



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Rua Vinte, 1600. Bairro Tupã. CEP 38304-402, Ituiutaba-MG

**RAFAELA LUCIANO DE OLIVEIRA SANCHES**

**REATIVIDADE DE COMPLEXOS  $[Ru^{II}Cl(X-tpy)(BDQ)]^+$  ( $X=Cl$  OU  $H$ ):  
ASPECTOS NA CINÉTICA DE AQUAÇÃO E INTERAÇÃO COM ALBUMINA  
HUMANA**

**ITUIUTABA**

**2020**

**RAFAELA LUCIANO DE OLIVEIRA SANCHES**

**REATIVIDADE DE COMPLEXOS  $[Ru^{II}Cl(X-tpy)(BDQ)]^+$  ( $X=Cl$  OU  $H$ ):  
ASPECTOS NA CINÉTICA DE AQUAÇÃO E INTERAÇÃO COM ALBUMINA  
HUMANA**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada à  
Comissão Avaliadora como parte das exigências do  
Curso de Graduação em Química: Bacharelado do  
Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da  
Universidade Federal de Uberlândia.  
Orientador: Profª. Drª. Renata Galvão de Lima

**ITUIUTABA  
2020**

**RAFAELA LUCIANO DE OLIVEIRA SANCHES**

**REATIVIDADE DE COMPLEXOS  $[Ru^{II}Cl(X-tpy)(BDQ)]^+$  ( $X=Cl$  OU  $H$ ):  
ASPECTOS NA CINÉTICA DE AQUAÇÃO E INTERAÇÃO COM ALBUMINA  
HUMANA**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada à Comissão Avaliadora como parte das exigências do Curso de Graduação em Química: Bacharelado do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia.

**COMISSÃO AVALIADORA:**

---

Prof. Dr. Fernando Rodrigues Goulart Bergamini

---

Ms. Allyson Leandro Rodrigues dos Santos

---

Profª. Drª. Renata Galvão de Lima (orientadora)

*Dedico este trabalho aos meus pais Frank Sanches e  
Maria Isabel L. de O. Sanches; a minha irmã  
Isabela Sanches.*

*Obrigada pelo apoio, amor, paciência, por estarem ao  
meu lado em todas as situações! Sem vocês nada disso  
seria possível!*

*Eu amo muito vocês!*

*Dedico este trabalho, também, a minha orientadora  
Profa. Dra. Renata Galvão de Lima.*

*Sempre admirei e me espelhei na Renata! Ela é um  
exemplo incrível de profissional, mulher e ser  
humano.*

*Obrigada por todos os ensinamentos, pela paciência,  
pela amizade construída e por me incentivar sempre a  
ser melhor!*

*Foi uma honra trabalhar com você nestes anos (que  
venham mais!!!).*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da minha vida, por me proporcionar viver coisas incríveis e por me amparar nos momentos mais difíceis. É dEle a vitória alcançada em minha vida!

A minha avó materna, Dolores Silva de Oliveira, obrigada por ter convivido comigo tempo suficiente para que eu soubesse o quanto incrível a senhora é/foi. Sei que está e estará comigo sempre. Aos meus avós paternos, Antônio e Maria de Lourdes; a minha madrinha Karla e toda a minha família. O amor, carinho de vocês foram fundamentais para que chegasse até aqui. Amo todos vocês!

Aos meus amigos de classe, Camila, Eduarda, João, Kátia, Laís e Naiad. Obrigada pela amizade, pelas risadas, histórias, por sempre me apoiarem nos momentos difíceis e por ser uma segunda família! Tenho certeza que ficaram mais leves meus dias nestes anos de graduação. Obrigada por tudo, sou muito grata a vocês!

Aos meus veteranos que sempre me apoiaram, ajudaram e aos poucos se tornaram grandes amigos! Obrigada por tudo, me inspira muito em vocês, sou muito grata por aprender com pessoas maravilhosas!

A todos os meus amigos e colegas de laboratório, em especial, Allyson, Andressa, Diele, Giselle, Isabela, Lauro, Marcos e Mateus. Obrigada pelo companheirismo e por, muitas vezes, me auxiliarem, seja dentro ou fora do laboratório.

Aos integrantes do Grupo de Pesquisas em Bioinorgânica (LABBIO), Bianca, Evelyn, Gabriela, Larissa, Luciana, Mayara, Naiara, Vinicius e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Renata Galvão de Lima. Muito obrigada por vocês serem uma família para mim, minha segunda casa e por me proporcionarem momentos incríveis! Somos um grupo unido, que sempre busca a ajudar o próximo. Que honra fazer parte deste time! Este trabalho é nosso!

A todos os professores que fizeram parte da minha formação, desde o ensino básico ao ensino superior, em especial, a todos os professores do curso de Graduação em Química Bacharelado, do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP). Obrigada por todos os ensinamentos e por serem exemplos a serem seguidos.

Inspiro-me muito em vocês! Sou imensamente grata por ter vocês como meus professores!

Ao Prof. Dr. Fernando Rodrigues Goulart Bergamini e ao Ms. Allyson Leandro Rodrigues dos Santos. Obrigada por aceitarem participar deste importante momento da minha vida acadêmica. É uma honra tê-los na banca examinadora deste TCC.

Aos servidores da Universidade Federal de Uberlândia, do Campus Pontal.

*"Se você quiser alguém em quem confiar  
Confie em si mesmo  
Quem acredita sempre alcança!"*

*(Renato Russo)*

## RESUMO

O câncer é um conjunto de doenças que consiste no crescimento descontrolado de células. Estas células podem invadir tecidos e/ou órgãos em um processo chamado de metástase. Portanto, a procura de fármacos que atuem como antitumorais é vasta. Muitos compostos de coordenação que possuem centro metálico de rutênio (II) com ligantes polipíridinicos, se mostram promissores agentes antitumorais. Os complexos de rutênio (II) oferecem perspectivas, pois apresentam estados de oxidação estável em condições fisiológicas, possuem solubilidade em água e estudos indicam menor toxicidade quando comparados aos fármacos de platina (II) convencionais. Em vista disso, realizou-se a síntese, caracterização, determinação da cinética de aquação e interação com a albumina humana dos complexos do tipo  $[Ru^{II}Cl(X-tpy)(BDQ)](PF_6)$  ( $X = H$  ou  $Cl$ ), denominados de  $[Ru(tpy)]$  e  $[Ru(Cl-tpy)]$ . Ambos os complexos  $[Ru(tpy)]$  e  $[Ru(Cl-tpy)]$  apresentam após a síntese isômeros de posição verificados através de análises por CLAE. Os resultados obtidos através do estudo da cinética de aquação, por sua vez, demonstraram que ambos os complexos estudados possuem constante cinética de aquação com ordem de grandeza maior que o complexo *cis*-diaminodicloridoplatina (II). Ao analisar os resultados de supressão de fluorescência, verificou-se a presença de interação entre os complexos  $[Ru(tpy)]$  e  $[Ru(Cl-tpy)]$  com a albumina humana (HSA). Entretanto, ao se observar os valores de  $K_a$ , notou-se que a interação é fraca. Experimentos de supressão de fluorescência síncrona e observou-se que apenas o  $[Ru(tpy)]$  é capaz de alterar o microambiente proteico próximo a um resíduo de aminoácido, Trp-214.

Palavras-chave: Albumina humana (HSA), complexos polipiridínicos de rutênio (II), cinética de aquação.

## ABSTRACT

Cancer is a disease that consists of uncontrolled cell growth. These cells can invade tissues and / or organs in a process called metastasis. However, the demand for drugs that act as antitumor drugs is vast. Many coordination compounds that have a metallic ruthenium (II) center with polypyridine ligands, show promising anti-tumor agents. The ruthenium (II) complexes offered perspectives, an oxidation states stable under physiological conditions, solubility in water and less toxicity when compared to conventional platinum (II) drugs. This work described the synthesis, characterization, determination of the aquation kinetics and interaction with human albumin of complexes of the type  $[Ru^{II}Cl(X-tpy)(BDQ)](PF_6)$  ( $X = H$  or  $Cl$ ), denominated from  $[Ru(tpy)]$  and  $[Ru(Cl-tpy)]$ . Both the  $[Ru(tpy)]$  and  $[Ru(Cl-tpy)]$  complexes, after synthesis, present position isomers verified through HPLC analysis. The results obtained through the study of aquation kinetics, in turn, demonstrated that both studied complexes have constant aquation kinetics with an order of magnitude greater than the *cis*-diaminodichloridoplatin (II) complex. When analyzing the results of suppression of fluorescence, it was verified the presence of interaction between the  $[Ru(tpy)]$  and  $[Ru(Cl-tpy)]$  complexes with human albumin (HSA). However, when observing the  $K_a$  values, it was noted that the interaction is weak. Synchronous fluorescence suppression experiments and it was observed that only  $[Ru(tpy)]$  is able to alter the protein microenvironment close to an amino acid residue, Trp-214.

**Keywords:** Human albumin (HSA), ruthenium (II) polypyridine complexes, aquation kinetics.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema simplificado de como ocorre o surgimento de um câncer.....	18
<b>Figura 2.</b> Complexos <i>cis</i> -diaminodicloridoplatina (II) ( <b>A</b> ) e <i>trans</i> -diaminodiclorido platina(II) ( <b>B</b> ).....	20
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de entrada da cisplatina na célula e sua ligação com o DNA.....	21
<b>Figura 4.</b> Estrutura química dos complexos carbopaltina ( <b>A</b> ) e oxaliplatina ( <b>B</b> ).....	29
<b>Figura 5.</b> Complexos polipiridínicos de rutênio em estudos descritos na literatura .....	25
<b>Figura 6.</b> Representações tridimensionais das estruturas terciárias da HSA e da BSA.....	27
<b>Figura 7.</b> Estruturas químicas dos complexos [Ru(tpy)] ( <b>A</b> ) e [Ru(Cl-tpy)] ( <b>B</b> ). ....	29
<b>Figura 8.</b> Eletrodo de trabalho de um SPE utilizado nas medidas eletroquímicas .....	35
<b>Figura 9.</b> Espectros vibracionais na região do IR para os complexos [Ru(tpy)] (-) e [Ru(Cl-tpy)] (-).....	41
<b>Figura 10.</b> Espectro de absorção na região do UV/Vis. para o complexo [Ru(tpy)] a $4,91 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> em KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> .....	42
<b>Figura 11.</b> Espectro de absorção na região do UV/Vis. para o complexo [Ru(Cl-tpy)] a $4,91 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> em KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> .....	43
<b>Figura 12.</b> Espectros eletrônicos na região do UV-vis. para o complexo [Ru(tpy)] obtidos a cada 5s, em temperatura controlada de 37°C em H <sub>2</sub> O em (A) e em PBS pH=7,4 (B). T= 0s (-); T= 5s (-); T= 10s (-); T= 15s (-); T= 20s (-); T=25s (-); T=30s (-); T=35s (-); T=40s (-); T= 45s (-); T= 50s (-); T= 55s (-); T=60s (-); T=65s (-); T=70s (-); T=75s (-); T=80s (-); T= 85s (-); T=90s (-); T=95s (-).....	47
<b>Figura 13.</b> O Espectros eletrônicos na região do UV-vis. para o complexo [Ru(Cl-tpy)] obtidos a cada 5s, em temperatura controlada de 37°C em H <sub>2</sub> O em (A) e em PBS pH=7,4 (B). T= 0s (-); T= 5s (-); T= 10s (-); T= 15s (-); T= 20s (-); T=25s (-); T=30s (-); T=35s (-); T=40s (-); T= 45s (-); T= 50s (-); T= 55s (-); T=60s (-); T=65s (-); T=70s (-); T=75s (-); T=80s (-); T= 85s (-); T=90s (-); T=95s (-).....	48

<b>Figura 14.</b> Os voltamogramas de pulso diferencial do complexo [Ru(tpy)] foram registrados em tempos diferentes, tempo zero (ciclo 1,) (-) e após 10 minutos (ciclo 5), (-).....	51
<b>Figura 15.</b> Os voltamogramas de pulso diferencial do complexo [Ru(Cl-tpy)] foram registrados em tempos diferentes, tempo zero (ciclo 1,) (-) e após 10 minutos (ciclo 5), (-). ..	52
<b>Figura 16.</b> Estruturas químicas dos isômeros do complexo [Ru(tpy)].....	61
<b>Figura 17.</b> Cromatogramas de separação do complexo [Ru(tpy)]. Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 1% de ácido trifluoracético:metanol (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 min (-) e 20 min (--).....	54
<b>Figura 18.</b> Espectros de absorção na região do UV/Vis. para o complexo [Ru(tpy)], referente aos picos : T= zero, Pico 1 ( <b>A</b> ); T=zero, Pico2 ( <b>B</b> ); T= 20 min, Pico 3 ( <b>C</b> ); T= 20 min, Pico 4 ( <b>D</b> ) e T= 20 min, Pico 1 ( <b>E</b> ) do cromatograma.....	55
<b>Figura 19.</b> Cromatogramas de separação do complexo [Ru(Cl-tpy)]. Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 1% de ácido trifluoracético:metanol (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 min (-) e 20 min (--).....	57
<b>Figura 20.</b> Espectro de absorção na região do UV/Vis. para o complexo Ru[(Cl-tpy)], referente aos picos: T= zero, Pico 1 ( <b>A</b> ); T=zero, Pico 2 ( <b>B</b> ); T=20min, Pico 3 ( <b>C</b> ) e T=20min, Pico 4 ( <b>D</b> ) do cromatograma ..	58
<b>Figura 21.</b> Espectros de fluorescência para a HSA em presença dos complexos [Ru(tpy)] ( <b>A</b> ) e [Ru(Cl-tpy)] ( <b>B</b> ), em PBS (pH=7,4) a 308 K. $\lambda_{exc}$ =280 nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. [HSA]=1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-); [Complexo]= 3,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; Tempo de incubação:4min.....	60
<b>Figura 22.</b> Espectros de absorção na região do UV/Vis. para a HSA e os complexos [Ru(tpy)], em PBS (pH=7,4) a 308 K - [HSA]=1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-); [Complexo]=0- $1,65\times10^{-5}$ $\mu\text{mol L}^{-1}$ [4,93x10 <sup>-7</sup> (-); 1,14x10 <sup>-7</sup> (-); 1,64x10 <sup>-6</sup> (-); 3,26x10 <sup>-6</sup> (-); 4,07x10 <sup>-6</sup> (-); 4,88x10 <sup>-6</sup> (-); 5,68x10 <sup>-6</sup> (-); 6,49x10 <sup>-6</sup> (-); 7,28x10 <sup>-6</sup> (-); 8,08x10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup> (-)].....	62
<b>Figura 23.</b> Espectros de emissão de fluorescência para a HSA e os complexos [Ru(Cl-tpy)], em PBS (pH=7,4) a 308 K - [HSA]=1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-); [Complexo]=0- $1,65\times10^{-5}$ $\mu\text{mol L}^{-1}$ [4,93x10 <sup>-7</sup> (-); 8,22x10 <sup>-7</sup> (-); 1,15x10 <sup>-7</sup> (-); 1,64x10 <sup>-6</sup> (-); 2,46x10 <sup>-6</sup> (-); 3,27x10 <sup>-6</sup> (-); 4,08x10 <sup>-6</sup> (-); 4,89x10 <sup>-6</sup> (-); 5,69x10 <sup>-6</sup> (-); 6,50x10 <sup>-6</sup> (-); 7,30x10 <sup>-6</sup> (-); 8,09x10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup> (-)].....	63
<b>Figura 24.</b> Espectros de emissão de fluorescência para a HSA e os complexos [Ru(tpy)], em PBS (pH=7,4) a 308 K - [HSA]=1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-); [Complexo]=0- $1,65\times10^{-5}$	

$5 \mu\text{mol L}^{-1}$  [ $4,93 \times 10^{-7}$  (-);  $8,20 \times 10^{-7}$  (-);  $1,14 \times 10^{-7}$  (-);  $1,64 \times 10^{-6}$  (-);  $2,45 \times 10^{-6}$  (-);  
 $3,26 \times 10^{-6}$  (-);  $4,07 \times 10^{-6}$  (-);  $4,88 \times 10^{-6}$  (-);  $5,68 \times 10^{-6}$  (-);  $6,49 \times 10^{-6}$  (-);  $7,28 \times 10^{-6}$  (-);  
 $8,08 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (-)].....64

**Figura 25.** Espectros de emissão de fluorescência para a HSA e os complexos [Ru(Cl-tpy)], em PBS (pH=7,4) a 308 K - [HSA]= $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (-); [Complexo]=0 -  $8,09 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  [ $4,93 \times 10^{-7}$  (-);  $8,22 \times 10^{-7}$  (-);  $1,15 \times 10^{-7}$  (-);  $1,64 \times 10^{-6}$  (-);  $2,46 \times 10^{-6}$  (-);  
 $3,27 \times 10^{-6}$  (-);  $4,08 \times 10^{-6}$  (-);  $4,89 \times 10^{-6}$  (-);  $5,69 \times 10^{-6}$  (-);  $6,50 \times 10^{-6}$  (-);  $7,30 \times 10^{-6}$  (-);  
 $8,09 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (-)].....65

**Figura 26.** Gráficos de Stern-Volmer acerca das interações entre a HSA e os complexos [Ru(tpy)] (**A**) e [Ru(Cl-tpy)] (**B**), em PBS (pH=7,4) em temperatura de 308K.  $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ . Janelas de excitação/emissão :5/20 nm.....67

**Figura 27.** Gráficos de  $\log\{\langle F_0 - F \rangle / F\}$  em função de  $\log[\text{Ru(tpy)}]$  (**A**) e  $\log[\text{Ru(Cl-tpy)}]$  (**B**) na temperatura de 310K.....69

**Figura 28.** Cromatograma de separação do complexo [Ru(tpy)]. Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 0,1% de ácido trifluoracético:metanol (85:15 v/v), incubado em PBS durante 2h a 310K, concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  do complexo em PBS (**A**) e os respectivos espectros UV/VIS. com tempo de retenção 3,25 min (**B**); tempo de retenção 3,86 min (**C**) e tempo de retenção 4,48 min (**D**).....72

**Figura 29.** Cromatograma do complexo [Ru(tpy)] incubado em HSA durante 2h a 310K, concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  do complexo em HSA (**A**) e os respectivos espectros UV/VIS. com tempo de retenção 3,45 min (**B**); tempo de retenção 4,20 min (**C**); tempo de retenção 4,88 min (**D**) .....77

**Figura 30.** Cromatograma de separação do complexo [Ru(tpy)]. Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 0,1% de ácido trifluoracético:metanol (85:15 v/v), incubado em HSA durante 2h a 310K, concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  do complexo em HSA (**A**) e os respectivos espectros UV/VIS. com tempo de retenção 3,45 min (**B**); tempo de retenção 4,20 min (**C**); tempo de retenção 4,88 min (**D**).....78

**Figura 31.** Cromatograma de separação do complexo [Ru(Cl-tpy)]. Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 0,1% de ácido trifluoracético:metanol (85:15 v/v), incubado em HSA durante 2h a 310K, concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  do complexo em HSA (**A**) e os respectivos espectros UV/VIS. com tempo de retenção 4,91 min (**B**); tempo de retenção 6,21 min (**C**); tempo de retenção 8,91 (**D**) e tempo de retenção 10,61 min (**E**).....80

**Figura 32.** Espectros de supressão de fluorescência síncrona para a HSA em presença do complexo [Ru(tpy)], em PBS (pH=7,4) a 308 K.  $\lambda_{\text{exc}}=280 \text{ nm}$ . Janelas de

excitação/emissão: 5/20 nm. (A)  $\Delta\lambda = 15$  nm; (B)  $\Delta\lambda = 60$  nm. [HSA]=1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (-); [Complexo]=0-8,08  $\mu\text{mol L}^{-1}$  [4,93x10<sup>-7</sup> (-); 8,20x10<sup>-7</sup> (-); 1,14x10<sup>-7</sup> (-); 1,64x10<sup>-6</sup> (-); 2,45x10<sup>-6</sup> (-); 3,26x10<sup>-6</sup> (-); 4,07x10<sup>-6</sup> (-); 4,88x10<sup>-6</sup> (-); 5,68x10<sup>-6</sup> (-); 6,49x10<sup>-6</sup> (-); 7,28x10<sup>-6</sup> (-); 8,08x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> (-)].....84

**Figura 33.** Espectros de supressão de fluorescência síncrona para a HSA em presença do complexo [Ru(Cl-tpy)], em PBS (pH=7,4) a 308 K.  $\lambda_{\text{ex}}c=280$  nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. (A)  $\Delta\lambda = 15$  nm; (B)  $\Delta\lambda = 60$  nm. [HSA]=1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (-); [Complexo]=0 - 8,09x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> [4,93x10<sup>-7</sup> (-); 8,22x10<sup>-7</sup> (-); 1,15x10<sup>-7</sup> (-); 1,64x10<sup>-6</sup> (-); 2,46x10<sup>-6</sup> (-); 3,27x10<sup>-6</sup> (-); 4,08x10<sup>-6</sup> (-); 4,89x10<sup>-6</sup> (-); 5,69x10<sup>-6</sup> (-); 6,50x10<sup>-6</sup> (-); 7,30x10<sup>-6</sup> (-); 8,09x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> (-)].....85

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Reagentes utilizados durante a síntese, caracterização e posteriores estudos acerca dos complexos, sua pureza percentual e procedência. ....	30
<b>Tabela 2.</b> Porcentagem obtida experimentalmente de carbono, hidrogênio e nitrogênio, em comparação aos valores teóricos. ....	40
<b>Tabela 3.</b> Dados espectroscópicos para os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)], seus coeficientes de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) e suas atribuições. ....	45
<b>Tabela 4.</b> Dados cinéticos para as reações de aquação dos complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)]. ....	49
<b>Tabela 5.</b> Valores de $k_{aq}$ e $t_{1/2}$ , obtidos para complexos polipiridínicos de Rutênio já descritos na literatura.. ....	50
<b>Tabela 6.</b> Valores de $K_{sv}$ , $K_a$ e $n$ para os complexos HSA-[Ru(tpy)], HSA-[Ru(Cl-tpy)] e para os demais complexos polipiridínicos de Rutênio já descritos na literatura, em temperatura de 308K.....	68
<b>Tabela 7.</b> Valores teóricos de logaritmo de partição (logP) teóricos e experimentais para o [Ru(tpy)], [Ru(Cl-tpy)] e e para os demais complexos polipiridínicos de Rutênio já descritos na literatura.....	71

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\lambda$	Comprimento de onda
$\lambda_{\text{em}}$	Comprimento de onda de emissão
$\lambda_{\text{exc}}$	Comprimento de onda de excitação
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo
$K_a$	Constante de associação
$k_{\text{aq}}$	Constante da cinética de aquação
$K_{\text{SV}}$	Constante de Stern-Volmer
$k_q$	Constante de velocidade bimolecular de supressão
$F_0$	Intensidade de fluorescência da biomolécula em ausência do supressor
$F$	Intensidade de fluorescência da biomolécula em presença do supressor
$n$	Número de sítios de ligação
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
$\log P$	logaritmo coeficiente de partição

# Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	18
1.1 Câncer .....	18
1.2 Complexos de Coordenação e Atividade Biológica .....	19
1.2.1 Complexos de platina .....	19
1.2.2 Complexos Polipiridínicos de Rutênio (II) .....	24
1.3 Albumina Humana (HSA) .....	27
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	28
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	30
3.1 Reagentes .....	30
3.2 Procedimentos Experimentais .....	31
3.2.1 Síntese dos Complexos de Rutênio Polipiridínicos .....	31
3.2.1.1 Síntese do Complexo [RuCl <sub>3</sub> (tpy)] .....	31
3.2.1.2 Síntese do Complexo [RuCl(tpy)(BDQ)]PF <sub>6</sub> .....	31
3.2.1.3 Síntese do Complexo [RuCl <sub>3</sub> (Cl-tpy)]. .....	32
3.2.1.4 Síntese do Complexo [RuCl(Cl-tpy)(BDQ)](PF <sub>6</sub> ).....	32
3.2.2 Caracterização dos Complexos de Rutênio.....	33
3.2.2.1 Análise Elementar do Complexo [Ru(Cl-tpy)] .....	33
3.2.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR) .....	33
3.2.2.3 Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível (UV/Vis.) .....	33
3.2.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	33
3.3.4 Avaliação da constante cinética de aquação dos Complexos de Rutênio.....	34
3.3.5 Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos de Rutênio.....	35
3.3.5.1 Preparação da Solução Tampão Fosfato (PBS) pH=7,4 .....	36
3.3.5.2 Preparação da Solução Estoque de HSA a 1,0 µmol L <sup>-1</sup> .....	37
3.3.5.3 Avaliação do Tempo de Interação entre a HSA e os Complexos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência.....	37
3.3.5.4 Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência.....	37
3.3.5.5 Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos de Rutênio através do processo de diálise via CLAE.....	38
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	39
4.1 Caracterização do Complexos de Rutênio Polipiridínicos.....	39

<b>4.1.1 Análise Elementar do Complexo [Ru(Cl-tpy)] .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR).....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.3 Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível (UV/Vis.).....</b>	<b>42</b>
<b>4.1.4 Estudo da Cinética de Aquação dos Complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cltpy)].....</b>	<b>46</b>
<b>4.1.5 Estudo da Cinética de Aquação dos Complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] via eletroquímica .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....</b>	<b>53</b>
<b>4.2 Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Polipiridínicos de Rutênio .....</b>	<b>59</b>
<b>    4.2.1 Avaliação do Tempo de Interação entre a HSA e os Complexos Polipiridínicos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência .....</b>	<b>58</b>
<b>    4.2.2. Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Rutênio Polipiridínicos via Espectroscopia na Região do UV/Vis.. .....</b>	<b>61</b>
<b>    4.2.3 Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Polipiridínicos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência .....</b>	<b>64</b>
<b>    4.2.4 Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos de Rutênio através do processo de diálise via CLAE.....</b>	<b>71</b>
<b>    4.2.5 Avaliação dos Sítios de Interação entre a HSA e os Complexos Polipiridínicos de Rutênio .....</b>	<b>83</b>
<b>        4.2.5.1. Avaliação dos Sítios de Interação entre a HSA e os Complexos Polipiridínicos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência Síncrona (<math>\Delta\lambda = 15 \text{ nm} / \Delta\lambda = 60 \text{ nm}</math>) .....</b>	<b>83</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>89</b>

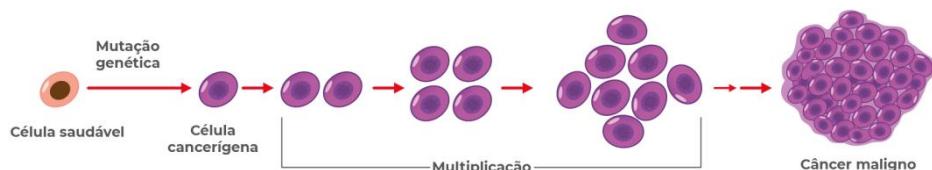
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer

O câncer é um conjunto de doenças que consiste em um crescimento desordenado e descontrolado de células. Este crescimento é chamado de carcinogênese/oncogênese, pois possui características fenotípicas diferenciadas, quando comparadas a células normais (INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em:<[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acesso em: 10/10/2020), podendo eventualmente invadir outros órgãos e tecidos em um processo chamado metástase.

A Figura 1 apresenta um esquema simplificado de como ocorre o surgimento de um câncer.

**Figura 1.** Esquema simplificado de como ocorre o surgimento de um câncer.



Fonte: Medicar. Disponível em:<[www.medicar.com.br](http://www.medicar.com.br)>. Acesso em: 21/12/2020

As alterações podem ocorrer em genes especiais, os quais são conhecidos como proto-oncogenes, que estão inativos em células normais. Se esses genes especiais forem ativados, tornam-se oncogênese, sendo responsáveis em transformar as células saudáveis em células cancerosas, modificando os perfis de metabolismo e homeostase celular (INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em:<[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acesso em: 10/10/2020).

Os tumores são divididos entre benignos e malignos, os quais são chamados de neoplasias. As neoplasias benignas tem um crescimento organizado e dificilmente invadem tecidos vizinhos. Já as neoplasias malignas, conhecidas como câncer, tem a capacidade de invadir tecidos vizinhos, tem grandes chances de metástases e possui um crescimento desorganizado (INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em:<[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acesso em: 10/10/2020).

No Brasil, os tipos de câncer mais frequentes em mulheres são os de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%).

Já em homens, o câncer de próstata lidera com (29,2%), em seguida, cólon e reto (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Estima-se que entre os anos de 2020 a 2022 surgirão 625 mil novos casos de câncer sendo, dentre estes novos casos (INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em:<[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acesso em: 10/10/2020).

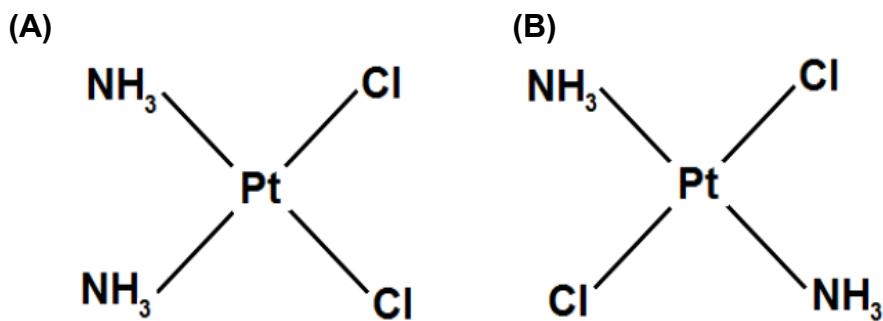
A incidência do câncer quer seja em função de uma maior susceptibilidade genética, quer seja através da interferência de agentes externos cada vez mais presentes na sociedade contemporânea faz com que seja imperativo o desenvolvimento de estratégias terapêuticas efetivas, dentre as quais, os complexos metálicos vêm se mostrando promissores. A seguir serão apresentados aspectos das atividades antiproliferativas de compostos de coordenação.

## **1.2 Complexos de Coordenação e Atividade Biológica**

### **1.2.1 Complexos de platina (II)**

A descoberta ocasional da atividade antiproliferativa do complexo de coordenação *cis*-diaminodicloridoplatina (II) (Cisplatina) da década de 1960 estimulou o interesse por compostos de coordenação como possíveis fármacos no tratamento do câncer. Historicamente, a cisplatina foi sintetizada inicialmente por Michele Peyrone em 1845, como componente do chamado cloreto de Peyrone, sendo sua estrutura sugerida por Alfred Werner em 1893. Neste estudo Werner sugeriu que o cloreto de Peyrone era composto por uma mistura de dois isômeros de platina (II): *trans*-diaminodicloridoplatina (II)platina (II) e *cis*-diaminodicloridoplatina (II). A Figura 2 mostra os isômeros de cisplatina (LIPPARD, 1982).

**Figura 2.** Estrutura química dos complexos *cis*-diaminodicloridoplatina(II) (A) e *trans*-diaminodicloridoplatina(II) (B).



Fonte: Autora

Assim como relatado, entretanto, a atividade antiproliferativa a cisplatina foi descoberta somente na década de 1960 por Barnett Rosenberg. Rosenberg buscava compreender o efeito de campos elétricos sob o crescimento de bactérias *Escherichia coli*, utilizando no meio de crescimento bacteriano cloreto de amônio. Ao aplicar o campo elétrico, Rosenberg notou que as bactérias não se multiplicavam formando, entretanto, filamentos alongados. Estes experimentos foram realizados utilizando um eletrodo de platina que, frente ao meio de cultura rico em cloreto de amônio, gerou espécies de platina (II) e (IV). Estas espécies foram posteriormente caracterizadas quanto às suas composições, estrutura e atividades antiproliferativas sendo a *cis*-diaminadicloridoplatina(II), ou cisplatina, o composto com maior capacidade inibitória do crescimento bacteriano. De maneira interessante, a transplatina, outro produto da oxidação do eletrodo, não apresentou capacidade inibitória frente as bactérias *Escherichia coli* (KELLAND, 2007)

Em experimentos subsequentes em camundongos, verificou-se que a cisplatina foi capaz de inibir completamente o crescimento de tumores sarcoma 180 e leucemia L1210. O uso da cisplatina em humanos teve início na década de 1970 em pacientes terminais, e logo em seguida em pacientes com tumores do sistema urogenital (ROSENBERG, 1970).

Atualmente, cisplatina é um fármaco amplamente utilizado como fármaco antitumoral, sendo os utilizada frente a tumores de cabeça, pescoço, pulmão e do sistema geniturinário. Vale ressaltar que a cisplatina apresentou uma eficácia

especial no tratamento de câncer testicular, o qual apresentava uma alta taxa de mortalidade em pacientes. Como anteriormente mencionado, o isômero *trans*-diaminodicloridoplatina (II) não apresenta atividade antitumoral (COHEN, et.al., 2001; CHANEY, et.al., 2004).

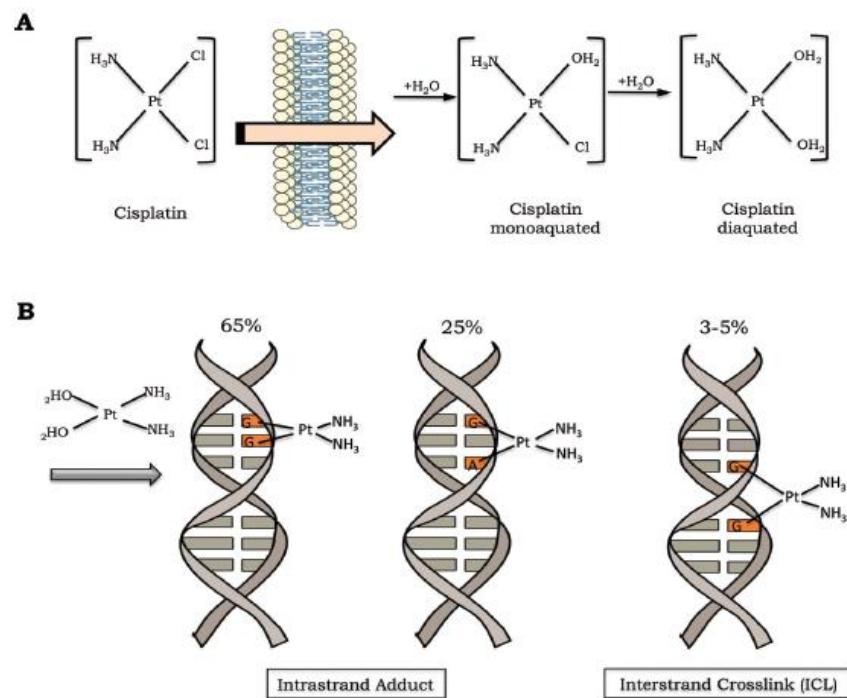
A descoberta da atividade antitumoral da cisplatina foi um marco para a Medicina e Química Inorgânica e a partir disso, vários compostos metálicos começaram a ser estudados. Atualmente, outros complexos de platina (II) são utilizados na clínica médica como, por exemplo, a carboplatina e a oxaliplatina.

Vale ressaltar que, apesar dos compostos de Pt (II) serem só 6% do total de fármacos utilizados mundialmente frente a neoplasias malignas, eles são utilizados em cerca de 50% dos tratamentos de câncer (FONTES, 2005).

Embora os compostos de Pt(II) apresentem grande sucesso, mesmos apresentam nefrotoxicidade , neurotoxicidade. Mais além, algumas neoplasias são refratárias a complexos de Pt(II) e em muitos casos muitos tumores podem desenvolver resistência a estes fármacos. Apesar de o mecanismo de ação da cisplatina não ter sido descrito completamente, estudos mostram que o complexo apresenta reações de substituição, denominadas de reações de aquação, as quais substituem os ligantes Cl<sup>-</sup> por ligantes H<sub>2</sub>O (NUSSBAUM, 2008). O complexo de cisplatina é inerte e torna-se ativo quando ocorre hidrólise, por isso pode ser classificado como um pró-fármaco.

Ainda está sob estudos os mecanismos bioquímicos envolvidos na entrada da cisplatina na célula, mas sabe-se que a captação celular da cisplatina se dá parcialmente através difusão passiva e parcialmente através de mecanismos ativos (NUSSBAUM, 2008). A Figura 3 apresenta o mecanismo de ação da cisplatina, a entrada do complexo na célula e sua ligação com o DNA.

**Figura 3.** Mecanismo de entrada da cisplatina na célula e sua ligação com o DNA.

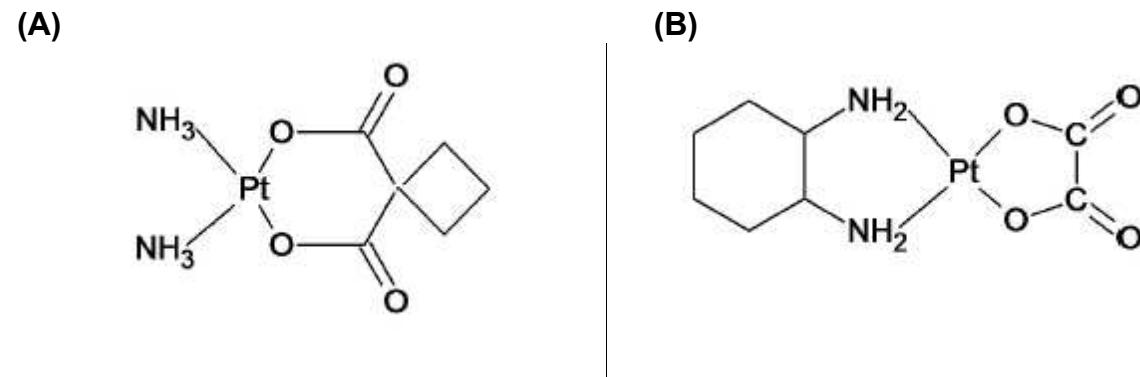


Fonte: (ROCHA, et.al.,2018)

Neste mecanismo de entrada da cisplatina na célula, Figura 3, observa-se que o processo de ativação da cisplatina ocorre pela troca de um ou dois de seus cloretos por moléculas de água (**A**) e que a cisplatina pode formar ligações covalentes com o DNA. As principais lesões de DNA são adutos de DNA intra-fita e ligações cruzadas inter-fita. As porcentagens representam a frequência de cada tipo de dano ao DNA induzido pela cisplatina (**B**). (ROCHA, et.al.,2018)

Além da cisplatina, existem outros complexos de platina, como a carboplatina e a oxaliplatina (Figura 4).

**Figura 4.** Estrutura química dos complexos carbopaltina (**A**) e oxaliplatina (**B**)



Fonte: DE LIMA, et.al.,2014

A carboplatina é considerada como um fármaco de segunda geração, em relação à cisplatina, e foi introduzida na prática clínica, após a cisplatina, considerada como um ser equivalente terapêutico da mesma (LOKICH, et.al., 1998). A mesma possui um perfil de toxicidade diferente, a qual incluiu osso supressão da medula e também uma menor neurotoxicidade, menor incidência de doenças renais e gastrointestinais (LOKICH, et.al., 1998). A carboplatina possui um grau de estabilidade química na reação de aquação maior do que a cisplatina, o que resulta em uma menor reatividade com o DNA e assim, faz-se necessário uma maior dose para que ocorram efeitos antitumorais em sistemas experimentais (TRUMP, et.al., 1987). Em testes *in vivo*, a carboplatina é de 8 a 45 vezes menos potente do que a cisplatina (KNOX, et.al., 1986). São realizados em muitos ensaios clínicos a combinação de administração simultânea de carboplatina e cisplatina, já que os perfis de toxicidade são distintos e a morte de células antitumorais depende da maximização na formação de adutos de DNA (TRUMP, et.al., 1987; PATTON, et.al., 1996).

A oxaliplatina é considerada um fármaco de terceira geração em relação à cisplatina e foi sintetizada por Chugaev e Khlopin em 1927, com sua atividade citotóxica analisada em modelos de tumores em ratos (PRESNOV, et.al., 1985; KONOVALOVA, et.al., 1977). Ao se comparar as propriedades farmacêuticas e antitumorais entre a oxaliplatina e a cisplatina, nota-se que a oxaliplatina apresenta doses terapêuticas e máximas toleradas cerca de 10 vezes maior além de efeito prolongado. Mais além, a oxaliplatina apresenta menor indução de lesões necróticas nos rins (baixa nefrotoxicidade) (LAZNICKOVA, et.al., 1989). Por este composto

apresentar estabilidade maior que a cisplatina frente a reação de aquação, estuda-se a possibilidade da aplicação via oral, entretanto, ela pode ser convertida em cisplatina por agentes redutores intracelulares, ou pode ser convertido em *cis*-diaminatetracloridoplatina (IV), caso entre em contato com ácido gástrico (OLSZEWSKI, et.al., 2009).

Desta forma, devido aos efeitos adversos apresentados pela cisplatina e também pelos complexos de platina (II) de segunda e terceira gerações, novos estudos envolvendo outros centros metálicos vêm sendo realizados. A seguir, aspectos químicos e biológicos de complexos polipiridínicos de rutênio (II) são apresentados.

### **1.2.2 Complexos Polipiridínicos de Rutênio (II)**

Os compostos de coordenação possuem vantagens quando comparados aos compostos orgânicos, já que apresentam características específicas dos centros metálicos, como sua geometria de coordenação e estado de oxidação e, até mesmo, as características dos ligantes, como a polaridade e a reatividade (RONCONI, et. al., 2007).

Como consequência da toxicidade e resistência apresentada a cisplatina, foram iniciados muitos estudos de compostos de coordenação que possuem centro metálico como ferro (II), gálio (II), ouro (II), titânio (II) e rutênio (II) (RONCONI, et. al., 2007). Dentre estes complexos, os compostos de coordenação de rutênio (II) que possuem ligantes polipiridínicos têm se mostrado promissores como potenciais agentes antitumorais em tumores resistentes ou refratários à cisplatina. Alguns destes complexos estão em estudos clínicos como, por exemplo, o NAMI-A ((ImH)[*trans*-RuCl<sub>4</sub>(dmso-S)(Im)]], Im =imidazol, dmso = dimetilsulfoxido) e KP1019/KP1339 (KP1019 = (IndH)[*trans*RuCl<sub>4</sub>(Ind)<sub>2</sub>], Ind = indazole;KP1339 = Na[*trans*-RuCl<sub>4</sub>(Ind)<sub>2</sub>]) (MANISKOSA, et. al., 2020).

Os complexos de rutênio (II) oferecem novas perspectivas, o que os torna mais atraentes como fármacos, por causa de sua rota sintética e sua química de coordenação, já que pode ter pelo menos dois estados de oxidação que são estáveis em condições fisiológicas, solubilidade em água favorável e menos toxicidade fármacos de platina convencionais (RONCONI, et. al., 2007). Complexos de rutênio possuem semelhanças em relação as propriedades físico-químicas com o

íon ferro. O organismo é capaz de se proteger dos efeitos causados pelo excesso de ferro, aumentando a produção de proteínas captadoras, como transferrina e albumina. Para complexos com centro metálico de rutênio, o mecanismo de defesa seria o mesmo (ALLARDYCE, et.al., 2001).

Normalmente se considera que complexos de rutênio (II) exercem atividade antitumoral gerando apoptose por meio das seguintes vias: autofagia via mediada por mitocôndrias e/ou desencadeamento de apoptose mediada por espécies reativas de oxigênio (RILAK, et.al., 2019). Para os complexos polipiridínicos de rutênio (II), os quais na maioria das vezes contêm ligantes do tipo 2,2'-bipiridina (bpy), 1,10-ligantes de fenantrolina (fen), 2,2 ': 6 ', 2 " -terpiridina (tpy) ou seus derivados, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação biológica, pois o que se sabe sobre sua citotoxicidade foi avaliada mediante testes *in vitro* (RILAK, et.al., 2019).

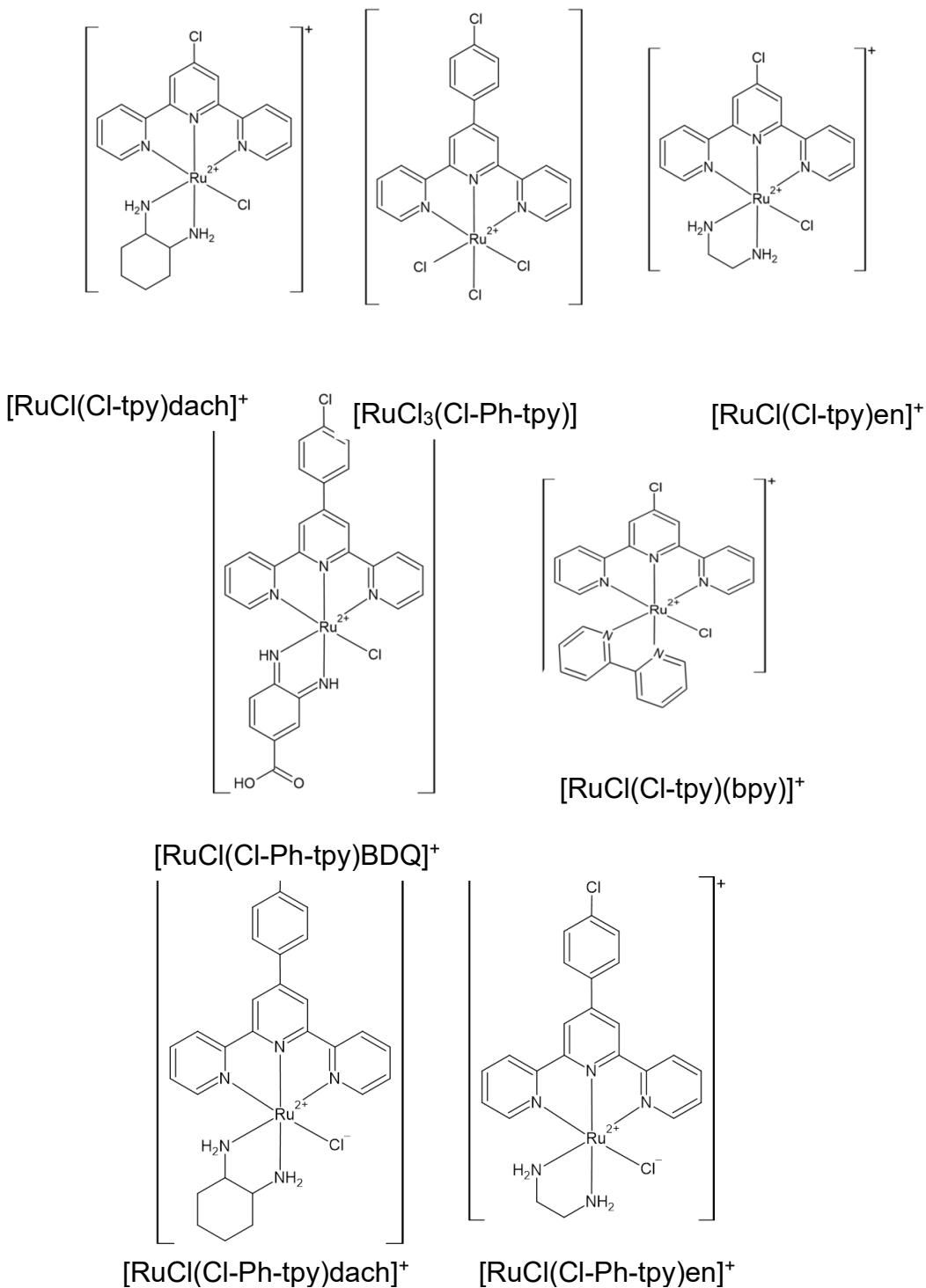
A atividade antitumoral dos complexos polipiridínicos de rutênio (II) foram avaliados, entretanto a interação dos mesmos com proteínas não fora muito estudada. O ligante terpiridina possui um interesse especial, já que ele forma ligações estáveis em complexos que possuem metais de transição, podendo interagir com o DNA (RILAK, et.al., 2014). Já os complexos de Ru (II) que apresentam/possuem uma geometria meridional, exibiram uma tendência promissora com a atividade antitumoral *in vitro*. Por exemplo o complexo  $[Ru^{III}(tpy)Cl_3](tpy = 2,20: 60,200\text{-terpiridina})$  apresentou uma notável alta citotoxicidade contra a grande parte das células tumorais testadas, e o complexo mer-[Ru(tpy)(N-N)Cl]<sup>+</sup> (onde N-N são Ndonor ligantes quelantes), foi detectado ligado covalentemente ao DNA, em que em alguns casos, estes adutos bloquearam a replicação do DNA (LAZIĆ, et.al., 2016; NIŠAVIĆ, et.al., 2018; NIŠAVIĆ, et.al., 2016; MILUTINOVIĆ, et.al., 2017).

Embora existam resultados promissores, os pesquisadores perderam o interesse em compostos do tipo mer- [Ru(tpy)], ja que apresentaram baixa solubilidade (MILUTINOVIĆ, et.al., 2017).

Além destes, há também outros de compostos de coordenação que possuem o rutênio (II) como centro metálico e ligantes polipiridínicos, os quais têm se mostrado promissores potenciais antitumorais como por exemplo:  $[RuCl_3(Cl\text{-Ph}\text{-tpy})]$  – onde Cl-Ph-tpy = 4-clorofenil-2,2'-6',2"-terpiridina–,  $[RuCl(Cl\text{-tpy})en]^+$  – onde en = etilenodiamina e Cl-tpy = 4-cloro-2,2'-6',2"-terpiridina–,  $[RuCl(Cl\text{-tpy})dach]^+$  – onde

dach = 1,2-diaminociclohexano-,  $[\text{RuCl}(\text{Cl-Ph-tpy})\text{BDQ}]^+$  – onde BDQ = ácido 3,4-diaminobenzóico-,  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$  – onde bpy = bipiridina –, os quais já estão descritos na literatura e estão apresentados na Figura 5 (SIMOVIĆ, et al., 2019).

**Figura 5.** Complexos polipiridínicos de rutênio em estudos descritos na literatura.



Fonte: Adaptado de SIMOVIĆ, et al., 2019.

Os estudos realizados por Čanović et. al. descreveram a síntese, caracterização de um complexo de rutênio do tipo  $[Ru(L_3)(N-N)(X)][Y]n$ , – onde 2,2':6',2"-terpiridina (tpy), 4'-cloro-2,2':6',2"-terpiridina (Cl-tpy) ou 4'-(4-clorofenil)-2,2':6',2"-terpiridina (Cl-Ph-tpy); N–N é um ligante quelante bidentado etilenodiamina (en), 1,2-diaminociclohexano (dach); 2,2'-bipiridina (bpy); X é um ligante monodentado (Cl ou DMSO-S); Y é um contra-íon ( $Cl^-$ ,  $PF_6^-$  ou  $CF_3SO_3^-$  ), à depender da natureza de  $X^-$  e, ainda, a interação do complexo antitumoral com o DNA (RILAK, et.al., 2014). Estes compostos passam por reações de aquação, as quais substituem os ligantes  $Cl^-$  por ligantes  $H_2O$ , posteriormente, observando-se interação com uma proteína transportadora (albumina humana, HSA), a qual é encarregada de transportar o complexo até a célula e ocorrendo por fim, interação do complexo com o DNA (MOTSWAINYANA, et. al., 2015).

Os complexos do tipo  $[Ru^{II}Cl(X-tpy)(BDQ)](PF_6)$  – onde  $(X-tpy)=(H-tpy)=2,2'-6',2"-terpiridina$  ou  $(X-tpy)=(Cl-tpy)=4\text{-cloro-2,2'-6',2"-terpiridina}$ ; e  $(BDQ)=ácido\ 3,4\ diaminobenzóico$  –, possuem um ligante  $Cl^-$ . Estes ligantes  $Cl^-$  são susceptíveis a reações de substituição, mais precisamente às reações de aquação e, ainda, fotoaquação, ou seja, reações de substituição dos ligantes  $Cl^-$  por ligantes  $H_2O$ , assim como o mecanismo de interação da cisplatina com o DNA, indicando uma possível interação dos complexos com a biomolécula.

Posteriormente, notou-se a necessidade de estudos acerca das interações destes complexos com biomoléculas, como proteínas, que são responsáveis pelo transporte, metabolismo e excreção como a albumina humana (HSA).

### **1.3 Albumina Humana (HSA)**

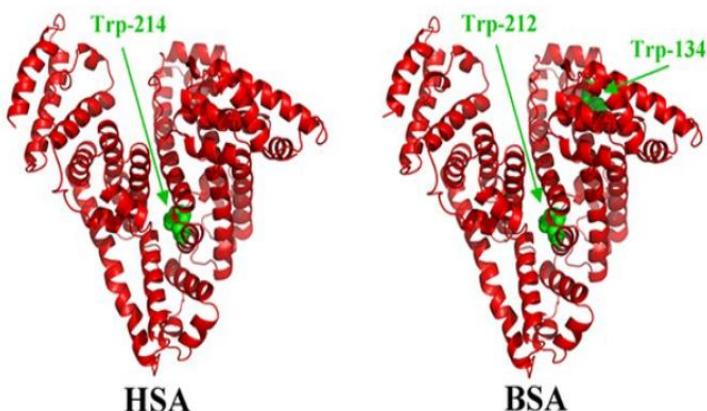
A albumina humana é uma proteína conhecida como transportadora de fármacos e é a mais abundante em tecidos e secreções corporais. A albumina é muito estudada, já que apresenta uma estrutura primária bem conhecida e uma estrutura terciária descoberta por cristalografia de raios-X (PETERS JR, 1995).

Esta proteína possui importância em transportar e distribuir moléculas exógenas e endógenas, metabólitos, bem como hormônios, gorduras, drogas e nutrientes. Existem muitos estudos sobre as interações dos fármacos com a HSA, sendo que em muitas vezes, essas interações provocam alterações estruturais da

proteína e alterações fisiológicas nos comportamentos dos fármacos (HU, et al., 2006; SEEDHER & BHATIA, 2006; RANJBAR, et al., 2013; MOREIRA, et al., 2015).

Estudos como estes citados acima, podem ser realizados em diferentes albuminas, como a albumina bovina (BSA) e a albumina humana (HSA). A albumina bovina tem sido cada vez mais usada, já que apresenta baixo custo e grande semelhança estrutural, sendo 80% de homologia e 76% de semelhança estrutural (PETERS JR., 1995; MOREIRA, et al., 2015). A Figura 6, apresenta a estrutura da albumina humana (HSA) e da albumina bovina (BSA).

**Figura 6.** Representações tridimensionais das estruturas terciárias da HSA e da BSA.



Fonte: BELATIK, et .al, 2012.

A albumina humana possui 585 aminoácidos, os quais são 1 resíduo de triptofano (Trp), denominado de Trp-214 (localizado na posição 214) e 17 resíduos de tirosina (Tyr).

Existem algumas regiões na proteína, que são classificadas em três grandes domínios, chamados de I, II e III. Essas regiões são locais onde ocorre de forma preferencial as ligações dos fármacos com a proteína, seja HSA ou BSA. Cada um desses três domínios possui dois subdomínios, A e B. Os subdomínios IIA e IIIA, conhecidos como Sítios I e II de Sudlow, são as principais regiões de ligação dos fármacos com a proteína (PETERS JR., 1995)

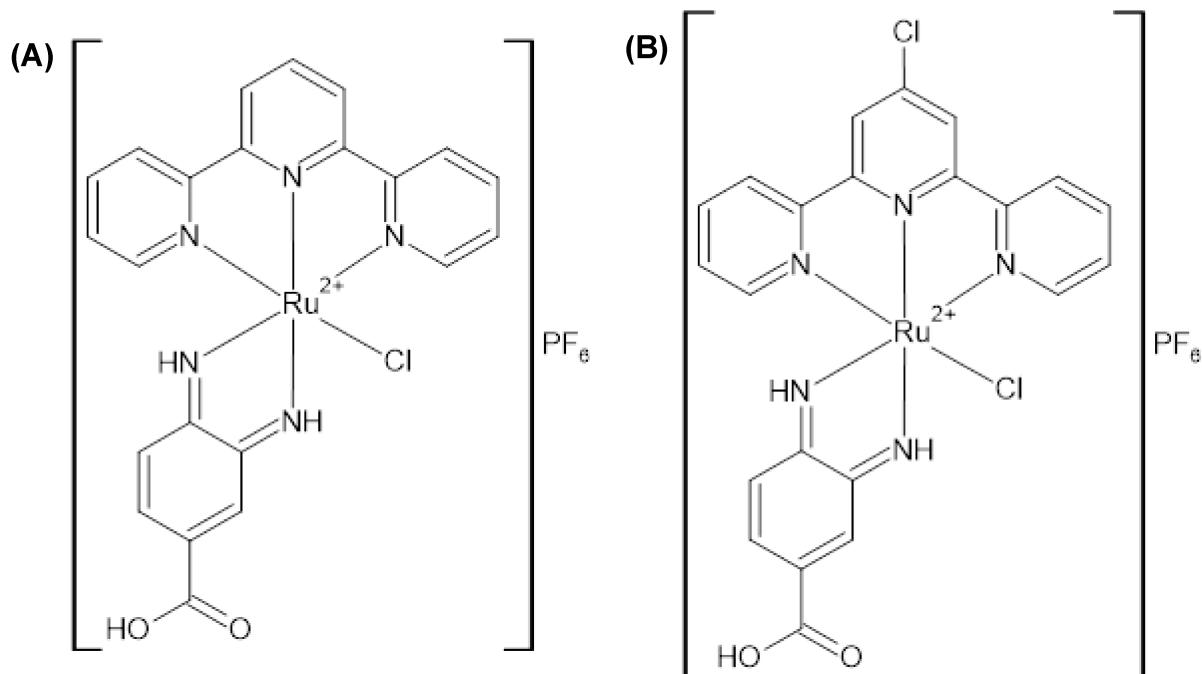
Utilizando a espectroscopia de fluorescência, pode-se analisar a supressão de fluorescência da biomolécula influenciada pela presença do fármaco e subsequentemente, através dos espectros obtidos, pode-se realizar alguns

tratamentos matemáticos para determinar constantes de ligação e parâmetros termodinâmicos da interação da albumina com o fármaco (LAKOWICZ, 2006).

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho são a síntese e caracterização físico-química de complexos polipiridínicos do tipo  $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{X-tpy})(\text{BDQ})](\text{PF}_6)$  – onde  $(\text{X-tpy})=(\text{H-tpy})=2,2'\text{-}6',2''\text{-terpiridina}$  **[\text{Ru(tpy)}]** e  $(\text{X-tpy})=(\text{Cl-tpy})=4\text{-cloro-2,2'\text{-}6',2''-terpiridina}$  **[\text{Ru(Cl-tpy)}]**; e  $(\text{BDQ})=\text{ácido 3,4 diaminobenzóico}$  (Figura 7). Bem como determinação das constantes cinéticas de aquação e interação com albumina humana (HSA).

**Figura 7.** Estruturas químicas dos complexos **[\text{Ru(tpy)}]** (A) e **[\text{Ru(Cl-tpy)}]** (B).



Fonte: Autora

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Reagentes

A Tabela 1 apresenta todos os reagentes utilizados ao longo deste trabalho, sua pureza percentual e procedência.

**Tabela 1.** Reagentes utilizados durante a síntese, caracterização e posteriores estudos acerca dos complexos, sua pureza percentual e procedência.

Reagentes	Pureza (%)	Procedência
Ácido clorídrico	-	Synth
Acetonitrila	97	Merck
Ácido 3,4-diaminobenzóico	97	Aldrich Chemicals
Ácido hexafluorfosfórico	98	Aldrich Chemicals
Ácido trifluoracético	99,9	Merck
Albumina Humana	-	Aldrich Chemicals
Cloreto de lítio	99	Aldrich Chemicals
Cloreto de potássio	98	Synth
Cloreto de rutênio (III)	99,9	Aldrich Chemicals
Cloreto de sódio	98	Synth
4-cloro-2,2'-6',2"-terpiridina	98	Aldrich Chemicals
Dihidrogenofosfato de sódio	99,5	Merck
Dimetilsulfóxido	97	Synth
Etanol	95	Qhemis
Hexafluorfosfato de amônio	95	Aldrich Chemicals
Hidróxido de Sódio	97	Synth
Metanol	99,5	Merck
2,2'-6',2"-terpiridina	98	Aldrich Chemicals
Trietilamina	85	Synth

Fonte: Autora

## 3.2. Procedimentos Experimentais

### 3.2.1 Síntese dos Complexos de Rutênio Polipiridínicos

#### 3.2.1.1 Síntese do Complexo [RuCl<sub>3</sub>(tpy)]

O complexo [RuCl<sub>3</sub>(tpy)] foi sintetizado conforme descrito previamente por Sullivan e colaboradores (1980).

Em um balão de 50 mL foram adicionados 0,3244 g de cloreto de rutênio (RuCl<sub>3</sub>.nH<sub>2</sub>O) (1,57 mmol) e 0,2912 g do ligante 2,2'-6',2"-terpiridina (tpy) (1,25 mmol). Em seguida, os sólidos foram dissolvidos em 30 mL de metanol. A solução foi mantida sob refluxo ( $T \approx 65^\circ\text{C}$ ) durante 3 h. Após esse tempo, a solução permaneceu 1 h em temperatura ambiente ( $\approx 30^\circ\text{C}$ ). O precipitado marrom obtido foi filtrado e seco à vácuo.

A massa obtida foi de 0,4216 g e o rendimento obtido foi de 60,16%.

#### 3.2.1.2 Síntese do Complexo [RuCl(tpy)(BDQ)]PF<sub>6</sub>

O complexo [RuCl(tpy)(BDQ)]PF<sub>6</sub> foi sintetizado conforme descrito por de Lima e colaboradores (2006).

Em um balão de 50 mL foi adicionado 40 mL de uma mistura contendo 75 % de etanol e 25 % de água (v/v). Em seguida, foram adicionados 0,1783 g do complexo precursor [RuCl<sub>3</sub>(tpy)] (0,40 mmol) e 0,1 mL de trietilamina (Et<sub>3</sub>N) (0,72 mmol). Observou-se a mudança de coloração da solução, de marrom para roxa. A solução foi mantida sob agitação durante 30 min, para a redução completa do íon metálico, de Ru<sup>3+</sup> para Ru<sup>2+</sup>. Posterior à redução do íon metálico, foram adicionados 0,0173 g do ligante ácido 3,4-diaminobenzóico (BDQ) (0,11 mmol) e 20 mg de cloreto de lítio (LiCl) (0,47 mmol). O LiCl foi adicionado de modo a garantir que o referido complexo mantivesse um íon cloreto em sua esfera de coordenação. A solução foi mantida sob refluxo ( $T \approx 80^\circ\text{C}$ ) durante 4 h. Após esse tempo, foi adicionado 1 g de hexafluorofosfato de amônio (NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>), para o fornecimento do contra-íon. Posteriormente, a solução permaneceu 24 h sob refrigeração. A fim de favorecer-se a formação de precipitado, a solução foi rotavaporada. O precipitado roxo avermelhado obtido foi filtrado e seco à vácuo.

Massa obtida: 0,0754 g. Rendimento: 30,23%

### **3.2.1.3 Síntese do Complexo [RuCl<sub>3</sub>(Cl-tpy)].**

O complexo [RuCl<sub>3</sub>(Cl-tpy)] foi sintetizado conforme descrito por Rilak e colaboradores (2006).

Em um balão de 50 mL foram adicionados 0,326 g de cloreto de rutênio (RuCl<sub>3</sub>.nH<sub>2</sub>O) (1,57 mmol) e 0,334 g do ligante 4-cloro-2,2'-6',2"-terpiridina (Cl-tpy) (1,25 mmol). Em seguida, os sólidos foram dissolvidos em 30 mL de metanol. A solução foi mantida sob refluxo ( $T \approx 65$  °C) durante 3 h. Após esse tempo, a solução permaneceu 1 h em temperatura ambiente ( $\approx 30$  °C). O precipitado marrom obtido foi filtrado e seco à vácuo.

A massa obtida foi de 0,2904 e o rendimento obtido foi de 61,21%.

### **3.2.1.4 Síntese do Complexo [RuCl(Cl-tpy)(BDQ)](PF<sub>6</sub>)**

O complexo [RuCl(Cl-tpy)(BDQ)]PF<sub>6</sub> foi sintetizado conforme descrito por Lima e colaboradores (2006), entretanto com algumas alterações na rota sintética, as quais foram descritas por Čanović e colaboradores (2017).

Em um balão de 50 mL foi adicionada uma mistura de 40 mL de etanol e água destilada (75 % de etanol e 25 % de água). Em seguida, foram adicionados 0,0940 g do complexo precursor [RuCl<sub>3</sub>(Cl-tpy)] (0,20 mmol) e 0,1 mL de trietilamina (Et<sub>3</sub>N). Observou-se a mudança de coloração da solução, de marrom para roxa. A solução foi mantida sob agitação durante 30 minutos, para a redução do centro metálico, de Ru<sup>III</sup> para Ru<sup>II</sup>. Posterior à redução do íon metálico, foram adicionados 0,0173 g do ligante ácido 3,4-diaminobenzóico (BDQ) (0,11 mmol) e 20 mg de cloreto de lítio (LiCl). A solução foi mantida sob aquecimento e refluxo ( $T \approx 80$  °C) durante 4 h. Após esse tempo, a solução foi filtrada a quente e em seguida foi adicionado 1 g de hexafluorfosfato de amônio (NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>), para o fornecimento do contra-íon. Posteriormente, a solução foi filtrada a quente permaneceu 24 h sob refrigeração. A fim de favorecer-se a formação de precipitado, a solução foi rotavaporada, para a redução do volume de solvente. O precipitado roxo-avermelhado obtido foi filtrado e seco à vácuo.

A massa obtida foi de 0,0539 g e o rendimento foi de 40 %.

### **3.2.2 Caracterização dos Complexos de Rutênio**

#### **3.2.2.1 Análise Elementar do Complexo [Ru(Cl-tpy)]**

A análise elementar do complexo [Ru(Cl-tpy)] foi realizada em um analisador CE Instruments Carlo Erba model 1110 CHNSeO lotado na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

#### **3.2.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR)**

Os espectros vibracionais na região do IR foram obtidos utilizando-se um espectrofômetro da marca Perkin Elmer®, de modelo FT-IR Frontier Single Range. O equipamento utilizado pertence ao Grupo de Pesquisa em Materiais Inorgânicos do Triângulo (GEMIT). As amostras foram analisadas em estado sólido, utilizando-se um acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante, sendo submetidas à varredura espectrofotométrica de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>.

#### **3.2.2.3 Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível (UV/Vis.)**

Os espectros na região do UV/Vis. foram obtidos utilizando-se um espectrofômetro UV-Visível-NIR Cary Series, da marca Agilent Technologies®. O equipamento utilizado pertence ao Laboratório e Equipamentos Multusuários do Pontal (LEMUP), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU. As amostras foram submetidas à varredura espectrofotométrica de 800 a 200 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico.

#### **3.2.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Os cromatogramas foram obtidos utilizando-se um equipamento da marca Waters, de modelo e2695; com detector de arranjo de diodos, de modelo 2998 PDA. Foi utilizada uma coluna da marca Aligent®, de modelo Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm d.i.), constituída por partículas de 5 µm. Para a obtenção dos dados foi utilizado o software Empower3®. O equipamento utilizado pertence ao Laboratório e Equipamentos Multusuários do Pontal (LEMUP), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

Para a preparação da fase móvel, foram pesados 0,6076 g de dihidrogenofosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e 0,8580 g de monohidrogenofosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ); foram adicionados, ainda, 0,5 mL de ácido trifluoracético (0,1%). Em seguida, os sólidos foram dissolvidos em água ultrapura. Para que o tampão atingisse o pH=6,95 foram adicionadas algumas gotas de uma solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A fase móvel utilizada foi uma mistura da solução tampão fosfato 0,1% de ácido trifluoracético (pH 6,95) e metanol (85:15) (v/v).

A eluição da fase móvel foi isocrática e o fluxo foi mantido em 0,8 mL min<sup>-1</sup>. As amostras foram dissolvidas na respectiva fase móvel e foram injetados volumes de 20  $\mu\text{L}$ .

### **3.3.4 Avaliação da constante cinética de aquação dos complexos de Rutênio**

Os estudos da cinética de aquação para os complexos  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$  e  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})]$  foram realizados via espectroscopia na região do UV/Vis., utilizando-se um espectrofotômetro SHIMADZU – modelo UV-1800, com controlador de temperatura SHIMADZU – modelo TCC-100 (a  $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ ), Laboratório de Compostos Inorgânicos.

Para os estudos de aquação de cada um dos complexos, ambos  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$  e  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})]$  foram analisados em meio aquoso e em meio KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. As soluções preparadas foram submetidas à varredura espectrofotométrica de 800 a 200 nm a cada 5 segundos, totalizando 95s, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico. Assim, realizou-se a determinação do comprimento de onda máximo de absorção dos complexos em temperaturas controlada de 298K e 310K.

Considerou-se a reação de aquação como sendo de cinética de primeira ordem, os valores de  $k_{aq}$  e  $t_{1/2}$  foram calculados para os complexos  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$  e  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})]$  em H<sub>2</sub>O e em PBS foram calculados pela Equação 1 e 2 (ATKINS, et.al., 2008). Através de análises gráficas, o valor de  $k_{aq}$  será o valor do coeficiente angular.

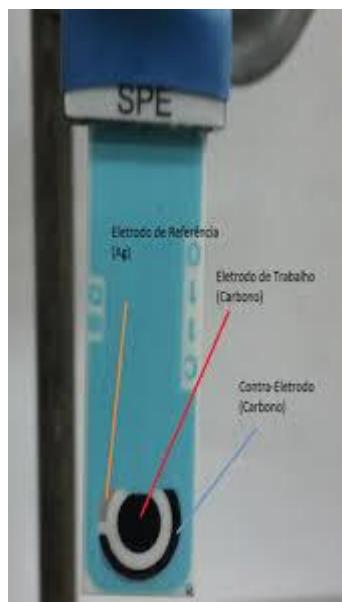
$$\frac{\ln[A]_t}{[A]_0} = -k_{aq}t \quad (1)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{aq}} \quad (2)$$

### 3.3.5 Avaliação da cinética de aquação dos Complexos de Rutênio via voltametria de pulso diferencial

Para a realização da avaliação cinética de aquação, via voltametria de pulso diferencial, foram dissolvidos separadamente 0,88 mg e 0,99 mg dos complexos  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})]$  e  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$ , respectivamente, em uma alíquota de etanol (1 mL). Após a dissolução, 1 $\mu\text{L}$  de cada solução dos complexos foram gotejadas na superfície do eletrodo de trabalho em um SPE (Figura 8). Após a secagem do solvente, 50  $\mu\text{L}$  de KCl (0,1 mol L $^{-1}$ ) foram adicionados na superfície do eletrodo e sequencialmente com o auxílio do Potenciómetro modelo Autolab®, foram registrados voltamogramas de pulso de diferencial.

**Figura 8.** Eletrodo de trabalho de um SPE utilizado nas medidas eletroquímicas.



Fonte: Autora.

### 3.3.5 Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos de Rutênio

#### 3.3.5.1. Preparação da Solução Tampão Fosfato (PBS) pH=7,4

Para a preparação do PBS, foram pesados 0,9815 g de cloreto de potássio (KCl), 40 g de cloreto de sódio (NaCl), 1,0413g de dihidrogenofosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e 8,7100 g de monohidrogenofosfato de potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ). Em seguida, os sólidos foram dissolvidos em água ultrapura, totalizando 500 mL de PBS com

pH=6,8. Para que o tampão atingisse o pH=7,4 foram diluídos 10 mL do PBS em 90 mL de água ultrapura, totalizando 100 mL de PBS com pH=7,4.

### **3.3.5.2. Preparação da Solução Estoque de HSA a 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$**

Para a preparação da solução estoque de HSA, foram pesados 0,0166 g de HSA. Em seguida, a proteína foi dissolvida em PBS (pH=7,4), totalizando 250 mL de solução. Para a realização dos procedimentos a seguir, foram utilizadas soluções estoque de HSA recém-preparadas, visando a manutenção da estrutura proteica estoque de HSA eram descartadas ao final de um dia de experimentos.

### **3.3.5.3 Avaliação do Tempo de Interação entre a HSA e os complexos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência**

Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo Cary Eclipse. O equipamento utilizado pertence ao Laboratório e Equipamentos Multiusuários do Pontal (LEMUP), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU. Para os estudos dos tempos de interação entre a HSA e os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] via espectroscopia de fluorescência, em uma cubeta de quartzo, foram colocados 3 mL de uma solução estoque de HSA 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em PBS. Para ambos os complexos, as análises foram realizadas mediante a adição de uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque do complexo 1  $\text{mmol L}^{-1}$  em PBS, obtendo-se uma solução de concentração 3,32  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de complexo. A solução foi mantida sob incubação, protegida da luz.

As amostras foram excitadas em 280 nm (janelas de excitação e emissão de 5 e 20 nm, respectivamente) e submetida à varredura espectrofotométrica de 290 a 500 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico. O experimento foi realizado à temperatura controlada, de 308 K, e, a cada minuto, foram obtidos espectros de fluorescência.

### 3.3.5.4 Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo Cary Eclipse. O equipamento utilizado pertence ao Laboratório e Equipamentos Multiusuários do Pontal (LEMUP), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU. Em uma cubeta de quartzo, foram colocados 3 mL de uma solução estoque de HSA 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em PBS. Para ambos os complexos, [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)], as análises foram realizadas através da adição de uma alíquota de 3  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque do complexo 1  $\text{mmol L}^{-1}$  em PBS à cubeta, obtendo-se uma solução de concentração 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de complexo. A solução foi mantida sob incubação durante 4 min, protegida da luz. As amostras foram excitadas em 280 nm (janelas de excitação e emissão de 5 e 20 nm, respectivamente) e submetidas à varredura espectrofotométrica de 290 a 500 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico. Os experimentos foram realizados à temperatura controlada, de 308 K, em duplicata. Para ambos os complexos, as análises foram realizadas mediante a adição sucessiva de outras alíquotas da solução dos complexos 1  $\text{mmol L}^{-1}$ , obtendo-se soluções de concentrações 1,7; 2,3; 3,3; 5,0; 6,6; 8,3; 9,9; 11,5; 13,2; 14,8; 16,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de complexo, respectivamente. Os experimentos foram realizados à temperatura controlada, de 308 K, em duplicata.

Considerando-se a absorção dos complexos de rutênio na região analisada, os valores de fluorescência foram corrigidos utilizando a equação para correção do filtro interno (3):

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times 10^{(A_{\text{exc}} + A_{\text{em}})/2} \quad (3)$$

na qual  $F_{\text{cor}}$  e  $F_{\text{obs}}$  são os valores de fluorescência corrigido e observado, respectivamente, e  $A_{\text{ex}}$  e  $A_{\text{em}}$  são os valores de absorbância nos comprimentos de ondas 280 e 350 nm, respectivamente (LAKOWICKS, 2006).

A correção do filtro interno é necessária, pois pode ocorrer uma diminuição na intensidade de fluorescência observada quando há o aumento da concentração dos complexos em solução com HSA, já que [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] apresentam bandas de absorção tanto no comprimento de onda de excitação utilizado ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ),

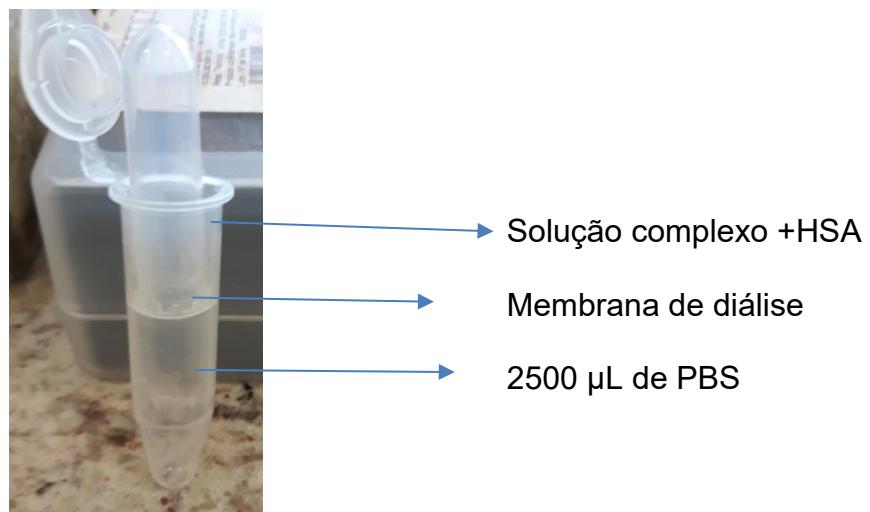
quanto no comprimento de onda de emissão da HSA ( $\lambda=350$  nm). Esse fenômeno é denominado de efeito do filtro interno (RANJBAR, et.al.,2013).

### **3.3.5.5 Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos de Rutênio através do processo de diálise via CLAE**

A determinação da interação dos complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] com a HSA também foi determinada através do processo de diálise e CLAE.

Os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] nas concentrações de 5 $\mu$ mol/L e 10 $\mu$ mol/L permaneceram em presença da solução de HSA (1 $\mu$ mol/L) durante 24h a 35 °C protegidas da luz. Após o tempo de interação de 24h, as soluções foram dialisadas (membrana celulose 12.000 a 14.000 Da) por 6 horas (Esquema 1). As soluções dialisadas foram injetadas do cromatógrafo utilizando-se fase móvel conforme descrito no item 3.2.2.4. (pág. 32).

**Esquema 1.** Esquema do processo de diálise para determinação da interação dos complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] com a HSA.



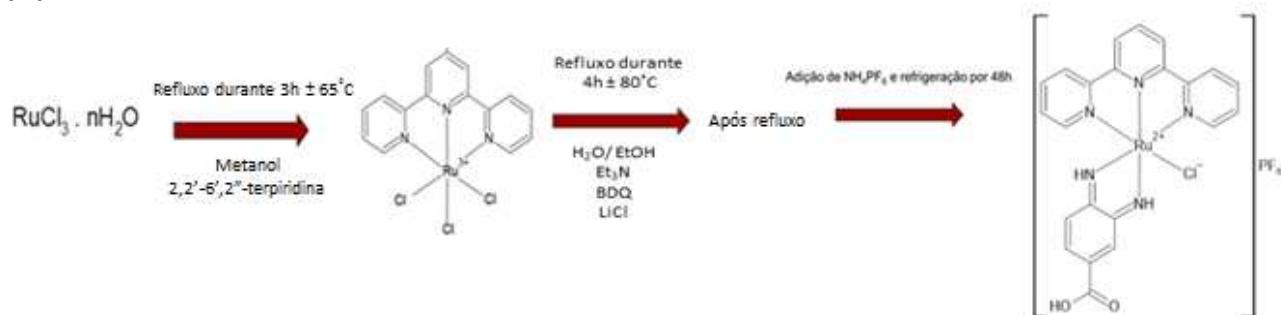
Fonte: Autora.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

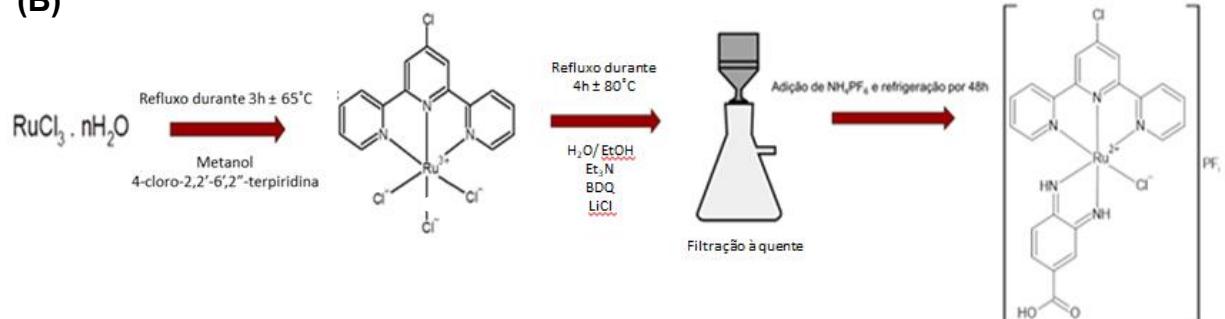
Os complexos  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$  e  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})]$  foram obtidos pela reação entre os complexos precursores Ru(III) do tipo *mer*- $[\text{RuCl}_3(\text{tpy})]$  (P1) e *mer*- $[\text{RuCl}_3(\text{Cl}-\text{tpy})]$  (P2) com o ligante quelante ácido diaminobenzóico (BDQ) em presença de  $\text{Et}_3\text{N}$  como redutor e excesso de  $\text{LiCl}$ . No Esquema 2, está apresentado a rota sintética dos complexos  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$  (**A**) e  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})]$  (**B**).

**Esquema 2.** A rota sintética dos complexos  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$  (**A**) e  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})]$  (**B**).

(A)



(B)



Os complexos  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$  e  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})]$  apresentaram solubilidade em água, dimetilsulfóxido, dimetilformamida e acetonitrila. No entanto, são parcialmente solúveis em metanol e etanol e insolúveis em diclorometano.

## 4.1 Caracterização do Complexos de Rutênio Polipiridínicos

### 4.1.1 Análise Elementar do Complexo [Ru(Cl-tpy)]

Na Tabela 2 encontram-se os valores de porcentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtidos para o complexo inédito nesse trabalho o [Ru(Cl-tpy)].

**Tabela 2.** Porcentagem obtida experimentalmente de carbono, hidrogênio e nitrogênio, em comparação aos valores teóricos.

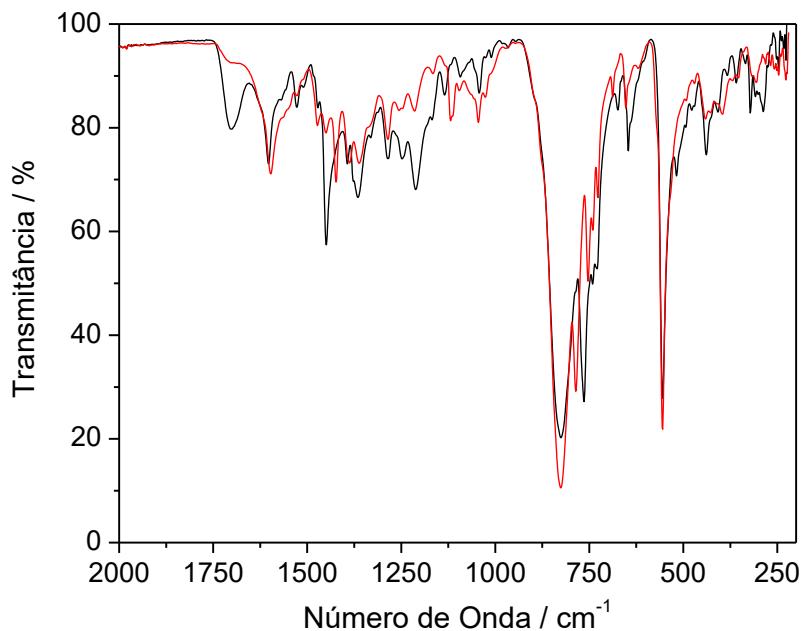
RuCl <sub>2</sub> C <sub>22</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> PF <sub>6</sub> . 7H <sub>2</sub> O (MM=825,44 g mol <sup>-1</sup> )	Valores Teóricos (%)	Valores Experimentais (%)
Carbono	32,01	31,98±0,006
Hidrogênio	3,66	2,74±0,000
Nitrogênio	8,48	8,96±0,007

Não houve o estudo de análise elementar para o complexo [Ru(tpy)], pois o mesmo já se encontra descrito na literatura.

### 4.1.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR)

A Figura 9 apresenta os espectros vibracionais para ambos os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)].

**Figura 9.** Espectros vibracionais na região do IR para os complexos [Ru(tpy)] (–) e [Ru(Cl-tpy)] (—).



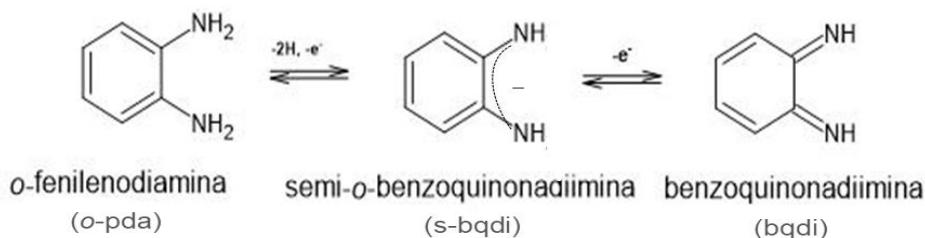
Fonte: Autora

Os espectros vibracionais, para ambos os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)], apresentado na Figura 9, apresentam bandas de estiramento em  $1732\text{ cm}^{-1}$ . Esse pico foi caracterizado como sendo o estiramento vibracional referente à ligação imina ( $\text{C}=\text{N}$ ), conforme descrito para o complexo [Ru(tpy)] por de Lima e colaboradores (2006).

Os estiramientos vibracionais de  $1600\text{cm}^{-1}$  e  $1475\text{ cm}^{-1}$  são referentes a ligação  $\nu(\text{C}=\text{C})$  do ligante terpiridina e os estiramientos vibracionais de  $\nu(\text{C}=\text{N})$  para ligante diiminicos são encontrados na região de  $1675\text{ cm}^{-1}$  a  $1665\text{ cm}^{-1}$  (PAVIA, et.al, 2008; VRIENDS, et.al., 1978) porém nesses complexos de rutênio descritos no trabalho, o somatório dos efeitos  $\sigma$ -doador e  $\pi$ -receptor do ligante imínico coordenado ao  $\text{Ru}^{II}$  pode proporcionar um aumento de energia observada.

O ligante quelante ácido 3,4 diaminobenzólico é um ligante amino aromático que pode encontrar-se em diferentes estados de oxidação (Esquema 3).

**Esquema 3.** Diferentes estados de oxidação do ligante quelante ácido 3,4-diaminobenzóico.



Fonte: Adaptado de ČANOVIĆ, et al., 2017

Tendo em vista, o estiramento vibracional para imina do ligante ácido 3,4-diaminobenzóico, podemos afirmar que os complexos obtidos se encontram na forma oxidada do ligante quando coordenado ao íon Ru<sup>II</sup>. Ligantes diamínicos (opda) ao coordenar-se ao Ru<sup>III</sup> ocorre uma reação intramolecular com o ligante opda, o qual oxida a foram bdqi e concomitantemente há redução a íon Ru<sup>II</sup> (ČANOVIĆ, et al., 2017).

Verificou-se, especificamente para o complexo [Ru(Cl-tpy)], uma banda de estiramento em 782 cm<sup>-1</sup>, estiramento vibracional referente à ligação C–Cl do ligante 4-cloro-2,2'-6',2"-terpiridina e uma banda de estiramento em 315 cm<sup>-1</sup>, referente a ligação Ru<sup>II</sup>–Cl, conforme descrito por Vriendts e colaboradores, 1978.

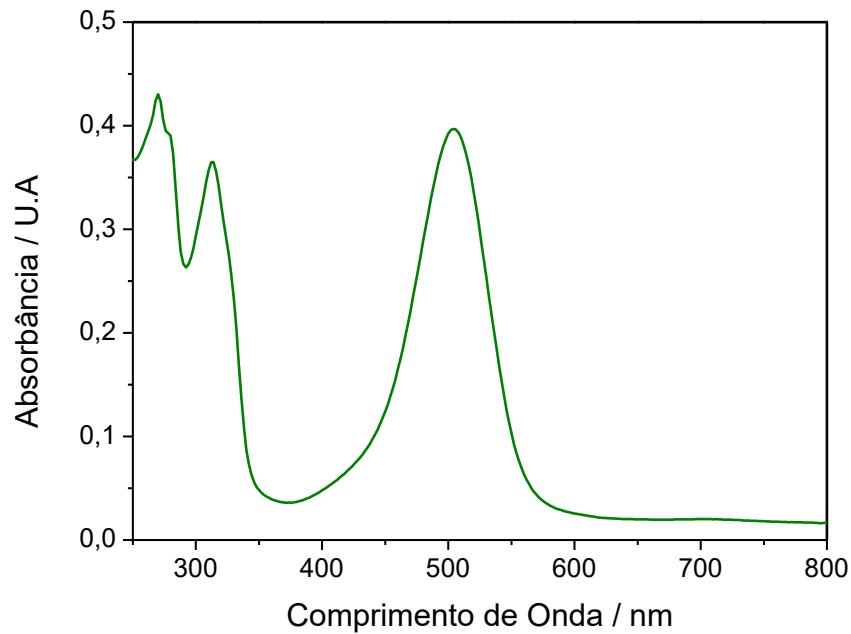
Observou-se, ainda, para ambos os complexos, outras bandas de estiramento em 825 cm<sup>-1</sup>, referente ao contra-íon PF<sub>6</sub><sup>-</sup>; e, ainda, em 555 cm<sup>-1</sup>, referente à ligação Ru<sup>II</sup>–N.

#### 4.1.3 Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível (UV/Vis.)

Complexos de rutênio (II) que possuem ligantes insaturados coordenados há o aparecimento de bandas na região do ultravioleta, relacionadas a transições intra ligante e bandas na região do visível, as quais são relacionadas a transições de transferência de carga e de transferência de campo ligante (LEVER, 1984).

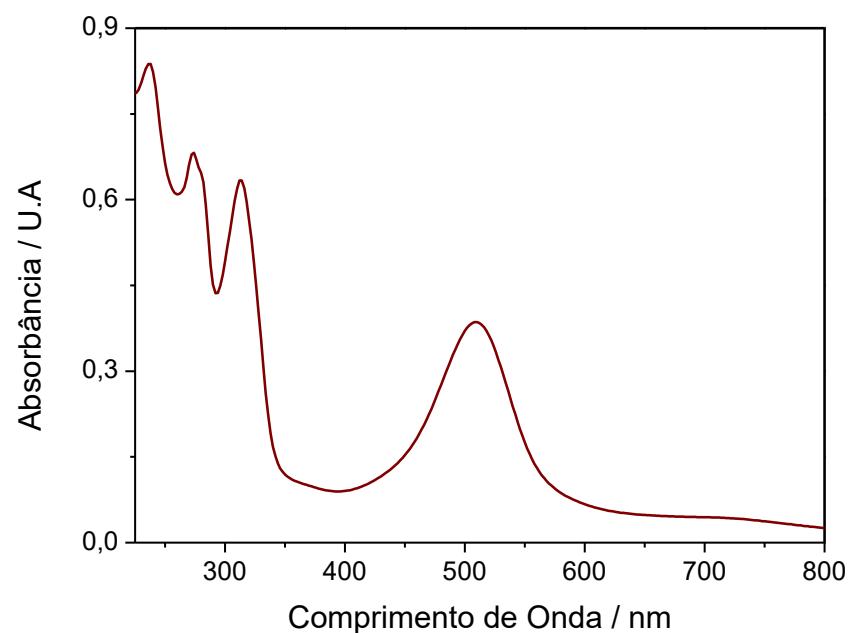
Foram realizadas análises espectroscópicas na região do UV/Vis para os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] (Figura 10 e 11).

**Figura 10.** Espectro de absorção na região do UV/Vis. para o complexo [Ru(tpy)] a  $4,91 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>.



Fonte: Autora

**Figura 11.** Espectro de absorção na região do UV/Vis. para o complexo [Ru(Cl-tpy)] a  $4,91 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>.



Fonte: Autora

Os espectros de absorção, para ambos os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)], apresentados nas Figuras 10 e 11 apresentam na região do ultravioleta (312 nm → 240 nm), bandas de transições intra ligantes, do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ , características para complexos que possuam ligantes como a terpiridina (tpy) (GUPTA, et al., 1993) (DOVLEOTOGLOU, et al., 1985).

Verificou-se, ainda, para ambos os complexos, porém na região do visível, bandas de transferência de carga metal-ligante (TCML), dos tipos  $d\pi(\text{Ru}^{II}) \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$  e  $d\pi(\text{Ru}^{II}) \rightarrow \pi^*(\text{BDQ})$  (GUPTA, et. al., 1993) (TAKEUCHI, et al., 1984) (DOVLEOTOGLOU, et al., 1985). No entanto, tais bandas exibem alterações entre os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)]. Para o complexo [Ru(tpy)], a banda de TCML encontra-se em 507 nm, enquanto que para o complexo [Ru(Cl-tpy)] a mesma encontra-se em 510 nm.

Complexos semelhantes aos estudos nesse trabalho como,  $[\text{RuCl}(\text{Cl-tpy})\text{en}]^+$ ,  $[\text{RuCl}(\text{Cl-tpy})\text{dach}]^+$  e  $[\text{RuCl}(\text{Cl-tpy})\text{bpy}]^+$ , apresentam bandas do tipo TCML em 562, 561 e 488 nm, respectivamente. Enquanto que os complexos  $[\text{RuCl}(\text{tpy})\text{en}]^+$  e  $[\text{RuCl}(\text{tpy})(\text{dach})]^+$  em regiões de 539 nm e 544 nm (RILAK, A, et al., 2014). A mudança no grupo substituinte do ligante terpiridina para 4'-(4-clorofenil)-2,2':6',2"-terpiridina (Cl-Ph-tpy), mostra a influência desse ligante na energia das transições eletrônicas na região do visível para os complexos em estudo. Os complexos reportados na literatura  $[\text{RuCl}(\text{Cl-Ph-tpy})\text{en}]^+$ ,  $[\text{RuCl}(\text{Cl-Ph-tpy})\text{dach}]^+$  e  $[\text{RuCl}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{bpy})]^+$ , por sua vez, apresentaram bandas TCML em 485 nm, 492 e 489 nm (MILUTINOVIĆ, et al., 2017)

A partir dos dados relatados acima pode-se sugerir que a energia de transição eletrônica para banda de TCML quando os co-ligantes bidentados são  $\pi$ -receptores fortes (como a bpy) possuem maior contribuição da transição  $d\pi(\text{Ru}^{II}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$  considerando que não há alteração neste comprimento de onda entre os complexos  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$  e  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$ . No entanto, para o caso de co-ligantes bidentados  $\sigma$ -doadores como etilenodiamina (en) e diaminociclohexano (dach), a contribuição da transição  $d\pi(\text{Ru}^{II}) \rightarrow \pi^*(X\text{-tpy})$  é mais destacada.

Para os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)], há o efeito batocrômico ( $\approx 3$  nm) da banda TCML para o complexo [Ru(Cl-tpy)], se comparado ao complexo [Ru(tpy)]. Pode-se afirmar que o co-ligante BDQ é uma base de Lewis mais fraca que a bipiridina. Então podemos discutir que o efeito batocrômico observado, refere-se ao

efeito dos ligantes terpiridina. O efeito retirador de elétrons proporcionado pelo substituinte cloro ( $-Cl$ ) do ligante terpiridina (tpy), diminui a retro-doação  $Ru^{II}$ -tpy-Cl e consequentemente diminui a energia da transição metal-ligante.

Na Tabela 3 apresentam-se os dados espectroscópicos para os complexos  $[Ru(tpy)]$  e  $[Ru(Cl-tpy)]$ , seus coeficientes de absorvividade molar ( $\epsilon$ ) e suas atribuições.

**Tabela 3.** Dados espectroscópicos para os complexos  $[Ru(tpy)]$  e  $[Ru(Cl-tpy)]$ , seus coeficientes de absorvividade molar ( $\epsilon$ ) e suas atribuições.

<b>Complexo</b>	<b><math>\lambda</math> (nm)/log <math>\epsilon</math></b>		<b>Atribuições</b>
	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>KCl</b>	
$[Ru(tpy)]$	270/4.12;	270/4.10;	$\pi \rightarrow \pi^*$
	281/4.06;	280/4.03;	$\pi \rightarrow \pi^*$
	313/4.02;	312/4.03;	$d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(Cl-tpy)$
	507/4.06	506/4,06	$+d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(BDQ)$
$[Ru(Cl-tpy)]$	238/3.84;	238/4,20;	$\pi \rightarrow \pi^*$
	270/3.76;	274/4,11;	$\pi \rightarrow \pi^*$
	280/3,72;	314/4,08;	$d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(Cl-tpy)$
	312/3.66;	509/3,85	$+d\pi(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(BDQ)$
	510/3.65		

Fonte: Autora

#### 4.1.4 Estudo da Cinética de Aquação dos Complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)]

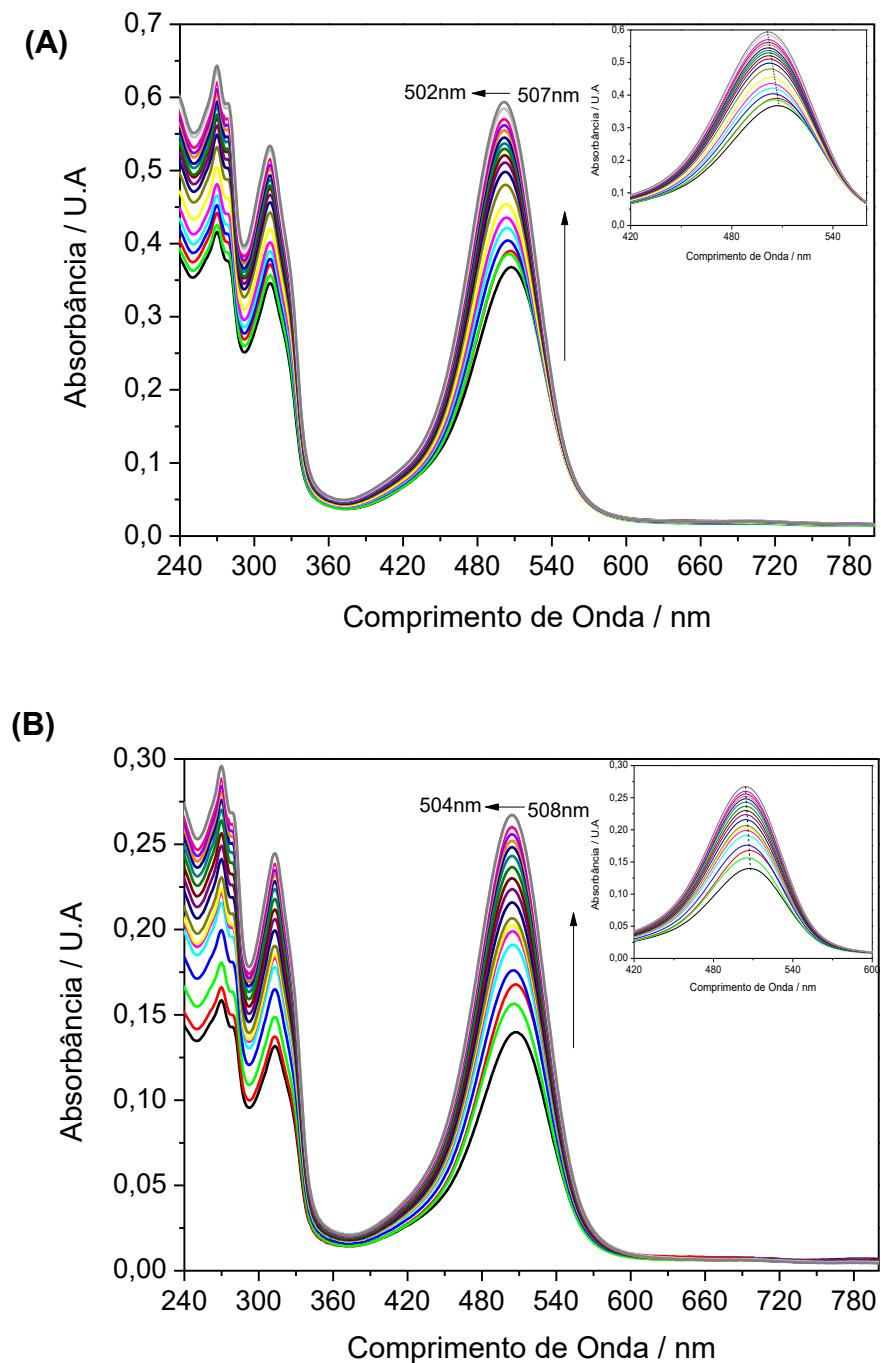
Tendo em vista que um dos objetivos deste trabalho é que ambos os complexos, [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)], sejam estudados em modelos de células tumorais, investigou-se a estabilidade em solução aquosa de ambos. Complexos que apresentam aquação como por exemplo a *cis*-diaminodicloridoplatina (II), cisplatina, tem a capacidade de se ligar ao DNA e assim, impede a replicação de células tumorais (ROSENBERG, 1970).

Os complexos polipiridínicos de rutênio (II), bem como o complexo de cisplatina, podem ser chamados de pró fármacos. A atividade citotóxica ocorrerá em função da labilização do ligante clorido e formação da espécie aquacomplexo. Muitos autores justificam a atividade citotóxica dessa classe de complexo devido à intercalação com DNA (SIMOVIĆ, et al., 2019)

Portanto, com o estudo da cinética de aquação, pode-se observar se há ou não a influência do cloro da terpiridina sobre o ligante cloro presente na esfera de coordenação.

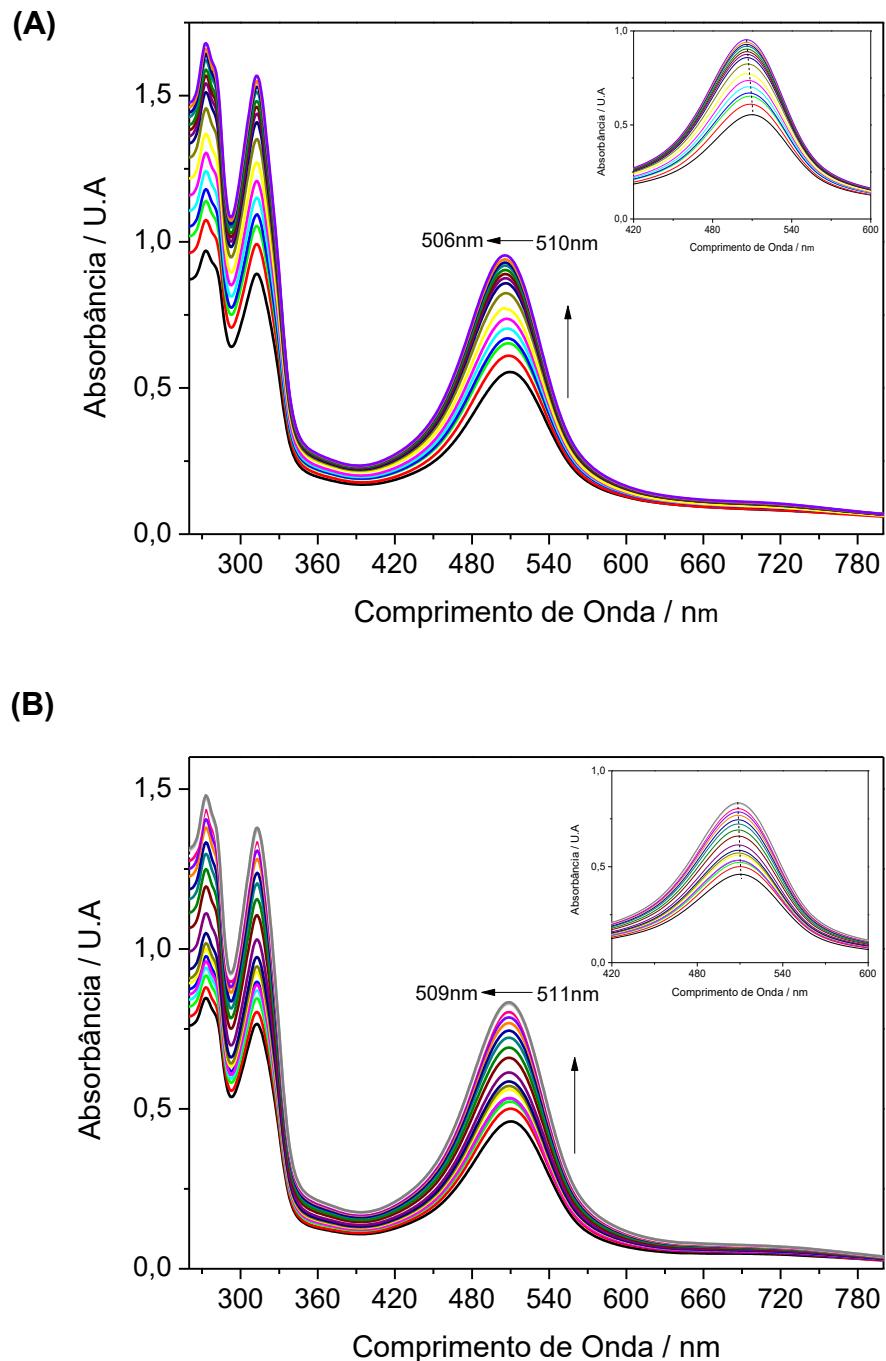
O estudo de aquação para ambos os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] foram realizados em tampão PBS (pH=7,4) e em H<sub>2</sub>O. Os espectros de absorção obtidos para cada complexo, [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] estão apresentados pelas Figuras 12 e 13, respectivamente.

**Figura 12.** Espectros eletrônicos na região do UV-vis. para o complexo [Ru(tpy)] obtidos a cada 5s., em temperatura controlada de 310K em H<sub>2</sub>O **(A)** e em PBS pH=7,4 **(B)** T= 0s (-); T= 5s (-); T= 10s (-); T= 15s (-); T= 20s (-); T=25s (-); T=30s (-); T=35s (-); T=40 (-); T= 45s (-); T= 50s (-); T= 55s (-); T=60s (-); T=65s (-); T=70s (-); T=75s (-); T=80s (-); T= 85s (-); T=90s (-); T=95s (-).



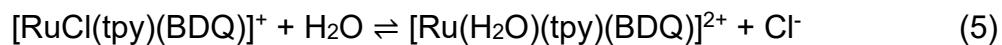
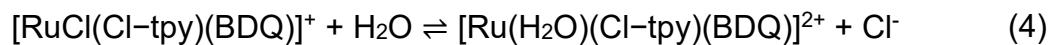
Fonte: Autora

**Figura 13.** Espectros eletrônicos na região do UV-vis. para o complexo [Ru(Cl-tpy)] obtidos a cada 5s, em temperatura controlada de 310K em H<sub>2</sub>O em **(A)** e em PBS pH=7,4 **(B)**. T= 0s (-); T= 5s (-); T= 10s (-); T= 15s (-); T= 20s (-); T=25s (-); T=30s(-); T=35s (-); T=40s (-); T= 45s (-); T= 50s (-); T= 55s (-); T=60s (-); T=65s (-); T=70s (-); T=75s (-); T=80s (-); T= 85s (-); T=90s (-); T=95s (-).



Fonte: Autora

Os espectros de absorção para os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] com o tempo, apresentaram um efeito hipsocrômico, o qual consiste em um deslocamento do máximo de absorção para regiões do espectro de menores comprimentos de onda, portanto, de maiores energias. Os deslocamentos dos máximos de absorção para regiões do espectro se dão através da reação de aquação, conforme representada pelas Equações 4 e 5. Estas são reações de substituição, de um ligante Cl<sup>-</sup>, por um ligante H<sub>2</sub>O. Quando há uma reação de substituição, onde o ligante de entrada, neste caso H<sub>2</sub>O apresenta um campo mais forte ao complexo, se comparado ao ligante de saída, neste caso Cl<sup>-</sup>, ocorre um aumento na Energia de Estabilização do Campo Cristalino (EECC) e uma maior desestabilização dos orbitais d<sub>π</sub> do rutênio (SHRIVER, et al., 2008). Quando se tem um maior desdobramento dos orbitais moleculares do complexo, é necessária uma energia maior para que ocorram as transições eletrônicas, assim, o máximo de absorção do complexo se deslocará para regiões do espectro de maiores energias, ou seja, de menores comprimentos de onda (SHRIVER, et al., 2008).



**Tabela 4.** Dados cinéticos para as reações de aquação dos complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)].

Complexo	H <sub>2</sub> O	PBS
[Ru(tpy)]	$k_{aq} = (4,40 \pm 0,89) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $t_{1/2} = 2,72 \pm 0,55 \text{ min}$	$k_{aq} = (3,60 \pm 0,51) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $t_{1/2} = 3,25 \pm 0,46 \text{ min}$
[Ru(Cl-tpy)]	$k_{aq} = (9,00 \pm 0,63) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $t_{1/2} = 1,30 \pm 0,10 \text{ min}$	$k_{aq} = (9,50 \pm 0,64) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $t_{1/2} = 1,95 \pm 0,21 \text{ min}$

Ao observar os valores de  $k_{aq}$  dos complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] obtidos, nota-se que a cinética de aquação de ambos é muito mais rápida quando comparada com os valores de  $k_{aq}$  da cisplatina ( $k_{aq}$  da cisplatina =  $6,32 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  e  $2,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , para o primeiro e segundo ligante clorido, respectivamente) (SIMOVIĆ, et al., 2019). Isto se deve ao ligante Cl<sup>-</sup> ser um bom grupo retirador de densidade

eletrônica e por sua vez, diminuir a retro-doação da terpiridina para o rutênio, o que torna o metal com caráter de Ru<sup>III</sup>. Entretanto, o Ru<sup>III</sup> é um ácido duro quando comparado ao Ru<sup>II</sup> e o ligante clorido (Cl<sup>-</sup>) uma base mole tendo em vista as características químicas para uma base mole. Portanto, a ligação não estável, o que facilita a formação do aqua complexo.

Ao comparar os valores de  $k_{aq}$  e  $t_{1/2}$  calculados para os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)], com os valores encontrados na literatura para os complexos polipiridínicos de rutênio como: [RuCl(Cl-Ph-tpy)BDQ]<sup>+</sup>; [RuCl<sub>3</sub>(Cl-Ph-tpy)]; [RuCl(Cl-tpy)en]<sup>+</sup>; [RuCl(Cl-tpy)dach]<sup>+</sup> e [RuCl(Cl-tpy)bpy]<sup>+</sup>, observa-se algumas diferenças. Os valores de  $k_{aq}$  e  $t_{1/2}$  para estes outros complexos polipiridínicos de rutênio, estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Valores de  $k_{aq}$  e  $t_{1/2}$ , obtidos para complexos polipiridínicos de rutênio já descritos na literatura.

<b>Complexos Polipiridínicos de Rutênio</b>	<b><math>k_{aq}/t_{1/2}</math></b>
[RuCl(Cl-Ph-tpy)BDQ] <sup>+</sup>	$t_{1/2} = 3\text{ h}$
[RuCl(Cl-Ph-tpy)(phen)] <sup>+</sup>	$t_{1/2} = 10\text{ h}$
[RuCl(Cl-tpy)en] <sup>+</sup>	$k_{aq} = 2,52 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $t_{1/2} = 4,58 \text{ min}$
[RuCl(Cl-tpy)dach] <sup>+</sup>	$k_{aq} = 3,94 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $t_{1/2} = 2,93 \text{ min}$
[RuCl(Cl-tpy)bpy] <sup>+</sup>	muito lenta

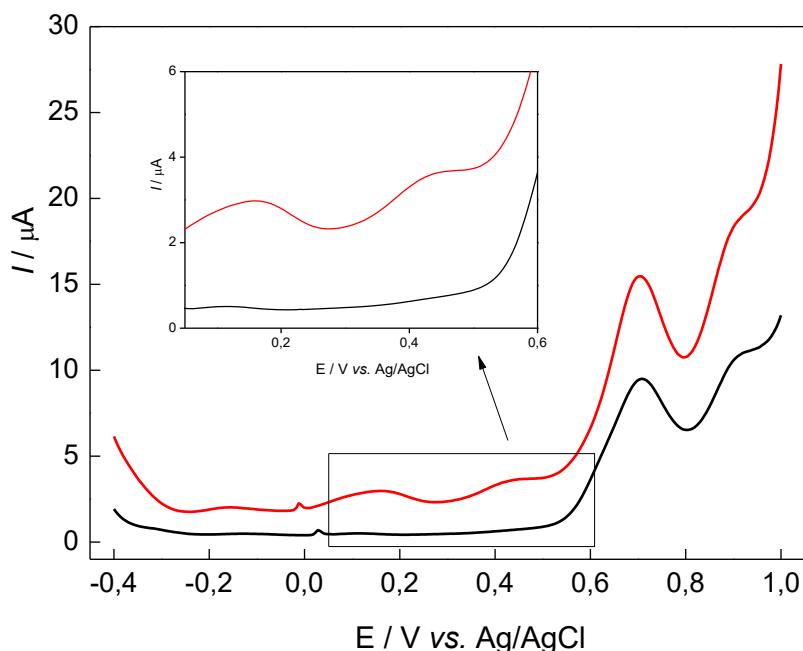
A labilização do ligante cloro é influenciada pelo efeito *trans* dos co-ligantes bidentados σ-doador em comparação aos co-ligantes π-receptores. Co-ligantes π receptores aumentam a estabilidade da ligação Ru-Cl, diminuindo a cinética de aquação. Veja que o valor de  $k_{aq}$  para o complexo [RuCl(Cl-tpy)bpy]<sup>+</sup> é muito lenta em relação aos complexos com co-ligantes etilenodiamina (en) e diaminociclohexano (dach). Os complexos [RuCl(Cl-Ph-tpy)opda] e [RuCl<sub>3</sub>(Cl-Ph-tpy)] são considerados inertes como o complexo [RuCl(Cl-tpy)bpy]<sup>+</sup>. Na literatura,

assume-se que o grupo substituinte Cl ou Ph-Cl na posição 4 da terpiridina não influencia na cinética de aquação (RILAK, et al., 2014).

#### 4.1.5 Estudo da Cinética de Aquação dos Complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] via eletroquímica

Os voltamogramas de pulso diferencial foram registrados em tempos diferentes, tempo zero (ciclo 1) e após 10 minutos (ciclo 5). Para o complexo [Ru(tpy)] (Figura 14) foi possível observar que no ciclo 1 em sentido de varredura anôdica, há dois potenciais de oxidação na região de +0,70 V vs Ag/AgCl e +0,90 vs Ag/AgCl. Possivelmente, esses potenciais podem ser atribuídos ao processo centrado no íon metálico Ru<sup>II</sup>/Ru<sup>III</sup> para os isômeros cloro complexo [Ru(tpy)]. Após 10 minutos (ciclo 5), pode-se observar que ocorre os processos de redução Ru<sup>II</sup>/Ru<sup>III</sup> para os isômeros cloro complexo, porém há o aparecimento de dois processos na região de +0,40 vs Ag/AgCl e +0,15 vs Ag/AgCl que são atribuídos aos ao processo centrado no íon metálico Ru<sup>II</sup>/Ru<sup>III</sup> para os isômeros aqua complexo ([RuH<sub>2</sub>O(tpy)]).

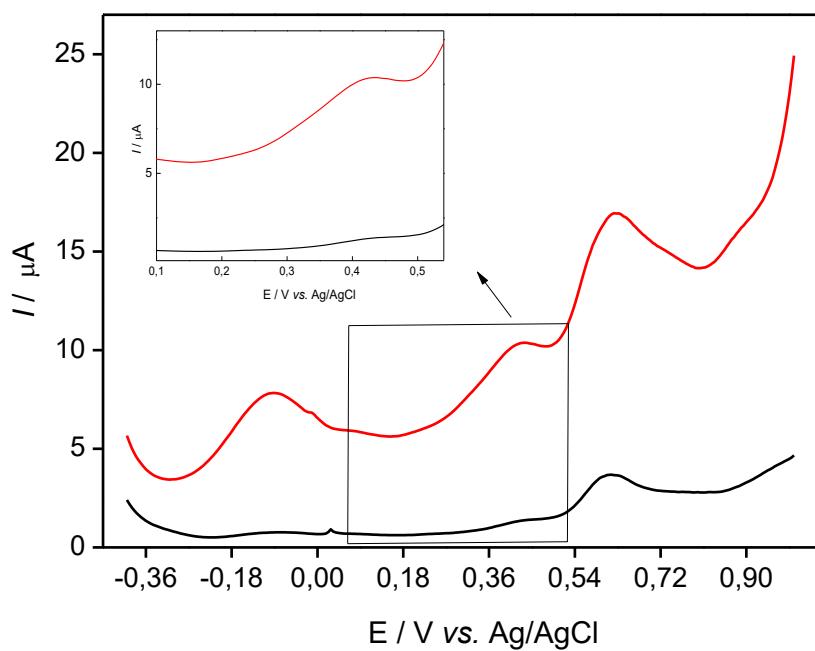
**Figure 14.** Os voltamogramas de pulso diferencial do complexo [Ru(tpy)] foram registrados em tempos diferentes, tempo zero (ciclo 1, -) e após 10 minutos (ciclo 5, -).



No trabalho de Bonaventura e colaboradores (2009), foi reportado o potencial de redução Ru<sup>II</sup>/Ru<sup>III</sup> para a espécies [Ru(H<sub>2</sub>O)(BDQ)(tpy)]<sup>2+</sup> na região de +0,64 vs Ag/AgCl (pH=7,4 e KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>), o que corrobora com a atribuição realizadas nos dados experimentais apresentados neste trabalho.

No caso do complexo [Ru(Cl-tpy)], nos voltamogramas de pulso diferencial foi possível de observar que no ciclo 1 em sentido de varredura anôdica (Figura 15), há somente um potencial de oxidação na região de +0,62 V vs Ag/AgCl, atribuído ao processo centrado no íon metálico Ru<sup>II</sup>/Ru<sup>III</sup> para o cloro complexo [Ru(Cl-tpy)]. Entretanto, no ciclo 5, visualiza-se dois processos de oxidação atribuídos as espécies aqua complexo [Ru(H<sub>2</sub>O)(Cl-tpy)] na região de +0,15 vs Ag/AgCl e -0,09 vs Ag/AgCl.

**Figura 15.** Os voltamogramas de pulso diferencial do complexo [Ru(Cl-tpy)] foram registrados em tempos diferentes, tempo zero (ciclo 1,) (-) e após 10 minutos (ciclo 5), (-).



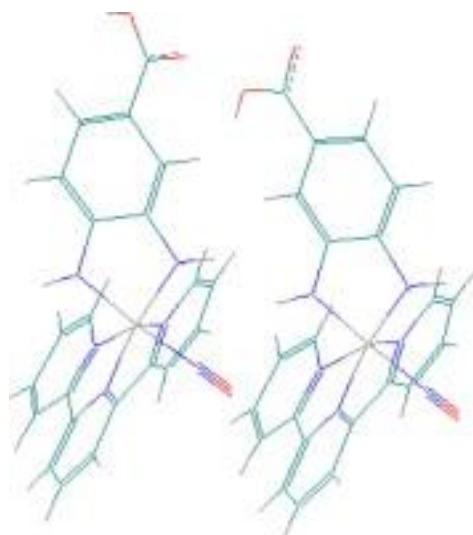
É importante ressaltar que os dados eletroquímicos contribuem com o entendimento da influência dos diferentes co-ligantes do tipo tpy e Cl-tpy, bem como sobre a estrutura eletrônica dos complexos em estudo. O potencial Ru<sup>II</sup>/Ru<sup>III</sup> para o complexo [Ru(tpy)] encontra-se em uma região mais positiva, +0,70 V vs Ag/AgCl,

quando comparado com o complexo [RuCl-tpy] (+0,62 V vs Ag/AgCl). Bem como visto, na parte espectroscópica na região do UV-visível (item 4.1.3, página 42), o efeito retirador de elétrons proporcionado pelo substituinte cloro (-Cl) do ligante terpiridina (tpy), diminui a retro-doação Ru<sup>II</sup>-tpy-Cl o que contribui para desestabilização do orbital HOMO (orbital ocupado de maior energia), assim facilitando a oxidação do íon Ru<sup>II</sup> no complexo. Assim sendo, o íon Ru<sup>III</sup> que apresenta caráter de ácido duro em relação ao ligante cloro, o qual é uma base mole, contribuirá com a instabilidade da ligação Ru<sup>II</sup>-Cl e assim facilitará a substituição pelo ligante aqua (Tabela 4).

#### **4.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Conforme reportado por de Oliveira e colaboradores (2009), o complexo [Ru(tpy)], através de análises via técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) e CLAE, demonstraram a formação de isômeros de posição durante a síntese do complexo [Ru(tpy)] (Figura 16). Considera-se as diferentes conformações espaciais do complexo em relação a posição do substituinte carboxila (-COOH) do ligante BDQ. Nessa perspectiva, sugerimos nesse trabalho a utilização da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para o melhor entendimento desses isômeros durante a cinética de aquação, já que a técnica espectroscópica na região do UV visível e fluorescência não nos permite a sensibilidade em relação aos diferentes isômeros.

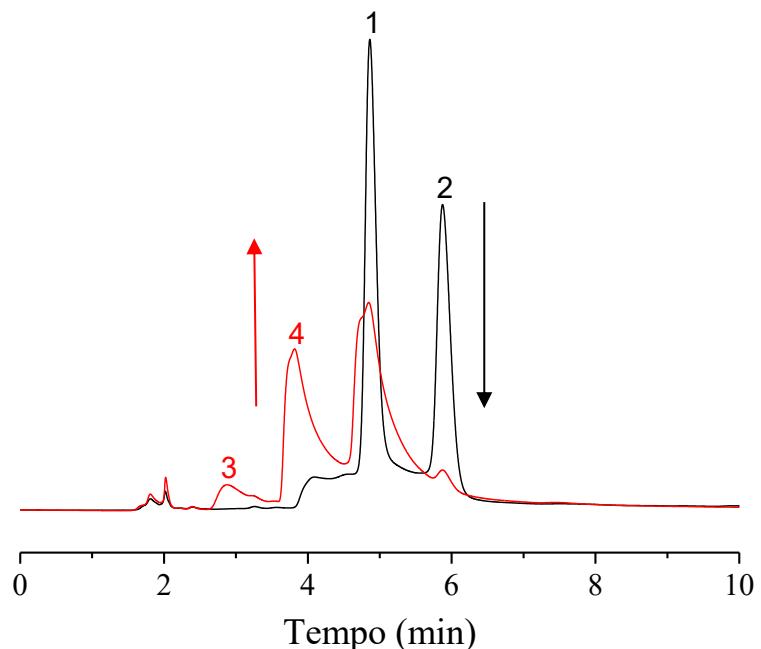
**Figura 16.** Estruturas químicas dos isômeros do complexo nitrosilo de rutênio do tipo  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{tpy})(\text{NH.NHq})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, et al., 2009.

O cromatograma, Figura 17, no tempo zero mostra a separação dos isômeros de posição do complexo  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$ , com picos (1 e 2) em diferentes tempos de retenção  $\text{tr}_1=4,85$  e  $\text{tr}_2= 5,87$  min. Após 20 min., a solução a  $37^{\circ}\text{C}$ , foi analisada e verificou-se uma diminuição dos picos 1 e 2 e aparecimento de novos picos com tempos de retenção em  $\text{tr}_3=2,89$  e  $\text{tr}_4= 3,81$  min (3 e 4).

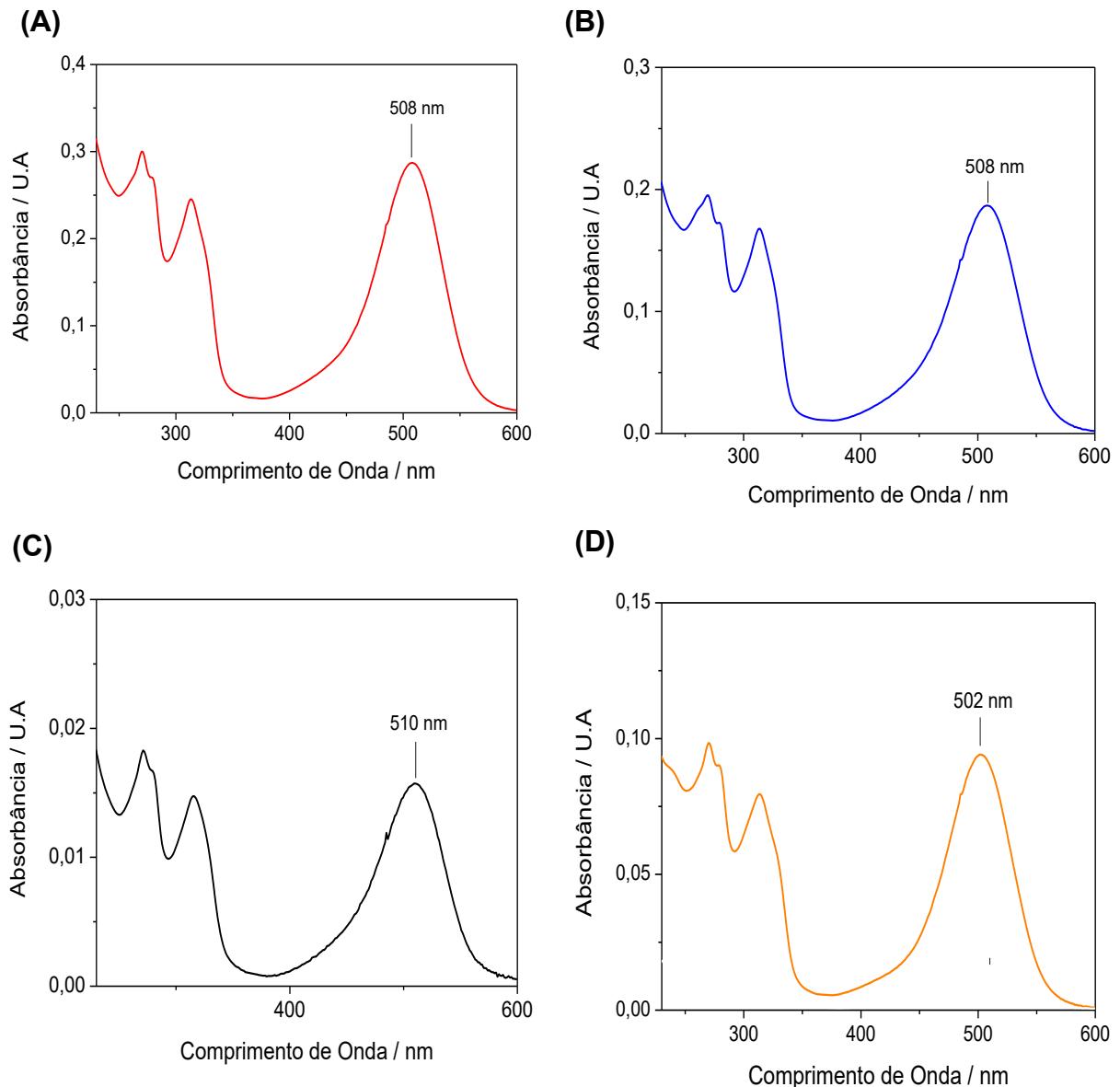
**Figura 17.** Cromatogramas de separação do complexo [Ru(tpy)]. Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 0,1% de ácido trifluoracético:metanol (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 min (—) e 20 min (—).

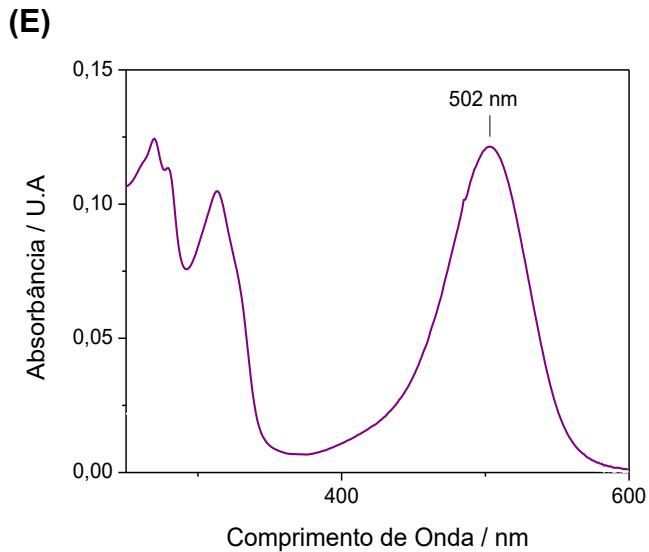


Fonte: Autora

Através das análises dos espectros na região do UV-visível para os diferentes tempos de retenção encontrados (Figura 18) nos cromatogramas para o complexo [Ru(tpy)] em diferentes tempos de reação, foi possível identificar as espécies cloro e aqua do complexo.

**Figura 18.** Espectros de absorção na região do UV/Vis. para o complexo [Ru(tpy)], referente aos picos: T= zero, Pico 1 **(A)**; T=zero, Pico2 **(B)**; T= 20 min, Pico 3 **(C)**; T= 20 min, Pico 4 **(D)** e T= 20 min, Pico 1 **(E)** do cromatograma.



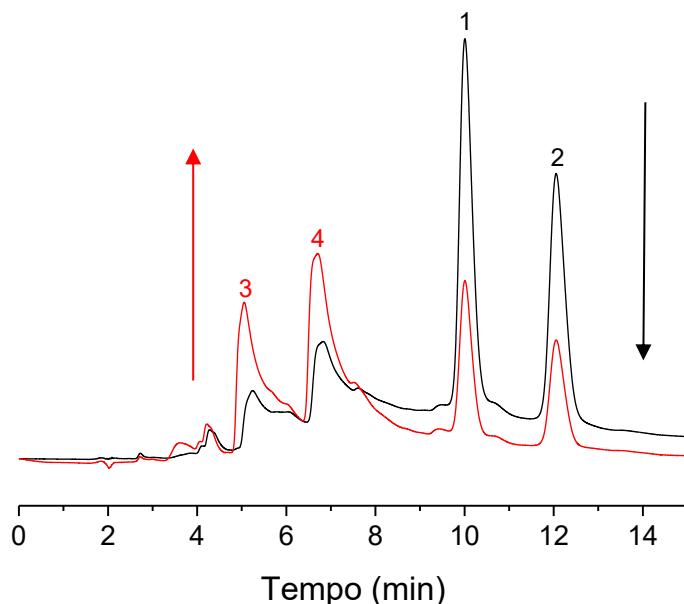


Fonte: Autora

Os picos 1 e 2, no tempo zero, referem-se as espécies cloro complexo com máximo de absorção na região do visível em 508 nm. No cromatograma após 20 min, se vê que os espectros de absorção para os picos 1 e 4 são as espécies aquo complexo com absorção máxima no visível em 502 nm. Importante notar, que um dos isômeros de posição convertem na totalidade para a espécie aquo complexo e altera o tempo de retenção, enquanto que o outro isômero a conversão é parcial e sem alteração do tempo de retenção.

Os cromatogramas obtidos para o complexo [Ru(Cl-tpy)] são apresentados na Figura 19. Pode-se observar no cromatograma, Figura 18, que no tempo zero mostra a separação dos isômeros de posição do complexo [Ru(Cl-tpy)], com picos (1 e 2) em diferentes tempos de retenção  $t_r = 10,09$  e  $t_r = 12,10$  min. Após 20 min., a solução a 310K, foi analisada e verificou-se uma diminuição dos picos 1 e 2 e aparecimento de novos picos com tempos de retenção em  $t_r = 5,05$  e  $t_r = 6,70$  min (3 e 4).

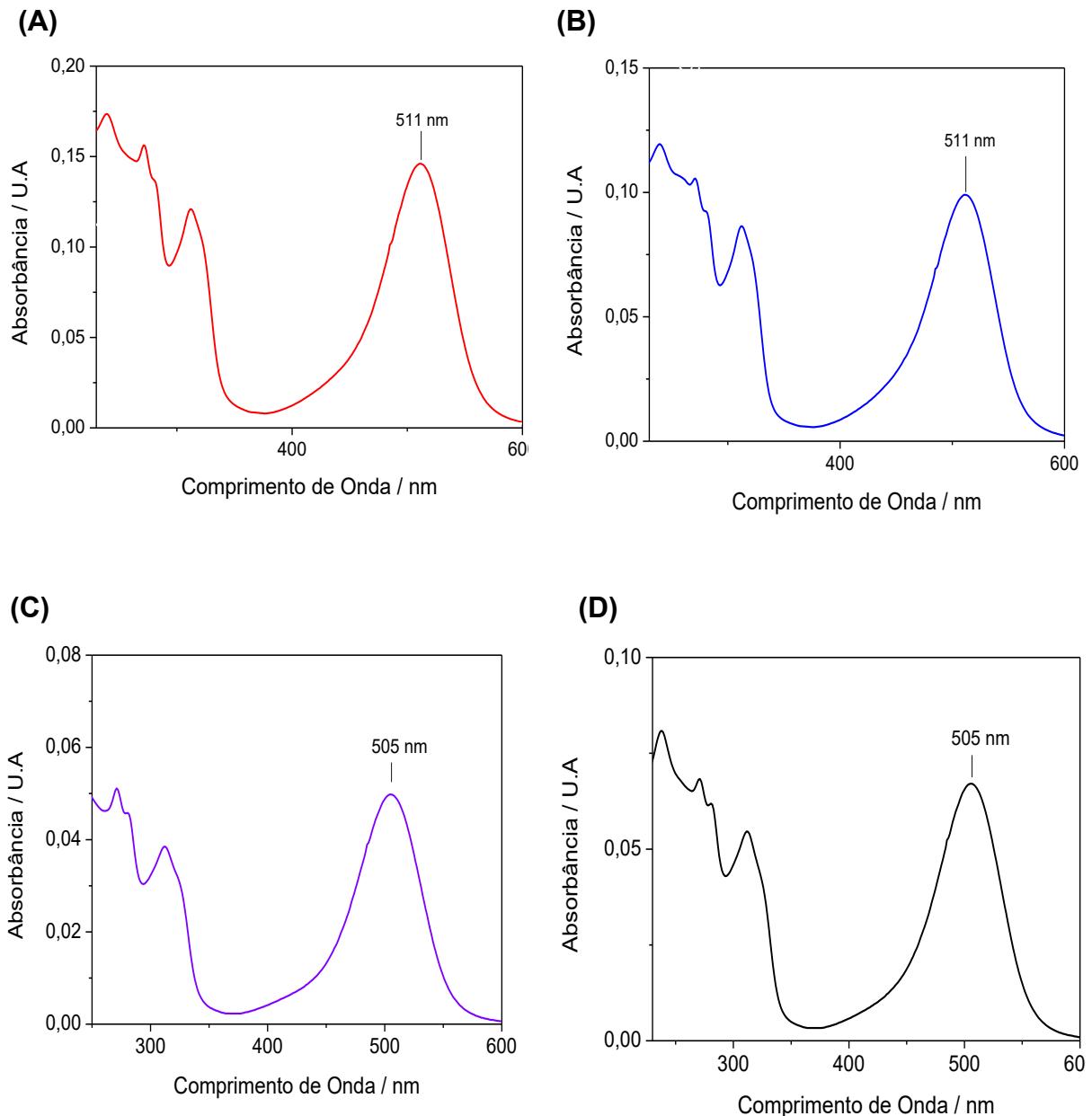
**Figura 19.** Cromatogramas de separação do complexo [Ru(Cl-tpy)]. Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 0,1% de ácido trifluoracético:metanol (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 min (—) e 20 min (---).



Fonte: Autora

Diante das análises dos espectros na região do UV-visível para os diferentes picos encontrados (Figura 19) no cromatograma para o complexo [Ru(Cl-tpy)] em diferentes tempos de retenção, foi possível identificar as espécies cloro e aqua do complexo (Figura 20).

**Figura 20.** Espectro de absorção na região do UV/Vis. para o complexo Ru[(Cl-tpy)], referente aos picos: T= zero, Pico 1 **(A)**; T=zero, Pico 2 **(B)**; T=20min, Pico 3 **(C)** e T=20min, Pico 4 **(D)** do cromatograma.



Fonte: Autora

Os picos 1 e 2, no tempo zero, referem-se as espécies cloro complexo com máximo de absorção na região do visível em 511 nm, já que a concentração de espécies cloro complexo em solução é muito maior, quando comparada com a do

aqua complexo. No cromatograma após 20 min, observa-se que os espectros de absorção para os picos 3 e 4 são as espécies aqua complexo com absorção máxima no visível em 505 nm, indicando-se que há a conversão parcial dos isômeros de posição cloro complexo para os isômeros de posição aqua complexos.

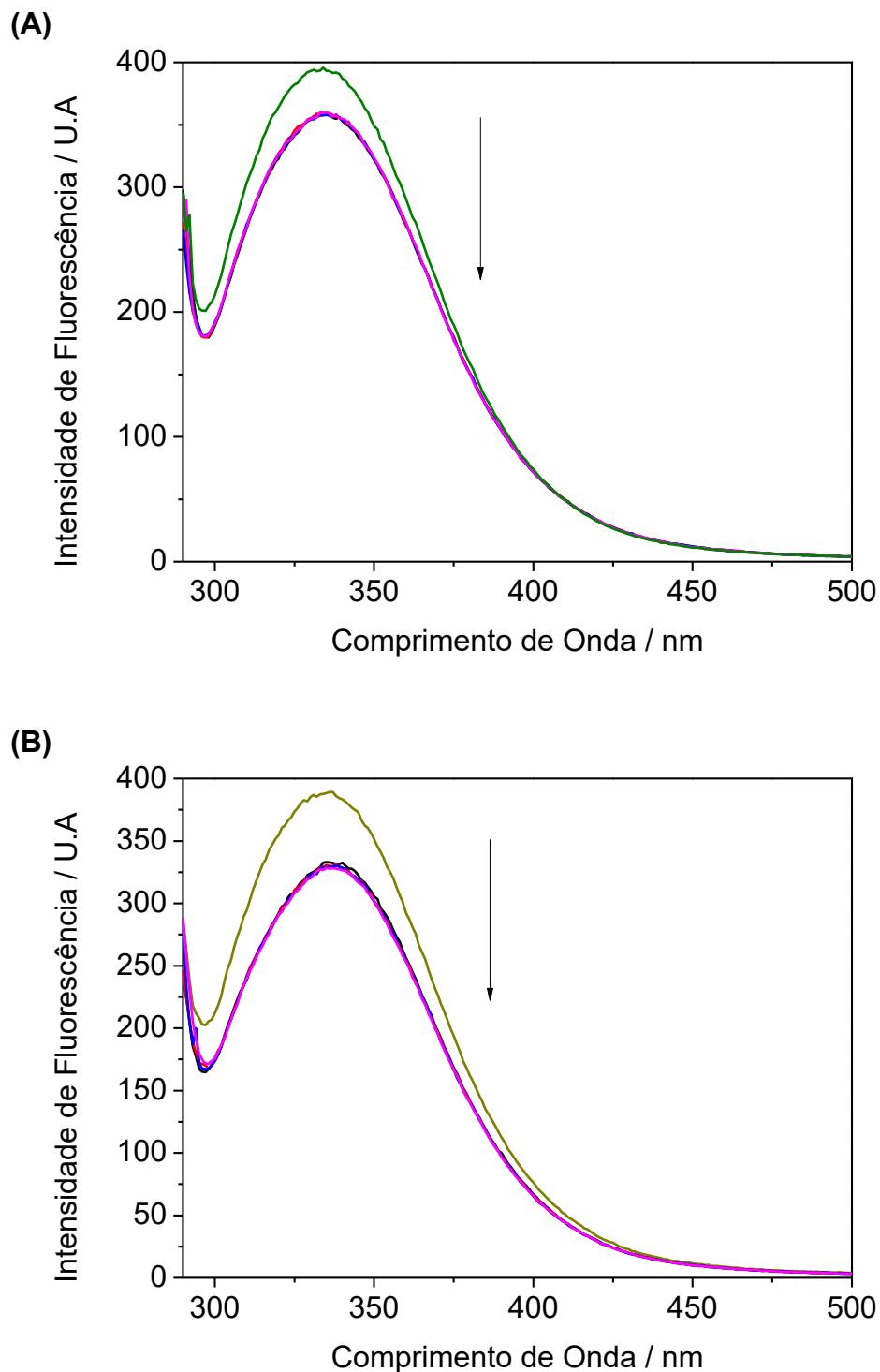
#### **4.2 Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Polipiridínicos de Rutênio.**

##### **4.2.1 Avaliação do Tempo de Interação entre a HSA e os Complexos Polipiridínicos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência.**

Os estudos acerca do tempo de interação entre a HSA e os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] são parâmetros de suma importância, pois os posteriores experimentos com relação à tais interações são totalmente dependentes do tempo de interação entre as espécies em questão. Para tal, utilizou-se a técnica de espectroscopia de fluorescência.

Portanto, foram realizadas análises espectroscópicas de fluorescência para a HSA em ausência e presença de uma alíquota do complexo [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] a 308 K em função do tempo de incubação. Os espectros de fluorescência obtidos para a biomolécula em presença do complexo [Ru(tpy)] para biomolécula em presença do complexo [Ru(Cl-tpy)], são apresentados na Figura 21.

**Figura 21.** Espectros de fluorescência para a HSA em presença dos complexos [Ru(tpy)] (**A**) e [Ru(Cl-tpy)] (**B**), em PBS (pH=7,4) a 308 K.  $\lambda_{exc}=280$  nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm.  $[HSA]=1,0 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  (—);  $[\text{Complexo}]=3,3 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ; Tempo de incubação: 4min.



Fonte: Autora

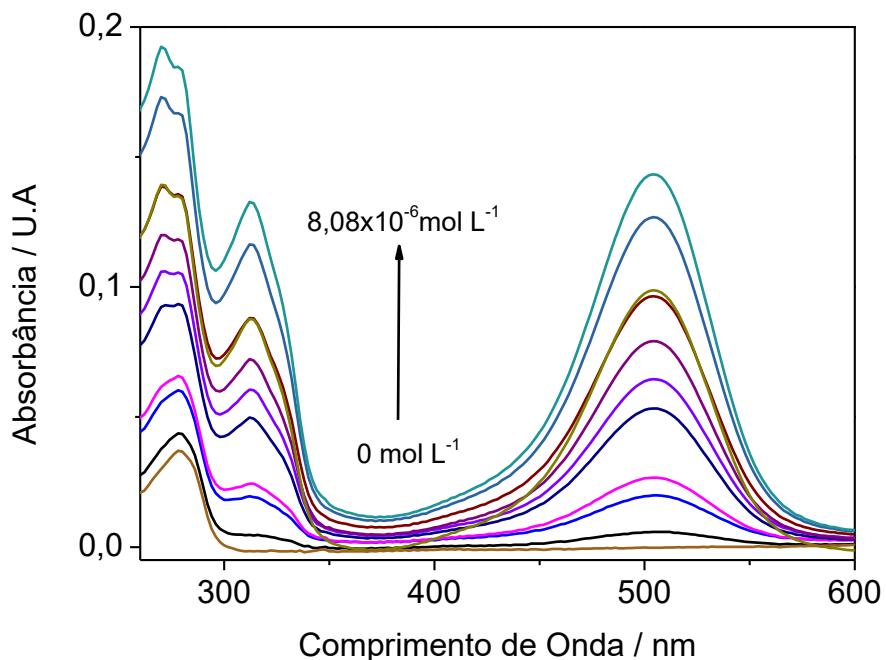
Os valores de intensidade de fluorescência obtidos para o sistema HSA-[Ru(tpy)] e HSA-[Ru(Cl-tpy)] apresentados na Figura 21 com tempo de incubação total de 4 min, exibem alterações significativas somente até o tempo de incubação de 2 minutos. Assim, conclui-se que o tempo de interação entre a HSA e os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] é de 2 minutos.

#### **4.2.2. Avaliação das Interações entre a HSA e os complexos rutênio polipiridínicos via Espectroscopia na Região do UV/Vis.**

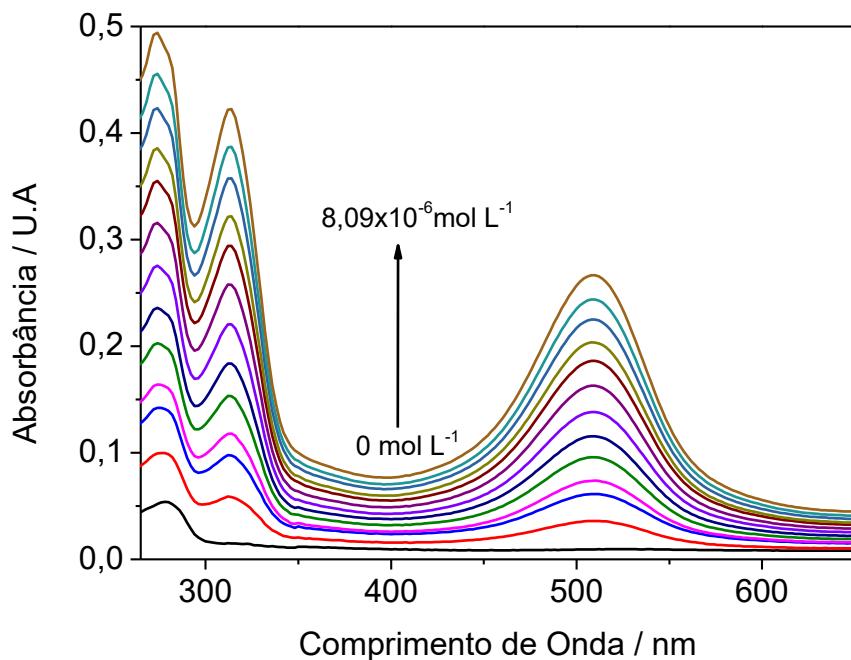
A fim de se avaliar as possíveis interações entre os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] com a albumina humana (HSA), a espectroscopia na região UV /Vis também foi realizada utilizando misturas de complexos de HSA em diferentes concentrações. A albumina humana é uma proteína transportadora e que pode sofrer modificações em sua estrutura quando a mesma interage com complexos de rutênio polipiridínicos (HU, et al., 2006; SEEDHER & BHATIA, 2006; RANJBAR, et al., 2013).

Foram realizadas análises espectroscópicas na região do UV/Vis. para a HSA na ausência e presença de diferentes concentrações dos complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] a 308 K. Os espectros de absorção obtidos para a HSA e os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] são apresentados na Figura 22 e 23, respectivamente.

**Figura 22.** Espectros de absorção na região do UV/Vis. para a HSA e os complexos [Ru(tpy)], em PBS (pH=7,4) a 308 K - [HSA]=1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (-); [Complexo]=0- $1,65 \times 10^{-5}$   $\mu\text{mol L}^{-1}$  [4,93x10<sup>-7</sup> (-); 1,14x10<sup>-7</sup> (-); 1,64x10<sup>-6</sup> (-); 3,26x10<sup>-6</sup> (-); 4,07x10<sup>-6</sup> (-); 4,88x10<sup>-6</sup> (-); 5,68x10<sup>-6</sup> (-); 6,49x10<sup>-6</sup> (-); 7,28x10<sup>-6</sup> (-); 8,08x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> (-)].



**Figura 23.** Espectros de absorção na região do UV/Vis. para a HSA e os complexos  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})]$ , em PBS ( $\text{pH}=7,4$ ) a 308 K -  $[\text{HSA}]=1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (-);  $[\text{Complexo}]=0 - 8,09 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  [4,93x10<sup>-7</sup> (-); 8,22x10<sup>-7</sup> (-); 1,15x10<sup>-7</sup> (-); 1,64x10<sup>-6</sup> (-); 2,46x10<sup>-6</sup> (-); 3,27x10<sup>-6</sup> (-); 4,08x10<sup>-6</sup> (-); 4,89x10<sup>-6</sup> (-); 5,69x10<sup>-6</sup> (-); 6,50x10<sup>-6</sup> (-); 7,30x10<sup>-6</sup> (-); 8,09x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> (-)].



Fonte: Autora

Ao observar as Figuras 22 e 23, nota-se que a absorbância de ambos os complexos é diretamente proporcional a concentração. Com o aumento da concentração dos complexos em solução, maior é a intensidade da absorbância. Não se verificou nenhum deslocamento espectral das bandas de absorção.

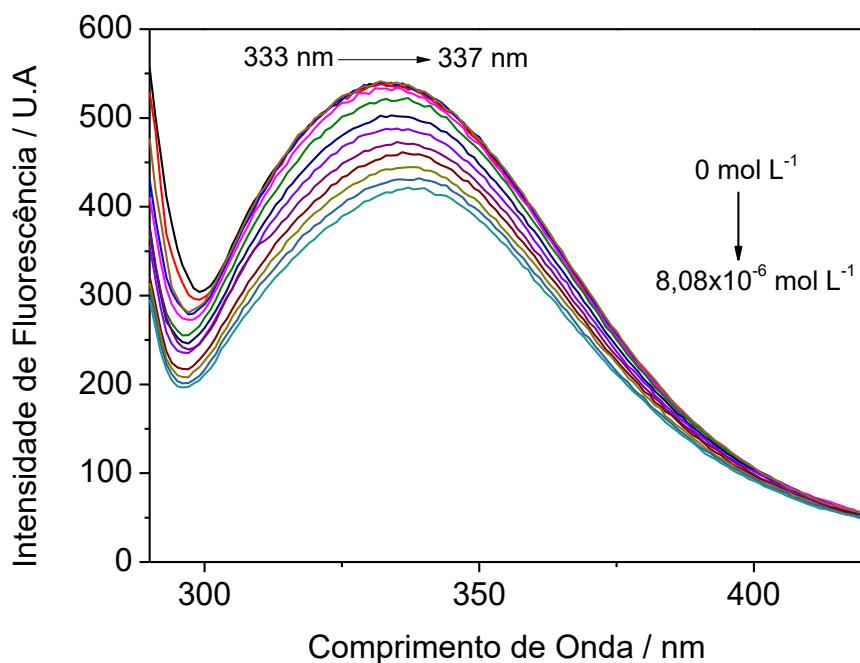
#### 4.2.3 Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Polipiridínicos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência

Utilizou-se a técnica de espectroscopia de fluorescência para analisar a supressão de fluorescência da HSA pela presença dos complexos e obter-se alguns parâmetros sobre as interações entre a HSA e os complexos  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$  e  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})]$ . Com o auxílio de tratamentos matemáticos e dos espectros obtidos de supressão de

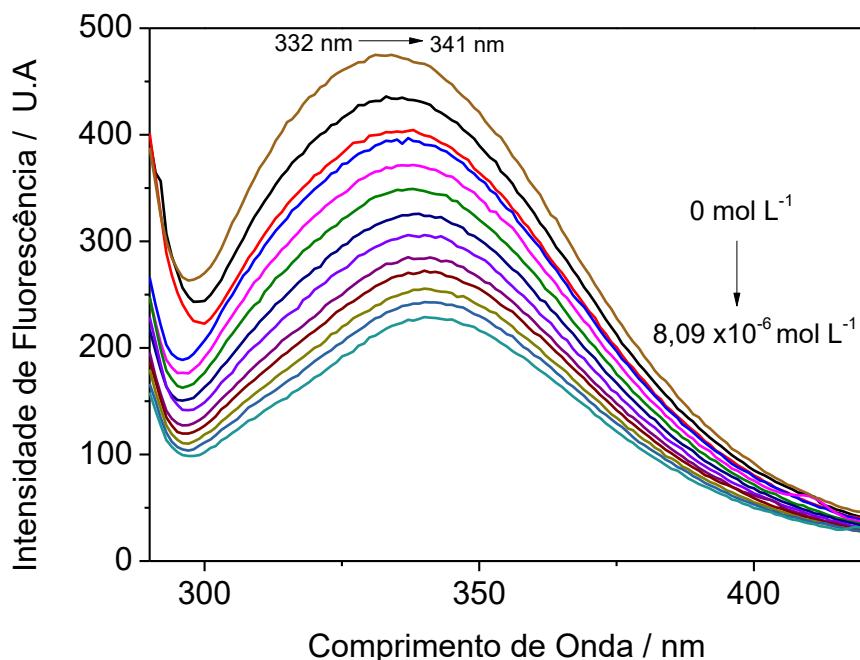
fluorescência, pode-se determinar os parâmetros termodinâmicos, tipos de mecanismos e constantes de ligação, provenientes das ligações estabelecidas entre os complexos e a albumina (LAKOWICZ, 2006; MOREIRA, et al., 2015).

À vista disso, realizaram-se análises espectroscópicas de fluorescência para a HSA em ausência e presença de diferentes concentrações dos complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] a 308 K. Os espectros de supressão de fluorescência obtidos para a biomolécula em presença do complexo [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] são apresentados nas Figuras 24 e 25.

**Figura 24.** Espectros de emissão de fluorescência para a HSA e os complexos [Ru(tpy)], em PBS (pH=7,4) a 308 K - [HSA]=1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (-); [Complexo]=0-1,65x10<sup>-5</sup>  $\mu\text{mol L}^{-1}$  [4,93x10<sup>-7</sup> (-); 8,20x10<sup>-7</sup> (-); 1,14x10<sup>-7</sup> (-); 1,64x10<sup>-6</sup> (-); 2,45x10<sup>-6</sup> (-); 3,26x10<sup>-6</sup> (-); 4,07x10<sup>-6</sup> (-); 4,88x10<sup>-6</sup> (-); 5,68x10<sup>-6</sup> (-); 6,49x10<sup>-6</sup> (-); 7,28x10<sup>-6</sup> (-); 8,08x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> (-)].



**Figura 25.** Espectros de emissão de fluorescência para a HSA e os complexos  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})]$ , em PBS ( $\text{pH}=7,4$ ) a 308 K -  $[\text{HSA}]=1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (-);  $[\text{Complexo}]=0 - 8,09 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  [4,93x10<sup>-7</sup> (-); 8,22x10<sup>-7</sup> (-); 1,15x10<sup>-7</sup> (-); 1,64x10<sup>-6</sup> (-); 2,46x10<sup>-6</sup> (-); 3,27x10<sup>-6</sup> (-); 4,08x10<sup>-6</sup> (-); 4,89x10<sup>-6</sup> (-); 5,69x10<sup>-6</sup> (-); 6,50x10<sup>-6</sup> (-); 7,30x10<sup>-6</sup> (-); 8,09x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> (-)].



Ao observar as Figuras 24 e 25, as quais apresentam os espectros de emissão de fluorescência para a HSA em presença dos complexos  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$  e  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})]$ , nota-se a supressão de fluorescência da HSA com adições sucessivas dos complexos. Além disso, os máximos de emissão ocorrem alterações de deslocamento os quais variaram de 333 nm a 337 nm para o complexo  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$  e, por sua vez, de 332 nm a 341 nm para o complexo  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})]$ .

Sabendo-se que a HSA em ausência de ambos os complexos possui um máximo de emissão em  $\lambda=335$  nm, correspondente fluorescência intrínseca dos aminoácidos aromáticos Tyr, Trp e Phe, pode-se concluir que essa diminuição das intensidades de fluorescência é causada devido às mudanças conformacionais dos microambientes proteicos próximos aos resíduos de aminoácidos, mais especificamente, aos resíduos de Tyr e Trp. Assim, é possível afirmar que há a interação entre a HSA e os complexos  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$  e  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})]$  (PETERS JR., 1995; EFTINK, et al., 2000; MOREIRA, et al., 2015).

Com o intuito de calcularem-se as constantes:  $K_{sv}$  é a constante de supressão de fluorescência e  $K_a$  é a constante de interação dos complexos com a HSA, utilizou-se a equação de Stern- Volmer (5) e equação de Stern-Volmer que foi alterada de modo a permitir a determinação do  $K_a$  (6).

$$F_0/F = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad (5)$$

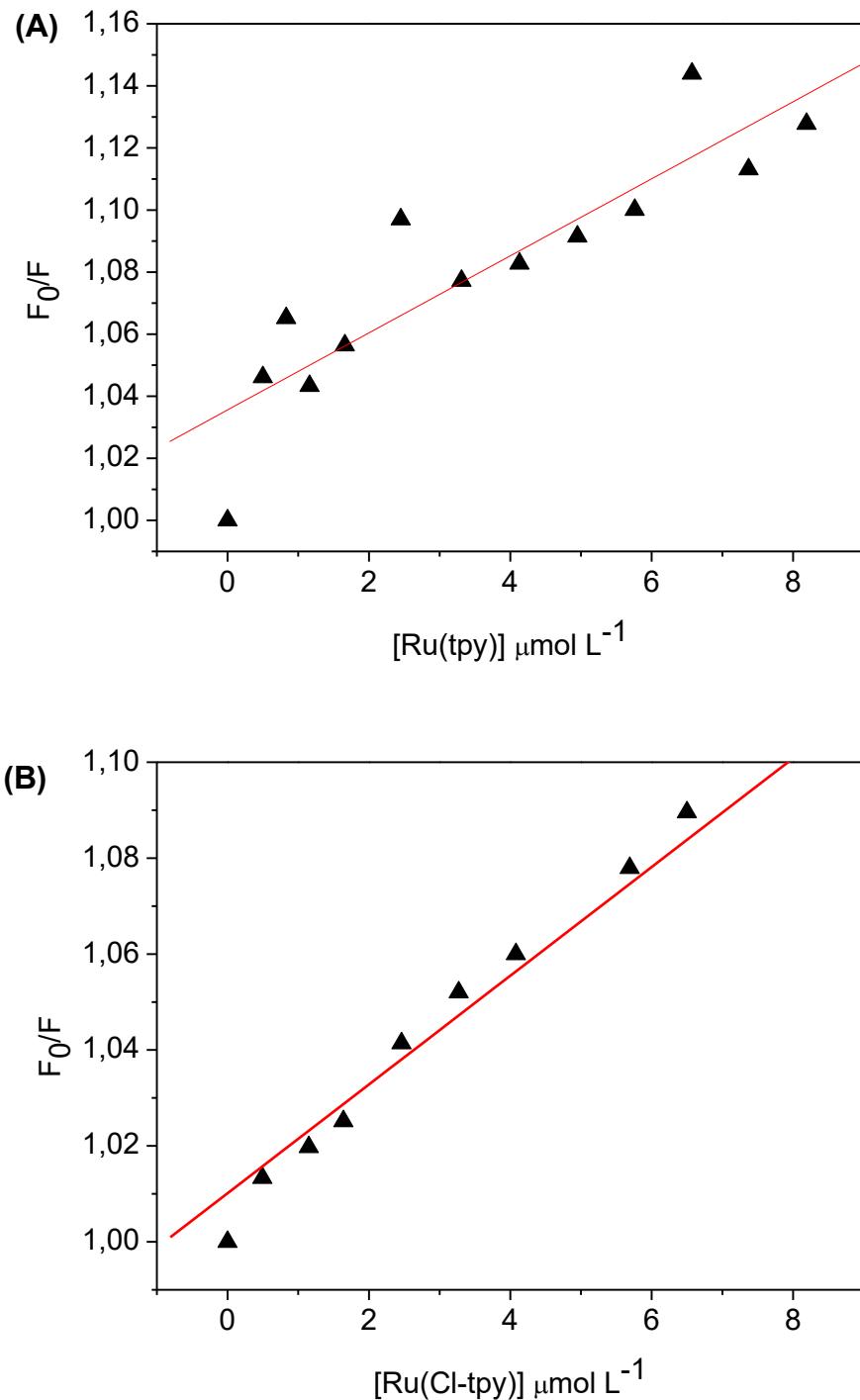
$$\log\{(F_0-F)/F\} = \log K_a + n \log [Q] \quad (6)$$

Na Equação 5,  $F_0$  e  $F$  são as intensidades relativas de fluorescência da HSA em ausência e em presença do complexo, respectivamente;  $k_q$  é a constante de velocidade bimolecular de supressão;  $\tau_0$  é o tempo de vida de fluorescência médio da biomolécula em ausência do supressor ( $10^{-8}$  s);  $[Q]$  é a concentração dos complexos; a constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) é o produto  $k_q\tau_0$  (LAKOWICZ, 2006).

Na Equação 6,  $F_0$  e  $F$  são as intensidades relativas de fluorescência da HSA em ausência e em presença do complexo; o  $K_a$  é a constante de associação e  $n$  é o número de sítios de ligação (LAKOWICZ, 2006).

Os gráficos de  $F_0/F$  em função da concentração dos complexos  $[\text{Ru(tpy)}]$  e  $[\text{Ru(Cl-tpy)}]$  são apresentados na Figura 26.

**Figura 26.** Gráficos de Stern-Volmer acerca das interações entre a HSA e os complexos  $[\text{Ru(tpy)}]$  (A) e  $[\text{Ru(Cl-tpy)}]$  (B), em PBS ( $\text{pH}=7,4$ ) em temperatura de 308K.  $\lambda_{\text{exc}}=280 \text{ nm}$ . Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm.



Fonte: Autora

Os gráficos de  $F_0/F$  em função da concentração dos complexos  $[\text{Ru(tpy)}]$  e  $[\text{Ru(Cl-tpy)}]$ , apresentados na Figura 26, exibem perfis lineares e, utilizando-se de regressões lineares, foram calculados os valores de  $K_{sv}$  para os sistemas HSA– $[\text{Ru(tpy)}]$  e HSA– $[\text{Ru(Cl-tpy)}]$  em temperatura de 308 K. Estes dados estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Valores de  $K_{sv}$ ,  $K_a$  e  $n$  para os complexos HSA– $[\text{Ru(tpy)}]$ , HSA– $[\text{Ru(Cl-tpy)}]$  e para os demais complexos polipiridínicos de rutênio já descritos na literatura, em temperatura de 308K.

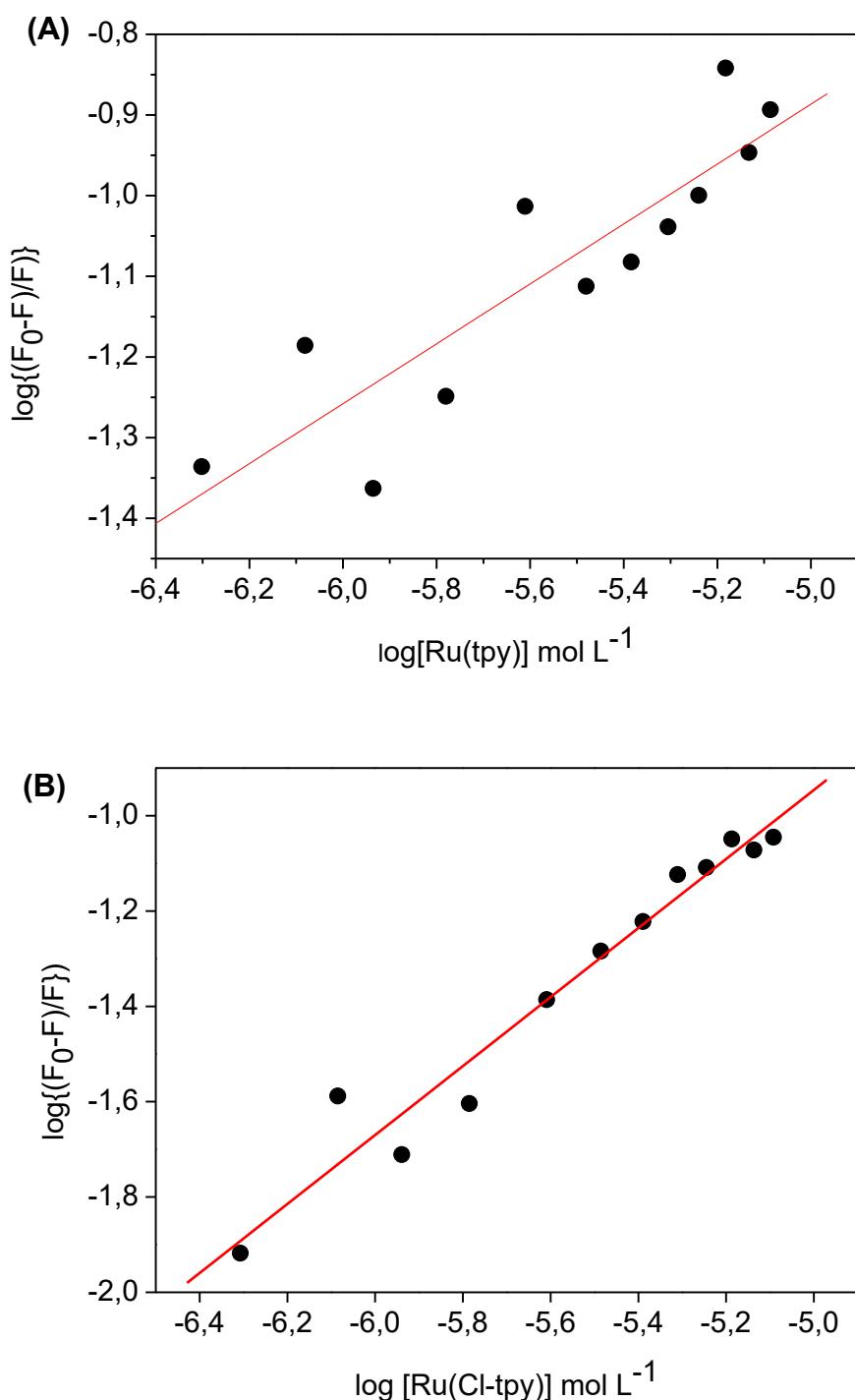
Complexos	$K_{sv}$ ( $\times 10^4$ mol L $^{-1}$ )	$K_a$ (L mol $^{-1}$ )	$n$
$[\text{RuCl(tpy)}(\text{BDQ})]^+$	1,24	9,33	0,37
$[\text{RuCl(Cl-tpy)}(\text{BDQ})]^+$	1,13	471	0,72
$[\text{RuCl(Cl-tpy)}(\text{en})]^+$	7,25	$7,19 \times 10^4$	-
$[\text{RuCl(Cl-tpy)dach}]^+$	8,70	$8,59 \times 10^4$	-
$[\text{RuCl(Cl-tpy)}(\text{bpy})]^+$	0,37	6,72	-
$[\text{RuCl(Cl-Ph-tpy)}\text{BDQ}]^+$	4,91	$2,70 \times 10^4$	1,35
$[\text{RuCl(Cl-Ph-tpy)}(\text{phen})]^+$	4,43	$4,30 \times 10^4$	1,40
$[\text{RuCl(Cl-Ph-tpy)}(\text{bpy})]^+$	1,00	19,74	0,45
$[\text{RuCl(Cl-Ph-tpy)}(\text{en})]^+$		$5,96 \times 10^4$	1,02
$[\text{RuCl(Cl-Ph-tpy)}(\text{dach})]^+$		$3,21 \times 10^4$	0,94

A determinação da constante de associação ( $K_a$ ) tendo como objetivo de investigar-se se a interação HSA– $[\text{Ru(tpy)}]$  e HSA– $[\text{Ru(Cl-tpy)}]$  é forte ou fraca. As

constantes foram obtidas utilizando-se a Equação 5 (Equação de Stern-Volmer modificada)

Os gráficos de  $\log\{(F_0-F)/F\}$  em função do logaritmo da concentração dos complexos  $[\text{Ru(tpy)}]$  e  $[\text{Ru(Cl-tpy)}]$  são apresentados na Figura 27.

**Figura 27.** Gráficos de  $\log\{(F_0-F)/F\}$  em função de  $\log[\text{Ru(tpy)}]$  (A) e  $\log[\text{Ru(Cl-tpy)}]$  (B) na temperatura de 308K.



Os gráficos de  $\log\{(F_0-F)/F\}$  em função da concentração dos complexos  $[\text{Ru(tpy)}]$  e  $[\text{Ru(Cl-tpy)}]$ , apresentados na Figura 27, apresentam perfis lineares e utilizando-se de regressões lineares, calcularam-se os valores de  $K_a$  e  $n$  (Tabela 6) para os sistemas HSA– $[\text{Ru(tpy)}$ ] e HSA– $[\text{Ru(Cl-tpy)}$ ] na temperatura de 308K.

Os valores de  $K_{sv}$  para supressão da HSA com adições subsequentes de  $[\text{Ru(tpy)}]$  e  $[\text{Ru(Cl-tpy)}]$  apresentaram valores próximos. Além disso, os valores encontrados estão na mesma ordem de grandeza para complexos polipiridínicos semelhantes (Tabela 6). Os valores calculados de  $k_q$ , com o auxílio da Equação 4, para os complexos  $[\text{Ru(tpy)}]$  e  $[\text{Ru(Cl-tpy)}]$  são de  $1,13 \times 10^{12}$  e  $1,24 \times 10^{12}$ , respectivamente, apresentando uma ordem de grandeza superior ao coeficiente de difusão bimolecular ( $2 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), podendo ser considerado um mecanismo estático de supressão entre HSA e os complexos em estudo (MANISKOSA. R, et.al, 2020). No entanto, a confirmação do mecanismo de supressão estático ou dinâmico haveria necessidade de determinação do tempo de vida no estado singuleto excitado para os complexos em estudo e HSA.

Conforme, Rilak-Simović e colaboradores (2020), complexos do tipo  $[\text{Ru}^{II}(X\text{-tpy})(N\text{-N})\text{Cl}]^{n+}$ , que apresentam estrutura rígida e planar, caráter hidrofóbico e arranjo estrutural pseudo-hexagonal, como os complexos  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$  ( $K_a = 19,74 \text{ mol}^{-1}$ ) e  $[\text{RuCl}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})]^+$  ( $K_a = 6,72 \text{ L mol}^{-1}$ ), mostraram fraca interação com HSA. Outros complexos de rutênio como,  $[\text{RuCl}(\text{Cl-tpy})\text{en}]^+$ ,  $[\text{RuCl}(\text{Cl-tpy})\text{dach}]^+$ ,  $[\text{RuCl}(\text{Cl-Ph-tpy})\text{BDQ}]^+$  e  $[\text{RuCl}(\text{Cl-Ph-tpy})]^+$  apresentaram valores de  $K_a$  na ordem  $10^4$  para interação com BSA e HSA.

Na tentativa de se discutir a relação do caráter hidrofóbico dos complexos de rutênio e a interação com albumina, foi utilizado o software Molinspiration® para determinar os valores teóricos de logaritmo de partição (milogP). Estes resultados estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Valores teóricos de logaritmo de partição (milogP) teóricos e experimentais para o [Ru(tpy)], [Ru(Cl-tpy)] e para os demais complexos polipiridínicos de Rutênio já descritos na literatura.

Complexo	milogP (teórico)	logP (experimental)
[RuCl <sub>3</sub> (tpy)]	-5,27	-
[RuCl <sub>3</sub> (Cl-tpy)]	-5,07	-
[RuCl <sub>3</sub> (Cl-Ph-tpy)]	-4,12	-
[RuCl(Cl-tpy)(em)] <sup>+</sup>	-5,55	-1,33
[RuCl(Cl-tpy)(dach)] <sup>+</sup>	-5,20	-1,45
[RuCl(Cl-Ph-tpy)(BDQ)] <sup>+</sup>	-4,71	-1,14
[RuCl(tpy)(BDQ)] <sup>+</sup>	-5,66	-
[RuCl(Cl-tpy)(BDQ)] <sup>+</sup>	-5,54	-

O caráter hidrofóbico não é o fator principal da discussão da interação complexo de Ru<sup>II</sup>-terpiridina e albumina, já que os valores de milogP para os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)]<sup>+</sup> são semelhantes para os complexos [RuCl(Cl-tpy)en]<sup>+</sup> e [RuCl(Cl-tpy)dach]<sup>+</sup>, no entanto mostraram fraca interação com HSA. Fatores estruturais contribuem mais com as interações complexo-HSA (RILAK-SIMOVIĆ.,et.al., 2020) e através de cálculos teóricos observa-se que interações π→π que ocorrem entre o complexo [RuCl(Cl-Ph-tpy)en]<sup>+</sup> e HSA garantem maior energia de ligação ( $\Delta E = -24,56$  kJ/mol) que para os complexos [RuCl(Cl-Ph-tpy)dach]<sup>+</sup> ( $\Delta E = -20,38$  kJ/mol) e [RuCl(Cl-Ph-tpy)bpy]<sup>+</sup> ( $\Delta E = -19,93$  kJ/mol).

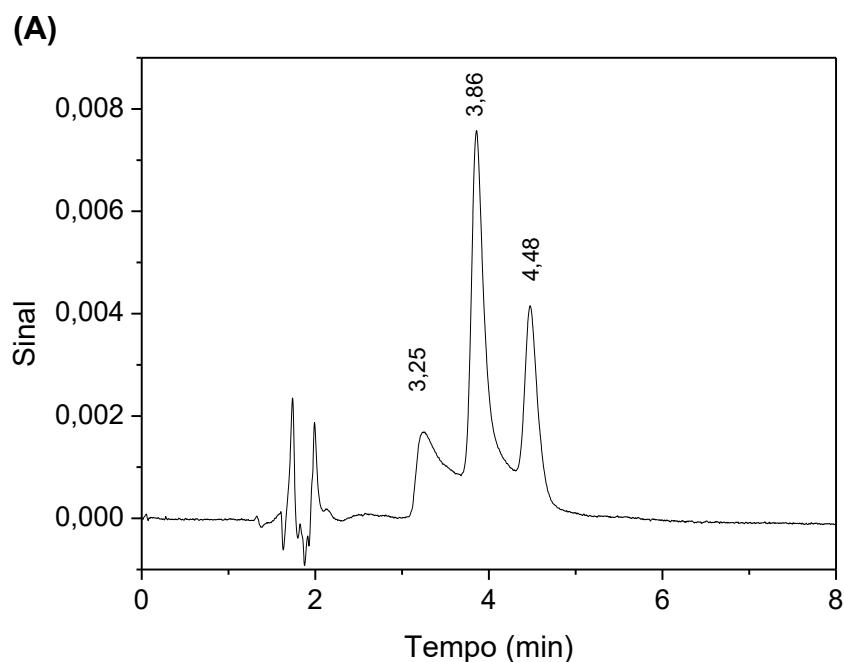
#### 4.2.4 Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos de Rutênio através do processo de diálise via CLAE

Tendo em vista que os cloro complexos, [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)], podem hidrolisar e formar os aquacomplexos, [Ru(H<sub>2</sub>O-tpy)] e [Ru(H<sub>2</sub>O)(Cl-tpy)] em meio

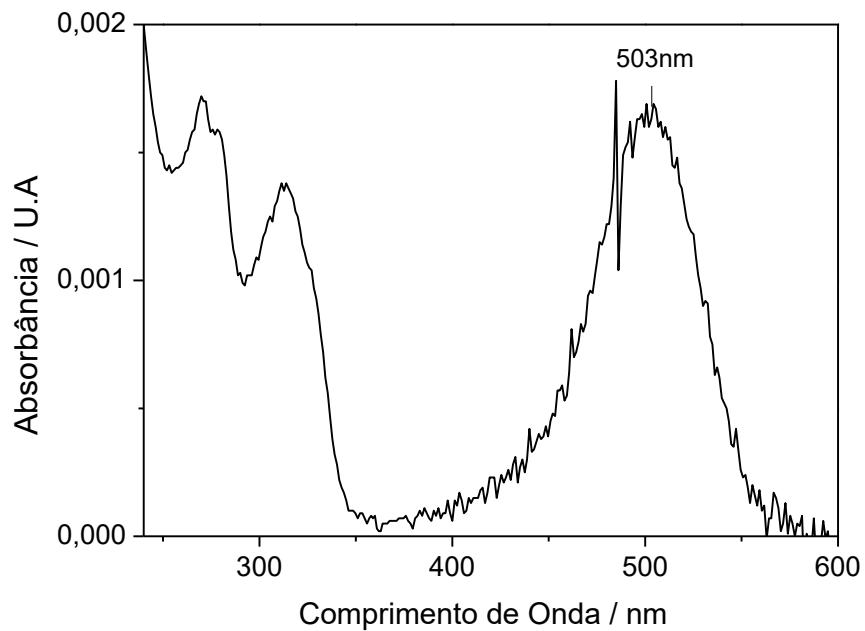
aquoso, além do fato que os complexos em estudos possuem isômeros de posição, foi sugerido o estudo da interação dos complexos com HSA através da CLAE, já que em vista das técnicas espectroscópicas, ela permite a separação e identificação dos isômeros.

Inicialmente, os complexos  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$  e  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})]$  foram incubados em PBS durante 2h a 310K. Os perfis dos cromatogramas registrados para o complexo  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$  estão apresentados na Figura 28 (A), com seus respectivos espectros de UV/vis. (B), (C) e (D) (Figura 28). Os cromatogramas para o complexo  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})]$  Figura 29 (A) e seus respectivos espectros de UV/vis (B), (C), (D) e (E) (Figura 29).

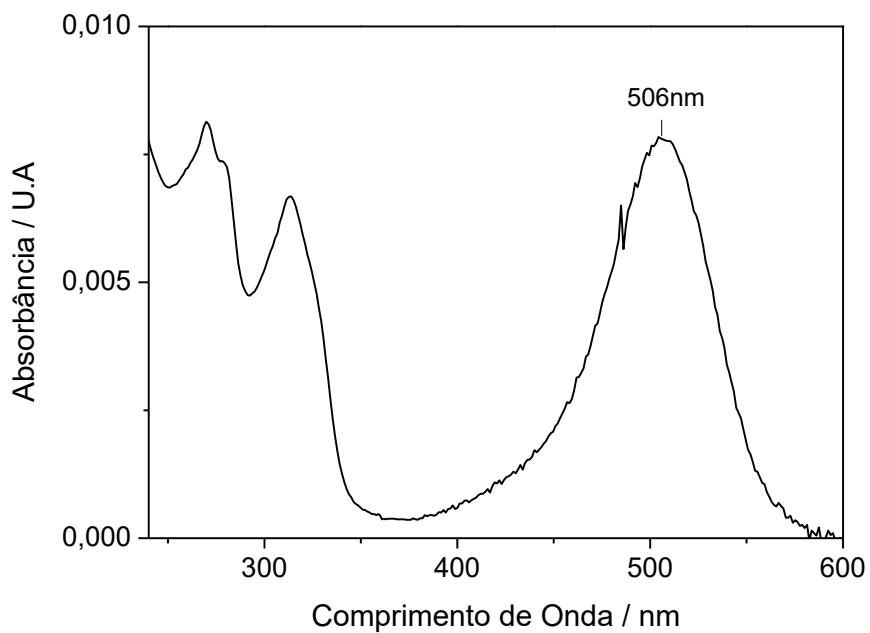
**Figura 28.** Cromatograma de separação do complexo  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$ . Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 0,1% de ácido trifluoracético:metanol (85:15 v/v), incubado em PBS durante 2h a 310K, concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  do complexo em PBS (A) e os respectivos espectros UV/VÍS. com tempo de retenção 3,25 min (B); tempo de retenção 3,86 min (C) e tempo de retenção 4,48 min (D).

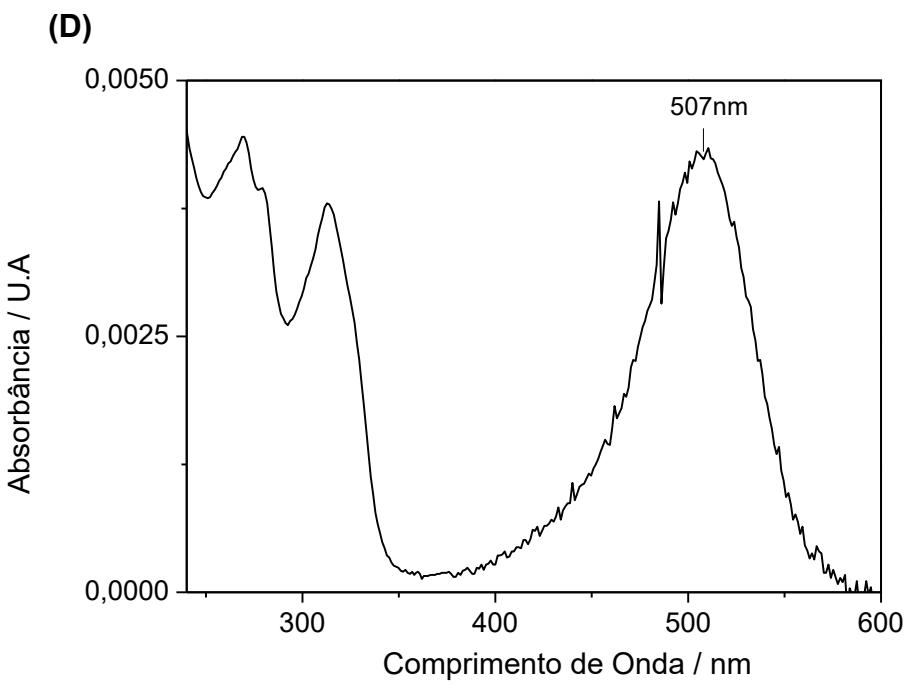


(B)

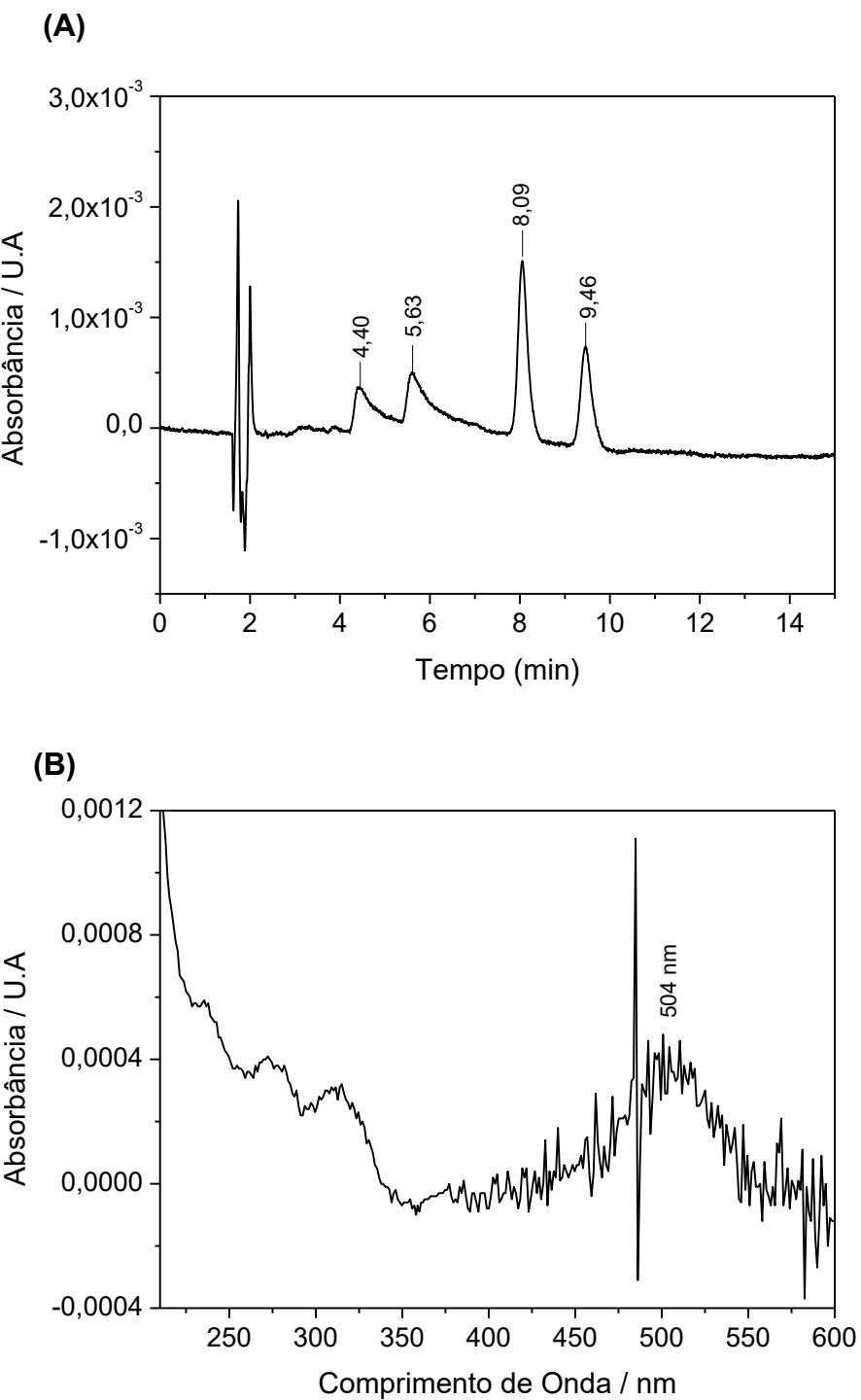


(C)

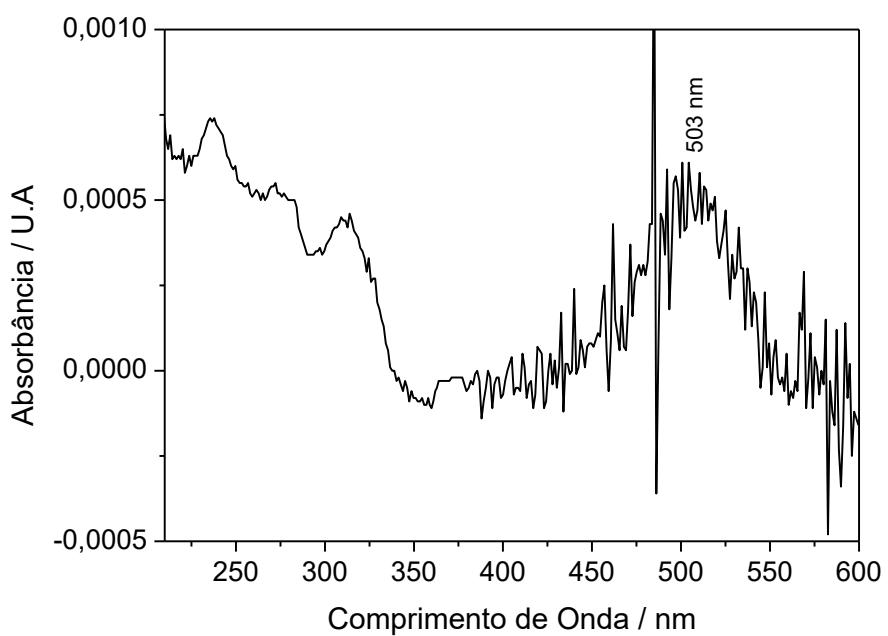




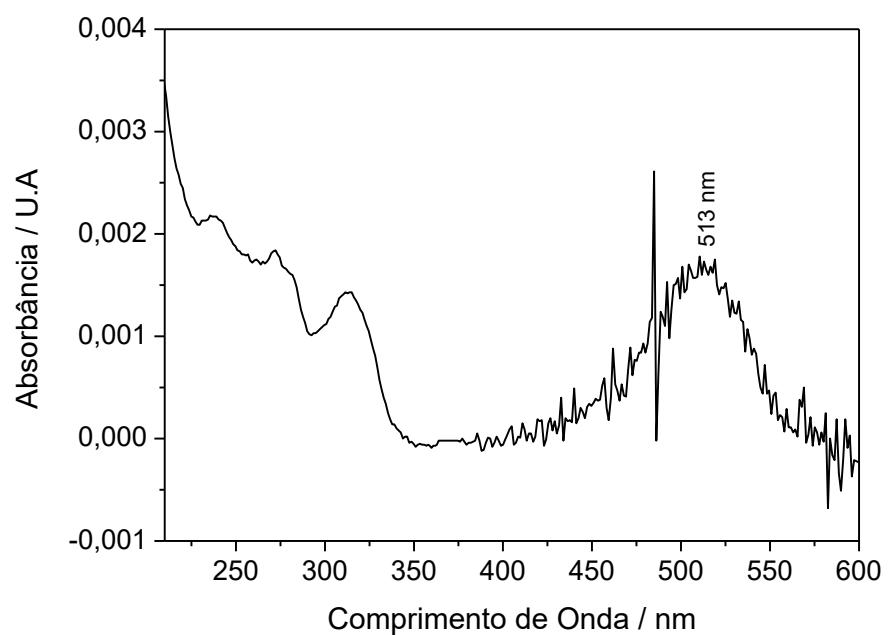
**Figura 29.** Cromatograma de separação do complexo [Ru(Cl-tpy)]. Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 0,1% de ácido trifluoracético:metanol (85:15 v/v), incubado em PBS durante 2h a 310K, concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  do complexo em PBS (A) e os respectivos espectros UV/VÍS. com tempo de retenção 4,40 min (B); tempo de retenção 5,63 min (C); tempo de retenção 8,09 min (D) e tempo de retenção 9,46 min (E).

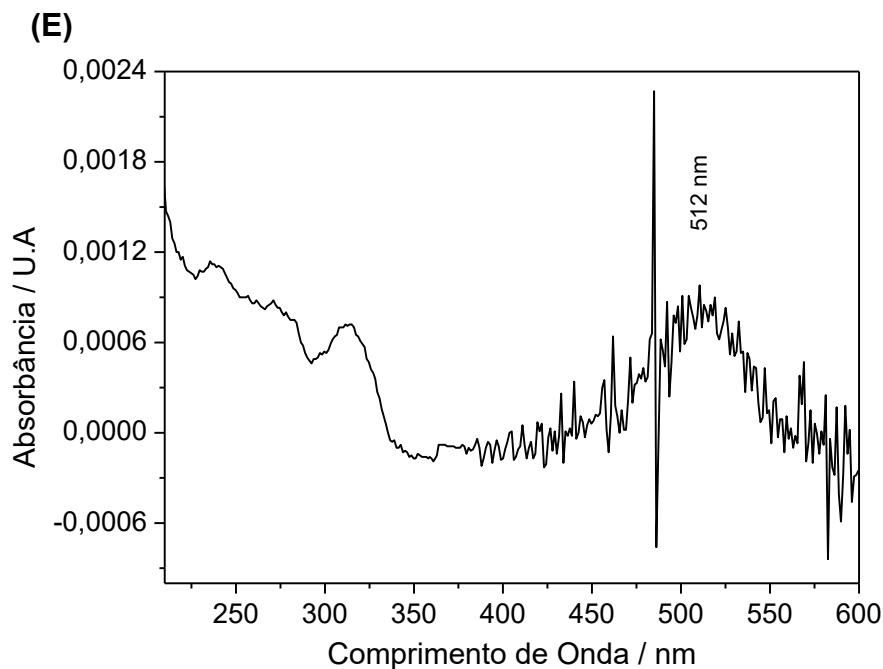


(C)



(D)



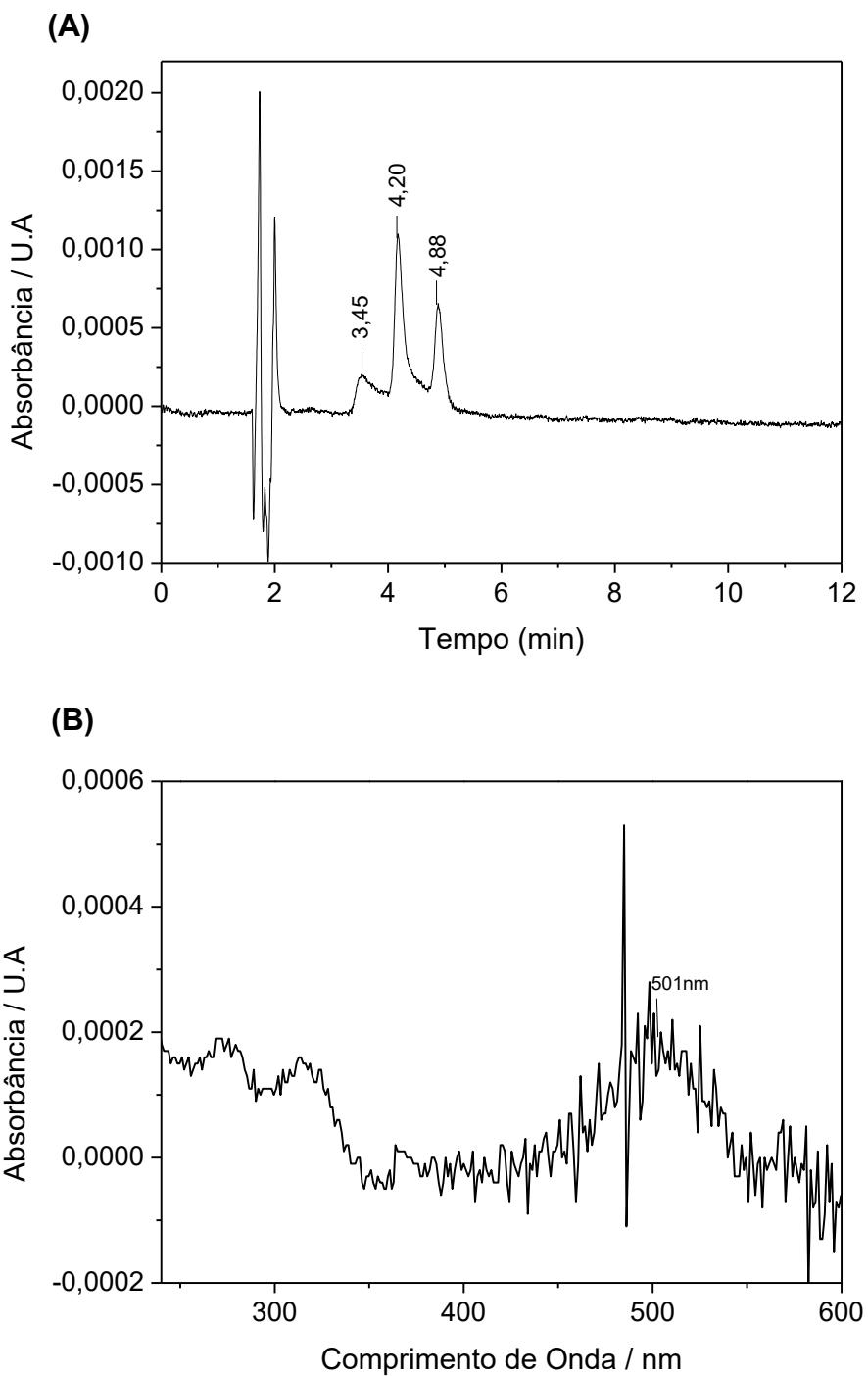


Nota-se que o complexo  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})]$  após 24h em meio aquoso, se vê os tempos de retenção de 9,46 min e 5,63 min para os isômeros das espécies cloro ( $\lambda \sim 512$  nm) e aqua ( $\lambda \sim 503$  nm), respectivamente. Enquanto para o complexo  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$ , somente um dos isômeros cloro ( $\lambda \sim 507$  nm), no tempo de retenção de 4,48 min, converte totalmente na forma do aqua ( $\lambda \sim$ complexo).

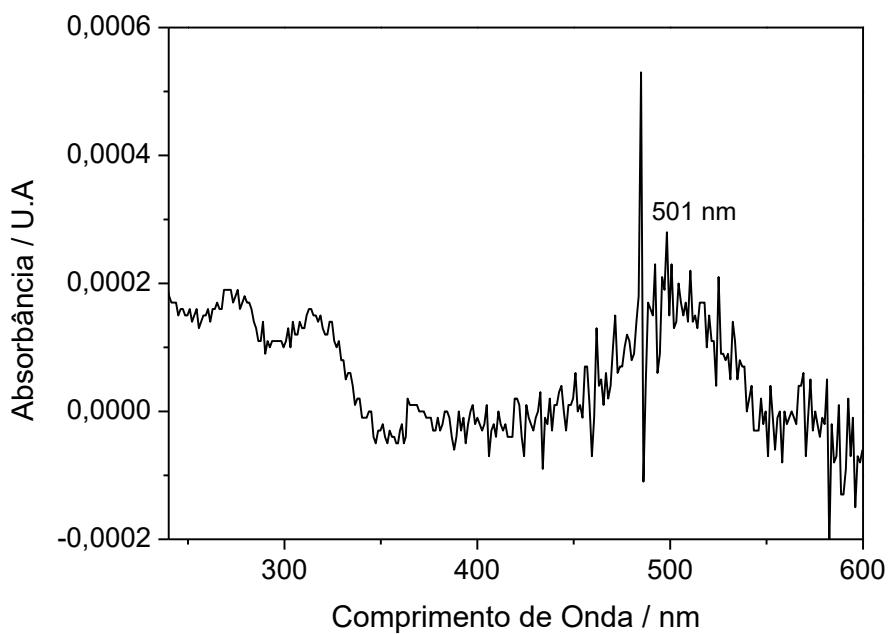
Em seguida, foram realizados os registros dos cromatogramas obtidos das soluções dialisadas, após incubadas durante 24h a 310K em presença de HSA.

Os perfis dos cromatogramas são semelhantes aos dos complexos registrados em PBS, o que mostra que existe uma fraca interação dos complexos  $[\text{Ru}(\text{tpy})]$  e  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})]$  com HSA (Figura 30 e Figura 31) bem como sugere que os ligante cloro ou aqua não influenciam na interação com HSA.

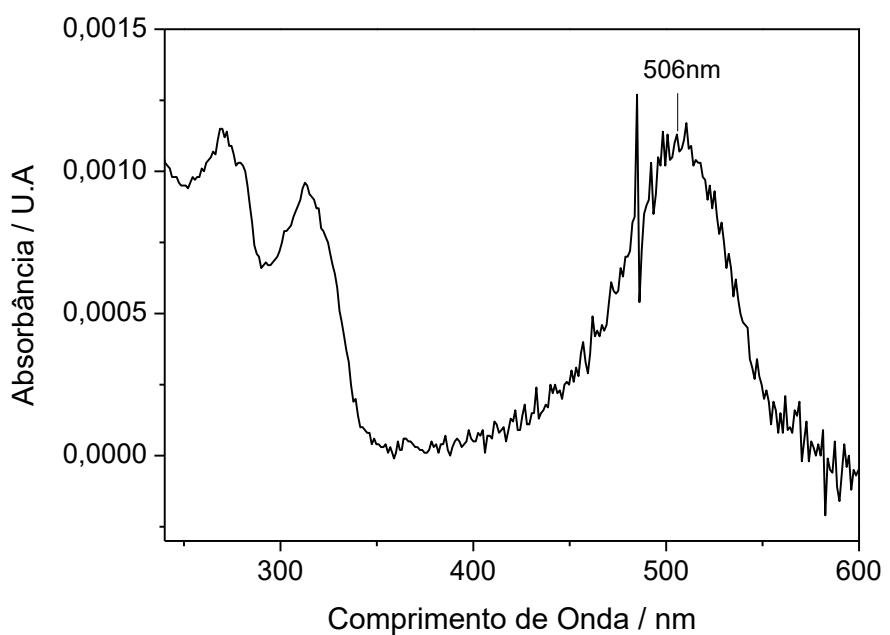
**Figura 30.** Cromatograma de separação do complexo [Ru(tpy)]. Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 0,1% de ácido trifluoracético:metanol (85:15 v/v), incubado em HSA durante 2h a 310K, concentração de  $10\mu\text{mol L}^{-1}$  do complexo em HSA **(A)** e os respectivos espectros UV/VÍS. com tempo de retenção 3,45 min **(B)**; tempo de retenção 4,20 min **(C)**; tempo de retenção 4,88 min **(D)**.



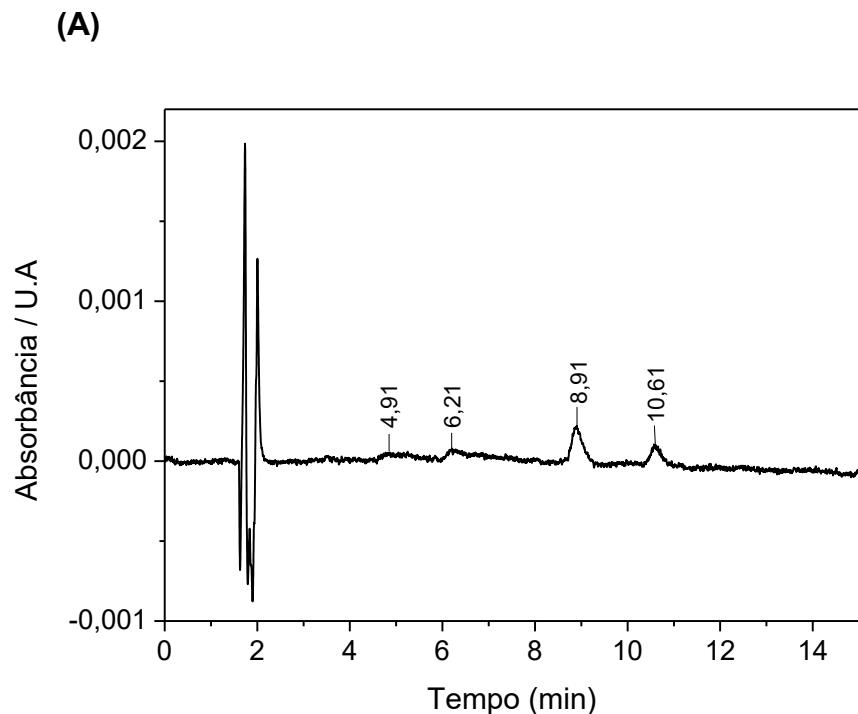
(C)

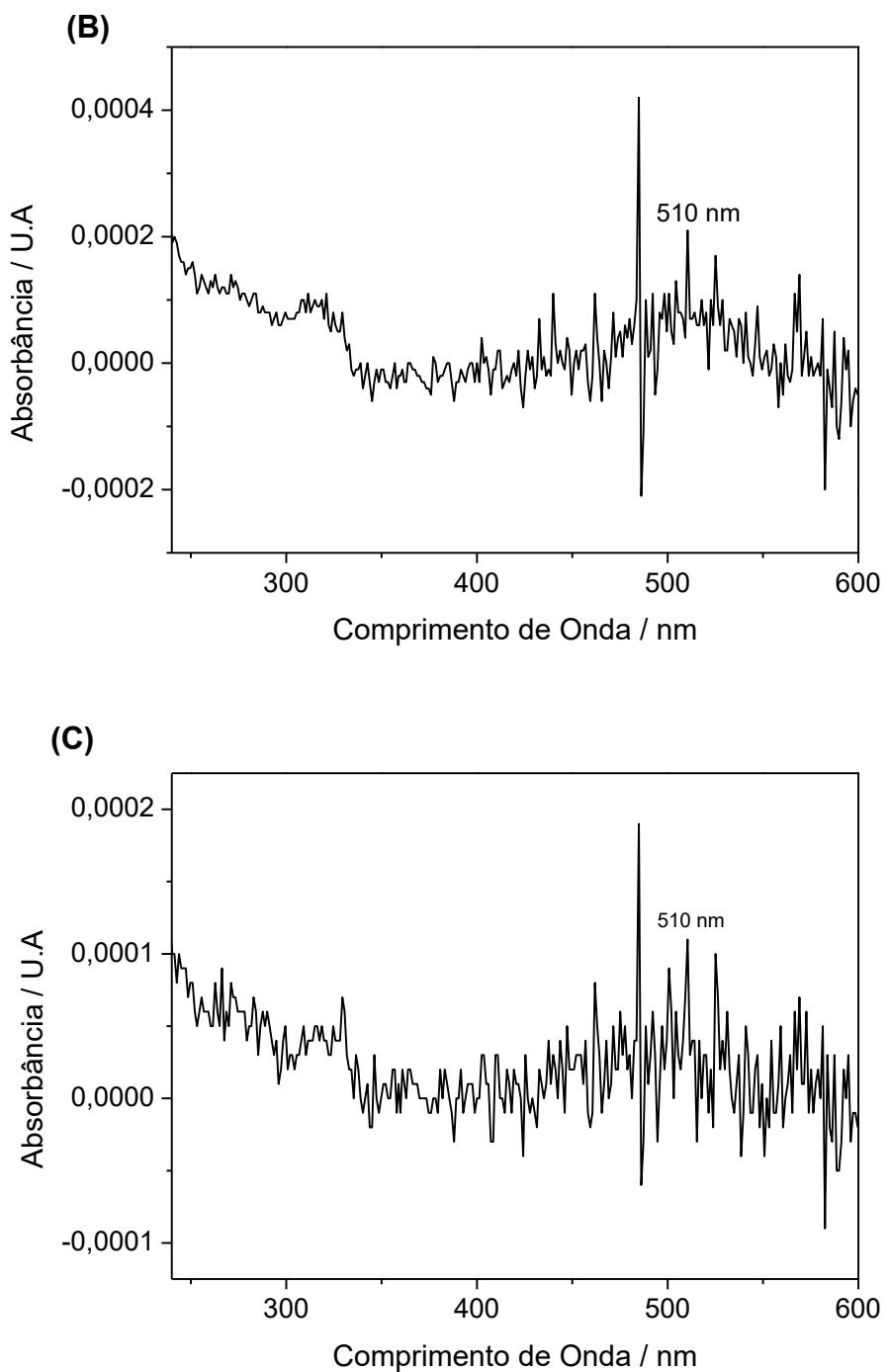


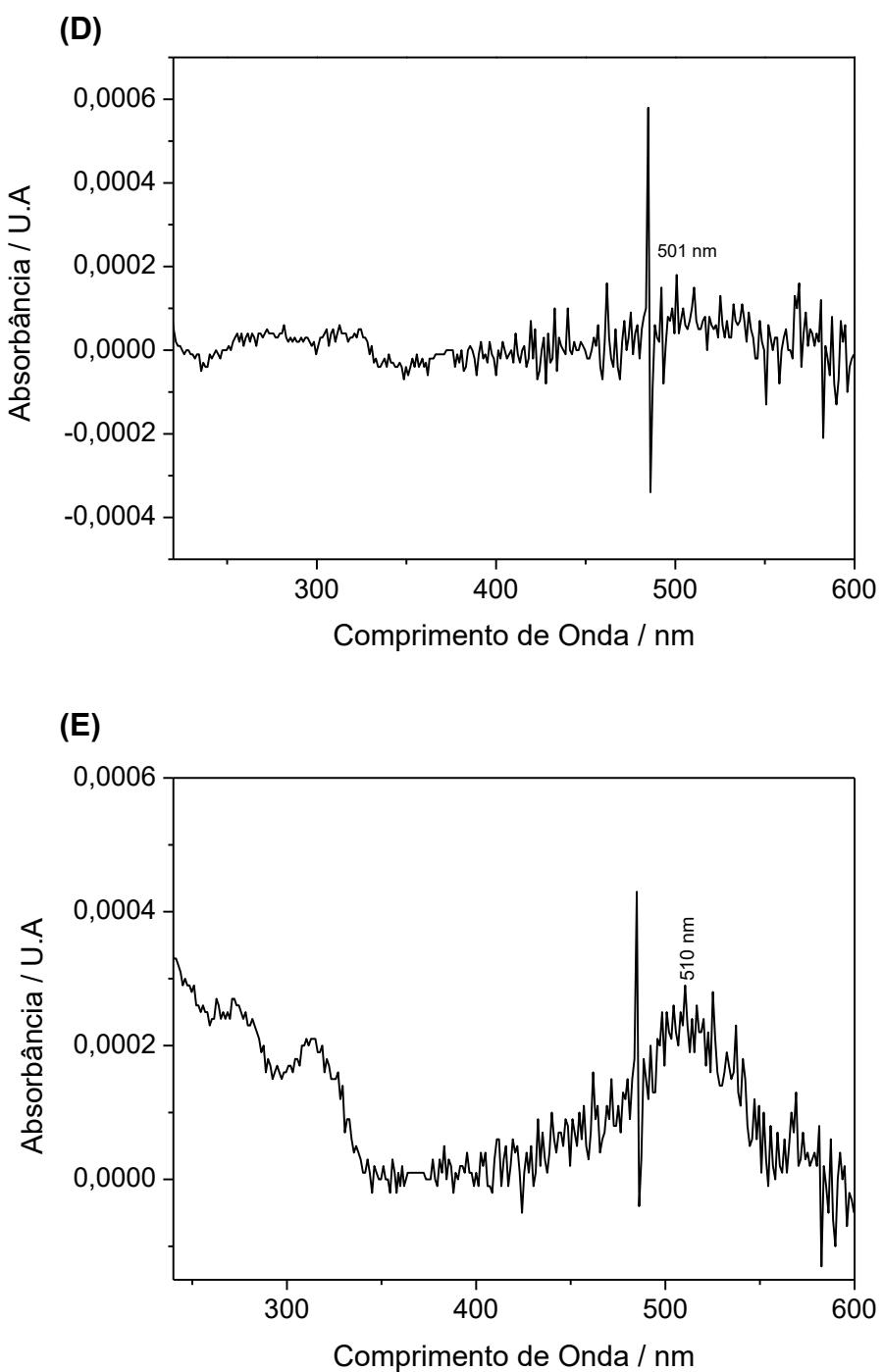
(D)



**Figura 31.** Cromatograma de separação do complexo [Ru(Cl-tpy)]. Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 0,1% de ácido trifluoracético:metanol (85:15 v/v), incubado em HSA durante 2h a 310K, concentração de  $10\mu\text{mol L}^{-1}$  do complexo em HSA (**A**) e os respectivos espectros UV/VÍS. com tempo de retenção 4,91 min (**B**); tempo de retenção 6,21 min (**C**); tempo de retenção 8,91 (**D**) e tempo de retenção 10,61 min (**E**).







#### **4.2.5 Avaliação dos Sítios de Interação entre a HSA e os Complexos Polipiridínicos de Rutênio**

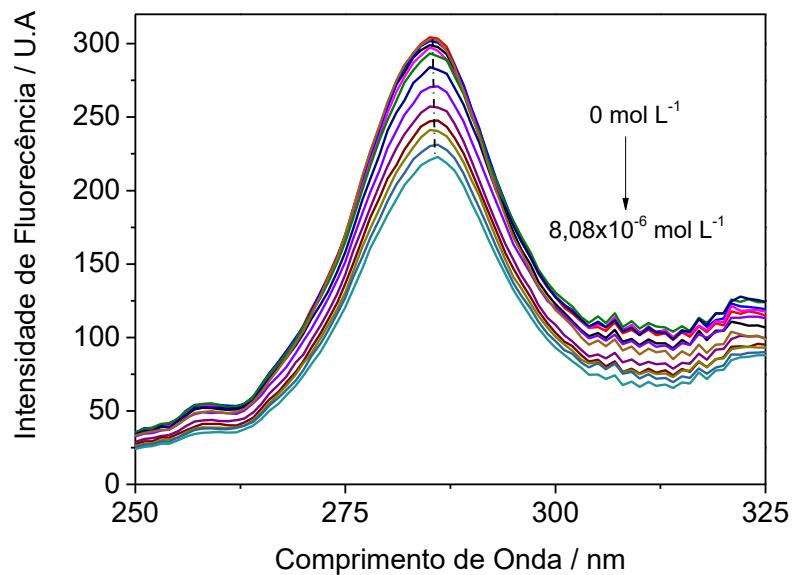
##### **4.2.5.1. Avaliação dos Sítios de Interação entre a HSA e os Complexos Polipiridínicos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência Síncrona ( $\Delta\lambda = 15 \text{ nm} / \Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ )**

A técnica de espectroscopia de fluorescência síncrona é utilizada para verificar-se mudanças conformacionais dos microambientes proteicos. Ao se fixar o intervalo de varredura ( $\Delta\lambda$ ) – onde  $\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{exc}}$  – em 15 e em 60 nm, a fluorescência síncrona de HSA evidencia informações sobre mudanças conformacionais dos microambientes proteicos próximos aos resíduos de aminoácidos de Tyr e Trp-214, respectivamente (LLOYD & EVETT, 1977; MILLER, 1979; TANG, et al., 2006; SURYAWANSI, et al., 2013).

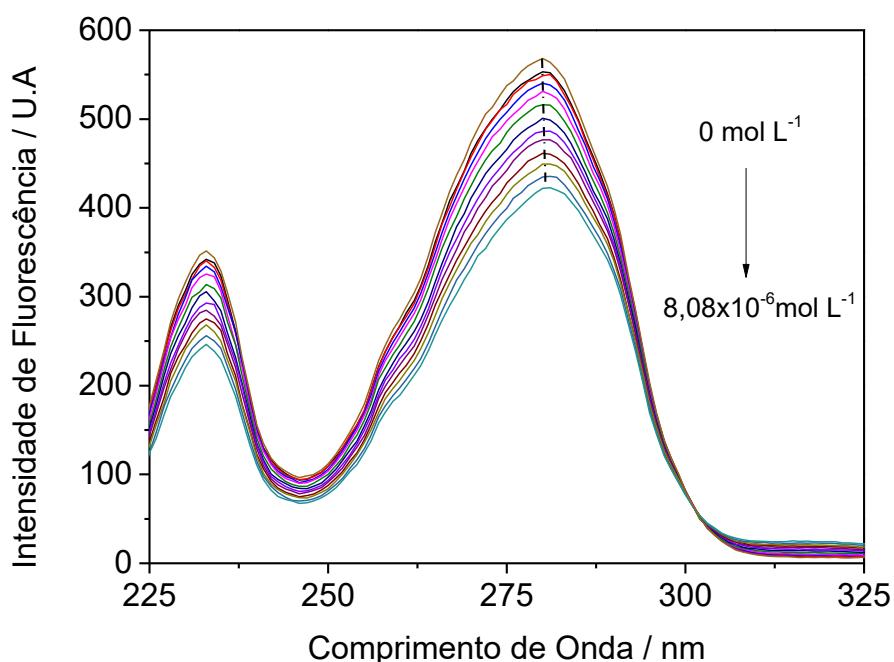
De acordo com as interações de os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] e a biomolécula HSA, fez-se necessário a determinação dos sítios de interação entre a HSA e os complexos. Para isso, utilizou-se a técnica de espectroscopia de fluorescência síncrona, analisando-se particularmente possíveis mudanças no comprimento de onda em um máximo de emissão ( $\lambda_{\text{em}}$ ) quando  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$  e  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ . Os experimentos foram em ausência e presença de diferentes concentrações dos complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] a 308 K. Os espectros de supressão de fluorescência síncrona obtidos para a biomolécula em presença do complexo [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)], a 308 K são apresentados nas Figuras 32 e 33.

**Figura 32.** Espectros de supressão de fluorescência síncrona para a HSA em presença do complexo [Ru(tpy)], em PBS (pH=7,4) a 308 K.  $\lambda_{exc}=280$  nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. (A)  $\Delta\lambda = 15$  nm; (B)  $\Delta\lambda = 60$  nm.  $[HSA]=1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (-);  $[\text{Complexo}]=0-8,08 \mu\text{mol L}^{-1}$  [ $4,93 \times 10^{-7}$  (-);  $8,20 \times 10^{-7}$  (-);  $1,14 \times 10^{-7}$  (-);  $1,64 \times 10^{-6}$  (-);  $2,45 \times 10^{-6}$  (-);  $3,26 \times 10^{-6}$  (-);  $4,07 \times 10^{-6}$  (-);  $4,88 \times 10^{-6}$  (-);  $5,68 \times 10^{-6}$  (-);  $6,49 \times 10^{-6}$  (-);  $7,28 \times 10^{-6}$  (-);  $8,08 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (-)].

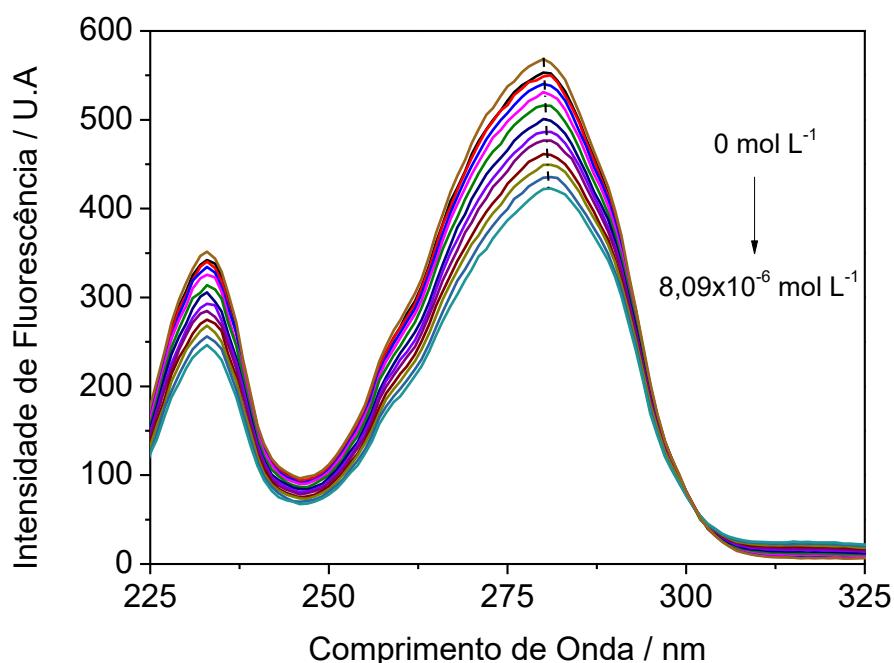
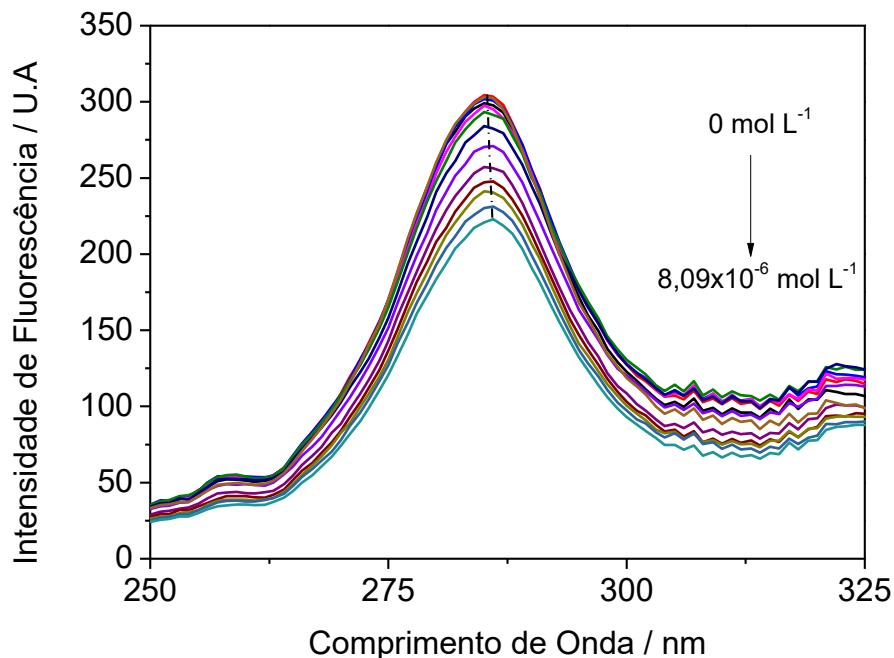
(A)



(B)



**Figura 33.** Espectros de supressão de fluorescência síncrona para a HSA em presença do complexo  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})]$ , em PBS (pH=7,4) a 308 K.  $\lambda_{\text{exc}}=280$  nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. (A)  $\Delta\lambda = 15$  nm; (B)  $\Delta\lambda = 60$  nm.  $[\text{HSA}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (-); [Complexo] = 0 -  $8,09 \times 10^{-6}$  mol L $^{-1}$  [ $4,93 \times 10^{-7}$  (-);  $8,22 \times 10^{-7}$  (-);  $1,15 \times 10^{-7}$  (-);  $1,64 \times 10^{-6}$  (-);  $2,46 \times 10^{-6}$  (-);  $3,27 \times 10^{-6}$  (-);  $4,08 \times 10^{-6}$  (-);  $4,89 \times 10^{-6}$  (-);  $5,69 \times 10^{-6}$  (-);  $6,50 \times 10^{-6}$  (-);  $7,30 \times 10^{-6}$  (-);  $8,09 \times 10^{-6}$  mol L $^{-1}$  (-)].



Os espectros de fluorescência síncrona para a HSA em presença dos complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)], quando  $\Delta\lambda = 15$  nm são apresentados nas Figuras 32(A) e 33(A). A diminuição das intensidades de fluorescência com o aumento das concentrações dos mesmos é devido à interação entre a HSA e os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)], já que, quanto maior a concentração dos complexos, menores os valores de intensidade de fluorescência. No entanto, para ambos os complexos, não houvera mudanças na posição do comprimento de onda máximo de emissão de 285 nm, ou seja, conclui-se que os complexos não alteram o microambiente proteico próximo ao resíduo de aminoácido Tyr. (O'HAVER, et al., 1982; RANJBAR, et al., 2013).

Já os espectros de fluorescência síncrona para a HSA em presença dos complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)], quando  $\Delta\lambda = 60$  nm são apresentados nas Figuras 32(B) e 33(B). Porém, para o complexo [Ru(tpy)] houvera mudanças discretas na posição do comprimento de onda máximo de emissão, de 280 para 279 nm, ou seja, uma alteração para a região do vermelho. Então, constata-se que o complexo [Ru(tpy)] altera o microambiente proteico próximo ao resíduo de aminoácido Trp-214 (O'HAVER, et al., 1982; RANJBAR, et al., 2013).

## 5 CONCLUSÕES

As análises via IR, UV/Vis. e análise elementar foram realizadas a fim de caracterizar os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)], assim, demonstrando que os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] apresentam estruturas químicas que fazem jus a proposta do trabalho e sendo o complexo [Ru(Cl-tpy)] inédito. As análises via CLAE evidenciaram que ambos os complexos possuem isômeros de posição.

Os estudos de cinética de aquação realizados para ambos os complexos, indicam que tanto o [Ru(tpy)], quanto o [Ru(Cl-tpy)], possuem uma constante de cinética de aquação com ordem de grandeza maior que para o complexo *cis*-diaminodicloridoplatina (II). As análises eletroquímicas indicaram dois potenciais de oxidação os quais podem ser atribuídos ao processo centrado no íon metálico Ru<sup>II</sup>/Ru<sup>III</sup> para os isômeros do cloro complexo [Ru(tpy)] e verificou-se após 10 minutos o aparecimento de dois processos de que são atribuídos aos ao processo centrado no íon metálico Ru<sup>II</sup>/Ru<sup>III</sup> para os isômeros aqua complexo ([RuH<sub>2</sub>O(tpy)]). Para o complexo [Ru(Cl-tpy)], as análises eletroquímicas indicaram que há somente um potencial de oxidação, atribuído ao processo centrado no íon metálico Ru<sup>II</sup>/Ru<sup>III</sup> para o cloro complexo [Ru(Cl-tpy)] e verificou-se após 10 min dois processos de oxidação atribuídos as espécies de aqua complexo [Ru(H<sub>2</sub>O)(Cl-tpy)].

Os estudos via UV/Vis. e supressão de fluorescência realizados com o intuito de investigar-se as interações entre a HSA e os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)], indicaram que há a interação entre as espécies, entretanto, os valores de K<sub>a</sub> calculados para os sistemas HSA-[Ru(tpy)] e HSA-[Ru(Cl-tpy)] evidenciaram que a interação entre a HSA e os complexos é fraca. Os valores de k<sub>q</sub> obtidos indicaram que o mecanismo de supressão de fluorescência entre a HSA e ambos os complexos em 308K pode ser do tipo estática. O caráter hidrofóbico não é o fator principal da discussão da interação complexo de Ru<sup>II</sup>-terpiridina-HSA ser fraca, já que os valores de milogP calculados para os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] são próximos a outros já descritos na literatura que possuem forte interação com a HSA. Sendo assim, realizou-se o estudo de diálise e, posteriormente, análises via CLAE, os quais indicaram que existe uma fraca interação dos complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)] com a HSA, bem como sugere que os ligante cloro ou aqua não influenciam na interação com a HSA.

Os experimentos de supressão de fluorescência síncrona da HSA indicaram que há a interação entre a HSA e ambos os complexos [Ru(tpy)] e [Ru(Cl-tpy)], mas

apenas o [Ru(tpy)] altera o microambiente proteico próximo ao resíduo de aminoácido, Trp-214.

## REFERÊNCIAS

- ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J.; **Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects**. Platinum Metals Review, v.45, p.62-69, 2001.
- de ALMEIDA, S.M.V.; de ALCANTARA, F.F.; de BRITO, C.G.X.; de SOUZA, G.C.A.; LAFAYETTE, E.A.; da SILVA, V.B.R.; CARVALHO, M.S.; de LIMA, M.C.A. **Compostos coordenados híbridos de platina no tratamento do câncer**. Revista de Ciências Farmacêutica Básica Aplicada. v.35, p.337-345, 2014.
- ATKINS, P. W.; PAULA, J. **Fundamentos de Físico-Química**. v 1. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.
- ČANOVIĆ, P.; SIMOVIĆ, A. R.; RADISAVLJEVIĆ, S.; BRATSOS, I.; DEMITRI, N.; MITROVIC, M.; ZELEN, I.; BUGARČIĆ, Z. D. **Impact of aromaticity on anticancer activity of polypyridyl ruthenium(II) complexes: synthesis, structure, DNA/protein binding, lipophilicity and anticancer activity**. Journal of Biological Inorganic Chemistry, v. 22, p. 1007-28, 2017.
- CHANAY, S.G.; CAMPBELL, S.L.; TEMPLE, B.; BASSETT, E.; WU, Y.; FALDU, M. “**Protein interactions with platinum- DNA adducts: from structure to function**”, Journal of Biological Inorganic Chemistry, v.98, p.1551-1559, 2004.
- CHRZANOWSKA, M.; KATAFIAS, A.; IMPERT, O.; KOZAKIEWICZ, A.; SURDYKWSKI, A.; BRZOZOWSKA, P.; FRANKE, A.; ZAHI, A.; PUCHTA, R.; ELDIK, R.V. **Structure reactivity of [Rull(terpy)(N<sup>N</sup>N)Cl]Cl complexes: consequences for biological applications**. Dalton Transactions, p. 1-17. 2017.
- COHEN, S.M.; LIPPARD, S.J. “**Cisplatin: from DNA damage to cancer chermother-any**”, Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, v.67, p.93-130, 2001.
- de LIMA, R. G.; SILVA, B. R.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. **Ruthenium Complexes as NO Donors for Vascular Relaxation Induction**. Molecules, v.19, p.9628-9654, 2014.
- FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T. **A química inorgânica na terapia do câncer**. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, v.6, p. 13-18, 2005.
- GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos: Mutações, Câncer e Reprodução**. Brasília: Editora UNB, 2005.
- GUPTA, N.; GROVER, N.; NEYHART, G. A.; SINGH, P.; THORP, H. H. **Synthesis and properties of new DNA cleavage agents based on oxoruthenium(IV)**. Inorganic Chemistry, v.32, p.310-316, 1993.

INCA: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br). Acessado em: 10/01/2020.

KNOX R.J.; FRIEDLOS F.; LYDALL D.A.; ROBERTS, J.J. **Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: Evidence that cis-diamminedichloroplatinum (II) and cis-diammine(I,I-cyclobutane-diacarboxylate)platinum(II) differ only in kinetics of their interaction with DNA.** Cancer Research, v.46, p.1972-9, 1986.

KONOVALOVA, A.L.; PRESNOV, M.A.; ZHELIGOVSKAIA, N.N.; TRESHCHALINA, E.M. **“Antitumor effect of complex compounds of tetravalent platinum”**, Doklady Akademii Nauk SSSR, v. 234, p. 223–226, 1977.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3<sup>a</sup> ed. Springer Science, 2006.

LAZIĆ, D.; ARSENIJEVIĆ, A.; PUCHTA, R.; BUGARČIĆ, Ž.D.; RILAK, A. **DNA binding properties, histidine interaction and cytotoxicity studies of water soluble ruthenium (II) terpyridine complexes**, Dalton Transactions, v.45, p.4633-4646, 2016.

LAZNICKOVA. A.; SEMECKY. V.; LAZNICEK, M.; ZUBR, V.; KOKSAL, J.; KVETINA, J. **“Effect of oxoplatinum and CBDCA on renal functions in rats”** Neoplasma, v. 36, p. 161–169, 1989.

LEVER, A. B. P. **Inorganic electronic spectroscopy**. 2<sup>a</sup> ed. Nova Iorque, Elsevier, 1984.

LIPPARD, L.J. **“New chemistry of an old molecule: cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]”**, Science, v.218, p.1075-1082, 1982.

LLOYD, J.B.F.; EVETT, I.W. **Prediction of peak wavelengths and intensities in synchronously excited fluorescence emission spectra**. Analytic Chemistry, v. 49, p. 1710-1715, 1977.

LOKICH, J.; ANDERSON, N. **Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature**. Annals of Oncology, v.9, p. 13-21, 1998.

- MANISKOSA, R.; MILUTINOVIC, M. M.; CRNOLATAC, I.; TOT, A.; VELICKOVIC, S.; BOJIC-TRBOJEVIC. Z.; SIMOVIC. A. R. **Anti-adhesive action of novel ruthenium (II) chlorophenyl terpyridine complexes with a high affinity for double-stranded DNA; in vitro and in silico**. Journal of Inorganic Biochemistry, v.208, p.1-13, 2020.

MILLER, J.N. **Recent advances in molecular luminescence analysis. Proceedings of the Analytical Division of the Chemical Society**, v. 16, p. 203-208, 1979.

MILUTINović, M. M.; RILAK, A.; BRATSOS, I.; KLISURIĆ, O.; VRANES, M.; GLIOGORIJEVIĆ, N.; RADULović, S.; BURGARCIĆ, Z., D. **New 4'-(4-chlorophenyl)-2,2':6',2"-terpyridine ruthenium(II) complexes: Synthesis, characterization, interaction with DNA/BSA and cytotoxicity studies**, Journal of Inorganic Biochemistry, v.169, p.1-12, 2017.

MOREIRA, M. B.; FRANCISCATO D.S.; TOLEDO, K. C. F.; de SOUZA, J. R. B.; NAKATANI H. S.; de SOUZA, V. R. **Avaliação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio**. Química Nova, v. 38, p. 227-232, 2015.

MOTSWAINYANA, W. M.; AJIBADE, P.A. **Anticancer activities of mononuclear ruthenium(II) coordination complexes**. Advances in Chemistry, p.1-21, 2015.

NEVES, A.P.; VARGAS, M.D. **Complexos de Platina (II) na Terapia do Câncer**. Revista Virtual de Química, p. 196-209, 2011.

NIKOLAOU, S.; DA SILVA, C. F. N. **Considerações sobre os textos que tratam do desenvolvimento de metalofármacos de rutênio**. Química Nova, v. 41, n. 7, 2018.

NIŠAVIĆ, M.; MASNIKOSA, R.; BUTORAC, A.; PERICA, K.; RILAK, A.; KORIĆANAC, L.; HOZIĆ, A.; PETKOVIĆ, M.; CINDRIĆ, M. **Elucidation of the binding sites of two novel Ru(II) complexes on bovine serum albumin**, Journal of Biological Inorganic Chemistry, v.159, p.89-95, 2016.

NIŠAVIĆ, M.; STOILJKOVIĆ, M.; CRNOLATAC, I.; MILOŠEVIĆ, M.; RILAK, A.; MASNIKOSA, R. **Highly water-soluble ruthenium(II) terpyridine coordination compounds form stable adducts with blood-borne metal-transporting proteins**, Arabian Journal of Chemistry, v.11, p.291-304, 2018.

NUSSBAUM, R.L.; MCINEES, R.R.; WILLARD, H.F. **Genética Médica**. 7<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.525, 2008.

O'HAVER, T. C.; FELL, A. F.; SMITH, G.; GANS, P.; SNEDDON, J.; BEZUR, L.; MICHEL, R.G.; OTTWAY, J.M.; MILLER, J.N.; AHMAD, T.A.; CHADBURN, B.P.; COTTRELL, C.T. **Derivative spectroscopy and its applications in analysis**. Analytical Proceedings, v. 19, p. 22-46, 1982.

OLSZEWSKI, U.; ACH, F.; ULSPERGER, E.; BAUMGARTNER, G.; ZEILLINGER, R.; BEDNARSKI, P.; HAMILTON, G. **In vitro Evaluation of Oxoplatin: An Oral Platinum (IV) Anticancer Agent**., Research Article, p.1-11, 2009.

PATTON, J.F.; POWELL, B.L.; WHITE, D.R.; RUSSELL, G.B; INABINET, R.T.; MUSS, H.B. **Combination cisplatin and carboplatin in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck**. Cancer Investigation, v.14, p.98-102, 1996.

PAVIA, D.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to Spectroscopy**. 4 ed. Brooks Cole, 2008.

PETERS JR, T. **All About Albumin; Biochemistry, Genetics and Medical Applications.** Academic Press: San Diego, 1995.

PRESNOV, M. A.; KONOVALOVA, A. L.; KOZLOV, A.M.; BROVTSYN, V.K.; ROMANOVA, L.F. "The antitumor activity of oxoplatinum," *Neoplasma*, vol. 32, p. 73-83, 1985.

RANJBAR, S.; SHOKOOHINIA, Y.; GHOBADI, S.; BIJARI, N.; GHOLAMZADEH, S.; MORADI, N.; ASHRAFI-KOOSHK, M.R.; AGHAEI, A.; KHODARAHMI, R. **Studies of the interaction between isoimperatorin and human serum albumin by multispectroscopic method: Identification of possible binding site of the compound using esterase activity of the protein.** The Scientific World Journal, v. 2013, p. 1-13, 2013.

RILAK, A.; BRATSOS, I.; ZANGRANDO, E.; KLJUN, J.; TUREL, I.; BUGARČIĆ, Ž.D.; ALESSIO, E. **Factors that influence the antiproliferative activity of half sandwich Ru<sup>II</sup>-[9]aneS<sub>3</sub> coordination compounds: activation kinetics and interaction with guanine derivatives.** Dalton Transactions, v. 41, p.11608–11618, 2012

RILAK, A.; BRATSOS, I.; ZANGRANDO, E.; KLJUN, J.; TUREL, I.; BUGARČIĆ, Ž.D.; ALESSIO, E. **New Water-Soluble Ruthenium(II) Terpyridine Complexes for Anticancer Activity: Synthesis, Characterization, Activation Kinetics, and Interaction with Guanine Derivatives.** Inorganic Chemistry, v.53, p.6113–6126, 2014

RILAK, A.; MASNIKOSA, R.; BRATSOS, I.; ALESSIO, E. **Chemistry and reactivity of ruthenium(II) complexes: DNA/protein binding mode and anticancer activity are related to the complex structure,** Coordination Chemistry Reviews, v.398, 2019.

ROCHA, R.R.C.; SILVA, M.M.; QUINET, A.; CABRAL-NETO, J.B.; MENCK, M.F.C. **DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship.** Clinics, v.73, 2018.

RONCONI, L.; SADLER, P. J. **Using coordination chemistry to design new medicines.** Coordination Chemistry Reviews, p. 1633-1648, 251, 2007.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; TROSKO, J. E.; MANSOUR, V. H. **Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents.** Nature, 1969.

ROSENBERG, B.; CAMP, L. V. "The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds", Cancer Research, v.30, p.1799-1802, 1970.

ROSENBERG, B.; CAMP, L. V.; GRIMLEY, E. B.; THOMSON, A. J. "The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum (IV) complexes", Journal of Biological Inorganic Chemistry, v.242, p.1347-1352, 1967.

ROSENBERG, B.; CAMP, L. V.; KRIGAS, T. "Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from platinum electrode", Nature, v. 205, p.698-699, 1965.

SGARBIERI, V.C. **The role of dietary energy and of macrocomponents of foods in modulating carcinogenesis (an overview)**. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science, v. 51, p. 104-121, 1999.

SHRIVER, D.; ATIKINS, P. **Química Inorgânica**. Tradução da 4<sup>a</sup> Edição. São Paulo: Bookman, 2008.

SIMOVIC, A. R.; MASNIKOSA, R.; BRATSOS, I.; ALESSIO, E. **Chemistry and reactivity of ruthenium(II) complexes; DNA/protein binding mode and anticancer activity are related to the complex structure**. Coordination Chemistry Reviews, p. 2-25, 2019.

SULLIVAN, B. P.; CALVERT, J. M.; MEYER, T. J. **Cis-trans isomerism in (trpy)(PPh<sub>3</sub>)RuCl<sub>2</sub>. Comparisons between the chemical and physical properties of a cis-trans isomeric pair**. Inorganic Chemistry, v. 19, p. 1404-07, 1980.

SURYAWANSI, V; ANBHULE, P.; GORE, A.; PATIL, S.; AND KOLEKAR, G. **A spectral deciphering the perturbation of model transporter protein (HSA) by antibacterial pyrimidine derivative: pharmacokinetic and biophysical insights**. Journal of Photochemistry and Photobiology B, v. 118, p. 1-8, 2013.

TAKEUCHI, K. J.; THOMPSON, M. S.; PIPES, D. W.; MEYER, T. J. **Redox and spectral properties of monooxo polypyridyl complexes of ruthenium and osmium in aqueous media**. Inorganic Chemistry, v.23, p.1845–185, 1984

TANG, J.; LUAN, F.; CHEN, X. **Binding analysis of glycyrrhetic acid to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy, FTIR, and molecular modeling**. Bioorganic and Medicinal Chemistry, v. 14, p. 3210-3217, 2006.

TRUMP D.L, GREM J.L, TUTSCH K.D., et al. **Platinum analoguecombination chemotherapy: Cisplatin and carboplatin - a phase I trial with pharmacokinetic assessment of the effect of cisplatinadministration on carboplatin excretion**. Journal of Clinical Oncology, v.5, p.1281-9, 1987

VRIENDS, R. C. J; VAN KOTEN, G.; VRIEZE, K. **Characterization of soluble [RuCl<sub>2</sub>P<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (P=PPh<sub>3</sub>), a species which has been postulated to be presented in solutions of RuCl<sub>2</sub>P<sub>3</sub>; Its synthesis from various Ru compounds via a novel catalytic process involving pyridyketones**. Inorgânica Chimica Acta, v. 26, p. L20-L31, 1978.