



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto Química
Programa de Pós-Graduação em Química - PPGQUI

PATRÍCIA ALVES DE MATOS

**COMPLEXOS POLIPIRIDINÍCOS DE RUTÊNIO(II) COMO
FOTOSENSIBILIZADORES NA TERAPIA FOTODINÂMICA:
AVALIAÇÃO QUÍMICA, FOTOQUÍMICA E EM CULTURA CELULAR**

UBERLÂNDIA-MG
2023

PATRÍCIA ALVES DE MATOS

**COMPLEXOS POLIPIRIDINÍCOS DE RUTÊNIO(II) COMO
FOTOSENSIBILIZADORES NA TERAPIA FOTODINÂMICA:
AVALIAÇÃO QUÍMICA, FOTOQUÍMICA E EM CULTURA CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia como exigência final para a obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Tayana Mazin Tsubone

Coorientador: Dr. Tiago Araújo Matias

UBERLÂNDIA-MG

2023

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

M433 2023	Matos, Patrícia Alves de, 1980- COMPLEXOS POLIPIRIDÍNICOS DE RUTÊNIO(II) COMO FOTOSENSIBILIZADORES NA TERAPIA FOTODINÂMICA: AVALIAÇÃO QUÍMICA, FOTOQUÍMICA E EM CULTURA CELULAR" [recurso eletrônico] / Patrícia Alves de Matos. - 2023. Orientadora: Tayana Mazin Tsubone. Coorientadora: Tiago Araújo Matias. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.55 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Química. I. Tsubone, Tayana Mazin, 1989-, (Orient.). II. Matias, Tiago Araújo, 1987-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. IV. Título. CDU: 54
--------------	--

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

30/01/2023 09:25

SEI/UFU - 4140930 - Ata



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 51 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 353, PPGQUI				
Data:	Vinte e seis de janeiro de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	18:00
Matrícula do Discente:	12022QMI016				
Nome do Discente:	Patrícia Alves de Matos				
Título do Trabalho:	"Interação de complexos de Rutênio com proteína e seu efeito fotodinâmico em células tumorais."				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Bioinorgânica, Fotoquímica e Fotobiologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	"Avaliação da estrutura-atividade de novos fotossensibilizadores visando aplicação em Terapia Fotodinâmica"				

Reuniu-se presencialmente no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Renata Galvão de Lima, do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia; Christiane Pavani, da Universidade Nove de Julho e Tayana Mazin Tsubone orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidenta da mesa, Dra. Tayana Mazin Tsubone, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a 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 Tayana Mazin Tsubone, Professor(a) do Magistério Superior, em 26/01/2023, às 17:57, 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 Renata Galvão de Lima, Professor(a) do Magistério Superior, em 26/01/2023, às 17:58, 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 Christiane Pavani, Usuário Externo, em 30/01/2023, às 09:04, 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 4140930 e o código CRC DE6BE4B2.

AGRADECIMENTOS

A orientadora Profa. Dra. Tayana Mazin Tsubone sempre muito paciente e atenciosa. Ao coorientador Dr. Tiago Araújo Matias, pela síntese e fornecimento dos compostos de Rutênio para a realização deste trabalho. Pela oportunidade, disponibilidade em me ajudar e por compreender minhas dificuldades nesta jornada.

Aos meus familiares, Maria Tereza, Giovanni, Estevam Júnior e João Vitor, pelo amor incondicional, carinho e por sempre apoiar minhas decisões. Obrigada por tudo! Amo vocês

Ao Prof. Dr. Antonio Otavio de Toledo Patrocinio e ao mestre Marcos Eduardo Gomes do Carmo do Laboratório de Fotoquímica e Ciência dos Materiais (LAFOT) pela ajuda e disposição.

Ao Prof. Dr. Marcelo Belleti e Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva por ceder a sala para o cultivo celular.

Ao Prof. Dr. Maurício Baptista (Instituto de Química da USP) por ter cedido as células de carcinoma do colo do útero humana (HeLa).

A pós-doutoranda Bruna Cristina Borges do Laboratório Tripanosomatídeos (LATRI) gentilmente cedeu as células de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-231).

Aos meus colegas do LIFeBio Jéssica, Tayná, Maynne, Larissa, Ieda, Vitor, pela ajuda, momentos de aprendizado, discussões, convivência, pelas gordices e amizade.

Ao programa de Pós-graduação em Química e seus funcionários.

A agência de fomento FAPEMIG pelo financiamento da pesquisa (Projeto Universal APQ-00704-21).

Ao PROAP pelo auxílio para participar do 51º Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology junto ao 46º Congress of the Brazilian Biophysical Society.

As agências de fomento CNPq e CAPES.

“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses que-
fazeres que se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino
continuo buscando, reprocuro. Ensino porque busco, porque
indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar,
constatando intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso
para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar
a verdade”.

Paulo Freire

RESUMO

Câncer tornou-se uma doença de grande preocupação mundial, sendo responsável por quase 10 milhões de mortes em 2020 e classificado entre “top 10” de causas de morte segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). Considerando as dificuldades nos tratamentos convencionais de câncer (quimioterapia, radioterapia e cirurgia), como a resistência do tumor e os efeitos colaterais, a Terapia Fotodinâmica (TFD) é um procedimento que tem recebido atenção especial na medicina, principalmente pelo procedimento minimamente invasivo, pouca ou nenhuma reação colateral e resistência insignificante aos fotossensibilizadores (FS). Dentre as classes de FS investigados para TFD, os complexos de polipiridina de Rutênio(II) apresentam interessantes propriedades químicas, fotofísicas e biológicas, incluindo alta produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e fotoestabilidade. Neste trabalho, avaliou-se a interação dos complexos *cis*-[Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e *cis*-[Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆) com biomoléculas, como proteína (representada por BSA) e lipídios (representados por lipossomos, DMPC), determinou a taxa de incorporação e toxicidade (citotoxicidade e fototoxicidade) destas moléculas em células do câncer do colo do útero (HeLa) e câncer de mama (MDA-MB-231). Os estudos de interação dos compostos com proteína (representada por BSA) realizados em tampão Tris tiveram os resultados afetados pela troca do ligante Cl⁻ por Tris, dificultando a interpretação dos dados. Por isso, os estudos de interação BSA-complexo foram reconduzidos em tampão PBS, cujos valores de constante de ligação (K_b) foram da ordem de 10^5 para ambos os compostos ($Rubpy \approx 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $Rubpe \approx 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), indicando forte interação entre complexo e a proteína BSA. A avaliação da oxidação fotoinduzida da BSA pelos complexos de Rutênio foi monitorada pelo tempo de decaimento da intensidade de fluorescência da albumina. O tempo de decaimento (t_2) foi em torno de 2 a 4 minutos na presença de compostos, e ~ 55 minutos na ausência de complexo, indicando que a oxidação fotoinduzida por complexos (Rubpy e Rubpe) acelera cerca de 10x a fotodegradação da BSA. Note que não houve diferença significativa tanto nos valores de K_b quanto t_2 entre os compostos estudados Rubpy e Rubpe, sugerindo que a adição de um grupo etileno num dos ligantes do Rubpe não é suficiente para aumentar a interação e/ou taxa de foto-oxidação da proteína (representada por BSA). Nos estudos de interação dos complexos com lipídeos (representados por lipossomos de DMPC), ambos complexos de Rutênio estudados

apresentaram valor elevado de constante de ligação ($K_b > 10^5 \text{ M}^{-1}$), também indicando forte interação desses compostos com a bicamada lipídica. Para avaliar a taxa de oxidação dos lipídeos fotoinduzida pelos complexos Rutênio(II), utilizou-se um ensaio que monitora o vazamento de uma sonda fluorescente (carboxifluoresceína, CF) para o exterior das vesículas de lipossomos. Entretanto, os resultados foram inconclusivos devido a sobreposição no espectro da banda de absorção dos compostos e a emissão da sonda CF, inviabilizando a análise dos dados. Nos estudos de % incorporação dos compostos em HeLa e MDA-MB-231, a porcentagem de incorporação dos complexos foi de aproximadamente $\approx 50\%$ em HeLa e $\approx 37\%$ em MDA-MB-231, não havendo diferença significativa na taxa incorporação entre o $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em nenhuma das linhagens tumorais testadas. Em relação a toxicidade dos compostos em células tumorais, $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ possui valor de IC_{50} aproximadamente 2,4 vezes menor que $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ para ambas as linhagens tumorais (HeLa e MDA-MB-231), e portanto Rubpe é mais citotóxico que Rubpy. A fototoxicidade foi mensurada pelo fator de fotoinibição (PIF), mostrando que apenas $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ em MDA-MB-231 possui provável fototoxicidade.

Palavras-chave: Complexo polipiridínicos de Rutênio(II); albumina (BSA); lipossomos (DMPC); toxicidade celular.

ABSTRACT

Cancer has become a disease of great concern worldwide, accounting for almost 10 million deaths in 2020 and ranked among the “top 10” causes of death according to the World Health Organization (WHO). Considering the difficulties in conventional cancer treatments (chemotherapy, radiotherapy and surgery), such as tumor resistance and side effects, Photodynamic Therapy (PDT) is a procedure that has received special attention in medicine, mainly due to its minimally invasive procedure, no side effects and insignificant resistance to photosensitizers (PS). Among the PS classes investigated for PDT, Ruthenium(II) polypyridine complexes have interesting chemical, photophysical and biological properties, including high production of reactive oxygen species (ROS) and photostability. This work studied the interaction of *cis*-[Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) and *cis*-[Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆) complexes with biomolecules such as protein (represented by BSA) and lipids (represented by liposomes, DMPC), estimated the amount of incorporation and **toxicity** (cytotoxicity and phototoxicity) in cervical cancer (HeLa) and breast cancer (MDA-MB-231) cells. The interaction studies of the compounds with protein (represented by BSA) carried out in Tris buffer had the results affected by the exchange of the Cl⁻ ligand by Tris, making the interpretation of the data inviable. Therefore, the BSA-complex interaction studies were conducted in PBS buffer, whose binding constant (K_b) values were around 10^5 for both compounds ($Rubpy \approx 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ and $Rubpe \approx 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), indicating strong interaction between complex and BSA protein. The evaluation of photoinduced oxidation of BSA by Ru complexes was monitored by the decay time of albumin fluorescence intensity. The decay time (t_2) was around 2 to 4 minutes in the presence of complex, and ~55 minutes in the absence of them, indicating that photoinduced oxidation by complexes (Rubpy and Rubpe) accelerates BSA photodegradation circa of 10x. Note that there was no significant difference in K_b or t_2 values between the Rubpy and Rubpe compounds studied, suggesting that the addition of an ethylene group to one of the Rubpe ligands is not sufficient to increase the interaction and/or rate of protein photooxidation (represented by BSA). On interaction studies of the complexes with lipids (represented by DMPC liposomes), both Ru complexes studied showed a high binding constant value ($K_b > 10^5 \text{ M}^{-1}$), also indicating a strong interaction of these compounds with the lipid bilayer. To assess the rate of lipid oxidation photoinduced by Ruthenium(II) complexes, it was used an assay that monitors the leakage of a fluorescent probe (carboxyfluorescein, CF) to the

outside of liposome vesicles. However, the results were inconclusive due to overlapping in the spectrum of the absorption band of the compounds and the emission of the CF probe, making data analysis unfeasible. Regards to % uptake of compounds in HeLa and MDA-MB-231 cells, the % uptake of the complexes was approximately $\approx 50\%$ in HeLa and $\approx 37\%$ in MDA-MB-231, with no statistically significant difference in the incorporation rate between the Rubpy and Rubpe. Regarding the toxicity of the compounds in tumor cells, $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ has an IC_{50} value approximately 2.4 times lower than $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ for both tumor cell lines (HeLa and MDA-MB-231), therefore Rubpe is more cytotoxic than Rubpy. Phototoxicity was measured by the photoinhibition factor (PIF), showing that only $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ in MDA-MB-231 has probable phototoxicity.

Key words: Ruthenium(II) polypyridine complexes; albumin (BSA); liposomes (DMPC); cellular toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema indicando a sequência de aplicação da Terapia Fotodinâmica para o tratamento de um tumor.....	23
Figura 2 - Diagrama de Jablonski modificado mostrando os mecanismos de ação dos FSs.	24
Figura 3 - Estado triplete ($^3\text{O}_2$) e singlete ($^1\text{O}_2$) do oxigênio.	26
Figura 4 - Espectro de absorção do $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ solubilizado em acetonitrila.	28
Figura 5 - Estrutura química do TLD-1433.....	29
Figura 6 - Estrutura das moléculas que serão estudadas: (A) <i>cis</i> -bis(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)-(4,4'-bipiridina)clororutênio(II), (B) <i>cis</i> -bis(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(trans-1,2-(4-piridil)etileno) clororutênio(II).....	29
Figura 7 - Representação dos arcabouços proteicos da albumina do soro bovino (BSA), destacando a localização dos resíduos de triptofano.	31
Figura 8 - Representação esquemática dos sistemas de modelos de membrana.	33
Figura 9 - Mini extrusora da Avanti Polar Lipids para obtenção de lipossomos unilamelares com tamanhos uniformes de 100nm.	42
Figura 10 - Filmes lipídicos contendo os complexos de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$	44
Figura 11 - (A) coluna de cromatografia de exclusão e (B) separação a CF livre dos lipossomos contendo CF no interior da vesícula.	45
Figura 12 - Espectro de emissão da luz do LED azul sobreposto aos espectros de absorção do Rubpy e do Rubpe.	46
Figura 13 - a) placa sem irradiação e b) placa irradiada.....	46
Figura 14 - Filmes dos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)^+$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ solubilizados em metanol.	49
Figura 15 - Espectros de absorção normalizados em 470nm do (A) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (B) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em meio de cultura (Dmem).....	49
Figura 16 - Solubilidade do pó dos complexos de Rutênio em meio de cultura.	50

Figura 17 - Espectro eletrônico de absorção no UV-Vis dos complexos de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ com concentração de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em metanol. 54

Figura 18 - Estrutura molecular da água e dos componentes das soluções tampão. 56

Figura 19. Espectros de absorção dos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ ($3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em (A1 e A2) 70% H_2O :30% MeOH , (B1 e B2) 80% H_2O :20% MeOH , (C1 e C2) 90% H_2O :10% MeOH , em função do tempo de preparo da solução. Temperatura ambiente. 57

Figura 20 - Espectros de absorção dos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ ($3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em (A1 e A2) 70% H_2O :30% MeOH , (B1 e B2) 80% H_2O :20% MeOH , (C1 e C2) 90% H_2O :10% MeOH , em função do tempo de preparo da solução nos comprimentos de ondas de 292nm e 460. 59

Figura 21 - (A) e (B) espectros de absorção eletrônica do $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ ($3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em várias concentrações de água/metanol (v/v) à temperatura ambiente; (C) e (D) intensidade de absorbância em comprimentos de onda fixos (470nm). 61

Figura 22 - (A) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (B) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ aderidos nas paredes das cubetas de quartzo. 62

Figura 23 - Estudo de estabilidade dos complexos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ ($3,0 \times 10^{-5}$; $6,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão PBS (pH=7.4) e espectro de absorção no UV/Visível ao longo do tempo. 63

Figura 24 - Espectros de absorção dos ($3,0 \times 10^{-5}$; $6,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em função do tempo de preparo da solução nos comprimentos de ondas de 292nm e 460nm. 65

Figura 25 - Espectro eletrônico de absorção da banda MLCT dos complexos (A) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (B) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em tampão Tris (pH=7.4), logo após (tempos 0 min.) a dissolução (linha preta) e 240 min. após a dissolução (linha vermelha). 67

Figura 26 - Algumas moléculas presentes no meio de cultura (Dmem). 67

Figura 27 - Espectros de absorção dos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ ($3,0 \times 10^{-5}$; $6,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) no meio de cultura (Dmem high glucose) em função do tempo. 69

Figura 28 - Espectro eletrônico de absorção da banda MCLT dos complexos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em meio de cultura (Dmem high glucose), logo após (tempo 0 hr) a dissolução (linha preta) e 96 hr após a dissolução (linha vermelha). 71

Figura 29 - (A) e (B) Espectro de absorção dos complexos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em BSA ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) no UV/Visível descontando o branco (BSA) ao longo do tempo. 72

Figura 30 - Espectro eletrônico dos complexos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)^+$ ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em ausência (-) e presença de concentração crescente de BSA ($3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) com 5 minutos de incubação a temperatura ambiente. Insert: banda MLCT do complexo em 383 a 470nm evidenciando o efeito hipocrômico. 73

Figura 31 - Espectros de (A1, B1, C1, D1) fluorescência e (A2, B2, C2, D2) absorbância da BSA sob adições sucessivas de complexo $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ em Tris (pH 7,4) nas temperaturas (A) 20°, (B) 25°, (C) 30° e (D) 35°C. $[\text{BSA}] = 3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fenda de abertura excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente... 76

Figura 32 - Espectros de (A1, B1, C1, D1) fluorescência e (A2, B2, C2, D2) absorbância da BSA sob adições sucessivas de complexo $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em Tris (pH 7,4) nas temperaturas (A) 20°, (B) 25°, (C) 30° e (D) 35°C. $[\text{BSA}] = 3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fenda de abertura excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente... 77

Figura 33 - Espectros de fluorescência da BSA sob adições sucessivas do complexo (A1, B1, C1, D1) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (A2, B2, C2, D2) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em Tris (pH 7,4) nas temperaturas (A) 20°, (B) 25°, (C) 30° e (D) 35°C. $[\text{BSA}] = 3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fendas de abertura excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente. 79

Figura 34 - Gráficos de Stern-Volmer das interações entre a BSA e complexo (A) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em tampão Tris (pH 7,4) nas temperaturas de 20°, 25°, 30° e 35°C. $[\text{BSA}] = 3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fendas de excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente..... 80

Figura 35 - Gráficos de $\log[(F_0/F)/F]$ em função de (A) $\log[\text{Rubpy}]$ e (B) $\log[\text{Rubpe}]$ em diferentes temperaturas (20°, 25°C, 30°C e 35°C). BSA $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão Tris 10mM pH 7.4; $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fendas de excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente. 82

Figura 36 - Gráficos de $\ln K_b$ em função de $1/T (\text{K}^{-1})$ (A) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (B) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em diferentes temperaturas (20°, 25°C, 30°C e 35°C). BSA $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão Tris 10mM pH 7.4; $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fendas de excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente. 84

Figura 37 - Espectros de fluorescência da BSA incubada por 24h em soluções independentes com concentrações diferentes de complexo (A) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (B) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em Tris (pH 7,4) à 35°C. Espectros de absorção da BSA incubada 24h com os complexos (C) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (D) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em Tris (pH 7,4) à 35°C. $[\text{BSA}] = 3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fendas de excitação e emissão de 50 nm e 1,0 nm, respectivamente. 86

Figura 38 - Espectros de fluorescência da BSA sob adições sucessivas de complexo (A) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (B) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em Tris (pH 7,4) à 35°C. Espectros de absorção da BSA incubada 0h com os complexos (C) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (D) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em Tris (pH 7,4) à 35°C.

[BSA] = 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. λ_{exc} = 280nm, fendas de excitação e emissão de 50 nm e 1,0 nm, respectivamente. 87

Figura 39 - Espectros de fluorescência da BSA incubada por 24h em soluções independentes com concentrações diferentes de complexo (A) [Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e (B) [Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆) em Tris (pH 7,4) à 35°C. Decaimento da intensidade de fluorescência (350 nm) em função da concentração de (C) [Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e (D) [Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆). T = 35°C. [BSA] = 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. λ_{exc} = 280nm, fendas de abertura excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente. 88

Figura 40 - Espectros de fluorescência da BSA sob adições sucessivas de complexo (A) [Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e (B) [Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆) em Tris (pH 7,4). Decaimento da intensidade de fluorescência (350 nm) em função da concentração de (C) [Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e (D) [Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆). T = 35°C. [BSA] = 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. λ_{exc} = 280nm, fendas de abertura excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente. 89

Figura 41 - Gráficos de Stern-Volmer das interações entre a BSA e complexo [Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e [Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆) (A e B) incubadas por 24 horas em soluções independentes à 35°C ou (C e D) sob adições sucessivas de alíquotas solução complexo à 35°C. [BSA] = 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão Tris (pH 7,4). λ_{exc} = 280nm, fendas de excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente. 90

Figura 42 - Gráficos de $\log[(F_0/F)/F]$ em função de $\log[\text{Rubpy}]$ ou $\log[\text{Rubpe}]$ (A e B) incubadas por 24 horas em soluções independentes à 35°C ou (C e D) sob adições sucessivas de alíquotas solução complexo à 35°C. BSA 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão Tris 10mM pH 7.4; λ_{exc} = 280nm, fendas de excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente. 92

Figura 43 - (A e B) Espectros de fluorescência da BSA sob adições sucessivas de complexo [Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e [Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆). (C e D) Gráficos de Stern-Volmer da interação de [Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e [Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆) ajustados pela equação 11. (E e F) Gráficos de $F_0/(F_0 - F) - 1$ em função de $[Q]$. Tampão PBS (pH 7,4), temperatura 25°C, [BSA] = 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, λ_{exc} = 280nm, fendas de abertura excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente. 95

Figura 44 - Espectro de supressão de fluorescência nos espectros de emissão da BSA (λ_{exc} = 280 nm) devido ao efeito fotodinâmico. Solução de BSA (3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), preparada em tampão Tris (pH = 7,4), irradiada com luz branca (λ = 470nm, I = 100 mW/cm², t = 40min, d = 20 cm) em presença de (A) BSA; (B) Rubpy e (C) Rubpe com concentração (1,5x10⁻⁵ mol L⁻¹). (D, E e F) Espectro de absorção da BSA e dos complexos [Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e [Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆). Temperatura 18°C. 98

Figura 45 - Cinética de decaimento da intensidade máxima de fluorescência BSA (350nm) em função do tempo de irradiação em presença de (A) 15 μM Rubpy e (B) 15 μM Rubpe em tampão Tris 10mM (pH=7,4). 101

Figura 46 - (A) Espectro de emissão do complexo [Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) contendo 25x10⁻⁴ mol L⁻¹ DMPC, em função do tempo de interação FS-lipossomo. (B) Intensidade

de emissão em 625 nm do complexo de Ru em lipossomo *versus* tempo de interação em minutos. $\lambda_{exc} = 425$ nm, fendas 5/15nm, temperatura 25°C..... 103

Figura 47 - (A) Espectros de absorção de $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$ em água antes (linha preta) e depois da adição de $2,16 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ - DMPC (linha vermelha). (B) Espectro de emissão do $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$ em água. ($\lambda_{exc} = 425$ nm, fendas 5/15nm em diferentes concentrações de DMPC, à temperatura 25°C..... 104

Figura 48 - (A) Espectro de absorção do $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$ em água antes (linha preta) e depois da adição de $2,16 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DMPC (linha vermelha). (B) Espectro de emissão do $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$ em água ($\lambda_{exc} = 425$ nm, fendas 5/15nm) em diferentes concentrações de DMPC, à temperatura 25°C..... 104

Figura 49 - Emissão normalizada em função da concentração de DMPC para (A) $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$ e (B) $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$. As linhas completas estão relacionadas com ajustes do modelo teórico usando a Equação 4. 105

Figura 50 - Espectro de emissão de fluorescência da CF em função do tempo, complexos de $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$ e $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$ encapsulados no lipossomo. 107

Figura 51 - Curva da cinética da liberação de CF em LUV's de lecitina de soja com adição dos complexos de $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$ e $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$ encapsulados no lipossomo. 108

Figura 52 - Porcentagem de liberação de CF em função do tempo em LUV's de lecitina de soja no escuro e irradiada e com fotossensibilizadores encapsulado..... 108

Figura 53 - % Incorporação celular dos complexos Ru ($6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) incubados por 24 horas em células (A) HeLa e (B) MDA-MB-231. As barras representam a média $\pm$ desvio médio de três experimentos independentes com 4 repetições em cada experimento (n = 12), *ns* indica que não há diferença estatística. 110

Figura 54 - % Incorporação celular dos complexos Ru (60 μ M) incubados por 24 h com concentração de 60 μ M em células HeLa e MDA-MB-231. As barras representam a média $\pm$ desvio médio de três experimentos independentes com 4 repetições em cada experimento (n = 12), *ns* indica que não há diferença estatística determinada pelo método de *Holm-Sidak*, $\alpha = 0,05$ 111

Figura 55 - (A e B) % Viabilidade celular em função da concentração (μ M) de $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$ e $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$ após 24 hs de incubação no escuro em (A) HeLa e (B) MDA-MB-231. (C e D) Viabilidade celular *versus* log[concentração] de $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$ e $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$ para determinação do IC₅₀ sem luz em (A) HeLa e (B) MDA-MB-231. As barras representam a média $\pm$ desvio médio de três experimentos independentes com 3 repetições em cada experimento (n = 9), *significância estatística determinada pelo método de *Holm-Sidak*, $\alpha = 0,05$ na mesma concentração..... 113

Figura 56 - (A e B) % Viabilidade celular em função da concentração (μ M) de $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$ e $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$ após 24 hs de incubação e

irradiação com LED Azul ($\lambda_{\text{máx}} = 460 \text{ nm}$), dose $\approx 3 \text{ J/cm}^2$ em (A) HeLa e (B) MDA-MB-231. (C e D) Viabilidade celular *versus* $\log[\text{concentração}]$ de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ para determinação do IC_{50} com luz em (A) HeLa e (B) MDA-MB-231. As barras representam a média $\pm$ desvio médio de três experimentos independentes com 3 repetições em cada experimento ($n=9$), *significância estatística determinada pelo método de *Holm-Sidak*, $\alpha=0,05$ na mesma concentração. 115

Figura 57 - (A e B) % Viabilidade celular *versus* $\log[\text{concentração}]$ do $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ após 24 hs de incubação e irradiação com LED Azul ($\lambda_{\text{máx}} = 460 \text{ nm}$), dose $\approx 3 \text{ J/cm}^2$ em (A) HeLa e (B) MDA-MB-231. (C e D) % Viabilidade celular *versus* $\log[\text{concentração}]$ do $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ após 24 hs de incubação e irradiação com LED Azul ($\lambda_{\text{máx}} = 460 \text{ nm}$), dose $\approx 3 \text{ J/cm}^2$ em (C) HeLa e (D) MDA-MB-231. As barras representam a média $\pm$ desvio médio de três experimentos independentes com 3 repetições em cada experimento ($n=9$). 117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reações que ocorrem durante a ação fotodinâmica.	25
Tabela 2 - Valores de IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) de alguns complexos de rutênio contra a linhagem tumoral.....	37
Tabela 3 - Comprimento de onda de máxima absorção (λ _{máx}); coeficiente de absortividade molar (ε) e comprimento de onda máximo de emissão e rendimento quântico de emissão (Φ) dos complexos polipiridínicos de rutênio (II) em metanol, e suas respectivas atribuições às transições eletrônicas.	55
Tabela 4 - Características espectroscópicas dos aminoácidos presentes na BSA.	73
Tabela 5 - Constante de Stern-Volmer (K _{sv}) dos complexos Ru com a BSA (solução 3,0 μmol L ⁻¹ de BSA em tampão Tris 10mM, pH 7.4).	81
Tabela 6 - Constantes de ligação (K _b) e número de sítios de ligação do supressor (n) para os compostos Rubpe e Rubpy.....	82
Tabela 7 - Parâmetros termodinâmicos para a determinação do caráter das forças de ligação envolvidas.	84
Tabela 8 - Constante de Stern-Volmer (K _{sv}) dos complexos Ru com a BSA (solução 1,0 μmol L ⁻¹ de BSA em tampão Tris, pH 7.4), após 24h de incubação em soluções independentes de complexo Ru ou após adições sucessivas de alíquotas complexo Ru.	91
Tabela 9 - Constantes de ligação (K _b) e número de sítios de ligação do supressor (n) obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados para a supressão de fluorescência de BSA (1,0 μmol L ⁻¹) para os compostos [Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpy)](PF ₆) e [Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpe)](PF ₆) em tampão Tris.	92
Tabela 10 - Constante de Stern-Volmer (K _{sv}), constante de ligação (K _b) e número de sítios de ligação do supressor (n) dos complexos Ru com a BSA (solução 3,0 μmol L ⁻¹ de BSA em tampão PBS, pH 7.4 à 25°C).	96
Tabela 11 - Tempo de decaimento t ₁ e t ₂ (em minutos) calculados a partir do ajuste exponencial de 2ª ordem pelo Origin.	102
Tabela 12 - Valores da constante de ligação (K _b) calculadas pela equação 4 para os complexos de Rutênio em lipossomos de DMPC.	105
Tabela 13 - Valores de IC ₅₀ (μM) no escuro dos complexos Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpy)](PF ₆) e [Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpe)](PF ₆) nas linhagens HeLa e MDA-MB-231.	114

Tabela 14 - Valores de IC_{50} dos complexos $Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$ e $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$ irradiados com LED Azul nas linhagens HeLa e MDA-MB-231. 116

Tabela 15 - Valores do fator de fotoinibição (PIF) para cada complexo (Rubpy e Rubpe) em ambas as linhagens celulares (HeLa e MDA-MB-231)..... 118

ABREVIações E Símbolos

BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
Dmen	Meio Dulbecco's modificado (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
FBS	Soro fetal bovino
HeLa	Linhagem celular de carcinoma uterino humano
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
PBS	Tampão fosfato salina
λ_{em}	Absorbância no comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	Absorbância no comprimento de onda de excitação
K_b	Constante de ligação aparente do supressor á BSA
K_q	Constante de velocidade de supressão de biomolecular
K_{sv}	Constante de supressão biomolecular de Stern-Volmer
<i>n</i>	Número de potenciais sítios de ligação à BSA
R	Constante dos gases (8,31447 Jmol ⁻¹ K ⁻¹)
T	Temperatura
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama
MLCT	Transferência de carga do metal para o ligante
IL	Transição eletrônica intraligante
IC₅₀	Concentração inibição do crescimento celular em 50%
[Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) ou Rubpy	<i>cis</i> -bis(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)-(4,4'-bipiridina)clororutênio(II)
[Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆) ou Rubpe	<i>cis</i> -bis(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(trans-1,2-(4-piridil)etileno) clororutênio(II)
MeOH	Metanol
R²	Coeficiente de determinação
Ru	Rutênio
LUV	Vesícula unilamelar grande
MLV	Vesícula multilamelar

TLD-1433

[Ru(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)2(2-(2',2'':5'',2'''-terthiophene)-imidazol[4,5-f][1,10]phenanthroline')]2⁺

UNIDADES DE MEDIDAS

mg	Miligramas
mL	Mililitro
μL	Microlitro

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO.....	6
ABSTRACT	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	10
LISTA DE TABELAS.....	16
ABREVIACÕES E SÍMBOLOS.....	18
UNIDADES DE MEDIDAS.....	20
SUMÁRIO.....	21
1 INTRODUÇÃO	23
1.1. Terapia Fotodinâmica	23
1.2. Polipiridina de rutênio como fotossensibilizadores para TFD	27
1.3. Importância da interação dos FSs com biomoléculas	30
1.4. Complexos Rutênio com atividade antitumoral.....	34
2. OBJETIVOS	38
2.1. Objetivos gerais	38
2.2. Objetivos específicos	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1. Caracterização espectroscópica de absorção eletrônica dos complexos de Rutênio	38
3.1.1. Estabilidade em tampão fosfato (PBS e Tris) e DMEM.....	39
3.1.2. Estabilidade na albumina de soro bovino	39
3.2. Estudo de interação dos complexos de Ru com albumina do soro bovino (BSA)	40
3.3. Estudo da interação dos complexos de Ru com lipossomos.....	42
3.4. Oxidação em lipossomos fotoinduzidos pelos complexos Ru.....	43
3.5. Oxidação na BSA fotoinduzida pelos complexos de Rutênio	47
3.6. Linhagens celulares e manutenção celular.....	47
3.6.1. Preparo de soluções do <i>cis</i> -[Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpy)](PF ₆) e <i>cis</i> -[Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpe)](PF ₆)	48
3.6.2. Incorporação do <i>cis</i> -[Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpy)](PF ₆) e <i>cis</i> -[Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpe)](PF ₆)	50

3.6.3. Toxicidade dos complexos de rutênio em células tumorais (HeLa e MDA-MB-231)	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1. Perfil dos complexos polipiridínicos de rutênio (II) na região do ultravioleta e visível (UV-vis).....	53
4.2. Estudo da estabilidade dos complexos polipiridínicos de Rutênio(II) em água (H ₂ O) e sistemas tampão (PBS e Tris)	55
4.3. Estudo da estabilidade dos complexos de rutênio(II) em meio de cultura (Dmem <i>high glucose</i>)	67
4.4. Estudo da estabilidade dos complexos polipiridínicos de rutênio(II) em albumina de soro bovino (BSA).....	72
4.5. Avaliação da interação entre os complexos polipiridínicos de rutênio (II) e albumina do soro bovino (BSA) <i>via</i> espectroscopia de fluorescência	73
4.6. Oxidação da BSA fotoinduzida pelos complexos de Ru	96
4.7. Estudo da interação do [Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpy)](PF ₆) e [Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpe)](PF ₆) com lipossomos (DMPC)	102
4.8. Oxidação dos lipossomos (Lecitina de Soja) fotoinduzida pelos complexos de Ru	106
4.9. Incorporação dos complexos de Rutênio em células HeLa e MDA-MB-231 ...	109
4.10. Toxicidade de [Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpy)](PF ₆) e [Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpe)](PF ₆) em células tumorais	111
5. CONCLUSÃO.....	118
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

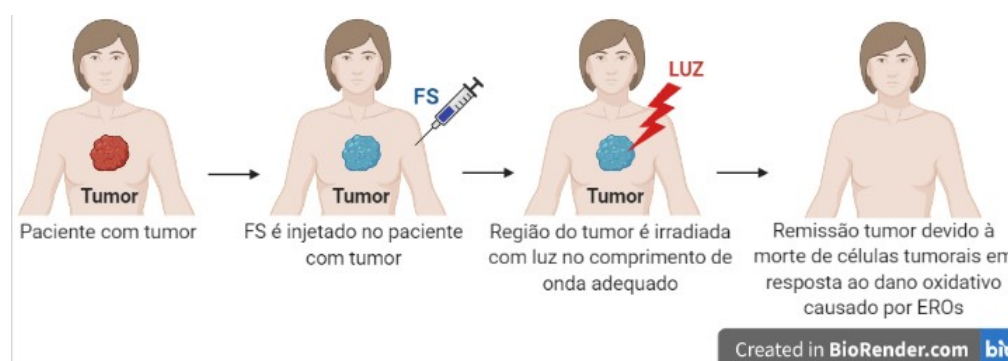
1 INTRODUÇÃO

1.1. Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um procedimento médico com aplicações terapêuticas utilizadas no combate de doenças neoplásicas (câncer), degeneração macular da retina, psoríase, arteriosclerose, doenças virais (herpes), doenças bacterianas, micoses, tratamentos odontológicos e dermatológicos (acne) (TETARD et al., 2014; VAROL, 2015). Essa terapia é baseada na foto-oxidação de biomoléculas promovida por um composto fotossensível (FS), que é ativado por irradiação luminosa em comprimentos de onda compatíveis com sua absorção (DOUGHERTY et al., 1998; STERNBERG; DOLPHIN; BRICKNER, 1998). A principal vantagem da TFD é de ser um método eficiente, que não danifica os tecidos saudáveis ao redor do tecido doente (TARDIVO et al., 2005).

O procedimento mais comum adotado na terapia fotodinâmica (Figura 1) consiste em injetar a droga na corrente sanguínea do paciente, que geralmente se concentra mais nas células doentes do que nas células saudáveis (KESSEL et al., 1997; PAVANI et al., 2009). Somente os tecidos doentes são irradiados com luz de comprimento de onda apropriado. O FS, eletronicamente excitado, gera espécies reativas de oxigênio (EROs) *via* transferência de energia ou de elétrons e prótons, promovendo danos moleculares que desencadeiam o processo de morte celular.

Figura 1 - Esquema indicando a sequência de aplicação da Terapia Fotodinâmica para o tratamento de um tumor.

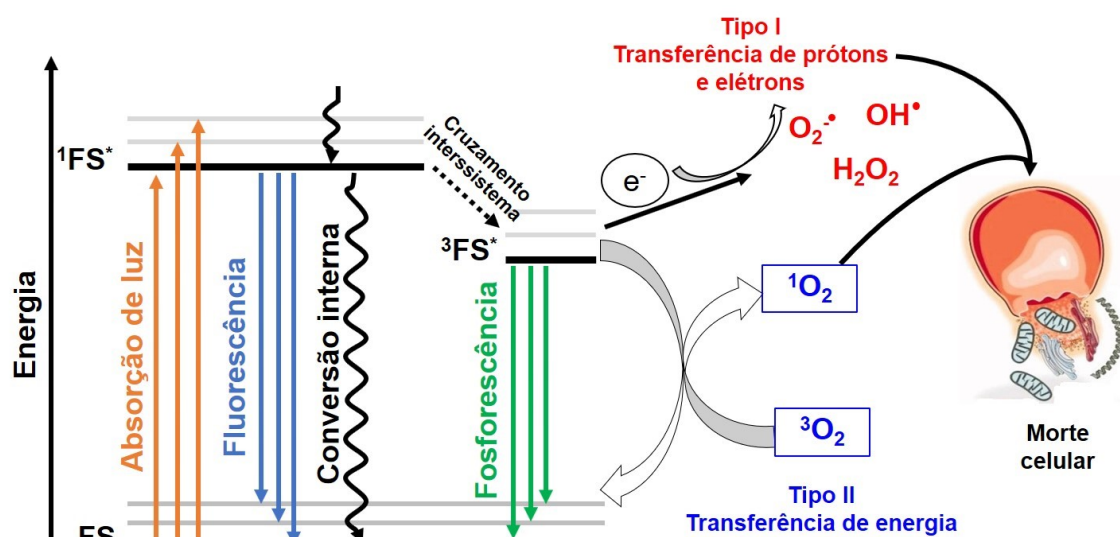


Fonte: Figura criada pela autora utilizando *BioRender*. – Adaptado de (REZENDE et al., 2022).

Esta modalidade terapêutica, por ser minimamente invasiva, é utilizada no tratamento de várias doenças que tem como característica comum um crescimento anormal de tecidos, tais como câncer, artrite reumatóide, miopia patológica, (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

A ação farmacológica na Terapia Fotodinâmica tem início quando o FS é excitado pela absorção de fótons de luz. Subsequentemente podem ocorrer dois mecanismos principais de reação: mecanismo do tipo I e mecanismo do tipo II, que estão ilustrados no diagrama de Jablonski apresentados na Figura 2 (BAPTISTA et al., 2017, 2021).

Figura 2 - Diagrama de Jablonski modificado mostrando os mecanismos de ação dos FSs.



Fonte: Figura criada pela autora – Adaptado de (PHAM et al., 2021).

O fotossensibilizador no estado fundamental S_0 absorve luz passando para o estado excitado singlete S_n . Como os processos de relaxação vibracional (não radioativos) ocorrem mais rapidamente em relação aos processos de decaimentos radioativos (fluorescência e fosforescência), as moléculas excitadas do FS decaem por relaxações vibracionais (conversão interna) até atingirem o primeiro estado excitado singlete S_1 . A partir deste nível energético, as moléculas podem decair para o estado fundamental S_0 por emissão de fluorescência e por processos não radioativos de conversão interna.

Os FSs podem também sofrer um processo isoenergético de cruzamento de sistema para formar um estado excitado tripleto T_1 . Deste nível de energia, as moléculas podem retornar ao estado fundamental com emissão de fosforescência, embora isso usualmente

não ocorra em soluções oxigenadas. O estado excitado triplete tem geralmente grande tendência em reagir com outras moléculas, por exemplo com substratos biológicos através do mecanismo do Tipo I (Figura 2). Nesse caso, o FS no estado triplete excitado reage por meio de transferência de elétrons, hidrogênios ou transferência de prótons e elétrons acoplados, gerando íons radicais ou radicais que tendem a reagir com oxigênio no estado fundamental produzindo espécies reativas de oxigênio capazes de oxidar biomoléculas (Tabela 1) (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001; ORMOND; FREEMAN, 2013; PUSHPAN et al., 2002).

Tabela 1 - Reações que ocorrem durante a ação fotodinâmica.

Excitação:		FS + $h\nu$	$^1\text{FS}^*$	$^3\text{FS}^*$
Mecanismo	Reação			Produto
Tipo I	$^3\text{FS}^* + \text{FS}$	$\longrightarrow$		$\text{FS}^{\bullet-} + \text{FS}^{+\bullet}$ (a)
	$^3\text{FS}^* + \text{S}$	$\longrightarrow$		$\text{FS}^{\bullet-} + \text{S}^+$ (b)
	$\text{FS}^{\bullet-} + \text{O}_2$	$\longrightarrow$		$\text{FS} + \text{O}_2^{\bullet-}$ (c)
	$^3\text{FS}^* + \text{O}_2$	$\longrightarrow$		$\text{FS}^{+\bullet} + \text{O}_2^{\bullet-}$ (d)
	$2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+$	$\longrightarrow$		$\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ (e)
Tipo II	$^3\text{FS}^* + \text{O}_2$	$\longrightarrow$		$\text{FS} + ^1\text{O}_2$ (f)

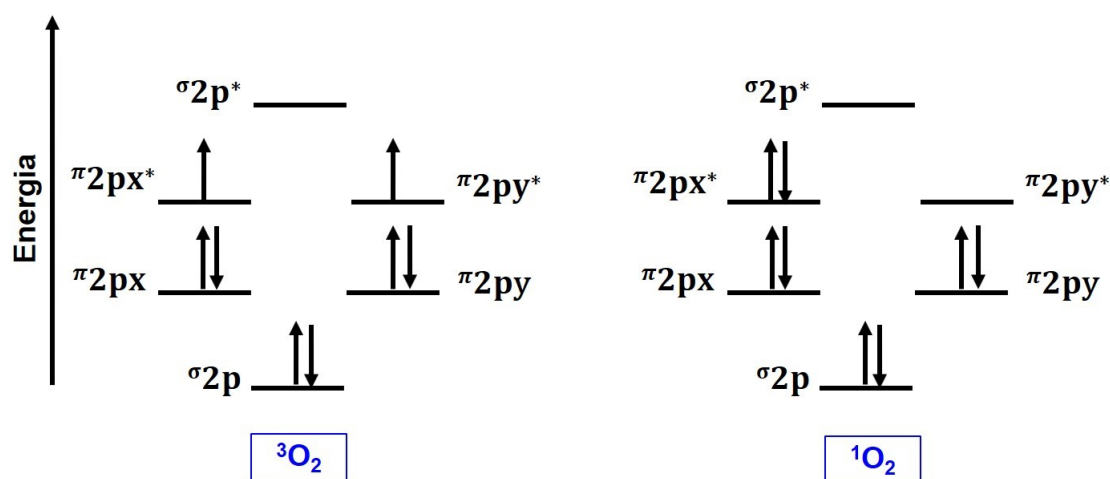
*S = substrato

Fonte: Adaptado de (ORMOND; FREEMAN, 2013)

No mecanismo do Tipo I podem ocorrer diferentes reações tais como descritas na Tabela 1. A reação entre o $^3\text{FS}^*$ e o próprio FS no estado fundamental provoca uma fotodegradação que formam os radicais ânions e cátions do FS, $\text{FS}^{\bullet-}$ e $\text{FS}^{+\bullet}$, respectivamente (a). O substrato (S) é uma molécula doadora de elétrons que pode reagir com o $^3\text{FS}^*$ produzindo substrato oxidado (S^+) e $\text{FS}^{\bullet-}$ (b). O ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pode ser formado em mecanismos do Tipo I por duas maneiras: uma em que o ânion radical do FS ($\text{FS}^{\bullet-}$) pode reagir com o oxigênio molecular (c) e outra em que ocorre transferência de elétron do $^3\text{FS}^*$ com o oxigênio (d). Neste último caso, no entanto, ocorre competição com a produção de oxigênio singlete (mecanismo do Tipo II - f). Também pode ocorrer a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), através da combinação de duas moléculas de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) com prótons (e).

Sendo que no mecanismo Tipo II (Figura 2 ou reação (f) na Tabela 1), o FS no estado excitado triplete interage com o oxigênio no estado fundamental ($^3\text{O}_2$) por transferência de energia, gerando o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) que é uma espécie altamente reativa e citotóxica. O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) é muito mais reativo que o oxigênio molecular, devido a configuração diamagnética do spin favorecendo o ataque de substratos doadores de pares de elétrons – Figura 3 (FOOTE, 1968a, 1968b; MACDONALD; DOUGHERTY, 2001). A energia necessária para a transição do oxigênio do estado triplete para o estado singlete é de 94 kJ.mol^{-1} ($22,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$), que corresponde ao comprimento de onda de 1270 nm. Portanto, a diferença de energia entre o estado T_1 e S_0 deve estar acima deste valor para que ocorra a formação de oxigênio singlete (DEROSA; CRUTCHLEY, 2002; ORMOND; FREEMAN, 2013).

Figura 3 - Estado triplete ($^3\text{O}_2$) e singlete ($^1\text{O}_2$) do oxigênio.



Fonte: Figura adaptada (ORMOND; FREEMAN, 2013).

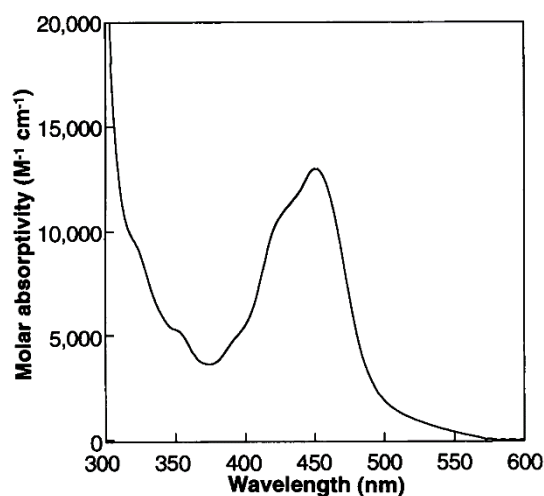
Os principais sítios de reação do oxigênio singlete são aqueles ricos em elétrons, ou seja, ligações insaturadas carbono-carbono, aminas, sulfetos, ânions e nucleófilos neutros (BAPTISTA et al., 2021; DEROSA; CRUTCHLEY, 2002). Portanto, o oxigênio singlete pode reagir com várias biomoléculas, tais como cadeias laterais de aminoácidos, lipídeos insaturados, colesterol e bases nitrogenadas. Isso implica, por exemplo, em danos a membranas, DNA, mitocôndria e lisossomos, comprometendo a homeostase celular (TSUBONE et al., 2021).

1.2. Polipiridina de rutênio como fotossensibilizadores para TFD

Os derivados polipiridínicos de rutênio(II) representam um dos tópicos mais importantes da química de coordenação, grande parte desse interesse é decorrente da estabilidade química, propriedade redox versátil, reatividade e tempo de vida do estado excitado dessas espécies (BALZANI et al., 2001; BALZANI; JURIS, 2001). Tais características fazem com que as polipiridinas de rutênio desempenhem um papel de fundamental importância nas áreas de fotoquímica, fotofísica, fotocatalise, quimio e fotoquimioluminescência e transferência de elétrons ou energia (BALZANI; JURIS, 2001) e mais recentemente como fotossensibilizadores na TFD (HEINEMANN; KARGES; GASSER, 2017; KNOLL; ALBANI; TURRO, 2015; MONRO et al., 2019).

O estudo dos complexos polipiridínicos de rutênio teve início em meados da década de 50, devido à descoberta da propriedade luminescente do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (bpy= 2,2'-bipiridina) reportado por Paris e Brandt (VOS; KELLY, 2006). Esta classe de compostos possui uma banda de absorção larga na região do visível que resulta de uma transição de transferência de carga metal-ligante (MLCT) (JAKUBIKOVA et al., 2009; MATIAS et al., 2016), como pode ser observado na Figura 4. No estado fundamental a molécula pode ser descrita como $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$, a absorção de luz resulta na transferência de um elétron do íon metálico para um dos ligantes bpy com a formação do estado excitado $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+*}$, descrito como $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{bpy}^{\bullet-})(\text{bpy})_2]^{2+}$ (DAMRAUER et al., 1997; THOMPSON; ITO; MEYER, 2013). A excitação eletrônica do $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ocorre via formação do estado $^1\text{MLCT}$ (estado singlete), seguido pelo rápido (~ 15 fs) e quantitativo cruzando intersistema produzindo o estado tripleto $^3\text{MLCT}$. Em adição, o tempo de vida do $^3\text{MLCT}$ no $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+*}$ é suficientemente longo, $\sim 0,6\mu\text{s}$ em água na temperatura ambiente, para possibilitar transferência de elétrons ou energia, fazendo muito atrativo a investigação deste tipo de complexo como fotossensibilizador (DAMRAUER et al., 1997; THOMPSON; ITO; MEYER, 2013). O estado excitado $^3\text{MLCT}$ possibilita a utilização deste composto em terapia fotodinâmica (TFD), neste caso, a energia é transferida do estado excitado da polipiridina de rutênio para a molécula de O_2 que no estado fundamental também é estado tripleto, produzindo oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) que é uma espécie altamente oxidante (ALBANI et al., 2014; LINCOLN et al., 2013; LIU et al., 2009; SUN et al., 2010). Se não houver transferência de elétrons ou energia, o estado excitado dos complexos ($^3\text{MLCT}$) é desativado via emissão de luz ao redor de 600 nm (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992).

Figura 4 - Espectro de absorção do $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ solubilizado em acetonitrila.



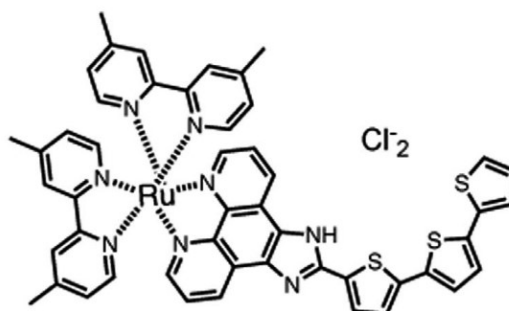
Fonte: (DAMRAUER et al., 1997).

Embora a nova era da TFD (após os trabalhos de Dougherty e Henderson (1998), já tenha mais de 30 anos, e tenha mostrado benefícios no tratamento de diversas doenças, a TFD ainda não chegou ao ponto de ser amplamente conhecida e utilizada por médicos. Acreditamos que seja necessário um ponto de ruptura em termos de eficiência do processo de TFD, para que este tipo de tratamento possa atrair mais médicos e consequentemente beneficiar mais pessoas. Isso de alguma forma já está acontecendo em termos das fontes de luz, um campo que avançou significativamente na última década (KIM; DARAFSHEH, 2020; MARCU et al., 2017). Além disso, centenas de novos medicamentos foram desenvolvidos, mas apenas alguns foram para as clínicas (BASKARAN; LEE; YANG, 2018; HAMBLIN, 2020). Provavelmente, porque ainda estamos usando as mesmas características físico-químicas dos compostos nas últimas décadas (porfirinas, clorinas e ftalocianinas), e de alguma forma as melhorias de eficiência descobertas em níveis moleculares não são transpostas para os ensaios clínicos.

Dentre as classes de compostos investigadas, os complexos metálicos e especialmente os complexos de polipiridina de Ru(II) têm recebido atenção crescente devido às suas intrigantes propriedades químicas, fotofísicas e biológicas, incluindo alta produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e fotoestabilidade (BALLESTER et al., 2020). Além disso, suas propriedades são facilmente modeladas por dois fatores: a natureza do ligante e o estado de oxidação do metal, o que determina a sua possível atividade biológica (BEIRITH et al., 1999). Recentemente, o complexo Ru(II) TLD-1433 (Figura 5) entrou na fase II dos ensaios clínicos como um FS para TFD contra câncer de bexiga (HAMBLIN, 2020). Este é o primeiro complexo inorgânico, que não pertence às

classes das porfirinas, clorinas e ftalocianinas a chegar em fase clínica para TFD; indicando uma nova possibilidade a se explorar. Por isso, neste projeto analisaremos as propriedades fotoquímicas de dois FS da classe dos complexos de Rutênio (Figura 6).

Figura 5 - Estrutura química do TLD-1433.

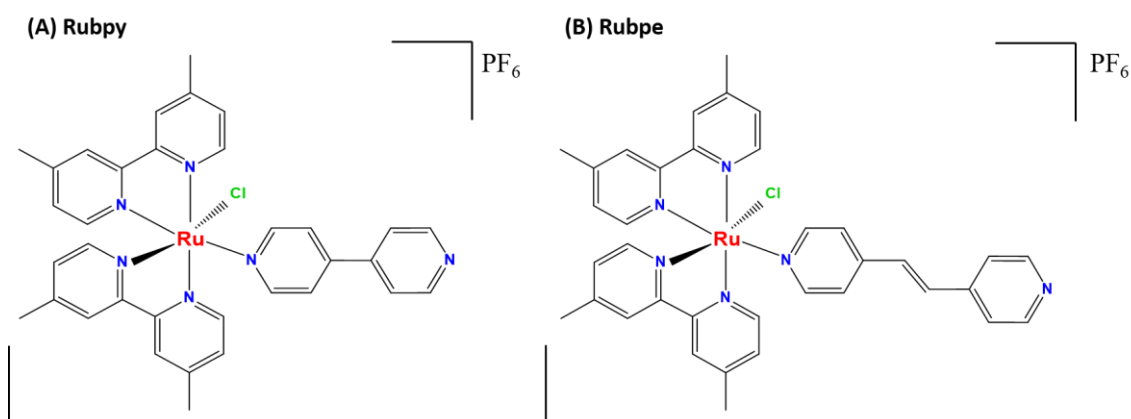


(e) TLD1433

Fonte: (HAMBLIN, 2020).

Dentre os 2 FS que foram estudados neste trabalho, um deles apresenta um dos ligantes com um grupo de hidrocarbonetos maior (grupo etileno separando dois anéis piridinas), conferindo uma maior hidrofobicidade ao composto (Figura 6).

Figura 6 - Estrutura das moléculas que serão estudadas: (A) *cis*-bis(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)-(4,4'-bipiridina)clororutênio(II), (B) *cis*-bis(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(*trans*-1,2-(4-piridil)etileno) clororutênio(II).



Fonte: Figura criada pela autora utilizando CS ChemDraw Drawing – Adaptado de (PARUSSULO, 2013)

Hipotetizamos que tal grupo etileno adicionado entre os anéis piridínicos, poderia aumentar a capacidade desse FS de interagir com biomoléculas, e consequentemente

fotooxidá-las com maior eficiência. Considerando que proteínas e bicamada lipídica exibem um papel importante nos organismos vivos (TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019), esta pode ser a chave para o design de novos complexos de rutênio voltados para aplicação em TFD. Então, torna-se necessário estudos acerca das interações dos complexos em estudo com biomoléculas que são responsáveis pelo armazenamento, transporte, metabolismo e excreção de ligantes, tanto endógenos quanto exógenos. Para avaliar isso, utilizaremos albumina bovina e sistemas modelo de membrana biológicas, que têm sido extensivamente utilizados para estudar a interações fármaco-biomoléculas e seu efeito interfacial em vários fenômenos, incluindo reações químicas, bioquímicas e processos fotoinduzidos. Estes sistemas são considerados ferramentas adequadas para investigar as possíveis alterações de equilíbrio e propriedades dinâmicas de membrana de maneira controlada (TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019). A interação entre tais espécies provoca a modificação estrutural da proteína e, conseqüentemente, a alteração das suas funções biológicas, e, possivelmente, ocasiona alterações dos comportamentos farmacodinâmicos dos fármacos em questão (HU et al., 2006; MOREIRA et al., 2015; SEEDHER; BHATIA, 2006).

Portanto, neste projeto estudamos as propriedades foto-físicas de duas moléculas novas (complexos de Ru – Figura 6), e avaliamos a interação e o dano que esses FSs causam em biomoléculas, bem como seu efeito de se incorporar e eliminar células tumorais *in vitro*.

1.3. Importância da interação dos FSs com biomoléculas

Dependendo da estrutura química do FS, o alvo terapêutico pode ser as membranas biológicas ou biomoléculas como proteínas do ambiente intracelular, em ambos os casos é necessário que FS interaja, se ligue ou atravesse a membrana celular (TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019). Portanto, os estudos de interação FS-biomoléculas podem fornecer informações importantes sobre a farmacocinética das moléculas, bem como sua fototoxicidade, fornecendo, assim, informações cruciais para o desenvolvimento racional de FS (PEREIRA-LEITE; NUNES; REIS, 2013).

As albuminas séricas têm sido uma das proteínas mais estudadas por muitos anos. São as proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo, correspondendo a cerca de 60% da proteína total e fornecendo cerca de 80% da pressão osmótica do sangue (SUN et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que albuminas séricas podem se ligar

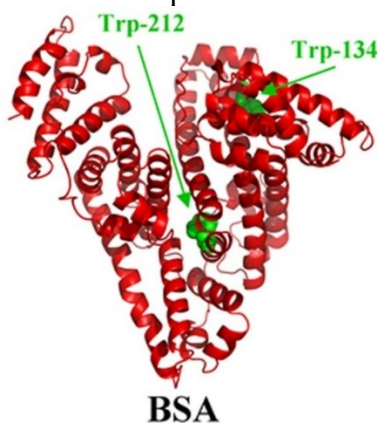
reversivelmente a uma variedade de moléculas endógenas e exógenas, como fármacos, FS e outras pequenas moléculas bioativas, que desempenham um papel importante na determinação da dosagem terapêutica dos fármacos (SUN et al., 2015). Cerca de 80%-90% dos complexos de Ru testados se ligam à albumina sérica (ZIA et al., 2018). Essa ligação entre complexo Ru e proteína plasmática ocorre mais provavelmente no nível de resíduos de histidina e pode levar à formação de aduto estável, dependendo da estrutura química do complexo (TIMERBAEV et al., 2006).

A albumina sérica bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) é a proteína mais estudada em sistemas biomiméticos devido à sua homologia estrutural com a albumina do sérica humana (HSA, do inglês *human serum albumin*) apresentando uma identidade de 76% (KANDAGAL et al., 2006). A BSA apresenta dois resíduos de triptofano (Trp-134 e 212), enquanto a HSA somente um (Trp 214). Estes resíduos de triptofano tornam a BSA altamente fluorescente em solução com um pico de emissão em 340nm, quando excitadas a 280nm (KANDAGAL et al., 2006).

Há também uma diferença na sequência de sítios N-terminais, onde a BSA apresenta a tríade Asp-Thr-His, e a HSA tem a tríade terminal Asp-Ala-His. Neste contexto, decidiu-se utilizar neste trabalho a BSA frente à HSA, pois além da sua semelhança com a estrutura primária da HSA, é estável e de baixo custo.

A BSA possui fluorescência intrínseca com máximo de emissão entre 332 – 350 nm, quando excitada em $\lambda_{exc} = 280$ nm, devido principalmente aos resíduos de triptofano (Trp) Trp-134 e Trp-212 (Figura 7), localizados no domínio I e subdomínio IIA, respectivamente.

Figura 7 - Representação dos arcabouços proteicos da albumina do soro bovino (BSA), destacando a localização dos resíduos de triptofano.



Fonte: (BELATIK et al., 2012).

Os sítios I e II da biomolécula são responsáveis pela ligação da BSA com os ligantes endógenos e exógenos. Na maioria das vezes, as interações e consequentemente o transporte de substâncias ocorrem nas cavidades hidrofóbicas localizadas no subdomínio IIA e IIB.

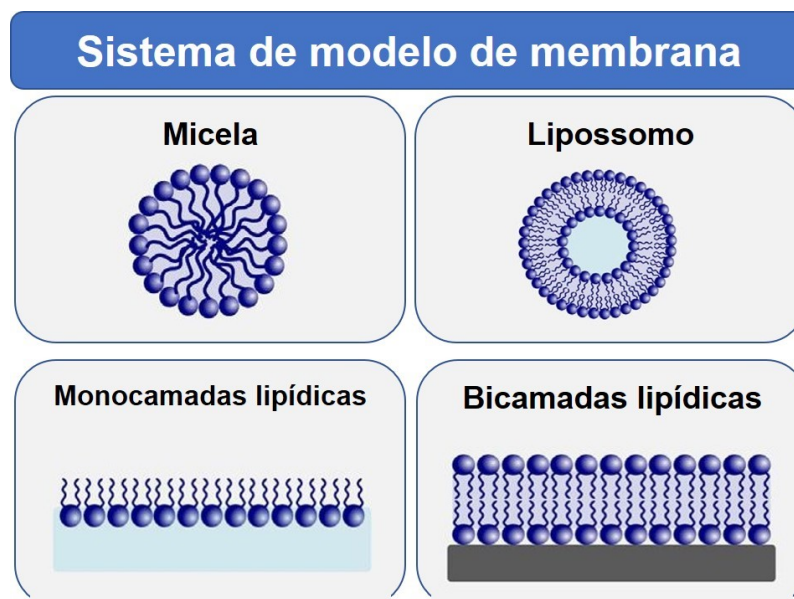
Depois do FS ser carreado pela corrente sanguínea com auxílio de biomoléculas como proteína albumina, o FS terá que ser incorporado nas células. Por isso, as interações FS-membrana são inevitáveis, uma vez que a maioria das moléculas precisa de atravessar ou se ligar a membranas lipídicas para exercer sua atividade terapêutica (ANDRADE et al., 2021).

Compreender os mecanismos a nível molecular pelos quais fármacos interagem com membranas biológicas é de importância crítica no campo farmacológico (BARREIRO; FRAGA, 2015). Entretanto, tais interações são difíceis de investigar a nível celular, devido à complexidade das membranas biológicas, principalmente relacionadas à estrutura dinâmica das membranas que possuem composição lipídica e proteica variada. Neste contexto, modelos de membrana *in vitro* à base de lipídios surgiram para oferecer uma alternativa simples, mas extremamente útil, de estudar as interações fármaco-membrana (ANDRADE et al., 2021).

Exemplos de tais modelos biomiméticos de membrana são as micelas e os lipossomos (Figura 8). Micela é um agregado de moléculas anfifílicas que se auto-organizam formando uma estrutura globular, sendo o modelo 3D mais simples para estudos de interação droga-membrana. Lipossomos são veículas constituídas por uma ou mais bicamada lipídica, sendo o modelo de membrana 3D mais popular devido a presença de folhetos internos e externos que simulam a membrana celular (ANDRADE et al., 2021).

Sabendo-se que a interação/localização do FS em membranas e células são importantes para o dano fotoinduzido, um estudo sistemático da relação estrutura-atividade pode ajudar a melhorar o processo terapêutico. Os sistemas biomiméticos têm sido extensivamente utilizados para estudar a influência da membrana em reações químicas e bioquímicas e em processos fotoinduzidos. Estes sistemas são ferramentas adequadas para investigar as possíveis alterações de equilíbrio e propriedades dinâmicas de superfície de maneira controlada (TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019).

Figura 8 - Representação esquemática dos sistemas de modelos de membrana.



Fonte: Figura criada pela própria autora, adaptado de (PEREIRA-LEITE; NUNES; REIS, 2013).

As membranas biológicas possuem o importante papel de controlar a entrada e saída de componentes das células (BETTELHEIM et al., 2012; KUČERKA et al., 2015; LEHNINGER; NELSON; COX, 2014). As micelas apresentam um grande potencial na solubilização de fármacos pouco solúveis em solução aquosa e, com isso, conseguem aumentar a sua biodisponibilidade no organismo (STEPHENSON et al., 2006), é o sistema de modelo mais simples por possuírem três regiões (hidrofóbica, esférica superficial e a camada de Gouy-Chapman) na sua estrutura (TANFORD, 1980). Este modelo mimético tem sido amplamente usado para estudar o efeito hidrofóbico, caracterizadas para membranas proteínas e peptídeos, para estudar interações droga-membrana e como veículos para entrega de drogas (CHAUDHURI; HALDAR; CHATTOPADHYAY, 2012).

Outro sistema mimético estudado são os lipídios que compõem a membrana, eles apresentam características distintas como tamanho, geometria de empacotamento, temperatura de transição gel-fluído, que podem influenciar tanto suas propriedades estruturais como espessura da bicamada lipídica, fluidez e permeabilidade (DA SILVEIRA SANTOS et al., 2020; LEHNINGER; NELSON; COX, 2014; SIANI et al., 2016; VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008).

As membranas celulares são difíceis de extrair e manipular, e sua composição complexa muitas vezes impede sua caracterização direta através de métodos biofísicos (SEDDON; CURNOW; BOOTH, 2004). Por outro lado, membranas lipídicas biomiméticas, que contêm menos espécies lipídicas do que membranas celulares reais, podem ser facilmente preparadas em laboratório e são compatíveis com múltiplas técnicas para sua investigação estrutural e dinâmica (SIONTOROU et al., 2017), sendo assim apropriadas para estudar a interação proteína-lipídicas através de métodos biofísicos.

A membrana plasmática está entre os componentes celulares mais externos, a caracterização de interações droga-lipídica tem um papel central no desenvolvimento de novas e drogas mais eficientes de origens naturais ou sintéticas (SEDDON et al., 2009).

A interação e localização de FSs em membranas biológicas, e consequentemente a ação fotossensibilizadora, são extremamente dependentes de suas estruturas moleculares (VILSINSKI et al., 2015). A hidrofobicidade, a simetria de distribuições de porções polares e hidrofóbica e os substituintes em torno do macrociclo cromofórico são propriedades estruturais de grande importância (ENGELMANN et al., 2007).

A importância de estudar as propriedades interfaciais entre FS-membrana, deve-se ao fato de que a interação inicial dos fármacos com as células ocorre devido a sua capacidade de se incorporar e permear membranas, bem como, na sua habilidade em produzir espécies citotóxicas nas proximidades do microambiente em que se pretende causar danos (TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019).

Uma série de complexos de rutênio(II) compreendendo diferentes ligantes de dipiridofenazina (dppz) mostra que mudanças sutis nos substituintes podem alterar localização e orientação dos complexos de Ru na bicamada lipídica da membrana. Recentemente, foi reportado que a interação entre complexo de Ru com membranas celulares podem induzir alterações elétricas, resultado em efeitos deletérios para células (SÁNCHEZ-MURCIA; NOGUEIRA; GONZÁLEZ, 2018; SANDRINO et al., 2016).

1.4. Complexos Rutênio com atividade antitumoral

Ultimamente, complexos de rutênio têm demonstrado interessantes propriedades antineoplásicas (HARTINGER et al., 2006; HUXHAM et al., 2003) na tentativa de se obter um fármaco menos tóxico e mais específico.

Três complexos de Ru(III) (NAMI-A, KP1019 e KP1339) entraram em ensaios clínicos, sendo caracterizados por exibirem menor citotoxicidade em comparação com

drogas contendo platina, internalização celular mediada por transferrina e redução para o íon Ru(II) sob condições de hipóxia em tumores. Da mesma forma, recentemente o composto TLD14333 (baseado em Ru(II)) também entrou em testes clínicos (Figura 5) (MITAL; ZIORA, 2018; THOTA et al., 2018).

O composto NAMI-A foi o primeiro complexo de Ru a ser testado em humanos, o qual foi introduzido em estudos clínicos de fase I em 1999, porém demonstrou eficácia limitada em estudos de fase II, limitando sua empregabilidade clínica (THOTA et al., 2018). Tanto o composto NAMI quanto NAMI-A compartilham o mesmo centro de Ru pseudo-octaédrico (III) cercado por quatro ligantes de cloreto no plano equatorial. Um grupamento Dmso(dmso-S) e umidazol ocupam as duas posições axiais. A carga negativa é neutralizada pelo sódio (Na^+) no composto NAMI e pelo cátion imidazólio no composto NAMI-A (ALESSIO; MESSORI, 2018). O NAMI-A possui toxicidade relativamente baixa em relação às células cancerígenas, mas é particularmente eficaz contra metástases de tumores sólidos em tumores experimentais de camundongos. Acredita-se que a atividade antimetastática do NAMI-A seja devida aos efeitos combinados no controle da angiogênese (possivelmente pela interferência no metabolismo dos óxido nítrico *in vivo*) e propriedades anti-invasivas contra células tumorais e vasos sanguíneos, e não à sua interação com ácidos nucleicos, embora interaja com o DNA *in vitro*) (PIZARRO; SADLER, 2009). Os efeitos biológicos do NAMI-A aparentemente derivam da ligação do rutênio ao colágeno presente na matriz extracelular e integrinas da superfície celular, levando ao aumento da adesão e à redução da invasividade das células (ALESSIO; MESSORI, 2018).

O trabalho de Gava et al. (2006) demonstra o efeito antimetastático do complexo NAMI-A frente a um modelo *in vitro* (linhagem celular B16) e *in vivo* (camundongos B6D2F1) de melanoma, onde pode-se observar a redução da produção de metástases nos animais tratados além de sua ação seletiva nas células de melanoma, a qual ocorreu de forma independente da concentração do composto utilizada, sugerindo que a inibição de metástases ocorreu devido à modulação negativa dos processos de invasão da célula tumoral, aliado à redução da atividade gelatinolítica das células tumorais, a qual possui um papel central no processo de invasão celular.

No trabalho publicado por Keppler e Rupp (1986)), foram apresentados os compostos KP418 e KP1019, contendo ligantes heterocíclicos coordenados por nitrogênio, quatro ligantes de cloreto equatorial e um íon azol ou sódio protonado para compensação de carga. Ambos os complexos apresentaram boa atividade anticâncer

contra linhagens de células cancerígenas colorretais resistentes a platina. Apesar das promissoras propriedades anticancerígenas, o composto KP418 não foi submetido a testes em humanos devido a gerar maior nefrotoxicidade em modelos murinos em comparação com KP1019.

O composto KP1019 sofre troca lenta de ligantes em condições fisiológicas, da mesma forma que os agentes anticancerígenos à base de platina. Outros estudos mostraram que os íons Ru foram localizados principalmente no citosol e na região nuclear celular. Infelizmente, este composto falhou em um teste de fase II, principalmente por causa da má solubilidade em água. A análise sanguínea de pacientes tratados com KP1019 mostrou menos de 1% da dose de KP1019 é vinculada à transferrina, sugerindo um papel limitado para esta proteína no transporte de drogas. Outras pesquisas mostraram que a albumina de soro humano liga prontamente KP1019 e seu análogo NKP1339 no plasma, e esta proteína sanguínea provavelmente desempenha um papel significativo no transporte e localização desta classe de drogas (MITAL; ZIORA, 2018). Foi demonstrado que a citotoxicidade de todos os três compostos KP está relacionada ao seu transporte transmembrana, com KP418 sendo pelo menos 10 vezes menos eficientemente absorvido em células do que KP1019 e KP1339. O composto KP418 nunca entrou em ensaios clínicos devido ao seu transporte transmembrana dificultado e, conseqüentemente, toxicidade sistêmica em doses efetivas *in vivo* (HUDEJ et al., 2014).

A Tabela 2 ilustra alguns resultados bastante satisfatórios frente a linhagens tumorais, pode-se destacar o complexo *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF₆ que apresenta um valor de IC₅₀ de 6,56 que é inferior ao da cisplatina (76,19), indicando que é necessária uma concentração de composto inferior ao da cisplatina para eliminar 50% das células tumorais na linhagem de MCF-7.

Tabela 2 - Valores de IC₅₀ (μmol L⁻¹) de alguns complexos de rutênio contra a linhagem tumoral.

Linhagem de células	Complexos*	IC ₅₀	Referências**
MCF-7	<i>ct</i> -[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF ₆	6,56	(CARNIZELLO et al., 2016)
MDA-MB-231	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(py)]PF ₆	19,0	(GOLFETO et al., 2010)
MDA-MB-231	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(4-Mepy)]PF ₆	7,4	(GOLFETO et al., 2010)
Hep-G2	RuH(HL)(PPh ₃) ₂ (CO)]	22,1	(KAMATCHI et al., 2013)
HeLa		10,83	
Tm5	[RuCl ₂ NO(BPA)]	17,75	(HEINRICH et al., 2011)
CHO		54,73	

Fonte: Do autor. Adaptada

*Onde: *ct* = Cl⁻ *cis* a CO e CO *trans* ao P da fosfina, bipy = 2,2'-bipiridina, dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano, py = piridina e HL = 2,2'-bipiridina-5,5'-dicarboxílico.

**Utilizando os autores descritos

O complexo de Ru mais recente a ser introduzido em ensaios clínicos foi o TLD-1433 (Figura 5), um complexo polipirídico de Ru(II) adequado para aplicações na TFD. A combinação de TLD-1433 com transferrina (Rutherrin) melhora as propriedades fotofísicas, farmacocinéticas (absorção celular rápida) e toxicológicas (redução da toxicidade no escuro), em comparação apenas com TLD-1433. O modo de ação relatado é baseado na produção de EROs, destruindo as mitocôndrias e induzindo apoptose celular (MITAL; ZIORA, 2018). Sua ativação nas células é ótima no domínio verde do espectro (520 nm), e embora o mecanismo de morte celular por TLD-1433 ativado pela luz não seja completamente claro, este agente fotossensibilizador gera ¹O₂ de forma eficaz. O modo de ação do Tipo II deste agente fotossensibilizador na TFD envolve a formação de uma população de moléculas excitadas, que, após cruzamento intersistêmico, levam a estados tripletes excitados que são muito sensíveis ao oxigênio (CHEN et al., 2020).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

No presente trabalho investigou-se a interação dos complexos *cis*-[Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e *cis*-[Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆) com biomoléculas (lipídio e proteína), bem como o impacto dessas interações na incorporação e toxicidade em células tumorais.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterização espectroscópica dos dois FS da classe dos complexos de Rutênio;
- Investigar a interação destes FSs com biomoléculas (lipídeo e proteína) *via* espectroscopia de fluorescência;
- Avaliar o dano oxidativo de biomoléculas fotoinduzido pelos complexos de Ru;
- Estimar a porcentagem de incorporação dos compostos em células;
- Determinar toxicidade (citotoxicidade e fototoxicidade) dos complexos polipiridínicos de rutênio (II) em células cancerosas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os complexos *cis*-[Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e *cis*-[Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆) (Figura 6) no decorrer dessa dissertação os complexos irão ser mencionados sem explicitar o prefixo *cis*, e nas figuras os complexos são abreviados como Rubpy ou Rubpe em função do ligantes lineares.

3.1. Caracterização espectroscópica de absorção eletrônica dos complexos de Rutênio

Os compostos *cis*-[Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e *cis*-[Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆) preparados seguindo o reportado por Toma e colaboradores (PARUSSULO et al., 2016) estando seus espectros eletrônico e a absorvidade molar de acordo com o reportado anteriormente.

Para avaliar a labilidade do ligante cloro, foi estudado o comportamento dos complexos em sistema aquoso. Para isso, os compostos foram dissolvidos em metanol para preparo da solução estoque, e posteriormente, diluído em diferentes razões de

água/metanol (v/v) (0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75% e 100% de metanol) com concentração de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, sendo monitorado em função tempo e em seguida realizando a leitura do espectro UV-Vis.

3.1.1. Estabilidade em tampão fosfato (PBS e Tris) e DMEM

Também analisou a estabilidade dos complexos de rutênio em tampão fosfato salino, do inglês *phosphate buffered saline* (PBS, pH=7,4), o tampão tris(hidroximetil)aminometano (Tris, pH 7,4) e em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM *high glucose*, código D6429 da Sigma Aldrich) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1% (v/v) de antibióticos (penicilina e estreptomicina), no qual preparou-se os filmes (item 3.6.1 de material e métodos) nas concentrações de $3,0 \times 10^{-5}$, $6,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e posteriormente foram hidratados. Realizou a leitura do DMEM (sem composto) com o objetivo de subtrair os espectros, para uma melhor visualização da sobreposição e similaridade da banda MLCT's (metanol e meio de cultura).

3.1.2. Estabilidade na albumina de soro bovino

Avaliou a estabilidade dos complexos de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ na albumina de soro bovino (BSA), onde foi feito os filmes (item 3.6.1 de material e métodos) na concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e hidratados posteriormente com a BSA com a concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ que foi preparada em tampão PBS (pH=7,4), sendo realizado as leituras de absorbância na região do UV/Visível em função do tempo durante 96 horas após a dissolução. Utilizou-se a BSA como branco (sem composto) para se subtrair aos espectros, para melhor visualizar a sobreposição e similaridade da banda MLCT's (metanol e a BSA), realizando à varredura espectroscópica Shimadzu modelo UV-2501 BC, na região do UV/Visível em função do tempo durante 96 horas de dissolução. As varreduras foram realizadas utilizando uma cubeta com 1,0 cm de caminho óptico. As soluções foram mantidas protegidas da luz e na temperatura ambiente.

Com os estudos de estabilidade foi não só possível confirmar a solubilidade dos compostos, como também avaliar a constância e estabilidade da intensidade de absorbância correspondente ao máximo das bandas de transferência de carga (MLCT's)

e também da banda correspondente a transições intraligantes (IL) dos compostos durante um período de 96 horas.

3.2. Estudo de interação dos complexos de Ru com albumina do soro bovino (BSA)

O intuito do experimento foi obter informações sobre a interação entre a BSA e os complexos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$, tais como as constantes de ligação, possíveis mecanismos de interação. Recorreu-se a técnica de fluorescência da BSA, utilizando 3mL de solução de BSA $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ com adição de 0 a $21,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ da solução estoque de Rutênio $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Para determinar por qual mecanismo ocorre a interação do complexo de rutênio com as albuminas, preparou soluções individuais de BSA em tampão Tris 10 mM (pH 7,4), com concentração final de $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ com adições nas concentrações de 0 a $14,56 \mu\text{mol L}^{-1}$ da solução dos complexos (supressor) de Rutênio $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, nas temperaturas de 20°, 25°, 30° e 35°C, efetuou as leituras dos espectros de absorbância e fluorescência em ambas as temperaturas. Realizou as leituras de absorbância e fluorescência com 24 horas de interação na temperatura de 35°C.

As soluções dos complexos foram preparadas pela diluição de 10 μL da solução estoque em acetronitrila e 990 μL de solução tampão PBS e/ou Tris, ambos em pH=7,4 em duplicata.

Considerando a absorção dos complexos de rutênio na região analisada, os valores de fluorescência foram corrigidos utilizando a equação de Parker (equação 1).

$$F_{cor} = F_{obs} \times \frac{2,3dA_{exc}}{1 - 10^{-dA_{exc}}} \times 10^{gA_{em}} \times \frac{2,3sA_{em}}{1 - 10^{-sA_{em}}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

F_{cor} e F_{obs} são valores de fluorescência corrigido e observado, respectivamente, e A_{exc} e A_{em} são medidas feitas no espectrofotômetro UV-Vis e correspondem às absorbâncias por centímetro nos comprimentos de onda de excitação (280 nm) e emissão (350 nm) (PARKER; BARNES, 1957). S é a largura do feixe de excitação, g é a distância da lateral do feixe de excitação até a lateral da cubeta e d é o comprimento da lateral da cubeta (MACDONALD; LVIN; PATTERSON, 1997).

Os espectros de emissão dos resíduos de aminoácidos da BSA foram registrados utilizando cubetas de quartzo, com caminho óptico de 1,0 cm, em um espectrofluorímetro

Horiba modelo Fluoromax-4, com largura das fendas de excitação 5,0 nm e de emissão 1,0 nm. As amostras foram excitadas em 280 nm e as leituras de emissão de fluorescência foram realizadas na faixa entre 300 e 550 nm após 5 minutos de interação composto e BSA, também foi monitorado os espectros de absorção em um espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-2501 BC.

Através dos espectros de supressão de fluorescência e de alguns tratamentos matemáticos, determina-se tais parâmetros acerca das interações entre a BSA e os complexos estudados.

A partir desse momento, pode-se determinar a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) e da constante de velocidade de supressão da biomolécula (k_q) utilizou-se a equação de Stern-Volmer (Equação 2).

$$\frac{F_0}{F} = K_{sv}[Q] + 1 \quad (\text{Equação 2})$$

onde F_0 corresponde à intensidade de fluorescência na ausência do complexo Ru; F é a intensidade de fluorescência na presença do complexo Ru; $[Q]$ concentração do composto supressor; e K_{sv} é a constante de supressão de Stern-Volmer (LAKOWICZ, 2006).

Calculou o grau de interação entre os compostos e a proteína (BSA), por meio da determinação da constante de associação ou ligação (K_b). Quantificar a força dessas interações é de extrema importância, uma vez que ela pode influenciar nas propriedades farmacocinéticas como a armazenagem, o transporte, liberação, e podem ter efeitos na eficiência dos medicamentos (ROSS; SUBRAMANIAN, 1980). Sendo assim, as constantes K_b foram obtidas a partir da equação 3 (equação de Stern-Volmer modificada).

$$\log \frac{(F_0-F)}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad (\text{Equação 3})$$

onde F_0 e F são respectivamente, a intensidade de fluorescência na ausência e na presença do supressor, K_b é a constante de ligação aparente do supressor à BSA, n é o número de sítios de ligação do supressor à BSA e $[Q]$ é a concentração do supressor (LAKOWICZ, 2006).

3.3. Estudo da interação dos complexos de Ru com lipossomos

Para avaliação da interação entre os complexos de rutênio(II) e lipídios, utilizou-se como modelo lipossomos constituídos por 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC).

A preparação de lipossomos, mais especificamente LUVs (vesículas unilamelares grandes, do inglês *Large Unilamellar Vesicles*), começou com a adição da quantidade(s) adequada(s) da(s) solução(ões) *stock* do(s) lipídio(s) desejado(s) para um *eppendorf*. Posteriormente, o solvente foi lentamente evaporado sob um fluxo contínuo e suave de argônio (atmosfera inerte), de modo a formar-se uma fina camada de filme lipídico na parte inferior do tubo ou *eppendorf*. Depois da secagem as amostras foram hidratadas com água, produzindo-se MLVs (do inglês, *Multilamellar Vesicles*). O volume de água usado para a hidratação dos lipídios foi escolhido de modo a ficar-se com a concentração lipídica final desejada, posteriormente as amostras foram homogeneizadas num agitador vórtex. Para a obtenção de LUVs, utilizou-se o processo de extrusão (ALVES et al., 2013), que consiste na passagem das amostras através de membranas de polycarbonato (*Nuclepore, Track-Etch Membrane*) da *Whatman Scheider & Schuell* (Kent, Reino Unido) com diâmetro de poro bem definido, no presente caso de 100 nm, um número ímpar de vezes (21 vezes), usando um Mini-Extrusora da Avanti Polar *Lipids* (Alabaster, AL, EUA) – Figura 9. Este procedimento garante que a suspensão final passe pela membrana e que praticamente 100% dos lipossomas sejam unilamelares e de tamanhos idênticos (MACDONALD et al., 1991; MAYER; HOPE; CULLIS, 1986).

Figura 9 - Mini extrusora da Avanti Polar Lipids para obtenção de lipossomos unilamelares com tamanhos uniformes de 100nm.



Fonte: autora.

Estando prontas as vesículas lipossomais de DMPC, preparou-se soluções contendo $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ na concentração $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A interação dos compostos com lipossomos foi realizada com sucessivas adições de

0 a 200 μL da suspensão de lipossomos DMPC ($25,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foram feitas numa solução de 3,0 mL de complexo de Ru ($[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$).

Após a adição de cada alíquota de lipossomo, a amostra foi submetida sob atmosfera inerte (Argônio) por 3 minutos para retirada de oxigênio, e os espectros de emissão registrados num espectrofluorímetro Horiba (modelo Fluoromax-4) no laboratório de fotoquímica (LAFOT) em colaboração com Prof. Dr. Antônio Otávio e Mestre Marcos Eduardo do Carmo. As leituras de emissão de fluorescência foram realizadas na faixa de 510 a 800nm, utilizando o filtro LP 455, sendo o comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) em 425nm, e a largura das fendas de excitação e de emissão igual a 5 e 15nm, respectivamente.

Os espectros de absorção molecular na região do UV-Vis também foram registrados antes e após a adição total de lipossomos, utilizando um espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-2501 BC, com cubeta de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm.

Para determinação das constantes de ligação (K_b) dos FS em lipossomos, plotou-se um gráfico de emissão relativa normalizada no comprimento de onda máximo *versus* a concentração do lipossomo e realizou-se um ajuste do modelo matemático descrito na equação 4 (SANTOS; PRIETO; CASTANHO, 2003).

$$F = \frac{F_0 + F_f \times k_b \times [L]}{1 + k_b \times [L]} \quad (\text{Equação 4})$$

onde F: Emissão relativa de fluorescência; F_f : fluorescência após adição de DMPC; F_0 : fluorescência na ausência de micela ou lipossomo; $[L]$: concentração de DMPC.

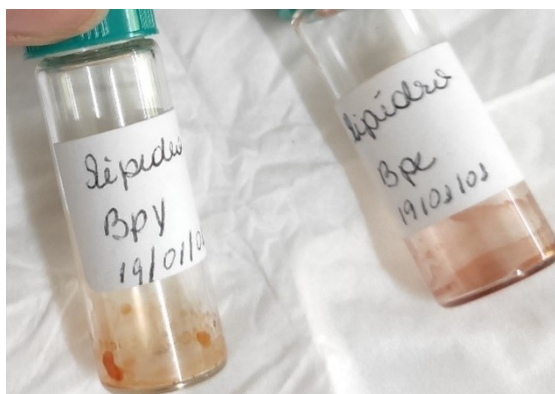
3.4. Oxidação em lipossomos fotoinduzidos pelos complexos Ru

Para investigar a permeabilidade em vesículas lipídicas foi utilizado o método de vesículas unilamelares (LUVs) encapsulando uma sonda fluorescente. O experimento consiste em comparar a ação dos dois complexos de rutênio na destruição fotoinduzida dos lipossomos com carboxifluoresceína encapsulada.

Primeiramente foram preparados os três filmes lipídicos usando 15 mg de lecitina de soja e ~0,5mL de clorofórmio. Em seguida evaporou todo o solvente, sob atmosfera

inerte de Argônio até formação dos filmes. Em dois filmes adicionou o $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ com concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e evaporou-se o solvente sob atmosfera inerte de Argônio até formação dos filmes que foram congelados para serem utilizados no outro dia e o terceiro filme sem FSs era o controle (Figura 10), a hidratação foi realizada por uma solução tampão de Tris-NaCl a 10mM em pH 8,1 contendo 50mM de carboxifluoresceína (CF) para se obter a suspensão de vesículas de lipossomos contendo carboxifluoresceína (CF) dentro da vesícula.

Figura 10 - Filmes lipídicos contendo os complexos de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$.

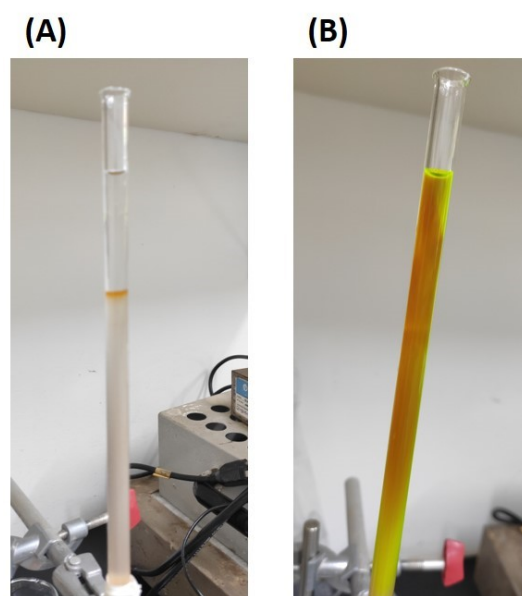


Fonte: autora.

A remoção da carboxifluoresceína livre presente na suspensão das LUVs foi realizada passando-se 1mL da suspensão em uma coluna Sephadex-G50 com solução tampão de 10mM de Tris-NaCl em pH 8,1. Na cromatografia de exclusão de tamanho, as moléculas/estruturas maiores tendem a migrar mais rápido que as menores, por não conseguirem penetrar no interior dos poros da resina, sendo assim eluem diretamente pela coluna. A fração contendo lipossomos pode ser identificada visualmente (alaranjada) e coletado no eppendorf (Figura 11). É de suma importância salientar que a fase móvel da coluna foi 10mM tampão Tris (pH 8,1) contendo 300mM NaCl, essa quantidade de sal (NaCl) é necessário para que a força iônica e osmolaridade dentro e fora das vesículas sejam idênticas. Isto é, 50mM de carboxifluoresceína em tampão Tris 10mM (pH 8,1) no compartimento interno da vesícula, e uma solução de 300mM cloreto de sódio em tampão Tris 10mM (pH 8,1) no compartimento externo dos lipossomos (BACELLAR et al., 2014).

A coluna de Sephadex-G-50 foi preparada pesando 1,5 g de Sephadex-G50 e transferida para um Erlenmeyer com 100mL de água destilada, hidratada por 30 minutos. A preparação da coluna Sephadex-G-50 foi realizada transferindo-se a fase estacionária suspensa em água destilada para coluna de vidro, preenchendo-se até encher a coluna e deixou decantar.

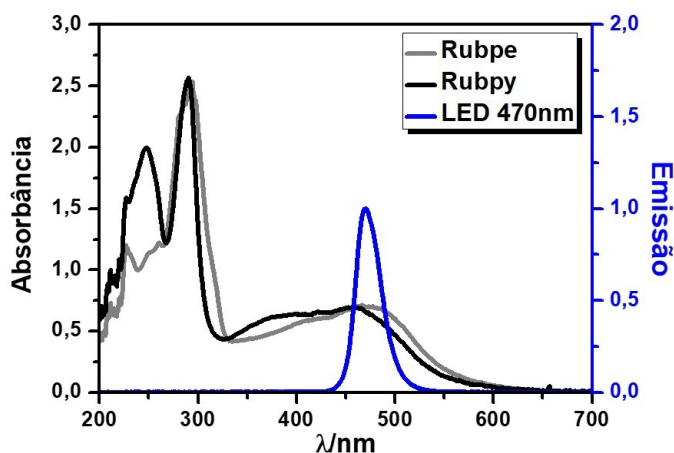
Figura 11 - (A) coluna de cromatografia de exclusão e (B) separação a CF livre dos lipossomos contendo CF no interior da vesícula.



Fonte: autora.

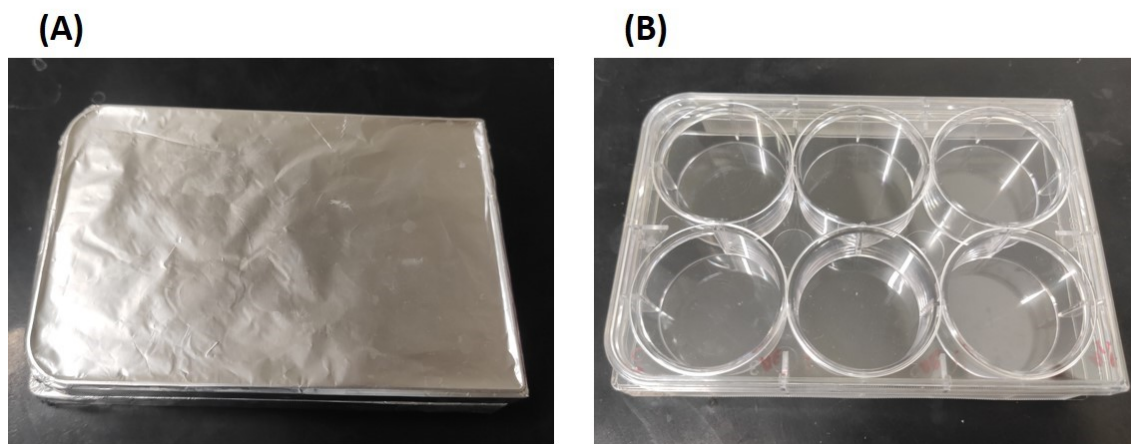
Determinação da quantidade do dano à membrana foi realizada em placa de poliestireno cristal transparente com 6 poços contendo 6000μL de solução total de análise. Os poços tinham um volume de lipídios (150 μL) e a concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ do [Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e [Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆). Cada poço foi preenchido com ~2850 μL de solução de NaCl em tampão Tris, utilizou-se também um controle contendo apenas tampão e lipossomo/CF encapsulada. A placa foi irradiada e a fluorescência monitorada em função do tempo de irradiação (1h e 20min), utilizando um LED de emissão no azul (~460nm) (Figura 12) para excitação dos FSs e outra placa ficou no escuro (papel alumínio) (Figura 13).

Figura 12 - Espectro de emissão da luz do LED azul sobreposto aos espectros de absorção do Rubpy e do Rubpe.



Fonte: autora.

Figura 13 - a) placa sem irradiação e b) placa irradiada.



Fonte: autora.

O aumento da fluorescência da CF em função do tempo de irradiação, a 25°C, foi medido continuamente no OceanOptics (modelo USB4000). Ao final de cada experimento, a fluorescência total da CF foi determinada pela adição de solução 10%(m/v) de Triton-X a cada poço, e a intensidade de fluorescência foi registrada. Para cada valor de intensidade, a porcentagem de liberação de CF foi calculada pela equação 5 (BACELLAR et al., 2014).

$$P = 100\% \frac{I_{\text{final}} - I_{\text{inicial}}}{I_t - I_{\text{inicial}}} \quad (\text{Equação 5})$$

onde P é a porcentagem do dano, I_{inicial} é a intensidade de emissão inicial da CF, I_t é a intensidade após a adição de Triton X-100 e I_{final} é a intensidade de fluorescência no tempo.

3.5. Oxidação na BSA fotoinduzida pelos complexos de Rutênio

Este experimento teve como objetivo analisar a eficiência de cada FS em causar a fotoxidação de proteínas utilizando a molécula da BSA como modelo de proteína. Essa eficiência fotodinâmica foi calculada com base na determinação dos valores das constantes de velocidade de fotoxidação da molécula da BSA.

Uma solução contendo $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de FS e $3,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA preparada em tampão Tris (pH=7,4) foi irradiada durante 40 minutos com luz branca Xe 300W (Oriol). A intensidade de irradiação foi determinada por um medidor de potência 1916-R (Newport) conectado a um sensor óptico 818-UV-DB (Newport) com 20cm de distância da amostra.

Foi irradiado no $\lambda=470\text{nm}$ com intensidade de 100mW/cm^2 durante 40 minutos usando filtro LP 400nm que corta a radiação UV, no qual irradiou na região do azul. Nesse intervalo, a cada 1 minuto foi retirada uma alíquota (5 minutos), depois foi monitorado de 5 em 5 minutos a fotoxidação da BSA foi monitorada através da variação da intensidade de absorção e o máximo de fluorescência em 350nm, sendo utilizado o comprimento de onda 280nm para excitar a molécula, uma cubeta de quartzo com 1,0cm de caminho óptico e fenda de excitação de 5,0nm e emissão 1,0nm. Os valores da intensidade de fluorescência foram monitorados em 350nm.

3.6. Linhagens celulares e manutenção celular

Nos estudos de viabilidade foram utilizadas células das linhagens HeLa e MDA-MB-231 em todos os experimentos, e as células foram cultivadas no laboratório de cultivo celular do Prof. Dr. Marcelo Belletti. As células de carcinoma do colo do útero humano (HeLa) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Maurício Baptista (Instituto de Química da USP) e as células de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-231) foram gentilmente cedidas pela pesquisadora pós-doutoranda Bruna Cristina Borges do Laboratório Tripanosomatídeos (LATRI) coordenado pelo Prof. Dr. Cláudio Vieira da

Silva. Ambas a células da de linhagem tumoral foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Dmem) *high glucose* (4500 mg/L de glicose, L-glutamina, piruvato de sódio, bicarbonato de sódio e vermelho de fenol) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

As linhagens celulares foram mantidas em uma estufa de CO₂ (5%) a 37°C para serem utilizadas nos ensaios ou cultivadas em garrafas de cultura. Para a realização dos ensaios, previamente as linhagens tumorais aderentes foram removidas dos frascos de cultura celular pela adição de 1 mL de enzima tripsina. Os frascos com solução de tripsina foram então mantidos na estufa a 37°C e 5% CO₂ por 3 minutos e depois agitados manual por aproximadamente 60 segundos. Em seguida, foram adicionados 3 mL de meio de cultura completo (Dmem contendo 10% de SFB e antibiótico) para inibir a ação da tripsina e transferidos para tubos plásticos.

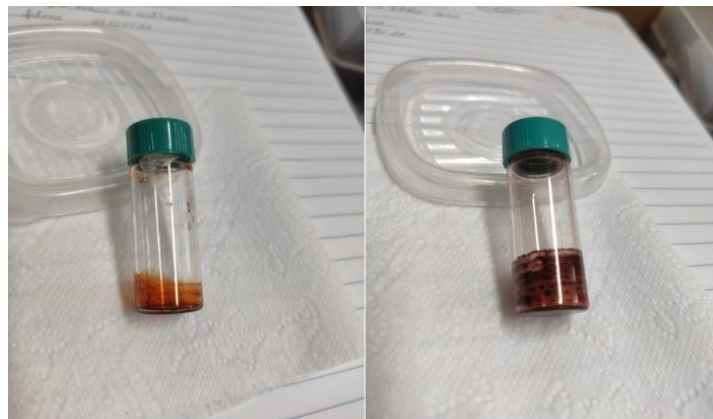
Com as células em suspensão, elas foram retiradas diretamente das garrafas e transferidas para tubo Falcon, uma alíquota de 50 µL da suspensão celular foi colocada em 150 µL de Azul de Tripán 2% (m:v) (SIGMA-ALDRICH CO ST LOUIS, MO, EUA) e homogeneizado, em seguida transferiu 20 µL da solução a Câmara de Neubauer e fez a contagem das células.

3.6.1. Preparo de soluções do *cis*-[Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e *cis*-[Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆)

A solução do complexo foi preparada em meio de cultura (DMEM), à temperatura ambiente. Primeiramente, foi colocado um pouco dos complexos em flaconetes e adicionou meio de cultura para solubilizar. Levou as soluções no ultrassom e no vórtex para solubilizar todo o pó, mas não obtivemos êxito na solubilização do pó dos compostos diretamente em Dmem.

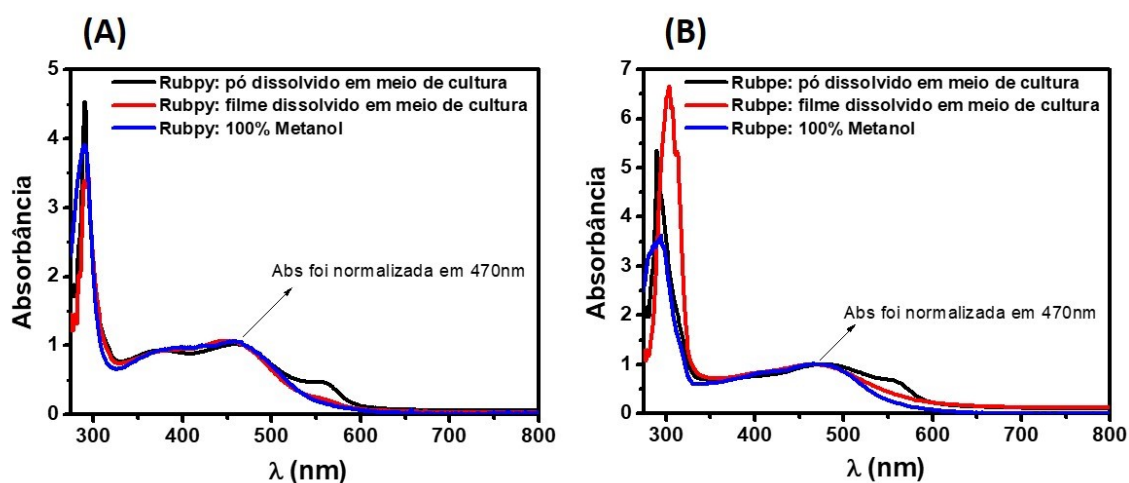
Por isso, foi feito outro teste de solubilização dos compostos através de seus respectivos filmes. Para preparar o filme o pó dos complexos foi solubilizado em metanol, logo após o solvente foi completamente evaporado sob fluxo de atmosfera inerte (Argônio ou Nitrogênio), ocorrendo a formação do filme (Figura 14). O filme do complexo de Ru foi hidratado com meio de cultura, sendo realizada a leitura do espectro UV-Vis (Figura 15A e 15B).

Figura 14 - Filmes dos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)^+$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ solubilizados em metanol.



Fonte: autora.

Figura 15 - Espectros de absorção normalizados em 470nm do (A) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (B) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em meio de cultura (Dmem).



Fonte: autora

Os espectros dos complexos de Ru em meio de cultura foram descontados do espectro meio de cultura sozinho (“branco”) para melhor visualização de sobreposição e similaridade da banda MLCT (metanol e meio de cultura), a absorbância em 470nm foi normalizada para 1,0 (Figura 15). A partir dos espectros (Figura 15), nota-se uma maior similaridade e sobreposição dos espectros quando o filme do complexo foi dissolvido em Dmem com o espectro em metanol (controle de que o filme está 100% dissolvido). Já os espectros de absorbância dos complexos em que o pó foi dissolvido diretamente no

Dmem, observa-se uma banda próximo de 600 nm (Figura 15). Além disso, durante o experimento notou-se pequenos grumos de complexos (Figura 16) quando utilizou-se o pó diretamente em meio de cultura. Por isso escolhemos usar filmes do $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ preparados a partir de MeOH nas concentrações usadas nos experimentos, e em seguida evaporou-se os solventes em fluxo laminar e posteriormente foram hidratados com Dmem suplementado com 10% (v/v) SFB, 1% (v/v) solução de penicilina-estreptomicina.

Figura 16 - Solubilidade do pó dos complexos de Rutênio em meio de cultura.



Fonte: autora.

Os compostos foram avaliados pela capacidade de inibir o crescimento *in vitro* de células tumorais em linhagens de HeLa (câncer colo do útero) e MDA-MB-231 (câncer de mama).

3.6.2. Incorporação do *cis*- $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e *cis*- $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$

As células foram distribuídas em poços de placas de 12 poços ($1,0 \times 10^5$ células/1000 μL cada poço) por 24hs em estufa de CO_2 (5%) a 37 °C. Após isso, os poços foram lavados com PBS 1x estéril e foi acrescentado 60 μM de cada complexo solubilizado em Dmem com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) e 1% de antibióticos. A incubação se deu por 24hs em estufa de CO_2 (5%) a 37°C.

Após este tempo, foi retirado 500 μL de sobrenadante de cada poço. As células foram lavadas com PBS 1x para posterior adição de 500 μL de MeOH por poço, a fim de

extrair a quantidade de complexo incorporado na célula. As soluções do sobrenadante e de complexo extraído foram completadas para 1000 µL com Dmem e 1000 µL de MeOH na mesma proporção para posterior leitura de absorbâncias.

A determinação do %Uptake (taxa de incorporação) foi realizada por meio de leituras de absorbância do sobrenadante e solução de complexo extraído usando a equação 6.

$$\% \text{ Uptake} = \frac{S_{\text{cell}}}{S_{\text{cell}} + S_{\text{supernatant}}} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Em que,

S_{cel} = área das bandas de absorbância da solução de complexo extraído da célula (280nm a 550nm).

$S_{\text{supernatant}}$ = área das bandas de absorbância do sobrenadante (280nm a 550nm).

3.6.3. Toxicidade dos complexos de rutênio em células tumorais (HeLa e MDA-MB-231)

Para avaliar a viabilidade e os efeitos dos complexos estudados sobre a proliferação das células tumorais de mama MDA-MB-231 e HeLa, foi utilizado o reagente 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (MOSMANN, 1983). A redução do MTT é um método colorimétrico rápido, frequentemente utilizado para medir proliferação celular e citotoxicidade. Neste ensaio o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de formazan de coloração violeta que se acumula em compartimentos endossomais, sendo transportado para fora das células por exocitose (RISS et al., 2004).

Para o experimento de citotoxicidade e fototoxicidade foram semeadas $2,8 \times 10^4$ células/poço das duas linhagens (HeLa e MDA-MB-231) em placas de 48 poços, tratadas com os complexos de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ nas concentrações de 0 a 100 µmol L⁻¹ e incubadas por 24hs em estufa de cultura de células a 37°C e 5% CO₂.

Após 24 hs de incubação em estufa a 37 °C, a suspensão contendo $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ foram descartadas e uma solução de PBS estéril foi adicionada aos poços e em seguida foram irradiados com LED Azul ($\lambda_{\text{máx}} = 466 \text{ nm}$).

A dosimetria da energia aplicada para os cultivos celulares foi determinada pelo *Optical Power Meter* da *Newport Model 1916-R* conectado a um detector *Newport Model 818-UV S/N 10488* que mede na faixa espectral entre 200 e 1000 nm e cuja área do sensor é de 0,785 cm². O cálculo utilizado para medir as fluências energéticas utilizadas para o tratamento das linhagens tumorais com a TFD está representado abaixo na equação 7 (SILVA et al., 2010):

$$D = I \left(\frac{W}{cm^2} \right) \times T(s) = \frac{Potência (W) \cdot Tempo (s)}{Área (cm^2)} \quad \text{(Equação 7)}$$

Onde:

Dose: energia necessária para excitação dos fótons dada por J/cm².

P - Potência: intensidade da fonte de luz a uma determinada distância, medida em watts.

T - Tempo: período em segundos de exposição à fonte de luz necessária para a excitação dos fótons.

Área: espaço da amostra a ser irradiada pela fonte de luz medida pela área do fundo da placa

Os tempos de irradiação foram ajustados de modo a obter fluências de aproximadamente 3J/cm² de luz, os tempos de irradiação para o LED azul foi de 30min no comprimento de onda de 466nm.

Após irradiação, as soluções de PBS foram substituídas por meio de cultura. Após 24 hs foi acrescentado a solução de MTT (0,75mg/mL⁻¹) no meio de cultura. As placas foram incubadas durante 3 horas e em seguida foi retirado a solução com muito cuidado, e os cristais formados foram diluídos em 300μL de DMSO. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca (SpectraMax M2^e) em comprimento de onda de 570nm. A determinação do % células viáveis (vivas) foi realizada por meio de leituras de absorbância das células controle e das células tratadas usando a equação 8.

$$\% \text{ Células viáveis} = \frac{Ab_{\text{Stratamento}}(570 \text{ nm}-800 \text{ nm})}{Abs_{CT}(570 \text{ nm}-800 \text{ nm})} \times 100\% \quad \text{(Equação 8)}$$

Em que,

Ab_{Stratamento} = leituras nos comprimentos de onda de 570 nm e 800 nm das células controle (CT)

Abs_{CT} = leituras nos comprimentos de onda de 570 nm e 800 nm das células tratadas

A análise estatística foi realizada através do método de *Holm-Sidak*, objetivo de avaliar as diferenças para os valores de % viabilidade celular. Os “valores de p” foram obtidos através da utilização do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

O valor de IC₅₀ (concentração em $\mu\text{mol L}^{-1}$ que inibe 50 % da viabilidade celular) foi determinada por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Os tempos de irradiação foram ajustados de modo a obter fluências de aproximadamente 3J/cm^2 de luz, os tempos de irradiação para o LED azul foi de 30 min no comprimento de onda de 466nm.

Para o experimento de citotoxicidade foram semeadas $2,8 \times 10^4$ células das duas linhagens (HeLa e MDA-MB-231) em placas de 48 poços como descrito anteriormente, tratadas com os complexos de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ nas concentrações de 0; 1,0; 5,0 e $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de $1,0 \times 10^{-5}$; $2,0 \times 10^{-5}$; $3,0 \times 10^{-5}$; $4,0 \times 10^{-5}$; $5,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e incubadas por 24hs.

Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C , a suspensão contendo $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ foram descartadas e uma solução de PBS estéril foi adicionada aos poços e em seguida foram irradiados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

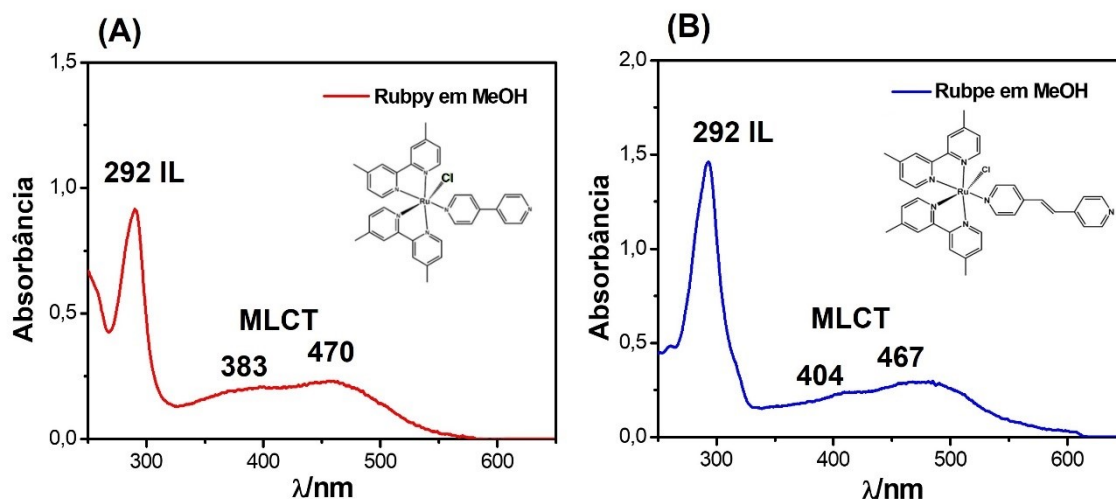
4.1. Perfil dos complexos polipiridínicos de rutênio (II) na região do ultravioleta e visível (UV-vis)

A espectroscopia de absorção no ultravioleta (UV) e visível (Vis) é uma técnica usada para estudar as transições eletrônicas em compostos de coordenação que absorvem na região do Ultravioleta-Visível (190 nm a 800 nm). Quando uma molécula absorve energia, elétrons são promovidos de um orbital ocupado de maior energia (HOMO), ou orbitais com energia menor que o HOMO para o orbital desocupado de menor energia (LUMO), ou orbitais com energia maior que o LUMO (PAVIA, 2015). Esse processo de absorção de radiação eletromagnética no UV-Vis pode ocorrer devido às transições eletrônicas referentes à: (i) elétrons de orbitais não ligantes (n), ou (ii) elétrons envolvidos em uma ligação química (σ ou π), que passam a ocupar um orbital desocupado ou antiligante (σ^* ou π^*) (PAVIA, 2015).

Os complexos polipiridínicos de rutênio(II) tipicamente apresentam bandas de transição interna do ligante bipiridina (IL) na região do ultravioleta e também banda na região do visível provenientes das transições de transferência de carga do orbital centrado no rutênio para orbitais da bipiridina (MLCT) (MEYER, 1986; PARUSSULO, 2013).

Foram realizadas análises espectroscópicas na região do UV/Vis para os complexos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)^+$ em metanol (Figura 17).

Figura 17 - Espectro eletrônico de absorção no UV-Vis dos complexos de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ com concentração de $3,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em metanol.



Fonte: autora.

As atribuições das transições eletrônicas foram realizadas por comparação com complexos de rutênio(II) idênticos e/ou análogos. (NAZEERUDDIN et al., 1999; PARUSSULO et al., 2016; PARUSSULO, 2013; TOMA; TOMA, 2007). Para ambos complexos as bandas em 292 nm são referentes as transições interna dos ligantes (IL) 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (dmbpy) e 4,4'-bipiridina (bpy) para *cis*- $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ ou *trans*-1,2-bis(4-piridil)-etileno (bpe) no *cis*- $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$. Na região do visível os complexos apresentaram duas bandas de absorção com máximos entorno de 400 e 470nm, estas bandas são atribuídas as transições de transferência de carga metal ligante (MLCT) $d\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes dmbpy, bpy ou bpe (PARUSSULO et al., 2016; PARUSSULO, 2013; TOMA et al., 2004). A

Tabela 3 apresenta os máximos de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$), a absorptividade molar (ϵ) dos complexos e suas respectivas atribuições referentes as transições eletrônicas.

Tabela 3 - Comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$); coeficiente de absorptividade molar (ϵ) e comprimento de onda máximo de emissão e rendimento quântico de emissão (Φ) dos complexos polipiridínicos de rutênio (II) em metanol, e suas respectivas atribuições às transições eletrônicas.

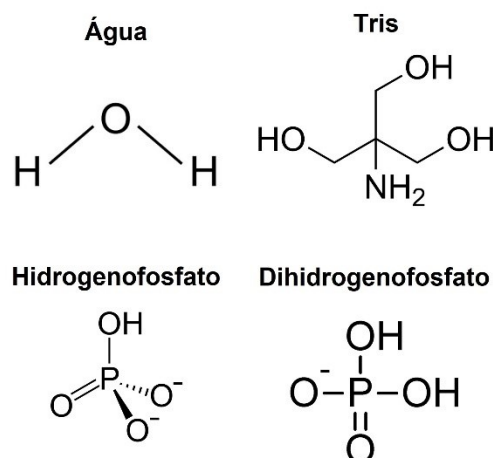
Composto	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ (mol.L ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$ (Φ)	Transições eletrônicas
<i>cis</i> -[Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpy)](PF ₆)	292	45000	470/790 (0,00011)	$\pi \rightarrow \pi^*$
	383	8700		$d\pi \rightarrow \pi^*$
	470	10000		$d\pi \rightarrow \pi^*$
<i>cis</i> -[Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpe)](PF ₆)	292	64400	470/770 (0,000097)	$\pi \rightarrow \pi^*$
	404	9700		$d\pi \rightarrow \pi^*$
	467	12500		$d\pi \rightarrow \pi^*$

Fonte: (PARUSSULO, 2013).

4.2. Estudo da estabilidade dos complexos polipiridínicos de Rutênio(II) em água (H₂O) e sistemas tampão (PBS e Tris)

Um dos objetivos desse trabalho é que ambos os complexos, [Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e [Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆) sejam estudados em modelos de células tumorais. Sabe-se que a água (H₂O) é a substância mais abundante nas células, constituindo cerca de 70% em massa. Além disso, para manutenção do pH praticamente constante as células contam com sistema-tampão, no qual o solvente é a água (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014). Os tampões mais utilizados em estudos bioquímicos são o tampão fosfato salino ou *phosphate buffered saline* (PBS) e o tampão tris(hidroximetil)aminometano (Tris) devido a sua faixa tamponante na região entre pH 7,0 e 8,0; que permite um tamponamento efetivo em pH fisiológico (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014). Entretanto, as moléculas de água (H₂O), derivados do íon fosfato (HPO₄²⁻ e/ou H₂PO₄⁻) e Tris ((HOCH₂)₃CNH₂) (Figura 18) são bases de Lewis que podem coordenar-se ao centro metálico dos complexos, e por isso é fundamental a avaliação da estabilidade destes complexos frente a essas espécies. Neste sentido, estudos da troca do ligante cloro para os complexos [Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e [Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆) foram realizados em H₂O, em tampão PBS (pH=7,4) e tampão Tris (pH 7,4).

Figura 18 - Estrutura molecular da água e dos componentes das soluções tampão.



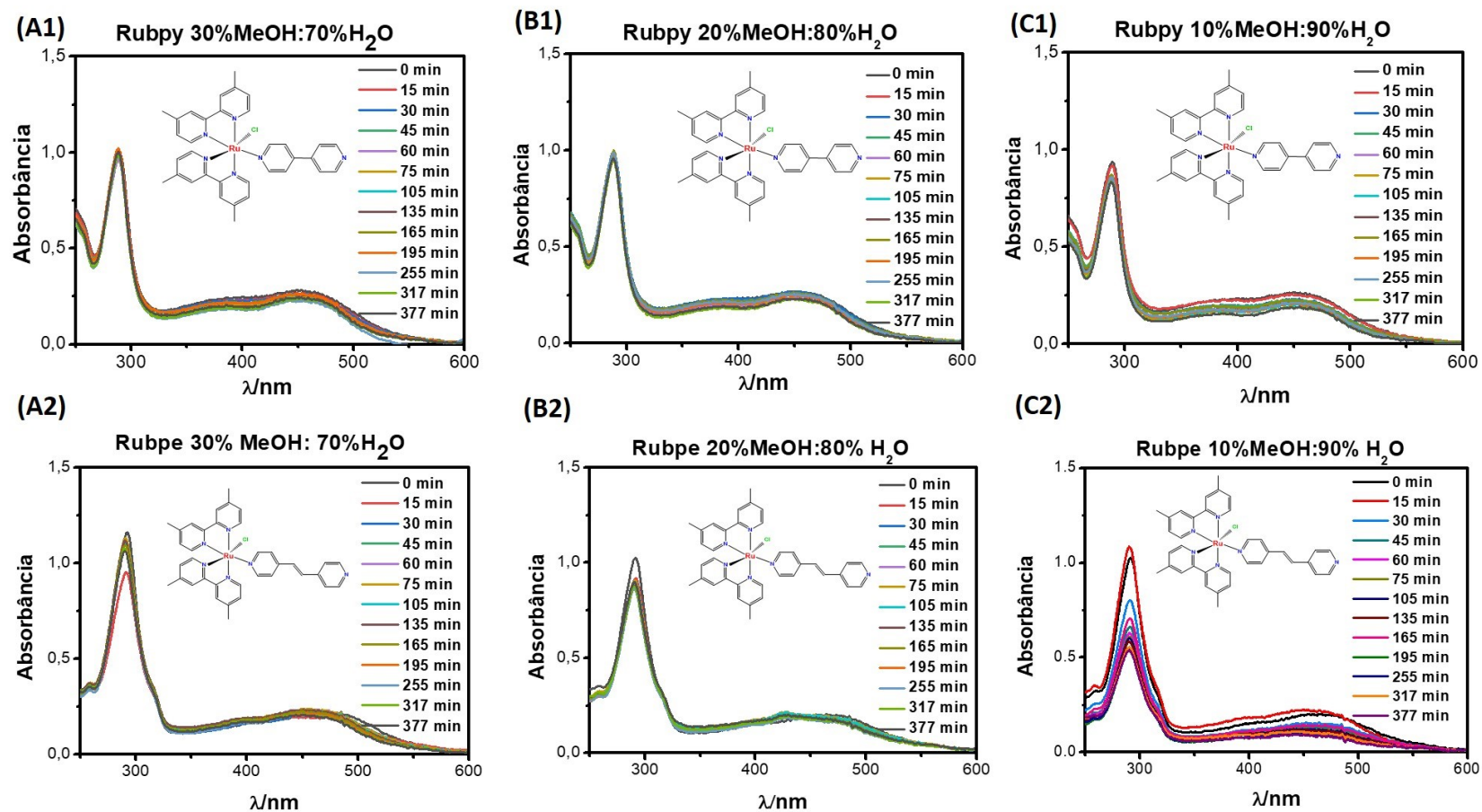
Neste sentido, estudos de aquação ou de troca do ligante cloro por alguma base de Lewis (Figura 18), para ambos os complexos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ foram realizados em H_2O , em tampão PBS ($\text{pH}=7,4$) e tampão Tris ($\text{pH } 7,4$).

A presença do ligante cloro na esfera de coordenação dos complexos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ pode possibilitar a produção de aqua complexos em presença de água. Neste caso, impactando propriedades espectroscópicas determinadas pelos ligantes que estão diretamente ligados ao íon metálico. Essa alteração espectral ocorre, pois a troca dessa espécie (Cl^- por H_2O) altera o nível de energia dos orbitais moleculares de fronteiras dessas espécies, orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) e orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO), resultando em uma mudança na diferença de energia entre HOMO e LUMO e consequentemente deslocando as bandas de absorção (MATIAS et al., 2016). Especificamente, a troca de cloreto por água na esfera de coordenação neste tipo de complexo resulta no aumento da diferença de energia entre o HOMO e o LUMO dos novos complexos ocasionando o deslocamento das bandas MLCT para menores comprimentos de onda, ou seja maiores energias (MATIAS et al., 2016, 2018, 2019).

Para investigar essa possibilidade de aquação, monitorou-se o espectro de absorção dessas espécies em misturas de metanol e água (em diferentes proporções), em soluções com 90, 80 e 70% de H_2O em função do tempo, durante 7 horas.

A Figura 19 apresenta os espectros eletrônicos dos complexos em água pura logo após sua dissolução (tempo zero minutos) e após 377 minutos do preparo da solução.

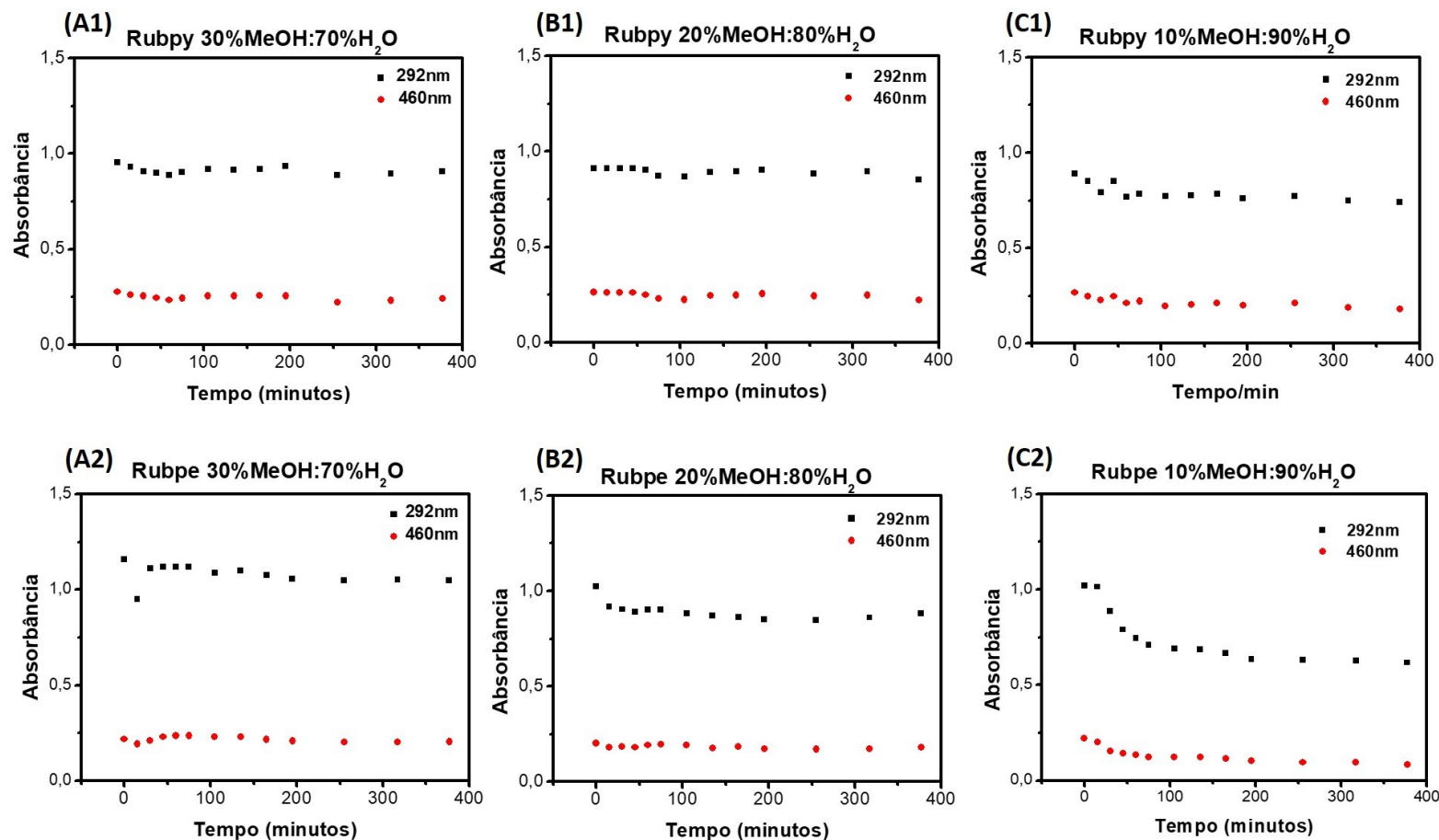
Figura 19. Espectros de absorção dos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ ($3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em (A1 e A2) 70% H_2O :30%MeOH, (B1 e B2) 80% H_2O :20%MeOH, (C1 e C2) 90% H_2O :10%MeOH, em função do tempo de preparo da solução. Temperatura ambiente.



Fonte: autora.

Na Figura 19 observa-se que não há deslocamento na de absorção das bandas MLCT's com o passar do tempo. A estabilidade do espectro de absorção dos complexos em função do tempo de preparo da solução fica mais evidente quando é graficado os valores de absorbância máximos das bandas intraligante em (292nm) e das MLCT's (em torno de 470nm) - Figura 20.

Figura 20 - Espectros de absorção dos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ ($3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em (A1 e A2) 70% H_2O :30%MeOH, (B1 e B2) 80% H_2O :20%MeOH, (C1 e C2) 90% H_2O :10%MeOH, em função do tempo de preparo da solução nos comprimentos de ondas de 292nm e 460.

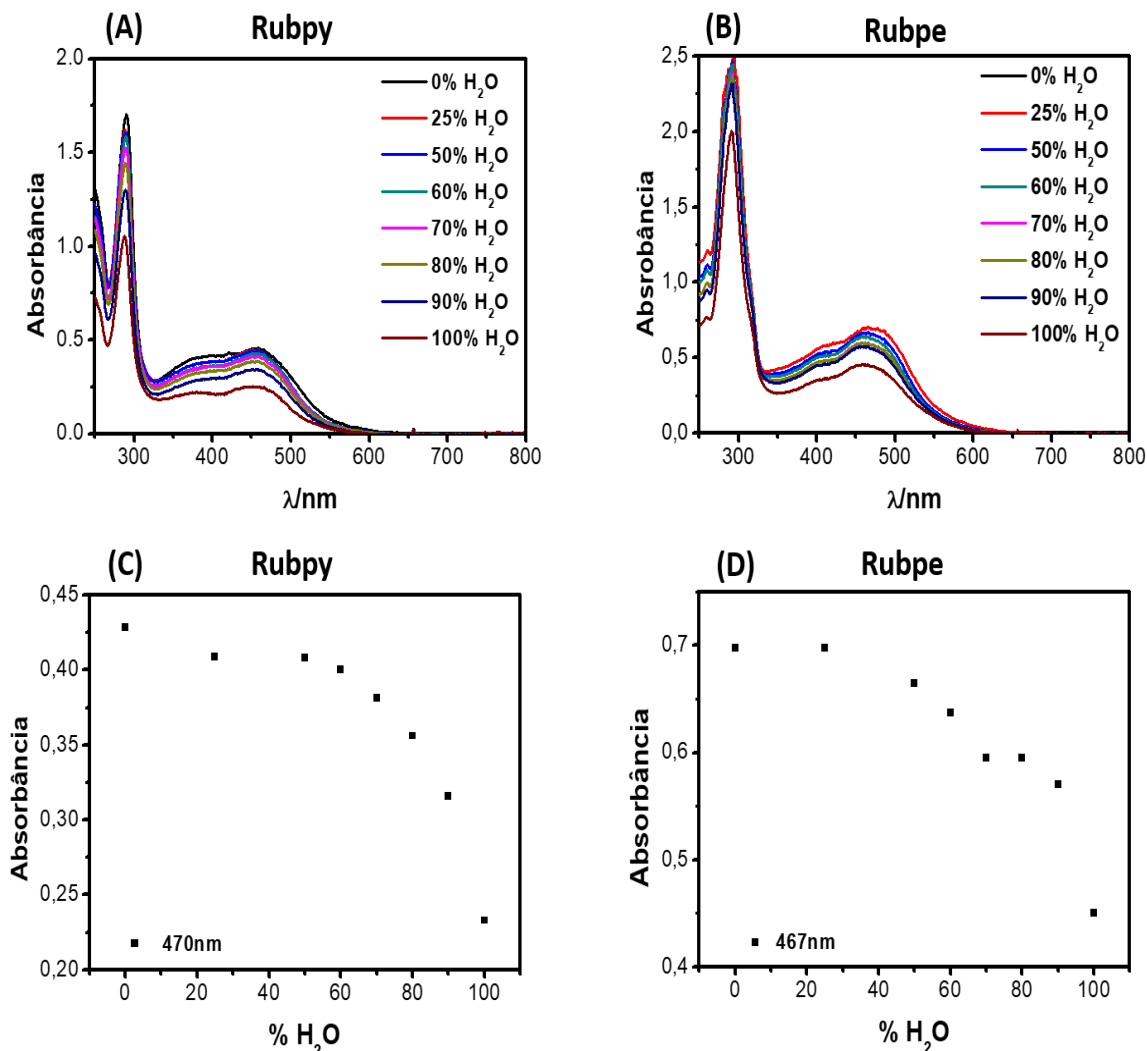


Fonte: autora.

Nota-se que não há variação na intensidade de absorção dessas bandas dos complexos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ mesmo depois de 6 horas (Figura 19 e Figura 20). Além disso, o aumento da porcentagem de água não resultou deslocamento do comprimento de onda máximo em função do tempo. Em compostos similares foi observado que a troca de um cloreto por uma molécula de água resultou em um deslocamento hipsocrômico de cerca de 30 nm nas bandas MLCT (MATIAS et al., 2016, 2018, 2019). Desta forma, os resultados experimentais indicam não houve troca do ligante cloreto por água e que os complexos são estáveis em meio aquoso, possibilitando a aplicação destes compostos em células compostas majoritariamente por água. A labilidade do ligante Cl^- pode ser determinada pela influência *trans*, efeito de labilização de um ligante de saída em posição *trans* a um ligante cuja ligação com o metal é forte. Ligantes σ -doadores, como aminas primárias, em posição *trans* ao ligante Cl^- favorecem a labilização desta última espécie, resultando na troca pelo ligante H_2O em minutos. Por outro lado, ligantes piridínicos *trans* ao Cl^- , resultam em longos tempos, até 24 hrs, para a troca total do ligante Cl^- (MILUTINOVIĆ et al., 2017).

Após avaliar a estabilidade dos complexos de Ru em função do tempo em determinadas proporções de água/metanol, avaliou-se o espectro de absorção em diferentes porcentagens de água/metanol (Figura 21).

Figura 21 - (A) e (B) espectros de absorção eletrônica do $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ ($3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em várias concentrações de água/metanol (v/v) à temperatura ambiente; (C) e (D) intensidade de absorbância em comprimentos de onda fixos (470nm).



Fonte: autora.

Ao analisarmos as características espectrais do $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$, observa-se que em metanol puro (0% de água, Figura 21) tem-se um máximo de intensidade de absorção, a adição de 25% e 50% de água não altera de forma significativa na intensidade de absorção (Figura 21). Contudo, em altas porcentagens de água ($> 60\%$) verificamos que a intensidade de absorção diminui significativamente a medida que se adiciona água. Esse efeito hipocrômico provavelmente ocorre devido a diminuição da solubilidade destes compostos a medida que

aumenta a proporção de água na solução, evidenciado pela observação de formação de agregados na parede da cubeta (Figura 22).

Figura 22 - (A) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (B) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ aderidos nas paredes das cubetas de quartzo.

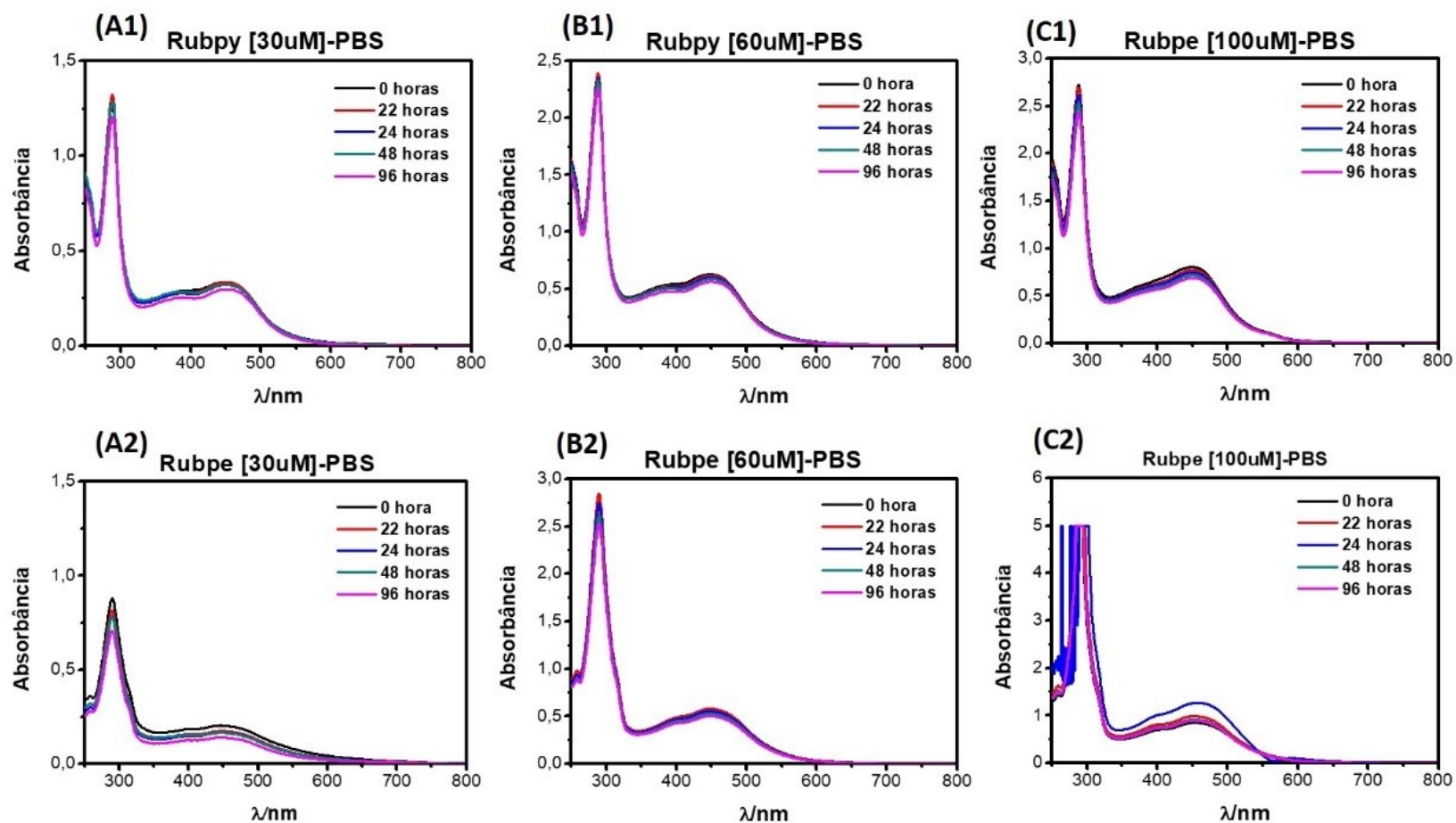


Fonte: autora.

Como mencionado anteriormente, o sistema tampão fosfato é um dos tampões biológicos mais importantes e mais comum em estudos bioquímicos. Por isso, o estudo de estabilidade dos complexos de rutênio em tampão PBS (pH=7,4) foi realizado a fim de investigar a existência de interações entre os complexos e as moléculas do tampão.

Monitorou-se os espectros de absorção dos compostos em tampão PBS pH 7,4, em soluções com concentrações de 30, 60 e 100 μM em função do tempo durante 96 horas, como mostrado nas Figuras 23, observa-se que também não há deslocamento de absorção das bandas MLCT's com o passar do tempo (Figura 23), resultado similar ao observado para soluções aquosa dos complexos.

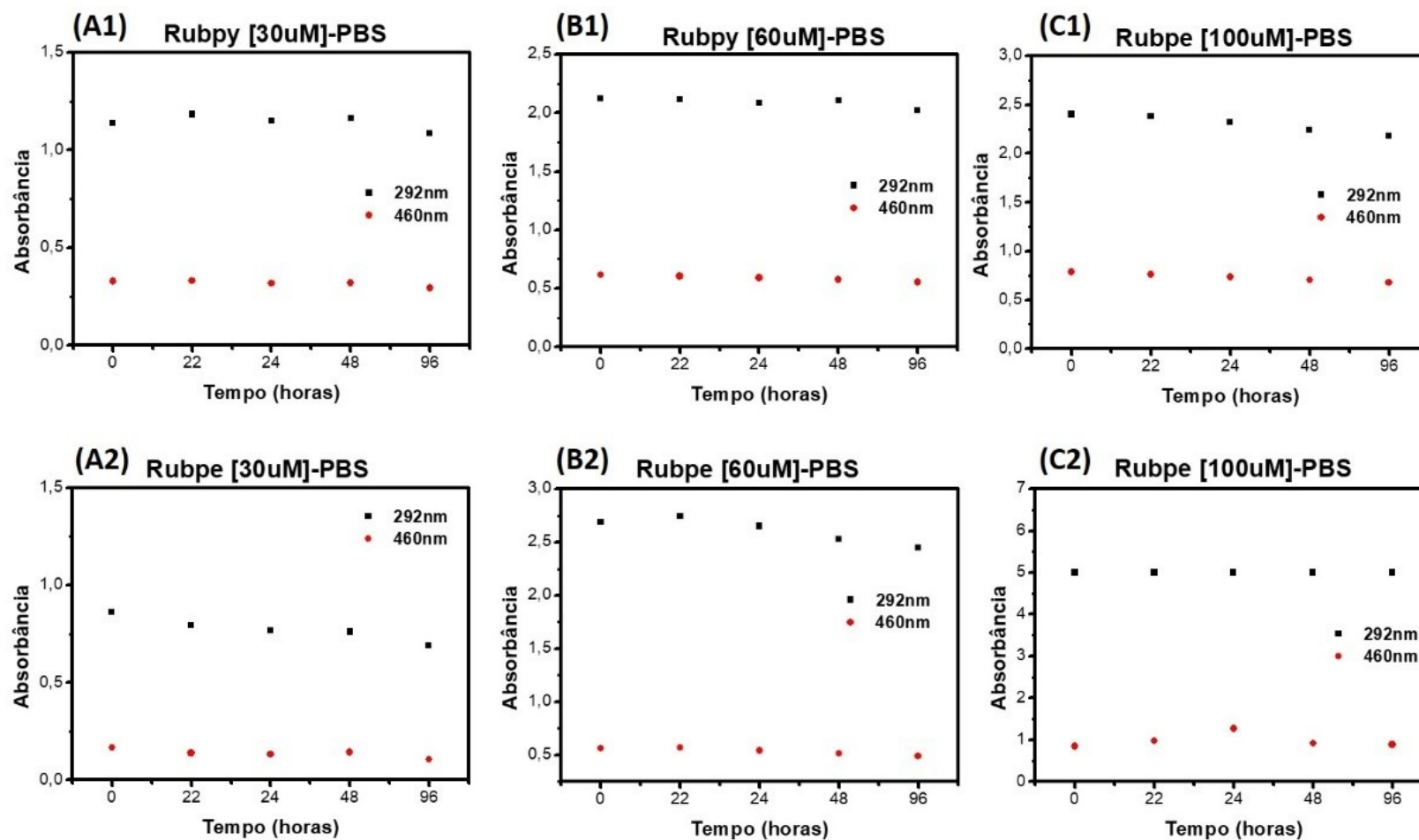
Figura 23 - Estudo de estabilidade dos complexos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ ($3,0 \times 10^{-5}$; $6,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em tampão PBS (pH=7.4) e espectro de absorção no UV/Visível ao longo do tempo.



Fonte: autora.

Novamente, a estabilidade dos complexos pode ser melhor averiguada analisando os valores máximos das bandas intraligante em (292nm) e da MLCT's (em torno de 460nm) - Figura 24.

Figura 24 - Espectros de absorção dos ($3,0 \times 10^{-5}$; $6,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em função do tempo de preparo da solução nos comprimentos de ondas de 292nm e 460nm.



Fonte: autora.

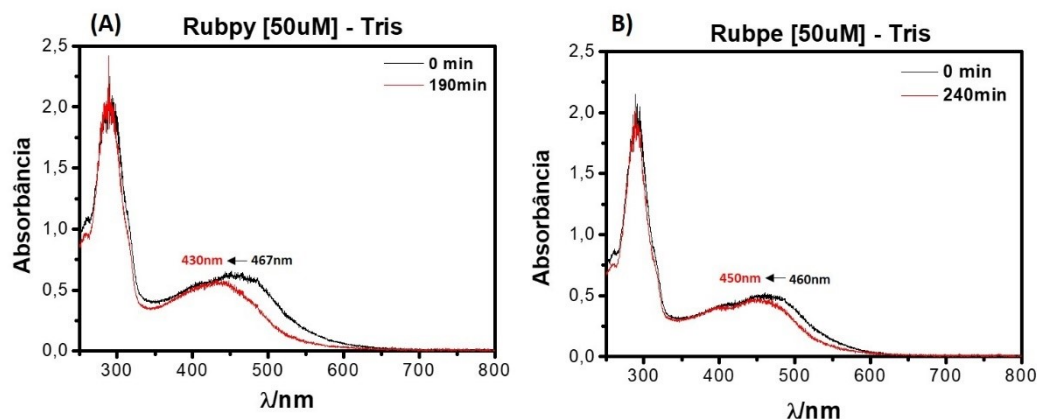
Observa-se que não houve variação na intensidade de absorção dessas bandas dos complexos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ mesmo depois de 96 horas (Figura 23 e Figura 24). Além disso, o aumento da concentração dos complexos não resultou deslocamento do comprimento de onda máximo nem variação na intensidade das bandas em função do tempo, indicando que os complexos são estáveis em tampão PBS.

A ausência de mudança na absorbância máxima sem deslocamento considerável de comprimento de onda, consolida a estabilidade desses complexos em tampão PBS pH 7,4, possibilitando a aplicação deste tampão em estudos posteriores que envolvam biomoléculas ou células vivas.

Como o tampão tris(hidroximetil)aminometano (Tris) também é bastante utilizado em estudos bioquímicos que exigem controle de pH, avaliou-se a estabilidade dos complexos de rutênio em tampão Tris (pH=7,4) a fim de investigar a existência de interações entre os complexos e as moléculas do tampão.

Monitorou-se os espectros de absorção dos compostos em tampão Tris pH 7,4, em soluções com concentrações de $50\mu\text{M}$ por mais de 100 minutos (Figura 25), e observou-se um deslocamento de absorção das bandas MLCT's para região do azul com o passar do tempo (Figura 25). Este deslocamento do máximo de absorção para regiões de maior energia do espectro sugere que o ligante Cl^- está sendo substituído por Tris em ambos com complexos Ru. Na molécula de água e no tampão fosfato a coordenação ocorre através do átomo de oxigênio, uma base dura. No tris, além dos átomos de oxigênio há o nitrogênio do grupo amino, uma base mais mole que o oxigênio (TOMA, 2016). Desta forma, devido o íon $\text{Ru}(\text{II})$ ser um ácido mole a interação com uma base mais macia pode ter contribuído para haver a troca do ligante Cl^- e coordenação do grupo amino (TOMA, 2016). Como o deslocamento foi mais significativo (37 nm) para o complexo $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$, provavelmente houve a troca total do íon cloreto por tris, enquanto para o $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ a troca foi parcial neste tempo, ou seja, houve a troca do ligante em uma parte do complexo em solução.

Figura 25 - Espectro eletrônico de absorção da banda MLCT dos complexos (A) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (B) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em tampão Tris (pH=7.4), logo após (tempos 0 min.) a dissolução (linha preta) e 240 min. após a dissolução (linha vermelha).

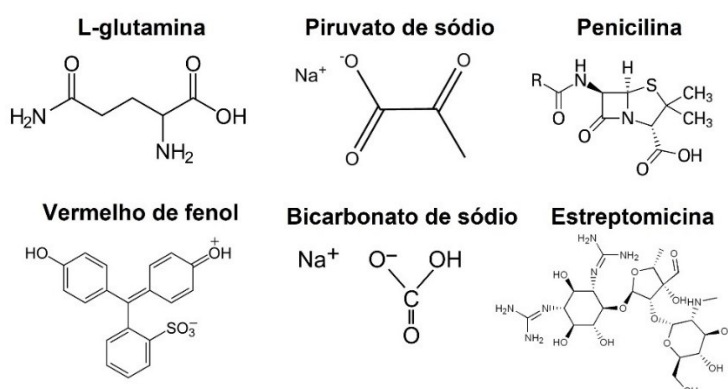


Fonte: autora.

4.3. Estudo da estabilidade dos complexos de rutênio(II) em meio de cultura (Dmem *high glucose*)

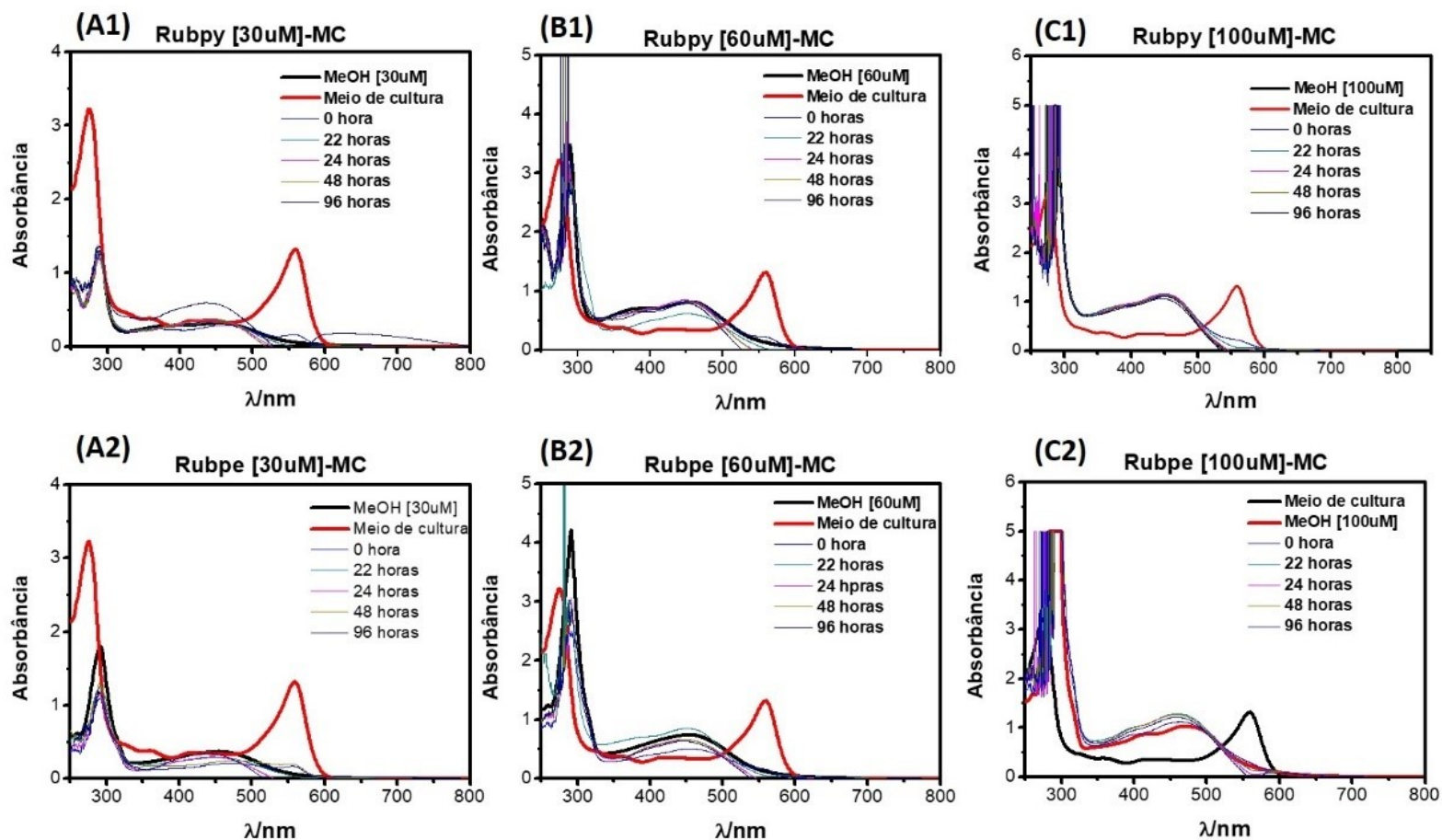
Para avaliar a incorporação e toxicidade dos compostos em células tumorais, é necessário solubilizá-los em meio de cultura, que contém diversas moléculas orgânicas como glicose, L-glutamina, piruvato de sódio, bicarbonato de sódio, vermelho de fenol, penicilina e estreptomicina (Figura 26). Note que essas moléculas possuem bases Lewis como $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ e $-\text{S}$, que podem se coordenar ao centro metálico dos complexos, por isso, estudou-se também a estabilidade dos complexos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em meio de cultura (Dmem *high glucose*), para verificar a ocorrência ou não da troca dos ligantes nos complexos.

Figura 26 - Algumas moléculas presentes no meio de cultura (Dmem).



Na Figura 27 estão representados os espectros de absorção UV-visível do complexo ao longo de 96 horas, a partir do preparo da solução dos compostos em meio de cultura.

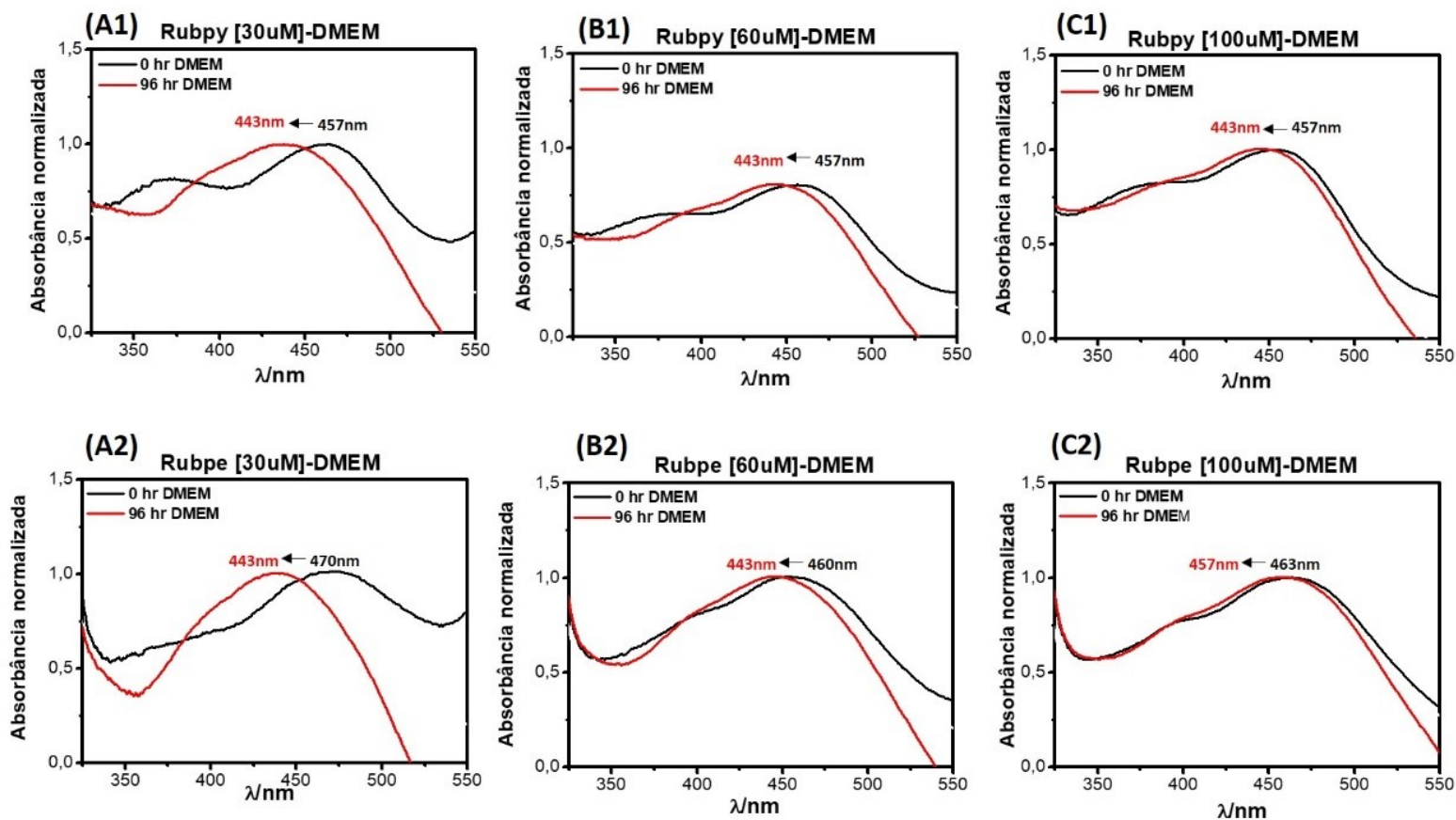
Figura 27 - Espectros de absorção dos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ ($3,0 \times 10^{-5}$; $6,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) no meio de cultura (Dmem high glucose) em função do tempo.



Fonte: autora.

Quando ampliamos os espectros eletrônicos dos complexos na banda MLCT na região do visível (Figura 28), e analisamos apenas o espectro logo após sua dissolução (em preto) e após 96h de incubação (em vermelho), observamos um deslocamento do máximo de absorção para regiões do espectro de menores comprimentos de onda, portanto, de maiores energias (Figura 28). Esses deslocamentos dos máximos de absorção para regiões do espectro sugerem que o ligante Cl^- está sendo substituído por outro ligante. Em adição, esse efeito é mais pronunciado em baixas concentrações dos complexos, e vai diminuindo com o aumento da concentração do complexo no meio de cultura. Em relação as espécies no meio de cultura, provavelmente a coordenação ocorre por espécies que possuem átomos de N e S, visto que moléculas como H_2O , HPO_4^{2-} e H_2PO_4^- não resultam na troca do ligante Cl^- , de acordo com o observado nos experimentos de troca do ligante me solução aquosa, tampão fosfato e tris.

Figura 28 - Espectro eletrônico de absorção da banda MCLT dos complexos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em meio de cultura (Dmem high glucose), logo após (tempo 0 hr) a dissolução (linha preta) e 96 hr após a dissolução (linha vermelha).

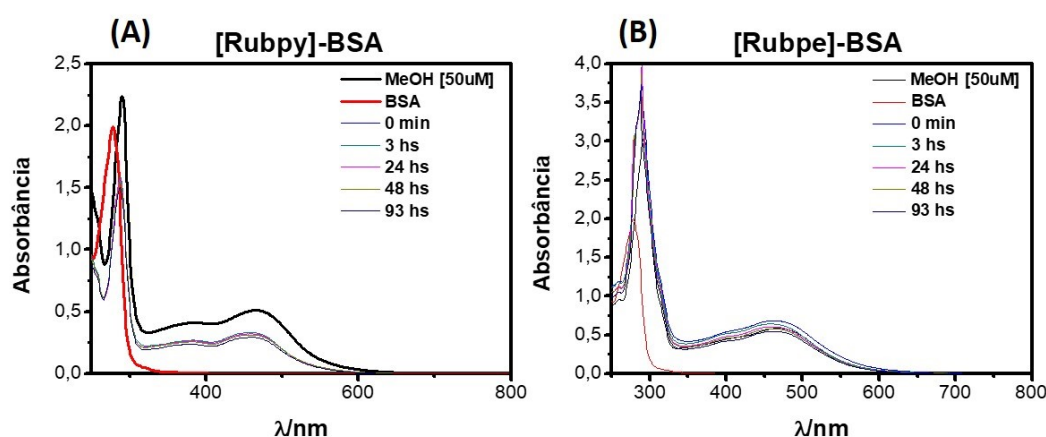


Fonte: autora.

4.4. Estudo da estabilidade dos complexos polipiridínicos de rutênio(II) em albumina de soro bovino (BSA)

Assim como no meio de cultura, a proteína tem grupos funcionais em sua cadeia polimérica de aminoácidos, como -NH_2 e -OH , que podem se coordenar ao centro metálico dos complexos, por isso, avaliou-se também a estabilidade dos espectros de absorção (Figura 29) para os compostos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ dos complexos frente presença de albumina de soro bovino (BSA).

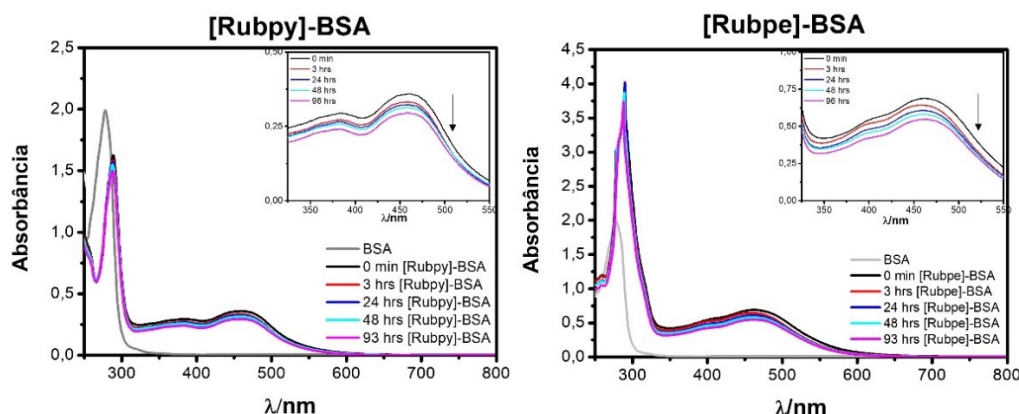
Figura 29 - (A) e (B) Espectro de absorção dos complexos $[[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em BSA ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) no UV/Visível descontando o branco (BSA) ao longo do tempo.



Fonte: autora.

Quando amplificamos os espectros eletrônicos dos complexos na banda MLCT na região do visível (Figura 30), nota-se que não ocorre um deslocamento do máximo de absorção (Figura 30). Por outro lado, observa-se uma leve diminuição da intensidade da banda MLCT, para ambos os compostos, em função do tempo de 93 horas analisados (insert da Figura 30).

Figura 30 - Espectro eletrônico dos complexos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)^+$ ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em ausência (-) e presença de concentração crescente de BSA ($3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) com 5 minutos de incubação a temperatura ambiente. Insert: banda MLCT do complexo em 383 a 470nm evidenciando o efeito hipocrômico.



Fonte: autora.

A ausência de deslocamento de banda MLCT indica que não há troca de ligante coordenado ao metal rutênio(II), mas o efeito hipocrômico sugere que existe interação entre os compostos e a proteína (BSA). A força dessa interação será avaliada em termos de constante de ligação (K_b) *via* espectroscopia de fluorescência, que é uma técnica mais sensível que espectroscopia UV-Vis.

4.5. Avaliação da interação entre os complexos polipiridínicos de rutênio (II) e albumina do soro bovino (BSA) *via* espectroscopia de fluorescência

A estrutura primária da albumina de soro bovino (BSA) é constituída por cerca de 580 aminoácidos. A Tabela 4 apresenta algumas características espectroscópicas dos aminoácidos aromáticos presentes na BSA (STRAIGHT; SPIKES, 1985).

Tabela 4 - Características espectroscópicas dos aminoácidos presentes na BSA.

Aminoácidos	Nº. de resíduos	$\lambda_{exc}(nm)$	$\epsilon(M^{-1}cm^{-1})$	$\lambda_{em}(nm)$
Fenilalanina	27	258	193	282
Tirosina	19	275	1405	304
Triptofano	2	279	5580	348
		290	3935	

Fonte: (SZABO, 1989)

A absorção eletrônica na albumina do soro bovino em 280nm, é devido aos resíduos de triptofano e tirosina. Em comprimentos de onda maiores que 290nm, a absorção é devida principalmente ao triptofano. A fenilalanina apresenta um coeficiente de extinção muito baixo e praticamente não é excitado (STRAIGHT; SPIKES, 1985).

A fluorescência da albumina de soro bovina é notada pela emissão do triptofano, devido ao coeficiente de extinção molar do indol desse resíduo ser aproximadamente cinco vezes maior do que o fenil da tirosina. Embora a tirosina seja altamente fluorescente em solução, sua emissão é muito menor em proteínas devido ao efeito de supressão por grupos vizinhos, uma vez que este resíduo é um fluoróforo natural bastante sensível à polaridade de sua vizinhança (STRAIGHT; SPIKES, 1985).

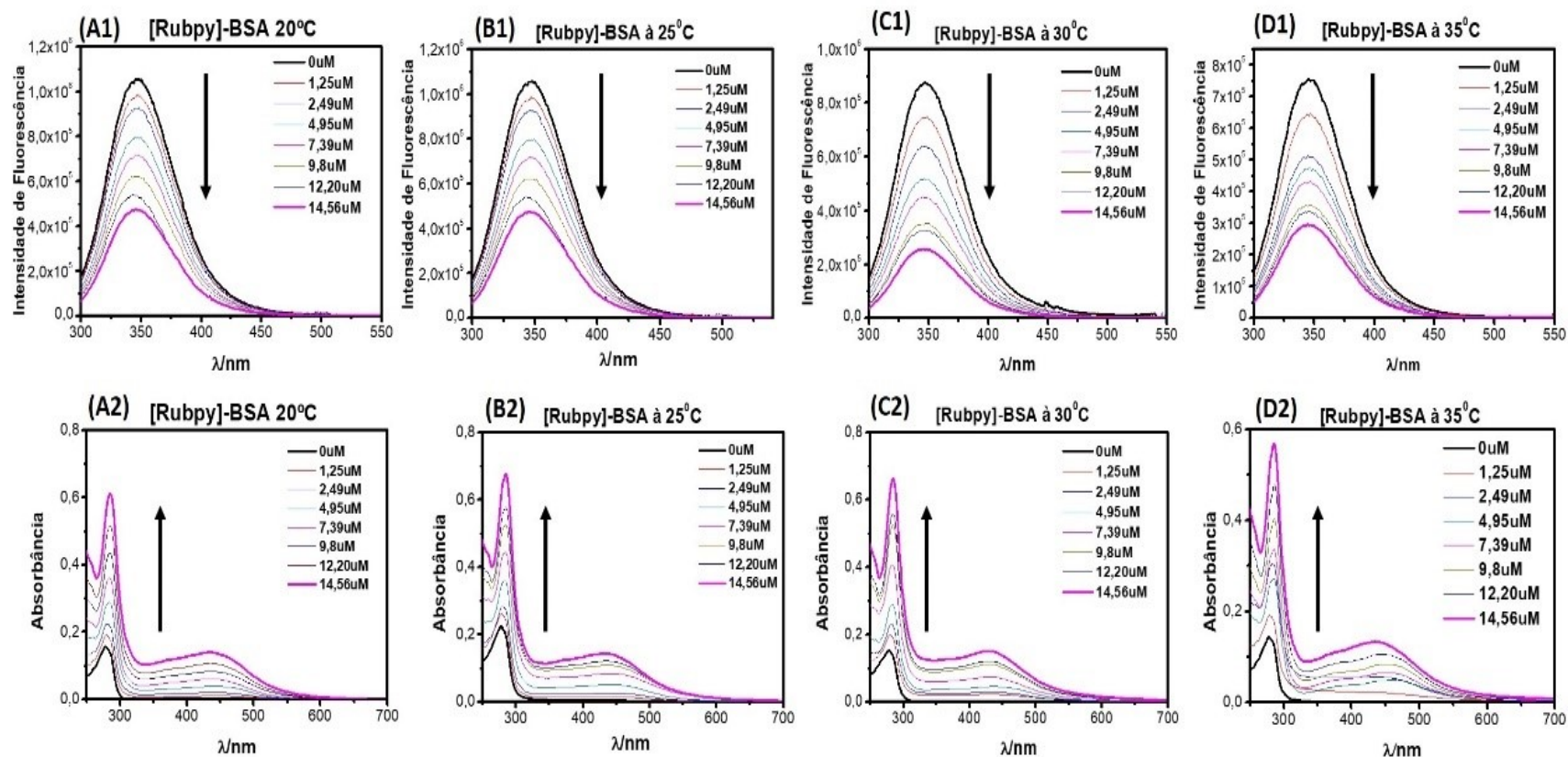
O microambiente da estrutura secundária da cadeia proteica pode ser alterado pela interação da BSA com moléculas pequenas e, nesse caso, geralmente, ocorre a supressão da fluorescência intrínseca da biomolécula. Essa supressão pode ser induzida por diferentes processos como reações no estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental e colisões moleculares (LAKOWICZ, 2006).

Segundo a literatura, para compostos de rutênio, a supressão de fluorescência da albumina é consequência da interação do centro metálico com o resíduo de triptofano *via* histidina e envolve um processo de transferência de energia (EFTINK, 1991; TRYNDAL-LEMIESZ; KEPPLER; KOZTOWSKI, 1999).

Estudos anteriores demonstraram que a ligação do composto organometálico de rutênio com HSA (do inglês, *Human Serum Albumin*) melhora efetivamente o direcionamento e a atividade anticâncer da droga à base de rutênio (WEE et al., 2007). Por isso, realizamos experimentos com o propósito de estudar a interação dos novos compostos com albumina, para avaliar a possibilidade de utilizá-los como compostos antitumorais.

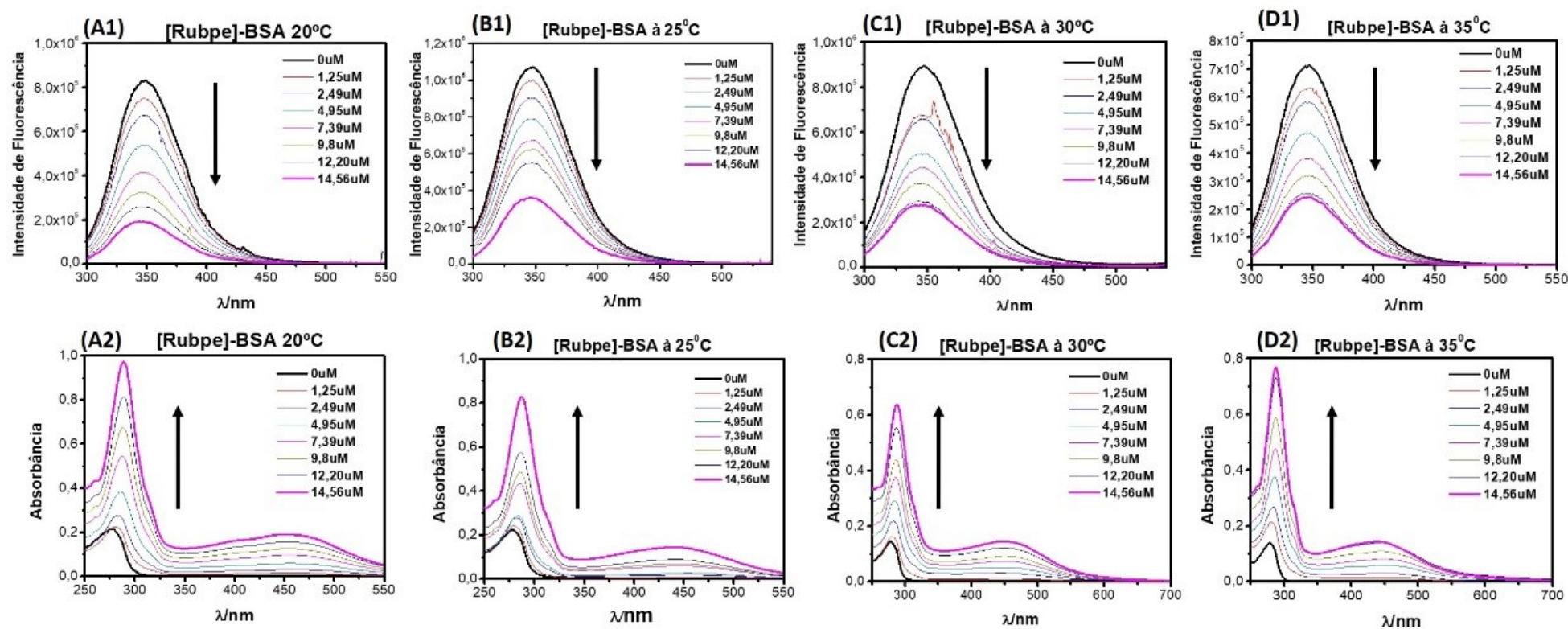
Com objetivo de obter-se os parâmetros sobre as interações entre a BSA e os complexos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$, utilizou-se a técnica de espectroscopia de fluorescência, explorando mais especificamente, a supressão de fluorescência da BSA induzida pela presença dos complexos em diferentes temperaturas: 20°C, 25°C, 30°C e 35°C. Os espectros de absorbância e fluorescência obtidos para a biomolécula em presença dos complexos são apresentados na Figura 31 e 32.

Figura 31 - Espectros de (A1, B1, C1, D1) fluorescência e (A2, B2, C2, D2) absorbância da BSA sob adições sucessivas de complexo $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ em Tris (pH 7,4) nas temperaturas (A) 20°, (B) 25°, (C) 30° e (D) 35°C. $[\text{BSA}] = 3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fenda de abertura excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente.



Fonte: autora.

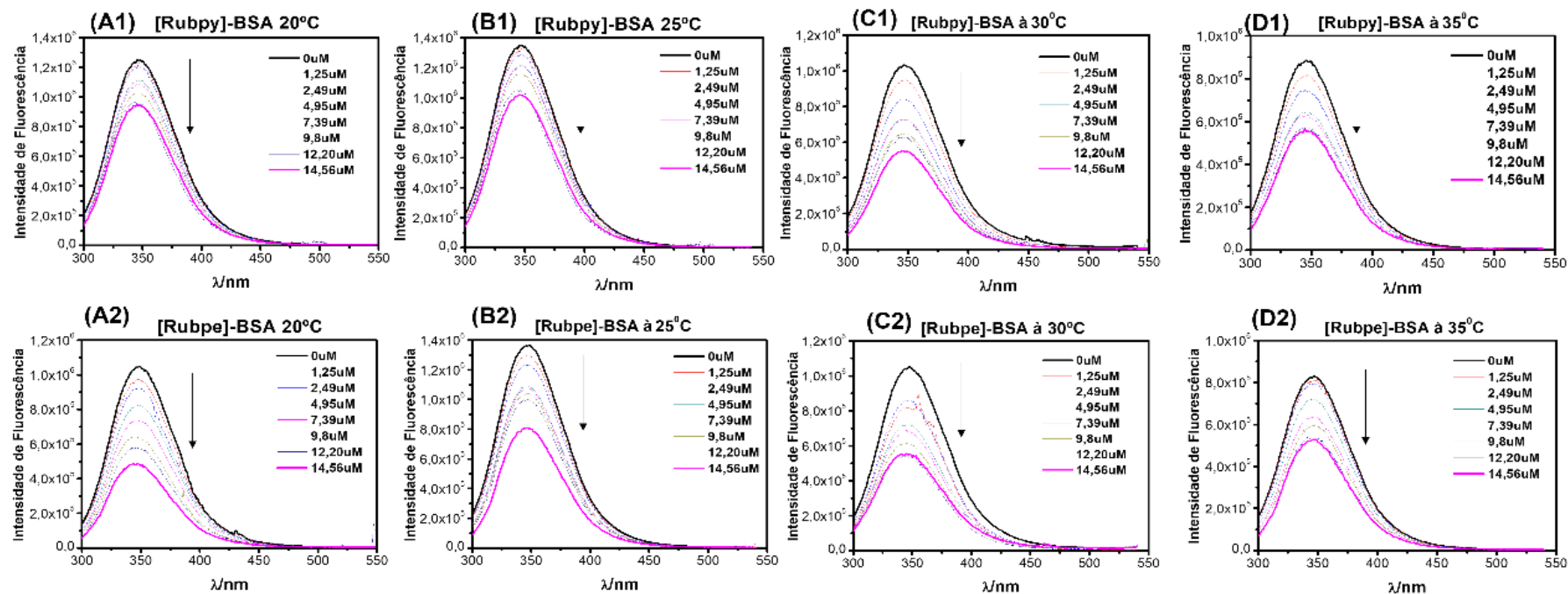
Figura 32 - Espectros de (A1, B1, C1, D1) fluorescência e (A2, B2, C2, D2) absorbância da BSA sob adições sucessivas de complexo $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em Tris (pH 7,4) nas temperaturas (A) 20°, (B) 25°, (C) 30° e (D) 35°C. $[\text{BSA}] = 3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fenda de abertura excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente.



Fonte: autora.

Os valores de fluorescência foram corrigidos em todas as temperaturas, utilizando a equação de Parker (equação 1, item 3.2 de materiais e métodos) devido aos complexos absorverem na região analisada (Figura 33) no sistema $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ -BSA e $[[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)]$ -BSA em tampão Tris, pH 7.4.

Figura 33 - Espectros de fluorescência da BSA sob adições sucessivas do complexo (A1, B1, C1, D1) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (A2, B2, C2, D2) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em Tris (pH 7,4) nas temperaturas (A) 20°, (B) 25°, (C) 30° e (D) 35°C. $[\text{BSA}] = 3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fendas de abertura excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente.



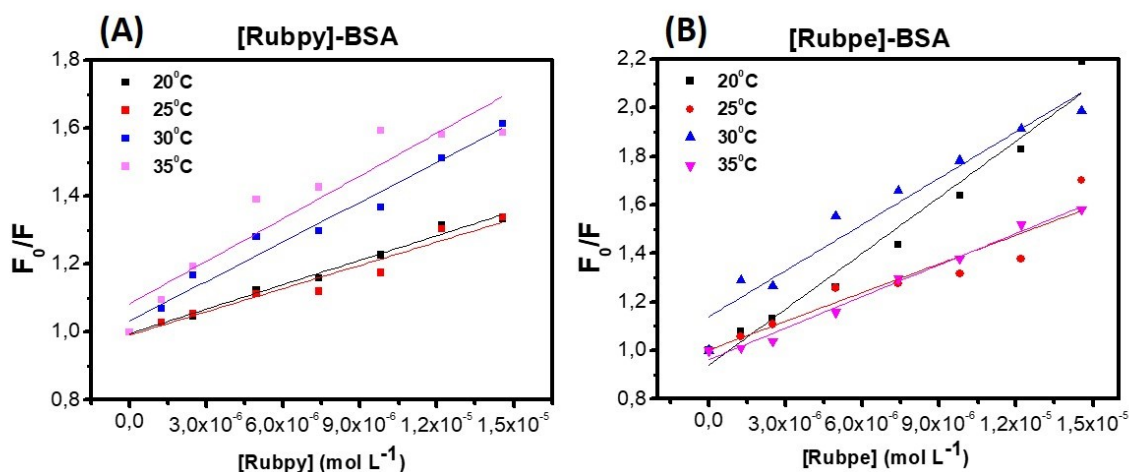
Fonte: autora.

Com a adição de alíquotas de solução dos complexos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em tampão Tris, nota-se que com o aumento da concentração dos complexos em solução, maior é a intensidade da absorbância (Figura 31 e Figura 32). Não se verificou nenhum deslocamento espectral das bandas de absorção.

Por outro lado, observou-se a diminuição gradual da intensidade dessa banda de fluorescência (Figura 33), esta diminuição de intensidade (supressão) da fluorescência da BSA em presença de complexo polipiridínico de Ru(II) é atribuída às mudanças conformacionais dos microambientes proteicos próximos aos resíduos de aminoácidos, em especial, aos fragmentos de triptofano (ANISH BABU et al., 2020; SUN et al., 2015).

A partir dos espectros de emissão BSA sob diferentes concentrações dos complexos, pode se determinar a constante de Stern Volmer (K_{sv}) a partir de gráficos de F_0/F versus $[Q]$ (Figura 34), utilizando a equação de Stern-Volmer (equação 2, item 3.2 de material e métodos).

Figura 34 - Gráficos de Stern-Volmer das interações entre a BSA e complexo (A) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em tampão Tris (pH 7,4) nas temperaturas de 20°, 25°, 35° e 35°C. $[\text{BSA}] = 3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fendas de excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente.



Fonte: autora.

Os gráficos da Figura 34 apresentam perfis lineares, portanto utilizou-se de regressões lineares para calcular os valores de constante Stern-Volmer (K_{sv}) para $[\text{Rubpy}]$ -BSA e $[\text{Rubpe}]$ -BSA em diferentes temperaturas (Tabela 5).

Tabela 5 - Constante de Stern-Volmer (K_{sv}) dos complexos Ru com a BSA (solução 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA em tampão Tris 10mM, pH 7.4).

Composto	T (°C)	K_{sv} ($\times 10^4 \text{ M}^{-1}$)	R^2
[Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆)	20°C	2,40±0,01	0,988
	25°C	2,28±0,02	0,946
	30°C	3,89±0,02	0,968
	35°C	4,18±0,04	0,876
[Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆)	20°C	7,69±0,04	0,964
	25°C	3,94±0,04	0,877
	30°C	6,35±0,05	0,938
	35°C	4,33±0,01	0,987

R^2 é o coeficiente de correlação.

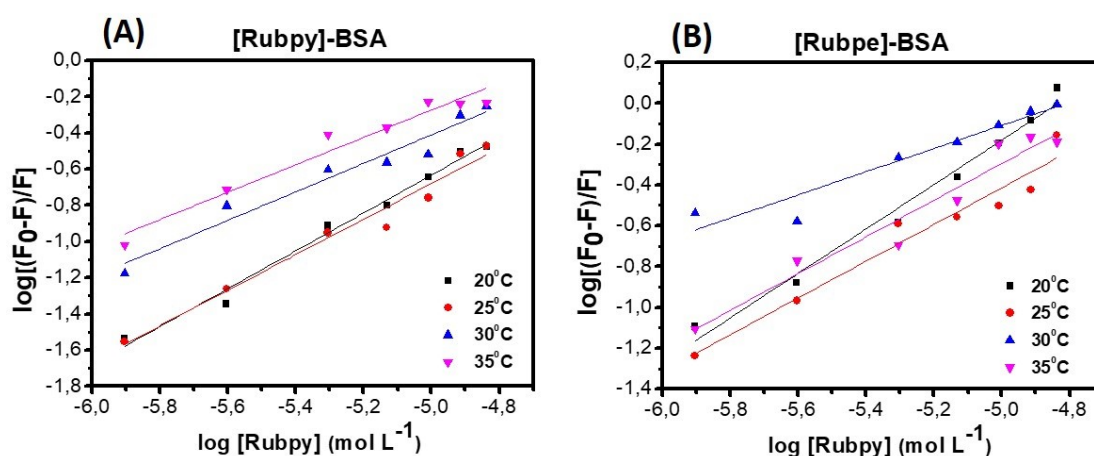
Fonte: autora.

Há dois tipos de mecanismos de supressão, o estático e o dinâmico. No primeiro ocorre a colisão entre a albumina e o supressor no estado fundamental, resultando formação de um complexo não fluorescente. No mecanismo dinâmico, a colisão ocorre entre o fluoróforo no estado excitado com o supressor formando um complexo que retorna ao estado fundamental sem emissão de luz (LAKOWICZ, 2006). Geralmente, no mecanismo estático de supressão, o aumento da temperatura promove a diminuição de K_{sv} , devido a diminuição da estabilidade do complexo formado entre proteína e complexo no estado fundamental. No mecanismo dinâmico de supressão, o aumento da temperatura é acompanhado de um aumento de K_{sv} , favorecendo a formação do complexo proteína-complexo no estado excitado devido a diminuição da viscosidade do meio reacional (LAKOWICZ, 2006).

Os valores da Tabela 5 mostram que não houve uma tendência linear de K_{sv} em função da temperatura para nenhuma das moléculas estudadas [Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e [Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆). Portanto, não foi possível estabelecer qual o mecanismo de supressão (estático ou dinâmico) ocorre entre BSA-complexo, devido à proximidade dos valores de K_{sv} obtidos e também a variação aleatória destes com o aumento da temperatura. Essa variação aleatória dos valores de K_{sv} com o aumento da temperatura também foi observado por Soares e colaboradores no estudo de derivados de Tianeptina (SOARES et al., 2019).

Também se avaliou o grau de interação entre o composto e a proteína (BSA), por meio da determinação da constante de associação ou ligação (K_b). Tais constantes (K_b) foram obtidas a partir de um gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ em função do $\log[Q]$ (Figura 35), utilizando a Stern-Volmer modificada (equação 3, descrita na metodologia 3.2), os valores encontram-se na Tabela 6.

Figura 35 - Gráficos de $\log[(F_0-F)/F]$ em função de (A) $\log[\text{Rubpy}]$ e (B) $\log[\text{Rubpe}]$ em diferentes temperaturas (20°, 25°C, 30°C e 35°C). BSA $3,0\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão Tris 10mM pH 7.4; $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fendas de excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente.



Fonte: autora.

Tabela 6 - Constantes de ligação (K_b) e número de sítios de ligação do supressor (n) para os compostos Rubpe e Rubpy.

Complexo	T (°C)	K_b (M^{-1})	* R^2	SD**	n
[Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpy)](PF ₆)	20°C	$3,98 \times 10^4$	0,985	$0,28 \times 10^4$	$1,05 \pm 0,05$
	25°C	$1,69 \times 10^4$	0,963	$0,41 \times 10^4$	$0,98 \pm 0,08$
	30°C	$3,27 \times 10^3$	0,944	$0,41 \times 10^3$	$0,79 \pm 0,08$
	35°C	$3,19 \times 10^3$	0,948	$0,38 \times 10^3$	$0,76 \pm 0,07$
[Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpe)](PF ₆)	20°C	$1,84 \times 10^5$	0,979	$0,34 \times 10^5$	$1,01 \pm 0,06$
	25°C	$1,21 \times 10^4$	0,942	$0,48 \times 10^4$	$0,89 \pm 0,09$
	30°C	$5,39 \times 10^2$	0,908	$0,39 \times 10^2$	$0,57 \pm 0,07$
	35°C	$1,58 \times 10^4$	0,939	$0,49 \times 10^4$	$0,89 \pm 0,09$

* R^2 é o coeficiente de correlação; SD** é o desvio padrão para os valores de K_b ; Fonte: autora.

Valor elevado de constante de ligação ($K_b > 10^5$) indica que a espécie exógena liga fortemente à proteína, enquanto que valor K_b entre 10^4 e 10^8 indica interação de moderada a forte (NETO et al., 2020). A ordem de grandeza dos valores de K_b obtidos para ambos os complexos variam de 10^2 a 10^5 , a depender da temperatura (Tabela 6). Pode-se observar que as interações entre a complexo Ru e a BSA são fracas a moderadas, uma vez que $K_b < 10^5 \text{ M}^{-1}$, com exceção de K_b [Rubpe]-BSA à 20°C. Não houve uma relação linear entre os valores de K_b e o aumento da temperatura.

O número de sítios de ligação do supressor (n) calculados para ambos os sistemas [Rubpy]-BSA e [Rubpe]-BSA, também são apresentados na Tabela 6, foram de aproximadamente 1. Portanto, sugere-se que um único sítio de ligação da BSA esteja presente para os complexos ($[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$), sendo a estequiometria 1:1.

O estudo de fluorescência em diferentes temperaturas permite calcular os parâmetros termodinâmicos, como a variação de energia Livre de Gibbs (ΔG), variação de entalpia (ΔH) e variação de entropia (ΔS). ΔG descreve a espontaneidade do processo, enquanto ΔH e ΔS caracterizam as forças ou tipos de ligações que estão sendo formadas (HU et al., 2009). Para isso, os valores da variação da entalpia (ΔH) e da entropia (ΔS) envolvidos na ligação entre BSA e cada complexo são calculados usando a equação de van't Hoff (Equação 9).

$$\ln K_b = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (\text{Equação 9})$$

Onde: ΔH é a variação da entalpia; ΔS é a variação da entropia; R é a constante dos gases ideais ($8,14 \text{ J.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$); T é a temperatura em Kelvin e K_b é a constante de ligação.

Já os valores de ΔG foram obtidos utilizando-se a Equação 10:

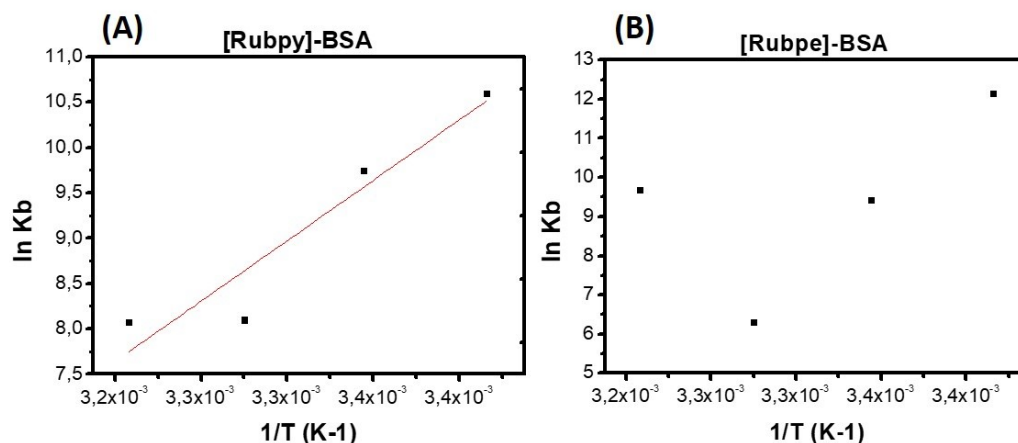
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Equação 10})$$

Onde: ΔH é a variação da entalpia; ΔS é a variação da entropia e T é a temperatura em Kelvin (LAKOWICZ, 2006).

Utilizando equação 9, foram construídos os gráficos de van't Hoff (Figura 36), em função de $1/T$ os quais apresentaram perfil linear apenas para [Rubpy]-BSA. Por meio do

seu coeficiente angular e linear, foram obtidos os parâmetros termodinâmicos apresentados na Tabela 6.

Figura 36 - Gráficos de $\ln K_b$ em função de $1/T$ (K^{-1}) (A) $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$ e (B) $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$ em diferentes temperaturas (20° , $25^\circ C$, $30^\circ C$ e $35^\circ C$). BSA $3,0 \mu mol L^{-1}$ em tampão Tris 10mM pH 7.4; $\lambda_{exc} = 280 nm$, fendas de excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente.



Fonte: autora.

Tabela 7 - Parâmetros termodinâmicos para a determinação do caráter das forças de ligação envolvidas.

Complexo	ΔH (kJ.mol ⁻¹)	ΔS (J.mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (K.J.mol ⁻¹)
$[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$	-138612,4797	-385,6	-25,8
			-24,1
			-20,4
			-20,7
$[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$	n.c	n.c	n.c
			n.c
			n.c
			n.c

n.c.: não calculável.

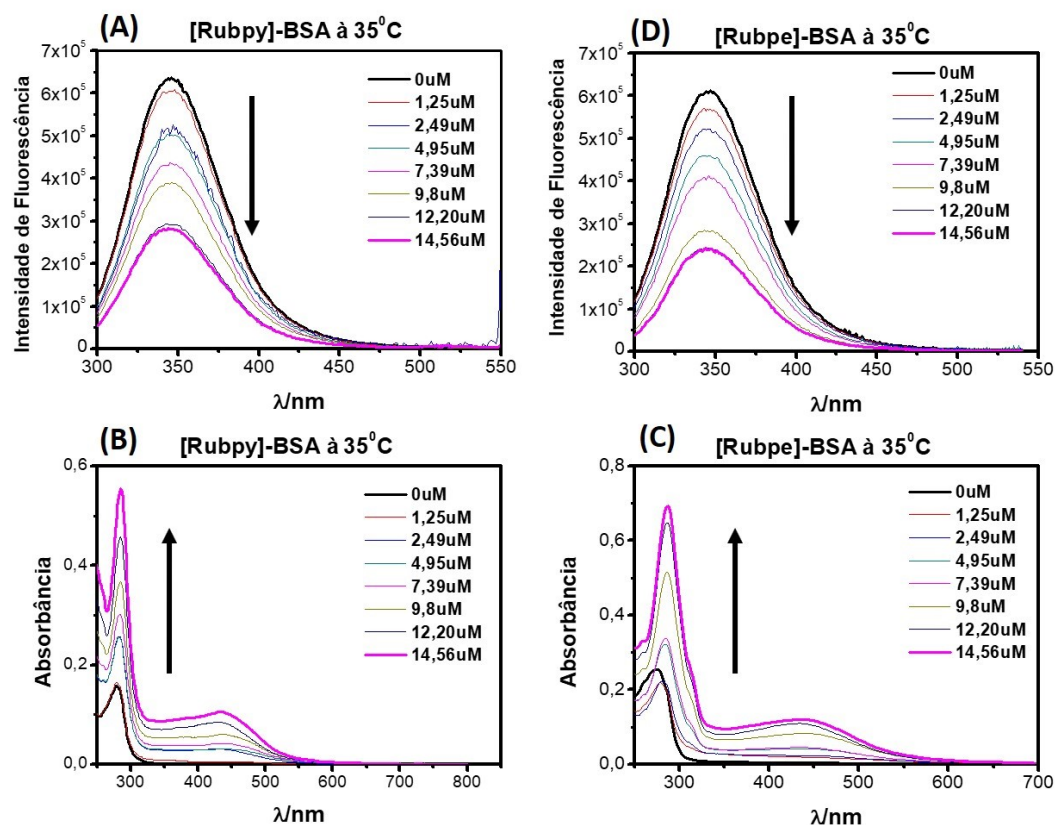
Fonte: autora.

Através dos parâmetros termodinâmicos calculados para o sistema $[Rubpy]$ -BSA, apresentados na Tabela 7, conclui-se que há a interação espontânea entre a BSA e o complexo $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$ (pois $\Delta G < 0$), e que tal interação é determinada basicamente por interações de van de Waals e/ou ligações de hidrogênio (pois $\Delta S < 0$ e $\Delta H < 0$) (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981).

Vale salientar que com os dados obtidos no estudo da supressão de fluorescência da BSA induzida pela presença dos complexos em diferentes temperaturas (20°C, 25°C, 30°C e 35°C), não foi possível estabelecer o tipo de mecanismo de supressão (estático ou dinâmico). Isso porque os valores de K_{sv} não apresentaram nenhuma tendência de aumento ou diminuição, com a elevação da temperatura. Além disso, os valores de K_b obtidos também variaram bastante (da ordem de 10^2 a 10^5 M^{-1}) e não apresentaram linearidade com aumento da temperatura. Por fim, também não foi possível determinar parâmetros termodinâmicos para o sistema [Rubpe]-BSA.

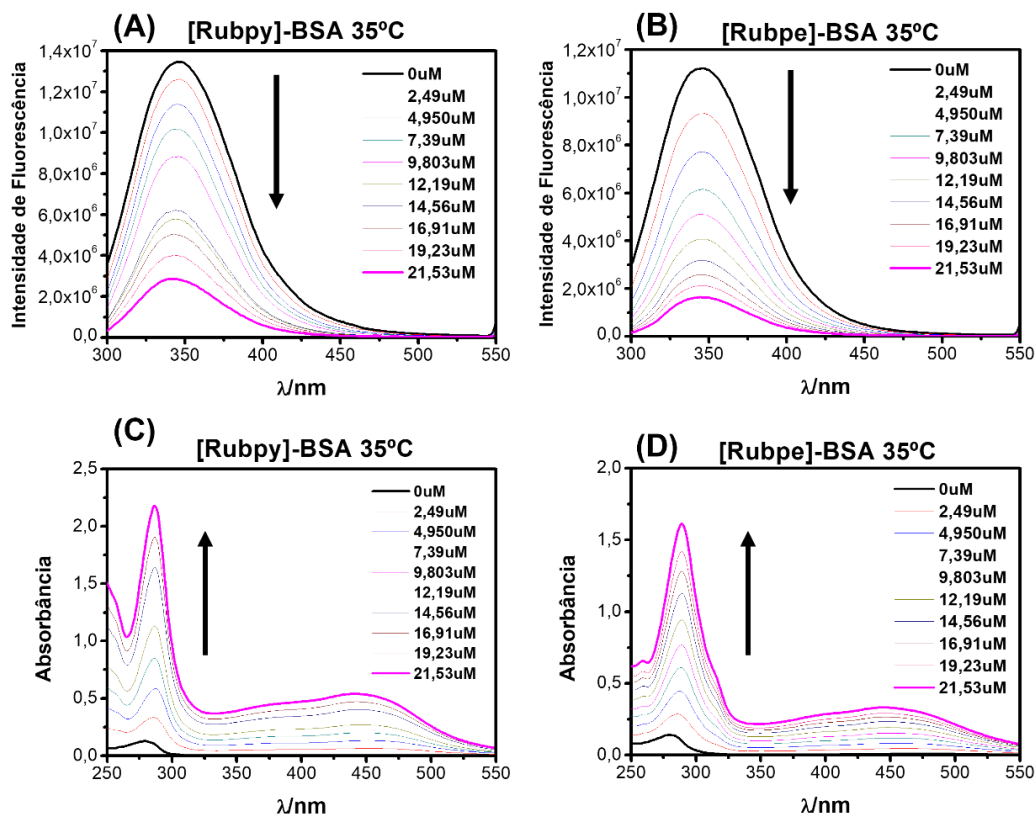
Diante dos resultados inconclusivos, hipotetizou-se que essa dificuldade de análise dos dados obtidos poderia ser devido à uma interferência do tampão Tris utilizado na interação dos complexos com BSA. Isso porque a molécula Tris (Figura 18) poderia trocar ligante com Cl^- em diferentes velocidades, a depender da temperatura e do tempo de interação, de acordo com o observado no experimento de aquação neste tampão. Para avaliar se o tempo de interação entre BSA e complexo afeta o resultado obtido, fixou-se a temperatura de 35°C e realizaram-se os mesmos ensaios de fluorescência com (i) 24 horas interação BSA-complexo (soluções independentes em concentrações diferentes de complexo foram preparadas e incubadas por 24h) – Figura 37, e com (ii) 0 hora interação BSA-complexo (adição de alíquotas de complexo diretamente na amostra de BSA) - Figura 38.

Figura 37 - Espectros de fluorescência da BSA incubada por 24h em soluções independentes com concentrações diferentes de complexo (A) $[[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)]$ e (B) $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$ em Tris (pH 7,4) à 35°C. Espectros de absorção da BSA incubada 24h com os complexos (C) $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$ e (D) $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$ em Tris (pH 7,4) à 35°C. $[BSA] = 3,0 \mu mol L^{-1}$. $\lambda_{exc} = 280 nm$, fendas de excitação e emissão de 50 nm e 1,0 nm, respectivamente.



Fonte: autora.

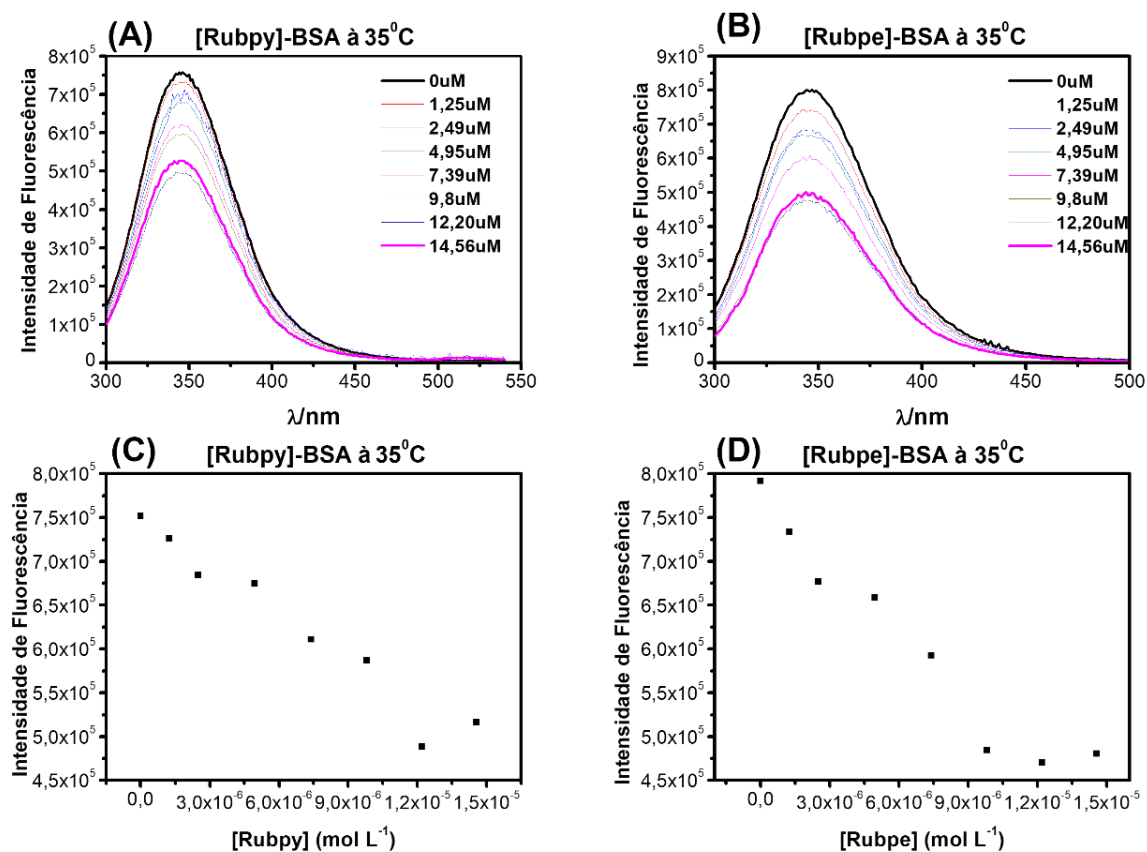
Figura 38 - Espectros de fluorescência da BSA sob adições sucessivas de complexo (A) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (B) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em Tris (pH 7,4) à 35°C. Espectros de absorção da BSA incubada 0h com os complexos (C) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (D) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em Tris (pH 7,4) à 35°C. $[\text{BSA}] = 3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fendas de excitação e emissão de 50 nm e 1,0 nm, respectivamente.



Fonte: autora.

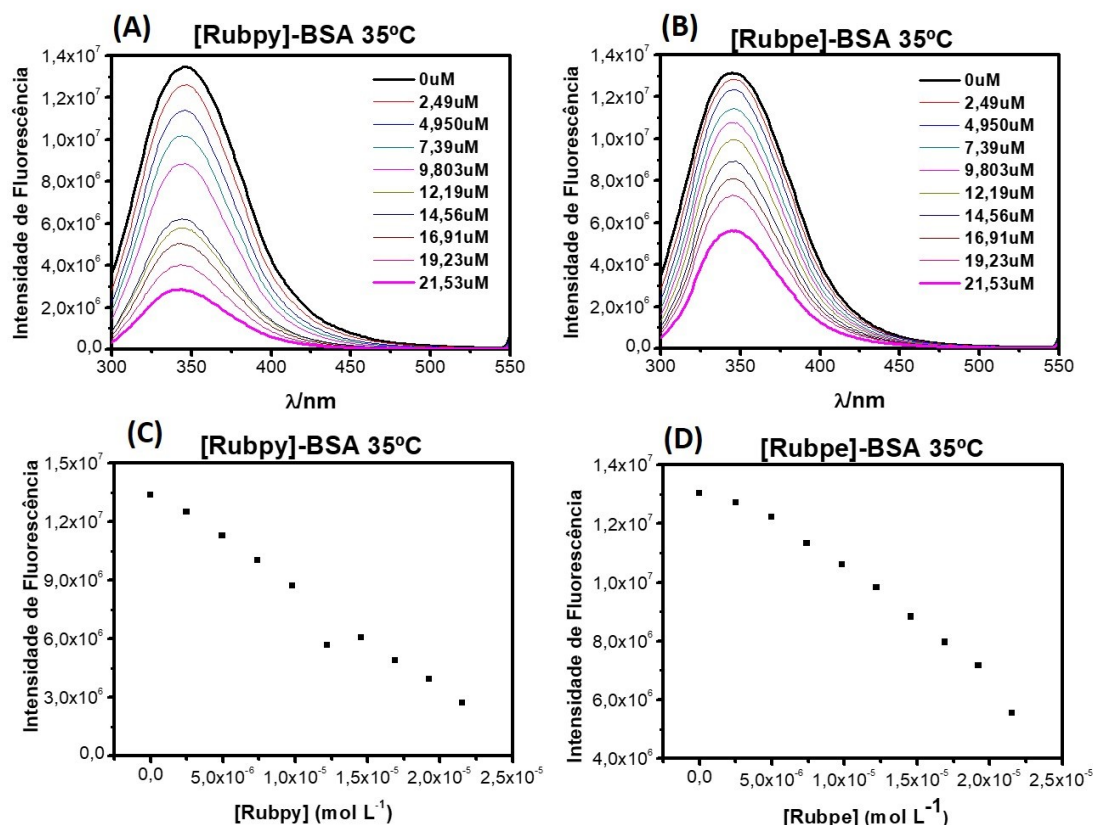
Os valores de intensidade de fluorescência foram corrigidos pela equação de Parker (equação 1, item 3.2 de materiais e métodos) devido ao efeito do filtro interno no sistema $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ -BSA e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ -BSA em tampão Tris (Figura 39 e Figura 40).

Figura 39 - Espectros de fluorescência da BSA incubada por 24h em soluções independentes com concentrações diferentes de complexo (A) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (B) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em Tris (pH 7,4) à 35°C. Decaimento da intensidade de fluorescência (350 nm) em função da concentração de (C) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (D) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$. $T = 35^\circ\text{C}$. $[\text{BSA}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fendas de abertura excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente.



Fonte: autora.

Figura 40 - Espectros de fluorescência da BSA sob adições sucessivas de complexo (A) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (B) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em Tris (pH 7,4). Decaimento da intensidade de fluorescência (350 nm) em função da concentração de (C) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (D) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$. $T = 35^\circ\text{C}$. $[\text{BSA}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fendas de abertura excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente.

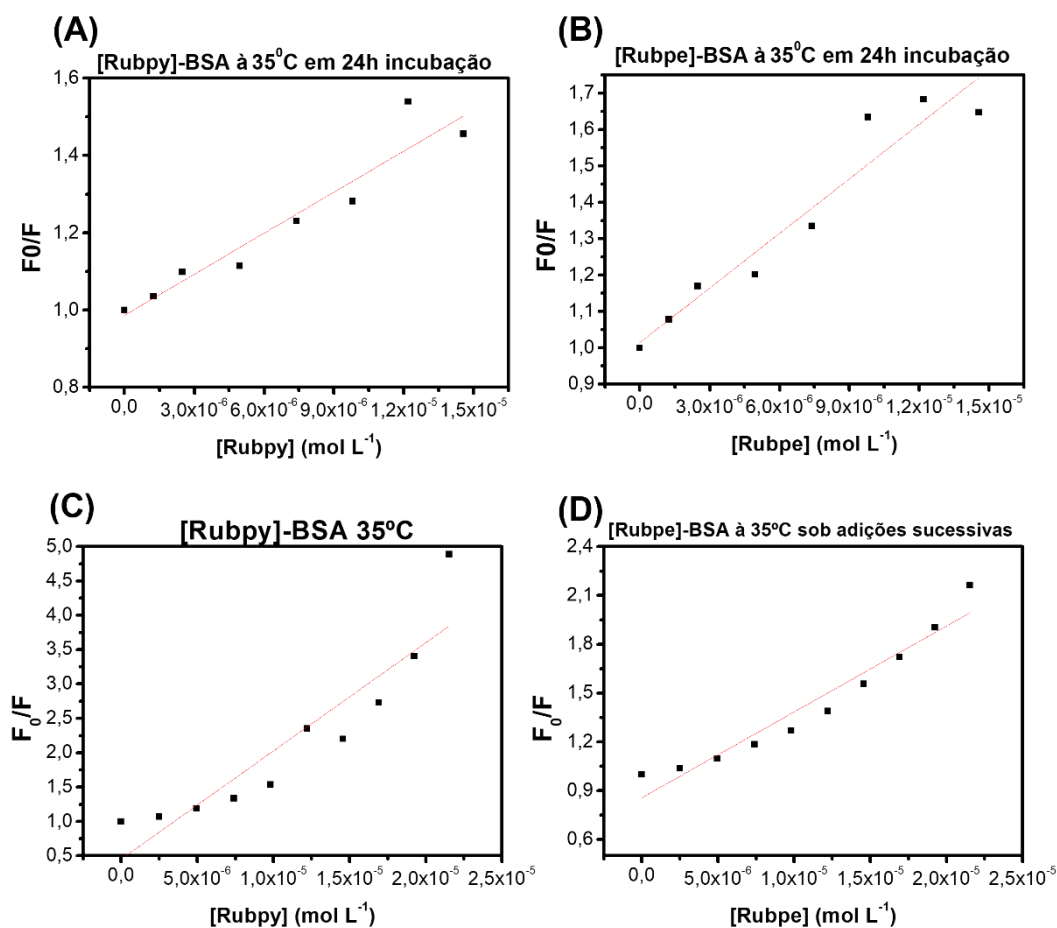


Fonte: autora.

Ao comparar os gráficos de decaimento da intensidade de fluorescência em função da concentração de complexo da Figura 39 (BSA incubada por 24h em soluções independentes com concentrações diferentes de complexo) e da Figura 40 (sob adições sucessivas de complexo), nota-se intensidade de fluorescência da BSA diminui de forma mais linear sob adições sucessivas de complexo (Figura 40) do que quando a BSA incubada por 24h em soluções independentes com concentrações diferentes de complexo (Figura 39). Como a troca de ligante Cl^- por Tris pode ser lenta, isso sugere que realizar a leitura dos espectros de fluorescência após 24h de interação BSA-complexo em soluções independentes pode resultar em valores de supressão mais aleatórios e/ou menos lineares.

De fato, ao plotar os gráficos de Stern-Volmer, observa-se que os pontos experimentais obtidos estão mais dispersos (Figura 41 A e B) quando BSA incubadas por 24 horas em soluções independentes de complexo Ru, enquanto tem-se uma tendência linear com desvio positivo da curva (Figura 41 C e D) sob adições sucessivas de alíquotas solução complexo.

Figura 41 - Gráficos de Stern-Volmer das interações entre a BSA e complexo $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ (A e B) incubadas por 24 horas em soluções independentes à 35°C ou (C e D) sob adições sucessivas de alíquotas solução complexo à 35°C. $[\text{BSA}] = 3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão Tris (pH 7,4). $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fendas de excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente.



Fonte: autora.

Tabela 8 - Constante de Stern-Volmer (K_{sv}) dos complexos Ru com a BSA (solução $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA em tampão Tris, pH 7.4), após 24h de incubação em soluções independentes de complexo Ru ou após adições sucessivas de alíquotas complexo Ru.

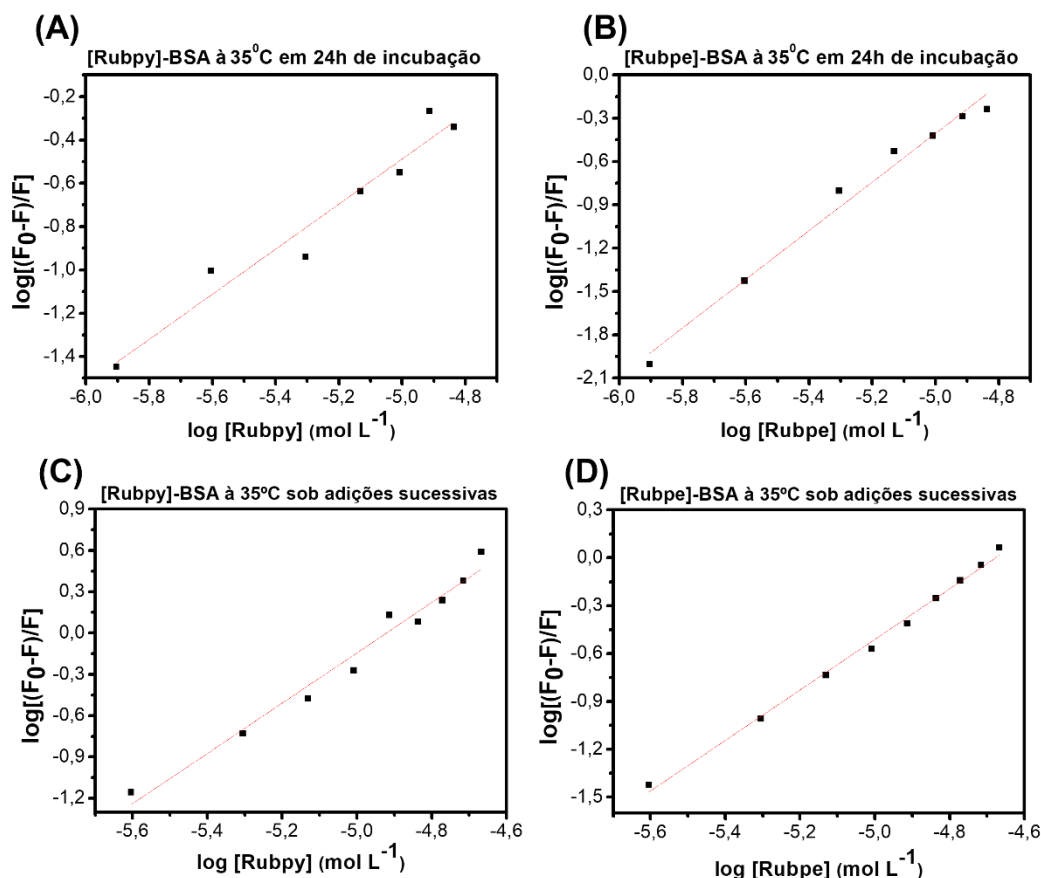
Composto	Tempo incubação	$K_{sv}(10^4 \text{ L mol}^{-1})$	R^2
[Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆)	24 h	$3,54 \pm 0,03$	0,901
	0 h	$15,75 \pm 0,03$	0,823
[Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆)	24 h	$5,00 \pm 0,04$	0,919
	0 h	$5,28 \pm 0,06$	0,931

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão de experimentos realizados em duplicatas. R^2 é o coeficiente de correlação para os valores de K_{sv} . Fonte: autora.

Note que [Rubpe]-BSA apresenta valores de K_{sv} em torno de $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ independente do tempo de incubação (24h em soluções independentes ou 0h sob adições sucessivas de alíquotas complexo) – Tabela 8. Entretanto, no sistema [Rubpy]-BSA não houve concordância nos valores de K_{sv} , sendo o mesmo 5x maior quando alíquotas de complexo são adicionadas comparada com incubação de 24h (Tabela 8).

Também se determinou-se os valores da constante de ligação (K_b) através do gráfico de $\log[(F_0/F)/F]$ em função do $\log[Q]$ (Figura 42), utilizando a Stern-Volmer modificada (equação 3, descrita na metodologia 3.2).

Figura 42 - Gráficos de $\log[(F_0-F)/F]$ em função de $\log[\text{Rubpy}]$ ou $\log[\text{Rubpe}]$ (A e B) incubadas por 24 horas em soluções independentes à 35°C ou (C e D) sob adições sucessivas de alíquotas solução complexo à 35°C. BSA 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão Tris 10mM pH 7,4; $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fendas de excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente.



Fonte: autora.

Tabela 9 - Constantes de ligação (K_b) e número de sítios de ligação do supressor (n) obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados para a supressão de fluorescência de BSA (1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) para os compostos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em tampão Tris.

Complexo	Tempo incubação	K_b (M^{-1})	n	R^2
$[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$	24 h	$5,19 (\pm 0,04) \times 10^4$	1,0	0,940
	0 h	$9,67 (\pm 0,04) \times 10^8$	1,8	0,971
$[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$	24 h	$1,06 (\pm 0,09) \times 10^8$	1,7	0,982
	0 h	$2,52 (\pm 0,06) \times 10^7$	1,6	0,995

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão de experimentos realizados em duplicatas. R^2 é o coeficiente de correlação para os valores de K_b e n . Fonte: autora

Para o sistema [Rubpe]-BSA, o valor K_b foi de $2,52 \times 10^7$ e $1,06 \times 10^8$ para incubação durante 0h e 24h, respectivamente, indicando forte ligação de Rubpe com a proteína (pois $K_b > 10^5$). O aumento do tempo de incubação de 0h para 24h, aumentou o valor de K_b em uma ordem de grandeza (de 10^7 para 10^8) no caso de [Rubpe]-BSA (Tabela 9). Por outro lado, para o sistema [Rubpy]-BSA, o aumento do tempo de incubação de 0h para 24h, diminuiu o valor de K_b em quatro ordens de grandeza (de $9,67 \times 10^8$ para $5,19 \times 10^4$) no caso de [Rubpy]-BSA (Tabela 9). O número de sítios de ligação do supressor (n) calculados para ambos os sistemas [Rubpy]-BSA e [Rubpe]-BSA foi em torno de 2, com exceção de [Rubpy]-BSA com 24h de incubação (Tabela 9).

Os valores de K_{SV} e K_b obtidos para [Rubpy]-BSA em tempos de incubação diferentes (0h e 24h) foram muito discrepantes, enquanto que para [Rubpe]-BSA os valores não foram tão dispersos assim (Tabela 8 e 9). Hipotetizamos que isso ocorre devido ao grupo funcional $-NH_2$ presente no Tris (tampão utilizado nos estudos de interação com BSA) coordenar-se ao íon metálico dos complexos (TOMA, 2016). De fato, os espectros eletrônicos de absorção (Figura 25 do tópico 4.2) mostra que um deslocamento de absorção das bandas MLCT's para região do azul com o passar do tempo (Figura 25 do tópico 4.2), indicando troca do ligante Cl^- por Tris. Isso ocorre em ambos os complexos, porém essa troca de ligante é mais rápida para o Rubpy (190 min) do que para Rubpe (> 240 min).

Uma vez que tampão Tris troca ligante com Cl^- nos complexos de Ru, impossibilitando a análise dos dados com clareza, realizou-se os mesmos estudos de interação BSA com $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$ e $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$ utilizando tampão PBS (Figura 43) ao invés de Tris. Estudos sobre a possibilidade de troca de ligante com PBS foram realizados previamente, e os resultados mostraram que não há deslocamento de absorção das bandas MLCT's dos complexos de Ru em PBS com o passar do tempo (Figura 23 do tópico 4.2).

A partir dos espectros de fluorescência da BSA sob adições consecutivas de alíquotas complexo Ru (à 25°C), observou-se novamente diminuição na intensidade de fluorescência referente à supressão da colisão entre proteína e composto (Figura 43). Plotou-se, então, o gráfico de Stern-Volmer (Figura 43) utilizando-se a intensidade de fluorescência corrigida (equação 1, item 3.2 de materiais e métodos). Observa-se que a equação 2 (item 3.2), utilizada para determinar o K_{SV} , não é ajustável aos dados das Figuras 43C e D, em razão da presença de uma curvatura para cima. A presença dessa curva é um indicativo que ambos os mecanismos de supressão (estático e dinâmico) estão

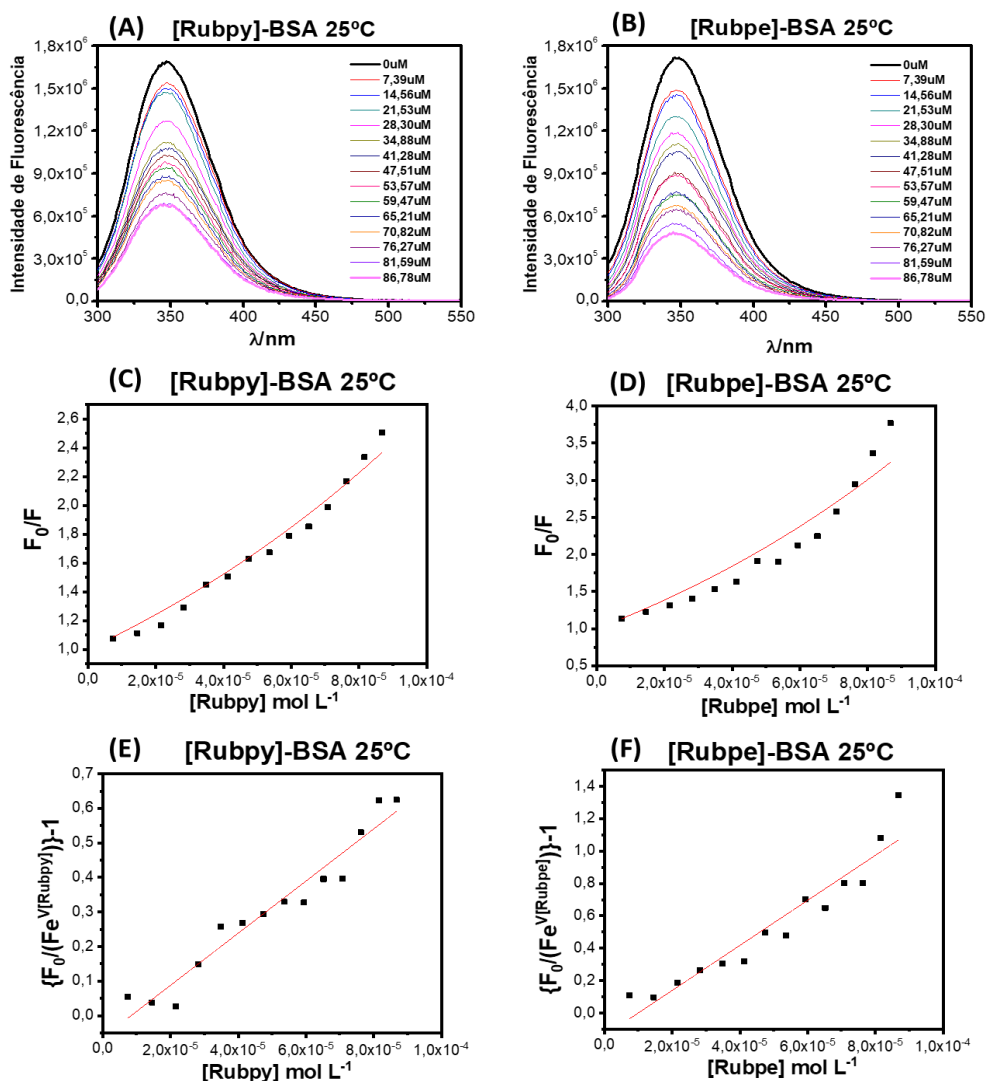
ocorrendo (LAKOWICZ, 2006; MILUTINOVIĆ et al., 2017; SEEDHER; AGARWAL, 2010).

Um fator exponencial ($e^{V[Q]}$) (onde “e” é número neperiano, V é a constante de supressão estática, [Q] é a concentração do supressor) pode ser introduzido na equação 2, a fim de descrever ambos os modos de supressão, assim é produzido a equação 11: (LAKOWICZ, 2006; MILUTINOVIĆ et al., 2017; SEEDHER; AGARWAL, 2010).

$$\frac{F_0}{F} = (K_{sv}[Q] + 1) e^{V[Q]} \quad (\text{Equação 11})$$

O fator V é obtido através da construção de um gráfico de $F_0/(Fe^{V[Q]}) - 1$ em função de [Q] variando-se o valor de V até obter-se o melhor ajuste linear, como mostrado nas Figuras 43E e F (SEEDHER; AGARWAL, 2010). Para determinar o valor de V foram utilizados dois critérios, o maior valor do coeficiente de determinação (R^2) nos dois tipos de gráficos das Figuras 43C e D, 43 E e F, o ajuste satisfatório foi alcançado com $V = 5000 \text{ L mol}^{-1}$. Desta forma, foi obtido o ajuste como mostrado nessas Figuras 43 (C-F) e foi determinado o valor de K_{sv} para os dois complexos, como mostrado na Tabela 9. O composto Rubpe apresentou K_{sv} aproximadamente duas vezes maior que o do Rubpy.

Figura 43 - (A e B) Espectros de fluorescência da BSA sob adições sucessivas de complexo $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$. (C e D) Gráficos de Stern-Volmer da interação de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ ajustados pela equação 11. (E e F) Gráficos de $F_0/(F_0 - F) - 1$ em função de $[Q]$. Tampão PBS (pH 7,4), temperatura 25°C, $[\text{BSA}] = 3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, fendas de abertura excitação e emissão de 5,0 nm e 1,0 nm, respectivamente.



Fonte: autora.

Tabela 10 - Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de ligação (K_b) e número de sítios de ligação do supressor (n) dos complexos Ru com a BSA (solução 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA em tampão PBS, pH 7.4 à 25°C).

Composto	K_{sv} (10^5 M^{-1})	K_b (10^5 M^{-1})	n
[Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆)	0,61 $\pm$ 0,02	2,89 $\pm$ 0,04	1,31
[Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆)	1,27 $\pm$ 0,08	1,97 $\pm$ 0,03	1,23

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão de experimentos realizados em duplicatas. R^2 é o coeficiente de correlação para os valores de K_{sv} . Fonte: autora.

Considerando que PBS não troca ligante com Cl^- , e que o estudo de interação foi conduzido sob adições sucessivas de composto (sem as 24h de interação), foi possível analisar os dados obtidos. Para ambos os complexos, o valor de K_b foi da ordem de 10^5 indicando forte interação entre complexo e a proteína BSA (Tabela 10). Rubpy teve valor de K_b levemente maior ($\approx 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) do que Rubpe ($K_b \approx 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), sugerindo interação um pouco mais forte de Rubpy à BSA comparado com Rubpe. A análise das constantes de ligação é bastante útil para inferir como uma espécie molecular será distribuída no plasma sanguíneo, a constante de ligação considerada ideal encontra-se na faixa de $10^4 - 10^6 \text{ L mol}^{-1}$ (LAZNIEWSKA et al., 2021). Desta forma, os valores obtidos para Rubpy e Rubpe são altos o suficiente para que os compostos liguem-se ao BSA para serem transportados, contudo, são suficientemente baixo de forma que os compostos pode ser liberado da albumina na chegada às células-alvo (MILUTINOVIĆ et al., 2017).

Em adição, o número de sítios de ligação do supressor (n) calculados para ambos os sistemas [Rubpy]-BSA e [Rubpe]-BSA foram de aproximadamente 1, indicando um único sítio de interação da BSA com os complexos.

4.6. Oxidação da BSA fotoinduzida pelos complexos de Ru

As albuminas são alvos fáceis de sofrer processos foto-oxidativos, principalmente por espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e/ou espécies radicais ($\text{OH}^\bullet$, $\text{O}_2^\bullet$ e $\text{OOH}^\bullet$) (DA SILVA et al., 2008; DA SILVEIRA SANTOS et al., 2020; SILVESTER; TIMMINS; DAVIES, 1998).

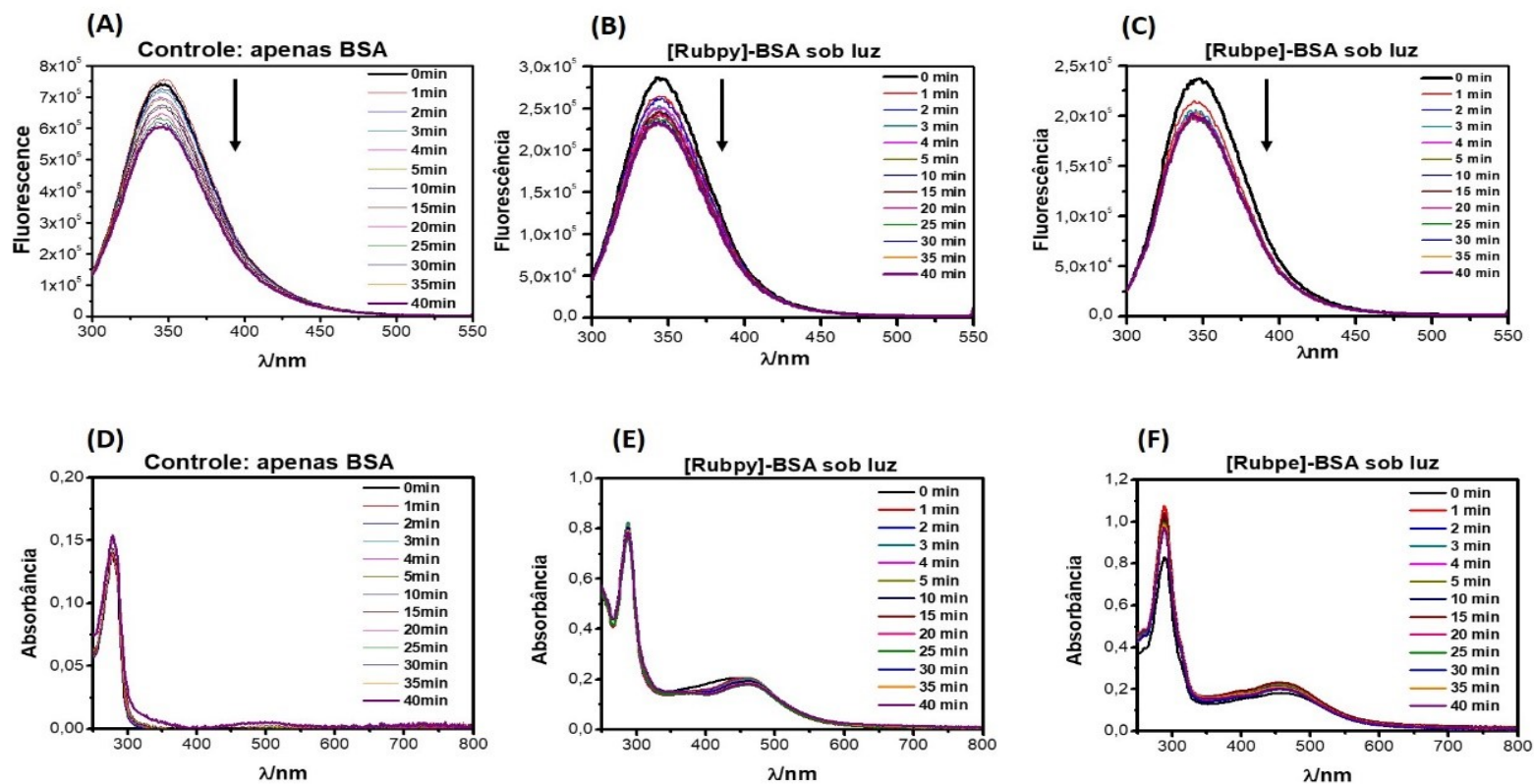
A fotoxidação de aminoácidos é um dos métodos utilizados com a finalidade de comparar compostos com potencial aplicação da terapia fotodinâmica. Nesse método, acompanha-se a supressão da fluorescência do triptofano devido a sua fotoxidação na

presença do FS e uma medida da eficiência fotodinâmica do composto é obtido através da determinação da constante de velocidade da reação (BALL et al., 1998; CAVALCANTE, 2007; SILVESTER; TIMMINS; DAVIES, 1998).

A fotooxidação de proteínas leva à degradação de suas cadeias laterais devido à presença de aminoácidos suscetíveis à fotooxidação como cisteína, histidinas, metionina, triptofano e tirosina. Os resíduos de triptofano, tirosina e fenilamina, sendo aminoácidos aromáticos, são os responsáveis pela fluorescência das proteínas na região do ultravioleta. Em geral, no caso onde há maior fotooxidação de aminoácidos aromáticos, a proteína mostra uma diminuição da sua intensidade de fluorescência (STRAIGHT; SPIKES, 1985).

Neste trabalho a oxidação da BSA fotoinduzida pelos compostos, foi utilizada para analisar a efetividade fotodinâmica dos complexos $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$. A eficácia da degradação da BSA por fotossensibilização é ilustrado na Figura 44 obtido pela diminuição da emissão de fluorescência em 350 nm da BSA em função do tempo de irradiação, que corresponde a cinética de segunda ordem.

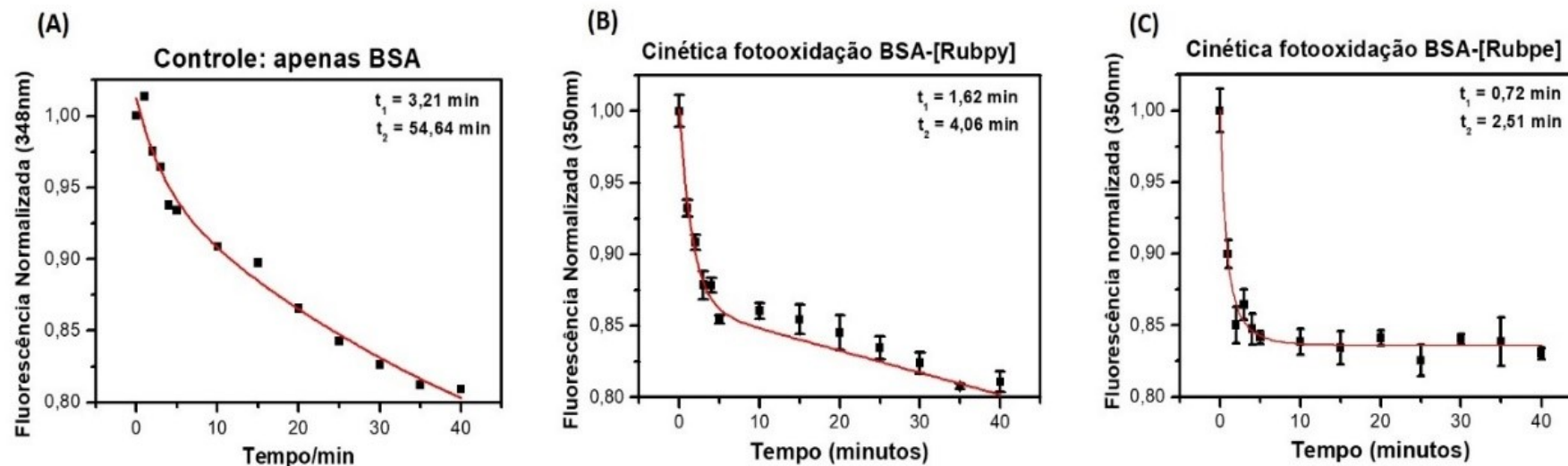
Figura 44 - Espectro de supressão de fluorescência nos espectros de emissão da BSA ($\lambda_{exc} = 280$ nm) devido ao efeito fotodinâmico. Solução de BSA ($3,0\mu\text{mol L}^{-1}$), preparada em tampão Tris (pH = 7,4), irradiada com luz branca ($\lambda = 470\text{nm}$, $I = 100$ mW/cm², $t = 40\text{min}$, $d = 20$ cm) em presença de (A) BSA; (B) Rubpy e (C) Rubpe com concentração ($1,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). (D, E e F) Espectro de absorção da BSA e dos complexos [Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e [Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆). Temperatura 18°C.



Fonte: autora.

Foram observadas uma diminuição da intensidade de emissão de fluorescência em função do tempo de irradiação com $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ (Figura 44). Na ausência de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$, também foi observado que um decaimento da intensidade de emissão de fluorescência, porém em menor velocidade. Na Figura 45 estão apresentados os decaimentos da intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação.

Figura 45 - Cinética de decaimento da intensidade máxima de fluorescência BSA (350nm) em função do tempo de irradiação em presença de (A) 15 μ M Rubpy e (B) 15 μ M Rubpe em tampão Tris 10mM (pH=7,4).



Fonte: autora.

Analisando-se a Figura 45, pode-se observar que houve redução na intensidade de fluorescência da proteína BSA com o tempo de irradiação na presença e ausência dos complexos de Ru. Note que em todos os casos (apenas proteína e proteína + composto) foram observados tempo de decaimento t_1 e t_2 (Tabela 11).

Tabela 11 - Tempo de decaimento t_1 e t_2 (em minutos) calculados a partir do ajuste exponencial de 2ª ordem pelo Origin.

Amostra	t_1 (minutos)	t_2 (minutos)
Apenas BSA (3 μ M) + Luz (100 mW/cm ²)	3,21 $\pm$ 3,7	54,64 $\pm$ 120
BSA (3 μ M) + Rubpy (15 μ M) + Luz (100 mW/cm ²)	1,62 $\pm$ 0,4	4,06 $\pm$ 1,6
BSA (3 μ M) + Rubpe (15 μ M) + Luz (100 mW/cm ²)	0,72 $\pm$ 0,8	2,51 $\pm$ 4,2

Fonte: autora.

Os valores de t_1 foram muito próximos (entre 1 e 3 minutos) para as amostras contendo complexo e a amostra sem complexo. Isso sugere que t_1 pode representar uma diminuição da intensidade de fluorescência BSA inicial relacionado à oxidação não-fotoinduzida, provocada pelo próprio ambiente oxidante da atmosfera ambiente. Os valores de t_2 para oxidação de BSA fotoinduzida na presença de compostos foi em torno de 2 - 4 minutos, enquanto t_2 para oxidação de BSA na ausência de complexo foi de ~ 55 minutos. Isso indica que a oxidação fotoinduzida por complexos (Rubpy e Rubpe) acelera cerca de 10x a degradação de resíduos de triptofano e tirosina da cadeia polimérica da BSA. Não houve diferença significativa na velocidade de decaimento da fluorescência da BSA quando compara-se o efeito fotodinâmico dos complexos [Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e [Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆).

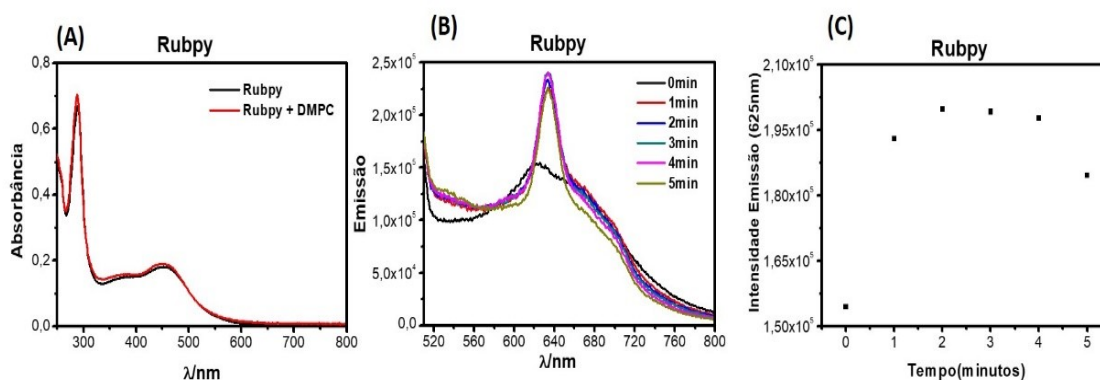
4.7. Estudo da interação do [Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) e [Ru(dmbpy)₂Cl(bpe)](PF₆) com lipossomos (DMPC)

Compreender os mecanismos a nível molecular pelos quais fármacos interagem com a bicamada lipídica é de importância crítica no campo farmacológico (BARREIRO; FRAGA, 2015). As interações composto-membrana são inevitáveis, uma vez que a maioria das moléculas precisa atravessar ou ligar-se a membranas lipídicas para exercer sua atividade terapêutica (ANDRADE et al., 2021). Neste trabalho, avaliamos a interação

de complexos de Ru com a bicamada lipídica utilizando lipossomos como sistema-modelo.

Sendo assim, estudou-se a interação do $\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em concentração $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em água, com diferentes concentrações de DMPC. Inicialmente, avaliou-se o tempo de interação entre os compostos e lipossomos (DMPC) por 8 minutos para verificar o tempo necessário para que o espectro de emissão permaneça praticamente constante (Figura 46).

Figura 46 - (A) Espectro de emissão do complexo $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ contendo $25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ DMPC, em função do tempo de interação FS-lipossomo. (B) Intensidade de emissão em 625 nm do complexo de Ru em lipossomo *versus* tempo de interação em minutos. $\lambda_{\text{exc}} = 425 \text{ nm}$, fendas 5/15nm, temperatura 25°C .

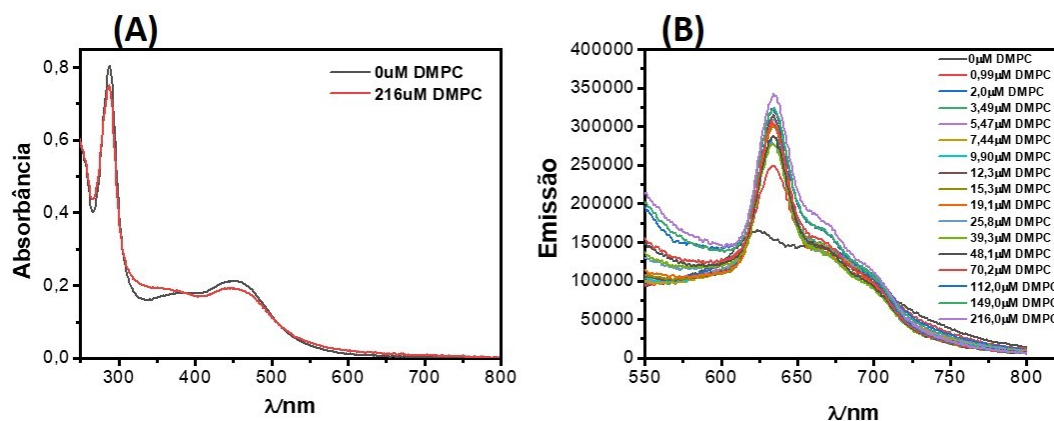


Fonte: autora.

A Figura 46A mostra que não houve alteração do perfil espectral de absorbância. Enquanto na Figura 46B observa-se um aumento na intensidade de emissão de 0 para 1 minuto, que permanece constante a partir de 1 minuto, indicando que 2 a 3 minutos de incubação do composto em lipossomo é suficiente para avaliar interação composto-lipossomo. Portanto, após cada adição de alíquota de lipossomos na amostra, foi estabelecido um tempo de 3 minutos de incubação da amostra sob atmosfera inerte (Argônio).

Nos resultados de espectroscopia de absorção e emissão do Rubpy observa-se que com o aumento da concentração de DMPC não houve uma diminuição significativa da intensidade de absorção (Figura 47). Por outro lado, observou-se o aumento na intensidade de emissão do composto à medida que foi adicionando alíquotas de DMPC (Figura 47).

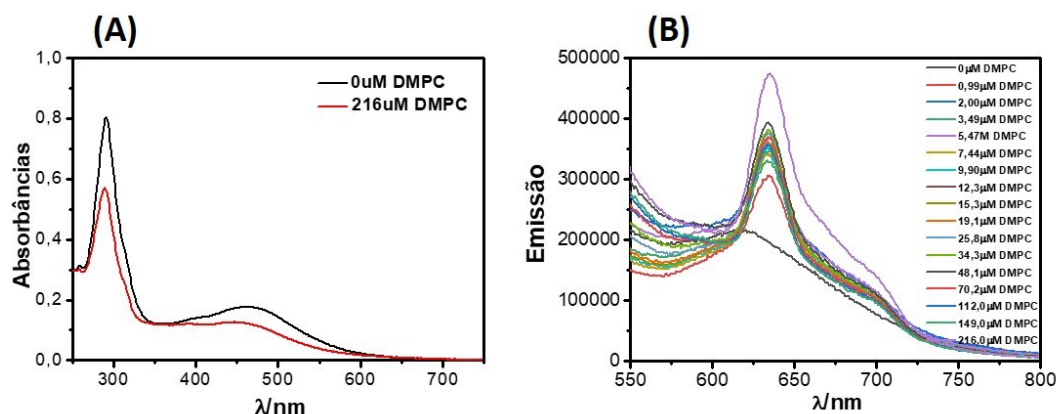
Figura 47 - (A) Espectros de absorção de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ em água antes (linha preta) e depois da adição de $2,16 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ - DMPC (linha vermelha). (B) Espectro de emissão do $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ em água. ($\lambda_{\text{exc}} = 425 \text{ nm}$, fendas 5/15nm em diferentes concentrações de DMPC, à temperatura 25°C).



Fonte: autora.

Nos resultados de espectroscopia de absorção e emissão (Figura 48) do Rubpe observa-se que com o aumento da concentração de DMPC leva a uma diminuição da intensidade de absorção Rubpe (Figura 48A), sugerindo que Rubpe pode estar degradando sob irradiação do comprimento de onda de excitação. No espectro de emissão (Figura 48B) podemos observar que houve o aumento da intensidade de emissão.

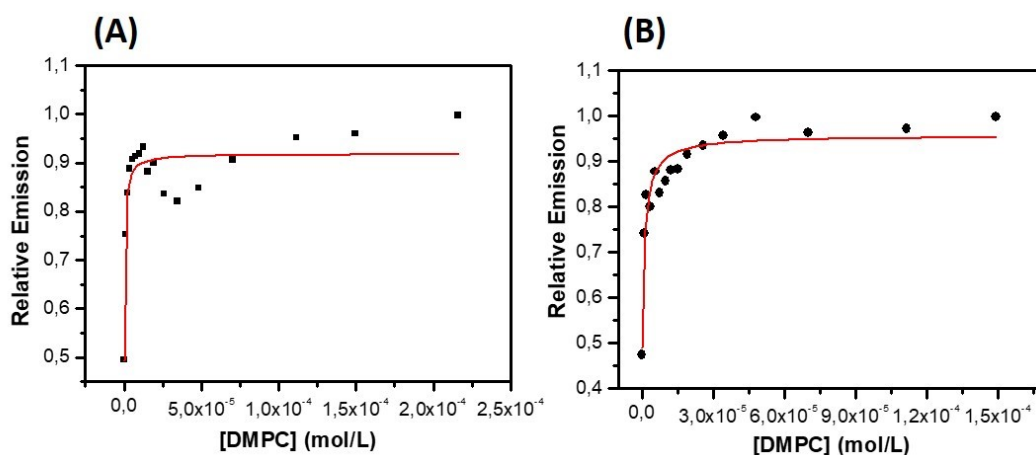
Figura 48 - (A) Espectro de absorção do $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em água antes (linha preta) e depois da adição de $2,16 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DMPC (linha vermelha). (B) Espectro de emissão do $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em água ($\lambda_{\text{exc}} = 425 \text{ nm}$, fendas 5/15nm) em diferentes concentrações de DMPC, à temperatura 25°C .



Fonte: autora.

Para melhor visualização das alterações nas intensidades de emissão causados pelo aumento da concentração de DMPC, construiu-se um gráfico da emissão relativa no $\lambda_{\text{máximo}}$ (630nm Rupby e 635nm para Rubpe) em função da concentração de DMPC (Figura 49). Nota-se que a partir de dada concentração do lipossoma a intensidade de emissão tende a aumentar mais lentamente até permanecer quase constante para ambos os compostos (Rubpy e Rubpe). Os pontos experimentais obtidos foram ajustados por um modelo teórico (equação 4, em Materiais e Métodos) para se obter os valores de constante de ligação (K_b), apresentados na Tabela 2.

Figura 49 - Emissão normalizada em função da concentração de DMPC para (A) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e (B) $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$. As linhas completas estão relacionadas com ajustes do modelo teórico usando a Equação 4.



Fonte: autora.

Tabela 12 - Valores da constante de ligação (K_b) calculadas pela equação 4 para os complexos de Rutênio em lipossomos de DMPC.

Complexo	K_b (10^6 L mol^{-1}) $\pm$ SE
$[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$	$1,99 \pm 0,91$
$[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$	$0,82 \pm 0,23$

Fonte: autora.

Na Tabela 12, tem-se que o valor de K_b para Rubpy ($\approx 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) é duas vezes maior que para Rubpe ($\approx 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Porém, vale ressaltar que os valores de erro padrão (SE, do inglês *Standard Error*) dos ajustes do modelo teórico para obtenção dos valores

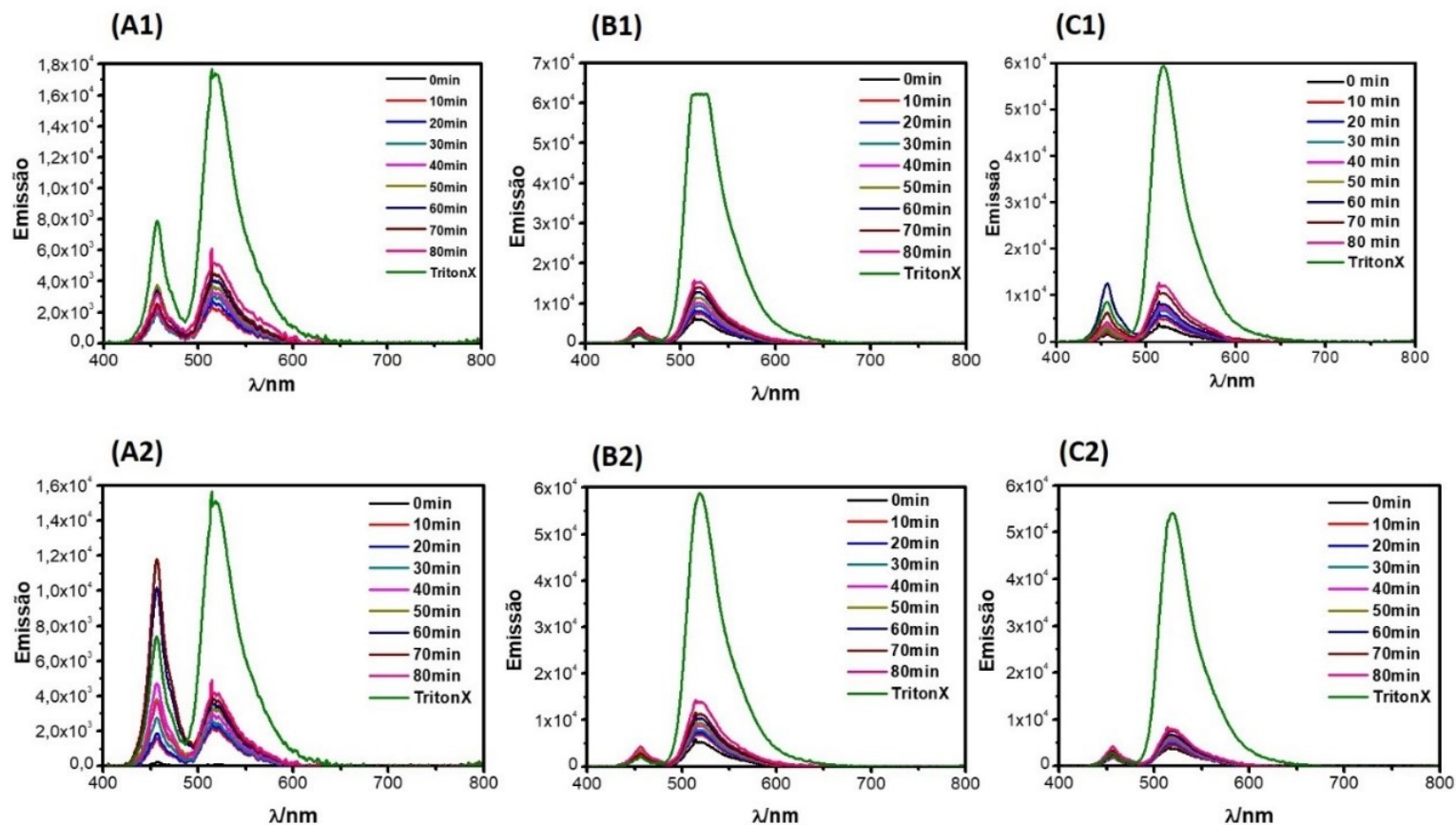
de K_b mostram que essa diferença entre os valores de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ não é significativa estatisticamente (Tabela 12). Portanto, um aumento da cadeia orgânica do grupo etileno ($-\text{CH}=\text{CH}-$) no ligante Rubpe não afeta a interação do complexo Ru com a bicamada lipídica quando comparado com Rubpy.

Os valores de K_b estimam a força das interações intermoleculares (atração eletrostática e efeito hidrofóbico) do processo de ligação composto-lipossomo. Ambos complexos de Ru estudados ($[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$) apresentam valor elevado de constante de ligação ($K_b > 10^5$), indicando forte interação dos FSs com a bicamada lipídica (NETO et al., 2020). Vale salientar que a temperatura de transição de fase do DMPC é de $24,1^\circ\text{C}$ (LEWIS; ZHANG; MCELHANEY, 2005), o que significa que na temperatura 25°C a bicamada lipídica encontra-se parcialmente na fase fluida e parcialmente na fase gel. Ou seja, houve uma forte ligação FS-lipossomo mesmo não estando 100% em fase fluida.

4.8. Oxidação dos lipossomos (Lecitina de Soja) fotoinduzida pelos complexos de Ru

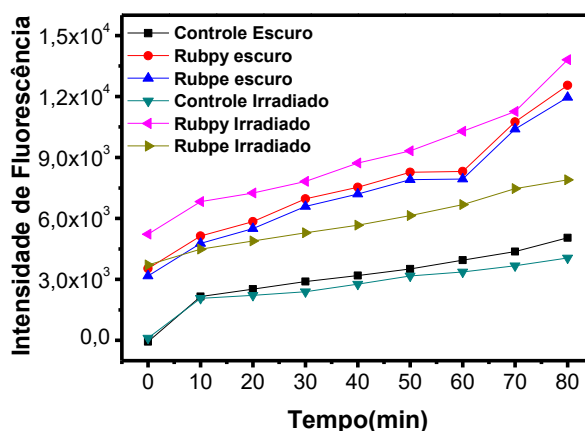
A atividade do $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ foi avaliada também em vesículas fosfolipídicas de lecitina de soja. Para isto, foram realizadas medidas de extravasamento de conteúdo aquoso de LUV's fosfolipídicas contendo o marcador químico carboxifluoresceína (CF), monitoradas pelo aumento da fluorescência decorrente da ruptura das membranas fosfolipídicas dos lipossomos (CABRERA et al., 2008; LOPES et al., 2015). Neste estudo a taxa de vazamento de CF das vesículas foi calculada pelo aumento da emissão de fluorescência em função do tempo, cujos resultados estão demonstrados na Figura 50 para vesículas de lecitina de soja.

Figura 50 - Espectro de emissão de fluorescência da CF em função do tempo, complexos de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ encapsulados no lipossomo.



Legenda: (A1) controle escuro, (B1) Rubpy escuro, (C1) Rubpe escuro. (B1) controle irradiado, (B2) Rubpy irradiado, (C2) Rubpe irradiado.
Fonte: autora.

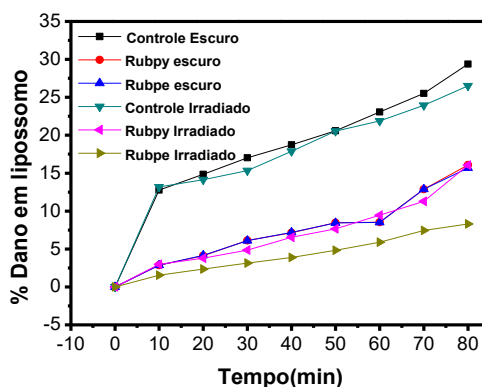
Figura 51 - Curva da cinética da liberação de CF em LUV's de lecitina de soja com adição dos complexos de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ encapsulados no lipossomo.



Fonte: autora.

Nas Figuras 50 e 51 é possível verificar a emissão de fluorescência da CF pelo tempo de irradiação. Esperávamos que a emissão da CF aumentasse com o tempo, demonstrando uma permeabilização da membrana quando irradiado, isso não foi observado no experimento. Pode-se observar que a liberação de CF induzida foi maior no controle escuro que no irradiado, outro ponto relevante que o tratamento irradiado com Rubpe ocorreu a diminuição na intensidade de fluorescência, enquanto os tratamentos não irradiados houve aumento na intensidade. A partir desses resultados, foi construído gráfico da porcentagem de liberação de CF (calculado pela equação 5, descrito no item 3.4) em função do tempo em vesículas de lecitina de soja, apresentados na Figura 52.

Figura 52 - Porcentagem de liberação de CF em função do tempo em LUV's de lecitina de soja no escuro e irradiada e com fotossensibilizadores encapsulado.



Fonte: autora.

Na Figura 52 mostra as porcentagens de CF vazado em função do tempo chegou a cerca de 29% no controle escuro e 26% no controle irradiado. O Rubpy no escuro e irradiado ficou em torno de 16% e Rubpe no escuro chegou a 15% e no irradiado ficou com 8%, sendo verificado que os controle no escuro e irradiado, tiveram maior percentual de CF vazado que o próprio tratamento com os FS.

Era esperado que a fluorescência dos poços aumentasse ao longo do tempo com a irradiação, uma vez que os complexos danificariam a membrana, ou seja, permeabilizaria e permitiria o vazamento da carboxifluoresceína (CF) e ocorreria dano no lipossomo mais acentuado, não foi o que ocorreu no experimento.

Gomes (2021), em sua pesquisa fez várias tentativas de fazer o teste de carboxifluoresceína com complexos de rutênio em diferentes lipossomos e concentrações do complexo, nenhuma delas obteve uma qualidade de dados suficientes para quantificar o dano em membrana. O principal problema que ele encontrou é que a sonda e os fotossensibilizadores absorvem em regiões de comprimento de onda semelhantes, tornando difícil separar os efeitos que são devidos às oxidações fotossensibilizadas aos que acontecem devido a eventos fotoquímicos diretos da sonda (GOMES, 2021).

Outra explicação esplanada pelo autor, que é possível que o complexo de rutênio poderia absorver a luz emitida pela CF, assim, quanto maior a concentração do complexo de rutênio, menor a emissão de fluorescência pela CF. Uma outra explicação possível seria que o complexo de rutênio participasse da fotodegradação da CF, causando uma permeabilização da membrana, e a CF liberada seria apenas mais fotodegradada rapidamente, o que também poderia explicar os resultados aqui obtidos, lembrando que todos os casos poderia estar ocorrendo simultaneamente.

4.9. Incorporação dos complexos de Rutênio em células HeLa e MDA-MB-231

As características de absorção/incorporação celular de uma molécula são críticas para sua aplicação como agente terapêutico. Para apresentar citotoxicidade, é necessário que o composto transpasse a membrana celular que contém, principalmente, lipídios e proteínas de membrana para regular a entrada e saída de substâncias na célula (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014).

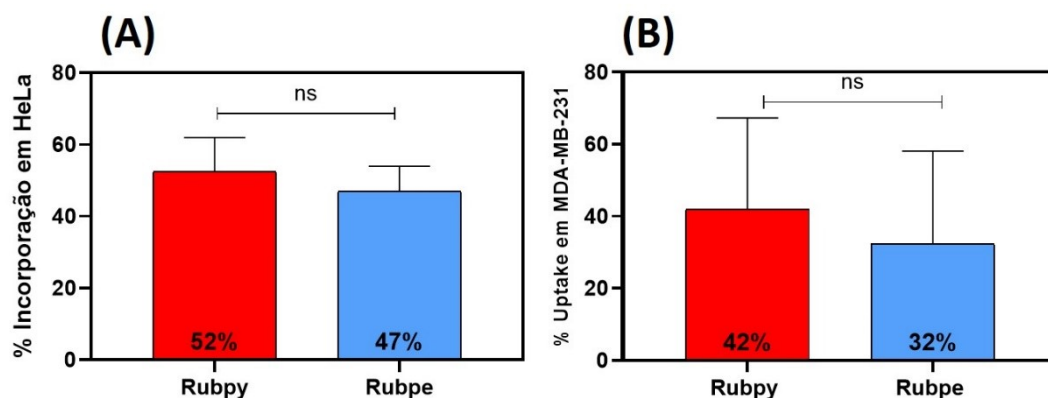
Este processo é extremamente fundamental para o modo seletivo e eficaz de tratamento. Estudos de absorção ou incorporação celular também são importantes para identificar fotossensibilizadores eficazes na TFD (MASCHERONI et al., 2019). Os

complexos de Ru podem entrar na célula através de vários mecanismos que incluem endocitose e transporte ativo (isto é, através de processo dependente de energia) ou difusão passiva e facilitada (isto é, através de processo independente de energia) (SUDHINDRA et al., 2020). Este mecanismo depende em geral de características como lipofilicidade/hidrofiliicidade, carga e tamanho das estruturas empregadas (ZHAO; HUANG; LI, 2011).

Citometria de fluxo, UV-Vis e espectroscopia de fluorescência são alguns métodos utilizados para determinar o acúmulo intracelular de compostos que possuem transição eletrônica detectável na região UV-Vis e/ou emissão de luz (DEDA et al., 2013; PUCKETT; BARTON, 2007; TSUBONE et al., 2017). A literatura referente aos complexos de rutênio tem mostrado que a incorporação celular é diretamente proporcional à hidrofobicidade e um aumento na incorporação celular aumenta a citotoxicidade (CHEN et al., 2016; MEHANNA et al., 2019; PICCOLO et al., 2019; TAN et al., 2010; ZHANG et al., 2019).

Todos os dois complexos tiveram sua porcentagem de incorporação celular determinados nas células HeLa e MDA-MB-231 por meio de medidas de absorção da área integrada com intervalo de 280 a 600nm. Na Figura 53 são apresentados os valores de % incorporação celular determinados com base na equação 6.

Figura 53 - % Incorporação celular dos complexos Ru ($6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) incubados por 24 horas em células (A) HeLa e (B) MDA-MB-231. As barras representam a média $\pm$ desvio médio de três experimentos independentes com 4 repetições em cada experimento (n = 12), *ns* indica que não há diferença estatística.

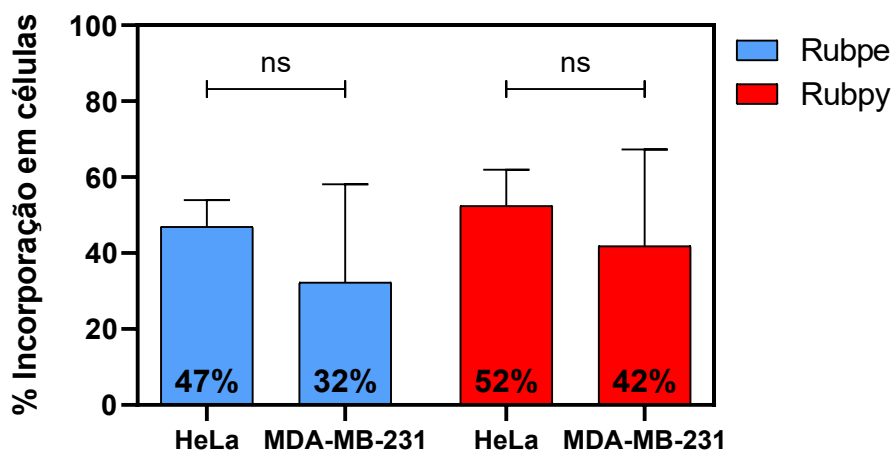


Fonte: autora.

Em HeLa, $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ incorpora em torno de 52% e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ cerca de 47% (Figura 53A). Já em MDA-MB-231, a taxa de

incorporação foi de 42% para $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e 32% para $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ (Figura 53B). Não houve diferença significativa na taxa incorporação entre o $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em nenhuma das linhagens tumorais testadas (Figura 53). Também não há diferença de incorporação celular do $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ entre as duas linhagens HeLa e MDA-MB-231 quando analisado para cada complexo, conforme Figura 54.

Figura 54 - % Incorporação celular dos complexos Ru (60 μM) incubados por 24 h com concentração de 60 μM em células HeLa e MDA-MB-231. As barras representam a média $\pm$ desvio médio de três experimentos independentes com 4 repetições em cada experimento ($n = 12$), *ns* indica que não há diferença estatística determinada pelo método de *Holm-Sidak*, $\alpha = 0,05$.



Fonte: autora.

Conclui-se que o pequeno aumento de 2 carbonos ($\text{CH} = \text{CH}$) na estrutura do ligante do Rubpe não proporcionou mudanças significativas nos percentuais de incorporação nas células tumorais HeLa e na MDA-MB-231 comparado com Rubpy.

4.10. Toxicidade de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em células tumorais

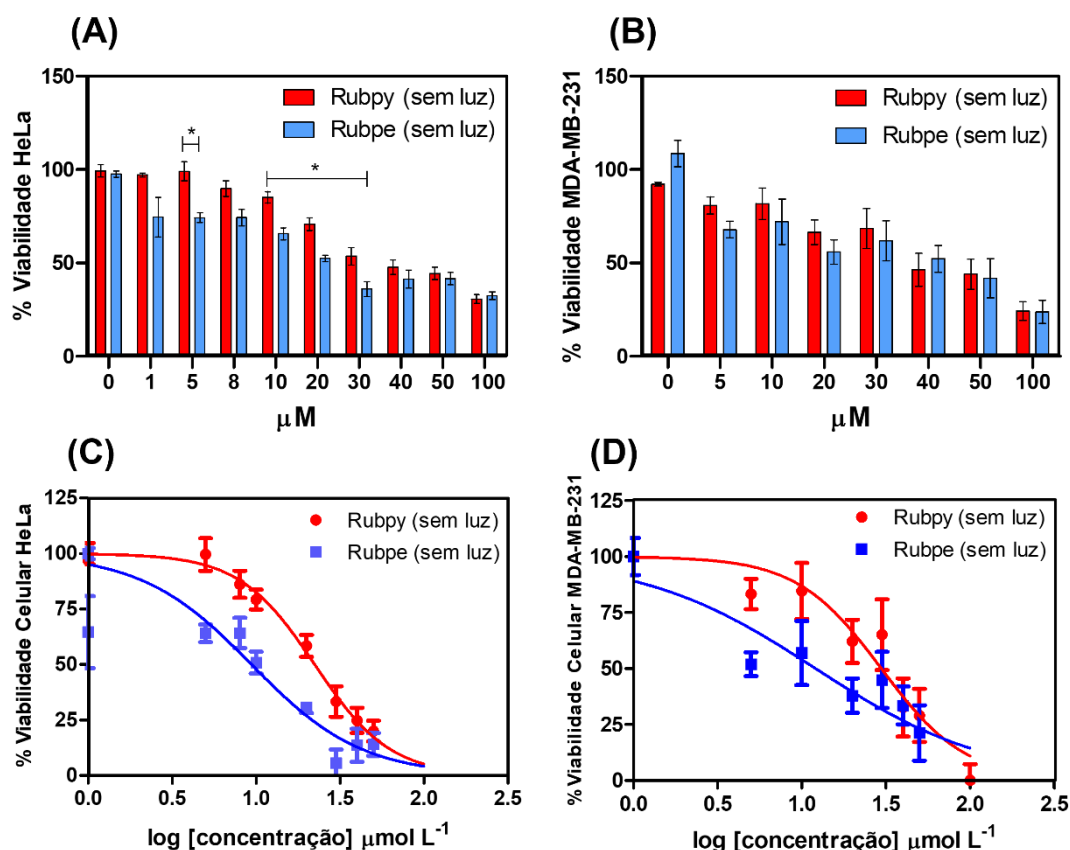
De modo a determinar a viabilidade celular, ou seja, a proliferação celular e a citotoxicidade dos materiais utilizados nos estudos *in vitro*, utilizou-se o ensaio de MTT. Este método quantifica o quanto de MTT presente no meio é reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADPH (atividade mitocondrial das células

viáveis) formando cristais de *formazan* de cor azul por quebra do anel de tetrazólio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. No passo final do teste as células são destruídas por ação do DMSO e os cristais de *formazan* são dissolvidos para que sua quantidade seja medida por espectrofotometria UV-Vis, sendo diretamente proporcional ao número de células viáveis (ALBERTS et al., 2017).

Deste modo, o ensaio MTT é um método colorimétrico que permite quantificar o número de células viáveis depois da exposição a um agente determinado e de maneira indireta a citotoxicidade do mesmo, a qual está dada pelo valor do IC_{50} , isto é, a concentração de composto que inibe o crescimento celular em 50% (densidade ótica após ensaio com MTT) de células tratadas em relação às células não tratadas (controles). Estes ensaios foram realizados nas linhagens HeLa (câncer do colo do útero) e MDA-MB-231 (câncer de mama).

Um dos princípios básicos para a aplicação de um complexo como FS para TFD é a sua baixa toxicidade no escuro. Portanto, a citotoxicidade do $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$ e $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$ foram avaliadas em células na ausência de luz, sendo uma de câncer de mama (MDA-MB-231) e a outra câncer colo do útero (HeLa), foram tratadas com diferentes concentrações dos complexos, incubadas por 24 horas e a análise foi realizada pelo método de MTT, e os resultados estão apresentados na Figura 55.

Figura 55 - (A e B) % Viabilidade celular em função da concentração (μM) de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ após 24 hs de incubação no escuro em (A) HeLa e (B) MDA-MB-231. (C e D) Viabilidade celular *versus* $\log[\text{concentração}]$ de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ para determinação do IC_{50} sem luz em (A) HeLa e (B) MDA-MB-231. As barras representam a média $\pm$ desvio médio de três experimentos independentes com 3 repetições em cada experimento ($n = 9$), *significância estatística determinada pelo método de *Holm-Sidak*, $\alpha = 0,05$ na mesma concentração.



Fonte: autora.

Os resultados preliminares para a linhagem de células HeLa mostraram que o complexo Rubpe apresentou maior citotoxicidade nas concentrações de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$; $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em relação ao Rubpy (Figura 55A). A partir de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ não há diferença significativa na citotoxicidade entre $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ para a linhagem HeLa (Figura 55A).

No caso da linhagem MDA-MB-231 (Figura 55B) não houve diferença significativa na atividade inibitória entre os dois complexos, não apresentando potencial citotóxico quando comparamos entre as mesmas concentrações.

Os valores de IC_{50} (mínima concentração de droga necessária para a inibição de 50 % do crescimento celular) foram determinados pelos gráficos de % viabilidade celular *versus* $\log[\text{concentração}]$ dos complexos para ambas as linhagens celulares HeLa e MDA-MB-231 (Figura 55C e Figura 55D, respectivamente), e estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores de IC_{50} (μM) no escuro dos complexos $\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ nas linhagens HeLa e MDA-MB-231.

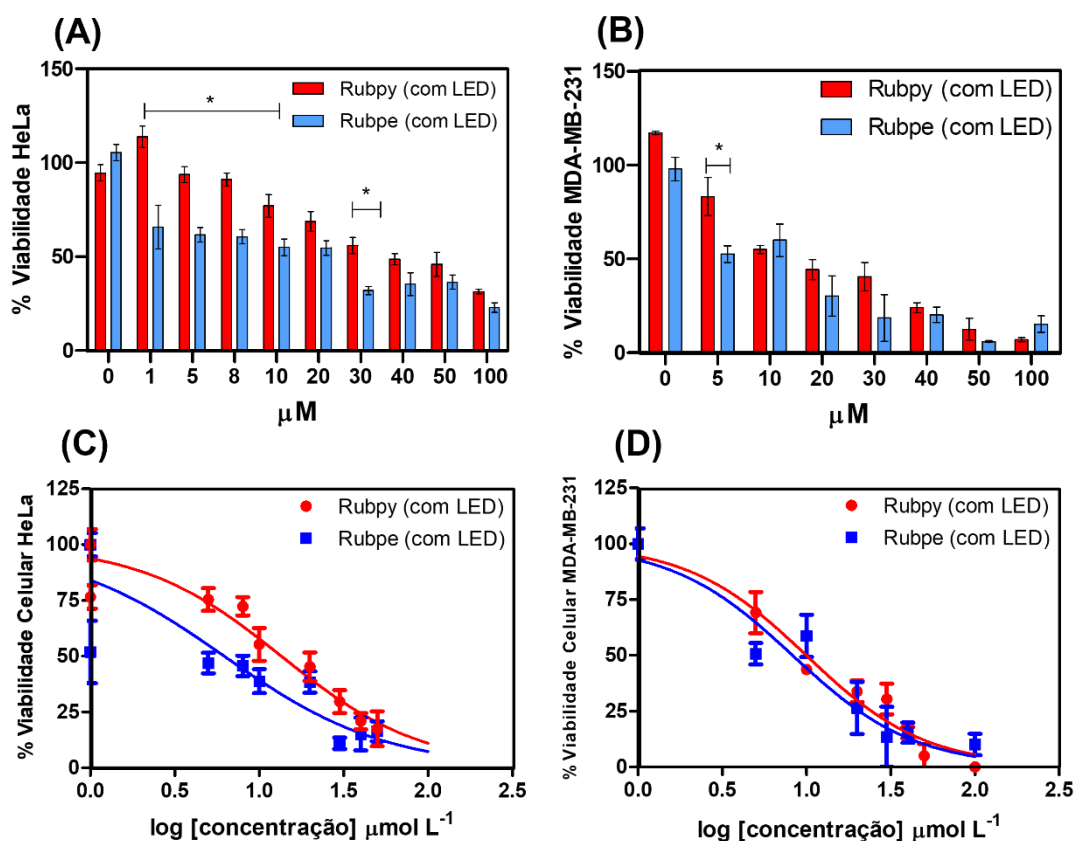
Composto	IC_{50} (μM) sem luz em HeLa	IC_{50} (μM) sem luz em MDA-MB-231
$[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$	$22,37 \pm 0,03$	$29,69 \pm 0,06$
$[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$	$9,41 \pm 0,04$	$12,08 \pm 0,10$

Fonte: autora.

Nota-se que $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ possui valor de IC_{50} aproximadamente 2,4 vezes menor que $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ para ambas as linhagens tumorais (Tabela 12), indicando que Rubpe é mais citotóxico que Rubpy. Os valores de IC_{50} foram muito próximos ao comparar as duas linhagens celulares, sendo IC_{50} entre 22 e 29 μM para $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e IC_{50} entre 9 e 12 μM para $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ (Tabela 12).

O experimento de viabilidade celular *via* MTT também foi realizado sob irradiação luminosa (LED Azul, $\lambda_{\text{máx}} = 460 \text{ nm}$, dose $\approx 3 \text{ J/cm}^2$) para avaliar o efeito fotodinâmico dos complexos em HeLa e MDA-MB-231 (Figura 56).

Figura 56 - (A e B) % Viabilidade celular em função da concentração (μM) de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ após 24 hs de incubação e irradiação com LED Azul ($\lambda_{\text{máx}} = 460 \text{ nm}$), dose $\approx 3 \text{ J/cm}^2$ em (A) HeLa e (B) MDA-MB-231. (C e D) Viabilidade celular *versus* $\log[\text{concentração}]$ de $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ para determinação do IC_{50} com luz em (A) HeLa e (B) MDA-MB-231. As barras representam a média $\pm$ desvio médio de três experimentos independentes com 3 repetições em cada experimento ($n=9$), *significância estatística determinada pelo método de *Holm-Sidak*, $\alpha=0,05$ na mesma concentração.



Fonte: autora.

Nota-se que na linhagem HeLa tivemos diferença com significância estatística entre o $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ nas concentrações de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 56A), sendo o Rubpe mais fototóxico que Rubpy. Já na linhagem da MDA-MB-231, a viabilidade celular diminui conforme aumenta a concentração dos complexos de rutênio sem diferença significativa entre os compostos, com exceção da concentração de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 56B).

Os valores de IC_{50} com luz também foram determinados por gráficos de viabilidade celular *versus* $\log[\text{concentração}]$ dos complexos para ambas as linhagens celulares HeLa

e MDA-MB-231 (Figura 56C e Figura 56D, respectivamente), e estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores de IC_{50} dos complexos $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$ e $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$ irradiados com LED Azul nas linhagens HeLa e MDA-MB-231.

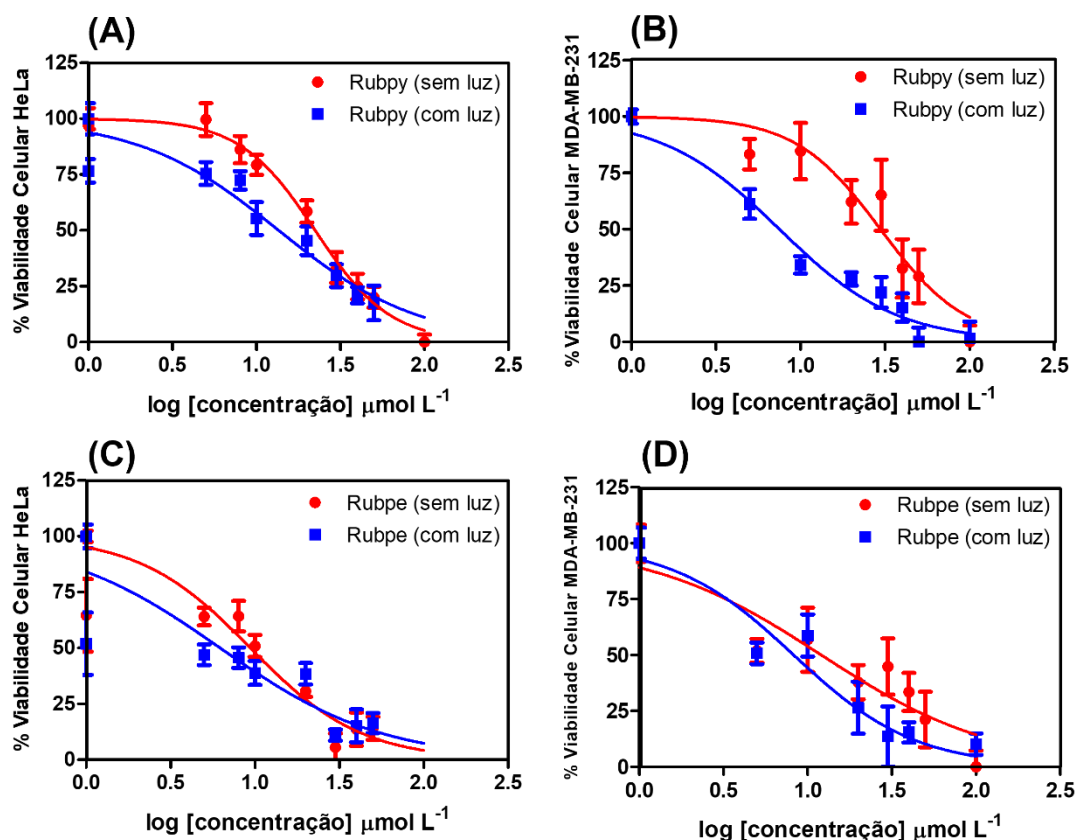
Composto	IC_{50} (μM) com luz em HeLa	IC_{50} (μM) com luz em MDA-MB-231
$[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$	$13,57 \pm 0,04$	$9,98 \pm 0,05$
$[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$	$6,23 \pm 0,06$	$8,28 \pm 0,08$

Fonte: autora.

Em HeLa, Rubpe apresenta maior fototoxicidade que Rubpy com IC_{50} aproximadamente 2,2 vezes menor (Tabela 14), após exposição ao LED Azul com dose $\approx 3 J/cm^2$. Já em MDA-MB-231, não observa-se diferença significativa nos valores de IC_{50} entre $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$ e $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$ (Tabela 14 e Figura 56D). Vale lembrar que esses valores de IC_{50} com luz não desconta os valores de IC_{50} sem luz, por isso é necessária uma análise da fotoatividade sem o efeito da citotoxicidade dos compostos.

Ao comparar as curvas de viabilidade celular sem luz e com luz (Figura 57), observa-se que $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpy)](PF_6)$ possui maior toxicidade com luz do que sem luz tanto em HeLa quanto em MDA-MB-231 (Figura 57A e Figura 57B). Por outro lado, $[Ru(dmbpy)_2Cl(bpe)](PF_6)$ não apresenta diferença na curva de viabilidade celular sem ou com luz (Figura 57C e Figura 57D), indicando que não é um composto fototóxico para células.

Figura 57 - (A e B) % Viabilidade celular versus log[concentração] do $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ após 24 hs de incubação e irradiação com LED Azul ($\lambda_{\text{máx}} = 460 \text{ nm}$), dose $\approx 3 \text{ J/cm}^2$ em (A) HeLa e (B) MDA-MB-231. (C e D) % Viabilidade celular versus log[concentração] do $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ após 24 hs de incubação e irradiação com LED Azul ($\lambda_{\text{máx}} = 460 \text{ nm}$), dose $\approx 3 \text{ J/cm}^2$ em (C) HeLa e (D) MDA-MB-231. As barras representam a média $\pm$ desvio médio de três experimentos independentes com 3 repetições em cada experimento ($n = 9$).



Fonte: autora.

Para quantificar a diferença entre essas duas curvas de viabilidade celular (sem luz e com luz) e determinar se os complexos Ru possuem ou não fotoatividade, utilizou-se o parâmetro “Fator de fotoinibição” (PIF, do inglês *Photoinhibition Factor*) (OECD, 2019; PETERS; HOLZHUTTER, 2002; SPIELMANN et al., 1998).

O fator de fotoinibição (PIF) foi calculado através da equação 12:

$$\text{PIF} = \frac{\text{IC}_{50} (\text{sem luz})}{\text{IC}_{50} (\text{com luz})} \quad (\text{Equação 12})$$

Os valores de PIF calculados, que prevê se o composto terá fototoxicidade *in vivo*, encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15 - Valores do fator de fotoinibição (PIF) para cada complexo (Rubpy e Rubpe) em ambas as linhagens celulares (HeLa e MDA-MB-231).

Composto	PIF em HeLa	PIF em MDA-MB-231
[Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpy)](PF ₆)	1,65	2,97
[Ru(dmbpy) ₂ Cl(bpe)](PF ₆)	1,51	1,46

Geralmente, quando $PIF < 2$ o composto não é fototóxico, para $2 < PIF < 5$ é provável fototóxico e $PIF > 5$ é fototóxico (KIM; PARK; LIM, 2015; OECD, 2019). Em HeLa, ambos os compostos apresentaram $PIF < 2$, por isso não apresentam fototoxicidade. Em MDA-MB-231, apenas [Ru(dmbpy)₂Cl(bpy)](PF₆) possui provável fototoxicidade (Tabela 15).

5. CONCLUSÃO

Os espectros eletrônicos dos complexos de Rutênio mostraram que em meio aquoso não ocorre troca de ligante para formação de aquocomplexo. Isso indica que Rubpy e Rubpe são estáveis em meio aquoso. O mesmo resultado foi obtido em solução de PBS, entretanto, em presença de moléculas com grupo amino, como Tris e aminoácidos do meio de cultura, ocorre a troca do ligante Cl⁻. Os complexos mostraram uma maior preferência por bases mais moles, como o -NH₂ encontrado no tampão tris, ou em moléculas no meio de cultura.

Os estudos de interação dos compostos com proteína (representada por BSA) em tampão Tris, inviabilizaram a determinação do mecanismo de supressão (estático ou dinâmico). Hipotetizou-se que isso poderia ser consequência do tempo de interação (24h) da BSA com os complexos, tempo suficiente para promover troca de ligante Cl⁻ por Tris, dificultando a análise dos dados. De fato, estudos de interação em diferentes condições de incubação (0h e 24h) mostraram que o tempo de interação altera significativamente os resultados obtidos. Por isso, optou-se por refazer os estudos de interação BSA-complexo em tampão PBS, cujos valores de K_b foram da ordem de 10^5 para ambos os compostos, indicando forte interação entre complexo e a proteína BSA. Não houve diferença significativa dos valores de K_b para Rubpy ($\approx 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) comparado com Rubpe ($\approx 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) em proteína (BSA). Isso sugere que a adição de um grupo etileno num dos ligantes

do Rubpe não é suficiente para aumentar a interação com proteína (representada por BSA).

Na avaliação da oxidação da BSA fotoinduzida pelos complexos de Ru, observou-se dois tempos de decaimento t_1 e t_2 na intensidade de fluorescência da proteína BSA com o tempo de irradiação na presença e ausência dos complexos de Ru. Os valores de t_1 foram muito próximos (entre 1 e 3 minutos) para as amostras contendo complexo e a amostra sem complexo, e por isso t_1 foi relacionado à oxidação não-fotoinduzida, provocada pelo próprio ambiente oxidante da atmosfera ambiente. Já os valores de t_2 , que representa a oxidação de BSA fotoinduzida, foi em torno de 2 - 4 minutos na presença de compostos, e ~ 55 minutos na ausência de complexo. Sugerindo que a oxidação fotoinduzida por complexos (Rubpy e Rubpe) acelera cerca de 10x a degradação de resíduos de triptofano e tirosina da cadeia polimérica da BSA.

Nos estudos de interação dos complexos com lipídeos (representados por lipossomos de DMPC), ambos complexos de Ru estudados ($[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$) apresentaram valor elevado de constante de ligação ($K_b > 10^5$), indicando forte interação desses compostos com a bicamada lipídica. Não houve diferença estatística dos valores de K_b para Rubpy ($\approx 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) comparado com Rubpe ($\approx 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) em lipossomos (DMPC). Isso sugere que a adição de um grupo etileno num dos ligantes do Rubpe não é suficiente para aumentar a interação com lipídeos (representada por lipossomos).

Os ensaios para avaliar a oxidação dos lipídeos fotoinduzida pelos complexos de Ru(II), utilizando carboxifluoresceína (CF) como sonda fluorescente, foram inconclusivos. Isso porque as amostras de lipossomos tratadas com complexos e luz apresentaram menor vazamento da CF do que as amostras controle (com e sem irradiação). Provavelmente, esse resultado teve interferência da sobreposição da região de absorção dos compostos com a região de emissão da sonda CF, criando o artefato de menor vazamento da CF do que as amostras controles e inviabilizando essa metodologia para análise da taxa de oxidação lipídica fotoinduzida pelos compostos.

Nos estudos de % incorporação dos compostos em HeLa e MDA-MB-231, a porcentagem de incorporação dos complexos foi de aproximadamente $\approx 50\%$ em HeLa e $\approx 37\%$ em MDA-MB-231, não havendo diferença significativa na taxa incorporação entre o $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ e $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ em nenhuma das linhagens tumorais testadas.

Em relação a toxicidade dos compostos em células tumorais, $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpe})](\text{PF}_6)$ possui valor de IC_{50} aproximadamente 2,4 vezes menor que $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ para ambas as linhagens tumorais (HeLa e MDA-MB-231), e portanto Rubpe é mais citotóxico que Rubpy. A fototoxicidade foi mensurada pelo fator de fotoinibição (PIF), mostrando que apenas $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}(\text{bpy})](\text{PF}_6)$ em MDA-MB-231 possui provável fototoxicidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANI, Bryan A.; PEÑA, Bruno; LEED, Nicholas A.; DE PAULA, Nataly A. B. G.; PAVANI, Christiane; BAPTISTA, Mauricio S.; DUNBAR, Kim R.; TURRO, Claudia. Marked Improvement in Photoinduced Cell Death by a New Tris-heteroleptic Complex with Dual Action: Singlet Oxygen Sensitization and Ligand Dissociation. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 136, n. 49, p. 17095–17101, 2014. DOI: 10.1021/ja508272h. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja508272h>.

ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; MORGAN, David; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WILSON, John; WALTER, Peter; HUNT, Tim. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ALESSIO, Enzo; MESSORI, Luigi. 5. THE DECEPTIVELY SIMILAR RUTHENIUM(III) DRUG CANDIDATES KP1019 AND NAMI-A HAVE DIFFERENT ACTIONS. WHAT DID WE LEARN IN THE PAST 30 YEARS? In: **Metallo-Drugs: Development and Action of Anticancer Agents**. [s.l.] : De Gruyter, 2018. p. 141–170. DOI: 10.1515/9783110470734-005. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/9783110470734-005/html>.

ALVES, Nathan J.; CUSICK, William; STEFANICK, Jared F.; ASHLEY, Jonathan D.; HANDLOGTEN, Michael W.; BILGICER, Basar. Functionalized liposome purification via Liposome Extruder Purification (LEP). **Analyst**, [S. l.], v. 138, n. 17, p. 4746–4751, 2013. DOI: 10.1039/c3an00680h.

ANDRADE, Stéphanie; RAMALHO, Maria J.; LOUREIRO, Joana A.; PEREIRA, Maria Carmo. Liposomes as biomembrane models: Biophysical techniques for drug-membrane interaction studies. **Journal of Molecular Liquids**, [S. l.], v. 334, 2021. DOI: 10.1016/j.molliq.2021.116141.

ANISH BABU, Athanas; KARTHICK, Kamaraj; SUBRAMANIAN, Ramasamy; SWARNALATHA, Kalaiyar. Exploring the structural interaction of BSA with amine functionalized ruthenium(II) metal complex. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [S. l.], v. 38, n. 13, p. 4032–4039, 2020. DOI: 10.1080/07391102.2019.1683071.

BACELLAR, Isabel O. L.; PAVANI, Christiane; SALES, Elisa M.; ITRI, Rosangela; WAINWRIGHT, Mark; BAPTISTA, Mauricio S. Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, [S. l.], v. 90, n.

4, p.801–813, 2014. DOI: 10.1111/php.12264.

BALL, Denise J.; WOOD, Simon R.; VERONON, David I.; GRIFFITHD, John; DUBBELMAN, Tom M. A. R.; BROWN, Stanley B. The characterisation of three substituted zinc phthalocyanines of differing charge for use in photodynamic therapy. A comparative study of their aggregation and photosensitising ability in relation to mTHPC and polyhaematoporphyrin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 45, p. 28–35, 1998. DOI: 10.1016/S1011-1344(98)00156-0 Abstract.

BALLESTER, Francisco J.; ORTEGA, Enrique; BAUTISTA, Delia; SANTANA, M. Dolores; RUIZ, José. Ru(II) photosensitizers competent for hypoxic cancers via green light activation. **Chemical Communications**, [S. l.], v. 56, n. 71, p. 10301–10304, 2020. DOI: 10.1039/d0cc02417a.

BALZANI, Vincenzo; CERONI, Paola; JURIS, Alberto; VENTURI, Margherita; CAMPAGNA, Sebastiano; PUNTORIERO, Fausto; SERRONI, Scolastica. Dendrimers based on photoactive metal complexes. Recent advances. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], p. 545–572, 2001. DOI: 10.1016/S0010-8545(01)00351-4. Disponível em: www.elsevier.com/locate/ccr.

BALZANI, Vincenzo; JURIS, Alberto. Photochemistry and photophysics of Ru(II) polypyridine complexes in the Bologna group. From early studies to recent developments. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], v. 211, p. 97–115, 2001. DOI: doi.org/10.1016/S0010-8545(00)00274-5. Disponível em: www.elsevier.com/locate/ccr.

BAPTISTA, Maurício S. et al. **Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways**. **Photochemistry and Photobiology** Blackwell Publishing Inc., , 2017. DOI: 10.1111/php.12716.

BAPTISTA, Maurício S.; CADET, Jean; GREER, Alexander; THOMAS, Andrés H. **Photosensitization Reactions of Biomolecules: Definition, Targets and Mechanisms**. **Photochemistry and Photobiology** John Wiley and Sons Inc, , 2021. DOI: 10.1111/php.13470.

BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. *In*: [s.l: s.n.]. p. 5–608.

BASKARAN, Rengarajan; LEE, Junghan; YANG, Su Geun. **Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications**. **Biomaterials Research** BioMed Central Ltd, , 2018. DOI: 10.1186/s40824-018-0140-z.

BEIRITH, Alessandra; CRECZYNSKI-PASA, Tania B.; BONETTI, Vilson R.; KONZEN, Marlon; SEIFRIZ, Ilana; PAULA, Marcos S.; FRANCO, Cesar V.; CALIXTO, Joao B. Antinociceptive properties and nitric oxide synthase inhibitory action of new ruthenium complexes. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 369, p. 289–297, 1999.

BELATIK, Ahmed; HOTCHANDANI, Surat; CARPENTIER, Robert; TAJMIR-RIAH, Heidar Ali. Locating the binding sites of pb(II) ion with human and bovine serum

albumins. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 5, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0036723.

BETTELHEIM, F. A. ...; BROUWEN, W. H. ...; CAMPBELL, M. K. ...; ARREL, S. O. **Introdução a Bioquímica**. [s.l.] : Cengage Learning, 2012.

CABRERA, Marcia Perez dos Santos; ARCISIO-MIRANDA, Manoel; COSTA, Sabrina Thais Broggio; KONNO, Katsuhiko; RUGGIERO, José Roberto; PROCOPIO, Joaquim; NETO, João Ruggiero. Study of the mechanism of action of anoplin, a helical antimicrobial decapeptide with ion channel-like activity, and the role of the amidated C-terminus. **Journal of Peptide Science**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 661–669, 2008. DOI: 10.1002/psc.960.

CARNIZELLO, Andréa P.; BARBOSA, Marília I. F.; MARTINS, Monize; FERREIRA, Natália H.; OLIVEIRA, Pollyanna F.; MAGALHÃES, Geórgia M.; BATISTA, Alzir A.; TAVARES, Denise C. In vitro and in vivo antitumor activity of a novel carbonyl ruthenium compound, the $\text{ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF}_6$ [dppb = 1,4-bis(diphenylphosphine)butane and bipy = 2,2'-bipyridine]. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 164, p. 42–48, 2016. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2016.08.010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013416302343>.

CAVALCANTE, Renato. **Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica**. 2007. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

CHAUDHURI, Arunima; HALDAR, Sourav; CHATTOPADHYAY, Amitabha. Structural transition in micelles: Novel insight into microenvironmental changes in polarity and dynamics. **Chemistry and Physics of Lipids**, [S. l.], v. 165, n. 4, p. 497–504, 2012. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2011.09.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.09.007>.

CHEN, Lan-mei et al. The studies on the cytotoxicity in vitro, cellular uptake, cell cycle arrest and apoptosis-inducing properties of ruthenium methylimidazole complex $[\text{Ru}(\text{MeIm})_4(\text{p-cpip})]^{2+}$. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 156, p. 64–74, 2016. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2015.12.016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013415301483>.

CHEN, Quanchi et al. TLD1433 Photosensitizer Inhibits Conjunctival Melanoma Cells in Zebrafish Ectopic and Orthotopic Tumour Models. **Cancers**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 587, 2020. DOI: 10.3390/cancers12030587. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/3/587>.

DA SILVA, André R.; PELEGRINO, Alessandra C.; TEDESCO, Antonio C.; JORGE, Renato A. Photodynamic activity of chloro(5,10,15,20-tetraphenylporphyrinato) indium(III). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 491–501, 2008. DOI: 10.1590/s0103-50532008000300017.

DA SILVEIRA SANTOS, Fabiano; DA SILVEIRA, Carolina H.; SOUZA NUNES, Fábio; FERREIRA, Daniele C.; VICTÓRIA, Henrique F. V.; KRAMBROCK, Klaus; CHAVES, Otávio A.; RODEMBUSCH, Fabiano S.; IGLESIAS, Bernardo A. Photophysical, photodynamical, redox properties and BSA interactions of novel isomeric

tetracationic peripheral palladium(ii)-bipyridyl porphyrins. **Dalton Transactions**, [S. l.], v. 49, n. 45, p. 16278–16295, 2020. DOI: 10.1039/d0dt01063d.

DAMRAUER, Niels H.; CERULLO, Giulio; YEH, Alvin; BOUSSIE, Thomas R.; SHANK, Charles V; MCCUSKER, James K. Femtosecond Dynamics of Excited-State Evolution in [Ru(bpy)₃]²⁺. **Science**, [S. l.], v. 81, p. 54–57, 1997. DOI: 10.1126/science.275.5296.54.

DEDA, Daiana K.; PAVANI, Christiane; CARITÁ, Eduardo; BAPTISTA, Maurício S.; TOMA, Henrique E.; ARAKI, Koiti. Control of Cytolocalization and Mechanism of Cell Death by Encapsulation of a Photosensitizer. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. 1307–1317, 2013. DOI: 10.1166/jbn.2013.1614.

DEROSA, Maria C.; CRUTCHLEY, Robert J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], p. 351–371, 2002. DOI: 10.1016/S0010-8545(02)00034-6. Disponível em: www.elsevier.com/locate/ccr.

DOUGHERTY, Thomas J.; GOMER, Charles J.; HENDERSON, Barbara W.; JORI, Giulio; KESSEL, David; KORBELIK, Mladen; MOAN, Johan; PENG, Qian. Photodynamic Therapy. **NCI: Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998. DOI: doi.org/10.1093/jnci/90.12.889. Disponível em: <http://jnci.oxfordjournals.org/>.

EFTINK, Maurice R. Fluorescence Quenching Reactions. In: **Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy**. New York. p. 1–41. DOI: 10.1007/978-1-4757-9513-4_1.

ENGELMANN, Fabio M.; MAYER, Ildemar; GABRIELLI, Dino S.; TOMA, Henrique E.; KOWALTOWSKI, Alicia J.; ARAKI, Koiti; BAPTISTA, Mauricio S. Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 175–185, 2007. DOI: 10.1007/s10863-007-9075-0.

FOOTE, Christopher S. Mechanisms of Photosensitized Oxidation: There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. **Science**, [S. l.], v. 162, n. 3857, p. 963–970, 1968. a. DOI: DOI: 10.1126/science.162.3857.963.

FOOTE, Christopher S. Photosensitized Oxygenations and the Role of Singlet Oxygen'. **Accounts of Chemical Research**, [S. l.], v. 1, p. 104–110, 1968. b. DOI: 10.1021/ar50004a002.

GAVA, B.; ZORZET, S.; SPESSOTTO, P.; COCCHIETTO, M.; SAVA, G. Inhibition of B16 melanoma metastases with the ruthenium complex imidazolium trans-imidazoledimethylsulfoxide-tetrachlororuthenate and down-regulation of tumor cell invasion. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [S. l.], v. 317, n. 1, p. 284–291, 2006. DOI: 10.1124/jpet.105.095141. Disponível em: <http://jpet.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/jpet.105.095141>.

GOLFETO, Camilla C.; POELHSITZ, Gustavo Von; SELISTRE-DE-ARAÚJO, Heloísa

S.; ARAUJO, Márcio P. De; ELLENA, Javier; CASTELLANO, Eduardo E.; LOPES, Luiz G. L.; MOREIRA, Icaro S.; BATISTA, Alzir A. Synthesis, characterization and cytotoxic activities of the $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(\text{L})]\text{PF}_6$ complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 104, n. 5, p. 489–495, 2010. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2009.12.015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013409003201>.

GOMES, Raphael de Ávila Narciso. **Fotossensibilização em modelos de membrana e células neuronais**. 2021. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

HAMBLIN, Michael R. **Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past is Prologue. Photochemistry and Photobiology** Blackwell Publishing Inc., , 2020. DOI: 10.1111/php.13190.

HARTINGER, Christian G.; ZORBAS-SEIFRIED, Stefanie; JAKUPEC, Michael A.; KYNAST, Bernd; ZORBAS, Haralabos; KEPPLER, Bernhard K. From bench to bedside – preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 100, n. 5–6, p. 891–904, 2006. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2006.02.013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013406000754>.

HEINEMANN, Franz; KARGES, Johannes; GASSER, Gilles. Critical Overview of the Use of Ru(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers in One-Photon and Two-Photon Photodynamic Therapy. **Accounts of Chemical Research**, [S. l.], v. 50, n. 11, p. 2727–2736, 2017. DOI: 10.1021/acs.accounts.7b00180.

HEINRICH, Tassiele A.; VON POELHSITZ, Gustavo; REIS, Rosana I.; CASTELLANO, Eduardo E.; NEVES, Ademir; LANZNASTER, Maurício; MACHADO, Sérgio P.; BATISTA, Alzir A.; COSTA-NETO, Claudio M. A new nitrosyl ruthenium complex: Synthesis, chemical characterization, in vitro and in vivo antitumor activities and probable mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. 3616–3622, 2011. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.04.064.

HENDERSON, Barbara W.; DOUGHERTY, Thomas J. **How does photodynamic therapy work? Photochemistry and Photobiology**, 1992. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x.

HU, Yan Jun; LIU, Yi; SUN, Ting Quan; BAI, Ai Min; LÜ, Jian Quan; PI, Zhen Bang. Binding of anti-inflammatory drug cromolyn sodium to bovine serum albumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 39, n. 4–5, p. 280–285, 2006. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2006.04.004.

HU, Yanyan; XU, Suqin; ZHU, Xiashi; GONG, Aiqin. Study on the interaction between methyl violet and bovine serum albumin by spectral analyses. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S. l.], v. 74, n. 2, p. 526–531, 2009. DOI: 10.1016/j.saa.2009.06.054.

HUDEJ, Rosana et al. Modulation of Activity of Known Cytotoxic Ruthenium(III) Compound (KP418) with Hampered Transmembrane Transport in Electrochemotherapy

In Vitro and In Vivo. **The Journal of Membrane Biology**, [S. l.], v. 247, n. 12, p. 1239–1251, 2014. DOI: 10.1007/s00232-014-9696-2. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00232-014-9696-2>.

HUXHAM, Lynsey A.; CHEU, Elizabeth L. S.; PATRICK, Brian O.; JAMES, Brian R. The synthesis, structural characterization, and in vitro anti-cancer activity of chloro(p-cymene) complexes of ruthenium(II) containing a disulfoxide ligand. **Inorganica Chimica Acta**, [S. l.], v. 352, p. 238–246, 2003. DOI: 10.1016/S0020-1693(03)00155-5. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020169303001555>.

JAKUBIKOVA, Elena; CHEN, Weizhong; DATTELBAUM, Dana M.; REIN, Francisca N.; ROCHA, Reginaldo C.; MARTIN, Richard L.; BATISTA, Enriaue R. Electronic structure and spectroscopy of [Ru(tpy)₂]²⁺, [Ru(tpy)(bpy)(H₂O)]²⁺, and [Ru(tpy)(bpy)(Cl)]⁺. **Inorganic Chemistry**, [S. l.], v. 48, n. 22, p. 10720–10725, 2009. DOI: 10.1021/ic901477m.

KAMATCHI, Thangavel Sathiya; CHITRAPRIYA, Nataraj; JAMAL AHAMED, V. S.; MOON, Surk-Sik; FRONCZEK, Frank R.; NATARAJAN, Karuppannan. Ruthenium(II) complexes of 2,2'-bipyridine-5,5'-dicarboxylic acid: Synthesis, structure, DNA binding, cytotoxicity and antioxidant activity. **Inorganica Chimica Acta**, [S. l.], v. 404, p. 58–67, 2013. DOI: 10.1016/j.ica.2013.04.029. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020169313002193>.

KANDAGAL, P. B.; ASHOKA, S.; SEETHARAMAPPA, J.; SHAIKH, S. M. T.; JADEGOUD, Y.; IJARE, O. B. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 393–399, 2006. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.11.037.

KEPPLER, B. K.; RUPP, W. Antitumor activity of imidazolium-bisimidazole-tetrachlororuthenate (III). **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, [S. l.], v. 111, n. 2, p. 166–168, 1986. DOI: 10.1007/BF00400758. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF00400758>.

KESSEL, David; LUO, Yu; DENG, Yongqi; CHANG, C. K. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. In: PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY 1997, **Anais** [...]. : Blackwell Publishing Inc., 1997. p. 422–426. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1997.tb08581.x.

KIM, Kyuri; PARK, Hyeonji; LIM, Kyung Min. Phototoxicity: Its mechanism and animal alternative test methods. **Toxicological Research**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 97–104, 2015. DOI: 10.5487/TR.2015.31.2.097.

KIM, Michele M.; DARAFSHEH, Arash. **Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy**. **Photochemistry and Photobiology** Blackwell Publishing Inc., , 2020. DOI: 10.1111/php.13219.

KNOLL, Jessica D.; ALBANI, Bryan A.; TURRO, Claudia. New Ru(II) Complexes for Dual Photoreactivity: Ligand Exchange and 1O₂ Generation. **Accounts of Chemical Research**, [S. l.], v. 48, n. 8, p. 2280–2287, 2015. DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00227.

KUČERKA, Norbert; HEBERLE, Frederick A.; PAN, Jianjun; KATSARAS, John. Structural significance of lipid diversity as studied by small angle neutron and X-ray scattering. **Membranes**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 454–472, 2015. DOI: 10.3390/membranes5030454.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3^a ed. New York: Springer US, 2006. DOI: 10.1007/978-0-387-46312-4. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/bfm%3A978-0-387-46312-4%2F1.pdf>.

LAZNIEWSKA, Joanna; AGOSTINO, Mark; HICKEY, Shane M.; PARKINSON-LAWRENCE, Emma; STAGNI, Stefano; MASSI, Massimiliano; BROOKS, Douglas A.; PLUSH, Sally E. Spectroscopic and Molecular Docking Study of the Interaction between Neutral Re(I) Tetrazolate Complexes and Bovine Serum Albumin. **Chemistry - A European Journal**, [S. l.], v. 27, n. 44, p. 11406–11417, 2021. DOI: 10.1002/chem.202101307.

LEHNINGER, T. M.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre.

LEWIS, Ruthven N. A. H.; ZHANG, Yuan Peng; MCELHANEY, Ronald N. Calorimetric and spectroscopic studies of the phase behavior and organization of lipid bilayer model membranes composed of binary mixtures of dimyristoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylglycerol. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [S. l.], v. 1668, n. 2, p. 203–214, 2005. DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.12.007.

LINCOLN, Richard et al. Exploitation of long-lived 3IL excited states for metal-organic photodynamic therapy: Verification in a metastatic melanoma model. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 135, n. 45, p. 17161–17175, 2013. DOI: 10.1021/ja408426z.

LIU, Yao; HAMMITT, Richard; LUTTERMAN, Daniel A.; JOYCE, Lauren E.; THUMMEL, Randolph P.; TURRO, Claudia. Ru(II) complexes of new tridentate ligands: Unexpected high yield of sensitized ¹O₂. **Inorganic Chemistry**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 375–385, 2009. DOI: 10.1021/ic801636u.

LOPES, F. C.; DOBROVOLSKA, O.; REAL-GUERRA, R.; BROLL, V.; ZAMBELLI, B.; MUSIANI, F.; UVERSKY, V. .. N.; CARLINI, C. R.; CIURLI, S. Pliable natural biocide: Jaburetox is an intrinsically disordered insecticidal and fungicidal polypeptide derived from jack bean urease. **FEBS Journal**, [S. l.], v. 282, n. 6, p. 1043–1064, 2015. DOI: 10.1111/febs.13201.

MACDONALD, Bruce C.; LVIN, Sergey J.; PATTERSON, Howard. **Correction of fluorescence inner filter effects and the partitioning of pyrene to dissolved organic carbon**. *Analytica Chimica Acta*. [s.l.: s.n.].

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 105–129, 2001. DOI: 10.1002/jpp.328.

MACDONALD, Robert C.; MACDONALD, Ruby I.; PHM MENCO, Bert; TAKESHITA, Keizo; SUBBARAO, Nanda K.; HU, Lan-rong. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1061**, [S. l.], p. 297–303, 1991.

MARCU, Laura; BOPPART, Stephen A.; HUTCHINSON, Mark R.; POPP, Jürgen; WILSON, Brian C. Biophotonics: the big picture. **Journal of Biomedical Optics**, [S. l.], v. 23, n. 02, p. 1, 2017. DOI: 10.1117/1.jbo.23.2.021103.

MASCHERONI, Luca; DOZZI, Maria Vittoria; RANUCCI, Elisabetta; FERRUTI, Paolo; FRANCIA, Valentina; SALVATI, Anna; MAGGIONI, Daniela. Tuning Polyamidoamine Design to Increase Uptake and Efficacy of Ruthenium Complexes for Photodynamic Therapy. **Inorganic Chemistry**, [S. l.], v. 58, n. 21, p. 14586–14599, 2019. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.9b02245.

MATIAS, Tiago A.; MANGONI, Ana P.; TOMA, Sergio H.; REIN, Francisca N.; ROCHA, Reginaldo C.; TOMA, Henrique E.; ARAKI, Koiti. Catalytic Water-Oxidation Activity of a Weakly Coupled Binuclear Ruthenium Polypyridyl Complex. **European Journal of Inorganic Chemistry**, [S. l.], v. 2016, n. 36, p. 5547–5556, 2016. DOI: 10.1002/ejic.201600889.

MATIAS, Tiago A.; PARUSSULO, André L. A.; BENAVIDES, Paola A.; GUIMARÃES, Robson R.; DOURADO, André H. B.; NAKAMURA, Marcelo; DE TORRESI, Susana I. Córdoba.; BERTOTTI, Mauro; ARAKI, Koiti. Polymeric binuclear ruthenium complex as efficient electrocatalyst for oxygen evolution reaction. **Electrochimica Acta**, [S. l.], v. 283, p. 18–26, 2018. DOI: 10.1016/j.electacta.2018.06.138.

MATIAS, Tiago A.; REIN, Francisca N.; ROCHA, Reginaldo C.; FORMIGA, André Luiz Barboza; TOMA, Henrique E.; ARAKI, Koiti. Effects of a strong π -accepting ancillary ligand on the water oxidation activity of weakly coupled binuclear ruthenium catalysts. **Dalton Transactions**, [S. l.], v. 48, n. 9, p. 3009–3017, 2019. DOI: 10.1039/c8dt04963g.

MAYER, L. D.; HOPE, M. J.; CULLIS, P. R. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S. l.], v. 858, p. 161–168, 1986.

MEHANNA, Stephanie; MANSOUR, Najwa; AUDI, Hassib; BODMAN-SMITH, Kikki; MROUEH, Mohamad A.; TALEB, Robin I.; DAHER, Costantine F.; KHAYZER, Rony S. Enhanced cellular uptake and photochemotherapeutic potential of a lipophilic strained Ru(II) polypyridyl complex. **RSC Advances**, [S. l.], v. 9, n. 30, p. 17254–17265, 2019. DOI: 10.1039/c9ra02615k.

MEYER, Tiunas J. Photochemistry of metal coordination complexes: metal to ligand charge transfer excited states. **Pure & Appl Chem**, [S. l.], v. 58, n. 9, p. 1193–1206, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1351/pac198658091193>.

MILUTINOVIĆ, Milan M.; RILAK, Ana; BRATSOS, Ioannis; KLISURIĆ, Olivera; VRANEŠ, Milan; GLIGORIJEVIĆ, Nevenka; RADULOVIĆ, Siniša; BUGARČIĆ,

Živadin D. New 4'-(4-chlorophenyl)-2,2':6',2''-terpyridine ruthenium(II) complexes: Synthesis, characterization, interaction with DNA/BSA and cytotoxicity studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 169, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2016.10.001.

MITAL, Mariusz; ZIORA, Zyta. **Biological applications of Ru(II) polypyridyl complexes. Coordination Chemistry Reviews** Elsevier B.V., , 2018. DOI: 10.1016/j.ccr.2018.02.013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010854517305921>.

MONRO, Susan et al. Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 119, n. 2, p. 797–828, 2019. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00211.

MOREIRA, Mariete B.; FRANCISCATO, Douglas S.; TOLEDO, Kalil C. F.; DE SOUZA, João Raul B.; NAKATANI, Helena S.; DE SOUZA, Vagner R. Investigation of the fluorescence quenching of bovine and human serum albumin by ruthenium complex. **Quimica Nova**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 227–232, 2015. DOI: 10.5935/0100-4042.20140315.

MOSMANN, Tim. **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays** *Journal of Immunological Methods*. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

NAZEERUDDIN, Md K.; ZAKEERUDDIN, S. M.; HUMPHRY-BAKER, R.; JIROUSEK, M.; LISKA, P.; VLACHOPOULOS, N.; SHKLOVER, V.; FISCHER, Christian H.; GRÄTZEL, M. Acid-base equilibria of (2,2'-bipyridyl-4,4'-dicarboxylic acid)ruthenium(II) complexes and the effect of protonation on charge-transfer sensitization of nanocrystalline titania. **Inorganic Chemistry**, [S. l.], v. 38, n. 26, p. 6298–6305, 1999. DOI: 10.1021/ic990916a.

NETO, Guilherme Luiz B.; BAPTISTA, Eduardo Alexandre M.; BECCA, Gabriel Hideki S.; NAKATANI, Helena S.; DE SOUZA, Vagner R. Interações competitivas de complexos de rutênio contendo dimetilsulfóxido e ligantes N-heterocíclicos com albumina de soro humano. **Quimica Nova**, [S. l.], v. 43, n. 3, p. 261–270, 2020. DOI: 10.21577/0100-4042.20170488.

OECD. OECD TG 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. **OECD Guidelines for the Testing Chemicals**, [S. l.], n. June, p. 1–15, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264071162-en>. Disponível em: <http://www.oecd.org/termsandconditions/>.

ORMOND, Alexandra B.; FREEMAN, Harold S. **Dye sensitizers for photodynamic therapy. Materials**, 2013. DOI: 10.3390/ma6030817.

PARKER, C. A.; BARNES, W. J. **Some Experiments with Spectrofluorimeters and Filter Fluorimeters**. [s.l: s.n.].

PARUSSULO, Andre L. A.; MATIAS, Tiago A.; GUIMARAES, Robson R.; TOMA, Sergio H.; ARAKI, Koiti; TOMA, Henrique E. Accessing the charge separation effects

in dye-sensitized solar cells based on a vectorial planning of supramolecular ruthenium dyes. **Inorganica Chimica Acta**, [S. l.], v. 453, p. 764–770, 2016. DOI: 10.1016/j.ica.2016.09.039.

PARUSSULO, André Luis Araújo. **Conceitos Supramoleculares e Morfologia Interfacial em Células Solares de TiO₂**. 2013. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. DOI: 10.11606/T.46.2013.tde-09052013-083741.

PAVANI, Christiane; UCHOA, Adjaci F.; OLIVEIRA, Carla S.; IAMAMOTO, Yassuko; BAPTISTA, Maurício S. Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers. **Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology** ER - , [S. l.], v. 8, n. 2, p. 233–240, 2009. DOI: 10.1039/b810313e.

PAVIA, D. Espectroscopia no ultravioleta. In: **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning ed. [s.l: s.n.]. p. 365–398. Disponível em: <https://www2.ufjf.br/quimicaead/wp-content/uploads/sites/224/2013/05/7-Espectroscopia-no-ultravioleta.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2022.

PEREIRA-LEITE, Catarina; NUNES, Cláudia; REIS, Salette. **Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with membranes: In vitro assessment and relevance for their biological actions**. **Progress in Lipid Research** Elsevier Ltd, , 2013. DOI: 10.1016/j.plipres.2013.08.003.

PETERS, Bjorn; HOLZHUTTER, Hermann-Georg. In vitro phototoxicity testing: development and validation of a new concentration response analysis software and biostatistical analyses related to the use of various prediction models. **ATLA**, [S. l.], v. 30, p. 415–432, 2002.

PICCOLO, Marialuisa et al. Exploring cellular uptake, accumulation and mechanism of action of a cationic Ru-based nanosystem in human preclinical models of breast cancer. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-43411-3.

PIZARRO, Ana M.; SADLER, Peter J. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. **Biochimie**, [S. l.], v. 91, n. 10, p. 1198–1211, 2009. DOI: 10.1016/j.biochi.2009.03.017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908409000789>.

PUCKETT, Cindy A.; BARTON, Jacqueline K. Methods to explore cellular uptake of ruthenium complexes. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 129, n. 1, p. 46–47, 2007. DOI: 10.1021/ja0677564.

PUSHPAN, S. K.; VENKATRAMAN, S.; ANAND, V. G.; SANKAR, J.; PARMESWARAN, D.; GANESAN, S.; CHANDRASHEKAR, T. K. Porphyrins in Photodynamic Therapy-A Search for Ideal Photosensitizers. **Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents**, [S. l.], v. 2, p. 187–207, 2002. DOI: 10.2174/1568011023354137.

REZENDE, Thaís K. L.; BARBOSA, Heliomar P.; DOS SANTOS, Luiz F.; DE O. LIMA, Karmel; ALVES DE MATOS, Patrícia; TSUBONE, Tayana M.; GONÇALVES,

Rogéria R.; FERRARI, Jefferson L. Upconversion rare Earths nanomaterials applied to photodynamic therapy and bioimaging. **Frontiers in Chemistry**, [S. l.], v. 10, 2022. DOI: 10.3389/fchem.2022.1035449. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2022.1035449/full>.

RISS, Terry L.; MORAVEC, Richard A.; NILLES, Andrew L.; DUELLMAN, Sarah; BENINK, Hélène A.; WORZELLA, Tracy J.; MINOR, Lisa. Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM, G. Sitta; MANAGING, Abigail Grossman; MARKOSSIAN, Sarine; BAELL, Jonathan (org.). Bethesda (MD): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/?report=reader#!po=1.38889>, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/?report=reader#!po=1.38889>. Acesso em: 24 set. 2022.

ROSS, Philip D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of macromolecular association reactions: Analysis of forces contributing to stabilization. **Biophysical Journal**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 79–81, 1980. DOI: 10.1016/S0006-3495(80)84918-6.

ROSS, Philip D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. **Biochemistry**, [S. l.], v. 20, n. 11, p. 3096–3102, 1981. DOI: 10.1021/bi00514a017.

SÁNCHEZ-MURCIA, Pedro A.; NOGUEIRA, Juan J.; GONZÁLEZ, Leticia. Exciton Localization on Ru-Based Photosensitizers Induced by Binding to Lipid Membranes. **Journal of Physical Chemistry Letters**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 683–688, 2018. DOI: 10.1021/acs.jpcclett.7b03357.

SANDRINO, B.; WROBEL, E. C.; NOBRE, T. M.; CASELI, L.; LAZARO, S. R.; JÚNIOR, A. C.; GARCIA, J. R.; OLIVEIRA, O. N.; WOHNATH, K. Interaction between active ruthenium complex [RuCl₃(dppb)(Vpy)] and phospholipid Langmuir monolayers: Effects on membrane electrical properties. **Chemical Physics Letters**, [S. l.], v. 649, p. 29–36, 2016. DOI: 10.1016/j.cplett.2016.02.023.

SANTOS, Nuno C.; PRIETO, Manuel; CASTANHO, Miguel A. R. B. **Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: An emphasis on optical spectroscopic methods**. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes** Elsevier, , 2003. DOI: 10.1016/S0005-2736(03)00112-3.

SEDDON, Annala M.; CASEY, Duncan; LAW, Robert V.; GEE, Antony; TEMPLER, Richard H.; CES, Oscar. Drug interactions with lipid membranes. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 38, n. 9, p. 2509–2519, 2009. DOI: 10.1039/b813853m.

SEDDON, Annala M.; CURNOW, Paul; BOOTH, Paula J. Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [S. l.], v. 1666, n. 1–2, p. 105–117, 2004. DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.04.011.

SEEDHER, Neelam; AGARWAL, Pooja. Complexation of fluoroquinolone antibiotics with human serum albumin: A fluorescence quenching study. **Journal of Luminescence**, [S. l.], v. 130, n. 10, p. 1841–1848, 2010. DOI: 10.1016/j.jlumin.2010.04.020.

SEEDHER, Neelam; BHATIA, Sonu. Reversible binding of celecoxib and valdecoxib with human serum albumin using fluorescence spectroscopic technique. **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 54, n. 2, p. 77–84, 2006. DOI: 10.1016/j.phrs.2006.02.008.

SIANI, P.; DE SOUZA, R. M.; DIAS, L. G.; ITRI, R.; KHANDELIA, H. An overview of molecular dynamics simulations of oxidized lipid systems, with a comparison of ELBA and MARTINI force fields for coarse grained lipid simulations. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [S. l.], v. 1858, n. 10, p. 2498–2511, 2016. DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.03.031.

SILVA, D. F. T.; NUNEZ, S. C.; SUZUKI, Luís Cláudio; RIBEIRO, Martha Simões. Dosimetria na Terapia com Laser de baixa intensidade. In: **Fundamentos de Odontologia: lasers em odontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda, 2010. p. 26–35. Disponível em: <https://www.ipen.br/biblioteca/2010/15975.pdf>. Acesso em: 17 out. 2022.

SILVESTER, Julie A.; TIMMINS, Graham S.; DAVIES, Michael J. Photodynamically generated bovine serum albumin radicals: evidence for damage transfer and oxidation at cysteine and tryptophan residues. **Free Radical Biology & Medicine**, [S. l.], v. 24, p. 754–766, 1998. DOI: 10.1016/s0891-5849(97)00327-4.

SIMPLICIO, Fernanda Ibanez; MAIONCHI, Florângela; HIOKA, Noboru. Terapia Fotodinâmica: Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Quim. Nova**, [S. l.], v. 25, n. 5, p. 801–807, 2002. DOI: doi.org/10.1590/S0100-40422002000500016.

SIONTOROU, Christina G.; NIKOLELI, Georgia Paraskevi; NIKOLELIS, Dimitrios P.; KARAPETIS, Stefanos K. Artificial lipid membranes: Past, present, and future. **Membranes**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 1–24, 2017. DOI: 10.3390/membranes7030038.

SOARES, Franciela A.; CESCHI, Marco A.; FRANCESCHINI, Daniel B.; DO CANTO, Vanessa P.; NETZ, Paulo A.; CAMPO, Leandra F. Tianeptine esters derivatives: A study of protein-drug interaction performed by fluorescence quenching and molecular docking. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 30, n. 10, p. 2125–2135, 2019. DOI: 10.21577/0103-5053.20190090.

SPIELMANN, H. et al. The International EU/COLIPA In Vitro Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1: The 3T3 NRU Phototoxicity Test. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 12, p. 305–327, 1998.

STEPHENSON, Brian C.; RANGEL-YAGUI, Carlota O.; JUNIOR, Adalberto Pessoa; TAVARES, Leoberto Costa; BEERS, Kenneth; BLANKSCHTEIN, Daniel. Experimental and Theoretical Investigation of the Micellar-Assisted Solubilization of Ibuprofen in Aqueous Media. **Langmuir**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 1514–1525, 2006. DOI: 10.1021/la052530k. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la052530k>.

STERNBERG, Ethan D.; DOLPHIN, David; BRICKNER, Christian. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, [S. l.], v. 54, p. 4151–4202, 1998. DOI: doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00015-5.

STRAIGHT, R. C.; SPIKES, J. D. Photosensitized oxidation of biomolecules in Singlet O₂. **CRC Press**, [S. l.], v. 4, p. 91–143, 1985.

SUDHINDRA, P.; AJAY SHARMA, S.; ROY, Nilmadhab; MOHARANA, Prithvi; PAIRA, Priyankar. **Recent advances in cytotoxicity, cellular uptake and mechanism of action of ruthenium metallodrugs: A review**. **Polyhedron** Elsevier Ltd, , 2020. DOI: 10.1016/j.poly.2020.114827.

SUN, Jing; HUANG, Yongchao; ZHENG, Chuping; ZHOU, Yanhui; LIU, Ying; LIU, Jie. Ruthenium (II) Complexes Interact with Human Serum Albumin and Induce Apoptosis of Tumor Cells. **Biological Trace Element Research**, [S. l.], v. 163, n. 1–2, p. 266–274, 2015. DOI: 10.1007/s12011-014-0165-7.

SUN, Yujie; JOYCE, Lauren E.; DICKSON, Nicole M.; TURRO, Claudia. Efficient DNA photocleavage by [Ru(bpy)₂(dppn)]²⁺ with visible light. **Chemical Communications**, [S. l.], v. 46, n. 14, p. 2426–2428, 2010. DOI: 10.1039/b925574e.

SZABO, A. **The Enzyme Catalysis Process**. Boston, MA: Springer US, 1989. DOI: 10.1007/978-1-4757-1607-8.

TAN, Caiping et al. Nuclear permeable ruthenium(II) β -carboline complexes induce autophagy to antagonize mitochondrial-mediated apoptosis. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 53, n. 21, p. 7613–7624, 2010. DOI: 10.1021/jm1009296.

TANFORD, Charles. **The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes**, Charles Tanford, Wiley-Interscience, New York, 1980, 233 pp. Price: \$18.50. **Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition**, [S. l.], v. 18, p. 1980, 1980.

TARDIVO, João Paulo; DEL GIGLIO, Auro; DE OLIVEIRA, Carla Santos; GABRIELLI, Dino Santesso; JUNQUEIRA, Helena Couto; TADA, Dayane Batista; SEVERINO, Divinomar; DE FÁTIMA TURCHIELLO, Rozane; BAPTISTA, Mauricio S. **Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications**. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2005. DOI: 10.1016/S1572-1000(05)00097-9.

TETARD, Marie Charlotte; VERMANDEL, Maximilien; MORDON, Serge; LEJEUNE, Jean Paul; REYNS, Nicolas. **Experimental use of photodynamic therapy in high grade gliomas: a review focused on 5-aminolevulinic acid**. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, 2014. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2014.04.004.

THOMPSON, David W.; ITO, Akitaka; MEYER, Thomas J. [Ru(bpy)₃]²⁺* and other remarkable metal-to-ligand charge transfer (MLCT) excited states. **Pure and Applied Chemistry**, [S. l.], v. 85, n. 7, p. 1257–1305, 2013. DOI: 10.1351/PAC-CON-13-03-04.

THOTA, Sreekanth; RODRIGUES, Daniel A.; CRANS, Debbie C.; BARREIRO, Eliezer J. Ru(II) Compounds: Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics? **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 61, n. 14, p. 5805–5821, 2018. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b01689. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.7b01689>.

TIMERBAEV, Andrei R.; HARTINGER, Christian G.; ALEKSENKO, Svetlana S.; KEPPLER, Bernhard K. Interactions of Antitumor Metallodrugs with Serum Proteins: Advances in Characterization Using Modern Analytical Methodology. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 106, n. 6, p. 2224–2248, 2006. DOI: 10.1021/cr040704h.

TOMA, Henrique Eisi. **Química de Coordenação, Organometálica e Catálise**. São Paulo: Blucher, 2016.

TOMA, S. H.; UEMI, M.; NIKOLAOU, S.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N.; TOMA, H. E. {trans-1,4=bis[(4-pyridyl)ethenyl]benzene}(2,2'-bipyridine) ruthenium(II) complexes and their supramolecular assemblies with β -cyclodextrin. **Inorganic Chemistry**, [S. l.], v. 43, n. 11, p. 3521–3527, 2004. DOI: 10.1021/ic0352250.

TOMA, Sergio H.; TOMA, Henrique E. **Self Assembled Rotaxane and Pseudo-Rotaxanes based on β β β β β -Cyclodextrin Inclusion Compounds with trans-1,4-Bis[(4-pyridyl)ethenyl]benzene-pentacyanoferrate(II) Complexes**. **J. Braz. Chem. Soc.** [s.l: s.n.].

TRYNDA-LEMIESZ, Lilianna; KEPPLER, Bernhard K.; KOZTOWSKI, Henryk. Studies on the interactions between human serum albumin and imidazolium [trans-tetrachlorobis (imidazol) ruthenate (III)]. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 73, p. 123–128, 1999.

TSUBONE, Tayana Mazin; BAPTISTA, Mauricio S.; ITRI, Rosangela. Understanding membrane remodelling initiated by photosensitized lipid oxidation. **Biophysical Chemistry**, [S. l.], v. 254, 2019. DOI: 10.1016/j.bpc.2019.106263.

TSUBONE, Tayana Mazin; MARTINS, Waleska Kerllen; FRANCO, Marcia S. F.; SILVA, Maryana N.; ITRI, Rosangela; BAPTISTA, Mauricio S. **Cellular compartments challenged by membrane photo-oxidation**. **Archives of Biochemistry and Biophysics** Academic Press Inc., , 2021. DOI: 10.1016/j.abb.2020.108665.

TSUBONE, Tayana Mazin; MARTINS, Waleska Kerllen; PAVANI, Christiane; JUNQUEIRA, Helena Couto; ITRI, Rosangela; BAPTISTA, Maurício S. Enhanced efficiency of cell death by lysosome-specific photodamage. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-06788-7.

VAN MEER, Gerrit; VOELKER, Dennis R.; FEIGENSON, Gerald W. Membrane lipids: Where they are and how they behave. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 112–124, 2008. DOI: 10.1038/nrm2330.

VAROL, Mehmet. An Alternative Treatment Modality of Diseases using Photodynamic Therapy with a Wide Range Biological Targeting Possibility. **Research & Reviews: Research Journal of Biology**, [S. l.], p. 21–25, 2015.

VILSINSKI, Bruno Henrique et al. Formulation of aluminum chloride phthalocyanine in PluronicTM P-123 and F-127 block copolymer micelles: Photophysical properties and photodynamic inactivation of microorganisms. **Photochemistry and Photobiology**, [S. l.], v. 91, n. 3, p. 518–525, 2015. DOI: 10.1111/php.12421.

VOS, Johannes G.; KELLY, John M. **Ruthenium polypyridyl chemistry; from basic research to applications and back again.** *Dalton Transactions* Royal Society of Chemistry, , 2006. DOI: 10.1039/b606490f.

WEE, Han Ang; DALDINI, Elisa; JUIILLERAT-JEANNERET, Lucienne; DYSON, Paul J. Strategy To Tether Organometallic Ruthenium-Arene Anticancer Compounds to Recombinant Human Serum Albumin. **Inorganic Chemistry**, [*S. l.*], v. 46, n. 22, p. 9048–9050, 2007. DOI: 10.1021/ic701474m.

ZHANG, Si Qi; MENG, Ting Ting; LI, Jia; HONG, Fan; LIU, Jin; WANG, Youjun; GAO, Li Hua; ZHAO, Hua; WANG, Ke Zhi. Near-IR/Visible-Emitting Thiophenyl-Based Ru(II) Complexes: Efficient Photodynamic Therapy, Cellular Uptake, and DNA Binding. **Inorganic Chemistry**, [*S. l.*], v. 58, n. 20, p. 14244–14259, 2019. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.9b02420.

ZHAO, Qiang; HUANG, Hunhui; LI, Fuyou. Phosphorescent heavy-metal complexes for bioimaging. **Chemical Society Reviews**, [*S. l.*], v. 40, n. 5, p. 2508–2524, 2011. DOI: 10.1039/c0cs00114g.

ZIA, Mohammad Khalid; SIDDIQUI, Tooba; ALI, Syed Saqib; REHMAN, Ahmed Abdur; AHSAN, Haseeb; KHAN, Fahim Halim. Chemotherapeutic Drugs and Plasma Proteins: Exploring New Dimensions. **Current Protein & Peptide Science**, [*S. l.*], v. 19, n. 10, p. 937–947, 2018. DOI: 10.2174/1389203718666171002115547.