

INVESTIGAÇÃO DA SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA DE SORO ALBUMINA BOVINA E HUMANA POR COMPLEXO DE RUTÊNIO

Mariete B. Moreira, Douglas S. Franciscato, Kalil C. F. Toledo, João Raul B. de Souza, Helena S. Nakatani e Vagner R. de Souza*

Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

Recebido em 10/08/2014; aceito em 31/10/2014; publicado na web em 19/12/2014

INVESTIGATION OF THE FLUORESCENCE QUENCHING OF BOVINE AND HUMAN SERUM ALBUMIN BY RUTHENIUM COMPLEX. The binding of $[RuCl_2(L)]$ ($L = N,N$ -bis(7-methyl-2-pyridylmethylene)-1,3-diiminopropane) to bovine and human serum albumin was investigated by the fluorescence quenching technique. The comparison of the quenching effect of serum albumin fluorescence by ruthenium complex allowed the estimation of subdomain IB in BSA and subdomain IIA in HSA as the binding sites for this complex. The results of fluorescence titration revealed that ruthenium complex quenches the intrinsic fluorescence of BSA through a dynamic quenching mechanism, while HSA has a static quenching mechanism. The thermodynamic parameters indicated that hydrophobic forces played a major role in the binding of ruthenium complex to proteins. The process of binding was a spontaneous process in which Gibbs free energy change was negative.

Keywords: serum albumin; ruthenium; dynamic quenching; static quenching.

INTRODUÇÃO

A partir dos anos 1970, com a comercialização do primeiro medicamento contendo platina, *cisplatina*, usado clinicamente no tratamento do câncer ovariano e de testículo, os complexos de metais de transição têm sido uma fonte inesgotável de compostos com atividades biológicas e farmacológicas promissoras.¹⁻⁹ Dentro dessa classe de compostos, os derivados de rutênio têm desempenhado um papel especial como potenciais agentes terapêuticos para processos antimetabólicos, devido à sua estabilidade, ao potencial de redução, substituição de ligante, processos de transferência de elétrons e propriedades citotóxicas.¹⁰⁻¹⁷ No entanto, antes de começar a projetar e sintetizar um novo medicamento, uma grande quantidade de dados biológicos precisa ser reunida, pois a ligação dos complexos com biomoléculas afeta seu perfil fisiológico e, na maioria dos casos, só a fração livre do complexo produz atividade terapêutica.¹⁸⁻²² Por essa razão, no processo de racionalização de novos fármacos é de fundamental importância que a etapa inicial envolva o estudo de interação dos compostos com proteínas, como a albumina.^{23,24} No organismo, a albumina é responsável por diversas funções biológicas, das quais destacamos as ações de armazenar, transportar, metabolizar e excretar ampla gama de ligantes exógenos e endógenos através da formação de adutos.²⁵

Das albuminas disponíveis no mercado, a do soro bovino (BSA) tem sido muito utilizada em estudos biomiméticos, devido à sua estabilidade, disponibilidade, baixo custo e semelhança estrutural com a albumina humana (HSA).²⁴⁻²⁷ Nesse sentido, a proteína bovina apresenta uma sequência homóloga de 80% e similaridade da estrutura terciária de 76% quando comparada à humana.^{25,28}

As estruturas das albuminas têm sido determinadas e as regiões de ligações preferenciais de fármacos têm sido caracterizadas por cristalografia.²⁹⁻³¹ Essas regiões são classificadas em três grandes domínios estruturalmente similares, denominados de I, II e III, e cada domínio contém dois subdomínios, classificados de A e B.²⁵ As regiões responsáveis pelo armazenamento dos compostos nas albuminas estão localizadas nos subdomínios IIA e IIIA, e são conhecidas como sítios I e II de Sudlow.^{32,33}

A albumina do soro humano é constituída por 585 aminoácidos, sendo 17 grupos de tirosina e apenas um fragmento de triptofano (Trp-214), que está localizado na posição 214 e no subdomínio IIA do arcabouço proteico, enquanto a bovina é composta por 582 aminoácidos, sendo 20 grupos de tirosina e dois fragmentos de triptofano denominados Trp-134 e Trp-212, localizados nos subdomínios IB e IIA, respectivamente, como representado na Figura 1.^{25,27,33}

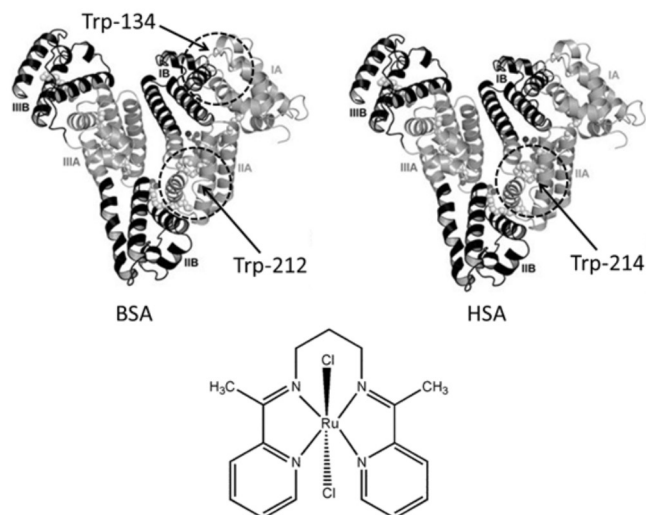


Figura 1. Representação dos arcabouços proteicos das albuminas do soro bovino (BSA) e humano (HSA), destacando a localização dos resíduos de triptofano, e do complexo de rutênio $[RuCl_2(L)]$

No início da década de 1980, Ross e Subramanian³⁴ foram os primeiros a relacionar parâmetros termodinâmicos com os diferentes tipos de forças intermoleculares que estão envolvidos na inserção de pequenas moléculas no arcabouço proteico. Segundo os autores, a relação entre os termos entrópico, entálpico e forças químicas é: *i*) $\Delta S > 0$ e $\Delta H > 0$, o processo de inserção do composto na proteína é determinado por interações hidrofóbicas; *ii*) $\Delta S < 0$ e $\Delta H < 0$, o processo é determinado por ligações de hidrogênio ou forças de

*e-mail: vrsouza2@uem.br

van der Waals; *iii*) $\Delta S < 0$ e $\Delta H > 0$, o processo é determinado por atrações eletrostáticas.

Um modo para obter esses parâmetros físico-químicos e, conseqüentemente, monitorar o metabolismo e a eficiência de fármacos no organismo é estudar a supressão de fluorescência das proteínas induzida pela presença dessas substâncias.³⁵ Essa supressão pode ser induzida por diferentes processos como reações no estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental e colisões moleculares.

A soro albumina, quando excitada em 280 nm, apresenta uma fluorescência intrínseca com máximo de emissão na região de 350 nm associada aos L-aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina.^{25,35} Dos três fragmentos, a emissão dos resíduos de triptofano da BSA (Trp-134 e Trp-212) e HSA (Trp-214) e é a mais significativa, devido à natureza química do microambiente ao redor desses grupos.²⁷

Uma descrição bastante completa acerca dos fundamentos de fluorescência encontra-se disponível na literatura³⁶ e, por isso, optou-se por não reproduzir aqui uma exaustiva descrição geral desse tema. Em vez disso, vamos destacar a abordagem matemática empregada para determinar parâmetros físico-químicos da interação de pequenas moléculas com as albuminas.

O mecanismo de supressão de fluorescência de Stern-Volmer, também conhecido como modelo de supressão dinâmica da fluorescência, tem sido amplamente utilizado para a obtenção de tais parâmetros.³⁷⁻⁴⁷ No mecanismo, a supressão da fluorescência depende da colisão entre a molécula da proteína excitada e a espécie supressora (Q) com constante de velocidade de supressão bimolecular K_q .³⁶ A redução da intensidade de emissão de fluorescência (F), em relação à intensidade observada na ausência de supressor (F_0) é dada pela equação 1 (equação de Stern-Volmer):³⁶

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

na qual F_0 e F são as intensidades relativas de fluorescência da BSA na ausência e presença do supressor, respectivamente. K_q é a constante de velocidade bimolecular de supressão, τ_0 é o tempo de vida médio das biomoléculas na ausência de supressor (10^{-8} s),³⁶ [Q] é a concentração do supressor, e o produto $K_q \tau_0$ é conhecido como constante de Stern-Volmer (K_{sv}).

Por outro lado, a colisão entre a proteína e o supressor pode ocorrer no estado fundamental, levando à formação de um complexo não fluorescente entre a albumina e a espécie supressora.³⁶ Neste caso, o mecanismo de supressão de fluorescência é tratado como um processo de supressão estática da fluorescência e a equação de Stern-Volmer pode ser reescrita como mostrado a seguir:³⁶

$$(F_0/\Delta F) = 1/(f_a K_a [Q]) + 1/f_a \quad (2)$$

na qual ΔF é a diferença da intensidade de fluorescência na ausência de supressor (F_0) e na presença de supressor (F), f_a é a fração da fluorescência inicial que está acessível ao supressor (complexo) e K_a é a constante de supressão de Stern-Volmer para a fração acessível ao supressor, usualmente empregada para tratamento de mecanismo estático de supressão.

Os processos dinâmico e estático podem ser distinguidos pela dependência dos valores de constantes de supressão com a temperatura e viscosidade.³⁶

No processo dinâmico, o aumento da temperatura promove a diminuição da viscosidade do meio reacional favorecendo a difusão do supressor em direção ao fluoróforo no estado excitado. O aumento da temperatura induz um aumento das colisões mútuas e, como conseqüência, observa-se um aumento da constante de supressão (K_{sv}) com a elevação da temperatura.³⁶

No caso do mecanismo estático, como há a formação de um complexo não fluorescente entre a albumina e o supressor no estado fundamental, o aumento da temperatura do meio reacional diminui a estabilidade do complexo intermediário e, conseqüentemente, os valores de constantes de supressão (K_{sv}) diminuem com a elevação da temperatura.³⁶

Nesse contexto, motivados pelo potencial farmacológico dos derivados de rutênio descritos na literatura,⁴⁸⁻⁵⁴ realizamos o estudo comparativo da interação do complexo de rutênio [RuCl₂(L)], (L = N,N-bis(7-metil-2-piridilmetileno)-1,3-diminopropano), Figura 1, com albumina do soro bovino (BSA) e humano (HSA). Os parâmetros termodinâmicos, constante de ligação e localização do composto no arcabouço proteico foram determinados a partir dos espectros de supressão de fluorescência das biomoléculas.

PARTE EXPERIMENTAL

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e empregados sem purificação prévia: RuCl₃·3H₂O (Aldrich), LiCl (Merck), 2-acetilpiridina (Aldrich), 1,3-diaminopropano (Aldrich), etanol (Merck), acetonitrila (Merck), albumina de soro bovino (Aldrich), albumina do soro humano (Aldrich), alumina neutra (Aldrich), NaOH (Synth), KH₂PO₄ (Synth) e HCl (Merck), (HOCH₂)₃CNH₂ (Merck). Todos os compostos foram dissolvidos em solução tampão TRIS-HCl pH 7,4, preparado conforme descrito na literatura,⁵⁵ cujo valor foi monitorado utilizando pHmetro digital modelo PHM 240 Meter Lab. A força iônica do meio foi ajustada com solução de NaCl 0,10 mol L⁻¹. O complexo de rutênio [RuCl₂(L)] foi obtido e caracterizado conforme descrito na literatura.⁵⁶ Os dados de análise elementar para RuC₁₇H₂₀N₄Cl₂ são: experimental C: 45,02; H: 4,54; N: 12,25; calculado C: 45,13; H: 4,46; N: 12,39%. A presença da base de Schiff tetradentada na esfera de coordenação do centro metálico foi confirmada por análise de RMN de ¹H, em CDCl₃, cujos dados são: δ (ppm): 7.27 (d, 2H), 7.72 (d, 2H), 7.90 (d, 2H), 9.55 (d, 2H), 4.65 (m, 4H), 2.72 (m, 2H), 2.65 (s, CH₃).

Supressão de fluorescência

Os espectros foram obtidos em um espectrofluorímetro da Varian, modelo Cary Eclipse, com compartimento de amostra com banho termostatizado, com largura das fendas de excitação e de emissão igual a 5 nm. As amostras foram excitadas em 280 nm e as leituras de emissão de fluorescência foram realizadas na faixa de 300 a 550 nm. Os espectros de emissão foram obtidos nas temperaturas de 25, 30 e 35 °C.

Para a obtenção dos espectros, fez-se a titulação de 3 mL de solução de BSA $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ com adições de 5 a 50 μ L da solução estoque do complexo [RuCl₂(L)] $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, perfazendo as concentrações de $1,6 \times 10^{-6}$ a $16,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em complexo. Para o sistema contendo HSA, os espectros foram obtidos a partir da titulação de 3 mL de solução HSA $1,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com adições de 30 a 230 μ L da solução estoque do complexo [RuCl₂(L)] $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, perfazendo as concentrações de $1,0 \times 10^{-5}$ a $7,7 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em complexo. Considerando a absorção do complexo de rutênio na região analisada,⁵⁶ os valores de fluorescência foram corrigidos utilizando a equação a seguir:³⁶

$$F_{cor} = F_{obs} \text{ antilog } (A_{ex} + A_{cm} / 2) \quad (3)$$

na qual F_{cor} e F_{obs} são os valores de fluorescência corrigido e observado, respectivamente, e A_{ex} e A_{cm} são os valores de absorbância nos comprimentos de onda 280 e 350 nm, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Supressão de fluorescência

Ambas albuminas, BSA e HSA, consistem de uma cadeia simples de aminoácidos e o microambiente da estrutura secundária da cadeia proteica pode ser alterado pela interação das proteínas com moléculas pequenas e, nesse caso, geralmente, ocorre a supressão da fluorescência intrínseca da biomolécula.^{25,27} Segundo a literatura,^{57,58} para compostos de rutênio, a supressão de fluorescência da albumina é consequência da interação do centro metálico com o resíduo de triptofano via histidina e envolvendo o processo de transferência de energia.

Nas condições experimentais deste trabalho, ambas albuminas apresentaram uma banda intensa e larga, centrada em 350 nm, quando excitada em 280 nm. A adição de alíquotas de solução do complexo de rutênio levou a uma diminuição da intensidade dessa banda, conforme ilustrado na Figura 2. Esta variação de intensidade é atribuída às mudanças conformacionais dos microambientes proteicos próximos aos resíduos de aminoácidos, em especial, aos fragmentos de triptofano.²⁷ Dessa maneira, podemos considerar que o complexo de rutênio atinge os subdomínios em que estão alojados os resíduos de triptofano. Para a HSA este subdomínio é o IIA, enquanto para a BSA pode ser o subdomínio IIA ou IB, pois ambos contêm resíduos de triptofano.²⁵

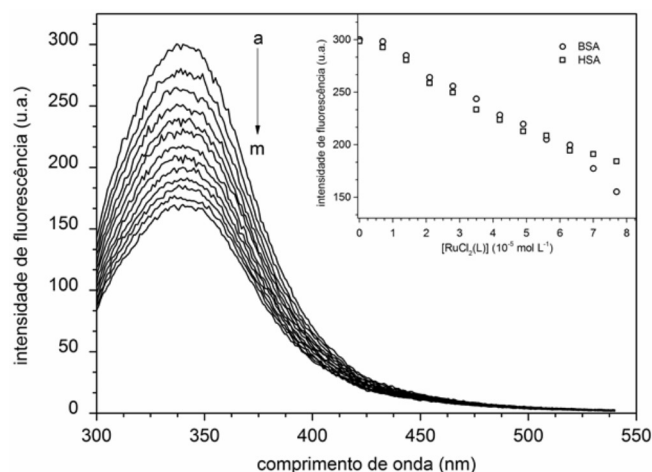


Figura 2. Espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença de $[RuCl_2(L)]$, em solução tampão Tris-HCl pH = 7,4; $\lambda_{exc.} = 280$ nm. Os espectros foram obtidos a partir da titulação de 3 mL de solução HSA $1,4 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} com adições de 30 a 230 μL da solução estoque do complexo $[RuCl_2(L)]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} , perfazendo as concentrações de $1,0 \times 10^{-5}$ a $7,7 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} em complexo (a \rightarrow m = 0 a $7,7 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}). Na parte superior da figura está representado o gráfico comparativo da supressão de fluorescência da BSA e HSA pelo complexo de rutênio

Mecanismo de supressão de fluorescência

Como a interação do complexo de rutênio com as albuminas resultou na supressão da fluorescência intrínseca das biomoléculas, fez-se necessário determinar por qual mecanismo esse processo aconteceu: mecanismo estático ou mecanismo dinâmico. Como mencionado anteriormente, no mecanismo estático ocorre a formação de um complexo não fluorescente entre a proteína e o derivado metálico no estado fundamental.³⁶ A estabilidade deste complexo intermediário é diminuída com o aumento da temperatura e, conseqüentemente, os valores de constantes de supressão (K_{sv}) diminuem com a elevação da temperatura.³⁶ No mecanismo dinâmico, a interação do complexo de

rutênio com a biomolécula ocorre durante o tempo de vida do estado excitado da biomolécula. Após a colisão do derivado metálico com a albumina excitada, a biomolécula retorna ao estado fundamental sem a emissão de fluorescência. O aumento da temperatura promove a diminuição da viscosidade do meio reacional favorecendo a difusão do supressor em direção ao fluoróforo no estado excitado.³⁶ Dessa forma, para o mecanismo dinâmico, o aumento da temperatura induz a um aumento das colisões entre o complexo de rutênio e a BSA (ou HSA) excitada e, como consequência, observa-se um aumento da constante de supressão (K_{sv}) com a elevação da temperatura.³⁶

Portanto, é possível inferir o mecanismo de atuação do complexo de rutênio no ambiente proteico pela análise da dependência da constante de supressão em função da temperatura. Assim, assumimos o tratamento matemático para a supressão de fluorescência, baseado na equação de Stern-Volmer (eq. 1).

Os gráficos de F_0/F em função da concentração do complexo para ambas albuminas, ilustrado na Figura 3, apresentaram perfis lineares e, a partir de regressões lineares, foram obtidos os valores de K_{sv} para os sistemas BSA/HSA – $[RuCl_2(L)]$ em diferentes temperaturas.

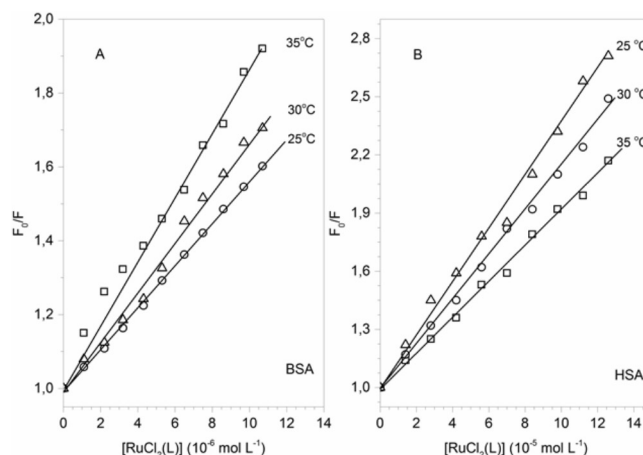


Figura 3. Gráficos de Stern-Volmer da interação de BSA (ou HSA) com complexo de rutênio, em solução tampão Tris-HCl pH = 7,4, em diferentes temperaturas, $\lambda_{exc.} = 280$ nm

Analisando a Figura 3A, para o sistema BSA- $[RuCl_2(L)]$, observamos que o aumento da temperatura resultou em aumento dos valores de K_{sv} , $\{5,72 \times 10^4$ mol $^{-1}$ L (25 °C), $6,84 \times 10^4$ mol $^{-1}$ L (30 °C) e $8,16 \times 10^4$ mol $^{-1}$ L (35 °C)} indicando que o processo de supressão ocorreu predominantemente via mecanismo dinâmico.

Para o sistema HSA- $[RuCl_2(L)]$, Figura 3B, verificamos que o aumento da temperatura resultou na diminuição dos valores de K_{sv} , $\{9,17 \times 10^3$ mol $^{-1}$ L (25 °C), $8,65 \times 10^3$ mol $^{-1}$ L (30 °C) e $8,06 \times 10^3$ mol $^{-1}$ L (35 °C)} indicando que a inserção do complexo de rutênio no arca-bouço proteico ocorreu predominantemente pelo mecanismo estático. Diante desse quadro, os dados dos espectros de fluorescência foram recalculados de acordo com a equação modificada de Stern-Volmer (eq. 2), visando a obtenção dos parâmetros f_a e K_a . Lembrando que f_a é a fração da fluorescência inicial que está acessível ao supressor (neste caso, o complexo de rutênio), e K_a é a constante de supressão de Stern-Volmer para a fração acessível ao supressor, usualmente empregada para tratamento de mecanismo estático de supressão.

Os gráficos de $F_0/\Delta F$ em função de $1/[RuCl_2(L)]$, Figura 4, também apresentaram perfis lineares e, a partir de regressões lineares, foram obtidos os valores de K_a $\{22,9 \times 10^3$ mol $^{-1}$ L (25 °C), $13,3 \times 10^3$ mol $^{-1}$ L (30 °C) e $11,4 \times 10^3$ mol $^{-1}$ L (35 °C)} que mantiveram a tendência de queda em função do aumento da temperatura, corroborando com o modelo estático para a supressão de fluorescência. O

valor médio de f_a foi de 0,90, indicando que aproximadamente 90% da fluorescência inicial está acessível ao complexo de rutênio.

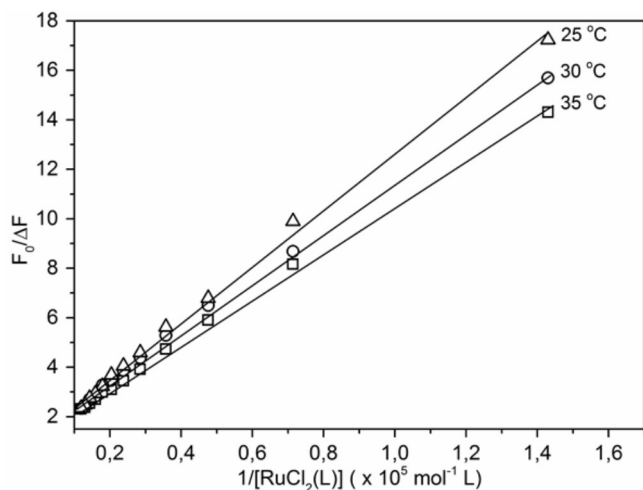


Figura 4. Gráficos de Stern-Volmer referentes ao modelo estático da interação de HSA com complexo de rutênio, em solução tampão Tris-HCl pH = 7,4, $\lambda_{exc.} = 280$ nm

A existência de dois tipos de mecanismos associados às interações do complexo de rutênio com as proteínas HSA e BSA pode ser justificada pela diferença de natureza química que há entre os potenciais sítios de ligação dessas biomoléculas e localização dos grupos fluoróforos nesses ambientes.²⁵

Como mencionado na parte introdutória desse artigo, existem dois principais locais de ligação nas albuminas séricas, localizados nos subdomínios IIA e IIIA. Esses microambientes se diferem em tamanho, flexibilidade, estereosseletividade e afinidade de ligação. O subdomínio IIA é maior, mais flexível e menos estereosseletivo quando comparado ao subdomínio IIIA. As forças intermoleculares que estabilizam as espécies exógenas no subdomínio IIA são predominantemente hidrofóbicas, enquanto no subdomínio IIIA coexistem forças hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e atração eletrostática. Além dessas duas regiões de ligação, a BSA apresenta o subdomínio IB, um microambiente localizado na periferia da proteína. Por estar na interface proteína – solução, o subdomínio IB é mais suscetível às alterações de constante dielétrica em relação à água, mudanças de pH, de estruturação do solvente, de força iônica, entre outros fatores. Quanto à presença de fluoróforos nessas regiões de ligação, o subdomínio IIA contém Trp-214 (ou Trp-212 para a BSA) e Tyr-263, o subdomínio IB tem Trp-134 (apenas na BSA), Tyr-138, Tyr-140, Tyr-148, Tyr-150 e Tyr-160, e o subdomínio IIIA apresenta os aminoácidos Tyr-401, Tyr-411 e Tyr-497.²⁵

A partir dessas informações e dos resultados de supressão de fluorescência dos fragmentos de triptofano inferimos que: *i*) a interação do complexo de rutênio com a BSA acontece preferencialmente no subdomínio IB, região mais externa da proteína que contém o Trp-134 e, conseqüentemente, mais acessível ao supressor. O aumento da temperatura diminui a viscosidade do meio, que favorece o aumento de colisões mútuas. Porém, por ser um microambiente exposto às alterações da interface proteica, as colisões não resultam na formação de um aduto BSA – [Ru] estável no estado fundamental, o que levaria à supressão estática. Por isso, a supressão de fluorescência da BSA é caracterizada por um processo de supressão colisional, também denominado supressão dinâmica. *ii*) a interação do complexo de rutênio com a HSA acontece no subdomínio IIA, única região que contém o fluoróforo Trp-214. Por ser uma região mais interna do arranjo proteico, o aumento da

temperatura contribui para a difusão do supressor pela biomolécula e, ao aproximar-se desse sítio de ligação com características hidrofóbicas, ocorre à formação de um intermediário HSA – [Ru] estável no estado fundamental. O aduto formado via interações $\pi - \pi$ do complexo imínico de rutênio e a proteína justifica o mecanismo de supressão estática.

Determinação da constante de associação e número de sítios de ligação

Uma vez definido o processo de supressão, fez-se necessário avaliar o grau de interação entre o composto de rutênio e as proteínas BSA e HSA. A afinidade de um derivado metálico com a albumina é um parâmetro muito relevante para o desenvolvimento de novos fármacos, e pode ser inferida pelos valores da constante de associação e pelo número de sítios ocupados pelo composto na estrutura proteica.^{25,27} Esses parâmetros podem ser obtidos pela equação mostrada a seguir (eq. 4):³⁶

$$\log\{(F_0 - F)/F\} = \log K_b + n \log [Q] \quad (4)$$

na qual K_b é a constante de associação, n é o número de sítios de ligação e $[Q]$ é a concentração do complexo de rutênio.

A partir dessa equação, foram construídos os gráficos de $\log\{(F_0 - F)/F\}$ em função do logaritmo da concentração do complexo, como representado na Figura 5 para os sistemas BSA – [RuCl₂(L)] e HSA – [RuCl₂(L)]. Nos dois sistemas, observamos um perfil linear para as diferentes temperaturas e, por meio dos valores dos coeficientes angular e linear obtidos pela inclinação da reta, foram determinados a constante de associação (K_b) e o número de sítios ligantes (n).

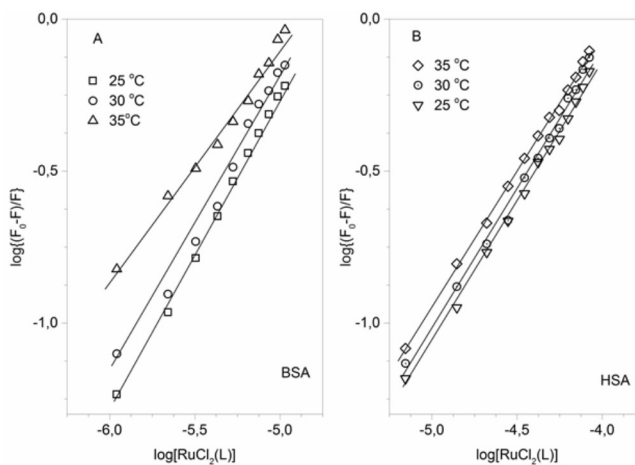


Figura 5. Gráficos de $\log\{(F_0 - F)/F\}$ versus $\log[RuCl_2(L)]$ em diferentes temperaturas

Em ambos os sistemas, o número de sítio ligante é aproximadamente 1, evidenciando, assim, que apenas uma molécula do complexo de rutênio está inserida nos arcabouços proteicos. Contudo, apesar da semelhança estrutural das albuminas bovina e humana, podemos observar comportamento divergente quanto à capacidade de retenção do complexo no interior da biomolécula.

Para o sistema BSA – [RuCl₂(L)], verificamos a diminuição da constante de associação (K_b) em função do aumento da temperatura { $10,1 \times 10^4$ mol⁻¹ L (25 °C), $6,69 \times 10^4$ mol⁻¹ L (30 °C) e $0,67 \times 10^4$ mol⁻¹ L (35 °C)}, o que revela uma redução da estabilidade do derivado formado entre a albumina bovina e o complexo de rutênio e, por conseguinte, abrevia o tempo de retenção do mesmo no interior da biomolécula.

Para o sistema HSA – [RuCl₂(L)], observamos tendência oposta, ou seja, o aumento da constante de associação com a elevação da temperatura do meio reacional {3,37 × 10³ mol⁻¹ L (25 °C), 5,61 × 10³ mol⁻¹ L (30 °C) e 7,14 × 10³ mol⁻¹ L (35 °C)}, que sugere um aumento da estabilidade do intermediário formado e, conseqüentemente, aumenta o tempo de retenção do derivado metálico no interior da proteína humana.²⁵

Essa diferença na tendência da constante de associação é conseqüência da localização do complexo nos sítios de ligação da BSA e HSA. Na BSA, o complexo está interagindo em uma região mais externa (subdomínio IB) e, portanto, mais suscetível à reestruturação do solvente na interface proteína – solução promovida pela variação da temperatura. Já na HSA o complexo de rutênio está inserido em uma cavidade mais interna (subdomínio IIA) e estabilizado por interações hidrofóbicas.^{25,27}

Determinação de parâmetros termodinâmicos

O estudo de fluorescência em diferentes temperaturas permite calcular os parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação do complexo de rutênio com as biomoléculas BSA e HSA. De acordo com Ross e Subramanian,³⁴ além de descrever a espontaneidade do processo a partir dos termos termodinâmicos, é possível inferir a natureza das ligações que determinam a inserção do complexo de rutênio no arcabouço proteico.

Os valores da variação da entalpia (ΔH) e da variação da entropia (ΔS) envolvidos na ligação entre as proteínas e o complexo de rutênio foram calculados utilizando a Equação de Van't Hoff,³⁴

$$\ln K_b = -(\Delta H/RT) + (\Delta S/R) \quad (5)$$

e a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) foi calculada utilizando a equação:

$$\Delta G = - RT \ln K_b \quad (6)$$

em ambas as equações, K_b é a constante de associação, $R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ e T é a temperatura em Kelvin.

Os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos estão apresentados na Tabela 1. Segundo a literatura, esses dados termodinâmicos indicam que a interação do complexo de rutênio com as albuminas é espontânea e que a sua inserção no arcabouço proteico é determinada por interações hidrofóbicas.

Tabela 1. Valores dos parâmetros termodinâmicos associados à interação do complexo de rutênio com BSA e HSA, em diferentes temperaturas

Sistema	Temperatura (°C)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)
Ru – BSA	25			-27,1
	30	26,8	181,5	-28,0
	35			-28,9
Ru – HSA	25			-20,1
	30	57,3	259,6	-21,6
	35			-22,8

A ligação do complexo de rutênio nas biomoléculas altera parcialmente as estruturas das proteínas e expõe fragmentos apolares do interior proteico para o solvente. Essa pequena mudança conformacional induz a reorganização das moléculas de solvente ao redor da proteína maximizando o efeito hidrofóbico, que é a tendência de espécies apolares a se agregarem em água com reconstrução da

estrutura original do solvente.⁵⁹⁻⁶¹ Dessa forma, o fator hidrofóbico passa a ser determinante na estabilização do sistema proteína – complexo de rutênio. Os parâmetros termodinâmicos também refletem as diferentes localizações do complexo nos sítios de ligação da BSA e HSA.

CONCLUSÃO

A inserção de complexo de rutênio no arcabouço proteico da BSA e HSA diminuiu significativamente a emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano de ambas biomoléculas. Apesar da similaridade estrutural, a supressão de fluorescência da BSA ocorreu via processo colisional ou dinâmico, enquanto para a HSA a supressão de fluorescência foi desencadeada por processo estático. A interação do complexo de rutênio com a BSA ocorreu preferencialmente no subdomínio IB da proteína, enquanto para a HSA a ligação aconteceu no sítio I de Sudlow e subdomínio IIA da biomolécula. Os parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG) indicaram que o processo foi espontâneo e o caráter das forças de ligação envolvidas foi hidrofóbico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Araucária/Paraná pelo suporte financeiro na execução do projeto do grupo.

REFERÊNCIAS

- Tiekink, E. R.; *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents – the use of metals in medicine*; Tiekink, E. R.; Gielen, M., eds.; John Wiley & Sons: Hoboken, 2005.
- Fontes, A. P. S.; Almeida, S. G.; Nader, L. A.; *Quim. Nova* **1997**, *20*, 398.
- Kostova, I.; *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discovery* **2006**, *1*, 1.
- Graf, N.; Lippard, S. J.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 993.
- Bani, D.; Bencini, A.; *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 4431.
- Ma, D-L.; He, H-Z.; Leung, K-H.; Chan, D. S.; Leung, C-H.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7666.
- Cutillas, N.; Yellol, G. S.; Haro, C.; Vicente, C.; Rodríguez, V.; Ruiz, J.; *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 2784.
- Novio, F.; Simmchen, J.; Vázquez-Mera, N.; Amorín-Ferré, L.; Ruiz-Molina, D.; *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 2839.
- Maldonado, C. R.; Salassa, L.; Gomez-Blanco, N.; Mareque-Rivas, J. C.; *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 2668.
- Clarke, M. J.; *Ruthenium and Other Non-Platinum Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*; Springer-Verlag: Heidelberg, Germany, 1989.
- Clarke, M. J.; Zhu, F.; Frasca, D.; *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2511.
- Clarke, M. J.; *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 69.
- Clarke, M. J.; *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *236*, 207.
- Brabec, V.; Nováková, O.; *Drug Resist. Updates* **2006**, *9*, 111.
- Barry, N. P. E.; Sadler, P. J.; *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3264.
- Bergamo, A.; Gaiddon, C.; Schellens, J. H. M.; Beijnen, J. H.; Sava, G.; *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *106*, 90.
- Joshi, T.; Pierroz, V.; Mari, C.; Gemperle, L.; Ferrari, S.; Gasser, G.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2960.
- Rowland, M.; Tozer, T. N.; *Clinical Pharmacokinetics – Concepts and Applications*, 3rd ed., Williams & Wilkins: Philadelphia, 1995.
- Almeida, A.; Oliveira, B. L.; Correia, J. D. G.; Soveral, G.; Casini, A.; *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 2689.
- Bal, W.; Sokolowska, M.; Kurowska, E.; Faller, P.; *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 5444.
- Wang, Z-M.; Ho, J. X.; Ruble, J. R.; Rose, J.; Rüker, F.; Ellenburg, M.; Murphy, R.; Click, J.; Soistman, E.; Wilkerson, L.; Carter, D. C.; *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 5356.

22. Muhammad, N.; Guo, Z.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 144.
23. Peters Jr, T.; Stewart, A. J.; *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 5351.
24. Sleep, D.; Cameron, J.; Evans, L. R.; *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 5526.
25. Peters Jr, T.; *All About Albumin; Biochemistry, Genetics and Medical Applications*, Academic Press: San Diego, 1995.
26. Chruszcz, M.; Mikolajczak, K.; Mank, N.; Majorek, K. A.; Porebski, P. J.; Minor, W.; *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 5375.
27. Naveenraj, S.; Anandan, S.; *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2013**, *14*, 53.
28. Carter, D. C.; He, X. M.; *Science* **1990**, *249*, 302
29. He, X. M.; Carter, D. C.; *Nature* **1992**, *358*, 209.
30. Carter, D.; Ho, J. X.; *Adv. Protein Chem.* **1994**, *45*, 153.
31. Galantini, L.; Leggio, C.; Konarev, P. V.; Pavel, N. V.; *Biophys. Chem.* **2010**, *147*, 111.
32. Kragh-Hansen, U.; *Pharmacol. Rev.* **1981**, *33*, 17.
33. Peters, T. J.; *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 161.
34. Ross, P. D.; Subramanian, S.; *Biochemistry* **1981**, *20*, 3096.
35. Eftink, M. R., Ross, J. B. A., Luck, L. A., Rousslang, K. W., Subramaniam, V., Stell D. G., Gafni, A.; *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Protein Fluorescence*; J. R. Lakowicz, ed.; Kluwer Academic Publishers, New York, **2000**, vol. 6, cap. 1 - 3.
36. Lakowicz, J. R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3^a ed., Springer Science, **2006**.
37. Cook, T. R.; Vajpayee, V.; Lee, M. H.; Stang, P. J.; Chi, K-W.; *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2464.
38. Fleischer, C. C.; Payne, C. K.; *Acc. Chem. Res.* (2014), doi:10.1021/ar500190q.
39. Sheng, F.; Wang, Y.; Zhao, X.; Tian, N.; Hu, H.; Li, P.; *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 6813.
40. Mu, Q.; Jiang, G.; Chen, L.; Zhou, H.; Fourches, D.; Tropsha, A.; Yan, B.; *Chem. Rev.* (2014), doi: 10.1021/cr400295a.
41. Liu, Q.; Wu, C.; Cai, H.; Hu, N.; Zhou, J.; Wang, P.; *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6423.
42. Yao, J.; Yang, M.; Duan, Y.; *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6130
43. Zhang, H-M.; Lou, K.; Cao, J.; Wang, Y-Q.; *Langmuir* **2014**, *30*, 5536.
44. Paul, B. K.; Ghosh, N.; Mukherjee, S.; *Langmuir* **2014**, *30*, 5921.
45. Tikhonova, T. N.; Shirshin, E. A.; Budylin, G. S.; Fadeev, V. V.; Petrova, G. P.; *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 6626.
46. Leung, A. H.; Jin, J.; Wang, S.; Lei, H.; Wong, W-T.; *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1112.
47. Huang, R.; Carney, R. P.; Ikuma, K.; Stellacci, F.; Lau, B. L. T.; *ACS Nano* **2014**, *8*, 5402.
48. Chow, M. J.; Licona, C.; Yuan, D.; Wong, Q.; Pastorin, G.; Gaiddon, C.; Ang, W. H.; *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6043.
49. Rilak, A.; Bratsos, I.; Zangrando, E.; Kljun, J.; Turel, I.; Bugarcic, Z. D.; Alessio, E.; *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 6113.
50. Cardoso, C. R.; Lima, M. V. S.; Cheleski, J.; Peterson, E. J.; Venâncio, T.; Farrell, N. P.; Carlos, R. M.; *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4906.
51. Klajner, M.; Fetzer, L. L.; Hebraud, P.; Mellitzer, G.; Pfeiffer, M.; Harlepp, S.; Gaiddon, C.; *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 5150.
52. Le Bideau, F.; Dagorne, S.; *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 7793.
53. Salas, P. F.; Herrmann, C.; Orvig, C.; *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 3450.
54. Hindi, K. M.; Panzner, M. J.; Tessier, C. A.; Cannon, C. L.; Youngs, W. J.; *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3859.
55. Morita, M.; Assumpção, R. M. V.; *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes*, 2^a ed., Blucher Editora: São Paulo, **2007**.
56. de Souza, V. R., Nunes, G. S., Rocha, R. C., Toma, H. E.; *Inorg. Chim. Acta* **2003**, *348*, 50.
57. Trynda-Lemiesz, L.; Karaczyn, A.; Keppler, B. K.; Koztowski, H.; *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *78*, 341.
58. Eftink, M. R., Ghiron, C. A.; *J. Phys. Chem.* **1976**, *80*, 486.
59. Hummer, G.; Garde, S.; García, A.E.; Paulaitis, M.E.; Pratt, L.R.; *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 10469.
60. Ruelle, P.; Kesselring U. W.; *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 987.
61. Blokzijl, W.; Engberts, J. B. F. N.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1545.