



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

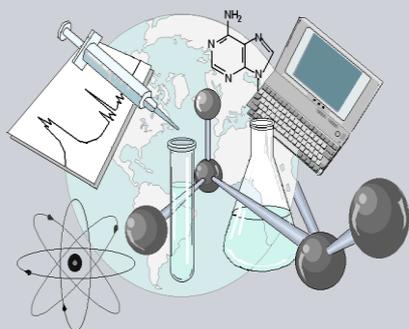
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Influência de ligantes ancilares na inserção de complexos de rutênio em proteína aplicada ao desenvolvimento de sensores amperométricos

Dissertação apresentada por
RONNIE EDSON DA SILVA ao
Programa de Pós-Graduação em
Química do Departamento de
Química do Centro de Ciências
Exatas da Universidade Estadual de
Maringá como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre
em Química

CEE



Centro de
Ciências Exatas

MARINGÁ, MAIO DE 2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

“Influência de ligantes ancilares na inserção de complexos de rutênio em proteína aplicada ao desenvolvimento de sensores amperométricos”

Mestrando: Ronnie Edson da Silva
Orientador: Prof. Dr. Vagner R. de Souza

Maringá, Maio de 2014.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

S586i Silva, Ronnie Edson da
Influência de ligantes ancilares na inserção de complexos de rutênio em proteína aplicada ao desenvolvimento de sensores amperométricos / Ronnie Edson da Silva. -- Maringá, 2014.
63 f.: il. Color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Vagner R. de Souza.

Dissertação (Mestrado em Química) -
Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química.

1.Química inorgânica. 2.Complexos de rutênio.
3.Albumina de soro bovino - BSA. 4.Sensores amperométricos. 5. Ácido ascórbico.
I. Souza, Vagner R., orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química.
III. Título.

546.632 21.ed.



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Ronnie Edson da Silva**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 23 de maio de 2014.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Wagner Roberto de Souza
Presidente - DQI/UEM

Profa. Dra. Helena Shizuko Nakatani
Membro - DQI/UEM

Prof. Dr. André Luiz Tessaro
Membro - UTFPR

“Porque cada um, independente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer.”

José Saramago (A Jangada e a Pedra)

Dedico este trabalho em especial a minha mãe Cimar Mendes, minha eterna tutora, educadora e incentivadora, que sempre me amou, me apoiou e fez o possível e o impossível para tornar realidade esta etapa do meu sonho e a minha irmã, Beatriz Mendes por sempre estar ao meu lado e a minha esposa Elisangela Pacheco, pelo apoio e amor incondicional que sempre torceu e acreditou em mim.

AGRADECIMENTOS

Às pessoas que são importantes e contribuíram com a execução deste trabalho de uma forma ou de outra, quero expressar meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente a Deus, que sempre esteve ao meu lado, me guiando e auxiliando nas escolhas certas.

Ao professor Dr. Vagner R. de Souza, por sempre poder me orientar nos momentos mais difíceis e principalmente pela paciência. Agradeço também por sempre poder me atender em horários especiais, mesmo estando já fora do expediente letivo.

A professora Dra. Helena S. Nakatani pelas várias conversas descontraídas e pelos vários conselhos dados desde a graduação.

A minha esposa Elisangela Pacheco pela paciência e por sempre me apoiar e me ajudar no decorrer do trabalho.

A minha mãe Cimar Mendes e minha irmã Beatriz Mendes que sempre me motivaram a sempre seguir em frente, havendo o que houver.

Aos colegas de laboratório Herculy, Mariete, Douglas, João Raul, Bento e principalmente ao Kalil, que sempre pude contar no que precisava.

A Vanessa Haffman por me acompanhar nas várias e várias noites e finais de semana na COMCAP-UEM.

A técnica Dra. Ivânia Schuquel pela paciência e ajuda na interpretação dos meus resultados.

ÍNDICE.....	I
RESUMO.....	III
ABSTRACT	V
ÍNDICE DE TABELAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Albumina do Soro Bovino.....	2
1.2 Eletrodos Modificados com Biomoléculas	5
1.3 Acido Ascórbico	9
2. OBJETIVO GERAL	13
2.1. Objetivos Específicos.....	13
3. EXPERIMENTAL	14
3.1. Reagentes	14
3.2. Procedimentos.....	15
2.1.1. Síntese	15
2.1.2. Preparação das soluções e amostras	17
3.3. Caracterização.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Caracterização espectroscópica dos complexos de rutênio.....	21
4.1. Espectroscopia de Fluorescência	31
4.2. Potencial aplicação dos complexos de rutênio com BSA na detecção amperométrica de ácido ascórbico.....	43
5. CONCLUSÃO.....	55

6. PERSPECTIVA FUTURA 57

7. REFERÊNCIAS..... 58

Resumo

Três novos complexos de rutênio de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2\text{L}]\text{PF}_6$ foram sintetizados e caracterizados pelas técnicas de RMN ^1H e UV/Visível. As interações dos complexos com a albumina do soro bovino foram monitoradas por espectros de supressão de fluorescência. As tendências dos valores de constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) em função da temperatura indicaram os possíveis mecanismos de interação desses três complexos com a macromolécula, sendo: *i*) mecanismo estático para os sistemas contendo os derivados $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{MeIM})]^+$ e $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(4,4'\text{-Bpy})]^+$; *ii*) mecanismo dinâmico para o sistema contendo o derivado $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{ISN})]^+$. Os parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG) associados à interação BSA – complexo de rutênio indicaram que os processos foram espontâneos e o caráter das forças de ligação envolvidas foi hidrofóbico para o sistema contendo o ligante ancilar isonicotinamida (ISN) e eletrostático para os sistemas contendo os ligantes ancilares metilimidazol (MeIM) e 4,4'-bipiridina (4,4'-Bpy). A utilização da sonda ibuprofeno (IBU) aliada aos parâmetros termodinâmicos, permitiu inferir a possível localização dos complexos de rutênio na biomolécula. Neste caso, o complexo contendo o ligante ancilar isonicotinamida ficou encapsulado em uma cavidade hidrofóbica mais interna, próxima ao resíduo de triptofano 212, enquanto os complexos contendo os ligantes ancilares metilimidazol e 4,4'-bipiridina ficaram alojados em uma região mais superficial da proteína, próxima ao resíduo de triptofano 134. Os ensaios eletroanalíticos preliminares envolvendo a modificação da superfície de eletrodos de FTO com albumina do soro bovino e complexos de rutênio revelaram a

[Resumo]

potencialidade desses sistemas como sensores amperométricos para a detecção de ácido ascórbico, em solução aquosa e na presença de dopamina (DA).

Abstract

Three new ruthenium complexes of general formula $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2\text{L}]\text{PF}_6$ were synthesized and characterized by RMN ^1H techniques and UV/Visible . The interaction of the complex with bovine serum albumin spectra was monitored by fluorescence quenching. The trends of the values contained suppression Stern-Volmer (K_{sv}) as a function of temperature indicate possible mechanisms for interaction of these three complexes with the macromolecule , where: *i*) static mechanism for systems containing derivatives $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{MeIM})]^+$ and $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(4,4'\text{-Bpy})]^+$; *ii*) dynamic mechanism for the system containing the derivative $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{ISN})]^+$. The thermodynamic parameters (ΔH , ΔS e ΔG) associated with the interaction BSA-ruthenium complex indicated that the cases were spontaneous and character of binding was hydrophobic forces involved for the system containing the ancillary ligand isonicotinamide (ISN) and to electrostatic systems containing the ancillary ligands methylimidazole (MeIM) and 4,4'-bipyridine (4,4'-Bpy) . The use of ibuprofen probe coupled with thermodynamic parameters, allowed us to infer the possible location of the ruthenium complexes in the biomolecule. In this case, the complex containing the ancillary ligand isonicotinamide (ISN) was encapsulated into a more hydrophobic internal cavity near the tryptophan residue 212, while the complex containing the ancillary ligands methylimidazole (MeIM) and 4,4'-bipyridine (4,4'-Bpy) were housed in a more superficial region of the protein , near the tryptophan residue 134.

Preliminary experiments involving electroanalytical the surface modification of electrodes FTO bovine albumin serum and ruthenium complex have revealed the

[Abstract]

potential of these systems as for amperometric detection of ascorbic acid in aqueous solution and in the presence of dopamine sensors.

Índice de Tabelas

TABELA 01. Métodos de modificação de superfície de eletrodos ^[34]	7
TABELA 02. Valores dos deslocamentos químicos obtidos pelas análises dos espectros de RMN dos complexos de rutênio.....	26
TABELA 03. Valores de absorvidade molar (ϵ) e comprimento de onda (λ) das transições eletrônicas observadas nos espectros eletrônicos dos complexos de rutênio.....	28
TABELA 04: Energia e composição dos orbitais moleculares para $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{ISN})]^+$	29
TABELA 05. Principais transições eletrônicas presentes no espectro de absorção na região de UV-vis do complexo $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{ISN})](\text{PF}_6)$ utilizando-se o método INDO/S.....	30
TABELA 06. Valores das constantes da Stern-Volmer variando a temperatura.....	37
TABELA 07. Parâmetros Termodinâmicos.....	39
TABELA 08. Valores de K_{SV} frente a sonda de Ibuprofeno.....	41
TABELA 09. Parâmetros eletroquímicos para os três EQM's em vários pHs.....	53
TABELA 10. Valores de LD obtidos para diferentes eletrodos.....	54

Índice de Figuras

Figura 01. Isomerização conformacional da BSA. De pH 7,0 para pH 4,3 – transição da forma normal (N) para a forma <i>fast</i> (F); de pH 4,3 para pH 2,7 – transição da forma F para forma estendida (E) ^[12]	2
Figura 02 – Estrutura Cristalina da BSA ^[18]	3
Figura 03: Linhas Gerais do desenvolvimento dos EQM's ^[32]	6
Figura 04. Principais direcionamentos no desenvolvimento dos EQM's.....	8
Figura 5: Estrutura do (a) L-áscórbico e (b) dehidroascórbico.....	9
Figura 06: Possível mecanismo de oxidação do ácido ascórbico ^[45]	10
Figura 07: Esquema ilustrando a síntese dos complexos Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ MeIM]PF ₆ , [Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ ISN]PF ₆ e [Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ 4,4'Bpy]PF ₆ com seus respectivos rendimentos.....	16
Figura 8. Espectro de RMN ¹ H do [Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ (MeIM)]PF ₆ em CDCl ₃	23
Figura 9. Espectro de RMN ¹ H do [Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ (4,4'Bpy)]PF ₆ em CDCl ₃	23
Figura 10. Espectro de RMN ¹ H do [Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ (ISN)]PF ₆ em CDCl ₃	24
Figura 11. Espectro de RMN ¹ H bidimensional - COSY do Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ ISN]PF ₆	24
Figura 12. Espectros eletrônicos dos complexos (Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ Cl), (Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ ISN)PF ₆ , (Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ (4,4'-Bpy)PF ₆ e Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ MeIM)PF ₆ em acetonitrila, concentração de 3x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , caminho óptico de 1 cm.....	27
Figura 13: Comparação entre os espectros eletrônicos teórico e experimental do complexo Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ (ISN)](PF ₆).....	31
Figura 14. Espectro de supressão da fluorescência do resíduo de triptofano causado pela adição do complexo [Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ ISN]PF ₆ . λ _{exc} = 280 nm, λ _{em} = 350 nm e t = 25 °C.....	33

- Figura 15.** Gráficos de Stern-Volmer referente à supressão da fluorescência do resíduo de Trp da BSA induzida pelos complexos com os ligantes MeIM(A), 4,4'-Bpy (B) e ISN (C), $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 350 \text{ nm}$36
- Figura 16.** Estrutura secundária tridimensional da proteína [66] e as supostas localizações dos complexos em seus respectivos sítios.....40
- Figura 17.** Voltamogramas cíclicos obtidos atmosfera de argônio para os eletrodos FTO puro e FTO quimicamente modificado com BSA/complexos de rutênio. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e pH 7,2.....45
- Figura 18.** Potenciais padrão de redução vs EPH (Eletrodo padrão de hidrogênio) e constantes de acidez do ácido ascórbico e espécies relacionadas, a 25° C e a força iônica 0,2 mol L⁻¹[71].....46
- Figura 19 -** Voltamogramas cíclicos obtidos pela oxidação do AA sobre o eletrodo modificado de FTO-BSA em atmosfera de argônio. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e pH 4,0.....47
- Figura 20.** Voltamogramas cíclicos obtidos pela oxidação do AA sobre o eletrodo modificado de FTO-BSA/Complexo com ligante de (a)MeIM, (b) 4,4'-Bpy e (c) ISN em atmosfera de argônio. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e pH 7,2.....48
- Figura 21.** Voltamogramas variando as velocidades de varredura para o eletrodo modificado de FTO-BSA/complexo de rutênio com o ligante MeIM. Velocidades de varredura de 50, 100 e 150 mV s⁻¹ em pH 7,2 e utilizando eletrodo de referência de saturado de calomelano.....49
- Figura 22.** Voltamogramas cíclicos para uma solução de AA 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ em tampão McIlvaine 0,1 mol L⁻¹. Eletrodos modificados com BSA contendo os ligantes (a)MeIM, (b) 4,4'-Bpy e (c) ISN. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e pH 7,2.....50
- Figura 23.** Voltamogramas em função do pH para os eletrodo modificado de FTO-BSA/Complexo com ligante de (a) MeIM, (b) 4,4'-Bpy e (c) ISN em atmosfera de argônio. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$51
- Figura 24.** Voltamogramas do eletrodo contendo complexo de [Ru(PAN)(PPh₃)₂MeIM]PF₆ na presença de (a) diferentes concentrações de AA (0,07 x 10⁻³ a 1,00 x 10⁻³ mol L⁻¹, com adições a cada 50 µL de AA. Este voltamograma foi apresentado com 5 concentrações para melhor visualização, porém foi feito com 11 variações. (b) Curva analítica. pH 4,0 e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$52

Figura 25. Voltamogramas cíclicos obtidos pela oxidação da DA sobre o eletrodo modificado de FTO-BSA em atmosfera de argônio. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e pH 4,0.....55

Índice de Abreviaturas

AA = Ácido ascórbico

Asp-Thr-His = Aspartato – Treonina – Histidina.

Asp-Ala-His = Aspartato - Alanina – Histidina.

BSA = Albumina de soro bovino.

COSY = Correlação bidimensional $^1\text{H} - ^1\text{H}$.

DA = Dopamina

DMSO = Dimetilsulfóxido.

EQM = Eletrodo quimicamente modificado.

EPH = Eletrodo padrão de hidrogênio

FTO = Eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor.

FTO-BSA = Eletrodo de FTO modificado com BSA

FTO-BSA/complexo de rutênio = Eletrodo de FTO modificado com BSA + complexo

HOMO = Orbital molecular ocupado de maior energia.

HSA = Albumina do soro humano

IBU = Ibuprofeno.

MeIM = Metilimidazol.

ISN = Isonicotinamida.

4,4'-Bpy = 4,4'-bipiridina.

K_{sv} = Constante de Stern-Volmer.

LD = Limite de detecção.

LQ = Limite de quantificação.

LUMO = Orbital molecular não-ocupado de menor energia.

MeIM = Metilimidazol.

PAN = Piridilazonaftol.

PPh₃ = Trifenilfosfina

RMN ^1H = Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SD = Sensibilidade.

TCML = Transferência de carga metal – ligante.

Trp = Triptofano.

UV-vis = Ultravioleta-visível.

VC = Voltametria cíclica.

λ = Comprimento de onda (nm).

$\Delta\lambda$ = Intervalo de varredura na técnica de fluorescência (nm).

$\lambda_{\text{emissão}}$ = Comprimento de onda de emissão (nm).

$\lambda_{\text{excitação}}$ = Comprimento de onda de excitação (nm).

ε = Absortividade molar ($\text{L cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$).

1. Introdução

A química de coordenação de complexos de rutênio tem despertado o interesse de vários grupos de pesquisadores¹⁻⁴, devido às suas propriedades catalíticas, redox, biológicas e supramoleculares, que podem ser modeladas por alterações nas estruturas dos ligantes.

A associação destes derivados metálicos com a seletividade de estruturas proteicas pode ser explorada com vantagem em sensores eletroquímicos que usam eletrodos quimicamente modificados. Por exemplo, proteínas imobilizadas sobre a superfície de um eletrodo condutor podem induzir uma variação no potencial do eletrodo quando se ligam ao analito. Dessa forma, a presença do analito na cavidade proteica pode ser registrada pela técnica de voltametria⁵. Moléculas de albumina bovina ligadas à superfície de eletrodos foram utilizadas desta maneira para detecção de vários analitos de interesse biológico, como relatado em artigos de revisão^{6,7}.

Contudo, antes de explorar a seletividade da proteína, aliada a versatilidade redox dos complexos e desenvolver sensores eletroquímicos em todas as áreas da química analítica, indo desde as indústrias de alimentos e medicamentos, até os centros de monitoramento ambiental⁸ é necessário estudar as interações existentes entre o centro metálico e a proteína, como as interações doador-aceitador, interações hidrofóbicas e coordenação do complexo no ambiente proteico.

Nesse sentido, vamos apresentar a partir de agora algumas características do arcabouço proteico, da modificação de superfícies de eletrodos, do analito de interesse e do ácido ascórbico.

1.1 Albumina do Soro Bovino

A albumina do soro bovino é a principal proteína do plasma sanguíneo, cuja concentração é de 50 mg mL^{-1} . Nos mamíferos, a albumina é sintetizada no fígado, pelos hepatócitos e apresenta um tempo de meia-vida de 19 dias⁹. Possui em sua estrutura uma sequência polipeptídica de 583 aminoácidos, e ponto isoelétrico em torno de $4,70 - 5,60$ ^{10, 11}. Em pH 7,0 a proteína apresenta-se na forma aniônica e, em função do pH, em especial no intervalo de pH 4,0 a 8,0, ocorre mudanças conformacionais conforme ilustrado na **Figura01**.

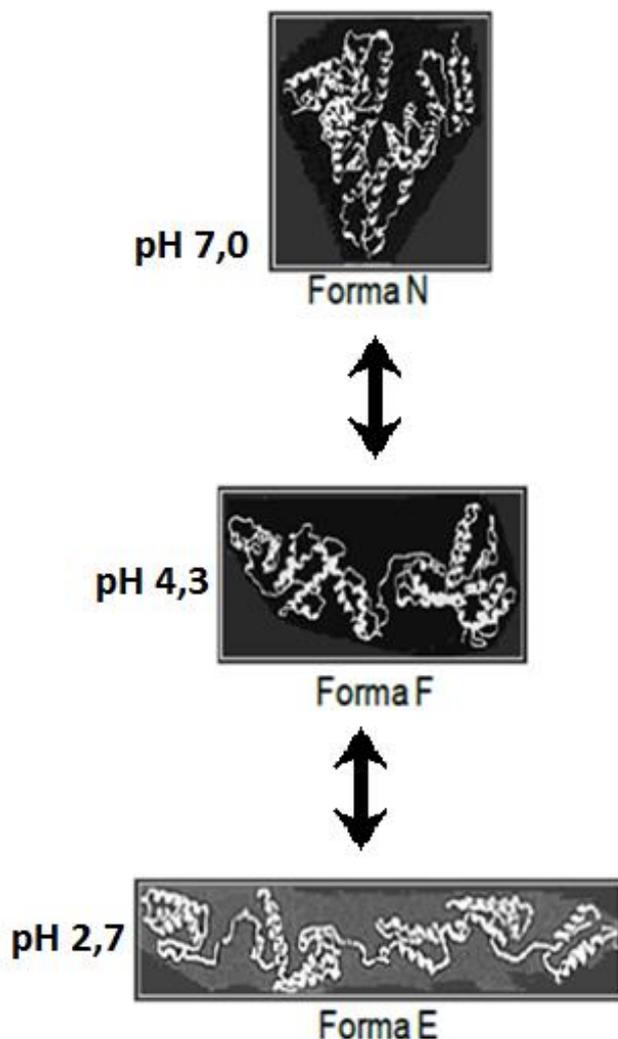


Figura 01. Isomerização conformacional da BSA. De pH 7,0 para pH 4,3 – transição da forma normal (N) para a forma *fast* (F); de pH 4,3 para pH 2,7 – transição da forma F para forma estendida (E)⁹.

A estrutura da albumina bovina é muito similar a da proteína humana (HSA – *Human Serum Albumin*). A BSA apresenta uma sequência de aminoácidos homóloga em 76% em relação a HSA⁹, se diferenciando apenas na quantidade de Trp disponíveis: a BSA apresenta dois resíduos (Trp 134 e 212) e a HSA apresenta somente um (Trp 214).

Há também uma diferença na sequência de sítios N-terminais, onde a BSA apresenta a tríade Asp-Thr-His, e a HSA tem a tríade terminal Asp-Ala-His^{12,13}.

Neste contexto, decidiu-se utilizar neste trabalho a BSA frente à HSA, pois além da sua semelhança com a estrutura primária da HSA, é estável e de baixo custo¹⁴.

A BSA nos mamíferos é responsável pelo controle da pressão osmótica necessária para a distribuição correta dos líquidos corporais entre o compartimento intravascular e o extravascular, localizado entre os tecidos, bem como pelo metabolismo e distribuição de várias substâncias endógenas e exógenas, como, ácidos graxos, hormônios e fármacos. Além disso, a biomolécula faz ligações covalentes com fosfato de piridoxil, cisteína, e vários íons de metais de transição, como Cu(II), Ni(II), Hg(II), Ag(II) e Au(II).

Como uma proteína transportadora multifuncional, a albumina pode ser considerada tanto como uma carregadora chave ou também como um reservatório de óxido nítrico, o que implica em vários processos fisiológicos, incluindo processos de neurotransmissão¹⁰.

A BSA é composta de dois grandes sítios, chamados de sítio I e II de Sudlow¹⁵, os quais estão subdivididos em A e B, como ilustrado na **Figura 02**, onde se encontram os dois resíduos do aminoácido de triptofano: o Trp 134 no sítio I; e o Trp 212 localizado no sítio II.

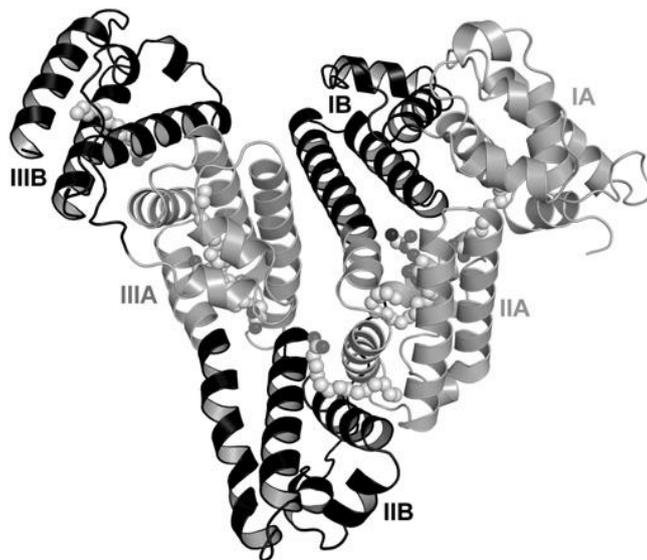


Figura 02– Estrutura Cristalina da BSA (Baseado no modelo da HSA)¹⁶

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

O estudo das interações entre fármacos e proteínas é de grande importância na medicina, farmacologia e bioquímica, pois o metabolismo e a eficácia de fármacos no organismo está relacionada com a sua afinidade pela macromolécula. Alguns íons metálicos presentes no plasma do sangue podem afetar a ligação entre fármacos e a BSA. Algumas proteínas plasmáticas, como a albumina do soro, podem atuar como agente sequestrante de íons metálicos e têm uma variedade de sítios metálicos que podem apresentar diferentes especificidades e fenômenos de alteração conformacional na albumina do soro bovino.

Para a obtenção das informações estruturais e dinâmicas sobre o ambiente proteico, utilizamos a técnica de fluorescência devido a sua precisão, sensibilidade, rapidez e conveniência de uso¹⁷⁻²¹. Os diferentes mecanismos de supressão são

geralmente classificados como dinâmico ou estático, que podem ser distinguidos pela sua dependência da temperatura e da viscosidade²².

Proteínas como a BSA apresentam em suas estruturas três fragmentos fluorescentes: resíduos de triptofano, de tirosina e de fenilalanina. Dos três grupos, os resíduos de triptofano exibem a maior densidade de fluorescência²³.

Assim, a sensibilidade dos fragmentos de triptofano permite observar mudanças espectrais resultantes de diversos fenômenos como a associação proteína-proteína, proteína-complexos, desnaturação, entre outros.

1.2. Eletrodos Modificados com Biomoléculas

Atualmente, um dos campos mais promissores da química analítica é o estudo de biossensores, em termos de investimento financeiro, publicações na literatura e número de pesquisadores ativos²⁴.

Isso tudo por possuírem enormes vantagens, como o grande poder de seletividade que os tornam capazes de reconhecer certos analitos numa amostra complexa, assim reduzindo a necessidade de tratamento da amostra, evitando possíveis problemas relacionados ao preparo da mesma.

Um biossensor é constituído por uma estrutura biológica (enzimas, proteínas, células, partículas de células, tecidos, anticorpos, etc.) como agente seletivo interligado e imobilizado em um material condutor que converte o sinal biológico em um sinal químico ou físico (transdutor).

Os primeiros trabalhos com eletrodos modificados foram o de Lane e Hubbard em 1973²⁵. Em 1975 Murray²⁶ descreveu a modificação química da superfície de eletrodos e, também introduziu o termo eletrodo quimicamente modificado no meio

científico para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas imobilizadas em sua superfície objetivando-se controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução, melhorando assim sua seletividade e abrindo novas possibilidades para novas aplicações.

Nas últimas décadas, os eletrodos quimicamente modificados (EQM's) vêm sendo muito utilizados nas áreas de eletroquímica e eletroanalítica^{26, 27} devido à versatilidade de modificar a superfície do eletrodo, bem como a diversidade de substâncias que podem agir como modificadores eletroquímicos.

Diversos sensores são baseados no ancoramento da BSA na superfície do eletrodo, podendo ser aplicados numa abordagem ambiental, industrial e clínica²⁸. Além do mais, estudos recentes apontam também para sua potencial utilização como sensor para discriminação quiral²⁹.

Um EQM consiste basicamente em duas partes: *i*)o eletrodo suporte, *ii*)a camada do modificador químico ou biológico.

O EQM deve ser preparado de acordo com os resultados que o operador deseja investigar. A **Figura 03** apresenta a evolução dos EQM nas últimas décadas:

[Introdução]

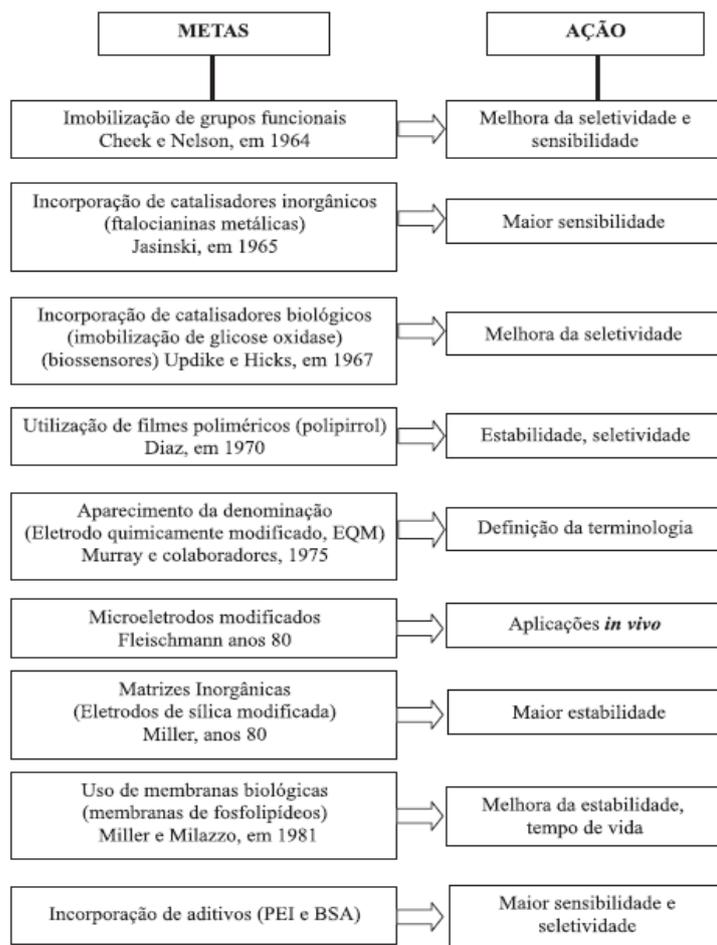


Figura 03: Linhas Gerais do desenvolvimento dos EQM's³⁰.

Os métodos de introduzir o agente modificador na superfície do eletrodo base são variados e dependem da natureza do eletrodo e do agente modificador³⁰, como resumido na Tabela 01.

TABELA 01. Métodos de modificação de superfície de eletrodos³⁰.

Modificações	Características
Adsorção	Incorporação simples e rápida de compostos em uma ampla gama de eletrodos base
Ligação covalente	Incorporação de um vasto número de substâncias, de maneira estável, através da manipulação da reatividade dos grupos funcionais existentes na superfície do eletrodo
Filmes poliméricos	Imobilização de polícamadas da espécie ativa na superfície do eletrodo – Ampliação da resposta eletroquímica
Materiais compósitos	Possibilidade de modificação interna do material eletródico. Exemplos: pasta de carbono, resina epóxi, poliestireno, etc

Entre os EQM's, pode-se optar por várias possibilidades existentes em suas "n" aplicações, basta o pesquisador saber qual linha vai seguir, tendo opções como controle de seletividade, eletrocatalise, aplicação de monocamadas em eletrodos automontados³¹, entre uma infinidade de novas aplicações.

Seguindo este conceito, podem-se destacar os principais enfoques analíticos envolvidos no desenvolvimento de EQM's, como demonstrado na **Figura 04**.

Uma das técnicas frequentemente utilizadas para o estudo de eletrodos modificados é a voltametria cíclica (VC), que também foi de essencial importância na realização deste trabalho.

A eficiência desta técnica implica na sua habilidade em fornecer de forma rápida informações sobre a cinética de transferência de elétrons, do processo redox e sobre reações químicas acopladas aos processos de adsorção.

A voltametria cíclica é uma técnica mais comumente utilizada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. Esta técnica é normalmente o primeiro experimento utilizado em um estudo eletroquímico, pois oferece rapidamente

a localização do potencial redox da espécie eletroativa e faz a avaliação conveniente do efeito do meio no processo redox.

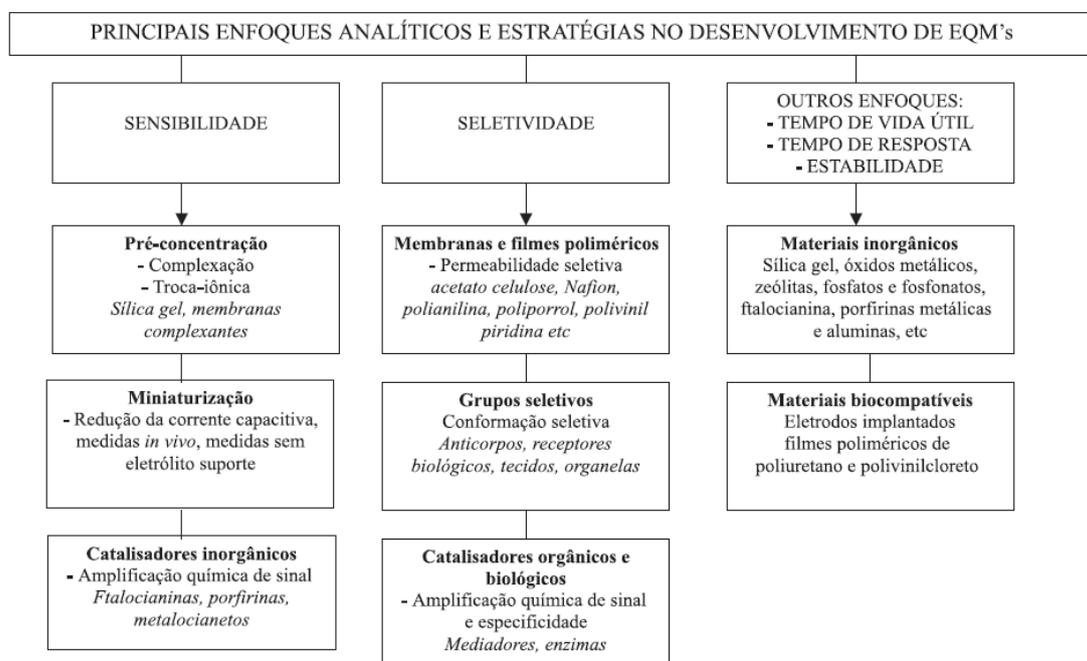


Figura 04. Principais direcionamentos no desenvolvimento dos EQM's.

1.3. Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico (AA ou ácido L-ascórbico) é uma vitamina hidrossolúvel e antioxidante, sendo utilizado como analito no eletrodo modificado. O AA é encontrado em frutas cítricas e vegetais e, está fisiologicamente envolvido com a absorção de ferro e síntese de colágeno^{31, 32}. Os seres humanos são incapazes de sintetizar o ácido ascórbico, logo, sua ingestão deve ser via dieta. O ácido ascórbico também tem sua aplicação em cosméticos, pois, atuando como um forte antioxidante ele ajuda na remoção de radicais livres gerados por exposição à radiação ultravioleta e também na restauração da vitamina. E³³.

Vitamina C é o termo frequentemente usado para referir-se ao ácido L-ascórbico, cuja estrutura molecular está representada na **Figura 5-a**, que é sua forma bioquímica e fisiologicamente ativa.

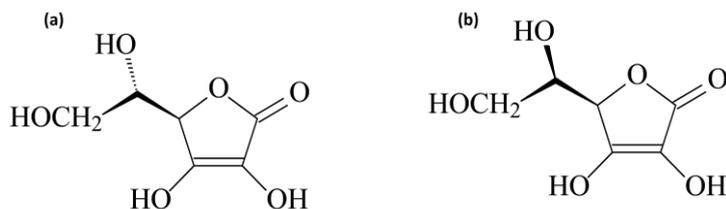


Figura 05: Estrutura do ácido (a) L-ascórbico e (b) Dehidroascórbico

Estruturalmente o AA é um ácido de açúcar hexanóico que apresenta dois prótons dissociáveis, cujos valores de constante de dissociação são pK_{a1} 4,04 e pK_{a2} 11,34³⁴. O AA é conhecido por suas propriedades redutoras, sendo facilmente oxidado em ácido dehidroascórbico, **Figura 5-b**, atuando como um poderoso antioxidante contra doenças induzidas por radicais livres³⁵⁻³⁹.

Ácido ascórbico é o composto biológico eletroativo mais comum, sendo facilmente oxidado, o que constitui a base de sua determinação eletroquímica.

O comportamento eletroquímico desse analito tem como característica a irreversibilidade do par redox ácido L-ascórbico / ácido dehidroascórbico, e vários pesquisadores tem se dedicado a estudar o mecanismo de oxidação do mesmo³⁴. O mecanismo dessa reação é descrito por uma transferência de elétrons eletroquimicamente reversível associada a reações químicas irreversíveis, determinando um processo irreversível global, onde a oxidação do ácido ascórbico envolve a liberação de dois elétrons e dois prótons, para produzir ácido dehidroascórbico³⁵, **Figura 06**.

Devido a importância biológica e tecnológica do ácido ascórbico várias técnicas têm sido utilizadas para sua detecção e quantificação, entre elas, cromatografia líquida

de alta performance com UV, detecção fluorimétrica e eletroquímica e métodos eletroanalíticos.

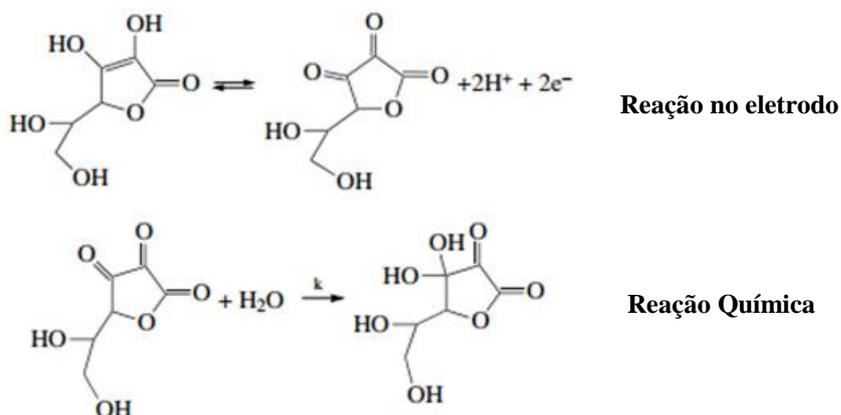


Figura 06: Possível mecanismo de oxidação do ácido ascórbico³⁵.

Sua determinação em alimentos é bastante complexa em função dos baixos níveis em que este pode ser encontrado, além da presença de substâncias interferentes da matriz estudada que podem, inclusive, contribuir para a sua degradação.

No Brasil, o método oficial para a quantificação de ácido ascórbico em medicamentos é a titulação com iodato de potássio⁴⁰. Já para a determinação em sucos de frutas, é mais utilizada a titulação pelo método de Tillmans⁴⁰, que se baseia na redução do corante 2,6-diclorofenol indofenol por uma solução ácida de vitamina C. Nesse caso, o titulante age como indicador e o ácido ascórbico pode ser determinado pela medida do excesso do reagente, no entanto, este método sofre interferência de ferro, estanho, cobre, sulfito e tiosulfato e ainda apresenta dificuldade de visualização do ponto final, quando se trabalha com amostras coloridas⁴¹.

Entre os métodos de detecção do ácido ascórbico acima citado, o método eletroquímico é considerado o mais adequado, devido a sua alta seletividade e

simplicidade⁴², haja vista os inúmeros trabalhos relatando a confecção e aplicação de eletrodos quimicamente modificados para a determinação de AA⁴³⁻⁴⁵.

Um dos interferentes mais comuns no sensoriamento de ácido ascórbico é a dopamina (DA), um neurotransmissor importante, precursor da adrenalina e da noradrenalina. Suas principais funções estão no sistema nervoso central, no controle hormonal, renal e cardiovascular, responsável pelos aspectos da cognição, comportamento, aprendizado, atenção, motivação, tomada de decisão e de também é regulador do humor.

Diversas doenças podem estar relacionadas com a variação do nível de DA, entre elas está a esquizofrenia, doença de Parkinson, a doença de Huntington, depressão e hiperatividade⁴⁶.

O ácido ascórbico e a dopamina geralmente coexistem fisiologicamente nos mamíferos, portanto, o desenvolvimento de um método sensível e seletivo para a determinação simultânea é altamente desejável para aplicações analíticas. Para ultrapassar estes problemas, vários eletrodos modificados foram construídos e utilizados para a determinação simultânea destes compostos⁴⁷.

Nesse contexto, apresentamos nessa dissertação os resultados obtidos da interação de complexos de rutênio com a proteína albumina do soro bovino e sua potencial aplicação como sensor amperométrico de ácido ascórbico em meio aquoso.

2. Objetivo Geral

Avaliar a influência de ligantes ancilares no processo de inserção de complexos de rutênio no arcabouço proteico da albumina do soro bovino, visando a sua aplicação no sensoriamento amperométrico de moléculas de interesse biológico.

2.1. Objetivos Específicos

Diante do quadro apresentado, este trabalho tem como objetivos específicos:

- Sintetizar os complexos de rutênio de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{L})]\text{PF}_6$, sendo L = metilimidazol (MeIM), isonicotinamida (ISN) e 4,4'-bipiridina (4,4'-Bpy);
- Caracterizar a série de complexos por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e Espectroscopia de Absorção na região UV-visível;
- Monitorar a interação dos complexos com a BSA por técnicas de fluorescência;
- Determinar o mecanismo de supressão de fluorescência nos três sistemas;
- Obter parâmetros termodinâmicos das interações BSA-complexos de rutênio;
- Inferir o sítio de ligação dos complexos na BSA via ensaios competitivos com ibuprofeno;
- Modificar a superfície de eletrodos de FTO com BSA e complexos de rutênio;
- Avaliar a potencialidade dos eletrodos modificados no sensoriamento de ácido ascórbico em solução aquosa.

3. Experimental

3.1. Reagentes

Os reagentes abaixo foram utilizados sem purificação prévia:

- Etanol absoluto (C_2H_6O , 99,3%), da marca *Fmaia Ind e Com Ltda.*
- Albumina do soro bovino (BSA, 98%), Nitrato de prata ($AgNO_3$, 99,0%), Metilimidazol (MeIM, 99,9%), Isonicotinamida (ISN, 99,0%), 4,4'-Bipiridina (4,4'-Bpy, 98,0%) e Hexafluorofosfato de amônio (NH_4PF_6 , 98%), Hidróxido de Sódio (NaOH, 98,0%), Ácido L-Ascórbico ($C_6H_8O_6$, 99,5%), Trifenilfosfina (PPh_3 , 95,0%), Cloreto de Rutênio Tri-Hidratado ($RuCl_3 \cdot 3H_2O$, 98,0%) todos da marca *Aldrich Chemical Co.*
- Diclorometano (CH_2Cl_2 , 99,5%), da marca *Biotec Reagentes Analíticos*
- Acetonitrila (CH_3CN , 99,8%), da marca *Vetec Química Fina.*
- Argônio (Ar, 5.0 analítico), da marca *White Martins.*
- Dimetilsulfóxido (DMSO, 99,9%), da marca *Mallinckrodt Chemical Inc.*
- Fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4 , 99,9%), Ácido Cítrico Anidro ($C_6H_8O_7$, 99%) e Fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4 , 99%), todos da marca *Labsynth Produtos para Laboratório Ltda.*
- Eletrodos transparentes de estanho dopados com flúor (FTO).

3.2. Procedimentos

3.2.1. Síntese

3.2.1.1. Síntese do complexo precursor [Ru(PAN)(PPh₃)₂Cl]

O complexo [Ru(PAN)(PPh₃)₂Cl] foi sintetizado a partir do complexo dicloro-tris(trifenilfosfina)rutênio(II), [Ru(PPh₃)₃(Cl)₂].

A síntese do complexo [Ru(PPh₃)₃(Cl)₂] foi realizada conforme descrito na literatura⁴⁸, onde 0,500 g (2 mmol) de cloreto de rutênio tri hidratado e 3,150 g (12 mmol) de trifenilfosfina foram adicionados em 50 mL de etanol anidro. O sistema foi mantido sob atmosfera de argônio e refluxo por 30 minutos. Nesse período ocorreu a formação de um precipitado marrom que foi filtrado e lavado com etanol a frio e seco a vácuo. Rendimento de 87%.

A obtenção do [Ru(PAN)(PPh₃)₂(Cl)] foi realizada adaptando-se o procedimento descrito na literatura⁴⁹, onde foram adicionados 0,500 g (0,6 mmols) do complexo [Ru(PPh₃)₃(Cl)₂] e 0,145 g (0,6 mmol) do ligante PAN em 50 mL de etanol. A solução resultante foi mantida sob refluxo e atmosfera inerte de argônio por 4 horas. Após esse período, a solução foi filtrada sob vácuo e o sólido de coloração avermelhada foi lavado com etanol a frio e seco a vácuo. Rendimento de 88%.

3.2.1.2. Sínteses dos novos complexos de fórmula geral [Ru(PAN)(PPh₃)₂L]PF₆, sendo L=MeIM, ISN ou 4,4'-Bpy

Foram dissolvidos 0,2 g do precursor e 0,037 g de AgNO₃ em 50 mL de etanol anidro e mantido sob refluxo por 1 hora em atmosfera inerte. Posteriormente a solução foi filtrada para remoção de AgCl formado. Em seguida, adicionou-se à solução 0,144 g de metilimidazol (ou 0,137 g de isonicotinamida ou 0,110 g de 4,4'-bipiridina). Após 4 horas de refluxo, a solução

foi concentrada em rotaevaporador e acrescentado 5 mL de solução de NH_4PF_6 0,10 mol L^{-1} .

O sólido formado foi filtrado e lavado com mistura água-etanol 1:1 (v/v) e seco a vácuo.

A purificação dos compostos foi realizada por cromatografia em coluna usando alumina neutra e mistura acetonitrila-diclorometano 1:9 (v/v) como solvente. Uma ilustração do processo de síntese e das estruturas dos complexos formados, juntamente com seus respectivos rendimentos, está representada na **Figura 07**.

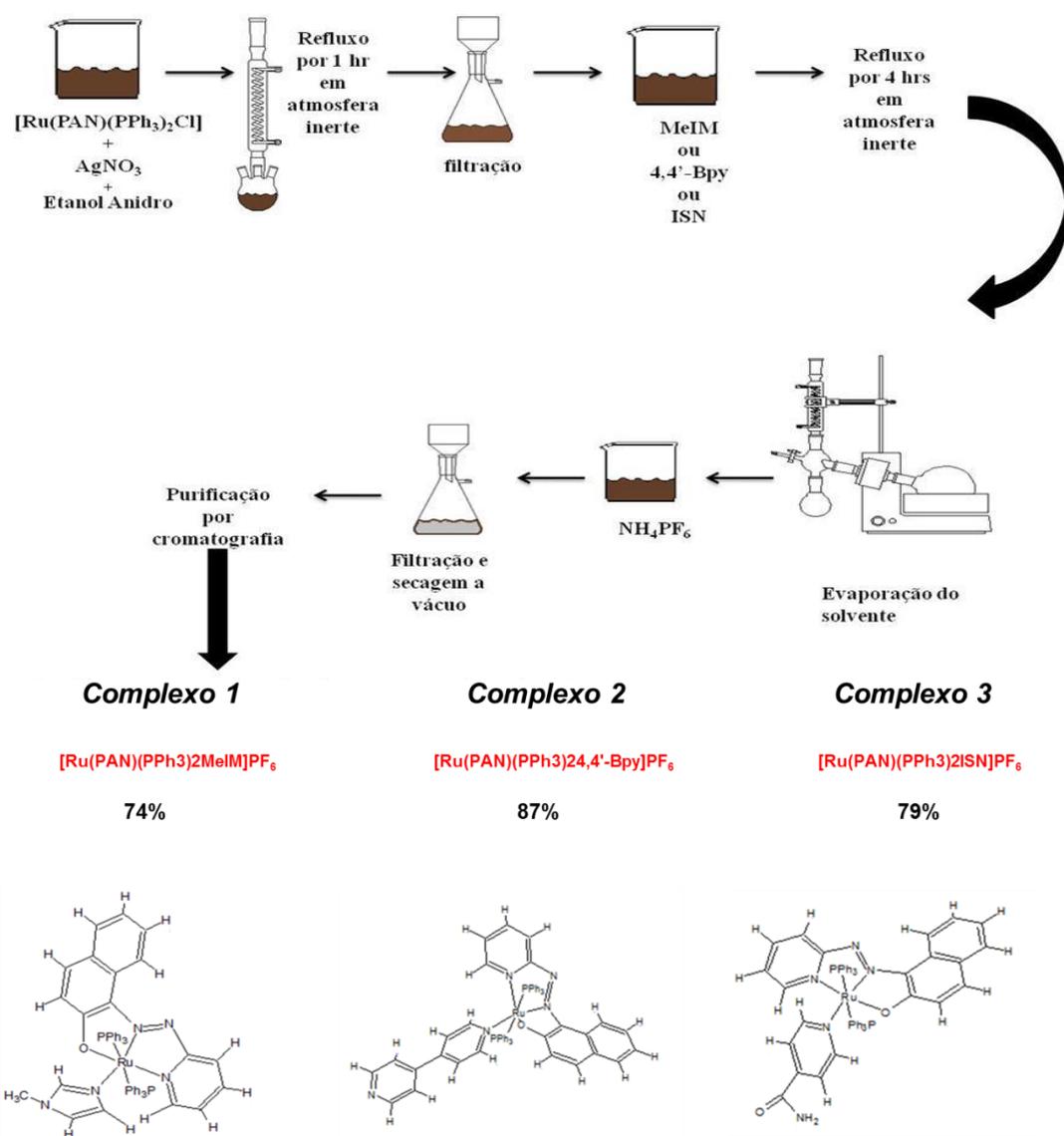


Figura 07: Esquema ilustrando a síntese dos complexos $\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2\text{MeIM}]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2\text{ISN}]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2\text{4,4'-Bpy}]\text{PF}_6$ com seus respectivos rendimentos.

3.2.2. Preparação das soluções e amostras

3.2.2.1. Preparação das soluções tampão⁵⁰

➤ **Solução de Mcllvayne pH 4,0**

Em um balão volumétrico, adicionou-se 192,7 mL de uma solução de Na₂HPO₄ em 307,3 mL da solução de ácido cítrico (C₆H₈O₇) para um total de 500,0 mL de solução tampão.

➤ **Solução de Mcllvayne pH 5,5**

Em um balão volumétrico, adicionou-se 278,7 mL de uma solução de Na₂HPO₄ em 221,3 mL da solução de C₆H₈O₇ para um total de 500,0 mL de solução tampão.

➤ **Solução de Fosfato pH 7,2**

Em um balão volumétrico, adicionou-se 350,0 mL de solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ em 500,0 mL de uma solução de KH₂PO₄ 0,10 mol L⁻¹ e completando o volume para 1.000 mL com água destilada.

3.2.2.2. Preparação da solução de BSA

Uma solução estoque de concentração 1,0x10⁻³ mol L⁻¹ foi preparada utilizando 0,3323 g de BSA em 5,0 mL de solução tampão fosfato de pH 7,2.

3.2.2.3. Preparação das soluções dos complexos para análises de Fluorescência e UV-vis.

Preparou-se soluções dos complexos Ru(PAN)(PPh₃)₂MeIM]PF₆, [Ru(PAN)(PPh₃)₂ISN]PF₆ e [Ru(PAN)(PPh₃)₂(4,4'-Bpy)]PF₆ de concentração 1,0x10⁻³ mol L⁻¹, em DMSO. A partir dessas soluções estoques foram preparadas novas soluções com diluição em solução tampão de pH 7,2 até obter as concentrações de 1,0x10⁻⁶ mol L⁻¹ até 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹.

3.2.2.4. Preparação da solução de ácido ascórbico

Adicionou-se 0,088 g de ácido ascórbico em 5,0 mL de água destilada para obtenção de uma solução 0,1 mol L⁻¹.

3.2.2.5. Preparação da solução de dopamina

Adicionou-se 0,076 g de dopamina em 5,0 mL de água destilada para obtenção de uma solução 0,1 mol L⁻¹.

3.2.2.6. Limpeza dos eletrodos transparentes de óxido de estanho dopado com Flúor (FTO)

Para a limpeza dos eletrodos, os mesmos foram imersos em uma mistura de H₂SO₄ 98% e H₂O₂ 32% (*solução piranha*), preparada na proporção 1:3 (v/v), respectivamente. Os eletrodos foram deixados nessa solução por 5 horas e, posteriormente retirados da solução, lavados em água destilada e deixados secar em um dessecador em temperatura ambiente.

3.2.2.7. Ativação dos eletrodos de FTO

A ativação dos eletrodos foi realizada através da imersão desses em uma mistura de H₂O₂ 32%, NH₄OH 30% e água destilada, numa proporção 1:1:5 (v/v) respectivamente, por um período de 24 horas. Após o período de imersão, os eletrodos foram lavados em água destilada e deixados secar em um dessecador por mais 24 horas.

3.2.2.8. Imobilização de BSA/complexos nos eletrodos de FTO

Primeiramente gotejou-se 50 µL da solução de BSA de concentração 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ sobre a superfície do eletrodo. Em seguida, 50 µL de solução do complexo Ru(PAN)(PPh₃)₂MeIM]PF₆ ,1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ foi gotejada sobre a camada de BSA e, por último, também gotejado 50 µL de glutaraldeído 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ para que o mesmo

polimerizasse o filme, concedendo maior estabilidade. O eletrodo foi deixado secar durante 8 horas em um dessecador em temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi realizado para os complexos $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2\text{ISN}]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(4,4'\text{-Bpy})]\text{PF}_6$.

3.3. Caracterização

3.3.1. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio - RMN 1H

Os espectros de RMN^1H foram obtidos, em temperatura ambiente, no espectrômetro Varian, modelo Mercury Plus, operando a 300 MHz. Foi utilizado tetrametilsilano como padrão interno nas medidas e as análises foram feitas em 0,7 mL de clorofórmio deuterado ou acetona deuterada com aproximadamente 0,010 g dos complexos sintetizados.

3.3.2. Espectroscopia de Absorção na região do UV-vis

Para o registro dos espectros de absorção dos complexos na região do ultravioleta e visível, foi utilizado o espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50 Conc, na região de 300 a 700 nm, empregando cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. Sendo as medidas realizadas a temperatura ambiente.

3.3.3. Cálculo computacional

Os cálculos computacionais dos complexos foram realizados no Laboratório de Nanotecnologia Molecular auxiliado pelo Prof. Dr. Juliano A. Bonacin. As geometrias dos complexos foram otimizadas pelo método semi-empírico PM6 usando vetor Eigen, o roteiro utilizado para a busca mínima (1000 ciclos) em software MOPAC. Espectros eletrônicos foram calculados utilizando o software ORCA usando um método semi-empírico INDO/S. Método CIS foram utilizados, nroots = 900 e maxdim = 1800 para calcular o espectro eletrônico.

3.3.4. Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de emissão dos resíduos de aminoácidos da BSA foram registrados utilizando cubetas de quartzo, com caminho óptico de 1,0 cm, em um espectrofluorímetro Varian, modelo Cary Eclipse, com compartimento de amostra com banho termostatizado (largura das fendas e excitação e de emissão: 5,0 nm). Foram excitadas em 280 nm e as leituras de emissão de fluorescência foram realizadas na faixa entre 300 e 550 nm após 5 minutos. Os espectros de emissão foram obtidos nas temperaturas de 20,0, 25,0 e 30,0 °C. Considerando a absorção dos complexos na região analisada, os valores de fluorescência foram corrigidos utilizando a equação: $F_{cor} = F_{obs} \text{antilog} (A_{ex} + A_{em}/ 2)^{51}$, onde F_{cor} e F_{obs} são os valores de fluorescência corrigido e observado, respectivamente, e A_{ex} e A_{em} são os valores de absorvância nos comprimentos de onda 280 e 350 nm, respectivamente.

3.3.5. Voltametria Cíclica

Os voltamogramas foram obtidos no potenciostato da marca Metrohm Autolab, modelo PGSTAT101, com eletrodos comerciais de FTO, variando as velocidades de varredura de 50, 100 e 150 mV s⁻¹ nos pHs 4,0, 5,5 e 7,2 utilizando ácido ascórbico e dopamina como analitos em temperatura ambiente com a cela eletroquímica semi preenchida em 75 mL de tampão. Todas as análises foram feitas utilizando o FTO modificado como eletrodo de trabalho (1,0 cm²), eletrodo saturado de calomelano (Hg/Hg₂Cl₂) como eletrodo de referência e contra eletrodo de platina. Antes de todas as medidas, foi adicionado argônio para obter atmosfera inerte.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização espectroscópica dos complexos de rutênio

4.1.1. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio - RMN ^1H

Os espectros de RMN de ^1H dos complexos de rutênio dissolvidos em clorofórmio deuterado apresentaram um conjunto de sinais de ressonância de alta complexidade na região de 6,4 a 9,5 ppm, que já era esperado devido aos ligantes que foram utilizados nas sínteses, como ilustrado nas **Figuras 8, 9 e 10**. Embora haja um perfil espectral complexo, três sinais associados ao ligante PAN se sobressaíram e foram utilizados inicialmente para esclarecer as estruturas dos complexos.

O primeiro destes foi o sinal dubleto na região de 9,40 ppm, associado ao hidrogênio 1 (H_1) do anel da piridina do ligante PAN. Esta atribuição é baseada na diminuição da densidade eletrônica ao redor deste átomo, induzida pela proximidade do átomo de nitrogênio piridínico coordenado ao centro metálico, que desloca o sinal do mesmo para região de campo alto em relação ao ligante livre⁵².

O outro sinal utilizado como referência foi o dubleto na região de 8,40 ppm, associado ao hidrogênio 5 (H_5) do grupo naftol do ligante PAN. Esta atribuição é baseada no efeito indutivo do grupo AZO coordenado ao rutênio. A proximidade do H_5 da nuvem eletrônica do fragmento $\text{N}\equiv\text{N}$, diminui a densidade eletrônica deste átomo, deslocando o sinal do mesmo para a região de campo alto⁵².

O terceiro sinal analisado foi o dubleto em 6,90 ppm associado ao hidrogênio 4 (H_4) do anel da piridina do ligante PAN. A formação de um anel de cinco membros Azo-Ru-N leva a uma rigidez do anel piridina e, conseqüentemente, aumenta

a densidade eletrônica ao redor do hidrogênio 4 deste fragmento, deslocando assim, o sinal do mesmo, para a região de campo baixo em relação ao ligante livre⁵².

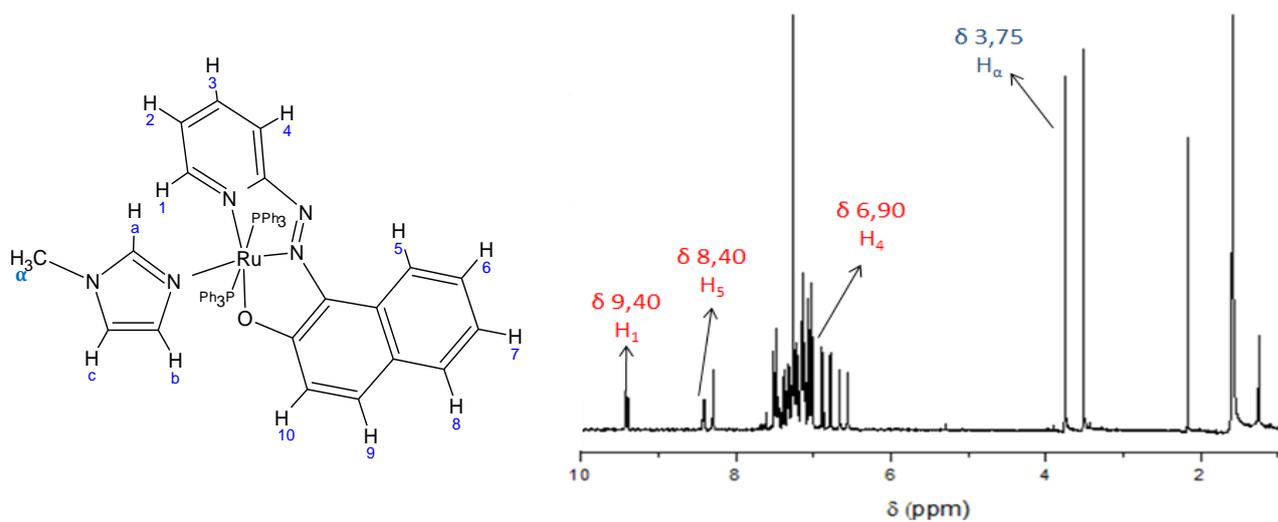


Figura 08. Espectro de RMN ^1H do $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{MeIM})]\text{PF}_6$ em CDCl_3 .

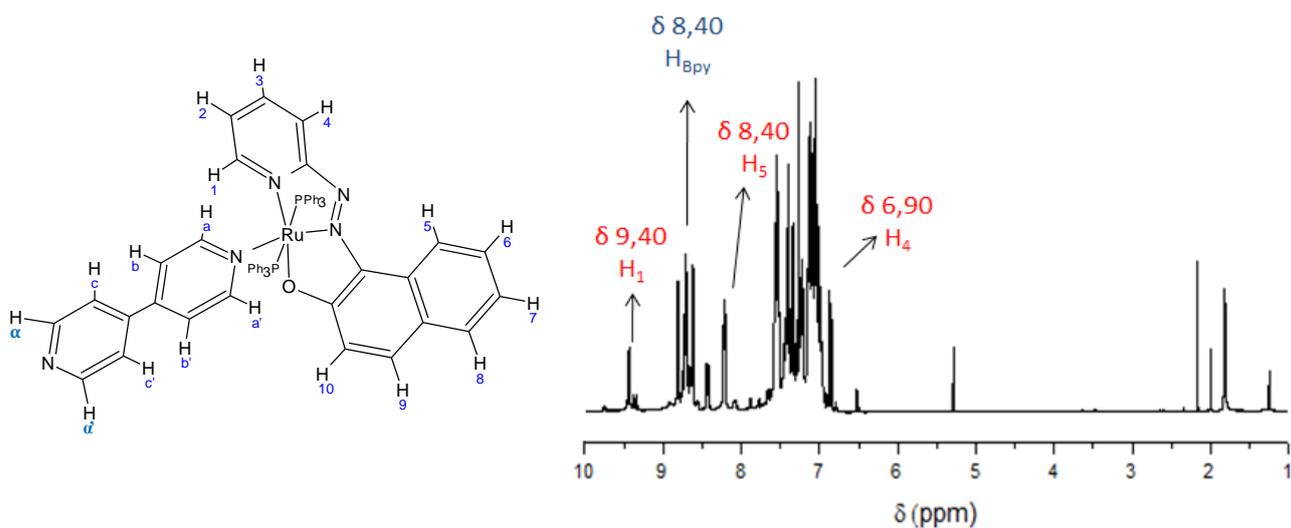


Figura 09. Espectro de RMN ^1H do $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(4,4'\text{Bpy})]\text{PF}_6$ em CDCl_3 .

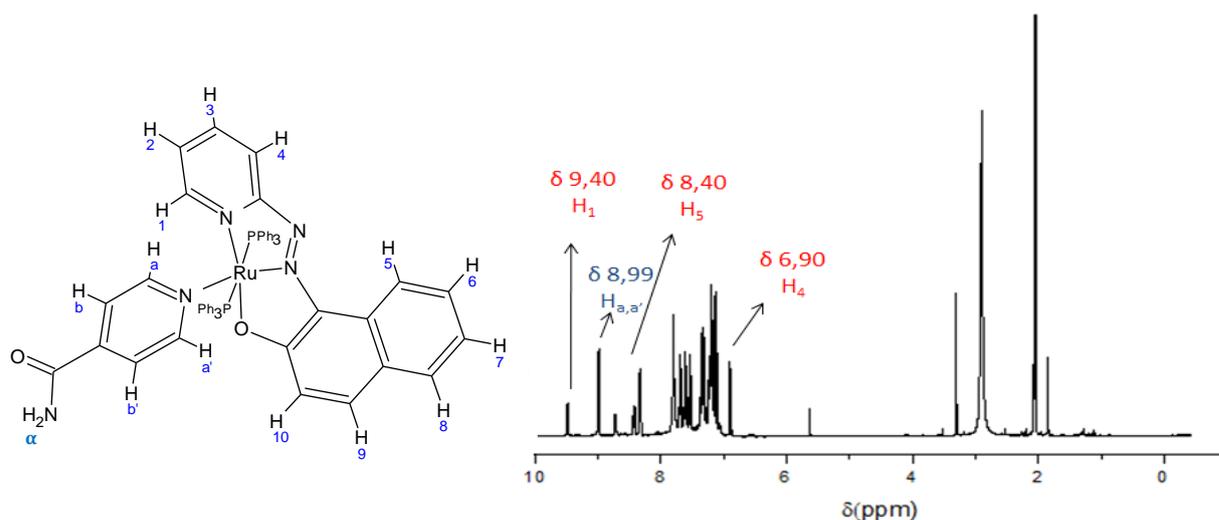


Figura 10. Espectro de RMN ^1H do $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{ISN})]\text{PF}_6$ em CDCl_3 .

A partir destes sinais, fizeram-se as correlações espaciais associadas aos acoplamentos entre os átomos de hidrogênio da molécula, o que permitiu a atribuição completa do ligante PAN coordenado ao rutênio.

O espectro de RMN bidimensional para o complexo $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{ISN})]\text{PF}_6$ está representado na **Figura 11** para ilustrar a metodologia usada nas atribuições dos sinais de ressonância.

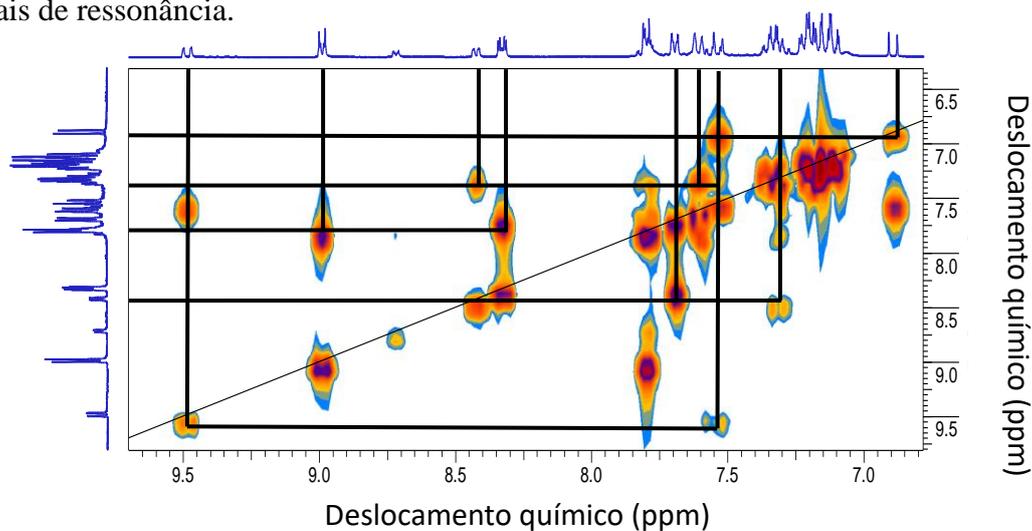


Figura 11. Espectro de RMN ^1H bidimensional - COSY do $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{ISN})]\text{PF}_6$.

Além do ligante PAN, moléculas de trifenilfosfina também compõe as esferas de coordenação dos complexos como podemos observar pelo conjunto de sinais de ressonância localizado entre 7,0 e 7,25 ppm. Contudo, a atribuição individual dos hidrogênios fenílicos da PPh₃ (C-H) não foi possível, pois os mesmos estão envolvidos em interações não covalentes com a nuvem eletrônica dos anéis piridina e naftol do ligante PAN, promovendo uma sobreposição de sinais⁵³⁻⁵⁵. No entanto, a partir dos valores de integração dos sinais de ressonância, determinou-se a relação estequiométrica entre os ligantes PAN e trifenilfosfina que, neste caso, foi de 1 PAN : 2 PPh₃.

Portanto, podemos concluir que o ligante PAN está coordenado ao rutênio(II) de forma tridentada e as duas moléculas de trifenilfosfina ocupam a posição axial do complexo, semelhante ao descrito na literatura para o complexo precursor⁵³. O sexto sítio de coordenação é ocupado pelo ligante N-heterocíclico (metilimidazol, 4,4'-bipiridina ou isonicotinamida), cujas atribuições dos hidrogênios foram baseadas na literatura⁵².

Os valores dos deslocamentos químicos obtidos pelas análises dos espectros de RMN dos complexos de rutênio estão apresentados na **Tabela 02**.

TABELA02. Valores dos deslocamentos químicos obtidos pelas análises dos espectros de RMN dos complexos de rutênio.

Ligante	Hidrogênios	Deslocamento químico (δ , ppm)		
		[Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ MeIM]PF ₆	[Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ (4-4'-Bpy)]PF ₆	Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ ISN]PF ₆
PAN	H1	9,41	9,44	9,45
	H2	7,3	7,34	7,6
	H3	7,39	7,4	7,54
	H4	6,89	6,86	6,89
	H5	8,42	8,43	8,41
	H6	7,22	7,22	7,34
	H7	7,5	7,57	7,8
	H8	7,46	7,4	7,7
	H9	7,22	8,22	8,33
	H10	7,22	8,22	8,33
PPh ₃	Ha'	7,00-7,18	7,35-7,47	7,26-7,36
	Hb'	7,00-7,18	6,95-7,17	7,00 a 7,25
	Hc'	7,00-7,18	6,95-7,17	7,00 a 7,25
L = MeIM, ISN Ou 4,4'-Bpy	(a)	8,3	8,81	8,99
	(b)	7,49	8,62	7,82
	(c)	6,78	7,57	-
	(d)	-	8,72	-
	(α)	3,75	-	8,72

4.1.2. *Espectroscopia de Absorção na região do UV-vis*

Os compostos de rutênio sintetizados neste trabalho, quando dissolvidos em acetonitrila, apresentaram o mesmo perfil espectral, como podemos observar na **Figura 12**.

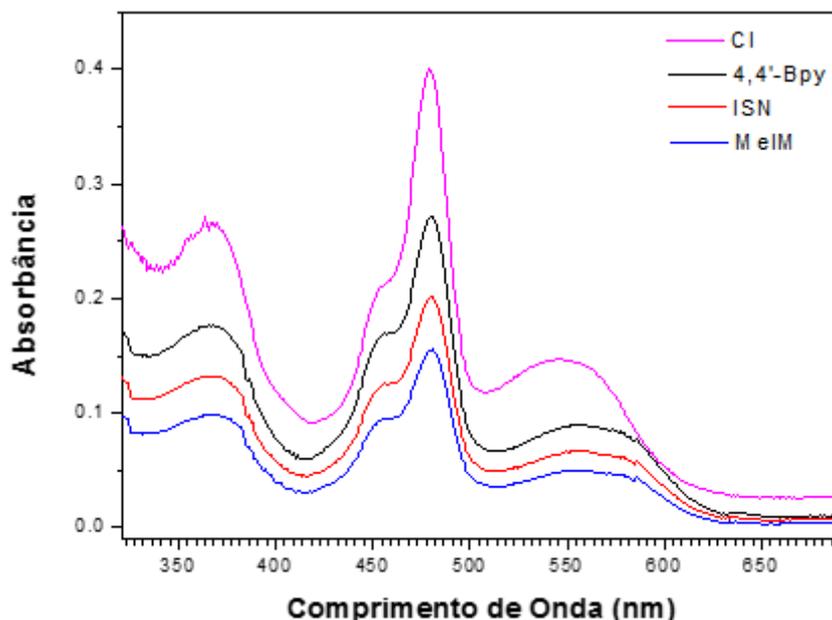


Figura 12. Espectros eletrônicos dos complexos $(\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2\text{Cl})$, $(\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2\text{ISN})\text{PF}_6$, $(\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(4,4'\text{-Bpy})\text{PF}_6$ e $(\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2\text{MeIM})\text{PF}_6$ em acetonitrila, concentração de $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, caminho óptico de 1 cm.

De acordo com a literatura⁵³, as bandas observadas na região do visível são atribuídas às transições do tipo transferência de carga metal-ligante (MLCT). As bandas de absorção na região ultravioleta estão associadas às transições internas nos orbitais do ligante ($\pi \rightarrow \pi^*$).

A troca do ligante cloro pelos ligantes N-heterocíclicos ISN, 4,4'-Bpy e MeIM, na esfera de coordenação do rutênio(II), promove um deslocamento das bandas de MLCT para a região de maior energia, principalmente a banda em $\lambda \sim 550 \text{ nm}$. Esse deslocamento pode ser justificado pelo forte caráter π aceitador dos ligantes N-heterocíclicos que induz uma maior estabilidade dos orbitais t_{2g} ⁶ do metal.

Os valores de absorvidade molar (ϵ) e comprimento de onda (λ) das transições eletrônicas observadas nos espectros eletrônicos dos complexos estão apresentados na **Tabela 03**.

TABELA 03. Valores de absorvidade molar (ϵ) e comprimento de onda (λ) das transições eletrônicas observadas nos espectros eletrônicos dos complexos de rutênio.

[Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ L]PF ₆	Comprimento de onda (λ) (nm)	Absorvidade molar (ϵ) (Lcm ⁻¹ mol ⁻¹)
L = MeIM	555	4,8 10 ³
	482	1,4 10 ⁴
	455	8,4 10 ³
	367	9,0 10 ³
	299	2,2 10 ⁴
L = 4,4'-Bpy	559	1,0 10 ⁴
	483	2,1 10 ⁴
	457	1,3 10 ⁴
	373	1,6 10 ⁴
	238	8,2 10 ⁴
L = ISN	549	1,0 10 ³
	479	1,9 10 ⁴
	454	9,2 10 ³
	352	1,2 10 ⁴
	293	1,4 10 ⁴

Para compreender melhor a natureza das transições eletrônicas observadas nos espectros, cálculos semi-empíricos de orbitais moleculares e simulação espectral foram desenvolvidos para o complexo [Ru(PAN)(PPh₃)₂(ISN)]PF₆. A metodologia utilizada está descrita na parte experimental deste trabalho.

A **Tabela 04** relaciona as energias e a composição dos orbitais moleculares de fronteira do íon complexo Ru(PAN)(PPh₃)₂(ISN)]⁺.

TABELA 04: Energia e composição dos orbitais moleculares para [Ru(PAN)(PPh₃)₂(ISN)]⁺.

O.M.	Energia (eV)	Ru (%)	PAN (%)	ISN (%)	PPh ₃ (%)
167	-0.1010	0.07	0.47	94.19	5.27
166	-0.1099	1.46	95.23	0.60	2.71
165	-0.1278	6.67	9.45	82.61	1.26
164(LUMO)	-0.1581	12.85	69.95	14.23	2.98
163(HOMO)	-0.3533	15.03	82.78	0.12	2.07
162	-0.3669	35.94	53.24	4.83	6.00
161	-0.3724	49.79	43.30	1.48	5.43
160	-0.3769	84.72	11.54	1.88	1.86
159	-0.3849	25.51	62.98	1.04	10.47
158	-0.3977	1.62	2.68	0.24	95.46
157	-0.4049	0.48	1.00	0.52	98.00
156	-0.4111	0.16	0.87	4.47	94.49

Conforme pode-se observar, os orbitais moleculares ocupados de maior energia (HOMO) e não-ocupados de menor energia (LUMO) são primariamente localizados no ligante PAN^{56, 57}.

Esta composição é pouco usual nos compostos de coordenação. Normalmente, o orbital HOMO possui uma contribuição maior do centro metálico enquanto o orbital LUMO apresenta uma contribuição maior do ligante.

Contudo, no caso de alguns compostos contendo ligantes não-inocentes, os orbitais moleculares correspondentes aos orbitais oriundos do metal apresentam um elevado grau de mistura com o ligante, que é uma consequência da forte interação de retrodoação π envolvendo os orbitais $d\pi(\text{metal})$ e π^* (ligante não inocente). Dessa forma, o caráter aceptor do ligante seria responsável pela composição anômala dos orbitais HOMO.

Assim, a partir das evidências teóricas, podemos concluir que há uma grande covalência na interação entre o íon rutênio(II) e o ligante PAN, bem como uma grande deslocalização de carga sobre o sistema $d\pi(\text{Ru}) - \pi^*(\text{PAN})$. Além disso, podemos afirmar que o ligante PAN comporta-se como um ligante não-inocente quando coordenado ao rutênio(II).

A **Tabela 05** apresenta uma base comparativa entre os espectros eletrônicos calculado e experimental e a atribuição, em termos de orbitais moleculares, das correspondentes transições para o complexo $\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{ISN})](\text{PF}_6)$.

Os espectros teórico e experimental estão apresentados na **Figura 13**.

TABELA 05. Principais transições eletrônicas presentes no espectro de absorção na região de UV-vis do complexo $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{ISN})](\text{PF}_6)$ utilizando-se o método INDO/S.

$\nu_{\text{exp}} (\text{cm}^{-1})$	$\nu_{\text{teo}} (\text{cm}^{-1})$	Orbitais envolvidos na transição	Atribuição
18215	18826	161 \rightarrow 164 162 \rightarrow 164	Ru \rightarrow PAN* PAN \rightarrow PAN
20877	21343	162 \rightarrow 164	PAN \rightarrow PAN
22026	22813	159 \rightarrow 164	PAN \rightarrow PAN
28409	28410	162 \rightarrow 165	PAN \rightarrow ISN
34130	33187	157 \rightarrow 164	PPh₃ \rightarrow PAN

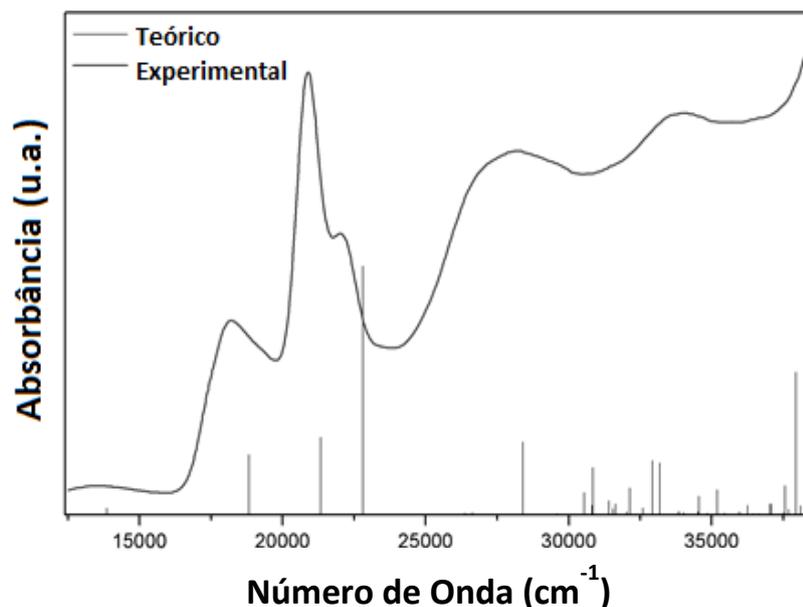


Figura 13: Comparação entre os espectros eletrônicos teórico e experimental do complexo $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{ISN})](\text{PF}_6)$.

Um ponto bastante favorável obtido dos resultados teóricos foi confirmar a natureza das transições por meio do caráter dos orbitais moleculares nelas envolvidos.

Por exemplo, as transições eletrônicas na região UV acima de 20.000 cm^{-1} ($\lambda \sim 479, 454, 352$ e 293 nm) são atribuídas principalmente a transição $p\pi_{\text{PAN}} \rightarrow p\pi_{\text{PAN}}^*$ e $p\pi_{\text{PPh}_3} \rightarrow p\pi_{(\text{PAN})}^*$, como mostrado na **Tabela 05**. A banda em 18.215 cm^{-1} ($\lambda \sim 549\text{ nm}$) é atribuída a uma somatória da transição $p\pi_{\text{PAN}} \rightarrow p\pi_{\text{PAN}}^*$ e a banda de transferência de carga metal-ligante $d\pi_{\text{Ru}} \rightarrow p\pi_{\text{PAN}}^*$. A transição HOMO-LUMO é atribuída a $p\pi_{\text{PAN}} \rightarrow p\pi_{\text{PAN}}^*$ de acordo com o cálculo teórico.

Cálculos semi-empíricos de orbitais moleculares e simulação espectral para os demais complexos deverão ser realizados para complementar esse trabalho.

4.1. Espectroscopia de Fluorescência

4.1.1. Interação dos complexos de rutênio com albumina do soro bovino (BSA)

A associação de derivados metálicos com a seletividade de estruturas proteicas pode ser explorada com vantagem em sensores eletroquímicos que usam eletrodos quimicamente modificados. Contudo, antes de explorar a seletividade da proteína, aliada a versatilidade redox dos complexos e desenvolver sensores eletroquímicos para diferentes áreas da química analítica, é necessário estudar as interações existentes entre o centro metálico e a biomolécula, como as interações doador-aceitador, interações hidrofóbicas e coordenação do complexo no ambiente proteico. Nesse contexto, apresentamos a seguir os resultados obtidos da interação dos três complexos de rutênio com a albumina do soro bovino.

4.1.2. Espectroscopia de emissão de fluorescência

A albumina do soro bovino apresenta uma fluorescência intrínseca associada aos resíduos triptofano, tirosina e fenilalanina. Dentre os três fragmentos, a emissão do triptofano é a mais significativa, como já dito anteriormente.

Segundo a literatura^{53, 54}, para derivados de rutênio, a supressão de fluorescência da BSA é consequência da interação do centro metálico com o resíduo de triptofano via histidina, e envolvendo o processo de transferência de energia. Por isso, o acompanhamento da interação dos complexos de rutênio com a BSA, neste trabalho, foi realizado no comprimento de onda de excitação de 280 nm, característico do fluoróforo triptofano.

Nas condições experimentais deste trabalho, a BSA apresentou uma banda relativamente intensa na região de em 350 nm, quando excitada em 280 nm. A adição de alíquotas de solução dos complexos levou a uma diminuição gradativa da intensidade dessa banda, como ilustrado na **Figura 14** para o sistema [Ru(PAN)(PPh₃)₂ISN]-BSA.

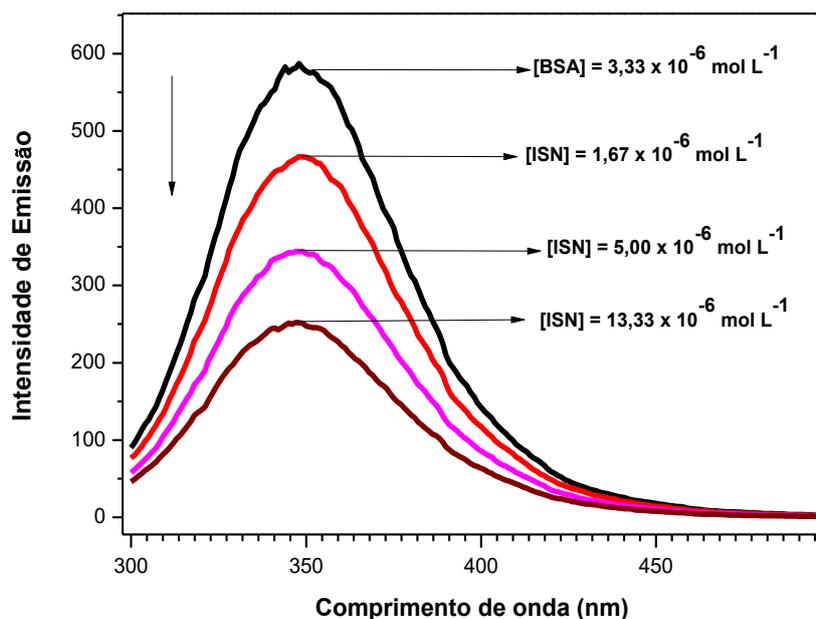


Figura 14. Espectro de supressão da fluorescência do resíduo de triptofano causado pela adição do complexo [Ru(PAN)(PPh₃)₂ISN]PF₆. $\lambda_{exc} = 280$ nm, $\lambda_{em} = 350$ nm e $t = 25$ °C.

Este comportamento foi o mesmo apresentado aos demais complexos contendo 4,4'-Bpy e MeIM.

Visto que a interação dos complexos de rutênio com a albumina resultou na supressão da fluorescência intrínseca da biomolécula, fez-se necessário determinar por qual mecanismo esse processo aconteceu: mecanismo estático ou mecanismo dinâmico.

a) Determinação do processo de supressão da BSA induzido pelos complexos de rutênio

A supressão da fluorescência dos fragmentos de aminoácidos pode ocorrer por diversos fatores, como as reações de estado excitado, rearranjos moleculares,

transferência de energia, formação de complexos no estado fundamental e a supressão colisional ou dinâmica⁵⁵.

Para os processos dinâmicos, quando os fluoróforos no estado excitado são atingidos pela colisão de outra molécula (supressor) eles são desativados, voltando ao seu estado fundamental sem emissão de fóton, logo tendo então sua fluorescência reprimida. As espécies envolvidas no processo não são alteradas quimicamente. Já nos processos estáticos, existe a formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor.

Os processos estáticos e dinâmicos podem ser distinguidos pela dependência dos valores da constante de supressão com a temperatura. No caso do processo estático, a formação de um intermediário BSA-rutênio no estado fundamental é desfavorável com o aumento da temperatura e, conseqüentemente, os valores de constante de supressão diminuem. No processo dinâmico ocorre o inverso, os valores de constantes de supressão aumentam com o aumento da temperatura, pois há uma diminuição da viscosidade do meio reacional, favorecendo o processo de colisão proteína-complexo de rutênio.

Os processos dinâmicos de supressão de fluorescência podem ser descritos pela equação de Stern-Volmer⁵⁸:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_D[Q] = 1 + \tau_0 k_q[Q]. \quad (\text{Equação 01})$$

Onde:

- ✓ K_D é a constante de supressão de Stern-Volmer;
- ✓ K_q é a constante de supressão bimolecular;
- ✓ τ_0 é o tempo de vida sem supressão;

- ✓ [Q] é a concentração do supressor.

Já para os processos estáticos, é adequado utilizar a equação de Stern-Volmer modificada (**Equação 02**) para a obtenção dos parâmetros associados á formação do complexo no estado fundamental entre o fluoróforo e o supressor:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_A + n \log[Q] \quad (\text{Equação 02})$$

Onde:

- ✓ K_A é a constante de supressão (ou associação) de Stern-Volmer para o sistema estático
- ✓ n é o número de sítios de ligação
- ✓ [Q] é a concentração do supressor.

A partir da variação da fluorescência em função da concentração dos complexos de rutênio, como proposto nas **Equações 01 e 02**, foram construídos os gráficos para o modelo estático e dinâmico para a supressão da fluorescência do resíduo de Trp da BSA. Na **Figura 15** apresentamos os resultados dos tratamentos matemáticos para os três sistemas.

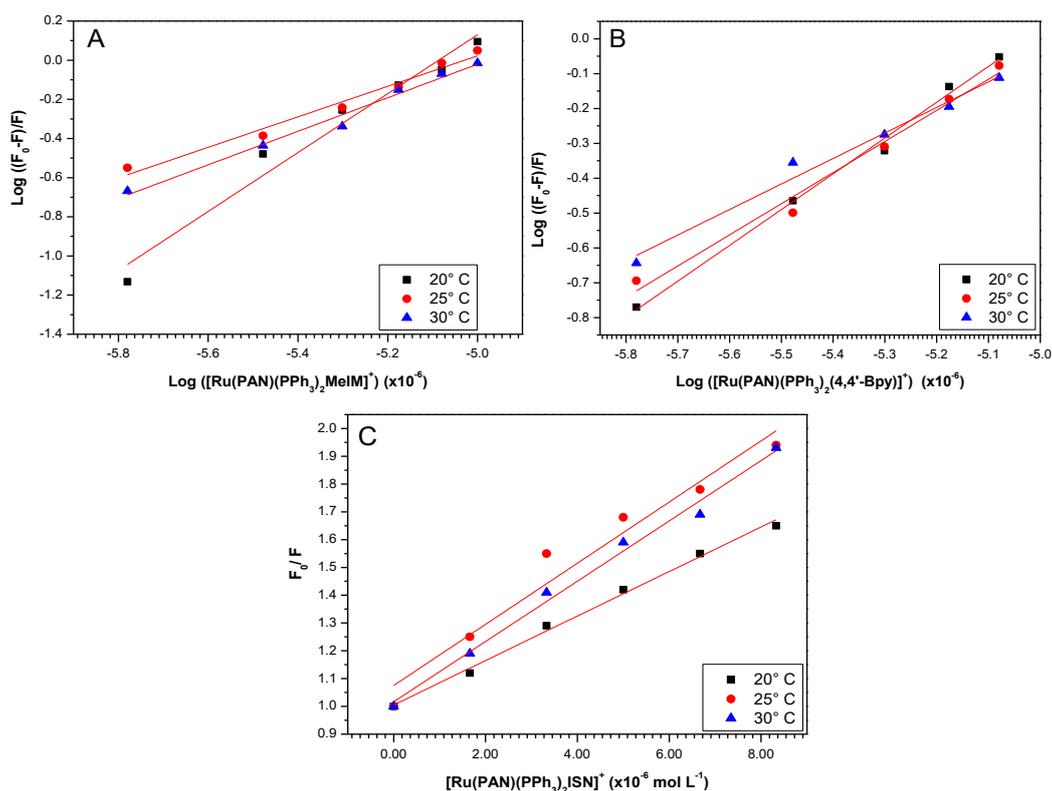


Figura 15. Gráficos de Stern-Volmer referente à supressão da fluorescência do resíduo de Trp da BSA induzida pelos complexos com os ligantes MeIM(A), 4,4'-Bpy (B) e ISN (C), $\lambda_{exc} = 280$ nm, $\lambda_{em} = 350$ nm. Caminho óptico de 1.0 cm.

Pela análise dos dados obtidos pelas **Equações 01 e 02, Tabela 06**, podemos propor que a interação dos complexos com os ligantes MeIM e 4,4'-Bpy, com a proteína ocorre por um processo estático, pois os valores das constantes diminuem com o aumento da temperatura. Neste caso, no estado fundamental ocorre a formação de um "complexo" entre o composto de coordenação e a BSA. Para o sistema contendo o ligante ISN, o processo de supressão é induzido por mecanismo dinâmico, como revelam os valores das constantes em função da temperatura.

TABELA 06. Valores das constantes da Stern-Volmer variando a temperatura.

[Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ L]PF ₆	T (° C)	K _{SV}	R ²
L= MeIM	20	13,3 10 ⁴	0,995
	25	10,1 10 ⁴	0,985
	30	9,90 10 ⁴	0,985
L= 4,4'-Bpy	20	10,4 10 ⁴	0,982
	25	9,80 10 ⁴	0,994
	30	9,07 10 ⁴	0,961
L= ISN	20	6,68 10 ⁴	0,988
	25	8,77 10 ⁴	0,982
	30	9,35 10 ⁴	0,971

Uma vez definido o processo de supressão, fez-se necessário avaliar o grau de interação entre os compostos de rutênio e a albumina do soro bovino.

b) Determinação dos parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação da BSA e complexos de rutênio

É evidenciado na literatura²³ que as forças responsáveis por unir uma molécula a uma proteína são do tipo forças de van der Waals: forças hidrofóbicas, ligações de hidrogênio ou atração eletrostática.

O estudo de fluorescência em diferentes temperaturas permite calcular os parâmetros termodinâmicos envolvidos na ligação dos complexos de rutênio com a BSA⁵⁵. Além de descrever a espontaneidade do processo através dos mesmos, é possível inferir a natureza das ligações formadas. De acordo com a teoria de Ross⁵⁹, valores de $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$ indicam que a ligação é constituída predominantemente por forças hidrofóbicas; $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$ mostram que a ligação é formada por ligações de hidrogênio ou forças de van der Waals e, quando $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ são indicativos que a ligação tem caráter eletrostático.

Os valores da variação da entalpia (ΔH) e da entropia (ΔS) envolvidos na ligação entre BSA e cada complexo em estudo foram calculados usando a equação de van't Hoff (Equação 03).

$$\ln K_{sv} = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \text{ (Equação 03)}$$

Onde:

- ✓ ΔH é a variação da entalpia;
- ✓ ΔS é a variação da entropia;
- ✓ R é a constante dos gases ideais ($8,14 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$);
- ✓ T é a temperatura absoluta
- ✓ K_{sv} é a constante de Stern-Volmer

Utilizando esta equação, foram construídos os gráficos de van't Hoff, em função de $\frac{1}{T}$ os quais apresentaram perfis lineares. Por meio do seu coeficiente angular e linear, foram obtidos os parâmetros termodinâmicos apresentados na **Tabela 07**.

A energia livre de Gibbs (ΔG) foi calculada usando a equação:

$$\Delta G = -RT \ln K \text{ (Equação 04)}$$

Onde:

- ✓ ΔG é a variação da energia livre de Gibbs;
- ✓ R é a constante dos gases ideais ($8,14 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$);
- ✓ T é a temperatura absoluta;
- ✓ k é a constante de Stern-Volmer.

Para o sistema envolvendo $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2\text{ISN}]\text{PF}_6$, os parâmetros termodinâmicos obtidos ($\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ e $\Delta G < 0$) refletem um processo de ligação

entre a proteína e o complexo de rutênio espontâneo e o caráter de forças de ligação envolvidas é predominantemente hidrofóbico.

Para os derivados $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2 \text{MeIM}]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(4,4'\text{-Bpy})]\text{PF}_6$ os parâmetros são coerentes com um processo de ligação espontâneo ($\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ e $\Delta G < 0$) entre a BSA e os complexos de rutênio, sendo o caráter das forças de ligação envolvidas predominantemente eletrostático.

TABELA 07. Parâmetros Termodinâmicos Para a Determinação do Caráter das Forças de Ligação Envolvidas.

$[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{L})]^+$	ΔH (kJmol ⁻¹)	ΔS (Jmol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (KJmol ⁻¹)
L= MeIM	-22,1	22,1	-28,6
			-28,7
			-28,8
L= 4,4'-Bpy	-10,5	60,1	-28,1
			-28,4
			-28,77
L= ISN	24,95	177,7	-27,15
			-28,04
			-28,93

Neste ponto é relevante lembrar os diferentes domínios do arcabouço proteico e dos ambientes hidrofílicos e hidrofóbicos em que estão inseridos os fluoróforos.

A BSA é dividida em dois sítios, em função das interações químicas que ocorrem entre ela e as moléculas pequenas, denominadas de sítio I e sítio II de Sudlow⁶⁰. O sítio I é caracterizado por interações hidrofóbicas, enquanto que no sítio II, as interações da BSA com moléculas menores ocorrem pela combinação de forças hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogênio²³.

É evidenciado que a interação destes compostos com a BSA se dá preferencialmente no sítio II de Sudlow, o qual contém os resíduos de triptofano 134 e

212. O Trp 134 está em um ambiente menos hidrofóbico, pois está localizado próximo à superfície da BSA, susceptível a interações eletrostáticas da proteína com outras moléculas. O Trp 212 está contido na cavidade hidrofóbica do subdomínio II da BSA, susceptível às interações hidrofóbicas ou ligações de hidrogênio do arcabouço proteico.

Diante da distribuição dos resíduos de triptofano na BSA e dos parâmetros termodinâmicos obtidos, podemos inferir que os complexos de rutênio estão interagindo com a BSA nos seguintes subdomínios apresentados na **Figura 16**:

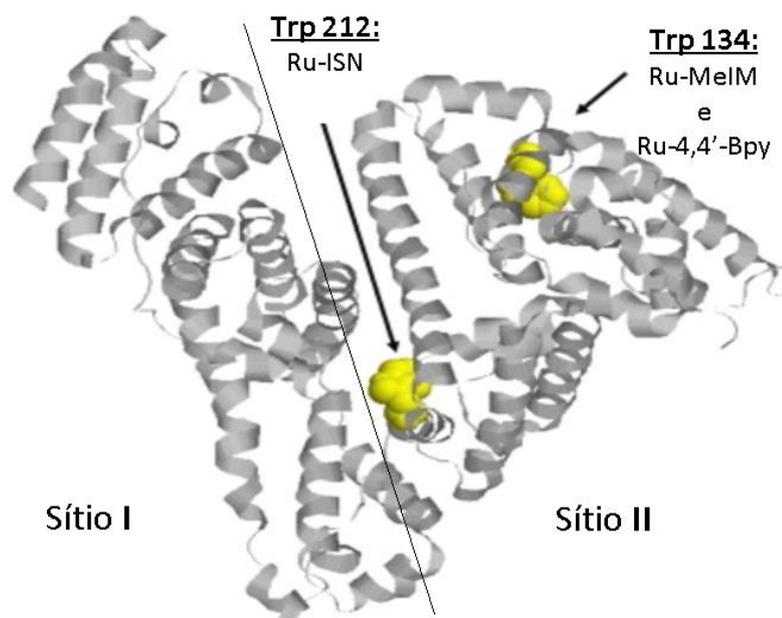


Figura 16. Estrutura secundária tridimensional da proteína⁶¹ e as supostas localizações dos complexos em seus respectivos sítios.

Para complementar a caracterização desses sistemas, um ensaio competitivo entre os complexos de rutênio e ibuprofeno foi realizado para identificar o sítio de interação dos complexos de rutênio no arcabouço proteico, cujos resultados estão apresentados a seguir.

c) Identificação do sítio de interação dos complexos de rutênio na BSA

A fim de averiguar se os complexos de rutênio estão interagindo com os resíduos de Trp 134 e/ou Trp 212, como proposto pelos parâmetros termodinâmicos, utilizou-se

a molécula de ibuprofeno (IBU) como sonda interna para competir com os derivados de rutênio pelos sítios proteicos.

Estudos comprovam que o IBU interage com a BSA no sítio II de Sudlow, alojando-se na proximidade do fluoróforo Trp 134⁶².

Dessa forma, prepararam-se soluções de BSA contendo quantidade equimolar de ibuprofeno e, em seguida, realizamos a titulação das mesmas com os complexos de rutênio.

Utilizando a abordagem matemática de Stern-Volmer (**Equações 01 e 02**) foi construído gráfico de variação de fluorescência em função da concentração dos complexos obtendo, assim, os valores das constantes de supressão apresentados na **Tabela 08**.

TABELA 08. Valores de K_{SV} frente a sonda de Ibuprofeno.

Ru(PAN)(PPh ₃) ₂ (L) ⁺	K_{SV}	
	Ausência de IBU	Presença de IBU
L= MeIM	13,3 10 ⁴	5,40 10 ⁴
L= 4,4'-Bpy	10,4 10 ⁴	9,10 10 ⁴
L= ISN	6,68 10 ⁴	12,3 10 ⁴

Neste caso, podemos observar que a titulação da solução BSA-IBU pelo complexo [Ru(PAN)(PPh₃)₂MeIM]⁺ resultou em um menor valor de K_{SV} em relação ao sistema sem a sonda interna. Esta diminuição de valor de K_{SV} reflete em uma menor eficiência de supressão da fluorescência da BSA pelo complexo de rutênio, promovida pela presença de ibuprofeno na região do Trp 134.

Para o sistema contendo o complexo [Ru(PAN)(PPh₃)₂ISN]⁺ observamos comportamento oposto da supressão da biomolécula. Aqui, a titulação da solução BSA-IBU pelo complexo de rutênio levou ao aumento da constante de Stern-Volmer, quando

comparado ao ensaio sem a sonda IBU. Este aumento de K_{SV} é coerente com uma maior eficiência supressora de fluorescência da proteína, indicando que tanto o complexo de rutênio, quanto o ibuprofeno estão mais próximos dos grupos fluorescentes.

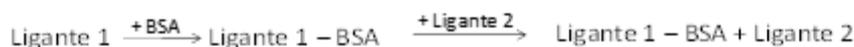
Já o sistema contendo o derivado $[Ru(PAN)(PPh_3)_2(4,4'-Bpy)]^+$ não apresentou variação significativa nos valores de K_{SV} na ausência ou presença da molécula ibuprofeno.

A variação dos valores de K_{SV} observados nesta etapa do trabalho pode ser justificada levando-se em consideração que o sítio II da BSA permite a inclusão de duas ou mais moléculas em seu interior e, quando isso ocorre, a interação destas com a biomolécula podem acontecer por dois mecanismos, como esquematizadas a seguir⁵⁸ e, que podem ser diferenciados pelos valores das constantes de supressão:

a) Mecanismo competitivo



b) Mecanismo não- competitivo



Sendo, Ligante 1 = Ibuprofeno e Ligante 2 = Complexo de Ru

No mecanismo competitivo, como o próprio nome enfatiza, os dois ligantes competem pelo mesmo resíduo de triptofano, no caso do ibuprofeno é o Trp 134, o que leva a uma diminuição da capacidade supressora do complexo de rutênio.

No mecanismo não-competitivo, os dois ligantes não competem pelo fluoróforo, o segundo ligante desloca a sonda do arcabouço proteico devido a afinidade eletrostática

do ligante com a superfície da biomolécula e, conseqüentemente, não há variação da capacidade supressora da molécula.

Assim, retomando as informações termodinâmicas, que os complexos $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{MeIM})]^+$ e $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(4,4'\text{-Bpy})]^+$ estão interagindo na superfície da biomolécula, no sítio preferencial da sonda ibuprofeno, e analisando os dois mecanismos propostos na literatura para esse tipo de interação, podemos concluir que:

O complexo $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2\text{MeIM}]^+$ está interagindo com a biomolécula via resíduo de Trp 134 e, quando na presença da sonda ibuprofeno compete com a mesma pela preferência do grupo fluoróforo. Isto ocorre devido a natureza do ligante ancilar MeIM, que na presença do grupo periférico, favorece a formação de ligações de hidrogênio com os aminoácidos presentes na cadeia protéica.

Por outro lado, a presença do ligante ancilar 4,4'-bipiridina confere ao complexo uma densidade eletrônica maior, aumentando o grau de polarizabilidade do complexo e, conseqüentemente, favorecendo a interação do arcabouço proteico com o complexo deslocando assim, a molécula de ibuprofeno da proximidade do Trp 134.

Para o sistema contendo o complexo $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2\text{ISN}]^+$, os dados termodinâmicos indicam que este complexo está inserido em um ambiente mais hidrofóbico, interagindo com o Trp 212. Como a sonda utilizada é específica para o resíduo de Trp 134, o que se observa aqui é um efetivo somatório da supressão da sonda no Trp 134 e do complexo no Trp 212. Dessa forma, este ensaio, corrobora com a hipótese de que o complexo $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2\text{ISN}]^+$ está realmente alojado no interior da proteína.

Isso ocorre provavelmente devido a natureza do ligante ancilar ISN que, devido a presença do grupo "NH₂-C=O", favorece a difusão do complexo pela estrutura da albumina, até atingir a cavidade interna de caráter hidrofóbico.

4.2. Potencial aplicação dos complexos de rutênio com BSA na detecção amperométrica de ácido ascórbico.

Nesta etapa do trabalho, procuramos avaliar a potencialidade dos complexos de rutênio sintetizados na modificação química da superfície de eletrodos e sua aplicação na área de sensoriamento químico.

A escolha pela técnica eletroanalítica foi motivada pelas vantagens que ela apresenta frente às técnicas cromatográficas como: i) análise direta da amostra, sem a necessidade de etapa de separação ou pré-tratamento; ii) análise em materiais coloridos ou com partículas sólidas dispersas; iii) simplicidade; iv) menor custo e menor tempo de análises; v) menor influência de interferentes presentes nas amostras.

O eletrodo utilizado para a modificação superficial foi o FTO devido ao seu baixo custo, sua elevada condutividade e área superficial que permite uma melhor acomodação do complexo e BSA.

A espécie escolhida para avaliar a potencialidade desse sistema como sensor foi o ácido ascórbico, pois a ação multifacetada do ácido ascórbico tem motivado o desenvolvimento de metodologias para a sua detecção e quantificação em alimentos⁶³,⁶⁴, produtos farmacêuticos e sistemas biológicos.

Nesse contexto, iniciamos o estudo eletroquímico do ácido ascórbico, em condições pseudo-fisiológicas, empregando eletrodos quimicamente modificados com albumina do soro bovino e complexos de rutênio.

Como as informações obtidas com o uso de técnicas eletroanalíticas dependem das reações redox que ocorrem na superfície do eletrodo ou na interface eletrodo-solução, o comportamento eletroquímico dos eletrodos de FTO quimicamente modificados com BSA/complexos de rutênio foi monitorado.

A **Figura 17** mostra os voltamogramas cíclicos comparativos obtidos com os eletrodos de FTO após as modificações com BSA/complexos de rutênio em uma solução tampão fosfato pH 7,2 saturada com argônio. Os eletrodos apresentaram voltamogramas sem a presença de processos redox associados às espécies adsorvidas (complexos de rutênio e BSA) no intervalo de potencial 0,0 a 1,0 V.

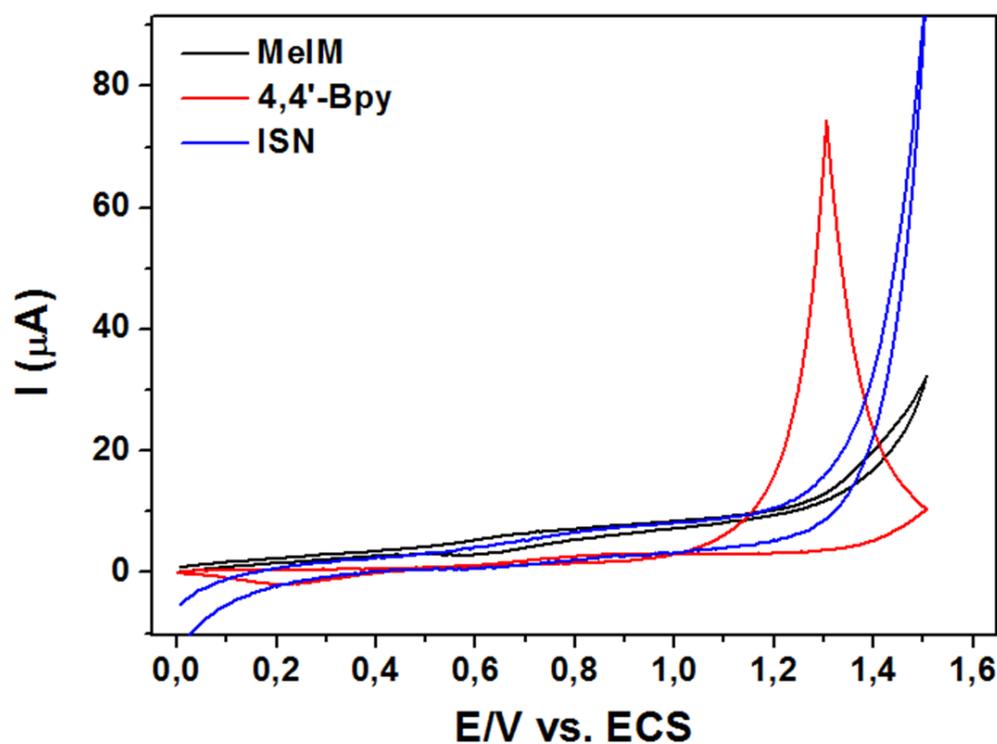


Figura 17. Voltamogramas cíclicos obtidos atmosfera de argônio para os eletrodos de FTO quimicamente modificados com BSA/complexos de rutênio. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e pH 7,2.

A dependência do comportamento eletroquímico desses eletrodos foi estudada em diferentes valores de pH (solução tampão pH 4,0; 5,5; 7,2) e os resultados obtidos foram análogos aos apresentados na **Figura 17**.

Esta janela de potencial de trabalho (0,0 a 1,0 V) é interessante, pois os processos redox associados à molécula de ácido ascórbico ocorrem nesta faixa de potencial e são dependentes da concentração de íons H^+ na solução, conforme podemos observar na **Figura 18**⁶⁵.

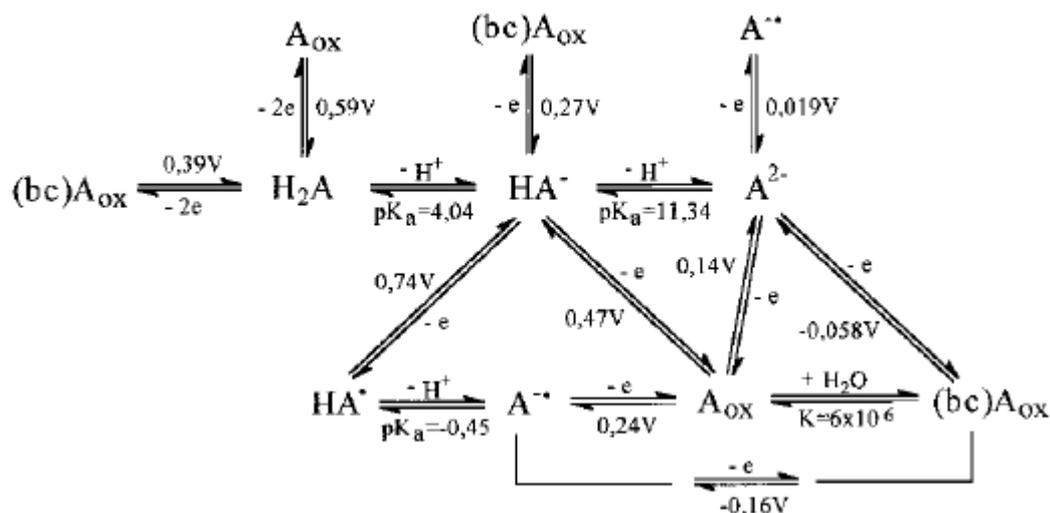


Figura 18. Potenciais padrão de redução vs EPH (Eletrodo padrão de hidrogênio) e constantes de acidez do ácido ascórbico e espécies relacionadas, a 25° C e a força iônica 0,2 mol L⁻¹⁶⁵

Para avaliar a resposta eletroquímica do analito de interesse com o eletrodo modificado apenas com a BSA, fez-se adições de alíquotas de solução de ácido ascórbico. A **Figura 19** apresenta os voltamogramas cíclicos da oxidação do ácido ascórbico sobre o eletrodo de FTO-BSA. Neste caso, observa-se apenas um aumento na intensidade de corrente catódica indicando que o analito interage com a superfície eletródica, porém o potencial de oxidação do ácido ascórbico ocorre fora da janela de potencial do eletrodo.

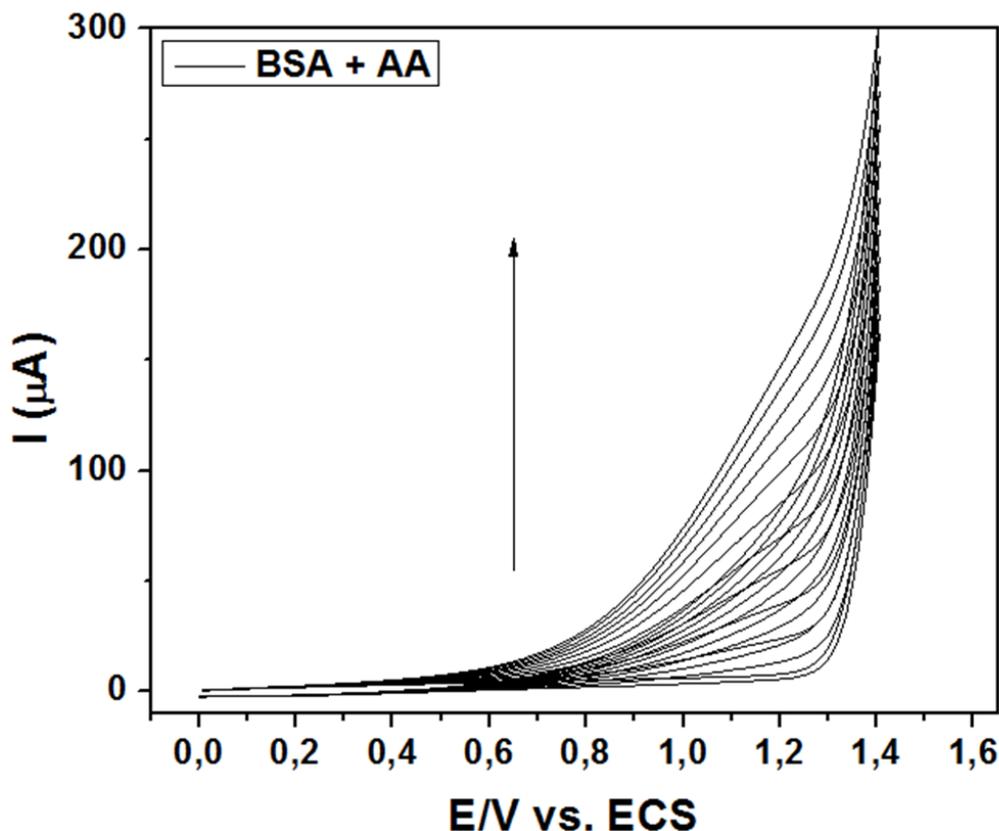


Figura 19 - Voltamogramas cíclicos obtidos pela oxidação do AA sobre o eletrodo modificado de FTO-BSA em atmosfera de argônio. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e pH 4,0.

A fim de melhorar a resposta final, onde o analito irá interagir diretamente com o agente modificante, fizeram-se as modificações da superfície do eletrodo com BSA e complexos de rutênio.

A **Figura 20** apresenta os voltamogramas cíclicos da oxidação do ácido ascórbico sobre os eletrodos FTO modificados com BSA/complexos de rutênio com os ligantes MeIM, 4,4'-Bpy e ISN, em solução tampão fosfato pH 7,2. Os comportamentos observados são típicos de um processo irreversível e mostram que após a inserção dos complexos de rutênio houve um aumento acentuado na magnitude da corrente, bem como a definição de uma onda catódica na região de +0,80 V (vs Hg/Hg₂Cl₂) para o sistema contendo o íon complexo $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{MeIM})]^+$. Além disso, uma

comparação destes resultados com os apresentados na **Figura 19** indicam que a corrente de oxidação do ácido ascórbico está diretamente associada com o processo redox do complexo metálico, ou seja, que o derivado de rutênio é o responsável pela atividade electrocatalítica da vitamina C.

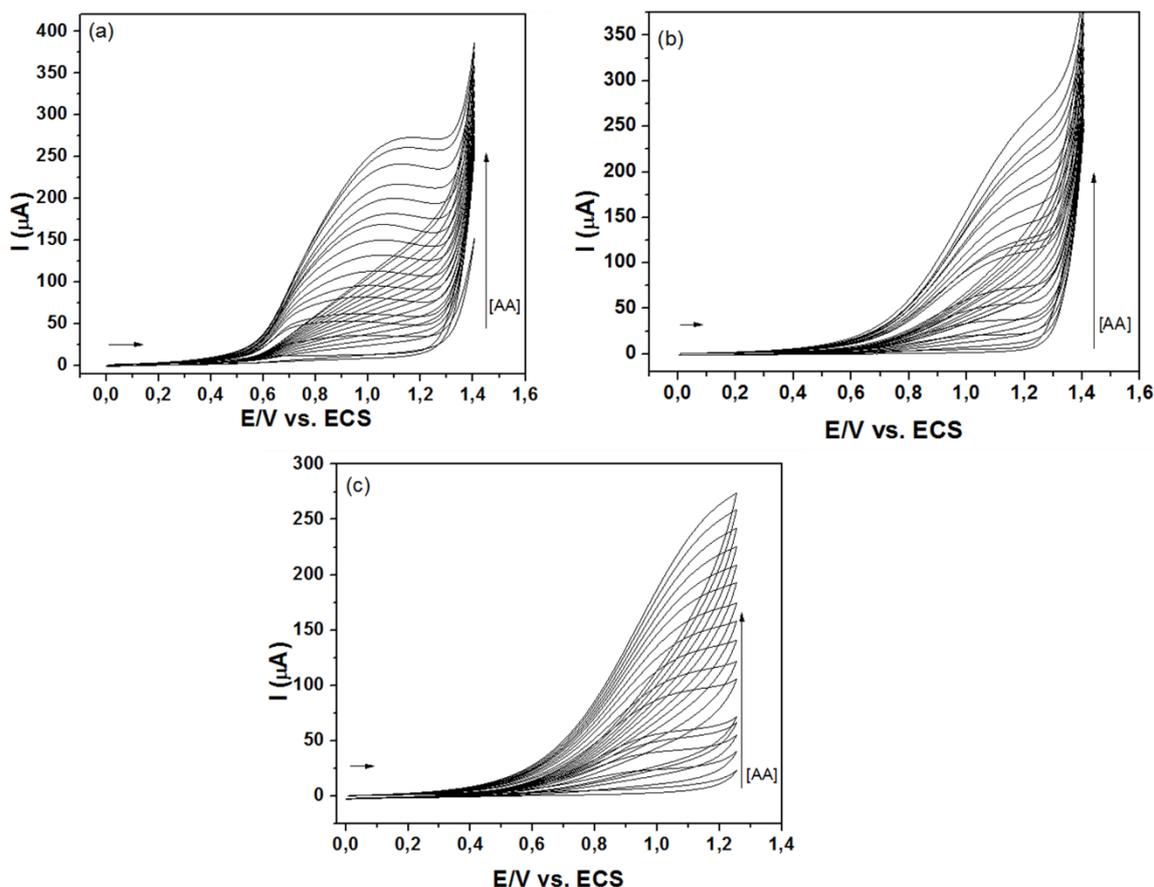


Figura 20. Voltamogramas cíclicos obtidos pela oxidação do AA sobre o eletrodo modificado de FTO-BSA/Complexo com ligante de (a) MeIM, (b) 4,4'-Bpy e (c) ISN em atmosfera de argônio. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e pH 7,2.

Voltamogramas cíclicos da oxidação do ácido ascórbico sobre FTO modificado com BSA/complexo de rutênio em solução tampão pH 7,2 também foram registrados a diferentes velocidades de varredura do potencial. Uma análise dos resultados mostrou uma dependência linear da corrente de pico (I_p) com a raiz quadrada da velocidade de varredura do potencial ($v^{1/2}$), como apresentado na **Figura 21**. Esta característica é de um

processo eletroquímico irreversível sob controle difusional e pode ser expressa pela

Equação 05 de Randles–Sevcik⁶⁶:

$$I_p = 2,99 \times 10^5 n (\alpha n_0)^{1/2} A C_0 D_0^{1/2} v^{1/2} \quad \text{Equação 05}$$

onde C_0 representa a concentração de ácido ascórbico na solução, D_0 o coeficiente de difusão do analito, A a área do eletrodo, n o número total de elétrons envolvidos na reação. O parâmetro αn_0 reflete a irreversibilidade da reação.

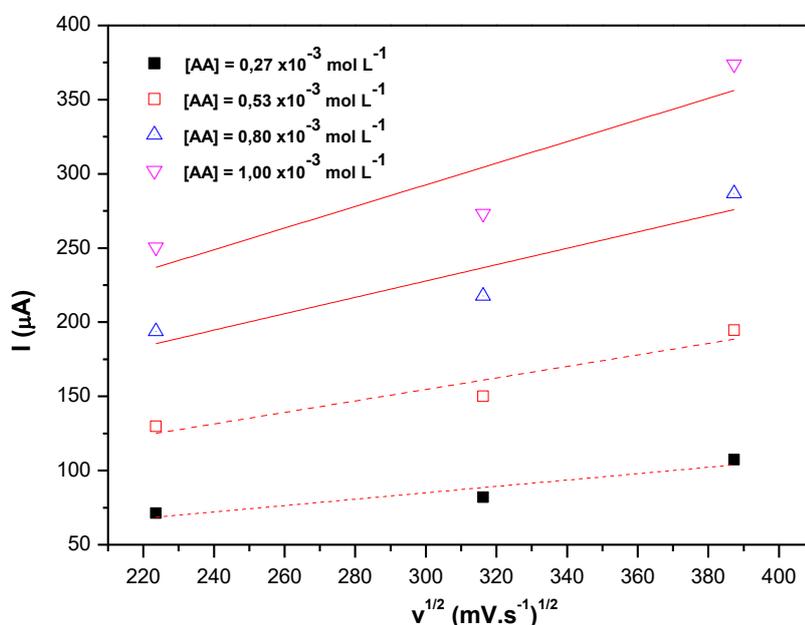


Figura 21. Voltamogramas variando as velocidades de varredura para o eletrodo modificado de FTO-BSA/complexo de rutênio com o ligante MeIM. Velocidades de varredura de 50, 100 e 150 mV s^{-1} em pH 7,2.

A dependência da velocidade de varredura foi análoga para os EQM's que apresentavam 4,4'-Bpy e ISN ligado ao Ru.

O estudo da dependência do efeito do pH no potencial de oxidação do ácido ascórbico em solução tampão nos intervalos de 4,0, 5,50 e 7,2 para verificar qual é o

melhor pH a ser utilizado na detecção amperométrica do ácido ascórbico também foi realizado e os voltamogramas cíclicos estão representados na **Figura 22**.

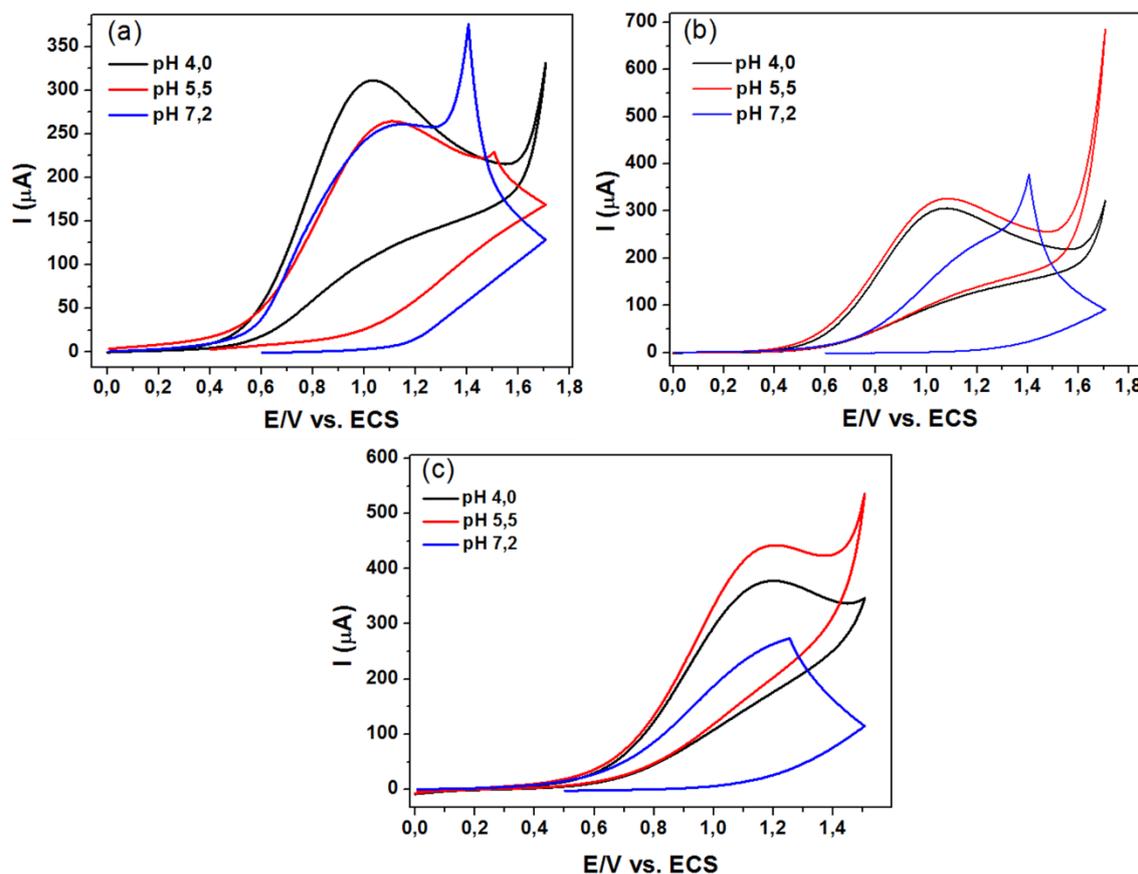


Figura 22. Voltamogramas cíclicos para uma solução de AA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão McIlvaine e tampão fosfato, ambos em concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodos modificados com BSA contendo os ligantes (a) MeIM, (b) 4,4'-Bpy e (c) ISN. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e pH 7,2.

Notou-se que conforme a variação do pH, os potenciais de pico se deslocam para valores menos negativos, indicando que a transferência eletrônica é dependente da concentração hidrogeniônica do meio.

Esta dependência pode ser melhor observada também através da **Figura 23**, onde nota-se que quando o pH varia de 4,0 para 7,2, a corrente de pico sofre um decaimento. Isso pode ser justificado pelo equilíbrio químico envolvendo AA, onde o valor de pKa é aproximadamente igual ao valor do pH trabalhado, ou seja, o pKa = 4,04 e o pH = 4,0. Em pHs abaixo de valor do primeiro pKa, existe quase que somente ácido

dehidroascórbico solvatado irreversivelmente, porém quando o pH ultrapassa o valor do pKa, pode ocorrer uma reação entre o ácido dehidroascórbico e a forma ascorbato, tornando o sistema relativamente instável³⁵.

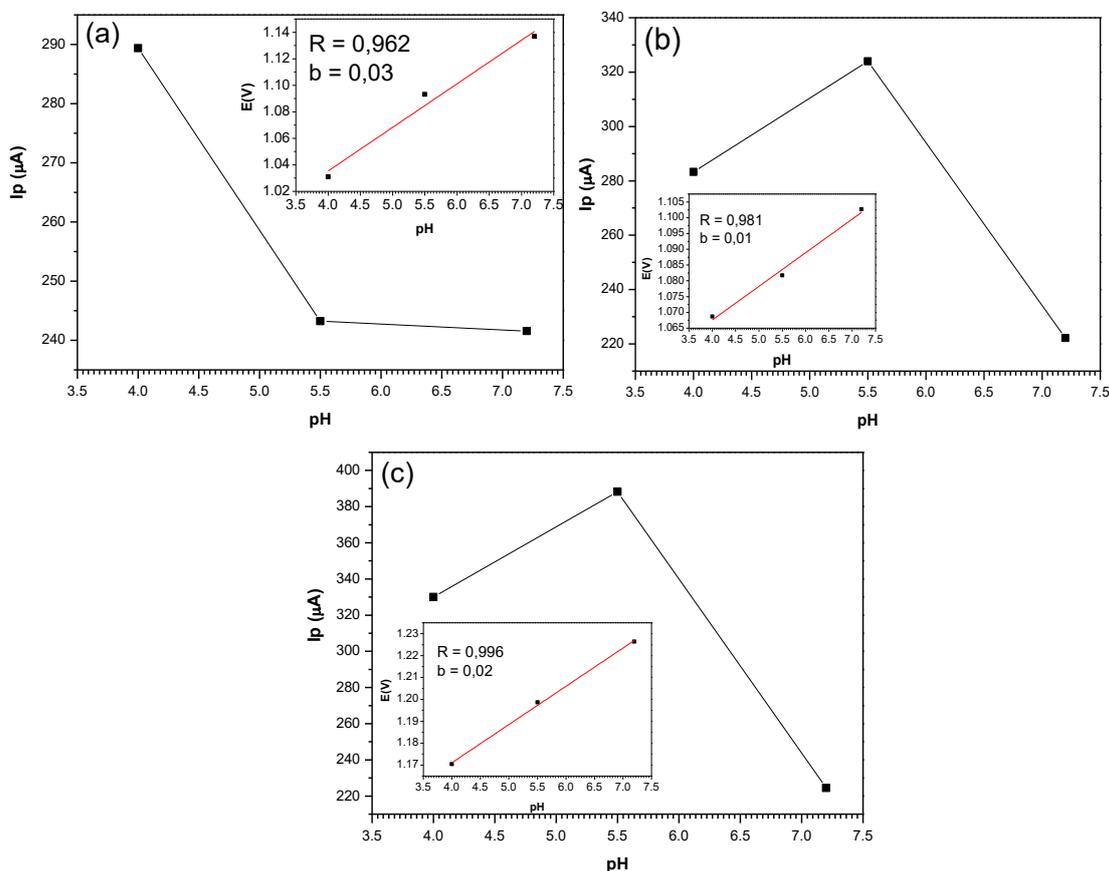


Figura 23. Voltamogramas em função do pH para os eletrodos modificados de FTO-BSA/Complexo com ligante de (a) MeIM, (b) 4,4'-Bpy e (c) ISN em atmosfera de argônio. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Como pode ser observado na **Figura 23**, para todos os sistemas o pico catódico apresentou uma dependência em função do pH, levando a uma variação de potencial de aproximadamente 100 mV em função do pH (passando de 1,14 V em pH 7,2 para 1,03 V em pH 4,0 para o sistema MeIM). Neste ponto, vale a pena destacar a definição da onda catódica na região de +1,0 V associada à oxidação do ácido ascórbico para os sistema contendo ISN e 4,4'-Bpy em meio ácido.

A partir dos parâmetros eletroquímicos obtidos pode-se concluir que dos três pHs estudados que, o meio mais ácido (pH 4,0) apresentou a melhor relação sinal – ruído mostrando-se um bom meio reacional para o sensoriamento amperométrico de ácido ascórbico.

Uma vez definido o melhor pH para detecção da vitamina C, foram determinados o intervalo linear de resposta e os parâmetros de desempenho analítico (Sensibilidade, Limite de detecção e limite de quantificação) dos eletrodos modificados.

Os VC foram obtidos após adições sucessivas de 50 μL de AA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na cela eletroquímica contendo 75mL de solução tampão fosfato pH 4,0, como ilustrado na **Figura 24 (a)**, o sinal amperométrico se estabilizou rapidamente após cada adição de AA, com um tempo de resposta médio de 20 s.

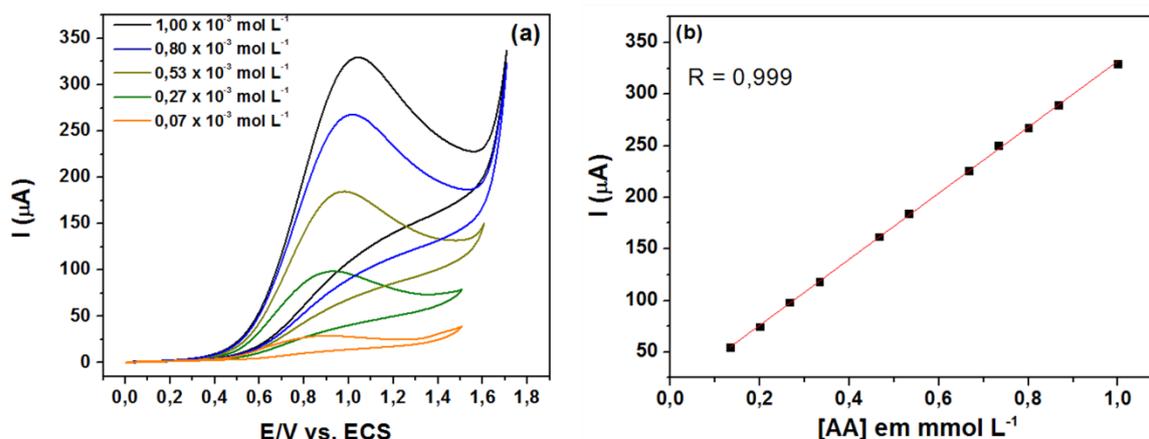


Figura 24. Voltamogramas do eletrodo contendo complexo de $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2\text{MeIM}]\text{PF}_6$ na presença de (a) diferentes concentrações de AA ($0,07 \times 10^{-3}$ a $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com adições a cada $50 \mu\text{L}$ de AA. Este voltamograma foi apresentado com 5 concentrações para melhor visualização, porém foi feito com 11 variações; (b) Curva analítica pH 4,0 e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Na **Figura 24(b)** observa-se a curva analítica obtida para o eletrodo modificado e seu intervalo de linearidade, que vai de $0,07 \times 10^{-3}$ até $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com $R = 0,999$.

Os três EQM' submetidos a esta análise apresentaram as mesmas propriedades eletroquímicas, todas obtiveram um aumento das intensidades das correntes de pico anódicas em função da concentração de AA.

De acordo com a literatura, o cálculo dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de um sensor eletroquímico deve ser realizado com as menores concentrações do analito, uma vez que se deve utilizar a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção. O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substancia em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, e o valor de limite de quantificação (LQ) corresponde a menor concentração da substancia em exame que pode ser medida utilizando um determinado procedimento experimental. Esses parâmetros podem ser calculados através das equações a seguir:

$$\mathbf{LD = 3SD/coeficiente\ angular\ da\ curva}$$

$$\mathbf{LQ = 10\ SD/coeficiente\ angular\ da\ curva}$$

Onde SD corresponde ao desvio padrão dos valores de corrente referente a 10 medidas do branco, determinado de acordo com as recomendações da IUPAC.

Os valores de LD e LQ encontrado para os eletrodos modificados estão apresentados na **Tabela 09**.

TABELA 09. Parâmetros eletroquímicos para os três EQM's em vários pHs.

	pH	Sensibilidade	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
MeIM	4,0	0,320	10,5	35,2
	5,5	0,260	35,6	119,0
	7,2	0,259	23,9	79,8
4,4'-Bpy	4,0	0,322	7,81	26,0
	5,5	0,355	42,1	140,0
	7,2	0,254	14,9	49,7
ISN	4,0	0,368	10,3	34,3
	5,5	0,440	13,2	44,0
	7,2	0,256	34,4	115,0

Comparando os valores de limite de detecção obtidos nesse trabalho com outros descritos na literatura^{47,67-69}, **Tabela 10**, podemos observar que os eletrodos quimicamente modificados com albumina e complexos de rutênio apresentam-se como bons candidatos para o sensoriamento eletroanalítico da vitamina C, em solução aquosa.

TABELA 10. Valores de LD obtidos para diferentes eletrodos.

Eletrodo	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Ref.
MWCNT/CCE ^a	7,71	[73]
FTO-BSA/Ru-4,4'-Bpy	7,81	Deste trabalho
FTO-BSA/Ru-ISN	10,30	Deste trabalho
FTO-BSA/Ru-MeIM	10,50	Deste trabalho
CILE ^b	20,00	[74]
PtNPs-MWCNT/GCE ^c	20,00	[75]
PAA-MWCNTs/SPCE ^d	49,80	[76]

4.2.1. Influência da dopamina (DA) no sensoriamento de AA.

Um dos interferentes de maior importância na determinação e quantificação do AA em sistemas biológicos é a dopamina (DA), por causa da proximidade de seus respectivos potenciais de oxidação. Desta forma, analisou-se a influência deste interferente na detecção de AA utilizando o eletrodo FTO-BSA/Ru-MeIM, pois foi o eletrodo que apresentou melhor resposta amperométrica.

Assim as medidas foram realizadas em pH 4,0 e velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹, como apresentado na **Figura 25**.

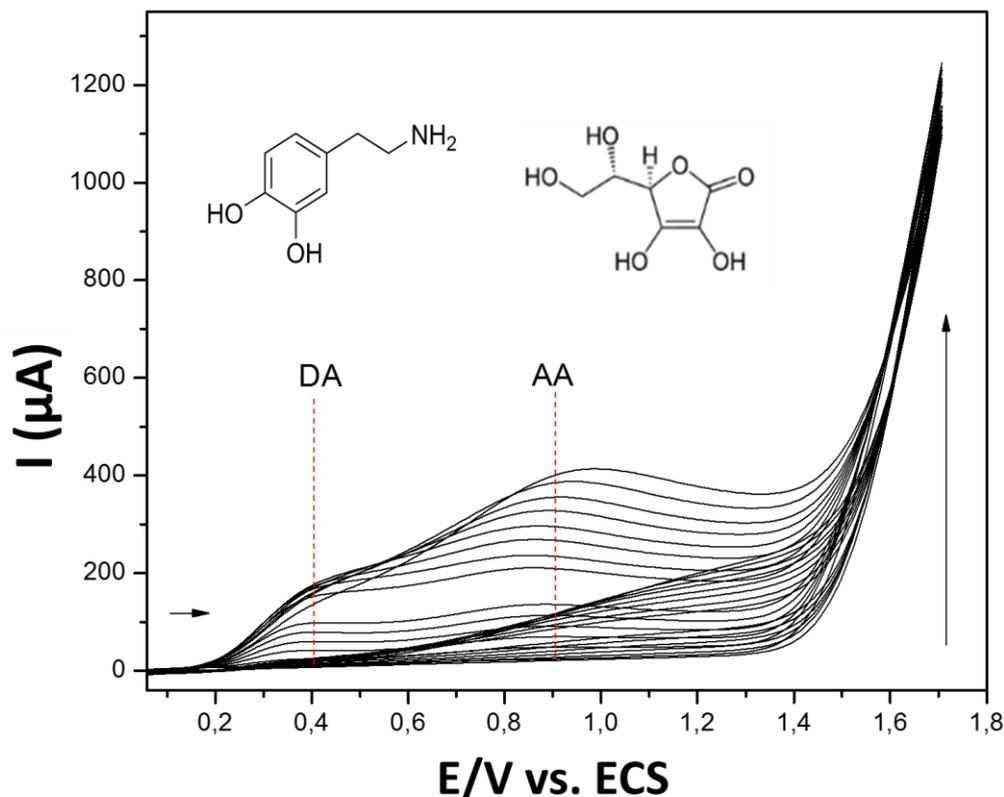


Figura 25. Voltamogramas cíclicos obtidos pela oxidação da DA sobre o eletrodo modificado de FTO-BSA em atmosfera de argônio. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e pH 4,0.

Como podemos observar na **Figura 25**, a molécula de dopamina apresenta uma onda catódica em +0,40 V (vs Hg/Hg₂Cl₂), enquanto a oxidação do ácido ascórbico ocorre em aproximadamente +0,91 V (vs Hg/Hg₂Cl₂), como indicado pela linha tracejada. A diferença de quase 500 mV entre os potenciais de oxidação da DA e AA corrobora com a nossa proposta de que o eletrodo de FTO quimicamente modificado com BSA e complexo de rutênio é um bom candidato para a detecção da vitamina C, mesmo na presença do interferente dopamina, ou seja, é possível realizar a detecção simultânea de ambos os analitos.

5. Conclusão

Três novos complexos de rutênio de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2\text{L}]\text{PF}_6$ foram sintetizados e caracterizados pelas técnicas de RMN ^1H e UV/Visível.

De acordo com as análises dos espectros de RMN podemos concluir que o ligante PAN coordenou-se ao rutênio(II) de forma tridentada e, conjuntamente, com o ligante N-heterocíclico ancilar metilimidazol, 4,4'-bipiridina ou isonicotinamida perfazem o plano equatorial do complexo de rutênio. As duas moléculas de trifenilfosfina ocupam a posição axial do complexo.

A partir das evidências teóricas, somadas aos espectros eletrônicos, podemos concluir que há uma grande covalência na interação entre o íon rutênio(II) e o ligante PAN, bem como uma grande deslocalização de carga sobre o sistema $d\pi(\text{Ru}) - \pi^*$ (PAN). Além disso, podemos afirmar que o ligante PAN comporta-se como um ligante não-inocente quando coordenado ao rutênio(II).

As interações desses complexos com a proteína albumina do soro bovino foram claramente observadas e comprovadas através do processo de supressão de fluorescência intrínseca da biomolécula.

As tendências dos valores de constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) em função da temperatura permitiram inferir o mecanismo de interação desses três complexos com a macromolécula, sendo: i) mecanismo estático para os sistemas contendo os derivados $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{MeIM})]^+$ e $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(4,4'\text{-Bpy})]^+$; ii) mecanismo dinâmico para o sistema contendo o derivado $[\text{Ru}(\text{PAN})(\text{PPh}_3)_2(\text{ISN})]^+$.

Os parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG) associados à interação BSA – complexo de rutênio indicaram que os processos foram espontâneos e o caráter das

[Conclusão]

forças de ligação envolvidas foi hidrofóbico para o sistema contendo o ligante ancilar isonicotinamida (ISN) e eletrostático para os sistemas contendo os ligantes ancilares metilimidazol (MeIM) e 4,4'-bipiridina(4,4'-Bpy).

A utilização da sonda ibuprofeno, aliada aos parâmetros termodinâmicos, permitiu inferir a possível localização dos complexos de rutênio na biomolécula. Neste caso, o complexo contendo o ligante ancilar isonicotinamida (ISN) ficou encapsulado em uma cavidade hidrofóbica mais interna, próxima ao resíduo de triptofano 212, enquanto os complexos contendo os ligantes ancilares metilimidazol (MeIM) e 4,4'-bipiridina (4,4'-Bpy) ficaram alojados em uma região mais superficial do proteína, próxima ao resíduo de triptofano 134. Portanto, ficou evidenciada a influência da natureza química dos ligantes ancilares no processo de inserção dos complexos no arcabouço proteico.

Os ensaios eletroanalíticos preliminares envolvendo a modificação da superfície de eletrodos de FTO com albumina do soro bovino e complexos de rutênio revelaram a potencialidade desses sistemas como sensores amperométricos para a detecção de ácido ascórbico, em solução aquosa e na presença de dopamina.

6. *Perspectiva Futura*

Para que o estudo continue em andamento e que o sensor possa se tornar realidade futuramente é necessário que se faça um estudo eletroquímico ainda mais profundo, buscando investigar novas modificações no sistema dos três eletrodos trabalhados, para que possam apresentar valores de LD e LQ ainda melhores. Outro ponto que merece atenção para novas análises é o tempo e a quantidade de leitura que cada eletrodo suporta, para que se possa aperfeiçoar a reprodutibilidade do mesmo. Deve-se fazer um estudo de resistência de cada eletrodo. Outra técnica que deve ser feita é a microscopia eletrônica de varredura, para que possa analisar como está disposto as sobreposições no eletrodo suporte de FTO.

Além dos estudos eletroquímicos, deve-se também testar a modificação com outros ligantes além do MeIM, 4,4'-Bpy e ISN , para verificar se é possível a redução do custo na produção do sensor.

7. Referências

1. Ackermann, L. Carboxylate-Assisted Ruthenium-Catalyzed Alkyne Annulations by C–H/Het–H Bond Functionalizations. *Accounts of Chemical Research* **47**, 281-295 (2013).
2. Quan, Z., Wang, Y. & Fang, J. High-Index Faceted Noble Metal Nanocrystals. *Accounts of Chemical Research* **46**, 191-202 (2012).
3. Prier, C.K., Rankic, D.A. & MacMillan, D.W.C. Visible Light Photoredox Catalysis with Transition Metal Complexes: Applications in Organic Synthesis. *Chemical Reviews* **113**, 5322-5363 (2013).
4. Fry, N.L. & Mascharak, P.K. Photoactive Ruthenium Nitrosyls as NO Donors: How To Sensitize Them toward Visible Light. *Accounts of Chemical Research* **44**, 289-298 (2011).
5. Hamann, C.H.H., A.; Vielstich, W. *Electrochemistry* (Weinheim - Germany, 1998).
6. Suginta, W., Khunkaewla, P. & Schulte, A. Electrochemical Biosensor Applications of Polysaccharides Chitin and Chitosan. *Chemical Reviews* **113**, 5458-5479 (2013).
7. Alaejos, M.S. & García Montelongo, F.J. Application of Amperometric Biosensors to the Determination of Vitamins and α -Amino Acids. *Chemical Reviews* **104**, 3239-3266 (2004).
8. Hall, N. *Neoquímica - A Química Moderna e Suas Aplicações* (Porto Alegre - Brasil, 2004).
9. Xiao M. H.; Carter, D.C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **358**, 209 - 215 (1992).
10. Goldberg, R.J. A Theory of Antibody—Antigen Reactions. I. Theory for Reactions of Multivalent Antigen with Bivalent and Univalent Antibody2. *Journal of the American Chemical Society* **74**, 5715-5725 (1952).
11. EMERSON, T.E.J. Unique features of albumin: A brief review. *Critical Care Medicine* **17**, 690-694 (1989).
12. Zhao, X.L., R.; Teng, Y.; Liu, X. The interaction between Ag⁺ and bovine serum albumin: A spectroscopic investigation *Science of The Total Environment* **409**, 892-897 (2011).

13. Punith, R. & Seetharamappa, J. Spectral characterization of the binding and conformational changes of serum albumins upon interaction with an anticancer drug, anastrozole. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **92**, 37-41 (2012).
14. Shaikh, S.M.T., Seetharamappa, J., Kandagal, P.B. & Ashoka, S. Binding of the bioactive component isothipendyl hydrochloride with bovine serum albumin. *Journal of Molecular Structure* **786**, 46-52 (2006).
15. Peters J, T. in *Advances in Protein Chemistry* (eds. C.B. Anfinsen, J.T.E. & Frederic, M.R.) 161-245 (Academic Press, 1985).
16. Guo, S. et al. Structural basis of transport of lysophospholipids by human serum albumin. *Biochem J* **423**, 23-30 (2009).
17. Lakowicz, J.R. *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Biochemical Applications* (New York, 2002).
18. Barreleiro, P.C.A. & Lindman, B. The Kinetics of DNA–Cationic Vesicle Complex Formation. *The Journal of Physical Chemistry B* **107**, 6208-6213 (2003).
19. Cárdenas, M., Schillén, K., Pebalk, D., Nylander, T. & Lindman, B. Interaction between DNA and Charged Colloids Could Be Hydrophobically Driven. *Biomacromolecules* **6**, 832-837 (2005).
20. Haldar, B. et al. Fluorometric and Isothermal Titration Calorimetric Studies on Binding Interaction of a Telechelic Polymer with Sodium Alkyl Sulfates of Varying Chain Length. *Langmuir* **22**, 3514-3520 (2006).
21. Mallick, A., Haldar, B. & Chattopadhyay, N. Spectroscopic Investigation on the Interaction of ICT Probe 3-Acetyl-4-oxo-6,7-dihydro-12H Indolo-[2,3-a] Quinolizine with Serum Albumins. *The Journal of Physical Chemistry B* **109**, 14683-14690 (2005).
22. SainanYang et al. High-capacitance MnO₂ nanoflakes on preformed C/TiO₂ shell/core nanowire arrays for electrochemical energy storage. *Electrochimica Acta* **120**, 416-422 (2014).
23. Peters, J.T. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications* (New York, 1995).
24. Windmiller, J.R. & Wang, J. Wearable electrochemical sensors and biosensors: a review. *Electroanalysis* **25**, 29-46 (2013).
25. Lane, R.F. & Hubbard, A.T. Electrochemistry of chemisorbed molecules. I. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents. *The Journal of Physical Chemistry* **77**, 1401-1410 (1973).

[Referências]

26. Moses, P.R., Wier, L. & Murray, R.W. Chemically modified tin oxide electrode. *Analytical Chemistry* **47**, 1882-1886 (1975).
27. Souza, M.d.F.B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. *Química Nova* **20**, 191-195 (1997).
28. Carvalho, J.B.S., V. P. A.; Futado, R. F.; Alves, C. R.; Rondina, D.; Dutra, R. F. in I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas (João Pessoa, 2010).
29. Wang, Y. et al. Enantioselective recognition of penicillamine enantiomers on bovine serum albumin-modified glassy carbon electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry* **17**, 627-633 (2013).
30. Pereira, A.C., Santos, A.d.S. & Kubota, L.T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova* **25**, 1012-1021 (2002).
31. Finot, M.O. & McDermott, M.T. Characterization of n-alkanethiolate monolayers adsorbed to electrochemically deposited gold nanocrystals on glassy carbon electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **488**, 125-132 (2000).
32. Charlotte, L.P., Susan, B.C. & Sheldon, R.P. Effects of Ascorbic Acid on Proliferation and Collagen Synthesis in Relation to the Donor Age of Human Dermal Fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* **103**, 228-232 (1994).
33. Huang, W.Y., Lee, P.C., Huang, L.K., Lu, L.P. & Liao, W.C. Stability studies of ascorbic acid 2-glucoside in cosmetic lotion using surface response methodology. *Bioorg Med Chem Lett* **23**, 1583-7 (2013).
34. Pisoschi, A.M., Pop, A., Serban, A.I. & Fafaneata, C. Electrochemical methods for ascorbic acid determination. *Electrochimica Acta* **121**, 443-460 (2014).
35. Erdurak-Kiliç, C.S. et al. Anodic voltammetric behavior of ascorbic acid and its selective determination in pharmaceutical dosage forms and some Rosa species of Turkey. *Journal of Analytical Chemistry* **61**, 1113-1120 (2006).
36. Bhagavan, N.V. *Medical Biochemistry* (2002,).
37. Sies, H., Stahl, W. & Sundquist, A.R. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci* **669**, 7-20 (1992).
38. Cathcart, R.F. A unique function for ascorbate. *Medical Hypotheses* **35**, 32-37 (1991).
39. Padayatty, S.J. et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* **22**, 18-35 (2003).
40. Pregnotatto, W. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

41. Paim, A.P.S., Kronka, E.A.M., Reis, B.F. & Korn, M. Determinação espectrofotométrica de ácido ascórbico em fármacos empregando amostragem binária em fluxo. *Química Nova* **21**, 47-50 (1998).
42. Zhang, R., Liu, S., Wang, L. & Yang, G. Electroanalysis of ascorbic acid using poly(bromocresol purple) film modified glassy carbon electrode. *Measurement* **46**, 1089-1093 (2013).
43. Gao, F. et al. Highly sensitive and selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid at graphene oxide modified electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* **186**, 380-387 (2013).
44. Zheng, X., Zhou, X., Ji, X., Lin, R. & Lin, W. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using poly(4-aminobutyric acid) modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* **178**, 359-365 (2013).
45. Wang, X. et al. Determination of ascorbic acid in individual liver cancer cells by capillary electrophoresis with a platinum nanoparticles modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **712**, 139-145 (2014).
46. Sun, D.Q., Z.; Tan, F.; Wang, X.; Gao, J. Simultaneous detection of dopamine, uric acid, and ascorbic acid using SnO₂ nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes/carbon paste electrode. *Analytical Methods* **4**, 3283 (2012,).
47. Habibi, B. & Pournaghi-Azar, M.H. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid by use of a MWCNT modified carbon-ceramic electrode and differential pulse voltammetry. *Electrochimica Acta* **55**, 5492-5498 (2010).
48. Stephenson, T.A. & Wilkinson, G. New complexes of ruthenium (II) and (III) with triphenylphosphine, triphenylarsine, trichlorostannate, pyridine and other ligands. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **28**, 945-956 (1966).
49. Basu, S. et al. 1-(2'-Pyridylazo)-2-naphtholate complexes of ruthenium: Synthesis, characterization, and DNA binding properties. *Polyhedron* **27**, 2943-2951 (2008).
50. Morita, T. & Assunção, R.M.V. Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação, indicadores de segurança, descarte de produtos químicos (E. Blucher, 1972).
51. Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy (2006).
52. Silverstein, R.M. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos (Rio de Janeiro 2006).

53. Kratz, F., Keppler, B.K., Messori, L., Smith, C. & Baker, E.N. Protein-binding Properties of two Antitumour Ru(III) Complexes to Human Apotransferrin and Apolactoferrin. *Met Based Drugs* **1**, 169-73 (1994).
54. Trynda-Lemiesz, L., Keppler, B.K. & Kozłowski, H. Studies on the interactions between human serum albumin and imidazolium [trans-tetrachlorobis(imidazol)ruthenate(III)]. *Journal of Inorganic Biochemistry* **73**, 123-128 (1999).
55. Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy (Cambridge University Press, 1999).
56. Gorelsky, S.I.D., E. S.; Lever, A. B. P.; Vlcek, A. A. Trends in metal–ligand orbital mixing in generic series of ruthenium N-donor ligand complexes—effect on electronic spectra and redox properties. *Coordination Chemistry Reviews* **174**, 469-494 (1998).
57. Bonacin, J.A.T., S. H.; Freitas, J. N.; Nogueira, A. F.; Toma, H. E. On the behavior of the carboxyphenylterpyridine(8-quinolinolate) thiocyanatoruthenium(II) complex as a new black dye in TiO₂ solar cells modified with carboxymethyl-beta-cyclodextrin. *Inorganic Chemistry Communications* **36**, 35-38 (2013).
58. Jayabharathi, J., Thanikachalam, V. & Venkatesh Perumal, M. Mechanistic investigation on binding interaction of bioactive imidazole with protein bovine serum albumin--a biophysical study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **79**, 502-7 (2011).
59. Ross, P.D. & Subramanian, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry* **20**, 3096-3102 (1981).
60. Sudlow, G., Birkett, D.J. & Wade, D.N. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol* **12**, 1052-61 (1976).
61. Zhao, X., Liu, R., Teng, Y. & Liu, X. The interaction between Ag⁺ and bovine serum albumin: a spectroscopic investigation. *Sci Total Environ* **409**, 892-7 (2011).
62. Wang, Y.X., Li, L., Sheng, L.J., Song, G.W. & Xu, Z.S. Spectroscopic study on the inherent binding information of cationic perfluorinated surfactant with bovine serum albumin. *Journal of Fluorine Chemistry* **132**, 489-494 (2011).
63. Muñoz-Montesino, C.R., F. J.; Peña, E.; González, M.; Sotomayor, K.; Inostroza, E.; Muñoz, C. A.; González, I.; Maldonado, M.; Soliz, C.; Reyes, A. M.; Vera, J. C.; Rivas, C. I.; . Mitochondrial ascorbic acid transport is mediated by a low-affinity form of the sodium-coupled ascorbic acid transporter-2. *Free Radical Biology and Medicine* **70**, 241 - 254 (2014).

[Referências]

64. Ping, J.W., Y.; Wu, J.; Ying, Y.; Ji, F. Determination of ascorbic acid levels in food samples by using an ionic liquid–carbon nanotube composite electrode. *Food Chemistry* **135**, 362–367 (2012).
65. Fornaro, A. & Coichev, N. Ácido L-ascórbico: reações de complexação e de óxido-redução com alguns íons metálicos de transição. *Química Nova* **21**, 642-650 (1998).
66. Wang, J. *Analytical Electrochemistry* (John Wiley & Sons, Nova York, 2000).
67. Safavi, A., Maleki, N., Moradlou, O. & Tajabadi, F. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid using carbon ionic liquid electrode. *Analytical Biochemistry* **359**, 224-229 (2006).
68. Dursun, Z. & Gelmez, B. Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Dopamine and Uric Acid at Pt Nanoparticles Decorated Multiwall Carbon Nanotubes Modified GCE. *Electroanalysis* **22**, 1106-1114 (2010).
69. Huang, S.H., Liao, H.H. & Chen, D.H. Simultaneous determination of norepinephrine, uric acid, and ascorbic acid at a screen printed carbon electrode modified with polyacrylic acid-coated multi-wall carbon nanotubes. *Biosens Bioelectron* **25**, 2351-5 (2010).