



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**Avaliação das interações entre a albumina sérica humana (ASH),
complexos terpiridina de Rutênio(II) doadores de óxido nítrico (NO) e seus
respectivos aqua complexos**

Dissertação de Mestrado

NAIARA CRISTINA BESSAS

Orientadora

PROFA. DRA. RENATA GALVÃO DE LIMA

ITUIUTABA

MARÇO DE 2022

**Avaliação das interações entre a albumina sérica humana (ASH),
complexos terpiridina de Rutênio(II) doadores de óxido nítrico (NO) e seus
respectivos aqua complexos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Candidata: **Naiara Cristina Bessas**

Orientadora: Profa. Dra. Renata Galvão de Lima

Área de Concentração: Química Bioinorgânica, Fotoquímica e Fotobiologia

ITUIUTABA
MARÇO DE 2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B557 2022	<p>Bessas, Naiara Cristina, 1998- Avaliação das interações entre a albumina sérica humana (ASH), complexos terpiridina de Rutênio(II) doadores de óxido nítrico (NO) e seus respectivos aqua complexos [recurso eletrônico] / Naiara Cristina Bessas. - 2022.</p> <p>Orientadora: Renata Galvão de Lima. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.182 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Química. I. Lima, Renata Galvão de, 1975-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 54</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP
38400-902
Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 339, PPGQUI				
Data:	Dezoito de março de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	8:30	Hora de encerramento:	11:20
Matrícula do Discente:	12012QMI010				
Nome do Discente:	Naiara Cristina Bessas				
Título do Trabalho:	Avaliação das interações entre a albumina sérica humana (ASH), complexos terpiridina de Rutênio(II) doadores de óxido nítrico (NO) e seus respectivos aqua complexos				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Bioinorgânica, Fotoquímica e Fotobiologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Entendimento das interações entre albumina humana e complexos de rutênio doadores de óxido nítrico do tipo $[RuII(NH.NHq)(tpy)L]n+$, $L=NO+$ ou $NO2-$: potencialidades na prevenção de alterações feto-placentárias				

Reuniu-se por meio de webconferência, Plataforma Teams, link <https://teams.microsoft.com/l/channel/19%3aT7tkG-OT4wFwYT8B2bNjtBDFRfHZWm2A7To9UnQu7I1%40thread.tacv2/Geral?groupId=bfc26869-305c-4ff4-a52c-446f4d1c4c67&tenantId=cd5e6d23-cb99-4189-88ab-1a9021a0c451>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Gilson de Freitas Silva, da Universidade Federal de Minas Gerais; Roberto Santana da Silva, da Universidade de São Paulo e Renata Galvão de Lima, orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Renata Galvão de Lima, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Renata Galvão de Lima, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/03/2022, às 11:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberto Santana da Silva, Usuário Externo**, em 18/03/2022, às 11:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gilson de Freitas Silva, Usuário Externo**, em 18/03/2022, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3409543** e o código CRC **BB2DBF9B**.

Referência: Processo nº 23117.013399/2022-09

SEI nº 3409543

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio Carlos e Maria Inalda, à minha irmã, Lidiane, e ao meu pequeno / grande amor, meu afilhado, Gabriel. Vocês são o verdadeiro significado de Família. Obrigada por estarem comigo em todas as circunstâncias da minha vida e por serem meu maior exemplo de amor, fé e perseverança. Amo muito vocês!

Ao meu amor, Amós. Obrigada pelo seu amor, carinho, cuidado e paciência, além de me apoiar e incentivar sempre. Sem dúvidas, eu sou uma pessoa melhor depois que te conheci! Amo muito você!

Dedico este trabalho, também, a quem eu tenho o maior orgulho em dizer que é minha orientadora:

Profa. Dra. Renata Galvão de Lima.

Para mim, a Renata é um exemplo, não só dentro, como também fora do laboratório. Não há palavras para agradecê-la pois, sem os ensinamentos dela, eu não estaria onde estou hoje.

Muitíssimo obrigada, Renata, por acreditar em mim e por se dedicar tanto aos seus alunos. A você, minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da minha vida e por ser meu alicerce, amparo e sustento. Tudo o que sou e faço é por Ti e para Ti. “Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele a glória por toda a eternidade!” (Romanos, 3:11).

A meus avós paternos, José e Maria Aparecida; meus avós maternos/padrinhos, Victor e Expedita (in memoriam); meus tios, primos e toda a minha família. O amor e o incentivo de vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Amo muito todos vocês!

A todos os meus amigos e colegas de laboratório, em especial, Allyson, Ana, Cynthia, Diele, Evelyn, Giselle, Isabela, Laís, Leticia, Marcos, Mateus, Mayara, Natália e Poliana. Obrigada por serem minha família em Ituiutaba/MG, pelo companheirismo e por, muitas vezes, me auxiliarem, seja dentro ou fora do laboratório.

Às integrantes do Laboratório de Pesquisas em Bioinorgânica (LABBIO). Obrigada por não serem simplesmente um grupo de pesquisa, mas uma família que faz pesquisa. Esta Dissertação de Mestrado é nossa!

A todos os professores que fizeram parte da minha formação, desde o ensino básico ao ensino superior, pelos quais eu tenho imensa admiração, gratidão e respeito. Em especial, a todos os professores do Curso de Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP). Obrigada por todos os ensinamentos e por serem exemplos a serem seguidos!

Ao Prof. Dr. Gilson de Freitas (ICEx – UFMG) e Silva e ao Prof. Dr. Roberto Santana da Silva (FCFRP – USP). Obrigada por aceitarem participar deste importante momento da minha vida acadêmica. É uma honra tê-los na banca examinadora desta Defesa de Dissertação de Mestrado.

Ao Prof. Dr. Gilson de Freitas, pela realização das análises via espectrometria de massas.

Ao Prof. Dr. Roberto Santana da Silva e aos integrantes do Laboratório de Físico-Química e Bioinorgânica (LaFQBIO), por cederem inúmeras vezes o espaço em seu laboratório para as integrantes do Laboratório de Pesquisas em Bioinorgânica (LABBIO).

Ao Dr. Adriano Batista da Costa (FFCLRP – USP), pelo auxílio na realização das análises via espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo.

Ao Cromat, em especial ao doutorando Allyson e à mestranda Laís, pelo auxílio na realização das análises via cromatografia líquida de alta eficiência.

Ao GPMEI, em especial à doutoranda Diele, pelo auxílio na realização das análises eletroquímicas.

Aos servidores da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

À FAPEMIG, pela bolsa concedida.

*Fazer tudo por Amor. Assim, não há coisas pequenas:
Tudo é grande! A perseverança nas pequenas coisas, por
Amor, é heroísmo.*

São Josemaria Escrivá

RESUMO

O óxido nítrico (NO) atua em diferentes processos fisiológicos, desde atividades antimicrobiana e antiparasitária, controle da coagulação e da pressão sanguínea, à neurotransmissão e ação antitumoral. Dentre os doadores exógenos de NO, complexos nitrosilos/nitro de rutênio são potenciais candidatos a pró-fármacos, devido às suas propriedades físico-químicas, como estabilidade térmica e em pH fisiológico (pH = 7,4). Além disso, a liberação de NO pelos complexos citados pode ser controlada por meio de estímulos químicos, eletroquímicos ou, ainda, fotoquímicos. Face ao exposto, foram sintetizados e caracterizados complexos terpiridina de rutênio(II) doadores de óxido nítrico (NO), sendo os nitrosilos complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, e os nitro complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ – onde tpy=2,2':6',2''-terpiridina; bdq=ácido 3,4-diaminobenzóico; e bd=*o*-fenilenodiamina. Além disso, foram sintetizados e caracterizados, também, os possíveis produtos da liberação do NO, sendo estes os aqua complexos terpiridina de rutênio(II) do tipo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$. Os complexos $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ são complexos inéditos. Neste interim, foi proposta a avaliação das interações entre os complexos terpiridina de rutênio(II) com a biomolécula responsável pelo armazenamento, difusão, metabolismo e excreção de ligantes, endógenos ou exógenos, sendo esta a albumina sérica humana (ASH). A avaliação das interações entre a ASH e os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ via espectroscopia na região do IV demonstrou que os complexos proporcionam mudanças conformacionais na estrutura secundária da ASH, mais especificamente nas α -hélices da proteína, sendo este um indicativo de que houve a interação entre as espécies em questão. Posteriormente os estudos via espectroscopia de fluorescência indicaram que há a interação entre as espécies, sendo que os mecanismos de supressão de fluorescência da ASH em presença dos nitrosilos complexos e dos nitro complexos são dinâmico, enquanto para os aqua complexos há a contribuição de ambos os mecanismos, estático e dinâmico. Os valores de K_a para os sistemas ASH- $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, ASH- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, ASH- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e ASH- $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ sugerem que tais interações são estabilizadas com a elevação da temperatura. Contudo, para os sistemas

ASH-[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃ e ASH- Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂, os resultados demonstram que tais interações são desestabilizadas com o aumento da temperatura. Os parâmetros termodinâmicos para os sistemas ASH-[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH-[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆, ASH-[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ e ASH- Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ indicam que as espécies interagem via interações hidrofóbicas. Entretanto, para os sistemas ASH-[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃ e ASH- Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂, os resultados sugerem que as espécies interagem via ligações de hidrogênio. As distâncias centro a centro entre o resíduo de Trp-214 e os complexos, estimadas pela teoria de FRET, demonstram que há a transferência de energia por ressonância da ASH para os complexos, resultando na supressão de fluorescência intrínseca da ASH. A avaliação dos sítios de interação entre a ASH e os complexos via supressão de fluorescência síncrona da ASH indica que os complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ encontram-se em um microambiente proteico hidrofílico, próximo ao resíduo de Trp-241, mais expostos ao solvente, enquanto os complexos [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃ e [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ estão situados em um microambiente proteico hidrofóbico, próximo a resíduos de Tyr, menos expostos ao solvente. A avaliação das interações entre a ASH e os aqua complexos, Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ e [Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂, via voltametria de pulso diferencial (VPD) sugerem que as alterações apresentadas nos perfis voltamétricos dos complexos em presença da ASH são atribuídas a mudanças no ambiente molecular dos mesmos, sendo tais mudanças caracterizadas pela interação entre as espécies.

Palavras-chave: ASH, complexos terpiridina de rutênio(II), óxido nítrico, supressão de fluorescência.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) acts in different physiological processes, from antimicrobial and antiparasitic activities, control of coagulation and blood pressure, to neurotransmission and antitumor action. Among the exogenous NO donors, ruthenium nitrosyl/nitro complexes are potential candidates for prodrugs, due to their physicochemical properties, such as thermal stability and physiological pH (pH = 7.4). In addition, the release of NO by the aforementioned complexes can be controlled through chemical, electrochemical or even photochemical stimuli. In view of the above, terpyridine complexes of ruthenium(II) nitric oxide (NO) donors were synthesized and characterized, and the nitrosyl complexes of the type $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ and $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, and the nitro complexes of the type $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ and $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ – where tpy=2,2':6',2''-terpyridine; bdq=3,4-diaminobenzoic acid; and bd=*o*-phenylenediamine. In addition, the possible products of NO release were synthesized and characterized, these being the aqua terpyridine complexes of ruthenium(II) of the type $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ and $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$. The complexes $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ and $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ are unpublished complexes. In the meantime, it was proposed to evaluate the interactions between the terpyridine complexes of ruthenium(II) with the biomolecule responsible for the storage, diffusion, metabolism and excretion of endogenous or exogenous ligands, which is human serum albumin (HSA). The evaluation of interactions between HSA and the complexes $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ and $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ via spectroscopy in the IR region showed that the complexes provide conformational changes in the secondary structure of HSA, more specifically in the α -helices of the protein, which is an indication that there was an interaction between the species in question. Subsequently, studies via fluorescence spectroscopy indicated that there is an interaction between the species, and the mechanisms of HSA fluorescence suppression in the presence of complex nitrosyls and complex nitros are dynamic, while for aqua complexes there is a contribution of both mechanisms, static and dynamic. The K_a values for the HSA- $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, HSA- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, HSA- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ and HSA- $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ systems suggest that such interactions are stabilized with increasing temperature. However, for HSA- $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ and HSA- $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ systems, the results demonstrate that such interactions are

destabilized with increasing temperature. The thermodynamic parameters for HSA–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, HSA–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆, HSA–[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ and HSA–Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ systems indicate that species interact via hydrophobic interactions. However, for HSA–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃ and HSA–Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂ systems, the results suggest that the species interact via hydrogen bonds. The center-to-center distances between the Trp-214 residue and the complexes, estimated by the FRET theory, demonstrate that there is a transfer of energy by resonance from HSA to the complexes, resulting in the suppression of intrinsic fluorescence of HSA. The evaluation of the sites of interaction between HSA and the complexes via synchronous fluorescence suppression of the HSA indicates that the complexes [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ and Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ are found in a hydrophilic protein microenvironment, close to the Trp-241 residue, more exposed to the solvent, while the complexes [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ are located in a hydrophobic protein microenvironment, close to Tyr residues, less exposed to solvent. The evaluation of interactions between HSA and the aqua complexes, Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ and Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂, via differential pulse voltammetry (VPD) suggest that the alterations presented in the voltammetric profiles of the complexes in the presence of HSA are attributed to changes in their molecular environment, and such changes are characterized by the interaction between the species.

Keywords: HSA, ruthenium(II) terpyridine complexes, nitric oxide, fluorescence suppression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diagrama de orbitais moleculares de valência qualitativo para o óxido nítrico (NO).	29
Figura 2 – Estrutura química da nitroglicerina (NTG) – C ₃ H ₅ (NO ₃) ₃	31
Figura 3 – Estrutura química do nitroprussiato de sódio (NPS) – Na ₂ [Fe(CN) ₅ (NO)].2H ₂ O. 31	31
Figura 4 – Estrutura química do íon complexo [Ru ₃ (μ ₃ -O)(μ-OOCCH ₃) ₆ (NO)(L) ₂] ⁺	33
Figura 5 – Estrutura química do íon complexo [RuCl(dppb)(4,4'-Mebipy)(L)] ²⁺	33
Figura 6 – Estrutura química do íon complexo <i>R,R,S,S-trans</i> -[RuCl(cyclam)(NO)] ²⁺	34
Figura 7 – Estrutura química do íon complexo [Ru(bdq)(tpy)(NO)] ³⁺	35
Figura 8 – Estrutura química do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(NO ₂)(bpy) ₂ (py)] ⁺	35
Figura 9 – Representação tridimensional da estrutura terciária da albumina sérica humana (ASH).	37
Figura 10 – Estrutura química do íon complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)] ³⁺	38
Figura 11 – Estrutura química dos complexos [RuCl(qn)(Lbpy ₁)(NO)]Cl (a) e [RuCl(qn)(Lbpy ₂)(NO)]NO ₃ (b).	39
Figura 12 – Estrutura química do íon complexo [RuCl ₃ (5cq)(NO)] ⁻	40
Figura 13 – Estruturas químicas dos complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ (a), [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ (b), [Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆ (c), [Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆ (d), [Ru(H ₂ O)(bdq)(tpy)](PF ₆) ₂ (e) e [Ru(H ₂ O)(bd)(tpy)](PF ₆) ₂ (f).	42
Figura 14 – Representação ilustrativa para dos procedimentos experimentais realizados para a preparação das soluções para a avaliação das interações entre a ASH e os complexos.....	52
Figura 15 – Rota sintética para os complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ , [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ , [Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆ , [Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆ , [Ru(H ₂ O)(bdq)(tpy)](PF ₆) ₂ e [Ru(H ₂ O)(bd)(tpy)](PF ₆) ₂	58
Figura 16 – Espectros de massas e fragmentações para o complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	62
Figura 17 – Espectros de massas para o complexo [Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆	63
Figura 18 – Espectros de massas para o complexo [Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆	64
Figura 19 – Espectros de massas para o complexo [Ru(H ₂ O)(bdq)(tpy)](PF ₆) ₂	66
Figura 20 – Espectros de massas para o complexo [Ru(H ₂ O)(bd)(tpy)](PF ₆) ₂	67
Figura 21 – Distribuição isotópica para os complexos [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ (a) (m/z=567,2936), [Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆ (b) (m/z=673,1381), [Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆ (c) (m/z=628,9613), [Ru(H ₂ O)(bdq)(tpy)](PF ₆) ₂ (d) (m/z=485,4483) e	

[Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂ (e) (m/z=476,2727). (–) Experimental; (—) Teórica (ChemCalc).

..... 69

Figura 22 – Cromatogramas para o complexo [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃ (a). Composição da fase móvel: Tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ a 0,1% de TFA:MeOH (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (–) e 2 h (---). t = 37 °C. Estruturas químicas dos isômeros de posição do complexo [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃ (b). 71

Figura 23 – Cromatogramas para o complexo [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ (a). Composição da fase móvel: Tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ a 0,1% de TFA:MeOH (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (–) e 2 h (---). t = 37 °C. Espectros de absorção na região do UV/Visível. para o complexo [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ referente aos picos 1 (b) e 2 (c). 72

Figura 24 – Cromatogramas para o complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃. Composição da fase móvel: Tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ a 0,1% de TFA:MeOH (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (–) e 2 h (---). t = 37 °C. 73

Figura 25 – Cromatogramas para o complexo [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ (a). Composição da fase móvel: Tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ a 0,1% de TFA:MeOH (75:25 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (–) e 2 h (---). t = 37 °C. Espectro de absorção na região do UV/Visível. para o complexo [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ referente ao pico em tr = 5,99 min. (b). 74

Figura 26 – Cromatogramas para o complexo [Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ (a). Composição da fase móvel: Tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ a 0,1% de TFA:MeOH (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (–) e 2 h (---). t = 37 °C. Espectros de absorção na região do UV/Visível. referente aos picos 1 (b), 2 (c), 3 (d), 4 (e), 5 (f) e 6 (g). 75

Figura 27 – Espectro eletrônico qualitativo para o complexo [Ru(OH)(bdq)(tpy)]PF₆ em NaOH 0,1 mol L⁻¹. 77

Figura 28 – Cromatogramas para o complexo [Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂ (a). Composição da fase móvel: Tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ a 0,1% de TFA:MeOH (75:25 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (–) e 2 h (---). t = 37 °C. Espectros de absorção na região do UV/Visível. referente aos picos 1 (b) e 2 (c). 78

Figura 29 – Espectro eletrônico qualitativo para o complexo [Ru(OH)(bd)(tpy)]PF₆ em NaOH 0,1 mol L⁻¹. 79

Figura 30 – Modos de coordenação Metal–NO. 80

Figura 31 – Modos de coordenação Metal–NO₂. 81

Figura 32 – Espectro vibracional na região do IV para o complexo [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃. 81

Figura 33 – Espectro vibracional na região do IV para o complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	82
Figura 34 – Espectro vibracional na região do IV para o complexo [Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆	82
Figura 35 – Espectro vibracional na região do IV para o complexo [Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆ .	83
Figura 36 – Espectros vibracionais na região do IV para os complexos [Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆ (a) e [Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆ (b), em PBS (pH = 7,4).....	85
Figura 37 – Espectro vibracional na região do IV para o complexo [Ru(H ₂ O)(bdq)(tpy)](PF ₆) ₂	87
Figura 38 – Espectro vibracional na região do IV para o complexo [Ru(H ₂ O)(bd)(tpy)](PF ₆) ₂	87
Figura 39 – Espectro eletrônico para o complexo [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ a 16,4 μmol L ⁻¹ em HCl 0,1 mol L ⁻¹	90
Figura 40 – Espectro eletrônico para o complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ a 16,4 μmol L ⁻¹ em HCl 0,1 mol L ⁻¹	91
Figura 41 – Espectro eletrônico para o complexo [Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆ a 16,4 μmol L ⁻¹ em NaOH 0,1 mol L ⁻¹	91
Figura 42 – Espectro eletrônico para o complexo [Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆ a 16,4 μmol L ⁻¹ em NaOH 0,1 mol L ⁻¹	92
Figura 43 – Espectro eletrônico para o complexo [Ru(H ₂ O)(bdq)(tpy)](PF ₆) ₂ a 16,4 μmol L ⁻¹ em meio aquoso.....	92
Figura 44 – Espectro eletrônico para o complexo [Ru(H ₂ O)(bd)(tpy)](PF ₆) ₂ a 16,4 μmol L ⁻¹ em meio aquoso.....	93
Figura 45 – Espectros de absorção na região do UV/Vis. para a ASH e os complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ (a), [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ (b), [Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆ (c) e [Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆ (d), em PBS (pH = 7,4) a 308 K durante 24 h. [ASH] = 1,0 μmol L ⁻¹ (-); [Complexo] = 0-16,4 μmol L ⁻¹ [1,0 (-); 1,7 (-); 2,3 (-); 3,3 (-); 5,0 (-); 6,6 (-); 8,3 (-); 9,9 (-); 11,5 (-); 13,2 (-); 14,8 (-); 16,4 μmol L ⁻¹ (-)].....	99
Figura 46 – Modos vibracionais das amidas I (a), II (b) e III (c).....	100
Figura 47 – Espectros vibracionais na região do IV para a ASH em ausência (-) e em presença dos complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ (-) e [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ (-).....	101
Figura 48 – Espectros vibracionais na região do IV para a ASH em ausência (-) e em presença dos complexos [Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆ (-) e [Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆ (-).....	102

Figura 49 – Espectros de supressão de fluorescência da ASH em presença dos complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ (a), [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ (b), [Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆ (c) e [Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆ (d), em PBS (pH = 7,4) a 308 K durante 24 h. $\lambda_{exc} = 280$ nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. [ASH] = 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (–); [Complexo] = 0-16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (–); 1,7 (–); 2,3 (–); 3,3 (–); 5,0 (–); 6,6 (–); 8,3 (–); 9,9 (–); 11,5 (–); 13,2 (–); 14,8 (–); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (–)]......	104
Figura 50 – Representação ilustrativa dos possíveis mecanismos de interação entre a ASH e o supressor (S).	105
Figura 51 – Gráficos de Stern-Volmer sobre as interações entre a ASH e o complexo [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ considerando-se diferentes tipos de correções para os valores de F_{Obs}	107
Figura 52 – Gráficos de Stern-Volmer sobre as interações entre a ASH e os complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ (a), [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ (b), [Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆ (c) e [Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆ (d) em PBS (pH = 7,4) a 298 K (●), 303 K (▲) e 308 K (■) durante 24 h. $\lambda_{exc} = 280$ nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm.	109
Figura 53 – Gráficos de $\log\{(F_0-F)/F\}$ em função de $\log [[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3]$ (a), $\log [[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3]$ (b), $\log [[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6]$ (c) e $\log [[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6]$ (d) em PBS (pH = 7,4) a 298 K (●), 303 K (▲) e 308 K (■) durante 24 h.	114
Figura 54 – Representação ilustrativa das possíveis interações entre a ASH e um ligante... 117	
Figura 55 – Perfis cinéticos para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ (a), ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ (b), ASH–[Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆ (c) e ASH–[Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆ (d) a 308 K. [ASH] = 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (–); [Complexo] = 0 (●); 6,6 (▲) e 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (■)......	121
Figura 56 – Sobreposição dos espectros de emissão para a ASH e de absorção para os complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ (a), [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ (b), [Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆ (c) e [Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆ (d), em PBS (pH = 7,4). [ASH] = 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (---); [Complexo] = 11,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (–).	124
Figura 57 – Espectros de supressão de fluorescência síncrona ($\Delta\lambda = 15$ nm) para a ASH em presença dos complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ (a), [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ (b), [Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆ (c) e [Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆ (d), em PBS (pH = 7,40) a 308 K durante 24 h. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. [ASH] = 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (–); [Complexo] = 0-16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (–); 1,7 (–); 2,3 (–); 3,3 (–); 5,0 (–); 6,6 (–); 8,3 (–); 9,9 (–); 11,5 (–); 13,2 (–); 14,8 (–); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (–)]......	127

Figura 58 – Espectros de supressão de fluorescência síncrona ($\Delta\lambda = 60$ nm) para a ASH em presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (a), $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (b), $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (c) e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (d), em PBS (pH = 7,40) a 308 K durante 24 h. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. $[\text{ASH}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (-); $[\text{Complexo}] = 0-16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (-); 1,7 (-); 2,3 (-); 3,3 (-); 5,0 (-); 6,6 (-); 8,3 (-); 9,9 (-); 11,5 (-); 13,2 (-); 14,8 (-); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-)].	128
Figura 59 – Espectros de absorção na região do UV/Vis. para a ASH e os complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (a) e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (b), em PBS (pH = 7,4) a 308 K durante 24 h. $[\text{ASH}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (-); $[\text{Complexo}] = 0-16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (-); 1,7 (-); 2,3 (-); 3,3 (-); 5,0 (-); 6,6 (-); 8,3 (-); 9,9 (-); 11,5 (-); 13,2 (-); 14,8 (-); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-)].	131
Figura 60 – Espectros vibracionais na região do IV para a ASH em ausência (-) e em presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (-) e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (-).	132
Figura 61 – Espectros de supressão de fluorescência da ASH em presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (a) e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (b), em PBS (pH = 7,4) a 308 K durante 24 h. $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. $[\text{ASH}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (-); $[\text{Complexo}] = 0-16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (-); 1,7 (-); 2,3 (-); 3,3 (-); 5,0 (-); 6,6 (-); 8,3 (-); 9,9 (-); 11,5 (-); 13,2 (-); 14,8 (-); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-)].	133
Figura 62 – Espectros de fluorescência para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ em PBS (pH = 7,4) a 308 K. $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. $[\text{Complexo}] = 1-16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (-); 1,7 (-); 2,3 (-); 3,3 (-); 5,0 (-); 6,6 (-); 8,3 (-); 9,9 (-); 11,5 (-); 13,2 (-); 14,8 (-); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-)].	134
Figura 63 – Gráficos de Stern-Volmer sobre as interações entre a ASH e os complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (a) e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (b) em PBS (pH = 7,4) a 298 K (●), 303 K (▲) e 308 K (■) durante 24 h. $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm.	135
Figura 64 – Gráficos de $\log\{(F_0-F)/F\}$ em função de $\log [\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (a) e $\log [\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (b) em PBS (pH = 7,4) a 298 K (●), 303 K (▲) e 308 K (■) durante 24 h.	135
Figura 65 – Perfis cinéticos para os sistemas ASH- $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (a) e ASH- $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (b) a 308 K. $[\text{ASH}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (-); $[\text{Complexo}] = 0$ (●); 6,6 (▲) e 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (■).	140

- Figura 66** – Sobreposição dos espectros de emissão para a ASH e de absorção para os complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (**a**) e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (**b**), em PBS (pH = 7,4). $[\text{ASH}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (---); $[\text{Complexo}] = 11,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (-). 142
- Figura 67** – Espectros de supressão de fluorescência síncrona ($\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ (**a**) e $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ (**b**)) para a ASH em presença do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, em PBS (pH=7,4) a 308 K durante 24 h. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. $[\text{ASH}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (-); $[\text{Complexo}] = 0-16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (-); 1,7 (-); 2,3 (-); 3,3 (-); 5,0 (-); 6,6 (-); 8,3 (-); 9,9 (-); 11,5 (-); 13,2 (-); 14,8 (-); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-)]...... 143
- Figura 68** – Espectros de fluorescência síncrona ($\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ (-) e $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ (-)) para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, em PBS (pH=7,4) a 308 K. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. 144
- Figura 69** – Voltamogramas de pulso diferencial para os complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (**a**) e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (**b**) em tampão fosfato (---) e em PBS (-) (pH = 7,40). 145
- Figura 70** – Voltamogramas de pulso diferencial para os complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (**a**) e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (**b**) em presença da ASH, em PBS (pH = 7,40). $[\text{Complexo}] = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (-); $[\text{ASH}] = 0-4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ [0,5 (-); 1,0 (-); 1,5 (-); 2,0 (-); 2,5 (-); 3,0 (-); 3,5 (-); 4,0 (-); 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-)].
 $[\text{ASH}] = 0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (---)..... 146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reagentes utilizados durante a síntese e caracterização dos complexos e estudos posteriores, sua pureza fração mássica percentual e procedência.	43
Tabela 2 – Porcentagens teóricas e experimentais de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtidas para os complexos terpiridina de rutênio(II).	60
Tabela 3 – Valores de estiramento para os ligantes nitrosil (NO^+) e nitro (NO_2) coordenados a complexos polipiridínicos de rutênio(II).	86
Tabela 4 – Dados espectroscópicos para os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, seus coeficientes de absorvidade molar (ϵ) e suas atribuições.	89
Tabela 5 – Valores de condutividade molar (Λ_m), de solubilidade e de coeficiente de partição ($\log P$) para os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$	95
Tabela 6 – Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) e constantes de velocidade bimolecular de supressão (k_q) para os sistemas $\text{ASH}-[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $\text{ASH}-[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $\text{ASH}-[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $\text{ASH}-[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ em diferentes temperaturas durante 24 h de interação.	110
Tabela 7 – Tempo de vida de fluorescência da ASH em função da concentração do complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$	111
Tabela 8 – Tempo de vida de fluorescência da ASH em função da concentração do complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$	112
Tabela 9 – Tempo de vida de fluorescência da ASH em função da concentração do complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$	112
Tabela 10 – Tempo de vida de fluorescência da ASH em função da concentração do complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$	112
Tabela 11 – Constantes de associação (K_a) e números de sítios de ligação (n) para os sistemas $\text{ASH}-[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $\text{ASH}-[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $\text{ASH}-[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $\text{ASH}-[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ em diferentes temperaturas durante 24 h de interação.	115

Tabela 12 – Parâmetros termodinâmicos para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ , ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ , ASH–[Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆ e ASH–[Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆	118
Tabela 13 – Constantes cinéticas para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ , ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ , ASH–[Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆ e ASH– [Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆ a 308 K.	122
Tabela 14 – Determinação de FRET para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ , ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ , ASH–[Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆ e ASH–[Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆ a 308 K.	125
Tabela 15 – Constantes de Stern-Volmer (K _{SV}) e constantes de associação (K _a) para os sistemas ASH–[Ru(H ₂ O)(bdq)(tpy)](PF ₆) ₂ e ASH–[Ru(H ₂ O)(bd)(tpy)](PF ₆) ₂ em diferentes temperaturas durante 24 h de interação.	136
Tabela 16 – Tempo de vida de fluorescência da ASH em função da concentração do complexo [Ru(H ₂ O)(bdq)(tpy)](PF ₆) ₂	137
Tabela 17 – Tempo de vida de fluorescência da ASH em função da concentração do complexo [Ru(H ₂ O)(bd)(tpy)](PF ₆) ₂	137
Tabela 18 – Parâmetros termodinâmicos para os sistemas ASH–[Ru(H ₂ O)(bdq)(tpy)](PF ₆) ₂ e ASH–[Ru(H ₂ O)(bd)(tpy)](PF ₆) ₂	139
Tabela 19 – Constantes cinéticas para os sistemas ASH–[Ru(H ₂ O)(bdq)(tpy)](PF ₆) ₂ e ASH–[Ru(H ₂ O)(bd)(tpy)](PF ₆) ₂ a 308 K.	141
Tabela 20 – Determinação de FRET para os sistemas ASH–[Ru(H ₂ O)(bdq)(tpy)](PF ₆) ₂ e ASH–[Ru(H ₂ O)(bd)(tpy)](PF ₆) ₂ a 308 K.	143
Tabela 21 – Constantes de Stern-Volmer (K _{SV}) e constantes de associação (K _a) para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ , ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃ , ASH–[Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆ e ASH–[Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆ em diferentes temperaturas durante minutos* de interação.....	159

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

4-acpy	Acetilpiridina
4-pic	4-picolina
4,4'-Mebipy	4,4-dimetil-2,2'-bipiridina
5cqn	5-cloro-8-quinolina
ACN	Acetonitrila
ALF	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
ASH	Albumina sérica humana
bd	<i>o</i> -fenilenodiamina
bdq	Ácido 3,4-diaminobenzóico
bpy	2,2'-bipiridina
cyclam	1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano
dppb	1,4-bis(difenilfosfina)butano
DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
EM	Espectrometria de massas
FRED	Fator de relaxamento de endotélio dependente
FRET	Transferência de energia por ressonância de Förster
IV	Infravermelho
MALDI	Ionização/dessorção a laser assistida por matriz
NPS	Nitroprussiato de sódio
NTG	Nitroglicerina
PBS	Tampão fosfato salino
py	Piridina
qn	8-hidroxiquinolina
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPE	Ressonância paramagnética eletrônica
TFA	Ácido trifluoracético
TOF	Tempo de voo
tpy	2,2'-6',2''-terpiridina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UV/Visível	Ultravioleta e visível

VPD

Voltametría de pulso diferencial

LISTA DE SÍMBOLOS

\AA	Angstrom
ϵ	Coefficiente de absorvidade molar
λ	Comprimento de onda
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação
$\lambda_{m\acute{a}x}$	Comprimento de onda máximo
Λ_m	Condutividade molar
K_a	Constante de associação
K_{SV}	Constante de Stern-Volmer
k_q	Constante de velocidade bimolecular de supressão
Δ	Delta
R_0	Distância crítica entre o doador e o receptor
r_0	Distância centro a centro entre o doador e o receptor
E	Eficiência do processo de transferência de energia por ressonância de Förster
K	Fator de orientação espacial
ν	Frequência
J	Grau de sobreposição espectral entre espectro de emissão do dador e o espectro de absorção do receptor
N	Índice de refração médio
F_0	Intensidade de fluorescência da biomolécula em ausência do supressor
F	Intensidade de fluorescência da biomolécula em presença do supressor
$\Delta\lambda$	Intervalo de varredura
n	Número de sítios de ligação
π	Pi
ϕ	Rendimento quântico de fluorescência
σ	Sigma
τ_0	Tempo de vida de fluorescência médio da biomolécula em ausência do supressor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	29
1.1. Óxido Nítrico (NO)	29
1.2. Espécies Doadoras de Óxido Nítrico (NO).....	30
1.2.1. Complexos de Rutênio Doadores de Óxido Nítrico (NO)	32
1.3. Albumina Sérica Humana (ASH)	36
2. OBJETIVOS.....	41
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	43
3.1. Reagentes	43
3.2. Parte Experimental.....	44
3.2.1. Síntese dos Complexos Terpiridina de Rutênio(II)	44
3.2.1.1. Síntese do Complexo [RuCl ₃ (tpy)]	44
3.2.1.2. Síntese do Complexo [RuCl(bdq)(tpy)]PF ₆	44
3.2.1.3. Síntese do Complexo [Ru(H ₂ O)(tpy)(bdq)](PF ₆) ₂	45
3.2.1.4. Síntese do Complexo [Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆	45
3.2.1.5. Síntese do Complexo [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	46
3.2.1.6. Síntese do Complexo [RuCl(tpy)(bd)](PF ₆) ₂	46
3.2.1.7. Síntese do Complexo [Ru(H ₂ O)(tpy)(bd)](PF ₆) ₂	46
3.2.1.8. Síntese do Complexo [Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆	47
3.2.1.9. Síntese do Complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	47
3.2.2. Caracterização Físico-Química dos Complexos Terpiridina de Rutênio(II)	47
3.2.2.1. Análise Elementar	47
3.2.2.2. Espectrometria de Massas – Ionização/Dessorção à Laser Assistida por Matriz (MALDI).....	47
3.2.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	48
3.2.2.4. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV).....	49
3.2.2.5. Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível (UV/Visível)	49
3.2.2.6. Análises Condutimétricas.....	49
3.2.2.7. Determinação da Solubilidade	50
3.2.2.8. Determinação do Coeficiente de Partição (log P)	50
3.2.3. Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II)	
51	
3.2.3.1. Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) via Espectroscopia na Região do UV/Visível.....	51

3.2.3.2.	Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) via Espectroscopia na Região do IV	52
3.2.3.3.	Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) via Espectroscopia de Fluorescência	53
3.2.3.4.	Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) via Espectroscopia de Fluorescência Resolvida no Tempo.....	53
3.2.3.5.	Avaliação Cinética das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) via Espectroscopia de Fluorescência	54
3.2.3.6.	Determinação da Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET) entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II).....	55
3.2.3.7.	Avaliação dos Sítios de Interação entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) via Espectroscopia de Fluorescência Síncrona ($\Delta\lambda = 15 \text{ nm}/\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$) 56	
3.2.3.8.	Avaliação das Interações entre a ASH e os Aqua Complexos Terpiridina de Rutênio(II) via Eletroquímica – Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)	56
4.	RESULTADOS.....	58
4.1.	Caracterização Físico-Química dos Complexos Terpiridina de Rutênio(II)	59
4.1.1.	Análise Elementar.....	59
4.1.2.	Espectrometria de Massas – Ionização/Dessorção à Laser Assistida por Matriz (MALDI).....	60
4.1.3.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	70
4.1.4.	Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)	79
4.1.5.	Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível (UV/Visível)	88
4.1.6.	Análises Condutimétricas e Determinações da Solubilidade e dos Coeficientes de Partição (log P).....	95
4.2.	Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) Doadores de Óxido Nítrico (NO).....	98
4.2.1.	Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) Doadores de Óxido Nítrico (NO) via Espectroscopia na Região do UV/Visível	98
4.2.2.	Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) Doadores de Óxido Nítrico (NO) via Espectroscopia na Região do IV.....	100
4.2.3.	Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) Doadores de Óxido Nítrico (NO) via Espectroscopia de Fluorescência.....	103
4.2.3.1.	Determinação dos Mecanismos de Supressão de Fluorescência.....	105
4.2.3.2.	Determinação da Constante de Associação (K_a) e do Número de Sítios de Ligação (n).....	113
4.2.3.3.	Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos.....	117
4.2.4.	Avaliação Cinética das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) Doadores de Óxido Nítrico (NO) via Espectroscopia de Fluorescência.....	120

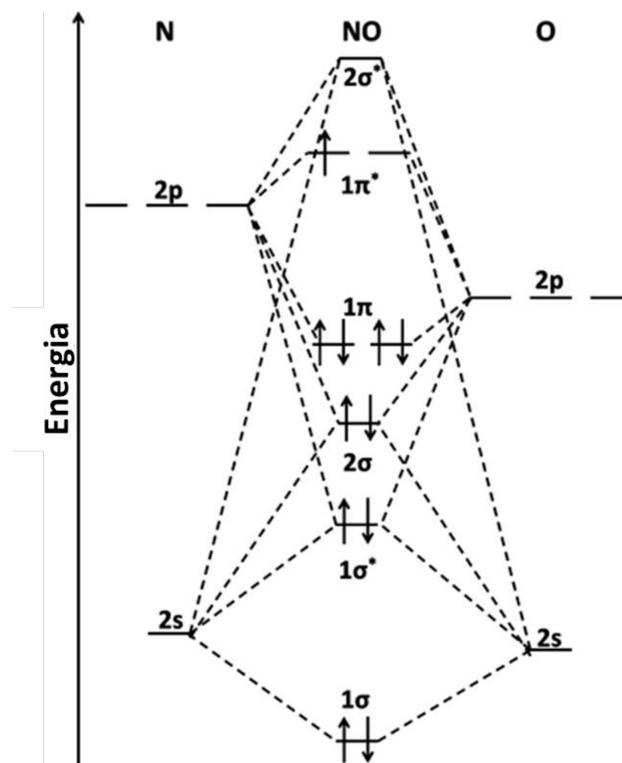
4.2.5. Determinação da Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET) entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) Doadores de Óxido Nítrico (NO)	123
4.2.6. Avaliação dos Sítios de Interação entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) Doadores de Óxido Nítrico (NO) via Espectroscopia de Fluorescência Síncrona ($\Delta\lambda = 15 \text{ nm}/\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$).....	126
4.3. Avaliação das Interações entre a ASH e os Aqua Complexos Terpiridina de Rutênio(II)	130
5. CONCLUSÕES.....	148
6. REFERÊNCIAS.....	150
ANEXO	159

1. INTRODUÇÃO

1.1. Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) é uma molécula diatômica que apresenta a configuração eletrônica $(1\sigma)^2 (1\sigma^*)^2 (2\sigma)^2 (2\sigma^*)^2 (3\sigma)^2 (1\pi)^4 (1\pi^*)^1$. O diagrama de orbitais moleculares para o NO é apresentado na Figura 1. A ordem de ligação para a molécula de NO é de 2,5, pois a mesma apresenta um elétron desemparelhado em um orbital do tipo pi antiligante (π^*). Assim, a molécula em questão exibe um comprimento de ligação de 1,15 Å, sendo este valor intermediário aos comprimentos de uma ligação dupla, de 1,18 Å, e de uma ligação tripla, de 1,06 Å (RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992).

Figura 1 – Diagrama de orbitais moleculares de valência qualitativo para o óxido nítrico (NO).



Fonte: Adaptado de ORENHA & GALEMBECK, 2014.

Até meados da década de 1970 o NO era conhecido somente como um subproduto decorrente da queima de combustíveis fósseis e, portanto, como um dos poluentes ambientais responsáveis pela destruição da camada de ozônio. Além de ser conhecido como um poluente ambiental, o NO era utilizado em uma importante etapa do processo de oxidação da amônia (NH_3) a ácido nítrico (HNO_3) em escala industrial (FELDMAN *et al.*, 1993).

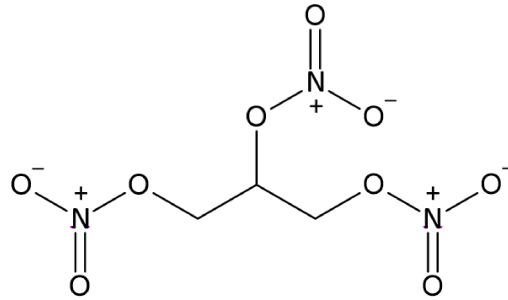
Somente após a década de 1980 surgiram as primeiras evidências da importância biológica do NO. GREEN e colaboradores (1981), pesquisando sobre a toxicologia das nitroaminas, constataram que espécies de óxidos de nitrogênio eram produzidas em quantidades significativas pelo metabolismo de mamíferos e, ainda, que a concentração das espécies produzidas era maior em condições inflamatórias. STUEHR & MARLETTA (1985) demonstraram que espécies de óxidos de nitrogênio, como nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), eram produzidos por macrófagos de rato *in vitro*, em presença do lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. Ferid Murad, Robert F. Furchgott e Louis J. Ignarro, pesquisando sobre o fator de relaxamento de endotélio dependente (FRED), concluíram que o mesmo possuía características biológicas e químicas idênticas àquelas do NO, ou seja, constataram que o NO é o FRED (KATSUKI *et al.*, 1977; FURCHGOTT *et al.*, 1980; IGNARRO *et al.*, 1987; apud IGNARRO, 2019). Em 1992 o NO foi escolhido como a molécula do ano pela revista *Science* (CULOTTA & KOSHLAND, 1992) e em 1998 Murad, Furchgott e Ignarro ganharam o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina pela descoberta de que o NO, no corpo humano, é classificado como uma molécula sinalizadora no sistema cardiovascular.

Atualmente sabe-se que o NO, apesar de ser uma molécula relativamente simples, atua em diferentes processos fisiológicos, desde atividades antimicrobiana (RAMACHANDRAN *et al.*, 2018) e antiparasitária (NARDI *et al.*, 2021), controle da coagulação e da pressão sanguínea (LI *et al.*, 2021), à neurotransmissão (WRIGHT, 2019) e ação antitumoral (RIZI *et al.*, 2017). Assim, considerando-se que o NO atua em diferentes processos fisiológicos, são desenvolvidas espécies, orgânicas ou inorgânicas, que atuem como doadoras exógenas de NO.

1.2. Espécies Doadoras de Óxido Nítrico (NO)

Dentre as espécies orgânicas que propiciam a liberação de NO, a nitroglicerina (NTG) – $\text{C}_3\text{H}_5(\text{NO}_3)_3$ – (Figura 2) é uma das mais antigas empregadas pela medicina chinesa no tratamento de *angina pectoris*, de hipertensão pulmonar, de insuficiência cardíaca congestiva e de outras complicações vasculares. Contudo, os efeitos clínicos da administração de NTG, a longo prazo, são controversos. Um dos problemas da utilização de NTG é o desenvolvimento de tolerância ao nitrato profilático, reduzindo a eficácia da mesma (CHEN & STAMLER, 2006). Assim, considerando-se o desenvolvimento de tolerância ao nitrato profilático decorrente da administração de NTG, foram estudadas espécies inorgânicas, que atuassem a fim de liberar NO e, ainda, que não apresentassem tais efeitos clínicos controversos.

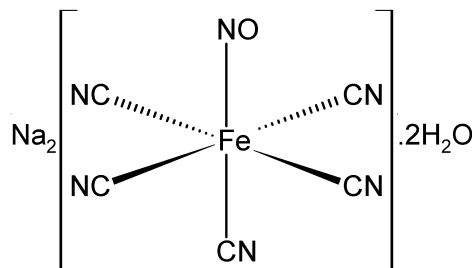
Figura 2 – Estrutura química da nitroglicerina (NTG) – $C_3H_5(NO_3)_3$.



Fonte: Autora.

Dentre as espécies inorgânicas que atuam como doadoras de NO, o nitroprussiato de sódio (NPS) – $Na_2[Fe(CN)_5(NO)].2H_2O$ – (Figura 3) é uma das mais antigas utilizadas como um vasodilatador útil no controle da pressão arterial, principalmente em casos de emergência. Entretanto, em alguns casos, os efeitos clínicos da administração de NPS são, além da reação de interesse, sendo esta a liberação de NO, reações secundárias indesejadas, sendo uma dessas a liberação de CN^- (MONCADA *et al.*, 1991). Além disso, em alguns casos, é observado um efeito rebote, devido à rápida indução de relaxamento proporcionada pelo NPS (da SILVA *et al.*, 2015). Então, considerando-se a limitação da utilização de NPS, devido à ocorrência de reações secundárias e possível efeito rebote, foram explorados outros complexos metálicos, que atuassem como doadores exógenos de NO de maneira controlada, por meio de estímulos químicos, eletroquímicos ou, ainda, fotoquímicos (PEREIRA *et al.*, 2011).

Figura 3 – Estrutura química do nitroprussiato de sódio (NPS) – $Na_2[Fe(CN)_5(NO)].2H_2O$.



Fonte: Autora.

Espécies tais como complexos nitrosilos/nitro de rutênio, devido às suas propriedades físico-químicas, como estabilidade térmica e em pH fisiológico (pH = 7,4), e, ainda, à vasta literatura a eles referente, têm se tornado potenciais candidatos a agentes doadores de NO (da SILVA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018; da ROCHA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2007; de LIMA *et al.*, 2006; LANG *et al.*, 2000).

1.2.1. Complexos de Rutênio Doadores de Óxido Nítrico (NO)

Complexos de coordenação que são considerados potenciais candidatos a agentes doadores de NO, suas propriedades físico-químicas, como estabilidade térmica e em pH fisiológico (pH = 7,4), e, principalmente, suas reatividades em sistemas biológicos, como citotoxicidade e interação com biomoléculas, são objeto de estudo em inúmeras pesquisas científicas. Conforme anteriormente descrito, espécies como complexos nitrosilos/nitros de rutênio são potenciais candidatos a agentes doadores de NO.

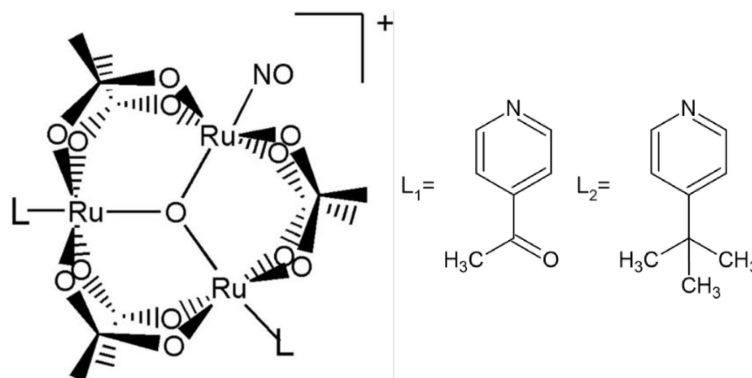
Contudo, primeiramente é necessário questionar-se: por que escolher o rutênio como íon metálico para a síntese de novos candidatos a metalofármacos/pró-fármacos? Escolhe-se o rutênio como íon metálico porque sabe-se que elementos que se encontram em um mesmo grupo da tabela periódica apresentam propriedades físico-químicas semelhantes, como o caso dos elementos ferro (Fe) e rutênio (Ru). Os metais em questão exibem estados de oxidação principais equivalentes, sendo estes Fe(II)/Fe(III) e Ru(II)/Ru(III). Além disso, os compostos de coordenação derivados desses metais, em sua maioria, apresentam geometria octaédrica. Assim, considerando-se as propriedades físico-químicas semelhantes entre os íons ferro e rutênio e, ainda, sabendo-se que o íon ferro é essencial em diferentes processos fisiológicos, como, por exemplo, na formação da hemoglobina, da mioglobina e de algumas enzimas (ABBASPOUR *et al.*, 2014), acredita-se que espécies de íons rutênio sejam capazes de mimetizar as ligações entre os íons ferro e biomoléculas como, por exemplo, a albumina sérica humana (ASH) e a transferrina, e, conseqüentemente, sejam armazenados, transportados, metabolizados e excretados pelas mesmas vias que espécies de íons ferro (GUO & SADLER, 1999; ANTONARAKIS & EMADI, 2010).

Então, considerando-se a semelhança entre os íons ferro e íons rutênio e, ainda, os processos fisiológicos nos quais o NO está envolvido, à seguir são apresentados alguns trabalhos envolvendo diferentes séries de complexos nitrosilos/nitro de rutênio, como clusters de rutênio (da SILVA *et al.*, 2018), complexos fosfínicos (SILVA *et al.*, 2018), macrocíclicos (OLIVEIRA *et al.*, 2007; LANG *et al.*, 2000) e polipiridínicos (da ROCHA *et al.*, 2008; de LIMA *et al.*, 2006) de rutênio e suas atividades citotóxicas/vasodilatadoras.

da SILVA e colaboradores (2018), sintetizaram e estudaram dois clusters de rutênio, do tipo $[\text{Ru}_3(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-OOCCH}_3)_6(\text{NO})(\text{L})_2]\text{PF}_6$ (Figura 4) – em que $\text{L}_1 = 4\text{-acetylpiridina}$ e $\text{L}_2 = 4\text{-terc-butylpiridina}$. Os autores avaliaram o efeito vasorrelaxante induzido pelos complexos em questão, os quais apresentaram 100% de vasorrelaxamento em aortas de ratos.

Os autores analisaram, ainda, a citotoxicidade dos complexos em células de melanoma murinho (B16F10) e concluíram que o complexo com o ligante L_2 é mais citotóxico, se comparado ao complexo com o ligante L_1 . O complexo com o ligante L_2 , em uma concentração 50 vezes menor que o complexo com o ligante L_1 , reduz a viabilidade celular para 50%, no escuro ou sob irradiação com luz visível ($\lambda_{\text{irrad}} = 527 \text{ nm}$).

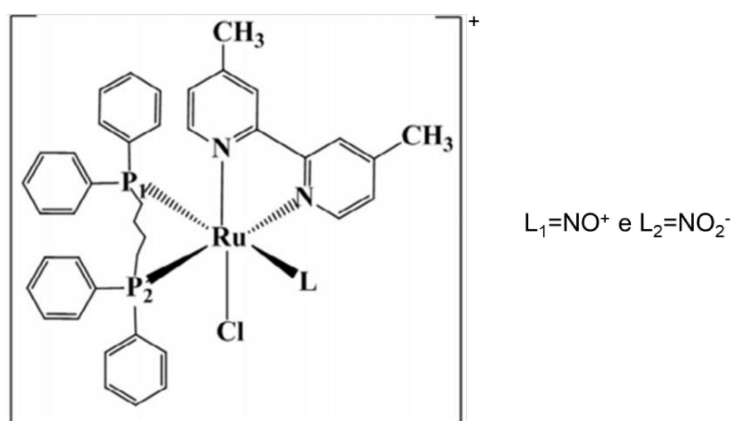
Figura 4 – Estrutura química do íon complexo $[\text{Ru}_3(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-OOCCH}_3)_6(\text{NO})(\text{L})_2]^+$.



Fonte: Adaptado de da SILVA *et al.*, 2018.

SILVA e colaboradores (2018), sintetizaram e estudaram um complexo fosfínico de rutênio, do tipo $[\text{RuCl}(\text{dppb})(4,4'\text{-Mebipy})(\text{L})](\text{PF}_6)_2$ (Figura 5) – em que $\text{dppb} = 1,4$ -bis(difenilfosfina)butano; $4,4'\text{-Mebipy} = 4,4$ -dimetil- $2,2'$ -bipiridina e $L_1 = \text{NO}^+$. Os autores avaliaram a citotoxicidade do complexo em células de câncer de cólon (HCT-9) e de câncer de pulmão (A549) e constataram que o complexo reduz as viabilidades celulares para 75 e 80%, respectivamente, no escuro.

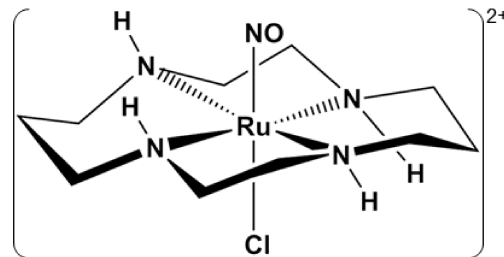
Figura 5 – Estrutura química do íon complexo $[\text{RuCl}(\text{dppb})(4,4'\text{-Mebipy})(\text{L})]^2+$.



Fonte: Adaptado SILVA *et al.*, 2018.

LANG e colaboradores (2000), com o intuito de minimizar as chances de ocorrerem reações secundárias indesejadas, sintetizaram e estudaram um complexo nitrosilo de rutênio com um co-ligante macrociclo, do tipo *R,R,S,S-trans*-[RuCl(cyclam)(NO)](PF₆)₂ (Figura 6) – em que cyclam = 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano –, pois co-ligantes macrociclos, além de conferirem aos compostos de coordenação diferentes propriedades físico-químicas, conferem alta estabilidade às estruturas formadas. OLIVEIRA e colaboradores (2007) analisaram o efeito vasorrelaxante induzido pelo complexo *R,R,S,S-trans*-[RuCl(cyclam)(NO)](PF₆)₂, sintetizado por LANG e colaboradores (2000), o qual apresentou, também, 100% de vasorrelaxamento em aortas de ratos.

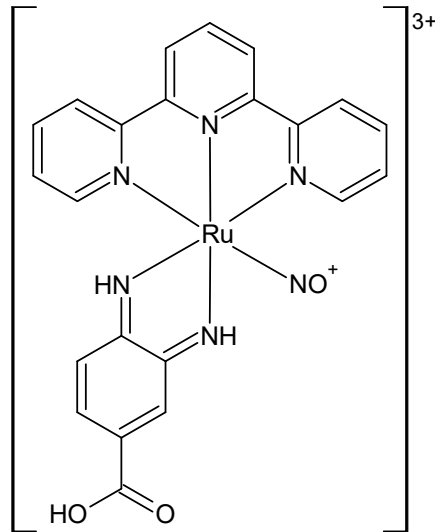
Figura 6 – Estrutura química do íon complexo *R,R,S,S-trans*-[RuCl(cyclam)(NO)]²⁺.



Fonte: LANG *et al.*, 2000.

de LIMA e colaboradores (2006) sintetizaram e estudaram um complexo nitrosilo de rutênio com um co-ligante polipiridínico, do tipo [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃ (Figura 7) – em que bdq = ácido 3,4-diaminobenzóico e tpy = 2,2':6',2''-terpiridina –, pois, co-ligantes polipiridínicos, como a terpiridina, conferem estabilidade às estruturas formadas (MOREL *et al.*, 2016). Os autores avaliaram, também, o efeito vasorrelaxante induzido pelo complexo em questão, o qual também apresentou 100% de vasorrelaxamento em aortas de ratos.

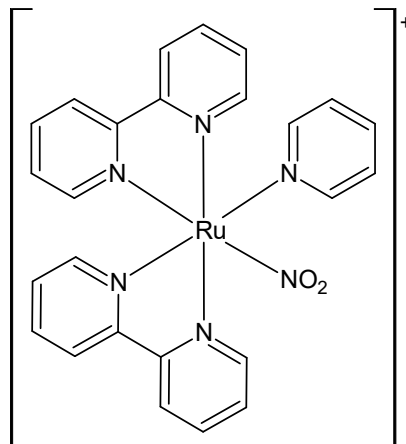
Figura 7 – Estrutura química do íon complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})]^{3+}$.



Fonte: Adaptado de de LIMA *et al.*, 2006.

da ROCHA e colaboradores (2008) sintetizaram e estudaram um complexo nitro de rutênio, do tipo *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{py})]\text{PF}_6$ (Figura 8) – em que bpy = 2,2'-bipiridina e py = piridina –, pois, para complexos nitrosilos de rutênio, em $\text{pH} < 7,0$ a forma com o ligante nitrosil, $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}^+$, é a mais estável, enquanto em $\text{pH} > 7,0$, a forma com o ligante nitro, $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}_2$, é a mais estável (SAUAIA & da SILVA, 2003). Complexos nitro de rutênio podem, também, atuar como agentes doadores de NO, uma vez que há mecanismos propostos para a conversão, *in vivo*, de NO_2^- a NO (da ROCHA *et al.*, 2008). Os autores analisaram, também, o efeito vasorrelaxante induzido pelo complexo em questão, o qual também apresentou 100% de vasorrelaxamento em aortas de ratos, comprovando que complexos nitro de rutênio podem, também, atuar como agentes doadores de NO.

Figura 8 – Estrutura química do íon complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{py})]^+$.



Fonte: Adaptado de da ROCHA *et al.*, 2008.

Assim, considerando-se a potencialidade de complexos de rutênio doadores de NO como pró-fármacos, são de suma importância estudos sobre as interações desses complexos com biomoléculas, principalmente aquelas que se encontram no plasma sanguíneo, como, por exemplo, a albumina sérica humana (ASH), que, dentre diversas outras funções fisiológicas, é responsável pela difusão de fármacos para diferentes tecidos do corpo humano.

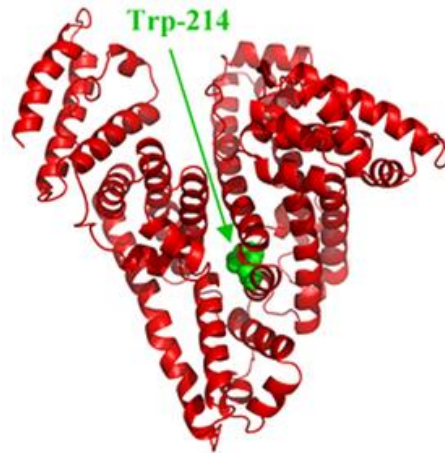
1.3. Albumina Sérica Humana (ASH)

A albumina sérica humana (ASH) é a proteína mais abundante do plasma sanguíneo, responsável pelo armazenamento, difusão e excreção de ligantes, tanto endógenos quanto exógenos, no corpo humano, além de auxiliar no metabolismo dos mesmos. Estudos sobre as interações entre a ASH e potenciais pró-fármacos, como os complexos de rutênio doadores de NO, são parâmetros de suma importância farmacológica, pois a interação entre tais espécies pode ocasionar alterações estruturais da proteína e, conseqüentemente, modificações de suas funções fisiológicas. Em alguns casos, além das alterações estruturais da proteína, podem haver modificações dos comportamentos farmacodinâmicos ou, até mesmo, a inativação dos potenciais pró-fármacos (TEKADE, 2019; XU *et al.*, 2017; MOREIRA *et al.*, 2015; RANJBAR *et al.*, 2013).

Quando há a interação entre a ASH e potenciais pró-fármacos, por exemplo, além do aumento da biodisponibilidade das espécies em questão, há o direcionamento desses potenciais pró-fármacos à células tumorais. Tal direcionamento se dá, pois, algumas células tumorais apresentam superexpressão ASH e, assim, exibem níveis mais altos da proteína, se comparado à células normais. Conseqüentemente, há o aumento da seletividade desses potenciais pró-fármacos para células tumorais (SONG *et al.*, 2021; DÖMÖTÖR *et al.*, 2016).

A estrutura da ASH e suas respectivas regiões de ligações preferenciais de fármacos são determinadas via técnica de cristalografia (HE & CARTER, 1992). A estrutura terciária da ASH (Figura 9) é classificada em três grandes domínios, denominados de I, II e III. Cada um desses três domínios contém dois subdomínios, classificados em A e B. As principais regiões de ligações preferenciais de fármacos estão localizadas nos subdomínios IIA e IIIA, mais comumente denominadas Sítios I e II de Sudlow. A ASH possui 585 aminoácidos, sendo 17 resíduos de tirosina (Tyr) e apenas um resíduo de triptofano (Trp), que está localizado na posição 214, situado no subdomínio IIA do arcabouço proteico (PETERS JR., 1995).

Figura 9 – Representação tridimensional da estrutura terciária da albumina sérica humana (ASH).

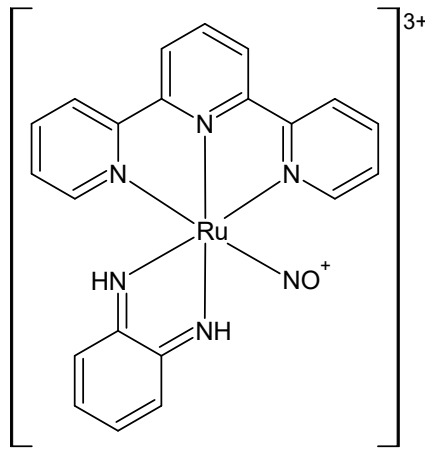


Fonte: BELATIK *et al.*, 2012.

Os estudos sobre as interações entre a ASH e quaisquer outras moléculas dar-se-ão via diferentes técnicas, sendo uma dessas a técnica de espectroscopia de fluorescência. As soro albuminas, quando excitadas em 280 nm, exibem fluorescência intrínseca aos resíduos de aminoácidos aromáticos tirosina (Tyr), triptofano (Trp) e fenilalanina (Phe), com máximo de emissão em 335 nm, sendo que a emissão para o resíduo de Trp-214 é a mais significativa, devido ao microambiente proteico no qual tal resíduo está situado (NAVEENRAJ & ANANDAN, 2013).

Com a finalidade de contribuir com o entendimento sobre as interações entre a ASH e potenciais pró-fármacos, como os complexos polipiridínicos de rutênio doadores de NO, BESSAS e colaboradores (2021), analisaram a interação entre a ASH e dois complexos terpiridina de rutênio(II) doadores de NO, do tipo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (Figura 7) e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (Figura 10) – em que tpy = 2,2':6',2''-terpiridina; bdq = ácido 3,4-diaminobenzóico; e bd = *o*-fenilenodiamina. A partir dos estudos via supressão de fluorescência, concluiu-se que ambos os complexos interagem com a ASH via um mecanismo dinâmico e apresentam constantes de associação (K_a) na ordem de 10^4 . Por meio dos parâmetros termodinâmicos obtidos, constatou-se que o complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ interage com a ASH via interações hidrofóbicas, enquanto o complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ via ligações de hidrogênio. A partir dos estudos via *docking* molecular, verificou-se que o ligante nitrosil (NO^+) contribui com a interação com a ASH via contato polar (ou seja, interação via íon-dipolo) com o resíduo de aminoácido de asparagina (Asp), que está localizado na posição 391 (Asp-391).

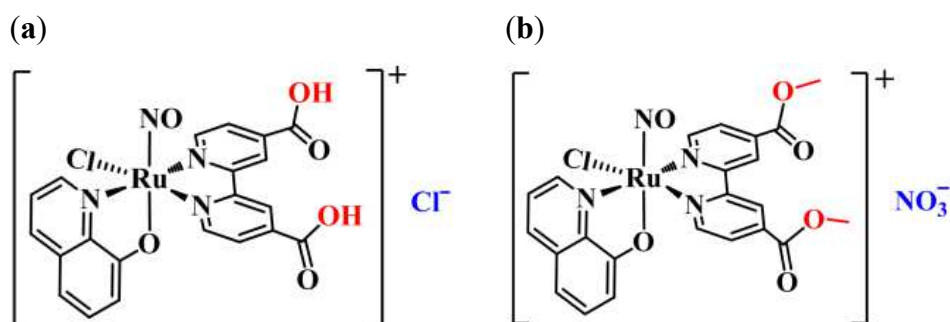
Figura 10 – Estrutura química do íon complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})]^{3+}$.



Fonte: BESSAS *et al.*, 2021.

Assim conforme descrito por BESSAS e colaboradores (2021), SONG e colaboradores (2021) analisaram a interação entre a ASH e dois complexos polipiridínicos de rutênio doadores de NO. Os autores avaliaram a interação entre a biomolécula e dois complexos bipyridina de rutênio(II) doadores de NO, do tipo $[\text{RuCl}(\text{qn})(\text{Lbpy}_1)(\text{NO})]\text{Cl}$ e $[\text{RuCl}(\text{qn})(\text{Lbpy}_2)(\text{NO})]\text{NO}_3$ (Figura 11) – em que $\text{qn} = 8$ -hidroxiquinolina, $\text{Lbpy}_1 = 4,4'$ -dicarboxil-2,2'-bipyridina e $\text{Lbpy}_2 = 4,4'$ -dimetoxicarbonil-2,2'-bipyridina. Os complexos interagem com a ASH e exibem constantes de associação (K_a) na ordem de 10^6 e 10^4 , respectivamente, demonstrando como os grupos substituintes do ligante 2,2'-bipyridina influenciam expressivamente os modos de interação com a proteína. Um resultado interessante é que, a partir dos estudos via supressão de fluorescência, concluiu-se que há a interação entre a ASH e apenas uma molécula dos complexos $[\text{RuCl}(\text{qn})(\text{Lbpy}_1)(\text{NO})]\text{Cl}$ e $[\text{RuCl}(\text{qn})(\text{Lbpy}_2)(\text{NO})]\text{NO}_3$, enquanto por meio dos estudos via MALDI-TOF-MS, constatou-se que há interação entre a ASH e quatro moléculas do complexo $[\text{RuCl}(\text{qn})(\text{Lbpy}_1)(\text{NO})]\text{Cl}$ e cinco moléculas do complexo $[\text{RuCl}(\text{qn})(\text{Lbpy}_2)(\text{NO})]\text{NO}_3$.

Figura 11 – Estrutura química dos complexos $[\text{RuCl}(\text{qn})(\text{Lbpy}_1)(\text{NO})]\text{Cl}$ (a) e $[\text{RuCl}(\text{qn})(\text{Lbpy}_2)(\text{NO})]\text{NO}_3$ (b).



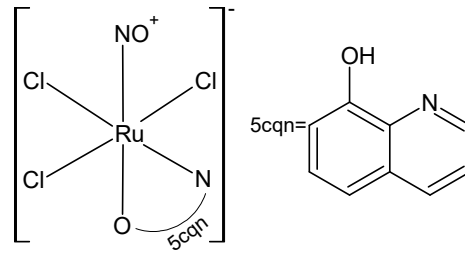
Fonte: SONG *et al.*, 2021.

da SILVA e colaboradores (2018), estudaram a interação entre a ASH e dois clusters de rutênio, do tipo $[\text{Ru}_3(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-OOCCH}_3)_6(\text{NO})(\text{L})_2]\text{PF}_6$ (Figura 4) – em que $\text{L}_1 = 4\text{-acetylpiridina}$ e $\text{L}_2 = 4\text{-terc-butilpiridina}$. Os clusters de rutênio interagem com a ASH via um mecanismo estático e apresentam K_a na ordem de 10^3 . Os clusters interagem com a ASH via interações hidrofóbicas, devido à influência dos co-ligantes.

SILVA e colaboradores (2018), analisaram a interação entre a ASH e dois complexos fosfínicos de rutênio, do tipo $[\text{RuCl}(\text{dppb})(4,4'\text{-Mebipy})(\text{L})](\text{PF}_6)_2$ (Figura 5) – em que $\text{dppb} = 1,4\text{-bis}(\text{difenilfosfina})\text{butano}$; $4,4'\text{-Mebipy} = 4,4\text{-dimetil-2,2'-bipiridina}$; $\text{L}_1 = \text{NO}^+$ e $\text{L}_2 = \text{NO}_2^-$. Os complexos interagem com a ASH via um mecanismo estático e exibem K_a na ordem de 10^6 , sendo o valor de K_a para o nitrosilo complexo maior, se comparado aquele para o nitro complexo – $9,37 \times 10^6$ e $2,23 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ a 310 K, respectivamente. O nitrosilo complexo interage com a ASH via ligações de hidrogênio, enquanto o nitro complexo interage via interações hidrofóbicas.

XIE e colaboradores (2021) avaliaram a interação entre a ASH e um complexo de rutênio doador de NO, do tipo $[(\text{CH}_3)_4\text{N}][\text{RuCl}_3(5\text{cqn})(\text{NO})]$ ($\text{Ru}^{\text{II}}\text{-NO}^+$) (Figura 12) – em que $5\text{cqn} = 5\text{-cloro-8-quinolina}$. O complexo interage com a ASH via um mecanismo dinâmico e apresenta K_a na ordem de 10^4 . Uma observação importante é que, a partir dos estudos via supressão de fluorescência, concluiu-se que há a interação entre a ASH e apenas uma molécula do complexo $\text{Ru}^{\text{II}}\text{-NO}^+$, enquanto por meio da obtenção de aductos cristalinos, constatou-se que há a interação entre a ASH e duas moléculas do complexo.

Figura 12 – Estrutura química do íon complexo $[\text{RuCl}_3(5\text{cqn})(\text{NO})]^-$.



Fonte: Adaptado de XIE *et al.*, 2021.

Os estudos sobre as interações entre a ASH e complexos de rutênio doadores de NO, com diferentes estruturas químicas, é bastante rico e extremamente diversificado. Assim, fazem-se necessários outros estudos e discussões sobre os modos de interação entre a ASH e outros complexos de rutênio doadores de NO.

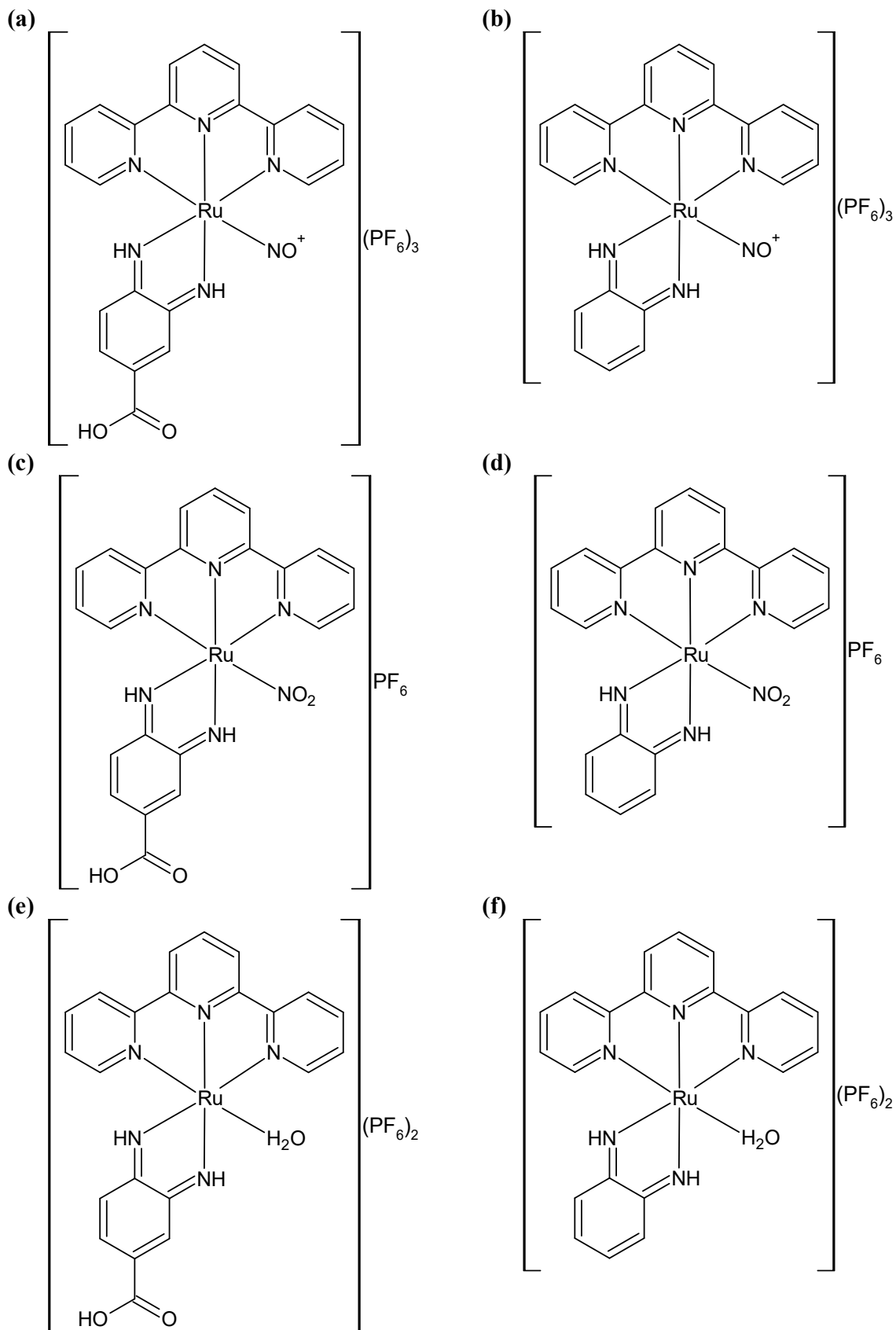
2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo as avaliações espectroscópicas na região do infravermelho (IV), do ultravioleta e visível (UV/Visível) e de supressão de fluorescência intrínseca e síncrona sobre as interações entre a albumina sérica humana (ASH) e os complexos terpiridina de rutênio(II) doadores de óxido nítrico (NO), sendo os nitrosilos complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, e os nitro complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ – em que tpy = 2,2':6',2''-terpiridina; bdq = ácido 3,4-diaminobenzóico; e bd = *o*-fenilenodiamina. Além disso, o presente trabalho tem como objetivo, também, as avaliações das interações entre a ASH e os possíveis produtos da liberação do NO, sendo estes os aqua complexos terpiridina de rutênio(II) do tipo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$.

Os complexos $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ são complexos inéditos.

As estruturas químicas dos complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ são apresentadas na Figura 13.

Figura 13 – Estruturas químicas dos complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ **(a)**, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ **(b)**, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ **(c)**, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ **(d)**, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ **(e)** e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ **(f)**.



3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes

A Tabela 1 apresenta todos os reagentes utilizados ao longo deste trabalho, com indicação da fração mássica percentual e procedência.

Tabela 1 – Reagentes utilizados durante a síntese e caracterização dos complexos e estudos posteriores, com indicação da fração mássica percentual e procedência.

Reagentes	Fração Mássica Percentual (%)	Procedência
Acetonitrila	99,9	Tedia
Ácido clorídrico	37	Synth
Ácido 3,4-diaminobenzóico	97	Aldrich Chemicals
Ácido hexafluorofosfórico	98	Aldrich Chemicals
Ácido trifluoracético	99	Merck
Albumina sérica 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
Dihidrogenofosfato de sódio	99,5	Merck
Etanol	95	Qhemis
Éter etílico	99	Tedia
<i>o</i> -fenilenodiamina	98	Aldrich Chemicals
Hexafluorofosfato de amônio	95	Aldrich Chemicals
Hidróxido de sódio	97	Synth
Monohidrogenofosfato de sódio	99,5	Merck
Metanol	99,5	Merck
Nitrito de sódio	99	Merck
1-Octanol	99,5	LS Chemicals
2,2':6',2''-terpiridina	98	Aldrich Chemicals
Trietilamina	85	Synth

Fonte: Autora.

3.2. Parte Experimental

3.2.1. Síntese dos Complexos Terpiridina de Rutênio(II)

3.2.1.1. Síntese do Complexo [RuCl₃(tpy)]

O complexo [RuCl₃(tpy)] foi sintetizado conforme descrito por SULLIVAN e colaboradores (1980).

Em um balão de 50 mL foram adicionados 0,3244 g de cloreto de rutênio (RuCl₃.nH₂O) (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 ($t \cong 65$ °C) durante 3 h. Após esse tempo, a fim de promover-se a precipitação do sólido, a solução permaneceu 1 h em temperatura ambiente (≈ 30 °C). O precipitado marrom obtido foi filtrado e seco à vácuo.

[RuCl₃(tpy)]: M = 440,7 g mol⁻¹. **Rendimento:** 0,4216 g (61,22%).

3.2.1.2. Síntese do Complexo [RuCl(bdq)(tpy)]PF₆

O complexo [RuCl(bdq)(tpy)]PF₆ foi sintetizado conforme descrito por de LIMA e colaboradores (2006).

Em um balão de 50 mL foi adicionada uma mistura de 40 mL de etanol e água (75% de etanol e 25% de água). Em seguida, foram adicionados 0,1783 g do complexo precursor [RuCl₃(tpy)] (0,40 mmol) e 0,1 mL de trietilamina (Et₃N) (0,72 mmol). A solução foi mantida sob agitação durante 30 min., para a redução do íon metálico, de Ru^{III} para Ru^{II}. O processo de redução do íon metálico foi acompanhado pela mudança de coloração da solução, de marrom para roxa. 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). A solução foi mantida sob refluxo ($t \cong 80$ °C) durante 4 h. Após esse tempo, foi adicionado 1 g de hexafluorofosfato de amônio (NH₄PF₆), para o fornecimento do contra-íon. Posteriormente, a solução permaneceu 24 h sob refrigeração ($t \approx 5$ °C). O volume da solução foi reduzido via rotaevaporação, a fim de facilitar-se o processo de precipitação. O precipitado roxo-avermelhado obtido foi lavado com 10 mL de éter etílico, filtrado e seco à vácuo.

[RuCl(bdq)(tpy)]PF₆: M = 664,9 g mol⁻¹. **Rendimento:** 0,0754 g (28,03%).

3.2.1.3. Síntese do Complexo [Ru(H₂O)(tpy)(bdq)](PF₆)₂

Em um balão de 50 mL foi adicionada uma mistura de 40 mL de etanol e água (75% de etanol e 25% de água). Em seguida, foram adicionados 0,1787 g do complexo precursor [RuCl₃(tpy)] (0,40 mmol) e 0,1 mL de trietilamina (Et₃N) (0,72 mmol). A solução foi mantida sob agitação durante 30 min., para a redução do íon metálico, de Ru^{III} para Ru^{II}. O processo de redução do íon metálico foi acompanhado pela mudança de coloração da solução, de marrom para roxa. Posterior à redução do íon metálico, foram adicionados 0,0173 g do ligante ácido 3,4-diaminobenzóico (bdq) (0,11 mmol). A solução foi mantida sob refluxo ($t \cong 80$ °C) durante 4 h. Após esse tempo, foi adicionado 1 g de hexafluorofosfato de amônio (NH₄PF₆), para o fornecimento do contra-íon. Posteriormente, a solução permaneceu 24 h sob refrigeração ($t \approx 5$ °C). O volume da solução foi reduzido via rotaevaporação, a fim de facilitar-se o processo de precipitação. O precipitado roxo-avermelhado obtido foi lavado com 10 mL de éter etílico, filtrado e seco à vácuo.

[Ru(H₂O)(tpy)(bdq)](PF₆)₂: M = 792,4 g mol⁻¹. Rendimento: 0,0983 g (30,60%).

Condutividade molar (Λ_m): 273,60 S cm² mol⁻¹ (ACN). Solubilidade: 181,01 µg mL⁻¹ (H₂O).

Log P: -1,35.

3.2.1.4. Síntese do Complexo [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆

Em um balão de 50 mL foram adicionados 30 mL de água. Em seguida, foram adicionados 0,0385 g do complexo [RuCl(bdq)(tpy)]PF₆ (0,058 mmol) e 0,0186 g de nitrito de sódio (NaNO₂) (0,27 mmol). Observou-se a mudança de coloração da solução, de roxa para vermelha. A solução foi mantida sob aquecimento ($t \cong 85$ °C) durante 2 h. Após esse tempo, foi adicionado 1 g de hexafluorofosfato de amônio (NH₄PF₆), para o fornecimento do contra-íon. Observou-se a formação de um precipitado vermelho. Posteriormente, a solução permaneceu 48 h sob refrigeração ($t \approx 5$ °C). O precipitado vermelho obtido foi filtrado e seco à vácuo.

[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆: M = 675,4 g mol⁻¹. Rendimento: 0,0210 g (53,70%).

Λ_m : 167,30 S cm² mol⁻¹ (ACN). Solubilidade: 408,05 µg mL⁻¹ (H₂O). Log P: -1,47.

3.2.1.5. Síntese do Complexo [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃

O complexo [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃ foi sintetizado conforme descrito por de LIMA e colaboradores (2006).

Em um balão de 50 mL foram adicionados 30 mL de água. Em seguida, foram adicionados 0,0388 g do complexo [RuCl(bdq)(tpy)]PF₆ (0,058 mmol) e 0,0183 g de nitrito de sódio (NaNO₂) (0,27 mmol). Observou-se a mudança de coloração da solução, de roxa para vermelha. A solução foi mantida sob aquecimento ($t \cong 85$ °C) durante 2 h. Após esse tempo, foi adicionado 1 mL de ácido hexafluorofosfórico (HPF₆), para o fornecimento do contra-íon e acidificação da solução. Observou-se a formação de um precipitado marrom. Posteriormente, a solução permaneceu 48 h sob refrigeração ($t \approx 5$ °C). O precipitado marrom obtido foi filtrado e seco à vácuo.

[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃: M = 949,4 g mol⁻¹. Rendimento: 0,0271 g (48,92%).

Λ_m : 133,20 S cm² mol⁻¹ (ACN); 350,00 S cm² mol⁻¹ (H₂O) (BESSAS *et al.*, 2021).

Solubilidade: 718,02 μg mL⁻¹ (H₂O) e Log P: -1,70 (MARQUELE-OLIVEIRA *et al.*, 2010).

3.2.1.6. Síntese do Complexo [RuCl(tpy)(bd)](PF₆)₂

Os procedimentos experimentais realizados foram semelhantes aqueles descritos na sessão 3.2.1.2, alterando-se apenas o ligante utilizado. Para a síntese do complexo [RuCl(bd)(tpy)]PF₆ foram utilizados 0,1783 g do complexo precursor [RuCl₃(tpy)] (0,40 mmol) e 0,0432 g do ligante *o*-fenilenodiamina (bd) (0,40 mmol).

[RuCl(bd)(tpy)]PF₆: M = 620,9 g mol⁻¹. Rendimento: 0,2016 g (80,25%).

3.2.1.7. Síntese do Complexo [Ru(H₂O)(tpy)(bd)](PF₆)₂

Os procedimentos experimentais realizados foram semelhantes aqueles descritos na sessão 3.2.1.3, alterando-se apenas o ligante utilizado. Para a síntese do complexo [Ru(H₂O)(tpy)(bd)](PF₆)₂ foram utilizados 0,0894 g do complexo precursor [RuCl₃(tpy)] (0,20 mmol) e 0,0217 g do ligante *o*-fenilenodiamina (bd) (0,20 mmol).

[Ru(H₂O)(tpy)(bd)](PF₆)₂: M = 748,4 g mol⁻¹. Rendimento: 0,0767 g (50,52%).

Λ_m : 201,40 S cm² mol⁻¹ (ACN). Solubilidade: 171,97 μg mL⁻¹ (H₂O). Log P: 0,17.

3.2.1.8. Síntese do Complexo [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆

Os procedimentos experimentais realizados foram semelhantes aqueles descritos na sessão 3.2.1.4, alterando-se apenas o complexo precursor utilizado. Para a síntese do complexo [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ foram utilizados 0,1284 g do complexo [RuCl(bd)(tpy)]PF₆ (0,21 mmol) e 0,0720 g de nitrito de sódio (NaNO₂) (1,04 mmol).

[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆: M = 631,4 g mol⁻¹. Rendimento: 0,0739 g (56,60%).

Λ_m: 130,80 S cm² mol⁻¹ (ACN). Solubilidade: 179,30 μg mL⁻¹ (H₂O). Log P: -0,29.

3.2.1.9. Síntese do Complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃

Os procedimentos experimentais realizados foram semelhantes aqueles descritos na sessão 3.2.1.5, alterando-se apenas o complexo precursor utilizado. Para a síntese do complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃ foram utilizados 0,0826 g do complexo [RuCl(bd)(tpy)]PF₆ (0,13 mmol) e 0,0444 g de nitrito de sódio (NaNO₂) (0,64 mmol).

[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃: M = 905,4 g mol⁻¹. Rendimento: 0,0640 g (53,14%).

Λ_m: 508,20 S cm² mol⁻¹ (ACN); 570,00 S cm² mol⁻¹ (H₂O) (BESSAS *et al.*, 2021).

Solubilidade: 398,73 μg mL⁻¹ (H₂O). Log P: -0,11.

3.2.2. Caracterização Físico-Química dos Complexos Terpiridina de Rutênio(II)

3.2.2.1. Análise Elementar

Os resultados de análise elementar para os complexos foram obtidos utilizando-se um analisador da marca PerkinElmer®, de modelo Series II 2400. O equipamento utilizado está lotado no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química (LAMIQ), da UFU.

3.2.2.2. Espectrometria de Massas – Ionização/Dessorção à Laser Assistida por Matriz (MALDI)

Os espectros de massas foram obtidos utilizando-se a técnica de ionização/dessorção a laser assistida por matriz (da sigla em inglês, MALDI), com analisador por tempo de voo (da sigla em inglês, TOF), em um equipamento Autoflex III MALDI-TOF-MS da marca Bruker®, modificado com Nd:YAG Laser (330-360, 495-540, 808, 990-1080 nm) e equipado com uma

fonte de íons de imagem de desorção a laser de feixe inteligente. As medidas foram realizadas no modo positivo. O equipamento utilizado está lotado no Laboratório Institucional de Pesquisa (LIPq), do Centro de Laboratórios Multiusuários (CELAM), e ao o Laboratório Multiusuários de Proteômica (LMProt), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da UFMG.

As matrizes utilizadas foram soluções de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (ALF) ($C_{10}H_7NO_3$) e ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) ($C_7H_6O_4$) a 1 mg mL^{-1} , em acetonitrila (ACN) a 0,1% de ácido trifluoracético (TFA).

Para as análises, foram preparadas soluções dos complexos a 2 mg mL^{-1} , em ACN. Posteriormente, foram preparadas misturas das soluções de matriz e dos complexos, com proporção de 1:1. Finalmente, em placas de aço inoxidável, foram adicionados $0,7 \text{ }\mu\text{L}$ das misturas e as amostras foram submetidas à análise.

3.2.2.3. 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 $5 \text{ }\mu\text{m}$. O equipamento utilizado está lotado na Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

A fase móvel utilizada foi uma mistura de uma solução tampão fosfato a 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) ($\text{pH} = 7,40$) e de metanol (MeOH). A eluição da fase móvel foi isocrática e o fluxo foi de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$.

Para a preparação da solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a 0,1% de TFA ($\text{pH} = 7,40$), foram pesados $0,6076 \text{ g}$ de dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) e $0,8580 \text{ g}$ de monohidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4); foram adicionados, ainda, $0,5 \text{ mL}$ de TFA. Em seguida, os sólidos foram dissolvidos em água ultrapura, totalizando 500 mL de solução. Foram adicionadas algumas gotas de uma solução de NaOH 1 mol L^{-1} para o ajuste do pH da solução, para $7,40$. Para as análises, foram preparadas soluções dos complexos a 1 mmol L^{-1} , em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a 0,1% de TFA. Foram injetados volumes de $20 \text{ }\mu\text{L}$ das soluções dos complexos.

3.2.2.4. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros vibracionais na região do IV em estado sólido foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Perkin Elmer®, de modelo FT-IR Frontier Single Range. O equipamento utilizado está lotado no Grupo de Materiais Inorgânicos do Triângulo (GMIT), do Laboratório de Fotoquímica e Ciência de Materiais (LAFOT-CM), do Instituto de Química (IQ), da UFU.

Os espectros em solução foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo FTIR Cary 630. O equipamento utilizado está lotado na Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

As amostras foram analisadas em estado sólido e em solução, utilizando-se um acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante, sendo submetidas à varredura espectrofotométrica de 4000 à 220 cm^{-1} . Para as análises em solução, O PBS foi considerado na linha de base (branco).

3.2.2.5. Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível (UV/Visível)

Os espectros de absorção na região do UV/Visível foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo UV-Vis.-NIR Cary Series. O equipamento utilizado está lotado na Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

As amostras foram submetidas à varredura espectrofotométrica de 800 à 200 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico.

3.2.2.6. Análises Condutimétricas

Os resultados de condutividade molar para os complexos foram obtidos utilizando-se um condutivímetro da marca Tecnopon®, de modelo mCA-150, equipado com uma cela de platina, de constante igual a 1.

Para as análises, foram preparadas soluções dos complexos a 0,1 mmol L^{-1} , em acetoneitrila (ACN).

3.2.2.7. Determinação da Solubilidade

Os espectros de absorção na região do UV/Visível, que auxiliaram na determinação da solubilidade dos complexos, foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo UV-Vis.-NIR Cary Series. O equipamento utilizado está lotado na Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

Para as análises, inicialmente, em um tubo cônico de 15 mL foram adicionados 5 mL de água. Em seguida, foram adicionados, aproximadamente, 2 mg do complexo. A solução foi mantida sob agitação em um banho ultrassônico durante 15 min. Após esse tempo, a solução foi submetida à centrifugação (3000 rpm) durante 15 min. Observou-se a separação das fases, em consequência da decantação da fração do complexo a qual não se dissolveu.

Posteriormente, em uma cubeta de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico, foram adicionados 3 mL de água. Foi adicionada uma alíquota de 200 µL do sobrenadante anteriormente obtido. A amostra foi submetida à varredura espectrofotométrica de 800 à 200 nm.

Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (≈ 30 °C), em triplicata.

3.2.2.8. Determinação do Coeficiente de Partição (log P)

Os espectros de absorção na região do UV/Visível, que auxiliaram na determinação do coeficiente de partição (log P) dos complexos, foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo UV-Vis.-NIR Cary Series. O equipamento utilizado está lotado na Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

Para a determinação do log P, foi utilizado o Método Shake-Flask. Para as análises, inicialmente, em um tubo cônico de 15 mL foram adicionados 6,5 mL de água e 6,5 mL de 1-octanol. Em seguida, foram adicionados 1,43 mg* do complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$. A solução foi mantida sob agitação em um misturador de rolos (50 rpm) durante 24 h, protegida da luz. Após esse tempo, a solução foi mantida em repouso durante 1 h. Observou-se a separação das fases aquosa e orgânica.

Posteriormente, em uma cubeta de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico, foram adicionados 2,5 mL de água. Foi adicionada uma alíquota de 500 µL da fase aquosa. A amostra foi submetida à varredura espectrofotométrica de 800 à 200 nm.

Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente ($\approx 30\text{ }^\circ\text{C}$).

*Para os complexos $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ lê-se 1,01; 0,99; 1,15; e 1,06 mg, respectivamente.

3.2.3. Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II)

3.2.3.1. Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) via Espectroscopia na Região do UV/Visível

Os espectros de absorção na região do UV/Visível foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo UV-Vis.-NIR Cary Series. O equipamento utilizado está lotado na Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

Para a avaliação das interações entre a ASH e os complexos via espectroscopia na região do UV/Visível, em uma cubeta de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico, foram adicionados 3 mL de uma solução estoque de ASH a $1,0\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão fosfato salino (PBS). Foi adicionada uma alíquota de 3 μL de uma solução estoque de complexo a 1 mmol L^{-1} , em PBS, obtendo-se uma solução de concentração $1,0\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de complexo. A solução foi mantida sob incubação e protegida da luz.

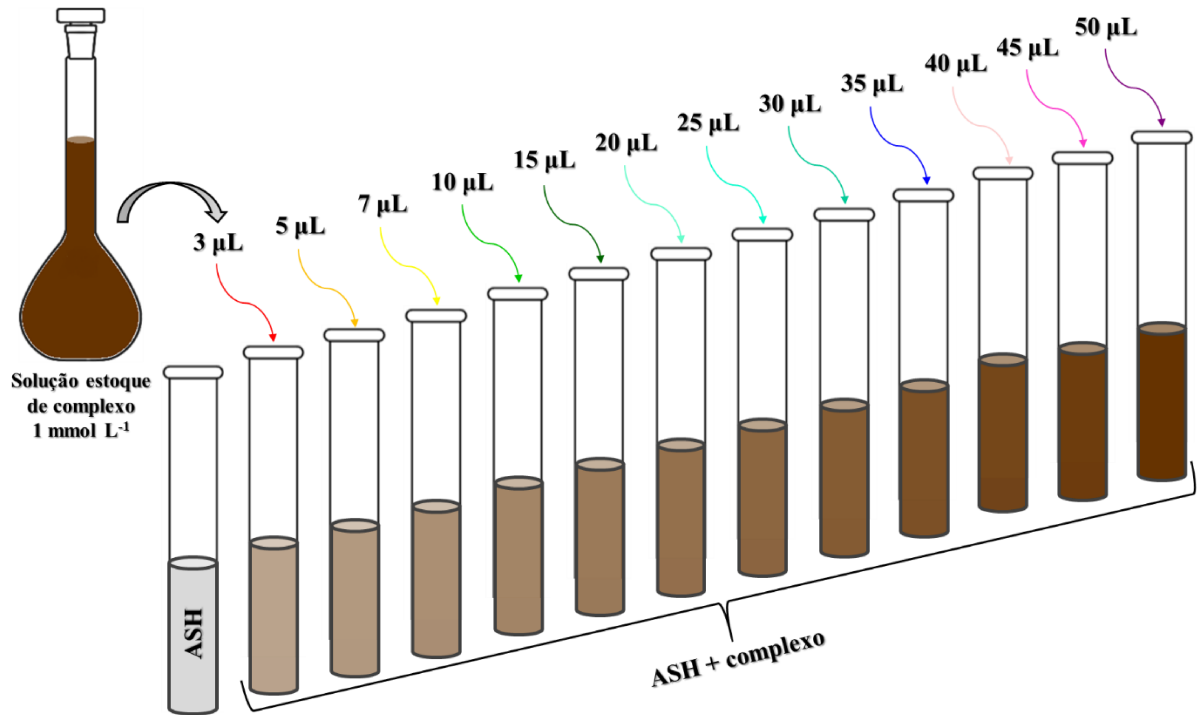
A amostra foi submetida à varredura espectrofotométrica de 800 à 200 nm.

Foram preparadas outras soluções individuais, com alíquotas de 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 μL da solução de complexo a 1 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. A representação ilustrativa dos procedimentos experimentais realizados para a preparação das soluções é apresentada na Figura 14.

Posteriormente, as soluções foram mantidas sob agitação em uma incubadora (100 rpm), protegidas da luz durante 24 h. Após esse tempo, as amostras foram submetidas, novamente, à varredura espectrofotométrica de 800 à 200 nm.

Os experimentos foram realizados à temperatura controlada, de 298, 303 e 308 K, em duplicata.

Figura 14 – Representação ilustrativa para dos procedimentos experimentais realizados para a preparação das soluções para a avaliação das interações entre a ASH e os complexos.



Fonte: Autora.

3.2.3.2. Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) via Espectroscopia na Região do IV

Os espectros vibracionais na região do IV foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo FTIR Cary 630. O equipamento utilizado está lotado na Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

Para a avaliação das interações entre a ASH e os complexos via IV, inicialmente, em um eppendorf de 2 mL foram adicionados 25 µL de uma solução estoque de ASH a 1,0 mmol L⁻¹, em tampão fosfato salino (PBS). Em seguida, foram adicionados 225 µL de PBS, obtendo-se uma solução de concentração 0,1 mmol L⁻¹ de ASH.

Posteriormente, em outro eppendorf de 2 mL foram adicionados 25 µL de uma solução estoque de ASH a 1,0 mmol L⁻¹, em tampão fosfato salino (PBS). Em seguida, foram adicionados 25 µL de uma solução estoque de complexo a 1,0 mmol L⁻¹ e 200 µL de PBS, obtendo-se uma solução de concentração 0,1 mmol L⁻¹ de ASH e de complexo.

As amostras foram analisadas em estado líquido, com o auxílio de um acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante, sendo submetidas à varredura espectrofotométrica de 2000 à 1200 cm^{-1} . O PBS foi considerado na linha de base (branco).

3.2.3.3. Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) 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 está lotado na Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

Para a avaliação das interações entre a ASH e os complexos via espectroscopia de fluorescência, foram utilizadas as mesmas amostras, preparadas conforme descrito na sessão 3.2.3.1.

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 à 500 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico.

Posteriormente, as soluções foram mantidas sob agitação em uma incubadora (100 rpm) durante 24 h, protegidas da luz. Após esse tempo, 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 à 500 nm.

Os experimentos foram realizados à temperatura controlada, de 298, 303 e 308 K, em duplicata.

3.2.3.4. Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) via Espectroscopia de Fluorescência Resolvida no Tempo

Os espectros de fluorescência resolvida no tempo foram obtidos utilizando-se um laser de titânio-safira Tsunami 3950 Spectra Physics® e laser pulsado Millennia X Spectra Physics®. Para a análise dos dados obtidos foi utilizado o software Edinburgh Instruments®. O equipamento utilizado está lotado no Departamento de Física, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), da USP.

Para a avaliação das interações entre a ASH e os complexos via espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo, em 3 tubos de ensaio foram adicionados 3 mL de uma solução

estoque de ASH a $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão fosfato salino (PBS). Em dois, dos três tubos de ensaio foram adicionadas alíquotas de 20 e 50 μL de uma solução estoque de complexo a 1 mmol L^{-1} , em PBS, obtendo-se soluções de concentrações 6,6 e 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de complexo, respectivamente. As soluções foram mantidas sob incubação, protegidas da luz durante 24 h. Após esse tempo, as amostras foram submetidas à análise, sendo o comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) de 280 nm e o comprimento de onda de emissão (λ_{em}) analisado de 335 nm.

Os experimentos foram realizados à temperatura controlada, de 298 e 308 K.

Os tempos de vida médios de fluorescência (τ) foram obtidos utilizando-se a Equação 1.

$$\tau = A_1\tau_1 + A_2\tau_2 + A_3\tau_3 \quad (1)$$

em que τ é o tempo de vida de fluorescência e A é a amplitude.

A qualidade dos ajustes foi avaliada a partir do valor reduzido do qui-quadrado (χ^2), que é em torno de 1, ou um pouco maior, para um ajuste de alta qualidade.

3.2.3.5. Avaliação Cinética das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) via Espectroscopia de Fluorescência

Os resultados de cinética foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo Cary Eclipse. O equipamento utilizado está lotado na Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

Para a avaliação da cinética de interação entre a ASH e os complexos via espectroscopia de fluorescência, em 3 cubetas de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico, foram adicionados 3 mL de uma solução estoque de ASH $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS. Em duas, das três cubetas, foram adicionadas alíquotas de 20 e 50 μL de uma solução estoque de complexo 1 mmol L^{-1} em PBS, obtendo-se soluções de concentração 6,6 e 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de complexo, respectivamente. As soluções foram mantidas sob incubação, protegidas da luz durante 12 h.

As amostras foram submetidas à análise, sendo o comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) de 280 nm (janelas de excitação e emissão de 5 e 20 nm, respectivamente) e o comprimento de onda de emissão (λ_{em}) analisado de 335 nm.

3.2.3.6. Determinação da Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET) entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II)

As taxas de FRET foram obtidas conforme descrito por (LAKOWICZ, 2006).

A eficiência do processo de transferência de energia por ressonância de Förster, E , é dependente da distância entre o doador – neste caso, os resíduos de tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) da ASH – e o receptor – neste caso, os complexos. O valor de E foi obtido utilizando-se a Equação 2,

$$E = 1 - \left(\frac{F}{F_0} \right) = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_0^6} \quad (2)$$

Em que F e F_0 são as intensidades de fluorescência do doador em presença e em ausência do receptor, respectivamente; R_0 , denominado raio de Förster, é a distância crítica entre o doador e o receptor em que a eficiência do processo é de 50%; e r_0 é a distância centro a centro entre o doador e o receptor. O valor de R_0^6 foi obtido utilizando-se a Equação 3,

$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{-5} K^2 N^4 \phi J \quad (3)$$

em que K é o fator de orientação espacial que descreve a geometria dos dipolos doadores e receptores; N é o índice de refração médio; ϕ é o rendimento quântico de fluorescência do doador em ausência do receptor; e J é o grau de sobreposição espectral entre espectro de emissão do doador e o espectro de absorção do receptor. O valor de J foi obtido utilizando-se o *software* *ae Fluortools*, e a Equação 4,

$$J = \int (\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda \quad (4)$$

em que F é a intensidade de fluorescência do doador em λ ; ε é o coeficiente de absorvidade molar do receptor em λ .

Os espectros de emissão de fluorescência da ASH e de absorção dos complexos foram sobrepostos, com o intuito de avaliar o grau de sobreposição (integral) entre os espectros (J) em questão e, posteriormente, calcular-se a eficiência do processo de transferência de energia por ressonância de Förster (E).

3.2.3.7. Avaliação dos Sítios de Interação entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) via Espectroscopia de Fluorescência Síncrona ($\Delta\lambda = 15 \text{ nm}/\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$)

Os espectros de fluorescência síncrona foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo Cary Eclipse. O equipamento utilizado está lotado na Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

Para a avaliação dos sítios de interações entre a ASH e os complexos via espectroscopia de fluorescência, foram utilizadas as mesmas amostras, preparadas conforme descrito na sessão 3.2.3.1.

As amostras foram excitadas utilizando-se $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}/\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$, e submetidas à varredura espectrofotométrica de 200 à 600 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico.

Posteriormente, as soluções foram mantidas sob agitação em uma incubadora (100 rpm) durante 24 h, protegidas da luz. Após esse tempo, as amostras foram excitadas em 280 nm (janelas de excitação e emissão de 5 e 20 nm, respectivamente), utilizando-se fluorescência síncrona ($\Delta\lambda = 15 \text{ nm}/\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$), e submetidas à varredura espectrofotométrica de 200 à 600 nm.

Os experimentos foram realizados à temperatura controlada, de 298, 303 e 308 K, em duplicata.

3.2.3.8. Avaliação das Interações entre a ASH e os Aqua Complexos Terpiridina de Rutênio(II) via Eletroquímica – Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)

Os voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos utilizando-se um potenciostato da marca Autolab®, de modelo μ Autolab tipo III. Para a análise dos dados obtidos foi utilizado o *software* NOVA®, versão 2.1.4. O equipamento utilizado está lotado na Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU. Para correção da linha de base dos voltamogramas, a opção *moving average* foi selecionada.

Para a avaliação das interações entre a ASH e os complexos via voltametria de pulso diferencial, uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos, com capacidade para

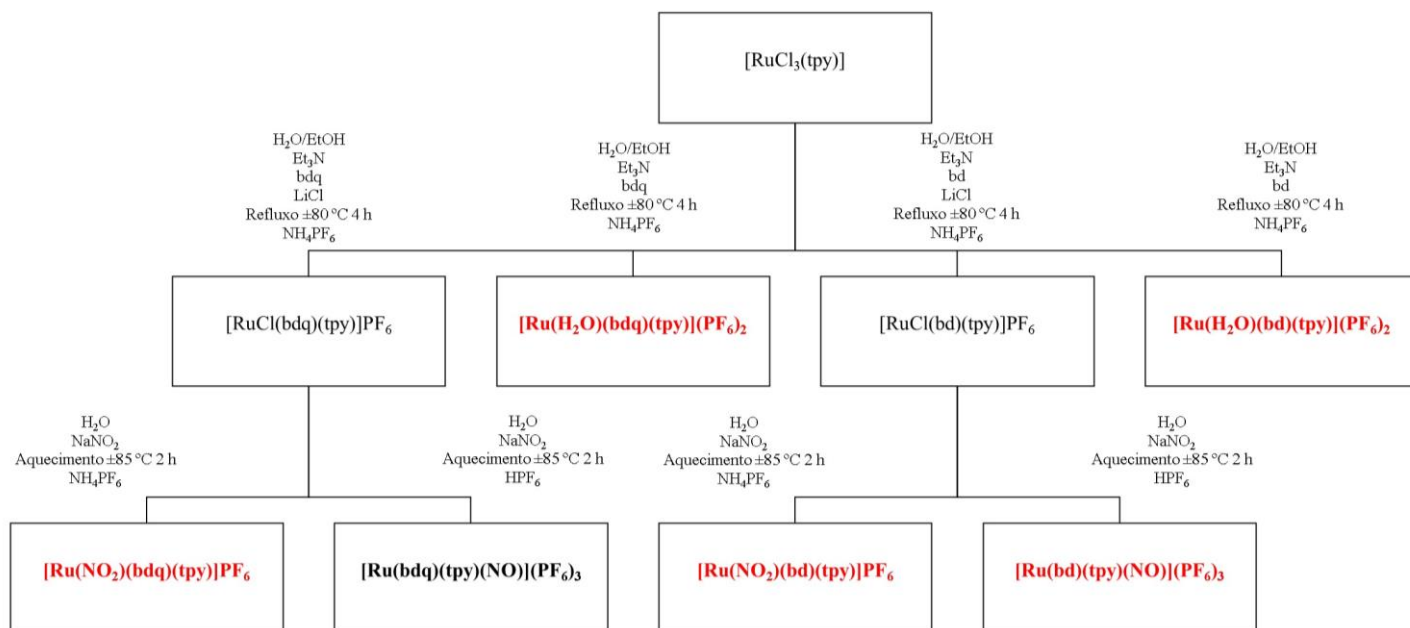
10 mL, foi utilizada. Foram empregados um fio de platina com 0,5 mm de diâmetro em espiral, como eletrodo auxiliar, um eletrodo de Ag/AgCl_{sat}, imerso em uma solução saturada de cloreto de potássio (KCl), como eletrodo de referência, e um eletrodo de carbono vítreo, como eletrodo de trabalho, o qual foi polido antes e após as análises.

Inicialmente, na célula eletroquímica, foram adicionados 500 µL de uma solução estoque de complexo a 1,0 mmol L⁻¹, em tampão fosfato salino (PBS). Em seguida, foram adicionados 5 mL de PBS, obtendo-se uma solução de concentração 0,1 mmol L⁻¹ de complexo. A amostra foi submetida a varredura, de 0,0 a 1,0 V, com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Posteriormente, na mesma célula eletroquímica, foram adicionadas 5 alíquotas de uma solução estoque de ASH a 1 mmol L⁻¹. Após cada adição a amostra foi submetida a varredura, de 0,0 a 1,0 V, com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

4. RESULTADOS

A rota sintética para os complexos terpiridina de rutênio(II) é apresentada na Figura 15.

Figura 15 – Rota sintética para os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$.



Fonte: Autora.

Os complexos destacados em vermelho são complexos inéditos.

Os aqua complexos, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, foram obtidos à partir da adição dos ligantes ácido 3,4-diaminobenzoico (bdq) e *o*-fenilenodiamina (bd), respectivamente, ao complexo precursor $[\text{RuCl}_3(\text{tpy})]$, conforme a rota de síntese descrita para os cloreto complexos, $[\text{RuCl}(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, porém na ausência de cloreto de lítio (LiCl). Os nitro complexos, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, foram obtidos à partir da adição de nitrito de sódio (NaNO_2) aos cloreto complexos, $[\text{RuCl}(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{RuCl}(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, respectivamente. Os nitrosilos complexos, $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, foram obtidos a partir da adição de ácido hexafluorofosfórico (HPF_6) aos nitro complexos, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, respectivamente, garantindo, além do fornecimento do contra-íon, a acidificação da solução e, conseqüentemente, a conversão do ligante nitro (NO_2^-) a nitrosil (NO^+) (de LIMA *et al.*, 2006).

Após a síntese dos complexos, com a finalidade de avaliar suas estruturas e propriedades físico-químicas, inicialmente, foram realizadas análises elementares e via espectrometria de massas (EM), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia na região do infravermelho (IV) e espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV/Visível).

Posteriormente, foram realizadas análises para a determinação da condutividade, da solubilidade e do coeficiente de partição ($\log P$) dos complexos.

4.1. Caracterização Físico-Química dos Complexos Terpiridina de Rutênio(II)

4.1.1. Análise Elementar

Com o intuito de corroborar com a elucidação das estruturas químicas e, ainda, verificar-se a pureza dos complexos inéditos $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, utilizou-se a técnica de análise elementar.

Os resultados teóricos e experimentais obtidos para os complexos $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Porcentagens teóricas e experimentais de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtidas para os complexos terpiridina de rutênio(II).

Complexo	Fórmula Molecular / Massa Molar	Elemento	Valores	Valores	Diferença (%)
			Teóricos (%)	Experimentais (%)	
[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	RuC ₂₁ H ₁₇ N ₅ NOP ₃ F ₁₈ ·	C	23,50	25,54	2,04
	1,9 NaNO ₂ ·2 H ₂ O	H	1,96	1,98	0,02
	M = 1072,50 g mol ⁻¹	N	9,14	10,97	1,83
[Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆	RuC ₂₂ H ₁₇ N ₅ O ₂ NO ₂ PF ₆ ·	C	36,17	36,94	0,77
	0,9 NaCl·0,1H ₂ O	H	2,36	2,36	0,00
	M = 729,85 g mol ⁻¹	N	11,51	10,74	0,77
[Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆	RuC ₂₁ H ₁₇ N ₅ NO ₂ PF ₆ ·	C	38,24	38,09	0,15
	0,4 NaNO ₂	H	2,58	2,34	0,24
	M = 659,00 g mol ⁻¹	N	13,60	13,26	0,34
[Ru(H ₂ O)(bdq)(tpy)](PF ₆) ₂	RuC ₂₂ H ₁₇ N ₅ O ₂ H ₂ OP ₂ F ₁₂	C	33,32	33,84	0,52
	M = 792,40 g mol ⁻¹	H	2,40	2,83	0,43
		N	8,83	9,59	0,76
[Ru(H ₂ O)(bd)(tpy)](PF ₆) ₂	RuC ₂₁ H ₁₇ N ₅ H ₂ OP ₂ F ₁₂ ·	C	37,92	37,94	0,02
	C ₆ H ₆ N ₂	H	2,93	2,95	0,02
	M = 854,40 g mol ⁻¹	N	11,47	10,25	1,22

Fonte: Autora.

Os valores experimentais de %C, %H e %N obtidos demonstram que as estruturas químicas obtidas para os complexos [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆, [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆, [Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ e [Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂ fazem jus àquelas propostas.

4.1.2. Espectrometria de Massas – Ionização/Dessorção à Laser Assistida por Matriz (MALDI)

A técnica de espectrometria de massas (EM) é utilizada para caracterizar-se e elucidar-se as estruturas químicas de diversas moléculas, como compostos de coordenação. As análises via técnica de espectrometria de massas fornecem informações de extrema relevância, como a relação massa/carga dos fragmentos gerados e, além disso, os espectros de massas obtidos

apresentam a distribuição isotópica característica do íon metálico presente na estrutura analisada (HENDERSON & MCINDOE, 2005).

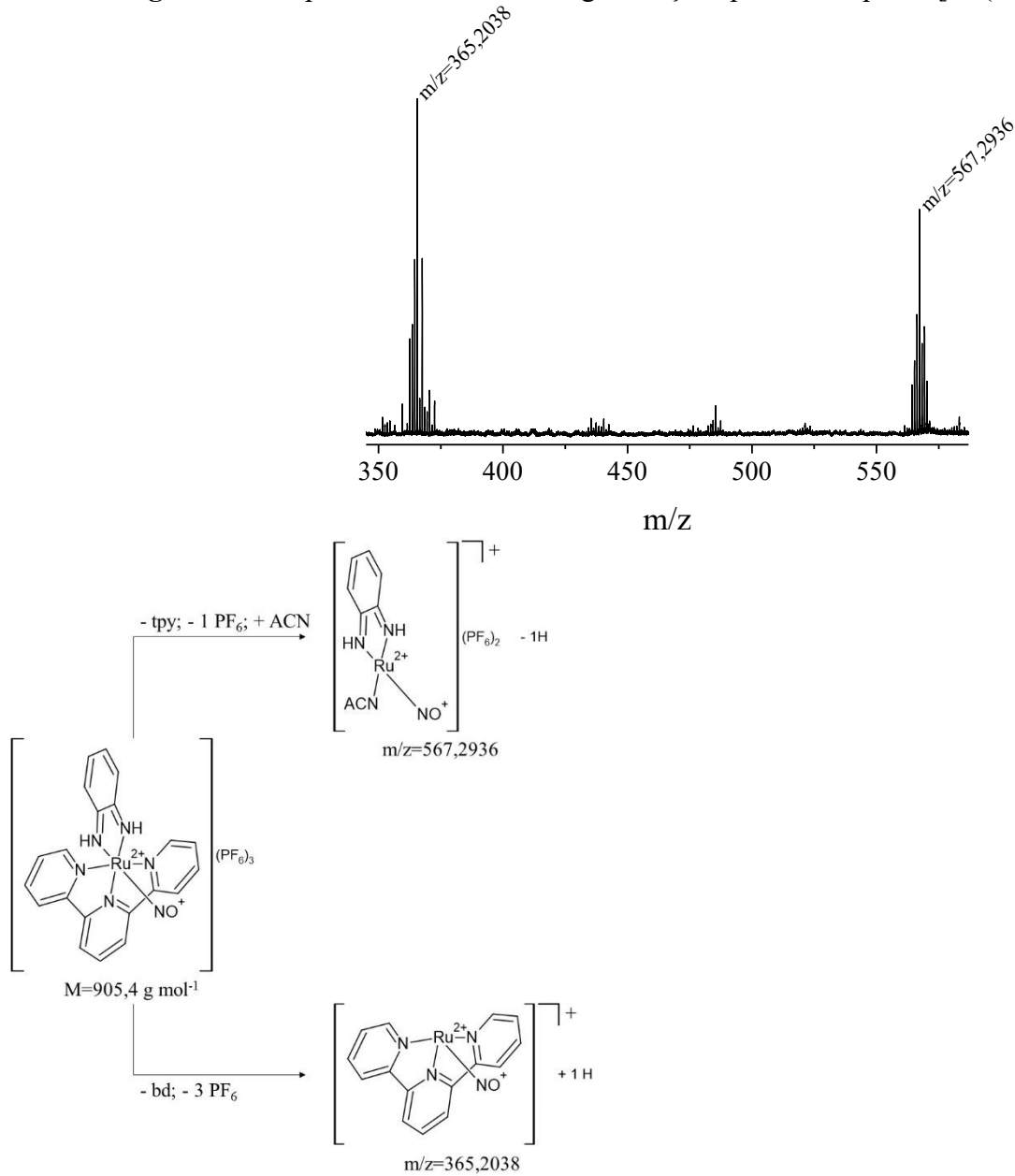
Assim, com o objetivo de corroborar com a caracterização e elucidação das estruturas químicas dos complexos inéditos $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ utilizou-se a técnica de espectrometria de massas com o método MALDI-TOF. A caracterização do complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ via espectrometria de massas com o método de ionização por electrospray (ESI) foi anteriormente descrita por de OLIVEIRA e colaboradores (2009), a qual auxiliará na elucidação dos resultados obtidos para os demais complexos utilizados no presente trabalho.

Para as análises, foram utilizadas duas matrizes diferentes, sendo o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (ALF) ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_3$) e o ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$). Contudo, para as análises utilizando-se diferentes tipos de matrizes, não foi possível observar o pico do íon molecular para os complexos. Para o nitrosilo complexo, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, os resultados obtidos utilizando-se a matriz de DHB foram melhores avaliados, enquanto para os nitro complexos, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, os resultados obtidos utilizando-se a matriz de ALF foram melhores.

Os resultados obtidos exibem a distribuição isotópica do rutênio (^{104}Ru , 18,7%; ^{102}Ru , 31,6%; ^{101}Ru , 17,0%; ^{100}Ru , 12,6%; ^{99}Ru , 12,7%; ^{98}Ru , 1,88% e ^{96}Ru , 5,52%) como sendo +1, indicando que os fragmentos observados são íons de carga 1+.

O espectro de massas obtido e as fragmentações propostas para o nitrosilo complexo, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, são apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Espectros de massas e fragmentações para o complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$.

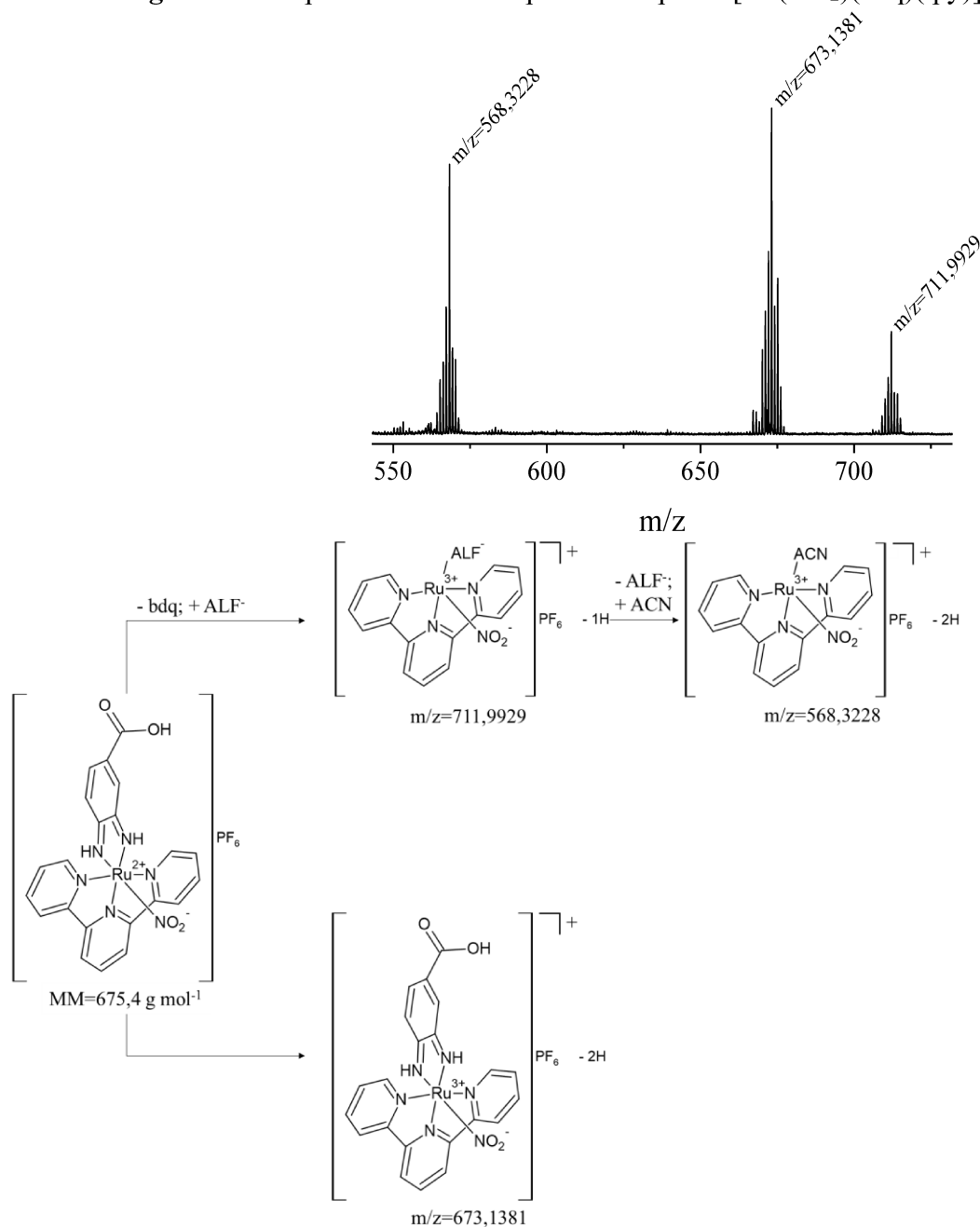


Fonte: Autora.

O espectro de massas obtido para o complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (Figura 16) utilizando-se a matriz de DHB, apresentou fragmentos em $m/z = 567,2936$ e $365,2038$. As estruturas químicas para os fragmentos observados para o complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ são descritas baseando-se nas atribuições para o complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ de OLIVEIRA e colaboradores (2009). O primeiro fragmento, em $m/z = 567,2936$, é atribuído à perda do ligante tpy e de um contra-íon, PF_6^- , e, ainda, pela entrada do solvente coordenante, neste caso, acetonitrila (ACN). O último fragmento, em $m/z = 365,2038$, é caracterizado pela perda do ligante bd e de três contra-íons, PF_6^- .

Os espectros de massas obtidos e as fragmentações propostas para os nitro complexos, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, são apresentados nas Figuras 17 e 18.

Figura 17 – Espectros de massas para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$.

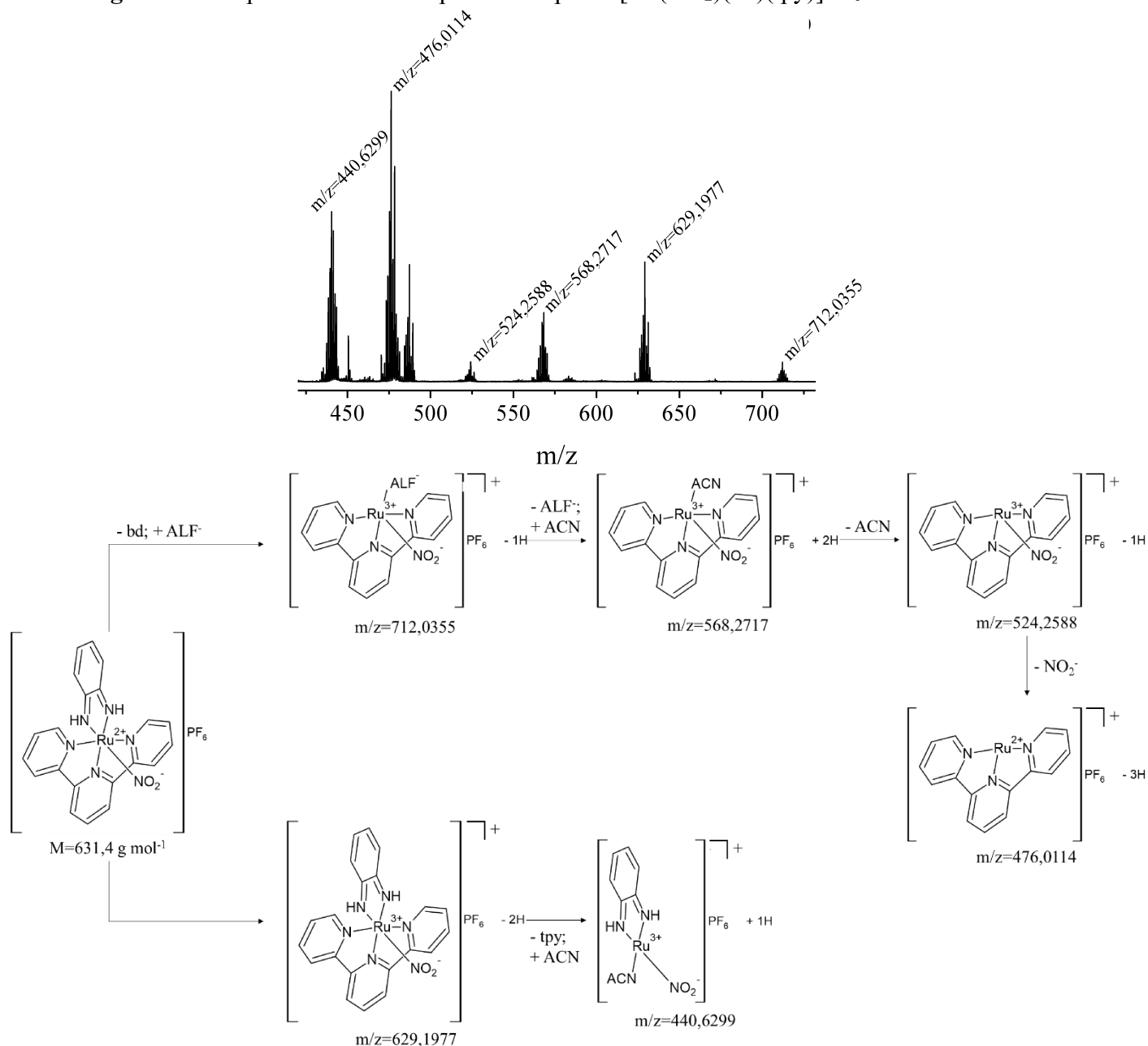


Fonte: Autora.

Para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (Figura 17), o espectro de massas obtido utilizando-se a matriz de ALF, apresentou fragmentos em $m/z = 711,9929$; $673,1381$ e $568,3228$. O fragmento em $m/z = 711,9929$ é atribuído à oxidação do centro metálico, de Ru^{II} para Ru^{III}, à perda do ligante bdq e de um átomo de hidrogênio e, ainda, à entrada da matriz,

neste caso, ALF ($C_{10}H_7NO_3$), em sua forma desprotonada. O fragmento em $m/z = 673,1381$ é caracterizado pela oxidação do centro metálico e pela perda de dois átomos de hidrogênio. O último fragmento, em $m/z = 568,3228$, é descrito pela oxidação do centro metálico, pela perda do ligante bd e, além disso, pela entrada do solvente coordenante, ACN, e dois átomos de hidrogênio.

Figura 18 – Espectros de massas para o complexo $[Ru(NO_2)(bd)(tpy)]PF_6$.



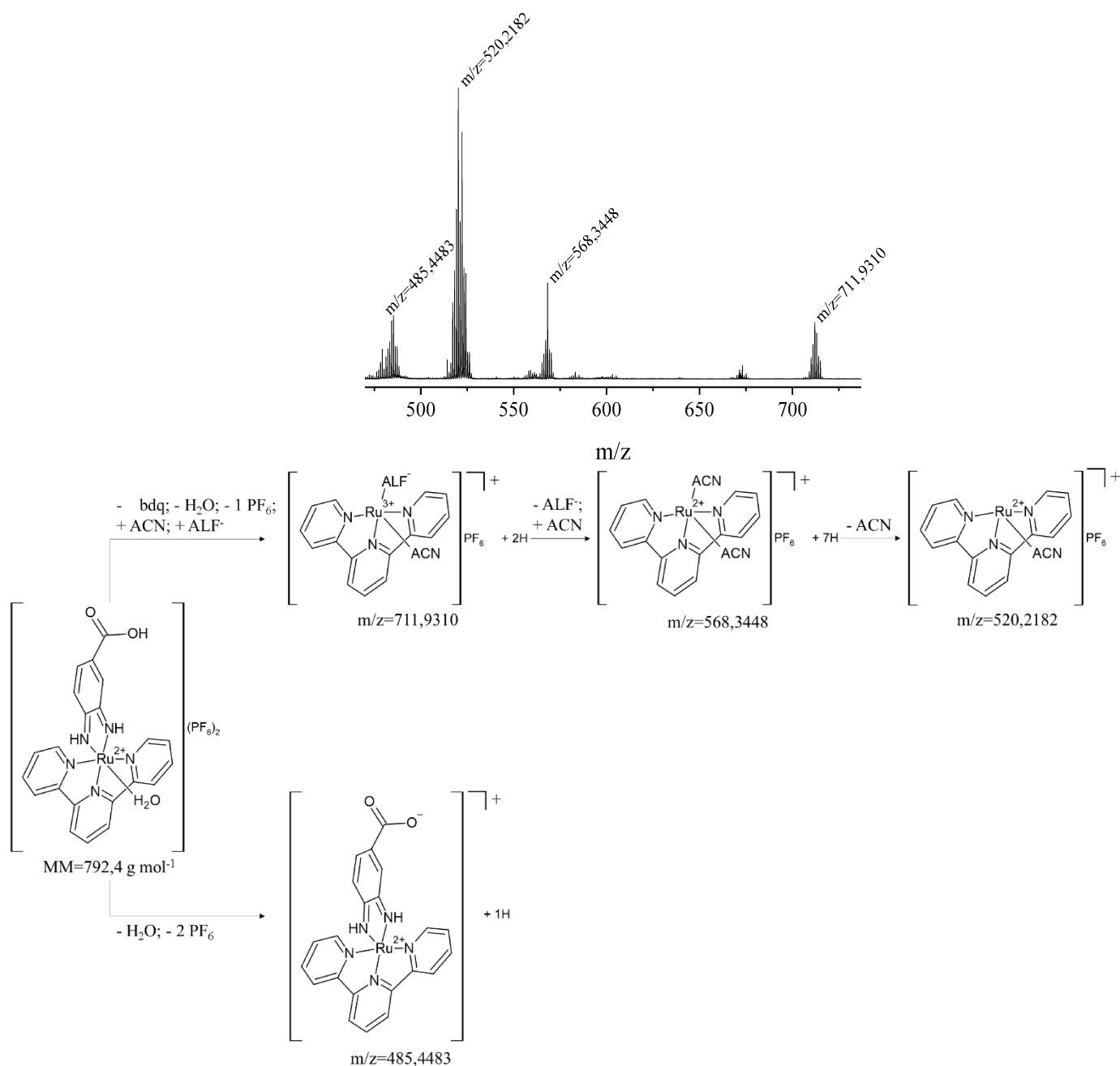
Fonte: Autora.

O espectro de massas obtido para o complexo $[Ru(NO_2)(bd)(tpy)]PF_6$ (Figura 18), utilizando-se a matriz de ALF, apresentou fragmentos em $m/z = 712,0355$; $629,1977$; $568,2717$;

524,2588; 476,0114; e 440,6299. O fragmento em $m/z = 712,0355$ é atribuído à oxidação do centro metálico, de Ru^{II} para Ru^{III} , à perda do ligante bd e de um átomo de hidrogênio e, ainda, à entrada da matriz, neste caso, ALF ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_3$), em sua forma desprotonada. O fragmento em $m/z = 629,1977$ é caracterizado pela oxidação do centro metálico e pela perda de dois átomos de hidrogênio. O fragmento em $m/z = 568,2717$ é descrito pela oxidação do centro metálico, pela perda do ligante bd e, além disso, pela entrada do solvente coordenante, ACN. O fragmento em $m/z = 524,288$ é atribuído à oxidação do centro metálico e à perda do ligante bd e de um átomo de hidrogênio. O fragmento em $m/z = 476,0114$ é caracterizado pela perda os ligantes bd e NO_2^- e de três átomos de hidrogênio. O último fragmento, em $m/z = 440,6299$, é descrito pela oxidação do centro metálico, pela perda do ligante tpy e, também, pela entrada do solvente coordenante, ACN, e um átomo de hidrogênio.

Os espectros de massas obtidos para os aqua complexos, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, são apresentados nas Figuras 19 e 20.

Figura 19 – Espectros de massas para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$.

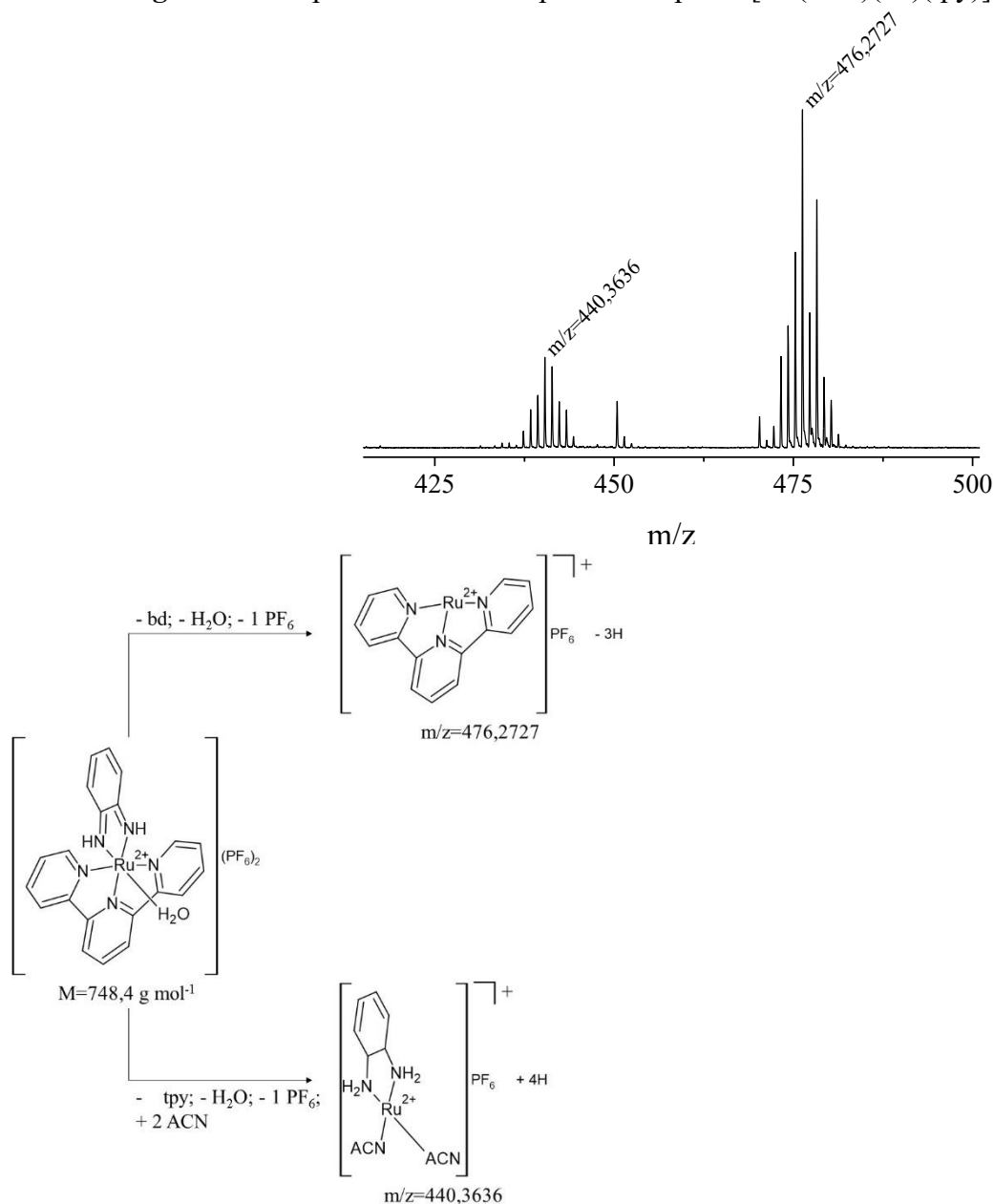


Fonte: Autora.

Para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (Figura 19), o espectro de massas obtido utilizando-se a matriz de ALF, apresentou fragmentos em $m/z = 711,9310$; $568,3448$ e $485,4483$. O fragmento em $m/z = 711,9310$ é atribuído à oxidação do centro metálico, de Ru^{II} para Ru^{III} , à perda dos ligantes bdq e H_2O , de um contra-íon, PF_6^- e, ainda, à entrada da matriz, neste caso, ALF ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_3$), em sua forma desprotonada, do solvente coordenante, ACN, e dois átomos de hidrogênio. O fragmento em $m/z = 568,3448$ é caracterizado pela perda dos ligantes bdq e H_2O , de um contra-íon, PF_6^- e, além disso, à entrada de duas moléculas do

solvente coordenante, ACN e sete átomos de hidrogênio. O fragmento em $m/z = 520,2182$ é caracterizado pela perda dos ligantes bdq e H_2O , de um contra-íon, PF_6^- e, além disso, à entrada de uma molécula do solvente coordenante, ACN. O último fragmento, em $m/z = 485,4483$, é descrito pela redução do grupo carboxila do ligante bdq, pela perda do ligante H_2O e de dois contra-íons, PF_6^- , e, ainda, pela entrada de um átomo de hidrogênio.

Figura 20 – Espectros de massas para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$.

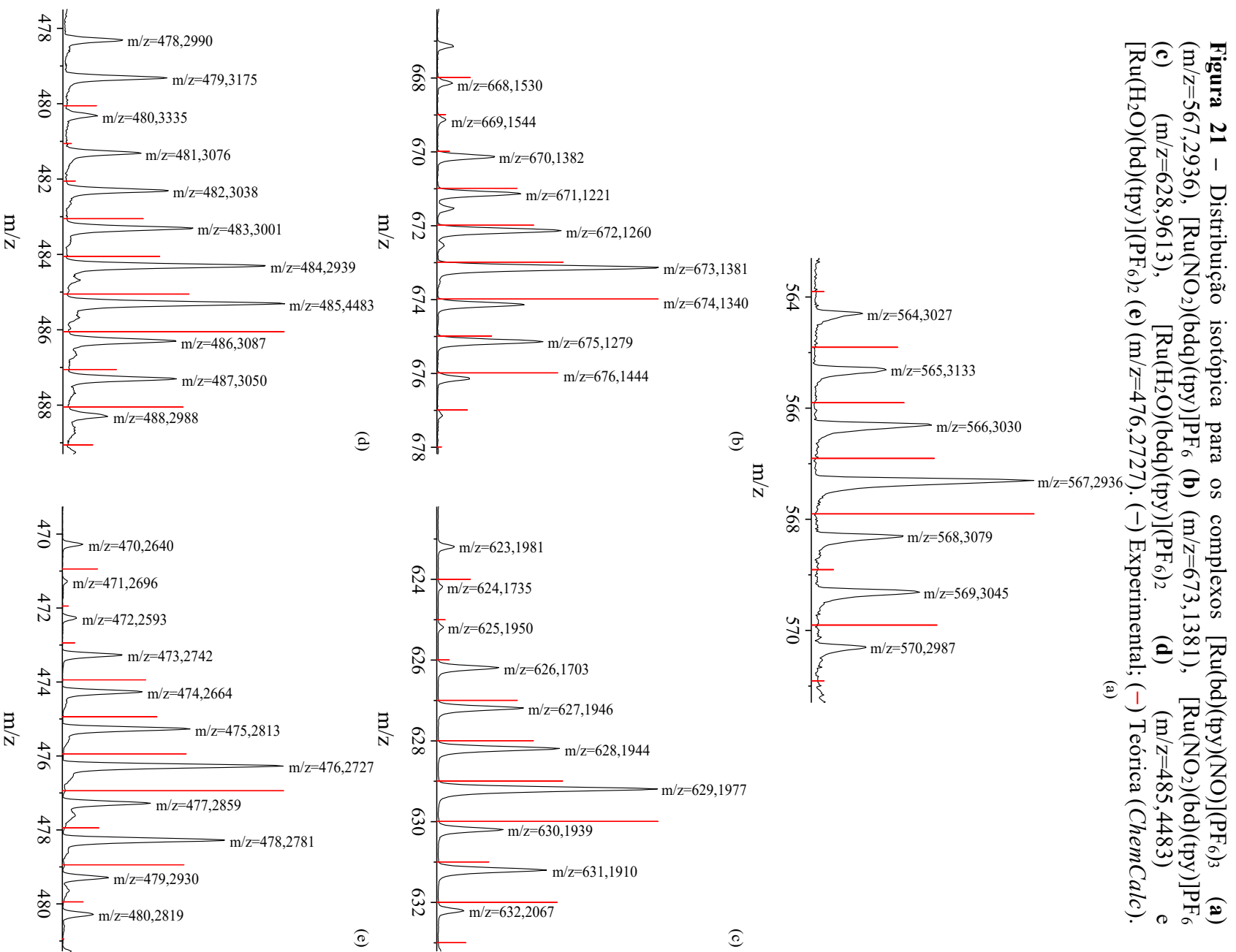


Fonte: Autora.

O espectro de massas obtido para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (Figura 20), utilizando-se a matriz de ALF, apresentou fragmentos em $m/z = 476,2727$ e $440,3636$. O

fragmento em $m/z = 476,2727$ é atribuído à perda dos ligantes bd e H_2O , de um contra-íon, PF_6^- e, ainda de três átomos de hidrogênio. O último fragmento, em $m/z = 440,3636$ é caracterizado pela oxidação do ligante bd, pela perda dos ligantes tpy e H_2O e de um contra-íon, PF_6^- e, ainda, pela entrada de duas moléculas do solvente coordenante, ACN, e quatro átomos de hidrogênio.

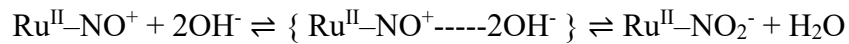
As distribuições isotópicas para o nitrosilo complexo, $[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF_6)_3$, para os nitro complexos, $[Ru(NO_2)(bdq)(tpy)]PF_6$ e $[Ru(NO_2)(bd)(tpy)]PF_6$, e para os aqua complexos, $[Ru(H_2O)(bdq)(tpy)](PF_6)_2$ e $[Ru(H_2O)(bd)(tpy)](PF_6)_2$, são apresentados na Figura 21. Os resultados experimentais e teóricos (*ChemCalc: A building block for tomorrow's chemical infrastructure*, 2013) obtidos exibem valores de m/z próximos, com intensidades relativas semelhantes, corroborando, assim, com os fragmentos propostos para os complexos.



4.1.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

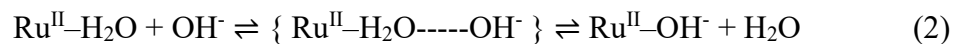
Complexos nitrosilos de rutênio(II) que apresentam co-ligantes polipiridínicos em sua esfera de coordenação, podem exibir tanto a forma com o ligante nitrosil, $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}^+$, quanto a forma com o ligante nitro, $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}_2^-$, a depender do pH do meio. Em $\text{pH} < 7,0$ a forma com o ligante nitrosil, $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}^+$, é a mais estável, enquanto em $\text{pH} > 7,0$ a forma com o ligante nitro, $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}_2^-$, é a mais estável (SAUAIA & da SILVA, 2003; de SANTANA *et al.*, 2017). A conversão do ligante NO^+ a NO_2^- em complexos de rutênio(II) é representada no Esquema 1.

Esquema 1 – Representação simplificada da conversão do ligante nitrosil (NO^+) a nitro (NO_2^-) em complexos de rutênio(II).



Semelhante aos complexos nitrosilos de rutênio(II) que apresentam diferentes estruturas a depender do pH do meio, aqua complexos terpiridina de rutênio(II) também podem exibir diferentes formas, sendo estas tanto a forma com o ligante água, $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{H}_2\text{O}$, quanto a forma com o ligante hidróxido, $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{OH}^-$ (TAKEUCHI, *et al.*, 1984; MIJATOVIĆ, *et al.*, 2013; HUANG, *et al.*, 2015; CHRZANOWSKA *et al.*, 2017). A conversão do ligante H_2O a OH^- em complexos de rutênio(II) é representada no Esquema 2.

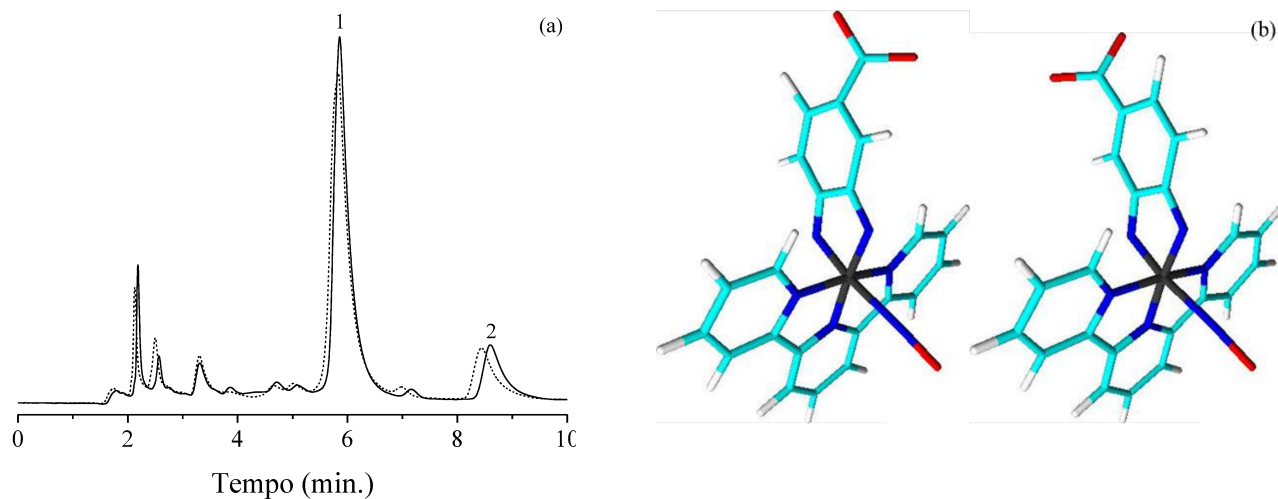
Esquema 2 – Representação simplificada da conversão do ligante água (H_2O) a hidróxido (OH^-) em complexos de rutênio(II).



Considerando-se que as interações entre a albumina sérica humana (ASH) e os complexos serão avaliadas em condições fisiológicas ($\text{pH} = 7,40$), com o propósito de analisar-se a estabilidade das formas $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}^+$ dos complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}_2^-$ dos complexos $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, (da SILVA, *et al.*, 2018) e $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{H}_2\text{O}$ dos complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, utilizou-se a técnica de CLAE.

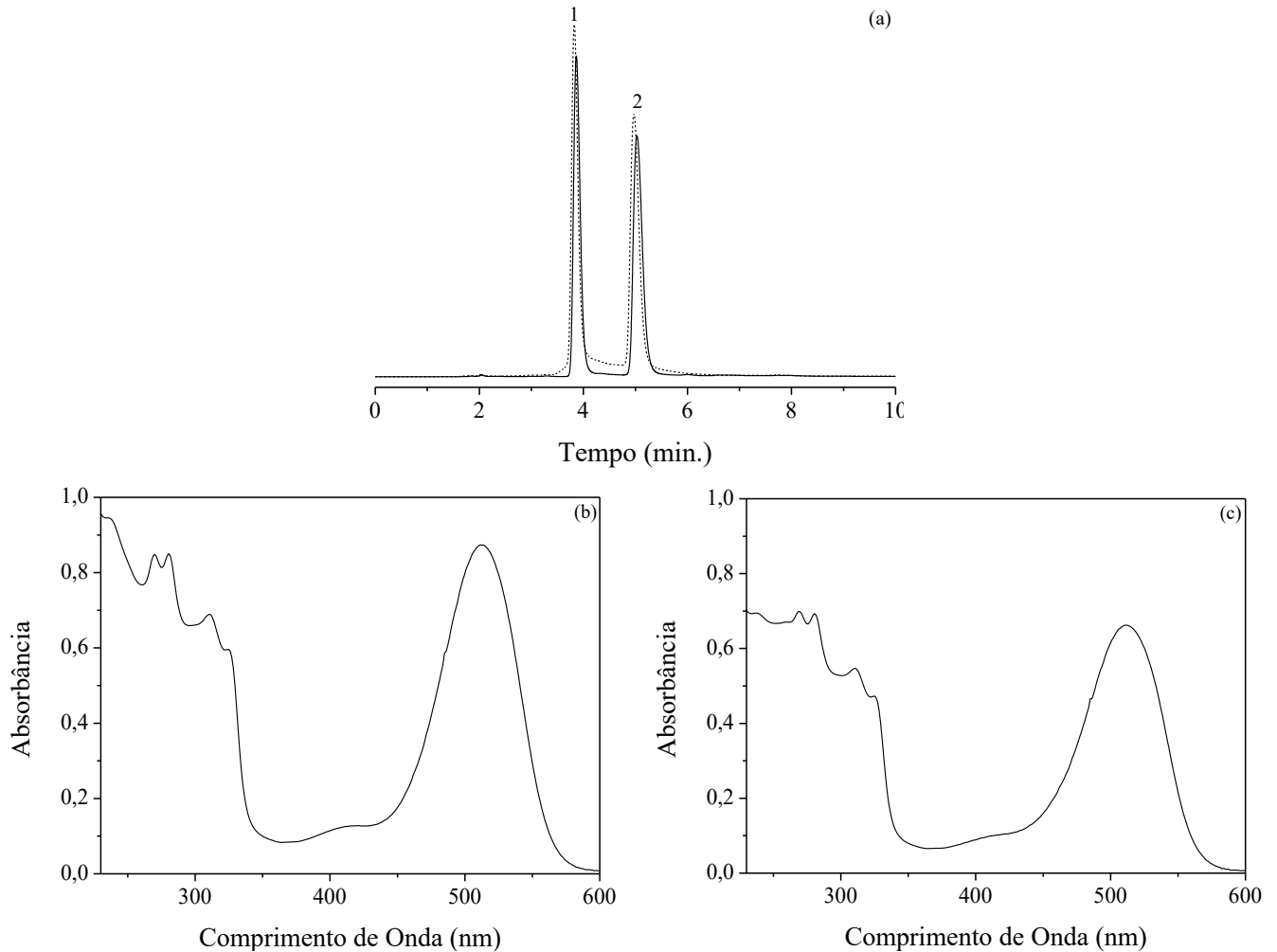
Os cromatogramas obtidos para os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (BESSAS *et al.*, 2021) e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ são apresentados nas Figuras 22 e 23, respectivamente.

Figura 22 – Cromatogramas para o complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (a). Composição da fase móvel: Tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a $0,1\%$ de TFA:MeOH (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (—) e 2 h (---). $t = 37 \text{ }^\circ\text{C}$. Estruturas químicas dos isômeros de posição do complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (b).



Fonte: BESSAS *et al.*, 2021 (a). Autora (b).

Figura 23 – Cromatogramas para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (a). Composição da fase móvel: Tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a $0,1\%$ de TFA:MeOH (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (–) e 2 h (---). $t = 37 \text{ }^\circ\text{C}$. Espectros de absorção na região do UV/Visível. para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ referente aos picos 1 (b) e 2 (c).



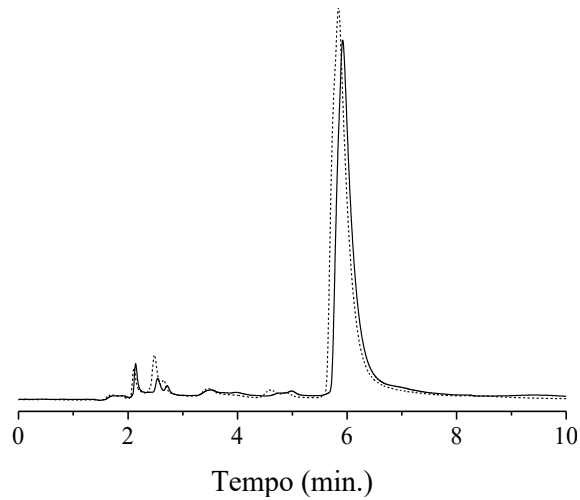
Fonte: Autora.

Os cromatogramas obtidos para os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (Figura 22 (a)) e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (Figura 23) exibem dois picos com tempos de retenção de $t_{r1} = 5,87$ (pico 1) e $t_{r2} = 8,59$ min. (pico 2), para $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, e $t_{r1} = 3,87$ (pico 1) e $t_{r2} = 5,03$ min. (pico 2), para $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$. Conforme descrito por OLIVEIRA e colaboradores (2009), o cromatograma de separação para o complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ apresenta dois picos. Os autores concluíram, através da técnica de RMN, que os picos 1 e 2 fazem referência a dois isômeros de posição do complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (Figura 22 (b)), observados devido à duas diferentes conformações espaciais do complexo, a depender da posição do grupo carboxila ($-\text{COOH}$) do ligante bdq. Então, infere-se que o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, assim como o complexo

[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, exibe dois isômeros de posição. Os espectros de absorção na região do UV/Visível obtidos das frações referentes aos picos 1 e 2 (Figura 23 (b) e (c)) apresentam perfis espectrais semelhantes, sustentando a afirmação de que os picos 1 e 2 fazem referência aos isômeros de posição do complexo [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆.

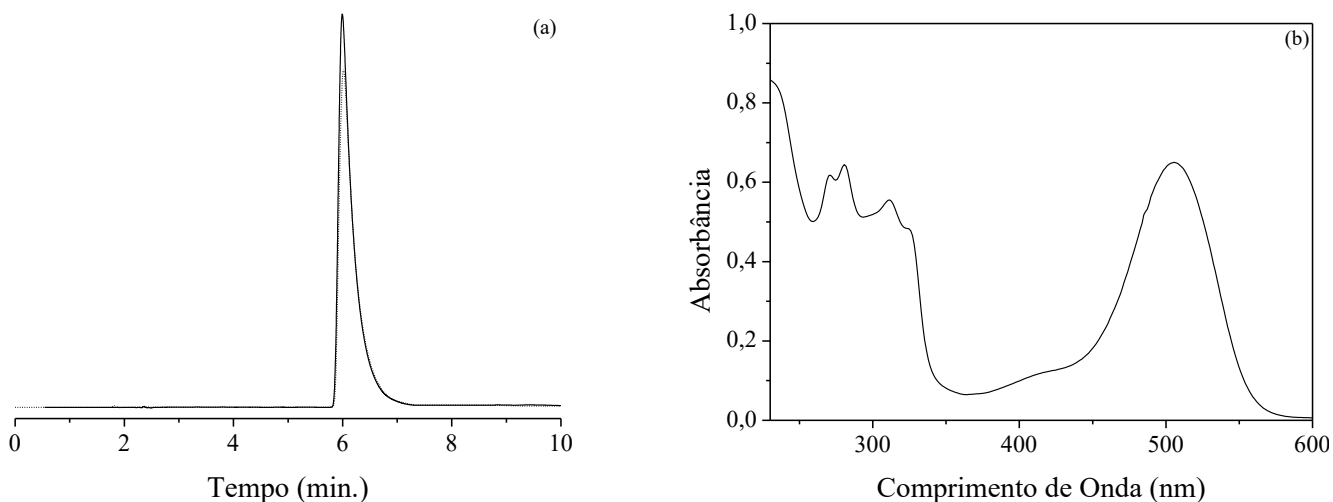
Os cromatogramas obtidos para os complexos [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃ (BESSAS *et al.*, 2021) e [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ são apresentados nas Figuras 24 e 25, respectivamente.

Figura 24 – Cromatogramas para o complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃. Composição da fase móvel: Tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ a 0,1% de TFA:MeOH (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (—) e 2 h (---). t = 37 °C.



Fonte: BESSAS *et al.*, 2021.

Figura 25 – Cromatogramas para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (a). Composição da fase móvel: Tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a $0,1\%$ de TFA:MeOH (75:25 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (–) e 2 h (---). $t = 37 \text{ }^\circ\text{C}$. Espectro de absorção na região do UV/Visível. para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ referente ao pico em $t_r = 5,99 \text{ min.}$ (b).



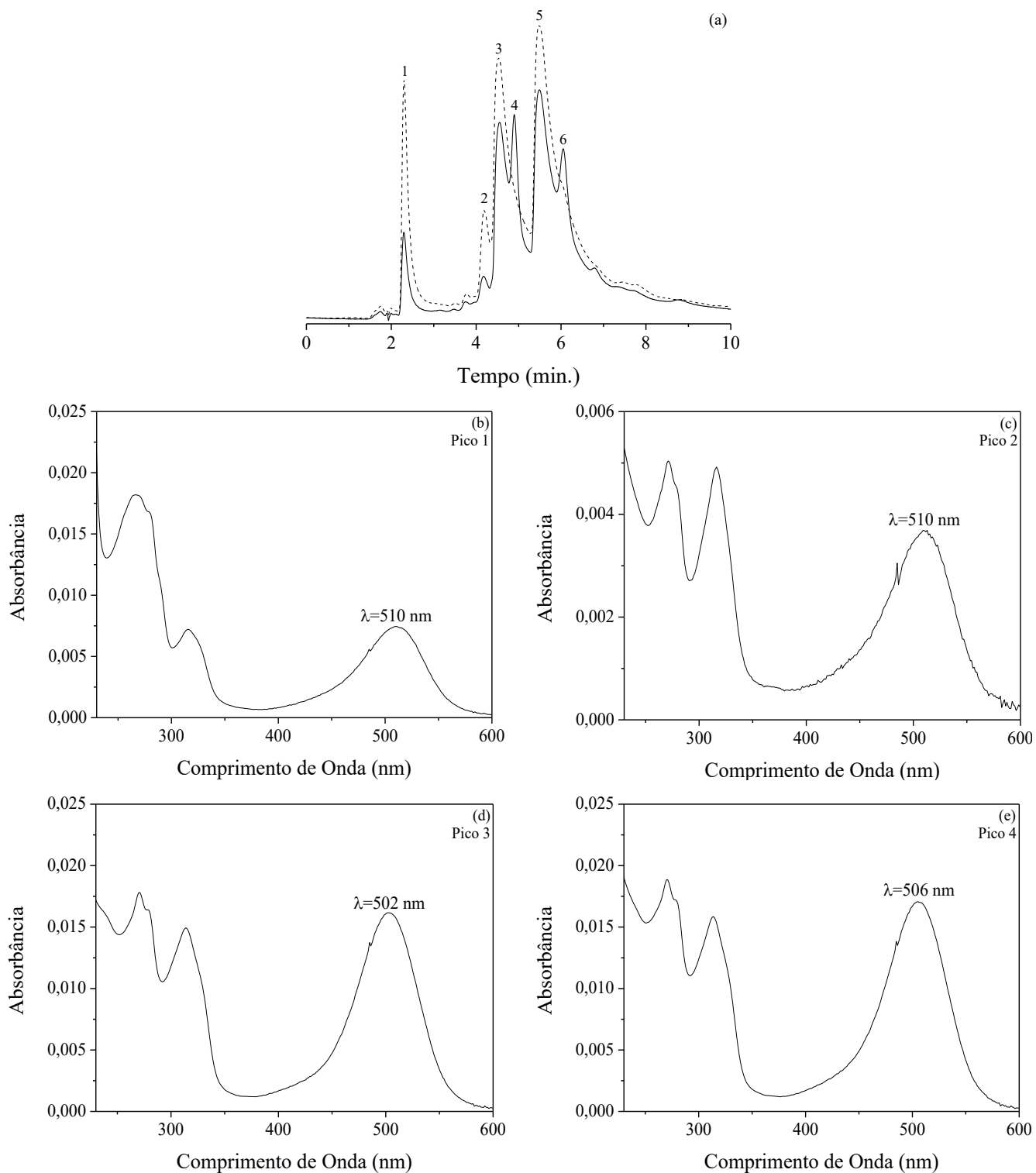
Fonte: Autora.

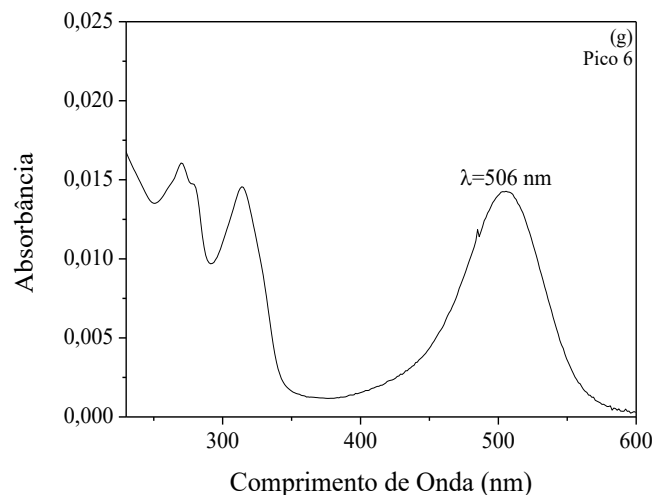
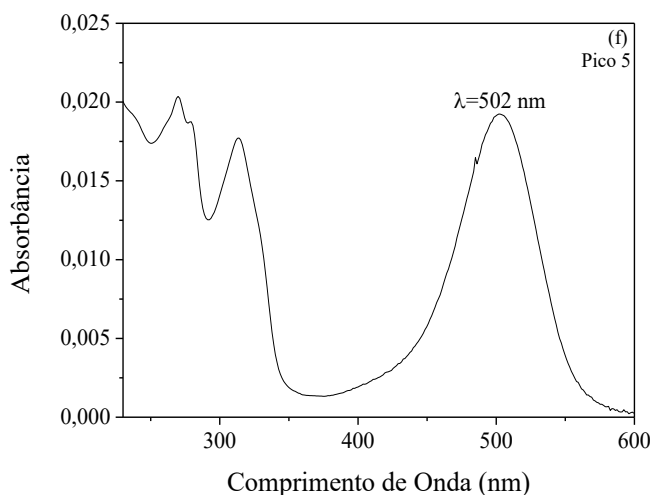
Os cromatogramas obtidos para os complexos $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (Figura 24) e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (Figura 25) exibem apenas um pico, com tempos de retenção de $t_r = 5,92 \text{ min.}$, para $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, e $t_r = 5,99 \text{ min.}$, para $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$.

Analisando-se os cromatogramas obtidos para os nitrosilos complexos, $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, e para os nitro complexos, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, e comparando-se os perfis obtidos em tempo zero e após 2 h de dissolução dos mesmos, observa-se que não houve alterações significativas dos picos exibidos, seja o aumento ou a diminuição de área, tampouco o aparecimento de quaisquer outros picos, indicando a não conversão do ligante NO^+ a NO_2^- ou vice-versa. Assim, conclui-se que tanto os nitrosilos complexos, quanto os nitro complexos são estáveis em suas respectivas formas após 2 h de dissolução dos mesmos.

Os cromatogramas obtidos para o aqua complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ são apresentados na Figura 26.

Figura 26 – Cromatogramas para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (a). Composição da fase móvel: Tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a $0,1\%$ de TFA:MeOH (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (–) e 2 h (---). $t = 37 \text{ }^\circ\text{C}$. Espectros de absorção na região do UV/Visível. referente aos picos 1 (b), 2 (c), 3 (d), 4 (e), 5 (f) e 6 (g).





Fonte: Autora.

O cromatograma obtido para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (Figura 26 (a)) logo após a dissolução do mesmo exibe seis picos, com tempos de retenção de $t_{r1} = 2,31$ (pico 1), $t_{r2} = 4,19$ (pico 2), $t_{r3} = 4,52$ (pico 3), $t_{r4} = 4,90$ (pico 4), $t_{r5} = 5,50$ (pico 5) e $t_{r6} = 6,04$ min. (pico 6). Já o cromatograma obtido após 2 h de dissolução do complexo apresenta apenas quatro picos com tempos de retenção de $t_{r1} = 2,31$ (pico 1), $t_{r2} = 4,19$ (pico 2), $t_{r3} = 4,52$ (pico 3) e $t_{r5} = 5,50$ min. (pico 5).

As espécies químicas referentes aos picos observados foram descritas baseando-se em atribuições para complexos polipiridínicos de rutênio(II) anteriormente reportadas por CHRZANOWSKA e colaboradores (2017).

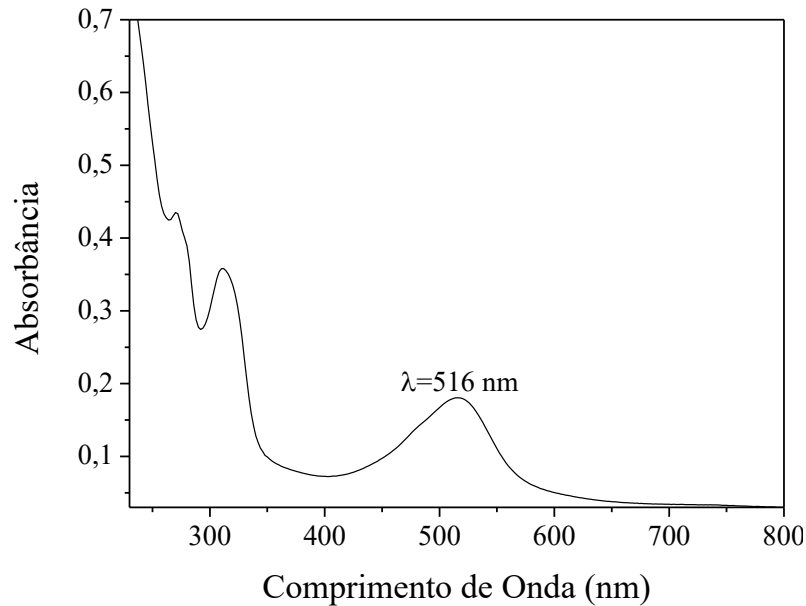
Os picos 4 e 6, possivelmente, fazem referência a dois isômeros de posição dos complexos com o ligante fosfato, observados devido à duas diferentes conformações espaciais do complexo, a depender da posição do grupo carboxila do ligante bdq e, ainda, devido a presença de íons mono (HPO_4^{2-}) e dihidrogenofosfato (H_2PO_4^-) na composição da fase móvel utilizada. Tais picos são observados, possivelmente, devido à conversão parcial do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ ao fosfato complexo no meio reacional, uma vez que na preparação da fase móvel adiciona-se 0,6076 g de dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) e 0,8580 g de monohidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4).

Os picos 3 e 5 fazem referência a dois isômeros de posição do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, também observados devido à duas diferentes conformações espaciais do complexo. Aqua complexos apresentam uma banda de TCML em regiões próximas a 502 nm.

Finalmente, os picos 1 e 2 fazem referência a dois isômeros de posição do complexo $[\text{Ru}(\text{OH})(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$. Hidróxido complexos apresentam a banda de TCML em regiões

próximas a 510 nm. O espectro eletrônico qualitativo obtido para o aqua complexo, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ em meio básico (pH = 13,0) (Figura 27) sustentam a afirmação de que a banda de TCML em 510 nm é atribuída ao hidróxido complexo, $[\text{Ru}(\text{OH})(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$.

Figura 27 – Espectro eletrônico qualitativo para o complexo $[\text{Ru}(\text{OH})(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ em NaOH 0,1 mol L⁻¹.

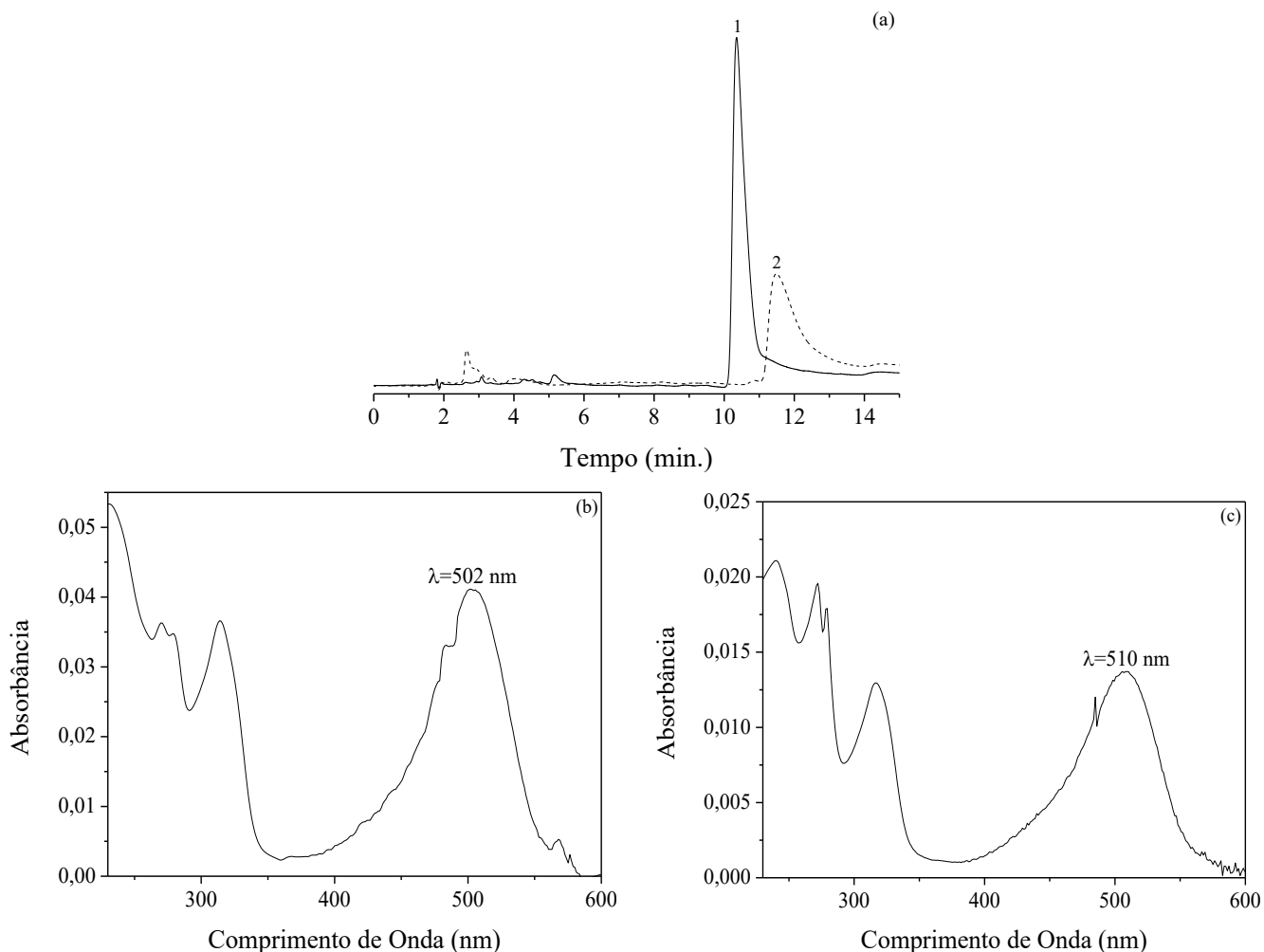


Fonte: Autora.

Após 2 h de dissolução do complexo observa-se que há o desaparecimento dos picos 4 e 6, referentes aos fosfato complexos, e, ainda o aumento de área dos picos 1 e 2, referentes aos hidróxido complexos, e, também, dos picos 3 e 5, referentes aos aqua complexos. Semelhante ao descrito por CHRZANOWSKA e colaboradores (2017), possivelmente os fosfato complexos são convertidos às espécies aqua, as quais, por sua vez, são parcialmente convertidas às espécies hidróxido após 2 h de dissolução.

Os cromatogramas obtidos para o aqua complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ são apresentados na Figura 28.

Figura 28 – Cromatogramas para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (a). Composição da fase móvel: Tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a $0,1\%$ de TFA:MeOH (75:25 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (–) e 2 h (---). $t = 37 \text{ }^\circ\text{C}$. Espectros de absorção na região do UV/Visível. referente aos picos 1 (b) e 2 (c).



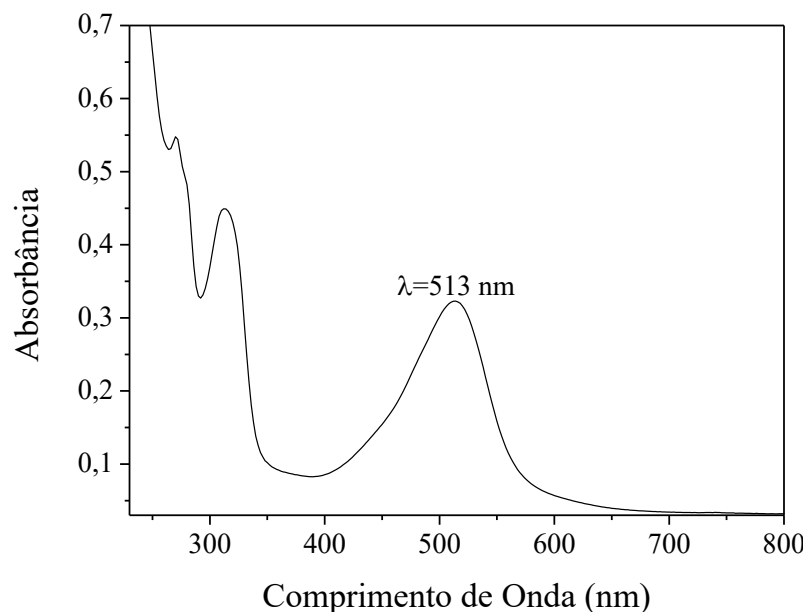
Fonte: Autora.

O cromatograma obtido para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (

Figura 28 (a)) logo após a dissolução do mesmo exibe apenas um pico, com tempo de retenção de $t_r = 10,35$ min (pico 1). O cromatograma obtido após 2 h de dissolução do complexo apresenta apenas um pico com tempo de retenção de $t_r = 11,48$ min. (pico 2).

O pico 1, possivelmente, faz referência ao complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, enquanto o pico 2, provavelmente, faz referência ao complexo $[\text{Ru}(\text{OH})(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$. Neste caso, diferentemente daquilo observado para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, a espécie aqua é convertida à espécie hidróxido após 2 h de dissolução. O espectro eletrônico qualitativo obtido para o aqua complexo, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ em meio básico ($\text{pH} = 13,0$) (Figura 29) sustentam a afirmação de que a banda de TCML em 510 nm é atribuída ao hidróxido complexo, $[\text{Ru}(\text{OH})(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$.

Figura 29 – Espectro eletrônico qualitativo para o complexo $[\text{Ru}(\text{OH})(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Autora.

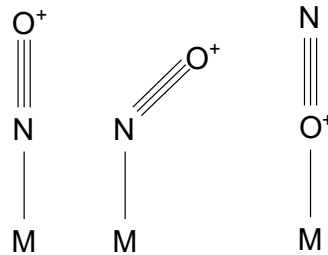
4.1.4. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)

Complexos nitrosilo/nitro de rutênio(II), dos tipos $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}^+$ e $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}_2^-$, apresentam estiramentos na região do IV característicos, a depender dos modos de coordenação dos íons NO^+ e NO_2^- .

O íon nitrosônio (NO^+) pode coordenar-se ao íon metálico de três diferentes modos (Figura 30) (RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992), sendo que quando o íon se coordena de

maneira linear, os complexos apresentarão estiramentos intensos na região entre 1970 e 1800 cm^{-1} . Os estiramentos aparecem em regiões de mais alta energia, devido ao menor comprimento da ligação $\text{N}=\text{O}^+$, em consequência da maior intensidade da retrodoação $\text{M}-\text{NO}^+$, quando o íon NO^+ se coordena de maneira linear (KUMAR, *et al.*, 2013). Sendo que o íon, ao se coordenar de maneira angular, os complexos exibirão estiramentos entre 1720 e 1400 cm^{-1} . Neste caso, os estiramentos aparecem em regiões de mais baixa energia, em consequência do maior comprimento da ligação $\text{N}=\text{O}^+$ (MCCLEVERTY, 2004). Dentre os três diferentes modos de coordenação do íon NO^+ , para complexos de rutênio(II), a forma mais comum é aquela onde há a coordenação através do átomo doador de nitrogênio, de maneira linear (BOTTOMLEY, 1978; GUENGERICH & SCHUG, 1978; de LIMA *et al.*, 2006).

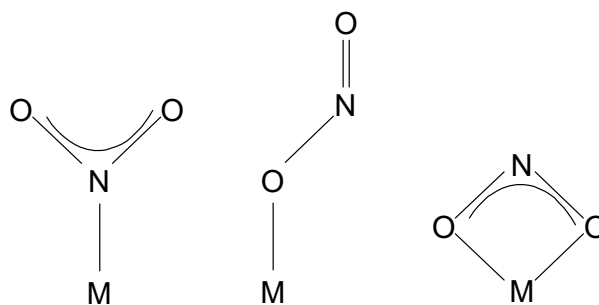
Figura 30 – Modos de coordenação Metal–NO.



Fonte: Adaptado de RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992.

O íon nitrito (NO_2^-) pode coordenar-se ao íon metálico de três diferentes modos (Figura 31) (RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992), sendo que quando o íon se coordena através do átomo doador de nitrogênio, os complexos apresentarão estiramentos assimétricos e simétricos próximos a 1349 e 1298 cm^{-1} , respectivamente. A diferença entre os valores de estiramentos assimétricos (ν_{as}) e simétricos (ν_{s}) é menor que 100 cm^{-1} , quando o íon NO_2^- se coordena através do átomo doador de nitrogênio. Sendo que o íon, ao se coordenar através do átomo doador de oxigênio, a diferença entre os valores de estiramentos assimétricos e simétricos é maior que 300 cm^{-1} (NAKAMOTO, 2009). Dentre os três diferentes modos de coordenação do íon NO_2^- , para complexos de rutênio(II), a forma mais encontrada é aquela onde há a coordenação através do átomo de nitrogênio (HITCHMAN & ROWBOTTOM, 1982).

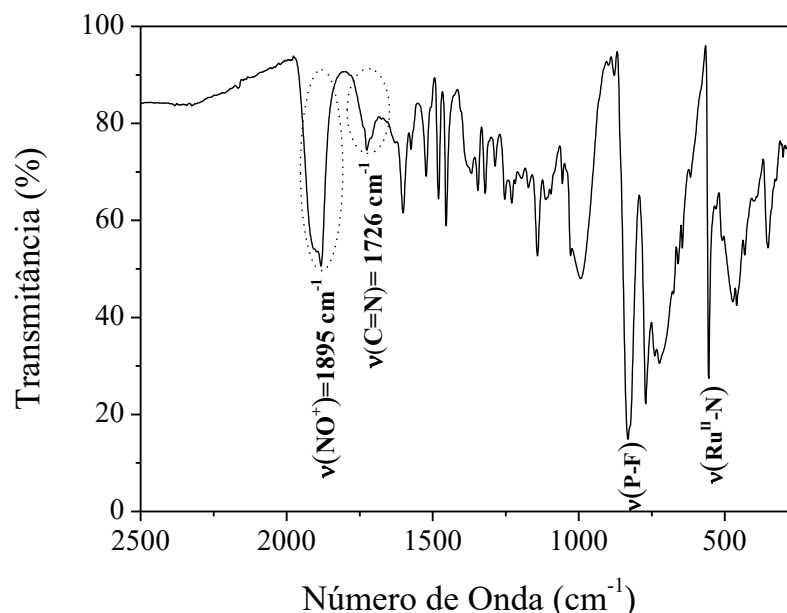
Figura 31 – Modos de coordenação Metal–NO₂.



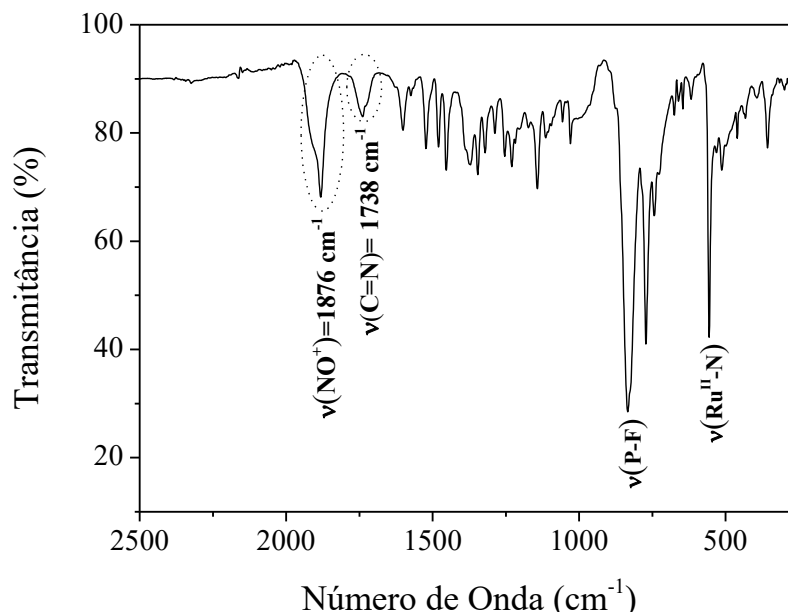
Fonte: Adaptado de RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992.

Assim, com a finalidade de analisar-se os estiramentos da ligação $\text{N}\equiv\text{O}^+$ dos complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e os estiramentos do ligante NO_2^- dos complexos $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, utilizou-se a técnica de IV. Os espectros vibracionais obtidos para os nitrosilos complexos e para os nitro complexos são apresentados nas Figuras 32, 33, 34 e 35, respectivamente.

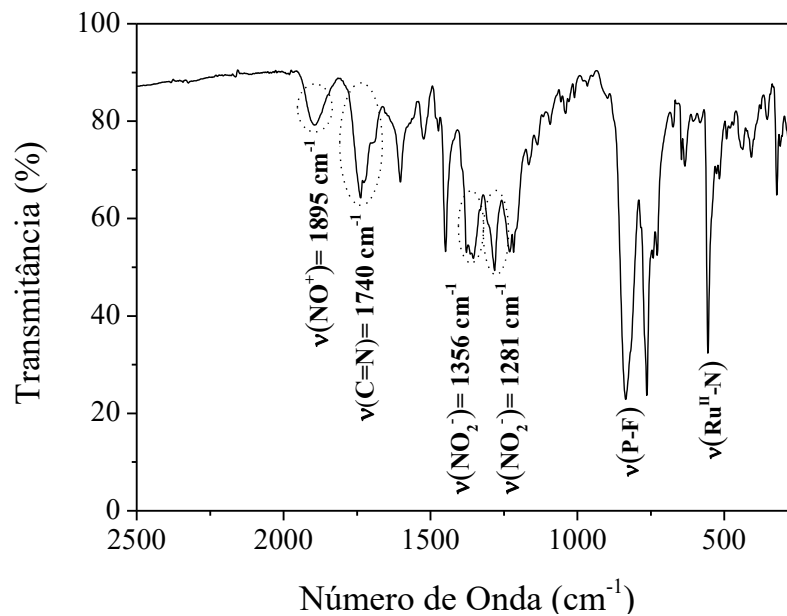
Figura 32 – Espectro vibracional na região do IV para o complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$.



Fonte: Autora.

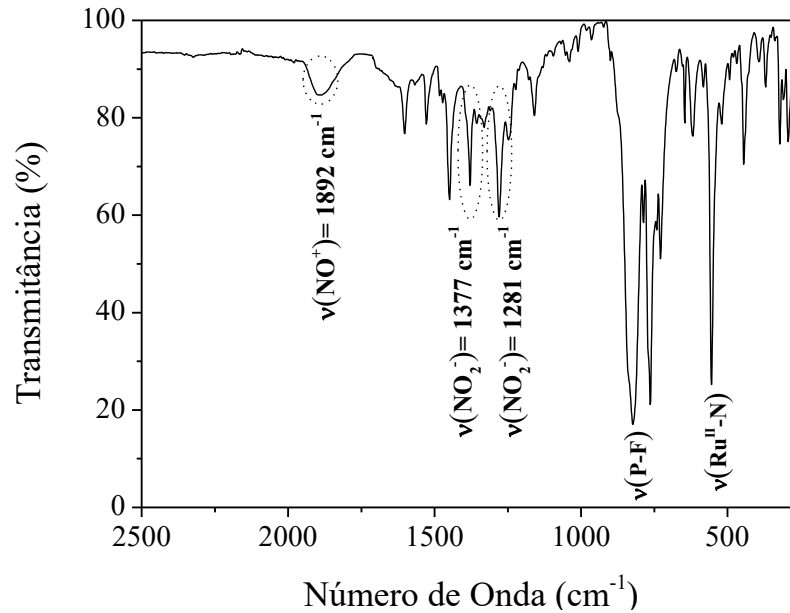
Figura 33 – Espectro vibracional na região do IV para o complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃.

Fonte: Autora.

Figura 34 – Espectro vibracional na região do IV para o complexo [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆.

Fonte: Autora.

Figura 35 – Espectro vibracional na região do IV para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$.



Fonte: Autora.

Os espectros vibracionais obtidos para os nitrosilos complexos, $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, apresentam estiramentos intensos em 1895 e 1876 cm^{-1} , respectivamente. Conforme anteriormente descrito, estiramentos intensos na região entre 1970 e 1800 cm^{-1} são característicos de uma estrutura linear para a ligação $\text{Ru}-\text{NO}$ e de um caráter nitrosônio (NO^+). Complexos de rutênio(II) desses tipos são frequentemente representados pela forma de ressonância $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}^+$, sendo que há outras formas de ressonância possíveis, eventualmente utilizadas, como $\text{Ru}^{\text{III}}-\text{NO}^0$ e $\text{Ru}^{\text{IV}}-\text{NO}^-$ (RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992).

A diferença entre os valores de $\nu(\text{N}\equiv\text{O}^+)$ obtidos para os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, de $\Delta=19 \text{ cm}^{-1}$, está relacionada aos co-ligantes bdq e bd. O co-ligante bdq apresenta um grupo carboxila ($-\text{COOH}$), o qual é um grupo retirador de densidade eletrônica. Assim, quando coordenado, o co-ligante bdq retira uma maior densidade eletrônica do íon metálico Ru^{II} , se comparado ao co-ligante bd e, então, pode-se atribuir um maior caráter π -receptor para o co-ligante bdq. Portanto, considerando-se o maior caráter π -receptor para o co-ligante bdq, pode-se inferir que a intensidade retrodoação $\text{Ru}^{\text{II}}\rightarrow\text{NO}^+$ no complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ é menor, se comparada àquela para o complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$. Quanto menor a retrodoação $\text{Ru}^{\text{II}}\rightarrow\text{NO}^+$, maior a força da ligação $\text{N}\equiv\text{O}^+$ e, conseqüentemente, maior a energia vibracional da ligação em questão.

Além dos estiramentos característicos da ligação $\text{N}\equiv\text{O}^+$, os espectros vibracionais obtidos para os nitrosilos complexos apresentam estiramentos em 1726 e 1738 cm^{-1} ,

respectivamente, atribuídos à ligação C=N, e estiramentos entre 1600 e 1500 cm^{-1} , caracterizados pelas ligações C=C e C=N do ligante tpy. Os espectros exibem, ainda, estiramentos em 829 e 833 cm^{-1} , respectivamente, referente às ligações P-F do contra-íon PF_6^- e estiramentos em 554 e 557 cm^{-1} , respectivamente, atribuídos às ligações $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{N}$, entre o íon metálico e o ligante tpy (NAKAMOTO, 2009).

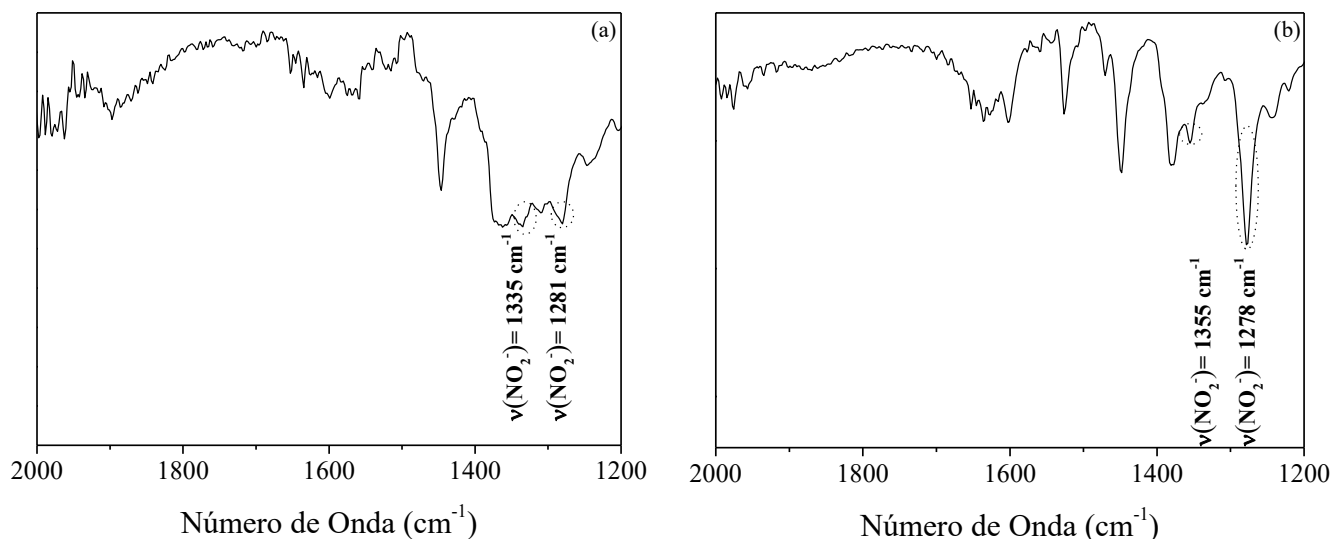
Os espectros vibracionais obtidos para os nitro complexos, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, exibem estiramentos assimétricos, em 1356 e 1377 cm^{-1} , e simétricos, em 1281 cm^{-1} , respectivamente. Tais estiramentos são inerentes ao ligante NO_2^- , quando há a coordenação do íon NO_2^- por meio do átomo de nitrogênio.

Além dos estiramentos inerentes ao ligante NO_2^- , os espectros vibracionais obtidos para os nitro complexos apresentam estiramentos entre 1600 e 1500 cm^{-1} , atribuídos às ligações C=C e C=N do ligante tpy. Os espectros exibem, ainda, estiramentos em 837 e 825 cm^{-1} , respectivamente, caracterizados pelas ligações P-F do contra-íon PF_6^- e estiramentos em 554 cm^{-1} , referente às ligações $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{N}$, entre o íon metálico e o ligante tpy (NAKAMOTO, 2009).

Contudo, os espectros apresentam, também, estiramentos em 1895 e 1892 cm^{-1} , respectivamente, atribuídos à ligação $\text{N}\equiv\text{O}^+$, os quais são observados, possivelmente, devido a um processo de hidrólise do íon amônio (NH_4^+), proveniente do sal NH_4PF_6 , utilizado durante a síntese dos complexos para o fornecimento do contra-íon. A hidrólise do íon NH_4^+ ocasiona a liberação de íons hidrônio (H_3O^+) e, conseqüentemente, propicia a acidificação do meio reacional.

Assim, pode-se concluir que os complexos $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, em estado sólido, consistem-se em uma mistura entre as formas $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}_2^-$ e $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}^+$. Entretanto, os espectros vibracionais obtidos para os nitro complexos $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ em solução tampão fosfato salino (PBS) (Figura 36) não exibem estiramentos atribuídos à ligação $\text{N}\equiv\text{O}^+$. Então, pode-se constatar que os complexos $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, em solução, apresentam-se apenas na forma de $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}_2^-$. Além disso, os resultados obtidos via CLAE (sessão 4.1.2) corroboram com a afirmação de que há somente uma espécie em solução para os nitro complexos.

Figura 36 – Espectros vibracionais na região do IV para os complexos $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (a) e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (b), em PBS (pH = 7,4).



Fonte: Autora.

Os valores de estiramento para os ligantes NO^+ e NO_2^- coordenados a complexos polipiridínicos de rutênio(II), tanto obtidos no presente trabalho, quanto descritos na literatura, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de estiramento para os ligantes nitrosil (NO⁺) e nitro (NO₂) coordenados a complexos polipiridínicos de rutênio(II).

Complexo	v(NO ⁺) (cm ⁻¹)	v(NO ₂) (cm ⁻¹)	Referência
		v _{as} / v _s	
[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	1895*	-	-
[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	1876*	-	-
[Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆	1895*	1356 / 1281*	-
[Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆	1892*	1377 / 1281*	-
[Ru(bpy) ₂ (py)(NO)](PF ₆) ₃	1947	-	SAUAIA & da SILVA, 2003
[Ru(NH ₂ .NH ₂ cat)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	1874	-	de LIMA <i>et al.</i> , 2006
[Ru(bpy)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	1952	-	FREEDMAN <i>et al.</i> , 2006
[Ru(NO ₂)(bpy)(tpy)]PF ₆	-	1322 / 1278	FREEDMAN <i>et al.</i> , 2006
[RuCl(NO ₂)(bpy) ₂].H ₂ O	-	1325 / 1270	GODWIN & MEYER, 1970
[Ru(NO ₂) ₂ (bpy) ₂].H ₂ O	-	1332 / 1304	GODWIN & MEYER, 1970
[Ru(NO ₂)(bpy) ₂ (NO)](PF ₆) ₂	1943	1430 / 1330	KOVALEVSKY <i>et al.</i> , 2005

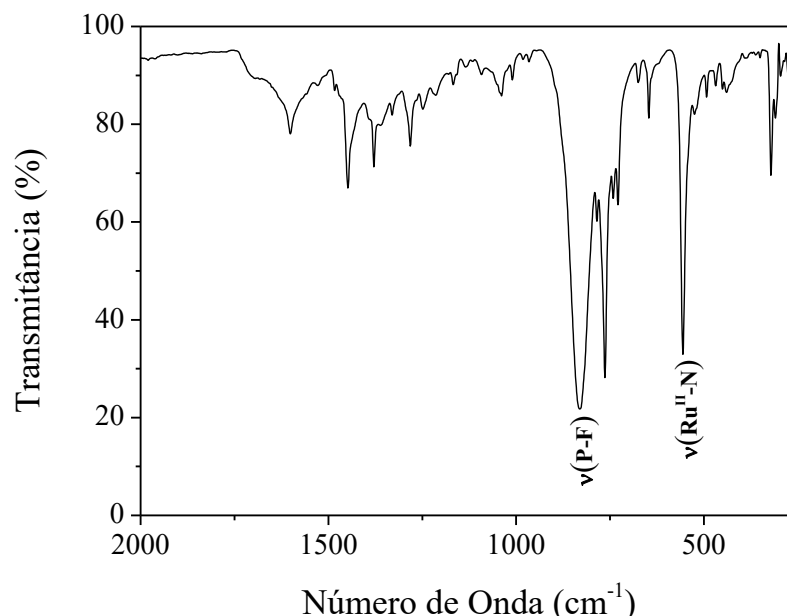
*Fonte: Autora.

NH₂.NH₂cat = Ácido 3,4-diaminobenzóico (Forma reduzida).

Os valores de estiramento para os ligantes NO⁺ e NO₂ coordenados a complexos polipiridínicos de rutênio(II), tanto obtidos no presente trabalho, quanto descritos na literatura são relativamente próximos, sustentando a afirmação de que os para os nitrosilos complexos, [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃ e [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, há a coordenação do íon NO⁺ através do átomo de nitrogênio, enquanto para os nitro complexos [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆, há a coordenação do íon NO₂⁻ por meio do átomo de nitrogênio. Além disso, os resultados obtidos por McGarvey (2000) via espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) corroboram com a afirmação de que os complexos nitrosilos sejam melhores representados considerando-se a forma Ru^{II}-NO⁺, em que o elétron desemparelhado encontra-se mais nos orbitais *d* do íon metálico do que nos orbitais *p* do nitrogênio.

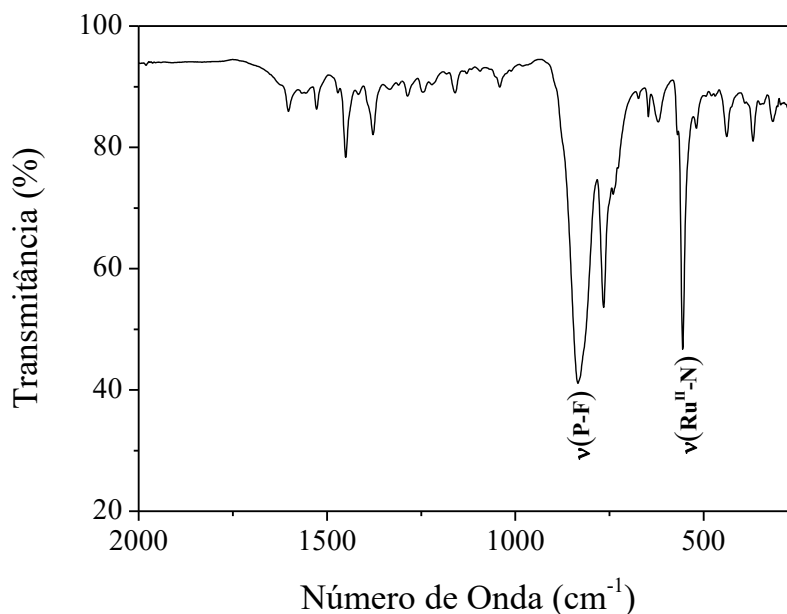
Os espectros vibracionais obtidos para os aqua complexos, [Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ e [Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂, são apresentados nas Figuras 37 e 38, respectivamente.

Figura 37 – Espectro vibracional na região do IV para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$.



Fonte: Autora.

Figura 38 – Espectro vibracional na região do IV para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$.



Fonte: Autora.

Os espectros vibracionais obtidos para os aqua complexos, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, apresentam estiramentos entre 1600 e 1500 cm⁻¹, atribuídos às ligações C=C e C=N do ligante tpy. Os espectros exibem, ainda, estiramentos em 830 e 838 cm⁻¹, respectivamente, caracterizados pelas ligações P-F do contra-íon PF₆⁻ e estiramentos em 555 cm⁻¹, referente às ligações Ru^{II}-N, entre o íon metálico e o ligante tpy. Os estiramentos inerentes ao ligante água, descritos pela ligação O-H, próximos a 1600 cm⁻¹, não foram

observados, uma vez que há a sobreposição de tal estiramento e dos estiramentos atribuídos às ligações C=C e C=N do ligante tpy (NAKAMOTO, 2009).

4.1.5. Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível (UV/Visível)

Complexos de rutênio(II) que apresentam co-ligantes insaturados, como co-ligantes polipiridínicos, em suas esferas de coordenação, geralmente, apresentam bandas de absorção na região do UV, atribuídas à transições do tipo intraligante (IL), e, também, exibem bandas de absorção na região do visível, caracterizadas por transições do tipo campo ligante (CL) e transferência de carga metal-ligante (TCML) (LEVER, 1984).

As transições do tipo IL são semelhantes àquelas observadas para ligantes insaturados não coordenados. Exemplificando-se, em ligantes aromáticos n-heterocíclicos, tais transições são originadas devido a elétrons livres (n) e, também, elétrons π (π), ou seja, são transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$, respectivamente. As transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ ocorrem em regiões de maior comprimento de onda e são de baixa intensidade, enquanto as transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ ocorrem em regiões de menor comprimento de onda e são de alta intensidade, semelhante àquelas observadas em hidrocarbonetos aromáticos correspondentes.

As transições do tipo CL ocorrem entre níveis energéticos localizados no metal, ou seja, são transições do tipo $d \rightarrow d$. Tais transições são originadas devido ao desdobramento de energia dos orbitais d do metal, os quais, em um campo octaédrico, são descritos como t_{2g} e e_g .

As transições do tipo TCML são observadas devido à ligações π nos complexos de rutênio os quais apresentam co-ligantes insaturados em suas esferas de coordenação, ou seja, são transições do tipo $d\pi(M) \rightarrow p\pi^*(L)$ (FORD, et al., 1968; TFOUNI & FORD, 1980). Tais transições são originadas em virtude dos orbitais do metal e dos ligantes apresentarem energia próximas e simetrias apropriadas. Assim, quando os elétrons do íon metálico estão em orbitais de simetria π e os orbitais desocupados de menor energia (LUMO) dos ligantes também são de simetria π , há transições do tipo $d\pi(M) \rightarrow p\pi^*(L)$.

Assim, com o intuito de analisar-se os espectros eletrônicos para os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, utilizou-se a técnica de UV/Visível.

Os dados espectroscópicos obtidos para os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Dados espectroscópicos para os complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆, [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆, [Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ e [Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂, seus coeficientes de absorvidade molar (ϵ) e suas atribuições.

Complexo	λ (nm)/log ϵ	Atribuições
[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	321/4,24 ^a	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bdq})$ e $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$
	356/4,18 ^a	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bdq})$ e $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}^+)$
	500/3,51 ^a	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bdq})$ e $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$
[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	285/4,16 ^a	$\pi \rightarrow \pi^*(\text{bd})$ e $\pi \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$
	304/4,16 ^a	$\pi \rightarrow \pi^*(\text{bd})$ e $\pi \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$
	328/4,07 ^a	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bd})$ e $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}^+)$
	444/3,54 ^a	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bd})$ e $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$
[Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆	271/4,12 ^b	$\pi \rightarrow \pi^*(\text{bdq})$ e $\pi \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$
	281/4,12 ^b	$\pi \rightarrow \pi^*(\text{bdq})$ e $\pi \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$
	310/4,02 ^b	$\pi \rightarrow \pi^*(\text{bdq})$ e $\pi \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$
	326/3,96 ^b	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bdq})$ e $n \rightarrow \pi^*(\text{NO}_2^-)$
	512/4,01 ^b	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bdq})$, $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$ e $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}_2^-)$
[Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆	270/4,00 ^b	$\pi \rightarrow \pi^*(\text{bd})$ e $\pi \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$
	280/3,96 ^b	$\pi \rightarrow \pi^*(\text{bd})$ e $\pi \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$
	308/4,00 ^b	$\pi \rightarrow \pi^*(\text{bd})$ e $\pi \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$
	326/3,88 ^b	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bd})$ e $n \rightarrow \pi^*(\text{NO}_2^-)$
	504/3,80 ^b	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bd})$, $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$ e $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}_2^-)$
[Ru(H ₂ O)(bdq)(tpy)](PF ₆) ₂	272/4,11 ^c	$\pi \rightarrow \pi^*(\text{bdq})$ e $\pi \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$
	312/4,12 ^c	$\pi \rightarrow \pi^*(\text{bdq})$ e $\pi \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$
	501/3,87 ^c	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bdq})$ e $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$
[Ru(H ₂ O)(bd)(tpy)](PF ₆) ₂	271/4,19 ^c	$\pi \rightarrow \pi^*(\text{bd})$ e $\pi \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$
	278/4,16 ^c	$\pi \rightarrow \pi^*(\text{bd})$ e $\pi \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$
	312/4,20 ^c	$\pi \rightarrow \pi^*(\text{bd})$ e $\pi \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$
	497/4,08 ^c	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bd})$ e $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{tpy})$

Fonte: Autora.

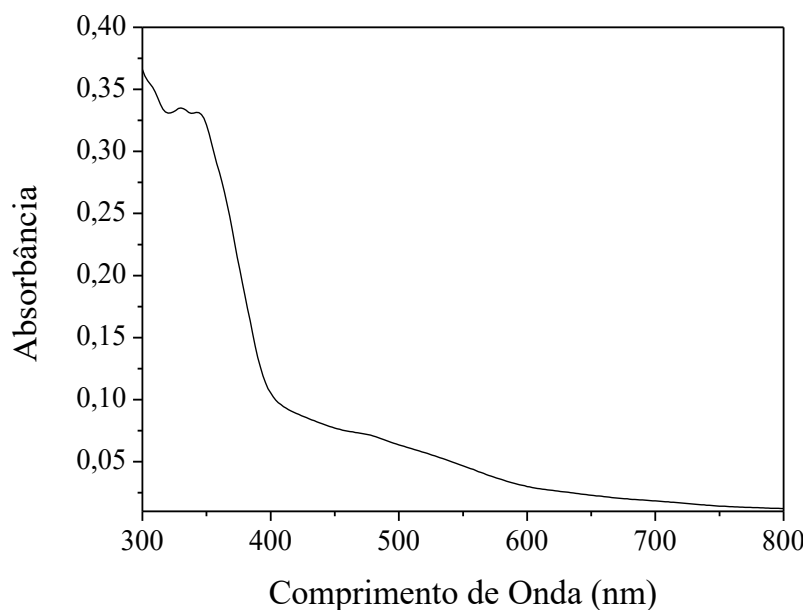
^aDados obtidos em meio de HCl 0,1 mol L⁻¹.

^bDados obtidos em meio de NaOH 0,1 mol L⁻¹.

^cDados obtidos em meio aquoso.

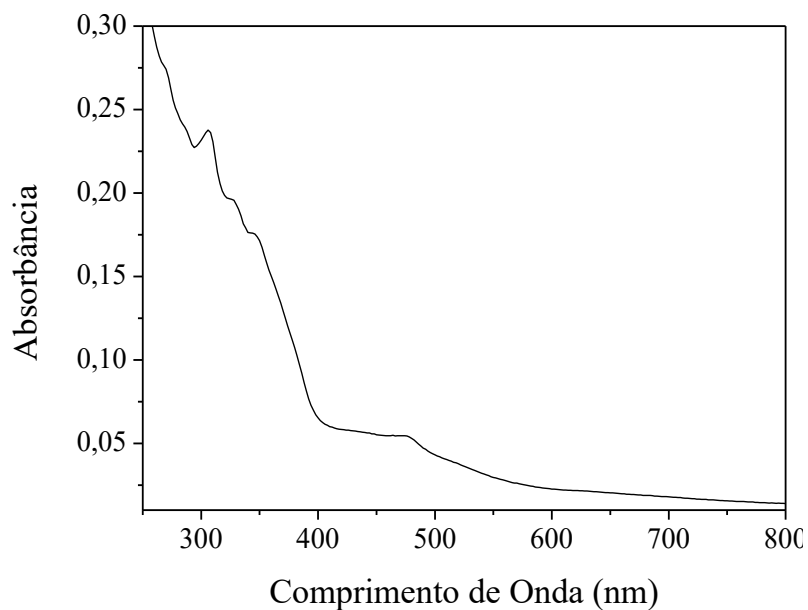
Os espectros eletrônicos obtidos para os nitrosilos complexos, $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, para os nitro complexos, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, e para os aqua complexos, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, são apresentados nas Figuras 39, 40, 41, 42, 43 e 44 respectivamente.

Figura 39 – Espectro eletrônico para o complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ a $16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ em $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



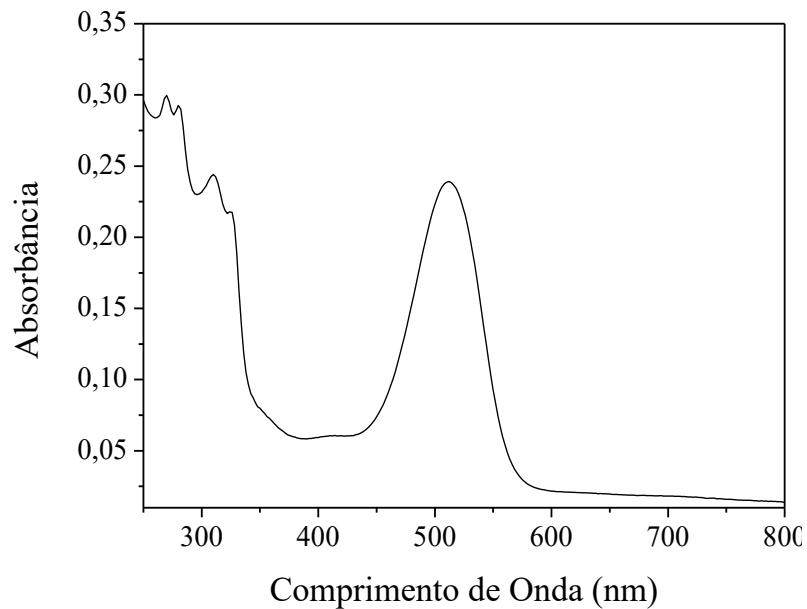
Fonte: Autora.

Figura 40 – Espectro eletrônico para o complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ a $16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ em $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



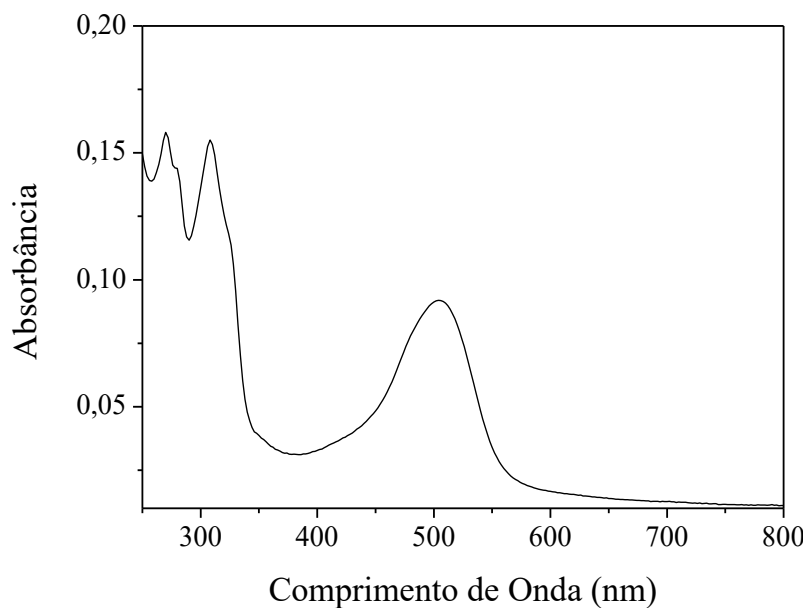
Fonte: Autora.

Figura 41 – Espectro eletrônico para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ a $16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ em $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



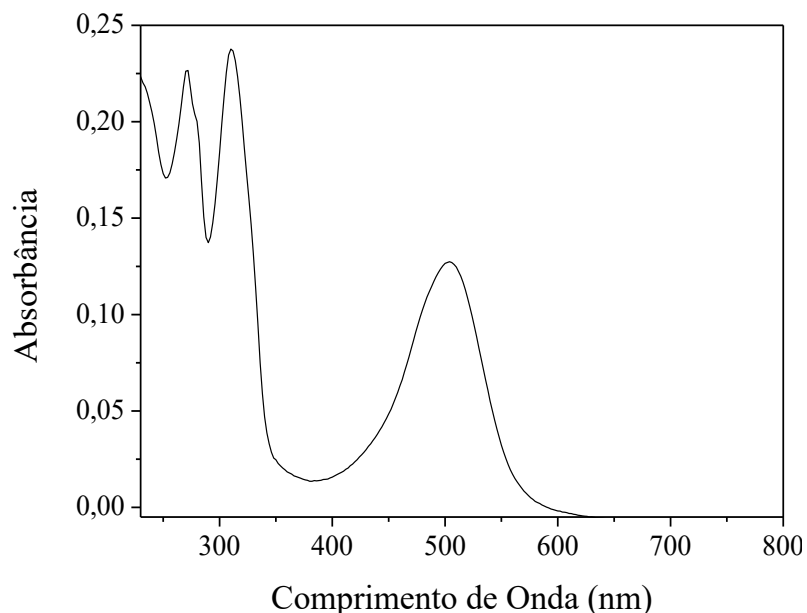
Fonte: Autora.

Figura 42 – Espectro eletrônico para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ a $16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ em $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



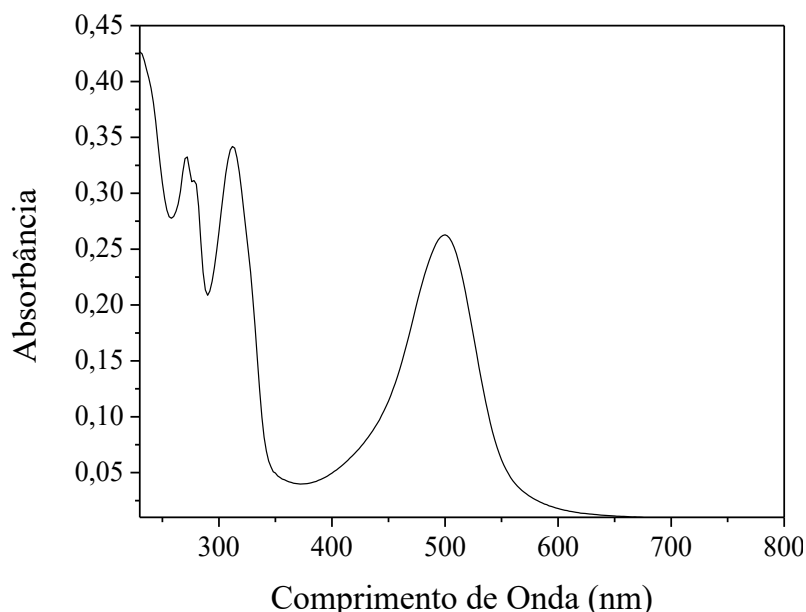
Fonte: Autora.

Figura 43 – Espectro eletrônico para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ a $16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio aquoso.



Fonte: Autora.

Figura 44 – Espectro eletrônico para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ a $16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio aquoso.



Fonte: Autora.

O espectro eletrônico para o complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (Figura 39) apresenta absorções em 321, 356 e 500 nm. A banda em 321 nm é atribuída à uma transição de TCML, devido à transição do tipo $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bdq e tpy})$. O ombro em 356 nm é caracterizado pela transição de TCML, do tipo $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bdq e NO}^+)$. Já a banda de baixa absorção em 500 nm é descrita como transições de TCML, do tipo $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bdq e tpy})$ (de LIMA *et al.*, 2006).

Para o complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (Figura 40), o espectro eletrônico exibe absorções em 285, 304, 328 e 444 nm, as quais foram caracterizadas baseando-se nas atribuições para o complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$. As bandas em 285 e 304 nm são atribuídas à transições IL, devido às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes bd e tpy. O ombro em 328 nm é caracterizado como uma transição de TCML, do tipo $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}^+)$. Já a banda de baixa absorção em 444 nm é descrita como transições de TCML, do tipo $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bd e tpy})$.

O espectro eletrônico para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (Figura 41) apresenta absorções em 271, 281, 310, 326 e 512, enquanto aquele para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (Figura 42) exibe absorções em 270, 280, 308, 326 e 504 nm. Tais transições eletrônicas foram caracterizadas baseando-se nas atribuições para sistemas semelhantes descritos na literatura (SILVA *et al.*, 2018; FREEDMAN, *et al.*, 2006; CALLAHAN & MEYER, 1977).

Para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, as bandas em 271, 281 e 310 nm são atribuídas à transições IL, devido às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes bdq e tpy. A banda em 326 nm é caracterizada pela transição de TCML, do tipo $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bdq})$. Além disso, a banda em 326 nm tem contribuição de transições IL, devido à transição do tipo $n \rightarrow \pi^*$ do ligante NO_2^- (de LEO & FORD, 2000). Já a banda em 512 nm é descrita como transições de TCML, do tipo $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bdq}, \text{tpy} \text{ e } \text{NO}_2^-)$.

As bandas em 270, 280 e 308 nm, para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, são atribuídas à transições IL, devido às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes bd e tpy. A banda em 326 nm é caracterizada pela transição de TCML, do tipo $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bd})$ e pela contribuição de transições IL, do tipo $n \rightarrow \pi^*$ do ligante NO_2^- . Já a banda em 504 nm é descrita como transições de TCML, do tipo $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bd}, \text{tpy} \text{ e } \text{NO}_2^-)$.

A diferença entre os valores de energia das bandas de TCML do tipo $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}^+)$ e $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}_2^-)$ obtidos para os complexos está relacionada ao caráter π -receptor dos ligantes NO^+ e NO_2^- . O ligante NO^+ apresenta um maior caráter π -receptor, se comparado ao ligante NO_2^- . Assim, pode-se concluir que a retrodoação para os nitrosilos complexos é maior, se comparada àquela para os nitro complexos e, conseqüentemente, a energia da transição $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}^+)$ é maior que para a transição $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}_2^-)$ (PAVAN *et al.*, 2012).

O espectro eletrônico para o complexo para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (Figura 43), apresenta absorções em 272, 312 e 501 nm, enquanto aquele para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (Figura 44) exhibe absorções em 271, 278, 312 e 497 nm. Tais transições eletrônicas foram caracterizadas baseando-se nas atribuições para sistemas semelhantes descritos na literatura (JAKUBIKOVA *et al.*, 2009).

Para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, as bandas em 272 e 312 nm são atribuídas à transições IL, devido às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes bdq e tpy. Já a banda em 500 nm é descrita como transições de TCML, do tipo $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bdq} \text{ e } \text{tpy})$.

As bandas em 271 e 312 nm e o ombro em 278 nm, para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, são atribuídos à transições IL, devido às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes bd e tpy. Já a banda em 497 nm é descrita como transições de TCML, do tipo $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bd} \text{ e } \text{tpy})$.

4.1.6. Análises Condutimétricas e Determinações da Solubilidade e dos Coeficientes de Partição (log P)

As análises para a determinação da condutividade molar (Λ_m) foram realizadas com o objetivo de corroborar com a caracterização e elucidação das estruturas químicas dos complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, enquanto as análises para a determinação da solubilidade e do coeficiente de partição (log P) foram realizadas, considerando-se que as interações entre a albumina sérica humana (ASH) e os complexos serão avaliadas em condições fisiológicas (pH = 7,40).

Os resultados obtidos para os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores de condutividade molar (Λ_m), de solubilidade e de coeficiente de partição (log P) para os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$.

Complexo	Condutividade (S cm ² mol ⁻¹)	Solubilidade (µg mL ⁻¹)	log P
$[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$	133,20 ^a /350,00 ^b	718,02 ^c	-1,70 ^c
$[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$	508,20 ^a /570,00 ^b	398,73	-0,11
$[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$	167,30 ^a	408,05	-1,47
$[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$	130,80 ^a	179,30	-0,29
$[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$	273,60 ^a	181,01	-1,35
$[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$	201,40 ^a	171,97	0,17

^aDados obtidos em ACN.

^bDados obtidos em meio aquoso (BESSAS *et al.*, 2021).

^cMARQUELE-OLIVEIRA *et al.*, 2010.

A partir dos resultados de Λ_m obtidos em acetonitrila (ACN), é possível concluir que os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ são eletrólitos do tipo 1:1, os complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ são eletrólitos do tipo 2:1 e o complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ é um eletrólito do tipo 3:1 (VELHO, 2006; GEARY, 1971). Esperar-se-ia que o complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$

fosse um eletrólito do tipo 3:1, assim como o complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$. Uma justificativa seria a possibilidade da labilização do ligante NO^+ e, conseqüentemente, a coordenação do solvente utilizado, neste caso, ACN. Contudo, conforme descrito por BESSAS e colaboradores (2021), os resultados de Λ_m obtidos em meio aquoso para os nitrosilos complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ demonstram que ambos os complexos são eletrólitos do tipo 3:1 (VELHO, 2006; GEARY, 1971).

Por meio dos resultados de solubilidade obtidos em água, é possível constatar que os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ apresentam maior solubilidade em meio aquoso, se comparado aos complexos $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$. A diferença entre os valores de solubilidade obtidos para os complexos está diretamente relacionada à diferença estrutural entre os co-ligantes ácido 3,4-diaminobenzóico (bdq) e o-fenilenodiamina (bd), sendo que o co-ligante bdq apresenta um grupo carboxila ($-\text{COOH}$). Possivelmente, a presença do grupo $-\text{COOH}$ possibilite a interação intermolecular entre moléculas de água e os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ via ligações de hidrogênio e os complexos em questão exibem maior solubilidade em meio aquoso. Além disso, os nitrosilos complexos apresentam maior solubilidade, se comparados aos respectivos nitro complexos, uma vez que os nitrosilos complexos exibem carga 3+, enquanto os nitro complexos exibem carga 1+.

Considerando-se os resultados de $\log P$ obtidos, é possível inferir que os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ são mais hidrofílicos, se comparados aos complexos $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$. Novamente, a diferença entre os valores de $\log P$ obtidos para os complexos está relacionada à diferença estrutural entre os co-ligantes bdq e bd. Valores negativos de $\log P$ refletem a maior afinidade do complexo pela água, enquanto valores positivos refletem a maior preferência pela fase orgânica, neste caso, 1-octanol. Assim, como os complexos $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ também apresentam valores de $\log P$ negativos, são considerados, também, hidrofílicos (ANDRÉS *et al.*, 2015; da SILVA *et al.*, 2020). Outra análise importante a ser feita é sobre os resultados de $\log P$ para os ligantes bdq e bd, em suas formas livres. Conforme descrito pelo *National Center for Biotechnology Information*, os resultados de $\log P$ para os ligantes bdq e bd livres são de 0,13 e 0,15, respectivamente. Então, é possível concluir que ambas as espécies, em suas formas livres, exibem maior afinidade pela fase orgânica. No entanto, quando complexados ao íon metálico, Ru^{II} , observa-se que o ligante bdq propicia um caráter mais

hidrofílico aos íons complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})]^{3+}$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]^+$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})]^{2+}$, enquanto o ligante bd proporciona um caráter menos hidrofílico aos íons complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})]^{3+}$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]^+$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})]^{2+}$.

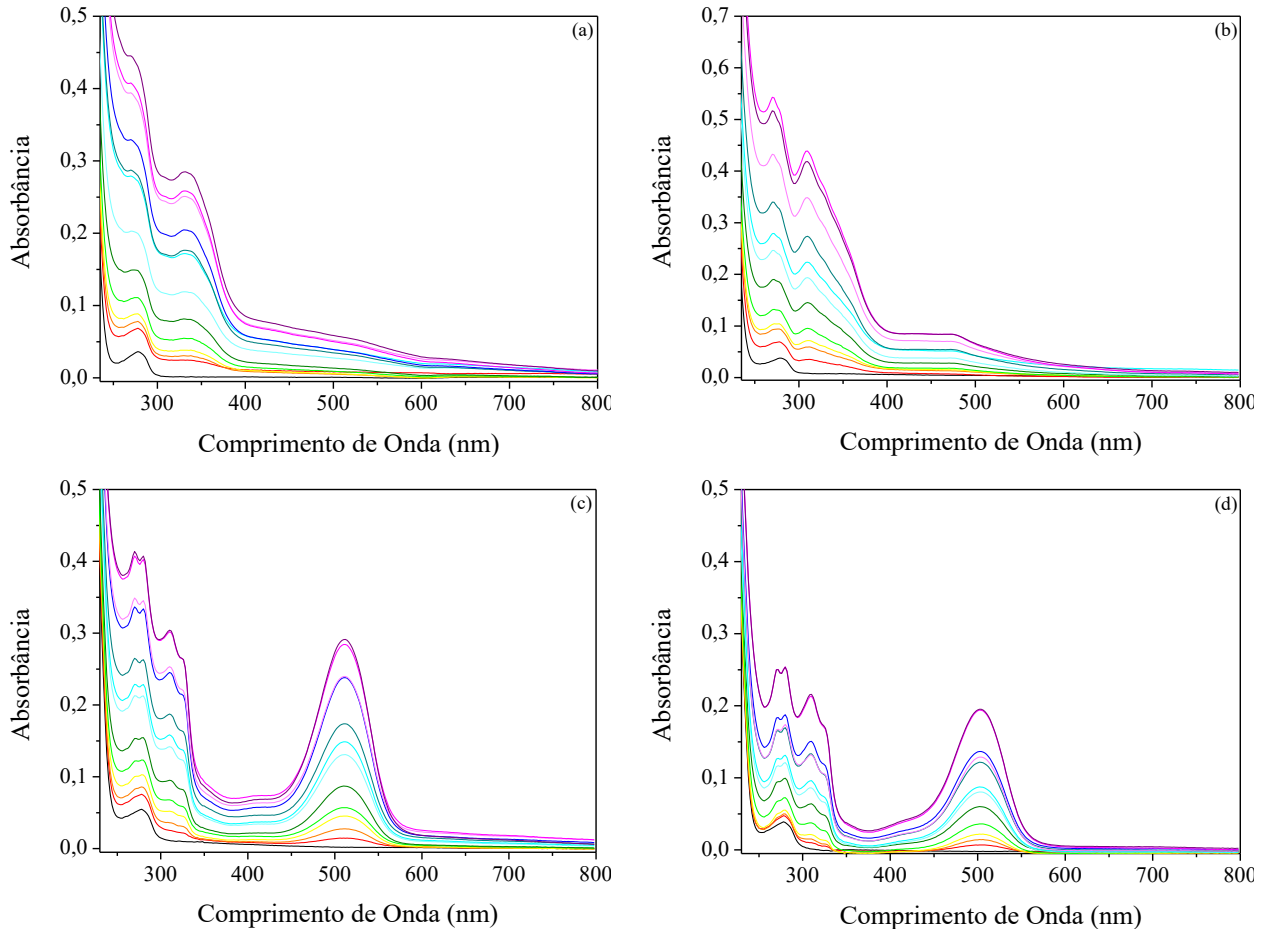
4.2. Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) Doadores de Óxido Nítrico (NO)

4.2.1. Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) Doadores de Óxido Nítrico (NO) via Espectroscopia na Região do UV/Visível

A avaliação das interações entre a ASH e potenciais pró-fármacos inorgânicos são parâmetros de suma importância farmacológica, pois a interação entre tais espécies pode ocasionar alterações estruturais da proteína e, conseqüentemente, modificações de suas funções fisiológicas. Em alguns casos, além das alterações estruturais da proteína, podem haver modificações dos comportamentos farmacodinâmicos ou, até mesmo, a inativação dos potenciais pró-fármacos (RANJBAR *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2017; TEKADE, 2019).

Assim, com o propósito de avaliar as interações entre a ASH e os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, inicialmente, utilizou-se a técnica de espectroscopia na região do UV/Visível. Os espectros de absorção na região do UV/Visível obtidos para a ASH em presença dos nitrosilos complexos e dos nitro complexos são apresentados na Figura 45.

Figura 45 – Espectros de absorção na região do UV/Vis. para a ASH e os complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃ (**a**), [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃ (**b**), [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ (**c**) e [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ (**d**), em PBS (pH = 7,4) a 308 K durante 24 h. [ASH] = 1,0 μmol L⁻¹ (-); [Complexo] = 0-16,4 μmol L⁻¹ [1,0 (-); 1,7 (-); 2,3 (-); 3,3 (-); 5,0 (-); 6,6 (-); 8,3 (-); 9,9 (-); 11,5 (-); 13,2 (-); 14,8 (-); 16,4 μmol L⁻¹ (-)].



Fonte: Autora.

O espectro de absorção na região do UV/Visível para a ASH em ausência dos complexos apresenta uma banda de absorção em 280 nm ($\epsilon_{280\text{nm}}=35700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), atribuída à uma transição IL, às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ dos aminoácidos aromáticos tirosina (Tyr), triptofano (Trp) e fenilalanina (Phe) (YUE *et al.*, 2009; RANJBAR *et al.*, 2013). Já os espectros de absorção para a ASH em presença de diferentes concentrações dos complexos exibem bandas de absorção características dos complexos.

Assim, analisando-se os espectros de absorção para a ASH em presença de diferentes concentrações dos complexos, conclui-se que não há alterações nos perfis espectrais após a adição dos complexos, como o deslocamento das bandas para maiores comprimentos de onda (efeito batocrômico) ou para menores comprimentos de onda (efeito hipsocrômico). Conforme

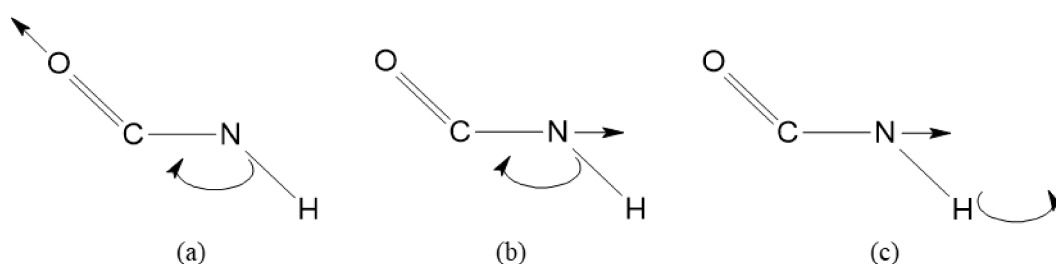
descrito por TANG e colaboradores (2006), SHI e colaboradores (2007) e CHENG e colaboradores (2009), quando há alterações nos perfis espectrais, constata-se que as espécies interagem entre si. Então, verifica-se que apenas os resultados obtidos via técnica de UV/Visível são insuficientes para inferir se há ou não a interação entre a ASH e os complexos.

Portanto, com a finalidade de avaliar as interações entre a ASH e os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, utilizou-se a técnica de espectroscopia na região do IV.

4.2.2. Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) Doadores de Óxido Nítrico (NO) via Espectroscopia na Região do IV

A ASH apresenta estiramentos em 1650 , 1550 e 1300 cm^{-1} , característicos dos três diferentes modos vibracionais das amidas (Figura 46). O estiramento em 1650 cm^{-1} é atribuído ao estiramento de deformação axial da ligação $\text{C}=\text{O}$ da amida, sendo este modo denominado amida I. O estiramento em 1550 cm^{-1} caracterizado pelo estiramento de deformação angular da ligação CN-N-H da amida, sendo este modo denominado amida II. Já o estiramento em 1300 cm^{-1} descrito pelo estiramento da ligação $\text{C}=\text{N}$, sendo este modo denominado amida III (USOLTSEV *et al.*, 2019).

Figura 46 – Modos vibracionais das amidas I (a), II (b) e III (c).

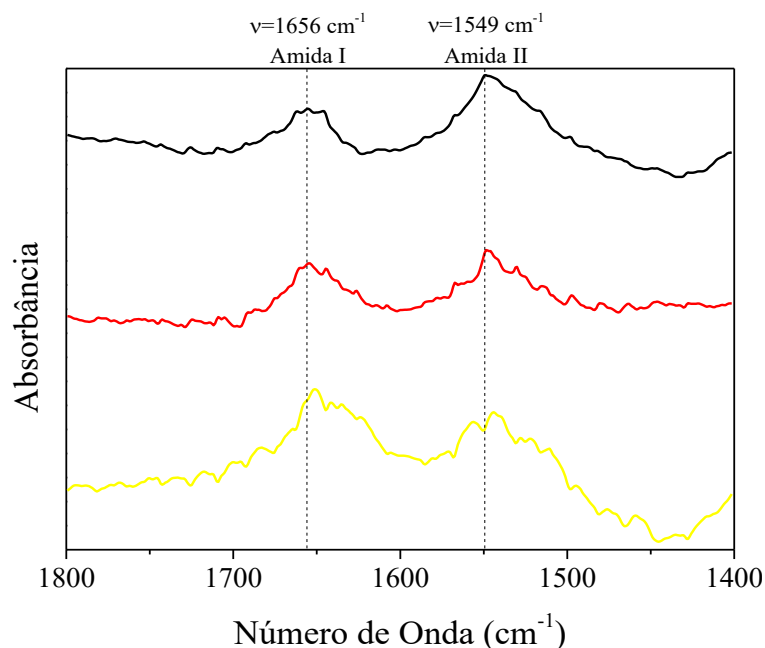


Fonte: Adaptado de <[http://www2.chem.uic.edu/tak/Chem34412/Notes%2014c-12\(Vibra.%20Spec-Bio%20Appl\).pdf](http://www2.chem.uic.edu/tak/Chem34412/Notes%2014c-12(Vibra.%20Spec-Bio%20Appl).pdf)>.

Assim, com o intuito de avaliar as interações entre a ASH e os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, analisando-se, mais especificamente, possíveis alterações nos estiramentos vibracionais atribuídos à ASH, utilizou-se a técnica de IV. Os espectros

vibracionais obtidos para a ASH em presença dos nitrosilos complexos, $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, são apresentados na Figura 47.

Figura 47 – Espectros vibracionais na região do IV para a ASH em ausência (–) e em presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (–) e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (–).



Fonte: Autora.

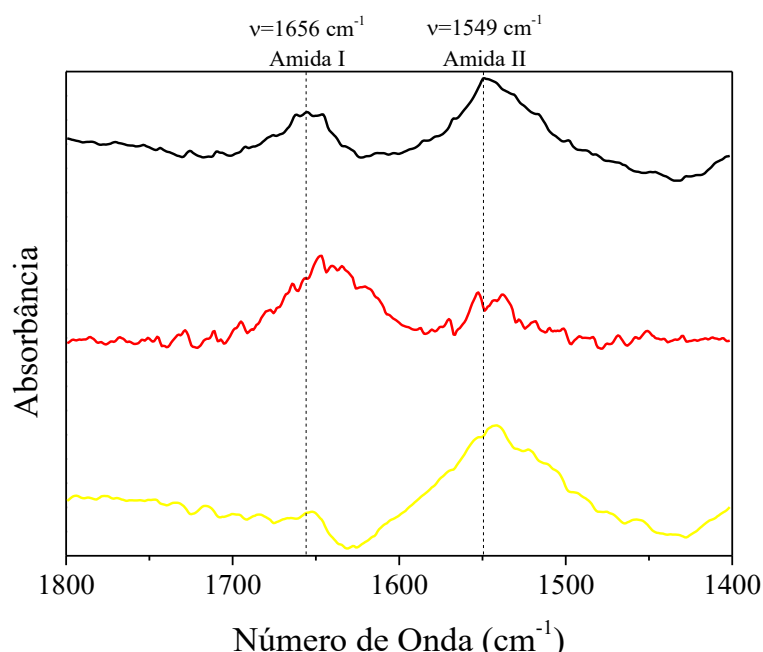
O espectro vibracional obtido para a ASH em ausência dos complexos exibe estiramentos em 1656 e 1549 cm^{-1} , atribuídos ao estiramento de deformação axial da ligação C=O da amida I e ao estiramento de deformação angular da ligação CN-N-H da amida II, respectivamente. O estiramento da ligação C=N da amida III não foi observado devido à sensibilidade do mesmo na região do IV, que é menor, se comparada àquelas para os estiramentos das amidas I e II (MALLAMACE *et al.*, 2015). A banda atribuída à amida I está diretamente relacionada à estrutura secundária da ASH (BYLER & SUSI, 1986). Assim, alterações na região da amida I são devido a mudanças conformacionais na estrutura secundária da ASH, mais especificamente nas α -hélices da proteína. A banda caracterizada pela amida II, por sua vez, não apresenta tanta sensibilidade relacionada à estrutura secundária da ASH, se comparada à amida I (BECKFORD *et al.*, 2016).

Em presença dos nitrosilos complexos, $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, os espectros vibracionais obtidos para a ASH apresentam alterações tanto no estiramento atribuído à amida I, quanto no estiramento caracterizado pela amida II. No caso do complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, houve os deslocamentos de 1656 cm^{-1} para

1654 cm^{-1} ($\Delta\nu = 2\text{ cm}^{-1}$) e de 1549 cm^{-1} para 1547 cm^{-1} ($\Delta\nu = 2\text{ cm}^{-1}$). No caso do complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ houve os deslocamentos de 1656 cm^{-1} para 1650 cm^{-1} ($\Delta\nu = 6\text{ cm}^{-1}$) e de 1549 cm^{-1} para 1544 cm^{-1} ($\Delta\nu = 5\text{ cm}^{-1}$).

Os espectros vibracionais obtidos para a ASH em presença dos nitro complexos, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, são apresentados na Figura 48.

Figura 48 – Espectros vibracionais na região do IV para a ASH em ausência (–) e em presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (–) e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (–).



Fonte: Autora.

Em presença dos nitro complexos $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, os espectros vibracionais obtidos para a ASH também apresentam alterações, tanto no estiramento atribuído à amida I, quanto no estiramento caracterizado pela amida II. No caso do complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ houve os deslocamentos de 1656 cm^{-1} para 1647 cm^{-1} ($\Delta\nu = 9\text{ cm}^{-1}$) e de 1549 cm^{-1} para 1552 cm^{-1} ($\Delta\nu = 3\text{ cm}^{-1}$). No caso do complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ houve o desaparecimento do estiramento em 1656 cm^{-1} e o deslocamento do estiramento de 1549 cm^{-1} , para 1542 cm^{-1} ($\Delta\nu = 7\text{ cm}^{-1}$). Quando há o desaparecimento do estiramento atribuído à amida I, seria um indicativo de que há a perda da estrutura de α -hélice da ASH (BYLER & SUSI, 1986).

Tais alterações nos perfis espectrais da ASH em presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ são devido a mudanças conformacionais na estrutura secundária da

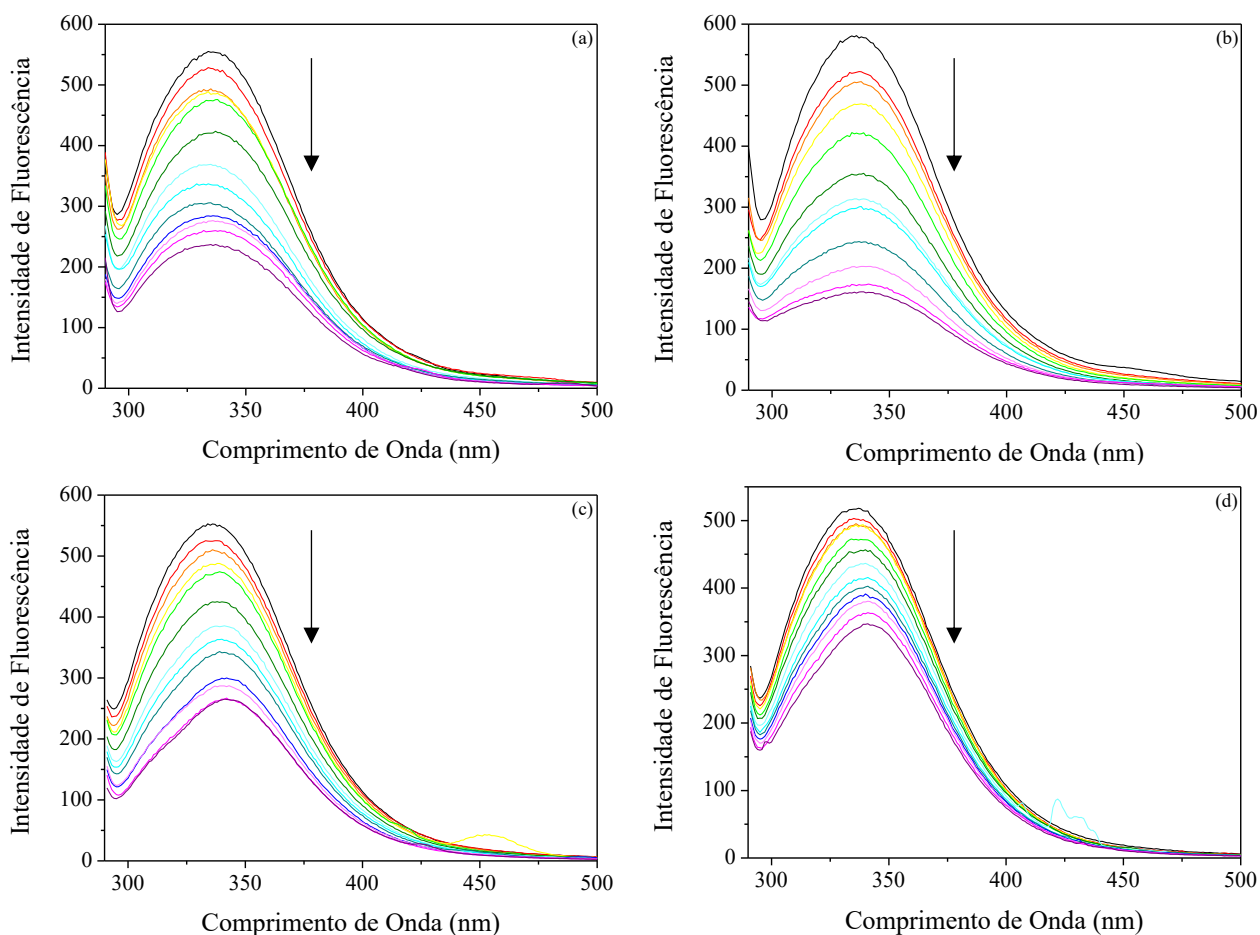
ASH, mais especificamente nas α -hélices da proteína. Assim, como foram observadas alterações nos perfis espectrais após a adição dos complexos, tem-se um indicativo de que há a interação entre a ASH e os mesmos (HUANG *et al.*, 2016).

4.2.3. Avaliação das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) Doadores de Óxido Nítrico (NO) via Espectroscopia de Fluorescência

A ASH, quando excitada em 280 nm, apresenta uma banda de emissão em 335 nm, característica da fluorescência intrínseca aos resíduos de aminoácidos aromáticos tirosina (Tyr), triptofano (Trp) e fenilalanina (Phe), sendo que a emissão para o resíduo de Trp-214 é a mais significativa (PETERS JR., 1995; NAVEENRAJ & ANANDAN, 2013).

Assim, com a finalidade de avaliar as interações entre a ASH e os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, utilizou-se a técnica de espectroscopia de fluorescência, a fim de analisar-se, mais especificamente, a supressão de fluorescência da ASH induzida pelos complexos. Os espectros de supressão de fluorescência obtidos para a ASH em presença dos nitrosilos complexos e dos nitro complexos são apresentados na Figura 49.

Figura 49 – Espectros de supressão de fluorescência da ASH em presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (**a**), $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (**b**), $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (**c**) e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (**d**), em PBS (pH = 7,4) a 308 K durante 24 h. $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. $[\text{ASH}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (-); $[\text{Complexo}] = 0-16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (-); 1,7 (-); 2,3 (-); 3,3 (-); 5,0 (-); 6,6 (-); 8,3 (-); 9,9 (-); 11,5 (-); 13,2 (-); 14,8 (-); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-)].



Fonte: Autora.

Os espectros de emissão para a ASH em presença de diferentes concentrações dos nitrosilos complexos, $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (Figura 49 (a)) e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (Figura 49 (b)), apresentam máximos de emissão em 335 nm, contudo com menores valores de intensidade de fluorescência. Os espectros de emissão para a ASH em presença de diferentes concentrações dos nitro complexos, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (Figura 49 (c)) e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (Figura 49 (d)), exibem deslocamentos dos máximos de emissão, de 335 nm para 342 nm, para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, e para 340 nm, para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, além de menores valores de intensidade de fluorescência, se comparados aquele em ausência dos complexos. A diminuição das intensidades de

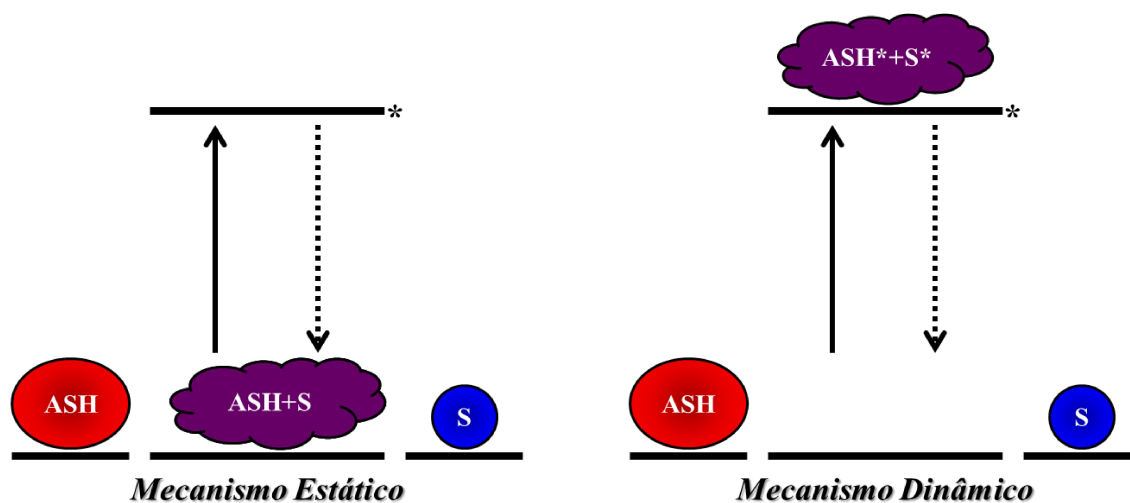
fluorescência da ASH é devido à mudanças conformacionais nos microambientes proteicos próximos aos resíduos de aminoácidos aromáticos. Assim, conclui-se que há a interação entre a ASH e os complexos (XIE *et al.*, 2021).

Então, considerando-se que há a interação entre a ASH e os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, com a finalidade de obter-se parâmetros de tais interações, utilizou-se dos espectros de supressão de fluorescência obtidos e de alguns tratamentos matemáticos (LAKOWICZ, 2006), determinando-se, portanto, os mecanismos de supressão de fluorescência, as constantes de associação e o número de sítios de ligação e, ainda, os parâmetros termodinâmicos de tais interações.

4.2.3.1. Determinação dos Mecanismos de Supressão de Fluorescência

A avaliação dos mecanismos de supressão de fluorescência da ASH em presença dos nitrosilos complexos, $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e os nitro complexos, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, é de extrema relevância, uma vez que as espécies podem interagir, basicamente, via dois mecanismos, sendo estes o mecanismo estático e o mecanismo dinâmico (Figura 50).

Figura 50 – Representação ilustrativa dos possíveis mecanismos de interação entre a ASH e o supressor (S).



Fonte: Autora.

Quando há a interação entre duas espécies via mecanismo estático (ou também denominado processo de supressão estática da fluorescência), há a colisão entre o fluoróforo e

o supressor no estado fundamental, ocasionando a formação de um complexo não fluorescente. Já quando há a interação entre duas espécies via mecanismo dinâmico (ou também denominado processo de supressão dinâmico da fluorescência), há a colisão entre o fluoróforo e o supressor no estado excitado, provocando a formação de um complexo não fluorescente, o qual retorna ao estado fundamental, conseqüentemente, sem fluorescência (LAKOWICZ, 2006).

A distinção entre os mecanismos como estático ou dinâmico se dá através da análise da Constante de Stern-Volmer (K_{SV}), a depender da temperatura. Quando há a interação entre duas espécies via mecanismo estático, a elevação da temperatura reduz a estabilidade do complexo formado e, conseqüentemente, há a diminuição do valor de K_{SV} . Já quando há a interação entre duas espécies via mecanismo dinâmico, a elevação da temperatura diminui a viscosidade do meio, propiciando a difusão do supressor em direção ao fluoróforo no estado excitado e, conseqüentemente, há o aumento do valor de K_{SV} (LAKOWICZ, 2006).

Os valores de K_{SV} foram obtidos utilizando-se a Equação 5 (Equação de Stern-Volmer),

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

em que F_0 e F são as intensidades relativas de fluorescência da ASH em ausência e em presença dos complexos, respectivamente; k_q é a constante de velocidade bimolecular de supressão; τ_0 é o tempo de vida de fluorescência médio da ASH em ausência dos complexos (10^{-8} s); $[Q]$ é a concentração dos complexos; e K_{SV} é a constante de Stern-Volmer, resultado do produto $k_q\tau_0$ (LAKOWICZ, 2006).

Os valores de F_0 e F foram corrigidos, considerando-se o Efeito do Filtro Interno (EFI), utilizando-se as Equações 6 (LAKOWICZ, 2006) e 7 (PARKER & BARNES, 1957; apud PANIGRAHI & MISHRA, 2019).

$$F_{Cor} = F_{Obs} \times 10^{(A_{exc} + A_{em})/2} \quad (6)$$

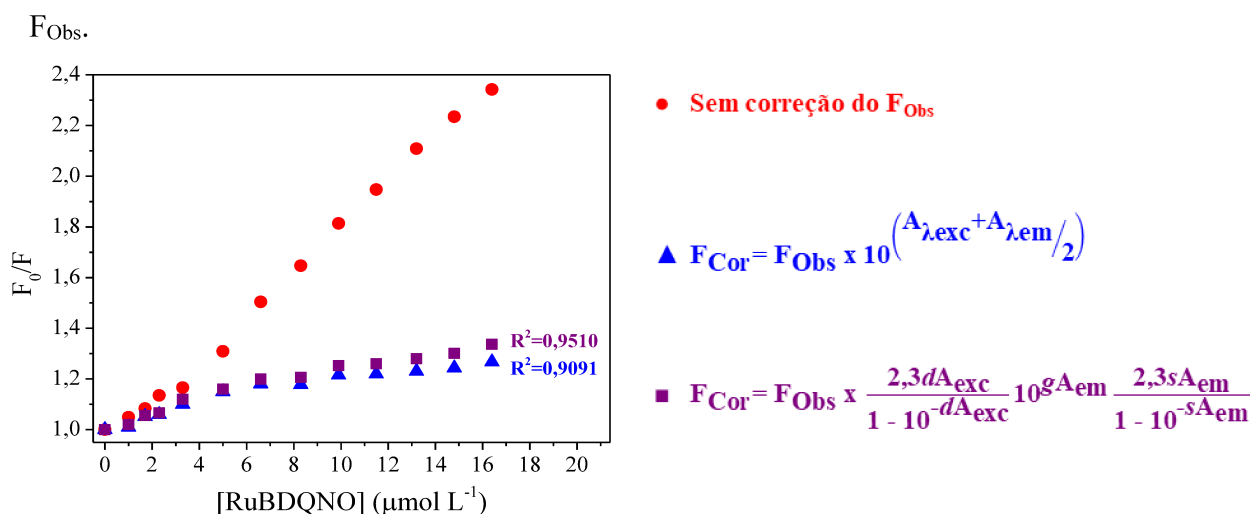
$$F_{Cor} = F_{Obs} \times \frac{2,3dA_{exc}}{1 - 10^{-dA_{exc}}} 10^{gA_{em}} \frac{2,3sA_{em}}{1 - 10^{-sA_{em}}} \quad (7)$$

em que F_{Cor} e F_{Obs} são as intensidades de fluorescência corrigidas e observadas, respectivamente; A_{exc} e A_{em} são as absorvâncias nos comprimentos de onda de excitação (neste caso, em 280 nm) e de emissão (neste caso, em 335 nm), respectivamente; d é o caminho óptico

da cubeta (1,000 cm); g é a distância entre a borda do feixe de excitação e a borda da cubeta (0,40 cm); e s é a espessura do feixe de excitação (0,10 cm) (PARKER & BARNES, 1957; apud PANIGRAHI & MISHRA, 2019; LAKOWICZ, 2006).

Os gráficos de F_0/F em função da concentração do complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, considerando-se os valores de F_0 e F corrigidos utilizando-se as Equações 6 e 7, são apresentados na Figura 51.

Figura 51 – Gráficos de Stern-Volmer sobre as interações entre a ASH e o complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ considerando-se diferentes tipos de correções para os valores de F_{Obs} .



Fonte: Autora.

Analisando-se os gráficos de F_0/F em função da concentração do complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e comparando-se os perfis lineares obtidos, observa-se que, para concentrações de complexo menores que $6,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, não há diferenças significativas entre os valores de F_0 e F corrigidos utilizando-se as diferentes equações. Entretanto, para concentrações de complexo maiores que $6,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, há diferenças entre os valores de F_0 e F corrigidos, sendo os valores obtidos utilizando-se a Equação 7 maiores, se comparados aqueles obtidos utilizando-se a Equação 6.

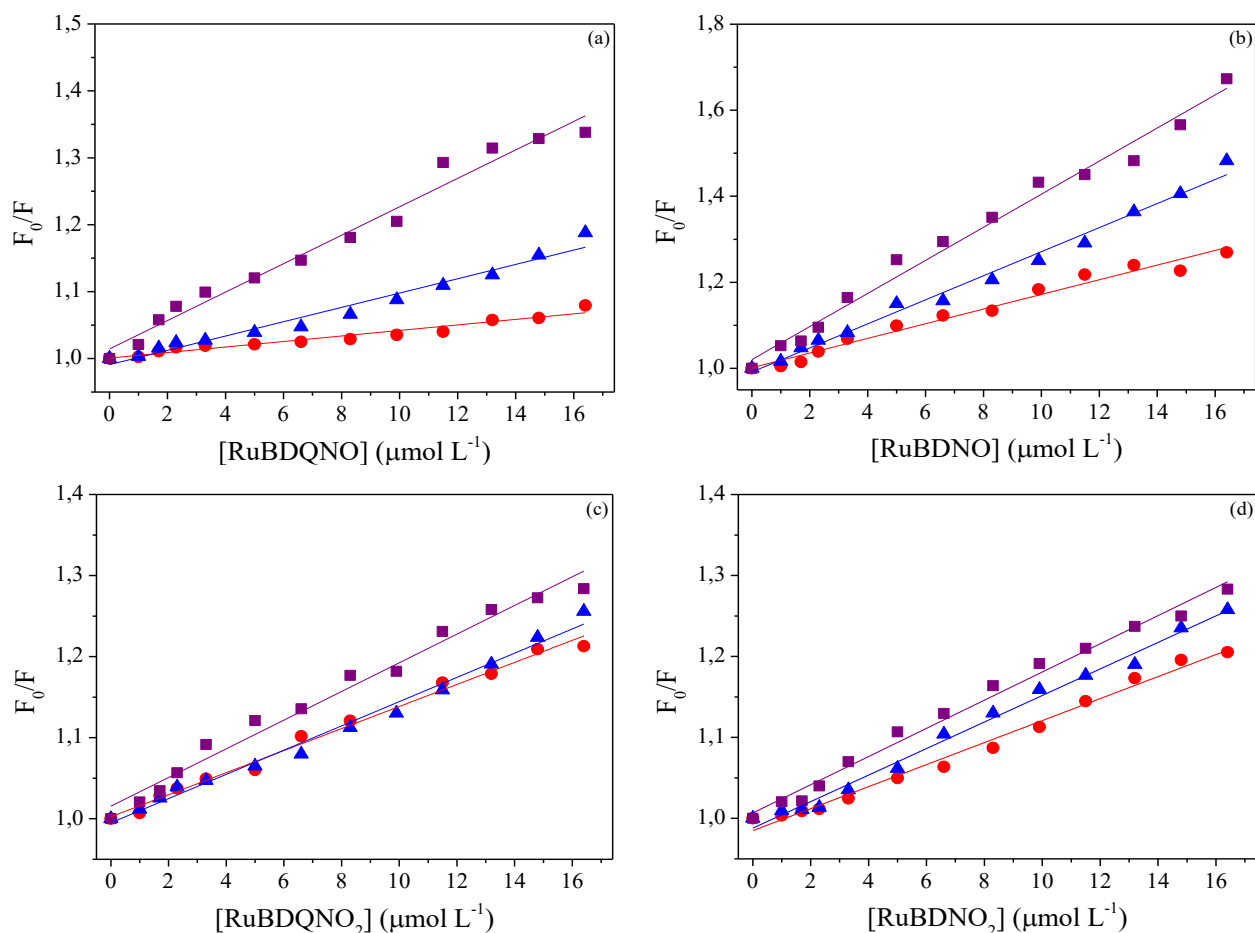
A Equação 6, descrita por Lakowicz (2006), é amplamente utilizada para a correção dos valores de intensidade de fluorescência – considerando-se o Efeito do Filtro Interno (EFI) – em estudos de supressão de fluorescência, os quais utilizam os tratamentos matemáticos de Stern-Volmer. Contudo, nesses estudos, é possível concluir que elevadas concentrações de supressor, neste caso, de complexos, ocasionam um desvio da linearidade da razão F_0/F . Entretanto, utilizando-se a Equação 7, reportada por PARKER & BARNES (1957), é possível constatar que elevados valores de absorvância proporcionam o aumento do fator de correção (R^2),

conforme observado analisando-se a Figura 51 (PANIGRAHI & MISHRA, 2019). Assim, prosseguiu-se com a correção dos valores de F_0 e F utilizando-se, somente, a Equação 7.

Os valores de F_0 e F utilizados fazem referência aos resultados obtidos após 24 h de interação entre a ASH e os complexos, considerando-se que estudos prévios indicaram o aumento dos valores de K_{SV} e de R^2 após 24 h de interação, se comparados aqueles obtidos após alguns minutos de interação (Tabela 21 – ANEXO). Então, os parâmetros de tais interações foram calculados utilizando-se, somente, os resultados de 24 h de interação entre a ASH e os complexos.

Os gráficos de F_0/F em função da concentração dos complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ são apresentados na Figura 52.

Figura 52 – Gráficos de Stern-Volmer sobre as interações entre a ASH e os complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃ (a), [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃ (b), [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ (c) e [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ (d) em PBS (pH = 7,4) a 298 K (●), 303 K (▲) e 308 K (■) durante 24 h. λ_{exc} = 280 nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm.



Fonte: Autora.

[RubdqNO] = Concentração do complexo [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃;

[RubdNO] = Concentração do complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃;

[RubdqNO₂] = Concentração do complexo [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆;

[RubdNO₂] = Concentração do complexo [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆.

Os gráficos exibem perfis lineares e, portanto, utilizando-se de regressões lineares, foram calculados os valores de K_{SV} para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e ASH–[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ em diferentes temperaturas, apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) e constantes de velocidade bimolecular de supressão (k_q) para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e ASH–[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ em diferentes temperaturas durante 24 h de interação.

Sistema	T (K)	K_{SV} (x 10 ⁴ M ⁻¹)	k_q (x 10 ¹² M ⁻¹ s ⁻¹)	R ²
ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	298	0,397 ± 0,007	0,397 ± 0,007	0,8176
	303	1,360 ± 0,205	1,360 ± 0,205	0,9521
	308	2,156 ± 0,022	2,156 ± 0,022	0,9685
ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	298	2,036 ± 0,145	2,036 ± 0,145	0,9813
	303	2,763 ± 0,019	2,763 ± 0,019	0,9726
	308	3,506 ± 0,195	3,506 ± 0,195	0,9639
ASH–[Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆	298	1,485 ± 0,007	1,485 ± 0,007	0,9889
	303	1,504 ± 0,261	1,504 ± 0,261	0,9875
	308	1,891 ± 0,259	1,891 ± 0,259	0,9612
ASH–[Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆	298	1,217 ± 0,022	1,217 ± 0,022	0,9768
	303	1,565 ± 0,140	1,565 ± 0,140	0,9749
	308	1,673 ± 0,118	1,673 ± 0,118	0,9931

Fonte: Autora.

Dados expressos como média ± desvio padrão de experimentos realizados em duplicata.

R² é o coeficiente de correlação para os valores de K_{SV} .

Os valores de K_{SV} calculados para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e ASH–[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ tendem a aumentar, com a elevação da temperatura. Tal tendência seria um indicativo de que a interação entre a ASH e os complexos se dê via mecanismo dinâmico. Porém, os valores de k_q calculados apresentam ordem de grandeza de 10¹², sendo estes superiores à taxa máxima de difusão constante da ASH, de 5x10⁹ M⁻¹ s⁻¹ (LAKOWICZ, 2006; CACITA & NIKOLAOU, 2016), o que seria um indicativo de que a interação entre a ASH e os complexos se dê via mecanismo estático.

A distinção exata entre os mecanismos como estático ou dinâmico se dá através da análise de fluorescência resolvida no tempo da ASH em ausência e presença dos complexos. Quando há a interação entre duas espécies via mecanismo estático, há a colisão entre o fluoróforo e o supressor no estado fundamental. Neste caso, a fração do fluoróforo que não está complexada não é perturbada, uma vez que a interação entre as espécies se dá no estado fundamental e, assim, os valores de tempo de vida de fluorescência da ASH no estado excitado

em ausência e presença do supressor são equivalentes entre si. Já quando há a interação entre duas espécies via mecanismo dinâmico, há a colisão entre o fluoróforo e o supressor no estado excitado. Neste outro caso, todavia, a fração do fluoróforo que não está complexada é perturbada, uma vez que a interação entre as espécies se dá no estado excitado e, então, os valores de tempo de vida de fluorescência da ASH no estado excitado em presença do supressor são inferiores, se comparados aqueles em ausência do mesmo (LAKOWICZ, 2006; CHILOM *et al.*, 2018).

As análises de fluorescência resolvida no tempo da ASH em ausência e em presença dos nitrosilos complexos, $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e dos nitro complexos, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, foram realizadas e os valores de tempo de vida de fluorescência obtidos são apresentados nas Tabelas 7, 8, 9 e 10, respectivamente.

Tabela 7 – Tempo de vida de fluorescência da ASH em função da concentração do complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$.

T (K)	[Complexo] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	A1 (%)	A2 (%)	A3 (%)	$\langle\tau\rangle$ (ns)
298	-	6,41	2,48	0,38	55,53	39,59	4,88	4,56
	6,6	6,37	2,60	0,59	52,48	39,58	7,94	4,42
	16,4	6,60	2,69	0,61	48,65	41,13	10,22	4,38
308	-	6,28	2,45	0,39	52,71	41,80	5,49	4,35
	6,6	6,48	2,67	0,64	48,03	41,69	10,29	4,29
	16,4	6,38	2,65	0,61	49,90	41,29	8,81	3,77

Fonte: Autora.

Tabela 8 – Tempo de vida de fluorescência da ASH em função da concentração do complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃.

T (K)	[Complexo] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	A1 (%)	A2 (%)	A3 (%)	$\langle\tau\rangle$ (ns)
	-	6,41	2,48	0,38	55,53	39,59	4,88	4,56
298	6,6	6,00	2,44	0,61	52,67	38,58	8,75	4,15
	16,4	5,92	2,30	0,57	53,22	37,45	9,33	4,06
	-	6,28	2,45	0,39	52,71	41,80	5,49	4,35
308	6,6	5,99	2,51	0,65	49,01	41,02	9,96	4,02
	16,4	5,92	2,38	0,62	50,56	39,18	10,26	3,98

Fonte: Autora.

Tabela 9 – Tempo de vida de fluorescência da ASH em função da concentração do complexo [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆.

T (K)	[Complexo] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	A1 (%)	A2 (%)	A3 (%)	$\langle\tau\rangle$ (ns)
	-	6,41	2,48	0,38	55,53	39,59	4,88	4,56
298	6,6	6,30	2,61	0,63	51,48	39,33	9,19	4,33
	16,4	6,06	2,52	0,63	52,58	38,27	9,14	4,21
	-	6,28	2,45	0,39	52,71	41,80	5,49	4,35
308	6,6	6,21	2,56	0,61	51,01	40,11	8,87	4,25
	16,4	5,83	2,35	0,60	53,73	37,68	8,58	4,07

Fonte: Autora.

Tabela 10 – Tempo de vida de fluorescência da ASH em função da concentração do complexo [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆.

T (K)	[Complexo] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	A1 (%)	A2 (%)	A3 (%)	$\langle\tau\rangle$ (ns)
	-	6,41	2,48	0,38	55,53	39,59	4,88	4,56
298	6,6	6,10	2,54	0,63	55,47	36,74	7,79	4,36
	16,4	6,24	2,60	0,64	50,50	39,74	9,77	4,24
	-	6,28	2,45	0,39	52,71	41,80	5,49	4,35
308	6,6	6,19	2,59	0,63	51,71	39,32	7,97	4,27
	16,4	6,09	2,53	0,64	50,48	39,99	9,53	4,14

Fonte: Autora.

Os valores de tempo de vida de fluorescência para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e ASH–[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ tendem a diminuir, com a elevação da concentração dos complexos, sustentando a afirmação de que a interação entre a ASH e os complexos se dá via mecanismo dinâmico.

4.2.3.2. Determinação da Constante de Associação (K_a) e do Número de Sítios de Ligação (n)

A avaliação da constante de associação (K_a) e, ainda, do número de sítios de ligação (n) entre a ASH e os nitrosilos complexos, [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃ e [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃ e os nitro complexos, [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆, é, também, de suma importância, uma vez que a afinidade entre a ASH e os complexos está diretamente relacionada a quão bem os mesmos serão armazenados, difundidos, metabolizados e, finalmente, excretados em condições fisiológicas.

A avaliação da afinidade entre as espécies se dá através da análise dos valores de K_a e n , a depender da temperatura. Quando há a interação entre duas espécies e os valores de K_a e n tendem a aumentar, com a elevação da temperatura, há um aumento da estabilidade da espécie formada. Já quando há a interação entre duas espécies e os valores de K_a e n tendem a diminuir, com a elevação da temperatura, há uma redução da estabilidade da espécie formada (LAKOWICZ, 2006).

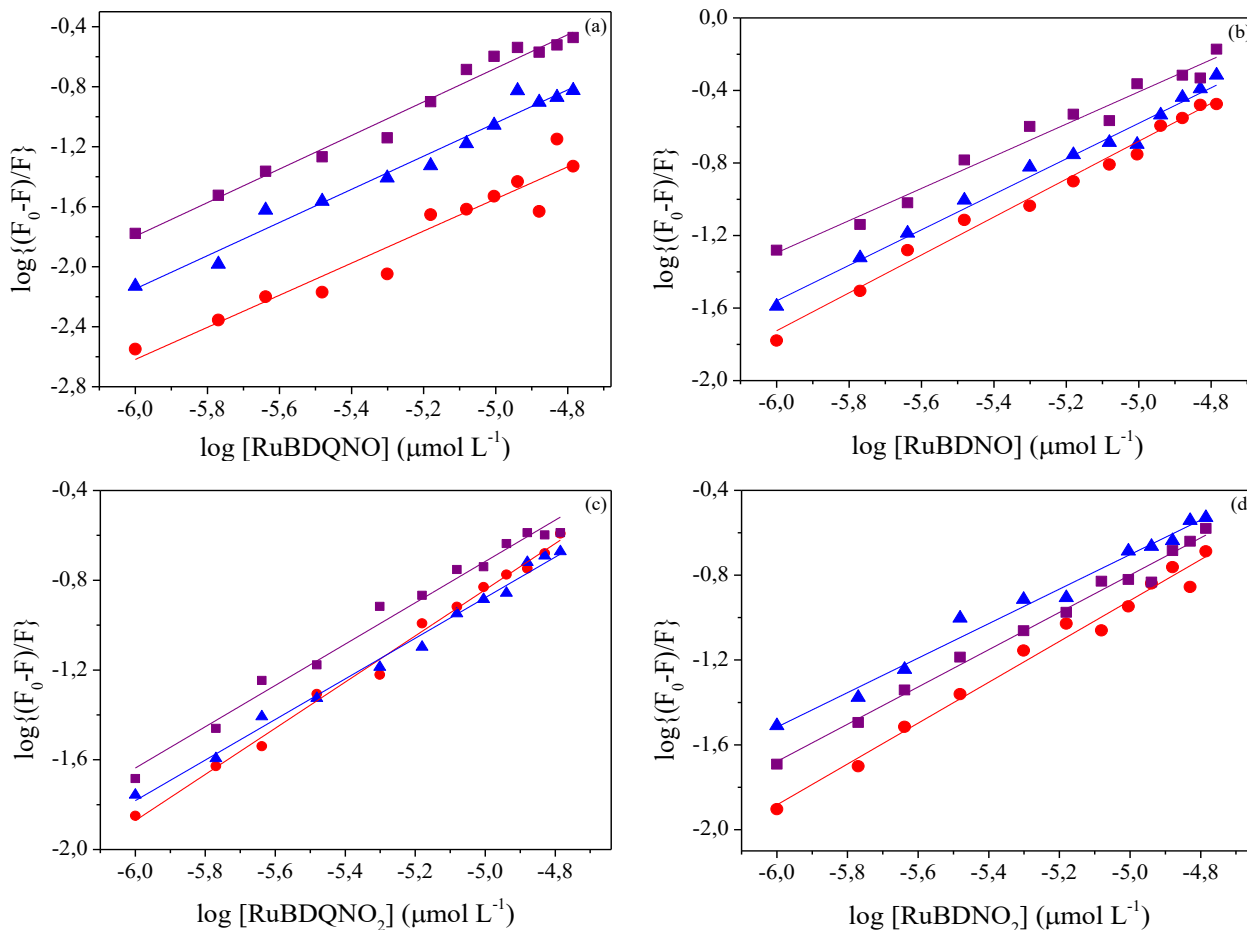
Os valores de K_a e n foram obtidos utilizando-se a Equação 8 (Equação de Stern-Volmer Modificada),

$$\log\{(F_0-F)/F\} = \log K_a + n \log [Q] \quad (8)$$

em que F_0 e F são as intensidades relativas de fluorescência da ASH em ausência e em presença dos complexos, respectivamente; K_a é a constante de interação dos complexos com a ASH; n é o número de sítios de ligação ocupados pelos complexos na estrutura proteica; e $[Q]$ é a concentração dos complexos (LAKOWICZ, 2006).

Os gráficos de $\log\{(F_0-F)/F\}$ em função do logaritmo da concentração dos complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ são apresentados na Figura 53.

Figura 53 – Gráficos de $\log\{(F_0-F)/F\}$ em função de \log $[[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3]$ (a), \log $[[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3]$ (b), \log $[[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6]$ (c) e \log $[[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6]$ (d) em PBS (pH = 7,4) a 298 K (●), 303 K (▲) e 308 K (■) durante 24 h.



Fonte: Autora.

$[\text{RubdqNO}]$ = Concentração do complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$;

$[\text{RubdNO}]$ = Concentração do complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$;

$[\text{RubdqNO}_2]$ = Concentração do complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$;

$[\text{RubdNO}_2]$ = Concentração do complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$.

Os gráficos exibem perfis lineares e, portanto, utilizando-se de regressões lineares, foram calculados os valores de K_a e n para os sistemas ASH– $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, ASH– $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, ASH– $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e ASH– $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ em diferentes temperaturas, apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Constantes de associação (K_a) e números de sítios de ligação (n) para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e ASH–[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ em diferentes temperaturas durante 24 h de interação.

Sistema	T (K)	K_a ($\times 10^3$ M ⁻¹)	n	R ²
ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	298	0,833 ± 0,041	0,86	0,8902
	303	1,452 ± 0,640	0,80	0,9774
	308	29,269 ± 1,664	1,02	0,9741
ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	298	27,533 ± 5,784	1,04	0,9817
	303	21,372 ± 4,490	0,97	0,9739
	308	5,281 ± 1,046	0,83	0,9912
ASH–[Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆	298	6,542 ± 0,532	0,90	0,9978
	303	5,033 ± 0,653	0,93	0,9824
	308	11,519 ± 3,686	0,98	0,9743
ASH–[Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆	298	0,439 ± 0,057	0,71	0,9699
	303	3,249 ± 2,020	0,84	0,9606
	308	4,416 ± 0,072	0,89	0,9885

Fonte: Autora.

Dados expressos como média ± desvio padrão de experimentos realizados em duplicata.

R² é o coeficiente de correlação para os valores de K_a e n .

Os valores de K_a e n calculados para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e ASH–[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ tendem a aumentar, com a elevação da temperatura, o que seria um indicativo de que a interação entre a ASH e os complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ se torne mais estável, a depender da temperatura. Os valores calculados para o sistema ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃ tendem a diminuir, o que seria uma sugestão de que a interação entre a ASH e o complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, contudo, se torne menos estável, a depender da temperatura.

Os valores de K_a calculados apresentam ordem de grandeza entre 10³ e 10⁴, sendo que tais valores estão em concordância com os resultados reportados na literatura sobre avaliações das interações entre a ASH e complexos de rutênio doadores de NO (da SILVA *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2021). da SILVA e colaboradores (2018) avaliaram a interação entre a ASH e dois clusters de rutênio do tipo [Ru₃(μ₃-O)(μ-OOCCH₃)₆(NO)(L)₂]PF₆ (Figura 4) – em que L₁=4-acetilpiridina e L₂=4-terc-butilpiridina. Ambos os complexos apresentaram valores de K_a

com ordem de grandeza de 10^3 . XIE e colaboradores (2021) analisaram a interação entre a ASH e um complexo de rutênio doador de NO, do tipo $[(\text{CH}_3)_4\text{N}][\text{RuCl}_3(5\text{cqn})(\text{NO})]$ ($\text{Ru}^{\text{II}}\text{-NO}^+$) (Figura 12) – em que 5cqn=5-cloro-8-quinolina. O complexo apresentou valor de K_a com ordem de grandeza de 10^4 . Outros resultados reportados na literatura sobre avaliações das interações entre a ASH e complexos polipiridínicos de rutênio demonstram que tais complexos podem apresentar valores de K_a com ordem de grandeza de 10^4 ou, a depender dos co-ligantes presentes na esfera de coordenação do metal (os quais conferem ao complexo uma estrutura pseudo-hexagonal, plana, rígida e hidrofóbica), tais valores podem apresentar ordem de grandeza de 10^1 (MASNIKOSA *et al.*, 2020).

Por meio dos valores de K_a obtidos para a interação entre a ASH e os complexos descritos no presente trabalho, é possível observar que há uma relação direta entre as estruturas dos complexos e aos modos de interação entre a ASH e os mesmos.

Em se tratando dos nitrosilos complexos, $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, conclui-se que há uma influência do co-ligante bdq no que se refere a maior estabilidade da interação ASH– $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ com a elevação da temperatura, diferentemente do que é observado para a interação ASH– $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$. Conforme reportado por BESSAS e colaboradores (2021), através de estudos via *docking* molecular, constatou-se que o complexo $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ interage, via ligações de hidrogênio e contato polar, com os resíduos de aminoácido de Ala-291 e Ser-192, sendo que o grupo carboxila ($-\text{COOH}$) do ligante bdq contribui com a interação com o resíduo de Ser-192. Verificou-se, também, que o complexo $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ interage com a ASH, sendo que o ligante terpiridina contribui com tal interação.

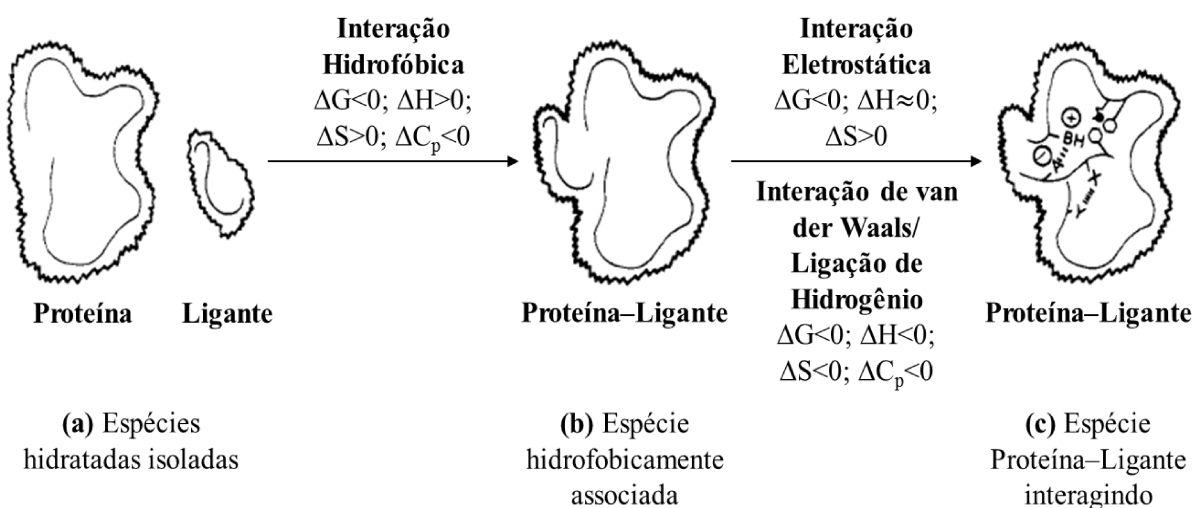
No que diz respeito aos nitro complexos, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, verificou-se que há uma maior estabilidade para ambas as interações ASH– $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e ASH– $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, sendo que os valores de K_a para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ são maiores, se comparados aqueles para o complexo $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$. Provavelmente, assim conforme anteriormente descrito para os nitrosilos complexos, há uma influência do co-ligante bdq no que tange a maior estabilidade da interação ASH– $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$.

Então, pode-se inferir que os valores de K_a para a interação entre a ASH e os nitrosilos e nitro complexos estão mais relacionadas às contribuições dos co-ligantes bdq e bd, do que àquelas para os ligantes NO^+ e NO_2^- .

4.2.3.3. Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos

A avaliação dos parâmetros termodinâmicos das interações entre a ASH e os nitrosilos complexos, $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e os nitro complexos, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, é, também, de extrema relevância, uma vez que se analisa a espontaneidade das interações $\text{ASH}-[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $\text{ASH}-[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $\text{ASH}-[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $\text{ASH}-[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e, ainda, investiga-se a natureza de tais interações, as quais proporcionam a retenção dos complexos no interior da ASH. As interações entre a ASH e os complexos podem ser via interações eletrostáticas, hidrofóbicas, van der Waals ou, ainda, via ligações de hidrogênio (Figura 54) (ROSS & SUBRAMANIAN, 1981; LAKOWICZ, 2006).

Figura 54 – Representação ilustrativa das possíveis interações entre a ASH e um ligante.



Fonte: Adaptado de ROSS & SUBRAMANIAN (1981).

A distinção entre os tipos de interação possíveis se dá por meio da análise dos sinais dos valores de variação de entalpia (ΔH) e variação de entropia (ΔS).

Os valores de ΔH e ΔS foram obtidos utilizando-se a Equação 9 (Equação de Van't Hoff),

$$\ln K_a = -(\Delta H/RT) + (\Delta S/R) \quad (9)$$

em que K_a é a constante de associação para a interação entre a ASH e os complexos; R é a constante dos gases ideais ($R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); e T é a temperatura em Kelvin (LAKOWICZ, 2006).

Os valores de ΔG foram obtidos utilizando-se a Equação 10,

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (10)$$

em que T é a temperatura em Kelvin.

Os valores das variações de entalpia ($\Delta H^\#$), entropia ($\Delta S^\#$) e energia livre de Gibbs ($\Delta G^\#$) de ativação calculados para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e ASH–[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Parâmetros termodinâmicos para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e ASH–[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆.

Sistema	T (K)	$\Delta H^\#$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta S^\#$ (J mol ⁻¹)	$\Delta G^\#$ (kJ mol ⁻¹)
	298			-15,96
ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	303	263	935	-20,64
	308			-25,31
	298			-25,57
ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	303	-122	-323	-23,96
	308			-22,34
	298			-21,52
ASH–[Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆	303	40	207	-22,55
	308			-23,59
	298			-15,80
ASH–[Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆	303	178	650	-19,05
	308			-22,30

Fonte: Autora.

Os valores de $\Delta G^\#$ calculados para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e ASH–[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆.

ASH-[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ são negativos. Assim, pode-se concluir que a interação entre a ASH e os complexos é espontânea.

Os valores de $\Delta H^\#$ e $\Delta S^\#$ calculados para os sistemas ASH-[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH-[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e ASH-[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ são positivos. Então, pode-se constatar que a interação entre a ASH e os complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ são determinadas, basicamente, por interações hidrofóbicas. Os valores de $\Delta H^\#$ e $\Delta S^\#$ calculados para o sistema ASH-[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃ são negativos. Portanto, pode-se inferir que a interação entre a ASH e o complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃ é determinada, predominantemente, por ligações de hidrogênio.

A distinção entre a natureza das interações determinadas para os complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ – sendo estas interações hidrofóbicas – e àquelas para o complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃ – sendo estas ligações de hidrogênio – é justificada considerando-se os valores de log P obtidos para os complexos.

Os resultados de log P obtidos para os complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆, [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃ e [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ são apresentados na sessão 4.1.5. Analisando-se os resultados de log P, observa-se que os complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ são mais hidrofílicos, se comparados ao complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃.

Considerando-se os complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆, sendo estes mais hidrofílicos, se comparados ao complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, justifica-se a interação entre a ASH e os mesmos via interações hidrofóbicas da seguinte forma: A ASH, quando isolada dos íons complexo, têm suas cavidades proteicas preenchidas com moléculas de solvente (H₂O). Os íons complexo [Ru(bdq)(tpy)(NO)]³⁺, [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]⁺ e [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]⁺, por serem mais hidrofílicos, interagem com inúmeras moléculas de H₂O. Para que haja as interações ASH-[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH-[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ e ASH-[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆, é necessário que ocorra o rompimento das esferas de solvatação dos íons complexo e, ainda, que os mesmos “expulsem” as moléculas de H₂O que preenchem as cavidades proteicas da ASH. Quando há o rompimento das esferas de solvatação dos íons complexo, há o consumo de energia do sistema, uma vez que a energia necessária para o rompimento das esferas de solvatação é maior, se comparadas à energia necessária para a formação das mesmas. Assim, conclui-se que se trata de um processo endotérmico, ou seja,

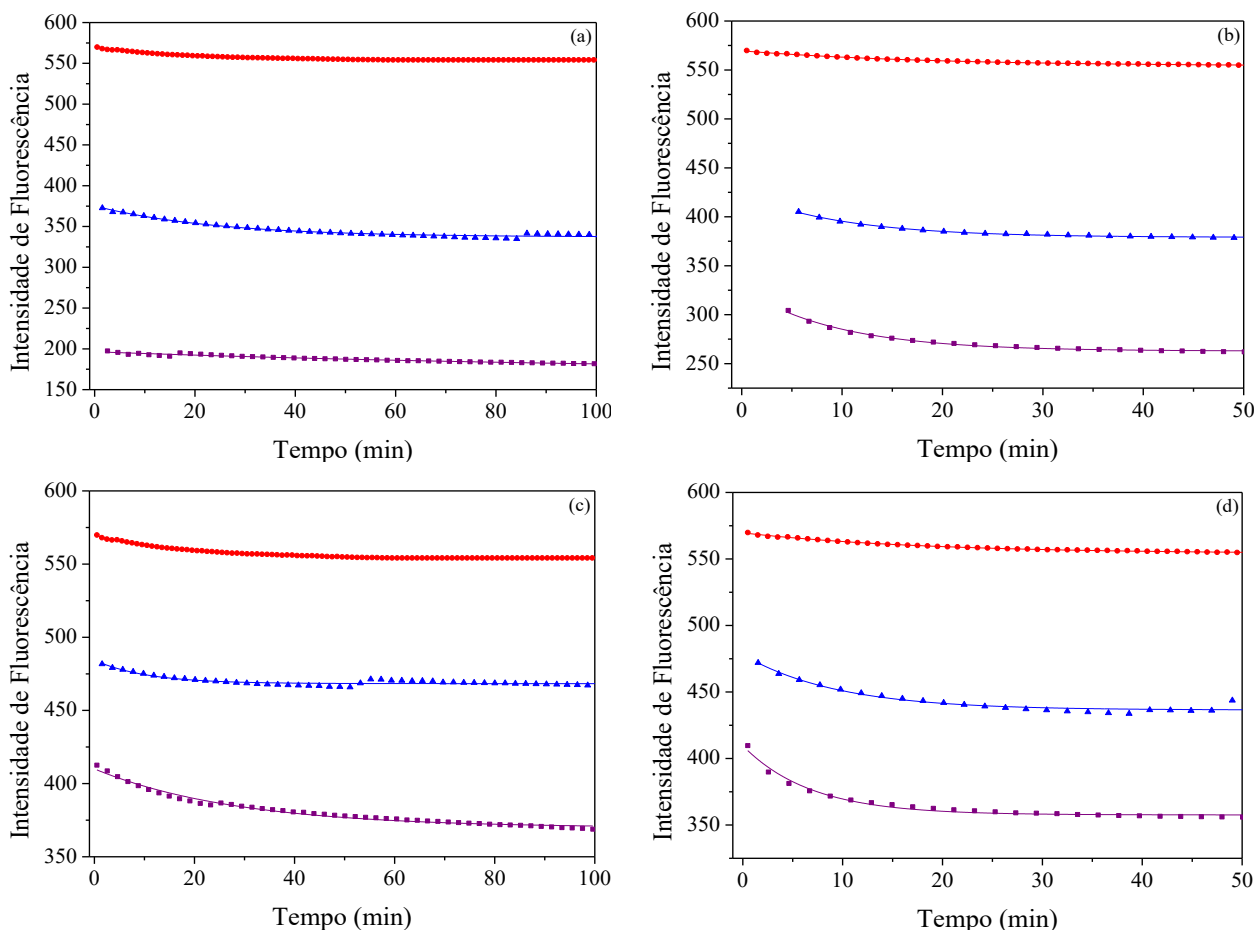
$\Delta H^\# > 0$. Quando há a “expulsão” das moléculas de H₂O que preenchem as cavidades proteicas da ASH, há o aumento dos graus de liberdade da ASH e, conseqüentemente, há um aumento do grau de desordem do sistema. Então, constata-se que se trata de um processo com o aumento da entropia do sistema, ou seja, $\Delta S^\# > 0$. Portanto, as interações hidrofóbicas tornam-se determinantes nos sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e ASH–[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆, fato este que não impede que haja outros tipos de interações nos sistemas em questão (ROSS & SUBRAMANIAN, 1981; LAKOWICZ, 2006).

Tendo em vista o complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, sendo este menos hidrofílico, se comparado aos demais complexos, justifica-se a interação entre a ASH e o mesmo via ligações de hidrogênio da seguinte maneira: O íon complexo [Ru(bd)(tpy)(NO)]³⁺, por ser menos hidrofílico, diferente dos demais íons complexo não interage com tantas moléculas de H₂O. Conseqüentemente, para que haja a interação ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃ é necessário que ocorra, somente, “expulsão” das moléculas de H₂O que preenchem as cavidades proteicas da ASH. Quando há a inserção do íon complexo na cavidade proteica da ASH, há a formação das ligações de hidrogênio entre o íon complexo e os resíduos de aminoácidos e, conseqüentemente, há tanto a liberação de energia para sistema, quanto a diminuição dos graus de liberdade da ASH. Assim, conclui-se que se trata de um processo exotérmico, ou seja, $\Delta H^\# < 0$, com a diminuição da entropia do sistema, ou seja, $\Delta S^\# < 0$. Portanto, as ligações de hidrogênio tornam-se determinantes no sistema ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, fato este que não impede que haja outros tipos de interações nos sistemas em questão (ROSS & SUBRAMANIAN, 1981; LAKOWICZ, 2006).

4.2.4. Avaliação Cinética das Interações entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) Doadores de Óxido Nítrico (NO) via Espectroscopia de Fluorescência

Com o intuito de corroborar com as discussões dos resultados de K_a , n e dos parâmetros termodinâmicos obtidos, utilizou-se a técnica de espectroscopia de fluorescência, analisando-se, mais especificamente, a intensidade de fluorescência da ASH em presença de diferentes concentrações dos complexos, em função do tempo. Os perfis cinéticos para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e ASH–[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ são apresentados na Figura 55.

Figura 55 – Perfis cinéticos para os sistemas $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (a), $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (b), $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (c) e $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (d) a 308 K. $[\text{ASH}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (–); $[\text{Complexo}] = 0$ (●); $6,6$ (▲) e $16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ (■).



Fonte: Autora.

Os perfis cinéticos obtidos para os sistemas $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ apresentam um decaimento exponencial da intensidade de fluorescência para a ASH, em função do tempo, em presença de diferentes concentrações dos complexos. Após 100 minutos, para os sistemas $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, e posterior à 50 minutos, para os sistemas $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, os valores de intensidade de fluorescência tendem a estabilizarem-se. Tal tendência seria um indicativo do equilíbrio do processo de interação entre a ASH e os complexos (SHEREEF *et al.*, 2022).

Considerando-se o decaimento exponencial da intensidade de fluorescência para a ASH em presença de diferentes concentrações dos complexos, em função do tempo, os perfis

cinéticos foram ajustados utilizando-se um modelo matemático de exponencial não linear simples, representado pela Equação 11.

$$F = F_0 + Ae^{-k/t} \quad (11)$$

em que k é a constante cinética.

Os valores de t e k calculados para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Constantes cinéticas para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ a 308 K.

Complexo	[Complexo] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	t (min)	k (min^{-1})
[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	6,6	24,41	0,041
	16,4	116,15	0,009
[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	6,6	10,06	0,099
	16,4	9,51	0,105
[Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆	6,6	10,50	0,095
	16,4	28,65	0,035
[Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆	6,6	9,47	0,106
	16,4	6,81	0,147

Fonte: Autora.

O valores de k obtidos para a ASH em presença dos complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃ e [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ tendem a diminuir com o aumento da concentração dos complexos, pois os valores de tempo de interação com a ASH (t) tendem a aumentar. Uma justificativa para tal tendência é a quantidade de espécies em solução, uma vez que ambos os complexos apresentam isômeros de posição, observados devido à duas diferentes conformações espaciais do complexo, a depender da posição do grupo carboxila (–COOH) do ligante bdq. Assim, a competição entre tais espécies reflete diretamente na tendência dos valores de k .

Os valores de k calculados para os sistemas $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ tendem a aumentar com o aumento da concentração dos complexos, pois os valores de tempo de interação com a ASH (t) tendem a diminuir. Tal tendência é uma evidência de que a interação entre as espécies é dependente da concentração de ambos os complexos.

É de suma importância ressaltar que, conforme anteriormente descrito, para os complexos os quais apresentam o ligante bdq em suas esferas de coordenação, os resultados cinéticos são um indicativo de que a velocidade de interação entre as espécies diminua devido à competição entre as várias espécies em solução. Contudo, os valores de K_a (sessão 4.2.3.2) evidenciam que, após a interação entre as espécies, há uma influência do co-ligante bdq no que tange a maior estabilidade das interações $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, se comparada àquelas para os complexos os quais apresentam o ligante bd em suas esferas de coordenação.

4.2.5. Determinação da Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET) entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) Doadores de Óxido Nítrico (NO)

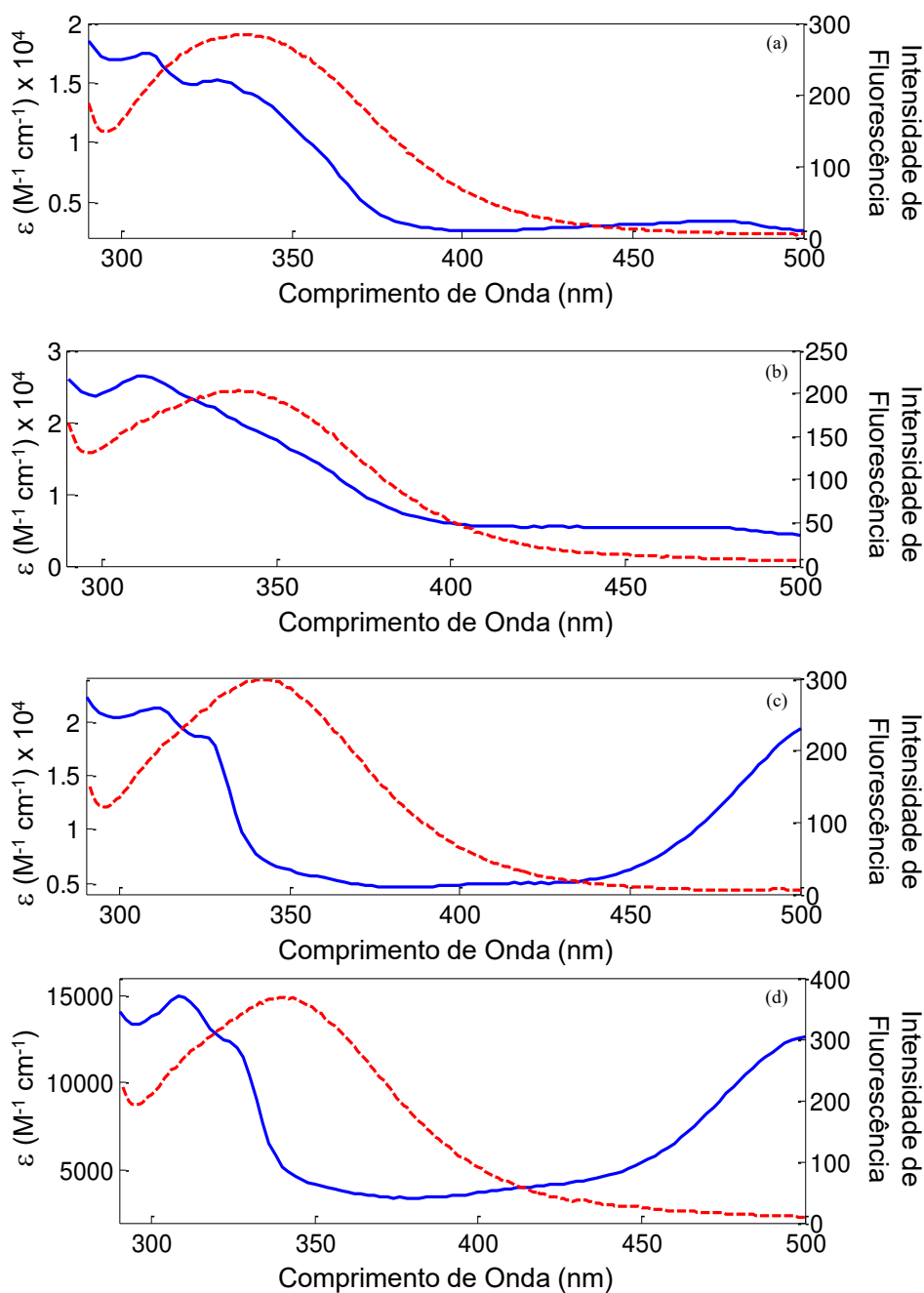
A avaliação da transferência de energia por ressonância de Förster (FRET) entre a ASH e os nitrosilos complexos, $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e os nitro complexos, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, é, também, de extrema relevância, uma vez que há a interação entre a ASH e ambos os complexos via mecanismo dinâmico e, conseqüentemente, pode haver a transferência de energia da ASH para os complexos.

A FRET é utilizada como uma “régua espectroscópica”, a qual determina a distância entre o doador – neste caso, o resíduo de Trp-214 da ASH – e o receptor – neste caso, os complexos (RANJBAR, et al., 2013). Para que seja possível a FRET, é necessário satisfazer três condições, sendo estas: 1) A molécula doadora deve emitir fluorescência; 2) os espectros de emissão do doador e absorção do receptor devem sobrepor-se; e 3) as moléculas do doador e do receptor devem estar próximas, com distância máxima de 7 nm (VALEUR & BROCHON, 1999; RANJBAR, et al., 2013).

Assim, com o objetivo de avaliar a possibilidade de FRET entre a ASH e os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, utilizou-se o *software* *ae* Fluortools. A sobreposição dos espectros de

emissão da ASH e de absorção dos complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ são apresentados na Figura 56.

Figura 56 – Sobreposição dos espectros de emissão para a ASH e de absorção para os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (a), $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (b), $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (c) e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (d), em PBS (pH = 7,4). $[\text{ASH}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (---); $[\text{Complexo}] = 11,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (—).



Fonte: Autora.

O grau de sobreposição espectral entre o espectro de emissão da ASH e de absorção dos complexos (J) foi obtido utilizando o *software* *ae* Fluortools e os valores de eficiência do processo de transferência de energia por ressonância de Förster (E), distância crítica entre o doador e o receptor em que a eficiência do processo é de 50% (R_0), distância centro a centro entre o doador e o receptor (r_0) foram obtidos conforme descrito na sessão 3.2.3.6, os quais são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Determinação de FRET para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e ASH–[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ a 308 K.

Sistema	J (x10 ¹⁴ cm ³ M ⁻¹)	R_0 (nm)	r_0 (nm)	E (%)
ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	1,417	2,57	2,59	49
ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	2,301	2,78	2,53	64
ASH–[Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆	1,420	2,59	2,66	46
ASH–[Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆	1,043	2,44	2,81	30

Fonte: Autora.

Os valores de J calculados para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e ASH–[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆, obtidos integrando-se a área de sobreposição dos espectros de emissão para a ASH e de absorção para os complexos em um intervalo de 290 a 500 nm, são de 1,417; 2,301; 1,420; e 1,043x10¹⁴ cm³ M⁻¹, respectivamente, os quais representam o grau de sobreposição espectral entre espectro de emissão da ASH e os espectro de absorção dos complexos.

Os valores de R_0 calculados para os sistemas em questão, obtidos utilizando-se $K^2 = 2/3$, $N = 1,36$, $\phi = 0,118$ e os valores de J obtidos para os mesmos, são de 2,57; 2,78; 2,59; e 2,44 nm, respectivamente, os quais representam a distância crítica entre a ASH e os complexos, onde a eficiência do processo é de 50%. (CHATTERJEE *et al.*, 2012; RANJBAR *et al.*, 2013; HASHEMPOUR *et al.*, 2020).

Os valores de r_0 calculados para os sistemas, obtidos utilizando-se $E=50\%$ e os valores de R_0 obtidos para os mesmos, são de 2,59; 2,53; 2,66 e 2,81 nm respectivamente, os quais representam a distância centro a centro entre a ASH e os complexos. Tais valores de r calculados para ambos os sistemas são inferiores à 7 nm e, ainda, estão entre $0,5R_0$ e $1,5R_0$.

Assim, conclui-se que há uma alta probabilidade de ocorrer FRET, resultando na supressão de fluorescência intrínseca da ASH (CHATTERJEE *et al.*, 2012; RANJBAR *et al.*, 2013; HASHEMPOUR *et al.*, 2020).

4.2.6. Avaliação dos Sítios de Interação entre a ASH e os Complexos Terpiridina de Rutênio(II) Doadores de Óxido Nítrico (NO) via Espectroscopia de Fluorescência Síncrona ($\Delta\lambda = 15 \text{ nm}/\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$)

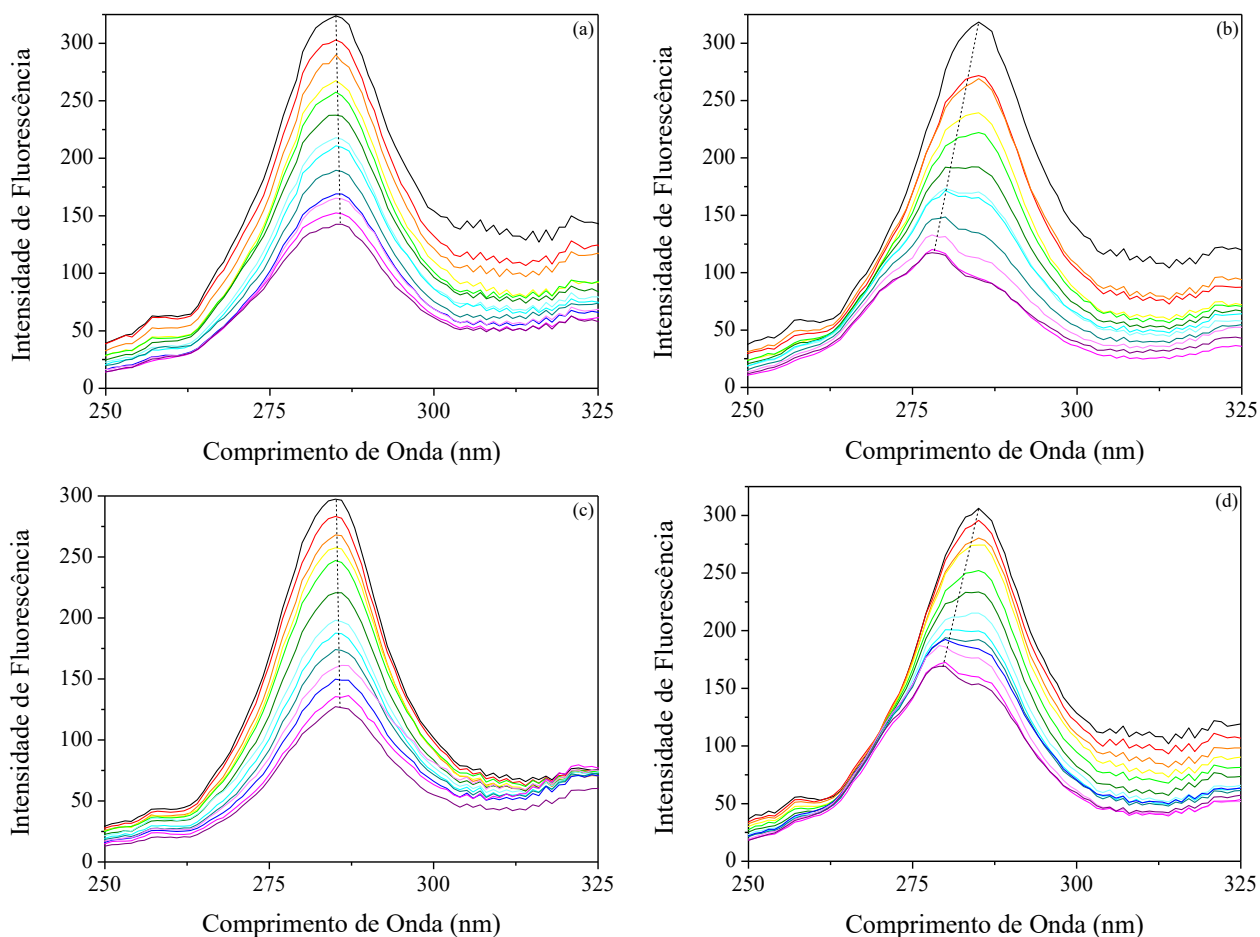
A avaliação dos sítios de interação entre a ASH e os nitrosilos complexos, $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e os nitro complexos, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, é de suma importância, uma vez que a ASH apresenta dois sítios de interação preferenciais para fármacos, sendo estes o sítio I, localizado no subdomínio IIA, e o sítio II, localizado no subdomínio IIIA (PETERS JR., 1995).

Assim, com o propósito de avaliar os sítios de interação entre a ASH e os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, analisando-se, mais especificamente, possíveis alterações nos valores de comprimento de onda máximo de emissão (λ_{em}) quando $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ e $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$, utilizou-se a técnica de espectroscopia de fluorescência síncrona.

A técnica de espectroscopia de fluorescência síncrona é utilizada para analisar-se mudanças conformacionais em microambientes proteicos específicos da ASH. Quando os valores de intervalo de varredura ($\Delta\lambda$) – onde $\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{exc}}$ – são fixados em 15 e em 60 nm, os resultados de emissão de fluorescência síncrona apresentam informações sobre mudanças conformacionais em microambientes proteicos próximos aos resíduos de Tyr e Trp-214, respectivamente (CHAVES *et al.*, 2019).

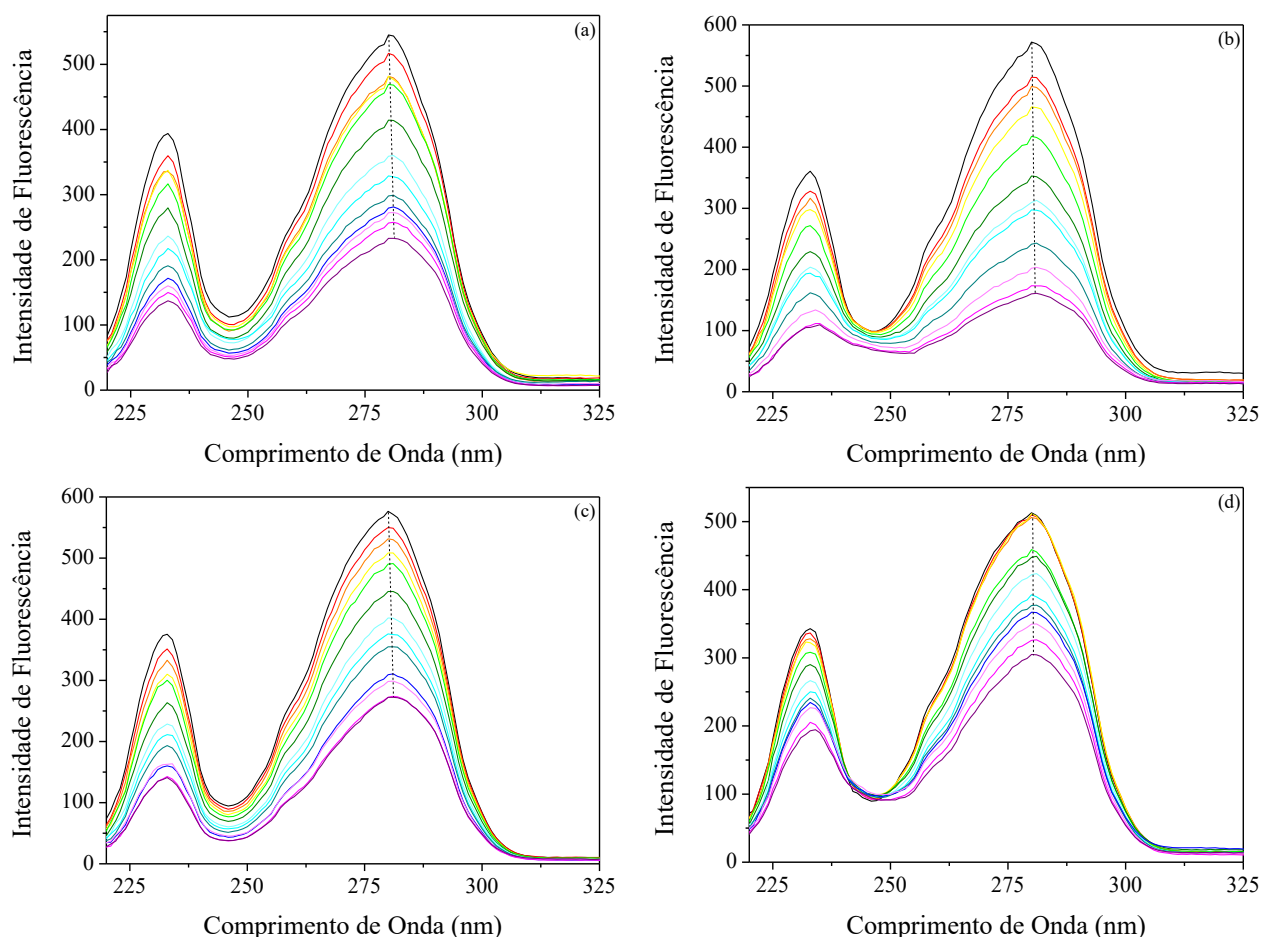
Os espectros de supressão de fluorescência síncrona obtidos para a ASH em presença dos nitrosilos complexos, $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e dos nitro complexos, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, quando $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ e $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$, são apresentados nas Figuras 57 e 58, respectivamente.

Figura 57 – Espectros de supressão de fluorescência síncrona ($\Delta\lambda = 15$ nm) para a ASH em presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (a), $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (b), $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (c) e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (d), em PBS (pH = 7,40) a 308 K durante 24 h. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. $[\text{ASH}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (-); $[\text{Complexo}] = 0-16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (-); 1,7 (-); 2,3 (-); 3,3 (-); 5,0 (-); 6,6 (-); 8,3 (-); 9,9 (-); 11,5 (-); 13,2 (-); 14,8 (-); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-)].



Fonte: Autora.

Figura 58 – Espectros de supressão de fluorescência síncrona ($\Delta\lambda = 60$ nm) para a ASH em presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (a), $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (b), $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (c) e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ (d), em PBS (pH = 7,40) a 308 K durante 24 h. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. $[\text{ASH}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (-); $[\text{Complexo}] = 0-16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (-); 1,7 (-); 2,3 (-); 3,3 (-); 5,0 (-); 6,6 (-); 8,3 (-); 9,9 (-); 11,5 (-); 13,2 (-); 14,8 (-); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-)].



Fonte: Autora.

O espectro de emissão para a ASH em ausência dos complexos, quando $\Delta\lambda = 15$ nm, apresenta um máximo de emissão em 285 nm, atribuída à emissão dos resíduos de Tyr. Os espectros sincronizados para a ASH em presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ também apresentam um máximo de emissão em 285 nm, contudo com menores valores de intensidade de fluorescência. Como não foram observadas alterações nos valores de comprimento de onda máximo de emissão para a ASH em presença dos complexos, conclui-se que os mesmos não proporcionam mudanças conformacionais nos microambientes proteicos próximos aos resíduos de Tyr.

Os espectros sincronizados para a ASH em presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, em contrapartida, exibem alterações nos valores de comprimento de onda máximo de emissão para a ASH, de 285 para 278 nm, para ambos os complexos. Tal alteração, para a região do azul, indica que os complexos propiciam mudanças conformacionais nos microambientes proteicos próximos aos resíduos de Tyr, e, além disso, que os resíduos de aminoácidos ao redor dos mesmos se encontram em um microambiente hidrofóbico e estão menos expostos ao solvente (RANJBAR *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2017). A inserção dos complexos em um microambiente hidrofóbico é justificada considerando-se os valores de log P para os mesmos, pois estes são mais hidrofóbicos, se comparados aos complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$.

O espectro de emissão para a ASH em ausência dos complexos, quando $\Delta\lambda = 60$ nm, apresenta um máximo de emissão em 280 nm, atribuída à emissão do resíduo de Trp-214. Os espectros sincronizados para a ASH em presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ também apresentam um máximo de emissão em 280 nm, entretanto com menores valores de intensidade de fluorescência, se comparados aquele em ausência dos complexos. Como não foram observadas alterações nos valores de comprimento de onda máximo de emissão para a ASH em presença dos complexos, constata-se que os mesmos não proporcionam mudanças conformacionais nos microambientes proteicos próximos ao resíduo de Trp-214.

Os espectros sincronizados para a ASH em presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ exibem alterações discretas nos valores de comprimento de onda máximo de emissão para a ASH, de 280 para 281 nm, para ambos os complexos. Tal alteração, para a região do vermelho, indica que os complexos propiciam mudanças conformacionais nos microambientes proteicos próximos ao resíduo de Trp-214 e, além disso, que os resíduos de aminoácidos ao redor dos mesmos se encontram em um microambiente hidrofílico e estão mais expostos ao solvente (RANJBAR *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2017). A inserção dos complexos em um microambiente hidrofílico é justificada, também, considerando-se os valores de log P para os mesmos, pois estes são mais hidrofílicos, se comparados aos complexos $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$.

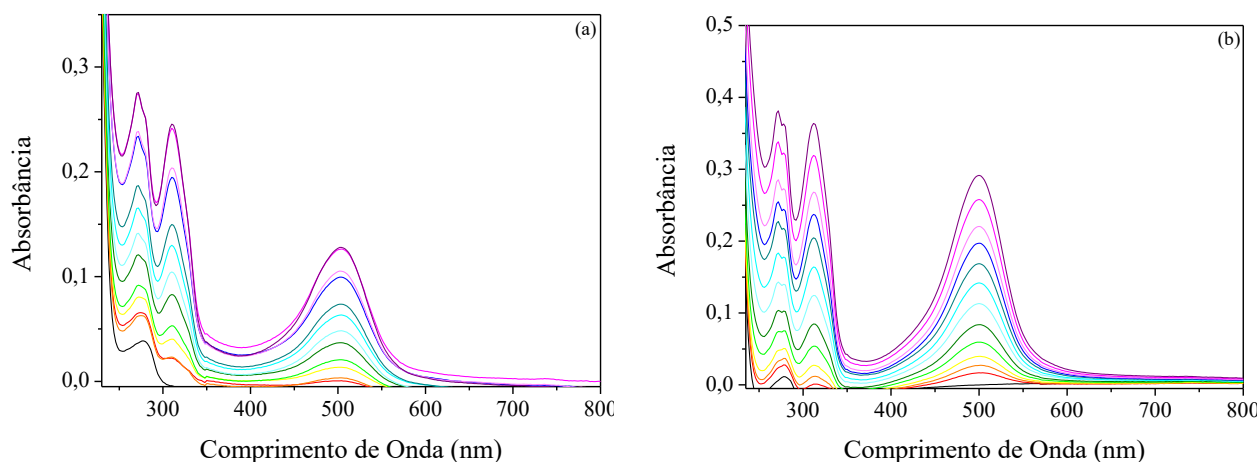
4.3. Avaliação das Interações entre a ASH e os Aqua Complexos Terpiridina de Rutênio(II)

Considerando-se que os nitrosilos complexos, $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, e os nitro complexos, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, são potenciais doadores de óxido nítrico (NO) em meio biológico, a avaliação das interações entre a ASH e os possíveis produtos da liberação do NO, sendo estes os aqua complexos terpiridina de rutênio(II) do tipo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (de LIMA *et al.*, 2006), são parâmetros de extrema relevância, uma vez que a afinidade entre a ASH e tais complexos está diretamente relacionada a quão bem os mesmos serão, difundidos, metabolizados e, finalmente, excretados em condições fisiológicas, após a liberação do NO.

Assim, com a finalidade de avaliar as interações entre a ASH e os aqua complexos, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, utilizou-se das mesmas técnicas anteriormente descritas para os nitrosilos e nitro complexos. Além das análises espectroscópicas, foram realizadas análises eletroquímicas, mais especificamente, análises via voltametria de pulso diferencial (VPD).

Inicialmente, utilizou-se a técnica de espectroscopia na região do UV/Visível. Os espectros de absorção na região do UV/Visível obtidos para a ASH em presença dos aqua complexos, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, são apresentados na Figura 59.

Figura 59 – Espectros de absorção na região do UV/Vis. para a ASH e os complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (a) e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (b), em PBS (pH = 7,4) a 308 K durante 24 h. $[\text{ASH}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (-); $[\text{Complexo}] = 0-16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (-); 1,7 (-); 2,3 (-); 3,3 (-); 5,0 (-); 6,6 (-); 8,3 (-); 9,9 (-); 11,5 (-); 13,2 (-); 14,8 (-); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-)].

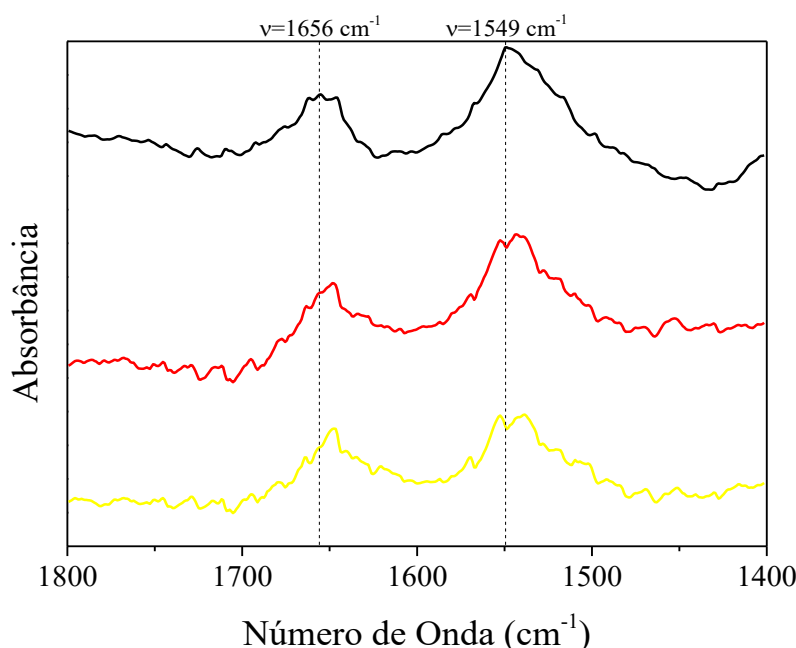


Fonte: Autora.

Assim, conforme observado para os nitrosilos e nitro complexos, analisando-se os espectros de absorção para a ASH em presença de diferentes concentrações dos aqua complexos, conclui-se que não há alterações nos perfis espectrais após a adição dos complexos. Então, verifica-se que apenas os resultados obtidos via técnica de UV/Visível são insuficientes para inferir se há ou não a interação entre a ASH e os aqua complexos.

Portanto, com o intuito de avaliar as interações entre a ASH e os complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, utilizou-se a técnica de espectroscopia na região do IV. Os espectros vibracionais obtidos para a ASH em presença dos aqua complexos, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, são apresentados na Figura 60.

Figura 60 – Espectros vibracionais na região do IV para a ASH em ausência (–) e em presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (–) e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (–).



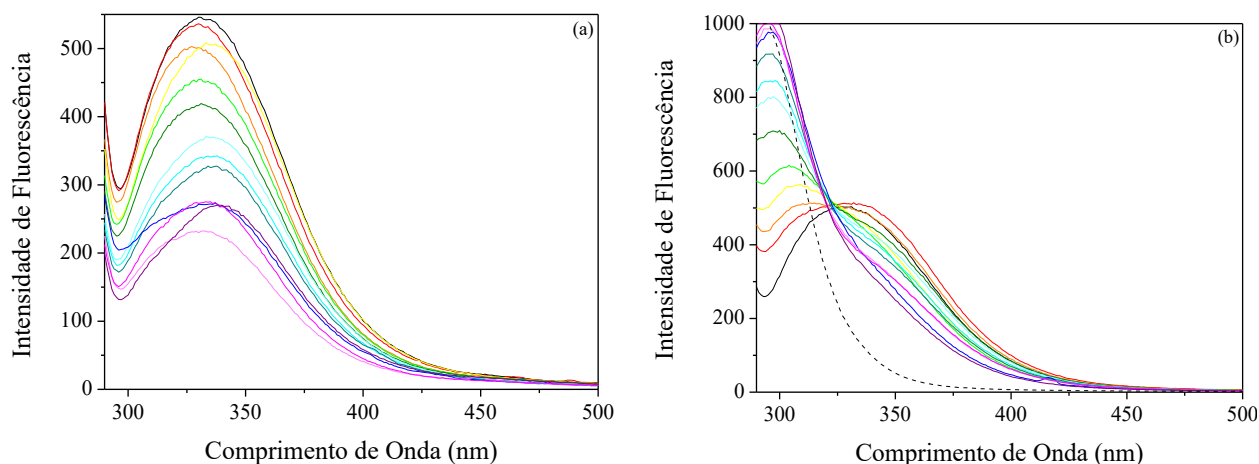
Fonte: Autora.

Em presença dos aqua complexos, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, os espectros vibracionais obtidos para a ASH apresentam alterações tanto no estiramento atribuído à amida I, quanto no estiramento caracterizado pela amida II. No caso do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, houve os deslocamentos de 1656 cm^{-1} para 1648 cm^{-1} ($\Delta\nu = 8 \text{ cm}^{-1}$), e de 1549 cm^{-1} para 1543 cm^{-1} ($\Delta\nu = 6 \text{ cm}^{-1}$). No caso do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, houve os deslocamentos de 1656 cm^{-1} para 1647 cm^{-1} ($\Delta\nu = 9 \text{ cm}^{-1}$), e de 1549 cm^{-1} para 1539 cm^{-1} ($\Delta\nu = 10 \text{ cm}^{-1}$).

Tais alterações nos perfis espectrais da ASH em presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ são devido a mudanças conformacionais na estrutura secundária da ASH. Assim, como foram observadas alterações nos perfis espectrais após a adição dos complexos, tem-se um indicativo de que há a interação entre a ASH e os mesmos (HUANG *et al.*, 2016).

Então, considerando-se que há a interação entre a ASH e os aqua complexos, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, com o objetivo de obter-se parâmetros de tais interações, utilizou-se dos espectros de supressão de fluorescência obtidos e dos tratamentos matemáticos anteriormente apresentados (4.2.3) (LAKOWICZ, 2006). Os espectros de supressão de fluorescência obtidos para a ASH em presença dos aqua complexos, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, são apresentados na Figura 61.

Figura 61 – Espectros de supressão de fluorescência da ASH em presença dos complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (a) e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (b), em PBS (pH = 7,4) a 308 K durante 24 h. $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. $[\text{ASH}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (–); $[\text{Complexo}] = 0-16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (–); 1,7 (–); 2,3 (–); 3,3 (–); 5,0 (–); 6,6 (–); 8,3 (–); 9,9 (–); 11,5 (–); 13,2 (–); 14,8 (–); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (–)]. (---) $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2 = 16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$.



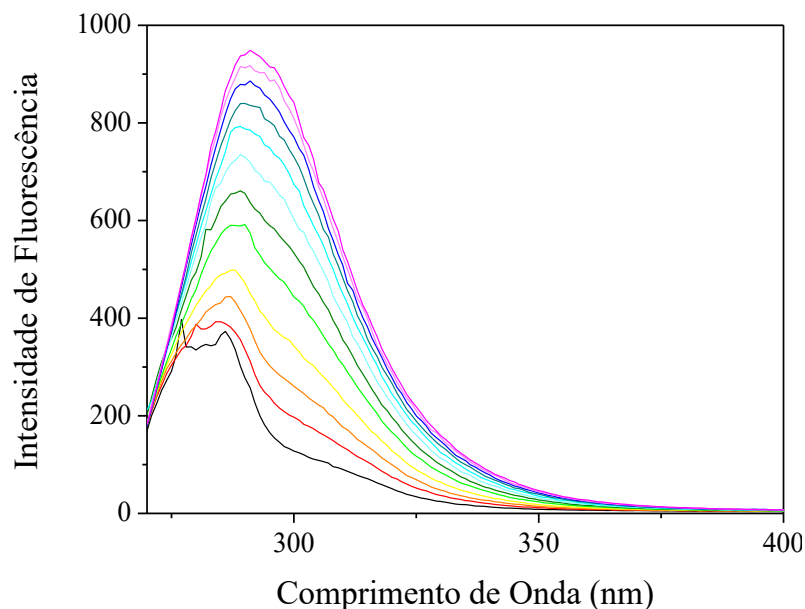
Fonte: Autora.

Semelhante ao observado para os nitrosilos e nitro complexos, os espectros de emissão para a ASH em presença de diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (Figura 61 (a)) apresentam máximos de emissão em 335 nm, contudo com menores valores de intensidade de fluorescência. A diminuição das intensidades de fluorescência da ASH é devido à mudanças conformacionais nos microambientes proteicos próximos aos resíduos de aminoácidos aromáticos. Assim, conclui-se que há a interação entre a ASH e o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$.

Os espectros de emissão para a ASH em presença de diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (Figura 61 (b)) apresentam uma tendência de diminuição das intensidades de fluorescência da ASH, entretanto os máximos de emissão são intrínsecos ao complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$.

Tendo em vista a fluorescência intrínseca ao complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, as intensidades relativas de fluorescência da ASH em presença do mesmo foram corrigidas, considerando-se os valores de intensidade de fluorescência observadas para cada uma das concentrações do complexo utilizadas (1,0-16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (Figura 62).

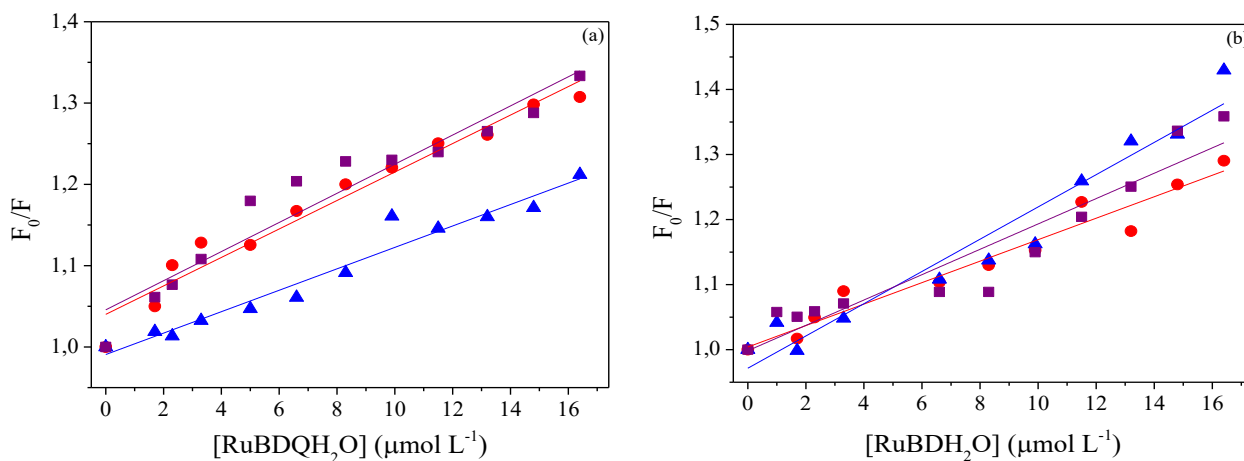
Figura 62 – Espectros de fluorescência para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ em PBS ($\text{pH} = 7,4$) a 308 K. $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. $[\text{Complexo}] = 1-16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (-); 1,7 (-); 2,3 (-); 3,3 (-); 5,0 (-); 6,6 (-); 8,3 (-); 9,9 (-); 11,5 (-); 13,2 (-); 14,8 (-); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-)].



Fonte: Autora.

Os gráficos de F_0/F em função da concentração dos complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, utilizados para a determinação dos valores de K_{SV} , e os gráficos de $\log\{(F_0-F)/F\}$ em função do logaritmo da concentração dos complexos, utilizados para a determinação dos valores de K_a e n , são apresentados nas Figuras 63 e 64.

Figura 63 – Gráficos de Stern-Volmer sobre as interações entre a ASH e os complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (a) e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (b) em PBS (pH = 7,4) a 298 K (●), 303 K (▲) e 308 K (■) durante 24 h. $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm.

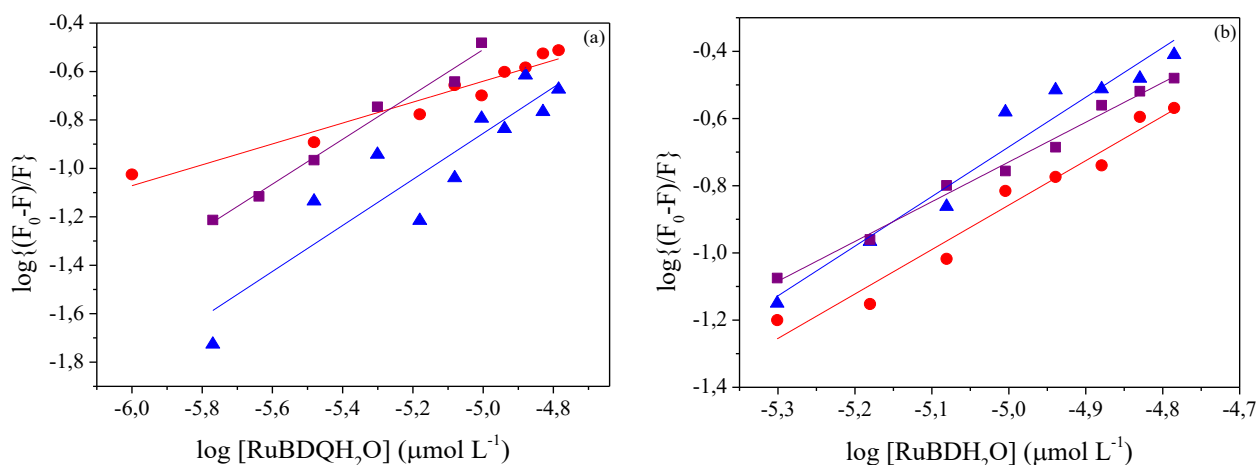


Fonte: Autora.

$[\text{RubdqH}_2\text{O}]$ = Concentração do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$;

$[\text{RubdH}_2\text{O}]$ = Concentração do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$.

Figura 64 – Gráficos de $\log\{(F_0-F)/F\}$ em função de $\log [\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (a) e $\log [\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (b) em PBS (pH = 7,4) a 298 K (●), 303 K (▲) e 308 K (■) durante 24 h.



Fonte: Autora.

$[\text{RubdqH}_2\text{O}]$ = Concentração do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$;

$[\text{RubdH}_2\text{O}]$ = Concentração do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$.

Utilizando-se de regressões lineares, foram calculados os valores de K_{SV} , K_a e n para os sistemas ASH– $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e ASH– $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ em diferentes temperaturas, apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) e constantes de associação (K_a) para os sistemas $ASH-[Ru(H_2O)(bdq)(tpy)](PF_6)_2$ e $ASH-[Ru(H_2O)(bd)(tpy)](PF_6)_2$ em diferentes temperaturas durante 24 h de interação.

Sistema	T (K)	K_{SV} (x 10^4 M ⁻¹)	R^2	K_a (x 10^3 M ⁻¹) / n	R^2
$ASH-[Ru(H_2O)(bdq)(tpy)](PF_6)_2$	298	1,775 ± 0,114	0,9373	0,034 ± 0,002 / 0,43	0,9319
	303	1,321 ± 0,856	0,9210	7,678 ± 0,375 / 0,97	0,8082
	308	1,555 ± 0,250	0,9612	13,570 ± 0,548 / 0,99	0,9798
$ASH-[Ru(H_2O)(bd)(tpy)](PF_6)_2$	298	1,437 ± 0,321	0,9292	298,558 ± 4,861 / 1,28	0,9591
	303	2,184 ± 0,490	0,9646	1307,401 ± 149,686 / 1,45	0,9453
	308	2,114 ± 0,448	0,9415	35,952 ± 2,924 / 1,08	0,9398

Fonte: Autora.

Dados expressos como média ± desvio padrão de experimentos realizados em duplicata.

R^2 é o coeficiente de correlação para os valores de K_{SV} e K_a .

Os valores de K_{SV} calculados para os sistemas $ASH-[Ru(H_2O)(bdq)(tpy)](PF_6)_2$ e $ASH-[Ru(H_2O)(bd)(tpy)](PF_6)_2$ tendem a manter-se inalteráveis, considerando-se os valores de desvio padrão para as médias, mesmo com a elevação da temperatura. Tal tendência seria um indicativo de que a interação entre a ASH e os complexos se dê via mecanismo estático. Além disso, os valores de k_q calculados apresentam ordem de grandeza de 10^{12} , sendo estes superiores à taxa máxima de difusão constante da ASH, de 5×10^9 M⁻¹ s⁻¹ (LAKOWICZ, 2006; CACITA & NIKOLAOU, 2016). Tal afirmação seria mais um indicativo de que a interação entre a ASH e os complexos se dê via mecanismo estático.

Com o propósito de fazer a distinção exata entre os mecanismos como estático ou dinâmico, as análises de fluorescência resolvida no tempo da ASH em ausência e em presença dos aqua complexos, $[Ru(H_2O)(bdq)(tpy)](PF_6)_2$ e $[Ru(H_2O)(bd)(tpy)](PF_6)_2$, foram realizadas e os valores de tempo de vida de fluorescência obtidos são apresentados nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16 – Tempo de vida de fluorescência da ASH em função da concentração do complexo [Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂.

T (K)	[Complexo] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	A1 (%)	A2 (%)	A3 (%)	$\langle\tau\rangle$ (ns)
298	-	6,41	2,48	0,38	55,53	39,59	4,88	4,56
	6,6	6,08	2,54	0,63	51,81	38,20	9,98	4,18
	16,4	5,72	2,31	0,57	42,40	45,64	11,97	2,62
308	-	6,28	2,45	0,39	52,71	41,80	5,49	4,35
	6,6	6,05	2,56	0,62	50,16	39,93	9,91	4,11
	16,4	5,62	2,28	0,58	42,29	45,66	12,05	3,49

Fonte: Autora.

Tabela 17 – Tempo de vida de fluorescência da ASH em função da concentração do complexo [Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂.

T (K)	[Complexo] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	A1 (%)	A2 (%)	A3 (%)	$\langle\tau\rangle$ (ns)
298	-	6,41	2,48	0,38	55,53	39,59	4,88	4,56
	6,6	6,36	2,69	0,63	51,33	39,94	8,73	4,38
	16,4	6,23	2,67	0,67	52,50	38,47	9,03	4,36
308	-	6,28	2,45	0,39	52,71	41,80	5,49	4,35
	6,6	5,86	2,47	0,63	55,32	36,06	8,62	4,18
	16,4	6,23	2,70	0,67	49,97	40,36	9,66	4,26

Fonte: Autora.

Os valores de tempo de vida de fluorescência para os sistemas ASH–[Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ e ASH–[Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂ tendem a diminuir, com a elevação da concentração dos complexos. Tal tendência seria um indicativo de que a interação entre a ASH e os complexos se dê via mecanismo dinâmico (LAKOWICZ, 2006; CACITA & NIKOLAOU, 2016). Assim, conclui-se, em presença dos aqua complexos, [Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ e [Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂, há a contribuição de ambos os mecanismos de supressão de fluorescência da ASH, estático e dinâmico.

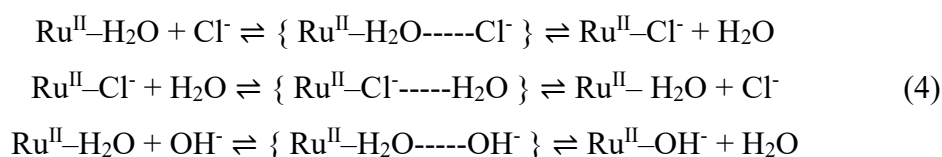
Os valores de K_a e n calculados para o sistema ASH–[Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ tendem a aumentar, com a elevação da temperatura, o que seria um indicativo de que a interação entre a ASH e o complexo se torne mais estável, a depender da temperatura. Contudo, os valores

calculados para o sistema $\text{ASH}-[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ tendem a diminuir, o que seria uma sugestão de que a interação entre a ASH e o complexo se torne menos estável, a depender da temperatura.

Diferentemente dos resultados obtidos para os nitrosilos e os nitro complexos, os valores de K_{SV} – tanto para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, quanto para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ – e os valores de K_a para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ não apresentam tendências bem definidas, bem como não exibem altos valores de fator de correção (R^2). Tais resultados são observados, possivelmente, devido à mistura de diferentes espécies em solução, tanto para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, quanto para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$.

Para a avaliação das interações entre a ASH e os aqua complexos, utiliza-se de uma solução tampão fosfato salino (PBS). A presença de íons cloreto (Cl^-) em solução, uma vez que na preparação do PBS adiciona-se $0,026 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $1,37 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl , propicia a conversão parcial das espécies aqua à espécies cloreto. As espécies aqua, por sua vez, são parcialmente convertidas às espécies hidróxido, conforme descrito pelos resultados obtidos via CLAE (sessão 3.2.2.3), proporcionando, assim, uma mistura de diferentes espécies em solução, para ambos os complexos (Esquema 3).

Esquema 3 – Representação simplificada da conversão das espécies aqua (H_2O) a cloreto (Cl^-) e hidróxido (OH^-) em complexos de rutênio(II).



As espécies aqua, cloreto e hidróxido, provavelmente, competem entre si, a fim de inserirem-se nos arcabouços proteicos da ASH. A competição entre tais espécies, então, reflete diretamente nos valores das constantes e dos fatores de correção (R^2).

Após a determinação dos valores de K_{SV} , K_a e n , semelhante ao reportado para os nitrosilos e nitro complexos, foram calculados os valores de das variações de entalpia (ΔH^\ddagger), entropia (ΔS^\ddagger) e energia livre de Gibbs (ΔG^\ddagger) de ativação para os sistemas $\text{ASH}-[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $\text{ASH}-[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 – Parâmetros termodinâmicos para os sistemas ASH–[Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ e ASH–[Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂.

Sistema	T (K)	$\Delta H^\#$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta S^\#$ (J mol ⁻¹)	$\Delta G^\#$ (kJ mol ⁻¹)
ASH–[Ru(H ₂ O)(bdq)(tpy)](PF ₆) ₂	298			-10,95
	303	463	1589	-18,90
	308			-26,84
ASH–[Ru(H ₂ O)(bd)(tpy)](PF ₆) ₂	298			-32,91
	303	-148	-387	-30,98
	308			-29,04

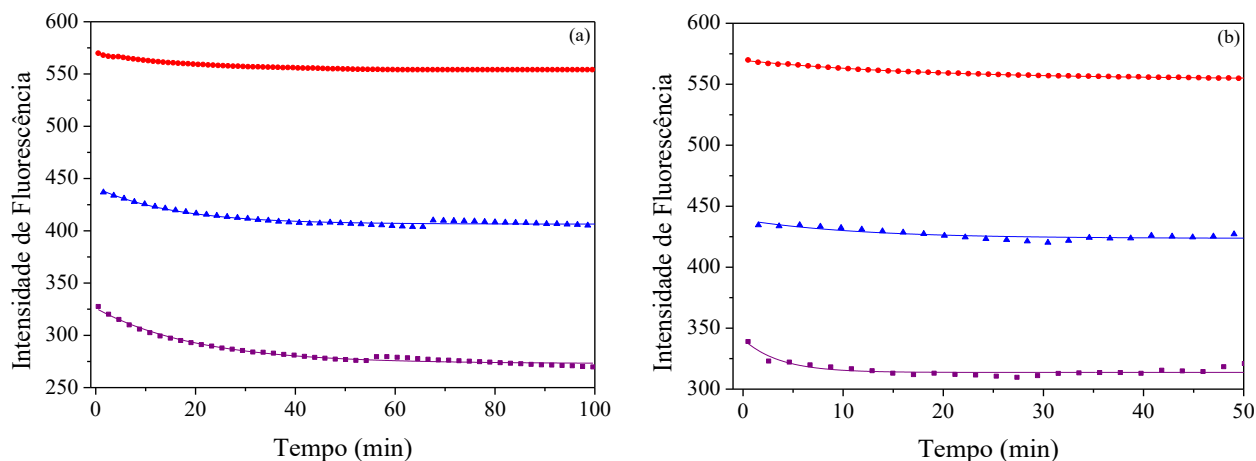
Fonte: Autora.

Os valores de $\Delta G^\#$ calculados para os sistemas ASH–[Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ e ASH–[Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂ são negativos. Assim, pode-se concluir que a interação entre a ASH e os complexos é espontânea.

Os valores de $\Delta H^\#$ e $\Delta S^\#$ calculados para os sistemas ASH–[Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂, são positivos. Então, pode-se constatar que a interação entre a ASH e o complexo é determinada, basicamente, por interações hidrofóbicas. Os valores de $\Delta H^\#$ e $\Delta S^\#$ calculados para o sistema ASH–[Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂ são negativos. Portanto, pode-se inferir que a interação entre a ASH e o complexo é determinada, predominantemente, por ligações de hidrogênio. Entretanto, é de extrema relevância ressaltar que as sugestões das possíveis naturezas das interações entre a ASH e os aqua complexos são uma estimativa, já que, para ambas as espécies, há uma mistura entre as espécies aqua, cloreto e hidróxido em solução.

Posterior à determinação dos valores de K_{SV} , K_a , n e dos parâmetros termodinâmicos, conforme descrito para os nitrosilos e nitro complexos, com a finalidade de avaliar cinética das interações entre a ASH e aqua complexos, [Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ e [Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂, utilizou-se a técnica de espectroscopia de fluorescência, analisando-se, mais especificamente, a intensidade de fluorescência da ASH em presença de diferentes concentrações dos complexos, em função do tempo. Os perfis cinéticos para os sistemas ASH–[Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ e ASH–[Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂ são apresentados na Figura 65.

Figura 65 – Perfis cinéticos para os sistemas $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (a) e $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (b) a 308 K. $[\text{ASH}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (—); $[\text{Complexo}] = 0$ (●); 6,6 (▲) e 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (■).



Fonte: Autora.

Semelhante ao observado para os nitrosilos e nitro complexos, os perfis cinéticos obtidos para os sistemas $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ apresentam um decaimento exponencial da intensidade de fluorescência para a ASH, em função do tempo, em presença de diferentes concentrações dos complexos. Após 100 minutos, para o sistema $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, e posterior à 50 minutos, para o sistema $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, os valores de intensidade de fluorescência tendem a estabilizarem-se. Tal tendência seria um indicativo do equilíbrio do processo de interação entre a ASH e os complexos (SHEREEF *et al.*, 2022).

Os valores de t e k calculados para os sistemas $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $\text{ASH}[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 – Constantes cinéticas para os sistemas ASH–[Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ e ASH–[Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂ a 308 K.

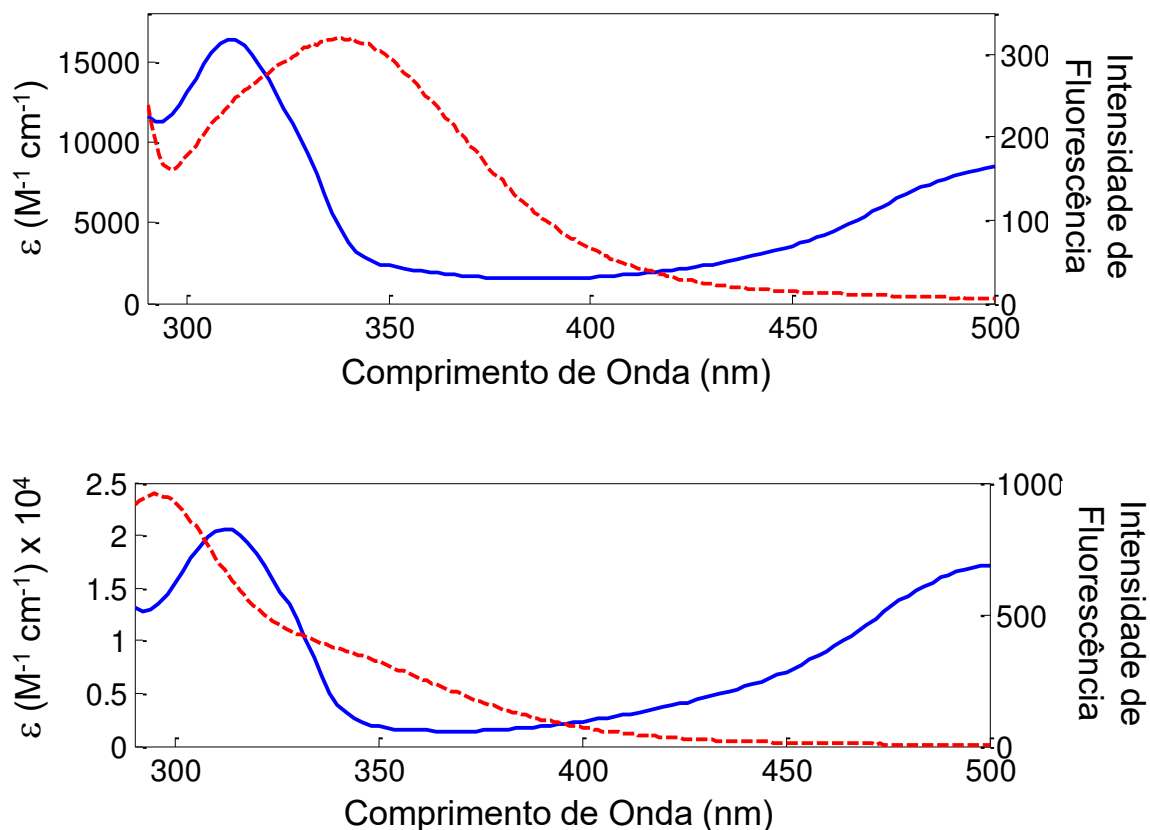
Complexo	[Complexo] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	t (min)	k (min^{-1})
[Ru(H ₂ O)(bdq)(tpy)](PF ₆) ₂	6,6	15,83	0,063
	16,4	20,24	0,049
[Ru(H ₂ O)(bd)(tpy)](PF ₆) ₂	6,6	11,66	0,086
	16,4	3,65	0,274

Fonte: Autora.

Os valores de k obtidos para a ASH em presença dos complexos [Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ e [Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ apresentam a mesma tendência observada para os nitrosilos e nitro complexos, reinterando a influência do co-ligante bdq.

Após a determinação dos valores de K_{SV} , K_a , n , dos parâmetros termodinâmicos e das avaliações cinéticas, conforme descrito para os nitrosilos e nitro complexos, com o intuito de avaliar a possibilidade de FRET entre a ASH e os aqua complexos, [Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ e [Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂, a sobreposição dos espectros de emissão da ASH e de absorção dos complexos foi avaliada (Figura 66).

Figura 66 – Sobreposição dos espectros de emissão para a ASH e de absorção para os complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (a) e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (b), em PBS (pH = 7,4). $[\text{ASH}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (---); $[\text{Complexo}] = 11,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (—).



Fonte: Autora.

O grau de sobreposição espectral entre o espectro de emissão da ASH e de absorção dos complexos (J) foi obtido utilizando o *software* *ae* Fluortools e os valores de eficiência do processo de transferência de energia por ressonância de Förster (E), distância crítica entre o doador e o receptor em que a eficiência do processo é de 50% (R_0), distância centro a centro entre o doador e o receptor (r_0) foram obtidos conforme descrito na sessão 3.2.3.6, os quais são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 – Determinação de FRET para os sistemas ASH–[Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂ e ASH–[Ru(H₂O)(bd)(tpy)](PF₆)₂ a 308 K.

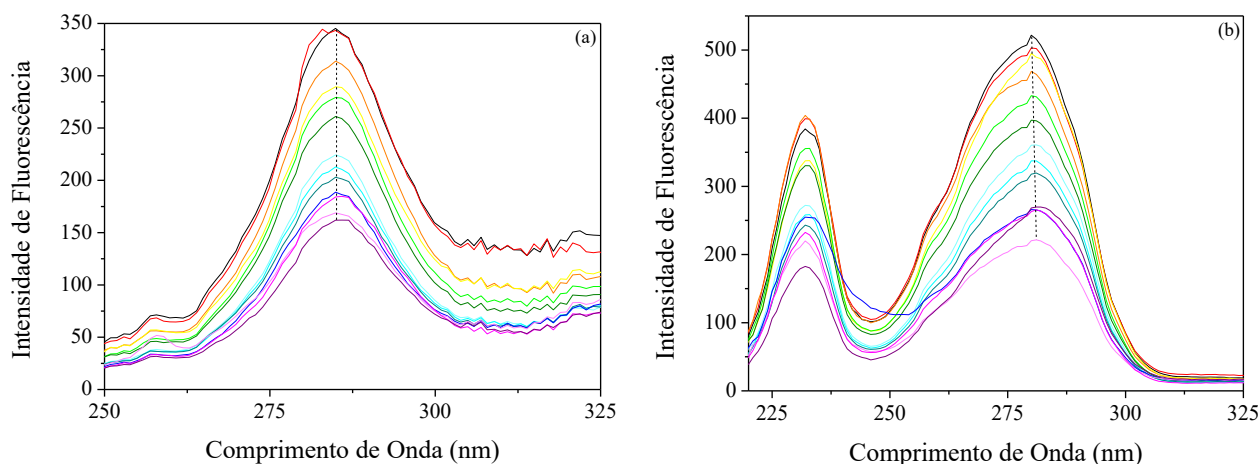
Sistema	J (x10 ¹⁴ cm ³ M ⁻¹)	R_0 (nm)	r_0 (nm)	E (%)
ASH–[Ru(H ₂ O)(bdq)(tpy)](PF ₆) ₂	0,804	2,34	2,59	35
ASH–[Ru(H ₂ O)(bd)(tpy)](PF ₆) ₂	1,164	2,49	3,21	18

Fonte: Autora.

Os valores de r_0 calculados para os sistemas, obtidos utilizando-se $E=50\%$ e os valores de R_0 obtidos para os mesmos, são de 2,59 e 3,21 nm respectivamente, os quais representam a distância centro a centro entre a ASH e os complexos. Tais valores de r calculados para ambos os sistemas são inferiores à 7 nm e, ainda, estão entre $0,5R_0$ e $1,5R_0$. Assim, conclui-se que há uma alta probabilidade de ocorrer FRET, resultando na supressão de fluorescência intrínseca da ASH (CHATTERJEE *et al.*, 2012; RANJBAR *et al.*, 2013; HASHEMPOUR *et al.*, 2020).

Com o objetivo de avaliar os sítios de interação para a ASH e os aqua complexos, utilizou-se dos espectros de supressão de fluorescência síncrona obtidos. Os espectros de supressão de fluorescência síncrona obtidos para a ASH em presença do aqua complexo, [Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂, quando $\Delta\lambda = 15$ nm e $\Delta\lambda = 60$ nm, são apresentados na Figura 67.

Figura 67 – Espectros de supressão de fluorescência síncrona ($\Delta\lambda=15$ nm (a) e $\Delta\lambda=60$ nm (b)) para a ASH em presença do complexo [Ru(H₂O)(bdq)(tpy)](PF₆)₂, em PBS (pH=7,4) a 308 K durante 24 h. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. [ASH] = 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (–); [Complexo] = 0-16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (–); 1,7 (–); 2,3 (–); 3,3 (–); 5,0 (–); 6,6 (–); 8,3 (–); 9,9 (–); 11,5 (–); 13,2 (–); 14,8 (–); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (–)].



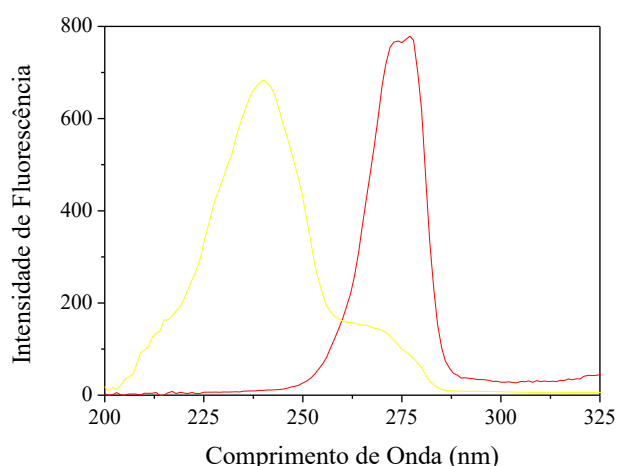
Fonte: Autora.

Os espectros sincronizados para a ASH em presença do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, quando $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$, apresentam um máximo de emissão em 285 nm, contudo com menores valores de intensidade de fluorescência. Como não foram observadas alterações nos valores de comprimento de onda máximo de emissão para a ASH em presença do complexo, conclui-se que o mesmo não proporciona mudanças conformacionais nos microambientes proteicos próximos aos resíduos de Tyr.

Os espectros sincronizados para a ASH em presença do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, quando $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$, exibem alterações discretas nos valores de comprimento de onda máximo de emissão para a ASH, de 280 para 281 nm. Tal alteração, para a região do vermelho, indica que o complexo propicia mudanças conformacionais nos microambientes proteicos próximos ao resíduo de Trp-214 e, além disso, que os resíduos de aminoácidos ao redor do mesmo se encontram em um microambiente hidrofílico e estão mais expostos ao solvente (RANJBAR *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2017).

Os espectros de supressão de fluorescência síncrona obtidos para a ASH em presença do aqua complexo, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, quando $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ e $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$, não foram obtidos, uma vez que há a emissão de fluorescência síncrona intrínseca ao complexo (Figura 68).

Figura 68 – Espectros de fluorescência síncrona ($\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ (—) e $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ (---)) para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, em PBS (pH=7,4) a 308 K. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm.

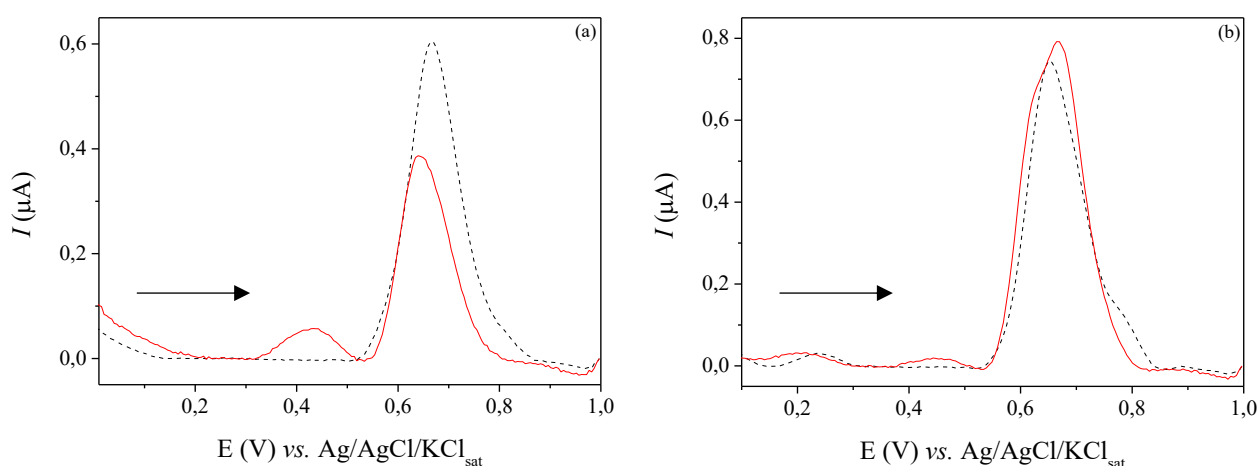


Fonte: Autora.

Finalmente, com o propósito de corroborar com os resultados obtidos durante a avaliação das interações entre a ASH e os aqua complexos, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, via análises espectroscópicas, foram realizadas análises

eletroquímicas, mais especificamente, análises via voltametria de pulso diferencial (VPD). As análises via VPD são de suma importância, uma vez que o mecanismo de supressão de fluorescência da ASH em presença dos aqua complexos tem uma contribuição estática, ou seja, as espécies interagem no estado fundamental e, ainda, há a possibilidade de diferenciar-se os processos de oxidação centrados no íon metálico $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ das espécies aqua e cloreto complexo. Os voltamogramas de pulso diferencial para os aqua complexos, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, são apresentados na Figura 69.

Figura 69 – Voltamogramas de pulso diferencial para os complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (a) e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (b) em tampão fosfato (---) e em PBS (—) (pH = 7,40).



Fonte: Autora.

O voltamograma de pulso diferencial em sentido anódico da varredura obtido para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ em tampão fosfato (pH = 7,40) exibe apenas um pico, em +0,67 V vs $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$. Conforme reportado por BONAVENTURA e colaboradores (2009) para aqua complexos terpiridina de rutênio(II), o pico em +0,64 V é atribuído ao processo de oxidação centrado no íon metálico $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$.

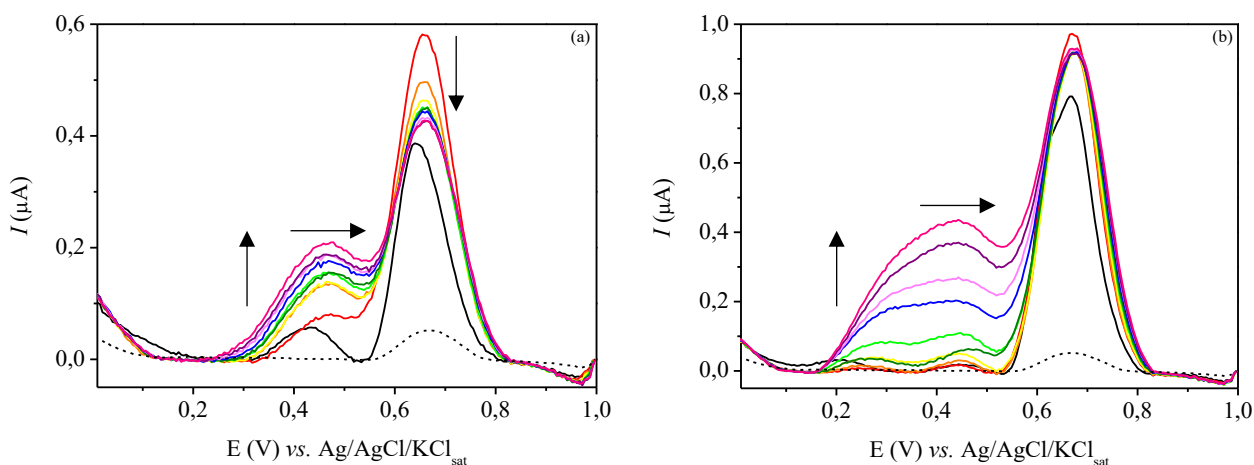
O voltamograma obtido para o complexo em tampão fosfato salino (PBS) (pH = 7,40) exibe dois picos, em +0,43 e +0,64 V vs $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$. Tais picos são caracterizados pelos processos de oxidação centrados no íon metálico $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ do cloreto e do aqua complexo, respectivamente. O pico em +0,43 V é observado, possivelmente, devido à conversão parcial do complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ ao complexo $[\text{RuCl}(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ no meio reacional, uma vez que na preparação do PBS adiciona-se $0,026 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $1,37 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl.

Para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, o voltamograma de pulso diferencial em sentido anódico da varredura obtido em tampão fosfato (pH = 7,40) exibe dois picos, em +0,24 e +0,65 V vs Ag/AgCl_{sat}. O pico em +0,24 V é descrito pelo processo de oxidação do ligante bd do aqua complexo, enquanto o pico em +0,65 V é atribuído ao processo de oxidação centrado no íon metálico Ru^{II}/Ru^{III} do aqua complexo.

O voltamograma obtido para o complexo em tampão fosfato salino (pH = 7,40) exibe três picos, em +0,20; +0,45 e +0,68 V vs Ag/AgCl_{sat}. O pico em +0,20 V é caracterizado processo de oxidação do ligante bd do aqua complexo, enquanto os picos em +0,45 e +0,68 V são descritos pelos processos de oxidação Ru^{II}/Ru^{III} do cloreto e do aqua complexo, respectivamente.

Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para os aqua complexos, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, em presença da ASH são apresentados na Figura 70.

Figura 70 – Voltamogramas de pulso diferencial para os complexos $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (a) e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ (b) em presença da ASH, em PBS (pH = 7,40). [Complexo] = 0,1 mmol L⁻¹ (–); [ASH] = 0-4,5 μmol L⁻¹ [0,5 (–); 1,0 (–); 1,5 (–); 2,0 (–); 2,5 (–); 3,0 (–); 3,5 (–); 4,0 (–); 4,5 μmol L⁻¹ (–)]. [ASH] = 0,5 μmol L⁻¹ (---).



Fonte: Autora.

Analisando-se os voltamogramas de pulso diferencial em sentido anódico da varredura obtidos para os aqua complexos, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, em presença da ASH observa-se que, quando há a adição da primeira alíquota da solução de ASH, há o deslocamento de todos os picos, para potenciais mais altos, bem como há o aumento das

intensidades de corrente para os processos de oxidação $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ dos aqua complexos. Verifica-se, também, que a ASH apresenta um pico em +0,67 V, próximo aos potenciais de oxidação $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ dos aqua complexos. Tal aumento das intensidades de corrente pode ser atribuído ao somatório das intensidades do processo de oxidação $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ e do processo de oxidação intrínseco à ASH.

Em se tratando dos voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, em presença da ASH observa-se que, quando a concentração da ASH é igual ou superior a $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, há a diminuição das intensidades de corrente próximo ao potencial de oxidação $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ do aqua complexo. Tal observação é uma evidência de que um complexo $\text{ASH}-[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, eletroquimicamente inativo, foi formado, resultando na diminuição da concentração do aqua complexo livre em solução. Os resultados obtidos estão de acordo com os parâmetros termodinâmicos obtidos para tal interação, os quais indicam que a interação entre a ASH e o complexo é determinada, basicamente, por interações hidrofóbicas (NI *et al.*, 2009).

No caso dos voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, em presença da ASH verifica-se que, quando há a adição da segunda alíquota da solução de ASH, há uma ligeira diminuição da intensidade de corrente próximo ao potencial de oxidação $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ do aqua complexo. Contudo, após a adição das sucessivas alíquotas, há uma estabilização das intensidades de corrente. Tal verificação é uma sugestão de que há a estabilização da interação $\text{ASH}-[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ quando a concentração da ASH é igual ou superior a $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Além disso, para ambos os complexos observa-se que, quando há a adição das sucessivas alíquotas da solução de ASH, há o aumento das intensidades de corrente para os processos de oxidação centrado no íon metálico $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ dos cloreto complexos. Estas e as demais alterações apresentadas nos perfis voltamétricos dos aqua complexos, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, em presença da ASH são atribuídas a mudanças no ambiente molecular dos complexos, sendo tais mudanças caracterizadas pela interação entre a ASH e os mesmos (PENG *et al.*, 2016).

5. CONCLUSÕES

As análises elementares e via espectrometria de massas (EM), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia na região do infravermelho (IV) e espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV/Visível), bem como a determinação dos valores de condutividade, solubilidade e log P, auxiliaram na caracterização e elucidação das estruturas químicas propostas para os nitrosilos complexos, $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, para os nitro complexos $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e para os aqua complexos, $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$.

A avaliação das interações entre a ASH e os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ via espectroscopia na região do IV demonstrou que os complexos proporcionam mudanças conformacionais na estrutura secundária da ASH, mais especificamente nas α -hélices da proteína, sendo este um indicativo de que houve a interação entre as espécies em questão. Posteriormente os estudos via espectroscopia de fluorescência indicaram que há a interação entre as espécies, sendo que os mecanismos de supressão de fluorescência da ASH em presença dos nitrosilos complexos e dos nitro complexos são dinâmico, enquanto para os aqua complexos há a contribuição de ambos os mecanismos, estático e dinâmico. Os valores de K_a para os sistemas ASH- $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, ASH- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, ASH- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e ASH- $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ sugerem que tais interações são estabilizadas com a elevação da temperatura. Contudo, para os sistemas ASH- $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e ASH- $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, os resultados demonstram que tais interações são desestabilizadas com o aumento da temperatura. Os parâmetros termodinâmicos para os sistemas ASH- $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, ASH- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, ASH- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e ASH- $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ indicam que as espécies interagem via interações hidrofóbicas. Entretanto, para os sistemas ASH- $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e ASH- $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, os resultados sugerem que as espécies interagem via ligações de hidrogênio. As distâncias centro a centro entre o resíduo de Trp-214 e os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$, $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, estimadas pela teoria de FRET, demonstram que há a transferência de energia por ressonância da ASH para os

complexos, resultando na supressão de fluorescência intrínseca da ASH. A avaliação dos sítios de interação entre a ASH e os complexos via supressão de fluorescência síncrona da ASH indica que os complexos $[\text{Ru}(\text{bdq})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bdq})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ e $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ encontram-se em um microambiente proteico hidrofílico, próximo ao resíduo de Trp-241, mais expostos ao solvente, enquanto os complexos $[\text{Ru}(\text{bd})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bd})(\text{tpy})]\text{PF}_6$ estão situados em um microambiente proteico hidrofóbico, próximo a resíduos de Tyr, menos expostos ao solvente.

A avaliação das interações entre a ASH e os aqua complexos, $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdq})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bd})(\text{tpy})](\text{PF}_6)_2$, sugerem que as alterações apresentadas nos perfis voltamétricos dos complexos em presença da ASH são atribuídas a mudanças no ambiente molecular dos mesmos, sendo tais mudanças caracterizadas pela interação entre as espécies.

6. REFERÊNCIAS

ABBASPOUR, N.; HURRELL, R.; KELISHADI, R. Review on iron and its importance for human health. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 2, n. 19, p. 164–174, 2014.

ANDRÉS, A.; ROSÉS, M.; RÀFOLS, C.; BOSCH, E.; ESPINOSA, S.; SEGARRA, V.; HUERTA, J. M. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (log *D*) from low drug amounts. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 76, p. 181–191, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.05.008>

ANTONARAKIS E.; EMADI, A. Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1293-1>

BECKFORD, F. A.; STOTT, A.; MBARUSHIMANA, P. C.; LeBLANC, M.-A.; HALL, K.; SMITH, S.; BULLOCK, J. L.; HOUGHTON, D. J.; HOLDER, A. A.; GERASIMCHUK, N.; SARRÍAS, G.-; SEERAM, N. P. Anticancer, biophysical and computational investigations of half-sandwich ruthenium(II) thiosemicarbazone complexes: The effect of arene versus thiacycrown face-cap. **Interdisciplinary Journal of Chemistry**, 2016. <https://doi.org/10.15761/IJC.1000101>

BELATIK, A.; HOTCHANDANI, S.; CARPENTIER, R.; TAJMIR-RIahi, H.-A. Locating the Binding Sites of Pb(II) Ion with Human and Bovine Serum Albumins. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–9, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036723>

BESSAS, N. C.; da SILVA, L. A.; COMAR JR., M.; de LIMA, R. G. Interaction of the nitrosyl ruthenium complex $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH.NHq-R})(\text{tpy})\text{NO}]^{3+}$ with human serum albumin: a spectroscopic and computational investigation. **Luminescence**, v. 36, n. 2, p. 391–408, 2021. <https://doi.org/10.1002/bio.3955>

BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C. N.; RODRIGUES, G. J.; NETO, M. A.; VERCESI, J. A.; de LIMA, R. G.; da SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 1366–1374, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.07.015>

BOTTOMLEY, F. Nitrosyl complexes of ruthenium. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 26, p.7–32, 1978. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)82063-9](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)82063-9)

BYLER, D. M.; SUSI, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. **Biopolymers**. v. 25, p. 469–487, 1986. <https://doi.org/10.1002/bip.360250307>

CACITA, N.; NIKOLAOU, S. Studying the interaction between trinuclear ruthenium complexes and human serum albumin by means of fluorescence quenching. **Journal of Luminescence**, v. 169, p. 115–120, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jlum.2015.08.066>

CALLAHAN, R. W.; MEYER, T. J. Reversible electron transfer in ruthenium nitrosyl complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 574–581, 1977. <https://doi.org/10.1021/ic50169a015>

CHATTERJEE, T.; PAL, A.; DEY, S.; CHATTERJEE, B.-K.; CHAKRABARTI, P. Interaction of virstatin with human serum albumin: spectroscopic analysis and molecular modeling. **Plos One**, vol. 7, p. 1–12, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037468>

CHAVES, O. A.; MENEZES, L. B.; IGLESIAS, B. A. Multiple spectroscopic and theoretical investigation of meso-tetra-(4-pyridyl)porphyrin ruthenium(II) complexes in HSA-binding studies. Effect of Zn(II) in protein binding. **Journal of Molecular Liquids**, v. 294, p. 1–11, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111581>

CHEN, Z.; STAMLER, J. S. Bioactivation of Nitroglycerin by the Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 16, n. 8, p. 259–265, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2006.05.001>

CHENG, X.-X.; LUI, Y.; ZHOU, B.; XIAO, X.-H.; LIU, Y. Probing the binding sites and the effect of berbamine on the structure of bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 72, p. 922–928, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2008.12.003>

CHILOM, C. G.; BACALUM, M.; STANESCU, M. M.; FLORESCU, M. Insight into the interaction of human serum albumin with folic acid: A biophysical study. **Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 204, p. 648–656, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.06.093>

CHRZANOWSKA, M.; KATAFIAS, A.; IMPERT, O.; KOZAKIEWICZ, A.; SURDYKOWSKI, A.; BRZOZOWSKA, P.; FRANKE, A.; ZAHL, A.; PUCHTA, R.; VAN ELDIK, R. Structure and reactivity of $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{terpy})(\text{N}^{\wedge}\text{N})\text{Cl}]\text{Cl}$ complexes: consequences for biological applications. **Dalton Transactions**, v. 46, p. 10264–10280, 2017. <https://doi.org/10.1039/c7dt01669g>

CULOTTA, E.; KOSHLAND, Jr. de. NO news is good news. **Science**, v. 258, p. 1862–1865. <https://doi.org/10.1126/science.1361684>

da ROCHA, Z. N.; MARCHESI, M. S. P.; MOLIN, J. C.; LUNARDI, C. N.; MIRANDA, K. M.; BENDHACK, L. M.; FORD, P. C.; da SILVA, R. S. The inducing NO-vasodilation by chemical reduction of coordinated nitrite ion in *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)\text{L}(\text{bpy})_2]^+$ complex. **Dalton Transactions**, n. 32, p. 4282–4287, 2008. <https://doi.org/10.1039/B803441A>

da SILVA, C. F. N.; POSSATO, B.; FRANCO, L. P.; RAMOS, L. C. B.; NIKOLAOU, S. The role of ancillary ligand substituents in the biological activity of triruthenium-NO complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 186, p. 197–205, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.05.021>

^bda SILVA, F. O. N.; PENHA, D. P. S.; de ALENCAR, A. E. V.; PONTES, D. L.; PONTES, A. C. F. de B.; SOUSA, E. H. S.; LOPES, G. F. Chromatographic investigation of ruthenium nitrosyl complex: NO interconversion and reactions with biological reductants. **Química Nova**, v. 41, n. 4, p. 400–404, 2018. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170181>

da SILVA, M. M.; de CAMARGO, M. S.; CASTELLI, S.; de GRANDIS, R. A.; CASTELLANO, E. E.; DEFLON, V. M.; COMINETTI, M. R.; DESIDERI, A.; BATISTA,

A. A. Ruthenium(II)-mercapto Complexes with Anticancer Activity Interact with Topoisomerase IB. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 3, p. 536–549, 2020. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190214>

da SILVA, R. S.; de LIMA, R. G.; MACHADO, S. P. Design, Reactivity, and Biological Activity of Ruthenium Nitrosyl Complexes. In: *Advances in Inorganic Chemistry. NO_x Related Chemistry*. American Press, Cáp. 67, p. 265–294, 2015.

de LIMA, R. G.; SAUAIA, M. G.; BONAVENTURA, D.; TEDESCO, A. C.; BENDHACK, L. M.; da SILVA, R. S. Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the [Ru(L)(tpy)NO]³⁺ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. **Inorganica Chimica Acta**, v. 359, p. 2543–2549, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2006.02.020>

de OLIVEIRA, A. R. M.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; de SANTANA, D. C. A. S.; NIKOLAOU, S.; BONATO, P. S.; da SILVA, R. S. HPLC separation, NMR and QTOF/MS/MS structure elucidation of a prominent nitric oxide donor agent based on an isomeric composition of a nitrosyl ruthenium complex. **Inorganic Chemistry Communications**, vol. 12, p. 343–346, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2009.02.001>

DÖMÖTÖR, O.; RATHGEB, A.; KUHN, P.S.; POPOVIĆ-BIJELIĆ, A.; BAČIĆ, G.; ENYED, E.A.; ARION, V.B. Investigation of the binding of *cis/trans*-[MCl₄(1*H*-indazole)(NO)]⁻ (M = Ru, Os) complexes to human serum albumin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 159, p. 37–44, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.02.003>

FELDMAN, P. L.; GRIFFITH, O. W.; STUEHR, D. J. The surprising life of nitric oxide. **Chemical & Engineering News**, v. 20, p. 26–33, 1993. <https://doi.org/10.1021/cen-v071n051.p026>

FORD, P. C.; de RUDD, F. P.; GAUNDER, R.; TAUBE, H. Synthesis and properties of pentaamminepyridineruthenium(II) and related pentaammineruthenium complexes of aromatic nitrogen heterocycles. **Journal American Chemistry Society**, v. 90, p.1187-1194, 1968. <https://doi.org/10.1021/ja01007a015>

FREEDMAN, D. A.; KRUGER, S.; ROOSA, C.; WYMER, C. Synthesis, Characterization, and Reactivity of [Ru(bpy)(CH₃CN)₃(NO₂)]PF₆, a Synthon for [Ru(bpy)(L₃)NO₂] Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 45, p. 9558–9568, 2006. <https://doi.org/10.1021/ic061039t>

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. F. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373–376, 1980. <https://doi.org/10.1038/288373a0>

GEARY, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 7, p. 81–122, 1971. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80009-0](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80009-0)

GODWIN, J. B.; MEYER, T. J. The Preparation of Ruthenium Nitrosyl Complexes Containing 2,2'-Bipyridine and 1,10-Phenanthroline. **Inorganic Chemistry**, v. 10, p. 471–474, 1971. <https://doi.org/10.1021/ic50097a006>

GREEN, L. C.; DELUZURIAGA, K. R.; WAGNER, D. A.; RAND, W.; ISTFAN, N.; YOUNG, V. R.; TANNENBAUM, S. R. Nitrate biosynthesis in man. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 78, n. 12, p. 7764–7768, 1981. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7764>

GUENGERICH, C. P.; SCHUG, L. Reaction of nitrosylpentaamminruthenium (II) with ethylamine, methylamine, and hexaammineruthenium (III) ion to produce dinitrogen complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 17, p. 1378–1379, 1978. <https://doi.org/10.1021/ic50183a060>

GUO, J.; SADLER, P. Metals in Medicine, **Angewandte Chemie**, v. 38, n. 11, p. 1512–1678, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990601\)38:11<1512::AID-ANIE1512>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990601)38:11<1512::AID-ANIE1512>3.0.CO;2-Y)

HASHEMPOUR, S.; SHAHABADI, N.; ADEWOYE, A.; MURPHY, B.; ROUSE, C.; SALVATORE, B. A.; STRATTON, C.; MAHDAVIAN, E. Binding Studies of AICAR and Human Serum Albumin by Spectroscopic, Theoretical, and Computational Methodologies. **Molecules**, v. 25, p. 1–17, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25225410>

HE, X. M.; CARTER, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature**, v. 358, p. 209–215, 1992. <https://doi.org/10.1038/358209a0>

HENDERSON, W.; MCINDOE, J. Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds: tools – techniques – tips. England: John Wiley & Sons Ltd, 2005.

HITCHMAN, M. A.; ROWBOTTOM, G. L. Transition metal nitrite complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 42, p. 55–132, 1982. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80527-5](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80527-5)

HUANG, S.; PENG, S.; ZHU, F.; LEI, X.; XIAO, Q.; SU, W.; LIU, Y.; HUANG, C.; ZHANG, L. Multispectroscopic Investigation of the Interaction Between two Ruthenium(II) Arene Complexes of Curcumin Analogs and Human Serum Albumin. **Biological Trace Element Research**, v. 169, p. 189–203, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0416-2>

HUANG, H.; ZHANG, P.; CHEN, Y.; JI, L.; CHAO, H. Labile ruthenium(II) complexes with extended phenyl-substituted terpyridyl ligands: synthesis, aquation and anticancer evaluation. **Dalton Transactions**, v. 44, p. 15602–15610, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5DT02446C>

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide. **Circulation Research**, v. 61, p. 866–879, 1987. <https://doi.org/10.1161/01.res.61.6.866>

IGNARRO, L. J.; Nitric oxide is not just blowing in the wind. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, p. 131–134, 2019. <https://doi.org/10.1111/bph.14540>

JAKUBIKOVA, E.; CHEN, W.; DATTELBAUM, D. M.; REIN, F. N.; ROCHA, R. C.; MARTIN, R. L.; BATISTA, E. R. Electronic Structure and Spectroscopy of $[\text{Ru}(\text{tpy})_2]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, and $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{bpy})(\text{Cl})]^+$. **Inorganic Chemistry**, v. 48, p. 10720–10725, 2009. <https://doi.org/10.1021/ic901477m>

KATSUKI, S.; ARNOLD, W.; MITTAL, C., MURAD, F. Stimulation of guanylyl cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **Journal of Cyclic Nucleotide Research**, v. 3, p. 23–35, 1977.

KOVALEVSKY, A. Y.; KING, G.; BAGLEY, K. A.; COPPENS, P. Photoinduced Oxygen Transfer and Double-Linkage Isomerism in a *cis*-(NO)(NO₂) Transition-Metal Complex by Photocrystallography, FT-IR Spectroscopy and DFT Calculations. **Chemistry: A European Journal**, v. 11, p. 7254–7264, 2005. <https://doi.org/10.1002/chem.200500653>

KUMAR, A. PANDEY, R.; GUPTA, R. K.; GHOSH, K.; PANDEY, D. S. Synthesis, characterization and photochemical properties of some ruthenium nitrosyl complexes. **Polyhedron**, v. 52, p. 837-843, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2012.07.032>

LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3^a ed. Springer Science, 2006.

LANG, D. R.; DAVIS, J. A., LOPES, L. G. F.; FERRO, A. A.; VASCONCELOS, L. C. G.; FRANCO, D. W.; TFOUNI, E.; WIRASZKO, A.; CLARKE, H. J. A controlled NO-releasing compound: synthesis, molecular structure, spectroscopy, electrochemistry and chemical reactivity of R,R,S,S-*trans*-[RuCl(NO)(cyclam)]²⁺ (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane). **Inorganic Chemistry**, v. 38, p. 2294–2300, 2000. <https://doi.org/10.1021/ic9912979>

LEVER, A. B. P. Inorganic electronic spectroscopy. 2^a ed. Nova Iorque, Elsevier, 1984.

LI, H.; LIU, Q.; ZOU, Z.; CHEN, Q.; WANG, W.; BACCARELLI, A. A.; DENG, F.; GUO, X. WU, S. L-arginine supplementation to mitigate cardiovascular effects of walking outside in the context of traffic-related air pollution in participants with elevated blood pressure: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Environment International**, v.156, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106631>

MALLAMACE F.; CORSARO, C.; MALLAMACE, D.; VASCI, S. VASI, C.; DUGO, G. The role of water in protein's behavior: The two dynamical crossovers studied by NMR and FTIR techniques. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 13, p. 33–37, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.11.007>

MARQUELE-OLIVEIRA, F.; SANTANA, D. C. de A.; TAVEIRA, S. F.; VERMEULEN, D. M.; de OLIVEIRA, A. R. M.; da SILVA, R. S.; LOPEZ, R. F. V. Development of nitrosyl ruthenium complex-loaded lipid carriers for topical administration: improvement in skin stability and in nitric oxide release by visible light irradiation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 4, p. 843–851, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.06.007>

MASNIKOSA, R.; MILUTINOVIĆ, M. M.; CRNOLATAC, I.; TOT, A.; VELIČKOVIĆ, S.; BOJIĆ-TRBOJEVIĆ, Z.; RILAK-SIMOVIĆ, A. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111090>

McCLEVERTY, J. A. Chemistry of Nitric Oxide Relevant to Biology. **Chemical Reviews**, v.

104, p. 403–418, 2004. <https://doi.org/10.1021/cr020623q>

McGARVEY, B. R. Detection of the EPR Spectra of NO[•] in Ruthenium(II) Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 39, p. 3577–3581, 2000. <https://doi.org/10.1021/ic9914701>

MIJATOVIĆ, A.; ŠMIT, B.; RILAK, A.; PETROVIĆ, B.; ČANOVIĆ, D.; BUGARČIĆ, Z. D. NMR kinetic studies of the interactions between [Ru(terpy)(bipy)(H₂O)]²⁺ and some sulfur-donor ligands **Inorganica Chimica Acta**, v. 394, p. 552–557, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2012.09.016>.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109–120, 1991.

MOREL, E.; POYER, F.; VASLIN, L.; BOMBARD, S.; TEULADE-FICHO, M. P. Photoactivatable platinum(II) terpyridine derivatives for G-quadruplex DNA double anchoring. **Inorganica Chimica Acta**, v. 452, p. 152–158, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2016.02.033>

MOREIRA, M. B.; FRANCISCATO D. S.; TOLEDO, K. C. F.; de SOUZA, J. R. B.; NAKATANI H. S.; de SOUZA, V. R. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 227-232, 2015. <http://doi.org/10.5935/0100-4042.20140315>

NAKAMOTO, K., *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. New York: John Wiley & Sons, 2009.

NARDI, M. B.; DOMINGUES, E. L. B. C.; GONÇALVES, K. R.; VIANA, M. L.; ZANINI, M. S.; de LIMA, W. G.; BAHIA, M. T.; dos SANTOS, F. M. L-arginine supplementation increases cardiac collagenogenesis in mice chronically infected with Berenice-78 Trypanosoma cruzi strain. **Parasitology International**, v. 83, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102345>

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 69263, 3,4-Diaminobenzoic acid. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3_4-Diaminobenzoic-acid>. Acesso em: 21 jun. 2021.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 7243, O-Phenylenediamine. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/o-Phenylenediamine>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

NAVEENRAJ, S.; ANANDAN, S. Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 14, p. 53–71, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2012.09.001>

NI, Y.; ZHANG, X.; KOKOT, S. Spectrometric and voltammetric studies of the interaction between quercetin and bovine serum albumin using warfarin as site marker with the aid of chemometrics. **Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, p. 1865–1872, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2008.07.004>

OLIVEIRA, F. DE S.; FERREIRA, K. Q.; BONAVENTURA, D.; BENDHACK, L. M.; TEDESCO, A. C.; MACHADO, S. P.; TFOUNI, E.; da SILVA, R. S. The macrocyclic effect and vasodilation response based on the photoinduced nitric oxide release from *trans*-[RuCl(tetraazamacrocyclic)NO]²⁺. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 2, p. 313–320, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.10.008>

ORENHA, R. P.; GALEMBECK, S. E. Molecular orbitals of NO, NO⁺, and NO⁻: A computational quantum chemistry experiment. **Journal of Chemical Education**, v. 91, p. 1064–1069, 2014. <https://doi.org/10.1021/ed400618j>

PARKER, C. A.; BARNES, W. J. Some experiments with spectrofluorimeters and filter fluorimeters. **Analyst**, v. 82, p. 606–618, 1957. <https://doi.org/10.1039/AN9578200606>

PANIGRAHI, S. K.; MISHRA, A. K. Inner filter effect in fluorescence spectroscopy: As a problem and as a solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 41, 100318, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2019.100318>

PATINY, L.; BOREL, A. ChemCalc: A building block for tomorrow's chemical infrastructure. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2013. Disponível em <<https://www.chemcalc.org>>. <https://doi.org/10.1021/ci300563h>

PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. V.; BARBOSA, M. I. F.; LEITE, S. R. A.; BATISTA, A. A.; ELLENA, J.; SATO, L. S.; FRANZBLAU, S. G.; MORENO, V. GAMBINO, D.; LEITE, C. Q. F. Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 5099–5177, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.08.023>

PENG, X.; WANG, X.; QI, W.; SU, R.; HE, Z. Affinity of rosmarinic acid to human serum albumin and its effect on protein conformation stability. **Food Chemistry**, v. 192, p. 178–187, 2016. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.109>

PEREIRA, A. de C.; FORD, P. C.; da SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Ruthenium-nitrite complex as pro-drug releases NO in a tissue and enzyme-dependent way. In: Ruthenium Complexes. **Photochemical and Biomedical Applications**. John Wiley and Sons, Cáp. 13, p. 192–198, 2011.

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

RAMACHANDRAN, R. A.; LUPFER, C.; ZAKI, H. The Inflammasome: Regulation of Nitric Oxide and Antimicrobial Host Defence. **Advances in Microbial Physiology**, v. 72, p. 65–115, 2018. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2018.01.004>

RANJBAR, S. BIJARI, N.; MORADI, N.; ASHRAFI-KOOSHK, M. R.; KHODARAHMI, R.; SHOKOOHINIA, Y.; GHOBADI, S.; GHOLAMZADEH, S.; AGHAEI, A. 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, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/305081>

RICHTER-ADDO, G. B.; LEGZDINS, P. Metal nitrosyls. Nova Iorque, Oxford University Press, 1992.

RIZI, B. S.; ACHREJA, A.; NAGRATH, D. Nitric oxide: The forgotten child of tumor metabolism. **Trends Cancer**, v. 3, n. 9, p. 659–672, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.07.005>

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability. **Biochemistry**, v. 20, p. 3096–3102, 1981. <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>

SAUAIA, M. G.; da SILVA, R. S. The reactivity of nitrosyl ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. **Transition Metal Chemistry**, v. 28, p. 254–259, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1022964510682>

SHEREEF, H. A.; SHABAN, S. Y.; MOEMEN, Y. S.; EL-KHOULY, M. E.; EL-NAHAS, A. M. Biophysicochemical studies of a ruthenium (II) nitrosyl thioether-thiolate complex binding to BSA: Mechanistic information, molecular docking, and relationship to antibacterial and cytotoxic activities. **Applied Organometallic Chemistry**, p. 1–14, 2022. <https://doi.org/10.1002/aoc.6583>

SHI, X. Y.; CAO, H.; REN, F. L.; XU, M. Spectroscopic analysis of the binding interaction between tinidazole and bovine serum albumin (BSA). **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, p. 2780–2790, 2007. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790227>

SILVA, H. V. R.; DIAS, J. S. M.; FERREIRA-SILVA, G. A.; VEGAS, L. C.; IONTA, M.; CORRÊA, C. C.; BATISTA, A. A.; BARBOSA, M. I. F.; DORIGUETTO, A. C. Phosphine/diimine ruthenium complexes with Cl⁻, CO, NO⁺, NO₂⁻, NO₃⁻ and pyridine ligands: Pro-apoptotic activity on triple-negative breast cancer cells and DNA/HSA interactions. **Polyhedron**, v. 144, p. 55–65, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2018.01.005>

SONG, L.; BAI, H.; LIU, C.; GONG, W.; WANG, A.; WANG, L.; ZHAO, Y.; ZHAO, X.; WANG, H. Synthesis, Biomacromolecular Interactions, Photodynamic NO Releasing and Cellular Imaging of Two [RuCl(qn)(Lbpy)(NO)]X Complexes. **Molecules**, v. 26, p. 1–16, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26092545>

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, p. 7738–7742, 1985. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.22.7738>

SULLIVAN, B. P.; CALVERT, M.; MEYER, T. J. *Cis-trans* isomerism in RuCl₂(tpy)(PPh₃). Comparisons between the chemical and physical properties of a *cis-trans* isomeric pair. **Inorganic Chemistry**, v. 19, p. 1404–1407, 1980. <https://doi.org/10.1021/ic50207a066>

TANG, J.; LUAN, F.; CHEN, X. Binding analysis of glycyrrhetic acid to human serum albumin: fluorescence spectroscopy, FTIR, and molecular modeling. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 3210–3217, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.12.034>

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. 1845-1851, 1984.
<https://doi.org/10.1021/ic00181a014>

TEKADE, R. Drug Delivery Systems. Cambridge, Academic Press, 2019.

TFOUNI, E.; FORD, P. C. Thermal and photochemical proprieties of some *trans*-disubstituted tetraamineruthenium (II) complexes of aromatic nitrogen heterocycles, *trans*-Ru(NH₃)₄LLⁿ⁺. **Inorganic Chemistry**, v. 19, p. 72-76, 1980.
<https://doi.org/10.1021/ic50203a016>

UNIVERSITY OF ILLINOIS CHICAGO – CHEMISTRY. Vibrational Spectroscopy – Biological Applications. Disponível em
<[http://www2.chem.uic.edu/tak/Chem34412/Notes%2014c-12\(Vibra.%20Spec-Bio%20Appl\).pdf](http://www2.chem.uic.edu/tak/Chem34412/Notes%2014c-12(Vibra.%20Spec-Bio%20Appl).pdf)>. Acesso em: 02 jul. 2021.

USOLTSEV, D.; SITNIKOVA, V.; KAJAVA, A.; USPENSKAYA, M. Systematic FTIR Spectroscopy Study of the Secondary Structure Changes in Human Serum Albumin under Various Denaturation Conditions. **Biomolecules**, v. 9, p. 1–17, 2019.
<https://doi.org/10.3390/biom9080359>

VALEUR, B.; BROCHON, J. C. New Trends in Fluorescence Spectroscopy. Springer, Berlin, Germany, 1999.

VELHO, R. G. **Medidas de condutividade na caracterização de complexos inorgânicos: Um levantamento bibliográfico**. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, p. 170, 2006.

WRIGHT, N. J. D. A review of the actions of Nitric Oxide in development and neuronal function in major invertebrate model systems. **AIMS Neuroscience**, v. 6, p. 146–147, 2019.
<https://doi.org/10.3934/Neuroscience.2019.3.146>

XIE, L.; BAI, H.; SONG, L.; LIU, C.; GONG, W.; WANG, W.; ZHAO, X.; TAKEMOTO, C.; WANG, H. Structural and Photodynamic Studies on Nitrosylruthenium- Complexed Serum Albumin as a Delivery System for Controlled Nitric Oxide Release. **Inorganic Chemistry**, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c00762>

XU, L.; MA, Z.; WANG, W.; XIE, L.; LIU, L.; LIU, J.; ZHAO, X.; WANG, H. Photo-induced cytotoxicity, photo-controlled nitric oxide release and DNA/human serum albumin binding of three water-soluble nitrosylruthenium complexes. **Polyhedron**, v. 137, p. 157–164, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.08.036>

YUE, Y.; CHEN, X.; QIN, J.; YAO, X. Characterization of the mangiferin-human serum albumin complex by spectroscopic and molecular modeling approaches. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 49, n. 3, p. 753759, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.12.017>

ANEXO

Tabela 21 – Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) e constantes de associação (K_a) para os sistemas ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃, ASH–[Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆ e ASH–[Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆ em diferentes temperaturas durante minutos* de interação.

Sistema	T (K)	K_{SV} (x 10 ⁴ M ⁻¹)	R ²	K_a (x 10 ³ M ⁻¹)	R ²
ASH–[Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	298	1,117 ± 0,023	0,9477	0,675 ± 0,195	0,9998
	303	1,328 ± 0,107	0,9197	0,083 ± 0,034	0,9837
	308	1,214 ± 0,154	0,9871	4,223 ± 1,451	0,9849
ASH–[Ru(bd)(tpy)(NO)](PF ₆) ₃	298	0,457 ± 0,193	0,8890	0,027 ± 0,006	0,9407
	303	0,494 ± 0,012	0,9210	0,245 ± 0,044	0,9739
	308	0,519 ± 0,154	0,9169	0,692 ± 0,011	0,9558
ASH–[Ru(NO ₂)(bdq)(tpy)]PF ₆	298	0,689 ± 0,065	0,9743	0,145 ± 0,005	0,9737
	303	0,822 ± 0,010	0,9227	0,172 ± 0,039	0,9925
	308	1,040 ± 0,346	0,9735	2,541 ± 0,041	0,9844
ASH–[Ru(NO ₂)(bd)(tpy)]PF ₆	298	0,156 ± 0,036	0,8249	2,147 ± 0,279	0,8249
	303	0,441 ± 0,170	0,8227	1,619 ± 0,468	0,9997
	308	0,126 ± 0,005	0,9550	1,850 ± 0,140	0,9856

Fonte: Autora.

Dados expressos como média ± desvio padrão de experimentos realizados em duplicata.

R² é o coeficiente de correlação para os valores de K_{SV} e K_a .

*2 min. de interação para os complexos [Ru(bdq)(tpy)(NO)](PF₆)₃ e [Ru(bd)(tpy)(NO)](PF₆)₃; 3 min. para o complexo [Ru(NO₂)(bdq)(tpy)]PF₆; e 4 min. para o complexo [Ru(NO₂)(bd)(tpy)]PF₆.