



ESTUDO COMPETITIVO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO SÍTIO DE INTERAÇÃO DE COMPLEXO DE RUTÊNIO EM SORO ALBUMINA.

Eduardo Malavazzi Rodrigues (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Vagner Roberto de Souza (Orientador), e-mail: vrsouza2@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas/Maringá, PR.

Ciências Exatas e da Terra - Química

Palavras-chave: proteína, fluorescência, bioinorgânica

Resumo:

A interação de complexo de rutênio com albumina na presença de íons metálicos foi monitorada pela supressão de fluorescência da proteína. A competição dos íons pelo sítio de ligação da albumina alterou a constante de ligação do aduto [Ru-HSA] e interferiu no tempo de retenção do complexo no interior da proteína.

Introdução

Na elaboração de agentes terapêuticos é importante estudar a interação desses derivados com biomoléculas, pois as biomoléculas presentes no plasma sanguíneo, como albumina, globulina e fibrinogênio, têm a capacidade de se ligarem aos complexos provocando sua inativação (STORR, 2014).

A absorção e a biodisponibilidade de um fármaco podem ser alteradas pela ligação da albumina a íons metálicos envolvidos em processos metabólicos que regulam as transferências de elétrons, a oxidação de aminoácidos e a formação de espécies reativas de oxigênio. A competição entre fármacos e íons metálicos pelos locais de ligação na estrutura proteica tem sido alvo de estudos por haver significativa correlação entre a farmacocinética do medicamento e mudanças conformacionais da proteína induzidas pela coordenação de íons metálicos (ROSENBAUM, 2011).

A potencial ação farmacológica de complexos de rutênio nos motivou a estudar a interação do complexo $[Ru(bpydip)Cl_2]$ ($bpydip = N,N$ -bis(7-metil-2-piridilmetileno)-1,3-diminopropano com a albumina do soro humano (HSA), Figura 1, (MOTSWAINYANA, 2015). O processo de inserção do complexo





de rutênio no arcabouço proteico foi monitorado pela supressão de fluorescência da albumina. A influência dos íons Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} na estabilidade da ligação HSA-complexo de rutênio também foi analisada a partir dos espectros de supressão.

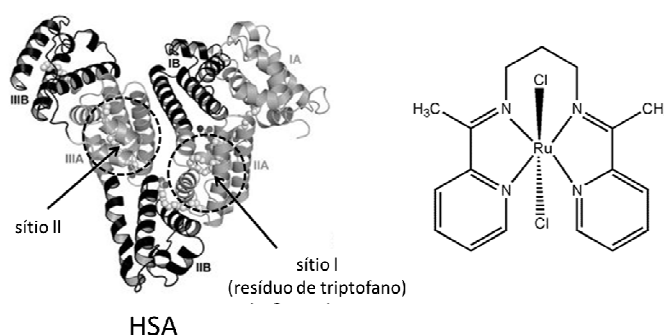


Figura 1 – Representação da albumina (HSA) e do complexo de rutênio

Materiais e Métodos

Supressão de fluorescência: Os espectros foram obtidos em um espectrofluorímetro da Varian, modelo Cary Eclipse, com compartimento de amostra com banho termostatzado, 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 entre 300 e 550 nm.

Influência de íons metálicos: Para a obtenção dos espectros, alíquotas de 3 a 30 μL da solução de $[Ru(bpydip)Cl_2]$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionadas em 3 mL de solução de HSA, pH 7,4, ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) contendo os respectivos sais metálicos $\{Zn(CH_3COO)_2, Ni(CH_3COO)_2, Mg(NO_3)_2, Co(CH_3COO)_2, Ca(NO_3)_2 \text{ ou } CuCl_2\}$ na concentração $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Resultados e Discussão

Dos 585 aminoácidos que compõem a estrutura primária da albumina, a emissão do triptofano, que ocorre em 350 nm quando a biomolécula é excitada na região de 280 nm, é a mais significativa (LAKOWICZ, 2006). A adição do complexo de rutênio diminuiu a intensidade dessa banda.





A partir dessa supressão é possível inferir que o complexo de rutênio atinge a microrregião em que está alojado o resíduo de triptofano que, nesse caso, é a interface dos subdomínios IB e IIA da cadeia proteica. A abordagem matemática de Stern-Volmer para o processo de supressão de proteína permite determinar a constante de ligação (K_b), o número de sítios de ligação (n) e os parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG) da interação do complexo com a albumina e correlacioná-los com os diferentes tipos de forças intermoleculares envolvidos na inclusão do complexo na cavidade proteica, Tabela 1, (LAKOWICZ, 2006).

Tabela 1 – Valores de constante de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos.

T (°C)	K_b ($10^4 \text{ mol}^{-1}\text{L}$)	n	ΔH (kJ mol^{-1})	ΔS ($\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$)	ΔG (kJ mol^{-1})
25	3,10	0,97	20,1	149	-24,2
30	5,80	0,95			-25,0
35	7,90	1,05			-25,8

Nesse caso, há um aumento dos valores de K_b com o aumento da temperatura. Essa tendência pode ser justificada pela diminuição do coeficiente de difusão promovida pela elevação da temperatura e, como consequência, há um aumento da estabilidade do complexo formado HSA – Ru, ou seja, aumenta o tempo de retenção do mesmo no interior da biomolécula. Considerando a magnitude e o sinal dos parâmetros termodinâmicos é possível inferir que a formação do aduto $[\text{Ru}(\text{bpydip})\text{Cl}_2]$ - HSA é espontânea e determinada por interações hidrofóbicas.

A presença de alguns cátions alterou significativamente a estabilidade da ligação da proteína com o complexo de rutênio (Tabela 2). O aumento do valor de K_b acarreta no aumento do tempo de retenção do complexo de rutênio no interior da proteína. Além disso, variação de K_b nessa série iônica indica que íons Zn^{2+} e Mg^{2+} não competem com o $[\text{Ru}(\text{bpydip})\text{Cl}_2]$ pelo mesmo sítio de ligação da proteína, pois se isso acontecesse haveria uma diminuição desses valores, como observado para os demais íons, principalmente Cu^{2+} . Neste caso, os íons metálicos, em especial o cátion Cu^{2+} , além de competirem pela mesma região proteica, estão reagindo com a proteína formando um intermediário M^{2+} - HSA, que aumenta o tempo de armazenamento do complexo na biomolécula.





Tabela 2. Valores de constante de ligação associados à interação do complexo com HSA na presença de diferentes íons metálicos a 30 °C

Sistema	$K_b \text{ (x } 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{L)}$	Sistema	$K_b \text{ (x } 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{L)}$
HSA + [Ru] + Zn^{2+}	5,50	HSA + [Ru] + Ni^{2+}	0,13
HSA + [Ru] + Mg^{2+}	6,05	HSA + [Ru] + Ca^{2+}	0,25
HSA + [Ru] + Co^{2+}	0,17	HSA + [Ru] + Cu^{2+}	0,023

Conclusões

A interação do complexo $[\text{Ru}(\text{bpydip})\text{Cl}_2]$ com HSA ocorreu na interface dos subdomínios IB e 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. A presença de íons metálicos interferiu significativamente no tempo de retenção do complexo no interior da proteína.

Agradecimentos

PIBIC / CNPQ / Fundação Araucária / UEM

Referências

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

MOTSWAINYANA, W. M.; AJIBADE, P. A. Anticancer Activities of Mononuclear Ruthenium(II) Coordination Complexes. **Advances in Chemistry**, London, v. 2015, n. 1, p. 1-21, 2015.

ROSENBAUM, S. E. **Basic Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: An Integrated Textbook and Computer Simulations**. 1 ed. New York:Wiley, 2011.

STORR, T. **Ligand Design in Medicinal Inorganic Chemistry**. 1 ed. New York Wiley, 2014.

