

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

**“PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DA DÍADE
LUMINESCENTE DE RU(II): APLICAÇÕES NA INIBIÇÃO E
MONITORAMENTO DA AGREGAÇÃO DE PROTEÍNAS
AMILOIDES E TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIBACTERIANA”**

Lorena Maria Borges Pereira*

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

Orientadora: Prof. Dra. Rose Maria Carlos

*** bolsista FAPESP (2021/04675-9)**

São Carlos - SP
2025



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 da candidata Lorena Maria Borges Pereira, realizada em 28/04/2025.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Rose Maria Carlos (UFSCar)

Profa. Dra. Márcia Valéria Silva Lima (IFPI)

Profa. Dra. Anna Karenina Azevedo Martins (USP)

Profa. Dra. Sarah Raquel de Annunzio (FOAr)

Prof. Dr. Manoel Gustavo Petrucelli Homem (UFSCar)

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

Agradeço e dedico este trabalho ao homem da minha vida, meu pai, Marco
Aurélio (*in memoriam*). Eu te amo eternamente.

“Piauí, terra querida
Filha do Sol do Equador
Pertencem-te a nossa vida
Nosso sonho, nosso amor!
As águas do Parnaíba
Rio abaixo, rio arriba
Espalhem pelo sertão
E levem pelas quebradas
Pelas várzeas e chapadas
Teu canto de exaltação”
(Hino do Piauí)

“A pesquisa científica exige paciência e perseverança. Não desista diante dos obstáculos e você encontrará soluções.”
(Bárbara McClintock)

“É justo que muito custe o que muito vale”
(Santa Tereza D’Ávila)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por sua infinita bondade em minha vida, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos e por me permitir concluir mais esta etapa.

Agradeço à minha família e, de maneira especial, aos meus pais, Marco Aurélio (*in memoriam*) e Elinalda, por terem sido meus maiores incentivadores nesta caminhada acadêmica. Dedico esta tese, em especial, ao meu pai, que dedicou sua vida à minha educação. Obrigada por ser minha fonte de inspiração e meu alicerce para nunca desistir dos meus sonhos. Dedico-lhe esse trabalho com todo o meu amor e dedicação, na esperança de que esteja orgulhoso de sua filha. Eu te amo eternamente. Agradeço à minha mãe pelo seu amor, cuidado e por todas as suas orações.

Agradeço ao meu irmão, Policarpo, por toda a ajuda e incentivo.

À Profa. Dra. Rose Maria Carlos, agradeço por toda ajuda, paciência e orientação ao longo da minha trajetória na UFSCar.

Aos meus colegas do Laboratório de Fotoquímica Inorgânica e Bioinorgânica (LaFIB) Rafael Marchi, Maria Laura, Denize Maria, Victoria Romero, Bárbara Patrícia, Ana Carla, Anderson, Ana Carla, Pedro Henrique, Rafaella de Simone e Rafaela Paixão agradeço a ajuda, pelas discussões, pelas risadas e pelos momentos de confraternizações ao longo desses anos. Em especial, meu agradecimento ao Marco Antonio, à Mariana Cali e à Denize Maria pelo constante apoio, pela torcida e por toda a ajuda ao longo dessa jornada.

Agradeço a todos os amigos que São Carlos me proporcionou durante esses anos. Em especial, gostaria de agradecer à Dona Nice e ao Sr. Ademar por toda a ajuda e grande amizade, que considero como uma verdadeira família. Agradeço também à minha amiga Alicia Ludymilla pela sua amizade e ajuda em todos os momentos. Obrigada por fazerem os meus dias em São Carlos mais especiais.

Ao Prof. Dr. Leonardo de Boni e seu aluno Diego, agradeço a colaboração nos experimentos de Espectroscopia de Absorção Transiente.

Ao Prof. Dr. Otaciro Nascimento, agradeço pelos ensinamentos e colaboração nos experimentos de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética (EPR).

À Dra. Sarah Raquel De Annunzio e à Dra. Cláudia Carolina Jordão pela colaboração nos experimentos de terapia fotodinâmica.

À Profa. Dra. Anna Karenina Azevedo Martins e ao Me. Matheus Pedro Santos, pela recepção em seu laboratório e pela ajuda nos experimentos de citotoxicidade.

Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), vinculado ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), por permitir a realização das imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) (20221086/20242353). De maneira especial, agradeço ao Otávio e ao Carlos que auxiliaram na aquisição das imagens.

Gostaria de agradecer a todos os meus professores que fizeram parte da minha trajetória educacional. Sem dúvida, vocês foram essenciais para a construção da minha formação.

Às secretárias Cristina, Luciani, Arianne e Thainá, meu muito obrigada por toda a ajuda burocrática durante a minha pós-graduação.

Agradeço aos órgãos de fomento CNPq (140403/2021-3), CAPES (código de financiamento 001) e FAPESP (processo 2021/04675-9), cujo financiamento possibilitou a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço à UFSCar e ao Departamento de Química pela minha formação e ensinamentos. Muito obrigada !

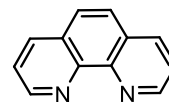
LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	absorbância
ABDA	ácido 9,10-antracenediilbis (metileno) dimalônico
AFM	Microscopia de força atômica (do inglês, <i>Atomic Force Microscopy</i>)
ANS	ácido 8-anilino-1-naftalenossulfônico
CD	Dicroísmo Circular (do inglês, <i>Circular Dichroism</i>)
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPR	Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (do inglês, <i>electron paramagnetic resonance</i>)
FRET	Transferência de Energia de Förster
ILCT	Transição de Transferência de Carga Intraligante
MLCT	Transição de Transferência de Carga do Metal para o Ligante
NIR	Região do infravermelho-próximo
ns	nanosegundos
Phen	1,10-fenantrolina
RupNDIp	Díade [Ru(phen) ₂ (pNDIp)] ²⁺
ThT	Tioflavina T

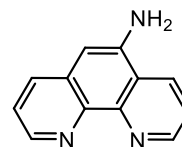
Φ_{EM}	Rendimento quântico de emissão
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
ε	Absortividade molar ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
λ_{EM}	Comprimento de onda de emissão
λ_{EX}	Comprimento de onda de excitação
τ_{EM}	Tempo de vida de emissão

LISTA DE FÓRMULAS E ESTRUTURAS DE COMPOSTOS

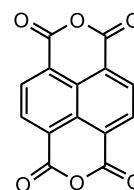
1,10-fenantrolina



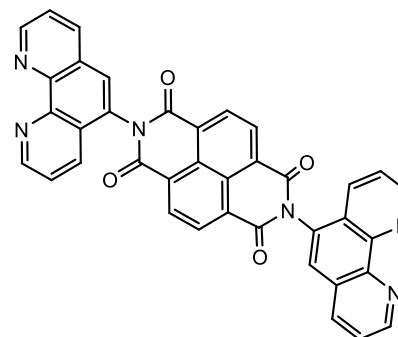
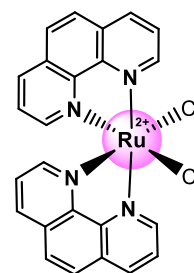
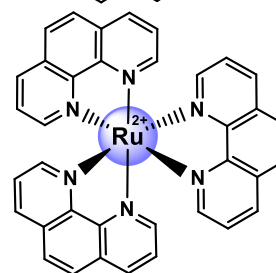
1,10-fenantrolina-5-amina



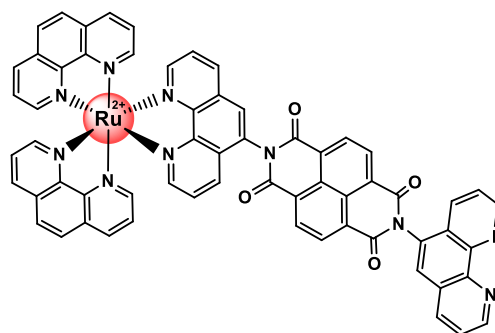
1,4,5,8- naftalenotetracarboxílico dianidrido



pNDIp

*cis* – [Ru(phen)₂(Cl)₂][Ru(phen)₃]²⁺

RupNDIp



LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H para o composto pNDIp em DMSO- d_6 . Deslocamentos químicos (em ppm), multiplicidade, constantes de acoplamento (Hz) e integral para hidrogênios.	41
Tabela 3.2. Atribuições dos espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e dados de correlação heteronuclear de COSY ^1H - ^1H , HSQC ^1H - ^{13}C e os principais sinais de HMBC ^1H - ^{13}C em DMSO- d_6 para a díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$. Deslocamentos químicos (em ppm), multiplicidade, constantes de acoplamento (Hz) e integrais para os hidrogênios.	45
Tabela 3.3. Propriedades fotofísicas da díade RupNDIp e do complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em solução de DMSO sob atmosfera de N_2	50
Tabela 3.4. Os potenciais de meia-onda ($E_{1/2}$) foram determinados a partir dos experimentos de VC em solução de DMSO com 0,1 M de hexafluorofosfato de tetrabutylamônio (TBAPF_6) como eletrólito de suporte. ^a	63
Tabela 5.1. Solubilidade da díade RupNDIp em solução de tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,4).	130

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Processamento do Prepro-hIAPP até a formação do hIAPP.	4
Figura 1.2. Representação da sequência polipeptídica da amilina humana destacado na cor cinza o núcleo amiloidogênico.	5
Figura 1.3. Representação da cinética de agregação da amilina humana. ³⁵	7
Figura 1.5. Estruturas dos complexos de Ru (II) utilizados em ensaios biológicos in vitro (A) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ e clínicos (B) (TLD-1433). ^{58,59}	11
Figura 1.6. Estrutura de complexos polipiridínicos de Ru (II) contendo ligantes (A) 8-hidroxiquinolina, (B) , piridina (C) imidazol , (D) benzimidazol e (E) 3,4-aminopiridina. ^{63,64}	12
Figura 1.7. Estruturas de complexos de rutênio (A) NAMI-A, (B) $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, (c) $[\text{Ru}(\text{phtpy})_3]^{2+}$ e (d) $[\text{Ru}(\text{phtpy})(\text{phen})\text{Cl}]^+$	14
Figura 1.8. Configuração eletrônica do oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) e os dois estados excitados do oxigênio $^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g^+$	16
Figura 1.9. Ilustração dos mecanismos tipo I e II para a geração do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e outras espécies reativas de oxigênio (EROs).	17
Figura 1.10. Estrutura da (A) porfirina e (B) ftalocianina.	20
Figura 2.1. Ilustração do processo intramolecular de transferência de elétrons fotoinduzidas.	27
Figura 3.1. Esquema da estrutura molecular da díade (A) RupPDIp e (B) RupNDIp.....	29

Figura 3.2. Rota sintética do composto N,N'-di(1,10-fenantrolina)-1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico diimida (pNDIp).....	38
Figura 3.3. Composto pNDIp (A) sólido e (B) em solução de DMSO.	39
Figura 3.4. Espectro de massas do composto pNDIp em solução de metanol. 39	
Figura 3.5. Espectro de ^1H RMN (DMSO-d_6 , 600 MHz) do composto pNDIp.40	
Figura 3.6. Rota sintética da díade Ru(phen)-naftalenodiimida (RupNDIp). ...	42
Figura 3.7. Díade Ru(phen)-naftalenodiimida (RupNDIp) (A) sólido e (B) em solução de DMSO.	42
Figura 3.8. Espectro de massas (MALDI-TOF) da díade RupNDIp em solução de acetonitrila e a distribuição isotópica do rutênio referente ao pico do íon molecular $m/z = 542,0910$	43
Figura 3.9. Região de desblindagem dos espectros de RMN de ^1H da díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$, (B) do composto pNDIp e (C) do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em DMSO-d_6	47
Figura 3.10. Mapa de contorno de $^1\text{H} - ^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ HSCQ RMN na região de desproteção da díade RupNDIp em DMSO-d_6 a 298K.	47
Figura 3.11. Mapa de contorno de $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY RMN na região de desproteção da díade RupNDIp em DMSO-d_6 a 298K.....	48
Figura 3.12. Mapa de contorno de RMN HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ na região de desblindagem da díade RupNDIp em DMSO-d_6 a 298K.	48

Figura 3.13. (A) Espectros de absorção da díade RupNDIp em diferentes concentrações ($10\text{-}100\ \mu\text{mol.L}^{-1}$) e (B) gráfico da intensidade de emissão em 610 nm em função da concentração ($10\text{-}100\ \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de DMSO..... 50

Figura 3.14. Espectro de absorção UV-Vis do composto pNDIp em solução de DMSO aerada (inserção do gráfico: ampliação do espectro na região de 265- 600 nm)..... 51

Figura 3.15. Espectros de absorção (A) complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e da (B) díade RupNDIp em solução de DMSO aerada ($c = 20\ \mu\text{M}$). 52

Figura 3.16. Espectros de emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450\ \text{nm}$) (A) complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e da (B) díade RupNDIp em solução de DMSO aerada ($c = 20\ \mu\text{M}$). 53

Figura 3.17. Comparação entre os espectros de emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450\ \text{nm}$) (linha sólida preta), excitação ($\lambda_{\text{EM}} = 610\ \text{nm}$) (colorido) e absorção (linha tracejada) do (A) complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e da (B) díade RupNDIp em solução de DMSO ($c = 20\ \mu\text{M}$). 53

Figura 3.18. Espectros de emissão da díade RupNDIp em solução de DMSO aerada ($c = 20\ \mu\text{M}$) em diferentes comprimentos de onda de excitação ($\lambda_{\text{EX}} = 350 - 470\ \text{nm}$). 54

Figura 3.19. Comparação da intensidade de emissão do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (linha azul) e da díade RupNDIp (linha vermelha) (A) sob atmosfera de oxigênio e (B) desaerado (N_2) utilizando soluções com absorção igual 0,1 no comprimento de onda de excitação ($\lambda_{\text{EX}} = 450\ \text{nm}$). 55

- Figura 3.20.** Espectros de absorção transiente em solução de DMSO do complexo (A) $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e da (B) díade RuPNDIp obtidos na escala de tempo de picossegundo com $\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$ 57
- Figura 3.21.** Espectros de absorção transiente em solução de acetonitrila do complexo (A) $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e da (B) díade RuPNDIp obtidos na escala de tempo de picossegundo com $\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$ 58
- Figura 3.22.** Diagrama qualitativo de níveis de energia da díade RuPNDIp em DMSO. azul: excitação a 350 nm; vermelho: excitação a 450 nm. 59
- Figura 3.23.** (A) Espectros de absorção da díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$ e (B) emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$) dependentes da temperatura (10-80°C) em solução de DMSO (concentração = 20 μM). 60
- Figura 3.24.** Espectros de (A) absorção e de (B) emissão ($\lambda_{\text{EM}} = 450 \text{ nm}$) da díade RuPNDIp em diferentes solventes. 61
- Figura 3.25.** Espectros de (A) absorção e de (B) emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$) do complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em diferentes solventes 62
- Figura 3.26.** Voltamogramas cíclicos do composto pNDIp em solução de DMSO com 0,1 M de TBAPF_6 (A) redução por 10 ciclos com taxa de varredura de 100 mV.s^{-1} e (B) em diferentes taxas de varredura (10-400 mV.s^{-1}). 64
- Figura 3.27.** Voltamogramas cíclicos da díade RuPNDIp em solução de DMSO com 0,1 M de TBAPF_6 (A) redução por 10 ciclos com taxa de varredura de 100 mV.s^{-1} e (B) em diferentes taxas de varredura (10-400 mV.s^{-1}). 64
- Figura 3.28.** Voltamograma cíclico da díade RuPNDIp em soluções de acetonitrila (TBAPF_6 , 0,1 M) e uma taxa de varredura de 100 mV.s^{-1} . $E_{1/2}$ para

$\text{Fc}^+/\text{Fc} = +0,635 \text{ V}$ medido sob as mesmas condições experimentais. (A) oxidação e (B) redução..... 65

Figura 3.29. Análise espectroeletroquímica do composto pNDIp em solução de DMSO (TBAPF_6 , 0,1 M) sob atmosfera de N_2 com potenciais aplicados: (A) $E = -0,22 \text{ V}$ (vs Ag^+/Ag como pseudorreferência); gráfico inserido com potencial aplicado de 0 V, (B) $E = -0,56 \text{ V}$ (vs Ag^+/Ag como pseudorreferência); gráfico inserido com potencial aplicado de 0 V e (C) comparação dos espectros do composto pNDIp (linha verde), $\text{pNDIp}^{\bullet-}$ (linha laranja) e pNDIp^{2-} (linha vermelha). 67

Figura 3.30. Análise espectroeletroquímica da díade RupNDIp em solução de DMSO (TBAPF_6 , 0,1 M) sob atmosfera de N_2 com potenciais aplicados: (A) $E = -0,37 \text{ V}$ (vs Ag^+/Ag como pseudorreferência); gráfico inserido com potencial aplicado de 0 V, (B) $E = -0,73 \text{ V}$ (vs Ag^+/Ag como pseudorreferência); gráfico inserido com potencial aplicado de 0 V e (C) comparação dos espectros do composto RupNDIp (linha azul), $\text{RupNDIp}^{\bullet-}$ (linha amarela) e RupNDIp^{2-} (linha vermelha). 69

Figura 3.31. (A) Espectro de absorção UV-Vis da solução sob atmosfera inerte no escuro (0 e 60 minutos) e (B) Evolução no espectro de absorção durante a fotólise com luz de 350 nm durante 60 minutos de irradiação. 71

Figura 3.32. (A) Espectro de absorção UV-Vis da solução sob atmosfera inerte no escuro (0 e 120 minutos) e (B) Evolução no espectro de absorção durante a fotólise com luz de 350 nm (120 minutos)..... 72

Figura 3.33. (A) Espectro de absorção UV-Vis da solução sob atmosfera inerte no escuro (0 e 60 minutos) e (B) emissão (sob atmosfera inerte no escuro (0 e 60 minutos). 72

Figura 3.34. Alterações nos espectros de (A) absorção durante a fotólise com luz de 350 nm e (B) de emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450$ nm) nm sob atmosfera inerte durante 60 minutos de irradiação com luz de 350 nm. (60 minutos). 73

Figura 3.35. Fotólise da díade RupNDIp com luz de irradiação de 450 nm em solução DMSO desaerada com N_2 monitorada por (A) Absorção e (B) Emissão ($\lambda_{\text{EX}}=450$ nm) (tempo de irradiação = 180 minutos). 74

Figura 3.36. Fotólise da díade RupNDIp com luz de irradiação de 450 nm em solução DMSO sob atmosfera de oxigênio por (A) Absorção e (B) Emissão ($\lambda_{\text{EX}}=450$ nm) (tempo de irradiação = 180 minutos). 74

Figura 3.37. Fotólise da díade RupNDIp com luz de irradiação de 350 nm em solução DMSO sob atmosfera de nitrogênio por (A) Absorção e (B) Emissão ($\lambda_{\text{EX}}=450$ nm) (tempo de irradiação = 180 minutos). 75

Figura 3.38. Fotólise da díade RupNDIp com luz de irradiação de 350 nm em solução de acetonitrila sob atmosfera de oxigênio por (A) Absorção e (B) Emissão ($\lambda_{\text{EX}}=450$ nm) (tempo de irradiação = 180 minutos). 76

Figura 3.39. Espectros de (A) absorção) e (B) emissão ($\lambda_{\text{EX}}= 450$ nm) da díade RupNDIp (concentração = 20 μM) em solução de acetonitrila em atmosfera de nitrogênio irradiada com luz de 450 nm durante 180 minutos. 77

Figura 3.40. Espectros de (A) absorção e (B) emissão ($\lambda_{\text{EX}}= 450$ nm) da díade RupNDIp (concentração = 20 μM) em solução de acetonitrila em atmosfera de oxigênio irradiada com luz de 450 nm durante 180 minutos. 77

- Figura 3.41.** Espectros de EPR do composto pNDIp no escuro (linha preta) e irradiado com luz de 350 nm durante 30 minutos (linha verde) em atmosfera de (A) N₂ e (B) O₂ em solução de DMSO. 79
- Figura 3.42.** Comparação dos espectros de EPR do composto pNDIp simulado (linha preta) e obtido experimentalmente (linha verde). 80
- Figura 3.43.** Ilustração da deslocalização do elétron desemparelhado nos anéis aromáticos do composto pNDIp. 80
- Figura 3.44.** Espectros de EPR da díade RupNDIp ($c = 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de DMSO no escuro (linha preta) e irradiado (linha vermelha) com comprimento de onda de 350 nm em atmosfera de (A) N₂ e (B) O₂ durante 30 minutos de irradiação. 80
- Figura 3.45.** Comparação dos espectros de EPR do composto pNDIp (linha verde) e da díade RupNDIp (linha vermelha) após irradiação com luz de 350 nm durante 30 minutos em solução de DMSO. 81
- Figura 3.46.** Espectros de EPR da díade RupNDIp ($c = 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) no escuro (linha preta) e irradiado (linha azul) com comprimento de onda de 450 nm em atmosfera de (A) N₂ e (B) O₂ durante 30 minutos de irradiação em solução de DMSO. 82
- Figura 3.47.** Espectros de EPR da díade RupNDIp ($c = 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) no escuro (linha preta) e irradiado (azul) com comprimento de onda de 350 nm em atmosfera (A) de N₂ e (B) de O₂ durante 30 minutos. 83

Figura 3.48. Espectros de EPR da díade RupNDIp ($c = 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) no escuro (linha preta) e irradiado (azul) com comprimento de onda de 450 nm em atmosfera (A) de N_2 e (B) de O_2 durante 30 minutos. 84

Figura 3.49. Decaimento da intensidade de luminescência do oxigênio singlete em DMSO a 1270 nm ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$); inserção: espectro de emissão de $^1\text{O}_2$ gerado pela díade (A) RupNDIp e pelo (B) complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em solução de DMSO. 85

Figura 3.50. Diagrama esquemático da geração de $^1\text{O}_2$ e reação química do ABDA com $^1\text{O}_2$ 86

Figura 3.51. Espectros de absorção do ABDA ($c = 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) irradiado com luz de 450 nm em solução de DMSO (A) solução contendo somente ABDA como controle, na presença (B) da díade RupNDIp ($c = 20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e (C) consumo da banda de absorção do ABDA através da relação A_0/A correspondendo a absorbância do ABDA em 380 nm em relação ao tempo de irradiação do ABDA sozinho (preto) e na presença da díade RupNDIp (vermelho). 87

Figura 4.1. Estrutura da sonda amiloide Thioflavina T (ThT). 99

Figura 4.2. (A) Espectros de emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 440 \text{ nm}$) da sonda amiloide tioflavina T (ThT) ($20 \mu\text{M}$) em solução tampão fosfato ($\text{pH} = 7,4$; 50 mM) em diferentes tempos de incubação (0-480 minutos) da amilina humana ($20 \mu\text{M}$). (B) Gráfico da intensidade de emissão da ThT (480 nm) contra o tempo (minutos) de incubação da amilina humana. 100

Figura 4.3. (A) Espectros de emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$) da díade RupNDIp em solução tampão fosfato ($\text{pH} = 7,4$; 50 mM) ($20 \mu\text{M}$) em diferentes tempos (0-480 minutos) de incubação da amilina humana ($20 \mu\text{M}$). (B) Gráfico da intensidade

de emissão do complexo (600 nm) contra o tempo (minutos) de incubação da amilina humana. 101

Figura 4.4. Imagens de microscopia (A) Bright field e de (B) luminescência das fibrilas de amilina (20 μ M) obtidas após 8 h de incubação á 37°C em solução de tampão fosfato (50 mM; pH= 7,4; 100 mM de NaCl). 103

Figura 4.5. Imagens de microscopia (A) Bright field e de (B) luminescência das fibrilas de amilina (20 μ M) com a díade RupNDIp (20 μ M) obtidas após 8 h de incubação á 37°C em solução de tampão fosfato (50 mM; pH= 7,4; 100 mM de NaCl). 103

Figura 4.6. Imagens de microscopia (A) Bright field e de (B) luminescência das fibrilas de amilina (20 μ M) com ThT (20 μ M) obtidas após 8 h de incubação á 37°C em solução de tampão fosfato (50 mM; pH= 7,4; 100 mM de NaCl). 104

Figura 4.7. Espectros de excitação (linha tracejada) da díade RupNDIp (λ_{EM} = 600 nm) e emissão das sondas fluorescentes de proteínas amiloides (A) tioflavina T (ThT) e (B) e ácido 8-anilino-1-naftalenossulfônico (ANS) em solução tampão fosfato (pH= 7,4; 50 mM). 105

Figura 4.8. Espectros de emissão das sondas amiloides na presença de amilina humana no tempo 0 h (linha preta) e após 8 horas de incubação (linha azul) (A) tioflavina T (ThT) e (B) e ácido 8-anilino-1-naftalenossulfônico (ANS) em solução de tampão fosfato de sódio (pH= 7,4; 50 mM) na presença (linha vermelha) da díade RupNDIp (c= 20 μ M). 106

Figura 4.9. Espectros de emissão (λ_{EX} = 450 nm) da díade RupNDIp em solução tampão fosfato de sódio (pH=7,4; 50 mM) incubada na presença da amilina

humana (20 μM) a 37°C durante 480 minutos com concentração de (A) 20 μM e (B) 40 μM 107

Figura 4.10. Espectros de DC da amilina humana ($c = 20 \mu\text{M}$) em 0 h (linha azul) e 8 h (linha laranja) em tampão fosfato de sódio ($\text{pH} = 7,4$; 50 mM). 109

Figura 4.11. Espectros de DC da amilina humana ($c = 20 \mu\text{M}$) incubada durante horas 8 horas na presença (linha amarela) e ausência (linha azul) da díade RupNDIp na proporção (A) 1:1 (amilina fibrilar: díade RupNDIp) e (B) 1:2 (amilina fibrilar: díade RupNDIp) em tampão fosfato de sódio ($\text{pH} = 7,4$; 50 mM). 110

Figura 4.12. Espectros de DC da amilina humana ($c = 20 \mu\text{M}$) incubada durante horas 8 horas na presença (linha amarela) e ausência (linha azul) do complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ na proporção (A) 1:1 (amilina fibrilar: $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$) e (B) 1:2 (amilina fibrilar: $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$) em tampão fosfato de sódio ($\text{pH} = 7,4$; 50 mM). 110

Figura 4.13. Imagens de microscopia força atômica da amilina humana (hIAPP) ($c = 20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) nos tempos 0 e 8 após incubação a 37°C na ausência e na presença da díade RupNDIp quando incubados nas proporções 1:1 e 1:2 (hIAPP:RupNDIp). 112

Figura 4.14. Resultados dos ensaios de toxicidade da díade RupNDIp em diferentes concentrações (0-200 μM). Os resultados estão expressos como média + EPM, após teste estatístico 1way ANOVA e pós-teste de Dunnet ($n=3$). $*p < 0,05$ vs. RupNDIp (0 μM). 114

Figura 4.15. Resultados dos ensaios de toxicidade da (A) amilina monomérica (A) e (B) da amilina fibrilar. Os resultados estão expressos como média + EPM,

após teste estatístico 1way ANOVA e pós-teste de Dunnet (n=3). *p < 0,05 vs. Amilina (0μM). 115

Figura 4.16. Toxicidade da amilina, combinada ao RupNDIp. Toxicidade da amilina fibrilar 20μM + RupNDIp (A), Toxicidade da amilina fibrilar 10μM + RupNDIp (B). Os resultados estão expressos como média + EPM, após teste estatístico 1way ANOVA e pós-teste de Sidak (n=4). *p < 0,05 vs. controle. . 116

Figura 5.1. Espectros de (A) absorção, (B) emissão ($\lambda_{EX} = 450$ nm) e excitação ($\lambda_{EM} = 600$ nm) e de (C) emissão em diferentes comprimentos de onda de excitação ($\lambda_{EX} = 350-470$ nm) da díade RupNDIp ($c = 20 \mu\text{mol. L}^{-1}$) em solução de tampão PBS (pH=7,4). 129

Figura 5.2. Espectros de (A) absorção e (B) emissão ($\lambda_{EX} = 450$ nm) e excitação ($\lambda_{EM} = 600$ nm) do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ($c = 20 \mu\text{mol. L}^{-1}$) em solução de tampão PBS (pH=7,4). 130

Figura 5.3. Espectro de emissão de $^1\text{O}_2$ gerado pela díade RupNDIp utilizando laser de excitação de 450 nm em solução PBS (pH= 7,4). 131

Figura 5.4. Irradiação do ABDA ($c = 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (A) sozinho em diferentes concentrações da díade RupNDIp (B) $c = 10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e (C) $c = 25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ durante 30 minutos com luz de 450 nm. 133

Figura 5.5. Relação A_0/A da absorbância do ABDA em 380 nm em relação ao tempo de irradiação do ABDA sozinho (preto) e na presença da díade RupNDIp (vermelho; $c = 10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (azul; $c = 25 \mu\text{mol.L}^{-1}$). 134

Figura 5.6. Espectros de absorção do ABDA ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) na presença de da díade RupNDIp ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em PBS irradiado de luz a 450 nm (azul) (A)

primeiro ciclo durante 30 minutos, (B) segundo ciclo durante 40 minutos e (C) terceiro ciclo durante 55 minutos. 136

Figura 5.7. Reação entre a armadilha de spin 2,2,6,6-tetrametil-4piperidinol (TMP-OH) e o $^1\text{O}_2$ para gerar o aduto 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidine N-oxil (TEMPO). 137

Figura 5.8. Espectros de EPR da solução (A) do TMP-OH ($c = 48 \text{ mmol.L}^{-1}$), (B) díade RupNDIp ($c = 100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) sozinho, (C) TMP-OH/Díade RupNDIp no escuro (linha preta) e irradiando (linha magenta) durante 30 minutos com luz de 350 nm. 138

Figura 5.9. Espectros de EPR da solução (A) do TMP-OH ($c = 48 \text{ mmol.L}^{-1}$), (B) díade RupNDIp ($c = 100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) sozinho, (C) TMP-OH/Díade RupNDIp no escuro (linha preta) e irradiando (linha azul) durante 30 minutos com luz de 450 nm. 139

Figura 5.10. Espectros de EPR da solução do DMPO/ Díade RupNDIp ($c = 30 \text{ mmol.L}^{-1}/100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) no escuro (linha preta) e irradiando (linha azul) durante 30 minutos com luz de 450 nm. 141

Figura 5.11. Atividade antibacteriana da RupNDIp sob diferentes concentrações avaliada após 24 horas no escuro. As colunas representam os valores médios de porcentagem entre os grupos avaliados e as barras representam o desvio-padrão ($n=9$). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle positivo. *** $p < 0,0001$; ns: não significativo. 142

Figura 5.12. Atividade antibacteriana da $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ sob diferentes concentrações avaliada após 24 horas no escuro. As colunas representam os valores médios de porcentagem entre os grupos avaliados e as barras representam

o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle positivo. **p < 0,001; ***p < 0,0001; ns: não significativo.

..... 143

Figura 5.13. Valores médios +/- desvio padrão (barras de erro) de $\log_{10}$ (UFC/mL) para diferentes grupos experimentais. C+: apenas suspensões de *E. coli*; $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}+\text{L}+$: $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ com luz; $\text{RupNDIp}+\text{L}+$: RupNDIp com luz; $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}+\text{L}-$: $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ sem luz; $\text{RupNDIp}+\text{L}-$: RupNDIp sem luz; $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}-\text{L}+$ ou $\text{RupNDIp}-\text{L}+$: apenas tratamento com luz. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo C+. ns: diferença estatística não significativa, *** p < 0,0001 (n = 9). O Kruskal-Wallis foi realizado com pós-teste de Dunn ($\alpha=0,05$). 144

Figura 5.14. Imagens CLSM. Lado Esquerdo (sem tratamento com luz de 450 nm) e lado direito (tratamento com luz de 450 nm). Controle: suspensões *E. coli* marcadas com Syto -9 (células coradas em verde) e PI (células coradas em vermelho). RupNDIp : suspensões de *E. coli* com a díade RupNDIp (c=25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$: suspensões de *E. coli* com o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ c=25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). 146

Figura 5.15. Representação das estruturas moleculares (A) 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfocolina (POPC) e (B) 1,2-dioleoil-snglicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DOPG). 147

Figura 5.16. Imagens de microscopia fluorescência de (A) contraste de fase das GUVs POPC:DOPG e de (B) fluorescência sob irradiação com luz de 450 nm durante 5 minutos. 148

Figura 5.17. Imagens de microscopia fluorescência de (A) contraste de fase de (B) fluorescência das GUVs POPC:DOPG na presença da díade RupNDIp ($c=25\text{ }\mu\text{M}$) no escuro. 149

Figura 5.18. Imagens de microscopia de fluorescência de (A) contraste de fase de (B) fluorescência das GUVs POPC:DOPG na presença da díade RupNDIp ($c=25\text{ }\mu\text{M}$) sob irradiação de luz contínua de 450 nm. 150

RESUMO

PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DA DÍADE LUMINESCENTE DE RU(II): APLICAÇÕES NA INIBIÇÃO E MONITORAMENTO DA AGREGAÇÃO DE PROTEÍNAS AMILOIDES E TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIBACTERIANA

Complexos metálicos de Ru(II) têm atraído considerável atenção para aplicações biológicas, devido às suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas. Esses compostos se destacam como sondas luminescentes e inibidores da agregação de proteínas amiloides, bem como potenciais candidatos a fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica antibacteriana. O objetivo deste trabalho foi investigar as propriedades da díade Ru(phen)-naftalenodiimida, $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$, no mecanismo de agregação da amilina humana (hIAPP) e como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica antibacteriana. Em solução de DMSO, a díade é caracterizada por uma banda de absorção intensa na região ultravioleta ($\lambda_{\text{MÁX}} = 265 \text{ nm}$; $\epsilon = 83000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), típica das transições internas de transferência de carga de ligantes aromáticos insaturados (ILCT), uma banda estruturada na região UV-vis (300-400 nm) atribuída ao centro aromático naftalenodiimida e uma banda de absorção larga na região do visível ($\lambda_{\text{MÁX}} = 450 \text{ nm}$; $\epsilon = 15300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), atribuída às transições de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT, $\text{Ru}, d\pi \rightarrow \text{phen}, \pi^*$), apresentando máximo de emissão em 610 nm ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$). Os estudos de absorção transiente demonstraram que a excitação da componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$ da díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$ resulta em uma rápida transferência de elétrons, gerando o estado excitado intermediário de separação de cargas (CSS) $\{\text{Ru}^{3+}(\text{phen})_2(\text{pNDIp}^{\bullet})\}$. A atribuição dessa espécie como o estado de separação de cargas foi confirmada por comparação com as características espectrais obtidas na espectroeletrólise UV-vis utilizando o primeiro potencial de redução negativo da componente $\{\text{pNDIp}\}$ da díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$ e por fotólise com luz de 350 nm. A díade demonstrou capacidade de monitorar, por luminescência, a cinética de agregação da amilina

humana, apresentando comportamento semelhante ao da sonda ThT. Os ensaios de inibição demonstraram ainda que a díade RupNDIp inibe o processo de agregação da amilina humana, apresentando um efeito dependente da concentração. Além disso, os ensaios de viabilidade realizados em linhagem celular MIN-6 evidenciaram que díade apresenta baixa citotoxicidade em concentrações $\leq 100 \mu\text{M}$, e quando utilizada em proporções adequadas em relação à concentração amilina humana ($10 \mu\text{M}$) mostra capacidade de reduzir os efeitos citotóxicos mediados pela forma fibrilar da hIAPP. Os ensaios de terapia fotodinâmica contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*) comprovaram a eficiência da díade ($25 \mu\text{M}$). Quando ativada com a luz azul (450 nm) verificou-se uma redução de $4,99 \log_{10}$ da viabilidade bacteriana. Esses resultados estão associados a outras características importantes do composto, incluindo sua capacidade de gerar $^1\text{O}_2$, enquanto mantém a estabilidade fotoquímica. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho evidenciam o potencial da díade RupNDIp como um composto versátil, apresentando propriedades estruturais e espectroscópicas favoráveis a aplicações biológicas.

Palavras-chave: Díade RupNDIp, amilina ou polipeptídeo amiloide das ilhotas pancreáticas (hIAPP), sonda luminescente, terapia fotodinâmica antibacteriana, fotossensibilizador.

ABSTRACT

THERAPEUTIC PROPERTIES OF THE LUMINESCENT RU(II) DYAD: APPLICATIONS IN THE INHIBITION AND MONITORING OF AMYLOID PROTEIN AGGREGATION AND ANTIBACTERIAL PHOTODYNAMIC THERAPY

Ru(II) metal complexes have attracted considerable attention for biological applications due to their photophysical and photochemical properties. These compounds stand out as luminescent probes and inhibitors of amyloid protein aggregation, as well as potential candidates for use as photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy. The aim of this study was to investigate the properties of the Ru(phen)-naphthalenediimide dyad, $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$, in the aggregation mechanism of human islet amyloid polypeptide (hIAPP) and as a photosensitizer in antibacterial photodynamic therapy. In DMSO solution, the dyad is characterized by an intense absorption band in the ultraviolet region ($\lambda_{\text{MAX}} = 265 \text{ nm}$; $\epsilon = 83000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), typical of intraligand charge transfer (ILCT) transitions of unsaturated aromatic ligands, a structured band in the UV-visible region (300–400 nm) attributed to the naphthalenediimide aromatic core, and a broad absorption band in the visible region ($\lambda_{\text{MAX}} = 450 \text{ nm}$; $\epsilon = 15300 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), assigned to metal-to-ligand charge transfer transitions (MLCT, $\text{Ru}, d\pi \rightarrow \text{phen}, \pi^*$), with an emission maximum at 610 nm ($\lambda_{\text{MAX}} = 450 \text{ nm}$). Transient absorption studies demonstrated that excitation of the $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$ component of the $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$ dyad results in rapid electron transfer, generating an intermediate charge-separated excited state (CSS) $\{\text{Ru}^{3+}(\text{phen})_2(\text{pNDIp}^{\bullet-})\}$. The assignment of this species as the charge-separated state was confirmed by comparison with spectral features obtained via UV-vis spectroelectrochemistry using the first reduction potential of the $\{\text{pNDIp}\}$ component of the dyad $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$, and by photolysis with 350 nm light. The dyad demonstrated the ability to monitor hIAPP aggregation kinetics via luminescence, exhibiting behavior similar to the ThT probe. Inhibition assays further revealed

that the RupNDIp dyad inhibits the aggregation process of hIAPP in a concentration-dependent manner. Moreover, viability assays conducted in MIN-6 cell lines indicated that the dyad exhibits low cytotoxicity at concentrations $\leq 100\ \mu\text{M}$ and, when applied in appropriate ratios relative to hIAPP concentration ($10\ \mu\text{M}$), can reduce cytotoxic effects mediated by the fibrillar form of hIAPP. Photodynamic therapy assays against the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* (*E. coli*) demonstrated the efficacy of the dyad ($25\ \mu\text{M}$). Upon activation with blue light ($450\ \text{nm}$), a $4.99\ \log_{10}$ reduction in bacterial viability was observed. These results are associated with additional key features of the compound, including its ability to generate singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) while maintaining photochemical stability. Therefore, the results obtained in this work highlight the potential of the RupNDIp dyad as a versatile compound, exhibiting structural and spectroscopic properties favorable for biological applications.

Keywords: RupNDIp dyad, amylin or human islet amyloid polypeptide (hIAPP), luminescent probe, antibacterial photodynamic therapy, photosensitizer.

SÚMARIO

Capítulo 1: Introdução	1
1. Agregação da amilina humana: uma abordagem terapêutica para o Diabetes Mellitus tipo 2	2
1.1. Diabetes Mellitus (DM)	2
1.2. Polipeptídeo amiloide das ilhotas pancreáticas humanas (hIAPP) ou amilina humana	4
1.3. Mecanismo de agregação do hIAPP	6
1.5. Complexos de rutênio (Ru) em relação a fibrilação de proteínas amiloides	11
2.2. Oxigênio Singleto: Mecanismos de Geração e Aplicações em Terapia Fotodinâmica	15
2.2.1. Oxigênio Singleto ($^1\text{O}_2$)	15
2.2. Terapia Fotodinâmica	18
2.2.3. Aplicações de Complexos de Rutênio (Ru) como Fotossensibilizadores na Terapia Fotodinâmica	21
Capítulo 2: Objetivos	23
2.1. Objetivo Geral	24
Capítulo 3: Síntese e Caracterização da Díade Ru(phen)-naftalenodiimida.	26
3.1. Introdução	27
3.2. Objetivo do Capítulo	30
3.3. Materiais e Métodos	30
3.3.1. Reagentes	30
3.3.2. Síntese do composto N,N'-di(1,10-fenantrolina)-1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico diimida	30
3.3.3. Síntese do complexo precursor <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ Cl ₂]	31
3.3.4. Síntese da díade [Ru(phen) ₂ (pNDIp)](PF ₆) ₂	31

3.3.5. Espectroscopia de massas	32
3.3.6. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	32
3.3.7. Espectroscopia de absorção na região do UV-vis.....	32
3.3.8. Espectroscopia de luminescência.....	33
3.3.9. Tempo de vida de emissão	33
3.3.10. Espectroscopia de absorção transiente	34
3.3.11. Medidas eletroquímicas	34
3.3.12. Espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR).....	35
3.3.13. Detecção de espécies reativas de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis.....	36
3.3.14. Medições de emissão de luz do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) na região do infravermelho próximo (NIR)	36
3.4. Resultados e Discussão	38
3.4.1. Síntese e Caracterização Estrutural	38
3.4.2. Estudo de Concentração	49
3.4.3. Propriedades Fotofísicas	50
3.4.3. Estabilidade Térmica	59
3.4.5. Propriedades Eletroquímicas	62
3.4.6. Comportamento Fotoquímico	70
3.4.7. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio ($^1\text{O}_2$)	84
3.5. Conclusões do Capítulo	88
Capítulo 4: Efeitos da díade Ru(phen)-naftalenodiimida na agregação do hIAPP.....	89
4.1. Introdução.....	90
4.2. Objetivos do Capítulo.....	91
4.3. Materiais e Métodos	92
4.3.1. Reagentes	92
4.3.2. Protocolo de Agregação da Amilina.....	92
4.3.3. Influência da díade RuNDIp em corantes amiloides	93

4.3.4. Cinética de agregação da amilina humana	93
4.3.5. Microscopia de Fluorescência	94
4.4.6. Dicroísmo Circular (DC)	94
4.3.7. Microscopia de Força Atômica (AFM)	95
4.3.8. Cultura celular e tratamentos	96
4.4. Resultados e Discussão	98
4.4.1. A díade Ru(II)-naftalenodiimida como sonda amiloide de agregação	98
4.4.2. Influência da díade Ru(II)-naftalenodiimida na agregação do hIAPP	104
4.5. Conclusões do Capítulo	117
Capítulo 5: Aplicação da Díade Ru(phen)-naftalenodiimida na Terapia Fotodinâmica Antibacteriana	118
5.1. Introdução.....	119
5.2. Objetivo do Capítulo	120
5.3. Materiais e Métodos	121
5.3.1. Fonte de Luz.....	121
5.3.2. Propriedades Fotofísicas em solução tampão fosfato salino (PBS)	121
5.3.3. Solubilidade	122
5.3.4. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio Singlete ($^1\text{O}_2$)	122
5.3.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	124
5.3.6. Terapia Fotodinâmica Antibacteriana.....	126
5.3.7. Microscopia de fluorescência de varredura a laser confocal (CLSM) ...	126
5.3.8. Preparação das vesículas unilamelares gigantes (GUVs)	127
5.4. Resultados e Discussão	128
5.4.1. Propriedades fotofísicas em solução de tampão fosfato salino (PBS)....	128
5.4.2 Solubilidade	130
5.4.3. Detecção de espécies reativas de Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$).....	131
5.4.4. Concentração Inibitória Mínima (MIC)	141
5.4.5. Terapia Fotodinâmica Antibacteriana.....	143
5.4.6. Microscopia Confocal de varredura a laser (CLSM).....	145

5.4.7. Modelos de Membranas Fosfolipídicas.....	147
5.5. Conclusões do Capítulo	150
Capítulo 6: Conclusão	152
6.1. Conclusões	153
Capítulo 7:Referências.....	156

Capítulo 1:

Introdução

1. Agregação da amilina humana: uma abordagem terapêutica para o Diabetes Mellitus tipo 2

1.1. Diabetes Mellitus (DM)

O Diabetes Mellitus (DM) consiste em distúrbio metabólico crônico associado a aumento no nível de açúcar no sangue.¹ Nessa doença, a insulina, hormônio secretado pelas células β pancreáticas e responsável por regular o nível de glicose no sangue não é produzida em quantidade suficiente ou as células do corpo não respondem adequadamente à insulina disponível ou ambas as condições ocorrem, desencadeando assim uma hiperglicemia.^{2,3}

Os dados divulgados pela Federação Internacional de Diabetes em 2025 mostram que 588,7 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de diabetes, com uma estimativa de aumento para 852,5 milhões em 2050.⁴ Essa doença, que afeta milhões de pessoas globalmente, está associada a uma série de complicações, como perda de peso, fome excessiva e visão turva, além de comprometimento do crescimento e suscetibilidade à infecção.⁵ Ao longo prazo, pode levar à retinopatia, perda de visão, nefropatia, insuficiência renal, doenças cardiovasculares, neuropatia periférica, úlceras nos pés, amputação de membros inferiores e morte, exigindo supervisão cautelosa para evitar complicações graves.^{6,7}

Os principais tipos de DM são a Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1), Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e Diabetes Mellitus gestacional (DMG).³ Os Indivíduos com DM1 apresentam insuficiência de insulina, causada pela destruição autoimune das células β no pâncreas, o que leva à deficiência total de insulina e consequente hiperglicemia. Nesse caso, o tratamento consiste na utilização de insulina exógena. Entretanto, essa terapia é incapaz de atingir o controle ideal da glicemia dos pacientes, tornando necessário o uso contínuo dessa medicação.^{8,9}

O DM2 corresponde a cerca de 95% dos casos diagnosticados e é uma das 10 principais causas de morte entre adultos em todo o mundo.¹⁰ Esse tipo de DM

é caracterizada pelo aumento do nível de glicose no sangue, resultante da produção insuficiente de insulina ou da resistência à ação da insulina pelas células do corpo.

Além da obesidade constituir um fator de risco que contribui para a DM2, estudos sugerem que outros fatores podem influenciar a progressão dessa doença. Por exemplo, a fibrilação do polipeptídeo amiloide das ilhotas pancreáticas humana (hIAPP) ou amilina humana é considerada um dos fatores importantes para o desenvolvimento da DM2, uma vez que o mecanismo de agregação da amilina é citotóxico, levando à redução das funções das células β e à subsequente diminuição da secreção de insulina, o que contribui para a progressão da DM2.¹¹⁻¹³ Desde então, reconhece-se a importância desses agregados tóxicos de amilina no desenvolvimento da DM2.

O último tipo de DM, o diabetes gestacional, é caracterizado pelo aumento dos níveis de glicose no sangue, causado pela resistência à insulina induzida pelos hormônios gestacionais. Os fatores de risco, como histórico familiar de diabetes, obesidade, síndrome dos ovários policísticos, idade materna avançada, estilo de vida sedentário pode aumentar a probabilidade de desenvolvimento do diabetes gestacional. Caso não seja tratado adequadamente, essa condição pode resultar em complicações graves para a gestante e o bebê, como morte súbita fetal, aumento do peso do feto e o risco de desenvolvimento de DM2 após o parto.^{14,15}

Embora as complicações do diabetes possam ser evitadas ou retardadas com medicação e acompanhamento médico regular, os custos com tratamentos permanecem elevados, especialmente no caso do DM2, devido à sua alta incidência. Além disso, estudos recentes evidenciam uma forte associação entre o DM2 e outros distúrbios, como a doença de Alzheimer (DA).^{16,17}

Como resultado, o DM é amplamente reconhecido como um dos principais problemas de saúde pública, exigindo medidas importantes para melhorar a qualidade de vida dos pacientes, visto que, atualmente, os tratamentos com

insulina e medicamentos hipoglicemiantes orais disponíveis para o DM2 não revertam a doença, atuando apenas no retardamento de sua progressão.^{18,19}

1.2. Polipeptídeo amiloide das ilhotas pancreáticas humanas (hIAPP) ou amilina humana

O polipeptídeo amiloide das ilhotas pancreáticas (IAPP), também conhecido como amilina, é um hormônio peptídico neuroendócrino presente em todos os mamíferos. No caso específico dos humanos, é denominado polipeptídeo amiloide das ilhotas pancreáticas humanas (hIAPP) ou amilina humana.^{20,21}

O hIAPP é transcrito pelas células β pancreáticas das ilhotas de Langerhans como um Prepro-hormônio composto por 89 resíduos de aminoácidos. Após a clivagem, o peptídeo sinal de 22 aminoácidos é removido do N-terminal, dando origem a um propeptídeo de 67 aminoácidos, conhecido como pró-hormônio (ProIAPP). Esse pró-hormônio é posteriormente processado no complexo de Golgi e nos grânulos secretores das células β , em que é clivado, resultando na produção do hormônio maduro, Figura 1.1.²²

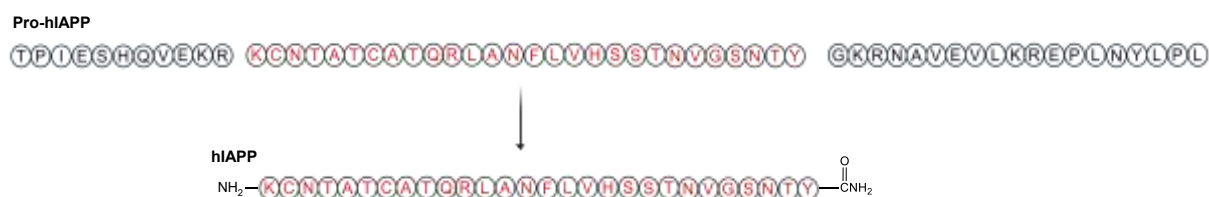


Figura 1.1. Processamento do Prepro-hIAPP até a formação do hIAPP.

A forma madura do hIAPP consiste em um polipeptídeo monomérico relativamente hidrofóbico, composto por 37 resíduos de aminoácidos, que apresenta uma ligação dissulfeto intramolecular entre os resíduos de cisteína Cys2 e Cys7 e uma extremidade C-terminal amidada, Figura 1.2.²¹ Esse hormônio é armazenado juntamente com a insulina nos grânulos secretores das células β

pancreáticas e é liberado em resposta aos estímulos que induzem a secreção de insulina, principalmente após as refeições, quando ocorre elevação dos níveis de glicose sanguínea.²²

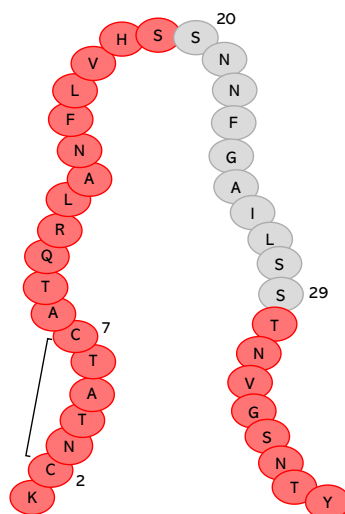


Figura 1.2. Representação da sequência polipeptídica da amilina humana destacado na cor cinza o núcleo amiloidogênico.

Em condições fisiológicas normais, o hIAPP é secretado junto com a insulina em uma proporção de 1:100 (hIAPP:insulina), contribuindo para a regulação dos níveis glicêmicos, um processo conhecido como homeostase da glicose. Além disso, outra função biológica importante desse hormônio é que, após sua liberação, o hIAPP entra na circulação sistêmica, atravessa a barreira hematoencefálica e ativa receptores específicos no cérebro, suprimindo a liberação de glucagon pelo pâncreas, induzindo a sensação de saciedade e regulando o esvaziamento gástrico.^{22,23}

Embora esse hormônio desempenhe um papel importante na regulação dos níveis de glicose no sangue, ele também é reconhecido como uma proteína amiloidogênica que devido ao desdobramento incorreto, pode se autoagregar, formando depósitos de agregados insolúveis, conhecidos como fibrilas amiloides. Esses agregados amiloides têm sido amplamente investigados por seu possível papel na perda de massa das células β pancreáticas em pacientes com DM2, contribuindo para a progressão dessa patologia.²⁰

Exames de *post-mortem* demonstraram que cerca de 90% dos pacientes com DM2 apresentaram agregados fibrilares extracelulares de hIAPP no pâncreas e em diferentes órgãos em pacientes com DM2, como os rins, o coração, o cérebro e na corrente sanguínea.²⁴⁻²⁸ Além disso, esses depósitos também foram identificados em uma minoria (~15%) de indivíduos idosos não diabéticos.²⁹

O hIAPP possui semelhanças com outras proteínas, como a α -sinucleína, que também apresenta um dobramento incorreto, resultando na formação de agregados no cérebro de indivíduos com doença de Parkinson. Além disso, a proteína tau e o peptídeo beta-amiloide ($A\beta$) exibem mecanismos similares, estando ligados à patogênese da doença de Alzheimer.^{30,31} Por essa razão, essas proteínas são classificadas como pertencentes ao grupo das proteínas amiloidogênicas.³²

1.3. Mecanismo de agregação do hIAPP

O mecanismo de agregação do hIAPP segue uma cinética sigmoidal, caracterizada por três etapas, sendo a fase de latência, na qual predominam monômeros e pequenos oligômeros solúveis, a fase de alongamento, marcada pela formação das protofibrilas, e a fase de saturação ou equilíbrio, caracterizada pela formação de fibrilas maduras, conforme ilustrado na Figura 1.3.³³ Essa cinética de agregação é semelhante à observada para outras proteínas amiloidogênicas, como o peptídeo $A\beta$ e a α -sinucleína, associados às patologias da doença de Alzheimer e de Parkinson, respectivamente.^{30,31}

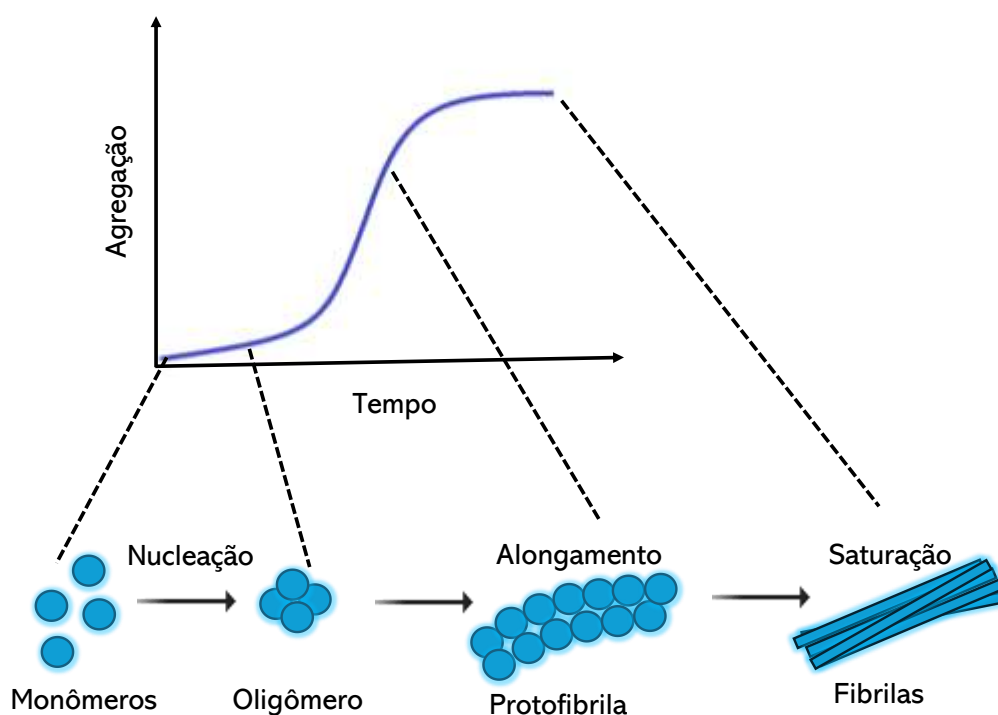


Figura 1.3. Representação da cinética de agregação da amilina humana.²²

Além da variação no tamanho das espécies formadas durante o processo de agregação do hIAPP, ocorre também uma mudança conformacional desse hormônio peptídico. Em sua forma monomérica, o hIAPP exibe uma estrutura desordenada em arranjo de bobina aleatória (do inglês, *random coil*), enquanto, durante a formação das fibrilas amiloides maduras, observa-se uma transição estrutural que resulta na característica conformação em folhas- β , típica das fibrilas amiloides.^{29,34,35}

Alguns fatores podem influenciar a propensão do hIAPP a formar estruturas com conformação em folha- β . Entre eles, destacam-se as alterações na hidrofobicidade dos resíduos 20–29, comumente denominados de sequência amiloidogênica, por serem considerados cruciais para a formação de amiloide. Estudos da literatura indicam que a sequência de resíduos de aminoácido da região 20–29 determina a capacidade do IAPP de formar amiloide, estando diretamente

relacionada à predisposição de certas espécies para desenvolver DM2 espontaneamente.^{29,36}

Mamíferos como humanos, primatas e felinos possuem a sequência de resíduos amiloidogênicos e, portanto, apresentam maior propensão à formação de agregados amiloides. Em contrapartida, espécies como roedores possuem três resíduos de prolina nessa região, substituindo os resíduos Ala25, Ser28 e Ser29. Essa diferença estrutural impede a formação de amiloide e, conseqüentemente, o desenvolvimento espontâneo de DM2 nessas espécies.^{29,36}

A formação e o acúmulo desses agregados amiloides têm demonstrado efeitos citotóxicos nas células β pancreáticas, responsáveis pela síntese de insulina, causando disfunção dessas células e apoptose e, conseqüentemente, contribuindo para a progressão do DM2.^{37,38} Dessa forma, a inibição da formação de fibrilas de hIAPP representa uma abordagem terapêutica promissora, capaz de prevenir os efeitos citotóxicos sobre as células β e retardar ou prevenir o desenvolvimento do DM2.

Apesar dos avanços no entendimento do DM2, o mecanismo de citotoxicidade induzido pelo hIAPP nas células β ainda não está totalmente esclarecido. Esse processo pode estar relacionado à capacidade do hIAPP de causar danos às membranas celulares, induzir estresse oxidativo por espécies reativas de oxigênio e desencadear respostas inflamatórias.³⁹ Embora todos esses mecanismos possam desempenhar um papel na morte das células β , a hipótese da ruptura da membrana tem sido a mais investigada.⁴⁰⁻⁴²

Diversos estudos têm demonstrado que, independentemente das espécies formadas durante a agregação do hIAPP, sejam oligômeros ou fibrilas maduras, essas espécies resultam em danos à membrana, levando à diminuição da viabilidade celular.⁴²⁻⁴⁴

Existem duas principais teorias que explicam a ruptura de membranas pelo hIAPP. A primeira é a teoria dos poros, que propõe que as espécies amiloides formam poros discretos na membrana. A segunda é o modelo não específico, no

qual as espécies oligoméricas comprometem a integridade estrutural da membrana, causando sua fragmentação ou afinamento.⁴¹

Os resultados obtidos utilizando modelos de membrana e o hIAPP também demonstraram que a formação de oligômeros durante o processo de agregação pode interagir diretamente com as membranas celulares, comprometendo sua integridade, permeabilidade e funções. Essas interações resultam na desregulação da homeostase iônica, alterações nas vias de sinalização, lesões oxidativas e, por fim, morte celular. Esses efeitos foram associados à citotoxicidade dessas espécies e podem contribuir para a disfunção das células β pancreáticas.^{42–47} Assim, a prevenção dos danos causados à membrana pela amiloidose é um foco importante, com destaque para o desenvolvimento de inibidores que bloqueiem a formação desses agregados tóxicos.

1.4. Complexos Metálicos Baseados em Rutênio (Ru)

Nos últimos anos, os complexos metálicos de rutênio (Ru) vêm ganhando crescente destaque em várias áreas científicas, particularmente em aplicações biomédicas e processos catalíticos.^{46,47} Esses compostos destacam-se por suas propriedades, que incluem reatividade controlada em condições fisiológicas, além de apresentarem custo relativamente mais baixo comparado a metais nobres como ródio (Rh), paládio (Pd), platina (Pt) e irídio (Ir).⁴⁸

Dentre os complexos de rutênio, aqueles no estado de oxidação Ru(II) contendo ligantes polipiridínicos têm se destacado devido à sua estabilidade, bem como às suas propriedades fotofísicas, fotoquímicas e eletroquímicas favoráveis. Além disso, complexos de Ru(II) possuem um arranjo d^6 de baixo spin (FIGURA 1.4), resultando na formação de estruturas altamente estáveis com geometria octaédrica.^{49,50}

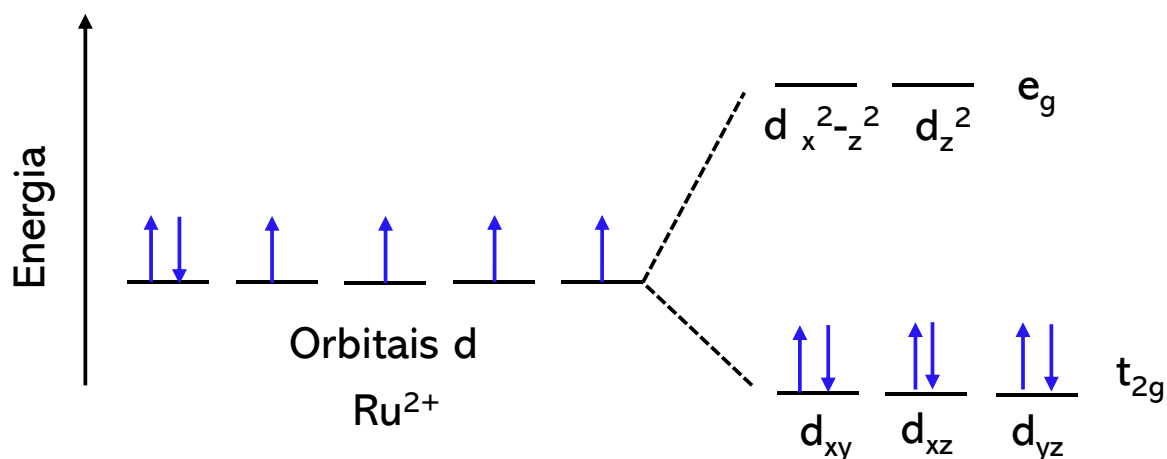


Figura 1.4. Configuração eletrônica de complexos de Ru(II).

Adicionalmente, os complexos polipiridínicos de Ru(II) exibem transições eletrônicas intensas, como transferências de carga do metal para o ligante (MLCT) na região do visível. Normalmente, esses compostos também apresentam intensa fosforescência proveniente do estado tripleto ($^3\text{MLCT}$), devido ao processo de cruzamento intersistemas (ISC), altamente favorecido pelo forte acoplamento spin-órbita. Essa fosforescência é caracterizada por um longo tempo de vida de emissão, resultado da inversão de spin necessária para a transição do T_1 para S_0 .⁵¹

Ademais, a reatividade controlada e a capacidade de participar de processos redox sem sofrer degradação rápida são características importantes. Outra vantagem dos complexos polipiridínicos de Ru(II) é que suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas podem ser ajustadas pela modificação dos ligantes, o que favorece a versatilidade de aplicação desses compostos. Isso os torna ideais para uma ampla variedade de áreas, como catálise e aplicações biológicas, incluindo diagnóstico e tratamento do câncer, agentes antimicrobianos e antifúngicos, biomarcadores luminescentes e moduladores da agregação de proteínas amiloidogênicas.⁵²⁻⁵⁵

Entre os complexos polipiridínicos de Ru(II), $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ (FIGURA 1.5.A) é uma das moléculas mais estudadas, com bpy = 2,2'-bipiridina dppz = dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina, destacando-se como uma sonda luminescente para

DNA. Esse complexo não exibe fotoluminescência em solução aquosa à temperatura ambiente, mas apresenta intensa fotoluminescência na presença de DNA de dupla hélice, característica que o torna uma sonda luminescente promissora.⁵⁶

Outra aplicação de compostos à base de Ru(II) é o desenvolvimento de agentes anticancerígenos. Por exemplo, o complexo Ru(II)-polipiridil (TLD-1433) (FIGURA 3.1.B), que entrou recentemente em ensaios clínicos como agente de terapia fotodinâmica (PDT) para pacientes com câncer de bexiga.⁵⁷

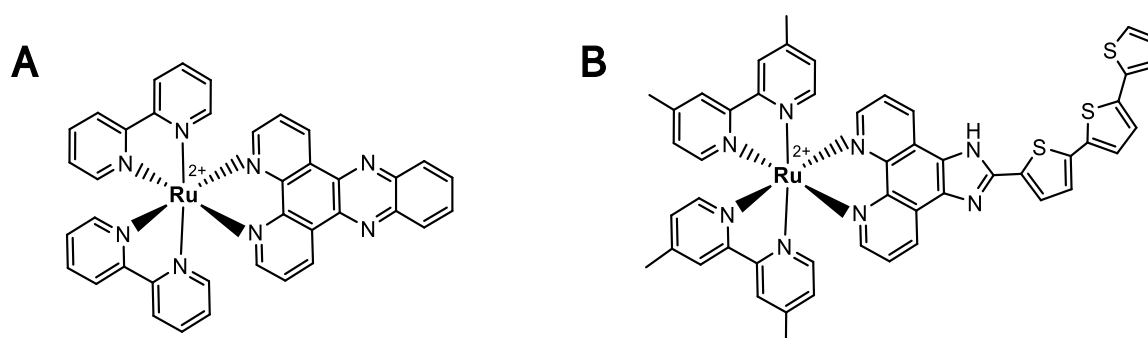


Figura 1.5. Estruturas dos complexos de Ru (II) utilizados em ensaios biológicos *in vitro* (A) $[Ru(bpy)_2dppz]^{2+}$ e clínicos (B) (TLD-1433).^{56,57}

1.5. Complexos de rutênio (Ru) em relação a fibrilação de proteínas amiloides

No contexto das doenças relacionadas à formação de fibrilas amiloides, os complexos de Ru vêm sendo empregados com duas finalidades principais. Primeiramente, atuam como agentes diagnósticos, funcionando como sondas luminescentes que permitem o monitoramento em tempo real do processo de agregação.⁵⁸ Em segundo lugar, servem como agentes terapêuticos, atuando tanto na inibição da formação de depósitos amiloidogênicos quanto na modificação do mecanismo de agregação molecular. Esta última ação promove a formação de espécies amorfas não tóxicas.^{59,60}

Por exemplo, complexos polipiridínicos de Ru(II) contendo ligantes como 8-hidroxiquinolina (FIGURA 1.6A), piridina (FIGURA 1.6B), imidazol (FIGURA 1.6C) e benzimidazol (FIGURA 1.6D) demonstraram a capacidade de inibir a agregação de A β por meio de interações hidrofóbicas. A presença de anéis aromáticos nesses complexos permite que eles interajam com resíduos de aminoácidos do A β , como tirosina e fenilalanina. Dessa forma, esses complexos conseguem romper as interações hidrofóbicas entre os aminoácidos e despolimerizar o peptídeo A β .⁶¹

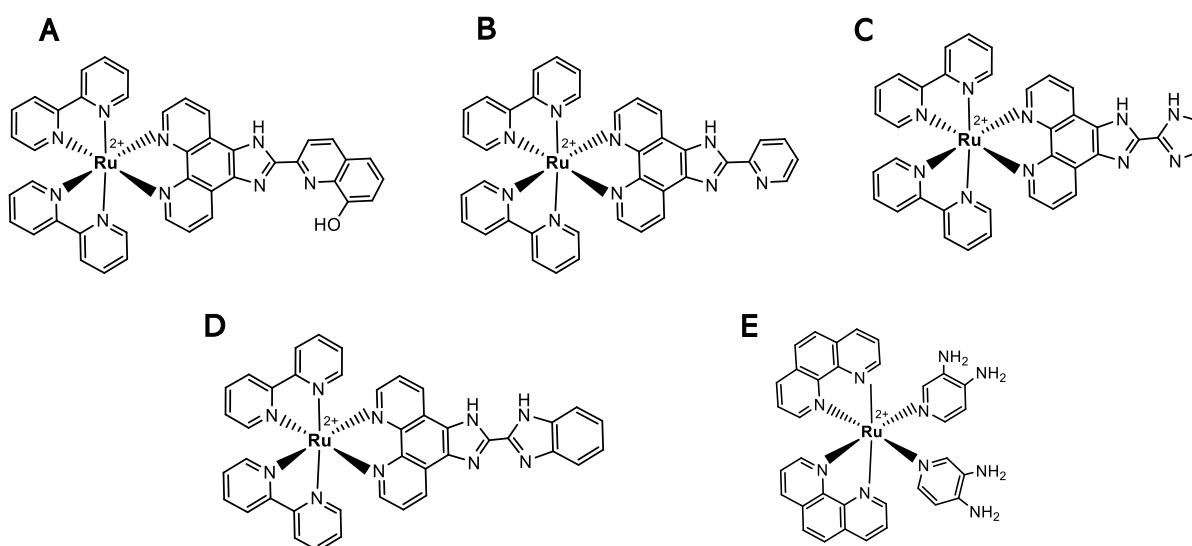


Figura 1.6. Estrutura de complexos polipiridínicos de Ru (II) contendo ligantes (A) 8-hidroxiquinolina, (B) , piridina (C) imidazol , (D) benzimidazol e (E) 3,4-aminopiridina.^{61,62}

O derivado de rutênio(II) dipiridofenazina, [Ru(phen)₂dppz]²⁺ (FIGURA 1.5A), foi capaz de monitorar em tempo real a presença de fibrilas amiloides formados durante a agregação de α -sinucleína associadas ao desenvolvimento da doença de Parkinson e quantificar agregados em células de neuroglioma.⁶³

Além disso, outro complexo polipiridínico de Ru(II), o [Ru(phen)₂(Apy)₂]²⁺ (RuApy) (FIGURA 1.6E) apresentou resultados interessantes quando investigado na agregação do peptídeo A β . Ensaios *in vitro*

demonstraram que o complexo RuApy possui propriedades eficazes contra as espécies tóxicas geradas nos estágios iniciais da agregação de A β ₁₋₄₀, alterando o processo de agregação deste peptídeo e protegendo as células PC12 das espécies oligoméricas tóxicas geradas durante a agregação. Ensaios de viabilidade celular indicaram ausência de citotoxicidade para células neuronais da linhagem PC12 em concentrações entre 5 e 60 μ M.⁶⁴

Esse mesmo composto também foi capaz de monitorar, por meio do aumento da intensidade de emissão, o mecanismo de agregação da insulina bovina e detectar por imagem luminescente a presença de fibrilas de insulina bovina, atuando assim como uma sonda luminescente.⁶²

Portanto, os complexos de rutênio têm se mostrado eficazes tanto como agentes inibidores da agregação de proteínas amiloides quanto como sensores luminescentes, capazes de detectar as fibrilas formadas. Isso se deve principalmente à sua estabilidade, emissão na região do visível e grandes deslocamentos de Stokes.

A emissão na região do visível é particularmente vantajosa, pois a maioria das proteínas e pequenas moléculas apresentam fluorescência na faixa ultravioleta. Dessa forma, sondas luminescentes que emitem no visível não sofrem interferência da fluorescência intrínseca de outros componentes biológicos em solução. Além disso, o deslocamento de Stokes grande evita a sobreposição entre a excitação e emissão, impedindo assim a reabsorção da luz emitida, evitando resultados falso-positivos.^{65,66}

1.6. Compostos de rutênio (Ru) como inibidores da agregação do hIAPP

No mecanismo de agregação do hIAPP, os compostos de rutênio são amplamente relatados como agentes inibidores desse processo, atuando como potenciais metalofármacos contra o DM2 ao evitar a transição conformacional do hIAPP e inibir a formação de fibrilas amiloides.^{67–70}

Os resultados de um estudo desenvolvido com uma série de complexos de Ru, incluindo NAMI-A (FIGURA 1.7A) $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (FIGURA 1.7B), $[\text{Ru}(\text{phtpy})_3]^{2+}$ (FIGURA 1.7C) e $[\text{Ru}(\text{phtpy})(\text{phen})\text{Cl}]^+$ (FIGURA 1.7D) mostraram que esses compostos sintetizados foram capazes de atuar impedindo a fibrilação amiloide de hIAPP. Além disso, esses compostos também foram capazes de proteger células INS-1 dos danos causados pelo hIAPP.⁷⁰

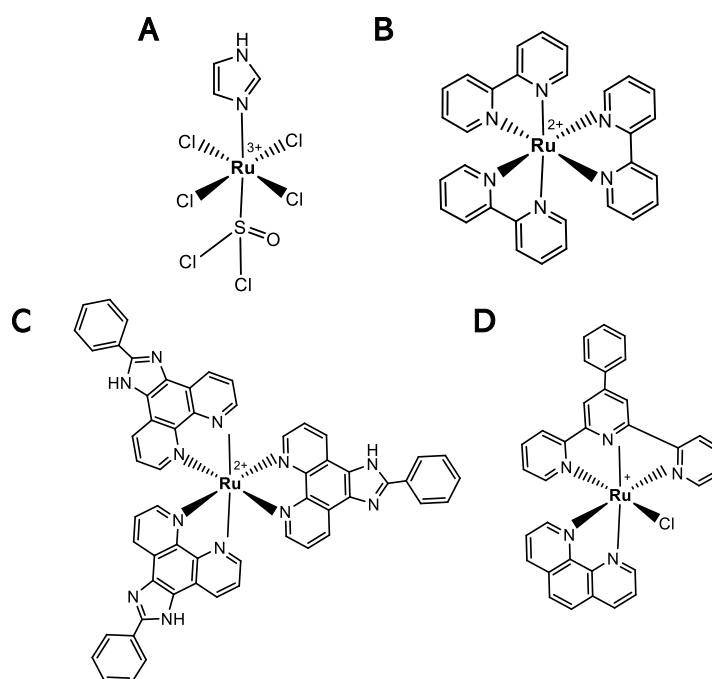


Figura 1.7. Estruturas de complexos de rutênio (A) NAMI-A, (B) $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, (c) $[\text{Ru}(\text{phtpy})_3]^{2+}$ e (d) $[\text{Ru}(\text{phtpy})(\text{phen})\text{Cl}]^+$.

Outros compostos polipiridínicos de rutênio, com ligantes de dimetilsulfóxido (DMSO), 2,2'-bipiridina (bpy), 1,10-fenantrolina (phen), dipirido[3,2-f:2',3'-h]quinoxalina (dpq) e dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz), foram avaliados como agentes desfibrilantes, ou seja, capazes de desagregar as fibrilas amiloides formadas. Os resultados mostraram que todos os quatro complexos de rutênio conseguiram desagregar as fibrilas de hIAPP em pequenas nanopartículas. Além disso, esses compostos reduziram a citotoxicidade nas células INS-1, uma linhagem celular de insulinoma induzida por hIAPP, conforme determinado pelo ensaio de brometo de 3-(4,5)-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-tetrazólio (MTT).⁶⁹

Apesar de essas séries de compostos apresentarem propriedades interessantes para atuarem como estratégia terapêutica potencial contra o DM2, eles não foram descritos apenas como inibidores e desagregadores desse processo. Esses estudos não mostram que esses compostos também consigam monitorar e identificar o processo de agregação, o que é importante para compreender esse mecanismo, sendo fundamental para entender as possíveis razões que levam à formação desse polipeptídeo amiloidogênico.

2.2. Oxigênio Singleto: Mecanismos de Geração e Aplicações em Terapia Fotodinâmica

2.2.1. Oxigênio Singleto ($^1\text{O}_2$)

O oxigênio tripleto ($^3\text{O}_2$; $^3\Sigma^-_g$) é o estado fundamental do oxigênio molecular (O_2). A configuração eletrônica dessa molécula apresenta dois elétrons desemparelhados em orbitais antiligantes (π^*) com spins paralelos. Devido a esses elétrons desemparelhados, o oxigênio molecular no estado fundamental exibe propriedades paramagnéticas.^{71,72}

Quando o $^3\text{O}_2$ é excitado eletronicamente, os dois elétrons com spins paralelos podem se rearranjar de duas maneiras diferentes nos orbitais antiligantes (π^*), originando os estados excitados singlete $^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g^+$. O estado $^1\Delta_g$, de menor energia, é caracterizado por dois elétrons com spins opostos ocupando um mesmo orbital π^* , enquanto o outro orbital π^* permanece vazio, esse estado excitado é comumente representado como $^1\text{O}_2$. Já o estado $^1\Sigma_g^+$, de maior energia, apresenta os dois elétrons com spins opostos distribuídos em orbitais π^* distintos, conforme representado na Figura 1.8.^{73,74}

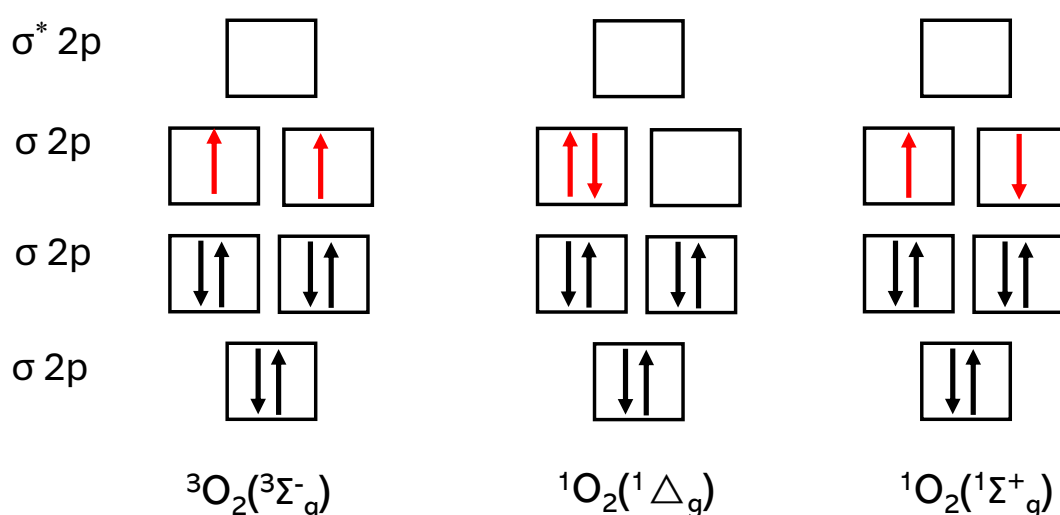


Figura 1.8. Configuração eletrônica do oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) e os dois estados excitados do oxigênio $^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g^+$.

Entre os mecanismos disponíveis para excitação do $^3\text{O}_2$ visando a produção de $^1\text{O}_2$, destaca-se o processo de transferência de energia tripleto-triplete, que ocorre via fotossensibilização. A geração fotossensibilizada é um método simples e controlável para a produção de $^1\text{O}_2$, exigindo apenas oxigênio molecular, luz de comprimento de onda específico e um fotossensibilizador (FS) capaz de absorver e usar essa energia para excitar o $^3\text{O}_2$ para seu estado excitado singlete ($^1\text{O}_2$).⁷⁵

Nesse mecanismo, a excitação do FS é geralmente obtida por meio de uma transição de um fóton ($h\nu$) entre o estado fundamental (S_0) e um estado excitado

singleto (S_1). O cruzamento intersistema (ICS) gera o estado tripleto do FS (T_1). O tempo de vida do estado T_1 é maior do que o do estado S_1 , permitindo que esse estado excitado reaja de uma das duas maneiras, definidas como mecanismos Tipo I e Tipo II.^{73,76}

No mecanismo Tipo I, ocorre a transferência de elétrons entre o sensibilizador excitado e o 3O_2 , gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Já no mecanismo Tipo II, o 1O_2 é gerado através da transferência de energia do FS excitado para o 3O_2 , conforme ilustrado na Figura 1.9.^{73,76}

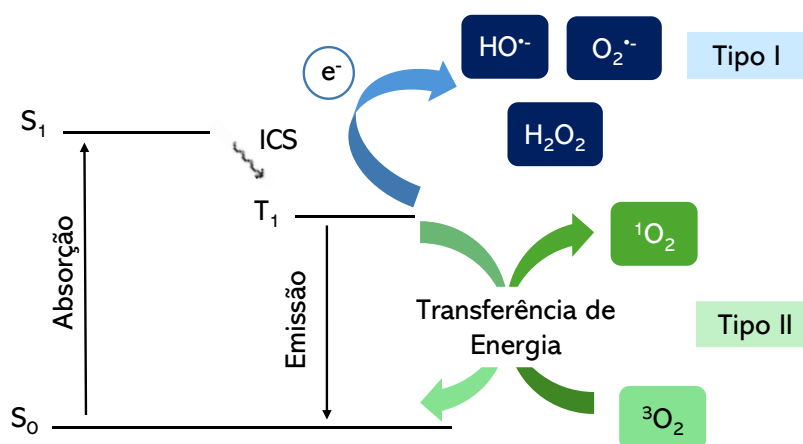


Figura 1.9. Ilustração dos mecanismos tipo I e II para a geração do oxigênio singleto (1O_2) e outras espécies reativas de oxigênio (EROs).

O oxigênio singleto (1O_2 ; $^1\Delta_g$), em seu estado eletronicamente excitado, apresenta elevada instabilidade e reatividade quando comparado ao oxigênio molecular no estado fundamental (3O_2). Essa instabilidade faz com que o 1O_2 , uma vez formado, sofra processos espontâneos de desativação através de diferentes vias. A desativação radiativa ocorre quando o 1O_2 decai para seu estado fundamental, emitindo radiação fosforescente característica em 1270 nm (transição $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$). Alternativamente, o 1O_2 pode reagir quimicamente com

compostos orgânicos, particularmente com sistemas conjugados contendo ligações duplas.⁷⁴

A elevada reatividade do $^1\text{O}_2$ é atribuída à presença do orbital π^* vazio em sua configuração eletrônica. Essa característica torna o $^1\text{O}_2$ um potente agente oxidante que reage com a maioria das biomoléculas contendo grupos insaturados, incluindo DNA, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos.^{71,77}

Quando o $^1\text{O}_2$ reage com essas biomoléculas, pode causar danos oxidativos irreversíveis, incluindo modificações estruturais em bases nitrogenadas, peroxidação lipídica e oxidação de grupos tiol em proteínas. Essas alterações moleculares frequentemente desencadeiam cascatas de sinalização que levam a distúrbios funcionais graves e, até mesmo, à morte celular por apoptose ou necrose, desempenhando um papel crucial em processos fisiopatológicos associados ao estresse oxidativo, como o envelhecimento celular e o desenvolvimento de doenças degenerativas.^{78–80}

Por outro lado, o $^1\text{O}_2$ desempenha funções cruciais em diversos processos biológicos, atuando como regulador da fisiologia celular e participando ativamente dos mecanismos de defesa imunológica. Nas células fagocitárias, o $^1\text{O}_2$ atua como potente oxidante, contribuindo para a destruição de vírus, bactérias e outros microrganismos.⁸¹ O efeito citotóxico do $^1\text{O}_2$ torna uma ferramenta versátil com aplicações em diversas áreas, incluindo desinfecção de feridas, tratamento de infecções bacterianas resistentes, terapia fotodinâmica para tratamento de câncer e purificação de águas contaminadas.^{82–84}

2.2. Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) consiste em uma modalidade terapêutica consolidada na prática clínica de tratamentos oncológicos que se utiliza a luz para excitar um fotossensibilizador (FS), que posteriormente gerar $^1\text{O}_2$ ou outras espécies reativas de oxigênio (EROs), levando à morte de células

cancerígenas.^{85,86} Além disso, a aplicação da TFD foi adaptada para o combate a microrganismos patogênicos, como bactéria, fungos e vírus, sendo reconhecida como terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA).^{83,87}

A TFD baseia-se na interação entre três componentes essenciais, um FS, luz em comprimento de onda adequado e oxigênio ($^3\text{O}_2$). O protocolo de tratamento envolve inicialmente a administração do PS por via tópica ou intravenosa, permitindo seu acúmulo seletivo no tecido-alvo durante um período pré-determinado. Posteriormente, a área é irradiada com luz de comprimento de onda específico, ativando o FS que, embora não reaja diretamente com biomoléculas, transfere de energia do estado excitado tripleto para o oxigênio molecular. Esse processo envolve a formação de $^1\text{O}_2$ e de outras EROs. Essas espécies citotóxicas desencadeiam vários eventos bioquímicos que resultam em danos oxidativos às estruturas celulares e, conseqüentemente, destruição seletiva do tecido alvo.^{88,89}

A TFD e a TFDA apresentam diversas vantagens em comparação com tratamentos convencionais. Entre estas, destaca-se a capacidade do FS de acumular-se preferencialmente em células-alvo, permitindo uma ação localizada mediante ativação luminosa que preserva os tecidos saudáveis.⁹⁰

Além disso, diferentemente dos antibióticos convencionais, o tratamento fotodinâmico apresenta a vantagem de serem menos susceptíveis à perda de atividade terapêutica, o que o torna uma opção particularmente promissora no combate a infecções resistentes.⁸⁵

Os fotossensibilizadores ideais para geração eficiente de $^1\text{O}_2$ devem apresentar um conjunto de propriedades, incluindo baixa toxicidade no escuro, elevada capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) através de mecanismos de transferência de energia ou elétrons capacidade de se acumular seletivamente no tecido tumoral e boa solubilidade.^{85,91}

Esses compostos necessitam ainda exibir alto rendimento quântico do estado tripleto e tempos de vida prolongados, uma vez que sua eficiência está

diretamente relacionada às propriedades fotofísicas do estado tripleto mais baixo (T_1), que deve possuir energia suficiente para excitar o 3O_2 . Adicionalmente, a alta fotoestabilidade é crucial para evitar a degradação do fotossensibilizador durante os processos de geração de 1O_2 , garantindo assim sua atividade prolongada.⁹¹

A maioria dos FS utilizados na TFD anticâncer aprovados clinicamente consiste em moléculas orgânicas derivados de porfirina e ftalocianina (FIGURA 1.10). Embora apresentem alto rendimento na formação de 1O_2 e boa penetração tecidual, a baixa solubilidade em solução aquosa, reduzida seletividade e limitada fotoestabilidade têm restringido a administração intravenosa e a aplicação terapêutica mais ampla.⁹²

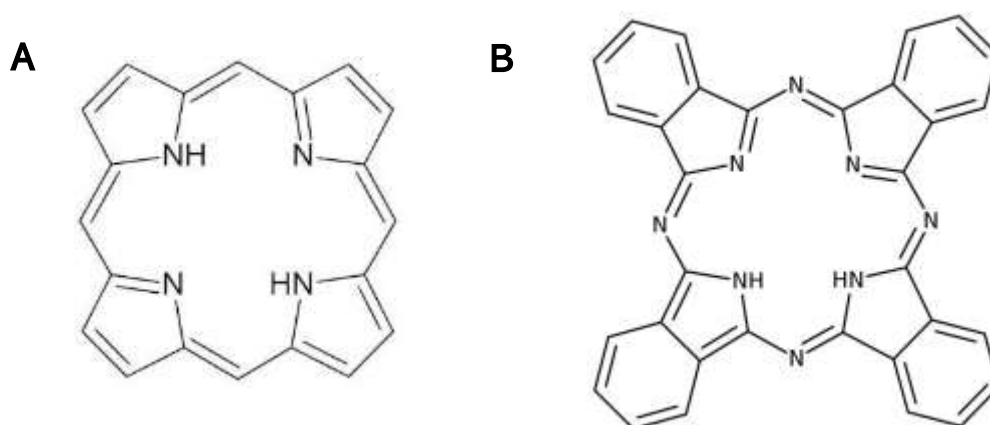


Figura 1.10. Estrutura da (A) porfirina e (B) ftalocianina.

O desenvolvimento de novos FS baseados em complexos metálicos, particularmente de Ru(II), Ir(III) e Pt(II), tem despertado interesse crescente como alternativa aos FSs tradicionais, visando superar as limitações dos FS orgânicos.^{93–95}

2.2.3. Aplicações de Complexos de Rutênio (Ru) como Fotossensibilizadores na Terapia Fotodinâmica

Os complexos metálicos de rutênio têm sido amplamente investigados para aplicações em terapia fotodinâmica no tratamento de diversos tipos de câncer e infecções microbianas.^{93,96,97} Esse interesse crescente deve-se a duas propriedades fundamentais desses complexos que normalmente absorvem luz eficientemente na região visível em um processo de absorção de um fóton e o efeito de átomo pesado, que possibilita um forte acoplamento spin-orbital (SOC), promovendo elevadas taxas de cruzamento intersistema (ISC). Esse mecanismo favorece a formação eficiente de estados tripleto metal-ligante (³MLCT) de longa duração, resultando em altos rendimentos nas espécies reativas de oxigênio (EROs).⁹⁶

Outra característica importante dos complexos à base de Ru(II) é que suas propriedades físicas e químicas podem ser facilmente alteradas pela modificação dos ligantes, permitindo ajustar suas propriedades fotofísicas conforme necessário. Por exemplo, a estrutura dos ligantes pode ser modificada para controlar características como solubilidade, lipofilicidade e comprimento de onda de absorção.⁹²

Em contraste com a maioria dos fotossensibilizadores orgânicos, os complexos de Ru destacam-se por sua excepcional fotoestabilidade, demonstrando resistência ao fotobranqueamento mesmo sob irradiação prolongada. Essa propriedade permite múltiplos ciclos de utilização do FS, reduzindo significativamente a dose total requerida para tratamentos de TFD.^{96,98,99}

Adicionalmente, muitos complexos de Ru exibem intensa luminescência, característica que permite o monitoramento preciso da biodistribuição do FS, incluindo sua localização subcelular através de microscopia confocal e 2 possibilita a realização de terapia fotodinâmica com acompanhamento em tempo

real (teranóstica). Essas propriedades sinérgicas posicionam os complexos de rutênio como candidatos ideais para aplicações avançadas em TFD.⁹³

Em 2017, o primeiro complexo polipiridínico de rutênio(II), denominado TLD-1433 (FIGURA 1.5.B), atingiu estágios clínicos avançados para terapia fotodinâmica (TFD) no tratamento do câncer de bexiga não músculo-invasivo. Este composto demonstrou alta afinidade por tecido tumoral e excepcional fotoestabilidade. Atualmente, encontra-se na Fase II de ensaios clínicos, que está avaliando a otimização de dose e a resposta terapêutica.¹⁰⁰

Capítulo 2:

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

A presente tese tem como objetivo investigar as propriedades da díade Ru(phen)-naftalenodiimida, $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$, no mecanismo de agregação da amilina humana (hIAPP) e como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica antibacteriana.

2.2. Objetivos Específicos

1. Sintetizar e caracterizar o composto pNDIp e a díade , $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$ (RupNDIp) pelas técnicas de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e 2D (COSY, HSQC e HMBC) e de Massas (UHPLC-QToF-MS/MS) (Capítulo 3);
2. Investigar as propriedades fotofísicas da díade RupNDIp utilizando as técnicas espectroscópicas de Absorção na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis), Luminescência (estado estacionário e resolvido no tempo) e Absorção Transiente (Capítulo 3);
3. Analisar o comportamento eletroquímico da díade RupNDIp utilizando as técnicas de voltametria cíclica e espectroeletroquímica (Capítulo 3);
4. Analisar o comportamento fotoquímico da díade RupNDIp utilizando as técnicas espectroscópicas de UV-Vis, Luminescência e Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) (Capítulo 3);
5. Investigar a capacidade da díade RupNDIp de gerar oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) em solução de DMSO, utilizando o método direto de detecção pela emissão

.....
de $^1\text{O}_2$ na região do infravermelho próximo (NIR) e o método indireto empregando a sonda ABDA (ácido 9,10-antracenediil-bis(metileno)dimalônico) (Capítulo 3);

6. Investigar *in vitro* a capacidade da díade RupNDIp de atuar como sonda luminescente para monitorar a cinética de agregação da amilina humana, utilizando técnicas de Luminescência e Microscopia de Luminescência (Capítulo 4);

7. Determinar *in vitro* a eficiência da díade RupNDIp de inibir a formação de fibrilas amiloides de amilina humana, utilizando as técnicas espectroscópicas de Luminescência, Dicroísmo Circular (DC) e Microscopia de Força Atômica (AFM) (Capítulo 4);

8. Avaliar o efeito citotóxico da díade RupNDIp, da amilina monomérica e da amilina na forma de fibrilas amiloides na linhagem celular MIN6 utilizando o ensaio de MTT (Capítulo 4);

9. Investigar o efeito citotóxico da díade RupNDIp na presença de amilina humana na linhagem celular MIN6 utilizando o ensaio de MTT (Capítulo 4);

10. Investigar o potencial da díade RupNDIp como fotossensibilizador na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) sob irradiação com luz azul ($\lambda = 450 \text{ nm}$) em tampão fosfato salino (PBS; pH 7,4) utilizando o método direto de detecção pela emissão de $^1\text{O}_2$ na NIR e o método indireto empregando a sonda ABDA (ácido 9,10-antracenediil-bis(metileno)dimalônico) e a técnica de EPR (Capítulo 5);

11. Avaliar o efeito da díade RupNDIp como fotossensibilizador contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*) sob irradiação com luz azul ($\lambda = 450 \text{ nm}$) (Capítulo 5).

Capítulo 3:

Síntese e Caracterização da Díade Ru(phen)-naftalenodiimida

3.1. Introdução

Recentemente, os processos envolvendo a transferência de elétrons fotoinduzida (TE) por moléculas do tipo Doadores-Aceitadores (D-A) têm sido amplamente estudados, essa investigação é impulsionada pelo objetivo de imitar a separação de carga fotoinduzida que ocorre na fotossíntese natural, o que tem orientado diversos grupos de pesquisa no desenvolvimento de análogos sintéticos^{101,102} para aplicações em reações catalíticas^{103,104} e em áreas biológicas, como a terapia fotodinâmica (PDT)¹⁰⁵ e biomarcadores luminescentes¹⁰⁶.

No processo de TE intramolecular, os componentes doadores (D) e aceptores (A) coexistem na mesma molécula, sendo o mecanismo de TE caracterizado por três etapas, conforme ilustrado na Figura 2. 1.

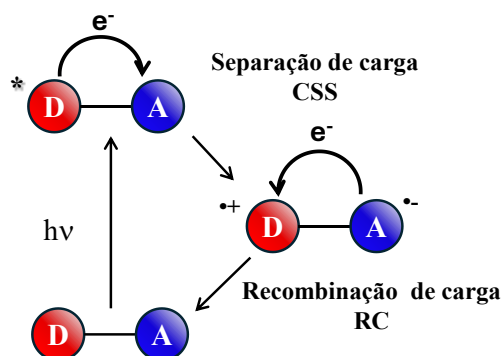


Figura 2.1. Ilustração do processo intramolecular de transferência de elétrons fotoinduzidas.

A primeira etapa envolve a absorção de luz e na subsequente excitação do componente D. Em seguida, na segunda etapa, ocorre a transferência de elétrons, na qual um elétron do estado excitado do doador (D^*) é transferido para o aceitador (A), formando o estado de carga separada (CSS), que consiste como um cátion radical do doador ($D^{\bullet+}$) e no ânion radical do aceitador ($A^{\bullet-}$), representado como ($D^{\bullet+}-A^{\bullet-}$). Por fim, na terceira etapa, ocorre a recombinação de carga (RC) que retorna o sistema ao seu estado fundamental original.¹⁰⁷

Diversos compostos moleculares do tipo D-A têm sido desenvolvidos e estudados.^{108,109} Dentre esses, destacam-se cromóforos orgânicos derivados de perilenodiimida (PDI)¹¹⁰ e naftalenodiimida (NDI)¹¹¹, além de sistemas híbridos que combinam componentes inorgânicos e orgânicos, conhecidos como díades.^{112,113}

Entre os componentes inorgânicos utilizados no desenvolvimento de díades, os complexos polipiridínicos de Ru(II) têm despertado grande interesse, principalmente devido às suas propriedades fotofísicas. Esses complexos apresentam uma intensa absorção na região do visível, decorrente da transição eletrônica de transferência de carga do metal para o ligante ($^1\text{MLCT}$, $\text{Ru}, d\pi \rightarrow \text{L}, \pi^*$). Além disso, apresentam um estado excitado de menor energia caracterizado por um longo tempo de vida de emissão ($^3\text{MLCT}$).¹¹⁴

Dessa maneira, caso o CSS se origine do estado $^3\text{MLCT}$, manterá uma configuração de spin tripleto, o que pode prolongar o tempo de vida. Ademais, os complexos polipiridínicos de Ru(II) são amplamente reconhecidos por sua estabilidade fotoquímica e química.¹¹⁵

Um exemplo de díade híbrida inorgânica-orgânica desenvolvida em nosso grupo de pesquisa é a díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})]^{2+}$ (RupPDIp). Essa estrutura é composta por um complexo de rutênio(II) tris-1,10-fenantrolina, $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, que atua como cromóforo e doador de elétrons, e por um perilenodiimida (PDI) funcionalizado com fenantrolina nas posições imida (pPDIp), que funciona como aceitador de elétrons (FIGURA 3.1A).¹¹⁶

A díade RupPDIp manteve as características de absorção e emissão de seus componentes individuais. Além disso, independentemente de qual cromóforo fosse eletronicamente excitado $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$ a 450 nm ou $\{\text{pPDIp}\}$ a 535 nm, o estado $^3\text{MLCT}$ do componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$ foi alcançado.¹¹⁶

A excitação de ambos os cromóforos resultou na formação de um estado excitado intermediário de separação de cargas, $\{(\text{Ru(III)})(\text{phen})_2(\text{pPDIp}^\cdot)\}$, com um tempo de vida (τ_{CS}) de 28 ps, devido à transferência de elétrons do doador

$\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$ para o aceptor pPDIp. Em seguida, a recombinação de cargas levou à população do estado $^3\text{pPDIp}$, com um tempo de vida de 1,8 μs . A partir desse estado $^3\text{pPDIp}$, a díade foi capaz de gerar oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) por meio do processo de transferência de energia tripleto-triplete.¹¹⁶ Esses resultados destacam essa díade como um potencial candidata para aplicação como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica.^{97,117}

Embora os resultados obtidos com a díade RupPDIp tenham sido promissores, a recombinação de carga para o estado $^3\text{pPDIp}$ ainda representa um desafio para a obtenção de um estado de separação de carga (^3CSS).

Diante disso, este capítulo apresenta o desenvolvimento de uma nova díade, na qual $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ é utilizado como doador de elétrons, enquanto um grupo naftalenodiimida (NDI) atua como aceptor de elétrons, resultando na formação da díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$ (RupNDIp), Figura 3.1B.

Nossa hipótese é que a redução da distância entre o doador e o aceptor na RupNDIp aproximará as energias dos estados $^3\text{MLCT}$ e ^3CSS , favorecendo a estabilização do ^3CSS . Além disso, a escolha do aceptor foi baseada em seu baixo potencial redox, que favorece a capacidade aceptora de elétrons, e em sua absorção característica no estado reduzido, uma propriedade típica de derivados de NDI, permitindo a identificação do ^3CSS .^{118,119}

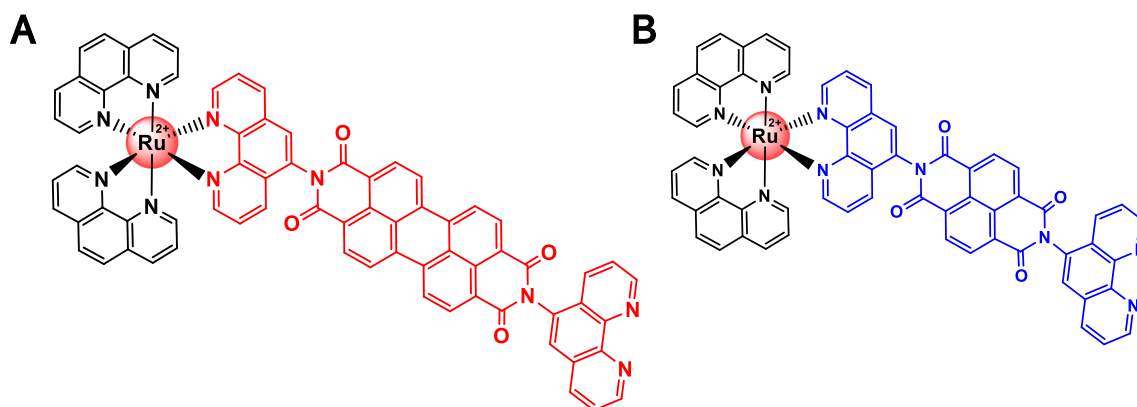


Figura 3.1. Esquema da estrutura molecular da díade (A) RupPDIp e (B) RupNDIp.

3.2. Objetivo do Capítulo

Sintetizar e caracterizar estruturalmente a díade Ru(phen)-naftaleno diimida, $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$, além de investigar as propriedades fotofísicas e eletroquímicas, bem como seu comportamento fotoquímico.

3.3. Materiais e Métodos

3.3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados na síntese dos compostos foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os solventes empregados tanto na síntese dos compostos quanto nos estudos espectroscópicos e eletroquímicos eram de grau de pureza HPLC.

3.3.2. Síntese do composto N,N'-di(1,10-fenantrolina)-1,4,5,8 naftalenotetracarboxílico diimida

O composto N,N'-di(1,10-fenantrolina)-1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico diimida (pNDIp) foi sintetizado por meio de um procedimento experimental adaptado da literatura.¹²⁰

Para a síntese, 0,4 mmol (0,100 g) de 1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico dianidrido (NTCDA), 1,0 mmol (0,225 g) de 1,10-fenantrolina-5-amina e 1,5 mmol (215 μL) de trietilamina (Et_3N) foram adicionados a 5 mL de dimetilformamida (DMF) previamente destilada e desaerada. A mistura reacional foi mantida sob refluxo em atmosfera de argônio, com agitação e aquecimento a 130 °C por 3 horas. Após esse período, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente. O produto obtido foi filtrado, purificado sucessivas vezes com DMF quente, lavado com etanol gelado e seco a vácuo, resultando em um sólido amarelo claro (0,957 g; rendimento de 41%).¹²¹

3.3.3. Síntese do complexo precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂]

O complexo precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂] foi obtido pelo procedimento experimental descrito na literatura, com algumas modificações.¹²² Para essa síntese, 1,0 mmol de RuCl₃·xH₂O, 3,0 mmol de 1,10-fenantrolina e 8,0 mmol de LiCl foram dissolvidos em 15 mL de DMF, sob refluxo em atmosfera de argônio, com aquecimento e agitação constante durante 8 horas. Em seguida, a solução de coloração roxa foi filtrada a quente, e o sólido obtido foi lavado com água destilada gelada até obter uma solução da água da lavagem incolor. O sólido de coloração roxa foi seco a vácuo à temperatura ambiente, resultando em um sólido escuro (0,110 g; rendimento de 61%).

3.3.4. Síntese da díade [Ru(phen)₂(pNDIp)](PF₆)₂

A díade [Ru(phen)₂(pNDIp)]²⁺ (RupNDIp) foi sintetizada a partir da reação entre o complexo precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂] (0,1 g, 0,18 mmol) e o composto pNDIp (0,17 g, 0,25 mmol), utilizando 14 mL de DMF previamente desaerado como solvente, conforme descrito na literatura.¹²¹

A reação foi mantida sob temperatura de refluxo e agitação constante em atmosfera de argônio durante 24 horas. Em seguida, a mistura reacional foi resfriada à temperatura ambiente, filtrada e rotoevaporada para reduzir o volume de solvente. Após esse procedimento, hexafluorofosfato de amônio (NH₄PF₆) (0,062 g, 0,374 mmol) foi adicionado. Posteriormente, 10 mL de éter etílico gelado foram adicionados à solução até a precipitação do sólido.

O sólido obtido foi filtrado e sucessivamente purificado. Durante a purificação, o composto foi solubilizado em acetona, e a solução resultante foi centrifugada para remover o excesso de ligante livre. Em seguida, a solução foi rotoevaporada e o composto obtido foi seco a vácuo, resultando em um sólido vermelho-escuro (0,170 g; rendimento de 66%).

3.3.5. Espectroscopia de massas

Os espectros de massas foram adquiridos no modo de ionização positiva, utilizando um espectrômetro de massas Agilent 6545 qTOF MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) equipado com uma interface de ionização por electrospray (ESI).

A amostra do composto pNDIp foi dissolvida em 100 µL de DMSO (grau HPLC) e 900 µL de MeOH (grau LC-MS), sendo posteriormente diluídas em MeOH (grau LC-MS) até atingir uma concentração final de 5 ppm. A díade RupNDIp foi solubilizada em 100 µL de DMSO (grau HPLC) e 900 µL de ACN (grau LC-MS), posteriormente diluída para a concentração de 1 ppm utilizando ACN (grau LC-MS). O erro de massa (em ppm) foi calculado com base na massa teórica e no espectro de MS correspondente, adquirido ao monitorar a faixa de 100–1000 Da, seguida por uma faixa de 400–800 Da, com uma taxa de varredura de 3 espectros por segundo. A aquisição e o processamento dos dados foram realizados por meio do software Mass Hunter Workstation, versão B.08.00.

3.3.6. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN unidimensional (^1H) e bidimensional (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC) foram realizadas em solução de DMSO- d_6 utilizando um espectrômetro Bruker Avance de 600 MHz pertencente ao laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do DQ-UFSCar.

3.3.7. Espectroscopia de absorção na região do UV-vis

Os espectros de absorção eletrônica na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Agilent 8453A. As cubetas de quartzo (Hellma) utilizadas possuíam um caminho óptico de 10,0 mm e capacidade de 3,5 mL.

3.3.8. Espectroscopia de luminescência

Os espectros de emissão e excitação foram adquiridos utilizando um espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301 PC, equipado com uma lâmpada de xenônio de alta pressão de 150 W e uma fotomultiplicadora do tipo R928. Durante os experimentos, foram utilizadas cubetas de quartzo (Hellma) com caminho óptico de 10,0 mm e capacidade de 3,5 mL.

As medidas de rendimento quântico de emissão da díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$ foram determinadas em relação ao padrão conhecido na literatura, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, cujos valores são $\Phi_{\text{EM}} = 0,028 \pm 0,002$ em solução aquosa na presença de oxigênio e $\Phi_{\text{EM}} = 0,042 \pm 0,002$ em solução aquosa sob atmosfera de N_2 .¹²³ A determinação foi realizada a partir da seguinte equação:

$$\Phi_{\text{am}} = \Phi_{\text{std}} \times \left(\frac{I_{\text{am}}}{A_{\text{am}}} \right) \times \left(\frac{A_{\text{std}}}{I_{\text{std}}} \right) \times \left(\frac{n_{\text{am}}^2}{n_{\text{std}}^2} \right)$$

Em que A_{am} e A_{std} são as absorbâncias da amostra e do padrão no comprimento de onda ($\lambda = 436 \text{ nm}$), respectivamente. Os I_{am} e I_{std} correspondem às intensidades integradas de emissão da amostra e do padrão, respectivamente, e n_{am} e n_{std} são os índices de refração dos solventes da amostra e do padrão utilizados. A absorção de cada solução no comprimento de onda de excitação ($\lambda_{\text{EXC}} = 436 \text{ nm}$) foram mantidas em torno de 0,10 sob atmosfera inerte e na presença de oxigênio molecular.

3.3.9. Tempo de vida de emissão

As medidas de tempo de vida de emissão foram realizadas utilizando um laser pulsado de diodo PDL 800-D (PicoQuant). Os dados foram adquiridos por meio do software da PicoQuant, sendo ajustados a um modelo monoexponencial. A qualidade do ajuste foi avaliada pelo parâmetro χ^2 .

3.3.10. Espectroscopia de absorção transiente

Os experimentos de espectroscopia de absorção transiente foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Leonardo de Boni, no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC/USP).

As medidas foram realizadas em um sistema experimental do tipo *Pump and Probe*, utilizando um laser de pulsos femtossegundos Yb:KGW (*Light Conversion*, modelo PHAROS) com emissão fundamental em 1030 nm. Os pulsos de Pump foram gerados por meio de um oscilador paramétrico óptico, que permite a sintonia do comprimento de onda entre 220 nm e 3 μm . O *Pump* passa por uma linha de atraso temporal, capaz de induzir um atraso de até 600 ps. Um chopper é sincronizado com o laser e alterna entre bloquear o pulso de *Pump* (*Pump-OFF*) ou permitir sua passagem (*Pump-ON*). Quando o *Pump* atravessa o chopper, ele atinge a amostra e cria uma população no estado excitado.

Os pulsos de *Probe* são gerados por meio da conversão de um contínuo de luz branca em um cristal de safira. Esse pulso de *Probe* incide sobre a amostra no mesmo ponto do *Pump*, e a luz transmitida é medida em um espectrômetro. Através da comparação do espectro transmitido do *Probe* durante as medições *Pump-ON* e *Pump-OFF*, é possível observar a dinâmica dos estados excitados transientes da amostra em função do tempo entre o *Pump* e o *Probe*. Todas as amostras foram medidas com a mesma absorbância (0,7) no comprimento de onda do *Pump*, utilizando o comprimento de onda de 450 nm, determinado com base no espectro de absorção da díade RupNDIp.

3.3.11. Medidas eletroquímicas

As medidas de voltametria cíclica (VC) foram realizadas em soluções de DMSO sob atmosfera de nitrogênio. As soluções do composto pNDIp e da díade foram preparadas com uma concentração de 1 mM, utilizando 0,1 M de hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (TBAPF₆) como eletrólito suporte. Os

experimentos foram realizados em uma célula eletroquímica composta por um eletrodo de trabalho de carbono vítreo (3 mm), como contraeletrodo um fio de platina e um fio de platina como eletrodo de pseudo-referência.

As soluções utilizadas nos experimentos de espectroeletroquímica foram preparadas conforme descrito anteriormente para as medidas de voltametria cíclica. As medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 2 mm, contendo dois minigrids de platina (32 fios/cm) como eletrodo de trabalho e contraeletrodo, e um fio de prata como eletrodo de pseudo-referência. Os potenciais aplicados foram previamente determinados por voltametria cíclica, e os espectros de absorção UV-Vis-NIR foram registrados em um espectrofotômetro Agilent Technologies 8543.

3.3.12. Espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR)

Os experimentos de espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR) foram realizados no laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica do Grupo de Biofísica Molecular “Sergio Mascarenhas”, no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC/USP) *campus 2*.

Os espectros do composto pNDIp e da díade RupNDIp, no escuro e após a fotólise, foram obtidos usando um padrão de MgO dopado com Cr(III). Cada solução foi irradiada com luz de 350 nm e 450 nm, tanto em condições aeradas quanto deaeradas. As medidas foram realizadas em um espectrômetro Varian E109 de banda X operando a 9,5 GHz, sob condições experimentais: potência de micro-ondas, 1 mW; amplitude de modulação, 0,1 G; constante de tempo, 0,064 s; tempo de varredura, 60 s; 1 varredura.

3.3.13. Detecção de espécies reativas de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis

Os estudos de detecção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) foram realizados monitorando a fotooxidação do ácido 9,10-antracenodiil-bis(metileno)dimalônico (ABDA) como sonda de $^1\text{O}_2$ utilizando a técnica de espectroscopia de absorção UV-Vis em solução de DMSO.

Para as medições, foram preparadas soluções de ABDA ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) contendo a díade RupNDIp ou o complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, mantendo a absorbância dos compostos analisados em 0,3 no comprimento de onda de irradiação. Em seguida, as soluções foram irradiadas com uma fonte de luz de 450 nm durante intervalos de tempo definidos. Como controle, foram realizadas irradiações da solução de ABDA isoladamente, bem como de cada composto analisado.

O gráfico do consumo de ABDA em 380 nm (A_0/A), em que A_0 e A correspondem à absorbância inicial e final, respectivamente, foi plotado em função do tempo de irradiação, subtraindo-se a absorção do composto analisado, a fim de avaliar exclusivamente a diminuição da absorção da sonda de $^1\text{O}_2$.

3.3.14. Medições de emissão de luz do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) na região do infravermelho próximo (NIR)

As medidas de emissão de luz do oxigênio singlete foram realizadas no laboratório do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Os espectros de emissão de $^1\text{O}_2$ na região do infravermelho próximo (NIR) foram adquiridos utilizando um contador de fótons FLSP 920 (Edinburgh Instruments, Edinburgh, Reino Unido), equipado com um detector NIR-PMT H10330A-45 (Hamamatsu, Japão) acoplado a um módulo de resfriamento mantido a -80°C . A emissão de $^1\text{O}_2$ foi processada em um monocromador

(TMS/DTMS300, Edinburgh Analytical Instruments, Reino Unido), equipado com uma grade de difração capaz de selecionar comprimentos de onda na região do infravermelho. A saída do tubo fotomultiplicador foi conectada a um computador para aquisição do sinal. O monocromador foi controlado, e os dados foram coletados por meio do software F-900, versão 6.22 (Edinburgh Analytical Instruments, Livingston, Reino Unido).

O tempo de vida da emissão do $^1\text{O}_2$ a 1270 nm foi medido utilizando um sistema de contagem de fótons, com um filtro de banda posicionado entre a cubeta e o fotomultiplicador. Antes das medições, todas as soluções da díade RuPNDIp e do complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ foram ajustadas para uma absorção de 0,3 em 450 nm.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Síntese e Caracterização Estrutural

3.4.1.1. Composto **N,N'-di(1,10-fenantrolina)-1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico diimida**

A síntese do composto **N,N'-di(1,10-fenantrolina)-1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico diimida** (pNDIp) foi realizada através da adição da 1,10-fenantrolina-5-amino à posição imida do anel do 1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico dianidrido (NDA), utilizando trietilamina (Et_3N) como catalisador da reação, resultando na formação de um composto derivado de naftalenodiimida (NDI).¹²⁴ A rota sintética seguiu um procedimento experimental adaptado da literatura, empregando dimetilformamida (DMF) como solvente, sob refluxo a 130°C e atmosfera de nitrogênio durante 3 horas, conforme o mecanismo reacional representado na Figura 3.2. O sólido final, obtido após purificação com DMF quente e lavagem com etanol gelado, apresentou coloração amarelo-claro, Figura 3.3A. No entanto, em solução de dimetilsulfóxido (DMSO), mostrou-se incolor (FIGURA 3.3B).

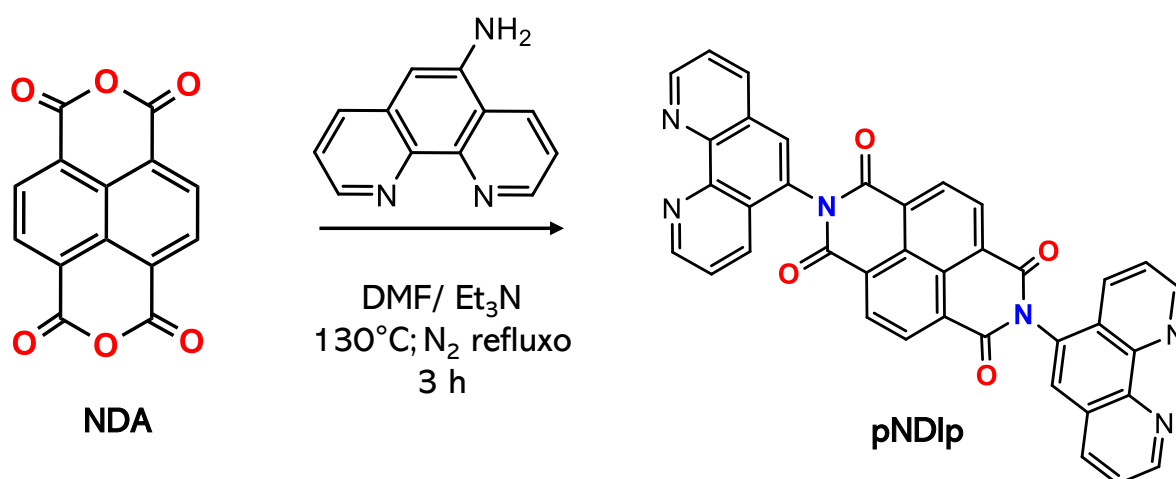


Figura 3.2. Rota sintética do composto **N,N'-di(1,10-fenantrolina)-1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico diimida** (pNDIp).

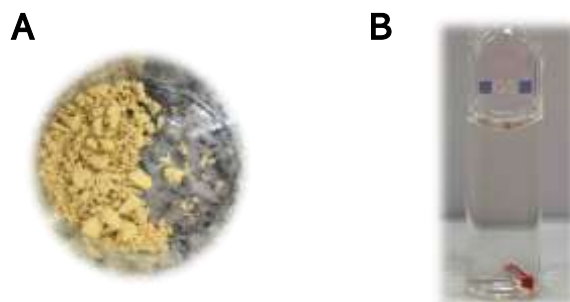


Figura 3.3. Composto pNDIp (A) sólido e (B) em solução de DMSO.

A estrutura molecular do pNDIp foi confirmada pelas técnicas de espectrometria de massas e de ressonância magnética nuclear (RMN). Conforme mostrado na Figura 3.4, o espectro de massas obtido apresenta dois sinais um em $m/z = 623,1481$, correspondente a $[(C_{38}H_{18}N_6O_4)+H]^+$, que representa a massa do pNDIp acrescida de um próton, e outro em $m/z = 645,1296$, referente a $[(C_{38}H_{18}N_6O_4)+Na]^+$, correspondente à massa do composto com a adição de um íon sódio.

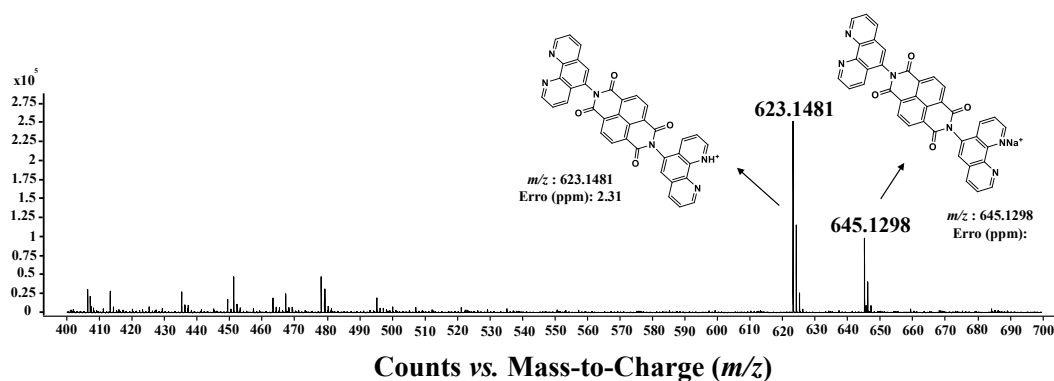


Figura 3.4. Espectro de massas do composto pNDIp em solução de metanol.

O composto pNDIp mostrou-se insolúvel em todos os solventes testados (diclorometano, clorofórmio, dimetilformamida e tolueno) e apenas pouco solúvel em DMSO. Devido à sua baixa solubilidade em DMSO- d_6 , os sinais de prótons (1H) no espectro de RMN apresentaram baixa intensidade (FIGURA 3.5).

Os sinais dos prótons no espectro de RMN do composto pNDIp aparecem na região aromática, exibindo um padrão de ressonâncias consistente com unidades de fenantrolina equivalentes, entre 7,7 e 9,2 ppm. A ressonância do singlete em δ 8,28 é atribuído aos quatro hidrogênios equivalentes na região do grupo naftalenodiimida, Figura 3.5. A tabela 3.1 exibe as atribuições dos espectros de RMN de ^1H e multiplicidade dos sinais.

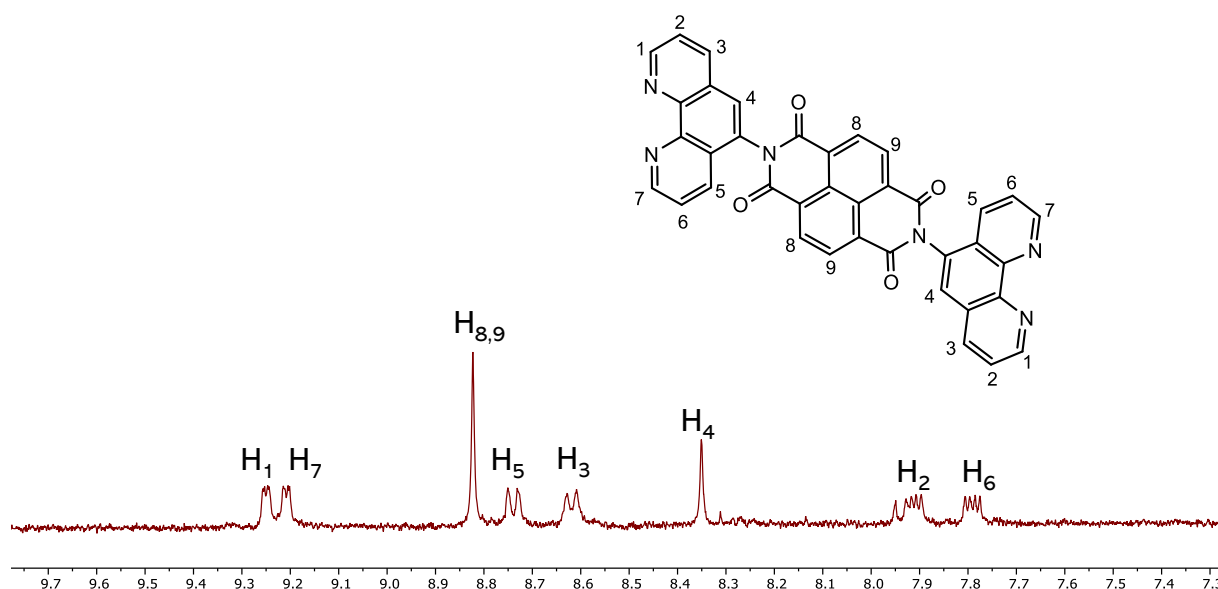


Figura 3.5. Espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto pNDIp.

Tabela 3.1. Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H para o composto pNDIp em DMSO- d_6 . Deslocamentos químicos (em ppm), multiplicidade, constantes de acoplamento (Hz) e integral para hidrogênios.

H	δ_{H} (ppm), mult. (J em Hz), H
1	9.25; dd (1.59, 4.33); 2H
2	7.91; dd (4.33, 7.95); 2H
3	8.63-8.60; m (6.1); 2H
4	8.34; s (6.1); 2H
5	8.74; db (8.,30); 2H
6	7.78; dd (4.15, 8.30); 2H
7	9.21; dd (1.51, 4.15); 2H
8,9	8.82; m; 2H

3.4.1.2 Díade [Ru(phen)₂(pNDIp)](PF₆)₂

A síntese da díade [Ru(phen)₂(pNDIp)]²⁺(RupNDIp) consistiu na substituição dos ligantes cloretos do complexo precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂] pelo composto pNDIp, na forma bidentada, utilizando hexafluorofosfato de amônio (NH₄PF₆) como contra-íon. A rota sintética empregou dimetilformamida (DMF) como solvente, sob temperatura de refluxo e atmosfera inerte, durante 24 horas, conforme o mecanismo reacional representado na Figura 3.6. O sólido final, obtido após purificação com acetona, apresentou coloração vermelho-escuro (FIGURA 3.7.A), enquanto, em solução de DMSO, exibiu coloração amarela (FIGURA 3.7.B).

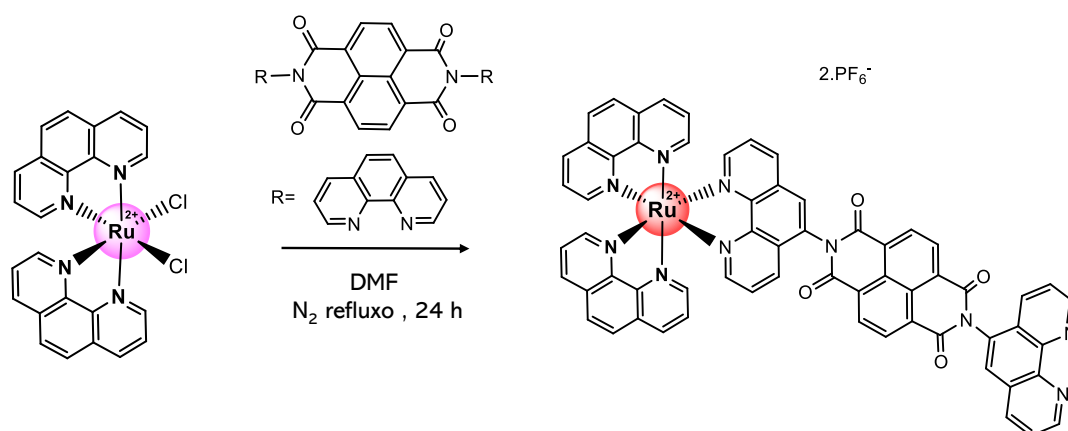


Figura 3.6. Rota sintética da díade Ru(phen)-naftalenodiimida (RupNDIp).

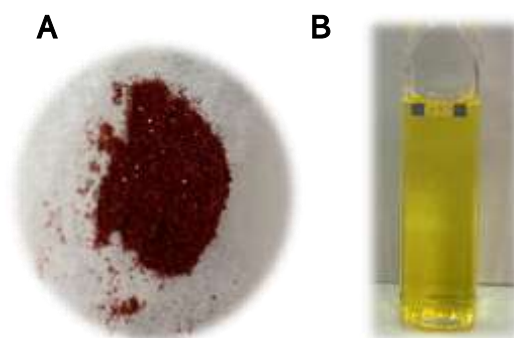
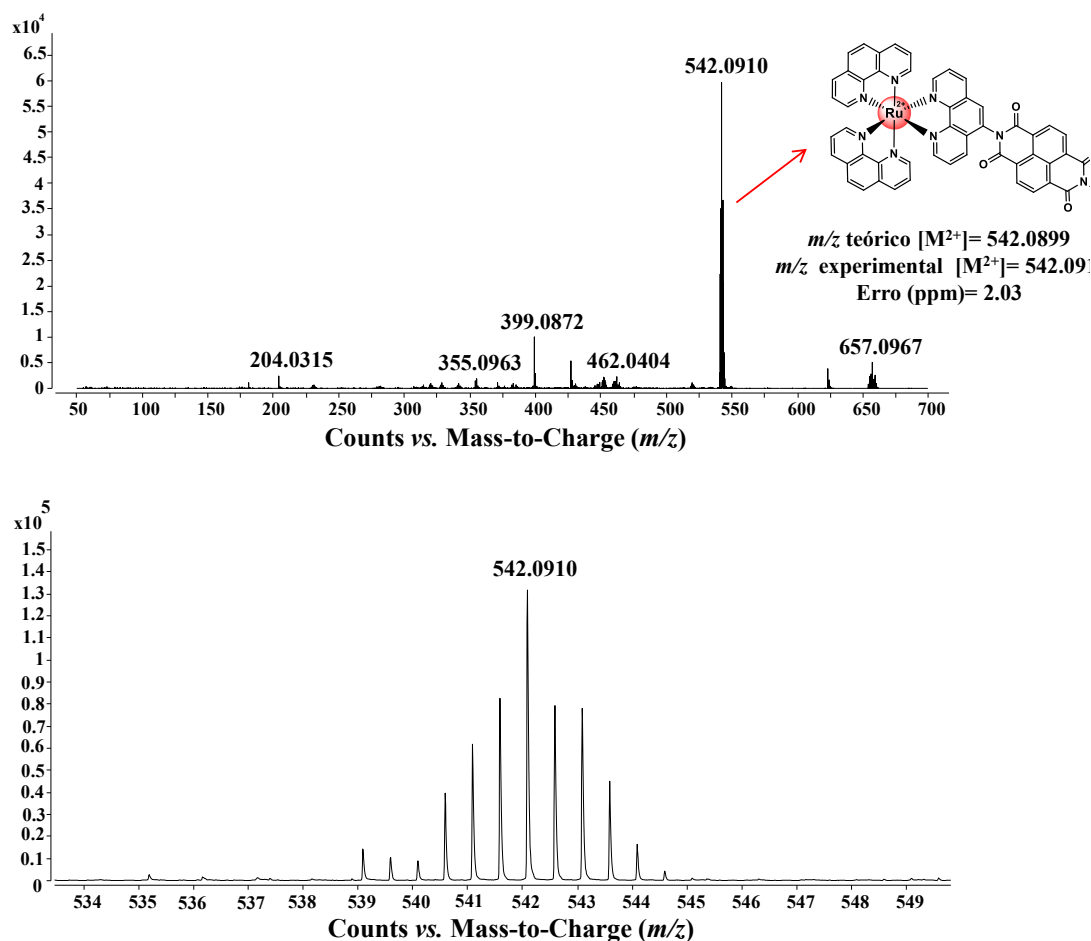


Figura 3.7. Díade Ru(phen)-naftalenodiimida (RupNDIp) (A) sólido e (B) em solução de DMSO.

Figura 3.8.



molecular $m/z= 542,0910$.

A Tabela 3.2 exhibe os descolamentos químicos dos prótons da díade RupNDIp. Devido à grande sobreposição dos sinais na região aromática, que dificulta a atribuição precisa dos deslocamentos químicos e das multiplicidades, foi necessário correlacionar os sinais dos prótons do composto pNDIp, do complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (FIGURA 3.9) e os dados obtidos nos experimentos de RMN 1D e 2D para a díade RupNDIp (FIGURAS 3.10, 3.11 e 3.12).

Os prótons das fenantrolinas (phen) foram agrupados em três conjuntos de sinais para uma descrição mais detalhada dos resultados. Observa-se que a coordenação do pNDIp ao centro Ru(II) provoca um deslocamento químico das ressonâncias para alto campo na porção fenantrolina do pNDIp (phen-pNDIp), tornando-as semelhantes às do ligante fenantrolina coordenado ao centro metálico. Esse comportamento está associado à desblindagem induzida pelo centro metálico. Em contraste, os deslocamentos químicos dos hidrogênios da porção fenantrolina não coordenada do pNDIp permanecem inalterados, exibindo ressonâncias comparáveis às do composto pNDIp livre.

Tabela 3.2. Atribuições dos espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e dados de correlação heteronuclear de COSY ^1H - ^1H , HSQC ^1H - ^{13}C e os principais sinais de HMBC ^1H - ^{13}C em DMSO- d_6 para a díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$. Deslocamentos químicos (em ppm), multiplicidade, constantes de acoplamento (Hz) e integrais para os hidrogênios.

Componentes	No.	^{13}C via HSQC	^1H	^1H - ^{13}C HMBC
Phen	N1			
	C1''/H1''	137.1	8.81 – 8.84, m, 2H	
	C2''/H2''	126.5	7.77 – 7.83, m, 2H	
	C3''/H3''	153.0	8.08 – 8.15, m, 2H	
	C4''	130.2 – 131.6	– –	
	C5''	147.7	– –	8.13 (H3'')
	C6''/H6''	128.5	8.40 – 8.44, m, 2H	
	C7''/H7''	128.5	8.40 – 8.44, m, 2H	
	C8''	130.2 – 131.6	– –	
	C9''	147.7	– –	8.21 (H12'')
	C10''/H10''	137.3	8.83 – 8.89, m, 2H	
	C11''/H11''	126.8	7.84 – 7.89, m, 2H	
	C12''/H12''	152.8	8.17 – 8.23, m, 2H	
	N2			
	N1			
pNDIp (phen coordenada)	C1'/H1'	133.5	8.97 – 9.02, m, 1H	
	C2'/H2'	126.7	7.71 – 7.78, m, 1H	
	C3'/H3'	153.9	8.18 – 8.22, m, 1H	
	C4'	130.2 – 131.6	– –	
	C5'	147.70	– –	8.21 (H3')
	C6'/H6'	128.2	8.40 – 8.44, m, 1H	
	C7'	Nd	– –	

Capítulo 3: Síntese e Caracterização da díade Ru(II)-naftalenodiimida

phen (pNDIp não coordenada)	C8'	130.2 – 131.6	--	
	C9'	147.7	--	8.25 (H12')
	C10'/H10'	137.3	8.76 – 8.81, m, 1H	
	C11'/H11'	127.1	7.89 – 7.95, m, 1H	
	C12'/H12'	153.0	8.23 – 8.27, m, 1H	
	N2			
	C20/C20' (C=O)	163,9		8.19 (H12'), 7.70 (H2')
	C19/C19'	Nd		
	C18	Nd		
	C17/H17	130.8	8.77 – 8.81, m, 2H	
	C16/H16	130.8	8.80 – 8.88, m, 2H	
	C15	Nd		
	C14/C14'	Nd	--	
	C13/C13' (C=O)	163.8	--	8.85 (H16; H16')
	N1			
	C1/H1	150.9	9.22 – 9.26, m, 1H	
	C2/H2	124.3	7.90 – 7.96 m 1H	
	C3/H3	137.5	8.62 – 8.67, m, 1H	
	C4	130.2 – 131.6	--	
	C5	145.2	--	8.65 (H3); 9.25 (H1)
	C6/H6	128.1	8.34 – 8.39, m, 1H	
	C7	Nd	--	
	C8	130.2 – 131.6	--	
	C9	145.1	--	8.36 (H6); 9.20 (H10)
	C10/H10	150.5	9.19 – 9.22, m, 1H	
	C11/H11	124.1	7.80 – 7.84, m, 1H	
	C12/H12	129.5	8.71 – 8.77, m, 1H	
	N2			

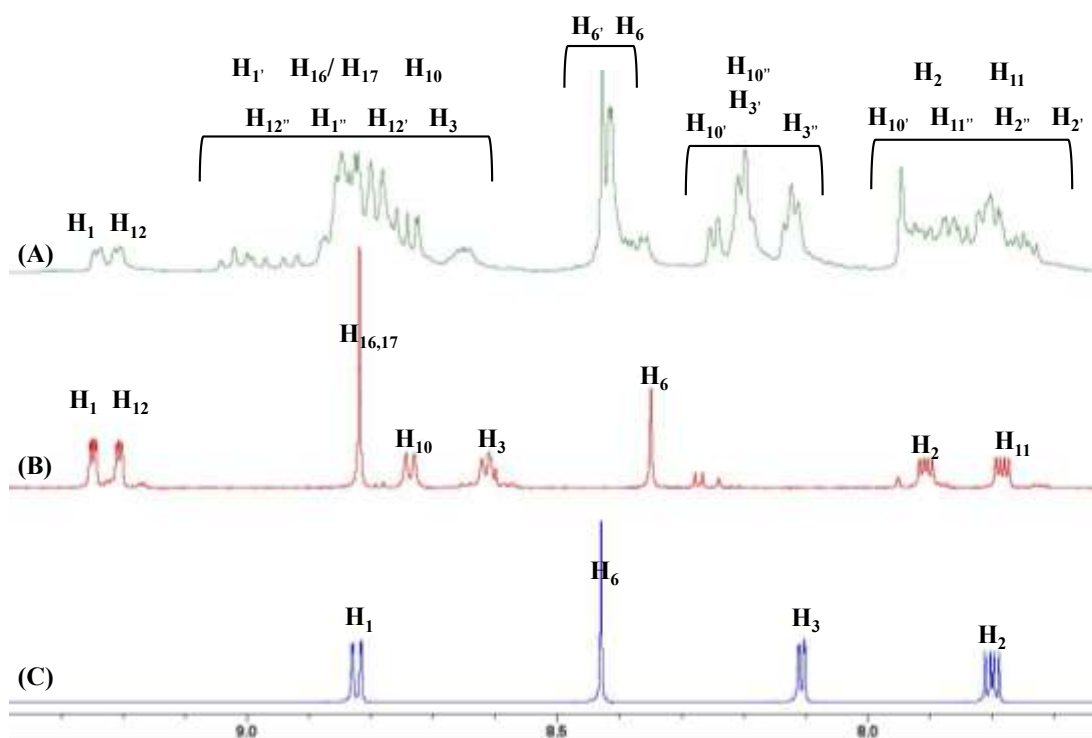


Figura 3.9. Região de desblindagem dos espectros de RMN de ^1H da díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$, (B) do composto pNDIp e (C) do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em DMSO-d_6 .

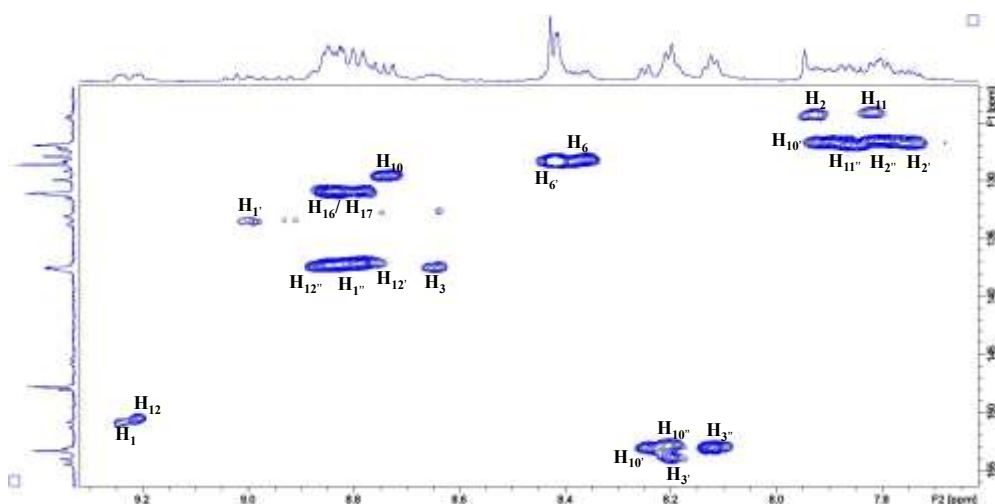


Figura 3.10. Mapa de contorno de $^1\text{H} - ^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ HSCQ RMN na região de desproteção da díade Ru(pNDIp) em DMSO-d_6 a 298K.

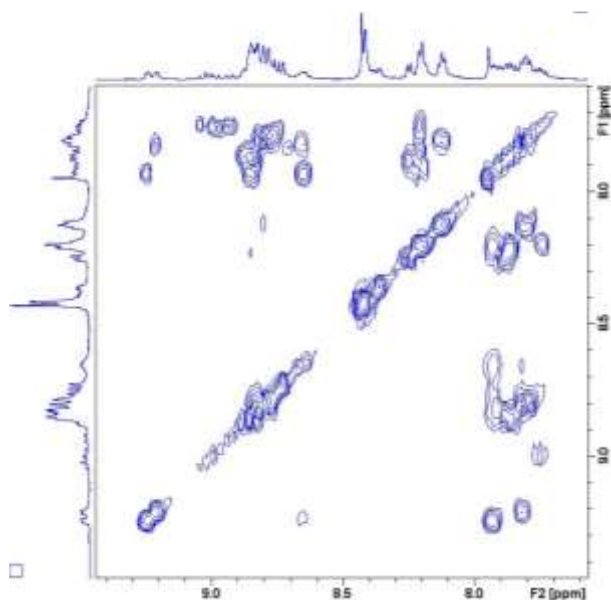


Figura 3.11. Mapa de contorno de $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY RMN na região de desproteção da díade RupNDIp em DMSO-d_6 a 298K.

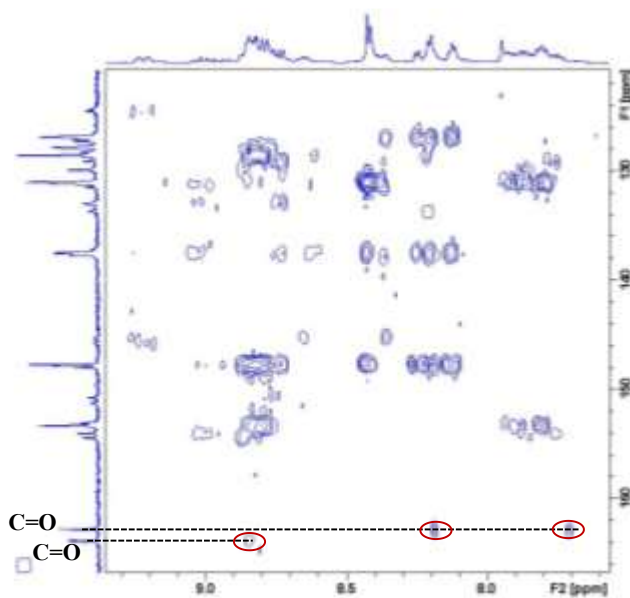


Figura 3.12. Mapa de contorno de RMN HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ na região de desblindagem da díade RupNDIp em DMSO-d_6 a 298K.

3.4.2. Estudo de Concentração

Para iniciar os estudos espectroscópicos da díade RupNDIp utilizando as técnicas de absorção eletrônica na região do UV-Vis e luminescência foi necessário determinar o limite de concentração adequado para essas análises, a fim de evitar efeitos de supressão devido à alta concentração. Para isso, foram obtidos espectros de absorção e luminescência variando a concentração da díade RupNDIp na faixa de 10 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em solução de DMSO (FIGURA 3.13).

Os espectros de absorção demonstram um aumento na absorção com o aumento da concentração, o que está de acordo com a lei de Lambert-Beer, visto que absorção é diretamente proporcional à concentração da solução.¹²⁵ No entanto, apesar do aumento da concentração, não foi observada uma alteração na razão entre as bandas características do composto, Figura 3.13.A.

Por outro lado, a análise da intensidade de emissão a 610 nm ($\lambda_{\text{EX}} = 450$ nm) em função da concentração da díade (Figura 3.13.B) demonstra uma relação linear entre a concentração e a intensidade de emissão até a concentração de 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Acima dessa concentração, observa-se uma tendência à saturação, seguida por uma eventual diminuição da intensidade de emissão em concentrações mais elevadas (acima de 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), indicando um processo de supressão da emissão. Esse efeito pode estar associado à perda de emissão devido a colisões moleculares resultado de altas concentrações. Com base nesses resultados, para minimizar os efeitos de supressão da luminescência, todos os experimentos de luminescência foram conduzidos com concentrações abaixo de 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

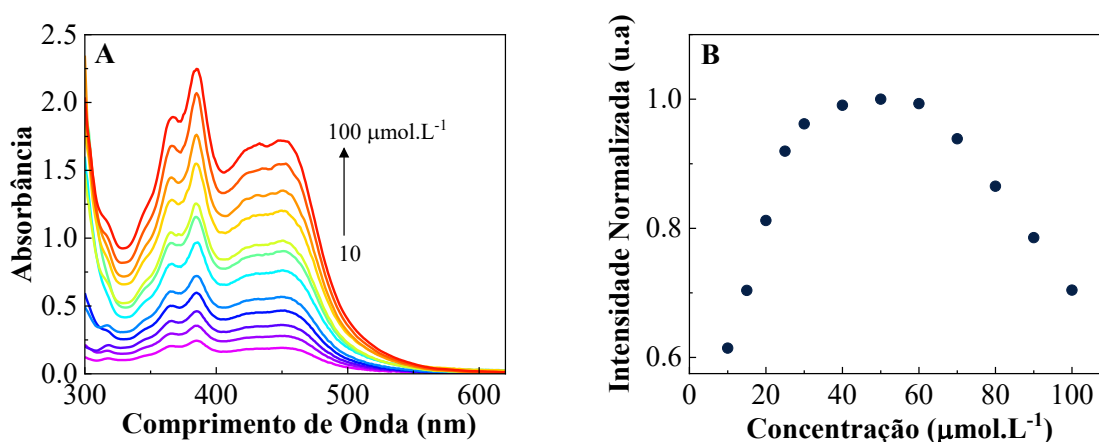


Figura 3.13. (A) Espectros de absorção da díade RupNDIp em diferentes concentrações (10-100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e (B) gráfico da intensidade de emissão em 610 nm em função da concentração (10-100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de DMSO.

3.4.3. Propriedades Fotofísicas

3.4.3.1. Espectroscopia de Absorção UV-Vis e Luminescência

As propriedades fotofísicas da díade RupNDIp foram investigadas por meio das técnicas de espectroscopia de absorção UV-Vis e luminescência em solução de dimetilsulfóxido (DMSO), sendo comparadas às propriedades do composto pNDIp e do complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Propriedades fotofísicas da díade RupNDIp e do complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em solução de DMSO sob atmosfera de N_2 .

Compostos	λ_{Abs} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	λ_{EM} , nm	τ_{EM} , ns	Φ_{EM}
RupNDIp	365 (15850)			
	385 (19000)	610	540	0.0075
	450 (15300)			
$[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$	450 (15000)	605	950	0.05

O espectro de absorção do composto pNDIp (FIGURA 3.14) é caracterizado por duas bandas de absorção na região UV-Vis (255 a 400 nm). A primeira transição eletrônica, de menor comprimento de onda ($\lambda_{\text{MÁX}} = 265 \text{ nm}$), corresponde às transições de transferência de carga intraligantes (ILCT) dos componentes aromáticos da fenantrolina ($\text{phen}, \pi \rightarrow \text{phen}, \pi^*$).

A segunda banda, localizada na região de 330 a 400 nm, é atribuída às transições eletrônicas $S_0 \rightarrow S_2$, $S_0 \rightarrow S_1$ e $S_0 \rightarrow S_0$ do grupo naftalenodiimida, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com dados da literatura para compostos similares.^{126,127} Devido à baixa solubilidade do composto, não foi possível registrar sua absorção em termos de absorvidade molar. Além disso, para o composto pNDIp, não foi observada emissão, independentemente do comprimento de onda de excitação.

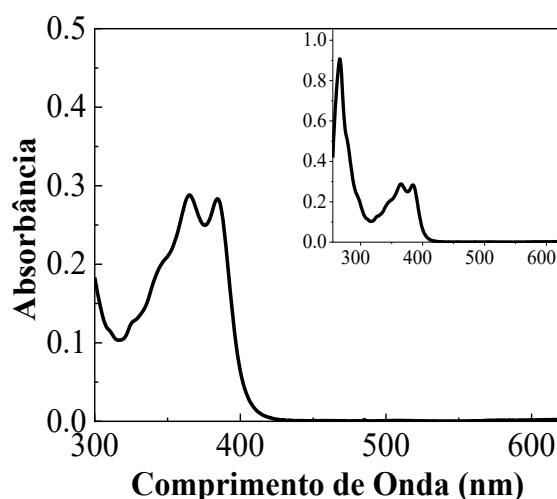


Figura 3.14. Espectro de absorção UV-Vis do composto pNDIp em solução de DMSO aerada (inserção do gráfico: ampliação do espectro na região de 265- 600 nm).

O complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ apresenta uma forte absorção UV ($\lambda_{\text{MÁX}} = 265$ nm) atribuída as transições ILCT dos ligantes aromáticos fenantrolina (FIGURA 3.15.A) e uma ampla absorção na região visível em torno de 350-550 nm com máximo em 450 nm ($\epsilon = 15000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) atribuída a transições eletrônicas de transferência de carga de metal para ligante ($^1\text{MLCT}$; $\text{Ru}, d\pi \rightarrow \text{phen}, \pi^*$). O espectro de emissão (Figura 3.16.A) é caracterizado por uma banda larga (500-800 nm) com máximo em 605 nm, correspondente à fosforescência do estado $^3\text{MLCT}$, os resultados apresentados são semelhantes ao observado para complexos polipiridínicos de Ru(II).¹¹⁴

O espectro de absorção da díade RupNDIp (Figura 3.15.B) corresponde à absorção de MLCT da componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$ com máximo em 450 nm e à contribuição das componentes $\{\text{pNDIp}\}$ e $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$ na região de 330 a 400 nm. O espectro de emissão do RupNDIp é caracterizado por uma ampla banda de emissão, com máximo em 610 nm, semelhante à banda de fosforescência do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, Figura 3.16.B.

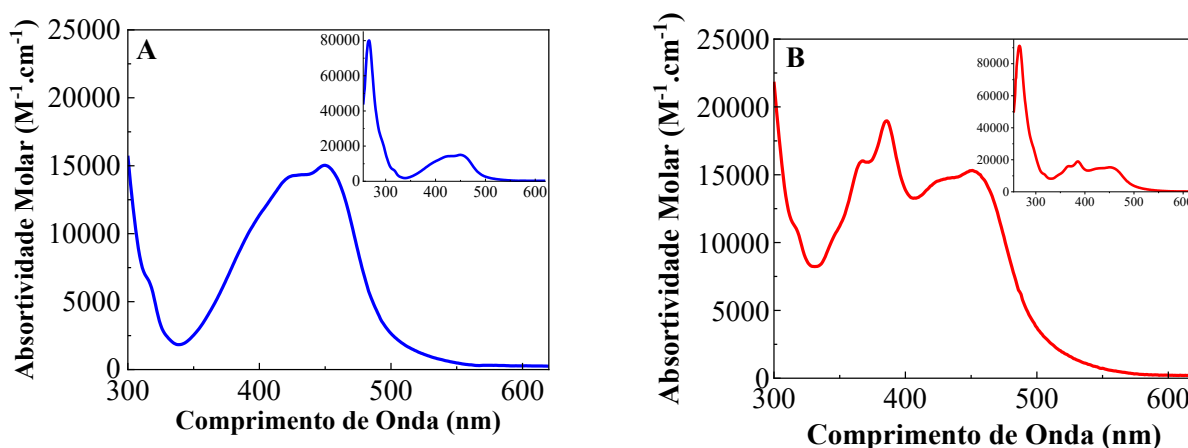


Figura 3.15. Espectros de absorção (A) complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e da (B) díade RupNDIp em solução de DMSO aerada ($c = 20 \mu\text{M}$).

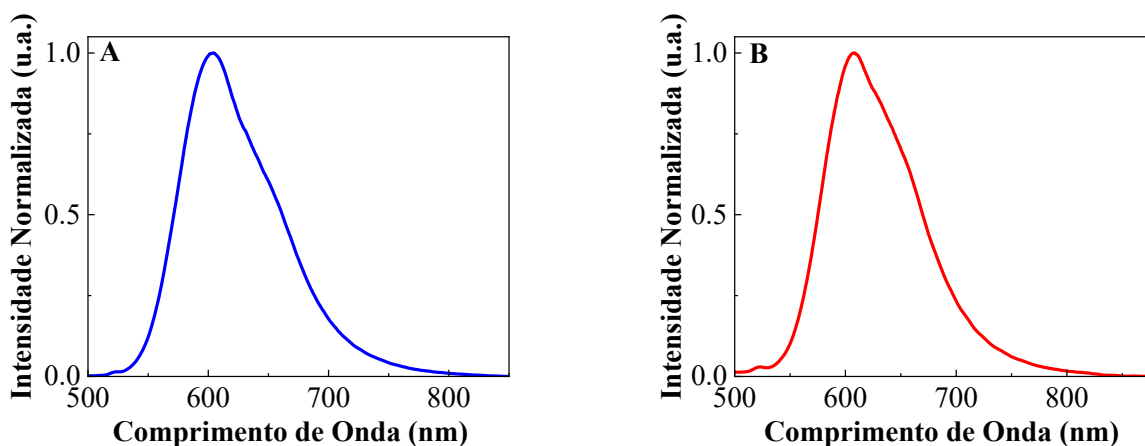


Figura 3.16. Espectros de emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450$ nm) (A) complexo [Ru(phen)₃]²⁺ e da (B) díade RupNDIp em solução de DMSO aerada ($c = 20$ μM).

O espectro de excitação da díade RupNDIp ($\lambda_{\text{EM}} = 610$ nm) (Figura 3.17.B) exibe um perfil semelhante ao espectro de absorção do complexo [Ru(phen)₃]²⁺ (FIGURA 3.17.A), indicando que a emissão da díade resulta da contribuição ³MLCT, sendo independente do comprimento de onda de excitação (350–470 nm), Figura 3.18.

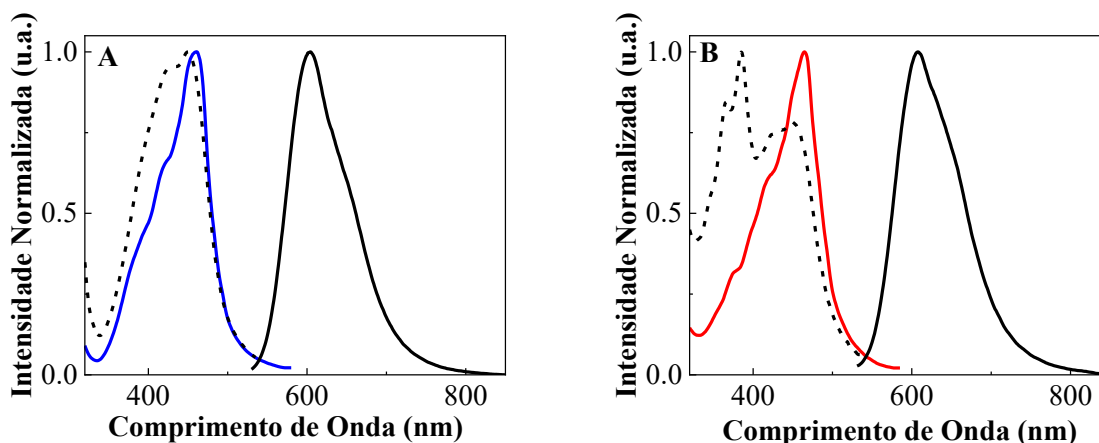


Figura 3.17. Comparação entre os espectros de emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450$ nm) (linha sólida preta), excitação ($\lambda_{\text{EM}} = 610$ nm) (colorido) e absorção (linha tracejada) do (A) complexo [Ru(phen)₃]²⁺ e da (B) díade RupNDIp em solução de DMSO ($c = 20$ μM).

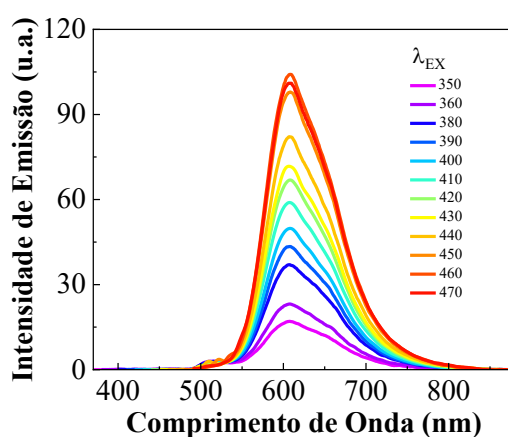


Figura 3.18. Espectros de emissão da díade RupNDIp em solução de DMSO aerada ($c = 20 \mu\text{M}$) em diferentes comprimentos de onda de excitação ($\lambda_{\text{EX}} = 350 - 470 \text{ nm}$).

No entanto, a intensidade de emissão é suprimida quando comparado com complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$. Os resultados obtidos mostram que quando a componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$ é seletivamente excitada a 450 nm, a intensidade de emissão da díade RupNDIp, apesar de apresentar o mesmo formato de banda do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ é suprimida em aproximadamente 75% em solução de DMSO, independentemente da atmosfera de oxigênio ou nitrogênio, Figura 3.19.

Esse efeito de supressão é confirmado pelos resultados de rendimento quântico de emissão (Φ_{EM}), que demonstram que a funcionalização da díade com o ligante pNDIp resulta na diminuição do Φ_{EM} ($\lambda_{\text{EX}} = 436 \text{ nm}$) da díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$ ($\Phi_{\text{EM}} = 0,002$) em comparação com o complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ($\Phi_{\text{EM}} = 0,03$) na presença de oxigênio. Sob atmosfera inerte, o Φ_{EM} ($\lambda_{\text{EX}} = 436 \text{ nm}$) da díade RupNDIp ($\Phi_{\text{EM}} = 0,0075$) também apresentou uma redução em relação ao complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ($\Phi_{\text{EM}} = 0,05$).

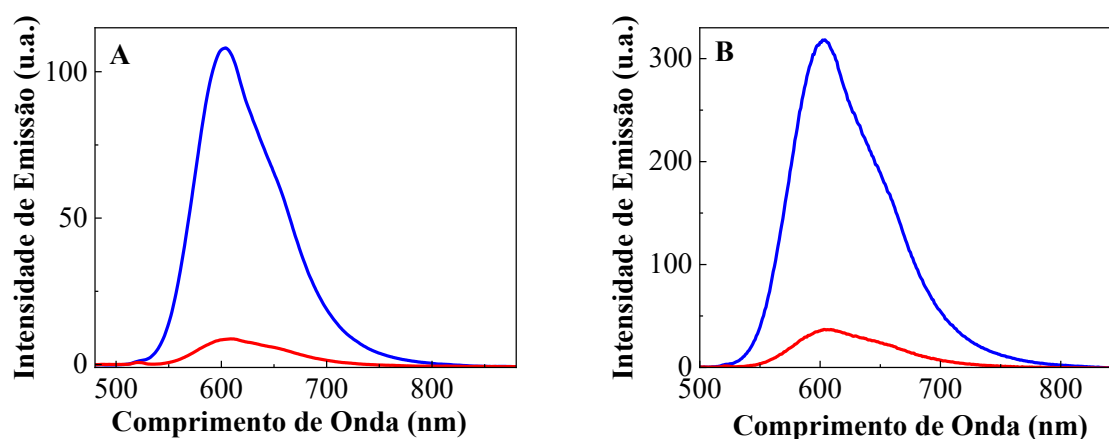


Figura 3.19. Comparação da intensidade de emissão do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (linha azul) e da díade RupNDIp (linha vermelha) (A) sob atmosfera de oxigênio e (B) des aerado (N_2) utilizando soluções com absorção igual 0,1 no comprimento de onda de excitação ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$).

Além disso, observou-se que os valores de Φ_{EM} da RupNDIp sob atmosfera inerte aumentaram em relação àqueles obtidos na presença de oxigênio, o que confirma que a emissão em 610 nm provém de um estado excitado com característica de tripleto.

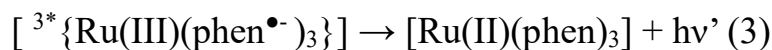
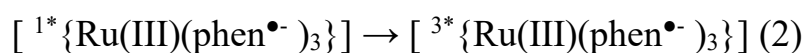
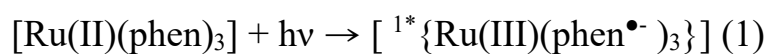
A diminuição da fosforescência observada sugere três caminhos distintos de desativação: transferência de elétrons fotoinduzida com a formação de um estado excitado de separação de cargas do tipo $\{\text{Ru}^{3+}(\text{phen})\text{pNDIp}^-\}$, transferência de energia entre as componentes e aumento do cruzamento entre sistemas (ISC) devido ao efeito de átomo pesado.

3.4.3.2. Espectroscopia de Absorção Transiente (TA)

A técnica de espectroscopia de absorção transiente (TA) na escala de tempo de picossegundos (ps) foi empregada para investigar os processos de supressão da emissão observados nos estudos de luminescência da díade RupNDIp, utilizando um pulso de excitação de 450 nm com duração de 220 fs em solução DMSO e

acetonitrila. Para fins de comparação, também foi medida a absorção transiente do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ sob as mesmas condições experimentais. As medidas com comprimento de excitação de 350 nm, nas quais ambos os componentes, $\{\text{pNDIp}\}$ e $\{[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}\}$, da díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$ absorvem luz, não foram possíveis devido à limitação do sinal do laser do equipamento.

As Figuras 3.20.A e 3.21.A mostram que, independentemente do solvente (DMSO ou acetonitrila), o comportamento espectral do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ entre 1,6 e 35 ps após a excitação é caracterizado pelo consumo da banda de absorção negativa em 480 nm, atribuída ao estado fundamental, e pela concomitante formação de uma banda positiva em 550 nm. Essa banda surge instantaneamente após a excitação, indicando que representa uma absorção de estado excitado (ESA) do estado tripleto do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, característica do estado $^3\text{MLCT}$ de complexos polipiridínicos de Ru(II).¹²⁸ Esses resultados indicam que a excitação em 450 nm promove o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ para o estado $^1\text{MLCT}$ e o rápido cruzamento intersistemas (ISC) gerando o estado $^3\text{MLCT}$, conforme representado nas equações 1 a 3.



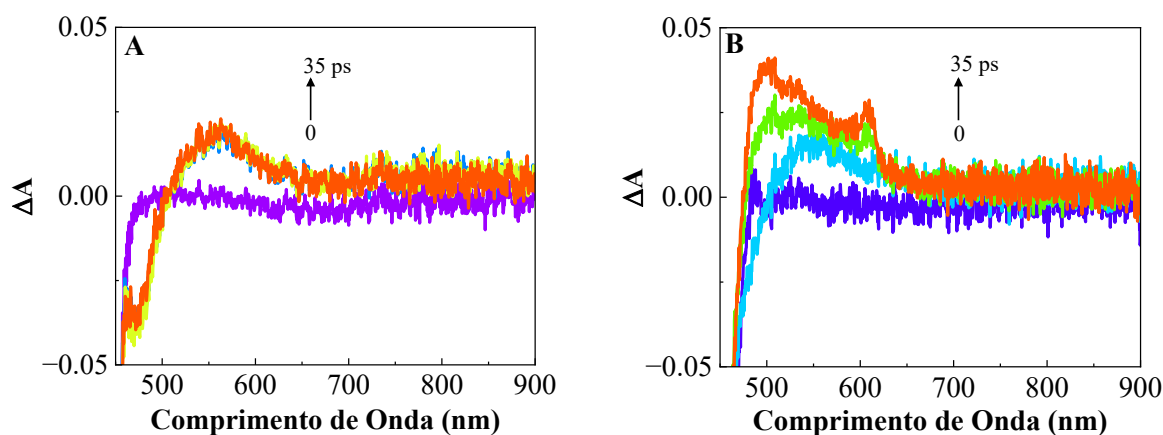


Figura 3.20. Espectros de absorção transiente em solução de DMSO do complexo (A) $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e da (B) díade RupNDIp obtidos na escala de tempo de picossegundo com $\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$.

Os espectros de absorção transiente da díade RupNDIp registrados em solução de DMSO e acetonitrila entre 1,6 e 35 ps após excitação de 450 nm (FIGURAS 3.20.B e 3.21.B) demonstram que em ambos os solventes ocorre o consumo da banda em 480 nm e simultaneamente à formação da absorção positiva em 560 nm atribuída ao estado $^3\text{MLCT}$ similar ao observado para o complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$.

Adicionalmente, o espectro exibe a formação de novas bandas de absorção de estado excitado (ESA) em 475 e 610 nm, indicando a formação do estado de separação de carga (CSS) $\{\text{Ru}^{3+}(\text{phen})_2(\text{pNDIp}^{\bullet-})\}$. A atribuição de espécies ESA como o CSS foi confirmada por comparação com as características espectrais obtidas na espectroeletrólise UV-vis (FIGURA 3.29.A) após a redução do primeiro potencial de redução negativo (- 0,37 V) do componente $\{\text{pNDIp}\}$ da díade RupNDIp e da fotólise com luz 350 nm (Figura 3.40.A).

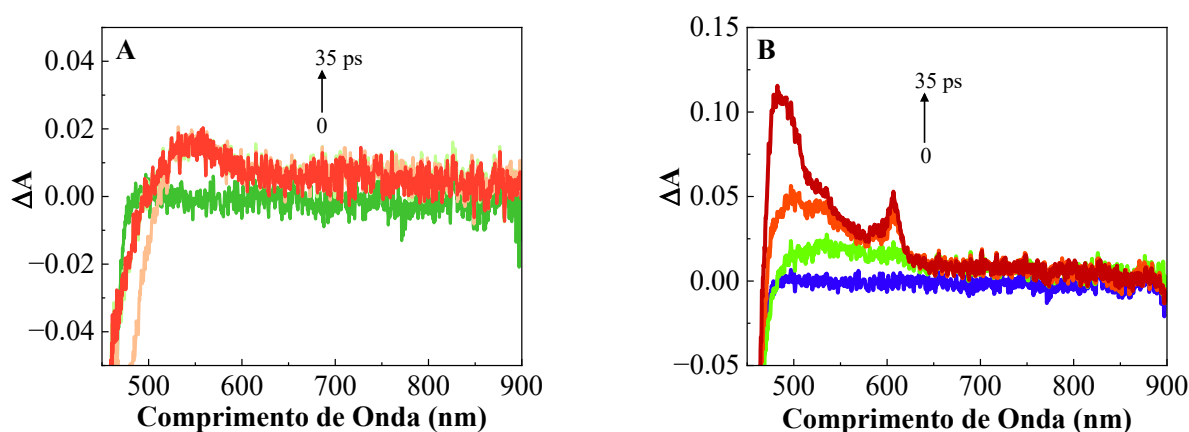


Figura 3.21. Espectros de absorção transiente em solução de acetonitrila do complexo (A) $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e da (B) díade RupNDIp obtidos na escala de tempo de picossegundo com $\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$.

A figura 3.22 resume as propriedades fotofísicas da díade RupNDIp. A excitação a 350 nm permite dois caminhos possíveis: o primeiro, no qual o componente $^1\text{pNDIp}$ é populado e, em seguida, decai para o estado fundamental por meio de um processo de conversão interna; e o segundo, um caminho alternativo de decaimento do $^1\text{pNDIp}$, no qual ocorre a transferência de sua energia de excitação para o $^1\text{MLCT}$ do componente $\{[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}\}$, seguido por um rápido cruzamento intersistemas para o $^3\text{MLCT}$.

A fotoexcitação da díade RupNDIp a 450 nm, em que o componente $\{[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}\}$ absorve luz, resulta na população do estado emissivo $^3\text{MLCT}$. A supressão da emissão do estado $^3\text{MLCT}$ é atribuída a dois processos de decaimento distintos: um processo não radiativo que gera oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (descrito na seção 3.4.6) e uma rápida transferência intramolecular de elétrons para o estado tripleto de separação de carga $\{\text{Ru}^{3+}(\text{phen})_2(\text{pNDIp}^{\bullet-})\}$.

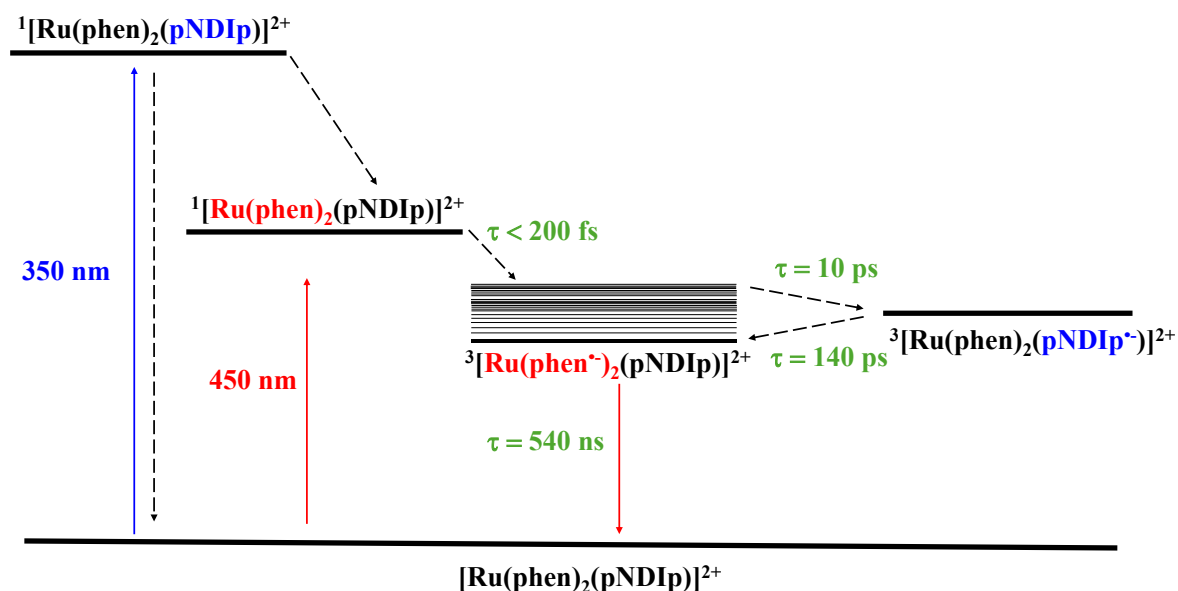


Figura 3.22. Diagrama qualitativo de níveis de energia da díade RupNDIp em DMSO. azul: excitação a 350 nm; vermelho: excitação a 450 nm.

3.4.3. Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica da díade RupNDIp em solução foi avaliada utilizando as técnicas de espectroscopia de absorção UV-vis e luminescência em diferentes temperaturas (10 -80 °C). Conforme demonstrado na Figura 3.23.A, o aumento na temperatura de 10 a 80 °C não altera a absorção da díade, esse resultado colabora para estabilidade térmica do composto. Por outro lado, o aumento da temperatura resultou na diminuição da intensidade de emissão, Figura 3.22.B. A mudança na intensidade de emissão pode ser atribuída ao aumento de colisões entre as moléculas, isto é, o aumento da temperatura resulta no aumento de colisões moleculares que favorecem o decaimento não radiativo.¹²⁹

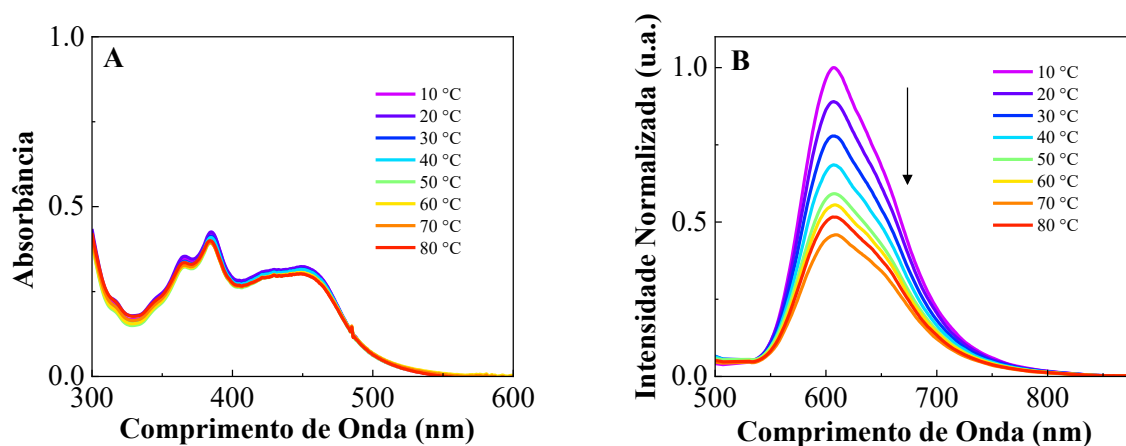


Figura 3.23. (A) Espectros de absorção da díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$ e (B) emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$) dependentes da temperatura (10-80 °C) em solução de DMSO (concentração = 20 μM).

3.4.4. Efeito do solvente nas propriedades espectroscópicas

As propriedades espectroscópicas da díade RuNDIp foram investigadas em solução aerada, utilizando os solventes diclorometano (DCM), metanol (MeOH), acetonitrila (ACN), dimetilformamida (DMF), água (H_2O) e dimetilsulfóxido (DMSO). A seleção desses solventes foi baseada em suas características de polaridade e na solubilidade da díade. Para fins de comparação, os mesmos ensaios foram conduzidos com o complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$.

Os espectros de absorção da díade RuNDIp não apresentaram deslocamentos significativos, sugerindo uma interação fraca entre a díade e o solvente no estado fundamental, Figura 3.24.A. No entanto, o espectro de emissão apresenta uma dependência considerável do solvente, com um deslocamento de 20 nm, de DCM (585 nm) para DMSO (610 nm), evidenciando uma interação mais forte entre o complexo no estado excitado e o solvente, Figura 3.24.B.

Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que solventes polares, como o DMSO, estabilizam o estado excitado polar, reduzindo sua energia e, conseqüentemente, causando um deslocamento do espectro para maiores

comprimentos de onda em comparação com solventes menos polares, como o DCM, Figura 3.24.B.

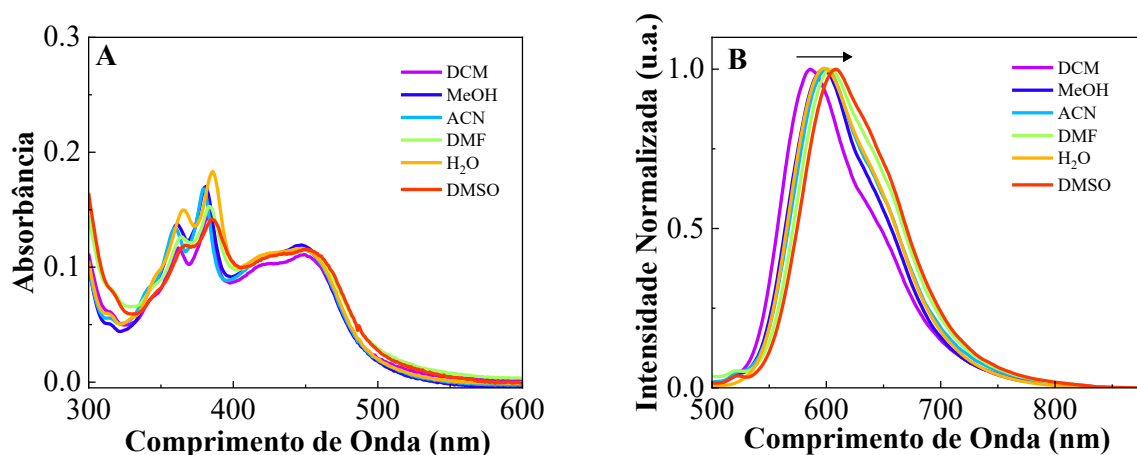


Figura 3.24. Espectros de (A) absorção e de (B) emissão ($\lambda_{EM}=450$ nm) da díade RupNDIp em diferentes solventes.

A Figura 3.25.A apresenta os espectros de absorção obtidos para o complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, evidenciando a ausência de um deslocamento significativo do máximo de absorção em 450 nm. Esse resultado é similar ao observado para a díade RupNDIp, indicando um comportamento espectroscópico similar no estado fundamental. De maneira semelhante ao observado para a díade de Ru(II), o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ também apresenta um deslocamento do máximo de emissão com o aumento da polaridade do solvente (FIGURA 3.25.B). Esse efeito está relacionado à estabilização do estado excitado polar, o que reduz sua energia e, consequentemente, desloca o espectro para maiores comprimentos de onda.

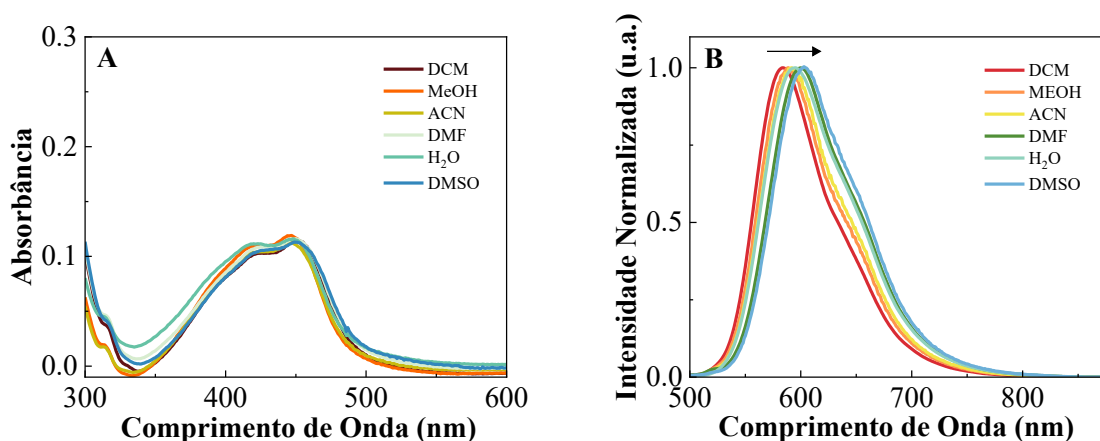


Figura 3.25. Espectros de (A) absorção e de (B) emissão ($\lambda_{\text{EX}}=450 \text{ nm}$) do complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em diferentes solventes

3.4.5. Propriedades Eletroquímicas

3.4.5.1. Voltametria Cíclica (VC)

As propriedades eletroquímicas do composto pNDIp e da díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$ foram avaliadas utilizando a técnica de voltametria cíclica (VC). Os voltamogramas cíclicos adquiridos em solução de DMSO com 0,1 M de hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (TBAPF_6) como eletrólito de suporte são demonstrados nas Figuras 3.26 e 3.27 e os valores dos potenciais redox obtidos são resumidos na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Os potenciais de meia-onda ($E_{1/2}$) foram determinados a partir dos experimentos de VC em solução de DMSO com 0,1 M de hexafluorofosfato de tetrabutylamônio (TBAPF₆) como eletrólito de suporte.^a

COMPOSTO	E _{ox} (V)	E _{red} (V)
pNDIp	-0,12	-0,22
	-0,46	-0,56
[Ru(phen) ₂ (pNDIp)] ²⁺	-0,27	-0,37
	-0,63	-0,73

^a O Ferroceno foi utilizado como padrão interno para correção do eletrodo de referência (+0,635 V *vs* em DMSO).

Conforme a Figura 3.26.A, o voltamograma cíclico do composto pNDIp é caracterizado por dois processos consecutivos de redução reversíveis associados à redução sequencial de pNDIp às espécies de ânion {pNDIp} ⇌ {pNDIp^{•-}} e diânion {pNDIp^{•-}} ⇌ {pNDIp²⁻}, respectivamente. Os dois processos redox são independentes da velocidade de varredura, mas observa-se um aumento nos dois potenciais de redução à medida que a velocidade de varredura aumenta, indicando um processo reversível, Figura 3.26.B.¹³⁰ Esse comportamento eletroquímico observado para o pNDIp é semelhante ao relatado na literatura para outros compostos derivados de naftalenodiimida, atribuído ao seu forte caráter de receptor de elétrons.^{130,131}

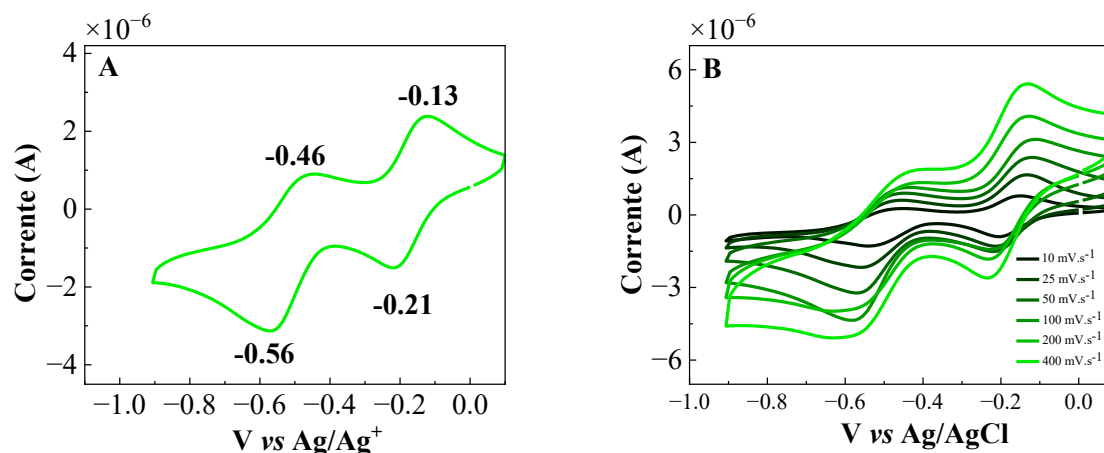


Figura 3.26. Voltamogramas cíclicos do composto pNDIp em solução de DMSO com 0,1 M de TBAPF₆ (A) redução por 10 ciclos com taxa de varredura de 100 mV.s⁻¹ e (B) em diferentes taxas de varredura (10-400 mV.s⁻¹).

O voltamograma cíclico da díade RupNDIp também apresenta dois processos de redução reversíveis, semelhantes ao observado para o composto pNDIp, Figura 3.27.A. Esse comportamento eletroquímico é atribuído ao processo de redução do componente {pNDIp} às espécies ânion RupNDIp $\rightleftharpoons$ RupNDIp⁻ e diânion RupNDIp⁻ $\rightleftharpoons$ RupNDIp²⁻, respectivamente. Assim como o composto pNDIp, os dois processos consecutivos redução independem da velocidade de varredura, Figura 3.27.B.

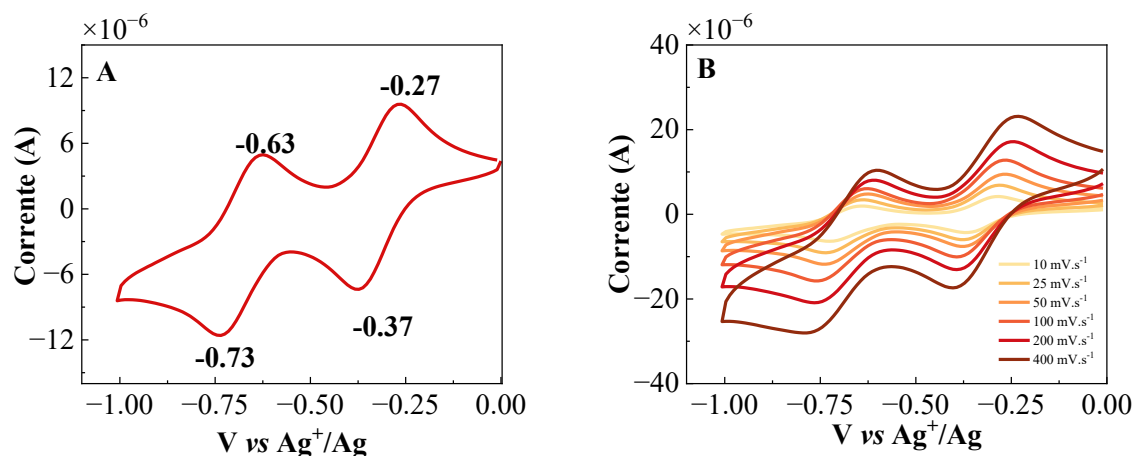


Figura 3.27. Voltamogramas cíclicos da díade RupNDIp em solução de DMSO com 0,1 M de TBAPF₆ (A) redução por 10 ciclos com taxa de varredura de 100 mV.s⁻¹ e (B) em diferentes taxas de varredura (10-400 mV.s⁻¹).

Devido à impossibilidade de realizar experimentos na janela de potencial de oxidação do DMSO, visto que, nesse solvente, há uma limitação acima de 1,0 V, os voltamogramas cíclicos foram determinados na janela de oxidação utilizando solução de acetonitrila.¹³² Os voltamogramas cíclicos da díade RupNDIp (FIGURA 3.28) em solução de acetonitrila exibe uma oxidação reversível, referente à oxidação do centro metálico ($\text{Ru}^{2+}/\text{Ru}^{3+}$) e o processo inverso, corresponde a redução do rutênio ($\text{Ru}^{3+}/\text{Ru}^{2+}$). Na janela de redução, observa-se dois processos reversíveis de redução de um elétron atribuídos à formação sequencial do ânion $\text{RupNDIp}^{\cdot-}$ e diânion RupNDIp^{2-} , respectivamente.

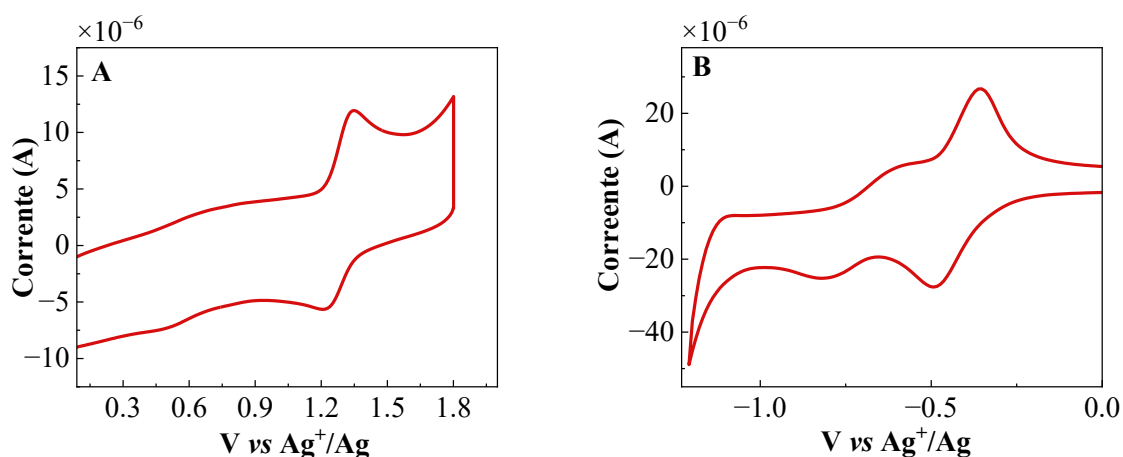


Figura 3.28. Voltamograma cíclico da díade RupNDIp em soluções de acetonitrila (TBAPF_6 , 0,1 M) e uma taxa de varredura de 100 mVs^{-1} . $E_{1/2}$ para $\text{Fc}^+/\text{Fc} = +0,635 \text{ V}$ medido sob as mesmas condições experimentais. (A) oxidação e (B) redução.

3.4.5.2. Espectroeletroquímica

Os estudos espectroeletroquímicos do composto pNDIp e da díade RupNDIp foram realizados em solução de DMSO com TBAPF_6 (0,1 M) para caracterizar espectroscopicamente as espécies reduzidas observadas na voltametria cíclica.

A Figura 3.29.A exibe a espectroeletroquímica do composto pNDIp, a aplicação do primeiro potencial de redução (-0,22 V) resulta na diminuição das bandas na região do UV, com $\lambda_{\text{MÁX}} = 365$ e 385 nm, atribuídas ao pNDIp neutro, e na concomitante formação de novas bandas na região do visível, com $\lambda_{\text{MÁX}} = 475, 607, 713$ e 790 nm, associadas à formação do radical ânion ($\text{pNDIp}^{\bullet-}$). Além disso, observa-se a presença de um ponto isosbético ($\lambda = 400$ nm), indicando que a redução ocorre em uma única espécie, conforme a transformação $\text{pNDIp} \rightarrow \text{pNDIp}^{\bullet-}$. A eletrólise oxidativa demonstra o retorno das bandas características da espécie neutra inicial, $\text{pNDIp}^{\bullet-} \rightarrow \text{pNDIp}$, evidenciando que se trata de um processo reversível (FIGURA 3.29.A; inserção).

Na eletrólise realizada com o segundo potencial de redução (-0,62 V), observa-se que ocorre inicialmente a formação da espécie monorradical $\text{pNDIp} \rightarrow \text{pNDIp}^{\bullet-}$, seguida pela redução adicional de $\text{pNDIp}^{\bullet-} \rightarrow \text{pNDIp}^{2-}$, Figura 3.29.B. Esse processo resulta no desaparecimento dos sinais de $\text{pNDIp}^{\bullet-}$ e no surgimento de novas bandas proeminentes com $\lambda_{\text{MÁX}} = 398, 421, 567$ e 617 nm. Cada uma das reduções também possui um ponto isosbético, confirmando que cada redução é de uma única espécie formando uma única espécie. A oxidação dessas espécies restaurou as propriedades moleculares originais do composto neutro, evidenciando a natureza reversível do processo (FIGURA 3.29.B, inserção).

A Figura 3.29.C apresenta a comparação entre os espectros de absorção UV-Vis da espécie neutra e aqueles das espécies formadas ao final das eletrólises redutivas. Os resultados espectroeletroquímicos obtidos estão em concordância com os descritos na literatura para derivados de naftalenodiimida, que exibem uma redução eletroquímica reversível em duas etapas dependentes do potencial.¹³³ A primeira etapa está associada à formação de um ânion radical, seguida pela geração do diânion na segunda etapa de redução.

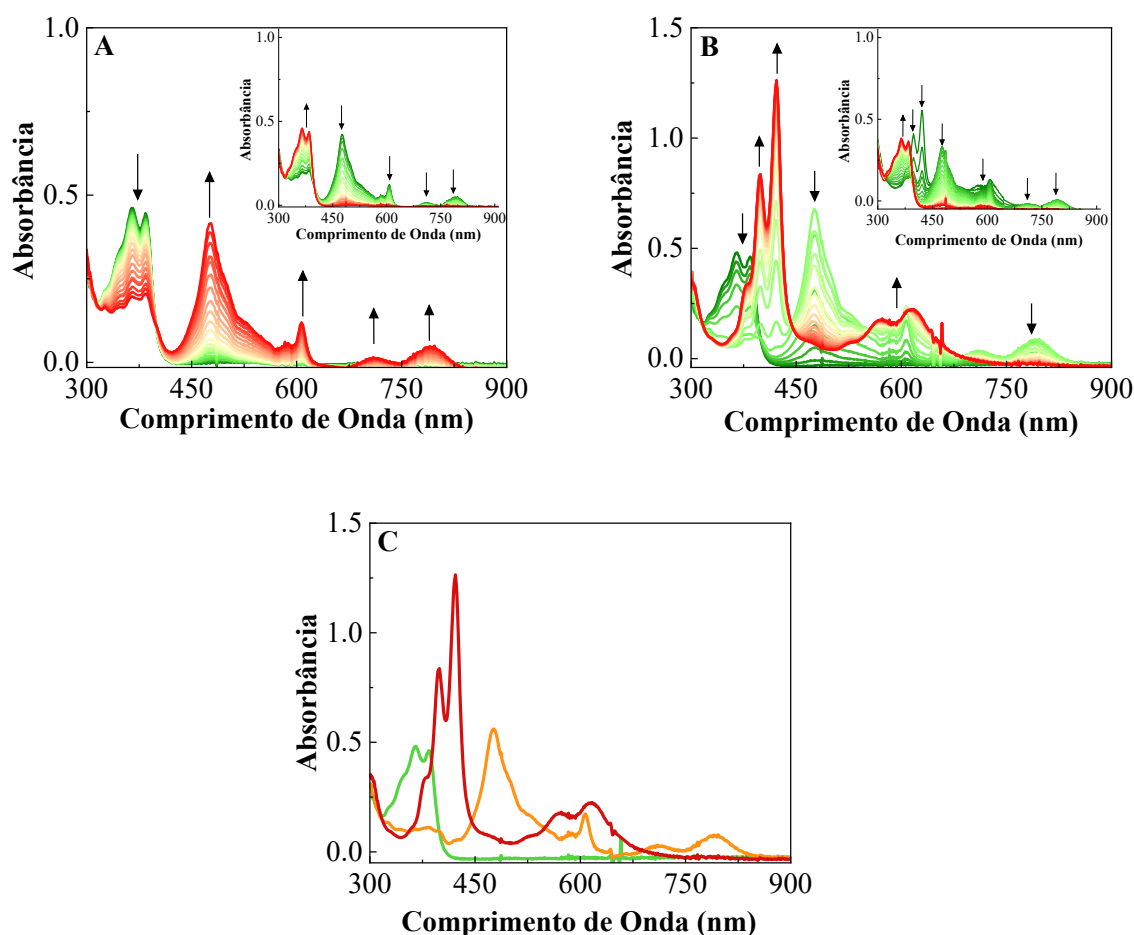


Figura 3.29. Análise espectroeletroquímica do composto pNDIp em solução de DMSO (TBAPF_6 , 0,1 M) sob atmosfera de N_2 com potenciais aplicados: (A) $E = -0,22$ V (*vs* Ag^+/Ag como pseudorreferência); gráfico inserido com potencial aplicado de 0 V, (B) $E = -0,56$ V (*vs* Ag^+/Ag como pseudorreferência); gráfico inserido com potencial aplicado de 0 V e (C) comparação dos espectros do composto pNDIp (linha verde), pNDIp $\bullet^-$ (linha laranja) e pNDIp $^{2-}$ (linha vermelha).

A Figura 3.30.A apresenta os espectros de absorção UV-Vis obtidos durante a eletrólise da díade Ru(pNDIp). No primeiro potencial de redução (-0,37 V), observa-se a diminuição das bandas atribuídas ao componente {pNDIp}, acompanhada da formação de novas bandas na região do visível com máximos de absorção em 475, 607, 713 e 790 nm, correspondentes à formação do ânion $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp}^{\bullet-})]^{2+}$. Esses resultados estão em concordância com os dados registrados para o composto pNDIp. Além disso, verifica-se que a oxidação dessa espécie restaura as propriedades moleculares originais, indicando a reversibilidade do processo (FIGURA 3.30.A, inserção).

Na eletrólise redutiva, com a aplicação do segundo potencial de redução (-0,73V), observa-se inicialmente a formação da espécie ânion $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp}^{\bullet-})]^{2+}$, seguida pela geração da espécie diânion $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp}^{2-})]^{2+}$, caracterizada pelo aparecimento de novas bandas com $\lambda_{\text{MÁX}} = 402, 422 \text{ e } 608 \text{ nm}$, conforme mostrado na Figura 3.30.B. A eletrólise oxidativa evidencia o retorno das espécies $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp}^{2-})]^{2+} \rightarrow [\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp}^{\bullet-})]^{2+}$, acompanhado da recuperação concomitante da espécie neutra inicial $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp}^{\bullet-})]^{2+} \rightarrow [\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$, indicando a reversibilidade do processo (FIGURA 3.30.B, inserção).

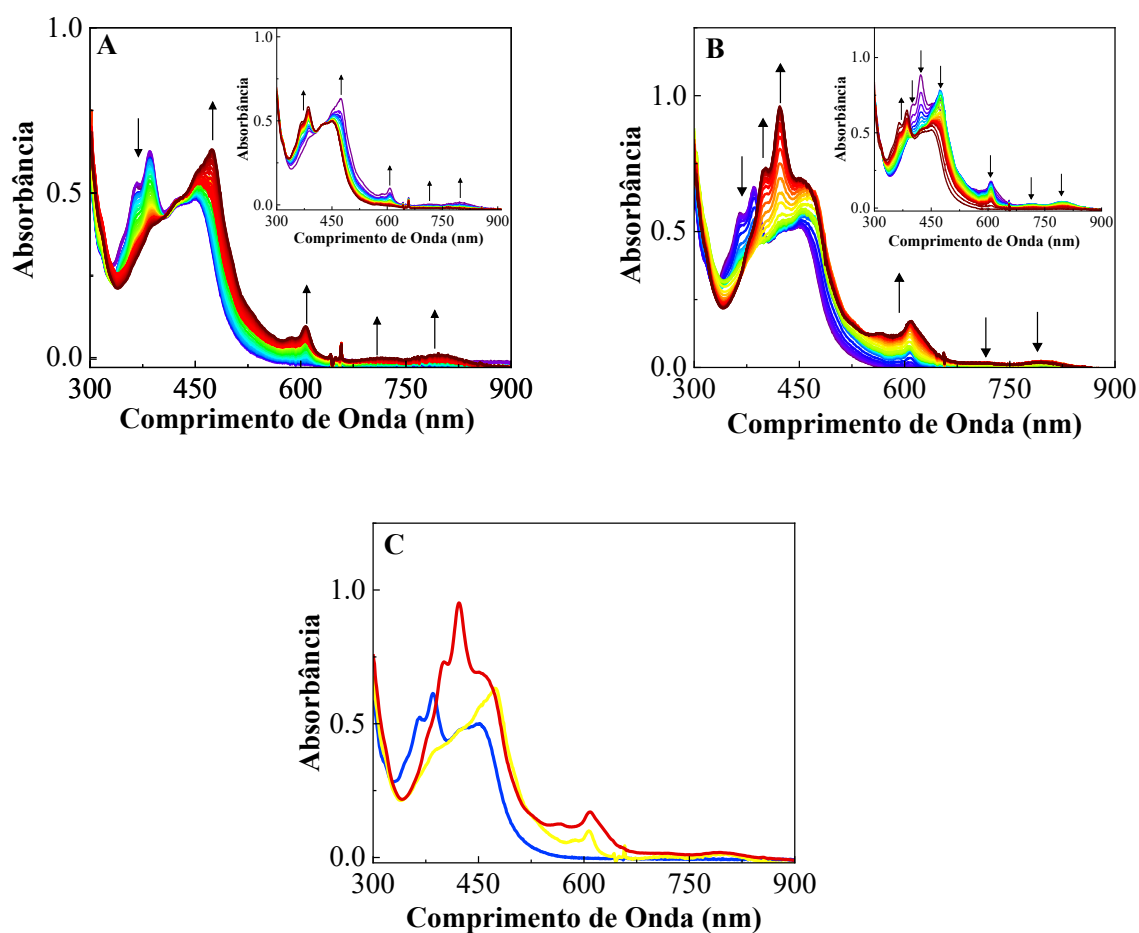


Figura 3.30. Análise espectroeletroquímica da díade RupNDIp em solução de DMSO (TBAPF_6 , 0,1 M) sob atmosfera de N_2 com potenciais aplicados: (A) $E = -0,37$ V (vs Ag^+/Ag como pseudorreferência); gráfico inserido com potencial aplicado de 0 V, (B) $E = -0,73$ V (vs Ag^+/Ag como pseudorreferência); gráfico inserido com potencial aplicado de 0 V e (C) comparação dos espectros do composto RupNDIp (linha azul), RupNDIp $^{\bullet-}$ (linha amarela) e RupNDIp $^{2-}$ (linha vermelha).

3.4.6. Comportamento Fotoquímico

3.4.6.1. Espectroscopia de absorção UV-Vis e luminescência

Os derivados de naftalenodiimidas são conhecidos por participar de reações intermoleculares de transferência de elétrons fotoinduzidas (TE), favorecidas por sua característica de bons receptores de elétrons.^{133,134} Com o objetivo de avaliar a capacidade do composto pNDIp e da díade RupNDIp de participar desses processos, foi realizada a fotoirradiação dessas substâncias utilizando lâmpadas de 350 e 450 nm, em solução de DMSO, na presença e ausência de oxigênio molecular utilizando técnicas de espectroscopia de absorção UV-Vis e luminescência.

As reações de TE do composto pNDIp foi avaliada usando uma lâmpada de 350 nm. Sob atmosfera inerte e no escuro, o espectro de absorção manteve-se inalterado (FIGURA 3.31.A). Enquanto, a fotólise do pNDIp resultou no consumo das bandas como $\lambda_{M\acute{A}X}$ = 345, 365 e 385 nm para transições eletrônicas $S_0 \rightarrow S_2$, $S_0 \rightarrow S_1$ e $S_0 \rightarrow S_0$, acompanhadas, simultaneamente, pelo aparecimento novas bandas de absorção com $\lambda_{M\acute{A}X}$ = 476, 607, 710 e 790 nm (FIGURA 3.31.B) característica da formação do ânion radical (pNDIp^{•-}).¹³⁵ Esses resultados colaboram para a TE favorecida pela característica doadora e aprótica do solvente DMSO no estado excitado.

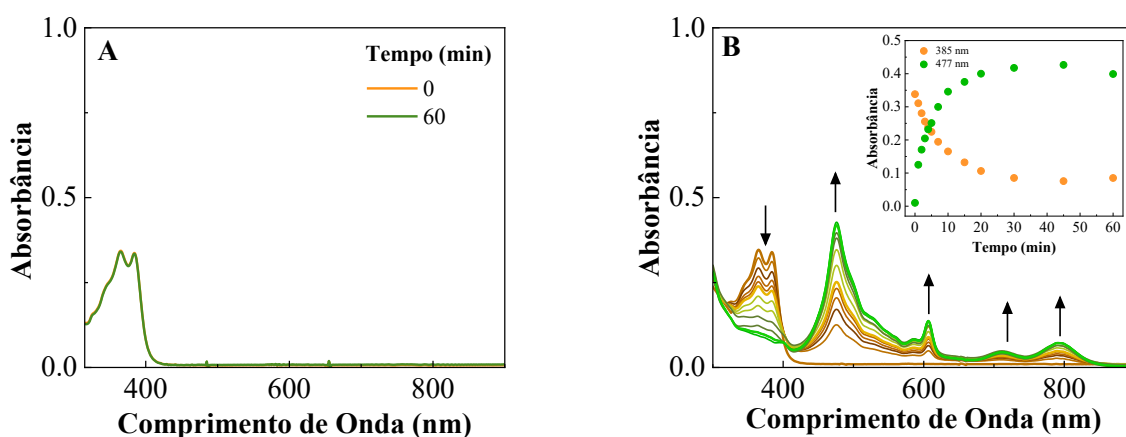


Figura 3.31. (A) Espectro de absorção UV-Vis da solução sob atmosfera inerte no escuro (0 e 60 minutos) e (B) Evolução no espectro de absorção durante a fotólise com luz de 350 nm durante 60 minutos de irradiação.

Na presença de oxigênio, o espectro de absorção do composto pNDIp monitorado no escuro também não apresentou mudanças (FIGURA 3.32.A). Quando irradiado com luz de 350 nm não foi observado a formação das bandas de absorção correspondentes ao radical ânion durante 120 minutos de irradiação (FIGURA 3.32.B). Entretanto, ocorre uma diminuição nos máximos de absorção, esse comportamento pode ser resultante da formação de agregados fotoinduzido.¹³⁶

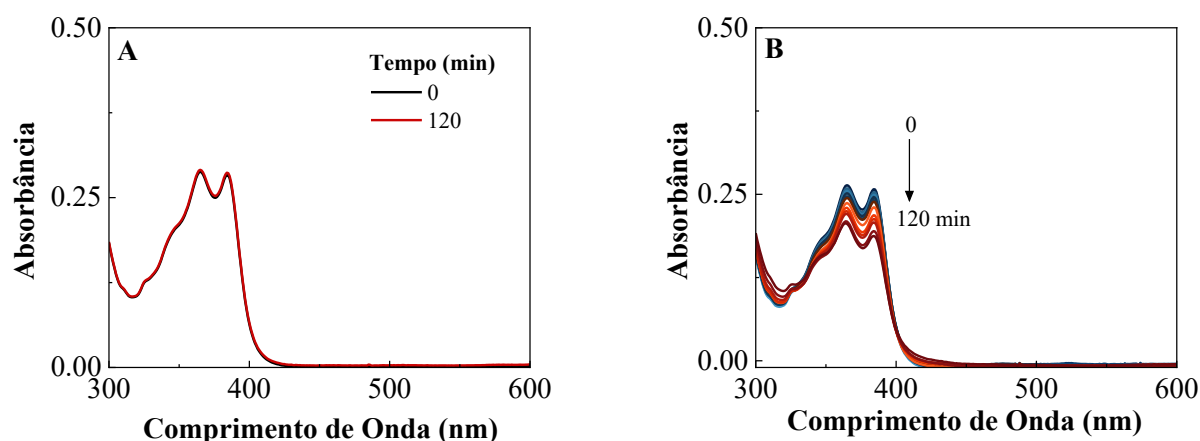


Figura 3.32. (A) Espectro de absorção UV-Vis da solução sob atmosfera inerte no escuro (0 e 120 minutos) e (B) Evolução no espectro de absorção durante a fotólise com luz de 350 nm (120 minutos).

A fim de verificar se a díade RupNDIp também seria capaz de participar de processos de TE foram realizados estudos em condições semelhantes ao composto pNDIp. No escuro e sob atmosfera inerte tanto o espectro de absorção quanto o de emissão do complexo permaneceram inalterados, Figura 3.33.

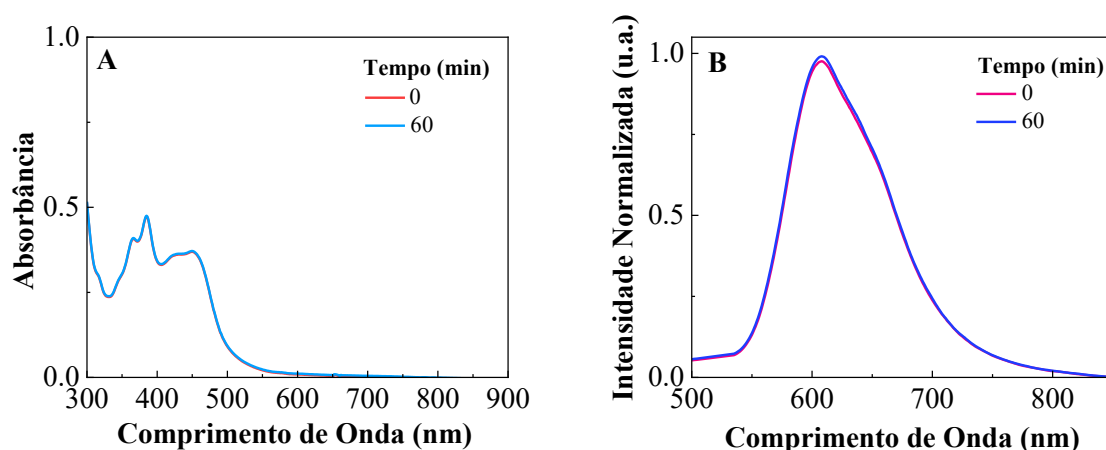


Figura 3.33. (A) Espectro de absorção UV-Vis da solução sob atmosfera inerte no escuro (0 e 60 minutos) e (B) emissão (sob atmosfera inerte no escuro (0 e 60 minutos)).

Enquanto, a irradiação com luz de 350 nm levou ao consumo da absorção da componente pNDIp e ao aparecimento concomitante de novas bandas na região do visível e infravermelho próximo similares as observadas no composto pNDIp, correspondendo ao ânion radical o $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp}^{\cdot-})]$ (FIGURA 29A). Esse comportamento indica que a formação do ânion depende da componente {pNDIp}.

Quando a fotólise é acompanhada pelo espectro de emissão (FIGURA 3.34.B), observa-se o decaimento do máximo de emissão em 610 nm e alteração no formato da banda, esse comportamento pode ser resultante da reabsorção de luz correspondente ao ânion radicalar na mesma região de absorção da componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$.

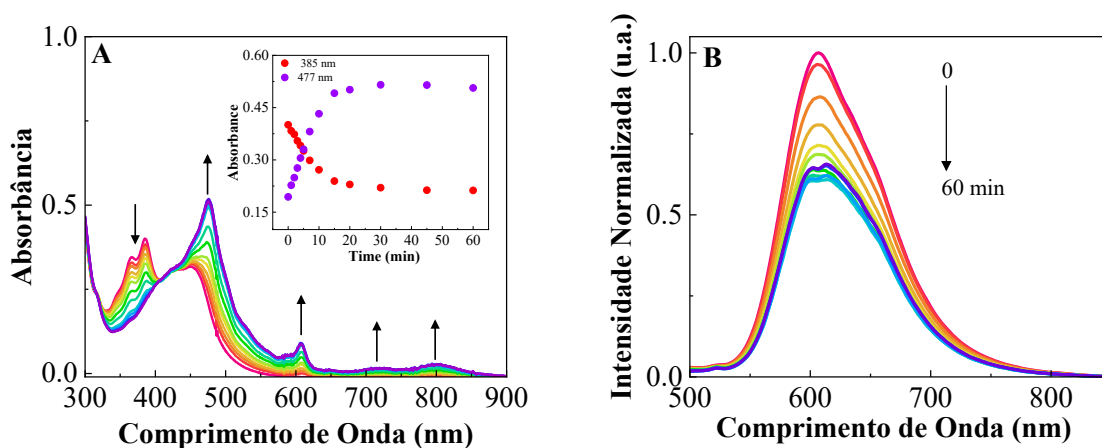


Figura 3.34. Alterações nos espectros de (A) absorção durante a fotólise com luz de 350 nm e (B) de emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450$ nm) nm sob atmosfera inerte durante 60 minutos de irradiação com luz de 350 nm. (60 minutos).

O comportamento fotoquímico do complexo também foi avaliado na região da componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$ utilizando luz de 450 nm (luz azul) na presença e ausência de oxigênio molecular. As figuras 3.35 e 3.36 demonstram que tanto em condições de atmosfera de nitrogênio, como de oxigênio não foram observadas alterações nos espectros de absorção e emissão do complexo. Os resultados

obtidos indicam que o processo de transferência de elétrons depende apenas da componente pNDIp, corroborando que a absorção na região de 450 nm é proveniente apenas da componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$.

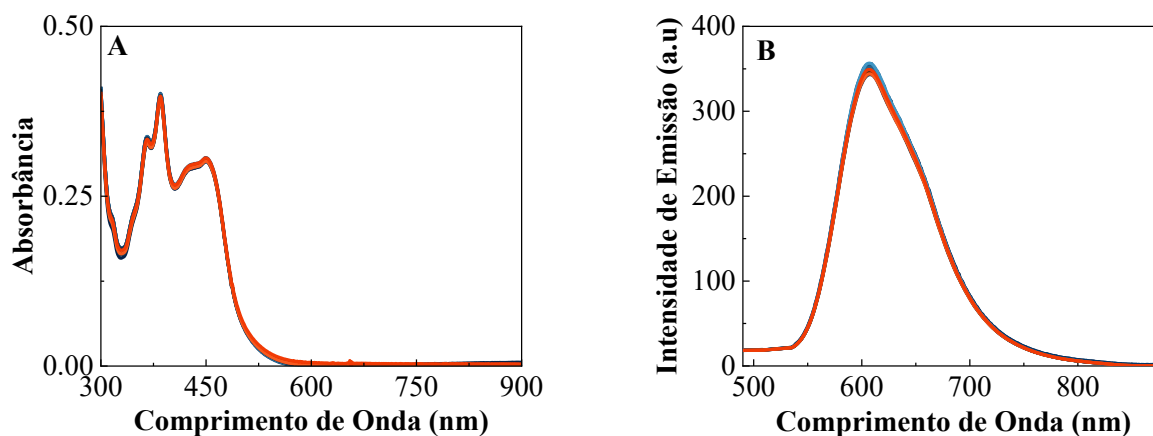


Figura 3.35. Fotólise da díade RupNDIp com luz de irradiação de 450 nm em solução DMSO desaerada com N_2 monitorada por (A) Absorção e (B) Emissão ($\lambda_{\text{EX}}=450$ nm) (tempo de irradiação = 180 minutos).

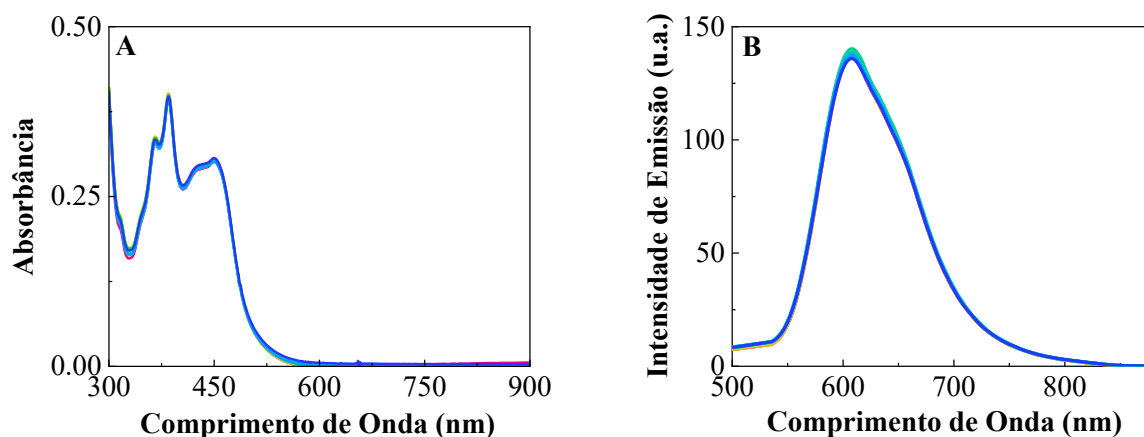


Figura 3.36. Fotólise da díade RupNDIp com luz de irradiação de 450 nm em solução DMSO sob atmosfera de oxigênio por (A) Absorção e (B) Emissão ($\lambda_{\text{EX}}=450$ nm) (tempo de irradiação = 180 minutos).

Para avaliar o efeito do solvente nas reações de TE, os mesmos experimentos foram reproduzidos em solução de acetonitrila para a díade RupNDIp, devido à baixa solubilidade do composto pNDIp nesse solvente não foi possível realizar as fotólise em acetonitrila.

As figuras 3.37 demonstram que a irradiação na região da componente {pNDIp} com luz de 350 nm não houve alteração nos espectros de absorção e emissão da díade. Os resultados obtidos diferem dos observados em solução de DMSO em atmosfera inerte, indicando que o processo de transferência de elétrons depende da natureza doadora do solvente. A falta de reatividade também foi observada em atmosfera de oxigênio molecular, confirmando que o processo independe da presença ou ausência de oxigênio em solução de acetonitrila, conforme as Figuras 3.38.

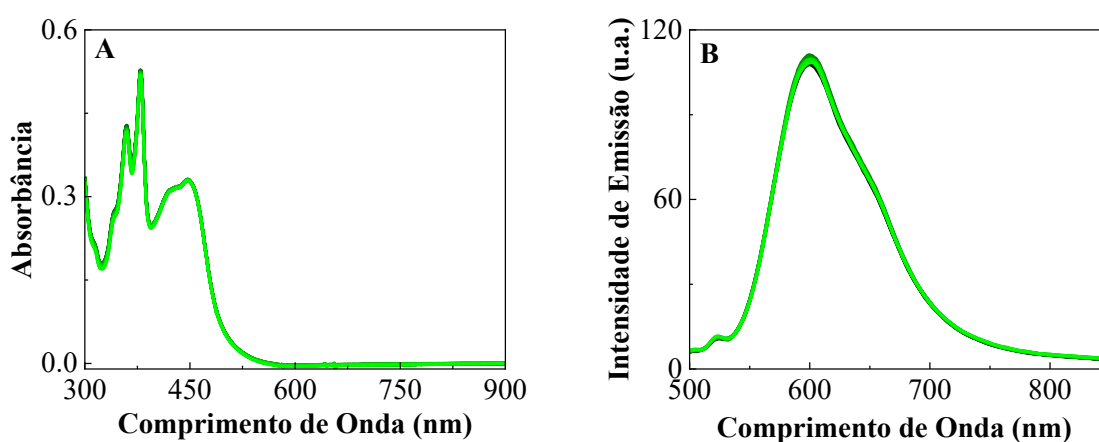


Figura 3.37. Fotólise da díade RupNDIp com luz de irradiação de 350 nm em solução DMSO sob atmosfera de nitrogênio por (A) Absorção e (B) Emissão ($\lambda_{\text{EX}}=450$ nm) (tempo de irradiação = 180 minutos).

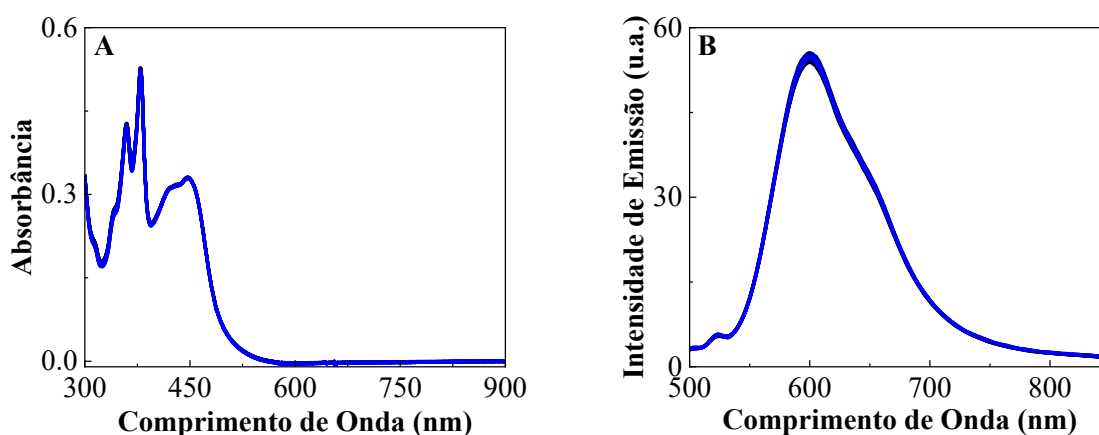


Figura 3.38. Fotólise da díade RupNDIp com luz de irradiação de 350 nm em solução de acetonitrila sob atmosfera de oxigênio por (A) Absorção e (B) Emissão (λ_{EX} =450 nm) (tempo de irradiação = 180 minutos).

O processo de transferência de elétrons também foi avaliado na região da componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$ utilizando luz de 450 nm na presença e ausência de oxigênio molecular. As figuras 3.39 e 3.40 mostram que tanto em condições de atmosfera de nitrogênio, como de oxigênio não foram observadas alterações nos espectros de absorção e emissão da díade. Esses resultados são semelhantes aos obtidos em solução de DMSO, confirmando que o processo de transferência de elétrons depende da irradiação em 350 nm referente a componente $\{\text{pNDIp}\}$ e da natureza doador do solvente.

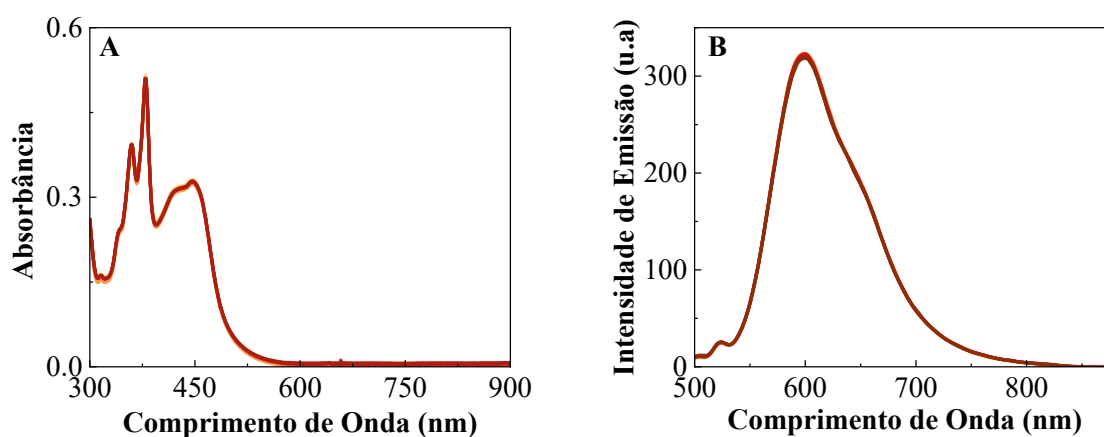


Figura 3.39. Espectros de (A) absorção e (B) emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450$ nm) da díade RupNDIp (concentração = 20 μM) em solução de acetonitrila em atmosfera de nitrogênio irradiada com luz de 450 nm durante 180 minutos.

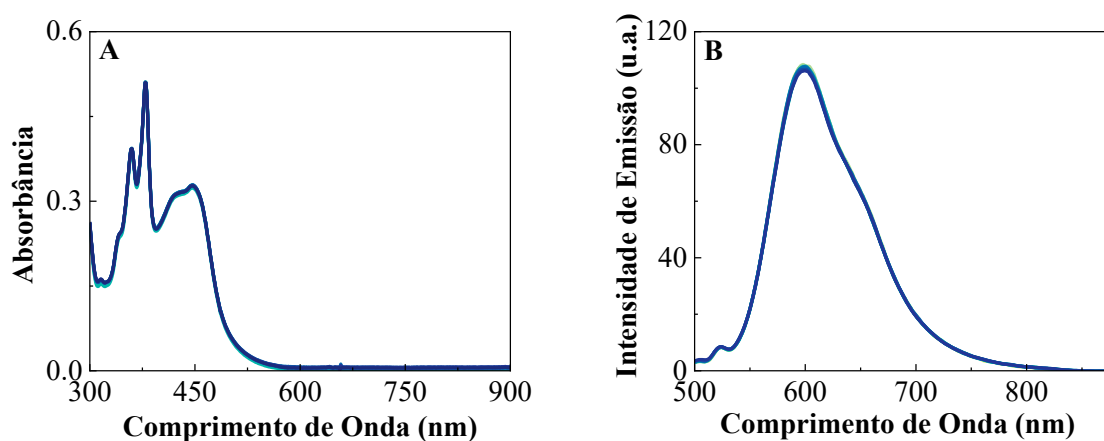


Figura 3.40. Espectros de (A) absorção e (B) emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450$ nm) da díade RupNDIp (concentração = 20 μM) em solução de acetonitrila em atmosfera de oxigênio irradiada com luz de 450 nm durante 180 minutos.

3.4.5.2. Espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR)

O comportamento fotoquímico do composto pNDIp e da díade RupNDIp foi avaliado utilizando a técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR) para confirmar e caracterizar a estrutura do ânion formado. O estudo foi realizado na presença e na ausência de oxigênio molecular, no escuro e sob iluminação com luz de comprimentos de onda de 350 e 450 nm, utilizando DMSO e acetonitrila como solventes. As medidas em solução de acetonitrila foram possíveis apenas para a díade RupNDIp devido à baixa solubilidade do composto pNDIp nesse solvente.

As reações de transferência de elétrons (TE) fotoinduzida do composto pNDIp foram monitoradas no escuro e sob irradiação com luz de 350 nm durante 30 minutos em solução de DMSO na ausência e presença de oxigênio molecular, Figura 3.41. Conforme a Figura 3.41.A, o espectro de EPR registrado no escuro e sob atmosfera de N₂ não exibe nenhum sinal, visto que o composto pNDIp é uma espécie diamagnética e, portanto, inativa no EPR. Por outro lado, a fotólise resultou no aparecimento de amplas linhas hiperfinas, características do ânion radical,¹³⁷ confirmando a formação da espécie paramagnética pNDIp^{•-} via TE, originada do estado excitado. Esses resultados estão em concordância com os dados obtidos durante a fotólise do composto monitorada por espectroscopia de absorção UV-Vis.

Os ensaios realizados sob atmosfera de oxigênio molecular demonstram que no escuro não ocorre a formação do ânion radicalar, Figura 3.41.B. Contudo, durante a irradiação com luz de 350 nm observa-se a formação de pequeno sinal característico do ânion radicalar (FIGURA 3.41.B). Quando a intensidade do sinal do ânion formado durante a irradiação sob atmosfera inerte e na presença de oxigênio molecular são comparados, observa-se que a atmosfera de N₂ favorece a formação do ânion, isso provavelmente ocorre devido a supressão do estado excitado pelo O₂.

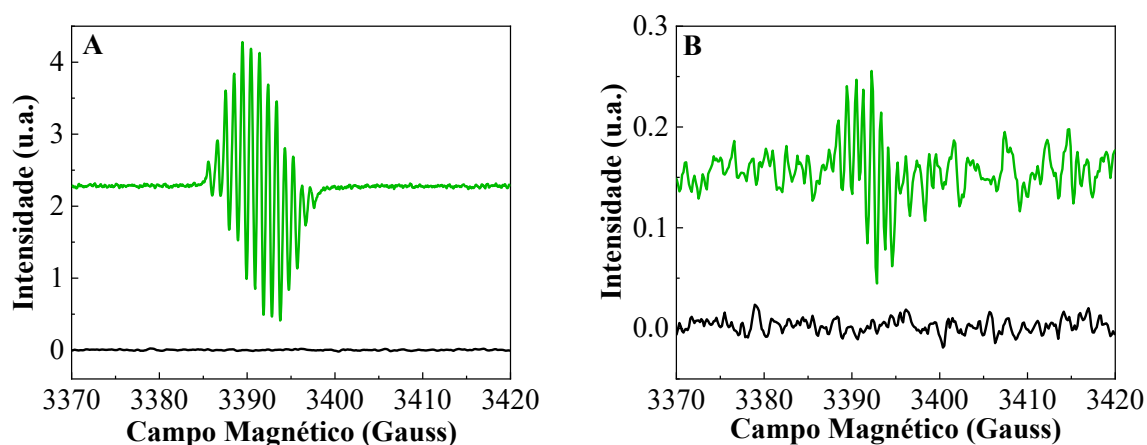


Figura 3.41. Espectros de EPR do composto pNDIp no escuro (linha preta) e irradiado com luz de 350 nm durante 30 minutos (linha verde) em atmosfera de (A) N₂ e (B) O₂ em solução de DMSO.

Os sinais obtidos experimentalmente foram comparados com o simulado (FIGURA 3.42), assumindo a interação do spin desemparelhado com dois nitrogênios equivalentes e dois conjunto de hidrogênios do anel diferindo ligeiramente (FIGURA 3.43), isso confirma a deslocalização do elétron desemparelhado nos anéis centrais aromáticos do ligante pNDIp e sugere que a densidade de spin desemparelhado não está distribuída uniformemente entre os núcleos aparentemente equivalentes.¹³⁸

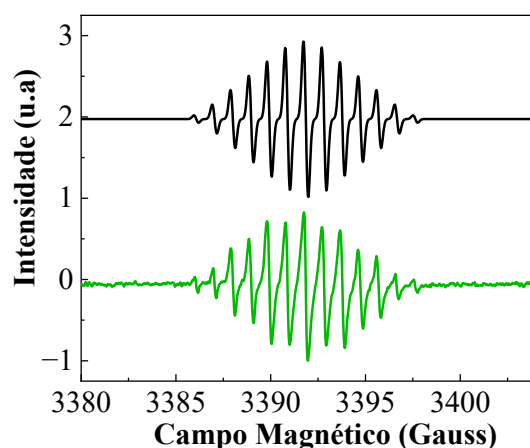


Figura 3.42. Comparação dos espectros de EPR do composto pNDIp simulado (linha preta) e obtido experimentalmente (linha verde).

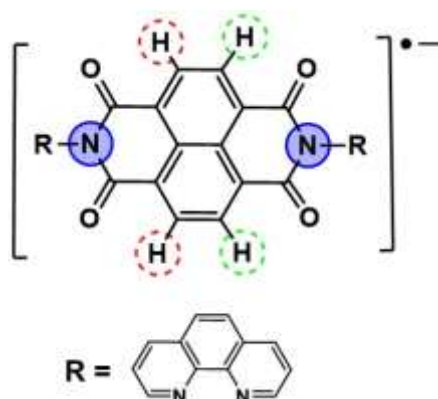


Figura 3.43. Ilustração da deslocalização do elétron desemparelhado nos anéis aromáticos do composto pNDIp.

Nos espectros de EPR da díade RupNDIp em solução de DMSO, observou-se que em atmosfera de nitrogênio e no escuro não há sinal característico do ânion radicalar, mas exibe um sinal semelhante ao observado para o composto pNDIp após 30 min de irradiação com luz 350 nm (FIGURA 3.44.A), esses resultados reafirmam que o ânion formado é proveniente da componente {pNDIp}.

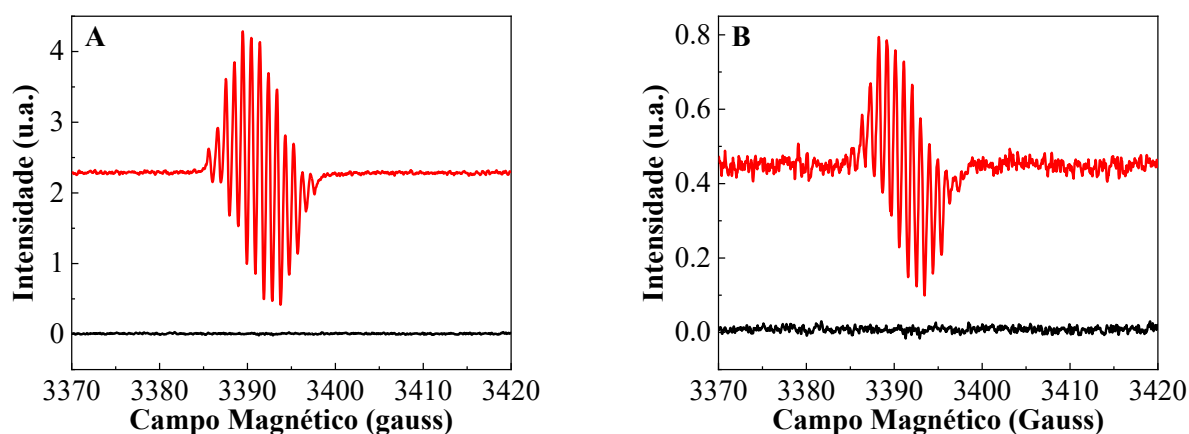


Figura 3.44. Espectros de EPR da díade RupNDIp ($c = 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de DMSO no escuro (linha preta) e irradiado (linha vermelha) com comprimento de onda de 350 nm em atmosfera de (A) N_2 e (B) O_2 durante 30 minutos de irradiação.

Os ensaios conduzidos sob atmosfera de oxigênio molecular demonstram que na díade RupNDIp também houve a formação do ânion (FIGURA 3.44.B), embora a quantidade de ânion formado seja menor quando comparado a intensidade dos sinais obtidos em atmosfera de N₂, sugerindo que a formação do ânion radical é suprimida pelo O₂.

A comparação dos sinais obtidos para o composto pNDIp e a díade RupNDIp (FIGURA 3.45) indica uma semelhança nos sinais das hiperfinas, com um total de 13 linhas, confirmando que a mesma espécie ânion radicalar está sendo formada e está associada ao componente {pNDIp}. Observa-se um pequeno alargamento das linhas no espectro de EPR da díade, resultante das diferenças no movimento rotacional do [Ru(phen)₂(pNDIp^{•-})]²⁺ em comparação com o composto pNDIp^{•-}.

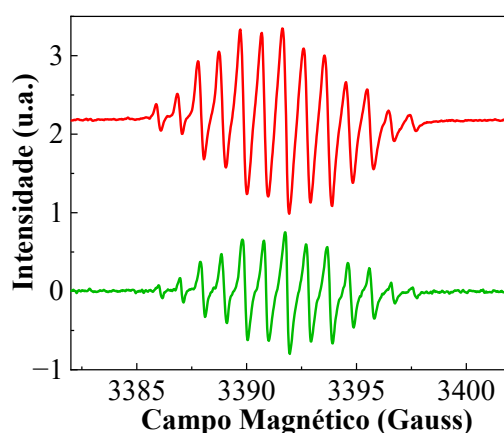


Figura 3.45. Comparação dos espectros de EPR do composto pNDIp (linha verde) e da díade RupNDIp (linha vermelha) após irradiação com luz de 350 nm durante 30 minutos em solução de DMSO.

A fotólise da díade também foi monitorada no componente {Ru(phen)₃}²⁺ utilizando luz de 450 nm. Como mostrado na Figura 3.46, tanto no escuro quanto em atmosferas de N₂ e O₂, não se observa sinal característico do ânion

$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp}^{\bullet-})]^{2+}$. Esses resultados reafirmam que o processo de transferência de elétrons depende exclusivamente do componente $\{\text{pNDIp}\}$ e corroboram que a absorção na região de 450 nm é atribuída unicamente ao componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$.

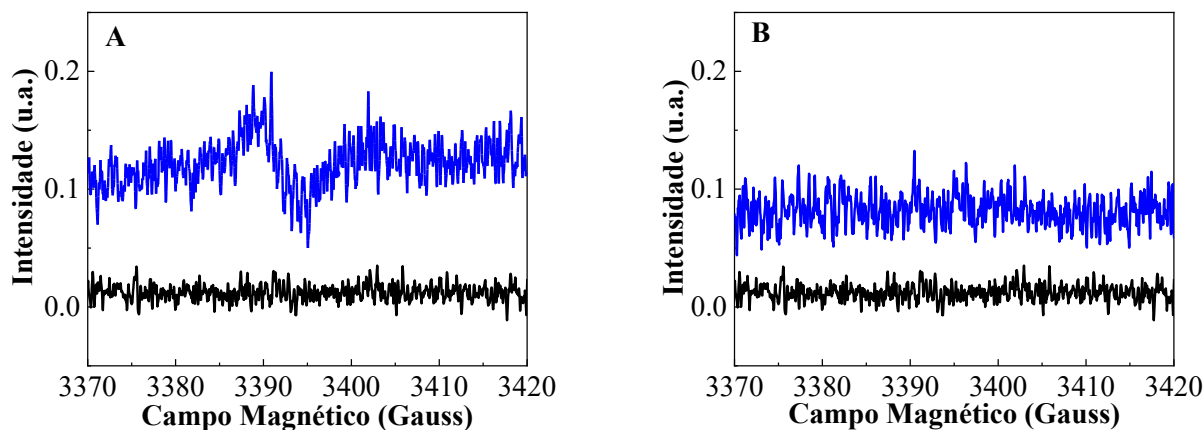


Figura 3.46. Espectros de EPR da díade Ru(pNDIp) ($c = 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) no escuro (linha preta) e irradiado (linha azul) com comprimento de onda de 450 nm em atmosfera de (A) N_2 e (B) O_2 durante 30 minutos de irradiação em solução de DMSO.

O processo de transferência de elétrons (TE) da díade Ru(pNDIp) também foi avaliado em solução de acetonitrila, com o objetivo de analisar o efeito do solvente nessa reação. Para isso, as reações foram monitoradas no escuro e sob irradiação com lâmpadas de 350 nm e 450 nm durante 30 minutos, na presença e ausência de atmosfera de O_2 . Os espectros obtidos estão apresentados na Figura 3.47.

Observa-se que, no escuro e em atmosfera de nitrogênio (FIGURA 3.47.A), não há alteração nos espectros de EPR, indicando a ausência de formação do ânion radicalar. Esses resultados são semelhantes aos obtidos em solução de DMSO (FIGURA 3.41.A), confirmando que os processos de transferência de elétrons dependem do estado excitado.

Diferentemente dos resultados obtidos em solução de DMSO, sob irradiação com luz de 350 nm, correspondente à absorção do componente {pNDIp} da díade, não há formação do ânion. Esses resultados confirmam a ausência do ânion radicalar, conforme demonstrado nos ensaios utilizando as técnicas de UV-Vis e luminescência discutidos na seção anterior. Dessa forma, fica evidenciado que a transferência de elétrons depende da natureza do solvente doador e do comprimento de onda de excitação. Além disso, a ausência da formação da espécie ânion independe da presença de oxigênio (FIGURA 3.47.B).

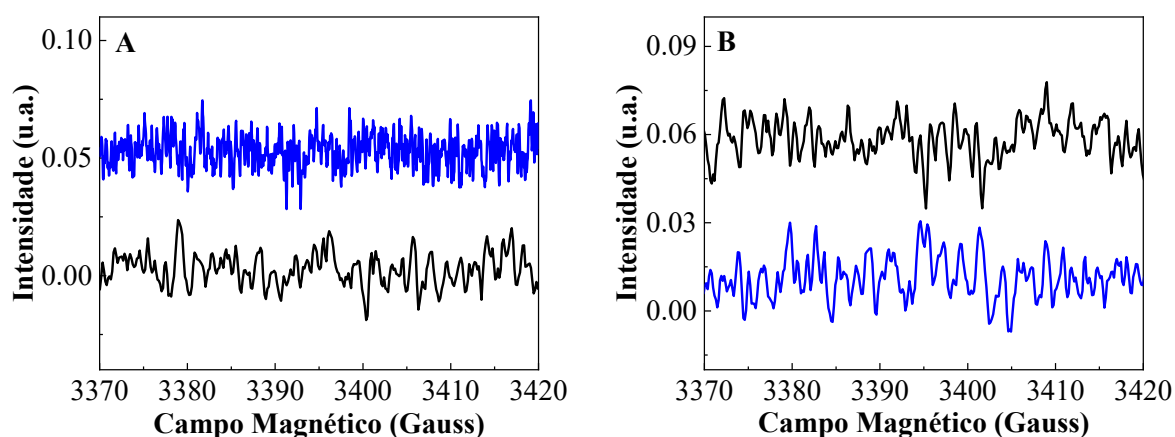


Figura 3.47. Espectros de EPR da díade RupNDIp ($c = 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) no escuro (linha preta) e irradiado (azul) com comprimento de onda de 350 nm em atmosfera (A) de N_2 e (B) de O_2 durante 30 minutos.

A ausência do ânion radical também foi observada na fotólise com 450 nm associado a componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$ na presença e ausência de oxigênio, Figura 3.48. Os resultados obtidos são semelhantes aos de solução em DMSO, visto que o processo de transferência de elétron depende do comprimento de onda de excitação da componente $\{\text{pNDIp}\}$.

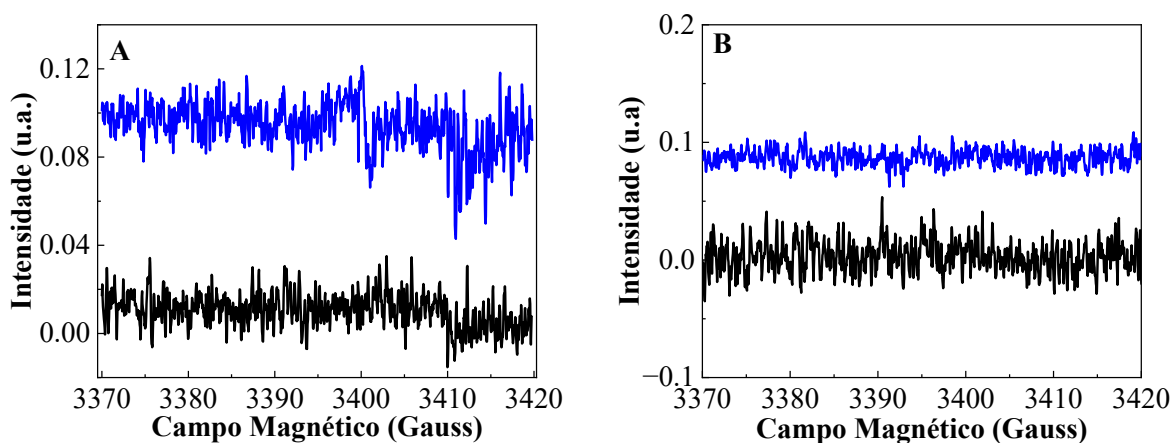


Figura 3.48. Espectros de EPR da díade RupNDIp ($c = 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) no escuro (linha preta) e irradiado (azul) com comprimento de onda de 450 nm em atmosfera (A) de N_2 e (B) de O_2 durante 30 minutos.

3.4.7. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio ($^1\text{O}_2$)

Na seção 3.4.3, foi relatado que a emissão da díade RupNDIp em 610 nm depende do oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$). Com base nesse resultado, foi investigado se a díade RupNDIp é capaz de transferir energia do estado excitado tripleto ($^3\text{MLCT}$) para excitar eletronicamente o $^3\text{O}_2$, formando oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). A capacidade da díade RupNDIp de gerar $^1\text{O}_2$ em solução de DMSO foi avaliada diretamente por meio da emissão no infravermelho próximo, em torno de 1270 nm, correspondente à transição de desativação do $^1\text{O}_2$ para o estado fundamental.¹³⁹

Os espectros de emissão de $^1\text{O}_2$ obtidos utilizando a díade RupNDIp e o complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, após excitação com um laser a 450 nm, estão apresentados na Figura 3.49. Os resultados indicam que a díade RupNDIp é

capaz de transferir energia para excitar o $^3\text{O}_2$, gerando $^1\text{O}_2$ quando irradiada com luz a 450 nm, atribuída ao componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$. O tempo de vida do oxigênio singleto, de 0,370 μs , foi determinado a partir da curva de decaimento da fosforescência em 1270 nm (FIGURA 3.49.A). Esse valor é inferior ao observado para $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, de 0,40 μs (FIGURA 3.49.B), preparado nas mesmas condições ($\text{Abs} = 0,3$; $\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$), o que pode ser atribuído ao processo competitivo de formação do estado de separação de carga (^3CSS).

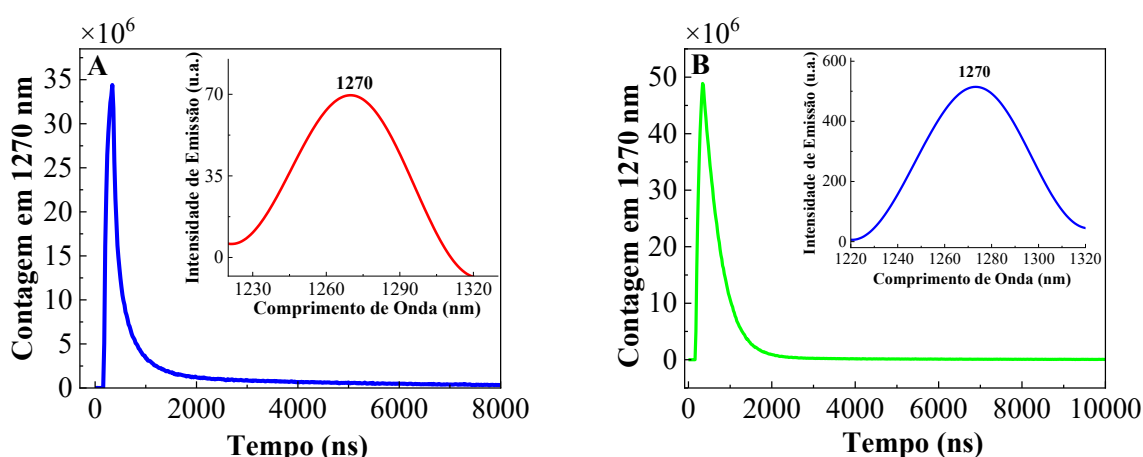


Figura 3.49. Decaimento da intensidade de luminescência do oxigênio singleto em DMSO a 1270 nm ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$); inserção: espectro de emissão de $^1\text{O}_2$ gerado pela díade (A) RupNDIp e pelo (B) complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em solução de DMSO.

A capacidade de formação de espécies reativas de oxigênio $^1\text{O}_2$ pela díade RupNDIp também foi avaliada por meio do método indireto, utilizando a técnica de espectroscopia de absorção UV-Vis em solução de DMSO.¹⁴⁰

Para isso, o ácido 9,10-antracenediilbis (metileno) dimalônico (ABDA) foi utilizado como sonda de $^1\text{O}_2$. De acordo com a literatura, quando ocorre a fotoexcitação de um composto fotossensibilizador (PS), forma-se um estado tripleto, que atua como doador de energia para o oxigênio molecular, gerando a espécie reativa $^1\text{O}_2$. O $^1\text{O}_2$ formado reage com o ABDA, originando uma espécie

de endoperóxido, o que resulta na perda de absorbância, conforme ilustrado na Figura 3.50.¹⁴¹ Dessa forma, a taxa de degradação do ABDA é diretamente proporcional à taxa de geração de $^1\text{O}_2$ e pode ser monitorada pela diminuição da absorbância em 380 nm.

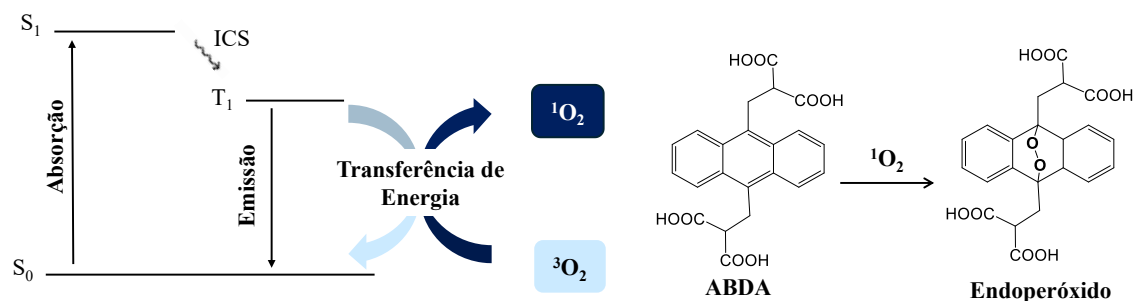


Figura 3.50. Diagrama esquemático da geração de $^1\text{O}_2$ e reação química do ABDA com $^1\text{O}_2$.

A Figura 3.51.A apresenta os espectros de absorção obtidos para o ABDA irradiado isoladamente a 450 nm, evidenciando que o ABDA permanece estável nesse comprimento de onda. Por outro lado, quando a solução contendo ABDA e a díade RupNDIp é irradiada nas mesmas condições, observa-se uma diminuição na absorção da sonda devido à formação da espécie endoperóxido, o que indica a geração de $^1\text{O}_2$, Figura 3.51.B. Esses resultados confirmam que o estado responsável pela transferência de energia para o oxigênio molecular, gerando espécies reativas de $^1\text{O}_2$ é caracterizado pelo estado $^3\text{MLCT}$.

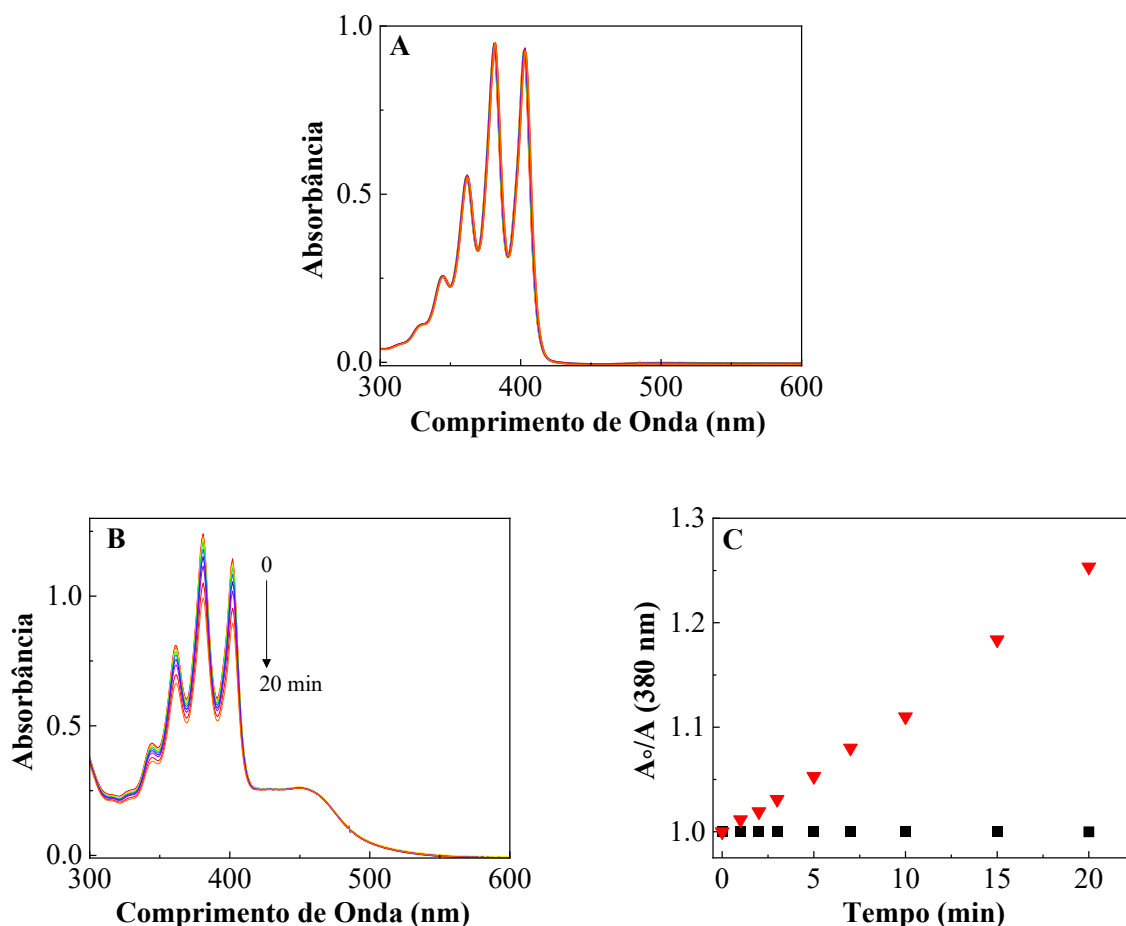


Figura 3.51. Espectros de absorção do ABDA ($c = 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) irradiado com luz de 450 nm em solução de DMSO (A) solução contendo somente ABDA como controle, na presença (B) da díade RupNDIp ($c = 20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e (C) consumo da banda de absorção do ABDA através da relação A_0/A correspondendo a absorbância do ABDA em 380 nm em relação ao tempo de irradiação do ABDA sozinho (preto) e na presença da díade RupNDIp (vermelho).

A relação entre o consumo do ABDA (A_0/A) em relação ao tempo de irradiação evidencia uma relação linear de formação de $^1\text{O}_2$, indicando uma correspondência de um para um (FIGURA 3.51.C). Esses resultados demonstram o potencial desse composto para aplicação como fotossensibilizador (FS) em terapias fotodinâmicas, tanto para o tratamento de doenças quanto para a terapia fotodinâmica antimicrobiana, nas quais o $^1\text{O}_2$ é o principal agente citotóxico responsável pelos danos oxidativos.¹⁴²

3.5. Conclusões do Capítulo

Este capítulo abordou a síntese e caracterização das propriedades fotofísicas, eletroquímicas e fotoquímicas da díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$ (RupNDIp). A estrutura desse composto foi confirmada pelas técnicas de espectrometria de massas e espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

Em solução de DMSO, a díade apresenta uma banda de absorção intensa na região ultravioleta ($\lambda_{\text{MÁX}} = 265 \text{ nm}$, $\epsilon = 83.000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), típica das transições internas de transferência de carga de ligantes aromáticos insaturados (ILCT), além de uma banda estruturada na região UV-vis (300-400 nm), atribuída ao centro aromático da naftalenodiimida. Ademais, foi observada uma banda de absorção larga na região do visível ($\lambda_{\text{MÁX}} = 450 \text{ nm}$, $\epsilon = 15.300 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), atribuída às transições de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT, $\text{Ru}, d\pi \rightarrow \text{phen}, \pi^*$). A díade apresenta um máximo de emissão em 610 nm ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$). Os estudos de absorção transiente demonstraram que a excitação da componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$ na díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$ resulta em uma rápida transferência de elétrons, gerando o estado excitado intermediário de separação de cargas (CSS) $\{\text{Ru}^{3+}(\text{phen})_2(\text{pNDIp}^{\cdot-})\}$. A atribuição dessa espécie como o estado de separação de cargas foi confirmada por comparação com as características espectrais obtidas na espectroeletroquímica UV-vis após a redução no primeiro potencial de redução negativo da componente $\{\text{pNDIp}\}$ da díade RupNDIp e pela fotólise com luz de 350 nm.

A díade RupNDIp mostrou-se estável quando submetida a temperaturas entre 10-80°C. Adicionalmente, a díade também apresentou estabilidade fotoquímica sob irradiação contínua na região da banda MLCT.

Além disso, a RupNDIp demonstrou capacidade de gerar $^1\text{O}_2$. Esses resultados indicam seu potencial aplicação como FS em terapia fotodinâmica tanto para tratamento de doenças quanto para terapia fotodinâmica antimicrobiana.

Capítulo 4:

Efeitos da díade Ru(phen)-
naftalenodiimida na agregação do
hIAPP

4.1. Introdução

Diversas proteínas e peptídeos são reconhecidos como proteínas amiloidogênicas devido ao seu mecanismo de agregação, caracterizado pelo dobramento incorreto, o que resulta na formação de agregados insolúveis e não ramificados, com estruturas secundárias em folhas β . Esses agregados, denominados fibrilas amiloides, são frequentemente citotóxicos e estão associados ao desenvolvimento de diversas patologias.^{143–145}

Dentre essas espécies com tendência à agregação, destaca-se o polipeptídeo amiloide das ilhotas pancreáticas humanas (hIAPP), também conhecido como amilina humana, um hormônio peptídico composto por 37 resíduos de aminoácidos. O hIAPP é produzido e co-secretado com a insulina pelas células das ilhotas pancreáticas em resposta a estímulos fisiológicos.^{146,147} Esse hormônio peptídico apresenta tendência à agregação e formação de depósitos amiloides nas ilhotas pancreáticas, um fenômeno amplamente associado ao desenvolvimento da Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2).¹⁴⁶

A formação desses agregados inclui desde a formação de oligômeros solúveis até a formação das fibrilas maduras insolúveis, cuja deposição progressiva nas ilhotas pancreáticas pode levar à perda de massa de células β . Estudos indicam que aproximadamente 90% dos pacientes com DM2 apresentam esses depósitos amiloides nas ilhotas pancreáticas, reforçando a forte correlação entre o potencial de agregação do hIAPP no pâncreas e a manifestação clínica do DM2.¹⁴⁸

Apesar dos avanços nas investigações sobre a agregação e toxicidade do hIAPP, os mecanismos moleculares que regem a formação dessas espécies amiloides tanto *in vivo* quanto *in vitro*, ainda não são completamente compreendidos. Além disso, os processos pelos quais o hIAPP induz a morte das células β permanecem indefinidos.^{148,149}

Diante desse cenário, há um grande interesse no desenvolvimento de estratégias para a detecção de depósitos amiloides de hIAPP. Além disso, a identificação de compostos capazes de inibir ou modular a taxa de agregação do hIAPP representa uma oportunidade não apenas para elucidar os mecanismos de crescimento fibrilar e toxicidade amiloide, mas também para expandir as possibilidades terapêuticas no tratamento do DM2.

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao desenvolvimento de complexos de Ru(II) fotoluminescentes com potenciais aplicações biológicas.^{150–152}

Nossa estratégia consistiu em explorar as propriedades da díade RupNDIp, que incluem fácil síntese, alto rendimento, forte absorção na região do visível e estabilidade química. Além disso, essa díade exibe emissão na região do visível, com um tempo de vida relativamente longo que não interfere na emissão de biomoléculas, além de apresentar um grande deslocamento de Stokes (5000 cm^{-1}), evitando a auto extinção da fosforescência.

A díade RupNDIp foi projetada para conter uma região hidrofóbica ao redor do centro metálico, favorecendo a interação com as ligações de hidrogênio e/ou o empilhamento π - π na estrutura do polipeptídeo. Com essas características, essa díade pode atuar tanto como um sensor luminescente sensível para a detecção da agregação do hIAPP em placas fibrilares quanto na inibição da agregação da amilina.

4.2. Objetivos do Capítulo

Investigar a influência da díade Ru(phen)-naftalenodiimida (RupNDIp) no mecanismo de agregação da amilina humana (hIAPP), bem como avaliar seus potenciais efeitos citotóxicos na linhagem celular MIN6.

4.3. Materiais e Métodos

4.3.1. Reagentes

Os estudos de agregação foram realizados com amilina humana (polipeptídeo amiloide das ilhotas pancreáticas – hIAPP) (RP11278; HPLC $\geq 95,0\%$) adquirida da GenScript. Como tampão, utilizou-se fosfato de sódio (50 mM; pH 7,4; 100 mM NaCl), preparado com cloreto de sódio (NaCl) de procedência Qhemis, fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e dihidrogenofosfato de sódio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) de procedência Synth, dissolvidos em água Milli-Q.

4.3.2. Protocolo de Agregação da Amilina

A agregação da amilina foi realizada utilizando um procedimento experimental adaptado da literatura.¹⁴⁴ Inicialmente, 0,5 mg de amilina humana (RP11278) foi solubilizada em 130 μL de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), e a solução obtida foi agitada durante 5 minutos em banho ultrassônico. Em seguida, alíquotas de aproximadamente 25 μL dessa solução foram transferidas para tubos vial e secadas sob fluxo de nitrogênio. Os filmes obtidos foram armazenados sob refrigeração para posterior utilização.

Para o processo de agregação, os filmes de amilina previamente preparados foram solubilizados em tampão fosfato de sódio (50 mM; pH 7,5; 100 mM NaCl), e a concentração final foi ajustada para 20 μM utilizando a absortividade molar ($\epsilon_{280\text{ nm}} = 1615\text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$). Os agregados amiloides de amilina foram formados incubando a solução a 37 °C durante 8 horas.

4.3.3. Influência da díade RupNDIp em corantes amiloides

Para avaliar a influência da díade RupNDIp na emissão das sondas amiloides tioflavina T (ThT) e ácido 8-anilino-1-naftalenossulfônico (ANS), foram preparadas fibrilas amiloides incubando 20 μM de amilina humana (hIAPP) em tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 50 mM; 150 mM NaCl) a 37 °C durante 8 horas na presença das sondas amiloides (20 μM).

Após esse período, foram adquiridos os espectros de emissão das sondas para confirmar a formação das espécies amiloides da amilina. Posteriormente, 2 μL da solução estoque da díade RupNDIp foi adicionado à mesma solução contendo as sondas amiloides e as fibrilas pré-formadas, resultando em uma concentração final da díade igual a 20 μM .

4.3.4. Cinética de agregação da amilina humana

O ensaio de cinética de agregação da amilina humana foi realizado utilizando a díade RupNDIp como sonda luminescente, seguindo um procedimento experimental adaptado da literatura.¹⁵² Para o ensaio, amostras (20 μL) da solução de amilina humana (20 μM) foram retiradas em intervalos de 30 minutos durante 480 minutos de incubação realizada a 37 °C em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 50 mM, 150 mM NaCl). Em seguida, 2 μL da solução da díade foram adicionados a cada amostra, resultando em uma solução final com razão molar 20 μM amilina: 20 μM díade RupNDIp.

Posteriormente, os espectros de luminescência da díade RupNDIp ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$) foram obtidos utilizando uma cubeta de 1 cm de caminho óptico e volume de 25 μL . Como controle, realizou-se o mesmo procedimento empregando a sonda amiloide tioflavina T (ThT) para fins comparativos. Os dados de intensidade de emissão obtidos foram plotados em função do tempo de incubação da amilina.

Além disso, esse experimento foi repetido com a incubação conjunta da díade RupNDIp nas concentrações de 20 e 40 μM com a amilina humana (20 μM) sob as mesmas condições de agregação, com o objetivo de avaliar a influência da díade na inibição da agregação da amilina.

4.3.5. Microscopia de Fluorescência

As imagens de microscopia de fluorescência foram adquiridas utilizando o microscópio invertido Carl Zeiss, modelo Axio Observer 7, equipado com o filtro Set20 (Rodamina) – emissão: 575-640 nm.

Para as análises, foram preparadas soluções de amilina humana (20 μM), conforme descrito na seção 4.3.2 de protocolo de agregação. As medições foram realizadas nos tempos 0 e 8 horas de incubação a 37 °C na ausência e na presença da díade, com proporções molares de 1:1 e 1:2 (amilina:díade).

4.4.6. Dicroísmo Circular (DC)

As medidas de dicroísmo circular (DC) foram realizadas utilizando o espectrômetro Jasco J-815, pertencente ao Grupo de Biofísica Molecular “Sergio Mascarenhas”, no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC/USP) *campus* 2.

Para as análises, foram preparadas soluções contendo 500 μL de amilina humana (20 μM) em tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 50 mM; 150 mM NaCl), incubadas a 37 °C durante 480 minutos na presença de 20 e 40 μM da díade RupNDIp. Como controle, foi preparada uma solução de amilina na ausência da díade RupNDIp, mantida sob as mesmas condições de agregação descritas.

Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5424 R) por 5 minutos à 5°C. Esse procedimento teve como objetivo concentrar o precipitado de fibrilas no fundo do microtubo tipo *Eppendorf*, otimizando a aquisição do sinal característico de folhas β no espectro de DC. Em seguida, 300

μL do sobrenadante de cada amostra foram cuidadosamente removidos e descartados, e o precipitado foi ressuspensionado em 300 μL de água *Milli-Q* de modo a manter a concentração final de amilina em 20 μM , correspondente ao volume inicial da amostra. Esse procedimento foi realizado para remover o excesso de tampão, uma vez que sua absorção na região espectral correspondente às folhas β pode interferir na análise.

Para confirmar a presença dos agregados, o mesmo procedimento descrito foi realizado em uma amostra controle contendo apenas amilina (20 μM), submetida às mesmas condições experimentais estabelecidas para as soluções contendo a díade RupNDIp. Os espectros de DC foram adquiridos após 14 acumulações, utilizando uma cubeta com caminho óptico de 1 mm e volume de 500 μL .

4.3.7. Microscopia de Força Atômica (AFM)

As imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) foram adquiridas utilizando o microscópio Bruker-MultiMode 8, pertencente ao Laboratório de Microscopia de Força Atômica do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), vinculado ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas-SP.

Para os ensaios, soluções de amilina humana (hIAPP) foram preparadas dissolvendo os filmes de hIAPP em tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 50 mM; 150 mM NaCl). A concentração final foi ajustada para 20 μM , calculada utilizando a absorvidade molar ($\epsilon_{280\text{ nm}} = 1615\text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$).

Em seguida, uma solução estoque de 0,5 mM da díade RupNDIp foi preparada em tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 50 mM; 150 mM NaCl) e posteriormente adicionadas a solução de hIAPP para obter concentrações de 0, 20 e 40 μM . Essas concentrações correspondem a razões molares da díade RupNDIp: hIAPP de 0:1 1:1 e 2:1, respectivamente. Após a adição da díade, as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37 °C durante 8 horas.

Para obtenção das imagens, 30 µL das amostras preparadas nos tempos de 0 e 8 horas de incubação foram depositados sobre uma superfície de mica recém-clivada e mantidos em repouso por 20 minutos. Em seguida, a superfície da amostra foi lavada cuidadosamente com 1 mL de água deionizada e seca sob fluxo de N₂ por 1 hora.

A aquisição das imagens foi realizada com frequência de 1 Hz, resolução de 512 linhas e varreduras de 2×2 µm e 1×1 µm. As imagens foram adquiridas e processadas pelo software Gwyddion.

4.3.8. Cultura celular e tratamentos

A linhagem celular Células MIN6, derivadas de insulinoma de camundongo, foram cultivadas com meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Gibco™) com alta glicose (25mM), suplementado com 15% soro fetal bovino (SFB; Gibco™), 1% de antibiótico (10.000 unidades/mL de penicillina e 10.000 µg/mL de streptomicina; Gibco™) e 20mM HEPES (Gibco™). As células foram mantidas em ambiente controlado (37°C, 5% CO₂) na Escola de Artes, Ciências e Humanidades (EACH) da Universidade de São Paulo (USP), em colaboração com a Prof^a Dra. Anna Kareninva Azevedo-Martins e Ms. Matheus Pedro Santos.

Para os experimentos, as células MIN6 foram semeadas em placas de 96 poços, a uma densidade de 1×10⁴ células por poço e, após 24 horas, tratadas com a díade RupNDIp e/ou amilina. Como grupo controle, utilizou-se apenas meio de cultura DMEM, enquanto o DMSO a 5% foi empregado como controle positivo de morte celular.

A díade RupNDIp foi solubilizada em DMEM nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µM para o tratamento celular por 24 horas. Da mesma forma, a amilina foi dissolvida em meio de cultura até atingir as concentrações de 1, 5, 10 e 20 µM, sendo utilizada na forma monomérica para o tratamento celular por 24 horas.

No caso da amilina fibrilar, a amilina humana foi inicialmente dissolvida em tampão fosfato de sódio (50 mM, 150 mM NaCl; pH 7,4) nas mesmas concentrações mencionadas anteriormente. Em seguida, a solução foi incubada a 37°C por 24 horas para promover o processo de fibrilação da amilina monomérica. Após esse período, a solução foi centrifugada e o precipitado foi ressuspensão em meio de cultura no mesmo volume inicial, garantindo a manutenção das concentrações desejadas, antes de ser adicionado às células para o tratamento por 24 horas.

Nos tratamentos combinados com a díade RupNDIp e amilina, ambos foram dissolvidos em tampão fosfato de sódio, e as amostras de amilina (10 e 20 µM) foram incubadas a 37 °C por 24 horas junto com a díade nas concentrações de 10, 25, 50 ou 100 µM. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura, mantendo os volumes iniciais, antes da adição às células para o tratamento por 24 horas.

4.3.9. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de MTT, uma técnica colorimétrica baseada no metabolismo de células viáveis para avaliar sua atividade metabólica. Esse ensaio utiliza o sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), um corante permeável à membrana celular que, em células metabolicamente ativas, é reduzido por redutases mitocondriais, resultando na formação de formazan (E,Z-1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan), um composto sólido de coloração azul-escura. O formazan formado é insolúvel em soluções aquosas, mas pode ser facilmente solubilizado em solventes orgânicos, como o dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância da solução resultante é proporcional à quantidade de células viáveis, permitindo a quantificação indireta da viabilidade celular.¹⁵³

Dessa forma, após os tratamentos, o meio de cultura celular foi substituído por meio DMEM fresco contendo 10% de MTT (5 mg/mL), e as células foram incubadas por 2 horas a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, o meio foi descartado, e as células foram submetidas a uma segunda incubação por 10 minutos com 200 µL de DMSO, a fim de solubilizar os cristais de formazan formados.

A absorbância de cada poço foi medida por espectrofotometria (Biotek Synergy HTX, Agilent) a 570 nm. A viabilidade celular foi calculada com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Absorbância teste}}{\text{Absorbância controle}} \times 100$$

Como referência a viabilidade de 100% do grupo controle. O software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) foi utilizado para a realização de todas as análises estatísticas dos dados.

4.4. Resultados e Discussão

4.4.1. A díade Ru(II)-naftalenodiimida como sonda amiloide de agregação

4.4.1.1. Cinética de Agregação

A detecção e caracterização dos agregados amiloides são essenciais para elucidar sua citotoxicidade e papel na progressão da doença.^{25,154} Nesse contexto, o desenvolvimento de sondas moleculares específicas para essas estruturas surge como uma estratégia promissora para novas abordagens no diagnóstico e terapia do DM2.

Dessa maneira, para avaliar a capacidade da díade RupNDIp de atuar como marcador luminescente no mecanismo de agregação da amilina foram realizados

ensaios de luminescência, comparando os resultados obtidos com o corante orgânico tioflavina T (ThT), Figura 4.1. Este fluoróforo é amplamente utilizado no monitoramento de proteínas amiloides, constituindo um padrão para a identificação *in vitro* de fibrilas amiloides.¹⁵⁵

Esse corante não apresenta luminescência em solução aquosa ou na presença de proteínas nativas. Entretanto, na presença de fibrilas amiloides exibe emissão fluorescente intensa (λ_{EM} = 480 nm/ λ_{EX} = 440 nm). Esse aumento na intensidade de emissão deve-se à especificidade de ligação com as espécies amiloides, resultando em um impedimento rotacional em torno da ligação que conecta os anéis de benzotiazol e anilina. Essa interação torna o sistema rígido, impedindo consequentemente a perda de energia por processos de desativação não-radiativos e aumentando significativamente o rendimento quântico de emissão.^{156,157}

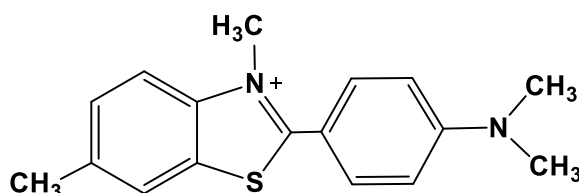


Figura 4.1. Estrutura da sonda amiloide Thioflavina T (ThT).

Na figura 4.2.A, observa-se o aumento da fluorescência da ThT com o tempo de incubação (0-480 minutos) da amilina humana durante a agregação. A partir desse ensaio, foi obtido um gráfico de intensidade de fluorescência *versus* tempo de incubação da amilina, caracterizado por uma curva sigmoide, conforme representado na Figura 4.2.B.

A curva sigmoide observada é característica da cinética de agregação de proteínas amiloides.¹⁵⁸ No estágio inicial de agregação (0 a 60 minutos), conhecido como fase de nucleação, a ThT apresenta baixa intensidade de emissão devido à rotação da ligação C-C entre os anéis benzotiazol e anilina em solução,

permitindo a perda de energia por processos não-radiativos. Após 60 minutos, ocorre um rápido aumento na intensidade de emissão do composto, caracterizando a fase de alongamento, que resulta do impedimento rotacional quando a ThT se liga às espécies amiloidogênicas. A última fase, entre 300 e 480 minutos, é marcada pelo equilíbrio, quando a maior parte da amilina monomérica é convertida em fibrilas maduras. Os resultados obtidos confirmam a formação de fibrilas amiloides da amilina.

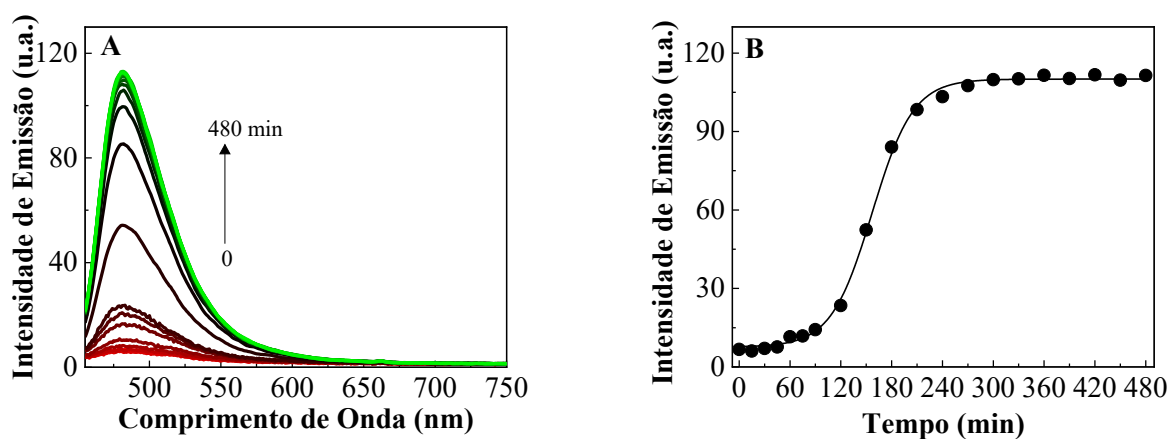


Figura 4.2. (A) Espectros de emissão ($\lambda_{EX}=440$ nm) da sonda amiloide tioflavina T (ThT) (20 μ M) em solução tampão fosfato (pH=7,4; 50 mM) em diferentes tempos de incubação (0-480 minutos) da amilina humana (20 μ M). (B) Gráfico da intensidade de emissão da ThT (480 nm) contra o tempo (minutos) de incubação da amilina humana.

Para avaliar a capacidade da díade RupNDIp em monitorar a cinética de fibrilação da amilina, reproduzimos os ensaios de agregação previamente padronizados para a ThT. Os espectros de emissão foram adquiridos em diferentes intervalos de tempo (0-480 minutos) durante a incubação da amilina a 37°C.

Conforme a Figura 4.3.A, durante os estágios iniciais de agregação, conhecidos como fase de nucleação (0 a 60 minutos), a díade não apresentou um aumento significativo na intensidade de emissão. No segundo estágio, entre 75 e 240 minutos, observou-se um aumento rápido na intensidade de emissão,

indicando a formação de espécies como protofibrilas. Por fim, na última fase, entre 240 e 480 minutos, houve apenas uma pequena variação na intensidade de emissão, atingindo a fase de equilíbrio, indicando que a maior parte da amilina monomérica foi convertida em fibrilas maduras.

Esses resultados tornam-se mais evidentes a partir da análise da curva sigmoide obtida pela variação da intensidade de emissão do complexo (600 nm) em função do tempo de incubação (FIGURA 4.3.B). O gráfico demonstra que a intensidade de emissão da díade se intensifica à medida que as espécies fibrilares são formadas.

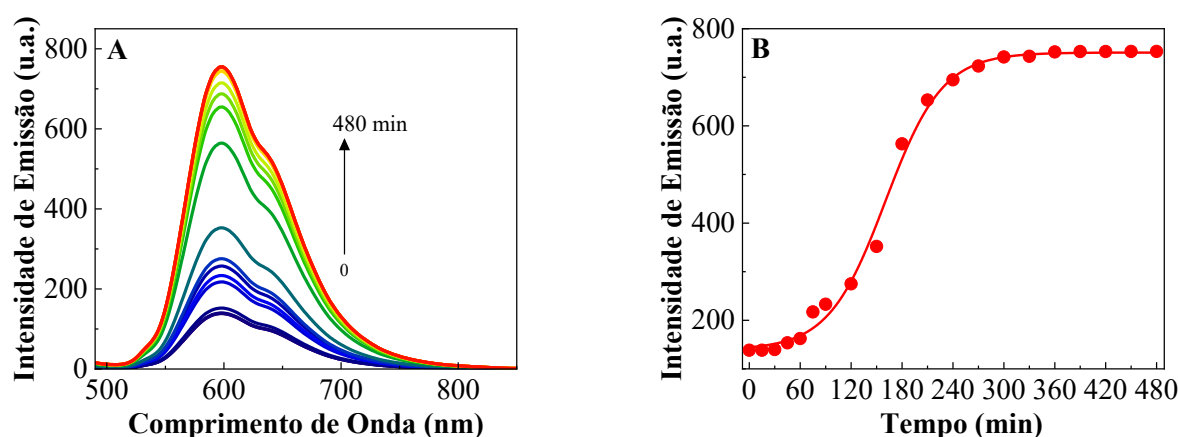


Figura 4.3. (A) Espectros de emissão ($\lambda_{EX}= 450$ nm) da díade RupNDIp em solução tampão fosfato (pH=7,4; 50 mM) (20 μ M) em diferentes tempos (0-480 minutos) de incubação da amilina humana (20 μ M). (B) Gráfico da intensidade de emissão do complexo (600 nm) contra o tempo (minutos) de incubação da amilina humana.

Esse resultado confirma que a díade interage com a forma amiloide do hIAPP, provavelmente por meio de ligações de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas entre a díade e os resíduos hidrofóbicos da amilina humana (Phe23, Gly24, Pro25, Ile26, Leu27, Pro28 e Pro29), influenciando, assim na luminescência da díade de Ru(II).

Adicionalmente, a curva sigmoide de agregação obtida com a díade RupNDIp exibiu padrão cinético equivalente ao observado para sondas amiloides, como ThT demonstrando que a díade não perturba o processo de fibrilação após sua interação com os agregados pré-formados. Esses resultados sugerem o potencial da díade RupNDIp como sonda fotoluminescente para monitoramento da cinética de agregação da amilina.

Além disso, a análise comparativa entre os dois sistemas indica que a díade RupNDIp apresenta vantagens significativas em relação à ThT. Entre estas vantagens destacam-se a absorção e emissão na região do visível ($\lambda_{\text{ABS}} = 450 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{EM}} = 600 \text{ nm}$), situando-se na faixa espectral ideal para aplicações tanto *in vitro* quanto *in vivo* e ausência de sobreposição com a janela terapêutica de biomoléculas, o que minimiza a interferência com a autofluorescência intrínseca de resíduos aromáticos, como a tirosina presente na hIAPP.

4.4.1.2. Microscopia de Luminescência

Diante da resposta luminescente da díade RupNDIp frente às fibrilas amiloides, investigou-se seu potencial como marcador como imagem luminescente. Para esta avaliação, empregou-se a técnica de microscopia de fluorescência. As imagens foram adquiridas após a adição da díade RupNDIp às fibrilas previamente formadas e os resultados foram comparados com a sonda amiloide ThT.

Inicialmente, os agregados amiloides foram previamente formados, conforme mostrado na Figura 4.4.A. Nota-se que as fibrilas amiloides de amilina não apresentam características luminescentes, Figura 4.4.B. No entanto, após a adição da díade às fibrilas, observou-se intensa emissão luminescente (FIGURA 4.5), comprovando a incorporação eficiente da sonda na estrutura dos agregados amiloides e o seu potencial como marcador específico para fibrilas de amilina.

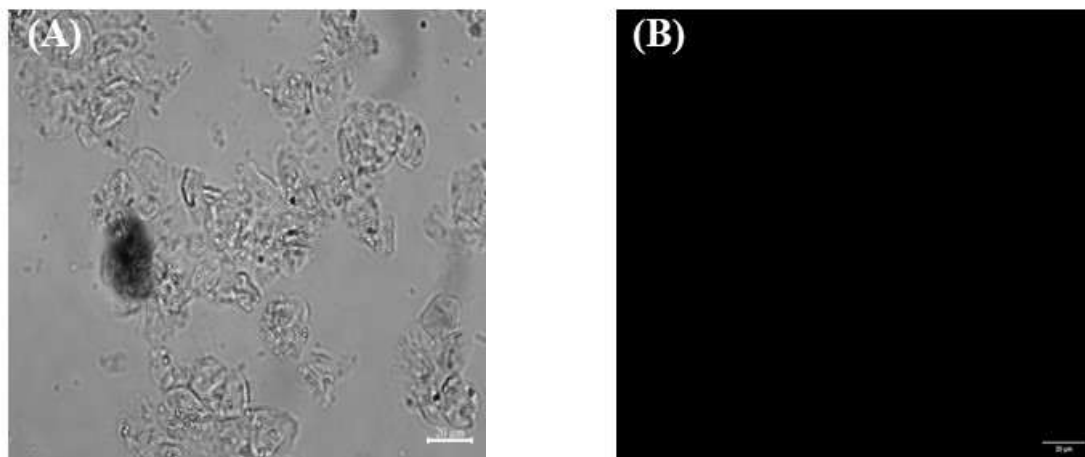


Figura 4.4. Imagens de microscopia (A) *Bright field* e de (B) luminescência das fibrilas de amilina (20 μ M) obtidas após 8 h de incubação á 37°C em solução de tampão fosfato (50 mM; pH= 7,4; 100 mM de NaCl).

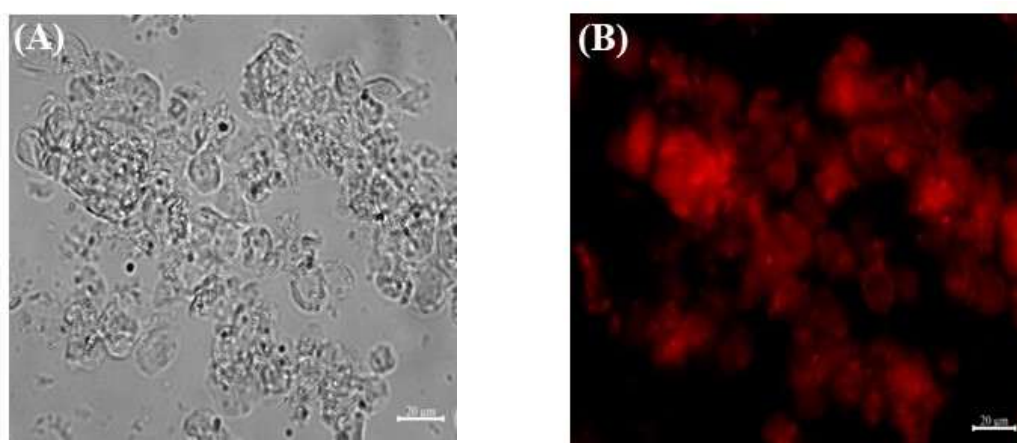


Figura 4.5. Imagens de microscopia (A) *Bright field* e de (B) luminescência das fibrilas de amilina (20 μ M) com a díade RupNDIp (20 μ M) obtidas após 8 h de incubação á 37°C em solução de tampão fosfato (50 mM; pH= 7,4; 100 mM de NaCl).

O resultado obtido é semelhante ao observado para a sonda fluorescente ThT (FIGURA 4.6), reafirmando os dados de que a díade consegue atuar como uma sonda amiloide para as fibrilas de amilina formadas. Além disso, esse resultado indica que a díade não é capaz de desagregar as fibrilas previamente formadas quando adicionada após a formação dessas espécies.

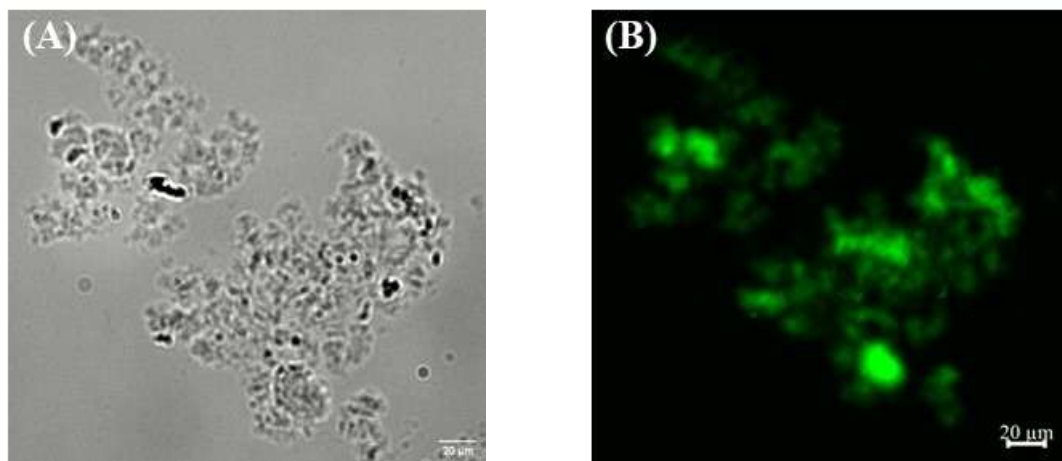


Figura 4.6. Imagens de microscopia (A) *Bright field* e de (B) luminescência das fibrilas de amilina (20 µM) com ThT (20 µM) obtidas após 8 h de incubação á 37°C em solução de tampão fosfato (50 mM; pH= 7,4; 100 mM de NaCl).

4.4.2. Influência da díade RupNDIp na agregação do hIAPP

4.4.2.1. Influência da díade na emissão dos corantes amiloides

As sondas amiloides são amplamente utilizadas em ensaios para avaliar a influência de outros compostos como inibidores da agregação. Entre essas sondas fluorescentes, destacam-se a tioflavina T (ThT) e o 1-anilino-8-naftalenossulfonato (ANS), empregadas na detecção da inibição da agregação de proteínas amiloides. Esse efeito ocorre devido ao aumento significativo da intensidade de emissão fluorescente desses compostos na presença de fibrilas amiloides.^{159,160}

Diante disso, antes de realizar os ensaios com essas sondas amiloides para avaliar o potencial inibitório da díade RupNDIp na agregação da amilina humana (hIAPP), investigamos possíveis interferências da díade na luminescência desses compostos. Essa análise foi essencial, pois tanto a emissão da ThT ($\lambda_{EM} = 480$ nm) quanto a do ANS ($\lambda_{EM} = 520$ nm) apresentam sobreposição espectral com a banda de absorção da díade RupNDIp (FIGURA 4.7), condição que favorece processos de transferência de energia por ressonância de Förster (FRET). Esse processo ocorre quando a energia no estado excitado de uma molécula doadora (sondas amiloides) é transferida de forma não-radiativa para uma molécula receptora (díade RupNDIp), resultando na supressão da luminescência da espécie doadora, pois a energia dissipada pode excitar a molécula receptora.¹⁶¹ Dessa forma, é fundamental avaliar inicialmente o efeito de supressão para evitar resultados falso negativos.

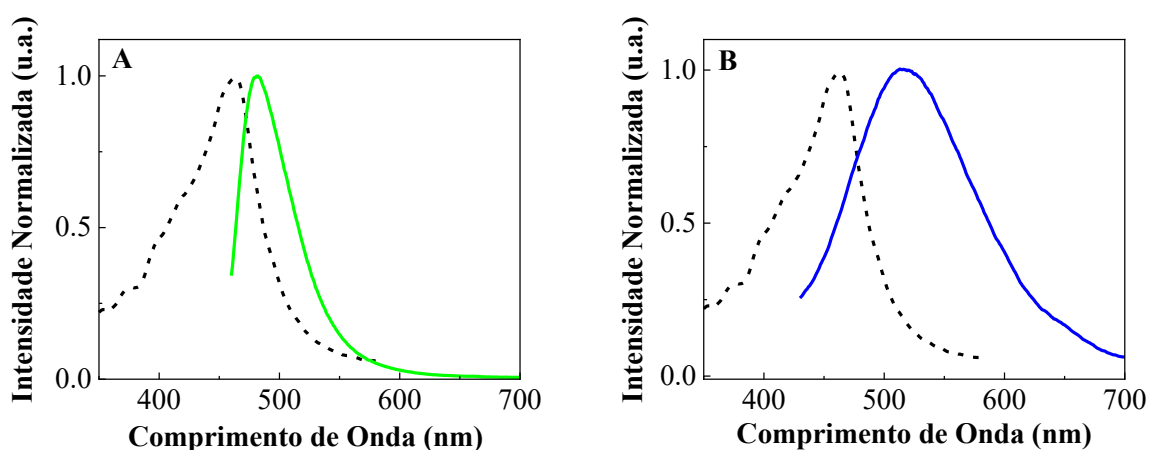


Figura 4.7. Espectros de excitação (linha tracejada) da díade RupNDIp ($\lambda_{EM} = 600$ nm) e emissão das sondas fluorescentes de proteínas amiloides (A) tioflavina T (ThT) e (B) e ácido 8-anilino-1-naftalenossulfônico (ANS) em solução tampão fosfato (pH= 7,4; 50 mM).

Para essa avaliação, agregados amiloides de amilina humana foram preparados na presença de ThT e ANS, seguindo o protocolo de agregação, que consistiu na incubação da amilina a 37°C por 8 horas. Como demonstrado nas Figuras 4.8.A e 4.8.B, observou-se um aumento significativo na intensidade de emissão tanto da ThT quanto do ANS após o período de incubação, confirmando a formação das fibrilas amiloides.

Na solução contendo os agregados amiloides formados, a adição da díade RupNDIp resultou em significativa supressão da emissão fluorescente tanto da ThT quanto do ANS (FIGURAS 4.8.A e 4.8.B). Esse efeito de supressão demonstra que a díade RupNDIp interfere diretamente nos processos de emissão dessas sondas amiloides e, conseqüentemente, inviabiliza o uso desses corantes como parâmetro para avaliar o potencial inibitório da RupNDIp na agregação do hIAPP.

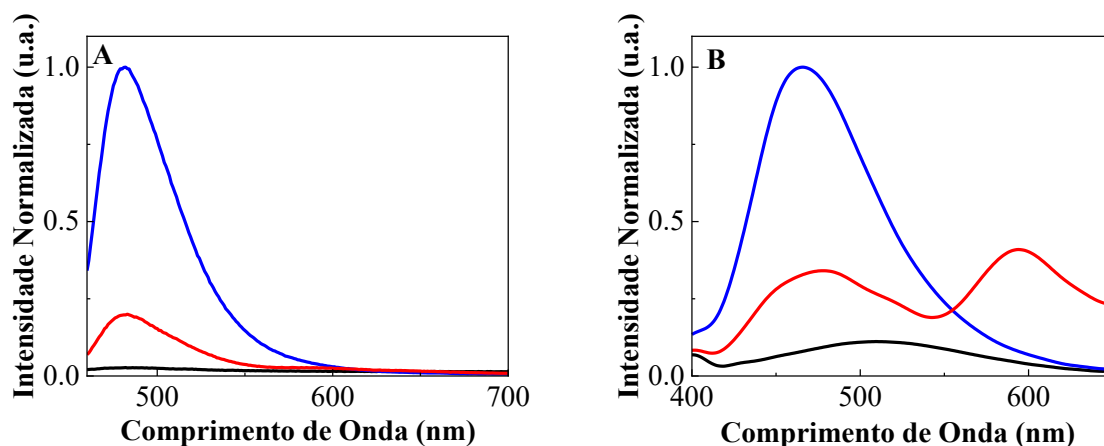


Figura 4.8. Espectros de emissão das sondas amiloides na presença de amilina humana no tempo 0 h (linha preta) e após 8 horas de incubação (linha azul) (A) tioflavina T (ThT) e (B) e ácido 8-anilino-1-naftalenossulfônico (ANS) em solução de tampão fosfato de sódio (pH= 7,4; 50 mM) na presença (linha vermelha) da díade RupNDIp ($c= 20 \mu\text{M}$).

4.4.2.2. Ensaio de Luminescência

Diante dos resultados apresentados na seção 4.4.2.1, que demonstraram a interferência da díade na luminescência das sondas amiloides, optou-se por avaliar os efeitos na emissão luminescente quando a díade foi incubada simultaneamente com amilina humana (20 μM). Para essa análise, foram obtidos espectros de emissão da díade RupNDIp (20 e 40 μM) incubado com amilina humana a 37°C por 8 horas.

Conforme mostra a Figura 4.9.A, na proporção estequiométrica 1:1 (amilina:díade RupNDIp), a díade não apresentou aumento significativo na intensidade de emissão, resultado provavelmente associado à inibição da formação de agregados amiloides pela díade, visto que quando a díade é adicionada posteriormente a formação de fibrilas amiloides ocorre um aumento no rendimento de emissão, Figura 4.3.A.

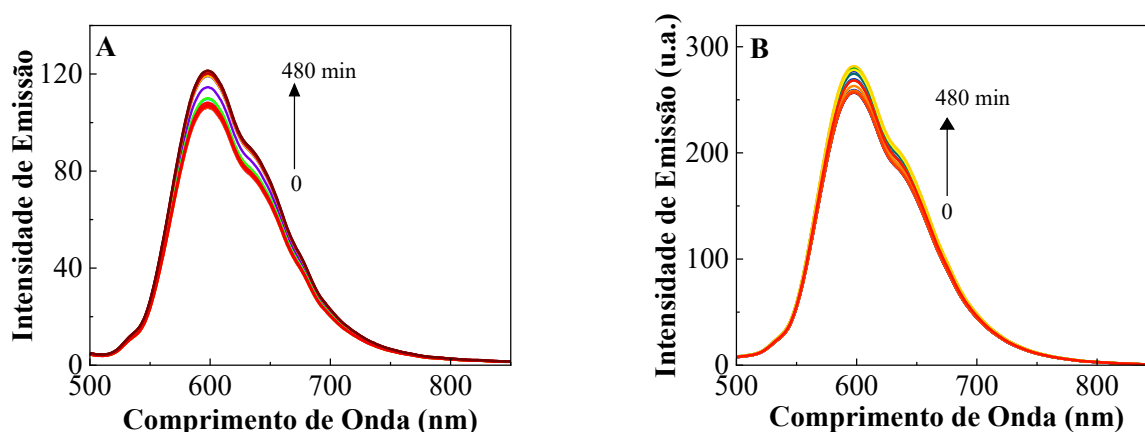


Figura 4.9. Espectros de emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$) da díade RupNDIp em solução tampão fosfato de sódio (pH=7,4; 50 mM) incubada na presença da amilina humana (20 μM) a 37°C durante 480 minutos com concentração de (A) 20 μM e (B) 40 μM .

Na proporção estequiométrica 1:2 (amilina:díade RupNDIp), observou-se que a intensidade de emissão se manteve constante durante todo o período de incubação com o hIAPP (FIGURA 4.9.B). Esses resultados corroboram a hipótese

de que a díade atua como inibidora da agregação mediante interação preferencial com a amilina monomérica, conforme evidenciado pela ausência de aumento significativo na emissão luminescente em contraste com os resultados obtidos quando a díade RupNDIp é adicionada após a agregação da amilina, Figura 4.3.A.

Para validação conclusiva desses resultados, foi necessária a utilização de outras técnicas, incluindo dicroísmo circular (DC) e microscopia de força atômica (AFM).

4.4.2.3. Ensaios de Dicroísmo Circular (DC)

As mudanças conformacionais durante o processo de agregação da amilina humana, no qual os monômeros em conformação de hélice aleatória se transformam em fibrilas amiloides com estrutura secundária do tipo folha β , podem ser caracterizadas por espectroscopia de dicroísmo circular (DC).¹⁶²

Para avaliar a ação inibitória da díade RupNDIp na agregação da amilina humana, empregou-se DC. Como pode ser observado na Figura 4.10, o espectro de DC da amilina no tempo inicial (0 hora) exibe um mínimo em 205 nm e um ombro em torno de 222 nm, indicando uma conformação predominantemente em espiral aleatória, característica da estrutura secundária na forma monomérica.¹⁶³

Após 8 horas de incubação a 37°C, o espectro de DC apresenta um mínimo negativo pronunciado centrado em 218 nm (FIGURA 4.10), característica espectral de conformações do tipo folha β típica de fibrilas amiloide.^{164,165} Esses resultados corroboram com os dados cinéticos de agregação obtidos por meio da sonda ThT, validando que, sob as condições experimentais estabelecidas, ocorre a formação de fibrilas amiloides.

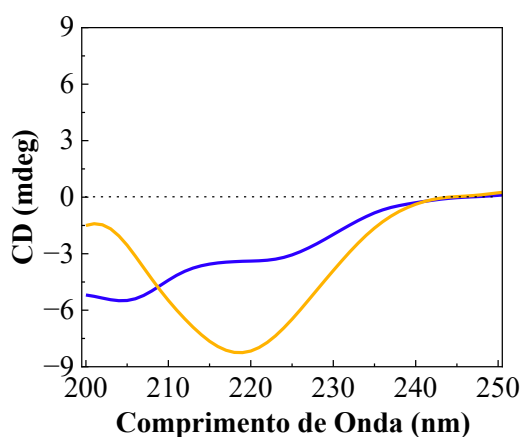


Figura 4.10. Espectros de DC da amilina humana ($c = 20 \mu\text{M}$) em 0 h (linha azul) e 8 h (linha laranja) em tampão fosfato de sódio ($\text{pH} = 7,4$; 50 mM).

Para avaliar a influência da díade RupNDIp na agregação da amilina, a proteína foi incubada com a díade nas proporções de 1:1 e 1:2 (amilina:díade). Como pode ser observado na Figura 4.11.A, na proporção de 1:1, há uma redução da banda característica da estrutura em folha β , enquanto na proporção de 1:2 não se observa mais a presença de estrutura secundária típica de agregados amiloides, conforme mostrado na Figura 4.11.B. Esses resultados indicam que a díade interage com a amilina humana, reduzindo a formação de estruturas conformacionais típicas de folhas β em uma proporção maior.

O mesmo procedimento foi realizado para o complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, a fim de avaliar o efeito da coordenação do ligante pNDIp no mecanismo de agregação da amilina, considerando a baixa solubilidade do ligante livre em meio aquoso. Observou-se que o complexo de referência manteve a estrutura secundária em folha β em todas as proporções avaliadas, Figura 4.12.

Assim, pode-se sugerir que a interação entre a amilina humana e a díade RupNDIp ocorre através do ligante pNDIp, uma vez que a funcionalização do ligante pNDIp aumenta a hidrofobicidade da díade, permitindo interações específicas com o domínio hidrofóbico da hIAPP (hIAPP 20–29), região associada ao processo de agregação desse polipeptídeo.^{162,163}

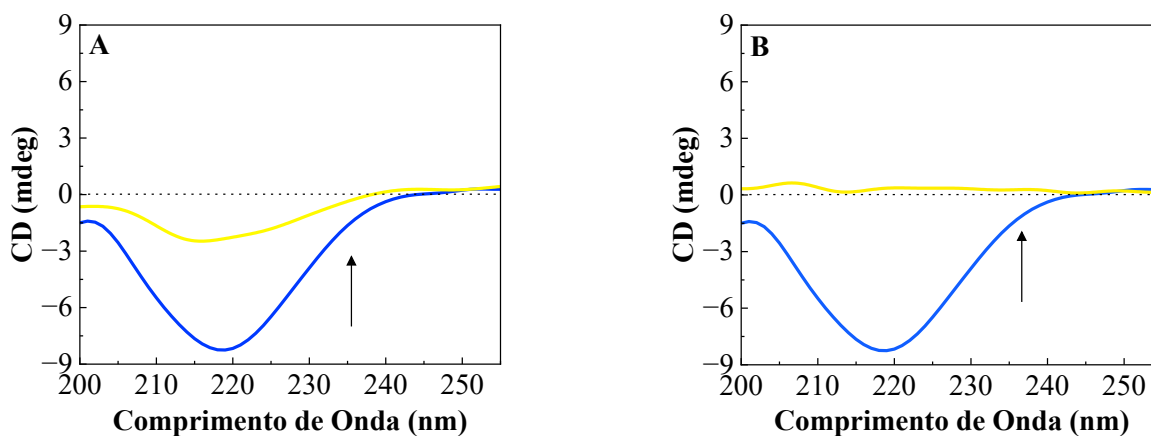


Figura 4.11. Espectros de DC da amilina humana ($c=20\ \mu\text{M}$) incubada durante horas 8 horas na presença (linha amarela) e ausência (linha azul) da díade RupNDIp na proporção (A) 1:1 (amilina fibrilar: díade RupNDIp) e (B) 1:2 (amilina fibrilar: díade RupNDIp) em tampão fosfato de sódio ($\text{pH}=7,4$; $50\ \text{mM}$).

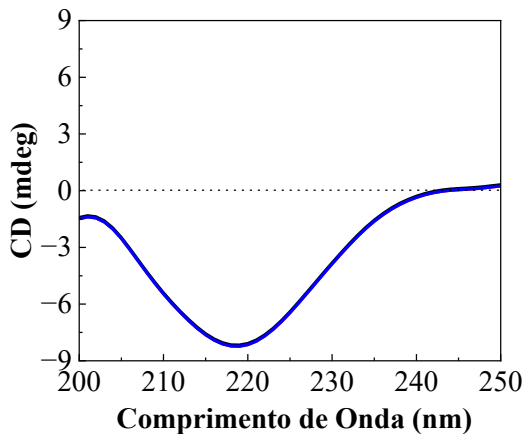


Figura 4.12. Espectros de DC da amilina humana ($c=20\ \mu\text{M}$) incubada durante horas 8 horas na presença (linha amarela) e ausência (linha azul) do complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ na proporção (A) 1:1 (amilina fibrilar: $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$) e (B) 1:2 (amilina fibrilar: $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$) em tampão fosfato de sódio ($\text{pH}=7,4$; $50\ \text{mM}$).

4.4.2.5. Morfologia das fibrilas amiloides

A análise morfológica das espécies formadas durante a agregação da amilina tanto isoladamente quanto na presença da díade foi realizada por meio da técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*).

Como mostrado nas imagens da Figura 4.13, no tempo inicial (0 horas), em solução tampão de fosfato de sódio (pH 7,4), não são observadas estruturas filamentosas características de agregados amiloides, confirmando que, nesse momento, a forma predominante é monomérica. Entretanto, após 8 horas de incubação, observa-se a presença de estruturas filamentosas típicas de fibras amiloides, com organização bem definida. Esses resultados estão de acordo com os dados obtidos por dicroísmo circular (DC), que indicaram a transição da amilina humana para uma estrutura em folha β após 8 horas de incubação a 37°C, evidenciando a formação de fibras amiloides.

As imagens obtidas quando a díade RupNDIp é incubada com a amilina humana na proporção de 1:1 (amilina:díade) demonstram uma redução no número de fibrilas formadas em comparação com as imagens obtidas na ausência da díade, indicando que a díade é capaz de inibir o mecanismo de dobramento incorreto desse polipeptídeo amiloide.

As imagens da figura 4.13 obtidas quando a concentração da díade é dobrada, mantendo-se a concentração de amilina (1:2; amilina: díade), não se observa a formação de fibras filamentosas, mas estruturas de espécies com características de agregados amorfos, semelhantes às observadas para compostos inibidores do mecanismo de agregação de proteínas amiloidogênicas.^{166,167}

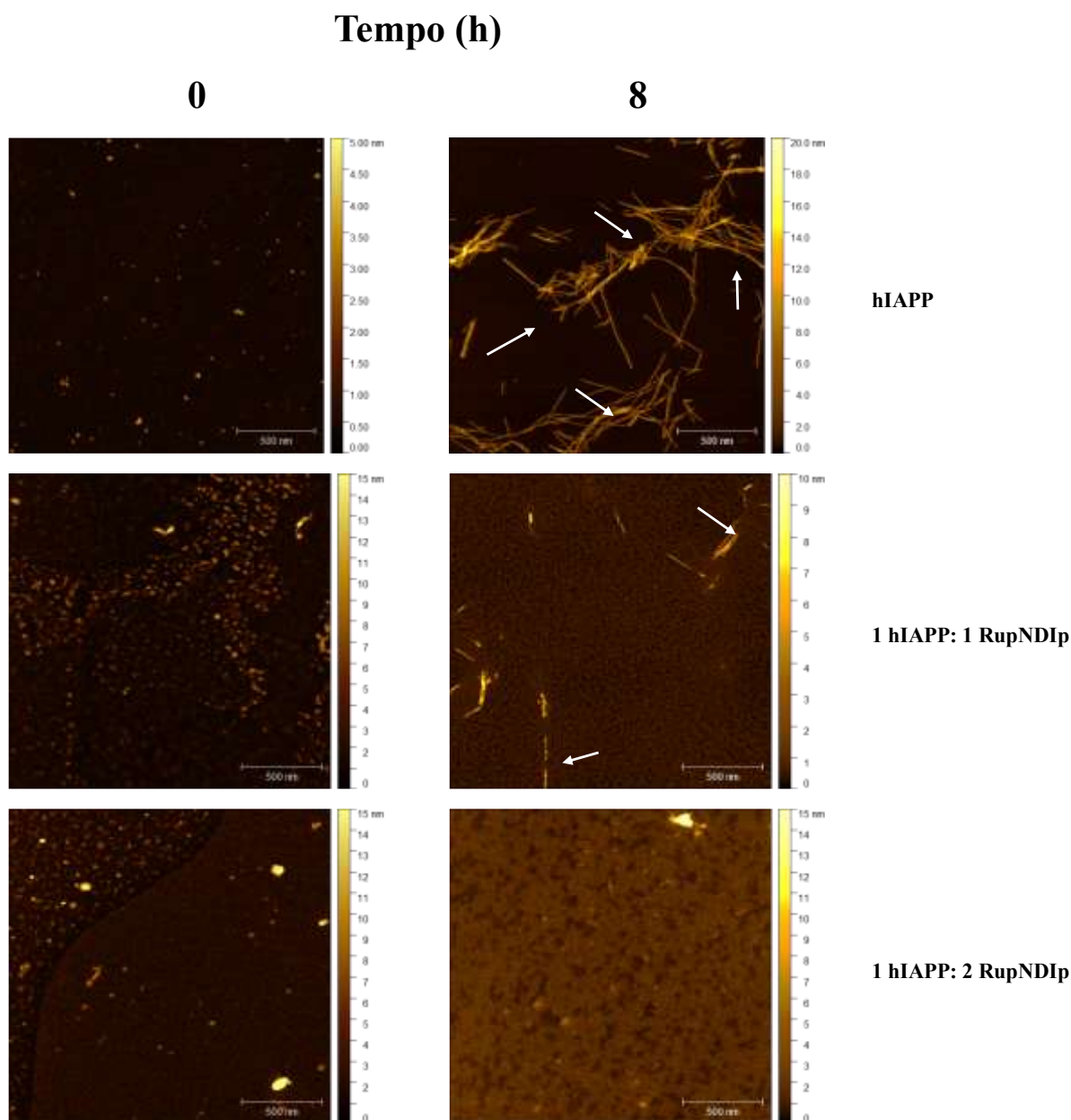


Figura 4.13. Imagens de microscopia força atômica da amilina humana (hIAPP) ($c = 20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) nos tempos 0 e 8 após incubação a 37°C na ausência e na presença da díade RupNDIp quando incubados nas proporções 1:1 e 1:2 (hIAPP:RupNDIp).

Esses resultados indicam que a díade altera o mecanismo de agregação da amilina dependente da concentração, favorecendo a formação de agregados amorfos, com característica não ordenadas. Como os agregados amorfos são espécies não tóxicas, essa mudança pode representar um efeito protetor contra a toxicidade associada às fibrilas amiloides.¹⁶⁸

4.4.3. Ensaios de Viabilidade Celular

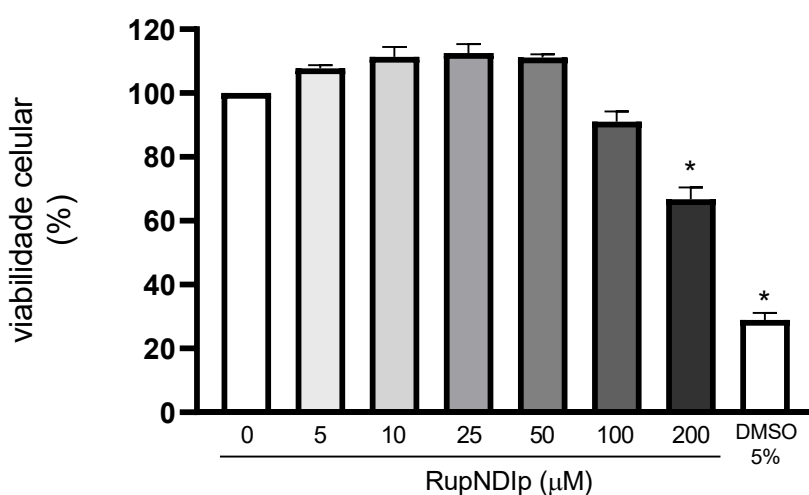
A fibrilação da hIAPP desempenha um papel crucial na patogênese do DM2, levando à morte das células β das ilhotas pancreáticas devido à citotoxicidade das fibrilas depositadas no pâncreas.^{144,169}

Os resultados obtidos através das técnicas de dicroísmo circular e microscopia de força atômica (AFM) demonstraram que a díade RupNDIp inibi o mecanismo de agregação da amilina humana de maneira dependente da concentração. Com base nesses resultados, foi inicialmente avaliado a citotoxicidade da díade RupNDIp em células MIN-6, seguida pela análise da toxicidade da amilina monomérica e na conformação de fibrilas amiloides. Adicionalmente, foi investigado a capacidade da díade em atenuar os efeitos citotóxicos das fibrilas de amilina quando introduzida durante o processo de agregação.

A linhagem celular MIN-6 é amplamente utilizada em pesquisas para estudar a função das células β devido à sua capacidade de sintetizar e secretar insulina. Além disso, essa linhagem celular é especialmente valiosa por manter muitas das características funcionais das células β pancreáticas primárias, tornando-se um modelo útil para pesquisas sobre diabetes.^{170,171}

A viabilidade das células MIN-6 foi avaliada pelo ensaio de MTT em diferentes concentrações da díade RupNDIp (0-200 μ M). Como mostra a Figura 4.14, enquanto o controle positivo com DMSO 5% apresentaram redução esperada na viabilidade celular (28%), apenas a concentração máxima de

RupNDIp testada (200 μM) demonstrou efeito citotóxico significativo, reduzindo a viabilidade para 66% em relação ao controle. Notavelmente, todas as concentrações inferiores mantiveram viabilidade celular acima de 80%, indicando baixa citotoxicidade nessas concentrações. Esses resultados são fundamentais para estabelecer as concentrações seguras de RupNDIp ($\leq 100 \mu\text{M}$) que podem ser utilizadas nos estudos para avaliar os efeitos da díade sobre a citotoxicidade da amilina humana fibrilar utilizando essa linhagem celular.



* $p > 0.05$ vs. RupNDIp (0 μM)

Figura 4.14. Resultados dos ensaios de toxicidade da díade RupNDIp em diferentes concentrações (0-200 μM). Os resultados estão expressos como média + EPM, após teste estatístico 1way ANOVA e pós-teste de Dunnet ($n=3$). * $p < 0,05$ vs. RupNDIp (0 μM).

Os efeitos citotóxicos da amilina humana tanto na forma monomérica quanto na conformação fibrilar foram investigados. Como mostra o gráfico na Figura 4.15.A, observou-se uma diminuição dose-dependente na viabilidade celular em resposta ao aumento da concentração de amilina monomérica. Contudo, apenas as concentrações de 10 e 20 μM demonstraram redução estatisticamente significativa na viabilidade, com 83% e 79% de células viáveis,

respectivamente. Este efeito está provavelmente associado à toxicidade dessas concentrações de amilina monomérica sobre as células.

Em contraste com os resultados obtidos com a forma monomérica, o tratamento com amilina fibrilar (FIGURA 4.14B) apresentou um padrão distinto de citotoxicidade. Uma redução estatisticamente significativa na viabilidade celular (87% em relação ao controle) foi observada já na menor concentração testada (1 μ M), demonstrando a maior toxicidade da conformação fibrilar. Além disso, nas concentrações mais elevadas (5-20 μ M), a viabilidade celular estabilizou em torno de 68%, não apresentando uma relação dose-dependente acima de 1 μ M. Esses resultados são consistentes com os relatos da literatura que descrevem a citotoxicidade das fibrilas amiloides de amilina.¹⁷²

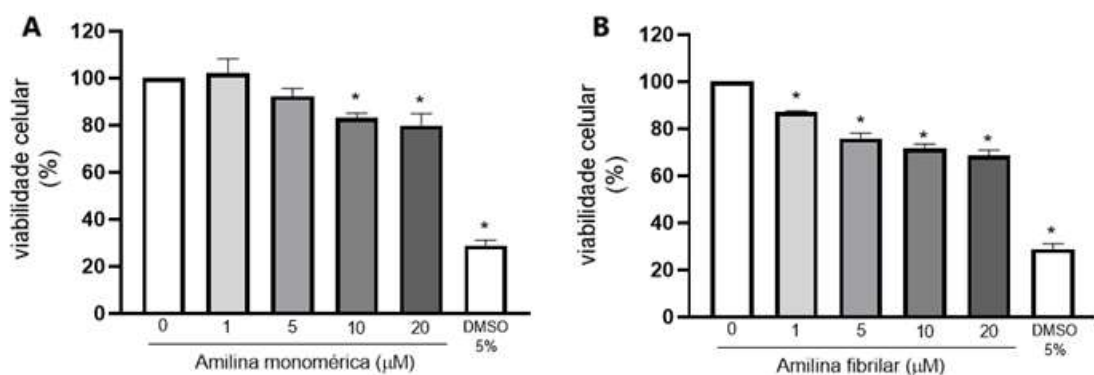


Figura 4.15. Resultados dos ensaios de toxicidade da (A) amilina monomérica (A) e (B) da amilina fibrilar. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM, após teste estatístico 1way ANOVA e pós-teste de Dunnet (n=3). * $p \leq 0,05$ vs. Amilina (0 μ M).

Como evidenciado na Figura 4.16.A, a amilina (20 μ M) quando incubada sob as condições de agregação exerce efeito citotóxico característico, reduzindo a viabilidade celular. Entretanto, a incubação previa com diferentes concentrações da díade RupNDIp (10-100 μ M) não foi capaz de reverter esse efeito. Diante desses resultados, investigamos uma concentração menor de amilina (10 μ M), que

também promoveu redução na viabilidade celular (71%), embora menos pronunciada que a observada com 20 μ M.

Notavelmente, quando a amilina (10 μ M) é incubada previamente em concentrações mais elevadas (25-100 μ M), observamos uma restauração parcial da viabilidade celular, com valores estatisticamente equivalentes ao controle, Figura 4.16.B. Esse efeito protetor demonstra uma dependência da concentração da díade RupNDIp, tornando-se evidente nas maiores concentrações testadas (25-100 μ M). Os resultados obtidos sugerem que o efeito protetor da díade é limitado pela concentração de amilina fibrilar, bem como dependente da concentração da díade RupNDIp.

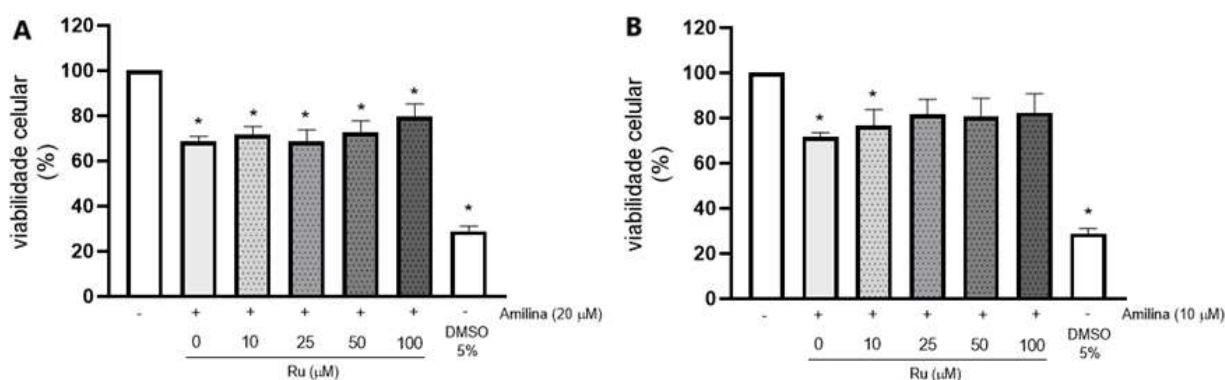


Figura 4.16. Toxicidade da amilina, combinada ao RupNDIp. Toxicidade da amilina fibrilar 20 μ M + RupNDIp (A), Toxicidade da amilina fibrilar 10 μ M + RupNDIp (B). Os resultados estão expressos como média + EPM, após teste estatístico 1way ANOVA e pós-teste de Sidak (n=4). *p < 0,05 vs. controle.

4.5. Conclusões do Capítulo

Os resultados apresentados nesse capítulo demonstram que a díade RupNDIp pode atuar tanto como uma sonda luminescente para a detecção de fibrilas amiloides de amilina humana (hIAPP) e como um agente inibidor da agregação desse polipeptídeo, dependente da concentração.

A capacidade da díade de monitorar a cinética de agregação da hIAPP foi confirmada através ensaios de luminescência, que revelaram um padrão sigmoide característico, semelhante ao observado com a sonda padrão tioflavina T (ThT). Além disso, a microscopia de fluorescência evidenciou que a RupNDIp interage com as fibrilas amiloides previamente formadas, emitindo sinal luminescente intenso, o que a torna uma sonda luminescente promissora para detecção de fibrilas amiloides.

Em relação ao efeito inibitório, os ensaios de dicroísmo circular (DC) e microscopia de força atômica (AFM) mostraram que a díade RupNDIp interfere no processo de agregação da hIAPP, reduzindo a formação de fibrilas. Esse efeito foi particularmente evidente em proporções estequiométricas mais altas (1:2, hIAPP:RupNDIp), nas quais a estrutura em folha β característica das fibrilas amiloides foi reduzida.

Os ensaios de viabilidade celular em células MIN-6 demonstraram, que a díade RupNDIp apresenta baixa citotoxicidade em concentrações $\leq 100 \mu\text{M}$ e é capaz de inibir parcialmente os efeitos tóxicos da hIAPP fibrilar quando incubada em concentrações adequadas e dependendo da concentração de amilina humana.

Portanto, os estudos realizados destacam a díade RupNDIp como um composto versátil, com aplicações tanto no diagnóstico, atuando como sonda luminescente para a detecção de fibrilas amiloides, quanto na terapia, ao inibir a agregação da hIAPP.

Capítulo 5:

**Aplicação da Díade Ru(phen)-
naftalenodiimida na Terapia
Fotodinâmica Antibacteriana**

5.1. Introdução

O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) tem se mostrado uma espécie versátil, com implicações tanto em processos químicos quanto em sistemas biológicos. A capacidade de atuar como um potente agente oxidante permite sua participação em diversos processos, incluindo sínteses orgânicas e na danificação eficiente de biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos.⁷⁴

As bactérias, como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) e *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), representam graves ameaças à saúde, contribuindo para altas taxas de mortalidade global.^{173,174}

Além disso, com o crescente problema da resistência aos antibióticos, há uma necessidade crítica de estratégias terapêuticas alternativas.¹⁷⁵ Nesse cenário, explorar a eficácia do $^1\text{O}_2$ pode oferecer uma direção promissora no combate a cepas bacterianas resistentes e aprimorar estratégias de controle de infecções.^{176–178}

O estresse oxidativo associado ao efeito do $^1\text{O}_2$ perturba as funções celulares, levando à morte celular, um mecanismo particularmente relevante em seu papel como agente bactericida.^{177,179}

Por essas razões, existe um interesse significativo no desenvolvimento da terapia fotodinâmica antibacteriana (TFDa) para ativação controlada de $^1\text{O}_2$, com foco em novos agentes fotossensibilizadores que possam atuar como agentes bactericidas. Essa abordagem apresenta vantagens únicas, pois permite um controle preciso do momento, da localização e da dosagem de liberação do $^1\text{O}_2$.¹⁷⁶

Diferentemente dos antibióticos convencionais, o mecanismo de ação dos fotossensibilizadores não depende da interação com alvos moleculares específicos nas bactérias, mas sim da disponibilidade de luz ativadora. Essa característica fundamental, combinada com a natureza localizada e temporalmente restrita da

terapia, cria uma barreira significativa contra o desenvolvimento de resistência bacteriana.¹⁸⁰

Entre os fotossensibilizadores investigados, os complexos metálicos destacam-se como sistemas particularmente promissores devido às suas propriedades fotofísicas ideais. Esses compostos exibem elevada absorção na região visível e formação eficiente de estados tripleto, resultando na geração de $^1\text{O}_2$ com altos rendimentos quânticos. Adicionalmente, esses complexos permitem a modificação de suas propriedades através da alteração dos ligantes, possibilitando o controle preciso de características essenciais como solubilidade e comprimentos de onda de absorção.¹⁰⁰

Considerando as propriedades fotoquímicas da díade RupNDI discutidas nos capítulos anteriores, especialmente absorção e emissão na região visível associada com estabilidade fotoquímica, esse sistema demonstrou ser particularmente promissor para aplicações biológicas. Diante dessas características, propusemo-nos a avaliar o potencial desse composto como fotossensibilizador em TFDa.

5.2. Objetivo do Capítulo

Investigar *in vitro* a capacidade da díade RupNDIp de gerar espécies reativas de oxigênio $^1\text{O}_2$ e atuar como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica antibacteriana.

5.3. Materiais e Métodos

5.3.1. Fonte de Luz

Para todos os estudos que utilizaram um sistema de luz, foram empregados comprimentos de onda de 350 e 450 nm. Nos experimentos com luz de 450 nm, a fonte utilizada foi um sistema de LED, composto por 96 LEDs posicionados de forma a garantir que cada poço individual da placa recebesse uma dose homogênea de luz. Nos experimentos com luz de 350 nm, a fonte utilizada foi uma lâmpada UV com comprimento de onda de 350 nm.

5.3.2. Propriedades Fotofísicas em solução tampão fosfato salino (PBS)

As propriedades fotofísicas da díade RupNDIp foram investigadas em solução de tampão fosfato salino (PBS; pH = 7,4) utilizando as técnicas de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) e luminescência. Os espectros de absorção eletrônica foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Agilent 8453A. As cubetas de quartzo (Hellma) utilizadas possuíam um caminho óptico de 10,0 mm e capacidade de 3,5 mL.

Os espectros de emissão e excitação foram adquiridos utilizando um espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301 PC, equipado com uma lâmpada de xenônio de alta pressão de 150 W e uma fotomultiplicadora do tipo R928. Durante os experimentos, foram utilizadas cubetas de quartzo (Hellma) com caminho óptico de 10,0 mm e capacidade de 3,5 mL.

5.3.3. Solubilidade

A solubilidade da díade RupNDIp foi determinada em solução tampão PBS (pH 7,4). O experimento foi realizado utilizando o método *Shake Flask*.¹⁸¹ Foram preparadas três soluções, cada uma contendo 2 mg da díade RupNDIp dissolvidos em 2 mL da solução tampão.

Em seguida, as soluções obtidas foram agitadas por 24 horas a 50 rpm e 37 °C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 220 rpm. Posteriormente, as soluções foram filtradas e a concentração da díade RupNDIp foi determinada por medidas em espectrofotômetro na região do UV-Vis.

5.3.4. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio Singlete ($^1\text{O}_2$)

5.3.4.1. Emissão do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) na região do infravermelho próximo (NIR)

A detecção do $^1\text{O}_2$ foi realizada no Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os espectros de emissão na região do infravermelho próximo (NIR) foram obtidos utilizando um sistema composto por: um espectrômetro de fluorescência FLSP 920 (Edinburgh Instruments, Reino Unido) equipado com detector NIR-PMT H10330A-45 (Hamamatsu, Japão) mantido a -80°C por um módulo de resfriamento dedicado; um monocromador TMS/DTMS300 (Edinburgh Analytical Instruments) com grade de difração específica para a região NIR; e um sistema de aquisição de dados controlado pelo software F-900 (v. 6.22, Edinburgh Analytical Instruments). O sinal do fotomultiplicador foi processado digitalmente e registrado em computador para posterior análise, permitindo a caracterização precisa da emissão do $^1\text{O}_2$ em 1270 nm.

5.3.4.2. Espectroscopia de absorção UV-Vis

Os estudos de detecção de $^1\text{O}_2$ foram realizados monitorando a fotooxidação do ácido 9,10-antraceni-diil-bis(metileno)dimalônico (ABDA) de procedência Sigma Aldrich como sonda de $^1\text{O}_2$, utilizando a técnica de espectroscopia de absorção UV-Vis em solução de PBS (pH = 7,4). Para as medidas, foram preparadas soluções de ABDA ($100\ \mu\text{mol.L}^{-1}$) e soluções contendo ABDA ($100\ \mu\text{mol.L}^{-1}$) e a díade RupNDIp ($20\ \mu\text{mol.L}^{-1}$) (ABDA/RupNDIp) sem saturação de oxigênio. O ensaio foi realizado ao longo de três ciclos e, após o consumo completo do ABDA, a díade foi adicionada novamente, reiniciando-se a irradiação com luz.

Em seguida, as soluções foram irradiadas utilizando fonte de luz com comprimento de onda igual 450 nm durante intervalos definidos de tempo, obtendo um tempo total de irradiação igual a 30 minutos. Como controle, foi realizada a irradiação apenas da solução contendo o ABDA. O gráfico do consumo de ABDA em 380 nm (A_0/A), em que A_0 e A corresponde absorbância inicial e absorbância final, respectivamente, *versus* o tempo de irradiação foi plotado subtraindo a absorção do composto analisado, a fim de analisar apenas a diminuição da absorção da sonda de $^1\text{O}_2$.

5.3.4.3. Espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR)

As medidas de espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR) foram realizados no laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica do Grupo de Biofísica Molecular “Sergio Mascarenhas”, no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC/USP) *campus* 2.

Para os ensaios, o composto 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol (TMP-OH) de procedência Sigma Aldrich foi utilizado como armadilha de spin (do inglês *spin trap*) para verificar a formação de $^1\text{O}_2$. Para isso, foram preparadas soluções

contendo 1 mL de TMP-OH (48 mmol.L^{-1}), soluções de díade RupNDIp (100 mmol.L^{-1}) e soluções contendo TMP-OH (48 mmol.L^{-1}) e RupNDIp (100 mmol.L^{-1}) (TMP-OH/RupNDIp) em solução de tampão PBS ($\text{pH} = 7,4$) sem saturação de oxigênio.

Em seguida, 200 μL da mistura foram transferidos para a cela de quartzo. As medidas foram realizadas no escuro e após irradiações com luz de 350 nm e 450 nm, durante 30 minutos. As amostras foram irradiadas com o feixe de luz posicionado na janela da cavidade de micro-ondas do equipamento de EPR, permitindo a permanência da cubeta na mesma posição durante a irradiação e a aquisição dos espectros. Como controle, as mesmas soluções foram analisadas no escuro.

Para a detecção de outras espécies reativas de oxigênio (EROs) foi utilizado 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO) (30 mmol.L^{-1}) adquirido da Sigma Aldrich como armadilha de spin, empregando a mesma concentração da díade descrita acima e o mesmo tempo de irradiação.

5.3.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Os ensaios para determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) foram realizados para definir a concentração utilizada no tratamento fotodinâmico antibacteriano. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Aplicada, em colaboração com a pós-doutoranda Sarah Raquel de Annunzio e o Professor Dr. Carlos Eduardo Vergani, docente da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr), UNESP.

Nesses estudos, a atividade antimicrobiana da díade RupNDIp e do complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ foi investigada no escuro contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*) (*American Type Culture Collection* - ATCC 25922) utilizando o método de microdiluição em caldo, conforme descrito

no manual do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* para bactérias.¹⁸²

O procedimento utilizado para o cultivo da bactéria *E. coli* foi baseado na literatura.¹⁸³ Inicialmente, as células foram cultivadas em placas de ágar *Trypticase Soy Agar* (TSA; KASVI) e incubadas por 48 horas a 37 °C. Em seguida, uma alça contendo 5 a 10 colônias bacterianas foi transferida para caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB; KASVI) para cultivo em meio líquido, seguido de incubação a 37°C durante 180 minutos. Esse período corresponde à fase de crescimento *mid-log* do microrganismo, determinada de acordo com a curva de crescimento microbiano previamente padronizada pelo grupo.

Após a incubação, a cultura bacteriana foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos e lavada duas vezes com tampão PBS (pH= 7,4). Em seguida, as bactérias foram ressuspensas em caldo *Mueller-Hinton* (MH). A suspensão bacteriana foi padronizada por espectrofotometria (leitura de absorbância a 600 nm) e diluída seriadamente até atingir uma concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL para *E. coli*, conforme estabelecido pelo CLSI.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada com os compostos RupNDIp e o complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, que foram inicialmente solubilizados em solução de 1% de DMSO em tampão PBS (pH 7,4) e subsequentemente diluídos para obtenção de concentrações entre 62,5 e 1000 µg/mL. As culturas bacterianas foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos (62,5-1000 µg/mL) em placas de 96 poços contendo meio de cultura, mantidas a 37°C por 24 horas. Paralelamente, foram incluídos controles experimentais adequados: um controle positivo contendo apenas microrganismos em meio de cultura, um controle de veículo com microrganismos em meio contendo 1% de DMSO para avaliar possíveis efeitos do solvente, e um controle negativo com apenas meio de cultura para verificação da esterilidade do sistema.

Após o período de incubação, a absorbância foi medida a 620 nm utilizando um leitor de microplacas *EZ Read 400* (BioChrom), com os dados sendo processados pelo software *Adapt 2.0* (BioChrom).

5.3.6. Terapia Fotodinâmica Antibacteriana

Para a avaliação da atividade fotodinâmica, empregou-se uma placa de 96 poços contendo alíquotas de 100 µL de suspensão bacteriana de *E. coli*. Nessa suspensão, adicionou-se igual volume (100 µL) da díade RupNDIp ou do complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ na concentração final de 25 µM. As amostras foram mantidas no escuro por 20 minutos para permitir a interação dos fotossensibilizadores com os microrganismos, seguido de irradiação com luz visível a 450 nm ($7,5 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$) durante 15 minutos. Para todas as condições avaliadas, diluições seriadas na faixa de 10^{-1} a 10^{-4} foram obtidas a partir das amostras contidas nos poços. Essas diluições seriadas foram semeadas em ágar *Trypticase Soy* (TSA; Acumedia Manufactures). Após 24 horas de incubação a 37 °C, as placas de Petri foram submetidas à contagem de colônias e o número de unidades formadoras de colônias foi calculado (UFC/mL).

5.3.7. Microscopia de fluorescência de varredura a laser confocal (CLSM)

A avaliação da eficácia da terapia fotodinâmica antibacteriana também foi realizada por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM, Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan) utilizando o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD BacLight™ (*Molecular Probes*). As imagens foram adquiridas conforme metodologia previamente descrita na literatura, empregando uma objetiva de 20x de ampliação.¹⁸⁴ Para a excitação, utilizou-se laser com comprimento de onda fixado em 488 nm, com faixas de detecção específicas para cada corante: 488-546

nm para Syto-9 (ganho de 685 V) e 561-700 nm para iodeto de propídio (PI) (ganho de 766 V).¹⁸⁵

5.3.8. Preparação das vesículas unilamelares gigantes (GUVs)

A preparação das Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs) foi realizada utilizando o método gel.¹⁸⁶ Inicialmente, adicionaram-se 400 µL de uma solução estoque de álcool polivinílico (PVA) a 5% (m/m) em um béquer de 5 mL. Em seguida, a solução foi mantida em estufa a 50 °C para formar um filme de PVA.

Posteriormente, os fosfolípidos 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (DOPG) de procedência Avanti Polar Lipids, utilizados para a formação das GUVs, foram solubilizados em clorofórmio, obtendo-se uma solução estoque de 1 mM. Adicionaram-se 16 µL da mistura lipídica POPC:DOPG (85:15) ao filme de PVA. O solvente residual foi evaporado sob vácuo por 1 hora, e as vesículas foram subsequentemente hidratadas com 1 mL de solução de sacarose (200 mM), permanecendo em repouso por 4 horas para a formação das GUVs.

Para a análise das GUVs utilizando o microscópio de fluorescência, transferiram-se 200 µL de solução de glicose (200 mM) e 50 µL da suspensão de GUVs para uma placa *Thermo Scientific™ Nunc™ Glass Bottom Dishes* (35 mm com fundo de vidro de 12 mm). Nas análises com a díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDI}p)]^{2+}$, adicionou-se um volume da solução estoque da díade preparado em solução de glicose (200 mM) a fim de atingir uma concentração final de $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ na solução total de 250 µL. A presença de sacarose no meio interno das GUVs e de glicose no meio externo permite a realização de medidas de contraste de fase em campo claro.

5.4. Resultados e Discussão

5.4.1. Propriedades fotofísicas em solução de tampão fosfato salino (PBS)

As propriedades fotofísicas da díade RupNDIp foram investigadas em solução de PBS (pH 7,4) utilizando a técnica de espectroscopia de absorção UV-Vis e luminescência e os resultados obtidos foram comparados com o complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$.

O espectro de absorção (FIGURA 5.1.A) é caracterizado pela soma de duas bandas intensas, sendo uma banda larga centrada em 450 nm ($\epsilon = 13.200 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), atribuída à transição de transferência de carga metal-ligante ($^1\text{MLCT}$; $\text{Ru}, d\pi \rightarrow \text{phen}, \pi^*$) da componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$ (FIGURA 5.1.A) e um conjunto de bandas vibracionalmente estruturadas com máximos em 386 nm ($\epsilon = 18.400 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), 364 nm ($\epsilon = 16.300 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) e 346 nm ($\epsilon = 11.000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), características das transições internas de transferência de carga de ligantes aromáticos insaturados (ILCT) do componente $\{\text{pNDIp}\}$.

O espectro de emissão de RupNDIp, mostrado na Figura 5.1.B, é caracterizado por uma banda larga com máximo em 600 nm que se assemelha à do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, Figura 5.2.B. Adicionalmente, a emissão demonstrou independência do comprimento de onda de excitação (350-470 nm), característica típica de um único estado emissivo (FIGURA 5.1.C). Além disso, o espectro de excitação da díade RupNDIp corresponde ao perfil de absorção de $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (FIGURA 5.2.B), confirmando que a luminescência é atribuída ao estado $^3\text{MLCT}$.

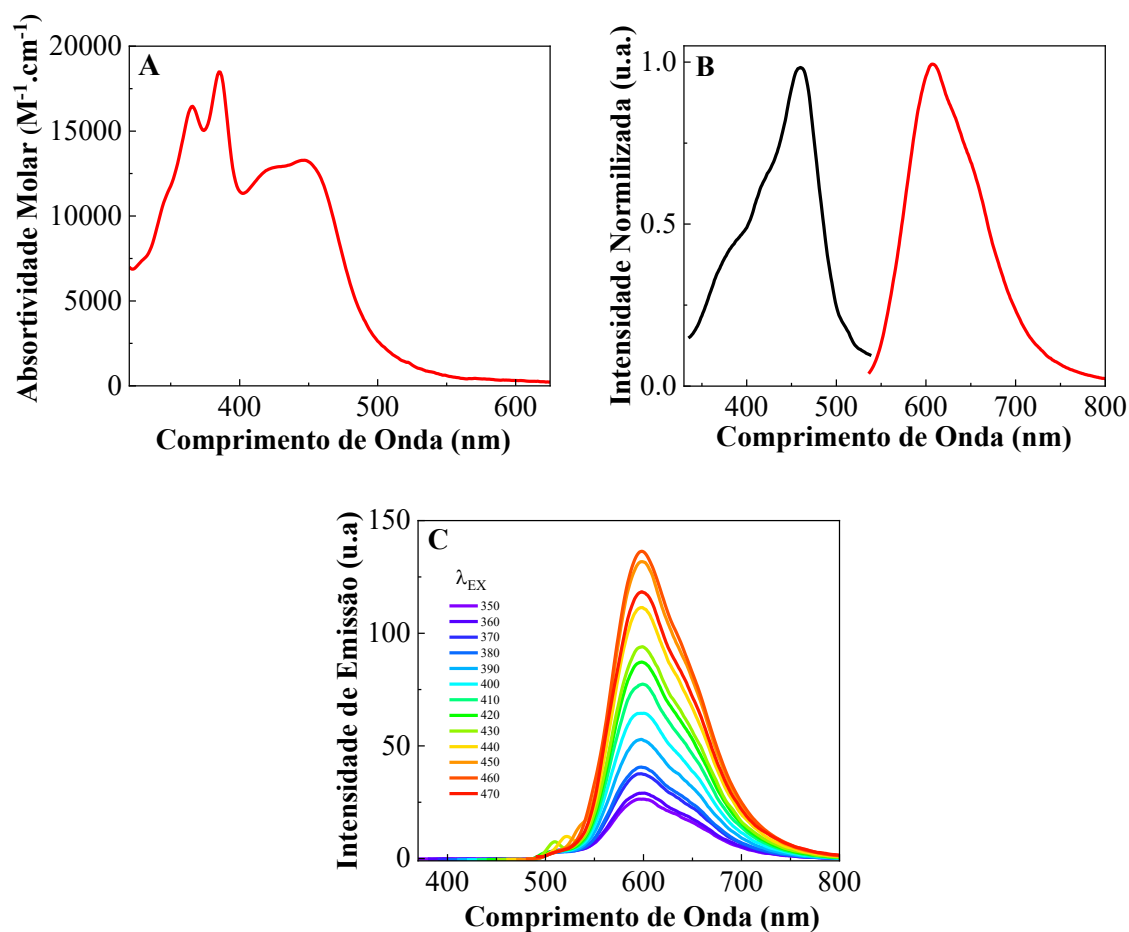


Figura 5.1. Espectros de (A) absorção, (B) emissão ($\lambda_{EX} = 450$ nm) e excitação ($\lambda_{EM} = 600$ nm) e de (C) emissão em diferentes comprimentos de onda de excitação ($\lambda_{EX} = 350$ - 470 nm) da díade RuPNDIp ($c = 20 \mu mol. L^{-1}$) em solução de tampão PBS (pH=7,4).

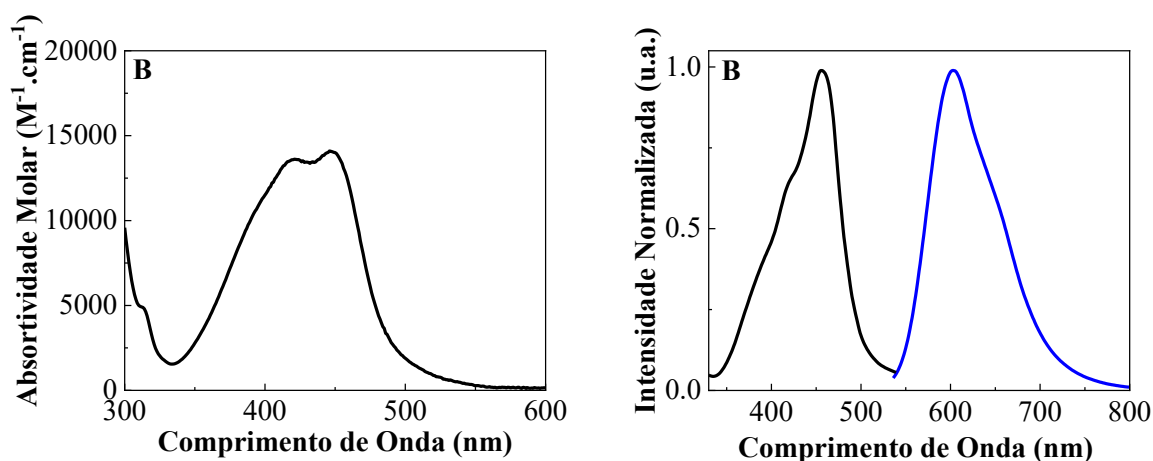


Figura 5.2. Espectros de (A) absorção e (B) emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$) e excitação ($\lambda_{\text{EM}} = 600 \text{ nm}$) do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ($c = 20 \mu\text{mol. L}^{-1}$) em solução de tampão PBS (pH=7,4).

5.4.2 Solubilidade

A solubilidade de um composto é um parâmetro determinante para aplicações biológicas, particularmente na terapia fotodinâmica, visto que a solubilidade do FS afeta diretamente sua distribuição nos tecidos-alvo e, consequentemente, sua eficácia terapêutica.¹⁸⁷

Esse efeito ocorre porque a baixa solubilidade reduz significativamente o coeficiente de absorção, comprometendo a geração de ¹O₂ espécie essencial para o mecanismo de ação do tratamento.^{187,188} Por essa razão, a solubilidade da díade RupNDIp foi avaliada em solução tampão PBS (pH = 7,4) utilizando o método Shake-Flask, cujo resultado está apresentado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Solubilidade da díade RupNDIp em solução de tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,4).

Composto	Tampão PBS (pH= 7,4)
RupNDIp	0,293 mg/mL $\pm$ 0,016

A díade RupNDIp apresentou valor de solubilidade inferior ao de outros compostos de Ru(II), o que sugere comportamento hidrofóbico¹⁸⁹. Entretanto, a solubilidade da díade avaliada ainda é superior à de outros fotossensibilizadores utilizados na terapia fotodinâmica, como o mTHPC (Foscan®) (<0,1 mg/mL), amplamente empregado em tratamentos oncológicos.¹⁹⁰

5.4.3. Detecção de espécies reativas de Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)

5.4.3.1. Emissão do $^1\text{O}_2$ na região do Infravermelho próximo (NIR)

A formação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) pela díade RupNDIp foi investigada através do método direto de detecção, monitorando a emissão característica do $^1\text{O}_2$ em 1270 nm. Essa emissão típica resulta da desativação do estado excitado singlete ($^1\Delta_g$) para o estado fundamental tripleto ($3\Sigma_g^-$) do oxigênio molecular, Figura 5.3. Os resultados obtidos demonstram a capacidade da díade RupNDIp em gerar $^1\text{O}_2$ em solução de tampão PBS (pH=7,4) quando fotoativada com luz azul ($\lambda=450$ nm).

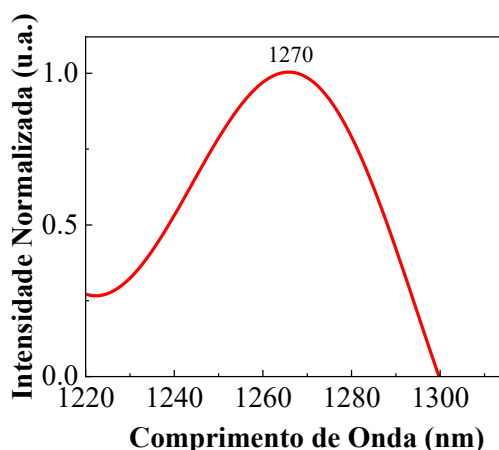


Figura 5.3. Espectro de emissão de $^1\text{O}_2$ gerado pela díade RupNDIp utilizando laser de excitação de 450 nm em solução PBS (pH= 7,4).

5.4.3.2. Espectroscopia de Absorção UV-Vis

A eficácia da terapia fotodinâmica (TFD) está diretamente ligada à capacidade do fotossensibilizador (FS) de gerar $^1\text{O}_2$. Para avaliar essa propriedade na díade RupNDIp, utilizou-se o ácido 9,10-antraceni-9,10-bis(metileno)dimalônico (ABDA) como sensor específico de $^1\text{O}_2$. O ABDA reage com $^1\text{O}_2$ sofrendo fotobranqueamento, formando um composto endoperóxido (FIGURA 3.50), o que reduz sua absorbância em 380 nm. Essa diminuição, monitorada por espectroscopia UV-Vis, determina a produção de $^1\text{O}_2$ em solução.^{140,191}

Na Figura 5.4, observa-se a redução da absorbância do ABDA em função do tempo de irradiação com luz azul ($\lambda = 450 \text{ nm}$, 7500 mcd) na presença de diferentes concentrações de RupNDIp (10 e 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). A degradação do ABDA mostrou-se proporcional à concentração da díade após 30 minutos de irradiação. Na concentração mais elevada (25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), verificou-se o consumo completo do ABDA, com permanência apenas do espectro característico da RupNDIp. O grupo controle, contendo apenas ABDA sem o fotossensibilizador (FIGURA 5.4.A), não apresentou variação significativa de absorbância após irradiação, confirmando que a diminuição observada resulta da geração de $^1\text{O}_2$ mediante fotoexcitação da díade RupNDIp.

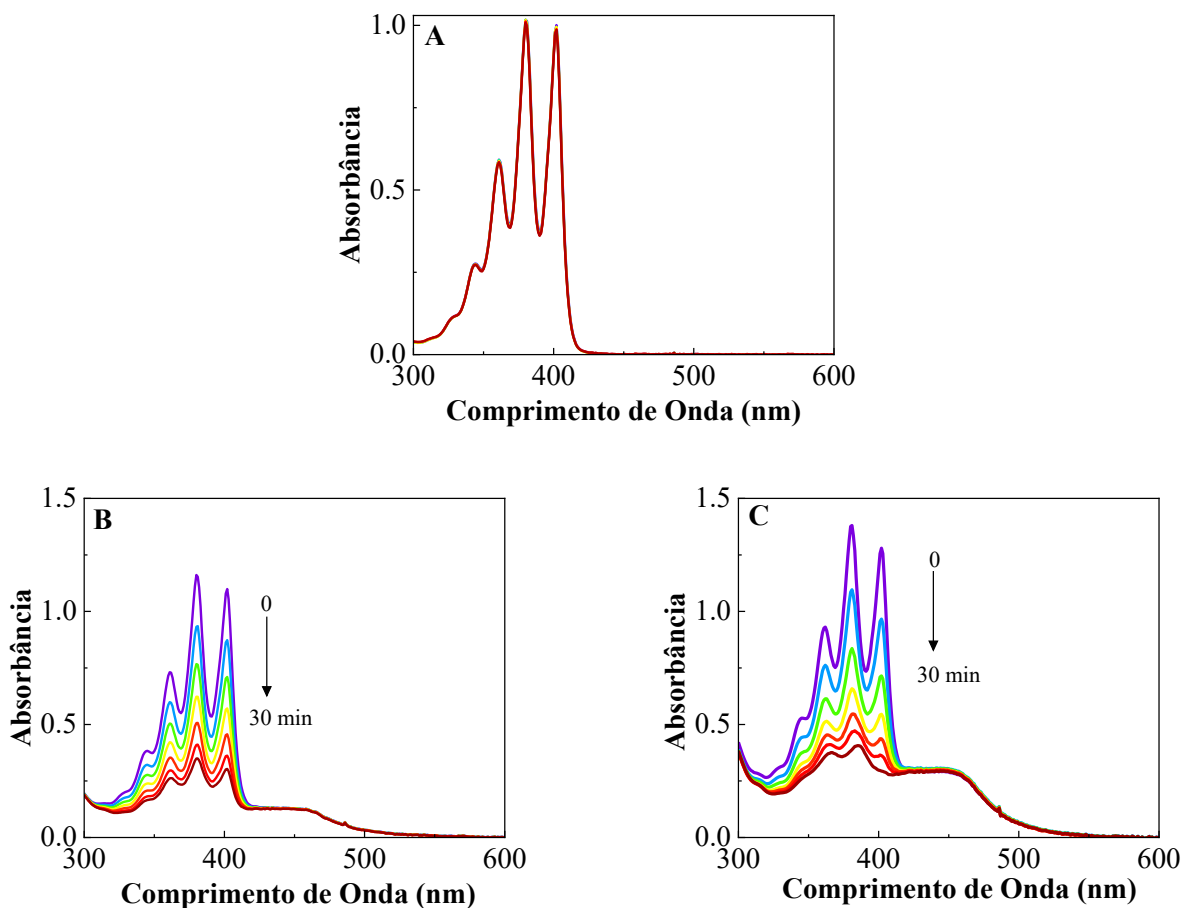


Figura 5.4. Irradiação do ABDA ($c = 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (A) sozinho em diferentes concentrações da díade RupNDIp (B) $c = 10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e (C) $c = 25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ durante 30 minutos com luz de 450 nm.

A análise da relação entre o consumo do ABDA durante o tempo de irradiação (A_0/A) foi realizada até 20 minutos de exposição, visto que após esse período ocorre saturação do sistema na concentração mais elevada. O gráfico obtido indica (FIGURA 5.5) que a geração de 1O_2 é dependente da concentração da díade RupNDIp.

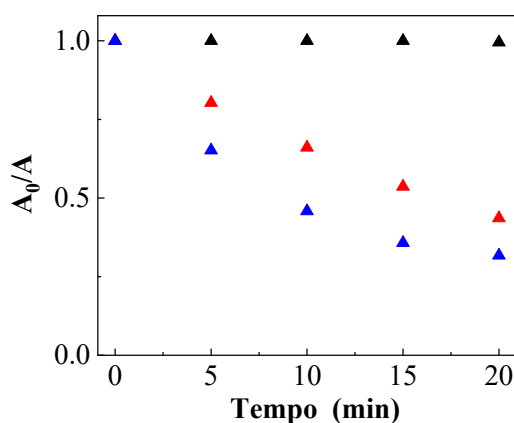


Figura 5.5. Relação A_0/A da absorvância do ABDA em 380 nm em relação ao tempo de irradiação do ABDA sozinho (preto) e na presença da díade RupNDIp (vermelho; $c = 10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (azul; $c = 25 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Além da eficiência na capacidade de geração de 1O_2 , a fotoestabilidade do FS é uma propriedade importante, uma vez que compostos fotoinstáveis podem sofrer degradação acelerada sob irradiação, comprometendo a produção de 1O_2 e, consequentemente, a eficácia terapêutica. Em contrapartida, FS com elevada fotoestabilidade permite um controle mais preciso de parâmetros críticos como dosagem e tempo de irradiação, aspectos essenciais para a reprodutibilidade de protocolos clínicos.^{192–194}

Dentre os fotossensibilizadores convencionais, observa-se que muitos apresentam susceptibilidade à fotodegradação. O azul de metileno, por exemplo, embora exiba alto rendimento quântico para formação de 1O_2 , apresenta limitações devido à sua instabilidade fotoquímica, o que prejudica sua eficácia terapêutica.¹⁹⁵

A díade RupNDIp demonstrou estabilidade na geração fotossensibilizada de $^1\text{O}_2$, mesmo após três ciclos consecutivos de irradiação com luz de 450 nm (FIGURA 5.6). Nesse experimento, a eficiência da formação de $^1\text{O}_2$ foi avaliada monitorando o consumo de ABDA ($c = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$) durante 30 minutos de irradiação ($\lambda = 450 \text{ nm}$) em uma solução contendo RupNDIp em concentração fixa ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$). Após cada ciclo de irradiação, o ABDA foi reintroduzido na solução na mesma concentração, e um novo ciclo foi iniciado. Esse procedimento foi repetido por três ciclos consecutivos.

No primeiro ciclo (Figura 5.6.A), observa-se o consumo total do ABDA após 30 minutos de irradiação, resultando, ao final, apenas no espectro de absorção da díade RupNDIp. Entretanto, nos dois ciclos subsequentes (FIGURA 5.6.B e 5.6.C) foram necessários maiores tempos de irradiação para o consumo completo da sonda. Esse resultado pode estar associado ao fato de que o oxigênio molecular presente na solução foi consumido, comprometendo a formação de $^1\text{O}_2$, uma vez que o experimento foi realizado sem saturação de oxigênio molecular.

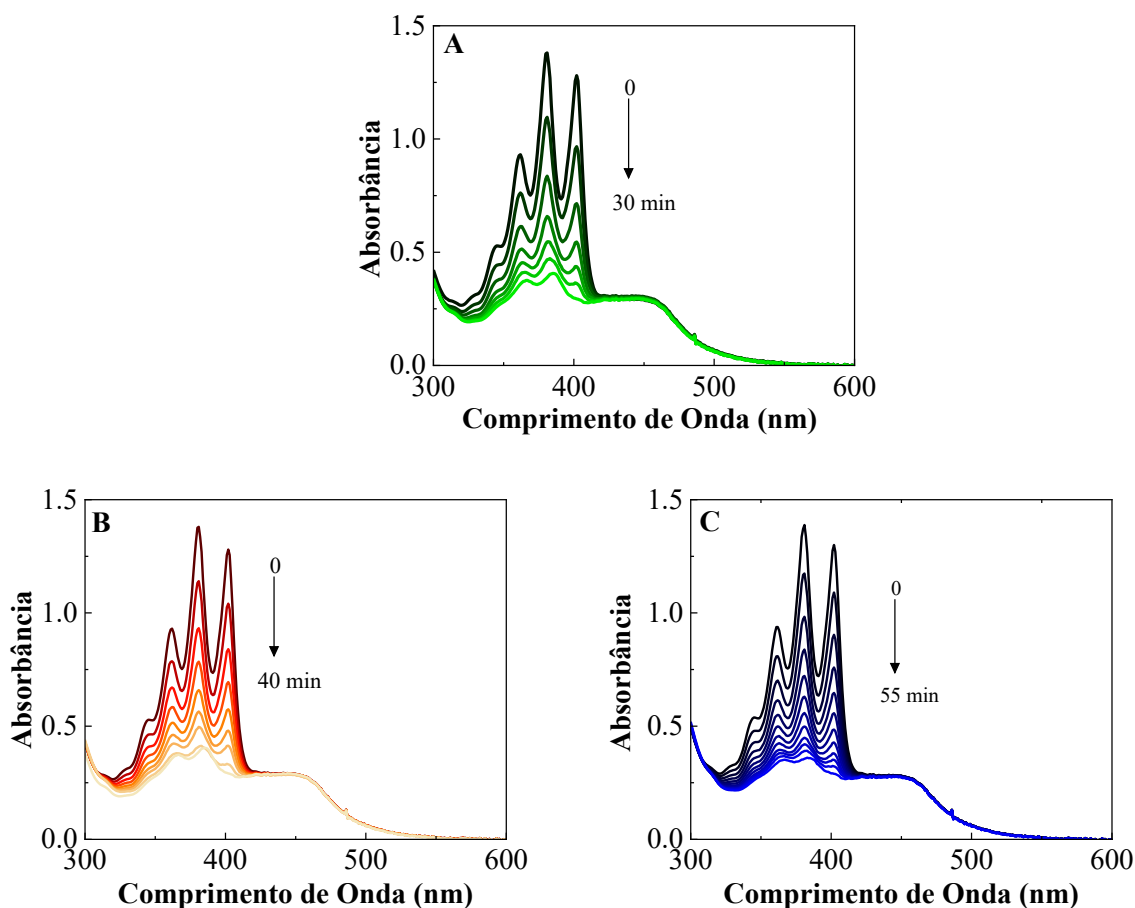


Figura 5.6. Espectros de absorção do ABDA ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) na presença de da díade RupNDIp ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em PBS irradiado de luz a 450 nm (azul) (A) primeiro ciclo durante 30 minutos, (B) segundo ciclo durante 40 minutos e (C) terceiro ciclo durante 55 minutos.

Apesar da técnica de UV-Vis ser eficiente para a determinação de $^1\text{O}_2$, os compostos utilizados como sondas do $^1\text{O}_2$ como o ABDA ou o 9,10-dimetilantraceno (DMA) apresentam processos fotoquímicos quando irradiado na região 350 nm. Diante disso, para avaliar a capacidade da díade gerar $^1\text{O}_2$ com luz de 350 nm utilizamos a espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR).

5.4.3.3. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética (EPR)

A Espectroscopia de Ressonância Paramagnética (EPR) é amplamente utilizada para a detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs).^{196,197} No entanto, devido ao curto tempo de vida dessas espécies, sua detecção direta por EPR não é viável. Diante disso, utilizou-se o composto 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol (TMP-OH) como armadilha de spin para monitorar a formação de $^1\text{O}_2$ gerado pela díade RupNDIp em solução PBS (pH = 7,4). O experimento foi realizado sob irradiação luminosa com comprimentos de onda de 350 nm e 450 nm (intensidade luminosa de 7500 mcd). Conforme ilustrado na Figura 5.7, o TMP-OH é uma espécie diamagnética (não ativo no EPR) e quando reage com o $^1\text{O}_2$ gera o aduto paramagnético 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidine N-oxil (TEMPO) que possui um sinal de EPR caracterizado por três linhas com desdobramento hiperfino de mesma intensidade (1:1:1).¹⁹⁸

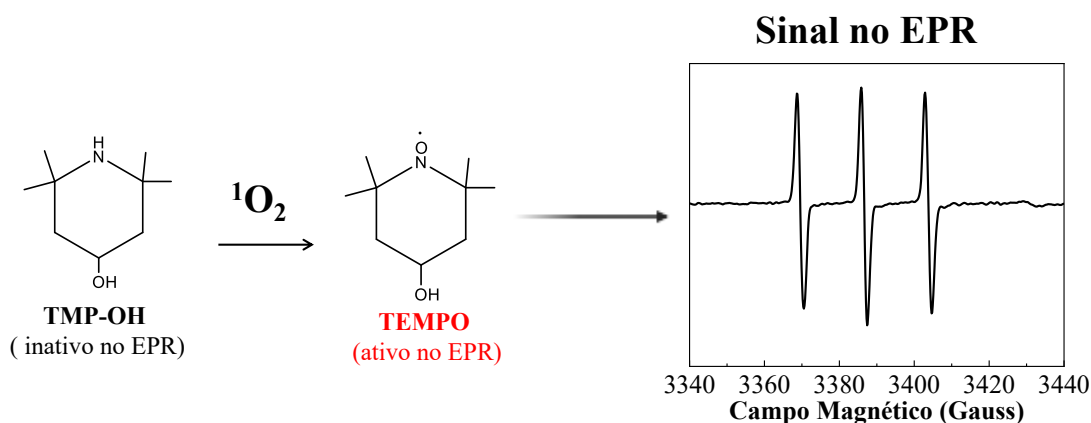


Figura 5.7. Reação entre a armadilha de spin 2,2,6,6-tetrametil-4piperidinol (TMP-OH) e o $^1\text{O}_2$ para gerar o aduto 4-hidroxi-2,2,6,6tetramethylpiperidine N-oxil (TEMPO).

Conforme demonstrado na Figura 5.8.A, a irradiação da solução de TMP-OH em PBS (pH = 7,4) com luz de 350 nm não apresenta crescimento do sinal das linhas hiperfinas características da formação da espécie TEMPO, indicando a ausência de geração de $^1\text{O}_2$.

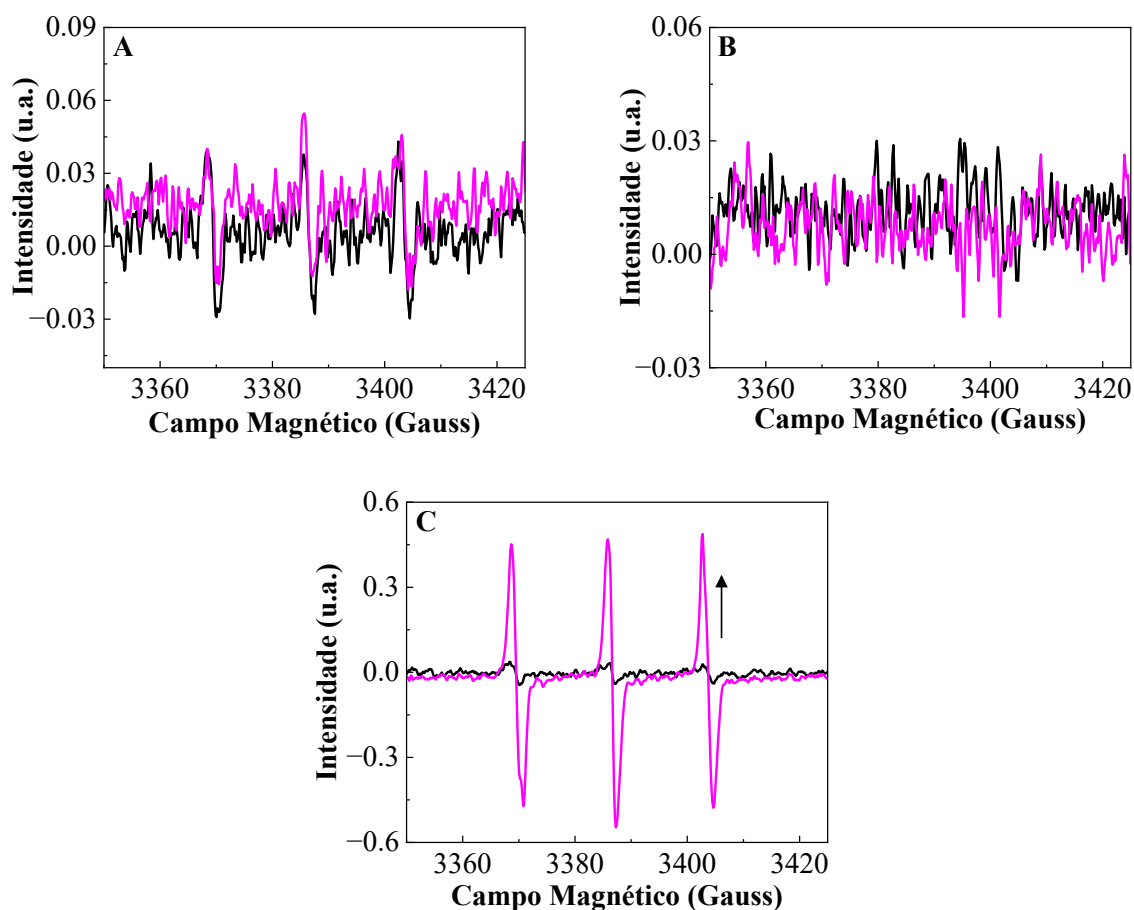


Figura 5.8. Espectros de EPR da solução (A) do TMP-OH ($c = 48 \text{ mmol.L}^{-1}$), (B) díade RupNDIp ($c = 100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) sozinho, (C) TMP-OH/Díade RupNDIp no escuro (linha preta) e irradiando (linha magenta) durante 30 minutos com luz de 350 nm.

De forma semelhante, a irradiação da díade RupNDIp com a mesma fonte luminosa também não gera sinal no espectro de EPR (FIGURA 5.8.B), visto que se trata de composto diamagnético e, portanto, inativo no EPR. Enquanto, a irradiação da mistura TMP-OH/RupNDIp com luz de 350 nm durante 30 minutos apresentou aumento do sinal com desdobramento hiperfino de mesma intensidade

entre 3360-3410 Gauss associado a geração de $^1\text{O}_2$, Figura 5.8.C. Esses resultados indicam que a fotoexcitação da díade RupNDIp é responsável pela transferência de energia para o oxigênio molecular, promovendo a geração de $^1\text{O}_2$.

A figura 5.9 exibem os espectros de EPR obtidos durante o ensaio utilizando luz de 450 nm (luz azul). Inicialmente, foram realizadas as amostras controles irradiando durante 30 minutos ($\lambda = 450$ nm) a solução contendo apenas o TMP-OH (FIGURA 5.9.A), observa-se que a irradiação apenas do TEMP não produz o aumento das hiperfinas.

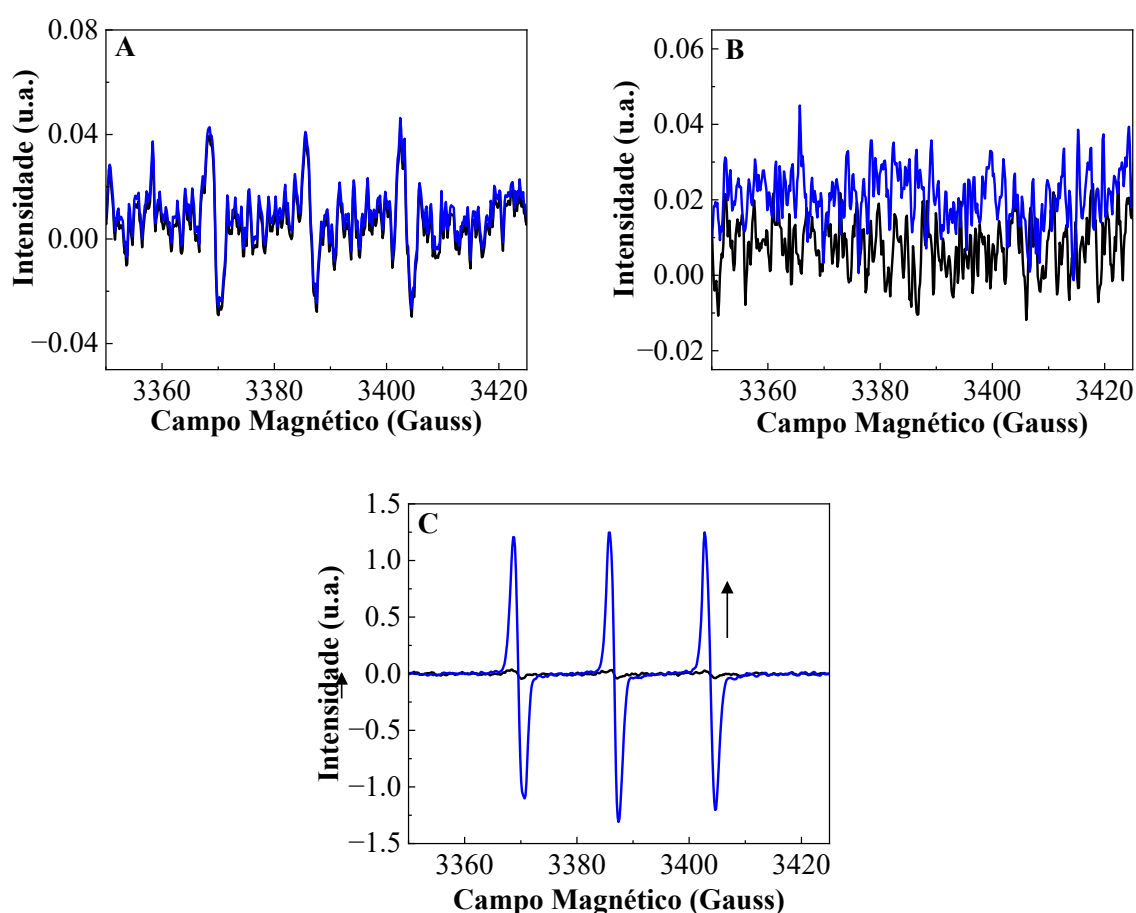


Figura 5.9. Espectros de EPR da solução (A) do TMP-OH ($c = 48 \text{ mmol.L}^{-1}$), (B) díade RupNDIp ($c = 100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) sozinho, (C) TMP-OH/Díade RupNDIp no escuro (linha preta) e irradiando (linha azul) durante 30 minutos com luz de 450 nm.

Adicionalmente, nenhum sinal é observado ao irradiar o complexo isolado, pois a díade é diamagnética, como evidenciado na Figura 5.9B. A fotoexcitação do TMP-OH/ díade RupNDIp com luz azul aumentou o sinal das linhas hiperfinas entre 3360-3410 Gauss característico da formação de TEMPO e consequente geração de $^1\text{O}_2$, Figura 5.9.C.

A análise da intensidade dos sinais demonstra uma maior eficiência na geração de $^1\text{O}_2$ quando o composto é irradiado com luz de 450 nm. Esse fator é especialmente relevante para aplicações em terapia fotodinâmica, uma vez que, além da eficiência na geração de $^1\text{O}_2$, é fundamental que um fotossensibilizador possua absorção dentro da janela fototerapêutica (região do espectro visível/infravermelho próximo). Nessa faixa, a absorção de luz pelas biomoléculas é mínima, permitindo maior seletividade e eficácia do processo fotodinâmico. Portanto, a capacidade de absorver luz visível e gerar $^1\text{O}_2$ de maneira eficiente reforça o potencial da díade estudado para aplicações terapêuticas.

A técnica de EPR também foi utilizada para investigar a capacidade da díade RupNDIp gerar outras espécies reativas de oxigênio (EROS). Para isso, foi utilizado 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO) ($0,03 \text{ mol.L}^{-1}$) como armadilha de spin.¹⁹⁹

A capacidade da díade RupNDIp em gerar as demais EROs, como $\text{OH}^\bullet$ e $\text{O}_2^{\bullet-}$ em solução de tampão PBS também foi avaliada empregando a técnica de EPR e a armadilha de spin e 5,5- dimetil-1-pirroline N-óxido (DMPO). O DMPO reage com radicais livres formando nitroxidos estáveis (aductos de spin), cujos espectros de EPR apresentam padrões de hiperfinos característicos dessas espécies.¹⁹⁹

Como evidenciado na Figura 5.10, a irradiação da díade RupNDIp ($\lambda = 450 \text{ nm}$) não produziu os sinais característicos dos aductos $\text{DMPO}^\bullet\text{OH}$ ou DMPO-OOH , demonstrando que, nas condições experimentais empregadas, o composto atua exclusivamente via produção de $^1\text{O}_2$.

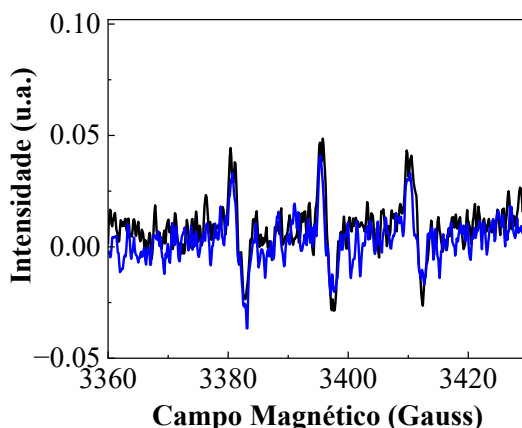


Figura 5.10. Espectros de EPR da solução do DMPO/ Díade RupNDIp ($c = 30 \text{ mmol.L}^{-1}/100 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$) no escuro (linha preta) e irradiando (linha azul) durante 30 minutos com luz de 450 nm.

5.4.4. Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Os resultados obtidos para a formação de espécies reativas de $^1\text{O}_2$ após a fotoexcitação da díade RupNDIp com luz azul ($\lambda = 450 \text{ nm}$) motivaram a investigação dos efeitos desse composto na terapia fotodinâmica antimicrobiana contra a bactéria Gram-negativa *E.coli*. Os resultados foram comparados com o complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$. Para isso, determinou-se inicialmente a concentração inibitória mínima (MIC) no escuro, definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de um microrganismo *in vitro*.²⁰⁰

Os resultados demonstraram que, na ausência de luz, tanto a díade RupNDIp quanto o complexo de referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. coli*. A díade RupNDIp mostrou redução completa do crescimento bacteriano a partir de $500 \text{ }\mu\text{g/mL}$ (FIGURA 5.11). Por outro lado, o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, na mesma concentração (FIGURA 5.12), exibiu apenas redução parcial do crescimento. Com base nesses resultados, estabeleceu-se que concentrações $\leq 62,5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ($60 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$) são ideais para avaliar a terapia

fotodinâmica, pois nesta faixa ambos os compostos não apresentaram citotoxicidade em condições de ausência de luz.

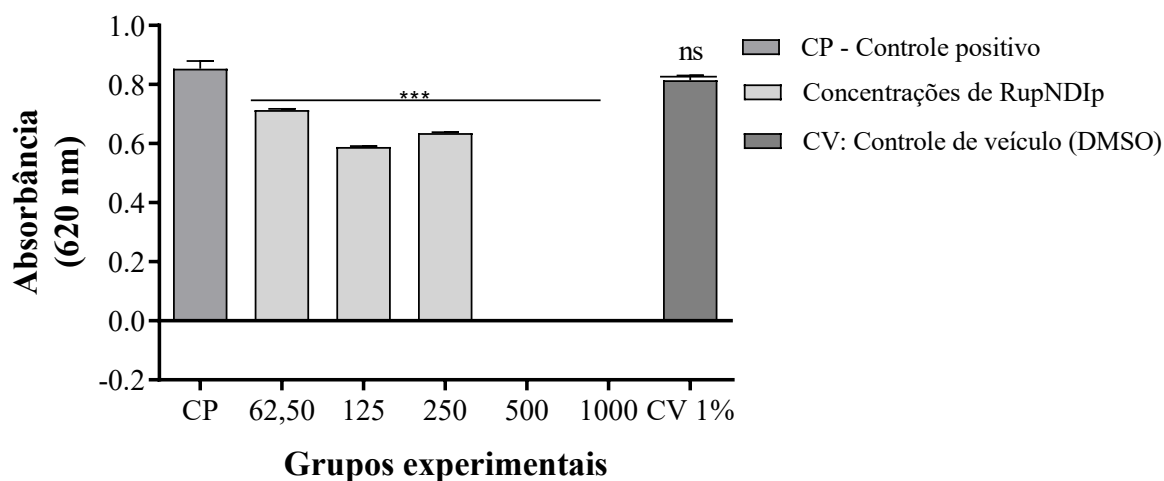


Figura 5.11. Atividade antibacteriana da RupNDIp sob diferentes concentrações avaliada após 24 horas no escuro. As colunas representam os valores médios de porcentagem entre os grupos avaliados e as barras representam o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle positivo. *** $p < 0,0001$; ns: não significativo.

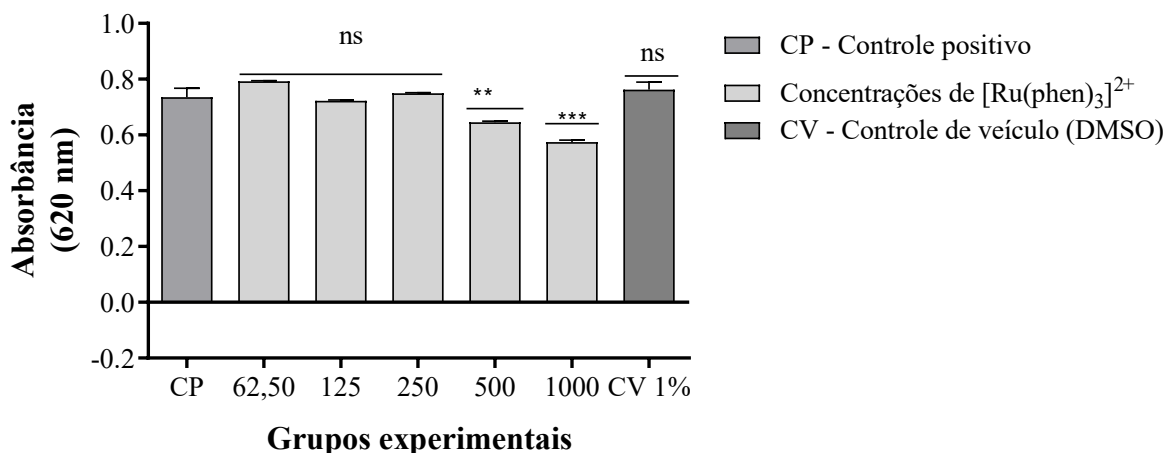


Figura 5.12. Atividade antibacteriana da $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ sob diferentes concentrações avaliada após 24 horas no escuro. As colunas representam os valores médios de porcentagem entre os grupos avaliados e as barras representam o desvio-padrão (n=9). Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle positivo. **p < 0,001; ***p < 0,0001; ns: não significativo.

5.4.5. Terapia Fotodinâmica Antibacteriana

A partir dos resultados obtidos da concentração inibitória mínima (MIC) no escuro, a concentração de 25 μM de RupNDIp foi selecionada para os estudos antimicrobianos realizados no escuro e sob fotoativação. A fonte de luz utilizada foi composta por LEDs azuis ($\lambda=450\text{ nm}$; $7,5\text{ J.cm}^{-2}$). A Figura 5.13 demonstra que, na ausência de luz, as taxas de redução de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de *E. coli* expostas a 25 μM de $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e RupNDIp apresentaram reduções de $1,11\text{ log}_{10}$ e $0,97\text{ log}_{10}$, respectivamente, na viabilidade bacteriana.

No entanto, 15 minutos de irradiação com luz na presença de RupNDIp resultaram em uma redução significativa de $4,99\text{ log}_{10}$ na viabilidade das colônias, em relação ao grupo controle (C+). A análise antibacteriana do $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ apresentou redução de $5,79\text{ log}_{10}$ na viabilidade bacteriana em comparação ao grupo controle (C+), sugerindo que a redução está associada à radiação luminosa

e, conseqüentemente, à formação de $^1\text{O}_2$, principal agente citotóxico responsável pelo efeito antibacteriano.

Os resultados obtidos são consistentes com outros estudos envolvendo fotossensibilizadores catiônicos, que têm sido empregados para superar a resistência de bactérias Gram-negativas. Em particular, complexos de Ru(II) catiônicos sob irradiação luminosa (50-100 μM de complexo, 10 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, 400-700 nm) demonstraram eficácia comparável contra *E. coli*.¹⁷⁶

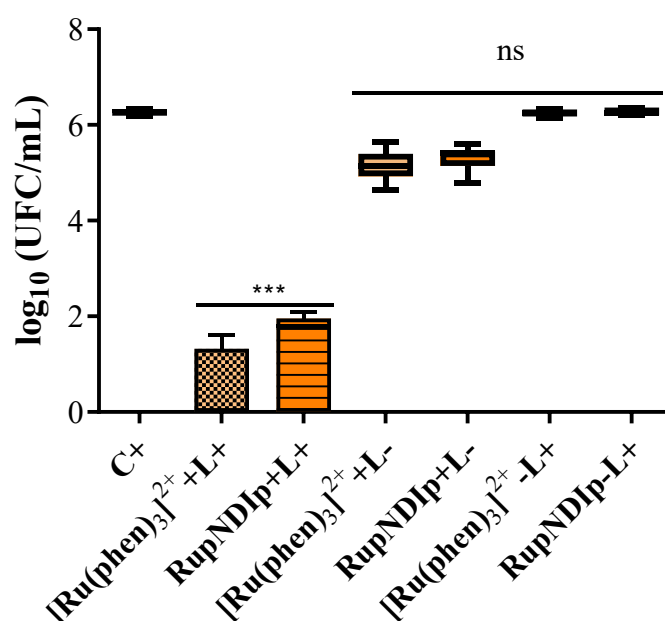


Figura 5.13. Valores médios +/- desvio padrão (barras de erro) de log₁₀ (UFC/mL) para diferentes grupos experimentais. C+: apenas suspensões de *E. coli*; [Ru(phen)₃]²⁺+L+: [Ru(phen)₃]²⁺ com luz; RupNDIp+L+: RupNDIp com luz; [Ru(phen)₃]²⁺+L-: [Ru(phen)₃]²⁺ sem luz; RupNDIp+L-: RupNDIp sem luz; [Ru(phen)₃]²⁺-L+ ou RupNDIp-L+: apenas tratamento com luz. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo C+. ns: diferença estatística não significativa, *** p < 0,0001 (n = 9). O Kruskal-Wallis foi realizado com pós-teste de Dunn (α=0,05).

5.4.6. Microscopia Confocal de varredura a laser (CLSM)

O efeito antibacteriano da díade RupNDIp também foi avaliado por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) utilizando o kit de viabilidade bacteriana *LIVE/DEAD*, que diferencia bactérias vivas (fluorescência verde) de mortas (fluorescência vermelha). Este kit emprega dois corantes fluorescentes: SYTO-9 (488-546 nm), que marca o ácido nucleico de todas as células emitindo fluorescência verde e iodeto de propídio (561-700 nm), que penetra exclusivamente em células com membrana danificada, substituindo o SYTO-9 e emitindo fluorescência vermelha.²⁰¹

Nas análises da Figura 5.14, as suspensões de *E. coli* (controle), tanto no escuro (imagem superior esquerda) quanto sob irradiação a 450 nm (imagem superior direita), apresentaram predominância de fluorescência verde, indicando viabilidade celular. As amostras tratadas com RupNDIp no escuro mantiveram a fluorescência verde, enquanto aquelas irradiadas com luz de 450 nm exibiram redução da fluorescência verde e aumento da marcação vermelha (imagem inferior direita), demonstrando dano à membrana bacteriana. Esses resultados corroboram os ensaios de atividade fotodinâmica anteriores, confirmando que a fotoativação do RupNDIp gera $^1\text{O}_2$, responsável pelo dano à membrana bacteriana.

Em comparação, as imagens do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ no escuro (FIGURA 5.14, inferior esquerda) também apresentaram fluorescência verde, indicando bactérias viáveis. Contudo, após irradiação, observou-se fluorescência vermelha (imagem inferior direita), indicando dano causado pelo efeito citotóxico do $^1\text{O}_2$.

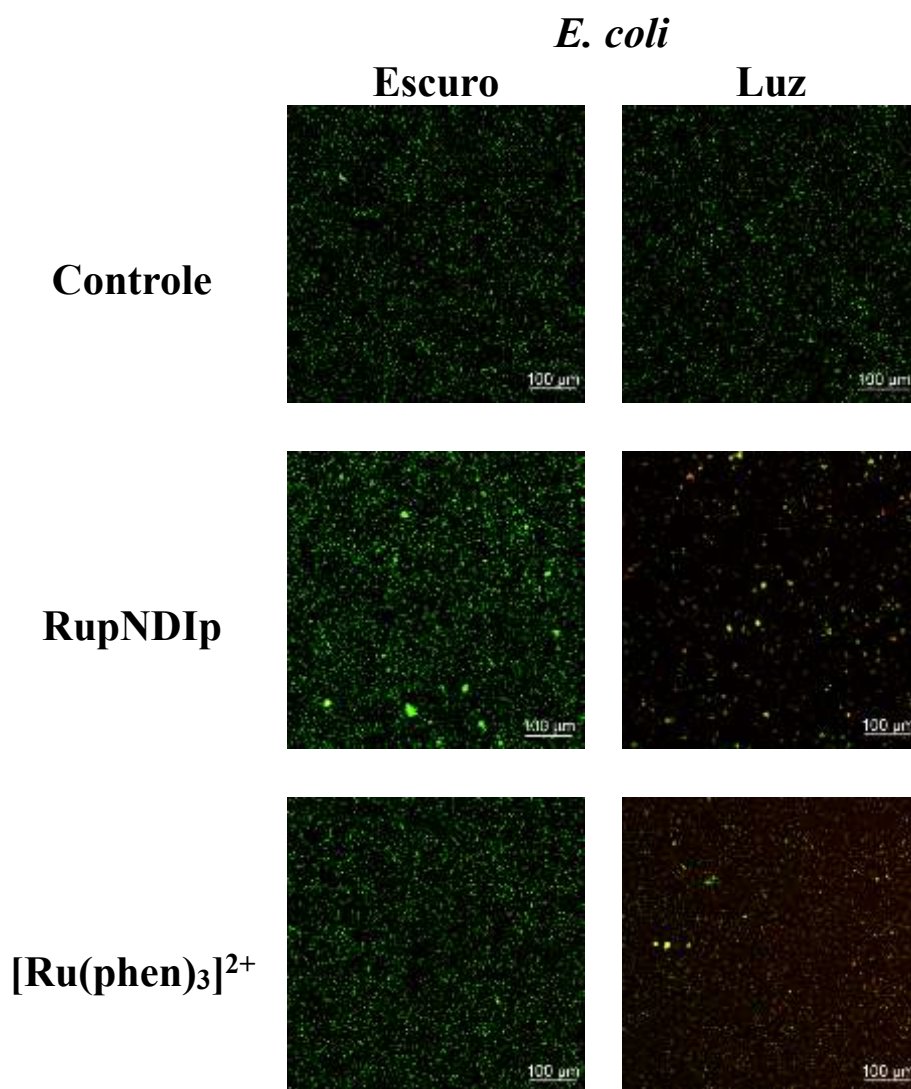


Figura 5.14. Imagens CLSM. Lado Esquerdo (sem tratamento com luz de 450 nm) e lado direito (tratamento com luz de 450 nm). Controle: suspensões *E. coli* marcadas com Syto -9 (células coradas em verde) e PI (células coradas em vermelho). RupNDIp: suspensões de *E. coli* com a díade RupNDIp ($c=25 \mu\text{mol.L}^{-1}$). $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$: suspensões de *E. coli* com o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ $c=25 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

5.4.7. Modelos de Membranas Fosfolipídicas

Para mimetizar a composição de membranas bacterianas, vesículas unilamelares gigantes (GUVs) foram preparadas como modelos de membranas lipídicas. As GUVs foram compostas por uma mistura dos fosfolipídios 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) (FIGURA 5.15.A) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DOPG) (FIGURA 5.15.B) na proporção 85:15 (POPC:DOPG), simulando a membrana bacteriana.²⁰²

As membranas bacterianas representam um dos principais sítios de interação de fotossensibilizadores (FS) e podem sofrer danos oxidativos significativos.¹⁷⁸ Diante disso, as alterações morfológicas induzidas pelo $^1\text{O}_2$ formado durante a fotoexcitação da díade RuPNDI_p foram monitoradas por microscopia de fluorescência.

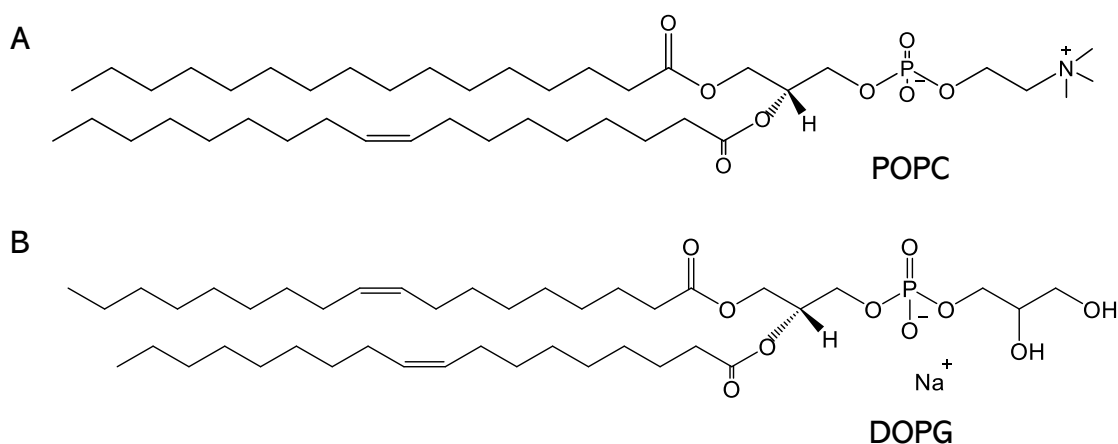


Figura 5.15. Representação das estruturas moleculares (A) 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfocolina (POPC) e (B) 1,2-dioleoil-snglicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DOPG).

Inicialmente, a interação da díade RupNDIp com a membrana POPC:DOPG foi avaliada no escuro durante 5 minutos. Como controle, a membrana POPC:DOPG foi irradiada sozinha nos mesmos intervalos de tempo da díade RupNDIp, Figuras 5.16.A e 5.16.B.

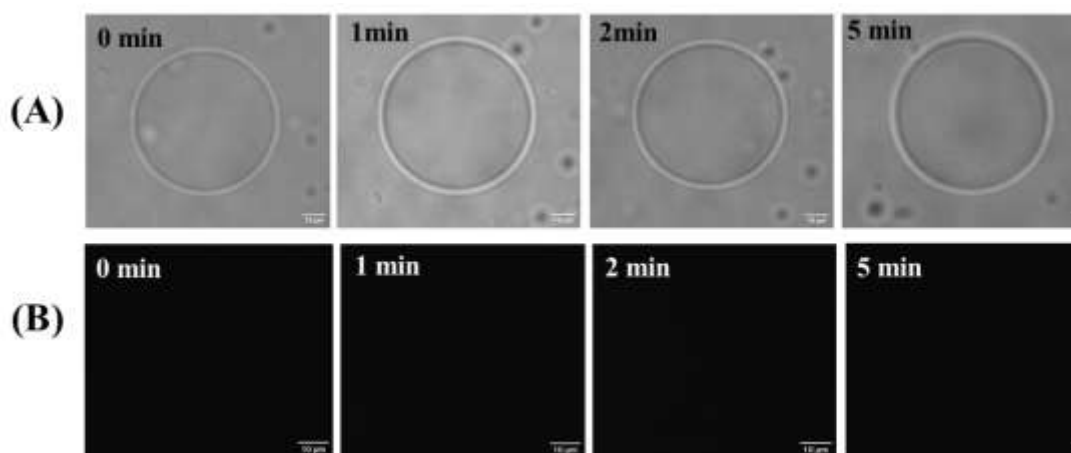


Figura 5.16. Imagens de microscopia fluorescência de (A) contraste de fase das GUVs POPC:DOPG e de (B) fluorescência sob irradiação com luz de 450 nm durante 5 minutos.

Nas Figuras 5.16.B, observa-se que as GUVs não apresentam resposta emissiva. Em contraste, nas Figuras 5.17.B verifica-se que, no escuro, a díade interage com a bicamada lipídica, como evidenciado pela resposta luminescente no contorno das GUVs. Essa interação resulta provavelmente de forças eletrostáticas entre a carga positiva da díade e as cargas negativas dos grupos fosfato presentes nos fosfolípidos.

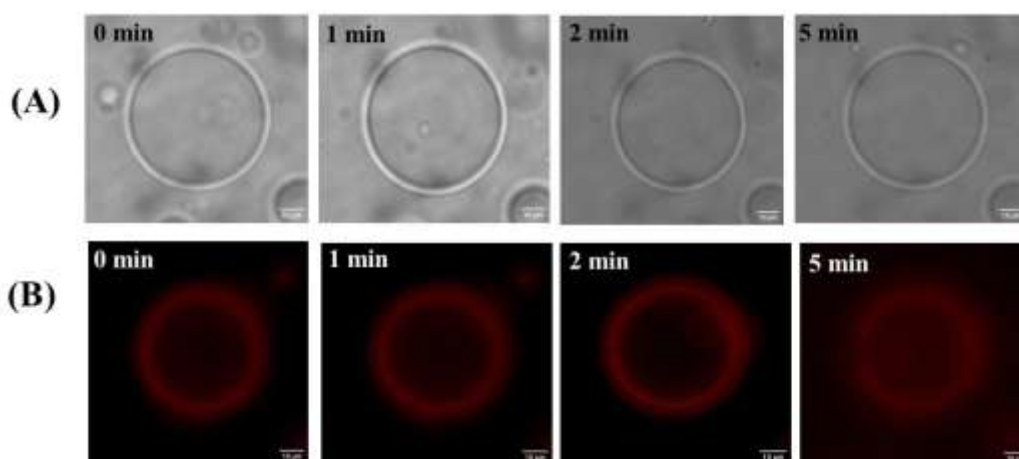


Figura 5.17. Imagens de microscopia fluorescência de (A) contraste de fase de (B) fluorescência das GUVs POPC:DOPG na presença da díade Ru(II)-NpDIp ($c = 25 \mu\text{M}$) no escuro.

Os resultados obtidos pelas Figuras 5.18.A e 5.18.B demonstram que, quando submetida à irradiação contínua com luz a 450 nm e monitorada simultaneamente por microscopia, a díade Ru(II)-NpDIp induz a ruptura da membrana bacteriana após apenas 5 minutos de exposição. Esses dados comprovam uma relação direta entre o dano estrutural observado e a presença da díade Ru(II)-NpDIp ativada pela luz de 450 nm. Esses resultados estão em concordância com os dados anteriores que demonstram a geração de $^1\text{O}_2$.

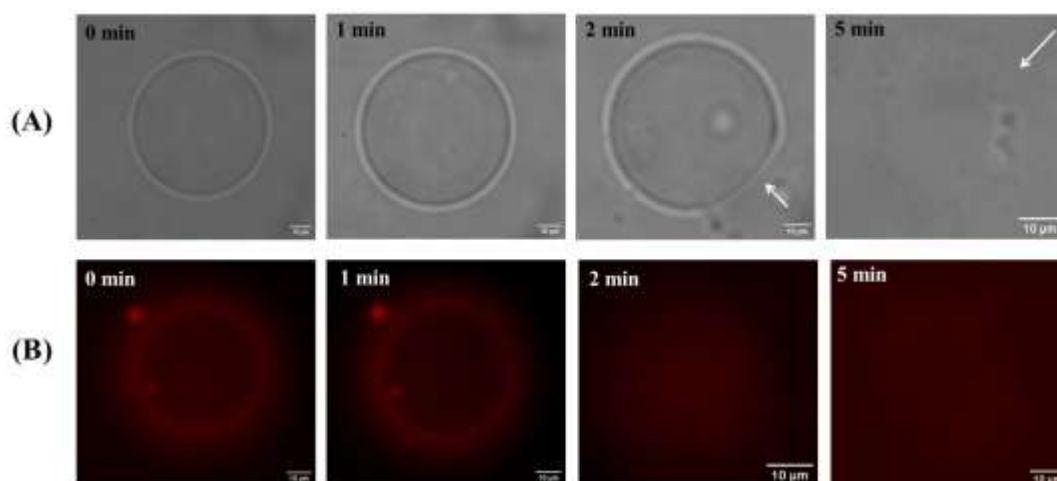


Figura 5.18. Imagens de microscopia de fluorescência de (A) contraste de fase de (B) fluorescência das GUVs POPC:DOPG na presença da díade RupNDIp ($c=25 \mu\text{M}$) sob irradiação de luz contínua de 450 nm.

Os resultados permitem propor um mecanismo de ação para o efeito antibacteriano da RupNDIp contra *E. coli in vitro*, envolve o estabelecimento de interações eletrostáticas entre a díade, que apresenta carga positiva e a parede celular de *E. coli*, de carga negativa e a ativação fotoinduzida de $^1\text{O}_2$ que desencadeia uma ruptura estrutural da membrana.

5.5. Conclusões do Capítulo

Os resultados apresentados nesse capítulo demonstram o potencial da díade RupNDIp como um FS eficiente para aplicação em terapia fotodinâmica contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*.

Os resultados revelaram que a díade RupNDIp apresenta propriedades fotofísicas altamente favoráveis para aplicações biológicas, como absorção na região visível e emissão característica em 600 nm, associados à razoável solubilidade, tornam a díade um candidato promissor para terapia fotodinâmica. A capacidade de gerar $^1\text{O}_2$ de forma eficiente e seletiva foi comprovada utilizando

as técnicas de espectroscopia de emissão no infravermelho próximo, absorção UV-Vis e ressonância paramagnética eletrônica (EPR).

Os resultados obtidos indicam a seletividade da RupNDIp na geração de $^1\text{O}_2$, sem produção de outras espécies reativas de oxigênio. Essa característica, associada à fotoestabilidade do composto são características importantes para a aplicações terapêuticas.

Os ensaios de terapia fotodinâmica demonstraram a eficácia da díade RupNDIp quando ativada por luz azul (450 nm). A combinação do composto com irradiação luminosa resultou em uma redução significativa na viabilidade bacteriana ($4,99 \log_{10}$ em UFC). A microscopia confocal e estudos com modelos de membranas fosfolipídicas (GUVs) corroboraram o mecanismo de ação proposto, mostrando que o dano oxidativo à membrana bacteriana associado a geração de $^1\text{O}_2$.

Os resultados obtidos possibilitam perspectivas interessantes para o desenvolvimento de novas estratégias no combate a infecções bacterianas, especialmente no contexto da crescente resistência aos antibióticos convencionais.

Capítulo 6:

Conclusão

6.1 Conclusões

O trabalho apresentado nessa tese envolve a síntese e a caracterização estrutural de uma nova díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$ (RupNDIp), bem como a investigação das propriedades fotofísicas, fotoquímicas e eletroquímicas. Além disso, são discutidas suas aplicações, incluindo o emprego como sonda luminescente no estudo da agregação da amilina humana e seu papel como inibidor desse processo. Adicionalmente, as propriedades fotofísicas e fotoquímicas da díade RupNDIp motivaram a investigação do potencial desse composto na terapia fotodinâmica antibacteriana.

No Capítulo 3 foi apresentado propriedades fotofísicas, fotoquímicas e eletroquímicas da díade RupNDIp. Em solução de DMSO, a díade apresenta uma banda de absorção intensa na região ultravioleta ($\lambda_{\text{MÁX}} = 265 \text{ nm}$, $\epsilon = 83.000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), típica das transições internas de transferência de carga de ligantes aromáticos insaturados (ILCT), além de uma banda estruturada na região UV-Vis (300-400 nm), atribuída ao centro aromático naftalenodiimida. Além disso, também foi observada uma banda de absorção larga na região do visível ($\lambda_{\text{MÁX}} = 450 \text{ nm}$, $\epsilon = 15.300 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), atribuída às transições de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT, $\text{Ru}, d\pi \rightarrow \text{phen}, \pi^*$), apresentando um máximo de emissão em 610 nm ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$).

Os estudos de absorção transiente demonstraram que a excitação da componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$ da díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})]^{2+}$ resulta em uma rápida transferência de elétrons, gerando o estado excitado intermediário de separação de cargas (CSS) $\{\text{Ru}^{3+}(\text{phen})_2(\text{pNDIp}^{\bullet-})\}$. A atribuição dessa espécie como o estado de separação de cargas foi confirmada por comparação com as características espectrais obtidas na espectroeletroquímica UV-vis após a redução no primeiro potencial de redução negativo da componente $\{\text{pNDIp}\}$ da díade RupNDIp e pela fotólise realizada em atmosfera inerte com luz de 350 nm.

No capítulo 4, foi demonstrado que a díade pode atuar como marcador luminescente, tanto pela alteração na intensidade de emissão quanto pela

.....

capacidade de marcar a agregação da amilina humana por imagem, de maneira semelhante à sonda amiloide ThT. Entretanto, em comparação com a ThT, a díade apresenta vantagens significativas, uma vez que a díade RupNDIp absorve e emite na região do visível, evitando a sobreposição com a janela terapêutica da maioria das biomoléculas e, conseqüentemente, minimizando a interferência com a fluorescência intrínseca dos resíduos de tirosina presentes na hIAPP.

Os ensaios de inibição demonstraram ainda que a díade RupNDIp inibe o processo de agregação da amilina humana, apresentando um efeito dependente da concentração. Além disso, os ensaios de viabilidade celular realizados em linhagem celular MIN-6 evidenciaram que díade apresenta baixa citotoxicidade em concentrações $\leq 100 \mu\text{M}$, e quando utilizada em proporções adequadas em relação à concentração amilina humana ($10 \mu\text{M}$) mostra capacidade de reduzir os efeitos citotóxicos da estrutura fibrilar da hIAPP.

Os resultados apresentados no Capítulo 6 demonstraram o potencial da díade RupNDIp como fotossensibilizador eficaz para aplicação em terapia fotodinâmica contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*. Os ensaios de terapia fotodinâmica comprovaram a eficiência da díade quando ativada por luz azul (450 nm), na qual combinação da díade com a luz promoveu uma redução significativa na viabilidade bacteriana ($4,99 \log_{10}$ em UFC/mL). Esses resultados estão associados à capacidade da díade em gerar $^1\text{O}_2$ a partir do processo de transferência de energia no estado excitado, mantendo sua estabilidade fotoquímica.

Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho evidenciam o potencial da díade RupNDIp como um composto multifuncional, apresentando propriedades estruturais e espectroscópicas favoráveis à sua aplicação em diferentes contextos. A capacidade de atuar como sonda luminescente e inibir a agregação da amilina humana, aliada à eficiência como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica antibacteriana, ressalta a versatilidade do composto e abre caminho para futuros

.....

estudos visando o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e diagnósticas baseadas em sistemas semelhantes.

Capítulo 7:

Referências

1. Antar, S. A. *et al.* Diabetes mellitus: Classification, mediators, and complications; A gate to identify potential targets for the development of new effective treatments. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **168**, 115734 (2023).
2. Ojo, O. A., Ibrahim, H. S., Rotimi, D. E., Ogunlakin, A. D. & Ojo, A. B. Diabetes mellitus: From molecular mechanism to pathophysiology and pharmacology. *Med Nov Technol Devices* **19**, 100247 (2023).
3. Hua, F. New insights into diabetes mellitus and its complications: a narrative review. *Ann Transl Med* **8**, 1689–1689 (2020).
4. IDF Diabetes Atlas. 11th ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2025. (2025).
5. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **32**, S62–S67 (2009).
6. Amod, A. *et al.* Risk factors for kidney disorders in patients with type 2 diabetes at high cardiovascular risk: An exploratory analysis (DEVOTE 12). *Diab Vasc Dis Res* **17**, (2020).
7. Lee, L., Blume, P. A. & Sumpio, B. Charcot Joint Disease in Diabetes Mellitus. *Ann Vasc Surg* **17**, 571–580 (2003).
8. ElSayed, N. A. *et al.* 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: *Standards of Care in Diabetes—2023*. *Diabetes Care* **46**, S19–S40 (2023).
9. Kahanovitz, L., Sluss, P. M. & Russell, S. J. Type 1 Diabetes—A Clinical Perspective. *Point of Care: The Journal of Near-Patient Testing & Technology* **16**, 37–40 (2017).
10. Lin, X. *et al.* Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025. *Sci Rep* **10**, 14790 (2020).

11. Kao, P.-Y. *et al.* Inhibition of toxic IAPP amyloid by extracts of common fruits. *J Funct Foods* **12**, 450–457 (2015).
12. Montane, J., Klimek-Abercrombie, A., Potter, K. J., Westwell-Roper, C. & Bruce Verchere, C. Metabolic stress, <scp>IAPP</scp> and islet amyloid. *Diabetes Obes Metab* **14**, 68–77 (2012).
13. Zhu, D., Gong, G., Wang, W. & Du, W. Disaggregation of human islet amyloid polypeptide fibril formation by ruthenium polypyridyl complexes. *J Inorg Biochem* **170**, 109–116 (2017).
14. McIntyre, H. D. *et al.* Gestational diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 47 (2019).
15. Koivusalo, S. B. *et al.* Gestational Diabetes Mellitus Can Be Prevented by Lifestyle Intervention: The Finnish Gestational Diabetes Prevention Study (RADIEL). *Diabetes Care* **39**, 24–30 (2016).
16. Zheng, Y., Ley, S. H. & Hu, F. B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol* **14**, 88–98 (2018).
17. de la Monte, S. M. & Wands, J. R. Alzheimer’s Disease is Type 3 Diabetes—Evidence Reviewed. *J Diabetes Sci Technol* **2**, 1101–1113 (2008).
18. Davies, M. J. *et al.* Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care* **41**, 2669–2701 (2018).
19. Kahn, S. E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* **46**, 3–19 (2003).

20. Roham, P. H., Save, S. N. & Sharma, S. Human islet amyloid polypeptide: A therapeutic target for the management of type 2 diabetes mellitus. *J Pharm Anal* **12**, 556–569 (2022).
21. Akter, R. *et al.* Islet Amyloid Polypeptide: Structure, Function, and Pathophysiology. *J Diabetes Res* **2016**, 1–18 (2016).
22. Bishoyi, A. K. *et al.* Human islet amyloid polypeptide (hIAPP) - a curse in type II diabetes mellitus: insights from structure and toxicity studies. *Biol Chem* **402**, 133–153 (2021).
23. Adeghate, E. & Kalász, H. Amylin Analogues in the Treatment of Diabetes Mellitus: Medicinal Chemistry and Structural Basis of its Function. *Open Med Chem J* **5**, 78–81 (2011).
24. Westermarck, P. & Wilander, E. Islet amyloid in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes is related to insulin. *Diabetologia* **24**, (1983).
25. Opie, E. L. THE RELATION OF DIABETES MELLITUS TO LESIONS OF THE PANCREAS. HYALINE DEGENERATION OF THE ISLANDS OF LANGERHANS. *Journal of Experimental Medicine* **5**, 527–540 (1901).
26. Gong, W. *et al.* Amylin deposition in the kidney of patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int* **72**, 213–218 (2007).
27. Despa, S. *et al.* Hyperamylinemia Contributes to Cardiac Dysfunction in Obesity and Diabetes. *Circ Res* **110**, 598–608 (2012).
28. Jackson, K. *et al.* Amylin deposition in the brain: A second amyloid in Alzheimer disease? *Ann Neurol* **74**, 517–526 (2013).
29. Hassan, S., White, K. & Terry, C. Linking hIAPP misfolding and aggregation with type 2 diabetes mellitus: a structural perspective. *Biosci Rep* **42**, (2022).

30. Soto, C. & Pritzkow, S. Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* **21**, 1332–1340 (2018).
31. Horvath, I. & Wittung-Stafshede, P. Cross-talk between amyloidogenic proteins in type-2 diabetes and Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 12473–12477 (2016).
32. Harrison, R. S., Sharpe, P. C., Singh, Y. & Fairlie, D. P. Amyloid peptides and proteins in review. in *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 1–77 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2007). doi:10.1007/112_2007_0701.
33. Hu, R. *et al.* Seed-Induced Heterogeneous Cross-Seeding Self-Assembly of Human and Rat Islet Polypeptides. *ACS Omega* **2**, 784–792 (2017).
34. Levine, H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science* **2**, 404–410 (1993).
35. Fink, A. L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des* **3**, R9–R23 (1998).
36. Chakraborty, S., Chatterjee, B. & Basu, S. A mechanistic insight into the amyloidogenic structure of hIAPP peptide revealed from sequence analysis and molecular dynamics simulation. *Biophys Chem* **168–169**, 1–9 (2012).
37. Haataja, L., Gurlo, T., Huang, C. J. & Butler, P. C. Islet Amyloid in Type 2 Diabetes, and the Toxic Oligomer Hypothesis. *Endocr Rev* **29**, 303–316 (2008).
38. Meier, J. J. *et al.* Inhibition of human IAPP fibril formation does not prevent β -cell death: evidence for distinct actions of oligomers and

- fibrils of human IAPP. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **291**, E1317–E1324 (2006).
39. Kanatsuka, A., Kou, S. & Makino, H. IAPP/amylin and β -cell failure: implication of the risk factors of type 2 diabetes. *Diabetol Int* **9**, 143–157 (2018).
 40. Zhang, M. *et al.* Membrane Interactions of hIAPP Monomer and Oligomer with Lipid Membranes by Molecular Dynamics Simulations. *ACS Chem Neurosci* **8**, 1789–1800 (2017).
 41. Brender, J. R., Salamekh, S. & Ramamoorthy, A. Membrane Disruption and Early Events in the Aggregation of the Diabetes Related Peptide IAPP from a Molecular Perspective. *Acc Chem Res* **45**, 454–462 (2012).
 42. Pilkington, E. H. *et al.* Pancreatic β -Cell Membrane Fluidity and Toxicity Induced by Human Islet Amyloid Polypeptide Species. *Sci Rep* **6**, 21274 (2016).
 43. Janson, J., Ashley, R. H., Harrison, D., McIntyre, S. & Butler, P. C. The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes* **48**, 491–498 (1999).
 44. Engel, M. F. M. *et al.* Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 6033–6038 (2008).
 45. Jayasinghe, S. A. & Langen, R. Lipid Membranes Modulate the Structure of Islet Amyloid Polypeptide. *Biochemistry* **44**, 12113–12119 (2005).
 46. Lee, S. Y., Kim, C. Y. & Nam, T.-G. <p>Ruthenium Complexes as Anticancer Agents: A Brief History and Perspectives</p>. *Drug Des Devel Ther* **Volume 14**, 5375–5392 (2020).

47. Hafeez, J. *et al.* Synthesis of ruthenium complexes and their catalytic applications: A review. *Arabian Journal of Chemistry* **15**, 104165 (2022).
48. Allardyce, C. S. & Dyson, P. J. Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects. *Platin Met Rev* **45**, 62–69 (2001).
49. Juris, A. *et al.* Ru(II) polypyridine complexes: photophysics, photochemistry, eletrochemistry, and chemiluminescence. *Coord Chem Rev* **84**, 85–277 (1988).
50. Campagna, S., Puntoriero, F., Nastasi, F., Bergamini, G. & Balzani, V. Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds: Ruthenium. in *Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds I* 117–214 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg). doi:10.1007/128_2007_133.
51. Balzani, V. & Juris, A. Photochemistry and photophysics of Ru(II)□polypyridine complexes in the Bologna group. From early studies to recent developments. *Coord Chem Rev* **211**, 97–115 (2001).
52. Mital, M. & Ziora, Z. Biological applications of Ru(II) polypyridyl complexes. *Coord Chem Rev* **375**, 434–458 (2018).
53. Florio, D. *et al.* Modulation of Amyloidogenic Peptide Aggregation by Photoactivatable CO-Releasing Ruthenium(II) Complexes. *Pharmaceuticals* **13**, 171 (2020).
54. Tyagi, N., Borah, G., Patel, P. & Ramaiah, D. Recent Advances in Ru Catalyzed Transfer Hydrogenation and Its Future Perspectives. in *Ruthenium - An Element Loved by Researchers* (IntechOpen, 2022). doi:10.5772/intechopen.96464.
55. Lee, S. Y., Kim, C. Y. & Nam, T.-G. <p>Ruthenium Complexes as Anticancer Agents: A Brief History and Perspectives</p>. *Drug Des Devel Ther* **Volume 14**, 5375–5392 (2020).

56. Elgar, C. E. *et al.* Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes as FRET Donors: Structure- and Sequence-Selective DNA-Binding and Anticancer Properties. *J Am Chem Soc* **145**, 1236–1246 (2023).
57. Kulkarni, G. S. *et al.* A Phase 1b Clinical Study of Intravesical Photodynamic Therapy in Patients with Bacillus Calmette-Guérin–unresponsive Non–muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol Open Sci* **41**, 105–111 (2022).
58. Pereira, L. M. B., Cali, M. P., Marchi, R. C., Pazin, W. M. & Carlos, R. M. Luminescent imaging of insulin amyloid aggregation using a sensitive ruthenium-based probe in the red region. *J Inorg Biochem* **224**, 111585 (2021).
59. Yawson, G. K. *et al.* Ruthenium(III) complexes with imidazole ligands that modulate the aggregation of the amyloid- β peptide via hydrophobic interactions. *J Inorg Biochem* **214**, 111303 (2021).
60. Peng, Y.-B., Tao, C., Tan, C.-P. & Zhao, P. Inhibition of A β peptide aggregation by ruthenium(II) polypyridyl complexes through copper chelation. *J Inorg Biochem* **224**, 111591 (2021).
61. Peng, Y.-B., Tao, C., Tan, C.-P. & Zhao, P. Inhibition of A β peptide aggregation by ruthenium(II) polypyridyl complexes through copper chelation. *J Inorg Biochem* **224**, 111591 (2021).
62. Pereira, L. M. B., Cali, M. P., Marchi, R. C., Pazin, W. M. & Carlos, R. M. Luminescent imaging of insulin amyloid aggregation using a sensitive ruthenium-based probe in the red region. *J Inorg Biochem* **224**, 111585 (2021).
63. Cook, N. P., Kilpatrick, K., Segatori, L. & Martí, A. A. Detection of α -Synuclein Amyloidogenic Aggregates *in Vitro* and in Cells using Light-Switching Dipyrrophenazine Ruthenium(II) Complexes. *J Am Chem Soc* **134**, 20776–20782 (2012).

64. Cali, M. P. *et al.* Comparison of A β (1–40, 1–28, 11–22, and 29–40) aggregation processes and inhibition of toxic species generated in early stages of aggregation by a water-soluble ruthenium complex. *J Inorg Biochem* **215**, 111314 (2021).
65. Mudliar, N. H. & Singh, P. K. A molecular rotor-based turn-on sensor probe for amyloid fibrils in the extreme near-infrared region. *Chemical Communications* **55**, 3907–3910 (2019).
66. Zhang, Y., Ding, C., Li, C. & Wang, X. Advances in fluorescent probes for detection and imaging of amyloid- β peptides in Alzheimer's disease. in 135–190 (2021). doi:10.1016/bs.acc.2020.08.008.
67. He, L., Wang, X., Zhao, C., Wang, H. & Du, W. Ruthenium complexes as novel inhibitors of human islet amyloid polypeptide fibril formation. *Metallomics* **5**, 1599 (2013).
68. Gong, G., Wang, W. & Du, W. Binuclear ruthenium complexes inhibit the fibril formation of human islet amyloid polypeptide. *RSC Adv* **7**, 18512–18522 (2017).
69. Zhu, D., Gong, G., Wang, W. & Du, W. Disaggregation of human islet amyloid polypeptide fibril formation by ruthenium polypyridyl complexes. *J Inorg Biochem* **170**, 109–116 (2017).
70. Ma, L. *et al.* Ruthenium complexes as inhibitors of human islet amyloid polypeptide aggregation, an effect that prevents beta cell apoptosis. *RSC Adv* **5**, 17405–17412 (2015).
71. DeRosa, M. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev* **233–234**, 351–371 (2002).
72. Xie, Z.-H. *et al.* Review of characteristics, generation pathways and detection methods of singlet oxygen generated in advanced oxidation processes (AOPs). *Chemical Engineering Journal* **468**, 143778 (2023).

73. Wang, Y., Lin, Y., He, S., Wu, S. & Yang, C. Singlet oxygen: Properties, generation, detection, and environmental applications. *J Hazard Mater* **461**, 132538 (2024).
74. María Curieses Andrés, C., Manuel Pérez de la Lastra, J., Andrés Juan, C., J. Plou, F. & Pérez-Lebeña, E. Reactivity and Applications of Singlet Oxygen Molecule. in (2024). doi:10.5772/intechopen.112024.
75. Hamblin, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol* **33**, 67–73 (2016).
76. Hynek, J., Chahal, M. K., Payne, D. T., Labuta, J. & Hill, J. P. Porous framework materials for singlet oxygen generation. *Coord Chem Rev* **425**, 213541 (2020).
77. Li, Y. R. & Trush, M. Defining ROS in Biology and Medicine. *Reactive Oxygen Species* **1**, (2016).
78. Dash, U. C. *et al.* Oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of neurological disorders: Mechanisms and implications. *Acta Pharm Sin B* **15**, 15–34 (2025).
79. Vona, R., Pallotta, L., Cappelletti, M., Severi, C. & Matarrese, P. The Impact of Oxidative Stress in Human Pathology: Focus on Gastrointestinal Disorders. *Antioxidants* **10**, 201 (2021).
80. Sies, H., Berndt, C. & Jones, D. P. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem* **86**, 715–748 (2017).
81. Vara, D. & Pula, G. Reactive Oxygen Species: Physiological Roles in the Regulation of Vascular Cells. *Curr Mol Med* **14**, 1103–1125 (2014).
82. Hamblin, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol* **33**, 67–73 (2016).

83. Dolmans, D. E. J. G. J., Fukumura, D. & Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 380–387 (2003).
84. Schneider, J. *et al.* Understanding TiO₂ Photocatalysis: Mechanisms and Materials. *Chem Rev* **114**, 9919–9986 (2014).
85. Steinke, S. J., Kodanko, J. J. & Turro, C. Ruthenium complexes for photoactivated dual activity: Drug delivery and singlet oxygen generation. in 285–320 (2022). doi:10.1016/bs.adioch.2022.05.001.
86. Correia, J. H., Rodrigues, J. A., Pimenta, S., Dong, T. & Yang, Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics* **13**, 1332 (2021).
87. Hamblin, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol* **33**, 67–73 (2016).
88. Wilson, B. C. & Patterson, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol* **53**, R61–R109 (2008).
89. Davies, M. J. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochemical & Photobiological Sciences* **3**, 17–25 (2004).
90. Steinke, S. J., Kodanko, J. J. & Turro, C. Ruthenium complexes for photoactivated dual activity: Drug delivery and singlet oxygen generation. in 285–320 (2022). doi:10.1016/bs.adioch.2022.05.001.
91. Würth, C., Grabolle, M., Pauli, J., Spieles, M. & Resch-Genger, U. Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples. *Nat Protoc* **8**, 1535–1550 (2013).
92. Wu, Y., Li, S., Chen, Y., He, W. & Guo, Z. Recent advances in noble metal complex based photodynamic therapy. *Chem Sci* **13**, 5085–5106 (2022).

93. Ng, X. Y. *et al.* Ruthenium(II) polypyridyl complexes as emerging photosensitisers for antibacterial photodynamic therapy. *J Inorg Biochem* **250**, 112425 (2024).
94. Park, M. *et al.* Rational Design of Biocompatible Ir(III) Photosensitizer to Overcome Drug-Resistant Cancer via Oxidative Autophagy Inhibition. *Advanced Science* **12**, (2025).
95. Wei, X. *et al.* Photophysical properties of Pt(II) and Pd(II) complexes for two-photon photodynamic therapy: A computational investigation. *Dyes and Pigments* **215**, 111283 (2023).
96. Monro, S. *et al.* Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. *Chem Rev* **119**, 797–828 (2019).
97. Tiburcio, M. A. *et al.* In vitro evaluation of the cis-[Ru(phen)₂(pPDIp)]^{2+*} complex for antimicrobial photodynamic therapy against *Sporothrix brasiliensis* and *Candida albicans*. *J Photochem Photobiol B* **229**, 112414 (2022).
98. He, G. *et al.* Red-Light-Responsive Ru Complex Photosensitizer for Lysosome Localization Photodynamic Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* **13**, 19572–19580 (2021).
99. Le Gall, T. *et al.* Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers for Antibacterial Photodynamic Therapy: A Structure–Activity Study on Clinical Bacterial Strains. *ChemMedChem* **13**, 2229–2239 (2018).
100. McKenzie, L. K., Bryant, H. E. & Weinstein, J. A. Transition metal complexes as photosensitisers in one- and two-photon photodynamic therapy. *Coord Chem Rev* **379**, 2–29 (2019).

101. Menzel, J. P., de Groot, H. J. M. & Buda, F. Photoinduced Electron Transfer in Donor–Acceptor Complexes: Isotope Effect and Dynamic Symmetry Breaking. *J Phys Chem Lett* **10**, 6504–6511 (2019).
102. Barber, J. Photosynthetic energy conversion: natural and artificial. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 185–196 (2009).
103. Li, S. *et al.* Photoinduced Hydrogen Atom Transfer Catalysis with Ruthenium Polypyridyl Coated-TiO₂ Nanoparticles for Selective C–C Bond Cleavage in a Lignin Model Compound. *ACS Catal* 4460–4467 (2025) doi:10.1021/acscatal.4c04934.
104. Fukuzumi, S. New development of photoinduced electron-transfer catalytic systems. *Pure and Applied Chemistry* **79**, 981–991 (2007).
105. Heredia, D. A., Durantini, A. M., Durantini, J. E. & Durantini, E. N. Fullerene C₆₀ derivatives as antimicrobial photodynamic agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **51**, 100471 (2022).
106. Wang, K.-P. *et al.* A thiophene-rhodamine dyad as fluorescence probe for ferric ion and its application in living cells imaging. *J Lumin* **208**, 468–474 (2019).
107. Goshisht, M. K., Tripathi, N., Patra, G. K. & Chaskar, M. Organelle-targeting ratiometric fluorescent probes: design principles, detection mechanisms, bio-applications, and challenges. *Chem Sci* **14**, 5842–5871 (2023).
108. Zayed, M. E. M., El-Shishtawy, R. M., Elroby, S. A., Al-Footy, K. O. & Al-amshany, Z. M. Experimental and theoretical study of donor- π -acceptor compounds based on malononitrile. *Chem Cent J* **12**, 26 (2018).
109. Chen, X. *et al.* Donor–acceptor photovoltaic polymers based on 1,4-dithienyl-2,5-dialkoxybenzene with intramolecular noncovalent interactions. *J Polym Sci A Polym Chem* **56**, 689–698 (2018).

110. Zhang, F. *et al.* Self-assembly, optical and electrical properties of perylene diimide dyes bearing unsymmetrical substituents at bay position. *Sci Rep* **8**, 8208 (2018).
111. Balzer, N. *et al.* Synthesis and Surface Behaviour of NDI Chromophores Mounted on a Tripodal Scaffold: Towards Self-Decoupled Chromophores for Single-Molecule Electroluminescence. *Chemistry – A European Journal* **27**, 12144–12155 (2021).
112. Maity, A., Mishra, V. K., Dolai, S., Mishra, S. & Patra, S. K. Design, Synthesis, and Characterization of Organometallic BODIPY-Ru(II) Dyads: Redox and Photophysical Properties with Singlet Oxygen Generation Capability. *Inorg Chem* **63**, 4839–4854 (2024).
113. Kohler, L., Kaveevivitchai, N., Zong, R. & Thummel, R. P. Component Analysis of Dyads Designed for Light-Driven Water Oxidation. *Inorg Chem* **53**, 912–921 (2014).
114. Montalti, M., Credi, A., Prodi, L. & Gandolfi, M. T. *Handbook of Photochemistry*. (CRC Press, 2006). doi:10.1201/9781420015195.
115. Campagna, S., Puntoriero, F., Nastasi, F., Bergamini, G. & Balzani, V. Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds: Ruthenium. in *Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds I* 117–214 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg). doi:10.1007/128_2007_133.
116. Santos, E. R. dos *et al.* Photoinduced Energy and Electron-Transfer Reactions by Polypyridine Ruthenium(II) Complexes Containing a Derivatized Perylene Diimide. *The Journal of Physical Chemistry C* **120**, 22831–22843 (2016).
117. de Campos, I. Ap. S. *et al.* Influence of the Medium on the Photochemical and Photophysical Properties of [Ru(phen)₂(pPDIp)]²⁺. *ChemPhotoChem* **2**, 757–764 (2018).

118. Quinn, S. *et al.* Donor-Acceptor Dyads and Triads Employing Core-Substituted Naphthalene Diimides: A Synthetic and Spectro (Electrochemical) Study. *Molecules* **27**, 8671 (2022).
119. Al Kobaisi, M., Bhosale, S. V., Latham, K., Raynor, A. M. & Bhosale, S. V. Functional Naphthalene Diimides: Synthesis, Properties, and Applications. *Chem Rev* **116**, 11685–11796 (2016).
120. Lv, M. *et al.* Heteroaromatic organic compound with conjugated multi-carbonyl as cathode material for rechargeable lithium batteries. *Sci Rep* **6**, 23515 (2016).
121. Pereira, L. M. B. *et al.* Exploring the Reversible Equilibrium State between ^3CS and ^3CSS in a Ru(phen)–Naphthalene Diimide Dyad. *Inorg Chem* **64**, 8544–8553 (2025).
122. P. Sullivan, B., J. Salmon, D. & J. Meyer, T. Mixed phosphine 2,2'-bipyridine complexes of ruthenium. *Inorg Chem* **17**, 3334–3341 (1978).
123. MONTALTI, M., CREDI, A., PRODI, L., GANDOLFI, M. T., MICHL, J. & BALZANI, V. Handbook of photochemistry.
124. Kumari, N., Naqvi, S., Ahuja, M., Bhardwaj, K. & Kumar, R. Facile synthesis of naphthalene diimide (NDI) derivatives: aggregation-induced emission, photophysical and transport properties. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* **31**, 4310–4322 (2020).
125. Swinehart, D. F. The Beer-Lambert Law. *J Chem Educ* **39**, 333 (1962).
126. Kumar, G. *et al.* Synthesis and photophysical properties of pyridyl conjugated triazole appended naphthalenediimide derivatives. *Photochemical & Photobiological Sciences* **18**, 1333–1341 (2019).
127. Kumari, N., Naqvi, S., Ahuja, M., Bhardwaj, K. & Kumar, R. Facile synthesis of naphthalene diimide (NDI) derivatives: aggregation-

- induced emission, photophysical and transport properties. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* **31**, 4310–4322 (2020).
128. Jiang, C. *et al.* Probing Interligand Electron Transfer in the 1 MLCT S_1 Excited State of *trans*- $\text{Mo}_2\text{L}_2\text{L}'_2$ Compounds: A Comparative Study of Auxiliary Ligands and Solvents. *Inorg Chem* **56**, 9660–9668 (2017).
129. Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*. (2017).
130. Medabalmi, V., Sundararajan, M., Singh, V., Baik, M.-H. & Byon, H. R. Naphthalene diimide as a two-electron anolyte for aqueous and neutral pH redox flow batteries. *J Mater Chem A Mater* **8**, 11218–11223 (2020).
131. Singh, V., Ahn, S. & Byon, H. R. Ammonium-Functionalized Naphthalene Diimides as Two-Electron-Transfer Negolyte for Aqueous Redox Flow Batteries. *Batter Supercaps* **5**, (2022).
132. Brett, C. M. & Brett, A. M. O. *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*. (Oxford University Press: New York, 1994).
133. Caby, S., Bouchet, L. M., Argüello, J. E., Rossi, R. A. & Bardagi, J. I. Excitation of Radical Anions of Naphthalene Diimides in Consecutive- and Electro-Photocatalysis**. *ChemCatChem* **13**, 3001–3009 (2021).
134. Jones, A. L., Gish, M. K., Zeman, C. J., Papanikolas, J. M. & Schanze, K. S. Photoinduced Electron Transfer in Naphthalene Diimide End-Capped Thiophene Oligomers. *J Phys Chem A* **121**, 9579–9588 (2017).
135. Caby, S., Bouchet, L. M., Argüello, J. E., Rossi, R. A. & Bardagi, J. I. Excitation of Radical Anions of Naphthalene Diimides in Consecutive- and Electro-Photocatalysis**. *ChemCatChem* **13**, 3001–3009 (2021).

136. Shejul, D. A. *et al.* Aggregation-induced emission characteristics and solvent triggered hierarchical self-assembled chiral superstructures of naphthalenediimide amphiphiles. *New Journal of Chemistry* **44**, 1615–1623 (2020).
137. Saha, M. & Bandyopadhyay, S. Stimuli Responsive Stable Radical Anion for Conductance Switching. *The Journal of Physical Chemistry C* **125**, 6427–6432 (2021).
138. Reszka, K. J., Takayama, M., Sik, R. H., Chignell, C. F. & Saito, I. Photochemistry of Naphthalene Diimides: EPR Study of Free Radical Formation via Photoredox Process¶. *Photochem Photobiol* **81**, 573 (2005).
139. Mikata, Y. *et al.* Detection of 1270 nm emission from singlet oxygen and photocytotoxic property of sugar-Pendant [60] fullerenes. *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 3289–3292 (2003).
140. Entradas, T., Waldron, S. & Volk, M. The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. *J Photochem Photobiol B* **204**, 111787 (2020).
141. Song, R. *et al.* Phytoalexin Phenalenone Derivatives Inactivate Mosquito Larvae and Root-knot Nematode as Type-II Photosensitizer. *Sci Rep* **7**, 42058 (2017).
142. Correia, J. H., Rodrigues, J. A., Pimenta, S., Dong, T. & Yang, Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics* **13**, 1332 (2021).
143. Lutz, T. A. The role of amylin in the control of energy homeostasis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **298**, R1475–R1484 (2010).
144. Azzam, S. K. *et al.* Inhibition of Human Amylin Aggregation and Cellular Toxicity by Lipoic Acid and Ascorbic Acid. *Mol Pharm* **15**, 2098–2106 (2018).

145. Ghosh, R., Ghosh, S. & Das, A. Understanding the mechanism of amylin aggregation: From identifying crucial segments to tracing dominant sequential events to modeling potential aggregation suppressors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1871**, 140866 (2023).
146. Bhowmick, D. C., Kudaibergenova, Z., Burnett, L. & Jeremic, A. M. Molecular Mechanisms of Amylin Turnover, Misfolding and Toxicity in the Pancreas. *Molecules* **27**, 1021 (2022).
147. Alkahtane, A. A. *et al.* Inhibition of human amylin aggregation by Flavonoid Chrysin: An *in-silico* and *in-vitro* approach. *Int J Med Sci* **18**, 199–206 (2021).
148. Zraika, S. *et al.* Neprilysin Impedes Islet Amyloid Formation by Inhibition of Fibril Formation Rather Than Peptide Degradation. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 18177–18183 (2010).
149. Bahramikia, S. & Yazdanparast, R. Inhibition of human islet amyloid polypeptide or amylin aggregation by two manganese-salen derivatives. *Eur J Pharmacol* **707**, 17–25 (2013).
150. Silva, D. E. S. *et al.* Luminescent Ru(II) Phenanthroline Complexes as a Probe for Real-Time Imaging of A β Self-Aggregation and Therapeutic Applications in Alzheimer's Disease. *J Med Chem* **59**, 9215–9227 (2016).
151. Cali, M. P. *et al.* Comparison of A β (1–40, 1–28, 11–22, and 29–40) aggregation processes and inhibition of toxic species generated in early stages of aggregation by a water-soluble ruthenium complex. *J Inorg Biochem* **215**, 111314 (2021).
152. Pereira, L. M. B., Cali, M. P., Marchi, R. C., Pazin, W. M., Carlos, R. M. Luminescent imaging of insulin amyloid aggregation using a sensitive ruthenium-based probe in the red region. *J Inorg Biochem* **224**, 111585 (2021).

153. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55–63 (1983).
154. Hull, R. L., Westermarck, G. T., Westermarck, P. & Kahn, S. E. Islet Amyloid: A Critical Entity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 3629–3643 (2004).
155. Xue, C., Lin, T. Y., Chang, D. & Guo, Z. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *R Soc Open Sci* **4**, 160696 (2017).
156. Voropai, E. S. *et al.* Spectral properties of thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils. *J Appl Spectrosc* **70**, 868–874 (2003).
157. Stsiapura, V. I., Maskevich, A. A., Kuzmitsky, V. A., Turoverov, K. K. & Kuznetsova, I. M. Computational Study of Thioflavin T Torsional Relaxation in the Excited State. *J Phys Chem A* **111**, 4829–4835 (2007).
158. Xue, C., Lin, T. Y., Chang, D. & Guo, Z. Thioflavin T as an amyloid dye: Fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *R Soc Open Sci* **4**, (2017).
159. Yeasmin Khusbu, F., Zhou, X., Chen, H., Ma, C. & Wang, K. Thioflavin T as a fluorescence probe for biosensing applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **109**, 1–18 (2018).
160. Gasymov, O. K. & Glasgow, B. J. ANS fluorescence: Potential to augment the identification of the external binding sites of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1774**, 403–411 (2007).
161. Kaur, A., Kaur, P. & Ahuja, S. Förster resonance energy transfer (FRET) and applications thereof. *Analytical Methods* **12**, 5532–5550 (2020).

162. Profit, A. A., Vedad, J., Saleh, M. & Desamero, R. Z. B. Aromaticity and amyloid formation: Effect of π -electron distribution and aryl substituent geometry on the self-assembly of peptides derived from hIAPP22–29. *Arch Biochem Biophys* **567**, 46–58 (2015).
163. Dubey, R. *et al.* Azadirachtin inhibits amyloid formation, disaggregates pre-formed fibrils and protects pancreatic β -cells from human islet amyloid polypeptide/amylin-induced cytotoxicity. *Biochemical Journal* **476**, 889–907 (2019).
164. Zhang, Y., Tang, Y., Liu, Y., Zhang, D. & Zheng, J. Design and Engineering of Amyloid Aggregation-Prone Fragments and Their Antimicrobial Conjugates with Multi-Target Functionality. *Adv Funct Mater* **31**, (2021).
165. Fang, X., Yousaf, M., Huang, Q., Yang, Y. & Wang, C. Dual effect of PEG-PE micelle over the oligomerization and fibrillation of human islet amyloid polypeptide. *Sci Rep* **8**, 4463 (2018).
166. Li, J. *et al.* Chiral Effect at Nano-Bio Interface: A Model of Chiral Gold Nanoparticle on Amylin Fibrillation. *Nanomaterials* **9**, 412 (2019).
167. Yoshimura, Y. *et al.* Distinguishing crystal-like amyloid fibrils and glass-like amorphous aggregates from their kinetics of formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 14446–14451 (2012).
168. Majid, N. & Khan, R. H. Protein aggregation: Consequences, mechanism, characterization and inhibitory strategies. *Int J Biol Macromol* **242**, 125123 (2023).
169. Alkahtane, A. A. *et al.* Inhibition of human amylin aggregation by Flavonoid Chrysin: An *in-silico* and *in-vitro* approach. *Int J Med Sci* **18**, 199–206 (2021).

170. Watson, M. L., Macrae, K., Marley, A. E. & Hundal, H. S. Chronic Effects of Palmitate Overload on Nutrient-Induced Insulin Secretion and Autocrine Signalling in Pancreatic MIN6 Beta Cells. *PLoS One* **6**, e25975 (2011).
171. MIYAZAKI, J.-I. *et al.* Establishment of a Pancreatic β Cell Line That Retains Glucose-Inducible Insulin Secretion: Special Reference to Expression of Glucose Transporter Isoforms*. *Endocrinology* **127**, 126–132 (1990).
172. Liu, B., Zhang, H. & Qin, X. Amyloid Fibrils and Their Applications: Current Status and Latest Developments. *Nanomaterials* **15**, 255 (2025).
173. Khoshnood, S. *et al.* A review on mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of mupirocin against *Staphylococcus aureus*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **109**, 1809–1818 (2019).
174. Cookson, B. D. The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **41**, 11–18 (1998).
175. Leanse, L. G., dos Anjos, C., Mushtaq, S. & Dai, T. Antimicrobial blue light: A ‘Magic Bullet’ for the 21st century and beyond? *Adv Drug Deliv Rev* **180**, 114057 (2022).
176. Hamblin, M. R. & Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical & Photobiological Sciences* **3**, 436–450 (2004).
177. Kearns, D. R. Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen. *Chem Rev* **71**, 395–427 (1971).
178. Hu, J.-J. *et al.* Recent strategies for developing membrane-targeting photodynamic therapy. *Coord Chem Rev* **532**, 216526 (2025).

179. Ogilby, P. R. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chem Soc Rev* **39**, 3181 (2010).
180. Yuan, H. *et al.* Singlet oxygen generation efficiency and antimicrobial ability in glutathione protected Ag31 nanoclusters. *Inorg Chem Commun* **159**, 111799 (2024).
181. Baka, E., Comer, J. E. A. & Takács-Novák, K. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. *J Pharm Biomed Anal* **46**, 335–341 (2008).
182. Clinical and Laboratory Standards Institute & Weinstein, M. P. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*.
183. de Foggi, C. C. *et al.* Tuning the Morphological, Optical, and Antimicrobial Properties of α -Ag₂WO₄ Microcrystals Using Different Solvents. *Cryst Growth Des* **17**, 6239–6246 (2017).
184. de Annunzio, S. R. *et al.* Antimicrobial activity and biocompatibility of alpha-silver tungstate nanoparticles. *Heliyon* **11**, e42648 (2025).
185. Zago, L. H. de P. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy against metronidazole-resistant dental plaque bacteria. *J Photochem Photobiol B* **209**, 111903 (2020).
186. Stein, H., Spindler, S., Bonakdar, N., Wang, C. & Sandoghdar, V. Production of Isolated Giant Unilamellar Vesicles under High Salt Concentrations. *Front Physiol* **8**, (2017).
187. ÖMEROĞLU, İ. & DURMUŞ, M. Water-soluble phthalocyanine photosensitizers for photodynamic therapy. *Turk J Chem* **47**, 837–863 (2023).

188. Hameed, S. *et al.* Ultrasmall porphyrin-silica core-shell dots for enhanced fluorescence imaging-guided cancer photodynamic therapy. *Nanoscale Adv* **5**, 277–289 (2023).
189. Valéria, M. L., Complexos de Metais de Transição: Aplicações no tratamento e diagnóstico da doença de Alzheimer. (Universidade Federal de São Carlos, 2014).
190. Jones, H. J., Vernon, D. I. & Brown, S. B. Photodynamic therapy effect of m-THPC (Foscan®) in vivo: correlation with pharmacokinetics. *Br J Cancer* **89**, 398–404 (2003).
191. Liang, J., Wu, P., Tan, C. & Jiang, Y. White light-induced cell apoptosis by a conjugated polyelectrolyte through singlet oxygen generation. *RSC Adv* **8**, 9218–9222 (2018).
192. Bonnett, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem Soc Rev* **24**, 19 (1995).
193. Lan, M. *et al.* Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Adv Healthc Mater* **8**, (2019).
194. Correia, J. H., Rodrigues, J. A., Pimenta, S., Dong, T. & Yang, Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics* **13**, 1332 (2021).
195. Tardivo, J. P. *et al.* Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2**, 175–191 (2005).
196. Victória, H. F. V. *et al.* Detection of singlet oxygen by EPR: The instability of the nitroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* **180**, 143–152 (2022).
197. Suzen, S., Gurer-Orhan, H. & Saso, L. Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Technique. *Molecules* **22**, 181 (2017).

198. Cooper, D. R., Dimitrijevic, N. M. & Nadeau, J. L. Photosensitization of CdSe/ZnS QDs and reliability of assays for reactive oxygen species production. *Nanoscale* **2**, 114–121 (2010).
199. Zhang, H. *et al.* Detection of superoxide anion using an isotopically labeled nitron spin trap: potential biological applications. *FEBS Lett* **473**, 58–62 (2000).
200. Andrews, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **48**, 5–16 (2001).
201. Tyagi, A. & Mishra, A. Optimal Balance of Hydrophobic Content and Degree of Polymerization Results in a Potent Membrane-Targeting Antibacterial Polymer. *ACS Omega* **6**, 34724–34735 (2021).
202. Bacalum, M. *et al.* Modulating short tryptophan- and arginine-rich peptides activity by substitution with histidine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1861**, 1844–1854 (2017).

