



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Lucas Brandalise Menezes

INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DE
PORFIRINAS *MESO* SUBSTITUÍDAS COM COMPLEXOS DE
 Ru^{II} E ESTUDO DA INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS

Santa Maria, RS
2019

Lucas Brandalise Menezes

**INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DE
PORFIRINAS *MESO* SUBSTITUÍDAS COM COMPLEXOS DE
Ru^{II} E ESTUDO DA INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS**

Dissertação, apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química.**

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias

Santa Maria, RS
2018

Brandalise Menezes, Lucas
INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DE
PORFIRINAS MESO SUBSTITUÍDAS COM COMPLEXOS DE RuII E
ESTUDO DA INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS / Lucas Brandalise
Menezes.- 2019.
109 p.; 30 cm

Orientador: Bernardo Almeida Iglesias
Coorientador: Ernesto Schulz lang
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2019

1. Porfirinas de rutênio(II) 2. Fotofísica 3. Interação
com DNA 4. Interação com HSA. I. Almeida Iglesias,
Bernardo II. Schulz lang, Ernesto III. Título.

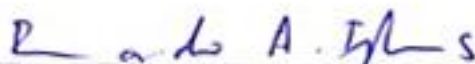
Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Lucas Brandalise Menezes

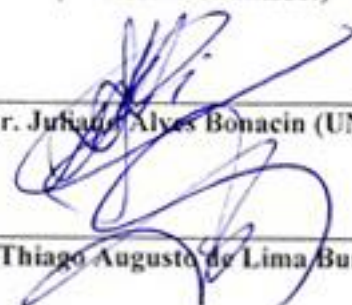
INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DE
PORFIRINAS *MESO* SUBSTITUÍDAS COM COMPLEXOS DE
Ru^{II} E ESTUDO DA INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS

Dissertação, apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**.

Aprovado em 05/08/2019



Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Prof. Dr. Juliano Alves Bonacin (UNICAMP)

Prof. Dr. Thiago Augusto de Lima Burgo (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao professor orientador Bernardo Almeida Iglesias pela constante ajuda e orientação neste trabalho e contribuindo com minha formação profissional.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Agradeço aos Profs. Pablo Gonçalves e Antônio Alonso da UFG pelas medidas fotofísicas e de EPR.

Agradeço ao CEBIME pelas análises dos HRMS-ESI.

Agradeço ao Otávio Augusto Chaves do SENAI-RJ pelas medidas com HSA e pelos cálculos de docking molecular.

Agradeço minha família pelo amor, carinho, confiança e por não medirem esforços para que eu tivesse a oportunidade de estudar.

Aos meus amigos de Passo Fundo: André, Emily, Bruna, Patrícia e Yasmin por se manterem presentes e por terem me apoiado nesta etapa.

Aos meus amigos de Santa Maria: Carolina, Thiago, Jennyfer, Fellipe, Ricardo, Julia, Luiz, Vanessa e Éveli pelas conversas e momentos felizes.

Esta dissertação é dedicada aos Prof. Henrique E. Toma e Koiti Araki, do Instituto de Química da USP - SP, pelas inúmeras contribuições na área de porfirinas de rutênio(II)

RESUMO

INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DE PORFIRINAS MESO-SUBSTITUÍDAS COM COMPLEXOS DE Ru^{II} E ESTUDO DA INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS

AUTOR: Lucas Brandalise Menezes.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias.

Este trabalho teve como objetivo investigar as propriedades fotofísicas de duas porfirinas cujas sínteses já são relatadas na literatura: *meso*-tetra(4-piridil)porfirina base-livre tetra-rutenada (**H₂RuTPyP**) e *meso*-tetra(4-piridil)porfirina de zinco(II) tetra-rutenada (**ZnRuTPyP**). Para isso, ambas foram sintetizadas de acordo com a metodologia relatada Araki e colaboradores e devidamente caracterizadas por análise elementar, espectrometria de massas, espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível, espectroscopia vibracional na região do infravermelho e espectroscopia de emissão. Além disso, foram realizados ensaios de agregação em solução, estudos de fotoestabilidade e geração de oxigênio singleto foram investigadas por espectroscopia na região do UV-vis. Mais ainda, os estudos de interação com DNA e HSA foram realizados via espectroscopia UV-vis, emissão fluorescente e de cálculos teóricos por *docking* molecular. A porfirina de Zn^{II} **ZnRuTPyP** apresentou melhores valores para constante intrínseca de ligação ao DNA (K_b), e para valores de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}), sugerindo que ambas as porfirinas interagem via sulco maior (*major groove*) e regidas por interações eletrostáticas, o que é evidenciado pelos cálculos de *docking* molecular.

Palavras-chave: Porfirinas de rutênio(II), Fotofísica, Interação com DNA, Interação com HSA.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE PHOTOPHYSICAL PROPERTIES OF MESO-SUBSTITUTED PORPHYRINS WITH Ru^{II} COMPLEXES AND STUDY OF INTERACTION WITH BIOMOLECULES

AUTHOR: Lucas Brandalise Menezes.
SUPERVISOR: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias.

The objective of this work was to investigate the photophysical properties of two porphyrins whose syntheses are already reported in the literature: *meso*-tetra(4-pyridyl)porphyrin tetra-ruthenated free-base (**H₂RuTPyP**) and *meso*-tetra(4-pyridyl)porphyrin tetra-ruthenated zinc(II) (**ZnRuTPyP**). For this, both porphyrins were synthesized according to the Araki and co-workers methodology and properly characterized by elemental analysis, mass spectrometry, ultraviolet-visible, infrared and emission spectroscopy. In addition, solution aggregation assays were performed, photostability studies and singlet oxygen generation were investigated by UV-vis spectroscopy. Moreover, the interactive studies with DNA and HSA were performed via UV-vis spectroscopy, fluorescence emission and theoretical calculations by molecular docking. ZnII-porphyrin (**ZnRuTPyP**) presented better values for intrinsic DNA binding constant (K_b), and Stern-Volmer quenching constant (K_{SV}), suggesting that both tetra-ruthenated porphyrins interact with major groove and are governed by electrostatic interactions, which is evidenced by molecular docking calculations.

Keywords: Ruthenium(II) porphyrins, Photophysics, DNA interactions, HSA interactions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação estrutural das moléculas sintetizadas de Ru ^{II} : H₂RuTPyP e ZnRuTPyP	21
Figura 2: Representação da estrutura molecular de um anel macrociclo da porfirina e suas posições β e meso.	23
Figura 3: Representação da estrutura molecular dos complexos NAMI-A, KP1019, KP1339 e RAPTAC.	27
Figura 4: Representação da estrutura de dupla hélice do ácido nucleico formada a partir de ligações de hidrogênio das bases nitrogenadas.	31
Figura 5: As formas conformacionais A, B e Z do DNA estão representadas e indicadas pelas letras A, B e C, respectivamente. Sendo A, B e C representação vista de frente e 1A, 1B e 1C representação vista de cima.	32
Figura 6: Representação da estrutura helicoidal do DNA (A) e da distorção na estrutura do DNA (B) causada pela ligação irreversível com o complexo de rutênio(II).	35
Figura 7: Representações de ligações ao DNA via intercalação, à esquerda, e ao sulco, à direita, bem como as distorções causadas no ácido nucleico através da inserção desses compostos em sua estrutura.	36
Figura 8: Ilustração e imagens de AFM das três formas do DNA plasmidial (acima) e a sua diferenciação após eletroforese em gel de agarose (abaixo).	37
Figura 9: Representação da estrutura proteica da Albumina do soro humano em laranja e do resíduo de aminoácido Trp ²¹⁴ em verde no subdomínio II A.	38
Figura 10: Mecanismos de supressão estático e dinâmico de transferência de energia entre o supressor e o fluoróforo.	40
Figura 11: Diagrama simplificado de Jablonski, representando seus processos e tempos de vida em níveis energéticos e vibracionais.	41
Figura 12: Diagrama de energia simplificado para obtenção de ROS a partir dos mecanismos do Tipo I e II.	43
Figura 13: Espectro de absorção na região do UV-vis a) H₂RuTPyP e b) ZnRuTPyP . A inserção mostra o comportamento linear da absorbância em 418 e 504 nm para H₂RuTPyP e 430 e 563 nm para ZnRuTPyP em função da concentração utilizados para calcular o coeficiente de absorvidade molar.	60
Figura 14: Espectro de absorção na região do UV-vis para as titulações realizadas na faixa de 1,0 μ M – 22,0 μ M para H₂RuTPyP em solução de DMSO(2%)/Tris-HCl pH 7,4. A inserção mostra o comportamento linear da absorbância em 420 nm em função da concentração.	62

Figura 15: Espectro de absorção na região do UV-vis para as titulações realizadas na faixa de 1,0 μM – 22,0 μM para ZnRuTPyP em solução de DMSO(2%)/Tris-HCl pH 7,4. A inserção mostra o comportamento linear da absorbância em 430 nm em função da concentração.....	62
Figura 16: Sobreposição dos espectros na região do UV-vis utilizados para determinar o número de fótons absorvidos pelas porfirinas H₂RuTPyP e ZnRuTPyP	64
Figura 17: Gráfico comparativo dos ensaios de foto-estabilidade por espectroscopia na região UV-vis da H₂RuTPyP em preto e ZnRuTPyP em vermelho. A foto-estabilidade foi monitorada pelo decréscimo da banda Soret.	65
Figura 18: Gráfico comparativo dos ensaios de foto-estabilidade por espectroscopia na região UV-vis da H₂RuTPyP em preto e ZnRuTPyP em vermelho. A foto-estabilidade foi monitorada pelo decréscimo da banda Soret (continuação).	66
Figura 19: Sobreposição dos espectros na região do UV-vis. Em cinza tem-se o espectro da foto-degradação do ácido úrico na presença da H₂RuTPyP (4 μM). Os gráficos inseridos correspondem as constantes de foto-degradação o UA para as concentrações de 4,0, 2,0 e 1,0 μM da porfirina de H₂RuTPyP	67
Figura 20: Efeitos das porfirinas ZnRuTPyP (círculos e linhas em azul) e H₂RuTPyP (quadrados e linhas em preto) na formação do aduto TEMP- ¹ O ₂ . (a) Espectro EPR do aduto TEMP após três períodos de iluminação com luz visível (0, 25 e 50 min) em soluções arejadas contendo porfirinas 100 μM numa mistura DMSO/água (16% água, vol.). (b) Intensidade relativa dos espectros EPR versus período de irradiação em DMSO puro e em (c) Água/DMSO (16%/84%), (d) Água/DMSO (50%/50%), (e) Água/DMSO (99%/1%). (f) Intensidade relativa do sinal versus fração de água no solvente.....	68
Figura 21: Espectros de EPR das armadilhas de spin DMPO e PBN após iluminação com luz visível (50 min) em soluções aeradas contendo 100 μM das porfirinas ZnRuTPyP (linha azul, espectro superior) ou H₂RuTPyP (linha preta). (a) DMPO em etilenoglicol/água (95/5, v/v), (b) DMPO em DMSO/água (98/2, v/v), (c) DMPO em DMSO/água (84/16, v/v), (d) PBN em DMSO (puro), (e) PBN em DMSO/água (99/1, v/v) e (f) o mesmo que em (e) após 5 h no escuro. A faixa total de varredura do campo magnético em cada espectro EPR foi de 60 G (eixo X), e a intensidade relativa está em unidades arbitrárias (eixo Y).	71
Figura 22: Espectros de absorção eletrônica na região UV-vis para as porfirinas H₂RuTPyP e ZnRuPyP . em solução de DMSO/Tris-HCl pH 7,4. A inserção mostra o comportamento linear da absorbância da banda Soret em função da $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ com $[\text{DNA}]$ utilizada para obter valores referente à K_b	73
Figura 23: Dicroísmo circular do ct-DNA na presença das porfirinas H₂RuTPyP e ZnRuTPyP em uma solução aquosa contendo 10% de acetonitrila com 200 μM de ct-DNA em 10 mM de Tris/HCl pH 7,4. Razão entre DNA:porfirina variando de 0 a 0,17.....	74

Figura 24: Espectros de emissão fluorescente para o estudo competitivo entre EB e H₂RuTPyP e ZnRuTPyP	76
Figura 25: Espectros de emissão fluorescente das competições entre DAPI e as porfirinas H₂RuTPyP e ZnRuTPyP	78
Figura 26: Espectros de emissão fluorescente das competições entre MG e as porfirinas H₂RuTPyP e ZnRuTPyP	79
Figura 27: Estudo de modelagem molecular para os derivados porfirínicos. Representação top view e front view para a interação entre DNA- H₂RuTPyP (A) e DNA- ZnRuTPyP (B).....	82
Figura 33: Espectro de emissão de fluorescência da proteína HSA na presença de H₂RuTPyP e ZnRuTPyP . A inserção mostra o comportamento linear da razão da intensidade de fluorescência F_0/F versus [Porfirina], com variação da temperatura em K, utilizados para obter valores referentes à K_{SV}	86
Figura 34: Gráfico modificado utilizado para obtenção dos valores de K_{SV} , com a variação da temperatura, para HSA-Porfirinas de Ru ^{II}	88
Figura 35: Gráficos de Stern-Volmer modificados para a interação HSA: H₂RuTPyP (A) e HSA: ZnRuTPyP (B) na presença de varfarina, ibuprofeno e digitoxina a 310 K. [HSA] = [varfarina] = [ibuprofeno] = [digitoxina] = 10 μ M e [H₂RuTPyP] = [ZnRuTPyP] = 1,7, 3,3, 5,0, 6,6, 8,3, 9,9, 11,5 e 13,2 μ M.	92
Figura 36: Espectro de CD para o HSA na ausência e na presença das porfirinas H₂RuTPyP e ZnRuTPyP a pH 7,4 e 310 K. [HSA] = 1,00 μ M e [H₂RuTPyP] = [ZnRuTPyP] = 1,7 e 13,2 μ M.....	95
Figura 37: Estudo de modelagem molecular para os derivados porfirínicos. Sendo (A) para ZnRuTPyP e (B) para H₂RuTPyP	97

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Representação da rota sintética geral para uma meso-tetra-(aril)porfirina proposta por Adler e.....	28
Esquema 2: Representação da rota sintética geral para uma meso-tetra-(aril)porfirina proposta por Lindsey e colaboradores, em 1986.....	29
Esquema 3: Representação da rota sintética para obtenção de uma porfirina meso substituídas por grupos piridil proposta por Fischer e colaboradores.	29
Esquema 4: Representação da rota sintética para obtenção da porfirina base-livre H₂RuTPyP .47	
Esquema 5: Representação da rota sintética para obtenção da metaloporfirina de zinco(II) ZnRuTPyP.....	48
Esquema 6: Representação da reação entre o reagente TEMP e p oxigênio singlete	69
Esquema 7: Representação da reação do reagente DMPO com ânio superóxido em meio prótico	71
Esquema 8: Representação da reação do reagente PBN com radical hidroxila em meio prótico	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Transições eletrônicas das porfirinas estudadas, em nm, observadas em seus respectivos espectros de absorção na região do UV-vis.....	61
Tabela 2: Principais estirametos e deformações em número de onda (cm^{-1}) para as porfirinas H₂RuTPyP e ZnRuTPyP	63
Tabela 3: Valores de γ_{Δ} , Φ_{Δ} e n_{1O_2} obtidos para H₂RuTPyP e ZnRuTPyP , bem como para a porfirina TPP (padrão).....	67
Tabela 4 Dados espectroscópicos da interação de CT-DNA com as porfirinas por espectroscopia na região do UV-vis.	73
Tabela 5: Valores obtidos de Q%, K_{SV} e k_q para os ensaios de competição com EB, DAPI e MG.	80
Tabela 6: Principais bases nitrogenadas, bem como a força de interação, envolvidas na interação DNA-Porfirinas de Ru ^{II}	83
Tabela 7: Parâmetros de ligação (K_{SV} , k_q , K_a ; ΔH° , ΔS° and ΔG°) para HSA com as porfirinas de Ru ^{II} à 296, 303 e 310 K.	89
Tabela 8: Parâmetros de tempos de vida de fluorescência resolvida no tempo para a formação dos adutos HSA:porfirina em $\lambda_{exc.} = 280$ nm. [HSA] = 10 μM and [H₂RuTPyP] = [ZnRuTPyP] = 13.2 μM em solução tampão de PBS (pH 7.4).....	90
Tabela 9: Valores modificados de Stern-Volmer (K_a) para os adutos de HSA:Ru ^{II} -porfirina na ausência e na presença de três marcadores de local (varfarina, ibuprofeno e digitoxina) a pH 7,4 e 310 K.	93
Tabela 10: Porcentagem quantitativa da α -hélice para os adutos HSA:Ru ^{II} -porfirina a 208 e 222 nm. [HSA] = 1,00 μM e [H₂RuTPyP] = [ZnRuTPyP] = 1,7 e 13,2 μM a 310 K.....	96
Tabela 11: Resíduos de amino ácidos que participam da interação HSA-Porfirina na subunidade III.....	98

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Equação para determinar o valor do rendimento quântico de oxigênio singleto.....	50
Equação 2: Equação para determinar valor referente à eficiência da formação de oxigênio singleto.	50
Equação 3: Equação para determinar o número de fótons absorvidos por segundo pelo OS.	50
Equação 4: Equação para determinar o rendimento quântico da formação de oxigênio singleto.	51
Equação 5: Equação para determinação da constante intrínseca de ligação K_b	52
Equação 6: Equação para determinação das constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}) ...	53
Equação 7: Equação para a correção do filtro interno aplicada aos dados de fluorescência no estado estacionário	55
Equação 8: Equação para obter valores de K_{sv}	84
Equação 9: Equação para obter valores de k_q	84
Equação 10: Equação de Stern-Volmer modificada.....	87
Equação 11: Equação modificada de Van 't Hoff.....	88
Equação 12: Equação da variação de energia livre de Gibbs (ΔG°)	88
Equação 13: Equação utilizada para obter valores quantitativos na perturbação da estrutura da proteína.....	94
Equação 14: Equação para calcular a perda da estrutura α -helicoidal da proteína	94
Equação 15: Equação para calcular a perda da estrutura α -helicoidal da proteína	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aPDT	Fototerapia Dinâmica Antimicrobiana
AU	Ácido Úrico
BF ₃ O(C ₂ H ₅) ₂	Eterato de trifluoreto de boro
CHCl ₃	Clorofórmio
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil-indol
DCM	Diclorometano
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DMF	N,N'-Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
EB	Brometo de Etídio
H ₂ RuTPyP	<i>meso</i> -tetra(4-piridil)porfirina tetra-rutenada base-livre
H ₂ TPyP	<i>meso</i> -tetra(4-piridil)porfirina
HSA	Albumina do soro humano
LMCT	Transferência de carga Ligante-Metal
MG	Verde de metila
MLCT	Transferência de carga Metal-Ligante
PDT	Fototerapia Dinâmica
PS	Fotossensibilizador
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
S ₀	Estado fundamental
S _n	Estado excitado singleto
TFA	Ácido Trifluoracético
T _m	Estado excitado tripleto
Tris-HCl	Solução de ácido clorídrico tamponada com tampão Tris
Trp ²¹⁴	Triptofano 214
UV-vis	Ultravioleta-visível
ZnRuTPyP	<i>meso</i> -tetra(4-piridil)porfirina tetra-rutenada de zinco(II)
ΔG	Varição da energia livre de Gibbs
ΔH	Varição da entalpia
ΔS	Varição da entropia
δ	Deslocamento químico
ν	Estiramento

λ_{exc}

λ_{em}

1O_2

Comprimento de onda de excitação

Comprimento de onda de emissão

Oxigênio singleto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 Aspectos gerais das porfirinas	23
3.2 Bioatividade de complexos de rutênio(II)	24
3.3 Metodologias sintéticas	27
3.4 Interações com biomoléculas	30
3.4.1 Ácido desoxirribonucleico	30
3.4.2 Albumina de soro humano	37
3.5 Processos fotofísicos	40
3.6 Fotofísica das porfirinas	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 Materiais gerais	46
4.2 Síntese das porfirinas tetra-rutenadas H ₂ RuTPyP e ZnRuTPyP	46
4.3 Análise Elementar	48
4.5 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	48
4.6 Espectrometria de massas	48
4.7 Espectroscopia de absorção na região do UV-vis	49
4.8 Estudo de agregação das porfirinas	49
4.9 Ensaio de fotoestabilidade	49
4.10 Rendimento quântico de oxigênio singlete e número de fótons absorvidos	50
4.11 Espectroscopia por ressonância eletrônica paramagnética (EPR)	51
4.11 Ensaio de interação das porfirinas de Ru ^{II} com DNA	52
4.11.1 Titulação espectrofotométrica de absorção na região do UV-vis	52
4.11.2 Espectroscopia por dicroísmo circular com CT-DNA	52
4.11.3 Ensaio de competição das porfirinas com EB-DNA, DAPI-DNA e MG-DNA por espectroscopia de emissão	53
4.11.4 Docking molecular das porfirinas com CT-DNA	54
4.12 Ensaio de interação das porfirinas de Ru ^{II} com albumina humana (HSA)	55
4.12.1 Medidas de tempo de vida das porfirinas de Ru ^{II} com albumina humana (HSA)	56
4.12.2 Ensaio de competição das porfirinas de Ru ^{II} com as subunidades da albumina humana (HSA)	56

4.12.3 Espectroscopia por dicroísmo circular com albumina humana (HSA)	56
4.12.4 Docking molecular com albumina humana (HSA).....	57
5. Discussão dos resultados	59
5.1. Análise elementar (CHN%) e espectrometria de massas de alta resolução	59
5.2 Espectroscopia de absorção na região do UV-vis	59
5.3 Ensaio de agregação em solução das porfirinas tetra-rutenadas	61
5.4 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	63
5.5 Determinação do número de fótons absorvidos (n_{abs})	63
5.6 Fotoestabilidade e geração de espécies reativas de oxigênio das porfirinas H2RuTPyP e ZnRuTPyP.....	64
5.7 Estudos interativos com CT-DNA e DNA plasmidial	72
5.7.1 Interação com CT-DNA via espectroscopia na região do UV-vis.....	72
5.8.2 Investigação dos modos de interação DNA–porfirina por espectroscopia de absorção de dicroísmo circular	73
5.8 Ensaio de competição com intercaladores e bloqueadores de sulco por espectroscopia de emissão fluorescente	75
5.8.1 Competição com Brometo de Etídio (EB).....	75
5.8.2. Ensaio de competição com 4,6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI) e com verde de metila (MG) por espectroscopia de emissão fluorescente	77
5.9 Docking molecular das porfirinas estudadas com ct-DNA	80
5.10. Avaliação dos parâmetros de ligação da albumina humana (HSA) com as porfirinas por espectroscopia de emissão	83
5.10.1. Medidas de fluorescência no estado estacionário.....	83
5.14. Medidas dos tempos de vida de fluorescência na presença do HSA.....	90
5.15. Investigação de competição nas subunidades da albumina HSA	91
5.16. Análise da perturbação da estrutura da proteína HSA por espectroscopia de dicroísmo circular.....	93
5.17 Docking molecular das porfirinas com HSA	96
6 Considerações Finais.	101
7 Perspectivas futuras.....	102
8 Anexos	105
8.1 Espectro na região do Infravermelho para H2RuTPyP.....	105
8.2 Espectro na região do Infravermelho para ZnRuTPyP.	105
8.3 Espectro de massas para H2RuTPyP.	106
8.4 Espectro de massas para ZnRuTPyP.....	106
8.5 Espectro de massas para H2RuTPyP.	107
8.6 Espectro de massas para ZnRuTPyP.....	107

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Porfirinas são macrociclos tetrapirrólicos que estão presentes em sistemas biológicos, desempenhando funções específicas, como por exemplo o transporte de oxigênio no sangue (hemoglobina) e captação de energia luminosa (clorofila). Desde a síntese e comprovação da heme (porfirina complexada com íons Fe^{II} , presente na hemoglobina), novos estudos que possibilitam a obtenção desses compostos em laboratório, a partir do pirrol, vem sendo relatados desde o ano de 1930.

Tendo em vista a aplicação em, por exemplo, terapia fotodinâmica, mimetização de moléculas fotossintéticas e interação com DNA, estudos que investigam as propriedades eletrônicas, químicas e fotofísicas de compostos porfirínicos estão sendo desenvolvidos. As metaloporfirinas têm sido utilizadas em vários campos de análise de interação com DNA, como mecanismo de quebras de DNA, sondas fluorescentes de DNA e atividade enzimática de reparo de DNA.

Há um crescente interesse no estudo de complexos de metais de transição devido às suas diferentes geometrias de coordenação, processos redox e a capacidade diferenciada de interagir com o DNA e proteínas, através de interações de natureza covalente ou não-covalente. Nas interações covalentes, a ligação pode ser irreversível, ocasionando a substituição de ligantes do complexo, interligação inter e intra-cadeia ou possível alquilação de bases nitrogenadas do DNA. No caso das interações não-covalentes, há uma interação reversível na qual o composto interage com biomoléculas por meio de intercalação, forças eletrostáticas ou interação no sulco maior/menor, desencadeando mudanças na estereoquímica do DNA, quebra de fita ou ainda inibindo a ligação ou interação proteína-DNA.

Na literatura, há compostos como NAMI-A, KP1019 e RAPTA-C, que apresentaram alta atividade antiproliferativa em testes *in vitro* e progrediram para ensaios clínicos. Estas moléculas apresentam centro metálico de Ru^{II} que compõe a estrutura da molécula, sendo assim, existe muitas pesquisas que exploram a utilização deste metal devido à sua atividade biológica quando coordenado à diferentes tipos de ligantes, em especial os ligantes bipyridínicos. Porfirinas de Ru^{II} têm sido exploradas neste contexto, ainda mais devido aos relatos de alto rendimento quântico de geração de oxigênio singlete para muitos complexos de Ru^{II} .

2 OBJETIVOS

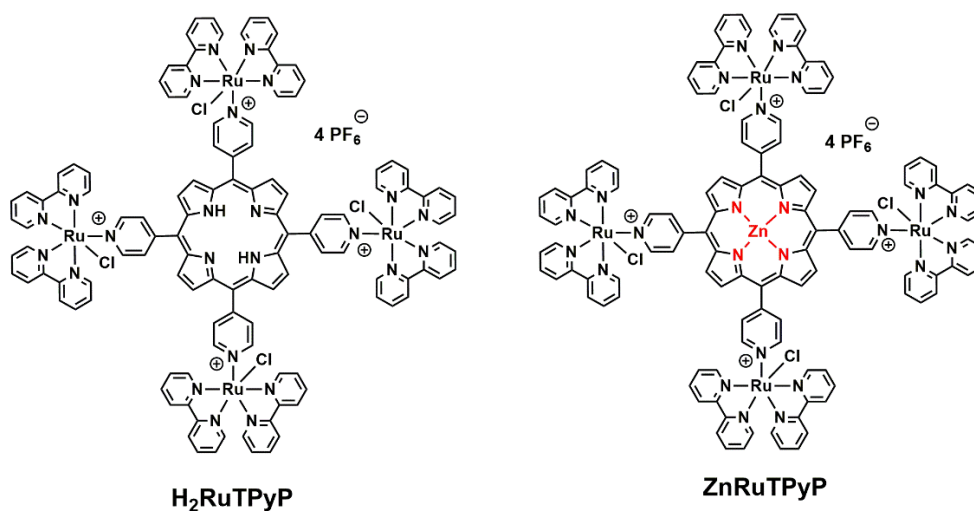
2.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar *meso*-tetra(4-piridil)porfirina tetra-rutenada base-livre (**H₂RuTPyP**) e *meso*-tetra(4-piridil)porfirina tetra-rutenada de zinco(II) (**ZnRuTPyP**), avaliar suas propriedades fotofísicas e suas interações com biomoléculas (DNA e HSA).

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Sintetizar a *meso*-tetra(4-piridil)porfirina tetra-rutenada base-livre (**H₂RuTPyP**) e a *meso*-tetra(4-piridil)porfirina tetra-rutenada de zinco(II) (**ZnRuTPyP**) (Figura 1).
- ❖ Caracterizar os compostos sintetizados utilizando técnicas como: análise elementar CHN%, espectrometria de massas de alta resolução (HRMS-ESI(+)), espectroscopia na região do UV-vis, infravermelho, emissão fluorescente.
- ❖ Avaliar propriedades fotofísicas das moléculas como: fotoestabilidade e geração de oxigênio singleto e espécies radiculares via espectrometria EPR.
- ❖ Analisar a interação destes compostos com biomoléculas (CT-DNA e HSA) via técnicas espectroscópicas, bem como através de cálculos de *docking* molecular.

Figura 1: Representação estrutural das moléculas sintetizadas de Ru^{II}: **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**.



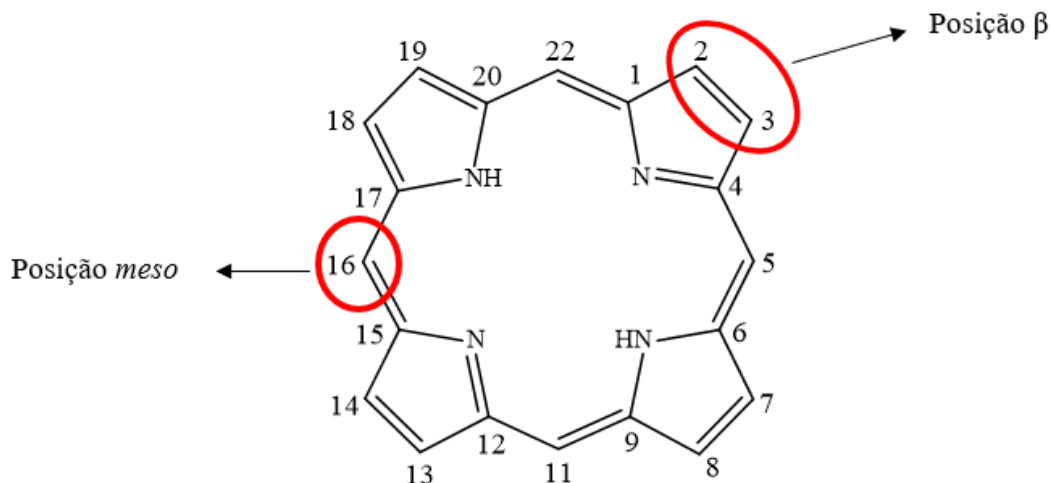
Revisão de literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais das porfirinas

Porfirinas são compostos macrocíclicos constituídos por quatro anéis pirrólicos unidos por grupos metílicos ($-\text{CH}=\text{}$), os quais são localizados nas posições 5, 10, 15 e 20 denominadas *meso*, enquanto as posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 são denominadas β -pirrólicas (Figura 2). Nesta molécula há 22 elétrons π dos quais 18 são conjugados formando um sistema aromático de acordo com a regra de Hückel para aromaticidade ($4n + 2 = \text{número de elétrons } \pi$)^{1,2}.

Figura 2: Representação da estrutura molecular de um anel macrocíclico da porfirina e suas posições β e *meso*.



Fonte: Adaptado de Milgrom, 1997.

Essas conjugações eletrônicas, bem como a aromaticidade, influenciam diretamente nas propriedades eletrônicas e moleculares do macrociclo porfirínico, proporcionando fácil identificação quando aliado a técnicas analíticas. Porfirinas de modo geral apresentam uma banda de absorção de alta intensidade na faixa de 410 a 430 nm,

1 MILGROM, Lionel R.; WARREN, Martin J. **The colours of life: an introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds**. 1997. p. 7.

2 KADISH, Karl; SMITH, Kevin M.; GUILARD, Roger (Ed.). **The porphyrin handbook**. Elsevier, 2000. p. 46.

atribuída as transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, denominada banda Soret ou banda B, e um conjunto de quatro bandas de menor intensidade entre 500 a 700 nm, denominadas bandas Q ³.

A aromaticidade do macrociclo também pode ser confirmada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). O espectro de ¹H RMN das porfirinas são caracterizados por efeitos anisotrópicos, uma vez que os prótons internos do grupo NH do pirrol são fortemente blindados (δ entre -2 e -4 ppm), enquanto os prótons das posições *meso* e β -pirrólicos são fracamente blindados (δ 10 – 11 ppm e δ 8 – 9 ppm, respectivamente) ³. Esse efeito favorece diversos tipos de reações, como substituições nucleofílicas e eletrofílicas, adições radicalares ou nucleofílicas, onde os carbonos das posições *meso* e β -pirrólicas participam das reações ⁴.

Porfirinas denominadas “base-livre” apresentam uma cavidade na região central do anel, o que possibilita o uso dessas moléculas como ligantes para diversos íons de metais de transição desde que tenha raio atômico apropriado ⁵. Reações de metalação são realizada, de forma genérica, a partir de um sal metálico de interesse $MX_n(s)$ (onde M = íon metálico, X= Cl⁻, Br⁻, AcO⁻) com a porfirina na forma base-livre e em meio reacional ácido (ácido acético ou propiônico) ou orgânico (tolueno, clorofórmio, DMF), levando a formação de uma metaloporfirina ⁶.

3.2 Bioatividade de complexos de rutênio(II)

A atividade biológica dos compostos de rutênio é conhecida e relatada na literatura ^{7, 8}. O interesse no comportamento biológico dos metalofármacos contendo íons rutênio como átomo central é devido às suas características eletrônicas serem semelhantes às dos

3 FLEISHER, E. B. **Accounts of Chemical Research**. 1970. p. 105 – 112.

4 INTRIERI, Daniela. Synthesis, Characterization and Catalytic activity of Iron, Ruthenium and Cobalt Porphyrin Complexes. 2014. Tese de Doutorado. Milan State University.

5 IGLESIAS, Bernardo Almeida. **Síntese e propriedades espectroscópicas e eletroquímicas de uma triazeno-porfirina**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

6 ADLER, A. D., *et al.*. On the preparation of metalloporphyrins, **J. Inorg. Nucl. Chem.** 1970. p. 2443.

7 TABARES, Julie Pauline Gaitan et al. A Ru (II)-p-cymene compound bearing naproxen-pyridineamide. Synthesis, spectroscopic studies, computational analysis and in vitro anticancer activity against lung cells compared to Ru (II)-p-cymene-naproxen and the corresponding drug ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 489, p. 27-38, 2019..

8 MITAL, Mariusz; ZIORA, Zyta. Biological applications of Ru (II) polypyridyl complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 375, p. 434-458, 2018.

íons ferro. Deste modo, o organismo adota mecanismos de detoxificação análogos aos excessos de íons de ferro, através da síntese de proteínas e agentes quelantes, tais como transferrina e albumina ⁹.

Nas últimas décadas, muita atenção tem sido focada nos complexos de Ru^{II} por sua potencial utilidade em quimioterapia, fototerapia dinâmica (PDT) e aplicação fotofísica ¹⁰. Vários complexos de rutênio(II) foram projetados e sua atividade inibitória contra o crescimento de células tumorais, bem como sua interação com macromoléculas biológicas, tem sido extensivamente estudada ¹¹. Alguns desses complexos de rutênio exibem excelente aplicação antitumoral, como por exemplo, o NAMI-A e o KP1019, os quais apresentam alta atividade antiproliferativa *in vitro* e entraram em ensaios clínicos e um terceiro, RAPTA-C, está progredindo no sentido de ensaios clínicos (Figura 3) ^{12, 13, 14, 15}.

Complexos polipiridínicos de rutênio(II) apresentam ligantes quelantes do tipo N-N, estrutura octaédrica e amplos estados de oxidação ¹⁶. Além disso, suas características fotofísicas e fotoquímicas (grande deslocamento de Stokes, longos tempos de vida e fotoestabilidade) possibilitam uma rica gama de aplicações, como por exemplo a

9 F KRATZ, Felix et al. The binding properties of two antitumor ruthenium (III) complexes to apotransferrin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 4, p. 2581-2588, 1994.

10 ZENG, Leli et al. The development of anticancer ruthenium (II) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 19, p. 5771-5804, 2017.

11 ZHANG, Jing-Xiang et al. Comparative studies of the cellular uptake, subcellular localization, and cytotoxic and phototoxic antitumor properties of ruthenium (II)-porphyrin conjugates with different linkers. **Bioconjugate chemistry**, v. 23, n. 8, p. 1623-1638, 2012.

12 SAVA, Gianni et al. Dual action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis: selective targeting of metastatic cells and binding to collagen. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 5, p. 1898-1905, 2003.

13 RADEMAKER-LAKHAI, Jeany M. et al. A phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 11, p. 3717-3727, 2004.

14 TRONDL, Robert et al. NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. **Chemical Science**, v. 5, n. 8, p. 2925-2932, 2014.

15 DO NASCIMENTO, Fábio B. et al. Synthesis, characterization, X-ray structure and *in vitro* antimycobacterial and antitumoral activities of Ru (II) phosphine/diimine complexes containing the "SpymMe2" ligand, SpymMe2= 4, 6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 102, n. 9, p. 1783-1789, 2008.

16 GILL, Martin R.; THOMAS, Jim A. Ruthenium (II) polypyridyl complexes and DNA—from structural probes to cellular imaging and therapeutics. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 8, p. 3179-3192, 2012.

catálise^{17, 18}, dispositivos moleculares¹⁹, sensibilizadores de corantes para células solares^{20, 21} e sondas fluorescentes²². Recentemente, estudos relataram que estes complexos demonstram propriedades biológicas interessantes em função da alta capacidade de interação com biomoléculas²³ (DNA, RNA e proteínas) e capacidade de atuar como biosinalizador, tornando-os propensos a serem utilizados como potenciais drogas terapêuticas e de diagnósticos para câncer²⁴.

Mais ainda, uma variedade de complexos polipiridínicos de rutênio(II) estão sendo investigados por apresentarem propriedades fotoativas, com certos compostos tendo citotoxicidade aumentada após irradiação de luz visível, proporcionando uma plataforma para terapia de tumores agindo por meio da dissociação fotoinduzida do ligante mais lábil ou por via de promoção de estado fundamental ao estado excitado, dando-lhes o potencial de produzir espécies reativas de oxigênio (EROS)^{25, 26}.

17 . CONCEPCION, Javier J. et al. Mechanism of water oxidation by single-site ruthenium complex catalysts. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 5, p. 1545-1557, 2010.

18 YOON, Tehshik P.; ISCHAY, Michael A.; DU, Juana. Visible light photocatalysis as a greener approach to photochemical synthesis. **Nature chemistry**, v. 2, n. 7, p. 527, 2010.

19 KALYANASUNDARAM, K.; GRÄTZEL, M. Applications of functionalized transition metal complexes in photonic and optoelectronic devices. **Coordination chemistry reviews**, v. 177, n. 1, p. 347-414, 1998.

20 SONAI, Gabriela G. et al. Solar cells sensitized with natural dyes: an introductory experiment about solar energy for undergraduate students. **Química Nova**, v. 38, n. 10, p. 1357-1365, 2015.

21 POLO, André Sarto; ITOKAZU, Melina Kayoko; IHA, Neyde Yukie Murakami. Metal complex sensitizers in dye-sensitized solar cells. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 248, n. 13-14, p. 1343-1361, 2004..

22 LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy Kluwer. **New York**, 1999..

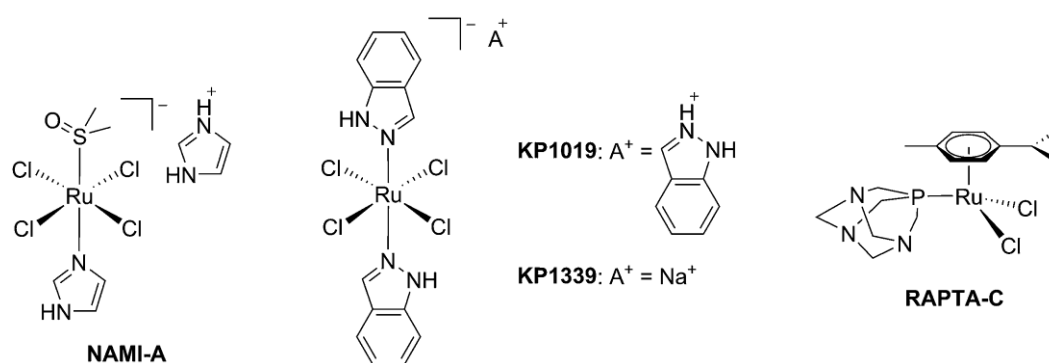
23 : LI, Guanying et al. Ruthenium (II) complexes with dppz: From molecular photoswitch to biological applications. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 34, p. 13261-13276, 2016.

24 GILL, Martin R.; THOMAS, Jim A. Ruthenium (II) polypyridyl complexes and DNA—from structural probes to cellular imaging and therapeutics. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 8, p. 3179-3192, 2012.

25 J. KNOLL, Jessica D.; TURRO, Claudia. Control and utilization of ruthenium and rhodium metal complex excited states for photoactivated cancer therapy. **Coordination chemistry reviews**, v. 282, p. 110-126, 2015.

26 MARI, Cristina et al. Combination of Ru (II) complexes and light: new frontiers in cancer therapy. **Chemical science**, v. 6, n. 5, p. 2660-2686, 2015.

Figura 3: Representação da estrutura molecular dos complexos NAMI-A, KP1019, KP1339 e RAPTA-C.



Fonte: Gasser, et. al., 2015²⁷.

3.3 Metodologias sintéticas

A primeira estrutura molecular de uma porfirina foi proposta por Küster, em 1912, porém, por se tratar de uma macromolécula, sua estabilidade foi questionada em função da excessiva massa molecular do anel porfirínico²⁸. Fischer e colaboradores, em 1929, sintetizaram a *heme*, porfirina complexada com íons de Fe^{II}, e sua estrutura foi caracterizada e comprovada por difração de raios-X²⁹. Este estudo despertou curiosidade e várias metodologias sintéticas de porfirinas foram relatadas.

No ano de 1935, Rothermund propôs uma rota sintética para obtenção de porfirinas *meso*-substituídas a partir da reação entre pirrol e benzaldeído, utilizando metanol como meio reacional com pequenas quantidades de piridina. O sistema foi mantido em refluxo durante 48 h. O rendimento obtido para a reação foi de 9%, porém o produto apresentava 5% de impureza (clorina)³⁰.

Adler e colaboradores em 1964 adaptaram a metodologia para alcançar maiores rendimentos. Para isso, modificaram o meio reacional para ácidos orgânicos (ácido

27 ANANTH NAG, Guddekoppa S.; SHETTI, Vijayendra S. Synthesis, structure and catalysis of organometallic porphyrin-pincer hybrids: a review. *Dalton Transactions*, v. 46, n. 41, p. 14062-14082, 2017.

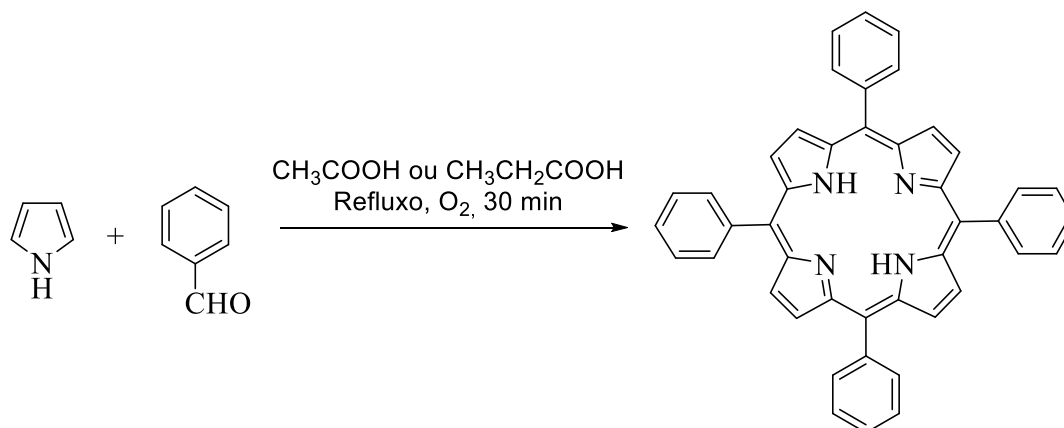
28 Küster., W. Beiträge zur Kenntnis des Bilirubins und Hämins. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiologische Chemie*, 82(6), p. 463-483, 1912.

29 BRAUNITZER, G. et al. The hemoglobins. In: *Advances in protein chemistry*. Academic Press, 1964. p. 1-71.

30 ROTHEMUND, Paul. Formation of porphyrins from pyrrole and aldehydes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 57, n. 10, p. 2010-2011, 1935.

acético ou ácido propiônico) sob atmosfera ambiente, mantendo o sistema em refluxo durante um tempo de 30 minutos. Estas alterações aumentaram o rendimento de 9% para 20%, contudo também houve aumento de impureza para 10%³¹. A rota sintética resumida está representada no Esquema 1.

Esquema 1: Representação da rota sintética geral para uma *meso*-tetra-(aril)porfirina proposta por Adler e colaboradores.



Fonte: Adaptado de Adler, Longo e Shergalis, 1964.

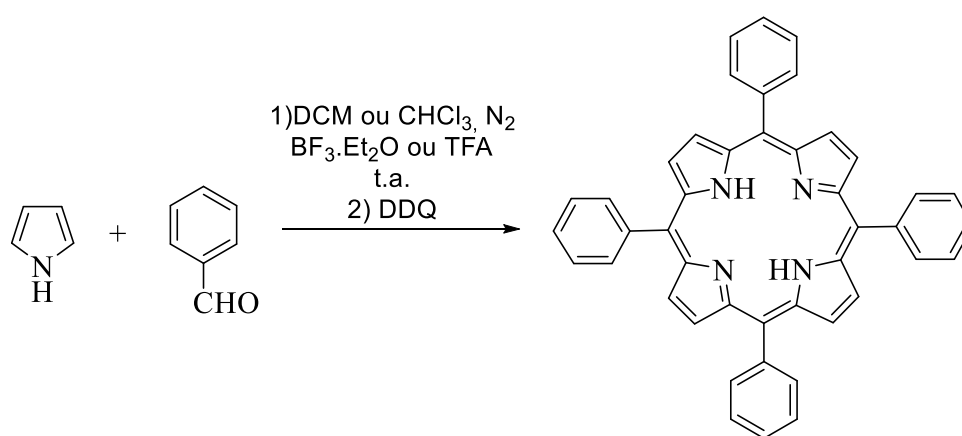
Com o objetivo de aumentar ainda mais o rendimento do macrociclo porfirínico, Lindsey e colaboradores, buscaram desenvolver uma nova rota de síntese que consistia em duas etapas, onde na primeira ocorria a reação entre o pirrol e benzaldeído em diclorometano (DCM) ou clorofórmio (CHCl₃), na presença de ácido trifluoracético (TFA) ou eterato de trifluoreto de boro (BF₃O(C₂H₅)₂), como ácido de Lewis a temperatura ambiente. Essa etapa produz um intermediário porfirogênico com quatro nitrogênios internos deprotonados. Na etapa seguinte ocorre a oxidação do intermediário a partir de um agente oxidante, geralmente 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ), levando a formação da *meso*-tetra(fenil)porfirina (Esquema 2). Os autores relatam que o rendimento obtido para este experimento foi de, aproximadamente, 45%³².

31 ADLER, Alan D.; LONGO, Frederick R.; SHERGALIS, William. Mechanistic investigations of porphyrin syntheses. I. Preliminary studies on *ms*-tetraphenylporphin. *Journal of the American Chemical Society*, v. 86, n. 15, p. 3145-3149, 1964.

32 LINDSEY, J. S., SCHREIMAN, I. C., HSU, H.C.. An improved synthesis of tetramesitylporphyrin *Tetrahedron Letters*. p. 3069-3070, 1986.

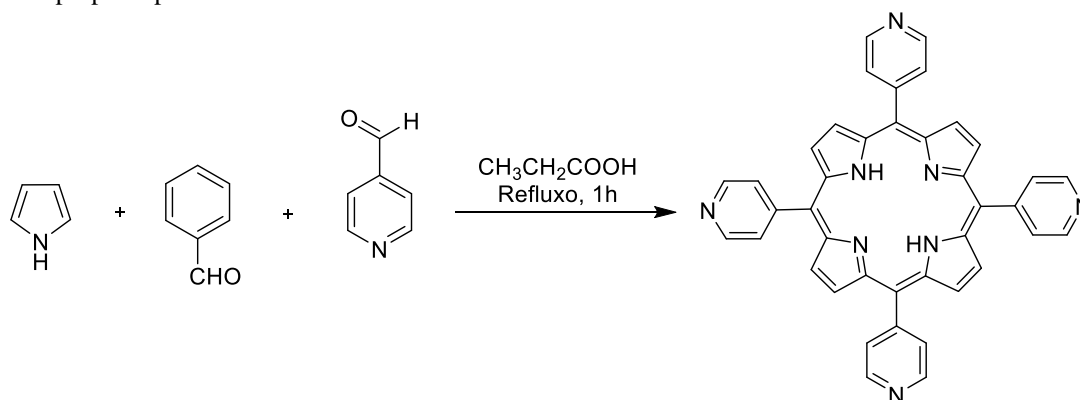
Em 1991, Fleischer e colaboradores prepararam a *meso*-tetra(4-piridil)porfirina a partir do método proposto por Adler e colaboradores³³. Partindo da reação entre pirrol, benzaldeído e 4-piridil-carboxaldeído (com proporções estequiométricas, em mmol, de 100:74:26, respectivamente), o sistema foi deixado em refluxo com 250 mL de ácido propiônico durante 1 h. Após o tempo de reação, a solução foi resfriada e deixada em repouso durante à noite. O produto final foi filtrado e lavado com metanol para obtenção do sólido púrpuro cristalino (Esquema 3).

Esquema 2: Representação da rota sintética geral para uma *meso*-tetra-(aril)porfirina proposta por Lindsey e colaboradores, em 1986.



Fonte: Adaptado de Lindsey e colaboradores, em 1986.

Esquema 3: Representação da rota sintética para obtenção de uma porfirina *meso* substituídas por grupos piridil proposta por Fischer e colaboradores.



Fonte: Adaptado de Fleischer e colaboradores, 1991.

Araki e Toma, em 1994, relataram a síntese de um novo composto porfirínico contendo complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$ ligados nas posições periféricas da *meso*-tetra(4-piridil)porfirina de zinco(II) (**ZnTPyP**). A porfirina tetra-rutenada foi obtida a partir da reação entre a porfirina tetra-piridil de zinco(II) e do complexo de rutênio $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$, com proporção molar de 1:4,1 em ácido acético glacial, sob refluxo durante uma hora. O solvente foi removido por evaporação e a porfirina foi isolada por precipitação pela adição de uma solução aquosa saturada de trifluorometanossulfonato de lítio (LiCF_3SO_3). O produto final da reação foi filtrado, lavado com água e seco sob vácuo ³⁴.

3.4 Interações com biomoléculas

3.4.1 Ácido desoxirribonucleico

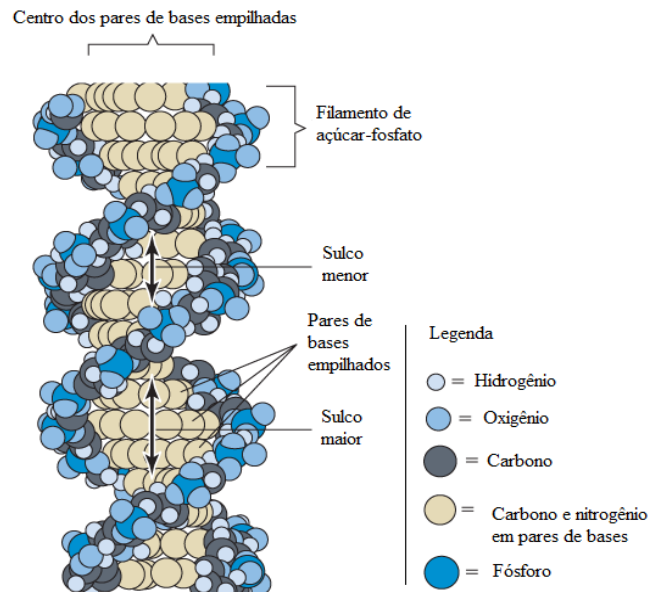
O ácido desoxirribonucleico (DNA) é uma macromolécula que contém informações genéticas. Contém informações importantes para a síntese de proteínas e de ácido ribonucleico (RNA). A estrutura do DNA formada a partir de dois filamentos de cadeias polinucleotídeas enoveladas em torno de um eixo formam uma estrutura helicoidal conforme é possível observar na Figura 4 ³⁵. A estrutura da dupla hélice é mantida pelo grande número de ligações de hidrogênio entra as bases nitrogenadas dos filamentos opostos. As bases nitrogenadas da estrutura tendem a ser hidrofóbicas contribuindo para o empilhamento das bases nitrogenadas promovendo estabilidade adicional à estrutura do DNA ³⁶.

34 ARAKI, Koiti; TOMA, Henrique E. Luminescence, spectroelectrochemistry and photoelectrochemical properties of a tetra-ruthenated zinc porphyrin. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 83, n. 3, p. 245-250, 1994.

35 MENK, C. F. M., SLUYS, M. V. *Genética Moleculas Básica: dos genes aos genomas*. 2017. Parte 2.

36 BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L. *Bioquímica*. 6, p. 1059, 2008.

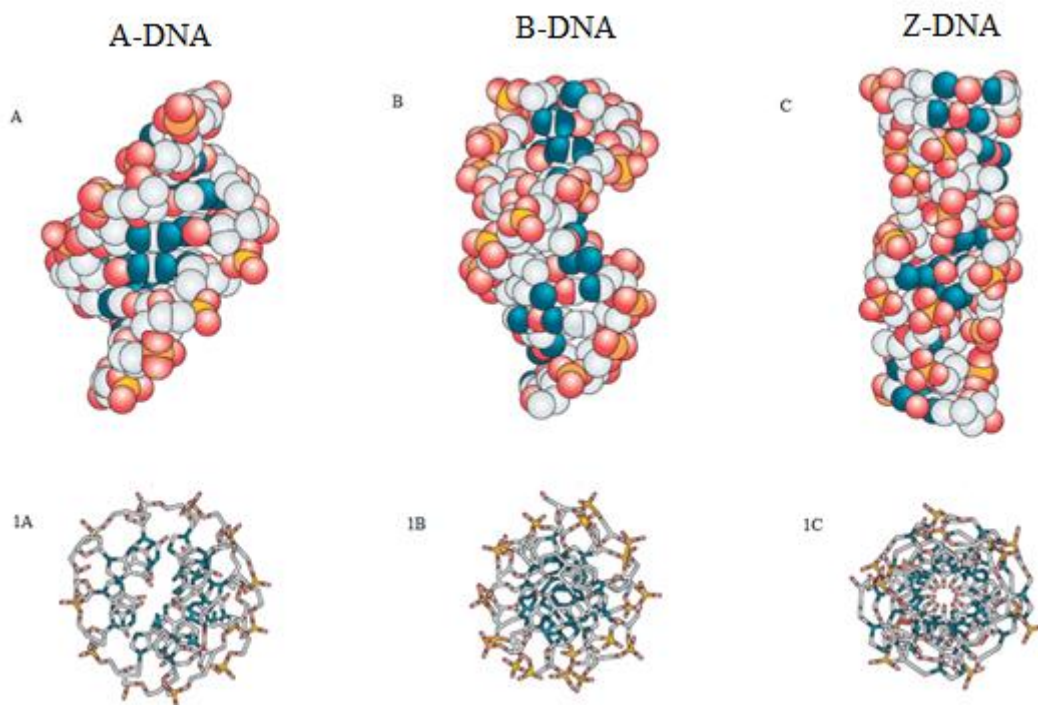
Figura 4: Representação da estrutura de dupla hélice do ácido nucleico formada a partir de ligações de hidrogênio das bases nitrogenadas.



Fonte: Adaptado de Menk e Sluys, (2017).

A conformação B-DNA, descrita por Watson e Crick, é predominante nas moléculas de DNA presente no citoplasma das células vivas. No entanto, a conformação varia de acordo com a natureza das moléculas que o DNA interage. Em condições não fisiológicas, ou em estado de desidratação, como sais comerciais de DNA, a estrutura do DNA tende a uma conformação do tipo A: uma hélice dextrógira com 11 pares de nucleotídeos por volta, enquanto a conformação do tipo B existe com 10 pares de nucleotídeos e filamentos mais alongados sob condições fisiológicas. A molécula de DNA, portanto, não é estática e invariável. Algumas sequências de DNA existem na conformação Z, estrutura helicoidal levógira com 12 pares de nucleotídeo empilhados e um único sulco. No entanto, a presença do Z-DNA nos seres vivos ainda não é clara. É possível observar as conformações na Figura 5 ¹⁴.

Figura 5: As formas conformacionais A, B e Z do DNA estão representadas e indicadas pelas letras A, B e C, respectivamente. Sendo A, B e C representação vista de frente e 1A, 1B e 1C representação vista de cima.



Fonte: Adaptado de Menk e Sluys, (2017).

A interação de porfirinas ligadas a complexos metálicos com o DNA tem sido investigada por décadas devido à potencial atividade fotoquímica e aplicabilidade em terapia fotodinâmica (PDT), bem como via de mecanismo para clivagem de DNA ³⁷, sondas fluorescentes de DNA ³⁸ e atividade enzimática de reparo de DNA ³⁹. Porfirinas

37 KOVALEVA, Oxana A. et al. Preferential DNA photocleavage potency of Zn (II) over Ni (II) derivatives of carboxymethyl tetracationic porphyrin: the role of the mode of binding to DNA. **European Biophysics Journal**, v. 43, n. 10-11, p. 545-554, 2014.

38 WANG, Yaqiong; SAURIAT-DORIZON, Helene; KORRI-YOUSSOUFI, Hafsa. Direct electrochemical DNA biosensor based on reduced graphene oxide and metalloporphyrin nanocomposite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 251, p. 40-48, 2017.

39 VAN HEMMEN, J. J.; MEULING, W. J. A.; BLEICHRODT, J. F. Effect of Oxygen on Inactivation of Biologically Active DNA by γ Rays in Vitro: Influence of Metalloporphyrins and Enzymatic DNA Repair. **Radiation research**, v. 75, n. 2, p. 410-423, 1978..

atuando como fotossensibilizadores (PS) em PDT, na inativação fotodinâmica de microrganismos (PDI) tem sido amplamente explorada em vários grupos de pesquisa^{40,41}.

Há um crescente interesse no estudo de complexos de metais de transição em função das suas diferentes geometrias de coordenação, processos redox e diferentes meios e capacidades de interagir com o DNA. Esta interação DNA–metaloporfirina pode ocorrer de forma reversível, através de ligação aos sulcos, intercalação, interações eletrostáticas; como também de forma irreversível, via ligações covalentes às bases e aos grupos fosfatos⁴².

As interações dos compostos com o DNA são possíveis devido às cargas negativas dos grupos fosfatos nos filamentos do DNA e à presença de átomos de elementos químicos como oxigênio, nitrogênio e hidrogênio nas bases nitrogenadas, como também, podem ser regidas por forças hidrofóbicas, Van der Waals ou ligações de hidrogênio^{43,44,45}. Com isso, a molécula de DNA torna-se um alvo interessante para metaloporfirinas, as quais, quando estabelecida a interação composto–DNA, podem apresentar atividades

40 SILVA, Ana Paula da. **Inativação dos micro-organismos causadores da onicomicose por terapia fotodinâmica-estudo in vitro e clínico**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo

41 OLIVEIRA, Vanessa A. et al. Photoactive meso-tetra (4-pyridyl) porphyrin-tetrakis-[chloro (2, 2' bipyridine) platinum (ii) derivatives recognize and cleave DNA upon irradiation. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 5, p. 1660-1669, 2017.

42 D'URSO, Alessandro; FRAGALA, Maria Elena; PURRELLO, Roberto. Non-covalent interactions of porphyrinoids with duplex DNA. In: **Applications of Porphyrinoids**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. p. 139-174.

43 KEENE, F. Richard; SMITH, Jayden A.; COLLINS, J. Grant. Metal complexes as structure-selective binding agents for nucleic acids. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, n. 15-16, p. 2021-2035, 2009.

44 BOER, D. Roeland; CANALS, Albert; COLL, Miquel. DNA-binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes. **Dalton Transactions**, n. 3, p. 399-414, 2009.

45 BARRA, Carolina Valério; NETTO, Adelino VG. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1998-2016, 2015.

antivirais ⁴⁶, antimicrobianas ⁴⁷ e antitumorais ⁴⁸, como também capacidade de clivar a estrutura do DNA ⁴⁹.

Moléculas, de modo geral, podem interagir com a estrutura do DNA de forma irreversível, a partir de ligações covalentes; ou reversível, através de interações eletrostáticas, ligações aos sulcos ou por intercalação. Estas interações induzem a mudanças estruturais do ácido nucleico resultando em alterações conformacionais, perda, adição ou substituição das bases nitrogenadas modificando, desta forma, a sequência do DNA e afetando a fidelidade do código genético ⁵⁰. Com isso, é possível que ocorra a inibição da síntese proteica (inibição da expressão gênica) ou originar proteínas com estrutura modificada e enzimas com a atividade específica alterada. A maioria dos compostos com atividade anticâncer exercem seu efeito antitumoral danificando a capacidade de replicação do ácido nucleico por ligações covalentes ou não covalente (irreversível e reversível, respectivamente) ou a partir de danos oxidativos ocasionados pelas EROS ⁵¹.

Compostos que se ligam de forma irreversível ao DNA (Figura 6) perdem seus ligantes mais lábeis para se coordenarem ao ácido nucleico e pode ocorrer inter ou intra-filamento das hélices. Essa ligação promove distorções na estrutura helicoidal do DNA, provocando alterações nas funções da molécula ⁵².

Interações eletrostáticas entre cátions e o DNA podem ocorrer na superfície externa da hélice como consequência da estrutura negativa proveniente dos grupos fosfatos. As bases ficam expostas nos sulcos, sendo que seus sítios de coordenação estão

46 SONG, R. et al. Anti-HIV activities of anionic metalloporphyrins and related compounds. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 8, n. 2, p. 85-97, 1997.

47 NUNEZ, Silvia; GARCEZ, Aguinaldo Silva; RIBEIRO, Martha Simões. **PDT-Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia**. Elsevier Brasil, 2015.

48 RIBEIRO, J. N. et al. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Eclética Química**, v. 32, n. 1, p. 7-14, 2007.

49 OLIVEIRA, Vanessa Almeida de et al. Interação de metaloporfirinas com DNA: mecanismo catalítico da fotoclivagem. 2017.

50 GARCÍA-RAMOS, Juan Carlos et al. Metal-based drug-DNA interactions. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 57, n. 3, p. 245-259, 2013.

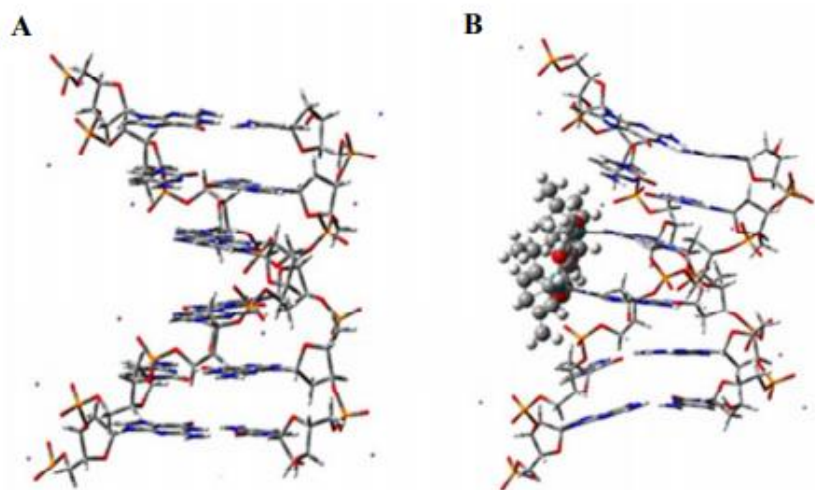
51 ARMITAGE, B. Photocleavage of Nucleic Acids. **Chem. Rev.** 1998. p. 1171–1200.

52 CALVILLO-PÁEZ, Viviana et al. Synthesis, spectroscopic, physicochemical and structural characterization of tetrandrine-based macrocycles functionalized with acridine and anthracene groups: DNA binding and anti-proliferative activity. **Chemico-biological interactions**, v. 286, p. 34-44, 2018.

localizados no centro do eixo da dupla hélice, desta forma é possível que o composto interaja diretamente com as bases nitrogenadas ⁵³.

A intercalação (Figura 7) consiste na inserção da molécula entre os pares vizinhos de bases nitrogenadas, provocando distorções na conformação do ácido nucleico e impedir a interação proteína–DNA. Isso pode interferir no reconhecimento e função das proteínas associadas ao DNA, como por exemplo topoisomerasas, polimerases, sistemas de reparo de DNA e fatores de transcrição, acarretando retardo ou inibição dos processos de transcrição e replicação, principalmente em células com alta taxa de proliferação, a exemplo das cancerosas ⁵⁸. Entretanto, é importante destacar que nem todos os intercaladores são genotóxicos, visto que são necessários alguns grupos funcionais, catiônicos ou eletrofílicos, como sistemas planares policíclicos aromáticos, para exercer a atividade genotóxica. Abordagens computacionais indicam que a carga positiva pode causar um abaixamento na energia do orbital molecular não ocupado de mais baixa energia (LUMO) do ligante, favorecendo assim a interação com o orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) das bases do DNA, segundo a teoria ácido e base de Pearson.

Figura 6: Representação da estrutura helicoidal do DNA (A) e da distorção na estrutura do DNA (B) causada pela ligação irreversível com o complexo de rutênio(II).



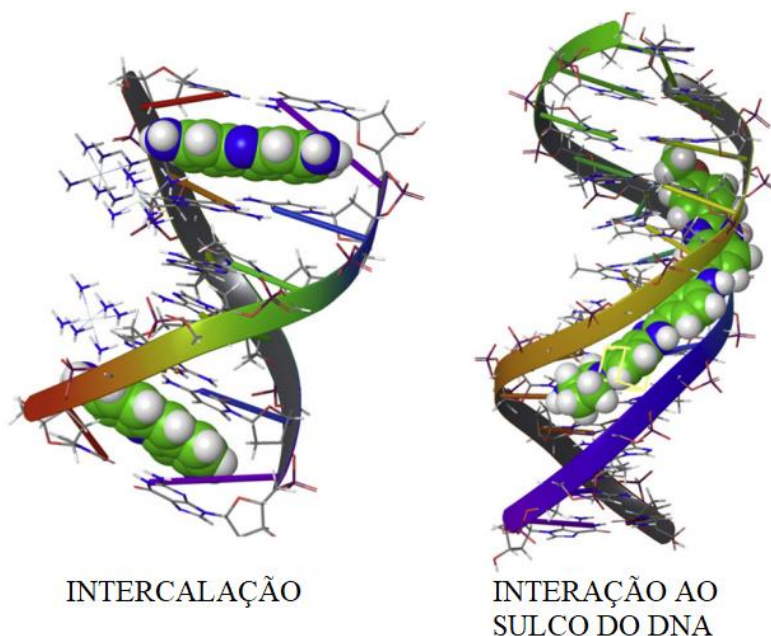
Fonte: García, *et al* (2017) ⁵⁴.

53 KR, Sangeetha Gowda et al. Mechanism of DNA binding and cleavage. **Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2014.

54 LOZANO, Héctor J. et al. Evidence for interstrand DNA covalent binding of two dinuclear Ru (II) complexes. Influence of the extra ring of the bridging ligand on the DNA interaction and cytotoxic activity.

Os compostos que interagem com DNA através dos sulcos (Figura 7) apresentam uma estrutura flexível e, desta forma, se conectam ao ácido nucleico por meio dos sulcos da dupla-hélice resultando numa distorção na estrutura do DNA ⁵⁵. Por comparação, a distorção causada por interação ao sulco é menos acentuada que a causada por intercaladores, entretanto, o conjunto de forças existentes, como van der Waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas podem originar complexos mais estáveis do que os provocados pela intercalação. A nível molecular, a vacância dos sulcos é diferente. O sulco maior tem 11,6 Å de largura e 8,5 Å de profundidade e oferece fácil acesso a moléculas volumosas. Os sulcos menores apresentam vacâncias reduzidas sendo menores em tamanho e com 8,2 Å de profundidade. Efeitos eletrostáticos entre espécies catiônicas e os grupos fosfatos do DNA carregados negativamente acontecem, de modo geral, a partir de moléculas pequenas e com interação externa à hélice do DNA ⁵⁷.

Figura 7: Representações de ligações ao DNA via intercalação, à esquerda, e ao sulco, à direita, bem como as distorções causadas no ácido nucleico através da inserção desses compostos em sua estrutura.

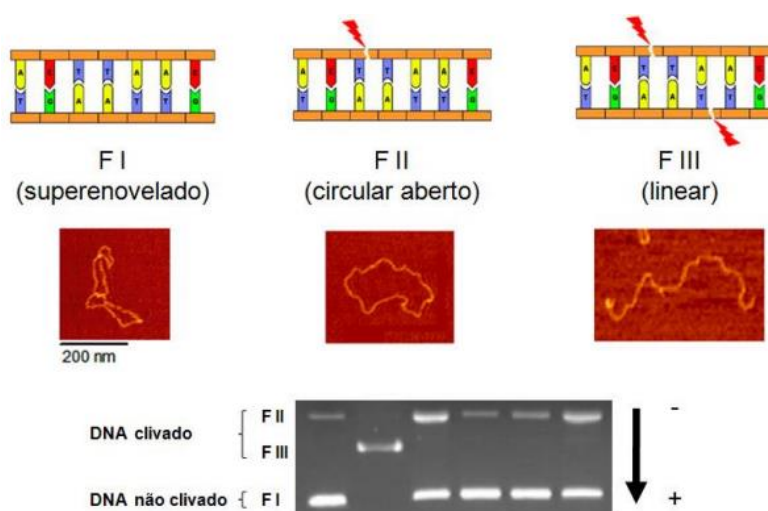


Fonte: Adaptado de Boer e Coll, 2009.

55 BOER, D. Roeland; CANALS, Albert; COLL, Miquel. DNA-binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes. **Dalton Transactions**, n. 3, p. 399-414, 2009.

As fitas do DNA estão altamente tensionadas, quando intactas, mantendo-se na forma super-enovelada (FI). Ao sofrer algum processo de clivagem em um de seus filamentos, ocorre um relaxamento na dupla-hélice convertendo a molécula para sua forma circular aberta (FII). No caso de ocorrer quebra nos dois filamentos de sua estrutura, o DNA assume sua forma linear (FIII). A identificação destas estruturas pode ser feita através da técnica de eletroforese em gel, uma vez que apresentam diferentes mobilidades eletroforética ⁵⁶, conforme é possível observar na Figura 8.

Figura 8: Ilustração e imagens de AFM das três formas do DNA plasmidial (acima) e a sua diferenciação após eletroforese em gel de agarose (abaixo).



Fonte: Bortollo, 2011 ⁵⁷.

3.4.2 Albumina de soro humano

Albumina de soro humano (HSA, do inglês *Human Serum Albumin*) é uma proteína de baixo peso molecular (66.5 kDa) com maior abundância nos seres humanos, cerca de 60% da quantidade total de proteínas, aproximadamente 40 mg mL⁻¹. É a principal proteína transportadora de pequenas e grandes cadeias de ácidos graxos, que são

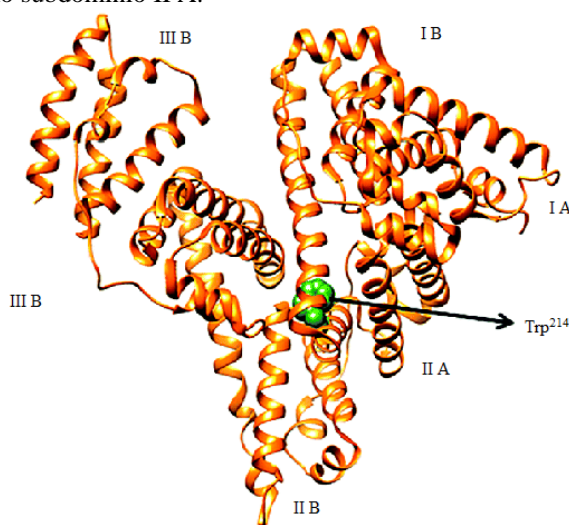
56 NAVARRO, Maribel et al. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of [Cu (dppz) 2] BF4. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 97, n. 4, p. 364-369, 2003.

57 BORTOLOTTI, Tiago et al. Interação e clivagem de DNA por novos complexos de cobre (II) derivados de tetraciclina e 1, 10-fenantrolina. 2012.

insolúveis no plasma sanguíneo, como também possui função sequestrante de radicais livres de oxigênio e inativadora de metabólicos lipofílicos tóxicos ^{58,59}.

O HSA (Figura 9) é constituído por cadeias polipeptídicas compostas por 585 aminoácidos. Apresenta um resíduo de triptofano (Trp²¹⁴) e outros resíduos formam 17 pontes dissulfeto que auxiliam a manter a estrutura terciária, 6 grupos de metionina, 59 grupos de lisina. Essa estrutura é dividida em três domínios homólogos (I, II e III). Cada domínio contém dois subdomínios A e B. No subgrupo IIA está localizado o resíduo de Trp²¹⁴ ⁶⁰.

Figura 9: Representação da estrutura proteica da Albumina do soro humano em laranja e do resíduo de aminoácido Trp²¹⁴ em verde no subdomínio II A.



Fonte: Peters (1995).

Ross e Subramanian, em 1980, correlacionaram parâmetros termodinâmicos, como variação da entropia (ΔS) e variação da entalpia (ΔH), com diferentes tipos de forças intermoleculares que regem a inserção de moléculas na estrutura de proteínas. Com isso, a interação proteína-complexo pode ser regida por interações hidrofóbicas (no caso

58 SATTARAHMADY, Naghme et al. Formation of the molten globule-like state during prolonged glycation of human serum albumin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1770, n. 6, p. 933-942, 2007.

59 SATTARAHMADY, Naghme; MOOSAVI-MOVAHEDI, Ali; HABIBI-REZAEI, Mehran. A biophysical comparison of human serum albumin to be glycated in vivo and in vitro. **Journal of Medical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 5-10, 2011.

60 PETERS JR, Theodore. **All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications**. Academic press, 1995.

de $\Delta S > 0$ e $\Delta H > 0$), ligações de hidrogênio ou van der Waals (se $\Delta S < 0$ e $\Delta H < 0$) ou atrações eletrostáticas (se $\Delta S < 0$ e $\Delta H > 0$)⁶¹.

A espectroscopia de emissão fluorescente é uma técnica empregada para o estudo de parâmetros físico-químicos, como também é muito utilizada para investigação e monitoramento da interação de atividade de várias substâncias com essas proteínas, como por exemplo, hormônios esteroides (testosterona e progesterona) e iso-imperatorina. O HSA apresenta fluorescência intrínseca devido à presença do resíduo de aminoácido Trp²¹⁴ e fenilalanina ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $\lambda_{em} = 350 - 500$ nm). Através da supressão da fluorescência do resíduo Trp²¹⁴, se permite avaliar as interações com complexos metálicos e obter informações dos seus possíveis sítios de ligação utilizando as equações de Stern-Volmer (vide Parte Experimental).

O mecanismo de supressão de fluorescência de Stern-Volmer tem sido amplamente utilizado por diversos autores para obtenção dos parâmetros físico-químicos de biomoléculas^{62,63}. Através destes parâmetros também podemos prever se este processo de supressão pode ser de natureza dinâmica ou estática, pela análise das constantes difusionais (k_{dif}) e pelos valores encontrados para as constantes cinéticas de supressão (k_q).

Para processos de natureza dinâmica de supressão (Figura 10), a intensidade de emissão da fluorescência decai conforme as moléculas de proteínas excitadas colidem com a substância supressora. Com isso, de maneira geral, os valores de k_q serão mais baixos que os valores da k_{dif} . Neste caso, o tempo de contato entre o fluoróforo e o supressor será muito curto para que o supressor se difunda ao fluoróforo e forme um aduto e, portanto, ocorre apenas colisões com transferência de energia entre o supressor e o fluoróforo sem que haja formações de adutos no estado excitado (processo chamado de FRET – *Föster Ressonance Energy Transfer*).

Enquanto isso, no processo de supressão estática (Figura 10), a colisão da albumina com a substância supressora pode ocorrer no estado fundamental levando à

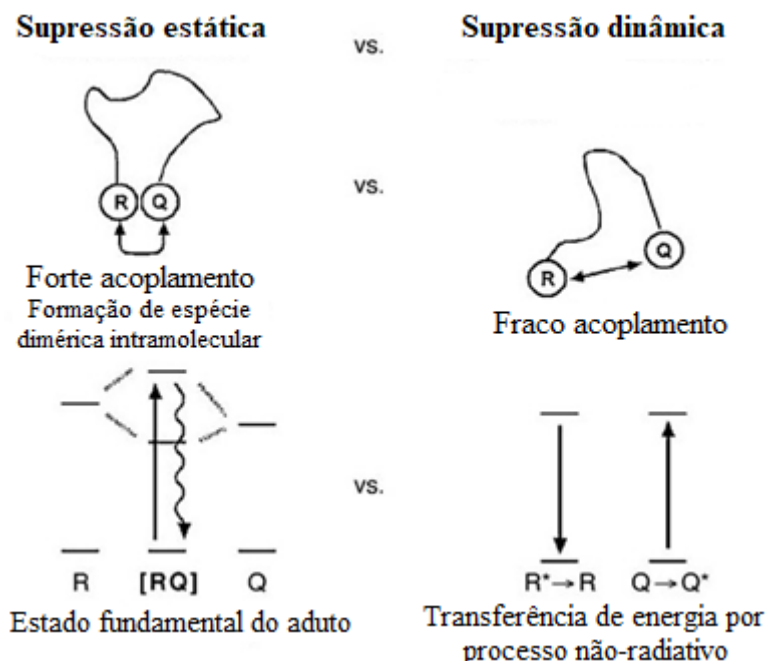
61 ROSS, Philip D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, v. 20, n. 11, p. 3096-3102, 1981.

62 JUREK, Katarzyna et al. New fluorescence probes for biomolecules. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13071-13079, 2015.

63 SAHU, Dillip Kumar; SINGHA, Debabrata; SAHU, Kalyanasis. Sensing of iron (III)-biomolecules by surfactant-free fluorescent copper nanoclusters. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 22, p. 100250, 2019.

formação de um complexo não fluorescente, sendo assim, verifica-se formação de um complexo entre o fluoróforo e o supressor. Neste caso, após a absorção da radiação eletromagnética, o fluoróforo retorna rapidamente ao seu estado fundamental sem que haja a emissão de fóton. Deste modo, a supressão da fluorescência ocorre devido à redução do número de moléculas fluorescentes no estado fundamental.

Figura 10: Mecanismos de supressão estático e dinâmico de transferência de energia entre o supressor e o fluoróforo.



Fonte: Johansson (2006) ⁶⁴

3.5 Processos fotofísicos

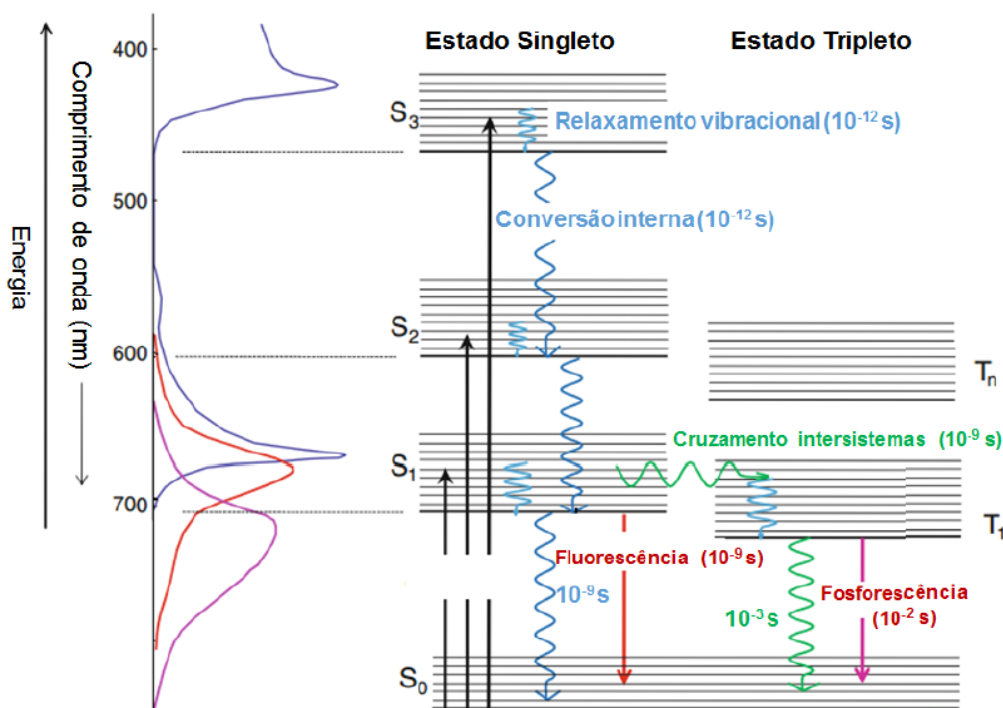
Os níveis de energia que ilustram os possíveis processos fotofísicos em uma molécula são exemplificados abaixo no diagrama de Jablonski, comumente utilizado para explicar os processos quânticos envolvidos na absorção e emissão da luz (Figura 11) ⁶⁵. Nele, os níveis de energia eletrônica são arranjados em ordem crescente, representados em retas horizontais e sobrepostos aos níveis de energia vibracional. As setas verticais correspondem às transições entre os níveis energéticos. Os estados eletrônicos singletos

64 JOHANSSON, Mary Katherine. Choosing reporter-quencher pairs for efficient quenching through formation of intramolecular dimers. In: **Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes**. Humana Press, 2006. p. 17-29.

65 ABDEL-KADER, Mahmoud H. **Photodynamic therapy**. Springer-Verlag Berlin An, 2016.

são representados pela letra S, sendo S_0 o estado eletrônico fundamental e S_1, S_2, S_n os estados eletrônicos excitados. Os estados tripleto são representados pela letra T.

Figura 11: Diagrama simplificado de Jablonski, representando seus processos e tempos de vida em níveis energéticos e vibracionais.



Fonte: Adaptado de Abdel-Kader, 2014.

Quando um elétron recebe quantidade suficiente de energia, o mesmo é promovido para um estado excitado mais energético ($S_0 \rightarrow S_1$). Esse estado excitado povoado pelo elétron é instável e a energia é dissipada através de diferentes processos de desativação, podendo ser radiativos ou não-radiativos ⁶⁶.

No processo de não-radiativo, a energia distribuída nos níveis excitados é preferencialmente perdida por conversão interna (setas em azul) ou por cruzamento intersistema (setas em verde). O decaimento por conversão interna ocorre em níveis de mesma multiplicidade de spin ($S_2 \rightarrow S_1$ ou $T_2 \rightarrow T_1$). Porém, a desativação também pode ocorrer entre estados de diferente multiplicidade de spin ($S_1 \rightarrow T_1$) se a energia entre os níveis for muito próxima. Nesse processo a energia é transferida por dissipação térmica, colisões com moléculas presentes na vizinhança ou convertida em mudanças geométricas da molécula ³⁸.

⁶⁶ HOLLAS, J. Michael. **Modern spectroscopy**. John Wiley & Sons, 2004.

Fluorescência e fosforescência são processos de desativação de estado excitado caracterizados por serem fotoluminescentes devido à radiação eletromagnética liberada durante a despovoação do nível excitado. No caso de o estado excitado de maior energia e o estado fundamental serem de mesma multiplicidade de spin ($S_1 \rightarrow S_0$), a transição eletrônica ocorre na faixa de tempos de vida curtos na ordem de 10^{-9} a 10^{-15} segundos, sendo este processo denominado como fluorescência. Já a fosforescência ocorre em faixas de tempos de vida mais elevados (10^{-6} a 1 segundo), visto que o estado excitado não tem mesma multiplicidades de spin do estado fundamental, ocasionando uma situação de menor energia passando do estado singleto excitado para um estado tripleto excitado antes que a molécula retorne ao seu estado fundamental ($S_1 \rightarrow T_1 \rightarrow S_0$)^{67,68}.

3.6 Fotofísica das porfirinas

Fotossensibilizadores (PS) como as porfirinas têm sido alvo de enorme interesse devido ao seu potencial uso em terapia fotodinâmica e/ou terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), devido à suas propriedades eletrônicas no estado excitado. O PS é foto-excitado pela luz visível para o estado excitado singleto que é eficientemente convertido através de um cruzamento intersistema para o estado excitado tripleto, onde pode seguir por dois caminhos: formação de espécies reativas por transferência elétrons (mecanismo do Tipo I) ou por transferência de energia (mecanismo do Tipo II), como pode ser observado na Figura 12. Estas propriedades eletrônicas e redox tornam as porfirinas e seus metalo-derivados compostos essenciais em importantes funcionalidades biológicas de transporte de elétrons, incluindo a fotossíntese e a respiração⁶⁹.

No caso do fotossensibilizador realizar cruzamento intersistema e estiver na presença de oxigênio molecular, ele poderá produzir espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas espécies correspondem a moléculas como ânion peróxido (O_2^{2-}), ânion hidroxila (OH^-), radicais superóxidos ($\bullet O_2^{2-}$) e hidroxila ($\bullet OH$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou oxigênio singleto (1O_2), as quais podem ser geradas via mecanismo do Tipo I ou do Tipo II.

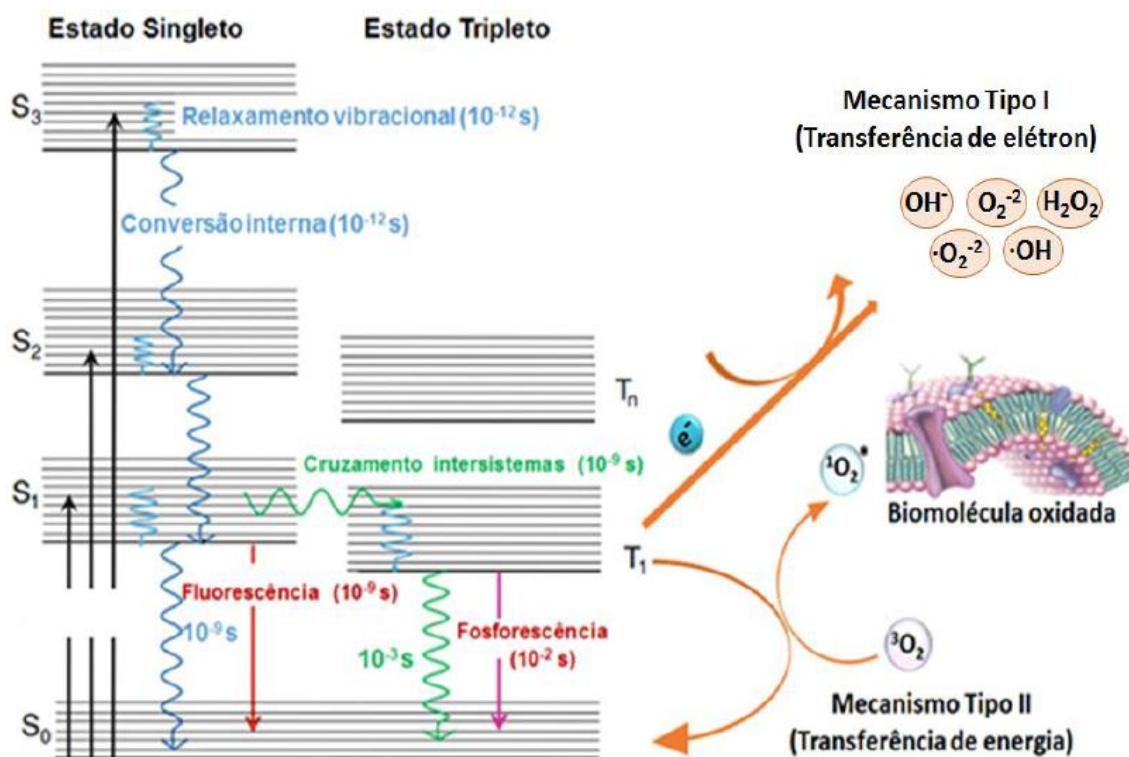
67 ROHATGI-MUKHERJEE, K. K. **Fundamentals of photochemistry**. New Age International, 1978.

68 ROHATGI-MUKHERJEE, K. K. **Fundamentals of photochemistry**. New Age International, 1978.

69 MACDONALD, Ian J.; DOUGHERTY, Thomas J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, n. 02, p. 105-129, 2001.

No mecanismo do Tipo I o PS no estado excitado tripleto pode interagir diretamente com um substrato e, a partir de uma transferência de elétrons, produzirá uma espécie oxidada (R^{+}) e o PS na forma reduzida (PS^{-}). As espécies radicalares produzidas podem reagir com o oxigênio molecular para formar EROS ⁷⁰. Já o mecanismo do Tipo II envolve processo de transferência de energia do PS para o O_2 molecular no estado excitado tripleto. O oxigênio molecular é excitado do seu estado tripleto para um estado excitado singleto ($^1\Delta_g$ de energia $95 \text{ kJ mol}^{-1} \rightarrow ^1\Sigma_g^-$ de energia 158 kJ mol^{-1}). Há relatos que ambos os mecanismos ocorrem de forma simultânea, no entanto o 1O_2 é relatado como produto majoritário ⁷¹.

Figura 12: Diagrama de energia simplificado para obtenção de ROS a partir dos mecanismos do Tipo I e II.



Fonte: Adaptado de Silva e colaboradores, 2015 ⁷².

70 DOLMANS, Dennis EJGJ; FUKUMURA, Dai; JAIN, Rakesh K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature reviews cancer**, v. 3, n. 5, p. 380, 2003.

71 MULLER, Paul J.; WILSON, Brian C. Photodynamic therapy for recurrent supratentorial gliomas. In: **Seminars in surgical oncology**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995. p. 346-354.

72 SILVA, Zenildo Santos et al. Animal models for photodynamic therapy (PDT). **Bioscience reports**, v. 35, n. 6, p. e00265, 2015.

Derivados de rutênio(II) têm sido amplamente estudados e apresentam significativa atividade biológica ⁷³. Isso pode ser devido à sua capacidade de se ligar fortemente ao DNA e às proteínas, à prevalência de dois estados principais de oxidação (2+ e 3+) e à propriedade de mimetizar derivados de ferro(II)/(III) quando ligados a moléculas biológicas ⁷⁴. Além disso, ambos os estados de oxidação comumente acessíveis das espécies de rutênio são de geometria octaédrica e relativamente inertes, como também, a química sintética é muito bem estabelecida. Nos últimos anos, o seu potencial terapêutico como agentes antimicrobianos e anticancerígenos tem sido demonstrado vantagens relacionadas aos efeitos colaterais mínimos e imunidade à resistência a drogas ⁷⁵.

73 YANG, Yanjing et al. Zwitterionic and cationic half-sandwich iridium (III) ruthenium (II) complexes bearing sulfonate groups: synthesis, characterization and their different biological activities. **Dalton Transactions**, v. 48, n. 10, p. 3193-3197, 2019.

74 CLARKE, Michael J.; ZHU, Fuchun; FRASCA, Dominic R. Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2511-2534, 1999.

75 SUN, Jing et al. Synthesis, Characterization, and Inducing Tumor Cell Apoptosis of Two Ru (II) Complexes Containing Guanidinium as Ligands. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 18, n. 1, p. 110-120, 2018.

Materiais e métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais gerais

A porfirina base-livre *meso*-tetra(4-piridil)porfirina (**H₂TPyP**) foi obtida comercialmente pela PorphyrChem[®] (Dijon, França) e utilizada sem nenhum tratamento prévio. O complexo *cis*-dihloro-bis-(2,2'-bipiridina)rutênio(II) foi sintetizado de acordo com a literatura⁷⁶. O acetato de zinco dihidratado foi obtido comercialmente pela Sigma-Aldrich[®].

4.2 Síntese das porfirinas tetra-rutenadas H₂RuTPyP e ZnRuTPyP

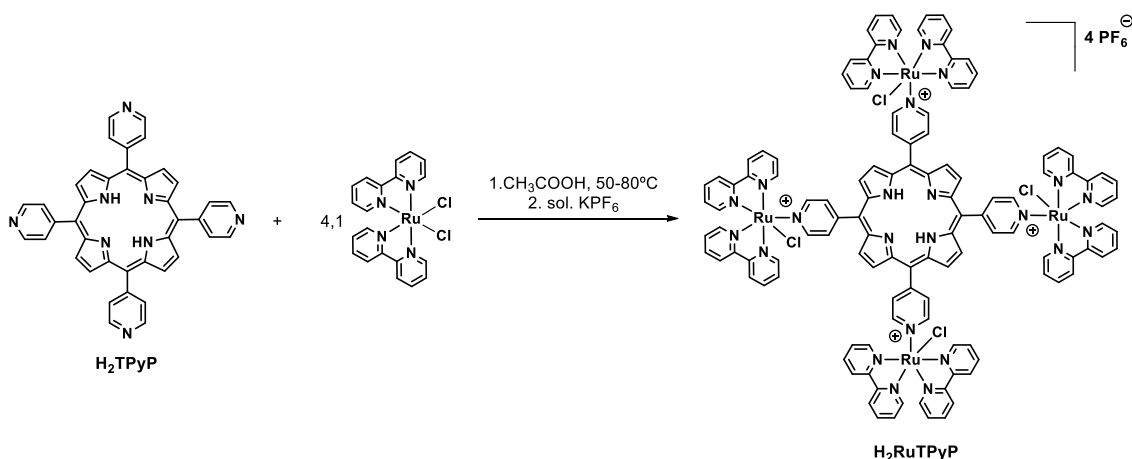
Porfirina base-livre **H₂RuTPyP**: primeiramente, em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 20 mg da *meso*-tetra(4-piridil)porfirina **H₂TPyP** (0,033 mmol; 1 equivalente). Após, 5 mL de ácido acético concentrado foram adicionados ao mesmo balão para a dissolução da porfirina, e em seguida, foi adicionado 61,99 mg do complexo [Ru(bpy)₂Cl₂] (0,128 mmol; 4,1 equivalentes). A reação foi realizada a temperatura de aquecimento na faixa de 50 – 80 °C e sob agitação constante durante um período de 4 h (Esquema 4). A reação de complexação dos derivados de [Ru(bpy)₂Cl₂] foi monitorada por UV-vis para acompanhar o surgimento da transição eletrônica próximo a 300 nm referente a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do complexo de rutênio(II)⁷⁷. A solução foi evaporada em um aparelho de rota-evaporação para remover o solvente e o produto foi isolado por precipitação pela adição de uma solução aquosa saturada de hexafluorofosfato de potássio (KPF₆). O sólido escuro final foi isolado por filtração em funil de vidro sinterizado e lavado com água deionizada, éter dietílico e seco dessecador sob vácuo. Rendimento: 98,50% (78,37 mg; 0,026 mmol). Análise Elementar: C₁₂₀H₉₀Cl₄F₂₄N₂₄P₄Ru₄•6H₂O, exp. (calc.): %C = 46.62 (46.46), %H = 3.35 (3.31), %N

76 ARAKI, K. *et al.*. Synthesis, electrochemistry, spectroscopy and photophysical properties of a series of *meso*-phenylpyridylporphyrins with one to four pyridyl rings coordinated to [Ru(bipy)₂Cl]⁺ groups. **J. Porphyrins Phthalocyanines** 2002. p. 33-42.

77 AKARI, k. *et al.* Synthesis, electrochemistry, spectroscopy and photophysical properties of a series of *meso*-phenylpyridylporphyrins with one to four pyridyl rings coordinated to [Ru (bipy) 2 Cl]⁺ groups. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 6, n. 01, p. 33-42, 2002.

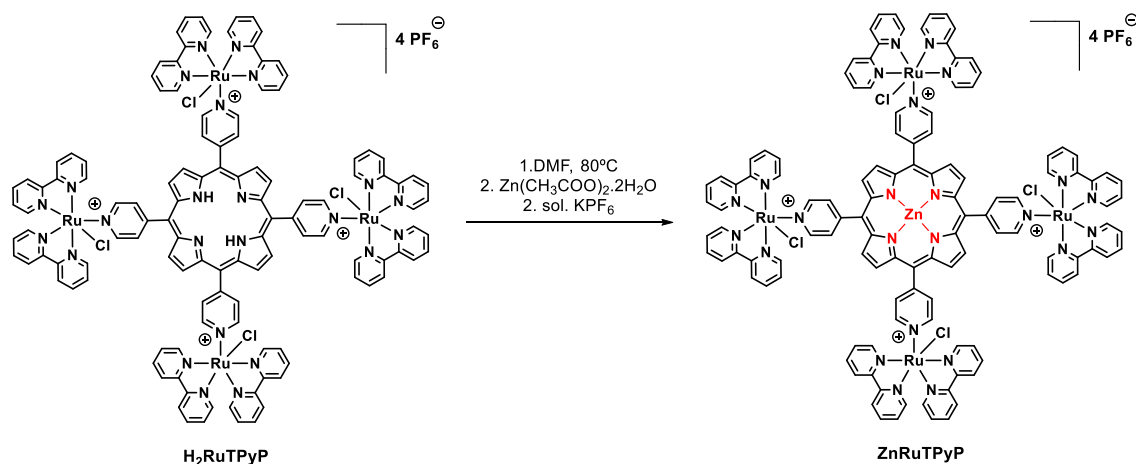
= 10.94 (10.84). HRMS-ESI(+) (m/z): 1067 $[M - 3Ru(bpy)_2Cl]^+$; 759 $[M - 2Ru(bpy)_2Cl]^+$ e 472 $[Ru(bpy)_2Cl + Na]^+$.

Esquema 4: Representação da rota sintética para obtenção da porfirina base-livre **H₂RuTPyP**.



Metaloporfirina de zinco(II) **ZnRuTPyP**: Para a reação de complexação de **H₂RuTPyP** com o íons zinco(II), 20 mg (0,065 mmol; 1 equivalente) de porfirina base-livre foi medida e transferida para um balão de fundo redondo de 50 mL e foram adicionados 5 mL de DMF. Após dissolução, 71 mg (0,325 mmol; 5 equivalentes) de acetato de zinco(II) dihidratado foram adicionados à esta solução. A reação foi aquecida a uma temperatura de 80 °C e agitação constante durante um tempo de 4 h (Esquema 5). Novamente, a reação foi monitorada via espectroscopia UV-vis (pelo desaparecimento de quatro bandas Q e o surgimento de apenas duas bandas Qs), confirmando a metalação. O DMF foi removido por evaporação e o produto foi precipitado com solução aquosa saturada de hexafluorofosfato de potássio (KPF₆). O sólido foi lavado com água e éter dietílico, isolado por filtração e seco dessecador sob vácuo. Rendimento: 96,05% (73 mg; 0,024 mmol). Análise Elementar: C₁₂₀H₈₈Cl₄F₂₄N₂₄P₄Ru₄Zn•8H₂O, exp. (calc.): %C = 45.23 (45.02), %H = 3.33 (3.27), %N = 10.60 (10.50). HRMS-ESI (m/z): 1130 $[M - 3Ru(bpy)_2Cl]^+$; 790 $[M - 2Ru(bpy)_2Cl]^+$ e 472 $[Ru(bpy)_2Cl + Na]^+$.

Esquema 5: Representação da rota sintética para obtenção da metaloporfirina de zinco(II) ZnRuTPyP.



4.3 Análise Elementar

A análise elementar de CHN% para as porfirinas foi realizada utilizando um equipamento Perkin Elmer CHN% 2400e na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). Todas as análises foram feitas em triplicata, utilizando em torno de 3 mg de cada composto (massa por medida).

4.5 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

As análises para obter os espectros na região do infravermelho foram realizadas através de um equipamento Bruker Tensor-27 Sample Compartment RT- DLa-TGS, janela espectral de 4.000 - 400 cm⁻¹, localizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. As amostras foram preparadas em pastilhas contendo 1% de composto e 99% de brometo de potássio (KBr), sendo as massas medidas em balança analítica.

4.6 Espectrometria de massas

Os espectros de massas de alta resolução dos compostos foram obtidos em um microTOF-QII (Bruker Daltonics, Billerica, MA), com ionização por electrospray (ESI),

no modo positivo, no CEBIME – Universidade Federal de Santa Catarina. Os espectros de massa foram registrados com soluções metanólicas de cerca de 500 ppb de concentração com um fluxo de 180 $\mu\text{L}/\text{min}$ e capilaridade de 4000 V.

4.7 Espectroscopia de absorção na região do UV-vis

Os espectros de absorção foram registrados usando um espectrofotômetro de feixe duplo Shimadzu UV-2600 (faixa de absorção de 250 a 900 nm) localizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. As soluções foram feitas em concentrações na faixa de 10^{-4} a 10^{-6} mol L^{-1} . Os valores de coeficientes de absorção molar (ϵ , em $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) foram obtidos usando a relação de Lambert-Beer $A = \epsilon c \ell$, onde A é a absorbância, c a concentração molar e ℓ o comprimento do caminho óptico. Em um gráfico de $A \times c$, ϵ é dado pelo produto entre a inclinação da curva *versus* $1 / \ell$.

4.8 Estudo de agregação das porfirinas

Os estudos de agregação das porfirinas foram feitos em um espectrofotômetro UV-vis 2600 Shimadzu, localizado na Universidade Federal de Santa Maria. Os espectros de absorção UV-vis foram medidos em função da concentração usando uma mistura de DMSO(2%)/Tampão Tris-HCl pH 7,4 como solvente, em concentrações variadas de 1.0 μM a 22.0 μM de cada porfirina. As mudanças nos λ_{max} das bandas de transição foram monitoradas.

4.9 Ensaios de fotoestabilidade

A fotoestabilidade dos derivados Ru^{II} foi determinada medindo a absorbância para as porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** na banda Soret antes e depois da irradiação com luz branca (400 – 800 nm) a uma taxa de fluência de 50 mW cm^{-2} (dose de aproximadamente 90 J cm^{-2}) pelo tempo total de 60 min.

4.10 Rendimento quântico de oxigênio singlete e número de fótons absorvidos

O valor do rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) foi obtido pelo método espectrofotométrico, utilizando o ácido úrico (AU) como supressor químico. As soluções foram preparadas usando porfirinas em três concentrações (1,0 μM , 2,0 μM e 3,0 μM), enquanto o AU permaneceu em concentração fixa (80 μM). Para cada concentração de porfirina, as amostras contendo porfirina e AU foram adicionadas a uma cubeta e iluminadas por um laser monocromático na região do verde ($\lambda = 532 \text{ nm}$) com uma potência de 50 mW, sob agitação constante. A geração de oxigênio singlete foi quantificada pela fotodegradação do AU monitorando a redução da banda de absorção do AU próximo a 293 nm em função do tempo de irradiação. Os valores de Φ_{Δ} são obtidos por relação à Equação 1:

Equação 1: Equação para determinar o valor do rendimento quântico de oxigênio singlete.

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^0 \frac{\gamma_{\Delta}}{\gamma_{\Delta}^0}$$

Em que os rótulos sobrescritos “0” são os parâmetros para o fotossensibilizador padrão e γ_{Δ} é a eficiência da formação de oxigênio singlete definida pela Equação 2:

Equação 2: Equação para determinar valor referente à eficiência da formação de oxigênio singlete.

$$\gamma_{\Delta} \propto \frac{k}{n_{\text{abs}}}$$

Sendo k a taxa de degradação do supressor AU e n_{abs} é o número de fótons absorvidos por segundo pelo PS. Para uma fonte de luz branca, os n_{abs} podem ser obtidos pela Equação 3.

Equação 3: Equação para determinar o número de fótons absorvidos por segundo pelo OS.

$$n_{\text{abs}} = \frac{1}{hc} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} (1 - 10^{-A(\lambda)}) P(\lambda) d\lambda$$

Onde h é a constante de Planck ($J s^{-1}$), c é a velocidade da luz, $A(\lambda)$ é a absorvância do PS e $P(\lambda)$ a potência incidente da fonte de luz. A partir do número de fótons absorvidos, podemos definir o rendimento quântico da formação de oxigênio singlete pela razão entre o fluxo de moléculas de 1O_2 produzidas ($n_{^1O_2}$) e o fluxo de fótons absorvido por uma molécula fotossensível (n_{abs}) pela Equação 4:

Equação 4: Equação para determinar o rendimento quântico da formação de oxigênio singlete.

$$\Phi_{\Delta} = \frac{n_{^1O_2}}{n_{abs}}$$

4.11 Espectroscopia por ressonância eletrônica paramagnética (EPR)

Medidas de EPR foram realizadas em um espectrômetro Bruker EMX Plus. Os espectros foram adquiridos usando as seguintes configurações do instrumento: frequência de micro-ondas de 9,83 GHz; potência de micro-ondas de 20 mW; frequência de modulação de 100 kHz; amplitude de modulação de 0,5 G; varredura de campo magnético de 60 G; tempo de varredura de 168 s e temperatura da amostra a 25 °C.

Alíquotas de uma solução estoque de 10 mM das porfirinas em DMSO foram usadas para preparar as amostras para irradiação com uma lâmpada de halogênio de 500 W, emitindo na região do visível (470-750 nm). Para evitar o aquecimento da amostra, a luz foi passada através de um filtro de água espesso. As amostras foram preparadas para um volume de 150 μ L (misturas de água/DMSO) contendo 100 μ M da porfirina e 25 mM de 2,2,6,6-tetra(metil)piperidina (TEMP) ou 75 mM de 5,5-dimetilpirrolina-*N*-óxido (DMPO) ou 55 mM de α -fenil-*N*-*terc*-butil nitrona (PBN). A armadilha de spin DMPO foi purificada com carvão ativado e assim foi inicialmente diluído em água. Os demais reagentes foram utilizados sem prévia purificação. Para as amostras das porfirinas de Ru^{II} em DMSO, um mínimo de 2% de água foi adicionado para a introdução de DMPO. As amostras foram irradiadas em tubos de vidro, incluindo as amostras controle sem porfirina, e alíquotas de 30 μ L foram coletadas nos períodos de irradiação de 0, 25 e 50 min com tubos capilares. O tubo capilar (1 mm de diâmetro interno) foi selado usando uma chama e logo após a medição do EPR foi realizada.

4.11 Ensaios de interação das porfirinas de Ru^{II} com DNA

4.11.1 Titulação espectrofotométrica de absorção na região do UV-vis

Os ensaios de interação DNA–porfirina foram realizados por meio de medidas de espectro de absorção UV-vis à temperatura ambiente. A concentração de CT-DNA foi determinada por espectroscopia UV-vis usando $13.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como coeficiente de absorvidade molar (por par de bases) em $\lambda = 260 \text{ nm}$. A porfirina ($1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$) em solução tampão DMSO(2%)/Tris-HCl (pH 7,4) foi titulada com quantidades crescentes de CT-DNA (de 0 a $190 \mu\text{M}$) com a gama de aquisição de espectros de absorção de 250-800 nm. As constantes de ligação intrínseca (K_b) dos compostos **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** foram calculadas de acordo com o decaimento da banda de absorção Soret usando a Equação 5 através de um gráfico de $[\text{DNA}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ em função do $[\text{DNA}]$:

Equação 5: Equação para determinação da constante intrínseca de ligação K_b .

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

onde $[\text{DNA}]$ é a concentração de CT-DNA nos pares de bases, ϵ_a é o coeficiente de absorvidade ($\text{Abs}/[\text{porfirina}]$), e ϵ_b e ϵ_f são os coeficientes de absorvidade das formas livre e totalmente ligada, respectivamente. Nas parcelas de $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ em função do $[\text{DNA}]$ K_b é dado pela razão entre o coeficiente angular e o coeficiente linear da equação da reta.

4.11.2 Espectroscopia por dicroísmo circular com CT-DNA

As análises por dicroísmo circular (CD) foram realizadas em um espectrofotômetro Jasco J-815 com o acessório PDF-425S/15 Peltier. Devido à baixa solubilidade da **H₂TPyP** (tetra-piridil base-livre) na mistura de solução tampão $\text{CH}_3\text{CN}(2\%)/\text{Tris-HCl}$ pH 7,4, não foi possível realizar a caracterização espectroscópica para esta molécula. Os ensaios foram realizados utilizando uma cubeta de quartzo de 2,0 mm a temperatura de 37°C na faixa de varredura de 220–520 nm. A solução padrão de

CT-DNA foi titulada com quantidades crescentes de porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**.

4.11.3 Ensaios de competição das porfirinas com EB-DNA, DAPI-DNA e MG-DNA por espectroscopia de emissão

Nos testes de competição das porfirinas com CT-DNA, a análise emissão de fluorescência no estado estacionário foi registrada e os derivados foram dissolvidos em solução estoque de DMSO ($2,0 \times 10^{-6}$ M). Estudos competitivos foram realizados através da adição gradual da solução estoque das porfirinas de Ru^{II} à cubeta de quartzo (caminho óptico de 1,0 cm) contendo brometo de etídio (EB, $2,0 \times 10^{-7}$ M; intercalante), 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, $2,0 \times 10^{-7}$ M; bloqueador de sulco menor) ou verde de metila (MG, $2,0 \times 10^{-7}$ M; bloqueador de sulco maior) e ct-DNA ($2,0 \times 10^{-6}$ M) numa solução tampão Tris-HCl pH 7,4. A concentração de derivados variou de 0 a 10 µM. As amostras foram excitadas na respectiva faixa de absorção dos corantes (EB – $\lambda_{exc} = 510$ nm; DAPI - $\lambda_{exc} = 360$ nm e MG - $\lambda_{exc} = 630$ nm) e os espectros de emissão foram registrados na faixa de comprimento de onda apropriada para cada corante, 5 min após cada adição da solução contendo a porfirina, a fim de permitir a incubação ocorra. As constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}) dos compostos foram calculadas de acordo com o decaimento das bandas de emissão do corante-DNA usando a seguinte Equação 6, através de um gráfico de F_0/F versus [DNA],

Equação 6: Equação para determinação das constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV})

$$\frac{F_0}{F} = \frac{1}{1 - k_q \tau_0 [Q]} = 1 + K_{SV}[Q]$$

Onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença da porfirina, respectivamente. K_{SV} , k_q , τ_0 e $[Q]$ representam a constante de supressão de Stern-Volmer, constante cinética de supressão, tempo de vida dos adutos EB-DNA (23,0

$\times 10^{-9}$ s)⁷⁸, DAPI-DNA ($2,20 \times 10^{-9}$ s)⁷⁹, MG-DNA ($2,8 \times 10^{-9}$ s)⁸⁰ e a concentração do supressor, respectivamente. De acordo com a Equação 6, as constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) foram calculadas a partir da inclinação da reta e os valores de k_q foram obtidos através da razão K_{SV}/τ_0 .

4.11.4 Docking molecular das porfirinas com CT-DNA

As análises teóricas por *docking* molecular foram conduzidas na Universidade Rural do Rio de Janeiro, sob a supervisão do Prof. Otávio A. Chaves. Estruturas moleculares para **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** foram construídas e minimizadas com a Teoria Funcional de Densidade (DFT), método Becke-3-Lee Yang Parr (B3LYP) com base 6-31G *, disponível no programa Spartan'14 (Wavefunction, Inc., Irvine, CA, EUA). A estrutura cristalográfica do DNA foi obtida a partir do Protein Data Bank, com código de acesso 1BNA⁸¹. O acoplamento molecular foi realizado com o programa GOLD 5.2 (Cambridge Crystallographic Data Center, Cambridge, Reino Unido)⁸², com um raio de 7,0 Å na dupla hélice do DNA, e a função de pontuação padrão "*ChemPLP*". O número de operações genéticas (cruzamento, migração, mutação) em cada corrida de ancoragem usada no procedimento de pesquisa foi definido como 100.000. Os átomos de hidrogênio foram incluídos na estrutura do DNA de acordo com os dados inferidos pelo programa GOLD 5.2 sobre estados de ionização e tautoméricos. Os valores para a melhor posição de encaixe para cada ligante – o maior valor de pontuação de encaixe – foram gerados

78 HELLER, Dennis P.; GREENSTOCK, Clive L. Fluorescence lifetime analysis of DNA intercalated ethidium bromide and quenching by free dye. **Biophysical chemistry**, v. 50, n. 3, p. 305-312, 1994.

79 ESTANDARTE, Ana Katrina et al. The use of DAPI fluorescence lifetime imaging for investigating chromatin condensation in human chromosomes. **Scientific reports**, v. 6, p. 31417, 2016.

80 SAHAR, Elhanan; LATT, Samuel A. Energy transfer and binding competition between dyes used to enhance staining differentiation in metaphase chromosomes. **Chromosoma**, v. 79, n. 1, p. 1-28, 1980.

81 DREW, Horace R. et al. Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 4, p. 2179-2183, 1981.

82 GOLD, The Cambridge Crystallographic Data Center. CCDC. Disponível em: <<http://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/>>. Acesso em janeiro de 2019.

com o nível 1 do sistema PyMOL Molecular Graphics 1.0 (Delano Scientific LLC, Palo Alto, CA, EUA) ⁸³.

4.12 Ensaios de interação das porfirinas de Ru^{II} com albumina humana (HSA)

Para estes experimentos, todos os espectros foram registrados com correções de filtro apropriadas para as amostras. Os espectros de UV-vis para **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** (13,2 μM) foram registrados na faixa de 200-700 nm, em solução tampão de PBS à 37 °C. Para medições de fluorescência em estado estacionário (290-450 nm e λ_{exc} = 280 nm em 23 °C, 30 °C e 37 °C), alíquotas sucessivas de cada derivado de porfirina de uma solução estoque (1,00 mM, em acetonitrila) foram adicionadas a 3,0 mL de solução de HSA (10 μM em PBS), levando a uma concentração final de porfirina de: 1,7 , 3,3, 5,0, 6,6, 8,3, 9,9, 11,5 e 13,2 μM, respectivamente. Os dados de fluorescência em estado estacionário foram analisados no comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência do HSA (λ_{exc} = 340 nm). Todas as temperaturas foram convertidas para a escala de Kelvin nas equações.

Como cada derivado de porfirina mostrou absorção significativa nos comprimentos de onda de excitação e emissão (280 e 340 nm, respectivamente), a correção do filtro interno foi aplicada aos dados de fluorescência no estado estacionário, de acordo com a Equação 7:

Equação 7: Equação para a correção do filtro interno aplicada aos dados de fluorescência no estado estacionário

$$F_{cor} = F_{obs} 10^{[(A_{ex}+A_{em})/2]}$$

onde F_{cor} e F_{obs} são os valores de intensidade de fluorescência corrigidos e observados, respectivamente. A_{ex} é o valor de absorbância para o ligante na excitação (λ_{exc}. = 280 nm, ε = 109.477 e 81.212 M⁻¹ cm⁻¹ em solução PBS para **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**, respectivamente), e A_{em} corresponde ao comprimento de onda de emissão (λ_{exc}. = 340

nm, $\epsilon = 31.586$ e $20.103 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em solução de PBS para **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**, respectivamente).

4.12.1 Medidas de tempo de vida das porfirinas de Ru^{II} com albumina humana (HSA)

Decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo usando $10 \text{ }\mu\text{M}$ de HSA ($3,0 \text{ mL}$ em PBS) foram medidos na ausência e na presença da **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**, na concentração máxima de cada porfirina utilizada nas medições de fluorescência em estado estacionário descrito acima ($13,2 \text{ }\mu\text{M}$). Os valores de tempos de vida de fluorescência foram analisados utilizando o espectrofluorímetro modelo FL920 CD da Edinburgh Instruments, equipado com um laser EPL ($\lambda_{\text{exc.}} = 280 \pm 10 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$; largura de pulso = 850 ps e energia por pulso = $1,8 \text{ }\mu\text{W}$).

4.12.2 Ensaio de competição das porfirinas de Ru^{II} com as subunidades da albumina humana (HSA)

Estudos de ligação competitiva foram realizados na presença de três marcadores (de forma independente) de subunidades (varfarina, ibuprofeno ou digitoxina) no mesmo fluorímetro e nas mesmas condições já descritas para as medidas de fluorescência no estado estacionário. A $3,0 \text{ mL}$ de uma solução de HSA ($10 \text{ }\mu\text{M}$, em PBS) foram adicionados cada marcador de subunidade na proporção de HSA:marcador (1:1). Alíquotas sucessivas de uma solução estoque de cada derivado de Ru^{II}-porfirina ($1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$, em acetonitrila) foram adicionadas, levando a uma concentração final de porfirina variando de $1,7$ a $13,2 \text{ }\mu\text{M}$. A temperatura utilizada neste experimento foi de $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.12.3 Espectroscopia por dicroísmo circular com albumina humana (HSA)

Os espectros de dicroísmo circular (CD) foram registrados na faixa de $200\text{-}260 \text{ nm}$ para solução de HSA ($1,00 \text{ }\mu\text{M}$) na ausência e na presença da concentração mínima e máxima de porfirina usada nas medições de fluorescência em estado estacionário ($1,7$ e $13,2 \text{ }\mu\text{M}$, respectivamente) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.12.4 Docking molecular com albumina humana (HSA)

A estrutura cristalográfica do HSA foi obtida do Banco de Dados de Proteína (PDB código 1N5U). As estruturas das porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** foram construídas e minimizadas em energia pela Teoria Funcional de Densidade (DFT), método Becke-3-Lee Yang Parr (B3LYP) com padrão 6-31G *, disponível no programa Spartan'14 (*Wavefunction, Inc.*). A ancoragem molecular foi realizada com o programa GOLD 5.2 (CCDC) previamente descrito.

A fim de avaliar a melhor função de pontuação que será utilizada no *docking* molecular (ChemPLP, GoldScore, ChemScore ou ASP), os estudos de re-docking foram realizados com protoporfirina IX dentro do sítio de ligação do HSA (1N5U). O Desvio Quadrático Médio da Raiz (RMSD) foi obtido para ChemPLP, GoldScore, ChemScore e ASP foi de 0,747, 1,190, 0,985 e 1,649, respectivamente. Como a função *ChemPLP* forneceu o menor valor de RMSD, é uma indicação clara de que o *ChemPLP* é a melhor função de pontuação a ser usada nos estudos de ancoragem molecular. Os números para a melhor posição de encaixe para cada ligante - o maior valor de pontuação de encaixe - foram gerados com o programa PyMOL Delano Scientific LLC.

Discussão dos resultados

5. Discussão dos resultados

5.1. Análise elementar (CHN%) e espectrometria de massas de alta resolução

De maneira geral, os dados obtidos das análises elementares para os compostos desse trabalho estão satisfatórios (dentro do erro de 0,5%) e de acordo com a pureza e fórmula molecular proposta (ver parte experimental). Nota-se que as porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** apresentam águas de hidratação.

Com relação à espectrometria de massas por ionização em eletrospray, as porfirinas tetra-rutenadas apresentaram em ambos os casos nos espectros de massas picos característicos do tipo $[M - 3Ru(bpy)_2Cl]^+$ e $[Ru(bpy)_2Cl + Na]^+$. Estes fragmentos são característicos das moléculas, de perdas de complexos de rutênio(II) durante a ionização, fazendo com que sejam estes os mais estáveis. Os espectros de HRMS-ESI(+) estão presentes na seção Anexo desta dissertação.

5.2 Espectroscopia de absorção na região do UV-vis

De maneira geral, porfirinas tetra-rutenadas apresentam um perfil característico nos espectros de absorção eletrônica que consiste num conjunto de bandas na faixa de 290 – 700 nm. A transição eletrônica próxima a 296 nm é atribuída a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ localizadas nos ligantes bipyridina (bpy) coordenados ao íon rutênio(II). A transição eletrônica próxima a 350 nm (ombro) e a banda sobreposta na região de 500-510 nm foram atribuídas a uma transição de campo ligante e que envolve os orbitais *d* do Ru^{II} aos orbitais $\pi\pi^*$ do ligante bpy (LMCT e MLCT, respectivamente). Observa-se, também, uma banda de transição eletrônica de grande intensidade em torno de 420 nm, a qual é atribuída a aromaticidade do anel porfirínico e chamada de banda Soret (ou banda B), visto que estas conjugações promovem transições de natureza $\pi \rightarrow \pi^*$.

Apesar de suas semelhanças, nota-se que houve diminuições nas bandas Q (de duas para quatro transições observadas) na porfirina **ZnRuTPyP**. Esta interpretação é consistente com a coordenação do íon Zn^{II}, onde o íon metálico apresenta uma configuração eletrônica de camada completa (d^{10}), não havendo, portanto, variação de energia envolvendo as transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, ocasionando aumento de simetria local

de D_{2h} para D_{4h} . Esta discussão já é bem concisa na literatura^{87, 84}. Os espectros de absorção na região do UV-vis podem ser observados na Figura 13 para **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**, respectivamente e os valores específicos de comprimento de onda referente a cada máxima da banda de transição eletrônica podem ser observados na Tabela 1.

Figura 13: Espectro de absorção na região do UV-vis a) **H₂RuTPyP** e b) **ZnRuTPyP**. A inserção mostra o comportamento linear da absorbância em 418 e 504 nm para **H₂RuTPyP** e 430 e 563 nm para **ZnRuTPyP** em função da concentração utilizados para calcular o coeficiente de absorvidade molar.

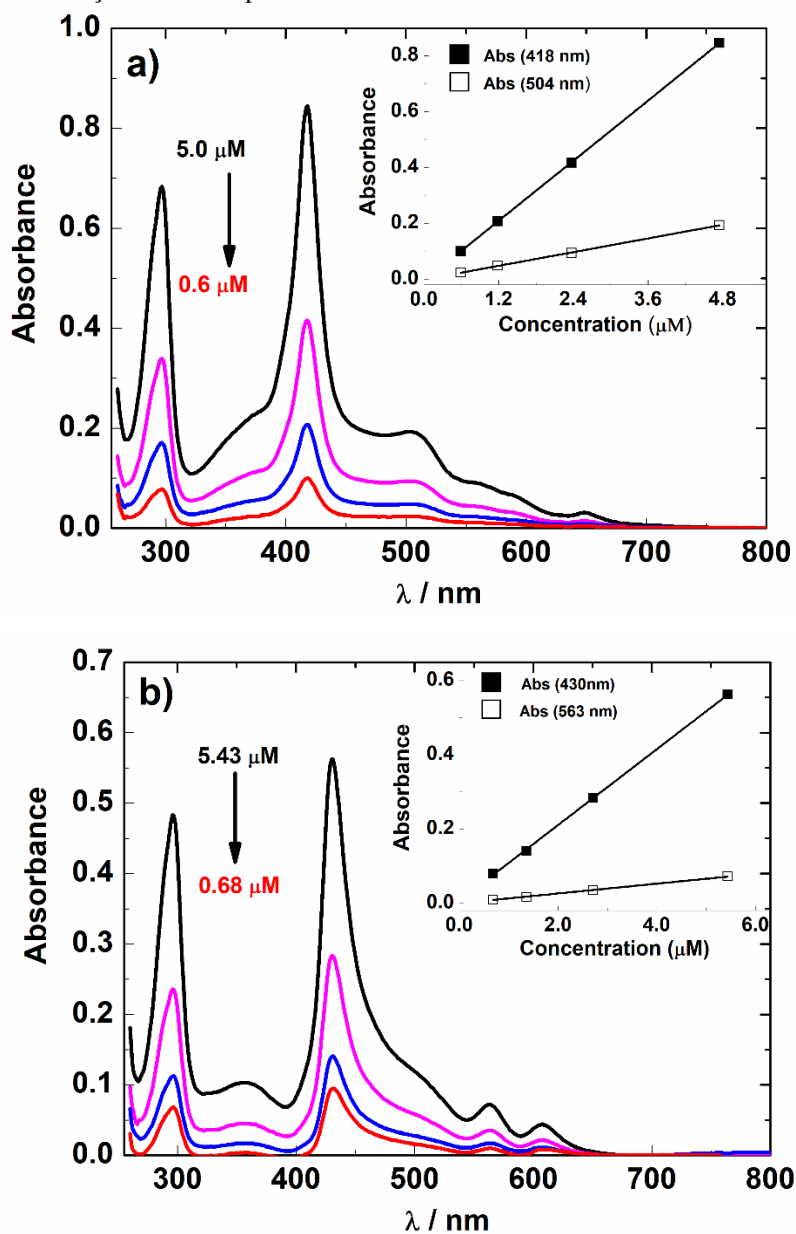


Tabela 1: Transições eletrônicas das porfirinas estudadas, em nm, observadas em seus respectivos espectros de absorção na região do UV-vis.

Transição eletrônica	$\epsilon; 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} (\lambda/\text{nm})$	
	H₂RuTPyP	ZnRuTPyP
$\pi \rightarrow \pi^*$	1.44 (297)	8.71 (296)
Soret	1.79 (418)	1.02 (430)
MLCT	502*	510*
Q _x (0-1)	4.08 (504)	1.32 (563)
Q _x (0-0)	3.22 (558)	1.21 (614)
Q _y (0-1)	3.19 (586)	---
Q _y (0-0)	2.96 (654)	---

*Ombro;

5.3 Ensaio de agregação em solução das porfirinas tetra-rutenadas

Porfirinas com porções volumosas de substituintes em uma orientação perpendicular à estrutura do núcleo são, geralmente, impedidas de interação de empilhamento π , evitando, portanto, a agregação em solução. Moléculas que tendem a agregação tendem a diminuir sua superfície de contato devido à formação dos aglomerados. Como consequência, a capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio pode ser menor⁸⁵. Com o intuito de avaliar o comportamento em solução das porfirinas tetra-rutenadas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**, foi realizado um estudo por espectroscopia na região do UV-vis em solução de DMSO(2%) tamponado com Tris-HCl pH 7,4 (Figura 14 e 15).

Para ambas as porfirinas contendo Ru^{II}, foi possível observar um aumento linear sem deslocamento significativo nos espectros de absorção em função da variação da concentração de 1,0 a 22 μM . Além disso, os espectros não exibiram alargamentos das bandas ou surgimento de novas transições. Estas observações indicam que não há agregação destas porfirinas nesta mistura de solventes.

Figura 14: Espectro de absorção na região do UV-vis para as titulações realizadas na faixa de 1,0 μM – 22,0 μM para **H₂RuTPyP** em solução de DMSO(2%)/Tris-HCl pH 7,4. A inserção mostra o comportamento linear da absorbância em 420 nm em função da concentração.

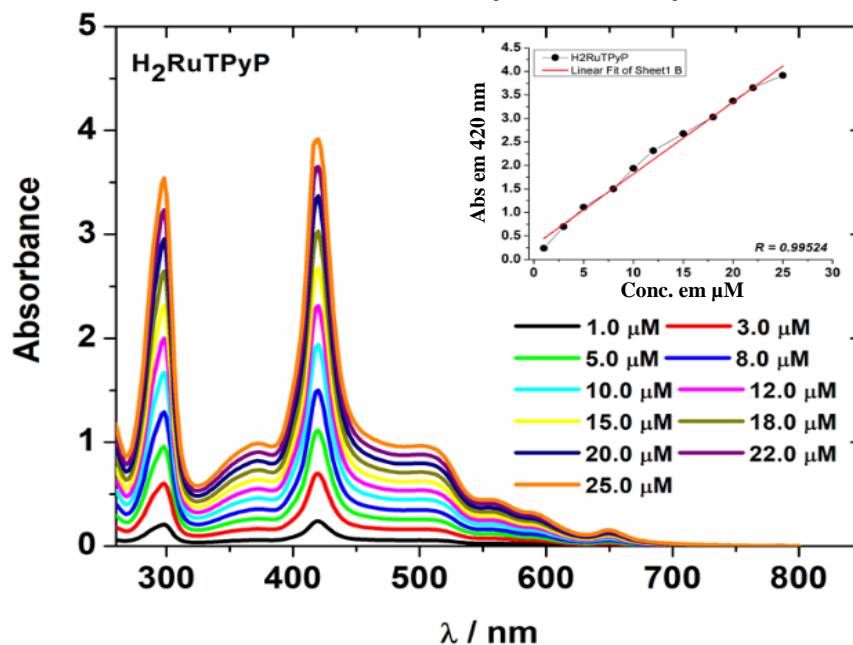
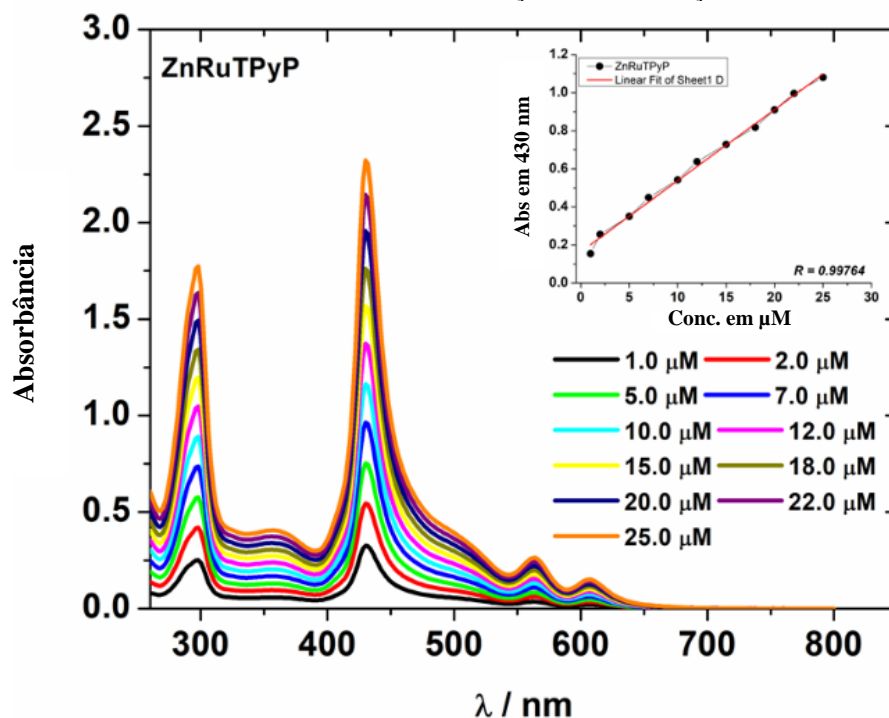


Figura 15: Espectro de absorção na região do UV-vis para as titulações realizadas na faixa de 1,0 μM – 22,0 μM para **ZnRuTPyP** em solução de DMSO(2%)/Tris-HCl pH 7,4. A inserção mostra o comportamento linear da absorbância em 430 nm em função da concentração.



5.4 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Porfirinas apresentam padrão de absorção bem complexo e de difícil interpretação na região do infravermelho. Uma porfirina sem substituintes possui aproximadamente 105 modos vibracionais nesta região espectral, as quais podem ser associadas a deformações estruturais simétricas e assimétricas do anel, vibrações de átomos do elemento químico hidrogênio ligados ao carbono (CH) e nitrogênio (NH) e, no caso de porfirinas com substituintes piridil, distorções destes grupos para fora do plano do anel⁸⁶. A Tabela 2 mostra os principais estiramentos e deformações (cm^{-1}) obtidos no espectro de absorção no infravermelho para **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**, respectivamente.

As bandas correspondentes à bipyridina coordenadas ao Ru^{II}, bem como os grupos piridil da porfirina, não são visíveis na janela espectral utilizada ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$). Desta forma, é possível observar os estiramentos $\nu_{\text{C-H}}$ em números de onda próximos a 3060 cm^{-1} . Na faixa de $1600 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ observa-se bandas de deformação atribuídas a $\delta_{\text{C=C}}$ e $\delta_{\text{C=N}}$. Entre $900 - 700 \text{ cm}^{-1}$ são apresentadas as bandas de deformação $\delta_{\text{C-H}}$ (Espectros na região do IR estão em anexo, ítem 8.1 e 8.2).

Tabela 2: Principais estiramentos e deformações em número de onda (cm^{-1}) para as porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**.

Bandas	H ₂ RuTPyP	ZnRuTPyP
$\nu_{\text{C-H}}$	3073	3442
$\nu_{\text{C=C}}$	1603	1604
$\delta_{\text{C-H}}$	557, 763 e 841	557, 763 e 841
$\delta_{\text{C=N}}$	1419	1416

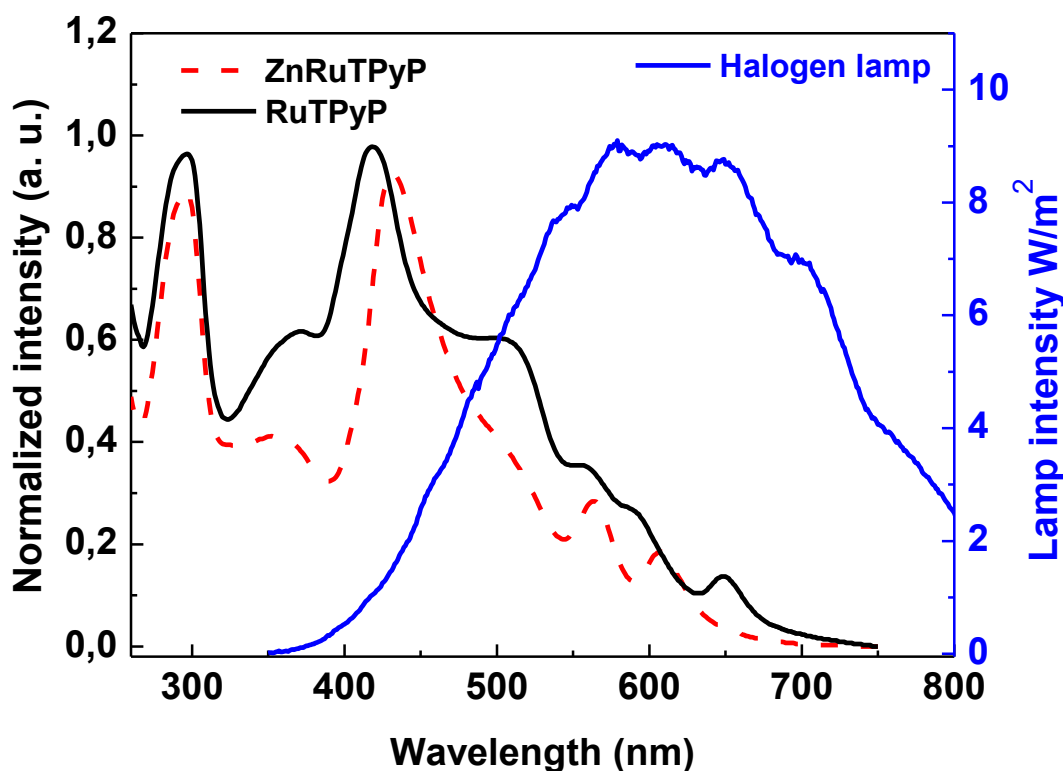
5.5 Determinação do número de fótons absorvidos (n_{abs})

O primeiro passo para um processo fotodinâmico ser eficiente consiste na absorção da radiação eletromagnética pelo fotosensibilizador. Sendo assim, é importante que o PS apresente alto coeficiente de absorvidade molar e que seu espectro de absorção se sobreponha à emissão da fonte de irradiação utilizada no experimento. Este efeito pode ser quantificado pelo número de fótons absorvidos. A Figura 16 mostra a intensidade

⁸⁶ NAUE, Jeferson André. **Química supramolecular de tetrapiridilporfirinas associadas a complexos de platina (II)**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

absorvida das porfirinas aqui estudadas e a intensidade de emissão da lâmpada usada para irradiação. Para as porfirinas tetra-rutenadas, os valores obtidos para o número de fótons absorvidos foram de $3,0 \times 10^{15} \text{ s}^{-1}$ para a porfirina base-livre **H₂RuTPyP** e de $2,4 \times 10^{15} \text{ s}^{-1}$ para a metalo-porfirina de zinco(II) **ZnRuTPyP**, respectivamente.

Figura 16: Sobreposição dos espectros na região do UV-vis utilizados para determinar o número de fótons absorvidos pelas porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**.



5.6 Fotoestabilidade e geração de espécies reativas de oxigênio das porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**

A fotoestabilidade e a capacidade dos compostos de Ru^{II} (**H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**) de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) no processo de foto-oxidação foram determinadas para avaliar seu potencial como um fotossensibilizador. A fotoestabilidade das porfirinas estudadas foi medida através do decaimento na absorvância das bandas correspondentes a banda Soret na faixa visível ($\lambda =$ intervalo de 400 – 800 nm) após diferentes tempos de irradiação de luz branca a uma taxa de fluência de 50 mW cm^{-2} (dose de irradiação de 90 J cm^{-2}) por 60 min. Conforme observado nos espectros e gráficos abaixo, os compostos se apresentaram bastante foto-estáveis durante

o período de irradiação (60 min; Figura 17 e 18), no entanto, o complexo **ZnRuTPyP** parece ser mais suscetível à foto-degradação. Este efeito pode ser atribuído a sua maior capacidade de gerar mais espécies reativas de oxigênio.

Figura 17: Gráfico comparativo dos ensaios de foto-estabilidade por espectroscopia na região UV-vis da **H₂RuTPyP** em preto e **ZnRuTPyP** em vermelho. A foto-estabilidade foi monitorada pelo decréscimo da banda Soret.

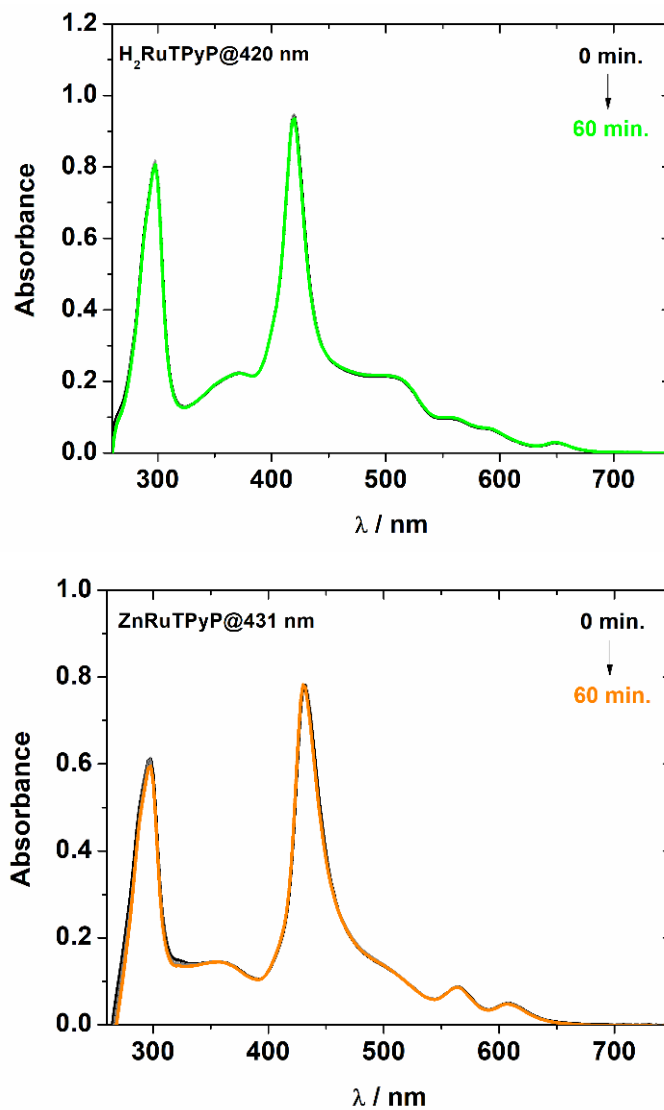
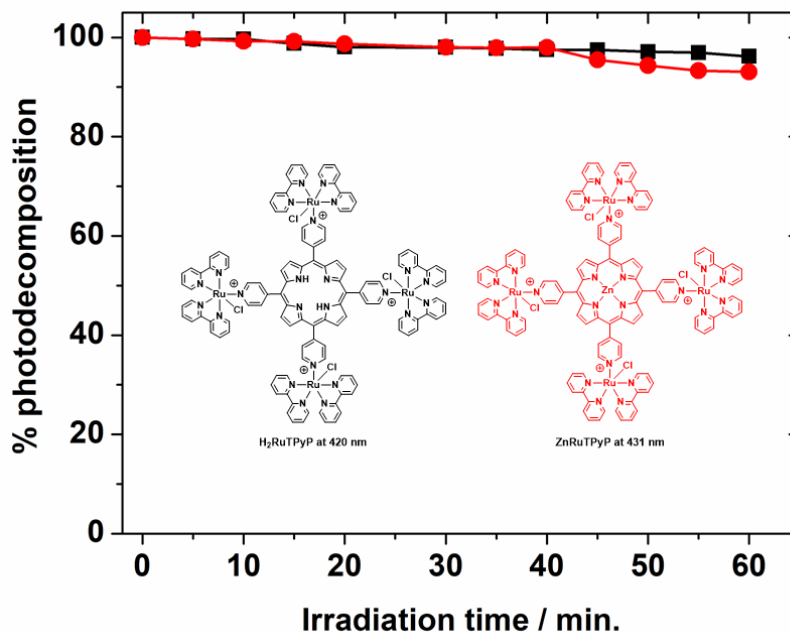


Figura 18: Gráfico comparativo dos ensaios de foto-estabilidade por espectroscopia na região UV-vis da **H₂RuTPyP** em preto e **ZnRuTPyP** em vermelho. A foto-estabilidade foi monitorada pelo decréscimo da banda Soret (continuação).



Para a quantificação de geração de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) foi realizado o experimento de foto-degradação do ácido úrico (AU - *supressor de oxigênio singlete*). A título de exemplo, a Figura 19a exibe o espectro de absorção da **H₂RuTPyP** sobreposta ao espectro de emissão de laser verde ($\lambda = 532$ nm) e as alterações dos espectros de absorção de UA devido à geração de oxigênio singlete. A Figura 19 evidencia a degradação da UA (transição em 293 nm, em cinza) como função de tempo de irradiação para as três concentrações de porfirina (1,0 μ M, 2,0 μ M e 4,0 μ M). As constantes de foto-degradação (k) são obtidas pela inclinação da reta na Figura 18b e expressas na Tabela 3. O aumento do k é proporcional ao aumento da concentração da porfirina. Para obter a eficiência da formação de oxigênio singlete, os valores de k para cada concentração de porfirina são observados em função do número de fótons absorvidos (Figura 16). Este mesmo procedimento foi realizado para a porfirina **ZnRuTPyP** e para a porfirina **TPP** como padrão ($\Phi_{\Delta} = 0,52$), e os resultados são apresentados na Tabela 3.

Figura 19: Sobreposição dos espectros na região do UV-vis. Em cinza tem-se o espectro da foto-degradação do ácido úrico na presença da **H₂RuTPyP** (4 μ M). Os gráficos inseridos correspondem as constantes de foto-degradação o UA para as concentrações de 4,0, 2,0 e 1,0 μ M da porfirina de **H₂RuTPyP**.

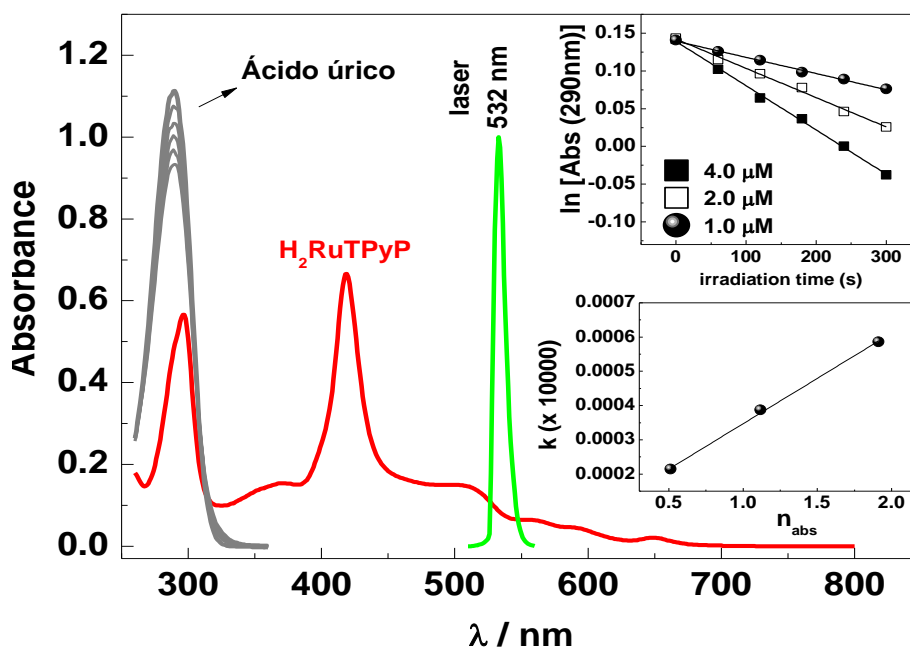


Tabela 3: Valores de γ_{Δ} , Φ_{Δ} e n_{1O_2} obtidos para **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**, bem como para a porfirina **TPP** (padrão).

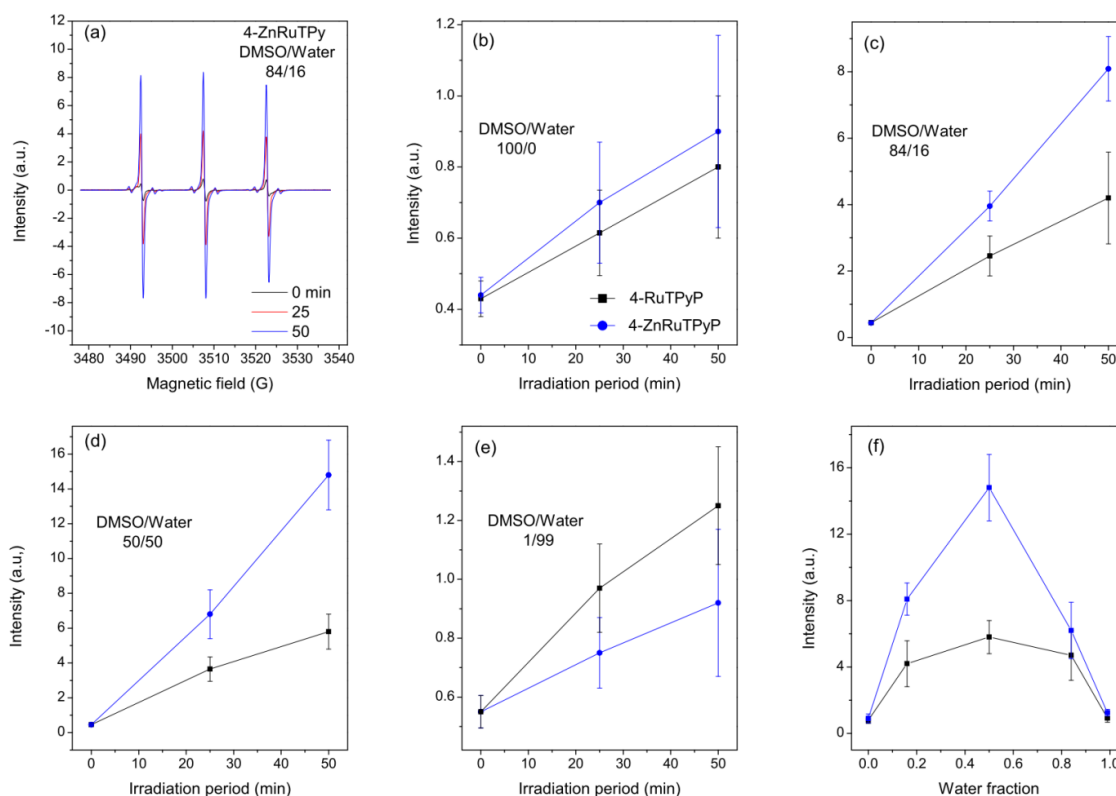
Porfirina	γ_{Δ}	Φ_{Δ}	n_{1O_2} ($\times 10^{13} s^{-1}$)	k ($10^{-5} s^{-1}$)
TPP	0,0076	0,52	-	58,0
H₂RuTPyP	0,00029	0,02	6,0	39,0
ZnRuTPyP	0,0053	0,36	84,0	21,0

Pode ser observado que, entre as porfirinas de rutênio(II), a porfirina **ZnRuTPyP** produz 14 vezes mais moléculas de oxigênio singleto em comparação à porfirina **H₂RuTPyP** e, portanto, apresenta maior rendimento quântico de geração de oxigênio singleto (Φ_{Δ}). Este resultado pode ser justificado pelo efeito do átomo pesado e pela maior simetria e rigidez desta molécula. A presença de íons Zn^{II} no anel porfirínico favorece o acoplamento spin-órbita, sendo que esta condição pode aumentar a taxa de cruzamento intersistemas e, conseqüentemente, aumentar o rendimento quântico da formação de oxigênio singleto.

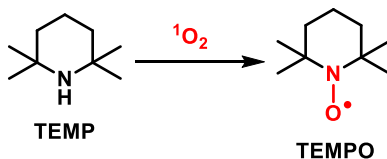
Para uma melhor avaliação de quais EROs podem estar sendo geradas, além de oxigênio singleto, foram também conduzidos experimentos por EPR das porfirinas na presença de armadilhas de spins (*spin traps*). Na Figura 20 os espectros de EPR do *spin trap* TEMPO, que é formado pela reação do TEMP com o oxigênio singleto gerado

(Esquema 6), são mostrados para uma amostra não irradiada contendo porfirina 100 μM em DMSO com 16% de água (v/v) e após irradiação com luz visível por períodos de 25 e 50 min. Com a irradiação, a intensidade relativa do sinal aumentou sensivelmente, mas o aumento na intensidade foi muito menor em DMPO puro ou em 99% de água (Figuras 20b e 20e). Nestas condições, amostras contendo as porfirinas mostraram um aumento significativo na formação de TEMPO em comparação com amostras irradiadas sem porfirina, no entanto, não houve diferença significativa entre os efeitos das duas porfirinas estudadas. Para misturas de água com DMSO houve um aumento pronunciado na formação de TEMPO dependente de $^1\text{O}_2$, especialmente para a mistura contendo partes iguais de cada solvente. Neste caso, a porfirina contendo zinco(II) demonstrou maior eficiência na produção de oxigênio singleto.

Figura 20: Efeitos das porfirinas **ZnRuTPyP** (círculos e linhas em azul) e **H₂RuTPyP** (quadrados e linhas em preto) na formação do aduto TEMPO- $^1\text{O}_2$. (a) Espectro EPR do aduto TEMPO após três períodos de iluminação com luz visível (0, 25 e 50 min) em soluções arejadas contendo porfirinas 100 μM numa mistura DMSO/água (16% água, vol.). (b) Intensidade relativa dos espectros EPR versus período de irradiação em DMSO puro e em (c) Água/DMSO (16%/84%), (d) Água/DMSO (50%/50%), (e) Água/DMSO (99%/1%). (f) Intensidade relativa do sinal versus fração de água no solvente.



Esquema 6: Representação da reação entre o reagente TEMP e p oxigênio singlete



Para examinar a produção de EROs induzida pelas porfirinas tetra-rutenadas irradiadas por luz visível, foram utilizados dois reagentes como “*armadilhas de spin*” e várias combinações de solventes (Figura 21). Em etilenoglicol com 5% de água (v/v) foi observado o aduto do ânion superóxido de DMPO (DMPO-O_2^-) (Esquema 7). Os espectros de EPR para este aduto do DMPO em etilenoglicol foram caracterizados como tendo um tripleto de nitrogênio primário com uma constante de acoplamento hiperfina (hcf), a_N , de 14,0 G, subdividido em dois pares devido às interações de dois átomos de hidrogênio com o elétron desemparelhado, no átomo de nitrogênio na molécula de DMPO ($a_H^\beta = 9,0 \text{ G}$ e $a_H^\gamma = 1,2 \text{ G}$)⁸⁷.

Nos espectros de EPR da Figura 21 apenas o valor do parâmetro magnético de a_H^γ foi ligeiramente diferente ($a_H^\gamma = 1,5 \text{ G}$). Para a mistura de solventes DMSO/água (2% água, Figura 21) os parâmetros mudaram para $a_N = 13,5 \text{ G}$, $a_H^\beta = 9,0 \text{ G}$ e $a_H^\gamma = 1,5 \text{ G}$. Estes valores de hcf podem ser o resultado de uma combinação dos adutos de rotação. DMPO-O_2^- ($a_N = 12,8 \text{ G}$, $a_H^\beta = 10,3 \text{ G}$ e $a_H^\gamma = 1,4 \text{ G}$) e DMPO-OCH_3 ($a_N = 13,0 \text{ G}$, $a_H^\beta = 8,3 \text{ G}$ e $a_H^\gamma = 1,9 \text{ G}$)^{88,89}. O aduto de spin DMPO-OCH_3 é frequentemente observado em sistemas DMPO/DMSO contendo fotossensibilizadores e já descrito na literatura⁹⁰. Em DMSO contendo 16% de água (Figura 21) os parâmetros foram $a_N = 13,3 \text{ G}$, $a_H^\beta = 10,1 \text{ G}$ e $a_H^\gamma = 1,4 \text{ G}$, sugerem uma tendência para uma maior formação do aduto DMPO-O_2^- em relação ao DMPO-OCH_3 . Nenhum sinal do *spin trap* do DMPO foi observado em

87 CASTELLANOS, Miguel M. et al. ESR-spin trapping study on the sonochemistry of liquids in the presence of oxygen. Evidence for the superoxide radical anion formation. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 8, n. 1, p. 17-22, 2001.

88 HRICOVÍNI, Michal et al. 6-Nitroquinolones in dimethylsulfoxide: Spectroscopic characterization and photoactivation of molecular oxygen. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 332, p. 112-121, 2017.

89 BARBIERIKOVÁ, Zuzana et al. Spectroscopic characterization, photoinduced processes and cytotoxic properties of substituted N-ethyl selenadiazoloquinolones. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 565-574, 2013.

90 SBARDELLA, Gianluca et al. New 6-nitroquinolones: synthesis and antimicrobial activities. **II Farmaco**, v. 59, n. 6, p. 463-471, 2004.

água, provavelmente devido à rápida reação de dismutação do ânion superóxido neste solvente puro ⁹¹. Já em DMSO e em outros solventes apróticos, o ânion superóxido é bastante estável porque a desproporção para obter a espécie de peróxido diânion é altamente desfavorável ⁹².

Para a armadilha de spin de PBN (Esquema 8) em DMSO, a mesma mostrou valores de hfc de $a_N = 13,9$ G e $a_H^\beta = 2,3$ G, que podem ser atribuídos a adutos de rotação de PBN do radical hidroxila ⁹³.

Em água com 2% de DMSO (Figura 21) dois conjuntos de parâmetros de PBN foram observados, indicando uma distribuição da sonda entre dois ambientes com uma pequena diferença de polaridade. Isso se deve provavelmente à formação de agregados de PBN, com uma fração de sonda dissolvida em água e outra formando agregados. Os parâmetros para o componente mais polar (Figura 21, indicado pelas linhas pretas) foram: $a_N = 16,4$ G, $a_H^\beta = 3,6$ G com uma largura de linha pico a pico (ΔB_{pp}) de 0,9 G e para o componente menos polar (indicadas por linhas azuis) foram: $a_N = 15,1$ G, $a_H^\beta = 3,4$ G com $\Delta B_{pp} = 0,6$ G. Nestes espectros de EPR também pode ser observado que em água a sonda PBN produziu um par de tripletos com $a_N = 14,6$ e $a_H^\beta = 13,8$ G (indicado por cruzeiros na Figura 21), que foram indexadas à formação do radical *tert*-butil-hidronitróxido [(CH₃)₃NOH•] a partir da hidrólise da sonda PBN ⁹⁴. Mais ainda, após a avaliação por um período de aproximadamente 5 h, os espectros de EPR mostraram decaimento do componente mais polar do PBN em meio aquoso (Figura 21).

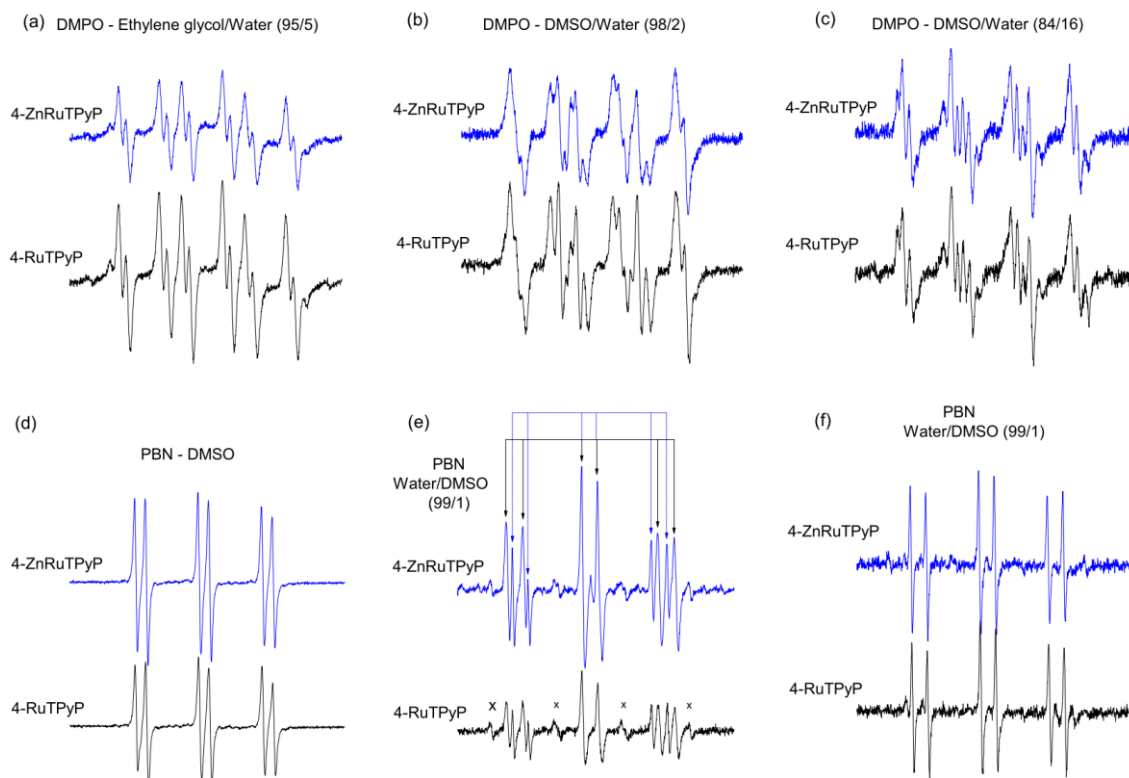
91 LIU, Guangming; ZHAO, Jincal; HIDAKA, Hisao. ESR spin-trapping detection of radical intermediates in the TiO₂-assisted photo-oxidation of sulforhodamine B under visible irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 133, n. 1-2, p. 83-88, 2000.

92 SAWYER, Donald T.; VALENTINE, Joan S. How super is superoxide?. **Accounts of Chemical Research**, v. 14, n. 12, p. 393-400, 1981.

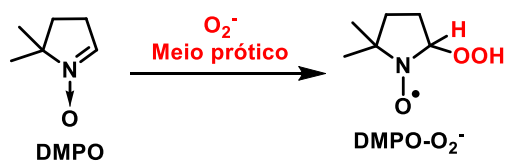
93 LIU, Guangming; ZHAO, Jincal; HIDAKA, Hisao. ESR spin-trapping detection of radical intermediates in the TiO₂-assisted photo-oxidation of sulforhodamine B under visible irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 133, n. 1-2, p. 83-88, 2000.

94 JANZEN, Edward G. et al. On spin trapping hydroxyl and hydroperoxyl radicals. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 2237-2242, 1978.

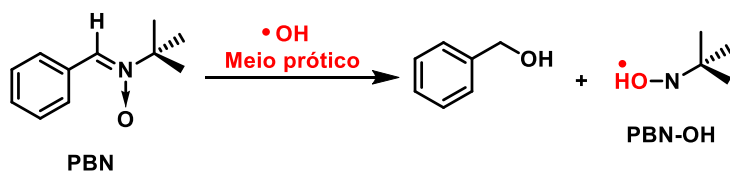
Figura 21: Espectros de EPR das armadilhas de spin DMPO e PBN após iluminação com luz visível (50 min) em soluções aeradas contendo 100 μ M das porfirinas **ZnRuTPyP** (linha azul, espectro superior) ou **H₂RuTPyP** (linha preta). (a) DMPO em etilenoglicol/água (95/5, v/v), (b) DMPO em DMSO/água (98/2, v/v), (c) DMPO em DMSO/água (84/16, v/v), (d) PBN em DMSO (puro), (e) PBN em DMSO/água (99/1, v/v) e (f) o mesmo que em (e) após 5 h no escuro. A faixa total de varredura do campo magnético em cada espectro EPR foi de 60 G (eixo X), e a intensidade relativa está em unidades arbitrárias (eixo Y).



Esquema 7: Representação da reação do reagente DMPO com ânio superóxido em meio prótico



Esquema 8: Representação da reação do reagente PBN com radical hidroxila em meio prótico



5.7 Estudos interativos com CT-DNA e DNA plasmidial

5.7.1 Interação com CT-DNA via espectroscopia na região do UV-vis

Através de experimentos de espectroscopia eletrônica na região do UV-vis é possível estimar como estas moléculas podem interagir com DNA. Neste estudo, as porfirinas de rutênio(II) **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** foram tituladas com quantidades crescentes de DNA de timo de bezerro (CT-DNA; de 0 a 190 μM) e os espectros de UV-vis foram obtidos conforme evidenciado na Figura 22. Na ausência da molécula de ct-DNA as porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** (linha cheia preta) tiveram maior absorvância entre 415 – 435 nm. Já na presença do CT-DNA é possível observar a diminuição na intensidade de absorvância nas bandas de transição eletrônica do espectro de UV-vis (indicado pelas setas) conforme é aumentada a concentração de ct-DNA à solução. Os valores referentes à diminuição de intensidade da banda Soret (*H*%) são expressos na Tabela 4. Além disso, se observa pequenos desvios batocrômicos ($\Delta\lambda$) no espectro de UV-vis para estas porfirinas.

As constantes de ligação intrínseca (K_b) foram calculadas e comparadas com os valores já estabelecidos na literatura para as mesmas moléculas, previamente descritos por Araki e colaboradores ($K_b = 3,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para **H₂RuTPyP** e $5,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para **ZnRuTPyP**)⁹⁵ e resumidos na Tabela 4. Os valores de K_b obtidos para os complexos **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** foram $4,69 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $6,67 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectivamente, os quais evidenciam que **ZnRuTPyP** apresentou maior interação com o DNA. Mais ainda, através destes dados e das mudanças espectrais podemos dizer que possíveis interações eletrostáticas (estabilização dos fosfatos do DNA pelas cargas positivas das porfirinas) e via sulco são observadas, sendo as mesmas reforçadas por análise de *docking* molecular.

Figura 22: Espectros de absorção eletrônica na região UV-vis para as porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**. em solução de DMSO/Tris-HCl pH 7,4. A inserção mostra o comportamento linear da absorbância da banda Soret em função da $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ com $[DNA]$ utilizada para obter valores referente à K_b .

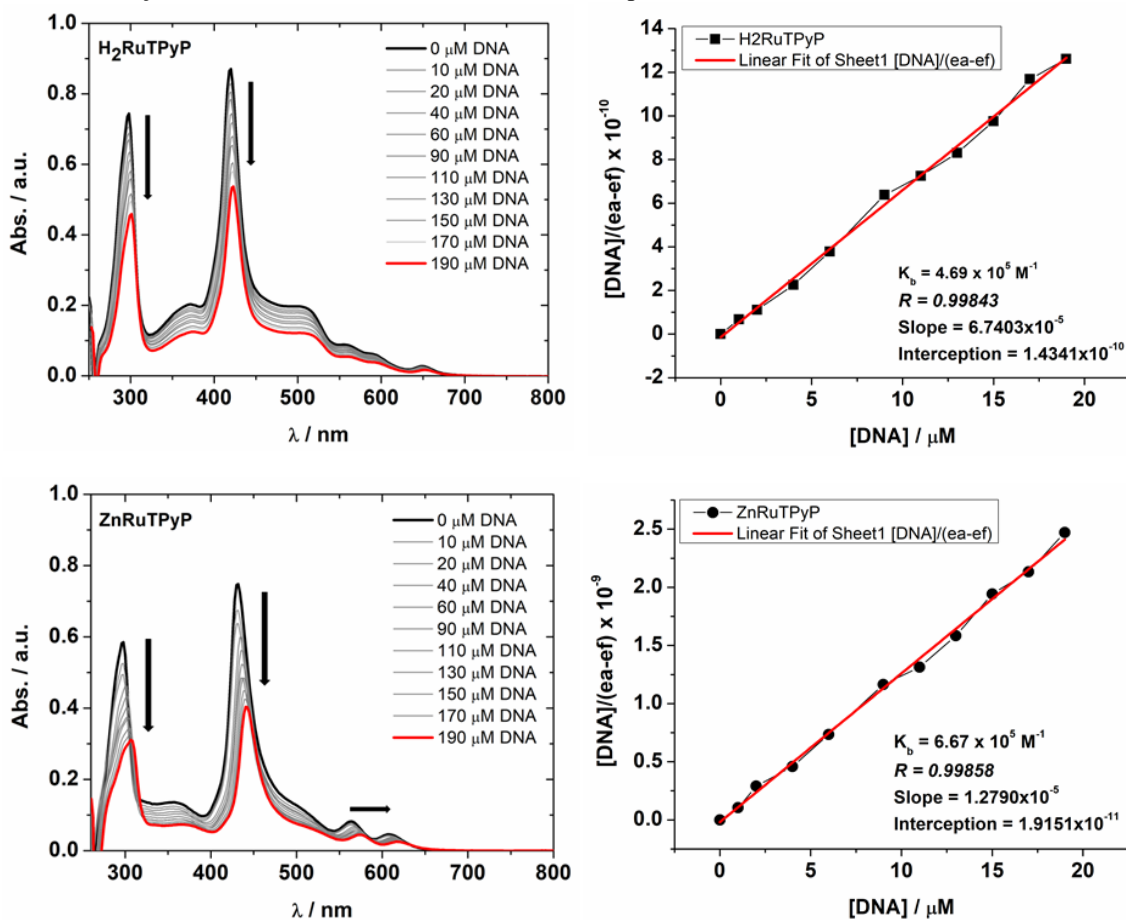


Tabela 4 Dados espectroscópicos da interação de CT-DNA com as porfirinas por espectroscopia na região do UV-vis.

Porfirina	H% ^a	$\Delta\lambda$ (nm) ^b	K_b (M ⁻¹) ^c
H₂RuTPyP	41,80	2,0	$4,69 \times 10^5$
ZnRuTPyP	50,59	4,0	$6,67 \times 10^5$

^aHipocromiscidade da banda Soret – $H(\%) = (\text{Abs}_{\text{initial}} - \text{Abs}_{\text{final}}) / (\text{Abs}_{\text{initial}}) \times 100$;

^bBatocromismo: $\Delta\lambda = \lambda_{\text{initial}} - \lambda_{\text{final}}$;

^cConstante intrínseca de ligação;

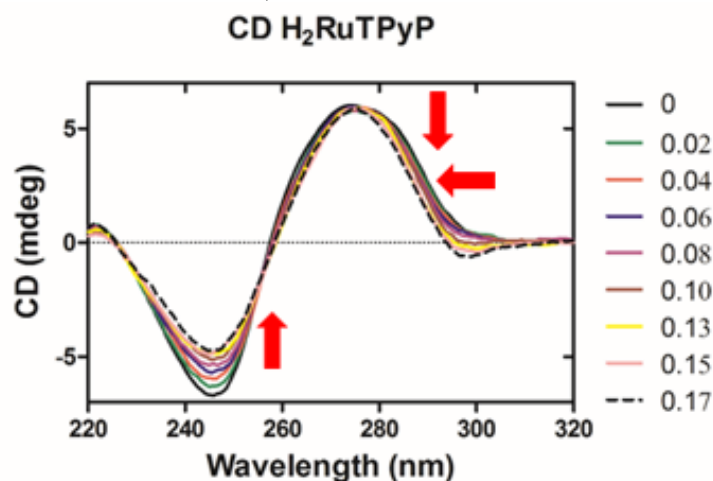
5.7.2 Investigação dos modos de interação DNA–porfirina por espectroscopia de absorção de dicroísmo circular

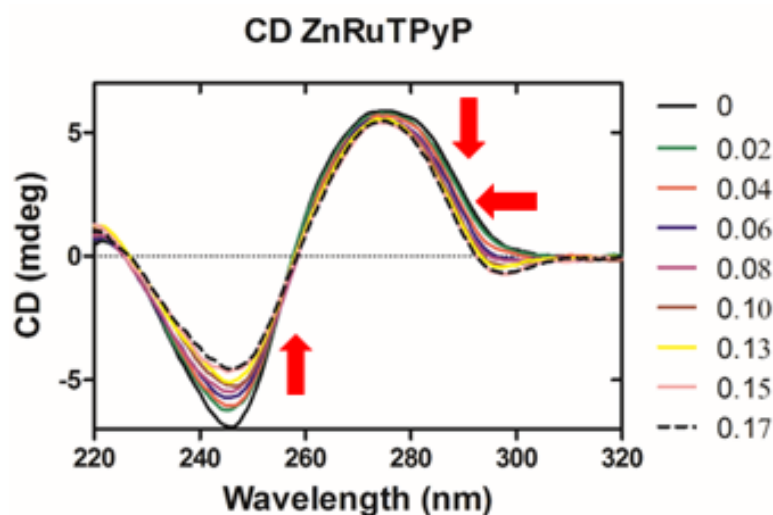
A técnica de dicroísmo circular (DC) é muito útil para investigar as interações na estrutura do DNA e mede a diferença na absorção da luz polarizada (desvios para sentido horário e anti-horário) de forma circular e foi realizada neste trabalho para se determinar

as potenciais alterações conformacionais do DNA induzidas pela adição das porfirinas tetra-rutenadas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**. A Figura 23 mostra o perfil do espectro de DC do DNA em função do aumento da concentração de **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**, em uma solução aquosa contendo 10% de acetonitrila, 200 μM de ct-DNA e 10 mM de Tris/HCl pH 7,4. Conforme observado, os espectros exibem uma transição negativa na região do UV numa faixa de 240-250 nm e uma transição positiva, também na região do UV, entre 260-300 nm, as quais são típicas de um espectro de DC para a molécula do DNA. Estas transições observadas são características da helipticidade do DNA na forma B (transição negativa) e do empilhamento da base (transição positiva).

A adição de concentrações crescentes das porfirinas de Ru^{II} ao CT-DNA modifica claramente os espectros de dicroísmo circular do DNA na conformação B, levando a uma diminuição da intensidade de ambas as bandas, indicando interação externa destas porfirinas com a dupla hélice. As intensidades das transições positivas e negativas diminuíram significativamente (indicado pelas setas verticais em vermelho), e um pequeno efeito batocrômico (indicado pela seta horizontal em vermelho) observado sugere a interação entre os sulcos do DNA e os complexos de Ru^{II} periféricos coordenados à porfirina.

Figura 23: Dicroísmo circular do ct-DNA na presença das porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** em uma solução aquosa contendo 10% de acetonitrila com 200 μM de ct-DNA em 10 mM de Tris/HCl pH 7,4. Razão entre DNA:porfirina variando de 0 a 0,17.





5.8 Ensaio de competição com intercaladores e bloqueadores de sulco por espectroscopia de emissão fluorescente

Com o propósito de avaliar a afinidade de ligação das porfirinas tetra-rutenadas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** com o DNA, realizaram-se ensaios de competição por titulação das porfirinas em solução contendo brometo de etídio (EB – intercalador), DAPI (bloqueador de sulco menor) e MG (bloqueador de sulco maior), sendo analisados pela supressão de fluorescência em estado estacionário.

5.8.1 Competição com Brometo de Etídio (EB)

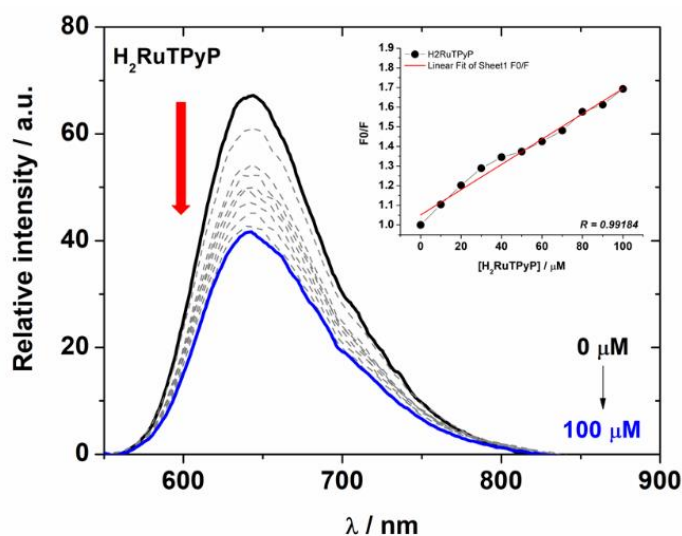
A interpretação das alterações observadas nos espectros de emissão de fluorescência do EB após a intercalação ao DNA é frequentemente usada para estudos de interação entre o DNA e derivados porfirínicos ⁹⁶. Os espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário foram monitorados pela adição das porfirinas tetra-rutenadas com concentrações crescentes adicionadas a uma concentração fixa de ct-DNA, previamente tratada com EB. Conforme observado na Figura 24 o espectro de emissão do aduto EB-DNA apresentou forte emissão em $\lambda_{em} = 643$ nm quando excitado a $\lambda_{exc} = 510$ nm.

⁹⁶ LEPECQ, J.-B.; PAOLETTI, C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: physical—chemical characterization. **Journal of molecular biology**, v. 27, n. 1, p. 87-106, 1967.

Os espectros de fluorescência demonstraram relativa supressão da intensidade da emissão de fluorescência do aduto EB-DNA (indicada pela seta vermelha) após a adição de concentrações de cada composto (**H₂RuTPP** e **ZnRuTPP**). O efeito observado nos espectros pode estar atribuído à competição das porfirinas com o corante EB que são intercalantes do DNA ⁸³. De maneira geral os valores de K_{SV} encontrados são baixos para as porfirinas **H₂RuTPP** e **ZnRuTPP**, na ordem de 10^3 M^{-1} . Este fato pode estar atribuído ao grande volume das porfirinas tetra-rutenadas (estereoquímica).

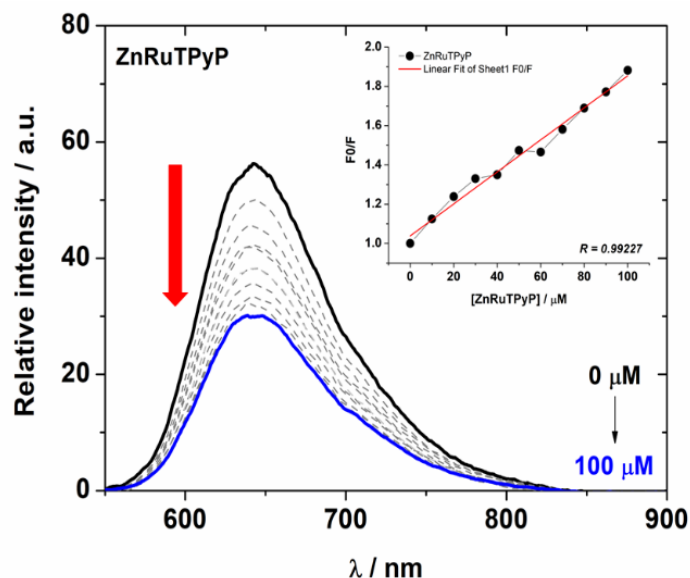
Os espectros de emissão fluorescente para o EB-DNA e seus valores das porcentagens de supressão (Q%), constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}) e constante cinética de supressão (k_q) na presença de cada porfirina estão listados na Tabela 5. Já os valores de k_q encontrados para as porfirinas de Ru^{II} são da ordem de $10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Tabela 5), sendo maiores que a constante difussional ($k_{diff} \sim 7,40 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a 37 °C, segundo a Teoria de Smoluchowski-Stokes-Einstein) ⁹⁷, há um indicativo de que estas porfirinas podem interagir com o aduto EB-DNA via associação no estado fundamental, provavelmente por mecanismo estático de supressão de fluorescência ⁹⁸.

Figura 24: Espectros de emissão fluorescente para o estudo competitivo entre EB e **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**.



97 MONTALTI, Marco et al. **Handbook of photochemistry**. CRC press, 2006.

98 CHAVES, Otávio Augusto et al. Biological interactions of fluorinated chalcones: stimulation of tyrosinase activity and binding to bovine serum albumin. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 199, p. 30-38, 2017.



5.8.2. Ensaio de competição com 4,6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI) e com verde de metila (MG) por espectroscopia de emissão fluorescente

Com o propósito de investigar os sítios preferenciais de interação das porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** com o DNA, realizaram-se ensaios de competição por titulação das porfirinas em solução contendo DAPI (sulco menor) e com MG (sulco maior), em análises individuais para cada tipo de corante. Os espectros de emissão de fluorescência no estado estacionário foram monitorados pela adição das porfirinas tetra-rutenadas com concentrações crescentes adicionadas a uma concentração fixa de ct-DNA, previamente tratada com os corantes. Tanto DAPI quanto MG são marcadores fluorescentes de DNA e amplamente utilizados como uma sonda fluorescente de sulco menor e sulco maior, respectivamente^{99,100}.

Como observado na Figuras 25 e 26 abaixo, os espectros de emissão fluorescente dos adutos DAPI-DNA e MG-DNA apresentam intensa emissão na faixa de 400 a 800 nm (DAPI – $\lambda_{exc} = 358$ nm e $\lambda_{em} = 461$ nm; MG – $\lambda_{exc} = 244$ nm e $\lambda_{em} = 371$ nm). Os espectros de fluorescência demonstraram significativa supressão da intensidade da emissão de fluorescência dos adutos com o ct-DNA (indicados pelas setas) após a adição

99 BIANCARDI, Alessandro et al. An investigation of the photophysical properties of minor groove bound and intercalated DAPI through quantum-mechanical and spectroscopic tools. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 13, p. 4596-4603, 2013.

100 PRIETO, Daniel et al. A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. **Histochemistry and cell biology**, v. 142, n. 3, p. 335-345, 2014.

de concentrações de cada porfirina (**H₂RuTPP** e **ZnRuTPP**). Não foram observados deslocamentos significativos dos picos de máxima intensidade de emissão fluorescente para os derivados. Os valores para as taxas de supressão ($Q\%$), constante de supressão (K_{SV}) e constante cinética de supressão de Stern-Volmer (k_q) para as porfirinas **H₂RuTPP** e **ZnRuTPP** estão apresentados na Tabela 5. Através dos dados obtidos com os três corantes, podemos dizer que a interação mais provável das porfirinas tetra-rutenadas ocorre via sulco maior (onde o MG interage), que também pode ser evidenciado e reforçado pela análise de *docking* molecular.

Figura 25: Espectros de emissão fluorescente das competições entre DAPI e as porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**.

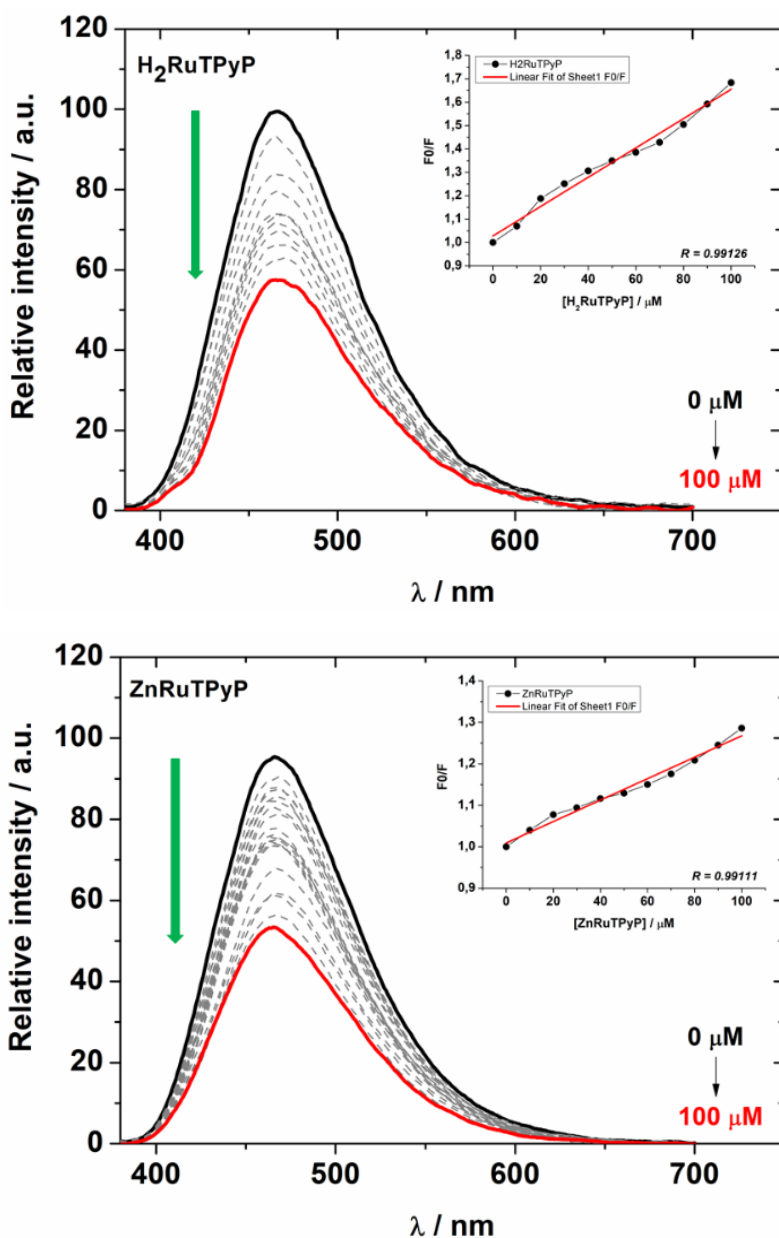


Figura 26: Espectros de emissão fluorescente das competições entre MG e as porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**.

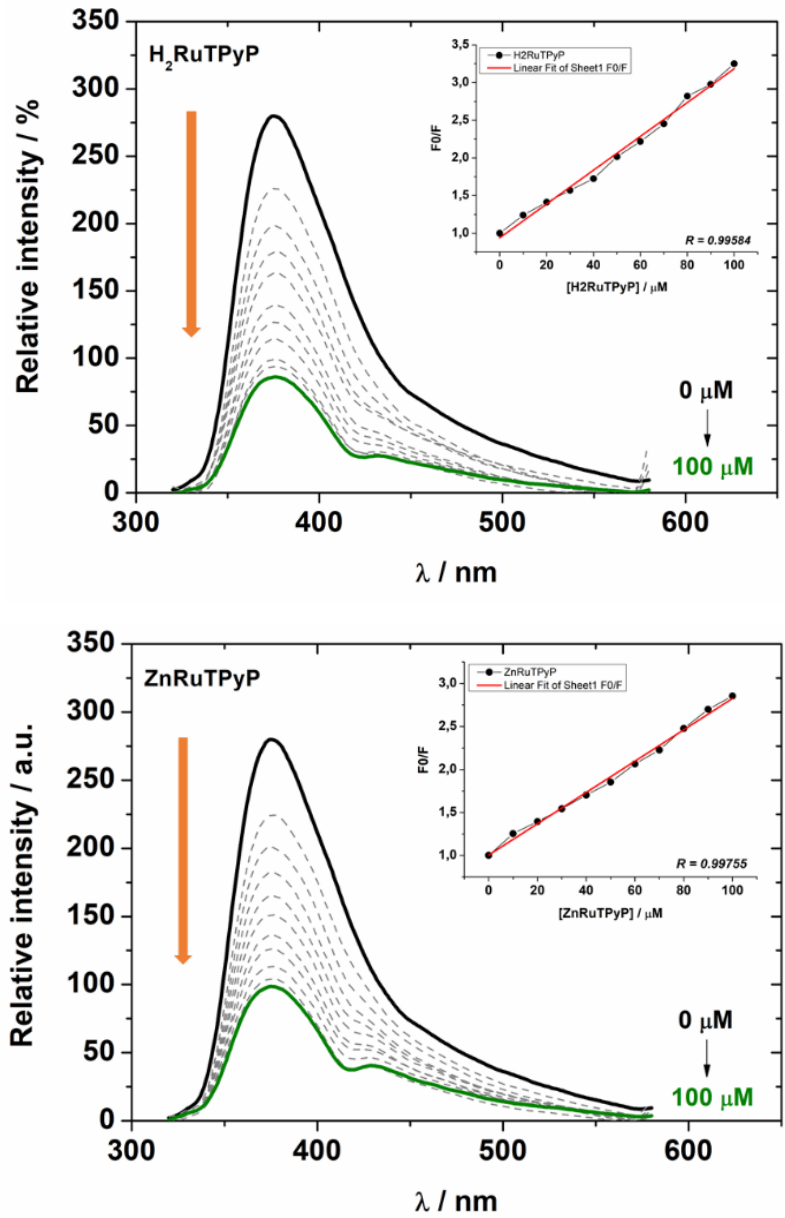


Tabela 5: Valores obtidos de $Q\%$, K_{SV} e k_q para os ensaios de competição com EB, DAPI e MG.

EB-DNA			
Porfirina	$Q\%a$	$K_{SV} (M^{-1})b$	$k_q (M^{-1} s^{-1})c$
H₂RuTPyP	38,08	$6,44 \times 10^3$	$2,80 \times 10^{11}$
ZnRuTPyP	46,87	$8,15 \times 10^3$	$3,54 \times 10^{11}$
DAPI-DNA			
Porfirina	$Q\%a$	$K_{SV} (M^{-1})b$	$k_q (M^{-1} s^{-1})c$
H₂RuTPyP	42,30	$6,26 \times 10^3$	$2,84 \times 10^{12}$
ZnRuTPyP	44,00	$2,58 \times 10^3$	$1,17 \times 10^{12}$
MG-DNA			
Porfirina	$Q\%a$	$K_{SV} (M^{-1})b$	$k_q (M^{-1} s^{-1})c$
H₂RuTPyP	69,23	$2,24 \times 10^4$	$8,00 \times 10^{12}$
ZnRuTPyP	74,95	$2,82 \times 10^4$	$1,00 \times 10^{13}$

^aSupressão da emissão de fluorescência – $Q(\%) = (Q_{\text{initial}} - Q_{\text{final}}) / (Q_{\text{initial}}) \times 100$;

^bConstante de supressão de Stern-Volmer;

^cConstante cinética de supressão de Stern-Volmer;

5.9 Docking molecular das porfirinas estudadas com ct-DNA

A análise por *docking* molecular fornece previsão da estrutura do composto-biomolécula utilizando métodos computacionais. O encaixe pode ser conseguido através de dois passos inter-relacionados: o primeiro por amostragem de conformações do composto estudado no sítio ativo da biomolécula; depois, classificar essas conformações por meio de algoritmos de amostragem (função de pontuação). A fim de fornecer visão atômica da capacidade de ligação das porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** ao DNA, como também explorar as principais bases nitrogenadas e as forças moleculares envolvidas neste processo cálculos de *docking* molecular.

Os resultados do *docking* molecular para estas moléculas sugeriram que as porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** não fazem ligação ou intercalação do DNA, possivelmente devido à conformação da porfirina (estereoquímica). Este resultado é bastante semelhante àqueles obtidos para alguns derivados da porfirina substituídas com grupos naftil, estudados por simulação computacional ¹⁰¹. A Figura 27 ilustra a representação da vista superior (*top view*) e a melhor posição frontal de encaixe para cada

101 DA SILVEIRA, Carolina Hahn et al. Synthesis, spectroscopy, electrochemistry and DNA interactive studies of meso-tetra (1-naphthyl) porphyrin and its metal complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 482, p. 542-553, 2018.

complexo (*front view*). Os resultados do *docking* molecular através da representação da vista superior sugere que ambos os derivados podem interagir externamente com as cadeias de DNA, provavelmente por interação eletrostática, entretanto a porfirina **ZnRuTPyP** é mais interna a interação quando comparada com a porfirina base-livre **H₂RuTPyP**, indicando que a presença dos íons Zn^{II} coordenado ao macrociclo porfirínico pode oferecer uma conformação mais rígida e mais efetiva da porfirina. Essa pode ser a razão pela qual a metalo-porfirina **ZnRuTPyP** apresentou maior valor experimental de K_b quando comparada a base-livre (K_b = 6,67 x 10⁵ M⁻¹).

Na Tabela 6 estão apresentadas as principais bases nitrogenadas que podem interagir com cada estrutura da porfirina, bem como a principal força intermolecular envolvida nessa interação. Os resultados sugerem que cada composto interage com a nucleobase citosina e timina, contudo, apenas a **H₂RuTPyP** pode interagir com um resíduo de guanina e a **ZnRuTPyP** para uma adenina. As interações de van der Waals podem ser as principais forças intermoleculares envolvidas na associação **DNA–H₂RuTPyP** e **DNA–ZnRuTPyP**.

A título de exemplo, os anéis aromáticos da 2,2-bipiridina coordenados ao íon Ru^{II} da porfirina **H₂RuTPyP** podem interagir através das forças de van der Waals com DG-04, desoxirribose-DT-07, fosfato-DT-07, DT-08, DC-09, DC-21 e desoxirribose-DC-21 dentro de uma distância de 3,80; 3,50; 1,70; 2,80; 3,60; 3,20 e 2,20 Å, respectivamente. Enquanto isso, a porção do anel porfirínico da base-livre **H₂RuTPyP** também pode interagir via forças de van der Waals com desoxirribose-DT-08, fosfato-DT-08, desoxirribose-DT-20 e fosfato-DT-20, dentro de uma distância de 1,80; 2,50; 3,20 e 2,40 Å, respectivamente.

Figura 27: Estudo de modelagem molecular para os derivados porfirínicos. Representação *top view* e *front view* para a interação entre DNA-**H₂RuTPyP** (A) e DNA-**ZnRuTPyP** (B).

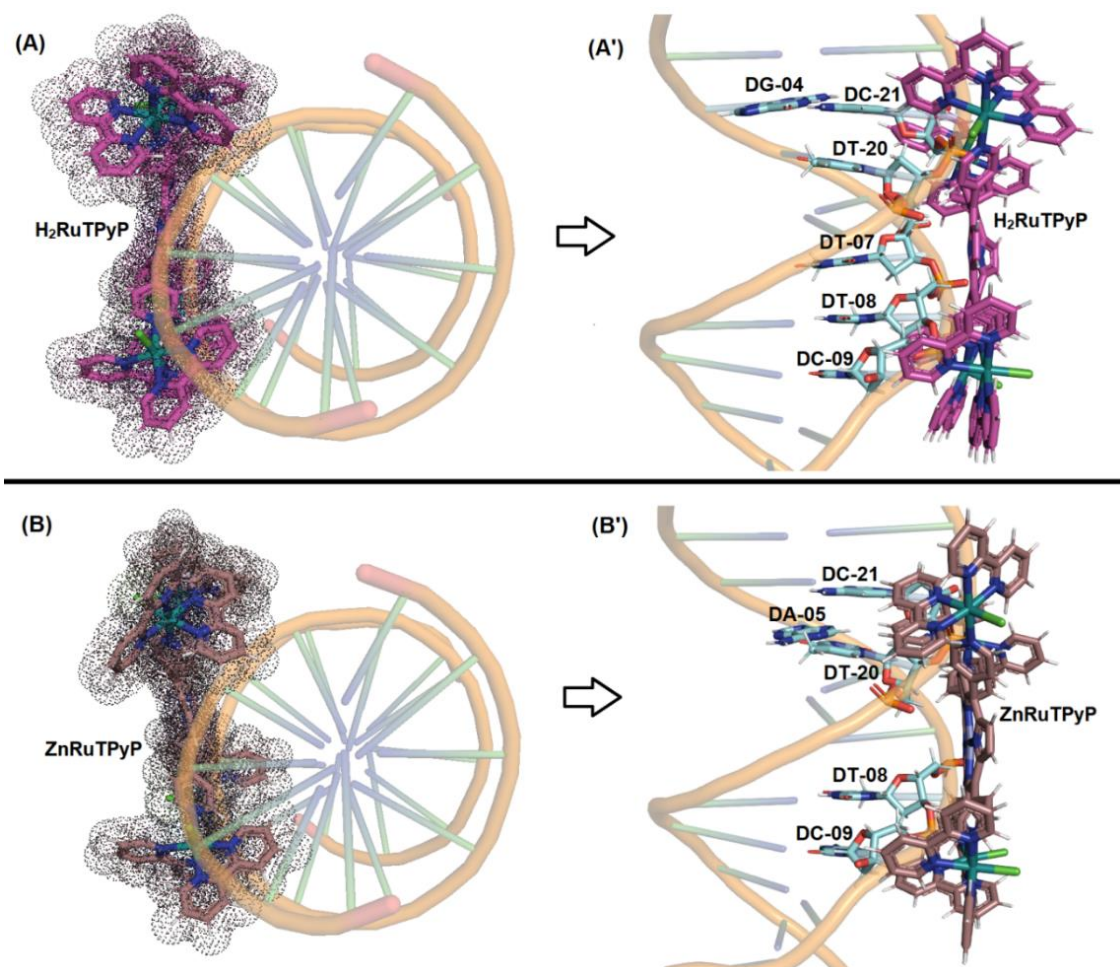


Tabela 6: Principais bases nitrogenadas, bem como a força de interação, envolvidas na interação DNA-Porfirinas de Ru^{II}.

Porfirina	Base nitrogenada	Interação	Distância (Å)
H₂RuTPyP	DG-04	van der Waals	3,80
	Desoxirribose-DT-07	van der Waals	3,50
	Fosfato-DT-07	van der Waals	1,70
	DT-08	van der Waals	2,80
	Desoxirribose -DT-08	van der Waals	1,80
	Fosfato-DT-08	van der Waals	2,50
	DC-09	van der Waals	3,60
	Desoxirribose -DT-20	van der Waals	3,20
	Fosfato-DT-20	van der Waals	2,40
	DC-21	van der Waals	3,20
Desoxirribose -DC-21	van der Waals	2,20	
ZnRuTPyP	DA-05	van der Waals	3,40
	Desoxirribose -DT-08	van der Waals	1,30
	Fosfato-DT-08	van der Waals	1,50
	DC-09	van der Waals	2,00
	Fosfato-DC-09	van der Waals	3,40
	Desoxirribose -DT-20	van der Waals	1,50
	Fosfato-DT-20	van der Waals	3,80
	DC-21	van der Waals	3,70
	Desoxirribose -DC-21	van der Waals	2,90
Fosfato-DC-21	van der Waals	1,70	

5.10. Avaliação dos parâmetros de ligação da albumina humana (HSA) com as porfirinas por espectroscopia de emissão

5.10.1. Medidas de fluorescência no estado estacionário

De modo geral, os parâmetros de ligação composto-proteína podem ser facilmente determinados pela técnica de fluorescência em estado estacionário através da diminuição

da fluorescência intrínseca da proteína HSA (resíduo de triptofano Trp²¹⁴). Nesse sentido, a interação entre a albumina e cada um dos derivados porfirínicos foi determinada através da supressão da fluorescência do HSA (resíduo fluorescente de Trp²¹⁴). A Figura 33 representa a emissão de fluorescência no estado estacionário do HSA (10 µM em solução de PBS) na ausência e na presença de sucessivas adições de **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** (variando de 1,7 a 13,2 µM) à 37 °C (310 K). Como era esperado, observa-se que o HSA exibiu uma intensa banda de emissão de fluorescência a 340 nm. As intensidades de fluorescência do HSA diminuíram gradualmente com o aumento da concentração das porfirinas, e um pequeno desvio hipsocrômico também foi observado (de 340 para 334 nm), sugerindo que esta porfirina base-livre de Ru^{II} podem estar interagindo com o resíduo Trp²¹⁴ e o cromóforo de fluorescência de HSA é colocado em um ambiente mais hidrofóbico sobre a ligação com a porfirina, o que pode estar relacionado com perturbações na estrutura da proteína. A mesma tendência foi também observada para o derivado **ZnRuTPyP** (de 340 a 338 nm).

É conhecido que dois mecanismos diferentes podem ser responsáveis pela interação entre o fluoróforo (neste caso, triptofano) e o supressor: processo dinâmico e/ou estático. Essas interações podem incluir extinção colisional no mecanismo dinâmico e uma formação de um aduto não-fluorescente no estado fundamental. Por outro lado, o modo dinâmico e estático pode ser facilmente distinguido por sua dependência da temperatura e por medições de tempos de vida por espectroscopia resolvida no tempo. Em geral, a análise de Stern-Volmer (Figura 33 para HSA:**H₂RuTPyP** e HSA:**ZnRuTPyP**) são úteis na elucidação do mecanismo envolvido no processo de supressão de fluorescência e a constante de Stern-Volmer pode ser obtidas pelas Equações 8 e 9:

Equação 8: Equação para obter valores de K_{SV}

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q]$$

Equação 9: Equação para obter valores de k_q

$$k_q = \frac{K_{SV}}{\tau_0} \quad (2)$$

Onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência no estado estacionário do HSA na ausência e na presença de cada porfirina, respectivamente. K_{sv} e k_q são a constante de fluorescência de Stern-Volmer e a constante cinética de fluorescência bimolecular, respectivamente. Os $[Q]$ e τ_0 são a concentração da porfirina e o tempo de vida de fluorescência do HSA na ausência do supressor ($\tau_0 = 5,47 \times 10^{-9}$ s)¹⁰².

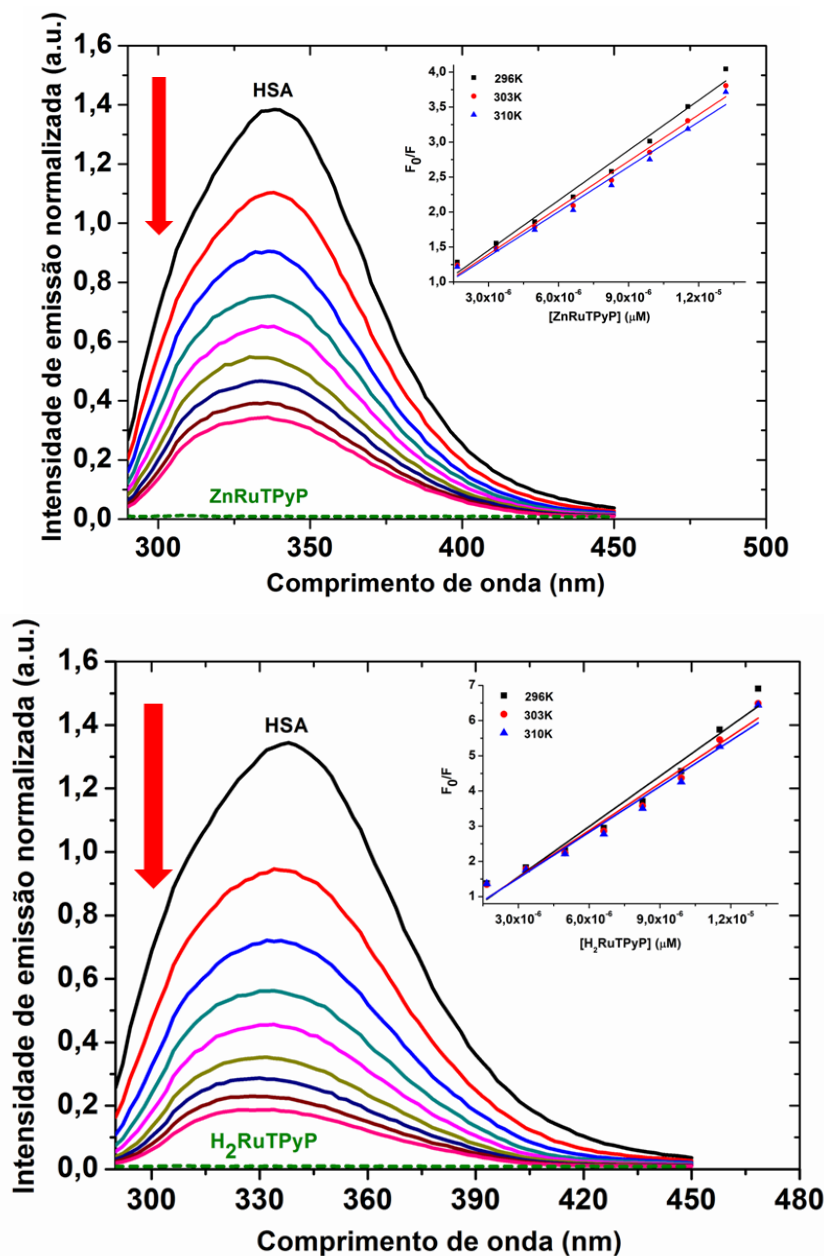
Além da diminuição da intensidade da emissão fluorescente (indicado pela seta vertical vermelha), também é possível observar que ambas as porfirinas (**H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**) não apresentaram intensidade de banda de emissão fluorescente (linha tracejada em verde). Isto já foi observado por Araki e colaboradores em seu estudo de caracterização de porfirinas *meso* substituídas, das quais exibiam menores intensidade de emissão fluorescente conforme grupos de $[Ru(bpy)_2Cl]^+$ eram adicionado nas periferias do anel porfirínico⁷⁵. Portanto, pode-se dizer que estas porfirinas não apresentam emissão fluorescente em função do efeito do átomo pesado, como já foi discutido na seção dos estudos fotofísicos.

Na Tabela 7 são apresentados os valores de K_{SV} e k_q para a interação entre HSA e cada porfirina à 296, 303 e 310 K. Em todos os casos os valores de K_{SV} diminuem com o aumento da temperatura e os valores k_q são cerca de quatro ordens de grandeza maiores ($1013 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) do que a constante de fluorescência de colisão difusional ($k_{dif} \approx 7,40 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, de acordo com a teoria de Smoluchowski-Stokes-Einstein a 298 K), indicando que o principal mecanismo de supressão de fluorescência pode ser via processo estático. Assim, há uma associação do estado fundamental entre o HSA e cada porfirina no estado fundamental. Por outro lado, em muitos casos, o fluoróforo (triptofano) pode ser extinto tanto por colisões como por formação de adutos com o mesmo supressor. O traço característico do gráfico de Stern-Volmer em tais circunstâncias é uma curvatura ascendente, côncava para o eixo y. Como representado na inserção da Figura 33, os gráficos de Stern-Volmer mostraram uma curvatura ascendente a alta concentração de porfirina de RuII, sugerindo que há uma combinação de mecanismo de fluorescência dinâmico e estático para a interação HSA:derivados de porfirina. Provavelmente, o mecanismo de supressão dinâmica ocorre na maior concentração de porfirina. A mesma tendência foi anteriormente relatada para alguns derivados porfirínicos catiônicos e

102 GENTILI, Pier Luigi; ORTICA, Fausto; FAVARO, Gianna. Static and dynamic interaction of a naturally occurring photochromic molecule with bovine serum albumin studied by UV– visible absorption and fluorescence spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 51, p. 16793-16801, 2008.

aniônicos, isto é, meso-tetra(4-carboximetilenoifenil)porfirina, meso-tetra(4-metilpiridil)-porfirina e a meso-tetra(4-sulfofenil)porfirina ¹⁰³.

Figura 28: Espectro de emissão de fluorescência da proteína HSA na presença de **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**. A inserção mostra o comportamento linear da razão da intensidade de fluorescência F_0/F versus [Porfirina], com variação da temperatura em K, utilizados para obter valores referentes à K_{SV} .



103 LEBEDEVA, Natalya Sh; GUBAREV, Yury A.; KOIFMAN, Oskar I. The interaction of cationic and anionic porphyrins with the bovine serum albumin in borate buffer. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 88, n. 3-4, p. 191-198, 2017.

A avaliação da constante de ligação entre HSA e uma porfirina é um parâmetro importante para entender a biodisponibilidade destas moléculas. Se a afinidade de ligação é baixa, o passo inicial de farmacocinética (absorção de droga) não é viável. No caso de afinidade de ligação moderada de substâncias bioativas à HSA, a absorção e distribuição de compostos para vários tecidos são viáveis. Finalmente, quando a afinidade de ligação for elevada, a absorção de derivados é viável, mas sua distribuição nos tecidos será limitada devido a estabilidade do complexo, o que por sua vez afeta a farmacocinética da molécula. A equação de Stern-Volmer modificada (equação 10) pode ser usada para obter informações sobre a constante de ligação entre HSA e as porfirinas de Ru^{II}.

Equação 10: Equação de Stern-Volmer modificada

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{fK_a[Q]} + \frac{1}{f}$$

Onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência no estado estacionário do HSA na ausência e presença de cada porfirina, respectivamente. K_a , f e $[Q]$ são a constante de ligação de Stern-Volmer modificada; a fração da fluorescência inicial que é acessível ao supressor ($f \approx 1,00$) e a concentração da porfirina, respectivamente.

Na Figura 34 são apresentados os gráficos de Stern-Volmer modificados para a interação HSA:**H₂RuTPyP** e HSA:**ZnRuTPyP**. Os valores de K_a para cada porfirina são observados na ordem de 10^5 M^{-1} , indicando uma interação moderada (Tabela 7) ¹⁰⁴. A presença do íon Zn^{II} na porfirina causou uma diminuição no valor da constante de ligação, porém esta diminuição não afetou significativamente a capacidade de ligação. Assim, a análise de Stern-Volmer modificada indicou que as porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** podem ser eficientemente transportadas e bio-distribuídas pela albumina sérica na corrente sanguínea humana.

A força de interação entre porfirinas e biomoléculas pode incluir interações eletrostáticas, múltiplas ligações de hidrogênio, interações fracas de van der Waals e interações hidrofóbicas, que podem ser avaliadas usando os sinais e magnitudes de parâmetros termodinâmicos, como mudança de entalpia (ΔH°) e mudança de entropia (ΔS°). Estes parâmetros termodinâmicos podem ser obtidos empregando a equação de

104 SUN, Jing et al. Ruthenium (II) complexes interact with human serum albumin and induce apoptosis of tumor cells. **Biological trace element research**, v. 163, n. 1-2, p. 266-274, 2015.

Van't Hoff e destes valores a variação de energia livre de Gibbs (ΔG°) pode ser obtida empregando as Equações 11 e 12, onde o termo $-\Delta H^0/R$ é o coeficiente angular e o termo $\Delta S^0/R$ é o coeficiente angular:

Equação 11: Equação modificada de Van't Hoff

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}$$

Equação 12: Equação da variação de energia livre de Gibbs (ΔG°)

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

Onde ΔH° , ΔS° e ΔG° são a entalpia, a entropia e a energia livre de Gibbs, respectivamente; R é a constante dos gases ($R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); T a temperatura em Kelvin (296, 303 e 310 K) e K_a a constante de ligação de Stern-Volmer modificada. A inserção na Figura 34 mostra o gráfico de Van't Hoff para a interação HSA:**H₂RuTPyP** e HSA:**ZnRuTPyP**. Na Tabela 7 são apresentados os parâmetros termodinâmicos para cada porfirina. A ligação da porfirina base-livre **H₂RuTPyP** ao HSA é entropicamente dirigida ($T\Delta S = 22,11 \text{ KJ mol}^{-1}$ à 303 K, ou seja, o termo $T\Delta S$ contribui para a diminuição da ΔG), enquanto a ligação da metalo-porfirina **ZnRuTPyP** ao HSA é entálpicamente dirigida ($\Delta H = -26,34 \text{ KJ mol}^{-1}$ à 303 K, ou seja, o termo ΔH contribui para a diminuição da ΔG) (ver Tabela 7). Estes valores corroboram com os obtidos no estudo de modelagem molecular para os derivados porfirínicos ligados ao HSA, onde as interações de van der Waals desempenham um papel importante no processo de ligação para a porfirina **ZnRuTPyP** (Tabela 11). Além disso, os valores de $\Delta H^\circ < 0$ e $\Delta S^\circ > 0$ também indicam que as interações eletrostáticas desempenharam um papel importante no processo de ligação. Adicionalmente, $\Delta S^\circ > 0$ também pode estar relacionado aos efeitos hidrofóbicos (dessolvatação) da estrutura da cavidade proteica e da porfirina na ligação.

Figura 29: Gráfico modificado utilizado para obtenção dos valores de K_{SV} , com a variação da temperatura, para HSA-Porfirinas de Ru^{II}.

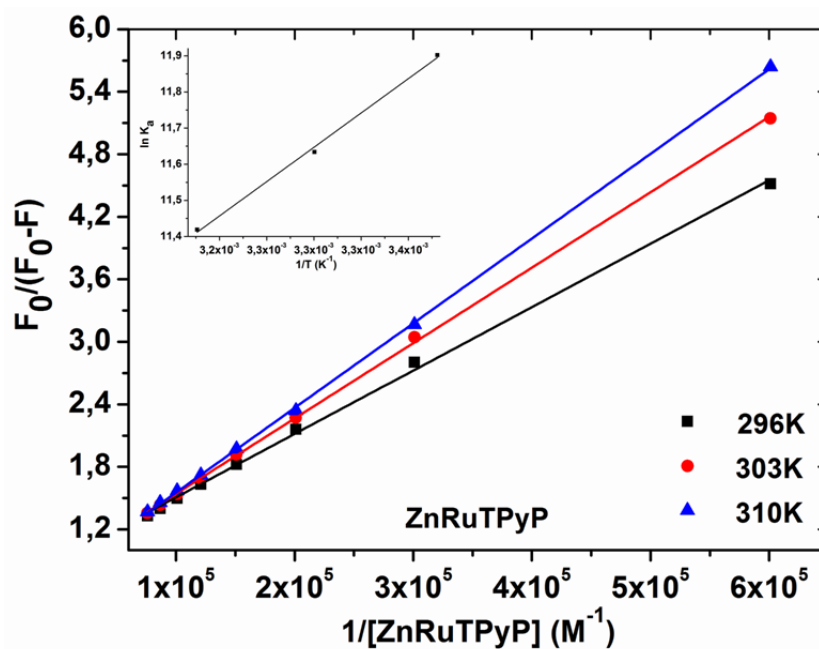
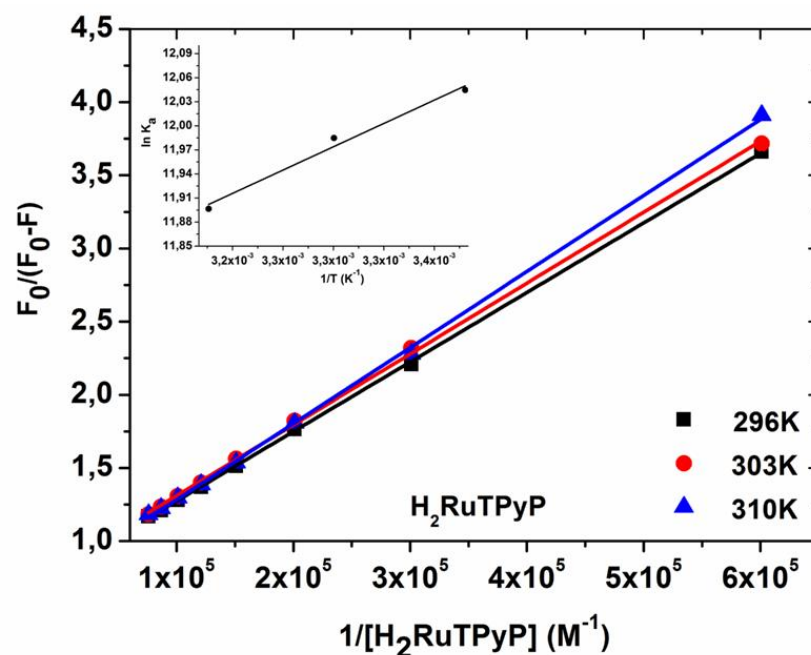


Tabela 7: Parâmetros de ligação (K_{sv} , k_q , K_a ; ΔH° , ΔS° and ΔG°) para HSA com as porfirinas de Ru^{II} à 296, 303 e 310 K.

Porfirina	T (K)	$K_{sv} (\times 10^5)$ (M^{-1})	$k_q (\times 10^{13})$ ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	$K_a (\times 10^5)$ (M^{-1})	ΔH° ($kJ mol^{-1}$)	ΔS° ($kJ mol^{-1} K^{-1}$)	ΔG° ($kJ mol^{-1}$)
$H_2RuTPyP$	296	4,77	8,72	1,70			-29,7
	303	4,45	8,14	1,60	-8,06	0,073	-30,2
	310	4,34	7,93	1,47			-30,7
$ZnRuTPyP$	296	2,39	4,37	1,48			-29,3
	303	2,22	4,06	1,13	-26,34	0,010	-29,4
	310	2,14	3,91	0,91			-29,5

5.11. Medidas dos tempos de vida de fluorescência na presença do HSA

Um método útil para identificar o mecanismo principal de supressão de fluorescência é a espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo. Se houver não-variância do tempo de vida da proteína (τ) na presença de cada um dos derivados de Ru^{II} é uma indicação clara do mecanismo de supressão de fluorescência via mecanismo de natureza estática, enquanto que uma diminuição significativa em τ revela a ocorrência de processo de supressão dinâmica¹⁰⁵. Parâmetros de fluorescência resolvidos no tempo para a interação dos adutos HSA: Ru^{II}-porfirina ($\lambda_{exc.} = 280$ nm) estão representados na Tabela 8. O HSA apresentou dois tempos de vida de fluorescência ($\tau_1 = 1,50$ e $\tau_2 = 5,47$ ns), sendo que o segundo apresentou a maior porcentagem relativa (81,1%), estando em boa concordância com a literatura¹⁰⁶. Uma vez que na ausência e na presença de cada porfirina na solução de HSA não se alterou significativamente os valores do tempo de vida - os valores de τ são os mesmos dentro do erro experimental, e. $\tau = 5,47$ e 5,38 ns para HSA (sem porfirina) e para o aduto HSA:H₂RuTPyP, respectivamente – sendo isso uma indicação de que há uma predominância do processo estático quando comparado ao mecanismo de supressão dinâmica de fluorescência¹⁰⁷.

Tabela 8: Parâmetros de tempos de vida de fluorescência resolvida no tempo para a formação dos adutos HSA:porfirina em $\lambda_{exc.} = 280$ nm. [HSA] = 10 μ M and [H₂RuTPyP] = [ZnRuTPyP] = 13.2 μ M em solução tampão de PBS (pH 7.4).

	τ_1 (ns)	%	τ_2 (ns)	%	χ^2
HSA	1.50	18.9	5.47	81.1	1.035
HSA:H₂RuTPyP	1.44	17.3	5.38	82.7	1.123
HSA:ZnRuTPyP	1.42	17.0	5.33	83.0	0.998

105 MOLINA-BOLÍVAR, J. A. et al. Simultaneous presence of dynamic and sphere action component in the fluorescence quenching of human serum albumin by diphtaloylmaslinic acid. **Journal of Luminescence**, v. 178, p. 259-266, 2016.

106 GAŁĘCKI, Krystian et al. Experimental and theoretical investigation of bezafibrate binding to serum albumins. **Journal of Luminescence**, v. 177, p. 235-241, 2016.

107 SOUSA-PEREIRA, Danilo et al. Synthesis and biological evaluation of N-aryl-2-phenyl-hydrazinecarbothioamides: Experimental and theoretical analysis on tyrosinase inhibition and interaction with HSA. **Bioorganic chemistry**, v. 81, p. 79-87, 2018.

5.12. Investigação de competição nas subunidades da albumina HSA

Como descrito anteriormente por Sudlow e colaboradores ¹⁰⁸, há dois principais locais de ligação na estrutura do HSA: as subunidades I e II de Sudlow, que estão localizadas no subdomínio IIA e IIIA, respectivamente (ver na Figura 9). O primeiro apresenta alta afinidade pela varfarina, acenocumarina e fenilbutazona, enquanto que o último apresenta alta afinidade pelo ibuprofeno, flurbiprofeno e ácido flufenâmico ¹⁰⁹. Por outro lado, o mesmo relatou que a estrutura do HSA também apresenta um local de ligação externo para os compostos que possuem um elevado volume estérico, tais como a digitoxina e a protoporfirina IX (local III, localizado no subdomínio IB) ^{110, 111}.

Com o objetivo de avaliar o principal sítio de ligação com as porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** em relação à estrutura do HSA, foram realizados estudos de ligação competitiva na presença de varfarina, ibuprofeno e digitoxina a 310 K. As constantes de Stern-Volmer modificadas na presença de cada marcador de subunidade são apresentadas na Figura 35 e a Tabela 9 mostra os valores de K_a para cada caso.

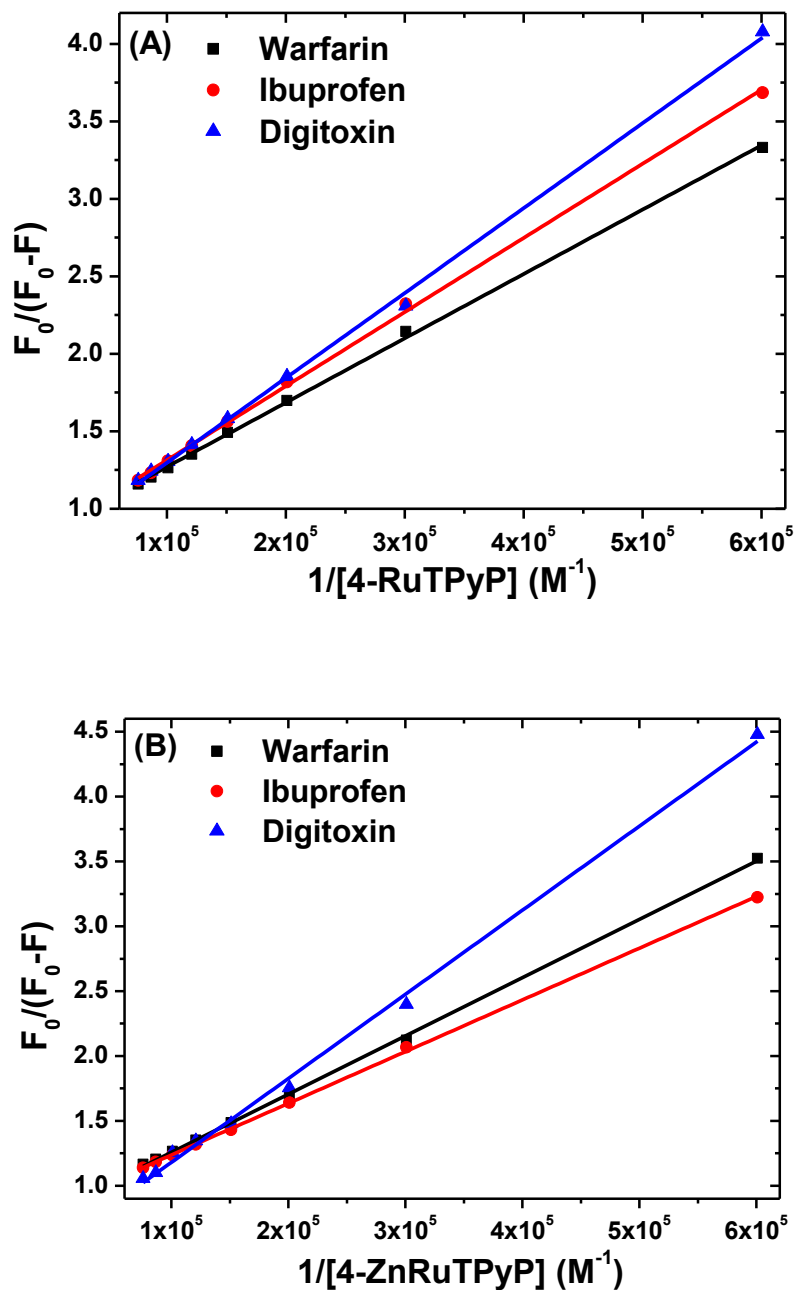
108 SOUSA-PEREIRA, Danilo et al. Synthesis and biological evaluation of N-aryl-2-phenyl-hydrazinecarbothioamides: Experimental and theoretical analysis on tyrosinase inhibition and interaction with HSA. **Bioorganic chemistry**, v. 81, p. 79-87, 2018.

109 SUDLOW, G. D. J. B.; BIRKETT, D. J.; WADE, D. N. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. **Molecular pharmacology**, v. 12, n. 6, p. 1052-1061, 1976.

110 LOPES, Natália Drumond et al. Novel piperonal 1, 3, 4-thiadiazolium-2-phenylamines mesoionic derivatives: Synthesis, tyrosinase inhibition evaluation and HSA binding study. **International journal of biological macromolecules**, v. 112, p. 1062-1072, 2018.

111 CHAVES, Otávio Augusto et al. Investigation of interaction between human plasmatic albumin and potential fluorinated anti-trypanosomal drugs. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 199, p. 103-112, 2017.

Figura 30: Gráficos de Stern-Volmer modificados para a interação HSA:**H₂RuTPyP** (A) e HSA:**ZnRuTPyP** (B) na presença de varfarina, ibuprofeno e digitoxina a 310 K. [HSA] = [varfarina] = [ibuprofeno] = [digitoxina] = 10 μM e [H₂RuTPyP] = [ZnRuTPyP] = 1,7, 3,3, 5,0, 6,6, 8,3, 9,9, 11,5 e 13,2 μM.



Comparando o valor de K_a na ausência e na presença de varfarina ou ibuprofeno em 310 K, há um aumento no valor de ligação, o que sugere um possível efeito alostérico positivo. Foi descrito que o HSA pode sofrer efeito alostérico na presença de alguns marcadores de localização, assim como as nanopartículas podem afetar alostericamente a

capacidade do HSA de se ligar, por exemplo, a ácidos graxos, tiroxina e metais ¹¹². Por outro lado, os valores de K_a diminuíram na presença de digitoxina para HSA:**H₂RuTPyP** (13,6%) e HSA:**ZnRuTPyP** (11,0%), indicando a subunidade III como o principal local de ligação para cada porfirina em estudo ¹¹³. Como a estrutura das porfirinas **H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP** apresenta alto volume estérico, era esperado que essas porfirinas se ligassem a um *pocket* de proteínas mais exposta ao meio aquoso. Na literatura por exemplo, os resultados cristalográficos mostraram a subunidade III como o principal local de ligação da protoporfirina IX ¹¹⁴.

Tabela 9: Valores modificados de Stern-Volmer (K_a) para os adutos de HSA:Ru^{II}-porfirina na ausência e na presença de três marcadores de local (varfarina, ibuprofeno e digitoxina) a pH 7,4 e 310 K.

	$K_a \times 10^5 (M^{-1})$ Sem marcador	$K_a \times 10^5 (M^{-1})$ Varfarina	$K_a \times 10^5 (M^{-1})$ Ibuprofeno	$K_a \times 10^5 (M^{-1})$ Digitoxina
H₂RuTPyP	1.47	2.06	1.74	1.27
ZnRuTPyP	0.91	1.80	2.10	0.81

5.13. Análise da perturbação da estrutura da proteína HSA por espectroscopia de dicroísmo circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é uma técnica útil para averiguar a possível influência do processo de interação na estrutura secundária das proteínas. O HSA apresenta duas bandas negativas na região do ultravioleta, que são características da estrutura α -helicoidal: 208 (transição $\pi \rightarrow \pi^*$) e 222 nm (transição $n \rightarrow \pi^*$) ¹¹⁵. As medições de CD realizadas na presença de concentração mínima e máxima da porfirina base-livre **H₂RuTPyP** utilizada nas medições de fluorescência no estado estacionário

112 SHAO, Qing; HALL, Carol K. Allosteric effects of gold nanoparticles on human serum albumin. **Nanoscale**, v. 9, n. 1, p. 380-390, 2017.

113 NOCTOR, Terence AG; WAINER, Irving W.; HAGE, David S. Allosteric and competitive displacement of drugs from human serum albumin by octanoic acid, as revealed by high-performance liquid affinity chromatography, on a human serum albumin-based stationary phase. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 577, n. 2, p. 305-315, 1992.

114 CHAVES, Otávio Augusto et al. Synthesis, tyrosinase inhibition and transportation behavior of novel β -enamino thiosemicarbazide derivatives by human serum albumin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 254, p. 280-290, 2018.

115 VARLAN, Aurica; HILLEBRAND, Mihaela. Bovine and human serum albumin interactions with 3-carboxyphenoxathiin studied by fluorescence and circular dichroism spectroscopy. **Molecules**, v. 15, n. 6, p. 3905-3919, 2010.

mostraram que a ligação deste derivado de porfirina ao HSA causou uma diminuição da elipticidade em ambas as transições (Figura 36). Assim, a porfirina **H₂RuTPyP** pode perturbar a estrutura secundária do HSA ¹¹⁶. A mesma tendência foi observada para o aduto **HSA:ZnRuTPyP**, que contém o íon metálico central Zn^{II} (Figura 3). Para obter valores quantitativos na perturbação da estrutura da proteína, os resultados de CD foram expressos em termos de elipticidade média do resíduo (MRE) em deg cm² d mol⁻¹, de acordo com a Equação 13:

Equação 13: Equação utilizada para obter valores quantitativos na perturbação da estrutura da proteína

$$MRE = \frac{\theta}{(10 \cdot n \cdot l \cdot C_p)}$$

onde θ é a elipticidade observada (mdeg); n é o número de resíduos de aminoácidos (585 a HSA) ¹¹⁷, l é o caminho óptico da cubeta (1,0 cm) e C_p é a concentração molar do HSA (1,00 μ M). A perda da estrutura α -helicoidal da proteína devido à ligação do ligante foi calculada como conteúdo do HSA livre e combinada dos valores de MRE a 208 e 222 nm, usando as equações abaixo 14 e 15:

Equação 14: Equação para calcular a perda da estrutura α -helicoidal da proteína

$$\alpha - helix\% = \frac{(-MRE_{208} - 4000)}{(33000 - 4000)} \times 100$$

Equação 15: Equação para calcular a perda da estrutura α -helicoidal da proteína

$$\alpha - helix\% = \frac{(-MRE_{222} - 2340)}{30300} \times 100$$

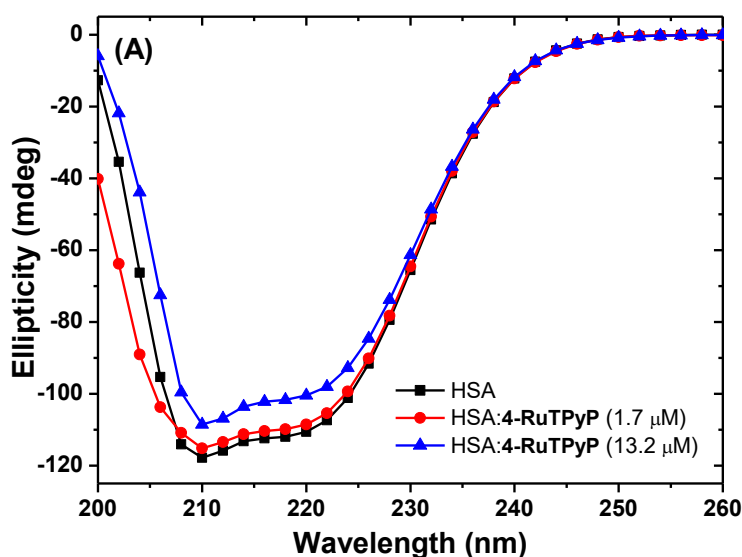
onde MRE₂₀₈ e MRE₂₂₂ são as elipticidades residuais molares significativos (deg cm² d mol⁻¹) a 208 e 222 nm, respectivamente. A Tabela 10 representa os resultados quantitativos de CD para os adutos HSA:Ru^{II}-porfirina. O teor de hélice α da estrutura secundária de HSA na ausência e na presença de cada derivado de Ru^{II} mudou

¹¹⁶ LAKOWICZ, Joseph R. et al. Plasmon-controlled fluorescence: a new paradigm in fluorescence spectroscopy. **Analyst**, v. 133, n. 10, p. 1308-1346, 2008.

¹¹⁷ WARDELL, Mark et al. The atomic structure of human methemalbumin at 1.9 Å. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 291, n. 4, p. 813-819, 2002.

significativamente na concentração máxima de composto, de 53,5 a 44,9% a 208 nm e de 52,9 a 47,6% a 222 nm para o aduto HSA:H₂RuTPyP. Estes cálculos quantitativos são uma confirmação adicional de que a formação do aduto HSA:Ru^{II}-porfirina ocorre com perturbação significativa na estrutura secundária da proteína ¹¹⁸. A presença do íon Zn^{II} no macrociclo porfirínico, causou uma perturbação mais significativa na estrutura secundária da albumina, com uma variação máxima na elipticidade da proteína de cerca de 15,2% a 208 nm, em comparação com 8,60% a 208 nm para a porfirina base-livre H₂RuTPyP. A mesma tendência foi previamente reportada para alguns complexos de Ru^{II}-polipiridil coordenados a porfirinas ¹¹⁹.

Figura 31: Espectro de CD para o HSA na ausência e na presença das porfirinas H₂RuTPyP e ZnRuTPyP a pH 7,4 e 310 K. [HSA] = 1,00 μM e [H₂RuTPyP] = [ZnRuTPyP] = 1,7 e 13,2 μM.



118 TAYYAB, Saad et al. Binding of an anticancer drug, axitinib to human serum albumin: Fluorescence quenching and molecular docking study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 162, p. 386-394, 2016.

119 MILLER, J. N. Photoluminescence and chemiluminescence methods of drug analysis. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 1, n. 4, p. 525-535, 1983.

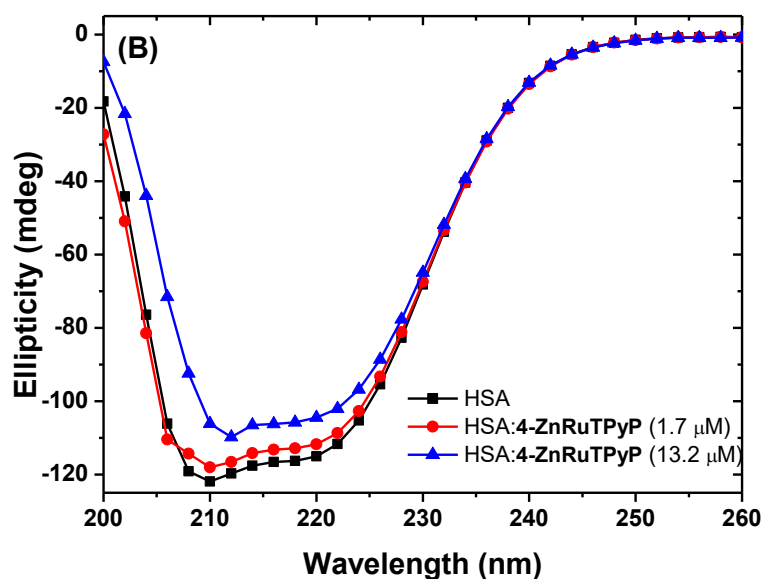


Tabela 10: Porcentagem quantitativa da α -hélice para os adutos HSA:Ru^{II}-porfirina a 208 e 222 nm. [HSA] = 1,00 μ M e [H₂RuTPyP] = [ZnRuTPyP] = 1,7 e 13,2 μ M a 310 K.

	α -hélice % livre		HSA:Ru ^{II} -porfirina α -hélice % (1.7 μ M)		HSA:Ru ^{II} -porfirina α -hélice % (13.2 μ M)	
	208 nm	222 nm	208 nm	222 nm	208 nm	222 nm
H ₂ RuTPyP	53.5	52.9	51.6	51.8	44.9	47.6
ZnRuTPyP	56.4	55.3	53.6	53.6	41.2	49.9

5.14 Docking molecular das porfirinas com HSA

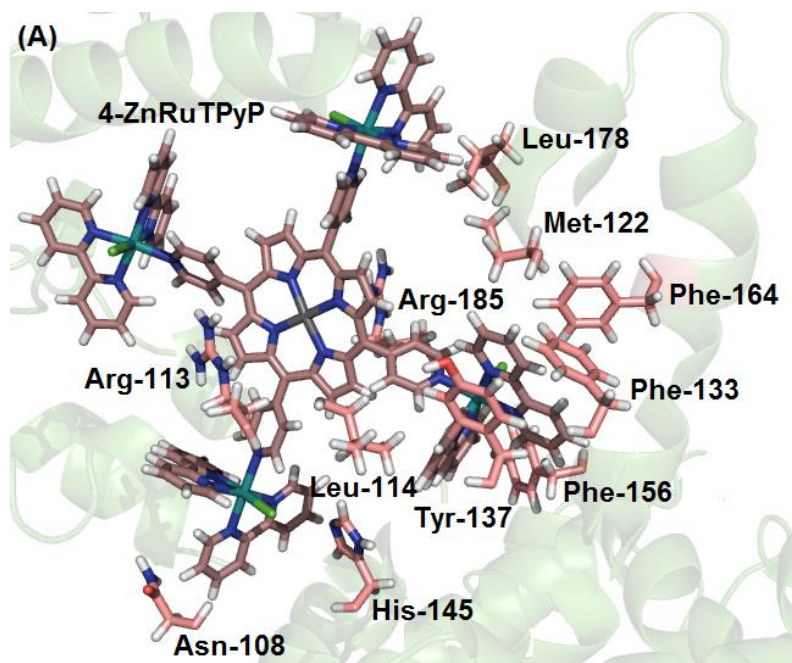
Cálculos teóricos através da abordagem de *docking* molecular são amplamente utilizados para modelar a interação entre uma molécula-alvo e uma macromolécula. Ele fornece informações importantes que podem aumentar a discussão dos resultados experimentais em um nível molecular. Assim, para analisar as principais interações intermoleculares entre cada composto estudado e os resíduos de aminoácidos presentes na cavidade de interação localizada na subunidade III, cálculos de *docking* molecular foram realizados nesta dissertação.

A Figura 37 mostra a superposição da melhor posição para cada porfirina de Ru^{II} na subunidade III. A base-livre H₂RuTPyP e o respectivo complexo de Zn^{II} ZnRuTPyP estão interagindo internamente nesta estrutura de proteínas, como esperado devido à influência de seus grupos substituintes localizados nas posições *meso*. O fluoróforo interno da estrutura de HSA (resíduo de Trp²¹⁴) que é representado como esfera na Figura

37, está próximo de cada porfirina, sugerindo a elevada possibilidade de suprimir a sua fluorescência. Os resultados de acoplamento molecular sugeriram interações eletrostáticas e hidrofóbicas como as principais forças de ligação envolvidas na interação entre HSA e cada derivado de porfirina de Ru^{II} (Tabela 11). Além disso, os cálculos teóricos também sugeriram a presença da interação de van der Waals apenas para as amostras que contêm o íon Zn^{II} no núcleo da porfirina. A Figura 37 mostra o melhor resultado de encaixe para HSA:**H₂RuTPyP** e **ZnRuTPyP**.

Como exemplo, para a porfirina base-livre **H₂RuTPyP**, o grupo guanidínio nos resíduos de aminoácido Arg¹¹³, Arg¹¹⁶ e Arg¹⁹⁶ interagem através de forças eletrostáticas com a estrutura de porfirina a uma distância de 3,40, 3,70 e 2,30 Å, respectivamente. Por outro lado, um dos anéis aromáticos da 2,2'-bipiridina coordenado com complexos de rutênio(II) coordenados à porfirina podem interagir com o resíduo de aminoácido His¹⁴⁵ via empilhamento π - π , a uma distância de 3,20. Finalmente, interações hidrofóbicas foram também detectadas entre a estrutura de **H₂RuTPyP** com os resíduos Leu¹¹⁴, Pro¹¹⁷, Ile¹⁴¹, Leu¹⁵³, Phe¹⁶⁴, Leu¹⁷⁸ e Leu¹⁸¹.

Figura 32: Estudo de modelagem molecular para os derivados porfirínicos. Sendo (A) para **ZnRuTPyP** e (B) para **H₂RuTPyP**.



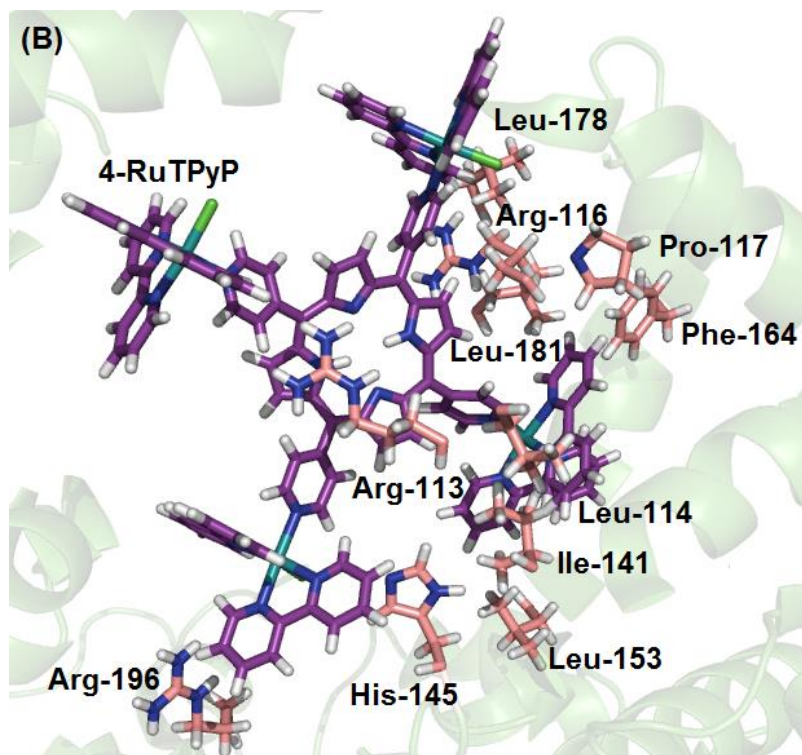


Tabela 11: Resíduos de amino ácidos que participam da interação HSA-Porfirina na subunidade III.

Porfirina	Resíduo de amino ácido	Interação	Distância (Å)
H₂RuTPyP	Arg-113	Eletrostática	3,40
	Leu-114	Hidrofóbica	3,20
	Arg-116	Eletrostática	3,70
	Pro-117	Hidrofóbica	3,60
	Ile-141	Hidrofóbica	3,00
	His-145	π -Stacking	3,20
	Leu-153	Hidrofóbica	2,80
	Phe-164	Hidrofóbica	3,00
	Leu-178	Hidrofóbica	1,30
	Leu-181	Hidrofóbica	2,30
Arg-196	Eletrostática	2,30	
ZnRuTPyP	Asn-108	van der Waals	1,40
	Arg-113	Eletrostática	2.60
	Leu-114	Hidrofóbica	3.00
	Met-122	Hidrofóbica	2.90
	Phe-133	Hidrofóbica	3.30
	Tyr-137	π -Stacking	4.00
	His-145	t -Stacking	3.80

Phe-156	Hidrofóbica	4.00
Phe-164	Hidrofóbica	2.50
Leu-178	Hidrofóbica	1.20
Arg-185	Eletrostática	3.80

Considerações finais

6 Considerações Finais.

Ambas as porfirinas se mostraram resistentes à degradação quando expostas a radiação eletromagnética, como também não apresentaram variações espectrais nos ensaios de agregação. Além disso, seus perfis espectrais não se sobrepueram ao perfil espectral da lâmpada de halogênio, como também foram capazes de absorver radiação eletromagnética (efeito observado e quantificado pelo experimento de determinação de fótons absorvidos). Outras propriedades fotofísicas avaliadas (eficiência e rendimento quântico da geração de oxigênio singleto) deram indicativos de geração de EROs, as quais estão associadas à danos oxidativos ao DNA. Estes dados obtidos para as porfirinas denotaram que ambas são interessantes para serem utilizadas como PS na PDT.

Os valores obtidos por K_b foram consistentes com os da literatura, sendo maiores para a ZnRuTPyP, e o estudo de interação com as biomoléculas mostram que as porfirinas têm preferência por interagir pelo sulco maior do DNA e pela subunidade III do HSA. Os parâmetros termodinâmicos indicam que a interação HSA:H₂RuTPyP é entálpicamente dirigida, enquanto a interação HSA:ZnRuTPyP é entropicamente dirigida.

Todos esses dados dão indícios de que estas porfirinas são ótimas candidatas para estudos *in vitro* para diferentes linhagens de células, pois apresentam forte interação com o DNA e moderada interação com HSA, possibilitando estudos investigativos de farmacocinética, como também de citotoxicidade e seletividade.

Perspectivas futuras

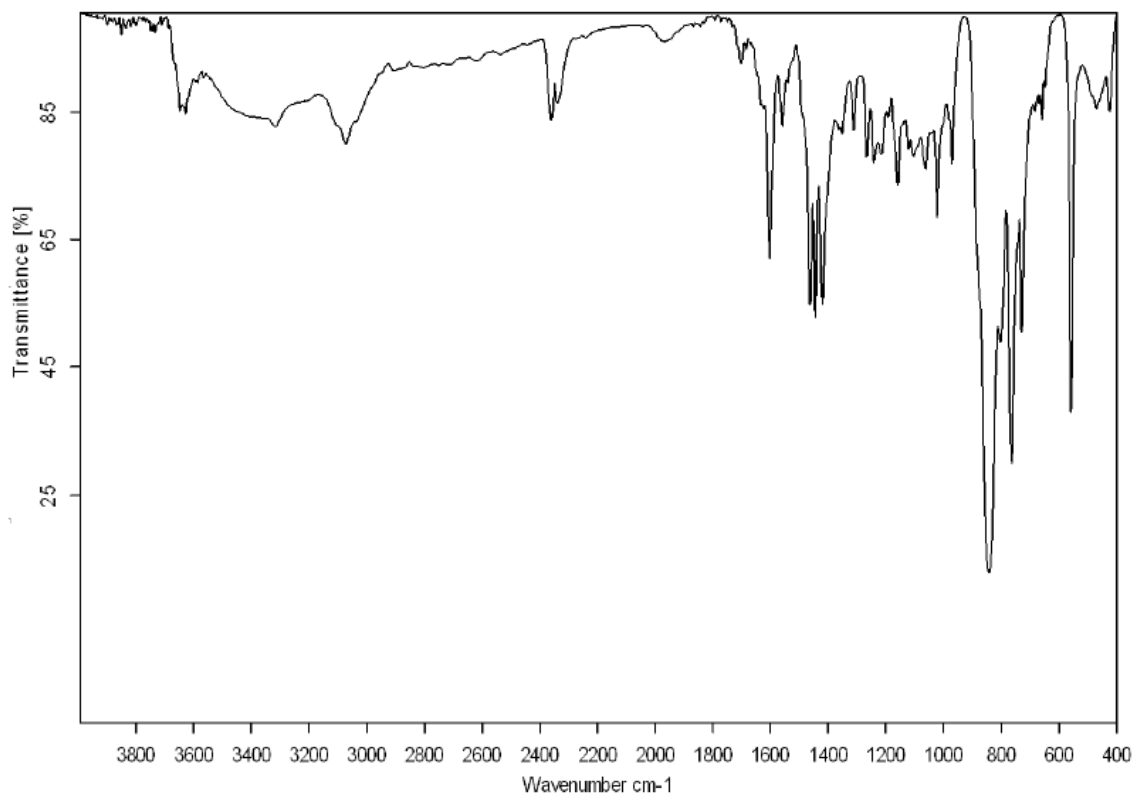
7 Perspectivas futuras

De modo a dar continuidade aos estudos, poderão ser realizadas pesquisas futuras envolvendo o mecanismo hidrolítico de clivagem do DNA em colaboração com outro núcleo de pesquisa da UFSM. Também há a possibilidade de avaliar outros centros metálicos diferentes do íon de Zn^{II} . Além disso, as atividades fotodinâmicas, bem como a interação com biomoléculas das porfirinas estudadas neste trabalho mostraram-se promissoras e as credenciam para estudos envolvendo micro-organismos e diferentes tipos de células tumorais.

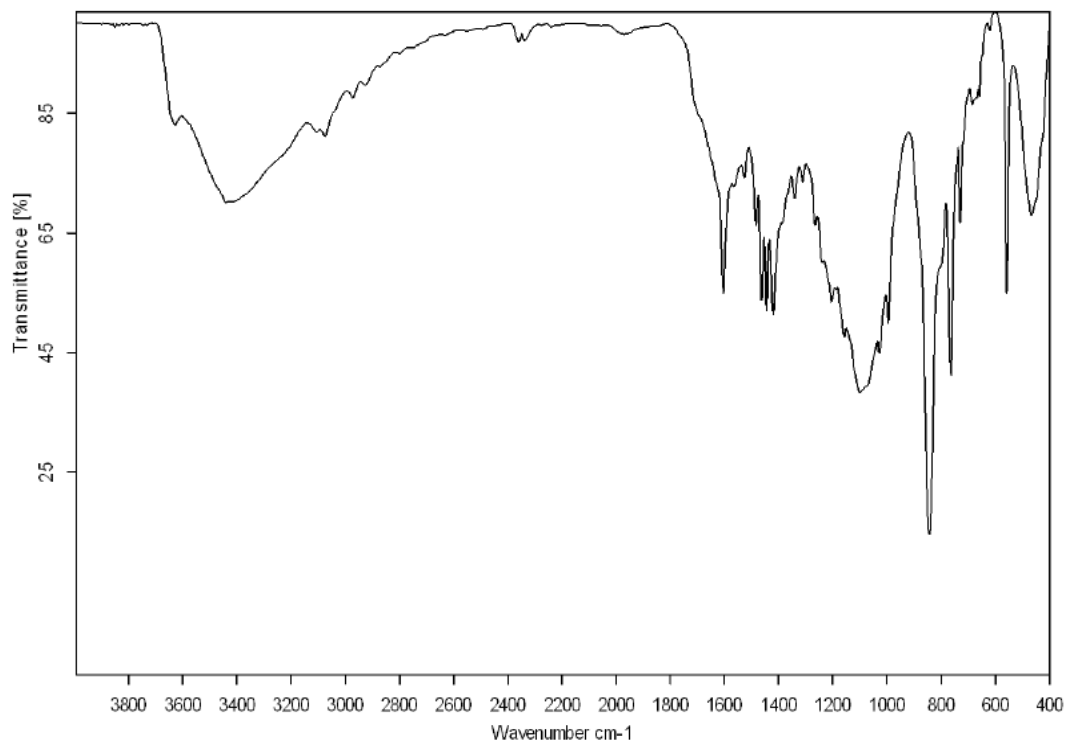
Anexos

8 Anexos

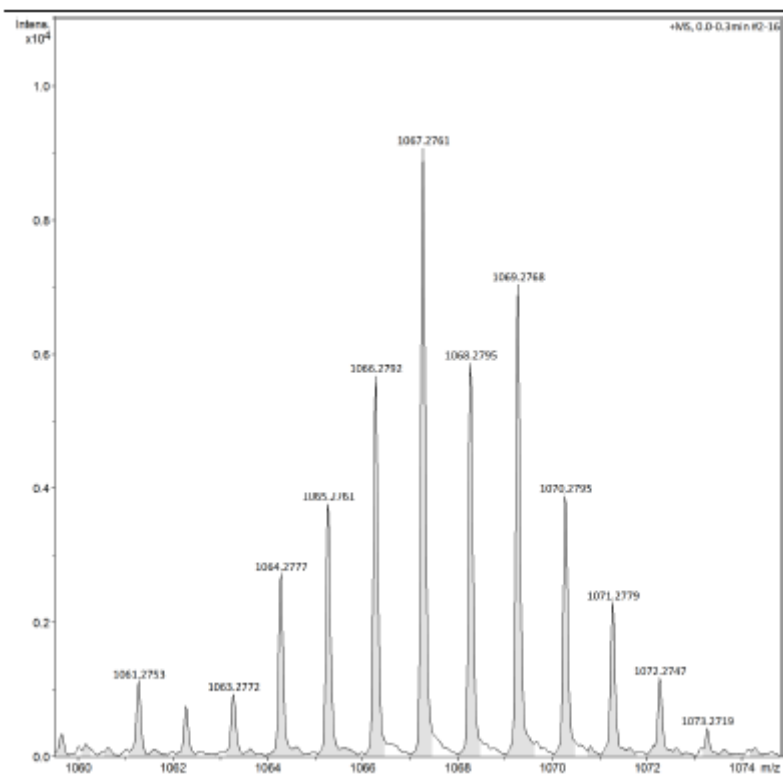
8.1 Espectro na região do Infravermelho para H₂RuTPyP.



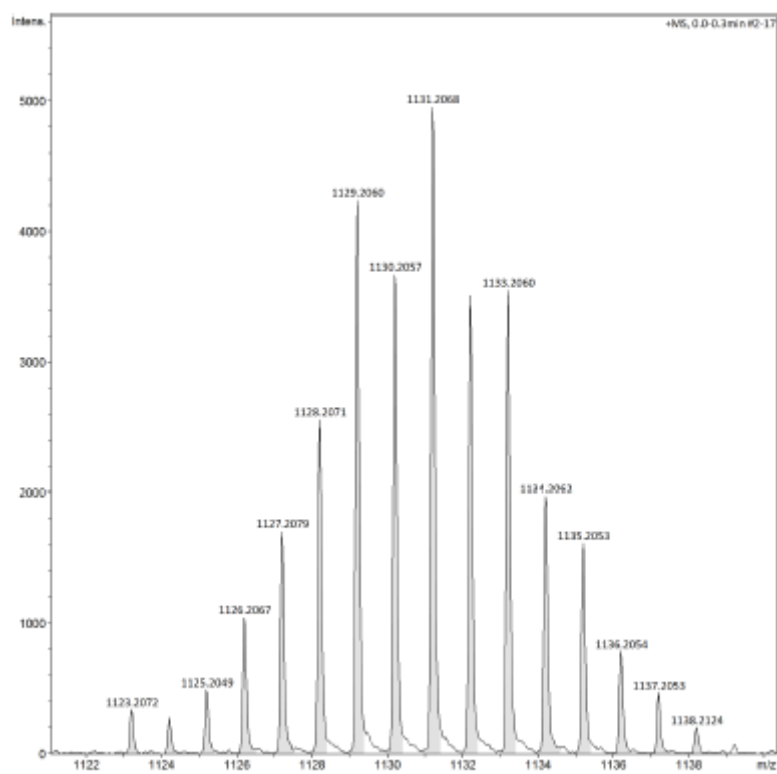
8.2 Espectro na região do Infravermelho para ZnRuTPyP.



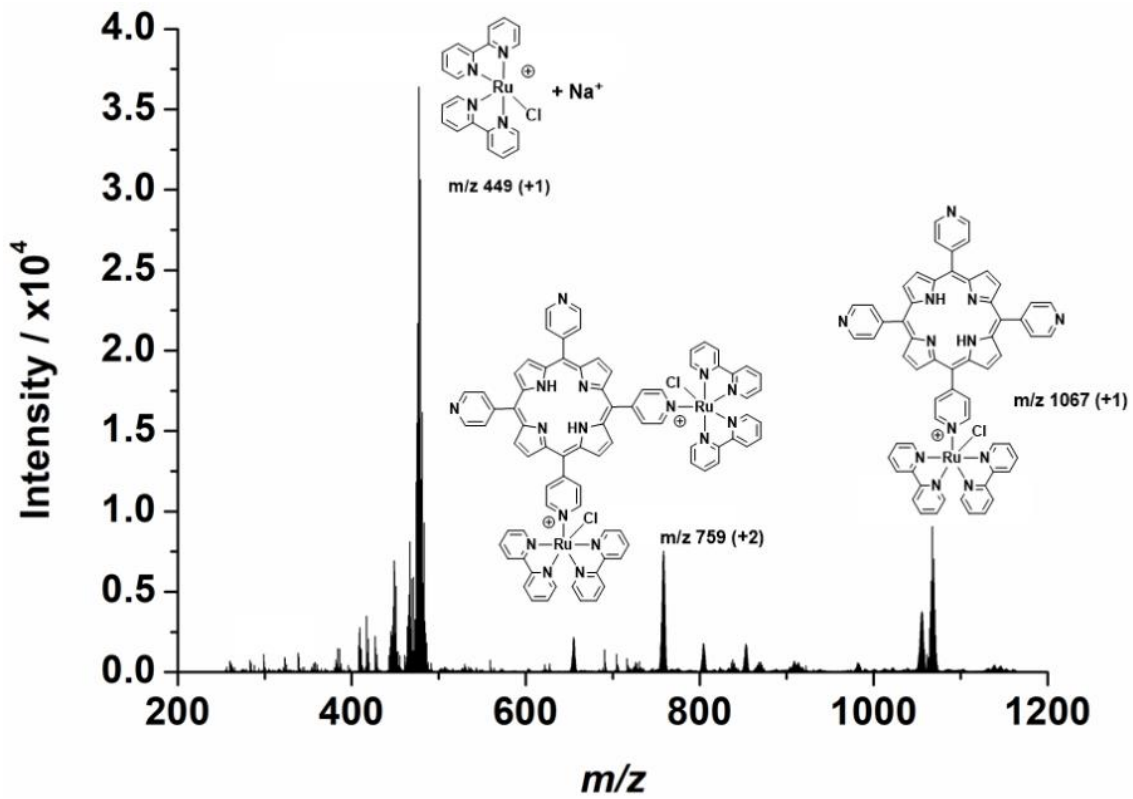
8.3 Espectro de massas para H2RuTPyP.



8.4 Espectro de massas para ZnRuTPyP.



8.5 Espectro de massas para H2RuTPyP.



8.6 Espectro de massas para ZnRuTPyP.

