



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

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



NAIARA CRISTINA BESSAS

**INTERAÇÕES ENTRE ALBUMINA HUMANA (HSA) E COMPLEXOS
NITROSILOS DE RUTÊNIO DO TIPO $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{tpy})(\text{L})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$: AVALIAÇÕES
ESPECTROSCÓPICAS E MODELAGEM MOLECULAR**

ITUIUTABA

2019

NAIARA CRISTINA BESSAS

**INTERAÇÕES ENTRE ALBUMINA HUMANA (HSA) E COMPLEXOS
NITROSILOS DE RUTÊNIO DO TIPO $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{tpy})(\text{L})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$: AVALIAÇÕES
ESPECTROSCÓPICAS E MODELAGEM MOLECULAR**

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

Orientador: Profa. Dra. Renata Galvão de Lima

ITUIUTABA

2019

NAIARA CRISTINA BESSAS

**INTERAÇÕES ENTRE ALBUMINA HUMANA (HSA) E COMPLEXOS
NITROSILOS DE RUTÊNIO DO TIPO $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{tpy})(\text{L})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$: AVALIAÇÕES
ESPECTROSCÓPICAS E MODELAGEM MOLECULAR**

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

DATA DA APROVAÇÃO: 12/12/2019

COMISSÃO AVALIADORA:

Prof. Dr. André Luiz Bogado

Prof. Dr. Diesley Martins da Silva Araújo

Profª. Dra. Renata Galvão de Lima

*Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio Carlos e Maria Inalda;
à minha irmã, Lidianne; ao meu cunhado, Mauro Sérgio;
e à luz da minha vida, meu afilhado, Gabriel.*
*Obrigada pelo amor, pela certeza de estarem ao meu lado em quaisquer circunstâncias,
e por me incentivarem sempre. Amo muito vocês!*

Ao meu namorado, Amós, a pessoa com quem eu amo partilhar a vida.
*Obrigada pelo amor, carinho, companheirismo, compreensão e paciência. Amo muito
você!*

Dedico este trabalho, também, à minha orientadora e “chefê”,

Profa. Dra. Renata Galvão de Lima.

Para mim, a Renata é um exemplo de mulher e pesquisadora.

*Eu só tenho que agradecer-lá, pois foi uma honra ter convivido e trabalhado com ela
por todos estes anos (e espero que venham outros mais!).*

*Renata, obrigada por me inspirar e me incentivar, todos os dias, a ser uma
profissional melhor.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da minha vida e pela permissão de vivê-la tão intensamente. Tudo o que sou e faço é por Ti e para Ti. “Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele a glória por toda a eternidade!” (Romanos, 3:11).

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

Aos meus amigos e colegas de classe, Allanna, Ana, Diego, Ellen, Felipe, Jonathan, Letícia e Renan. Obrigada pela amizade construída e, por diversas vezes, serem o meu alicerce e minha família em Ituiutaba/MG. Com vocês, o meu dia-a-dia e a minha graduação tornaram-se mais leves. A nossa amizade foi essencial para que chegasse até aqui. Sou muito grata a todos vocês!

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

Aos integrantes do Grupo de Pesquisas em Bioinorgânica, Bianca, Evelyn, Gabriela, Larissa, Luciana, Mayara, Rafaela, Vinicius e Profa. Dra Renata Galvão de Lima. Renata, obrigada por formar, não somente um grupo, mas também uma família que faz pesquisa. Este TCC é nosso!

A todos os professores que fizeram parte da minha formação, desde o ensino básico ao ensino superior, em especial, a todos os professores do curso técnico em Química, da ETEC Pedro Badran, e do Curso de Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP). Obrigada por todos os ensinamentos e por serem exemplos a serem seguidos. Admiro e sou muito grata a todos vocês!

Ao Prof. Dr. André Luiz Bogado e ao Prof. Dr. Diesley Martins da Silva Araújo. Obrigada por aceitarem participar deste importante momento da minha vida acadêmica. É uma honra tê-los na banca examinadora deste TCC.

Ao Prof. Dr. Moacyr Comar Júnior e à mestrande Letícia, pela realização dos estudos via simulação computacional e pelo auxílio no entendimento dos mesmos.

Aos servos do Grupo de Oração Universitário São Gabriel, Ana, Ayeska, Bruna, Felipe, Evelyn, Jackeline, Lorena, Maurício, Raphael e Rômulo. Obrigada por serem rostos de Cristo para mim e por vivenciarmos, juntos, o amor dEle por nós.

A minha psicóloga, Ana Luiza. Aninha, obrigada por auxiliar no meu crescimento pessoal e, conseqüentemente, profissional. Nunca me esquecerei das nossas conversas e dos inúmeros atendimentos, muitos deles à distância. A sua amizade e o seu profissionalismo foram primordiais para que chegasse até aqui. Sou muito grata a você!

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

À FAPEMIG, pelas bolsas concedidas durante os meus 3 anos de Iniciação Científica.

“Eu sei que meu trabalho é uma gota no oceano, mas sem ele, o oceano seria menor.”

(Santa Teresa de Calcutá)

RESUMO

O óxido nítrico (NO) atua em diferentes processos fisiológicos, desde atividades antimicrobiana e antiparasitária, coagulação sanguínea, controle da pressão sanguínea, à neurotransmissão e ação antitumoral. Dentre todos os processos fisiológicos nos quais o NO está envolvido, possivelmente, a área de pesquisa que mais tem se desenvolvido está relacionada à sua ação vasodilatadora. Os complexos nitrosilos de rutênio, do tipo $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BDQ})(\text{NO})]^{3+}$ (RuBDQ) e $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BD})(\text{NO})]^{3+}$ (RuBD) – onde tpy=2,2':6',2''-terpiridina; BDQ=ácido 3,4-diaminobenzóico; e BD=*o*-fenilenodiamina –, mostraram-se potenciais candidatos a agentes doadores exógenos de NO e, consequentemente, potenciais pró-fármacos. Nesse ínterim, propuseram-se estudos acerca das interações destes complexos doadores de NO com biomoléculas as quais são responsáveis pelo armazenamento, transporte, metabolismo e excreção de fármacos, como a albumina humana (HSA). Os estudos para o entendimento das interações entre a HSA e os complexos nitrosilos de rutênio foram baseados em experimentos de supressão de fluorescência da HSA. Os resultados obtidos demonstraram que há a interação entre a HSA e ambos os complexos via mecanismo dinâmico. Os parâmetros termodinâmicos para o sistema HSA–RuBDQ evidenciaram que as espécies em questão interagem via interações hidrofóbicas, e aqueles para o sistema HSA–RuBD indicaram que as espécies interagem via ligações de hidrogênio. As distâncias centro a centro entre o resíduo de Trp-214 e os complexos RuBDQ e RuBD, estimadas pela teoria de FRET, são de 3,38 e 3,01 nm, respectivamente. Os experimentos de supressão de fluorescência síncrona da HSA demonstraram que há a interação entre a HSA e ambos os complexos RuBDQ e RuBD em um microambiente proteico próximo aos resíduos de aminoácido de Tyr e Trp-214. Através de estudos baseados em ancoragem molecular foi possível propor que a interação entre a HSA e ambos os complexos ocorre em um microambiente proteico próximo aos resíduos de aminoácido de Tyr-452 e Trp-214, corroborando os resultados experimentais. Os estudos via ancoragem molecular, evidenciaram, ainda, que é possível que ambos os complexos estejam inseridos em um microambiente proteico referente ao Sítio I, subdomínio IIA da HSA.

Palavras-chave: Ancoragem molecular, espectroscopia de fluorescência, complexos nitrosilos de rutênio, HSA, óxido nítrico.

ABSTRACT

The nitric oxide (NO) acts in different physiological processes, from antimicrobial and antiparasitic activities, blood coagulation, blood pressure control, neurotransmission and antitumor action. Among all the physiological processes in which NO is possibly involved, the most developed research area is related to its vasodilatory action. Ruthenium nitrosyl complexes of the type $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BDQ})(\text{NO})]^{3+}$ (RuBDQ) and $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BD})(\text{NO})]^{3+}$ (RuBD) – where tpy = 2,2':6',2''-terpyridine; BDQ = 3,4-diaminobenzoic acid; and BD = *o*-phenylenediamine –, showed up potential candidates for exogenous NO donating agents and, consequently, potential prodrugs. In the meantime, studies have been proposed on the interactions of these NO donor complexes with biomolecules which are responsible for the storage, transport, metabolism and excretion of drugs such as human albumin (HSA). The studies to understand the interactions between HSA and nitrosyl ruthenium complexes were based on HSA fluorescence quenching experiments. The results showed that there is the interaction between HSA and both complexes via dynamic mechanism. The thermodynamic parameters for the HSA–RuBDQ system showed that the species in question interact via hydrophobic interactions, and those for the HSA–RuBD system indicated that the species interact via hydrogen bonds. The center to center distances between the Trp-214 residue and the RuBDQ and RuBD complexes, estimated by the FRET theory, are 3.38 and 3.01 nm, respectively. The HSA synchronous fluorescence quenching experiments demonstrated that there is interaction between HSA and both RuBDQ and RuBD complexes in a protein microenvironment near the amino acid residues of Tyr and Trp-214. Through studies based on molecular docking it was possible to propose that the interaction between HSA and both complexes occurs in a protein microenvironment near to the amino acid residues of Tyr-452 and Trp-214, corroborating the experimental results. Studies by molecular docking also showed that it is possible that both complexes are inserted in a protein microenvironment referring to the HSA Site I subdomain IIA.

Keywords: Molecular docking, fluorescence spectroscopy, nitrosyl ruthenium complexes, HSA, nitric oxide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do complexo $\text{Na}_2(\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})).2\text{H}_2\text{O}$ (NPS).....	22
Figura 2 – Estrutura química do complexo R,R,S,S-trans- $[\text{RuCl}(\text{cyclam})(\text{NO})]^{2+}$	23
Figura 3 – Estruturas químicas dos complexos $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BDQ})(\text{NO})]^{3+}$ (a) e $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BD})(\text{NO})]^{3+}$ (b)	24
Figura 4 – Representações tridimensionais das estruturas terciárias da HSA e da BSA.	26
Figura 5 – Estrutura química do complexo $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{ISN})]^+$	27
Figura 6 – Estrutura química do complexo $[\text{RuCl}_2(\text{L})]$	27
Figura 7 – Estrutura química do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$	28
Figura 8 – Representação das transições eletrônicas envolvidas nos fenômenos de fluorescência (a) e fosforescência (b)	29
Figura 9 – Estruturas químicas tridimensionais dos complexos RuBDQ (a) e RuBD (b)	31
Figura 10 – Representação ilustrativa dos procedimentos experimentais realizados para a avaliação das interações entre a HSA e os complexos nitrosilos de rutênio.	39
Figura 11 – Espectros vibracionais na região do IR para os complexos RuBDQ (–) e RuBD (–) em ATR.	45
Figura 12 – Espectro de absorção na região do UV/Vis. para o complexo RuBDQ a $16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ em HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH=1,0).	47
Figura 13 – Espectro de absorção na região do UV/Vis. para o complexo RuBD a $16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ em HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH=1,0).	48
Figura 14 – Cromatogramas de separação do complexo RuBDQ. Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 1% de ácido trifluoracético:Metanol (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (–) e 2 h (---).	50
Figura 15 – Estruturas químicas dos isômeros do complexo RuBDQ.	51
Figura 16 – Cromatogramas de separação do complexo RuBD. Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 1% de ácido trifluoracético:Metanol (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (–) e 2 h (---).	52
Figura 17 – Espectros de fluorescência para a HSA em presença dos complexos RuBDQ (a) e RuBD (b) , em PBS (pH=7,4) a 308 K. $\lambda_{\text{exc}}=280 \text{ nm}$. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. $[\text{HSA}]=1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (–); $[\text{Complexo}]=3,3 \mu\text{mol L}^{-1}$; Tempo de incubação: 1 (–); 2 (–); 3 (–); 4 (–); 5 (–); 6 (–); 7 (–); 8 (–); 9 (–); 10 min (–).	54
Figura 18 – Espectros de absorção na região do UV/Vis. para a HSA e os complexos RuBDQ (a) e RuBD (b) , em PBS (pH=7,4) a 308 K. $[\text{HSA}]=1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (–);	

[Complexo]=0-16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (-); 1,7 (-); 2,3 (-); 3,3 (-); 5,0 (-); 6,6 (-); 8,3 (-); 9,9 (-); 11,5 (-); 13,2 (-); 14,8 (-); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-)].....	56
Figura 19 – Espectros vibracionais na região do IR para a HSA em ausência (-) e em presença (-) dos complexos RuBDQ (a) e RuBD (b).....	58
Figura 20 – Espectros vibracionais na região do IR para os complexos RuBDQ (a) e RuBD (b) em presença da HSA.....	60
Figura 21 – Espectros de supressão de fluorescência para a HSA em presença dos complexos RuBDQ (a) e RuBD (b), em PBS (pH=7,4) a 308 K. λ_{exc} =280 nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. [HSA]=1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-); [Complexo]=0-16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (-); 1,7 (-); 2,3 (-); 3,3 (-); 5,0 (-); 6,6 (-); 8,3 (-); 9,9 (-); 11,5 (-); 13,2 (-); 14,8 (-); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-)].	62
Figura 22 – Representação ilustrativa dos possíveis mecanismos de interação entre a HSA e o supressor (S). (a) Mecanismo estático; (b) Mecanismo dinâmico.	64
Figura 23 – Gráficos de Stern-Volmer acerca das interações entre a HSA e os complexos RuBDQ (a) e RuBD (b), em PBS (pH=7,4) em diferentes temperaturas. λ_{exc} =280 nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm.	65
Figura 24 – Gráficos de tempo de vida de fluorescência da HSA em função de [RuBDQ] (a) e [RuBD] (b) a 298 K (●) e 308 K (▲).	69
Figura 25 – Gráficos de $\log\{(F_0-F)/F\}$ em função de $\log[\text{RuBDQ}]$ (a) e $\log[\text{RuBD}]$ (b) em diferentes temperaturas.....	71
Figura 26 – Representação ilustrativa das possíveis interações entre a HSA e os complexos RuBDQ e RuBD.	73
Figura 27 – Sobreposição dos espectros de emissão para a HSA e de absorção para os complexos RuBDQ (a) e RuBD (b), em PBS (pH=7,4). [HSA]=1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-); [Complexo]=16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (---).....	76
Figura 28 – Espectros de supressão de fluorescência síncrona para a HSA em presença do complexo RuBDQ, em PBS (pH=7,4) a 308 K. λ_{exc} =280 nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. (a) $\Delta\lambda = 15$ nm; (b) $\Delta\lambda = 60$ nm. [HSA]=1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-); [Complexo]=0-16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (-); 1,7 (-); 2,3 (-); 3,3 (-); 5,0 (-); 6,6 (-); 8,3 (-); 9,9 (-); 11,5 (-); 13,2 (-); 14,8 (-); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-)].....	79
Figura 29 – Espectros de supressão de fluorescência síncrona para a HSA em presença do complexo RuBD, em PBS (pH=7,4) a 308 K. λ_{exc} =280 nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. (a) $\Delta\lambda = 15$ nm; (b) $\Delta\lambda = 60$ nm. [HSA]=1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-); [Complexo]=0-16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (-); 1,7 (-); 2,3 (-); 3,3 (-); 5,0 (-); 6,6 (-); 8,3 (-); 9,9 (-); 11,5 (-); 13,2 (-); 14,8 (-); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-)].....	80

Figura 30 – Estruturas químicas dos fármacos marcadores IBU (a) e WAR (b)	83
Figura 31 – Gráficos de F_0/F em função de [RuBDQ] (a) e [RuBD] (b) em presença dos fármacos marcadores IBU (■) e WAR (■).....	84
Figura 32 – Representações tridimensionais das ancoragens moleculares para os sistemas HSA–RuBDQ (a) e HSA–RuBD (b)	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reagentes utilizados durante a síntese, caracterização e posteriores estudos acerca dos complexos, sua pureza percentual e procedência.....	32
Tabela 2 – Dados espectroscópicos para os complexos RuBDQ e RuBD, seus coeficientes de absortividade molar (ϵ) e suas atribuições.....	49
Tabela 3 – Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) e constantes de velocidade bimolecular de supressão (k_q) para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD em diferentes temperaturas. ...	66
Tabela 4 – Tempo de vida de fluorescência da HSA em função da concentração do complexo RuBDQ.....	68
Tabela 5 – Tempo de vida de fluorescência da HSA em função da concentração do complexo RuBD.....	68
Tabela 6 – Constantes de associação (K_a) e números de sítios de ligação (n) para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD em diferentes temperaturas.....	72
Tabela 7 – Parâmetros termodinâmicos para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD.	74
Tabela 8 – Determinação de FRET para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD.	77
Tabela 9 – Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) e valores de deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão ($\Delta\lambda_{\text{máx}}$) para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD.....	82
Tabela 10 – Constantes Stern-Volmer (K_{SV}) e constantes de associação (K_a) para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD em ausência e em presença dos fármacos marcadores IBU e WAR.....	85

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3-pic	3-metilpiridina
4-acpy	4-acetilpiridina
4-pic	4-picolina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
BD	<i>o</i> -fenilenodiamina
BDQ	Ácido 3,4-diaminobenzóico
BSA	Albumina bovina
CL	Campo ligante
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
cyclam	1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano
Cys	Cisteína
FRED	Fator de relaxamento de endotélio dependente
FRET	Transferência de energia por ressonância de Förster
Glu	Glutamina
GC	Guanilato ciclase
HSA	Albumina humana
IBU	Ibuprofeno
IL	Intra ligante
IR	Infravermelho
ISN	Isonicotinamida
Lys	Lisina
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato em sua forma reduzida
NOS _e	Óxido Nítrico Sintase endotelial
NPS	Nitroprussiato de sódio
PAN	1-(2'-piridilazo)-2-naftolato
PBS	Tampão fosfato salino
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Py	Piridina

RMN	Ressonância magnética nuclear
TCML	Transferência de carga metal-ligante
tpy	2,2'-6',2''-terpiridina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UV/Vis.	Ultravioleta e visível
WAR	Varfarina

LISTA DE SÍMBOLOS

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Óxido Nítrico (NO)	20
1.2. Espécies Doadoras de Óxido Nítrico (NO)	22
1.2.1. Complexos Nitrosilos de Rutênio Doadores de NO	23
1.3. Albumina Humana (HSA)	25
1.4. Espectroscopia de Fluorescência	28
2. OBJETIVOS	31
3. PARTE EXPERIMENTAL	32
3.1. Reagentes	32
3.2. Procedimentos Experimentais	33
3.2.1. Síntese dos Complexos Nitrosilos de Rutênio	33
3.2.1.1. Síntese do Complexo [RuCl ₃ (tpy)]	33
3.2.1.2. Síntese do Complexo [RuCl(tpy)(BDQ)]PF ₆	33
3.2.1.3. Síntese do Complexo [Ru(tpy)(BDQ)NO](PF ₆) ₃	34
3.2.1.4. Síntese do Complexo [RuCl(tpy)(BD)]PF ₆	34
3.2.1.5. Síntese do Complexo [Ru(tpy)(BD)NO](PF ₆) ₃	35
3.2.2. Preparação das Soluções	35
3.2.2.1. Preparação da Solução Tampão Fosfato (PBS) pH=7,4	35
3.2.2.2. Preparação da Solução Estoque de HSA a 1,0 µmol L ⁻¹	35
3.2.2.3. Preparação da Solução Estoque dos Complexos Nitrosilos de Rutênio 1 mmol L ⁻¹	36
3.2.3. Caracterização dos Complexos Nitrosilos de Rutênio	36
3.2.3.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR)	36
3.2.3.2. Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível (UV/Vis.)	36
3.2.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	37
3.2.4. Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio	37
3.2.4.1. Avaliação do Tempo de Interação entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência	37
3.2.4.2. Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia na Região do UV/Vis.	38
3.2.4.3. Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR)	39

3.2.4.4. Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência	40
3.2.4.5. Determinação do Tempo de vida de fluorescência de Fluorescência da HSA no Estado Excitado em Ausência e Presença dos Complexos Nitrosilos de Rutênio	40
3.2.4.6. Determinação da Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET) entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio	41
3.2.4.7. Avaliação dos Sítios de Interação entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência Síncrona ($\Delta\lambda = 15 \text{ nm} / \Delta\lambda = 60 \text{ nm}$)	42
3.2.4.8. Avaliação dos Sítios de Interação entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Modelagem Molecular	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1. Caracterização dos Complexos Nitrosilos de Rutênio	44
4.1.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR)	44
4.1.2. Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível (UV/Vis.)	46
4.1.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	49
4.2. Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio	53
4.2.1. Avaliação do Tempo de Interação entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência	53
4.2.2. Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia na Região do UV/Vis.	55
4.2.3. Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia na Região do IR	57
4.2.4. Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência	61
4.2.4.1. Mecanismos de Supressão de Fluorescência	63
4.2.4.2. Determinação da constante de associação (K_a) e do número de sítios de ligação (n)	70
4.2.4.3. Determinação de parâmetros termodinâmicos	72
4.2.5. Determinação da Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET) entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio	75
4.2.6. Avaliação dos Sítios de Interação entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio	78

4.2.6.1. Avaliação dos Sítios de Interação entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência Síncrona ($\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ / $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$)	78
4.2.6.2. Avaliação dos Sítios de Interação entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio utilizando Fármacos Marcadores	82
4.2.6.3. Avaliação dos Sítios de Interação entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Modelagem Molecular	86
5. CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. Óxido Nítrico (NO)

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

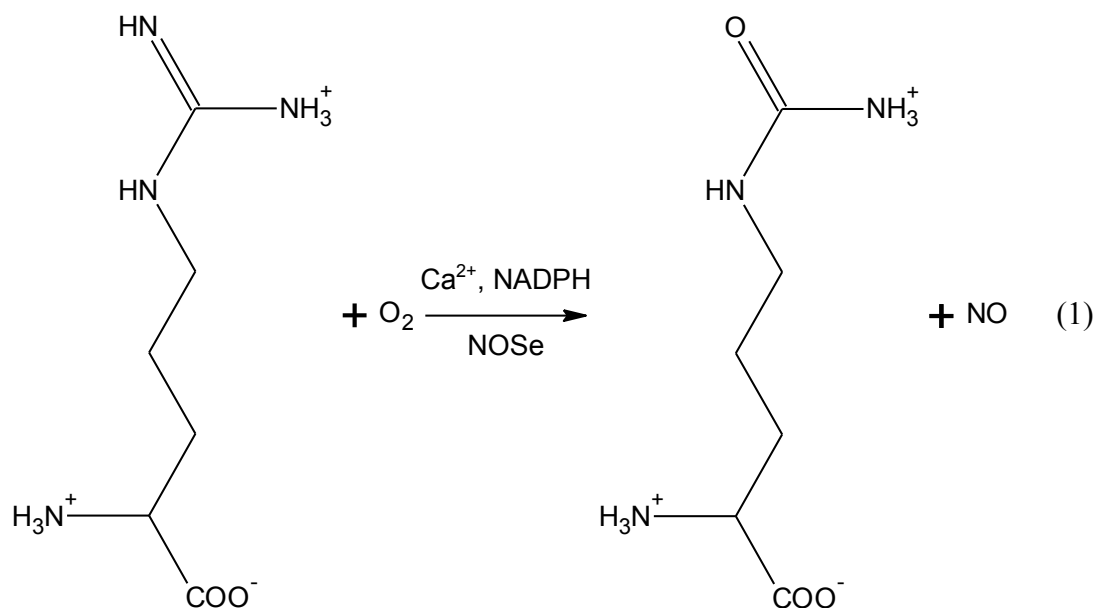
Em 1980, surgiram as primeiras evidências da importância biológica do NO. GREEN e colaboradores (1981), pesquisando acerca da toxicologia das nitroaminas, constataram que óxidos de nitrogênio eram produzidos em quantidades significativas pelo metabolismo de mamíferos e, ainda, que a concentração das espécies era maior em condições inflamatórias. HEGESH & SHILOAH (1982) comprovaram que espécies de óxidos de nitrogênio, como NO_3^- , eram produzidos em quantidades significativas pelo metabolismo de crianças com diarreia aguda de etiologias diversas. STUEHR & MARLETTA (1985) demonstraram que espécies de óxidos de nitrogênio, como NO_2^- e NO_3^- , eram produzidos por macrófagos de rato *in vitro*, em presença do lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. Assim, durante a década de 80, estas e outras descobertas modificaram os conceitos que, até então, tinham-se em relação ao NO.

Em 1990, Furchgott, Ignarro e Murad ganharam o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina pela descoberta de que o NO, no corpo humano, é classificado como um mensageiro biológico. O NO pode adentrar células sem que haja canais de passagem intracelulares ou, ainda, proteínas transportadoras específicas. O NO propaga-se por toda a célula, sendo o meio tanto hidrofílico quanto lipofílico. Apesar de ser uma molécula relativamente simples, o NO atua em diferentes processos fisiológicos, desde atividades antimicrobiana e antiparasitária, coagulação sanguínea, controle da pressão sanguínea, à neurotransmissão e ação antitumoral. (TRAYLOR & SHARMA, 1992).

Dentre todos os processos fisiológicos nos quais o NO está envolvido, possivelmente, a área de pesquisa que mais tem se desenvolvido está relacionada à sua ação vasodilatadora. MURAD e colaboradores (1977), FURCHGOTT & ZAWADZKI (1980) e IGNARRO e colaboradores (1987), pesquisando sobre o fator de relaxamento de endotélio dependente (FRED), concluíram que o mesmo possuía características biológicas e químicas idênticas àsquelas do NO, ou seja, constataram que o NO é o FRED.

Nas células endoteliais, há a reação de conversão da L-arginina e do oxigênio (O_2) a L-citrulina e NO, catalisada pela enzima Óxido Nítrico Sintase endotelial (NOS_e), conforme apresentado no Esquema 1. Tal reação envolve a conversão de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato em sua forma reduzida (NADPH) à nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) e, ainda, a transferência de 5 elétrons.

Esquema 1 – Representação simplificada da biossíntese do óxido nítrico (NO).



Fonte: Adaptado de BUTLER (1995).

O NO produzido reage com o íon metálico Fe^{III} , constituinte da enzima guanilato ciclase (GC), ativando-a. Tal reação produz a guanosina monofosfato cíclica (cGMP), a qual é classificada como um segundo mensageiro biológico, que atua em diferentes processos fisiológicos, como o relaxamento da musculatura lisa das artérias (BUTLER, 1995).

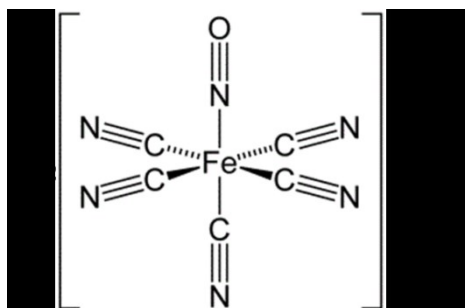
Considerando-se que o NO atua em diferentes processos fisiológicos, atualmente, têm sido cada vez mais exploradas espécies, orgânicas ou inorgânicas, que atuam a fim de liberar NO, sendo que algumas destas últimas podem ser susceptíveis a estímulos, tanto químicos, quanto fotoquímicos ou, ainda, eletroquímicos que promoverão a liberação de NO (da SILVA, et al., 2015).

1.2. Espécies Doadoras de Óxido Nítrico (NO)

Dentre as espécies orgânicas que propiciam a liberação de NO, uma destas à ser citada é a nitroglicerina – $C_3H_5(NO_3)_3$, em meio a diversos outros nitratos orgânicos. A nitroglicerina e outros nitratos orgânicos são algumas das espécies orgânicas mais antigas empregadas pela medicina chinesa no tratamento de *angina pectoris*, de hipertensão pulmonar, de insuficiência cardíaca congestiva e de outras complicações vasculares. No entanto, os efeitos clínicos da ministração de nitroglicerina, a longo prazo, são controversos. Um dos problemas da ministração de nitroglicerina é o desenvolvimento de tolerância ao nitrato profilático, reduzindo a eficácia da mesma (PARKER, 1987; HOROWITZ, 1992). Assim, considerando-se o desenvolvimento de tolerância ao nitrato profilático, foram exploradas espécies inorgânicas, que atuassem a fim de liberar NO.

O nitroprussiato de sódio – $Na_2[Fe(CN)_5(NO)] \cdot 2H_2O$ – (NPS) (Figura 1) é uma das espécies inorgânicas mais antigas utilizadas como um vasodilatador útil no controle da pressão arterial, principalmente em casos de emergência.

Figura 1 – Estrutura química do complexo $Na_2[Fe(CN)_5(NO)] \cdot 2H_2O$ (NPS).



Fonte: Autora.

No entanto, alguns dos efeitos clínicos da ministração de NPS são, além da reação de interesse, sendo esta a liberação de NO, reações secundárias indesejadas, sendo uma destas a liberação de CN^- (MONCADA, et al., 1991). Então, considerando-se a limitação da utilização de espécies como o NPS, devido à ocorrência de reações secundárias, foram explorados outros complexos metálicos, que atuassem como doadores exógenos de NO de maneira controlada, por meio de estímulos, tanto químicos, quanto eletroquímicos ou, ainda, fotoquímicos (terapia fotodinâmica) (de LIMA, et al., 2014).

Espécies como complexos nitrosilos de rutênio, devido às suas características físico-químicas, como estabilidade térmica, e, ainda, à vasta literatura a eles referente, têm se tornado

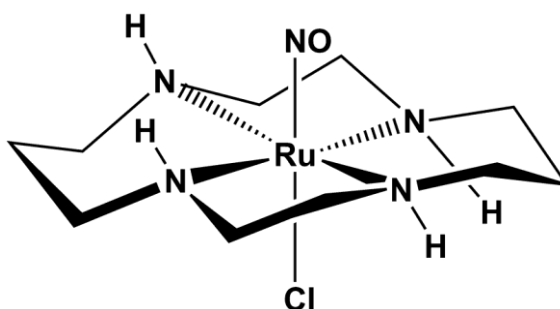
potenciais candidatos à agentes liberadores de NO e, portanto, atualmente, têm sido cada vez mais exploradas espécies de complexos nitrosilos de rutênio que são viáveis clinicamente (de LIMA, et al., 2014).

1.2.1. Complexos Nitrosilos de Rutênio Doadores de NO

Compostos de coordenação os quais são considerados potenciais candidatos à agentes liberadores de NO, suas propriedades físico-químicas e, principalmente, suas reatividades em alvos biológicos são objetos de estudo em diversas pesquisas científicas. Conforme descrito anteriormente, espécies como complexos nitrosilos de rutênio têm se tornado potenciais candidatos à agentes liberadores de NO e, assim, atualmente, têm sido cada vez mais exploradas séries de complexos nitrosilos de rutênio com diferentes co-ligantes e suas propriedades e reatividades.

Batista e colaboradores (1997), pesquisando sobre a reatividade de alguns complexos nitrosilos de rutênio, sintetizaram e estudaram uma série de complexos do tipo $[\text{RuCl}_n(\text{L})(\text{NO})]$ – onde L são diferentes co-ligantes fosfinicos. LANG e colaboradores (2000), com o objetivo de minimizar as chances de ocorrerem reações secundárias indesejadas, sintetizaram complexos nitrosilos de rutênio com co-ligantes macrociclos, do tipo $R,R,S,S\text{-trans-}[\text{RuCl}(\text{cyclam})(\text{NO})]^{2+}$ – onde cyclam é 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano – (Figura 2), pois, co-ligantes macrociclos conferem aos compostos de coordenação diferentes propriedades físico-químicas e, principalmente devido à sua inércia, potenciais candidatos à agentes liberadores de NO.

Figura 2 – Estrutura química do complexo $R,R,S,S\text{-trans-}[\text{RuCl}(\text{cyclam})(\text{NO})]^{2+}$.

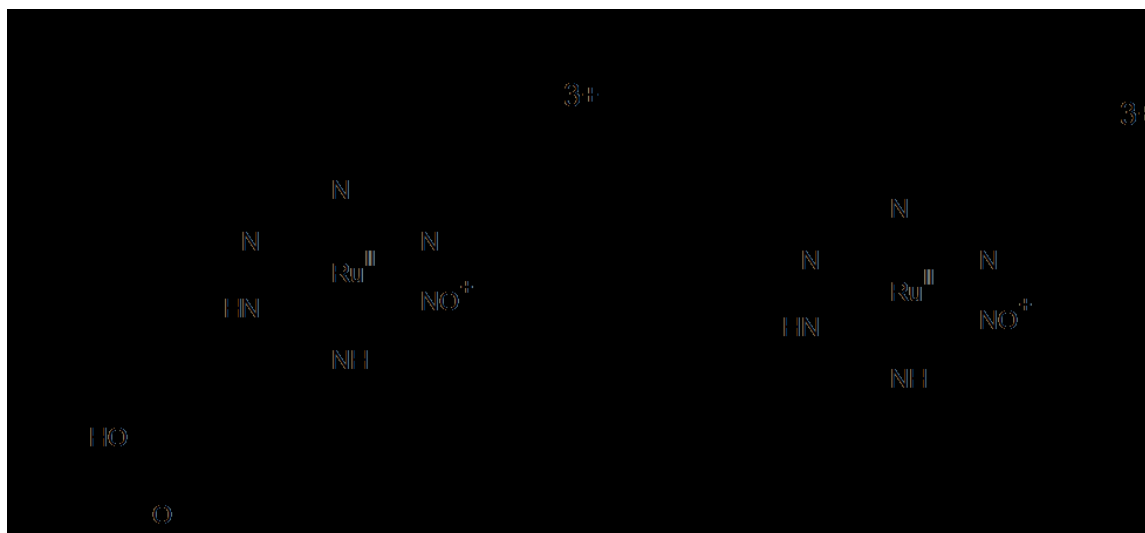


FONTE: LANG, et al., 2000.

de LIMA e colaboradores (2006) e MUNHOZ e colaboradores (2012), sintetizaram complexos nitrosilos de rutênio com co-ligantes dioxolenos, mais especificamente, diaminobenzenos, do tipo $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BDQ})(\text{NO})]^{3+}$ e $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BD})(\text{NO})]^{3+}$ – onde tpy=2,2':6',2''-

terpiridina; BDQ=ácido 3,4-diaminobenzóico; BD=*o*-fenilenodiamina – (Figura 3), pois, co-ligantes dioxolenos estão presentes em grande escala na natureza, além de atuarem em diversas funções biológicas, como o transporte de elétrons na respiração celular.

Figura 3 – Estruturas químicas dos complexos $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BDQ})(\text{NO})]^{3+}$ **(a)** e $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BD})(\text{NO})]^{3+}$ **(b)**.



Fonte: Adaptado de de LIMA, et al., 2006 **(a)**; MUNHOZ, et al., 2012 **(b)**.

BONAVENTURA e colaboradores (2009) constatou que o complexo sintetizado por de LIMA e colaboradores (2006), $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BDQ})(\text{NO})]^{3+}$ e $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BD})(\text{NO})]^{3+}$, propiciam a liberação controlada de NO com estímulos eletroquímicos e, ainda, que os perfis de relaxamento da aorta de camundongos em presença dos mesmos são semelhantes àqueles em presença do NPS. Concluíram, ainda, que os complexos $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BDQ})(\text{NO})]^{3+}$ e $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BD})(\text{NO})]^{3+}$, propiciam a liberação de NO, fato este que não é observado para o NPS que, conforme descrito anteriormente, além de ocasionar a reação de interesse, sendo esta a liberação de NO, propicia reações secundárias indesejadas, sendo uma destas a liberação de CN^- . Assim, os complexos $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BDQ})(\text{NO})]^{3+}$ e $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BD})(\text{NO})]^{3+}$ tornaram-se potenciais candidatos à agentes liberadores de NO e, conseqüentemente, potenciais pró-fármacos. Então, são necessários estudos acerca das interações destes complexos com biomoléculas que são responsáveis pelo armazenamento, transporte, metabolismo, excreção e, quando tratam-se de compostos de coordenação, a regulação das possíveis atividades dos mesmos no organismo, como a albumina humana (HSA).

1.3. Albumina Humana (HSA)

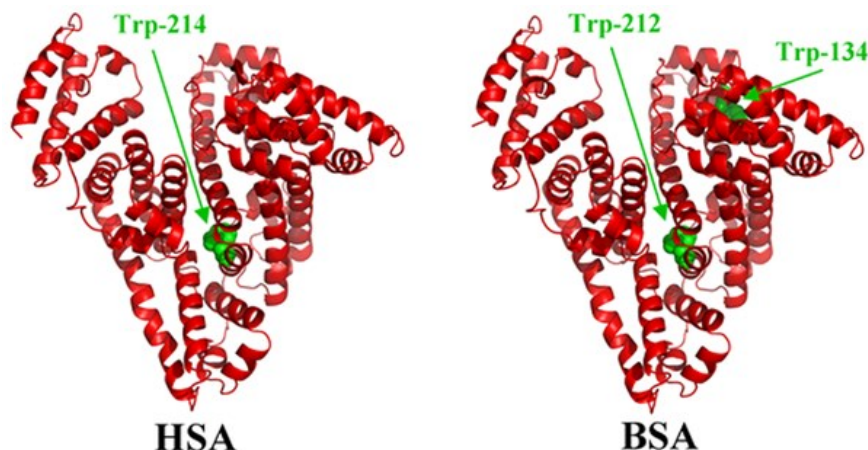
Estudos sobre as interações entre biomoléculas – que são responsáveis pelo armazenamento, transporte, metabolismo e excreção de ligantes, tanto endógenos quanto exógenos –, como a albumina, e fármacos em potencial, como os complexos nitrosilos de rutênio, são parâmetros de suma importância farmacológica. A interação entre tais espécies provoca a modificação estrutural da proteína e, conseqüentemente, a alteração das suas funções fisiológicas, e, possivelmente, ocasiona alterações dos comportamentos farmacodinâmicos dos fármacos em questão (HU, et al., 2006; SEEDHER & BHATIA, 2006; RANJBAR, et al., 2013; MOREIRA, et al., 2015).

Tais estudos podem ser realizados com as diferentes albuminas disponíveis, sendo algumas destas a albumina humana (HSA) e a albumina bovina (BSA). Atualmente, a BSA tem sido cada vez mais utilizada, devido à sua alta semelhança estrutural com a HSA e seu baixo custo. A BSA exibe 76% semelhança estrutural, se comparada à HSA e, ainda, 80% de sua sequência homóloga (PETERS JR., 1995; MOREIRA, et al., 2015).

As estruturas e as regiões de ligações preferenciais de fármacos, tanto da HSA quanto da BSA, são caracterizadas e determinadas via técnica de cristalografia (MOREIRA, et al., 2015). Tais regiões são classificadas em três grandes domínios, denominados de I, II e III. Cada um destes três domínios contém dois subdomínios, classificados em A e B. As principais regiões de ligações preferenciais de fármacos estão localizadas nos subdomínios IIA e IIIA, mais comumente denominadas Sítios I e II de Sudlow (PETERS JR., 1995).

A HSA possui 585 aminoácidos, sendo 17 resíduos de tirosina (Tyr) e apenas um resíduo de triptofano (Trp), denominado Trp-214, que está localizado na posição 214, situado no subdomínio IIA do arcabouço proteico, enquanto a BSA possui 582 aminoácidos, sendo 20 grupos de Tyr e dois fragmentos de Trp, denominados Trp-134 e Trp-212, que estão localizados nas posições 134 e 212, situados nos subdomínios IB e IIA, respectivamente. As estruturas terciárias da HSA e da BSA são apresentadas na Figura 4.

Figura 4 – Representações tridimensionais das estruturas terciárias da HSA e da BSA.

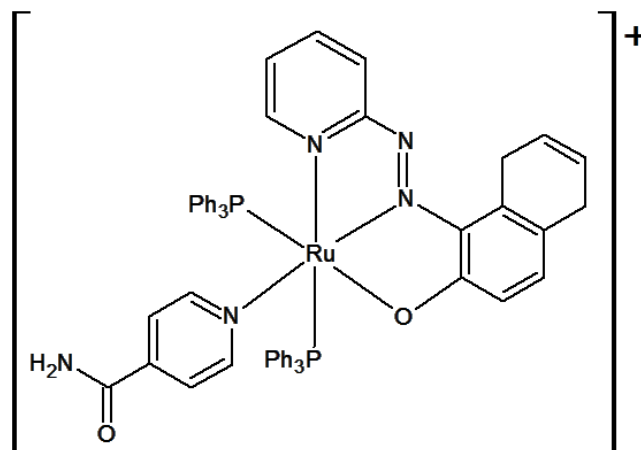


Fonte: BELATIK, et al., 2012.

Os estudos acerca das interações entre a HSA/BSA e fármacos em potencial dar-se-ão de diversas maneiras, sendo uma destas a técnica de espectroscopia de fluorescência. As soro albuminas, quando excitadas em $\lambda=280$ nm, exibem fluorescência intrínseca aos resíduos de aminoácidos aromáticos tirosina (Tyr), triptofano (Trp) e fenilalanina (Phe), com máximo de emissão em $\lambda=350$ nm, sendo que a emissão para os resíduos de Trp-214, da HSA, de Trp-134 e Trp-212, da BSA, são as mais significativas, devido ao microambiente proteico no qual tais resíduos estão situados (PETERS JR., 1995). Utilizando-se a técnica de espectroscopia de fluorescência, analisa-se, mais especificamente, a supressão de fluorescência da biomolécula induzida pela presença do fármaco. Posteriormente, utilizando-se dos espectros de supressão de fluorescência obtidos e de alguns tratamentos matemáticos, determina-se as constantes de ligação, os mecanismos, e, ainda, os parâmetros termodinâmicos da interação em questão (LAKOWICZ, 2006).

da SILVA e colaboradores (2014) constataram que o complexo $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{ISN})]^+$ – onde PAN=1-(2'-piridilazo)-2-naftolato e ISN=isonicotinamida – (Figura 5), interage com a BSA via um mecanismo dinâmico, e que a interação que propicia a retenção do derivado metálico no interior da biomolécula é determinada, basicamente, por interações hidrofóbicas. Concluíram, também, que o complexo de rutênio está inserido em um microambiente proteico referente ao Sítio I, subdomínio IIA.

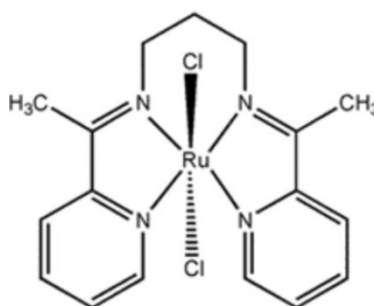
Figura 5 – Estrutura química do complexo $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{ISN})]^+$.



Fonte: da SILVA, et al., 2014.

MOREIRA e colaboradores (2015) constataram que o complexo $[\text{RuCl}_2(\text{L})]$ – onde $\text{L}=\text{N,N-bis(7-metil-2-piridilmetileno)-1,3-diminopropano}$ – (Figura 6), interage com a BSA via um mecanismo dinâmico, enquanto que interage com a HSA via um mecanismo estático e que, para ambas as biomoléculas, a interação que propicia a retenção do derivado metálico no interior das mesmas é determinada, basicamente, por interações hidrofóbicas. Concluíram, também, que o complexo de rutênio está inserido em um microambiente proteico referente ao Sítio II, subdomínio IB da BSA, enquanto está em um microambiente proteico referente ao Sítio I, subdomínio IIA da HSA.

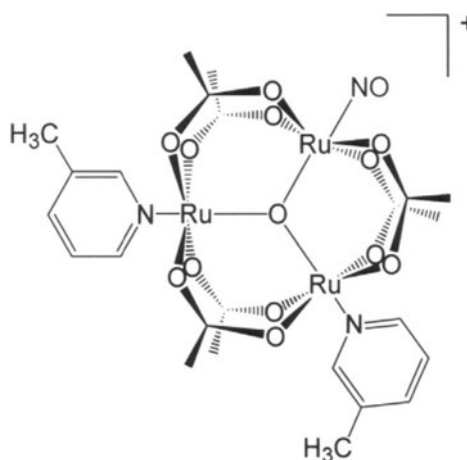
Figura 6 – Estrutura química do complexo $[\text{RuCl}_2(\text{L})]$.



Fonte: MOREIRA, et al., 2015.

CACITA & NIKOLAU (2016) constataram que o complexo nitrosilo de rutênio $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$ – onde 3-pic=3-metilpiridina – (Figura 7), interage com a HSA via um mecanismo dinâmico, e que a interação que propicia a retenção do derivado metálico no interior da biomolécula é determinada, basicamente, por interações hidrofóbicas.

Figura 7 – Estrutura química do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(3\text{-pic})_2(\text{NO})]^+$.



Fonte: CACITA & NIKOLAU (2016).

1.4. Espectroscopia de Fluorescência

Dentre os diversos fenômenos luminescentes, como bioluminescência, quimiluminescência, radioluminescência, sonoluminescência, termoluminescência e triboluminescência, possivelmente, aqueles que mais têm sido abordados são fluorescência e fosforescência (SOTOMAYOR, et al., 2008).

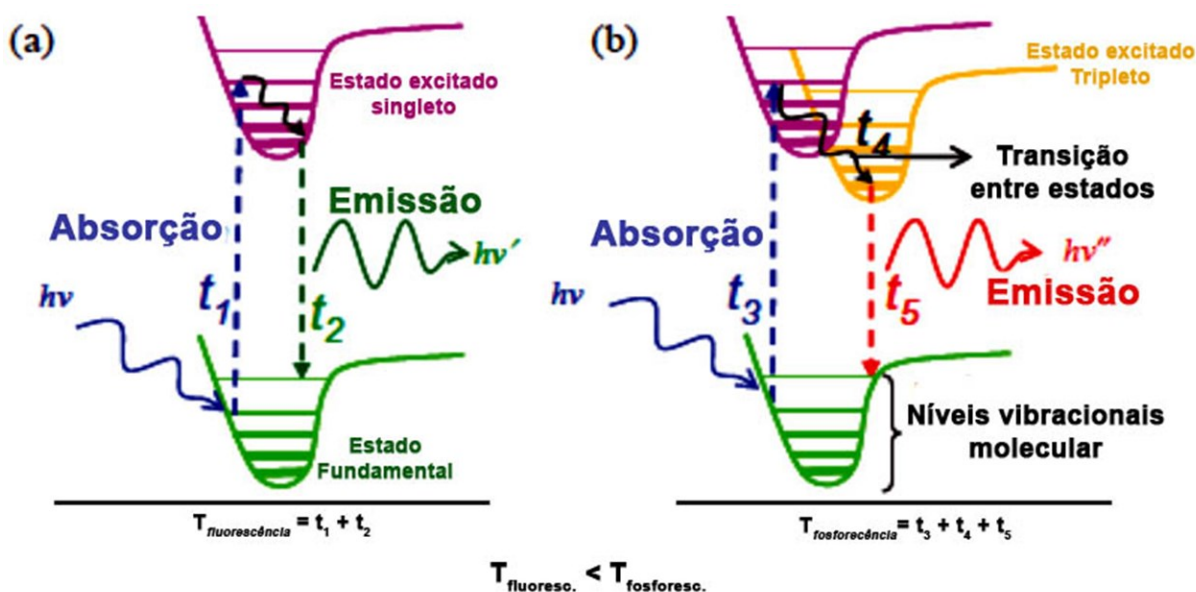
Os métodos de fluorescência e fosforescência, também denominados métodos fotoluminescentes, são baseados na excitação de uma molécula, via absorção de fótons, a qual é promovida, do estado fundamental para o estado excitado. Quando tal molécula retorna, do estado excitado para o estado fundamental, há a emissão de radiação eletromagnética na região do visível, sendo esta compreendida entre 400 e 700 nm. No entanto, é importante ressaltar que a excitação de uma molécula via absorção de fótons em fluorescência e fosforescência resultará em transições eletrônicas distintas (SOTOMAYOR, et al., 2008).

Na fluorescência, os elétrons são promovidos de um estado fundamental singleto, para um estado excitado singleto ($S_0 \rightarrow S_1$), conforme apresentado na Figura 8. Assim, não há a mudança do número quântico de spin dos elétrons. Então, os mesmos retornam, do estado excitado S_1 para um dos níveis vibracionais do estado fundamental S_0 . Portanto, a fluorescência exhibe tempos de vida extremamente curtos, da ordem de 10^{-9} a 10^{-6} s (LAKOWICZ, 2006).

Na fosforescência, os elétrons são promovidos de um estado fundamental singleto, para um estado excitado singleto ($S_0 \rightarrow S_1$) e, posteriormente, há o cruzamento intersistemas. Os

elétrons passam do estado excitado singlete para um estado excitado tripleto ($S_1 \rightarrow T_1$), também conforme apresentado na Figura 8. Assim, há a mudança do número quântico de spin dos elétrons. Então, os mesmos retornam, do estado excitado T_1 para um dos níveis vibracionais do estado fundamental S_0 . Portanto, a fosforescência exibe tempos de vida mais longos, se comparados àqueles para a fluorescência, da ordem de 10^{-4} a 10 s (LAKOWICZ, 2006).

Figura 8 – Representação das transições eletrônicas envolvidas nos fenômenos de fluorescência (a) e fosforescência (b).



Fonte: BONTURIM (2017).

Disponível em: <<http://nanoluminescent.blogspot.com/p/luminescencia.html>>.

A espectroscopia de fluorescência, especificamente, exibe alta seletividade e sensibilidade. A alta seletividade da espectroscopia de fluorescência é devido à quantidade limitada de espécies que possuam rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ) mensuráveis, ou seja, espécies que exibem fluorescência. Já a alta sensibilidade da técnica é em virtude do baixo sinal de fundo que as medidas de fluorescência apresentam, conferindo, assim, limites de detecção de até três ordens de grandeza menores, se comparados aqueles de diversas outras técnicas, como a espectroscopia na região do UV/Vis, os quais são da ordem de ng mL^{-1} (SOTOMAYOR, et al., 2008).

Considerando-se as inúmeras vantagens sobre a utilização da técnica de espectroscopia de fluorescência, como seletividade e sensibilidade, os principais estudos acerca das interações entre biomoléculas, como a albumina, e fármacos em potencial são realizados utilizando-se a técnica em questão, conforme descrito por LIU e colaboradores (2003);

SEENDHER & BHATIA (2006), da SILVA e colaboradores (2014), MOREIRA e colaboradores (2015), CACITA & NIKOLAU (2016), entre outros autores.

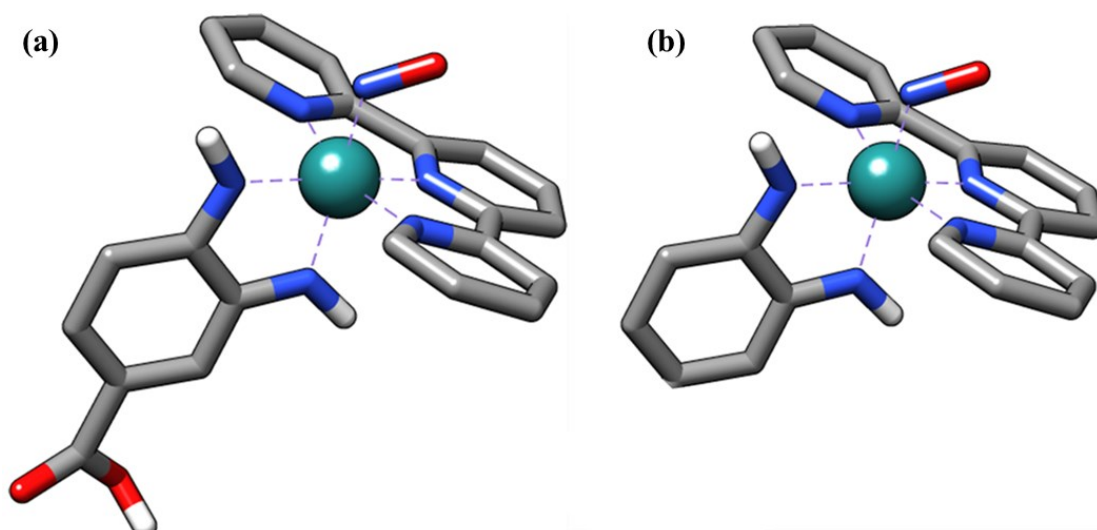
2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo avaliações espectroscópicas na região do UV/Vis. e de fluorescência acerca das interações entre albumina humana (HSA) e complexos nitrosilos de rutênio, do tipo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{tpy})(\text{BDQ})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (**RuBDQ**) e $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{tpy})(\text{BD})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (**RuBD**) – onde tpy=2,2':6',2''-terpiridina; BDQ=ácido 3,4-diaminobenzóico; e BD=*o*-fenilenodiamina.

As estruturas químicas dos complexos RuBDQ e RuBD são apresentadas na Figura 9.

Figura 9 – Estruturas químicas tridimensionais dos complexos RuBDQ (a) e RuBD (b).

(●) Rutênio; (—) Carbono; (—) Nitrogênio; (—) Oxigênio.



Fonte: Autora.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes

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

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

Reagentes	Pureza (%)	Procedência
Ácido clorídrico	-	Synth
Ácido 3,4-diaminobenzóico	97	Aldrich Chemicals
Ácido hexafluorofosfórico	98	Aldrich Chemicals
Ácido trifluoracético	-	Merck
Albumina humana	-	Aldrich Chemicals
Cloreto de lítio	99	Aldrich Chemicals
Cloreto de potássio	98	Synth
Cloreto de rutênio (III)	99,9	Aldrich Chemicals
Cloreto de sódio	98	Synth
Dihidrogenofosfato de sódio	99,5	Merck
Etanol	95	Qhemis
<i>o</i> -fenilenodiamina	98	Aldrich Chemicals
Hexafluorofosfato de amônio	95	Aldrich Chemicals
Hidróxido de sódio	97	Synth
Monohidrogenofosfato de sódio	99,5	Merck
Metanol	99,5	Merck
Nitrito de sódio	99	Merck
2,2':6',2''-terpiridina	98	Aldrich Chemicals
Trietilamina	85	Synth

Fonte: Autora.

3.2. Procedimentos Experimentais

3.2.1. Síntese dos Complexos Nitrosilos de Rutênio

3.2.1.1. Síntese do Complexo $[\text{RuCl}_3(\text{tpy})]$

O complexo $[\text{RuCl}_3(\text{tpy})]$ foi sintetizado conforme descrito por SULLIVAN e colaboradores (1980).

Em um balão de 50 mL foram colocados 0,3244 g de cloreto de rutênio ($\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) (1,57 mmol) e 0,2912 g do ligante 2,2'-6',2''-terpiridina (tpy) (1,25 mmol). Em seguida, os sólidos foram dissolvidos em 30 mL de metanol. A solução foi mantida sob refluxo ($T \cong 65^\circ\text{C}$) durante 3 h. Após esse tempo, a fim de promover-se a precipitação do sólido, a solução permaneceu 1 h em temperatura ambiente ($\approx 30^\circ\text{C}$). O precipitado marrom obtido foi filtrado e seco à vácuo.

Massa obtida: 0,4216 g. Rendimento: 61,18%.

3.2.1.2. Síntese do Complexo $[\text{RuCl}(\text{tpy})(\text{BDQ})]\text{PF}_6$

O complexo $[\text{RuCl}(\text{tpy})(\text{BDQ})]\text{PF}_6$ foi sintetizado conforme descrito por de LIMA e colaboradores (2006).

Em um balão de 50 mL foi colocada uma mistura de 40 mL de etanol e água (75 % de etanol e 25 % de água). Em seguida, foram adicionados 0,1783 g do complexo precursor $[\text{RuCl}_3(\text{tpy})]$ (0,40 mmol) e 0,1 mL de trietilamina (Et_3N) (0,72 mmol). Observou-se a mudança de coloração da solução, de marrom para roxa. A solução foi mantida sob agitação durante 30 min, para a redução do íon metálico, de Ru^{III} para Ru^{II} . Posterior à redução do íon metálico, foram adicionados 0,0173 g do ligante ácido 3,4-diaminobenzóico (BDQ) (0,11 mmol) e 20 mg de cloreto de lítio (LiCl) (0,47 mmol). A solução foi mantida sob refluxo ($T \cong 80^\circ\text{C}$) durante 4 h. Após esse tempo, foi adicionado 1 g de hexafluorofosfato de amônio (NH_4PF_6), para o fornecimento do contra-íon. Posteriormente, a solução permaneceu 24 h sob refrigeração. A fim de favorecer-se a formação de precipitado, a solução foi rotaevaporada. O precipitado roxo-avermelhado obtido foi filtrado e seco à vácuo.

Massa obtida: 0,0754 g. Rendimento: 28,03%.

3.2.1.3. Síntese do Complexo [Ru(tpy)(BDQ)NO](PF₆)₃

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

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

Massa obtida: 0,0271 g. Rendimento: 48,92%.

3.2.1.4. Síntese do Complexo [RuCl(tpy)(BD)]PF₆

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

Em um balão de 50 mL foi colocada uma mistura de 40 mL de etanol e água (75 % de etanol e 25 % de água). Em seguida, foram adicionados 0,1783 g do complexo precursor [RuCl₃(tpy)] (0,40 mmol) e 0,1 mL de trietilamina (Et₃N) (0,72 mmol). Observou-se a mudança de coloração da solução, de marrom para roxa. A solução foi mantida sob agitação durante 30 min, para a redução do íon metálico, de Ru^{III} para Ru^{II}. Posterior à redução do íon metálico, foram adicionados 0,0432 g do ligante *o*-fenilenodiamina (BD) (0,40 mmol) e 20 mg de cloreto de lítio (LiCl) (0,47 mmol). A solução foi mantida sob refluxo ($T \cong 80\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 4 h. Após esse tempo, foi adicionado 1 g de hexafluorofosfato de amônio (NH₄PF₆), para o fornecimento do contra-íon. Posteriormente, a solução permaneceu 24 h sob refrigeração. A fim de favorecer-se a formação de precipitado, a solução foi rotaevaporada. O precipitado roxo-avermelhado obtido foi filtrado e seco à vácuo.

Massa obtida: 0,2016 g. Rendimento: 80,41%.

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

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

Em um balão de 50 mL foram colocados 30 mL de água. Em seguida, foram adicionados 0,0826 g do complexo [RuCl(tpy)(BD)]PF₆ (0,13 mmol) e 0,0444 g de nitrito de sódio (NaNO₂) (0,64 mmol). Observou-se a mudança de coloração da solução, de roxa para vermelha. A solução foi mantida sob e refluxo ($T \cong 85\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 2 h. Após esse tempo, foi adicionado 1 mL de ácido hexafluorofosfórico (HPF₆), para o fornecimento do contra-íon. Observou-se a formação de um precipitado marrom. Posteriormente, a solução permaneceu 48 h sob refrigeração. O precipitado obtido foi filtrado e seco à vácuo.

Massa obtida: 0,0640 g Rendimento: 53,20%.

3.2.2. Preparação das Soluções

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

Para a preparação do PBS, foram pesados 0,9815 g de cloreto de potássio (KCl), 40 g de cloreto de sódio (NaCl), 1,0413g de dihidrogenofosfato de sódio (NaH₂PO₄) e 8,7100 g de monohidrogenofosfato de potássio (K₂HPO₄). Em seguida, os sólidos foram dissolvidos em de água ultrapura, totalizando 500 mL de PBS com pH=6,8. Para que o tampão atingisse o pH=7,4 foram diluídos 10 mL do PBS em 90 mL de água ultrapura, totalizando 100 mL de PBS com pH=7,4.

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

Para a preparação da solução estoque de HSA, foram pesados 0,0166 g de HSA. Em seguida, a proteína foi dissolvida em PBS (pH=7,4), totalizando 250 mL de solução.

Para a realização dos procedimentos a seguir, foram utilizadas soluções estoque de HSA recém-preparadas, visando a manutenção da estrutura proteica. Portanto, as soluções estoque de HSA eram descartadas ao final de um dia de experimentos.

3.2.2.3. Preparação da Solução Estoque dos Complexos Nitrosilos de Rutênio 1 mmol L⁻¹

Para a preparação da solução estoque de RuBDQ, foram pesados 0,0047 g de RuBDQ. Em seguida, o complexo foi dissolvido em PBS (pH=7,4), totalizando 5 mL de solução.

Para a preparação da solução estoque de RuBD, foram pesados 0,0045 g de RuBD. Em seguida, o complexo foi dissolvido em PBS (pH=7,4), totalizando 5 mL de solução.

Para a realização dos procedimentos a seguir, as soluções estoque dos complexos RuBDQ e RuBD foram mantidas protegidas da luz.

3.2.3. Caracterização dos Complexos Nitrosilos de Rutênio

3.2.3.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR)

Os espectros vibracionais na região do IR foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Perkin Elmer®, de modelo FT-IR Frontier Single Range. O equipamento utilizado pertence ao Grupo de Materiais Inorgânicos do Triângulo (GMIT), do Laboratório de Fotoquímica e Ciência de Materiais (LAFOT-CM), do Instituto de Química (IQ), da UFU.

As amostras foram analisadas em estado sólido, utilizando-se um acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante, sendo submetidas à varredura espectrofotométrica de 4000 à 220 cm⁻¹.

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

Os espectros de absorção na região do UV/Vis. foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo UV-Vis.-NIR Cary Series. O equipamento utilizado pertence ao Laboratório e Equipamentos Multiusuários do Pontal (LEMUP), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

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

3.2.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

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

A fase móvel constituiu-se de uma solução tampão fosfato em presença de 1% de ácido trifluoracético (pH=7,4). Para a preparação da fase móvel, foram pesados 0,6076 g de dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) e 0,8580 g de monohidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4); foram adicionados, ainda, 0,5 mL de ácido trifluoracético. Em seguida, os sólidos foram dissolvidos em água ultrapura. Para que o tampão atingisse o pH=7,4 foram adicionadas algumas gotas de uma solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} . A fase móvel utilizada foi uma mistura da solução tampão fosfato 1% de ácido trifluoracético (pH 7,4) e metanol (85:15) (v/v).

A eluição da fase móvel foi isocrática e o fluxo foi mantido em 0,8 mL min^{-1} . As amostras foram dissolvidas na respectiva fase móvel e foram injetados volumes de 20 μL .

3.2.4. Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio

3.2.4.1. Avaliação do Tempo de Interação entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo Cary Eclipse. O equipamento utilizado pertence ao Laboratório e Equipamentos Multiusuários do Pontal (LEMUP), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

Para os estudos dos tempos de interação entre a HSA e os complexos via espectroscopia de fluorescência, em uma cubeta de quartzo, foram colocados 3 mL de uma solução estoque de HSA 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS. Foi adicionada uma alíquota de 10 μL de uma solução estoque de complexo (RuBDQ ou RuBD) 1 mmol L^{-1} em PBS, obtendo-se uma solução de concentração 3,32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de complexo. A solução foi mantida sob incubação, protegida da luz.

A amostra foi excitada em 280 nm (janelas de excitação e emissão de 5 e 20 nm, respectivamente) e submetida à varredura espectrofotométrica de 290 à 500 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico.

O experimento foi realizado à temperatura controlada, de 308 K, e, a cada minuto, foram obtidos espectros de fluorescência.

3.2.4.2. Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia na Região do UV/Vis.

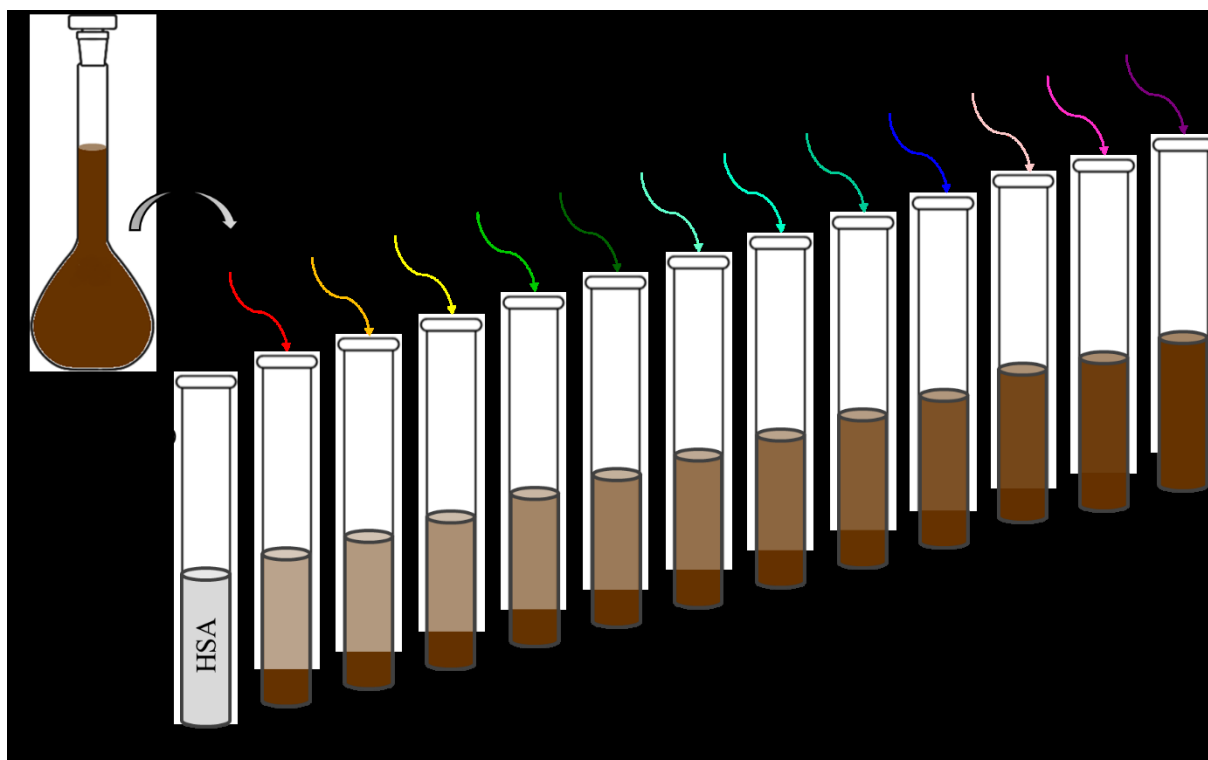
Os espectros de absorção na região do UV/Vis. foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo UV-Vis.-NIR Cary Series. O equipamento utilizado pertence ao Laboratório e Equipamentos Multiusuários do Pontal (LEMUP), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

Em uma cubeta de quartzo, foram colocados 3 mL de uma solução estoque de HSA $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS. Foi adicionada uma alíquota de 3 μL de uma solução estoque de complexo (RuBDQ ou RuBD) 1 mmol L^{-1} em PBS, obtendo-se uma solução de concentração $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de complexo. A solução foi mantida sob incubação durante 2 min, protegida da luz.

A amostra foi submetida à varredura espectrofotométrica de 800 à 200 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico. Foram preparadas outras soluções individuais, com alíquotas de 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 μL da solução do complexo (RuBDQ ou RuBD) 1 mmol L^{-1} , conforme apresentado na Figura 10, obtendo-se soluções de concentrações 1,7; 2,3; 3,3; 5,0; 6,6; 8,3; 9,9; 11,5; 13,2; 14,8; 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de complexo, respectivamente.

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

Figura 10 – Representação ilustrativa dos procedimentos experimentais realizados para a avaliação das interações entre a HSA e os complexos nitrosilos de rutênio.



Fonte: Autora.

3.2.4.3. Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR)

Os espectros vibracionais na região do IR foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo FTIR Cary 630. O equipamento utilizado pertence ao Laboratório e Equipamentos Multiusuários do Pontal (LEMUP), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

Para os estudos via espectroscopia na região do IR, as amostras preparadas qualitativamente, utilizando-se da solução estoque de HSA $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS e da solução estoque de complexo (RuBDQ ou RuBD) 1 mmol L^{-1} em PBS.

As amostras foram analisadas em estado líquido, com o auxílio de um acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante, sendo submetidas à varredura espectrofotométrica de 2000 a 1000 cm^{-1} . O PBS foi considerado na linha de base (branco).

3.2.4.4. Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo Cary Eclipse. O equipamento utilizado pertence ao Laboratório e Equipamentos Multiusuários do Pontal (LEMUP), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

Para os estudos via espectroscopia de fluorescência, foram utilizadas as mesmas amostras, preparadas conforme descrito na sessão 3.2.4.2.

As amostras foram excitadas em 280 nm (janelas de excitação e emissão de 5 e 20 nm, respectivamente) e submetidas à varredura espectrofotométrica de 290 à 500 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico.

Os experimentos foram realizados à temperatura controlada, de 298, 303 e 308 K, em duplicata, em ausência e presença ($1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) de fármacos marcadores, sendo estes ibuprofeno (IBU) e varfarina (WAR).

3.2.4.5. Determinação do Tempo de vida de fluorescência de Fluorescência da HSA no Estado Excitado em Ausência e Presença dos Complexos Nitrosilos de Rutênio

Os tempos de vida de fluorescência da HSA no estado excitado foram obtidos utilizando-se o método de contagem de fótons, com uma fonte de excitação Tsunami 3950 Spectra Physics, laser de titânio-safira e laser pulsado Millenia X Spectra Physics. Para a análise dos dados obtidos foi utilizado o software Edinburgh Instruments®. O equipamento utilizado pertence ao Departamento de Física, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras (FFCL), da USP.

Para os estudos dos tempos de vida de fluorescência da HSA no estado excitado, em uma cubeta de quartzo, foram colocados 3 mL de uma solução estoque de HSA $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS. Foram adicionadas alíquotas de uma solução estoque de complexo (RuBDQ ou RuBD) 1 mmol L^{-1} em PBS, obtendo-se soluções de concentração 0,0; 1,7; 5,0; 11,5; e $18,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de complexo. A solução foi mantida sob incubação durante 2 min. As amostras foram excitadas em 280 nm.

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

3.2.4.6. Determinação da Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET) entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio

As taxas de FRET foram obtidas conforme descrito por RANJBAR e colaboradores (2013).

A eficiência do processo de transferência de energia por ressonância de Förster, E , é dependente da distância entre o doador – neste caso, os resíduos de triptofano (Trp) e tirosina (Tyr) da HSA – e o receptor – neste caso, os complexos RuBDQ e RuBD. A mesma foi obtida utilizando-se a Equação 1,

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

onde F e F_0 são as intensidades de fluorescência do doador em presença e em ausência do receptor, respectivamente; R_0 , denominado raio de Förster, é a distância crítica entre o doador e o receptor onde a eficiência do processo é de 50%; e r_0 é a distância centro a centro entre o doador e o receptor. O valor de R_0^6 foi obtido utilizando-se a Equação 2,

$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \phi J \quad (2)$$

onde K é o fator de orientação espacial que descreve a geometria dos dipolos doadores e receptores; N é o índice de refração médio; ϕ é o rendimento quântico de fluorescência do doador em ausência do receptor; e J é o grau de sobreposição espectral entre espectro de emissão do doador e o espectro de absorção do receptor. O valor de J foi obtido utilizando-se o *software* *ae*, Fluortools, e a Equação 3,

$$J = \sum (\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda \quad (3)$$

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

Os espectros de emissão de fluorescência da HSA e de absorção do complexo (RuBDQ ou RuBD) foram sobrepostos, com o intuito de calcular-se a eficiência do processo de

transferência de energia por ressonância de Förster (E) e avaliar-se o grau de sobreposição (integral) entre os espectros (J) em questão.

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

Os espectros de fluorescência síncrona foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo Cary Eclipse. O equipamento utilizado pertence ao Laboratório e Equipamentos Multiusuários do Pontal (LEMUP), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

Para os estudos via espectroscopia de fluorescência síncrona, foram utilizadas as mesmas amostras, preparadas conforme descrito na sessão 3.2.4.2.

As amostras foram excitadas em 280 nm (janelas de excitação e emissão de 5 e 20 nm, respectivamente), utilizando-se fluorescência síncrona ($\Delta\lambda = 15 \text{ nm} / \Delta\lambda = 60 \text{ nm}$), e submetidas à varredura espectrofotométrica de 200 à 600 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1,000 cm de caminho óptico.

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

3.2.4.8. Avaliação dos Sítios de Interação entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Modelagem Molecular

- **Obtenção das Estruturas da HSA e dos Complexos RuBDQ e RuBD**

A estrutura da HSA foi obtida no banco de dados de proteínas *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics – Protein Data Bank®* (RCSC–PDB), identificada pelo código de modelo cristalográfico 5IJF.

As estruturas dos complexos RuBDQ e RuBD foram obtidas operando-se o programa Gaussian®, onde foram otimizadas e carregadas.

- **Preparação da Estrutura da HSA**

Os resíduos não proteicos da HSA, como átomos de Zn e moléculas de H₂O, foram removidos da proteína, operando-se o programa Pymol®.

Os átomos de H foram adicionados à mesma, explicitando átomos de H polares, operando-se o programa AutodockTools® (ADT), de versão 1.5.6.

As cargas Gasteiger para todos os átomos da HSA foram computadas e foram empregadas para a construção do arquivo de entrada *.pdbqt*, o qual foi utilizado no AutoGrid e durante os cálculos de ancoragem molecular.

A flexibilidade dos resíduos de Tyr-452 e Trp-214, presentes no Sítio I, no subdomínio IIA da HSA, foi considerada e foi empregada para a construção do arquivo de entrada *.pdbqt*, o qual foi utilizado no AutoGrid e durante os cálculos de ancoragem molecular.

- **Preparação das Estruturas dos Complexos RuBDQ e RuBD**

As estruturas dos complexos RuBDQ e RuBD foram empregadas para a construção do arquivo de entrada *.pdbqt*.

A detecção do átomo central, neste caso Ru^{II}, foi realizada, operando-se o programa AutodockTools® (ADT), de versão 1.5.6. O Ru^{II} foi empregado como referência nas rotações das estruturas dos complexos RuBDQ e RuBD durante os cálculos de ancoragem molecular.

- **Ancoragem Molecular (*Docking* Molecular)**

Os cálculos de ancoragem molecular foram realizados conforme descrito por LOKESH & KRISHNAN (2016), operando-se o programa AutoDock® (AD4), de versão 4.2.

O sítio ativo da HSA foi definido por uma caixa de grades centrada entre os resíduos de Tyr-452 e Trp-214, presentes no Sítio I, no subdomínio IIA da HSA, com um ajuste de 70×70×70 pontos e espaçamento de 0,375 Å. Tal caixa de grades centrada englobou todo o Sítio I da HSA, sendo que as dimensões deste foram definidas de modo que houvesse espaço suficiente para a caminhada, rotação e translação dos complexos RuBDQ e RuBD.

A busca local e a avaliação energética dos sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD foram realizadas utilizando-se o algoritmo genético Lamarckiano® (GA–LS) com um total de 100 execuções. Em cada uma das execuções foi utilizada uma população de 150 indivíduos, com 27000 gerações e com 2500000 avaliações de energia. Os valores padrões foram mantidos para a busca local e para os pesos do operador nos parâmetros de cruzamento (0,80), elitismo (1,00) e mutação (0,02).

Os parâmetros átomo central, neste caso Ru^{II}, sendo estes 2.96, 0.056, 12.0000, -0.00110, 0.0, 0.0, 0, -1, -1, 4, correspondentes a Rii, epsii, vol, solpar, Rij_hb, epij_bh, hbond, rec_index, map_index, bond_index, respectivamente, foram inseridos no arquivo de parâmetros do programa AutoDock® (AD4), de versão 4.2.

Os modelos de menor energia para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD foram analisados operando-se o programa Chimera®, de versão 1.13.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os complexos nitrosilos de rutênio utilizados no presente trabalho foram sintetizados conforme descrito por de LIMA e colaboradores (2006). Com o objetivo de avaliar-se suas propriedades físico-químicas e compará-las com a literatura, foram realizadas, análises espectroscópicas na região do IR e do UV/Vis e, também, análises via CLAE.

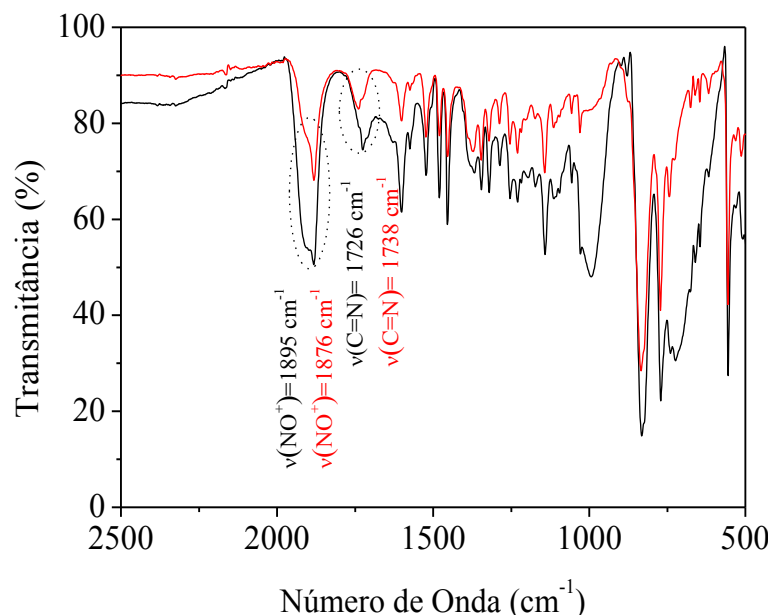
4.1. Caracterização dos Complexos Nitrosilos de Rutênio

4.1.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR)

Complexos de rutênio que possuem o ligante nitrosil, NO^+ , em suas esferas de coordenação são descritos, geralmente, como $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}^+$ (BOTTOMLEY, 1978; GUENGERICH & SCHUG, 1978; WALSH, et al., 1980; BORGES, et al., 1998; de LIMA, et al., 2006). Com o propósito de verificar-se a coordenação do ligante NO^+ ao íon metálico Ru^{II} , utilizou-se a técnica de espectroscopia na região do IR. Tal verificação dar-se-á pela observação estiramentos intensos entre 1970 e 1800 cm^{-1} . A variação das energias de estiramento do ligante nitrosil $\nu(\text{NO})$ é devido a influência da densidade eletrônica do íon metálico, ao estado de oxidação do ligante nitrosil, a estereoquímica do mesmo e, ainda, aos co-ligantes presentes na esfera de coordenação do complexo (SCHRÖDER & STEPHENSON, 1987; BATISTA, et al., 1997; FORD, et al., 1998).

Portanto, foram realizadas análises espectroscópicas na região do IR. Os espectros vibracionais obtidos para os complexos RuBDQ e RuBD são apresentados na Figura 11.

Figura 11 – Espectros vibracionais na região do IR para os complexos RuBDQ (–) e RuBD (–) em ATR.



Fonte: Autora.

Os espectros vibracionais para os complexos RuBDQ e RuBD, apresentados na Figura 11, exibem estiramentos em $\nu = 1895$ e 1876 cm^{-1} , respectivamente, atribuídos ao estiramento da ligação $\text{N}\equiv\text{O}^+$.

A diferença entre os valores obtidos dos estiramentos vibracionais atribuídos à ligação $\text{N}\equiv\text{O}^+$ está relacionada à diferença estrutural dos co-ligantes BDQ e BD, pois o co-ligante BDQ possui um substituinte carboxilato ($-\text{COOH}$). O substituinte carboxilato é um grupo funcional o qual retira densidade eletrônica do anel aromático no qual está ligado. Consequentemente, quando coordenado, o co-ligante BDQ retirará uma maior densidade eletrônica do centro metálico, neste caso, o íon metálico Ru^{II} , do que co-ligante BD, que não possui um grupo carboxilato. Assim, pode-se atribuir um maior caráter π -receptor para o co-ligante BDQ, se comparado àquele para o co-ligante BD. Então, considerando-se o maior caráter π -receptor para o co-ligante BDQ, pode-se inferir que a retro-doação $\text{Ru}^{\text{II}} \rightarrow \text{NO}^+$ no complexo RuBDQ é menor, do que àquela para o complexo RuBD. Quanto maior a intensidade da retro-doação, maior é a força da ligação $\text{N}\equiv\text{O}^+$ e, consequentemente, maior é a energia vibracional. Portanto, observa-se uma ligeira diferença entre os valores obtidos dos estiramentos vibracionais atribuídos à ligação $\text{N}\equiv\text{O}^+$, sendo tal valor maior para o complexo RuBDQ, se comparado àquele para o complexo RuBD.

Os mesmos espectros vibracionais para o complexo RuBDQ e RuBD, apresentados na Figura 11, exibem, ainda, estiramentos em $\nu=1726$ e 1738 cm^{-1} , respectivamente, atribuídos ao estiramento da ligação C=N. No entanto, os estiramentos vibracionais atribuídos à ligação C=N, geralmente, encontram-se entre 1675 e 1665 cm^{-1} (MASSUI, 1993).

A diferença entre os valores obtidos dos estiramentos vibracionais atribuídos à ligação C=N e àqueles contidos na literatura está relacionada, possivelmente, ao somatório dos efeitos σ -doador e π -receptor dos ligantes imínicos BDQ e BD, quando coordenados. Assim, pode-se atribuir uma maior energia para a ligação C=N. Portanto, observa-se uma ligeira diferença entre os valores obtidos dos estiramentos vibracionais atribuídos à ligação C=N e àqueles contidos na literatura.

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

Complexos nitrosilos de rutênio que possuem ligantes insaturados em suas esferas de coordenação, geralmente, apresentam bandas na região do UV e do visível, atribuídas a transições de campo ligante (CL), intra ligante (IL) e transferência de carga metal-ligante (TCML) (LEVER, 1984).

As transições de CL são observadas entre níveis energéticos localizados no metal – transições do tipo $d \rightarrow d$. As bandas são originadas devido ao desdobramento das energias dos orbitais d que, em um campo octaédrico, são descritos como t_{2g} e e_g .

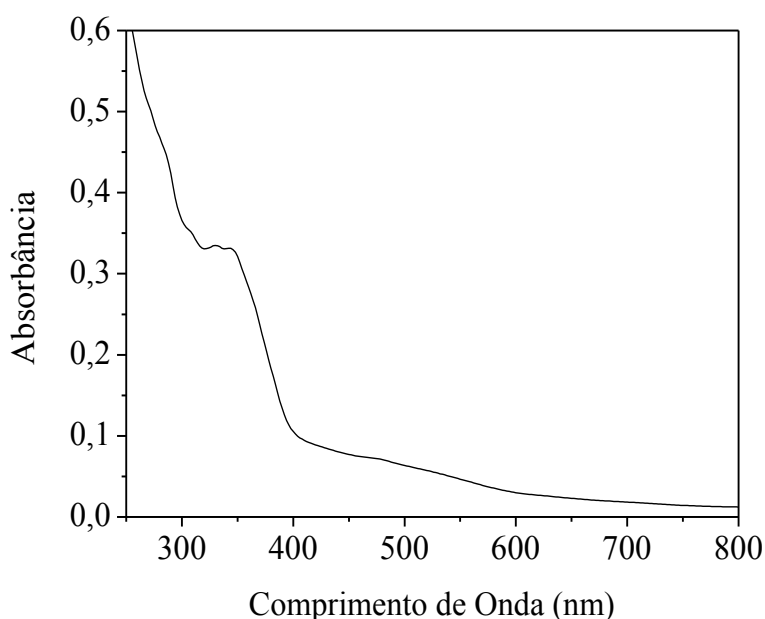
As transições IL são semelhantes àquelas observadas em ligantes insaturados não coordenados. Exemplificando-se, para ligantes aromáticos N-heterocíclicos não coordenados, as bandas são originadas a transições envolvendo elétrons livres (n) – transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ – ou, também, elétrons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

As transições de TCML são observadas em ligações π nos complexos de rutênio com ligantes insaturados – transições do tipo $d\pi(M) \rightarrow p\pi^*(L)$ (FORD, et al., 1968; TFOUNI & FORD, 1980). As bandas são originadas devido a existência de orbitais de simetria apropriada no metal e nos ligantes. Portanto, quando os elétrons do íon metálico encontrarem-se em orbitais de simetria π e os orbitais desocupados de menor energia dos ligantes também forem de simetria π , haverá transições do tipo $d\pi(M) \rightarrow p\pi^*(L)$.

Considerando-se que os complexos RuBDQ e RuBD são complexos já caracterizados, a fim de verificar-se as transições apresentadas pelos mesmos e posteriores comparações aos dados já reportados por de LIMA e colaboradores (2006) e HEINRICH (2013), utilizou-se a técnica de espectroscopia na região do UV/Vis.

Portanto, foram realizadas análises espectroscópicas na região do UV/Vis. O espectro de absorção obtido para o complexo RuBDQ é apresentado na Figura 12.

Figura 12 – Espectro de absorção na região do UV/Vis. para o complexo RuBDQ a $16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ em HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH=1,0).

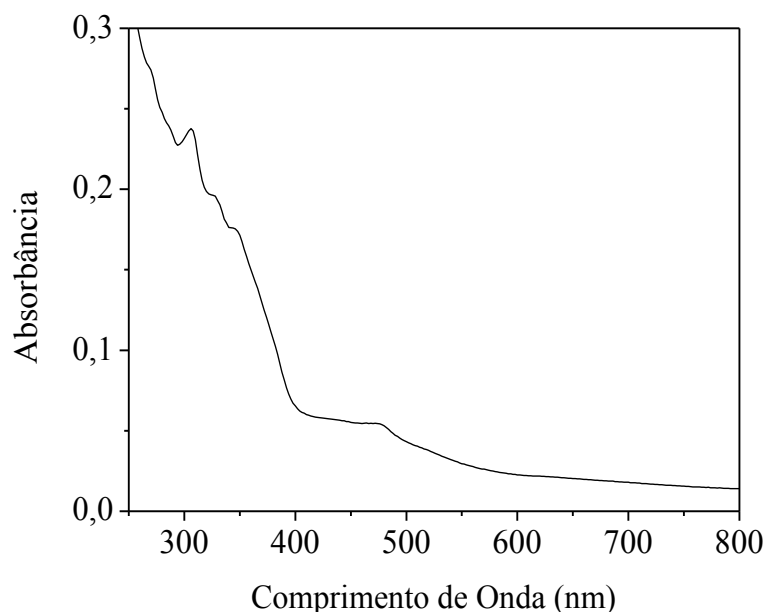


Fonte: Autora.

O espectro de absorção para o complexo RuBDQ, apresentado na Figura 12, exibe quatro bandas de absorção. Conforme reportado por de LIMA e colaboradores (2006), o espectro de absorção para o complexo RuBDQ, obtido nas mesmas condições utilizadas no presente trabalho, também apresenta quatro bandas de absorção. A primeira banda de absorção em $\lambda=281 \text{ nm}$ é atribuída à uma transição IL, devido às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes tpy e BDQ. A segunda banda de absorção em $\lambda=321 \text{ nm}$ é caracterizada como uma transição de TCML, devido à transição do tipo $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{tpy e BDQ})$. A terceira banda de absorção (ombro) em $\lambda=356 \text{ nm}$ é atribuída à uma transição de TCML, devido a transição do tipo $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{BDQ e NO}^+)$. A quarta banda de absorção em $\lambda=500 \text{ nm}$ é caracterizada como uma TCML, devido a transição do tipo $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{BDQ})$ (de LIMA, et al., 2006).

O espectro de absorção obtido para o complexo RuBD é apresentado na Figura 13.

Figura 13 – Espectro de absorção na região do UV/Vis. para o complexo RuBD a $16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ em HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH=1,0).



Fonte: Autora.

O espectro de absorção para o complexo RuBD, apresentado na Figura 13, assim, como àquele para o complexo RuBDQ, também exibe quatro bandas de absorção. Conforme reportado por HEINRICH (2013), o espectro de absorção para o complexo RuBD, obtido nas mesmas condições utilizadas no presente trabalho, também apresenta quatro bandas de absorção. A primeira banda de absorção em $\lambda = 285 \text{ nm}$ é atribuída à uma transição IL, devido às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes tpy e BD. A segunda banda de absorção em $\lambda = 304 \text{ nm}$ é caracterizada, também, como transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes tpy e BD. A terceira banda de absorção (ombro) em $\lambda = 328 \text{ nm}$ é atribuída à uma transição de TCML, devido a transição do tipo $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}^+)$. A quarta banda de absorção em $\lambda = 444 \text{ nm}$ é caracterizada como uma TCML, devido a transição do tipo $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{BD})$ (HEINRICH, 2013).

Na Tabela 2 apresentam-se os dados espectroscópicos para os complexos RuBDQ e RuBD, seus coeficientes de absortividade molar (ϵ) e suas atribuições.

Tabela 2 – Dados espectroscópicos para os complexos RuBDQ e RuBD, seus coeficientes de absortividade molar (ϵ) e suas atribuições.

Complexo	λ (nm)/log ϵ	λ (nm)/log ϵ	Atribuições
RuBDQ	281/4,38 ^a	285/4,39 ^b	$\pi \rightarrow \pi^*$ (tpy) e $\pi \rightarrow \pi^*$ (BDQ)
	321/4,24 ^a	324/4,27 ^b	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (tpy) e $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (BDQ)
	356/4,18 ^a	358/4,15 ^b	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (BDQ) e $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (NO^+)
	500/3,51 ^a	510/3,65 ^b	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (BDQ)
RuBD	285/4,16 ^a	285/4,39 ^c	$\pi \rightarrow \pi^*$ (tpy) e $\pi \rightarrow \pi^*$ (BD)
	304/4,16 ^a	304/4,31 ^c	$\pi \rightarrow \pi^*$ (tpy) e $\pi \rightarrow \pi^*$ (BD)
	328/4,07 ^a	328/4,27 ^c	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (NO^+)
	444/3,54 ^a	444/3,61 ^c	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (BD)

Fonte: ^aAutora; ^bde LIMA, et al., 2006; ^cHEINRICH, 2013.

^{a,b}Dados obtidos em meio de HCl 0,1 mol L⁻¹.

^cDados obtidos em meio de PBS (pH=7,4).

Os dados espectroscópicos obtidos para os complexos RuBDQ e RuBD, e àqueles reportados de LIMA e colaboradores (2006) e HEINRICH (2013), apresentados na Tabela 2, são relativamente próximos. A ligeira diferença entre os dados obtidos para o complexo RuBD e àqueles contidos na literatura está relacionada aos meios utilizados para a determinação dos valores de ϵ , pois, enquanto ao longo deste empregou-se meio de HCl 0,1 mol L⁻¹ (pH=1,0), na literatura utilizou-se meio de PBS (pH=7,4). Assim, conclui-se que os complexos RuBDQ e RuBD sintetizados fazem jus ao proposto na literatura.

4.1.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Complexos nitrosilos de rutênio que possuem ligantes polipiridinicos em suas esferas de coordenação, geralmente, em pH<7,0 a forma com o ligante nitrosil, $\text{Ru}^{\text{II}}\text{--NO}^+$, é a mais estável; enquanto em pH>7,0, a forma com o ligante nitro, $\text{Ru}^{\text{II}}\text{--NO}_2^-$, é a mais estável (SAUAIA & da SILVA, 2003; de SANTANA, et al., 2017). A conversão do ligante nitrosil a nitro é representada pelo Esquema 2.

Esquema 2 – Representação simplificada da conversão do ligante nitrosil a nitro de complexos de rutênio.

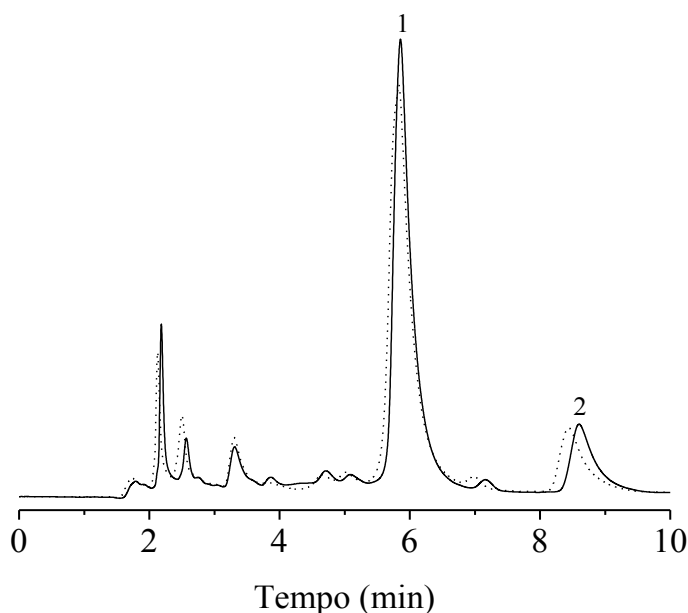


Conforme reportado por SAUAIA & da SILVA (2003), complexos do tipo *cis*-[RuL-(bpy)₂(NO)]³⁺, onde L=piridina (py), 4-picolina (4-pic) e 4-acetilpiridina (4-acpy) apresentaram $K_{\text{eq}} = 1,6 \times 10^{21}$, $3,8 \times 10^{20}$ e $3,2 \times 10^{21}$ para a conversão do ligante nitrosil a nitro, representada pelo Esquema 2. Assim, conclui-se que em pH>7,0, a forma Ru^{II}-NO₂⁻ é favorecida, em relação a forma Ru^{II}-NO⁺.

Considerando-se que os complexos RuBDQ e RuBD são potenciais agentes doadores de NO em condições fisiológicas (pH=7,4) (de LIMA, et al., 2006), com o intuito de verificar-se a estabilidade da forma Ru^{II}-NO⁺ dos mesmos em pH=7,4, utilizou-se a técnica de CLAE.

Portanto, foram realizadas análises cromatográficas. Os cromatogramas obtidos para o complexo RuBDQ são apresentados na Figura 14.

Figura 14 – Cromatogramas de separação do complexo RuBDQ. Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 1% de ácido trifluoracético:Metanol (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (—) e 2 h (---).

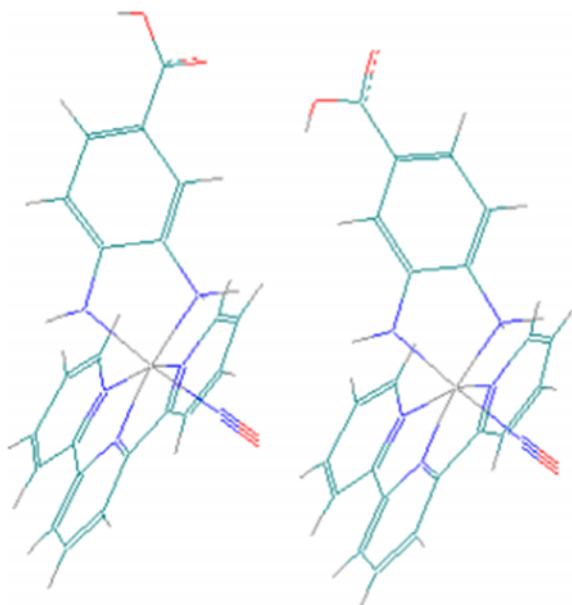


Fonte: Autora.

Ambos os cromatogramas de separação do complexo RuBDQ, apresentados na Figura 14, exibem picos, com diferentes tempos de retenção, sendo alguns destes de $t_{\text{r1}}=5,87$ e

t_{r2} = 8,59 min. Conforme reportado por de OLIVEIRA e colaboradores (2009), o cromatograma de separação do complexo RuBDQ, obtido nas mesmas condições utilizadas no presente trabalho, também apresenta dois picos. Através de análises via técnica de ressonância magnética nuclear (RMN), de OLIVEIRA e colaboradores verificaram que os picos 1 e 2, com tempos de retenção de 5,87 e 8,59 min, respectivamente, fazem referência aos isômeros de posição do complexo RuBDQ, considerando-se as diferentes conformações espaciais do complexo, à depender da posição do substituinte carboxila ($-\text{COOH}$) do ligante BDQ, conforme apresentado na Figura 15.

Figura 15 – Estruturas químicas dos isômeros do complexo RuBDQ.

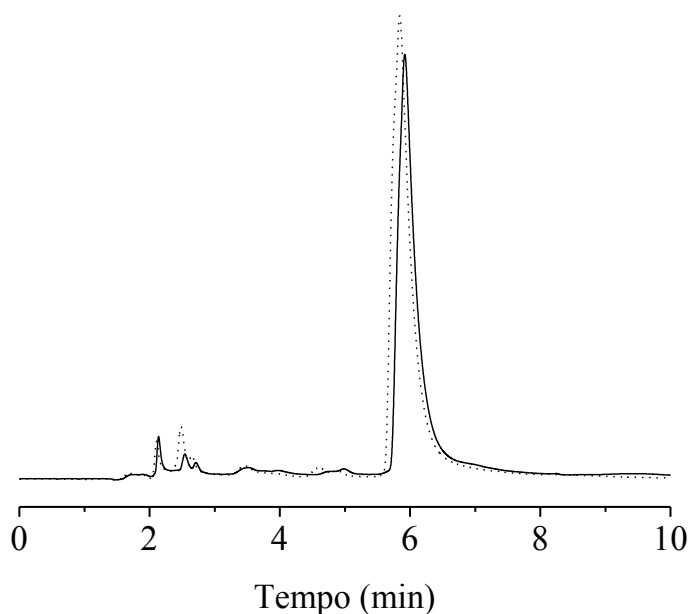


Fonte: de OLIVEIRA, et al., 2009.

Ainda analisando-se os cromatogramas de separação dos isômeros do complexo RuBDQ, apresentados na Figura 14, comparando-se os perfis obtidos em tempo zero e após 2 h de dissolução do complexo RuBDQ, observa-se que não houve aumento ou diminuição significativa dos picos exibidos, tampouco o aparecimento de quaisquer outros picos, que poderiam fazer referência aos isômeros do complexo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NO}_2^-)(\text{tpy})(\text{BDQ})](\text{PF}_6)_3$. Assim, pode-se concluir que, em $\text{pH}=7,4$, a forma com o ligante nitrosil, $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}^+$, no complexo RuBDQ é a mais estável após 2 h de dissolução do mesmo.

Os cromatogramas obtidos para o complexo RuBD são apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Cromatogramas de separação do complexo RuBD. Composição da fase móvel: Tampão fosfato a 1% de ácido trifluoracético:Metanol (85:15 v/v). Tempo após a dissolução do complexo: 0 h (–) e 2 h (---).



Fonte: Autora.

Ambos os cromatogramas de separação do complexo RuBD, apresentados na Figura 16, exibem apenas um pico, com tempo de retenção de $t_r=5,92$ min. Enquanto os cromatogramas obtidos para o complexo RuBDQ exibem dois picos, àqueles obtidos para o complexo RuBD exibem apenas um pico, devido à diferença estrutural dos ligantes BDQ e BD, pois o ligante BDQ possui um grupo carboxilato ($-\text{COOH}$). Como o ligante BD não possui um substituinte carboxilato ($-\text{COOH}$), não há a possibilidade de haver diferentes conformações espaciais do complexo RuBD.

Ainda analisando-se os cromatogramas de separação do complexo RuBD, apresentados na Figura 16, comparando-se os perfis obtidos em tempo zero e após 2 h de dissolução do complexo RuBD, observa-se que não houve aumento ou diminuição significativa do pico exibido, tampouco o aparecimento de qualquer outro pico, que poderia fazer referência ao complexo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NO}_2^-)(\text{tpy})(\text{BD})](\text{PF}_6)_3$. Assim, pode-se concluir que, em $\text{pH}=7,4$, a forma com o ligante nitrosil, $\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}^+$, no complexo RuBD é a mais estável após 2 h de dissolução do mesmo.

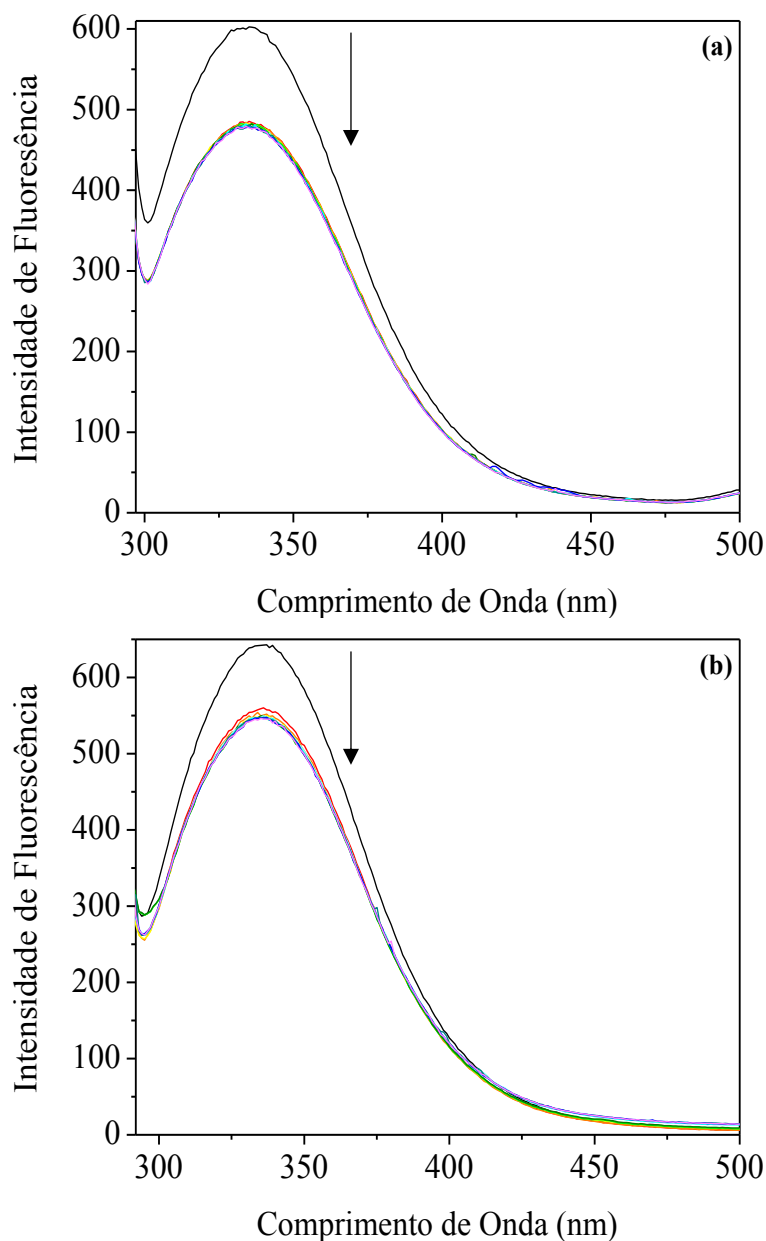
4.2. Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio

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

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

Portanto, foram realizadas análises espectroscópicas de fluorescência para a HSA em ausência e presença de uma alíquota dos complexos RuBDQ e RuBD a 308 K em função do tempo de incubação. Os espectros de fluorescência obtidos para a biomolécula em presença dos complexos RuBDQ e RuBD a 308 K são apresentados na Figura 17.

Figura 17 – Espectros de fluorescência para a HSA em presença dos complexos RuBDQ **(a)** e RuBD **(b)**, em PBS (pH=7,4) a 308 K. $\lambda_{exc}=280$ nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. [HSA]=1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (–); [Complexo]=3,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$; Tempo de incubação: 1 (–); 2 (–); 3 (–); 4 (–); 5 (–); 6 (–); 7 (–); 8 (–); 9 (–); 10 min (–).



Fonte: Autora.

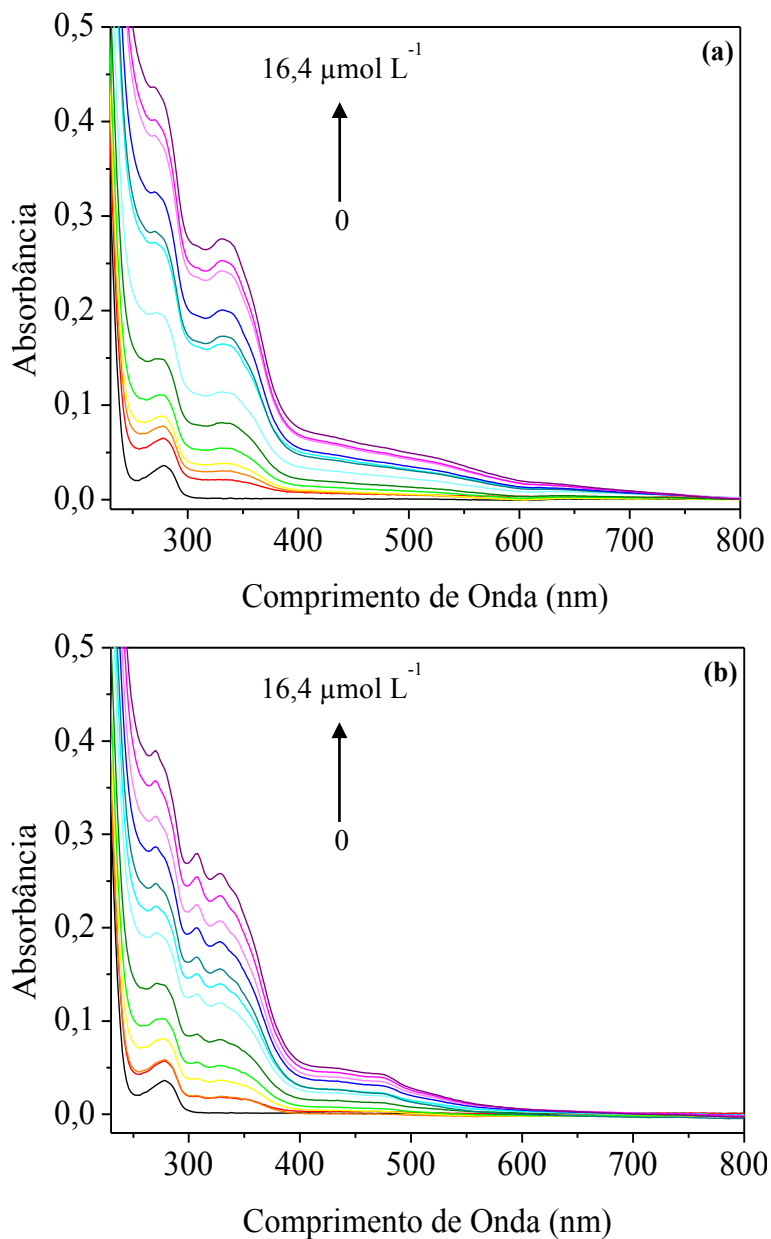
Os valores de intensidade de fluorescência obtidos para ambos os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD, apresentados na Figura 17, apresentam-se constantes quando o tempo de incubação é de 2 min. Assim, conclui-se que o tempo de interação entre a HSA e os complexos RuBDQ e RuBD é de 2 min.

4.2.2. Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia na Região do UV/Vis.

Os estudos a respeito das interações entre proteínas, como a HSA, e fármacos em potencial, como os complexos RuBDQ e RuBD, são parâmetros de suma importância farmacológica, pois ocorre a modificação estrutural da proteína e, consequentemente, a alteração das suas funções fisiológicas, como a distribuição e eliminação dos complexos. Podem ocorrer, ainda, alterações dos comportamentos farmacodinâmicos dos complexos (HU, et al., 2006; SEEDHER & BHATIA, 2006; RANJBAR, et al., 2013). Para tal, utilizou-se, inicialmente, a técnica de espectroscopia na região do UV/Vis.

Portanto, foram realizadas análises espectroscópicas na região do UV/Vis. para a HSA em ausência e presença de diferentes concentrações dos complexos RuBDQ e RuBD a 298, 303 e 308 K. Os espectros de absorção obtidos para a biomolécula e os complexos RuBDQ e RuBD a 308 K são apresentados na Figura 18.

Figura 18 – Espectros de absorção na região do UV/Vis. para a HSA e os complexos RuBDQ **(a)** e RuBD **(b)**, em PBS (pH=7,4) a 308 K. [HSA]=1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); [Complexo]=0-16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (—); 1,7 (—); 2,3 (—); 3,3 (—); 5,0 (—); 6,6 (—); 8,3 (—); 9,9 (—); 11,5 (—); 13,2 (—); 14,8 (—); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—)].



Fonte: Autora.

Os espectros de absorção para a HSA em ausência dos complexos RuBDQ e RuBD, apresentados na Figura 18, exibem uma banda de absorção em $\lambda=280\text{ nm}$ ($\epsilon_{280\text{nm}}=35700\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), devido às transições do tipo $\pi\rightarrow\pi^*$ dos aminoácidos aromáticos tirosina (Tyr), triptofano (Trp) e fenilalanina (Phe) (LIU, et al., 2003; YUE, et al., 2009; RANJBAR, et al., 2013).

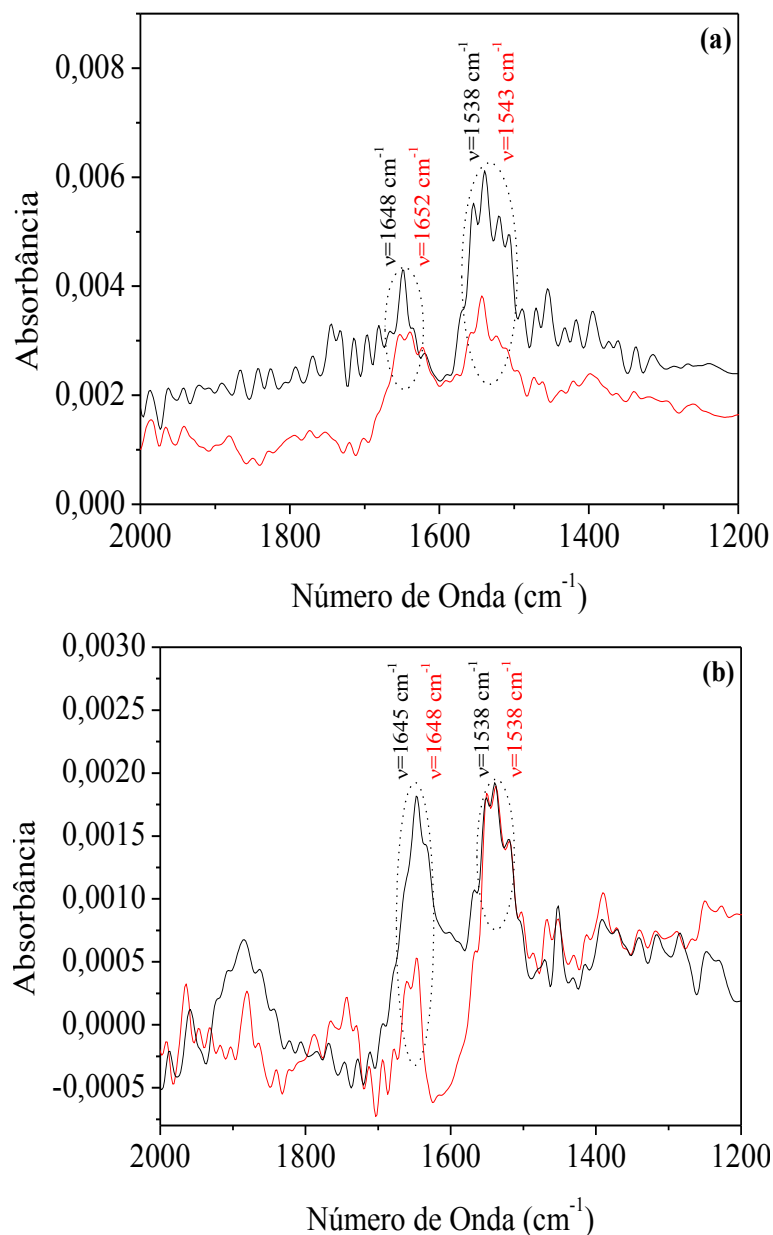
Os espectros de absorção para a HSA em presença de diferentes concentrações dos complexos RuBDQ e RuBD, também apresentados na Figura 18, exibem bandas de absorção características dos complexos. Quanto maior a concentração dos complexos, maiores foram as intensidades das bandas de absorção, conforme o Princípio das Aditividades das Absorbâncias (HARRIS, 2001). Como não houvera alterações nos perfis espectrais após a adição dos complexos, como o deslocamento das bandas para maiores comprimentos de onda (efeito batocrômico) ou para menores comprimentos de onda (efeito hipsocrômico), não é possível afirmar, apenas com os dados obtidos via técnica de UV/Vis., se há ou não a interação entre a HSA e os complexos. Portanto, ainda a fim de investigar-se as interações entre a HSA e os mesmos, utilizou-se a técnica de espectroscopia na região do IR.

4.2.3. Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia na Região do IR

Com o intuito de investigar-se as interações entre a HSA e os complexos em questão, utilizou-se, também, a técnica de espectroscopia na região do IR, analisando-se, mais especificamente, possíveis variações nos valores dos estiramentos vibracionais atribuídos à HSA e aos complexos RuBDQ e RuBD.

Portanto, foram realizadas análises espectroscópicas na região do IR para a HSA em ausência e presença dos complexos RuBDQ. Os espectros vibracionais obtidos para a biomolécula e os complexos RuBDQ e RuBD são apresentados na Figura 19.

Figura 19 – Espectros vibracionais na região do IR para a HSA em ausência (–) e em presença (–) dos complexos RuBDQ (a) e RuBD (b).



Fonte: Autora.

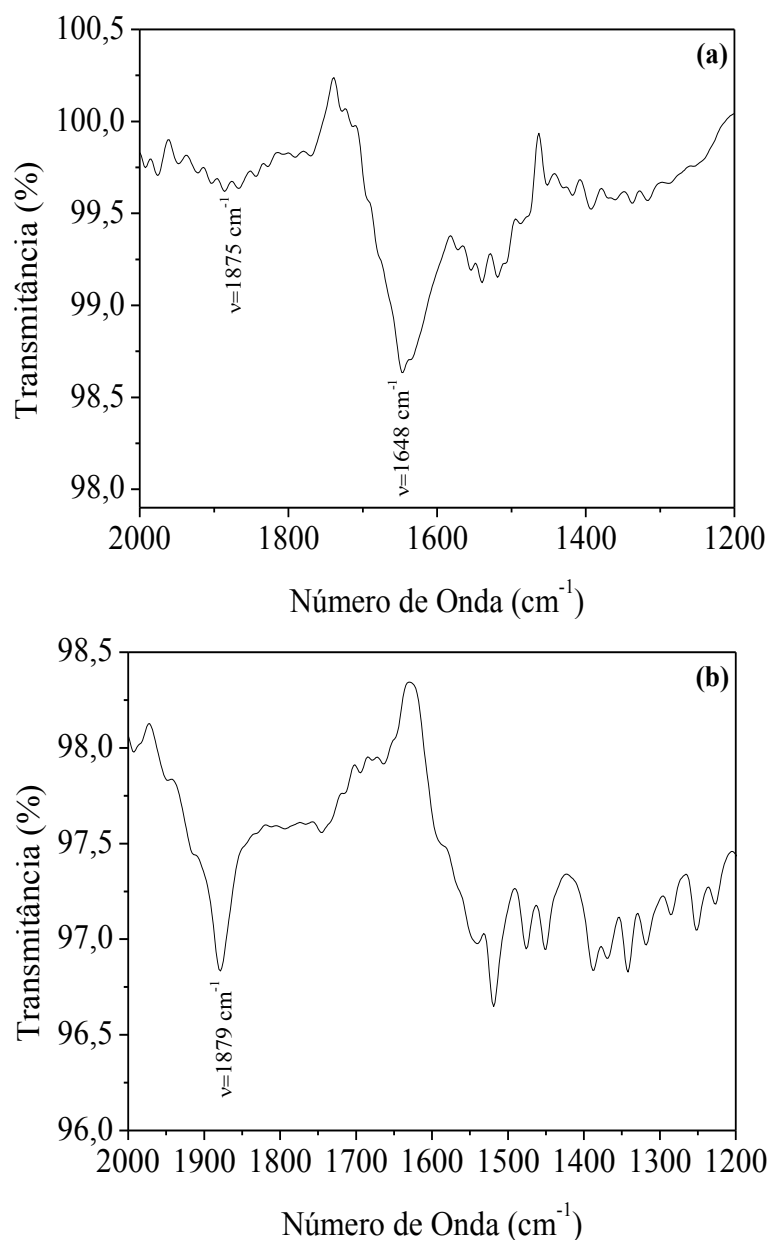
Os espectros vibracionais para a HSA em ausência dos complexos RuBDQ e RuBD, apresentados na Figura 19, exibem estiramentos em $\nu=1648$ e 1538 cm^{-1} , atribuídos ao estiramento de deformação axial da ligação C=O da amida I e ao estiramento de deformação angular da ligação CN-N-H da amida II, respectivamente. O estiramento da ligação C=N da amida III não foi observado, devido à sensibilidade do mesmo, que é menor, se comparada àquela para a amida I e, ainda, para a amida II (CUI, et al., 2004).

O espectro vibracional para a HSA em presença do complexo RuBDQ, apresentado na Figura 19(a), exibe deslocamentos dos estiramentos em $\nu=1648$ e 1538 cm^{-1} para $\nu=1652$ e 1543 cm^{-1} e, ainda, menores valores de absorbância, se comparados àqueles em ausência do complexo. Tais alterações nos perfis espectrais são devido às mudanças conformacionais dos microambientes proteicos próximos aos resíduos de aminoácidos que contém grupos C=O e C=N. Assim, constata-se que há a interação entre os resíduos de aminoácidos da HSA, os quais contém grupos C=O e C=N da HSA e o complexo RuBDQ, modificando a estrutura secundária da biomolécula.

O espectro vibracional para a HSA em presença do complexo RuBD, apresentado na Figura 19(b), exibe somente deslocamento do estiramento em $\nu=1645\text{ cm}^{-1}$ para $\nu=1648\text{ cm}^{-1}$ e, ainda, menor valor de absorbância, se comparados àquele em ausência do complexo. Tal alteração nos perfis espectrais é devido às mudanças conformacionais dos microambientes proteicos próximos aos resíduos de aminoácidos que contém grupos C=O. Então, conclui-se que há a interação entre os resíduos de aminoácidos da HSA, os quais contém grupos C=O, e o complexo RuBD, modificando a estrutura secundária da biomolécula.

Os espectros vibracionais obtidos para a biomolécula e os complexos RuBDQ e RuBD, para analisar-se, mais especificamente, possíveis variações nos valores dos estiramentos vibracionais atribuídos à ligação $\text{Ru-N}\equiv\text{O}^+$, são apresentados na Figura 20.

Figura 20 – Espectros vibracionais na região do IR para os complexos RuBDQ (a) e RuBD (b) em presença da HSA.



Fonte: Autora.

Conforme descrito na sessão 4.1.1, os complexos RuBDQ e RuBD exibem estiramentos vibracionais característicos em $\nu=1895$ e 1876 cm^{-1} , respectivamente, referentes à ligação Ru–N≡O⁺.

O espectro vibracional para o complexo RuBDQ em presença da HSA, apresentado na Figura 20(a), exibe estiramentos em $\nu=1875$ e 1648 cm^{-1} . Conforme reportado na sessão 4.1.1, o estiramento em $\nu=1875\text{ cm}^{-1}$ é referente ao estiramento da ligação N≡O⁺, porém, com menores valores de intensidade, se comparados àquele em ausência da HSA. O estiramento em

$\nu=1648\text{ cm}^{-1}$ é referente ao estiramento da ligação $\text{N}\equiv\text{O}^0$ (DE, et al., 2011). Assim, deduz-se que, possivelmente, há a interação entre a HSA e o complexo RuBDQ e, ainda, que há a conversão do ligante nitrosil, de NO^+ para de NO^0 . Tal ligante NO^0 permanece coordenado ao metal.

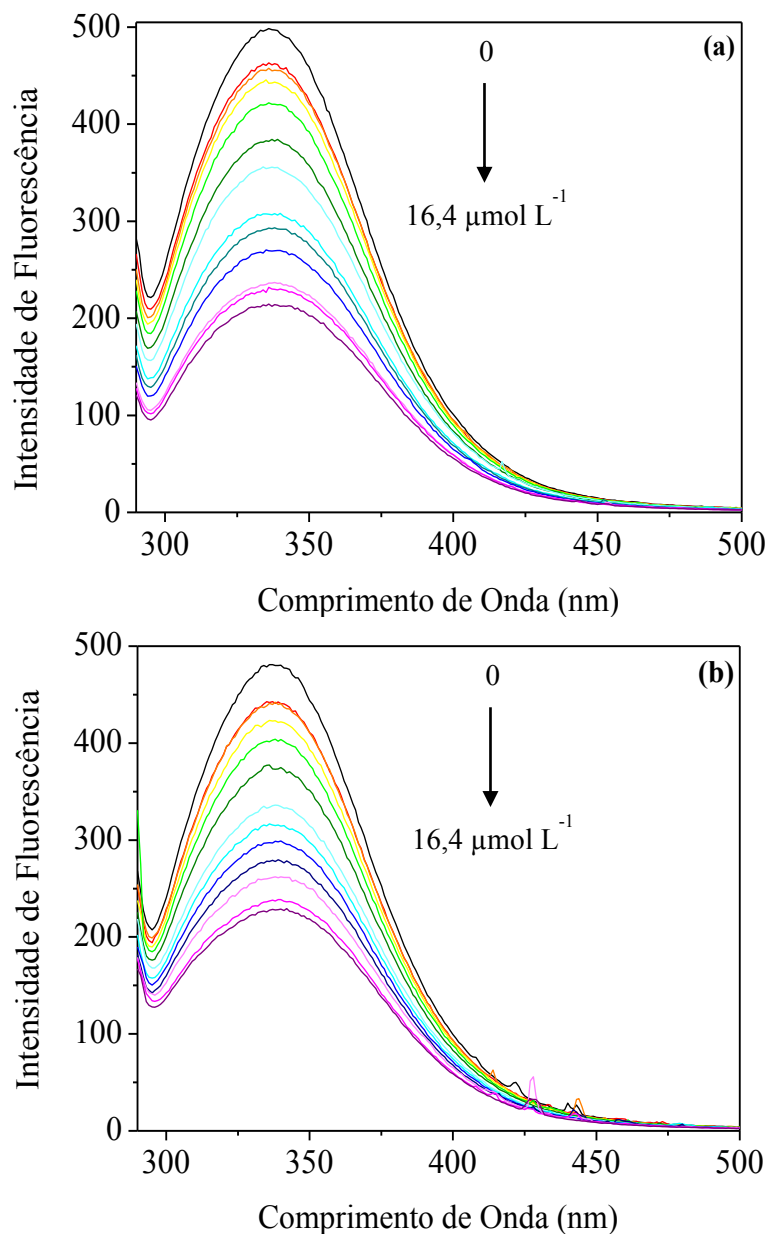
O espectro vibracional para o complexo RuBD em presença da HSA, apresentado na Figura 20(b), exibiu somente estiramento em $\nu=1879\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento da ligação $\text{N}\equiv\text{O}^+$.

4.2.4. Avaliação das Interações entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência

Com propósito de obter-se os parâmetros sobre as interações entre a HSA e os complexos RuBDQ e RuBD, como as constantes de ligação, os mecanismos, e, ainda, os parâmetros termodinâmicos, utilizou-se a técnica de espectroscopia de fluorescência, analisando-se, mais especificamente, a supressão de fluorescência da HSA induzida pela presença dos complexos. Utilizando-se dos espectros de supressão de fluorescência e de alguns tratamentos matemáticos, determina-se tais parâmetros acerca das interações entre a HSA e os mesmos (LAKOWICZ, 2006; MOREIRA, et al., 2015).

Portanto, foram realizadas análises espectroscópicas de fluorescência para a HSA em ausência e presença de diferentes concentrações dos complexos RuBDQ e RuBD a 298, 303 e 308 K. Os espectros de supressão de fluorescência obtidos para a biomolécula em presença dos complexos RuBDQ e RuBD a 308 K são apresentados na Figura 21.

Figura 21 – Espectros de supressão de fluorescência para a HSA em presença dos complexos RuBDQ **(a)** e RuBD **(b)**, em PBS (pH=7,4) a 308 K. $\lambda_{exc}=280$ nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. [HSA]=1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (–); [Complexo]=0-16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (–); 1,7 (–); 2,3 (–); 3,3 (–); 5,0 (–); 6,6 (–); 8,3 (–); 9,9 (–); 11,5 (–); 13,2 (–); 14,8 (–); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (–)].



Fonte: Autora.

Os espectros de emissão para a HSA em ausência dos complexos RuBDQ e RuBD, apresentados na Figura 21, exibem um máximo de emissão em $\lambda=335$ nm, fluorescência intrínseca dos aminoácidos aromáticos Tyr, Trp e Phe (PETERS JR., 1995; EFTINK, et al., 2000; MOREIRA, et al., 2015).

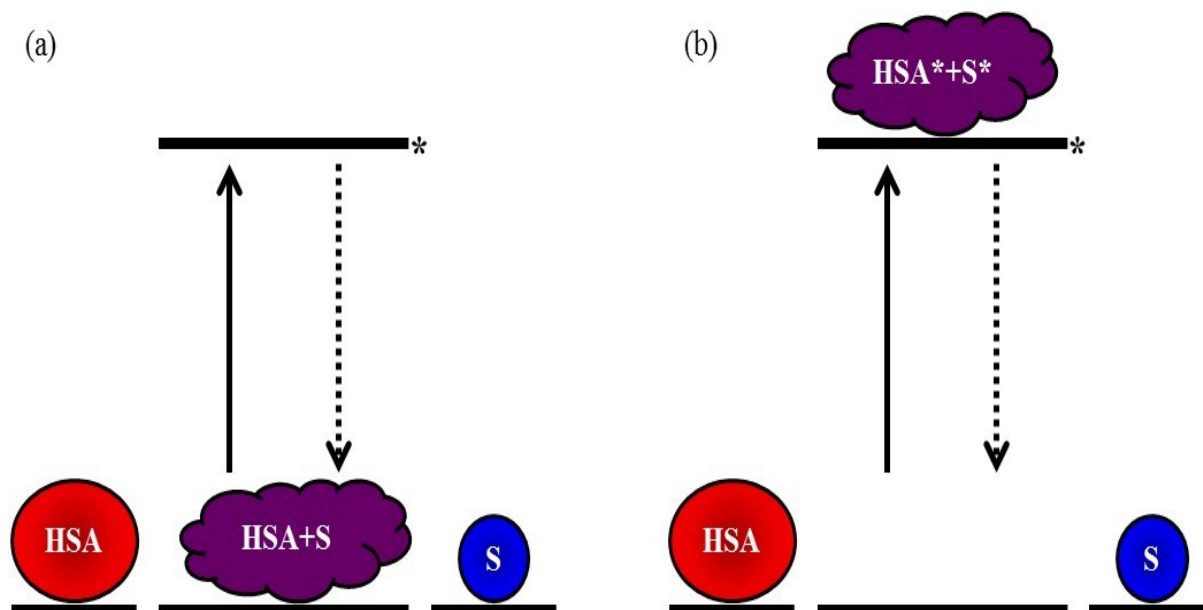
Os espectros de emissão para a HSA em presença dos complexos RuBDQ e RuBD, também exibem máximos de emissão em $\lambda=335$ nm (ou seja, não foram verificadas alterações nos máximos de emissão), porém, com menores valores de intensidade de fluorescência, se comparados àqueles em ausência dos complexos. Quanto maior a concentração dos complexos, menores são as intensidades de fluorescência. Tal diminuição das intensidades de fluorescência é devido às mudanças conformacionais dos microambientes proteicos próximos aos resíduos de aminoácidos, mais especificamente, aos resíduos de Tyr e Trp. Assim, é possível afirmar, novamente, que há a interação entre a HSA e os complexos RuBDQ e RuBD (NAVEENRAJ & ANANDAN, 2013; MOREIRA, et al., 2015).

4.2.4.1. Mecanismos de Supressão de Fluorescência

A determinação dos mecanismos das interações faz-se essencial, a fim de investigar-se se os mecanismos das interações HSA–RuBDQ e HSA–RuBD são estáticos ou dinâmicos.

No mecanismo estático ou, também denominado, processo de supressão estática da fluorescência, há a colisão entre o fluoróforo e o supressor no estado fundamental, ocasionando a formação de um complexo não fluorescente (LAKOWICZ, 2006; MOREIRA, et al., 2015). No mecanismo dinâmico ou, também denominado, processo de supressão dinâmico da fluorescência, há a colisão entre o fluoróforo e o supressor no estado excitado, ocasionando a formação de um complexo não fluorescente no estado excitado, o qual retorna ao estado fundamental, consequentemente, sem fluorescência (LAKOWICZ, 2006). A representação ilustrativa dos mecanismos estático e dinâmico é apresentada na Figura 22.

Figura 22 – Representação ilustrativa dos possíveis mecanismos de interação entre a HSA e o supressor (S). **(a)** Mecanismo estático; **(b)** Mecanismo dinâmico.



Fonte: Autora.

A distinção dos mecanismos estáticos ou dinâmicos dar-se-á analisando-se a tendência da Constante de Stern-Volmer (K_{SV}), a depender da temperatura (LAKOWICZ, 2006).

No mecanismo estático, a elevação da temperatura diminuirá a estabilidade deste complexo formado e, conseqüentemente, haverá a diminuição de K_{SV} . No mecanismo dinâmico, a elevação da temperatura diminuirá a viscosidade do meio, favorecendo a difusão do supressor em direção à espécie fluorófora no estado excitado e, conseqüentemente, haverá o aumento de K_{SV} (LAKOWICZ, 2006).

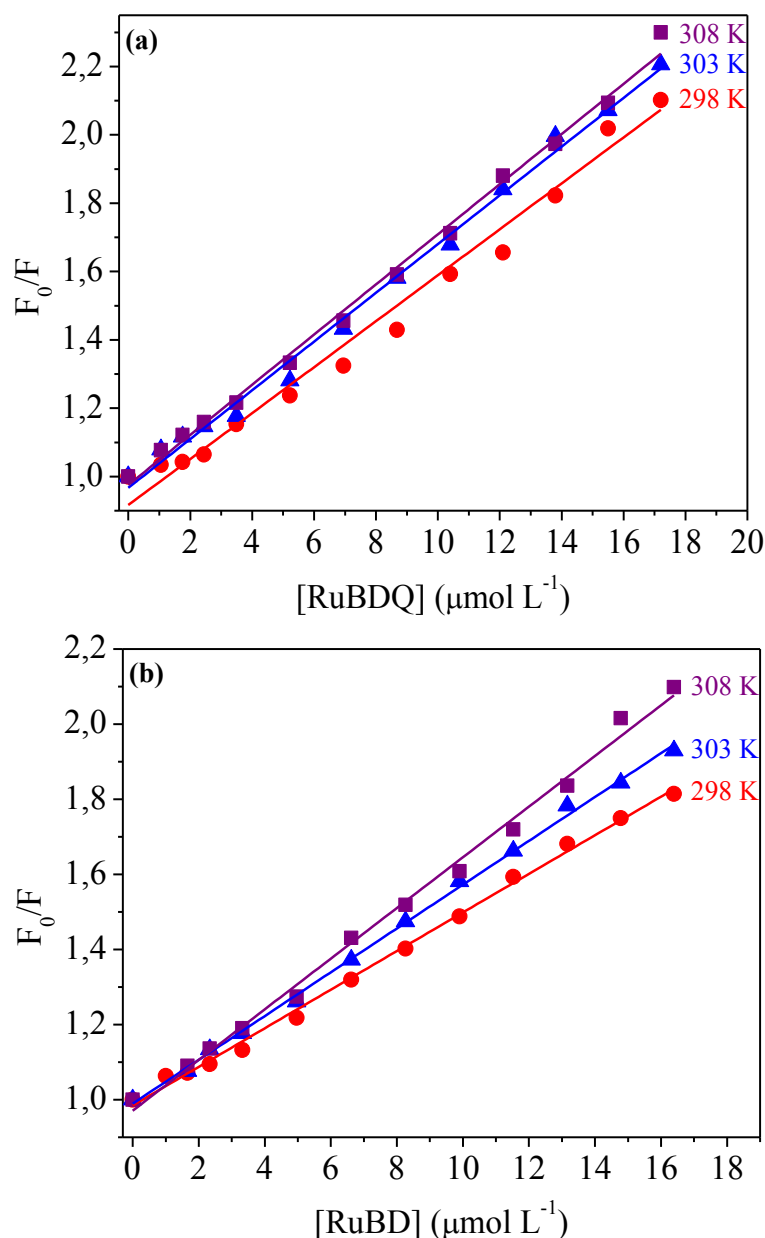
Portanto, com o intuito de distinguir-se se são mecanismos estáticos ou dinâmicos, analisa-se a tendência de K_{SV} , a depender da temperatura. As constantes foram obtidas utilizando-se a Equação 4 (Equação de Stern-Volmer),

$$F_0/F = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad (4)$$

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

$k_q\tau_0$ (LAKOWICZ, 2006). Os gráficos de F_0/F em função da concentração dos complexos RuBDQ e RuBD são apresentados na Figura 23.

Figura 23 – Gráficos de Stern-Volmer acerca das interações entre a HSA e os complexos RuBDQ (a) e RuBD (b), em PBS (pH=7,4) em diferentes temperaturas. $\lambda_{exc}=280$ nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm.



Fonte: Autora.

Os gráficos de F_0/F em função da concentração dos complexos RuBDQ e RuBD, apresentados na Figura 23, exibem perfis lineares e, utilizando-se de regressões lineares, foram

calculados os valores de K_{SV} para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD em diferentes temperaturas.

Os valores de K_{SV} calculados para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD em diferentes temperaturas são apresentados na Tabela 3. A partir dos valores de K_{SV} calculados para os sistemas em questão, sabendo-se que $K_{SV} = k_q \tau_0$ e que $\tau_0 = 10^{-8}$ s, foram calculados, ainda, os valores de k_q para os mesmos (Tabela 3).

Tabela 3 – Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) e constantes de velocidade bimolecular de supressão (k_q) para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD em diferentes temperaturas.

Sistema	T (K)	K_{SV} ($\times 10^4$ L mol ⁻¹)	k_q ($\times 10^{12}$ L mol ⁻¹ s ⁻¹)	R^2
HSA–RuBDQ	298	$6,50 \pm 0,71$	$6,50 \pm 0,71$	0,9935
	303	$7,30 \pm 0,14$	$7,30 \pm 0,14$	0,9914
	308	$7,25 \pm 0,21$	$7,25 \pm 0,21$	0,9836
HSA–RuBD	298	$5,40 \pm 0,30$	$5,40 \pm 0,30$	0,9966
	303	$6,40 \pm 0,30$	$6,40 \pm 0,30$	0,9982
	308	$6,70 \pm 0,50$	$6,70 \pm 0,50$	0,9946

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão de experimentos realizados em duplicata.

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

Fonte: Autora.

Os valores de K_{SV} calculados para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD, apresentados na Tabela 3, exibem a tendência de elevarem-se com o aumento da temperatura. Assim, conclui-se que há a interação entre a HSA e os complexos via mecanismo dinâmico (RANJBAR, et al., 2013).

Os valores de k_q calculados para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD, também apresentados na Tabela 3, exibem a tendência elevarem-se com o aumento da temperatura. Então, como a taxa máxima de difusão constante da biomolécula é de 2×10^{10} L mol⁻¹ s⁻¹ e os valores obtidos são superiores a este (na faixa de 10^{12} L mol⁻¹ s⁻¹), constata-se que há a interação entre a HSA e os complexos via mecanismo estático (BIJARI, et al., 2013; RANJBAR, et al., 2013).

Portanto, considerando-se a discordância com relação à distinção dos mecanismos – onde a tendência dos valores de K_{SV} evidenciou um mecanismo dinâmico, enquanto as grandezas dos valores de k_q indicaram um mecanismo estático –, analisa-se o tempo de vida de

fluorescência da HSA no estado excitado em ausência e presença dos complexos RuBDQ e RuBD.

No mecanismo estático, para que ocorra a formação do complexo não fluorescente, faz-se necessária a remoção de uma fração do fluoróforo em questão e, conseqüentemente, observa-se, exclusivamente, a fluorescência da fração da proteína a qual não encontra-se complexada. Por sua vez, a fração da proteína a qual não encontra-se complexada não é perturbada e, conseqüentemente, os tempos de vida de fluorescência da mesma no estado excitado em ausência e presença do supressor são equivalentes e iguais a τ_0 (VALEUR, 2001; LAKOWICZ, 2006; SHEEHAN, 2009; REIS, et al., 2016).

No mecanismo dinâmico, ao contrário do observado no mecanismo estático, a fração da proteína a qual não encontra-se complexada é perturbada e, conseqüentemente, os tempos de vida de fluorescência da mesma no estado excitado em ausência e presença do supressor são distintos (REIS, et al., 2016).

Portanto, com o objetivo de distinguir-se se são mecanismos estáticos ou dinâmicos, analisa-se o tempo de vida de fluorescência da HSA no estado excitado em ausência e presença dos complexos RuBDQ e RuBD, a depender da temperatura.

Os valores de tempo de vida de fluorescência da HSA em função da concentração dos complexos RuBDQ e RuBD são apresentados nas Tabelas 4 e 5 e os respectivos gráficos são apresentados na Figura 24.

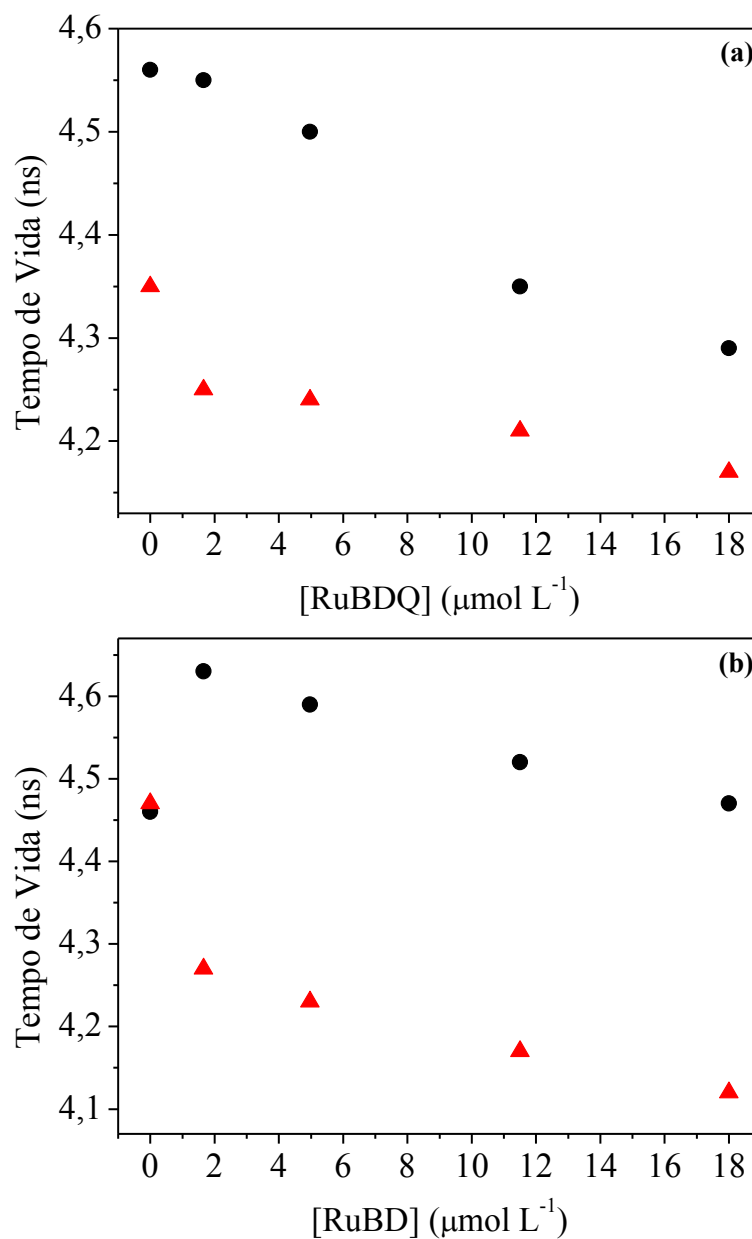
Tabela 4 – Tempo de vida de fluorescência da HSA em função da concentração do complexo RuBDQ.

T (K)	[RuBDQ] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	α_1 (%)	α_2 (%)	α_3 (%)	$\langle\tau\rangle$ (ns)	E τ
298	-	6,41	2,48	0,38	55,53	39,59	4,88	4,56	-
	1,7	6,46	2,49	0,38	54,81	40,16	5,03	4,55	0,002
	5,0	6,41	2,49	0,39	54,46	39,65	5,89	4,50	0,013
	11,5	6,23	2,26	0,33	55,48	38,59	5,93	4,35	0,046
	18,0	6,25	2,30	0,31	53,47	40,26	6,28	4,29	0,059
308	-	6,28	2,45	0,39	52,71	41,80	5,49	4,35	-
	1,7	6,19	2,42	0,41	51,83	42,10	6,07	4,25	0,022
	5,0	6,18	2,39	0,39	51,89	42,22	5,89	4,24	0,025
	11,5	6,18	2,45	0,41	50,92	42,53	6,55	4,21	0,032
	18,0	6,10	2,31	0,34	52,07	41,99	5,95	4,17	0,041

Tabela 5 – Tempo de vida de fluorescência da HSA em função da concentração do complexo RuBD.

T (K)	[RuBD] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	α_1 (%)	α_2 (%)	α_3 (%)	$\langle\tau\rangle$ (ns)	E τ
298	-	6,64	2,07	0,40	54,13	40,79	5,09	4,46	-
	1,7	6,71	2,71	0,43	51,27	43,00	5,72	4,63	0,038
	5,0	6,43	2,50	0,40	56,10	38,49	5,41	4,59	0,029
	11,5	6,40	2,43	0,42	55,53	38,85	5,62	4,52	0,013
	18,0	6,36	2,41	0,45	55,27	38,61	6,12	4,47	0,002
308	-	6,47	2,56	0,41	51,94	42,29	5,76	4,47	-
	1,7	6,22	2,43	0,40	51,67	42,38	5,95	4,27	0,044
	5,0	6,21	2,46	0,45	50,81	42,51	6,68	4,23	0,054
	11,5	6,03	2,24	0,35	53,70	40,83	5,47	4,17	0,067
	18,0	6,01	2,25	0,38	52,94	40,88	6,18	4,12	0,078

Figura 24 – Gráficos de tempo de vida de fluorescência da HSA em função de [RuBDQ] (a) e [RuBD] (b) a 298 K (●) e 308 K (▲).



Fonte: Autora.

Os valores de tempo de vida de fluorescência da HSA em função da concentração dos complexos RuBDQ e RuBD, apresentados nas Tabelas 4 e 5, e os respectivos gráficos, apresentados na Figura 24, exibem perfis de decaimentos exponenciais, ou seja, os tempos de vida de fluorescência da HSA no estado excitado em presença dos complexos RuBDQ e RuBD são inferiores àquele em ausência dos complexos. Assim, conclui-se que há a interação entre a HSA e os complexos via mecanismo dinâmico.

4.2.4.2. Determinação da constante de associação (K_a) e do número de sítios de ligação (n)

A determinação da constante de associação (K_a) faz-se indispensável, com objetivo de investigar-se se as interações HSA–RuBDQ e HSA–RuBD tornam-se mais fortes ou fracas, a depender da temperatura.

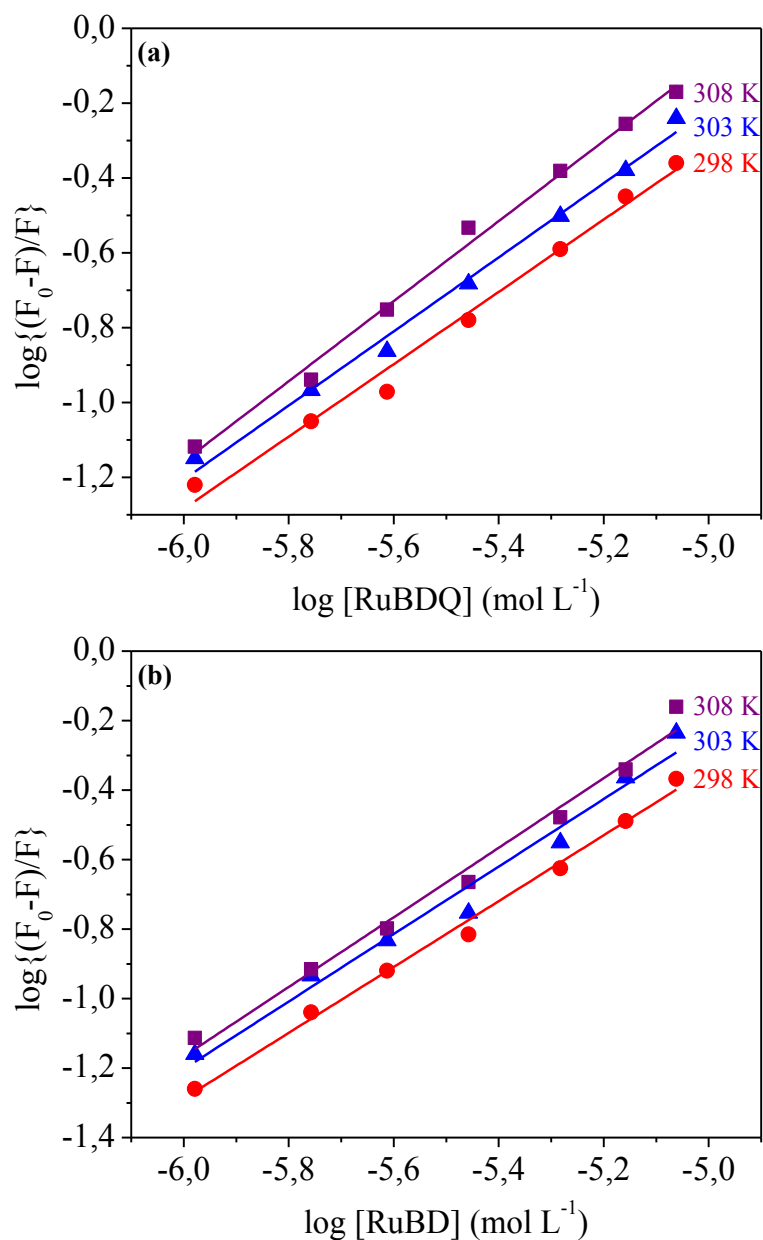
Quando uma interação torna-se mais forte, a elevação da temperatura aumentará o tempo de vida de fluorescência da espécie HSA–fármaco, ou seja, aumentará a estabilidade do mesmo e, consequentemente, haverá o aumento de K_a (LAKOWICZ, 2006; MOREIRA, et al., 2015). Quando uma interação torna-se mais fraca, a elevação da temperatura diminuirá do tempo de vida de fluorescência da espécie HSA–fármaco e, ou seja, diminuirá a estabilidade do mesmo, fato este que poderá ocasionar uma má distribuição do fármaco, e, consequentemente, haverá a diminuição de K_a (RANJBAR, et al., 2013; MOREIRA, et al., 2015).

Portanto, com propósito de distinguir-se se as interações se tornam mais fortes ou fracas, analisa-se a tendência de K_a , a depender da temperatura. As constantes foram obtidas utilizando-se a Equação 5 (Equação de Stern-Volmer modificada),

$$\log\{(F_0-F)/F\} = \log K_a + n \log [Q] \quad (5)$$

onde F e F_0 são as intensidades relativas de fluorescência da HSA em presença e em ausência dos complexos, respectivamente; K_a é a constante de interação dos complexos com a HSA; n é o número de sítios de ligação ocupados pelos complexos na estrutura proteica; e $[Q]$ é a concentração dos complexos (LAKOWICZ, 2006). Os gráficos de $\log\{(F_0-F)/F\}$ em função do logaritmo da concentração dos complexos RuBDQ e RuBD são apresentados na Figura 25.

Figura 25 – Gráficos de $\log\{(F_0-F)/F\}$ em função de $\log[\text{RuBDQ}]$ (a) e $\log[\text{RuBD}]$ (b) em diferentes temperaturas.



Fonte: Autora.

Os gráficos de $\log\{(F_0-F)/F\}$ em função da concentração dos complexos RuBDQ e RuBD, apresentados na Figura 25, exibem perfis lineares e, utilizando-se de regressões lineares, foram calculados os valores de K_a e n para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD em diferentes temperaturas.

Os valores de K_a e n calculados para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD em diferentes temperaturas são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Constantes de associação (K_a) e números de sítios de ligação (n) para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD em diferentes temperaturas.

Sistema	T (K)	K_a ($\times 10^4$ L mol ⁻¹)	n	R^2
HSA–RuBDQ	298	$4,50 \pm 0,28$	0,98	0,9953
	303	$5,75 \pm 0,21$	0,99	0,9973
	308	$11,00 \pm 1,10$	0,99	0,9953
HSA–RuBD	298	$5,85 \pm 0,05$	1,00	0,9931
	303	$5,25 \pm 0,15$	0,99	0,9750
	308	$3,45 \pm 0,05$	0,95	0,9841

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão de experimentos realizados em duplicata.

R^2 é o coeficiente de correlação para os valores de K_a e n .

Fonte: Autora.

Os valores de K_a calculados para o sistema HSA–RuBDQ, apresentados na Tabela 6, exibem a tendência de elevarem-se com o aumento da temperatura. Assim, conclui-se que a interação entre a HSA e o complexo RuBDQ torna-se mais forte.

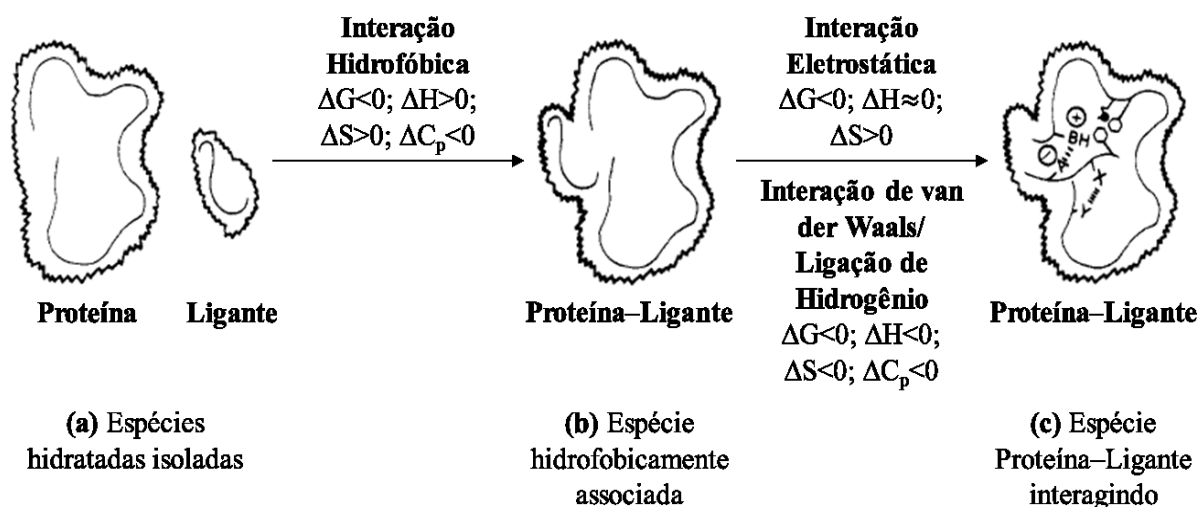
Os valores de K_a calculados para o sistema HSA–RuBD, também apresentados na Tabela 6, exibem a tendência de reduzirem-se com o aumento da temperatura. Então, constata-se que a interação entre a HSA e o complexo RuBD torna-se mais fraca.

Os valores de n calculados para ambos os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD, também apresentados na Tabela 6, foram de aproximadamente 1. Portanto, sugere-se que um único sítio de ligação da HSA esteja presente para os complexos RuBDQ e RuBD, sendo a estequiometria 1:1.

4.2.4.3. Determinação de parâmetros termodinâmicos

A determinação dos parâmetros termodinâmicos faz-se necessária, a fim de investigar-se a espontaneidade das interações HSA–RuBDQ e HSA–RuBD e, ainda, a natureza das mesmas, as quais propiciam a retenção dos derivados metálicos no interior da biomolécula – podendo ser estas interações forças de interações hidrofóbicas, forças de van der Waals, forças eletrostáticas ou ligações de hidrogênio (LAKOWICZ, 2006; RANJBAR, et al., 2013). A representação ilustrativa das possíveis interações é apresentada na Figura 26.

Figura 26 – Representação ilustrativa das possíveis interações entre a HSA e os complexos RuBDQ e RuBD.



Fonte: Adaptado de ROSS & SUBRAMANIAN (1981).

Portanto, com o intuito de distinguir-se a espontaneidade e, ainda, a natureza das interações que propiciam a retenção dos derivados metálicos no interior da biomolécula, analisa-se os valores de variação da entalpia (ΔH), variação da entropia (ΔS) e energia livre de Gibbs (ΔG). Os valores de ΔH e ΔS foram obtidos utilizando-se a Equação 6 (Equação de Van't Hoff),

$$\ln K_a = -(\Delta H/RT) + (\Delta S/R) \quad (6)$$

onde K_a é a constante de interação dos complexos com a HSA; R é a constante dos gases ideais ($R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); e T é a temperatura em Kelvin. Os valores de ΔG foram obtidos utilizando-se a Equação 7,

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (7)$$

onde T é a temperatura em Kelvin (LAKOWICZ, 2006).

Os valores de variação da entalpia ($\Delta H^\#$), variação da entropia ($\Delta S^\#$) e energia livre de Gibbs ($\Delta G^\#$) de ativação calculados para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Parâmetros termodinâmicos para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD.

Sistema	T (K)	$\Delta H^\#$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta S^\#$ (J mol ⁻¹)	$\Delta G^\#$ (kJ mol ⁻¹)
HSA–RuBDQ	298			-26,18
	303	77,52	348	-27,92
	308			-27,66
HSA–RuBD	298			-27,67
	303	-44,06	-55	-27,40
	308			-27,12

Fonte: Autora.

Através dos parâmetros termodinâmicos calculados para o sistema HSA–RuBDQ, apresentados na Tabela 7, conclui-se que há a interação espontânea entre a HSA e o complexo RuBDQ (pois $\Delta G^\# < 0$) e, ainda, que tal interação que propicia a retenção do derivado metálico no interior da biomolécula é determinada, basicamente, por interações hidrofóbicas (pois $\Delta S^\# > 0$ e $\Delta H^\# > 0$), conforme descrito na Figura 26(b).

Com o objetivo de justificar-se que tal interação é determinada, principalmente, por interações hidrofóbicas, infere-se que: A HSA, quando isolada do íon complexo, têm suas cavidades preenchidas com moléculas de solvente (H₂O). O íon complexo [Ru(tpy)(BDQ)NO]³⁺, por sua vez, quando isolado da HSA, interage com inúmeras moléculas de H₂O, principalmente devido à presença do ligante BDQ, que possui um grupo carboxilato (–COOH). Para que ocorra a interação HSA–RuBDQ, é necessário que haja o rompimento da esfera de solvatação do íon complexo e, ainda, que o mesmo “expulse” as moléculas de H₂O que preenchem as cavidades proteicas da HSA. Quando o íon complexo “expulsa” as moléculas de H₂O que preenchem as cavidades proteicas da HSA, há o aumento do grau de liberdade da proteína. Assim, constata-se que há a desorganização do sistema, tratando-se um processo com o aumento da entropia do mesmo, ou seja, $\Delta S^\# > 0$. Conclui-se, também, que a energia necessária para o rompimento das ligações presentes nas esferas de solvatação é maior, se comparada à energia necessária para a formação daquela. Então trata-se um processo endotérmico, ou seja, $\Delta H^\# > 0$. Portanto, as interações hidrofóbicas tornam-se determinantes no sistema HSA–RuBDQ, o que não impede que haja outros tipos de interações no sistema em questão (ROSS & SUBRAMANIAN, 1981; LAKOWICZ, 2006).

Através dos parâmetros termodinâmicos calculados para o sistema HSA–RuBD, também apresentados na Tabela 7, constata-se que há a interação espontânea entre a HSA e o

complexo RuBD (pois $\Delta G^\# < 0$) e, ainda, que tal interação que propicia a retenção do derivado metálico no interior da biomolécula é determinada, basicamente, por ligações de hidrogênio (pois $\Delta S^\# < 0$ e $\Delta H^\# < 0$), conforme descrito na Figura 26(c).

Com o propósito de justificar-se que tal interação é determinada, principalmente, por ligações de hidrogênio, supõe-se que: O íon complexo $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BD})\text{NO}]^{3+}$, diferente do íon complexo $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{BDQ})\text{NO}]^{3+}$, por sua vez, não interage com tantas moléculas de H_2O . Assim, para que ocorra a interação HSA–RuBD é necessário, apenas, que o íon complexo “expulse” as moléculas de H_2O que preenchem as cavidades proteicas da HSA. Quando o íon complexo insere-se na cavidade proteica da HSA, há a formação de ligações de hidrogênio entre o mesmo e os resíduos de aminoácidos e, conseqüentemente, a diminuição do grau de liberdade da proteína. Assim, conclui-se que há a organização do sistema, tratando-se um processo com a diminuição da entropia do mesmo, ou seja, $\Delta S^\# < 0$. Constata-se, também, que há a liberação de energia na formação das ligações de hidrogênio entre o íon complexo e os resíduos de aminoácidos. Então trata-se um processo exotérmico, ou seja, $\Delta H^\# < 0$.

Portanto, as interações por ligação de hidrogênio tornam-se determinantes no sistema HSA–RuBD, o que não impede que haja outros tipos de interações no sistema em questão (ROSS & SUBRAMANIAN, 1981; LAKOWICZ, 2006).

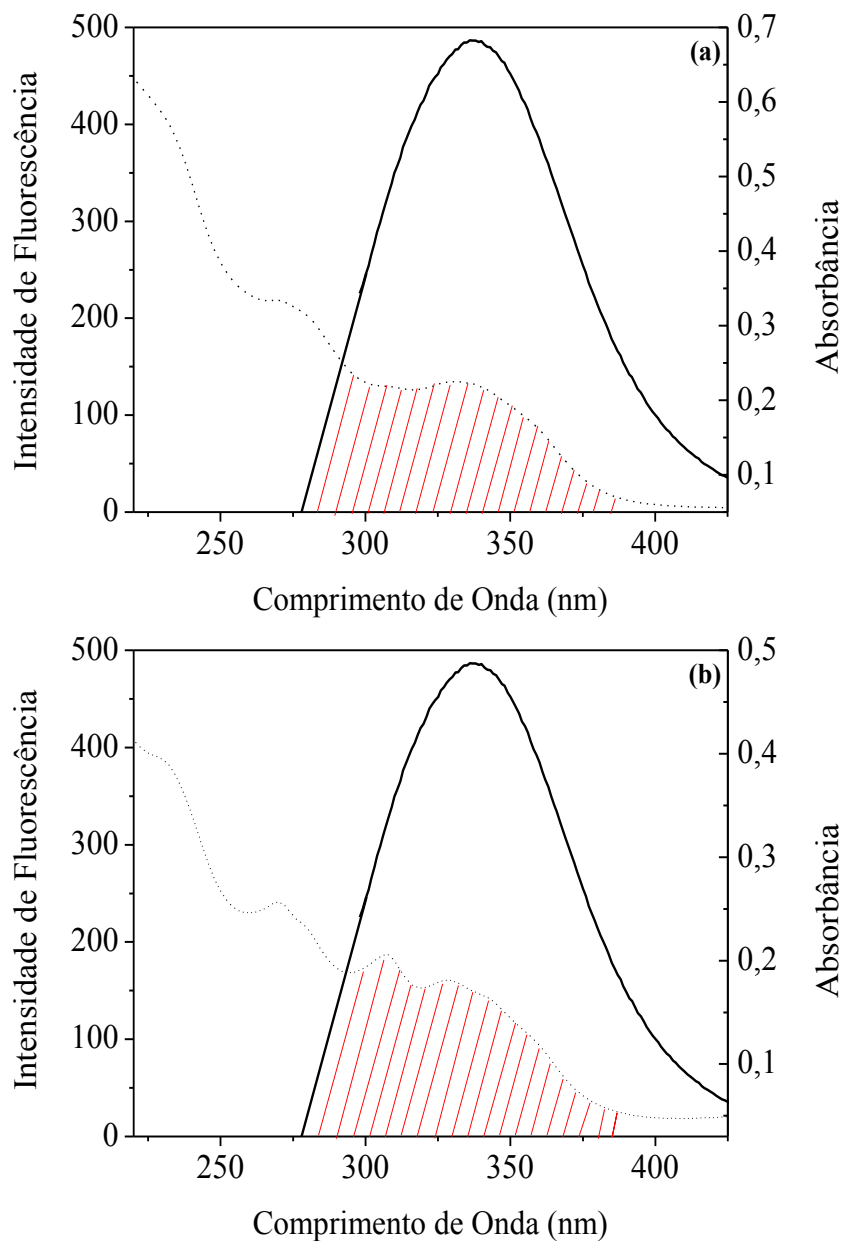
4.2.5. Determinação da Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET) entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio

Sabendo-se que há a interação entre a HSA e os complexos RuBDQ e RuBD via mecanismo dinâmico, faz-se possível a determinação da transferência de energia por ressonância de Förster (FRET) entre a HSA e os complexos.

A FRET é utilizada como uma “régua espectroscópica”, a qual determina a distância entre o doador – neste caso, o resíduo de Trp-214 da HSA – e o receptor – neste caso, os complexos RuBDQ e RuBD (STRYER, 1968; RANJBAR, et al., 2013). Para que haja FRET, faz-se necessária a satisfação de algumas condições, como: 1) A molécula doadora deve emitir fluorescência; 2) os espectros de emissão do doador e de absorção do receptor devem sobrepor-se; e 3) as moléculas do doador e do receptor devem estar próximas, com distância máxima de 7 nm (VALEUR & BROCHON, 1999; RANJBAR, et al., 2013).

Portanto, a fim de determinar-se se há ou não FRET, analisa-se os espectros sobrepostos de emissão do doador e de absorção do receptor. Os espectros de emissão para a HSA e de absorção para os complexos RuBDQ e RuBD são apresentados na Figura 27.

Figura 27 – Sobreposição dos espectros de emissão para a HSA e de absorção para os complexos RuBDQ **(a)** e RuBD **(b)**, em PBS (pH=7,4). [HSA]=1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); [Complexo]=16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (---).



Fonte: Autora.

Os espectros de emissão para a HSA e de absorção para os complexos RuBDQ e RuBD, apresentados na Figura 27, exibem boas sobreposições. Porém, como os espectros de emissão para a HSA são afetados pela luz de excitação em torno de 280 nm, fez-se necessário um ajuste dos espectros de emissão em questão e utilizou-se um intervalo de 285 a 400 nm para avaliar-se o grau de sobreposição (integral) entre os espectros.

Os valores de eficiência do processo de transferência de energia por ressonância de Förster (E), distância crítica entre o doador e o receptor onde a eficiência do processo é de 50% (R_0), distância centro a centro entre o doador e o receptor (r_0) e o grau de sobreposição espectral entre o espectro de emissão do doador e o espectro de absorção do receptor (J) foram obtidos utilizando-se as Equações 1, 2 e 3 (Sessão 3.2.4.6.), respectivamente, e são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Determinação de FRET para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD.

Sistema	J ($\times 10^{14} \text{ cm}^3 \text{ mol L}^{-1}$)	R_0 (nm)	r_0 (nm)	E (%)
HSA–RuBDQ	2,34	2,57	3,38	16
HSA–RuBD	1,73	2,44	3,01	22

Fonte: Autora.

Os valores de J calculados para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD, obtidos integrando-se a área de sobreposição dos espectros de emissão para a HSA e de absorção para os complexos RuBDQ e RuBD em um intervalo de 285 a 400 nm, são de $2,34 \times 10^{14}$ e $1,73 \times 10^{14} \text{ cm}^3 \text{ L mol}^{-1}$, respectivamente, os quais representam o grau de sobreposição espectral entre espectro de emissão da HSA e os espectro de absorção dos complexos RuBDQ e RuBD.

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

Os valores de r_0 calculados para os sistemas, obtidos utilizando-se $E=50\%$ e os valores de R_0 obtidos para os mesmos, são de 3,38 e 3,01 nm, respectivamente, os quais representam a distância centro a centro entre a HSA e os complexos. Tais valores de r calculados para ambos os sistemas são inferiores à 7 nm e, ainda, estão entre $0,5R_0$ e $1,5R_0$. Assim, conclui-se que há uma alta probabilidade de ocorrer FRET (RANJBAR, et al., 2013).

Portanto, considerando-se a alta probabilidade de ocorrer FRET para ambos os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD, com o intuito de determinar-se a eficiência do processo de transferência de energia por ressonância de Förster, analisa-se os valores de E . Os valores de E calculados para os sistemas em questão, utilizando-se os valores de R_0 e r obtidos para os mesmos, são de 16 e 22%, respectivamente, os quais representam a eficiência do processo, resultando na supressão de fluorescência intrínseca da biomolécula.

4.2.6. Avaliação dos Sítios de Interação entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio

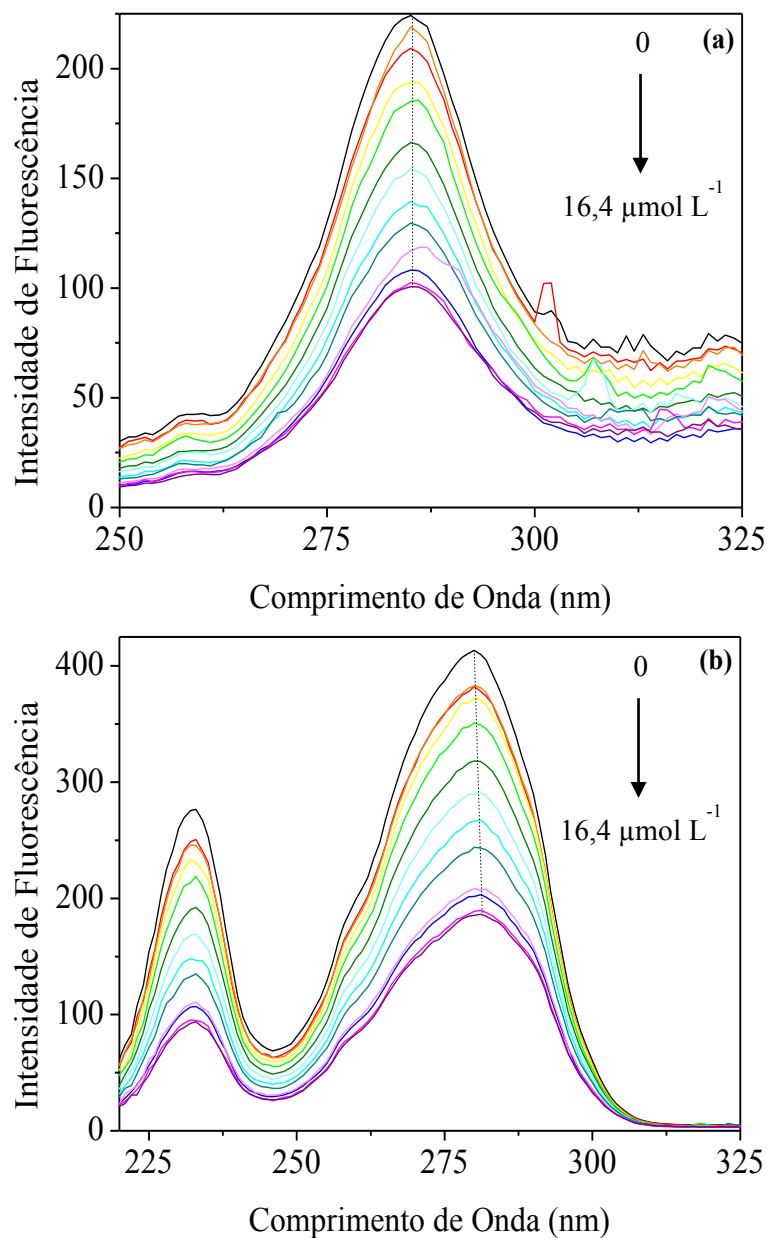
4.2.6.1. Avaliação dos Sítios de Interação entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Espectroscopia de Fluorescência Síncrona ($\Delta\lambda = 15 \text{ nm} / \Delta\lambda = 60 \text{ nm}$)

Sabendo-se que há a interação entre a HSA e os complexos RuBDQ e RuBD, os mecanismos, as constantes de associação, os números de sítios de ligação e os parâmetros termodinâmicos de tais interações, e, também, que há a transferência de energia por ressonância de Förster para ambos os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD, faz-se substancial a determinação dos sítios de interação entre a HSA e os complexos. Sendo assim, com o objetivo de investigar-se os sítios de interação entre a HSA e os mesmos, utilizou-se a técnica de espectroscopia de fluorescência síncrona, analisando-se, mais especificamente possíveis mudanças na posição do comprimento de onda máximo de emissão (λ_{em}) quando $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ e $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$.

A técnica de espectroscopia de fluorescência síncrona é utilizada para analisar-se possíveis mudanças conformacionais dos microambientes proteicos. Quando os valores de intervalo de varredura ($\Delta\lambda$) – onde $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{exc}$ – são fixados em 15 e em 60 nm a fluorescência síncrona da HSA fornece informações sobre mudanças conformacionais dos microambientes proteicos próximos aos resíduos de aminoácidos de Tyr e Trp-214, respectivamente (LLOYD & EVETT, 1977; MILLER, 1979; TANG, et al., 2006; SURYAWANSHI, et al., 2013).

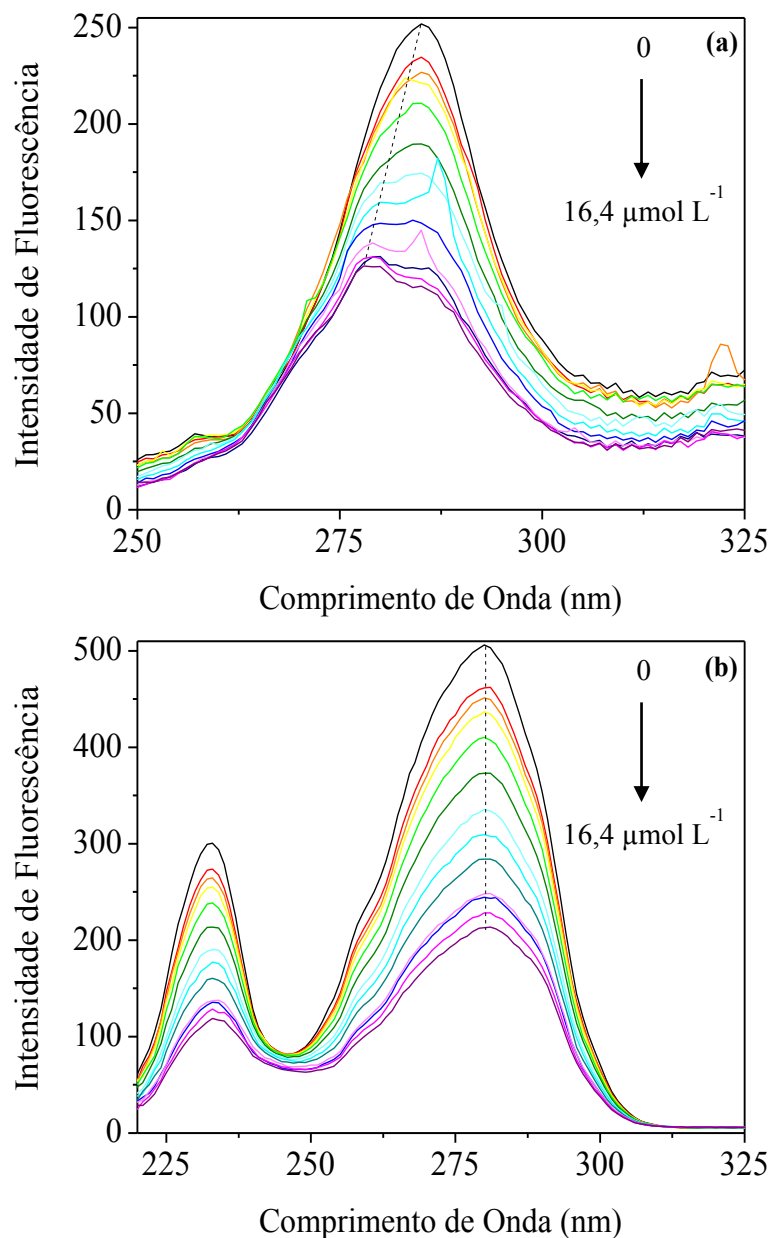
Portanto, com o propósito de determinar-se os sítios de interação entre a HSA e os complexos RuBDQ e RuBD, foram realizadas análises espectroscópicas de fluorescência síncrona para a HSA em ausência e presença de diferentes concentrações dos complexos RuBDQ e RuBD a 308 K. Os espectros de supressão de fluorescência síncrona obtidos para a biomolécula em presença do complexo RuBDQ e RuBD, a 308 K são apresentados nas Figuras 28 e 29.

Figura 28 – Espectros de supressão de fluorescência síncrona para a HSA em presença do complexo RuBDQ, em PBS (pH=7,4) a 308 K. $\lambda_{exc}=280$ nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. **(a)** $\Delta\lambda = 15$ nm; **(b)** $\Delta\lambda = 60$ nm. [HSA]=1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (–); [Complexo]=0-16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (–); 1,7 (–); 2,3 (–); 3,3 (–); 5,0 (–); 6,6 (–); 8,3 (–); 9,9 (–); 11,5 (–); 13,2 (–); 14,8 (–); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (–)].



Fonte: Autora.

Figura 29 – Espectros de supressão de fluorescência síncrona para a HSA em presença do complexo RuBD, em PBS (pH=7,4) a 308 K. $\lambda_{exc}=280$ nm. Janelas de excitação/emissão: 5/20 nm. **(a)** $\Delta\lambda = 15$ nm; **(b)** $\Delta\lambda = 60$ nm. [HSA]=1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (–); [Complexo]=0-16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [1,0 (–); 1,7 (–); 2,3 (–); 3,3 (–); 5,0 (–); 6,6 (–); 8,3 (–); 9,9 (–); 11,5 (–); 13,2 (–); 14,8 (–); 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (–)].



Fonte: Autora.

Os espectros de fluorescência síncrona para a HSA em ausência dos complexos RuBDQ e RuBD, apresentados nas Figura 28 e 29, exibem máximos de emissão em $\lambda=285$ nm, quando $\Delta\lambda = 15$ nm, e em $\lambda=279$ nm, quando $\Delta\lambda = 60$ nm, fluorescências intrínsecas dos aminoácidos aromáticos Tyr e Trp-214, respectivamente.

Os espectros de fluorescência síncrona para a HSA em presença dos complexos RuBDQ e RuBD, quando $\Delta\lambda = 15$ nm, apresentados nas Figuras 28(a) e 29(a), também exibem máximos de emissão em $\lambda=285$ nm, porém, com menores valores de intensidade de fluorescência, se comparados àqueles em ausência dos complexos. Quanto maior a concentração dos complexos, menores os valores de intensidade de fluorescência. Tal diminuição das intensidades de fluorescência com o aumento das concentrações dos mesmos é devido à interação entre a HSA e os complexos RuBDQ e RuBD. No entanto, para RuBDQ, houve mudanças discretas na posição do comprimento de onda máximo de emissão, de 285 para 286 nm, ou seja, uma alteração para a região do vermelho. Então, conclui-se que o complexo altera o microambiente proteico próximo ao resíduo de aminoácido Tyr, e, ainda, que os resíduos de aminoácidos ao redor estão em um microambiente polar e mais expostos ao solvente. Para RuBD, houve mudanças evidentes na posição do comprimento de onda máximo de emissão, de 285 para 278 nm, ou seja, uma alteração para a região do azul. Assim, conclui-se que o complexo altera o microambiente proteico próximo ao resíduo de aminoácido Tyr, e, ainda, que os resíduos de aminoácidos ao redor estão em um microambiente apolar e menos expostos ao solvente (O'HAVER, et al., 1982; RANJBAR, et al., 2013).

Os espectros de fluorescência síncrona para a HSA em presença dos complexos RuBDQ e RuBD, quando $\Delta\lambda = 60$ nm, apresentados nas Figuras 28(b) e 29(b), também exibem máximos de emissão em $\lambda=279$ nm, porém, com menores valores de intensidade de fluorescência, se comparados àqueles em ausência do complexo em questão, devido à interação entre a HSA e os complexos RuBDQ e RuBD, conforme descrito anteriormente. Porém, houve mudanças discretas na posição do comprimento de onda máximo de emissão, de 279 para 280 nm, ou seja, uma alteração para a região do vermelho. Então, constata-se que os complexos alteram o microambiente proteico próximo ao resíduo de aminoácido Trp-214, e, ainda, que os resíduos de aminoácidos ao redor estão em um microambiente polar e mais expostos ao solvente (O'HAVER, et al., 1982; RANJBAR, et al., 2013).

Portanto, a fim de distinguir-se quais os microambientes proteicos são efetivamente alterados pelos complexos RuBDQ e RuBD, analisa-se a grandeza de K_{SV} , quando $\Delta\lambda = 15$ nm e $\Delta\lambda = 60$ nm. As constantes foram obtidas utilizando-se a Equação 4 (Equação de Stern-Volmer).

Os valores de K_{SV} calculados e os valores de deslocamento obtidos para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) e valores de deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão ($\Delta\lambda_{\text{máx}}$) para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD.

Sistema	$\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$			$\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$		
	$K_{SV} (\times 10^4 \text{ mol L}^{-1})$	R^2	$\Delta\lambda_{\text{máx}}$	$K_{SV} (\times 10^4 \text{ L mol}^{-1})$	R^2	$\Delta\lambda_{\text{máx}}$
HSA–RuBDQ	7,7	0,9887	+1	7,7	0,9894	+1
HSA–RuBD	6,7	0,9979	-6	7,9	0,9980	+1

Fonte: Autora.

Os valores de K_{SV} calculados para o sistema HSA–RuBDQ, apresentados na Tabela 9, exibem os mesmos valores, quando $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ e quando $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$. Assim, conclui-se que ambos os resíduos de Tyr e Trp-214 estão igualmente acessíveis ao complexo RuBDQ durante o processo de interação HSA–RuBDQ.

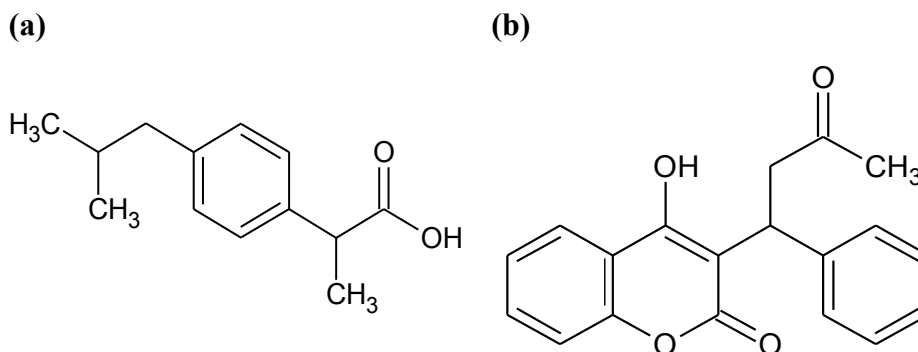
Os valores de K_{SV} calculados para o sistema HSA–RuBD, também apresentados na Tabela 9, exibem valores distintos, quando $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ e quando $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$. O valor de K_{SV} quando $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ é menor, se comparado ao mesmo quando $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$. Então, constata-se que o resíduo de Trp-214 está mais acessível ao complexo RuBD durante o processo de interação

HSA–RuBD, se comparado ao resíduo de Tyr. Tal constatação corrobora com os resultados de FRET, apresentados na sessão 4.2.4., onde a eficiência do processo de transferência de energia por ressonância de Förster com o resíduo de Trp-214 é maior para o complexo RuBD (22%), se comparada àquela para o complexo RuBDQ (16%). No entanto, conclui-se, também, que ambos os resíduos de Tyr e Trp-214 estão acessíveis ao complexo RuBD.

4.2.6.2. Avaliação dos Sítios de Interação entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio utilizando Fármacos Marcadores

Com o intuito de investigar-se os sítios de interação entre a HSA e os complexos RuBDQ e RuBD, utilizou-se, também, a técnica de espectroscopia de fluorescência, analisando-se, mais especificamente, a supressão de fluorescência da HSA induzida pelos complexos, porém em presença de fármacos marcadores, sendo estes o Ibuprofeno (IBU) e a Varfarina (WAR). As estruturas químicas dos fármacos marcadores IBU e WAR são apresentadas na Figura 30.

Figura 30 – Estruturas químicas dos fármacos marcadores IBU (a) e WAR (b).

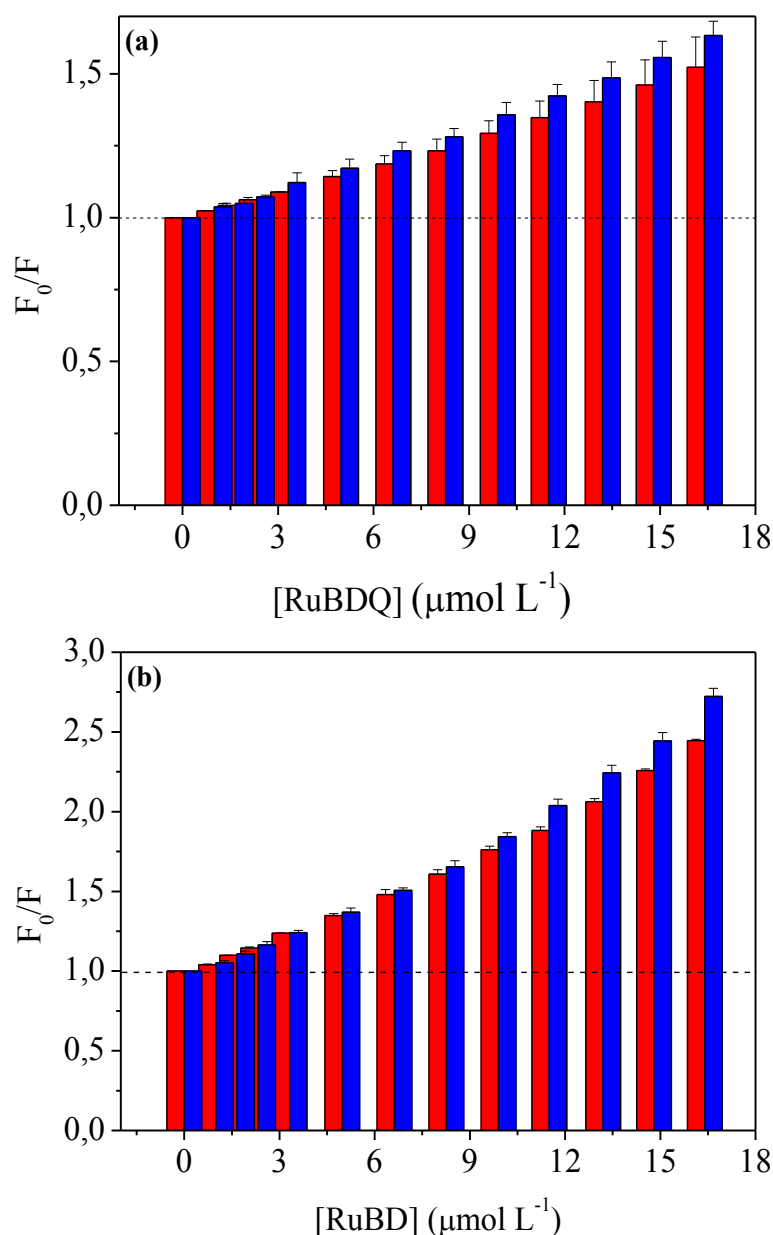


Fonte: Autora.

IBU e WAR são marcadores específicos para os diferentes sítios da HSA, pois, enquanto IBU interage no Sítio II, no subdomínio IIIA, WAR interage no Sítio I, no subdomínio IIA. Utilizando-se dos espectros de supressão de fluorescência e de alguns tratamentos matemáticos, determina-se as constantes K_{SV} e K_a em presença dos marcadores IBU e WAR e compará-las com aquelas obtidas em ausência dos mesmos. No caso de ocorrer a diminuição de K_{SV} ou K_a em presença do fármaco marcador IBU, pode-se deduzir que o complexo compete com o IBU pelo Sítio II, subdomínio IIIA. No caso de ocorrer a diminuição das constantes em presença do fármaco marcador WAR, pode-se inferir que o complexo compete com a WAR pelo Sítio I, subdomínio IIA (BASKEN, et al., 2009).

Portanto, foram realizadas análises espectroscópicas de fluorescência para a HSA em presença de diferentes concentrações dos complexos RuBDQ e RuBD a 308 K em presença, ainda, dos marcadores IBU e WAR. Os gráficos de F_0/F em função da concentração dos complexos RuBDQ e RuBD, em presença dos marcadores IBU e WAR, são apresentados na Figura 31.

Figura 31 – Gráficos de F_0/F em função de [RuBDQ] (a) e [RuBD] (b) em presença dos fármacos marcadores IBU (■) e WAR (■).



Fonte: Autora.

O gráfico de F_0/F em função da concentração do complexo RuBDQ, apresentado na Figura 31, não exhibe variações significativas nos valores de F_0/F quando no intervalo de concentração foi de 0 a $3,22 \mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo. No entanto, exhibe variações significativas dos valores de F_0/F quando no intervalo foi de $3,2$ a $16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo. Assim, considerando-se que, quando há o aumento da razão de F_0/F , há a interação entre a HSA e o complexo e, conseqüentemente a competição entre o complexo RuBD e os marcadores, utilizou-se do intervalo de $3,22$ a $16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ para determinar-se as constantes K_{SV} e K_a .

O gráfico de F_0/F em função da concentração do complexo RuBD, também apresentado na Figura 31, não exibe variações significativas nos valores de F_0/F quando no intervalo de concentração foi de 0 a $2,33 \mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo. No entanto, exibe variações significativas dos valores de F_0/F quando no intervalo foi de 2,3 a $16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo. Então, considerando-se que, quando há o aumento da razão de F_0/F , há a interação entre a HSA e o complexo e, conseqüentemente a competição entre o complexo RuBD e os marcadores, utilizou-se do intervalo de 2,3 a $16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ para determinar-se as constantes K_{SV} e K_a .

As constantes foram obtidas utilizando-se a Equação 4 (Equação de Stern-Volmer) e a Equação 5 (Equação de Stern-Volmer modificada) (Sessão 4.2.3.1 e 4.2.3.2, respectivamente).

Os valores de K_{SV} e K_a calculados para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD em presença de IBU e WAR são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Constantes Stern-Volmer (K_{SV}) e constantes de associação (K_a) para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD em ausência e em presença dos fármacos marcadores IBU e WAR.

Sistema	$K_{SV} (\times 10^4 \text{ mol L}^{-1})$	R^2	$K_a (\times 10^4 \text{ mol L}^{-1})$	R^2
HSA–RuBDQ	7,25	0,9836	11,00	0,9953
HSA–RuBDQ–IBU	3,82	0,9983	5,01	0,9963
HSA–RuBDQ–WAR	3,23	0,9989	8,22	0,9996
HSA–RuBD	6,70	0,9946	3,45	0,9841
HSA–RuBD–IBU	10,58	0,9958	67,6	0,9985
HSA–RuBD–WAR	8,76	0,9965	36,3	0,9989

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

Fonte: Autora.

Os valores de K_{SV} e K_a calculados para os sistemas HSA–RuBDQ–IBU e HSA–RuBDQ–WAR, apresentados na Tabela 10, exibem a tendência de reduzirem-se em relação àqueles para o sistema HSA–RuBDQ (sistema sem quaisquer um dos marcadores). Esperar-se-ia que os valores de K_{SV} e/ou de K_a iriam reduzir-se em presença de somente um dos marcadores, considerando-se que os mesmos interagem em sítios distintos. Assim, pode-se concluir que o complexo RuBDQ pode interagir em ambos os sítios, competindo com IBU e WAR, simultaneamente.

Os valores de K_{SV} e K_a calculados para os sistemas HSA–RuBD–IBU e HSA–RuBD–WAR, também apresentados na Tabela 10, exibem a tendência de elevarem-se

em relação àqueles para o sistema HSA–RuBD (sistema sem quaisquer um dos marcadores). Esperar-se-ia que os valores de K_{SV} e/ou de K_a iriam reduzir-se em presença de um dos marcadores. Então, neste caso, nada pode-se constatar, pois tais valores elevaram-se, fato este que não está descrito na literatura.

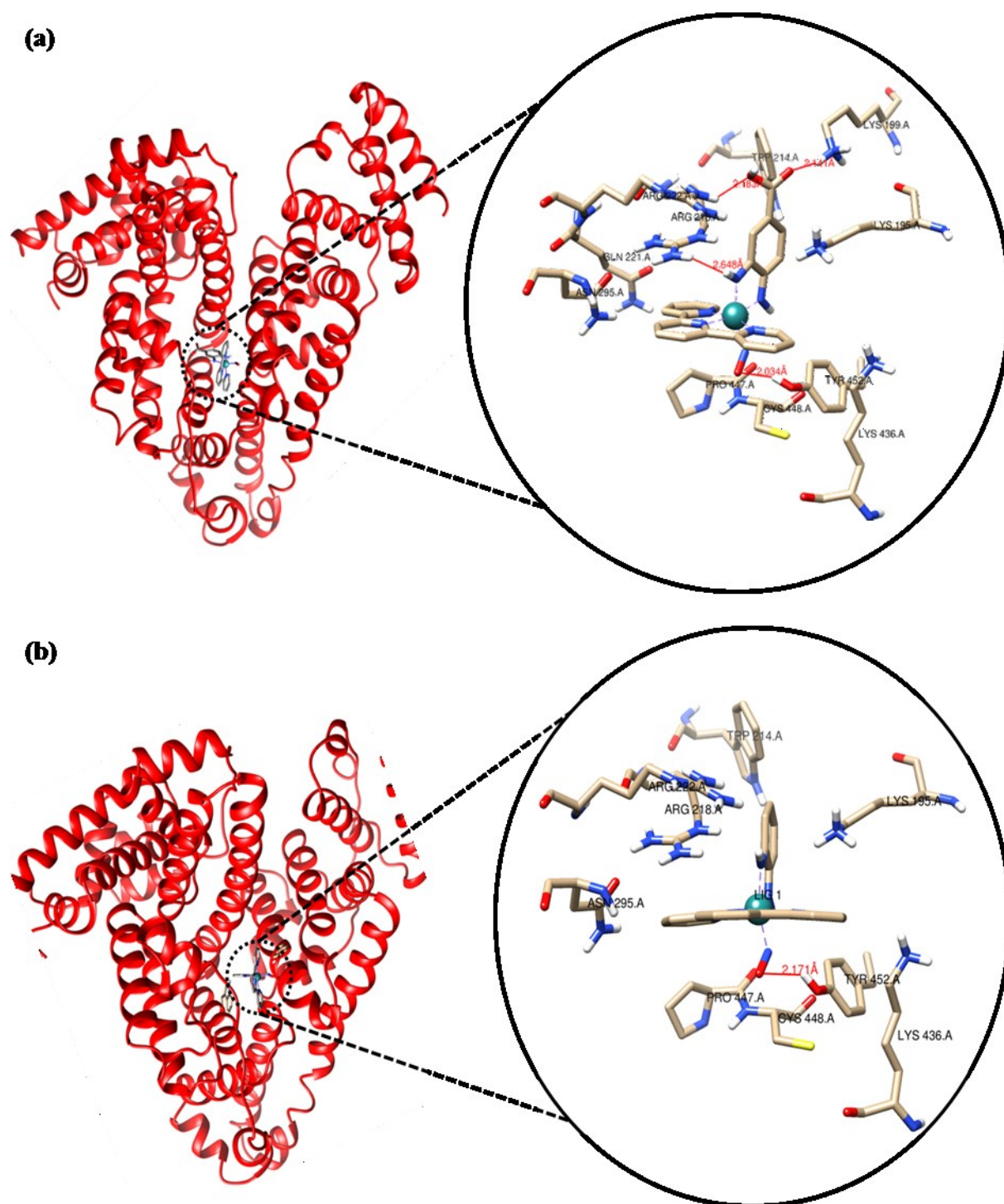
Portanto, considerando-se a necessidade de aprimorar os resultados obtidos acerca dos sítios de interação entre a HSA e os complexos RuBDQ e RuBD, utilizou-se uma das técnicas de modelagem molecular, sendo esta a ancoragem molecular (*docking* molecular).

4.2.6.3. Avaliação dos Sítios de Interação entre a HSA e os Complexos Nitrosilos de Rutênio via Modelagem Molecular

Estudos teóricos, baseados em diferentes algoritmos, são desenvolvidos com o objetivo de realizar-se estudos de ancoragem molecular. A ancoragem molecular tornou-se um parâmetro de suma importância farmacológica, a qual é utilizada para modelar a interação entre uma proteína, como a HSA, e pequenas moléculas, como os complexos nitrosilos de rutênio, à nível atômico. Para a realização dos estudos de ancoragem molecular, fazem-se necessárias três etapas, como: 1) A previsão da conformação da pequena molécula (denominada, ligante) na proteína; 2) a orientação e posição (denominada, pose), do ligante; e 3) a avaliação do grau de interação entre as espécies. Assim, tal modelo de interação propiciará o local de ligação das pequenas moléculas à proteína, bem como as possíveis interações entre as espécies (MENG, et al., 2011).

Portanto, com o propósito de investigar-se os sítios de interação entre a HSA e os complexos RuBDQ e RuBD, utilizou-se a técnica de ancoragem molecular. As representações tridimensionais das ancoragens moleculares para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD são apresentadas na Figura 32.

Figura 32 – Representações tridimensionais das ancoragens moleculares para os sistemas HSA–RuBDQ **(a)** e HSA–RuBD **(b)**.



As representações tridimensionais das ancoragens moleculares para os sistemas HSA–RuBDQ e HSA–RuBD, apresentadas na Figura 32, exibem ambos os complexos RuBDQ e RuBD inseridos em um microambiente proteico referente ao Sítio I, subdomínio IIA. Ambos os complexos estão localizados próximos aos resíduos de aminoácidos Arg-210; Arg-222; Asn-295; Cys-448; Gln-221; Lys-195; Lys-199; Lys-453; Pro-447; Tyr-452 e Trp-214.

A conclusão de que os complexos estão localizados próximos ao resíduo de Trp-214 corrobora com os resultados de FRET, apresentados na sessão 4.2.4., onde a eficiência do processo de transferência de energia por ressonância de Förster com o resíduo de Trp-214 para o complexo RuBDQ é de 16%, enquanto para o complexo RuBD é de 22%.

A constatação de que os complexos estão localizados próximos aos resíduos de Tyr-452 e Trp-214 corrobora com os resultados de fluorescência síncrona, apresentados na sessão 4.2.5.1, onde concluiu-se, que ambos os resíduos de Tyr e Trp-214 estão acessíveis aos complexos RuBDQ e RuBD.

5. CONCLUSÕES

As análises via IR, UV/Vis. e CLAE, foram realizadas a fim de caracterizar os complexos RuBDQ e RuBD e demonstrar que ambos os complexos apresentam estruturas químicas que fazem jus àquelas propostas na literatura. As análises via CLAE evidenciaram, ainda, que, para ambos os complexos, em pH=7,4, a forma com o ligante nitrosil, $\text{Ru}^{\text{II}}\text{--NO}^+$, é a mais estável após 2 h de dissolução dos mesmos.

Os estudos via IR, UV/Vis. e fluorescência, realizados com o intuito de investigar-se as interações entre a HSA e os complexos RuBDQ e RuBD, indicaram que há a interação entre as espécies. Os experimentos de supressão de fluorescência da HSA demonstraram que há a interação entre a HSA e ambos os complexos via mecanismo dinâmico. Os valores de K_a calculados para o sistema HSA–RuBDQ evidenciaram que a interação entre a HSA e o complexo RuBDQ torna-se mais forte. Em contrapartida, os valores de K_a calculados para o sistema HSA–RuBD indicaram que a interação entre a HSA e o complexo RuBD torna-se mais fraca. Os parâmetros termodinâmicos para o sistema HSA–RuBDQ demonstraram que as espécies em questão interagem via interações hidrofóbicas. Por outro lado, os parâmetros termodinâmicos para o sistema HSA–RuBD evidenciaram que as espécies em questão interagem via ligações de hidrogênio. As distâncias centro a centro entre o resíduo de Trp-214 e os complexos RuBDQ e RuBD, estimadas pela teoria de FRET, são de 3,38 e 3,01 nm, respectivamente.

Os experimentos de supressão de fluorescência síncrona da HSA indicaram que há a interação entre a HSA e ambos os complexos RuBDQ e RuBD em um microambiente proteico próximo aos resíduos de aminoácido de Tyr e Trp-214. Os estudos via ancoragem molecular demonstraram que é possível a interação entre a HSA e ambos os complexos em um microambiente proteico próximo aos resíduos de aminoácido de Tyr-452 e Trp-214, corroborando com as informações obtidas via experimentos de supressão de fluorescência síncrona da HSA. Os estudos via ancoragem molecular, evidenciaram, ainda, que é possível que ambos os complexos estejam inseridos em um microambiente proteico referente ao Sítio I, subdomínio IIA da HSA.

REFERÊNCIAS

- ARNOLD, W. P.; MITTAL, C. K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. **Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 74, p. 3203-3207, 1977.
- BASKEN, N. E.; MATHIAS, C. J.; GREEN, M. A. **Elucidation of the human serum albumin (HSA) binding site for the Cu-PTSM and Cu-ATSM radiopharmaceuticals**. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 98, p. 2170-2179, 2009.
- BATISTA, A. A.; PEREIRA, C.; QUEIROZ, S. L.; de OLIVEIRA, L. A. A.; SANTOS, R. H. D.; GAMBARDILLA, M. T. D. **Nitrosyl ruthenium complexes with general formula $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{P-P})]$ ($\text{P-P} = \{\text{PPh}_2(\text{CH}_2)_n\text{PPh}_2\}$, $n = 1-3$ and $\{\text{PPh}_2\text{-CH}=\text{CH-PPh}_2\}$). X-ray structure of $[\text{RuCl}_3(\text{NO})\{\text{PPh}_2(\text{CH}_2)_3\text{PPh}_2\}]$** . Polyhedron, v. 16, p. 927-931, 1997.
- BIJARI, N.; SHOKOOHINIA, Y.; ASHRAFI-KOOSHK, M.-R. et al. **Spectroscopic study of interaction between osthole and human serum albumin: identification of possible binding site of the compound**. Journal of Luminescence, vol. 143, p. 328-336, 2013.
- BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C. N.; RODRIGUES, G. J.; NETO, M. A.; VERCESI, J. A.; de LIMA, R. G.; da SILVA, R. S.; BENDHACK, L. **Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase**. Journal of Inorganic Biochemistry, v. 103, p. 1366-1374, 2009.
- BONTURIM, E. **Luminescência**. 2017. Disponível em: <<http://nanoluminescent.blogspot.com/p/luminescencia.html>>.
- BORGES, S. S. S. et al. **Ruthenium nitrosyl complexes with n-heterocyclic ligands**. Inorganic Chemistry, v. 37, p. 2670-2677, 1998.
- BOTTOMLEY, F. **Nitrosyl complexes of ruthenium**. Coordination Chemistry Review, v. 26, p.7-32, 1978.
- BUTLER, A. R. **The biological roles of nitric oxide**. Chemistry & Industry, v. 26, p. 828-830, 1995.
- CACITA, N.; NIKOLAOU, S. **Studying the interaction between trinuclear ruthenium complexes and human serum albumin by means of fluorescence quenching**. Journal of Luminescence, v. 169, p. 115-120, 2016.
- CHATTERJEE, T.; PAL, A.; DEY, S.; CHATTERJEE, B.-K.; CHAKRABARTI, P. **Interaction of virstatin with human serum albumin: spectroscopic analysis and molecular modeling**. Plos One, vol. 7, p. 1-12, 2012.
- CUI F. L., FAN J., LI J. P., HU Z. D. Bioorg. Med. Chem., v. 12, p. 151, 2004.
- da SILVA, R. E.; TOLEDO, K. C. F.; JORGE, H. B.; NETO, B. M.; de SOUZA, V. R.; NAKATANI, H. S. **Interação de complexo de rutênio com albumina bovina para detecção amperométrica de ácido ascórbico**. Química Nova, v. 37, p. 1633-1638, 2014.

da SILVA, R. S.; de LIMA, R. G.; MACHADO, S. P. **Design, Reactivity, and Biological Activity of Ruthenium Nitrosyl Complexes.** *Advances in Inorganic Chemistry*, v. 67, cap. 6, p. 265-294, 2015.

de LIMA, R. G.; SAUAIA, M. G.; BONAVENTURA, D.; TEDESCO, A. C.; BANDHACK, L. M.; da SILVA, R. S. **Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the [Ru(L)(tpy)NO]³⁺ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation.** *Inorganica Chimica Acta*, v. 359, n. 8, p. 2543-2549, 2006.

de LIMA, R. G.; SILVA, B. R. da SILVA, R. S. BENDHACK, L. M. **Ruthenium Complexes as NO Donors for Vascular Relaxation Induction.** *Molecules*, v. 19, p. 9628-9654, 2014.

DE, P.; MAJI, S.; CHOWDHURY, A. D.; MOBIN, S. M.; MONDAL, T. K.; PARETZKI, A.; LAHIRI, G. K. **Ruthenium nitrosyl complexes with 1,4,7-trithiacyclononane and 2,2'-bipyridine (bpy) or 2-phenylazopyridine (pap) coligands. Electronic structure and reactivity aspects.** v. 40, n. 46, p. 12527-12539, 2011.

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

de SANTANA, D. C. A. S.; DIAS, K.; SOUZA, J. G.; OGUNJIMI, A. T.; SOUZA, M. C.; SILVA, R. S.; LOPEZ, R. F. V. **NO exchange for a water molecule favorably changes iontophoretic release of ruthenium complexes to the skin.** *Molecules*, v. 22, p. 104, 2017.

EFTINK, M. R., ROSS, J. B. A., LUCK, L. A., ROUSSLANG, K. W., SUBRAMANIAM, V., STELL D. G., GAFNI, A. **Topics in Fluorescence Spectroscopy: Protein Fluorescence.** J. R. Lakowicz, ed.; Kluwer Academic Publishers, New York, vol. 6, cap. 1-3, 2000.

FELDMAN, P.L.; GRIFFITH, O. W.; STUEHR, D. J. **The surprising life of nitric oxide.** *C&EN*, v. 20, p. 26-33, 1993.

FORD, P. C. et al. **Photochemistry of metal nitrosyl complexes. Delivery of nitric oxide to biological targets.** *Coordination Chemistry Review*, v. 171, p. 185-202, 1998.

FORD, P. C.; de RUDD, F. P.; GAUNDER, R.; TAUBE, H. **Synthesis and proprieties of pentaaminepyridineruthenium (II) and related pentaammuneruthenium complexes of aromatic nitrogen heterocycles.** *Journal American Chemistry Society*, v. 90, p.1187-1194, 1968).

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. F. **The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.** *Nature*, v. 288, p. 373-376, 1980.

GREEN, L. C.; DELUZURIAGA, K. R.; WAGNER, D. A.; RAND, W. ISTFAN, N.

GUENGERICH, C. P.; SCHUG, L. **Reaction of nitrosylpentaammineruthenium (II) with ethylamine, methylamine, and hexaammineruthenium (III) ion to produce dinitrogen complexes.** *Inorganic Chemistry*, v. 17, p. 1378-1379, 1978.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa.** 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC, cap. 21, p. 483-501, 2001.

HEGESH, E.; SHILOAH, J. **Blood nitrates and infantile methemoglobinemia.** *Clin. Chim. Acta.*, v. 125, p. 107-142, 1982.

HEINRICH, T. A. **Aspectos químicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexo rutênio-nitrosilo como precursor de óxido nítrico. Princípios de aplicação como agente citotóxico em linhagem de células tumorais.** 2013. 159 p. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2013.

HOROWITZ, J. D. **Role of nitrates in unstable angina pectoris.** *Am. J. Cardiol.*, v. 70, Suppl B:64B-71B, 1992.

HU, Y.-J.; LIU, Y.; SUN, T.-Q.; BAI, A.-M.; LÜ, J.-Q.; PI, Z.-B. **Binding of antiinflammatory drug cromolyn sodium to bovine serum albumin.** *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 39, n. 4-5, p. 280-285, 2006.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. **Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide.** *Circ. Res.*, v. 61, p. 866-879, 1987.

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

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

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

LIU, J.; TIAN, J.-N.; ZHANG, J.; HU, Z.; CHEN, X. **Interaction of magnolol with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 376, no. 6, p. 864-867, 2003.

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

LOKESH, R.; KRISHNAN, K. **A Handbook on Protein-Ligand Docking, Tool: AutoDock4.** *Inovare Journal of Medical Sciences*, v. 4, n. 3, p. 632, 2016.

MASSUI, H.; LEVER, A. B. P.; DODSWORTH, E. S. **Substituent effects and bonding characteristics in (o-benzoquinonediimine)bis(bipyridine)ruthenium(II) complexes.** *Inorganic Chemistry*, v. 32, p. 97, 1993.

- MENG, X-Y.; ZHANG, H-X. MEZEI, M.; CUI, M. **Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery**. Current Computer-Aided Drug Design, v. 7, p.146-157, 2011.
- MILLER, J.N. **Recent advances in molecular luminescence analysis**. Proc. Anal. Div. Chem. Soc., v. 16, p. 203-208, 1979.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J. HIGGS, E. A. **Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology**. Pharm. Rev., v. 43, p. 109-120, 1991.
- MOREIRA, M. B.; FRANCISCATO D.S.; TOLEDO, K. C. F.; de SOUZA, J. R. B.; NAKATANI H. S.; de SOUZA, V. R. **Avaliação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio**. Química Nova, v. 38, n. 2, p. 227-232, 2015.
- MUNHOZ, F. C.; POTJE, S. R.; PEREIRA, A. C.; DARUGE, M. G., da SILVA, R. S.; Bendhack, L. M.; ANTONIALI, C. **Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NO-donor $[Ru(terpy)(bdq)NO]^3+$ in spontaneously hypertensive rats**. Nitric Oxide, v. 26, p. 111-117, 2012.
- NAVEENRAJ, S.; ANANDAN, S.; J. Photochemistry Photobiology. C: Photochemistry Review, v. 14, p. 53, 2013.
- O'HAVER, T. C., FELL, A. F., SMITH, G. et al. **Derivative spectroscopy and its applications in analysis**. Analytical Proceedings, vol. 19, n. 1, p. 22-46, 1982.
- PARKER, J. P. **Nitrate therapy in stable angina pectoris**. N. Engl. J. Med., v. 316, p. 1635-1642, 1987.
- PETERS JR., T. **All About Albumin; Biochemistry, Genetics and Medical Applications**. Academic Press: San Diego, 1995.
- RANJBAR, S. et al. **Studies of the interaction between isoimperatorin and human serum albumin by multispectroscopic method: Identification of possible binding site of the compound using esterase activity of the protein**. The Scientific World Journal, v. 2013, p. 1-13, 2013.
- REIS, F. C. C.; COELHO, J. S. V.; PAZIN, W. M.; NIKOLAOU, S. **A new homoleptic coordination compound of ruthenium and norfloxacin and its interaction with human serum albumin**. Inorganic Chemistry Communications, v. 63, p. 96-100, 2016.
- ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. **Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability**. Biochemistry. v. 20, p. 3096-3102, 1981.
- SAUAIA, M. G.; da SILVA, R. S. **The reactivity of nitrosyl ruthenium complexes containing polypyridyl ligands**. Transition Metal Chemistry, v. 28, p. 254-259, 2003.

SCHRÖDER, M.; STEPHENSON, T. A. Ruthenium. Em: WILKINSON, G. **Comprehensive Coordination Chemistry**. The synthesis, reactions and applications of coordination compounds. 1^a ed. Nova Iorque, Pergamon Press, v. 4, cap. 45, p. 279-518, 1987.

SEDDON, E. A.; SEDDON, K. R. **The chemistry of ruthenium**. Nova Iorque, Elsevier, 1984.

SEEDHER, N.; BHATIA, S. **Reversible binding of celecoxib and valdecoxib with human serum albumin using fluorescence spectroscopic technique**. Pharmacological Research, vol. 54, n. 2, p. 77-84, 2006.

SHEEHAN, D. **Physical Biochemistry: Principles and Applications**, 2^a ed. 2009.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5^a ed. São Paulo: Bookman, 2002.

SOTOMAYOR, M. D. P. T.; DIAS, I. L. T.; LANZA, M. R. V.; MOREIRA, A. B.; KUBOTA, L. T. **Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas**. Química Nova, v. 31, n. 7, p. 1755-1774, 2008.

STRYER, L. **Fluorescence spectroscopy of proteins**. Science, vol. 162, n. 3853, p. 526-533, 1968.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. **Mamallian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 82, p. 7738-7742, 1985.

SULLIVAN, B. P.; CALVERT, J. M.; MEYER, T. J. **Cis-trans isomerism in RuCl₂(tpy)(PPh₃). Comparasions between the chemical and physical properties of a cis-trans isomeric pair**. Inorganic Chemistry, v. 19, p. 1404-1407, 1980.

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

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

TFOUNI, E.; FORD, P. C. **Thermal and photochemical proprieties of some trans-disubstituted tetraamineruthenium (II) complexes of aromatic nitrogen heterocycles, trans-Ru(NH₃)₄LL'²⁺**. Inorganic Chemistry, v. 19, p. 72-76, 1980.

TRAYLOR, T. G.; SHARMA, V. S. **Why NO?** Biochem., v. 31, p. 2847-2855, 1992.

VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**, 3^a ed. 2001.

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

WALSH, J. L.; BULLOCK, R. M.; MEYER, T. J. **Alkyl nitrite complexes of ruthenium prepared by acid-base chemistry at the bound nitrosyl group**. *Inorganic Chemistry*, v. 19, p. 865-869, 1980.

YOUNG, V. R.; TANNENBAUM, S. R. **Nitrate biosynthesis in man**. *P. Natl. Acad. Sci-Biol.*, v. 78, p. 7764-7768, 1981.

YUE, Y.; CHEN, X.; QIN, J.; YAO, X. **Characterization of the mangiferin-human serum albumin complex by spectroscopic and molecular modeling approaches**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 49, n. 3, p. 753-759, 2009.