

AFINIDADE DO COMPLEXO $[Ru(DMSO)_4(MBPY)]Cl_2$ POR DIFERENTES SÍTIOS DE LIGAÇÃO DA SORO ALBUMINA FRENTE ÀS MOLÉCULAS BIOATIVAS IBUPROFENO, CAFEÍNA E ÁCIDO SALICÍLICO

Eduardo Malavazzi Rodrigues (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Vagner Roberto de Souza (Orientador), e-mail: edumalrod@hotmail.com

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

Ciências Exatas e da Terra - Química

Palavras-chave: proteína, fluorescência, competição

Resumo:

A síntese de um complexo com potencial ação farmacológica é a primeira etapa de um longo processo laboratorial. Nos ensaios pré-clínicos é necessário descobrir como direcionar o complexo para um local específico do organismo e como as barreiras naturais do organismo podem interagir com o complexo. A potencial ação farmacológica dos derivados de rutênio nos motivou a estudar a interação do complexo $[Ru(DMSO)_4(mbpY)]Cl_2$ (DMSO = dimetilsulfóxido; mbpy = 2,6-dimetilbipiridina) com albumina do soro humano e avaliar a afinidade do complexo por diferentes sítios de ligação da biomolécula frente às espécies bioativas ibuprofeno, cafeína e ácido salicílico. Os processos de inserção do complexo de rutênio, bem como das espécies bioativas, no arcabouço proteico foram monitorados pela supressão de fluorescência da albumina. Os parâmetros associados à supressão de fluorescência da albumina permitiram inferir a possível região de ligação do derivado metálico na soro-proteína.

Introdução

A síntese de um complexo com potencial ação farmacológica é a primeira etapa de um longo processo laboratorial. Nos ensaios pré-clínicos é necessário descobrir como direcionar o complexo para um local específico do organismo e como as barreiras naturais do organismo podem interagir com o complexo (WILKES, 2016). Por isso, na elaboração de agentes terapêuticos é importante estudar a interação desses derivados com biomoléculas, pois as biomoléculas presentes no plasma sanguíneo têm a capacidade de se ligarem aos complexos provocando sua inativação (WILKES, 2016).

Das biomoléculas plasmáticas, albumina e globulinas são encarregadas pelo armazenamento e transporte de íons, metabólitos e nutrientes, como glicose, gorduras, vitaminas e aminoácidos pela corrente

sanguínea até os tecidos do corpo humano (NAVEEN, 2016). Em organismos saudáveis, a concentração de albumina no sangue está entre 3,5 e 4,5 g/100 mL, que corresponde a aproximadamente 60% das proteínas plasmáticas, enquanto os teores de globulinas são 4% de globulina- α_1 , 8% de globulina- α_2 , 12% de globulina- β e 16% de globulina- γ (ROSENBAUM, 2011). Por ser a proteína mais abundante no sangue e corresponsável pela difusão de fármacos para os diferentes tipos de tecidos do corpo humano, a interação dos derivados metálicos com albumina tem sido um ponto central na pesquisa científica bioinorgânica, ressaltando a sua relevância como biomolécula sinalizadora para a atuação de fármacos (NAVEEN, 2016).

A potencial ação farmacológica dos derivados de rutênio nos motivou a estudar a interação do complexo $[\text{Ru}(\text{DMSO})_4(\text{mbpy})]\text{Cl}_2$ (DMSO = dimetilsulfóxido; mbpy = 2,6-dimetilbipiridina) com a albumina do soro humano (HSA), cujo processo de inserção do complexo de rutênio no arcabouço proteico foi monitorado pela supressão de fluorescência da albumina (STROHFELDT, 2015). Os parâmetros associados à supressão de fluorescência da albumina permitiram inferir as possíveis regiões de ligação do derivado metálico na soro-proteína. Também foi avaliada a afinidade do complexo por diferentes sítios de ligação da HSA frente às moléculas bioativas ibuprofeno, cafeína e ácido salicílico, pois a compreensão do mecanismo de substituição de espécies no arcabouço proteico permite entender e controlar a ação terapêutica dos fármacos no organismo humano.

Materiais e métodos

Supressão de fluorescência: Os espectros foram obtidos em um espectrofluorímetro da Varian, modelo Cary Eclipse, com compartimento de amostra com banho termostaticado, 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 moléculas bioativas: Para a obtenção dos espectros, alíquotas de 3 a 30 μL da solução do complexo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionadas em 3 mL de solução de HSA, pH 7,4, ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) contendo as respectivas moléculas sondas ibuprofeno, cafeína e ácido salicílico 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 foi possível inferir que o complexo de rutênio atingiu a microrregião em que está alojado o resíduo de triptofano. Usando a abordagem matemática de Stern-Volmer para o processo de supressão de

proteína foi determinada 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 (Tabela 1). Nesse caso, considerando a magnitude e o sinal dos parâmetros termodinâmicos foi possível inferir que a formação do aduto [complexo de rutênio-HSA] foi espontânea e determinada por interações hidrofóbicas (LAKOWICZ, 2006).

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

T (°C)	K_b ($10^5 \text{ mol}^{-1}\text{L}$)	n	ΔH (kJ mol^{-1})	ΔS ($\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$)	ΔG (kJ mol^{-1})
20	1,4	1,1	18	135	-22,7
25	1,0	0,9			-24,4
37	0,8	1,3			-26,5

Para o estudo de localização do complexo no interior da proteína foram utilizados como marcadores de sítio proteico a cafeína, o ibuprofeno e o ácido salicílico. O primeiro possui uma interação característica com a HSA em duas regiões distintas, uma mais próxima a cavidade localizada no centro da molécula de proteína, no interior do subdomínio IIA e outro no limite entre os subdomínios IIA e IIB. O ibuprofeno liga-se no subdomínio IIIA quase que exclusivamente nas condições experimentais utilizadas. Já o ácido salicílico se liga próximo ao resíduo de triptofano no subdomínio IIA com forte intensidade (ROSENBAUM, 2011). O efeito da competição entre os marcadores de sítio da HSA e o complexo pode ser avaliado pela variação da constante de ligação do complexo à HSA na temperatura de 37 °C (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de constante de ligação (K_b) do complexo à HSA obtidos na presença de moléculas sondas a 37 °C.

	Complexo + HSA + ibuprofeno	Complexo + HSA + cafeína	Complexo + HSA + ácido salicílico
K_b ($\times 10^5 \text{ mol}^{-1}\text{L}$)	0,035	0,68	0,47

Na condição experimental o valor de constante diminui em todas as situações se comparado aquele quando o complexo é a única substância a se ligar à albumina, indicando que a ligação da molécula é sentida por toda a proteína. No entanto, o valor de constante verificado na presença de ibuprofeno demonstra uma competição maior entre este marcador e o complexo de rutênio estudado. Desta forma se pode propor que a ligação do complexo metálico se dá na região do subdomínio IIIA da proteína, mas causa alterações em toda a estrutura proteica.

Conclusões

De acordo com os parâmetros obtidos, a interação do complexo de rutênio com a HSA ocorreu espontaneamente direcionada por forças hidrofóbicas. O uso de moléculas marcadoras de sítios proteicos permitiu inferir que o complexo de rutênio ligou preferencialmente na microrregião do subdomínio IIIA. Esse conjunto de dados é importante para o desenvolvimento de novos fármacos, pois o aduto formado entre a proteína e o complexo funciona como um reservatório temporário no plasma sanguíneo retardando a chegada do complexo aos sítios alvos

Agradecimentos

PIBIC / CNPQ / Fundação Araucária / UEM

Referências

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

NAVEEN, R., AKSHATA, K., PIMPLE, S., CHAUDHARI, P. A review on albumin as drug carrier in treating different diseases and disorders. **Der Pharmacia Sinica**, Maharashtra, v. 7, n. 1, p. 11 -15, 2016.

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

STROHFELDT, K. A. **Essentials of inorganic chemistry: for students of pharmacy, pharmaceutical sciences and medicinal chemistry**. 1 ed. Londres: Wiley, 2015

WILKES, G. M., BARTON-BURKE, M. **Oncology nursing drug handbook**. 1 ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning, 2016.