## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

RUTE NAZARÉ FERNANDES SANCHES

# Estudo da interação de metalofármacos de dirutênio-anti-inflamatórios com as proteínas séricas transferrina e albumina

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890 O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data de depósito na SPG: **26/02/2016** 

# RUTE NAZARÉ FERNANDES SANCHES

i

# Estudo da interação de metalofármacos de dirutênio-anti-inflamatórios com as proteínas séricas transferrina e albumina

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Química)

Orientadora: Profa. Dra. Denise de Oliveira Silva

São Paulo

Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Sanches, Rute Nazaré Fernandes

S211e Estudo da interação de metalofármacos de dirutênio-antiinflamatórios com as proteínas séricas transferrina e albumina / Rute Nazaré Fernandes Sanches. -- São Paulo, 2016. 196p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental. Orientador: de Oliveira Silva, Denise

1. Química bioinorgânica 2. Rutênio : Compostos de coordenação 3. Antiinflamatório 4. Síntese inorgânica 5. Proteínas I. T. II. de Oliveira Silva, Denise, orientador.

546.3 CDD



## "Estudo da interação de metalofármacos de dirutênio-anti-inflamatórios com as proteínas séricas transferrina e albumina"

## **RUTE NAZARÉ FERNANDES SANCHES**

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências no Programa de Química.

Aprovado(a) por:

Profa. Dra. Denise de Oliveira Silva (Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. Breno Pannia Esposito IQ - USP

Prof. Dr. Gianluca Camillo Azzellini IQ - USP

Profa. Dra. Anamaria Dias Pereira Alexiou UPM

Prof. Dr. Rodrigo Luis da Silva Ribeiro dos Santos UESC

> SÃO PAULO 26 de abril de 2016

A Deus e à minha família. Samuel e Miguel, meus pais e irmãs.

#### AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Prof. Dra. Denise de Oliveira Silva, minha orientadora, que me recebeu tão bem no grupo, e que dedicou tanto do seu tempo e atenção, e que foi mais que orientadora. Pela compreensão, pela confiança, pelo incentivo, por acreditar no meu potencial, e por contribuir enormemente para o meu desenvolvimento profissional e pessoal. Muito obrigada.

Aos professores Prof. Dra. Alison Colqhoun, Prof. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira, Prof. Dr. Breno Pannia Espósito, Prof. Dra. Cristiane Guzzo, Prof. Dr. Erick Leite Bastos, Prof. Dr. Henrique Eisi Toma, Prof. Dr. Hermi Felinto de Brito, Prof. Dr. Koiti Araki e Prof. Dra. Vera Regina Leopoldo Constatino, que cederam gentilmente seus laboratórios e equipamentos para o desenvolvimento desta tese, além de toda a contribuição científica.

Aos funcionários da Central Analítica, Alessandra de C. Ramalho, Giovana C. de Freitas Lemeszenksi, Luzia Emiko Narimatsu, Marcio Nardelli Wandermuren, Michele Rocha e Rebeca Yatsuzuka, por todas as análises realizadas. Aos técnicos de laboratório Ricardo, Cida e Armando, por todo o apoio técnico ao longo desses anos.

A todos os amigos de grupo com quem tive a oportunidade de trabalhar, Rodrigo, Douglas, Iguatinã, João Henrique, Andrea, Luís, Hanif, Samara, Julie, Jeferson, Antônio, Carolina, Ana Carolina, Marcus Vinicius e Lucas, e amigos de outros grupos, Marina, Ana Paula, Maiara e Tatiana, por toda a ajuda, amizade, contribuição científica, tempo gasto em treinamentos ou por apenas me ouvirem quando tudo dava errado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da pesquisa do grupo.

Aos meus pais (Plínio e Terezinha) e irmãs (Ana Paula e Sara), por me ajudarem de tal forma que este trabalho não teria sido concluído sem vocês. Por todo o tempo e apoio, pelo carinho, cuidado e dedicação com minha família, obrigada. Vocês foram essenciais.

Aos meus sogros (Zeli e Francisco) e cunhadas (Viviane e Lucilene), por cuidarem com tanto carinho do meu pequeno tesouro.

Ao meu esposo Samuel e meu filho Miguel, que chegou já na reta final do Doutorado, obrigada pela paciência, amor, compreensão, incentivo, cuidado e apoio em todos os momentos. Faço tudo por vocês.

E por fim agradeço a Deus, que colocou as pessoas certas em minha vida nos momentos certos, por ter me dado a oportunidade de realizar o Doutorado, e me chamado para ser cientista. Muito obrigada.

"A glória de Deus é ocultar certas coisas; tentar descobri-las é a glória dos reis."

Rei Salomão, em Provérbios 25:2

#### RESUMO

SANCHES, R. N. F. Estudo da interação de metalofármacos de dirutênio-anti-inflamatórios com as proteínas séricas transferrina e albumina. 2016. (196p). Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Metalofármacos baseados em rutênio têm se mostrado promissores com relação à atividade anticancerígena frente a diversos tipos de tumores. Nosso grupo de pesquisa dedica-se ao estudo de compostos contendo o centro dimetálico de valência mista Ru<sub>2</sub>(II,III) coordenado a ligantes derivados de Faines (Fármacos anti-inflamatórios não esteroides), tendo demostrando o potencial desses complexos frente a glioma. O entendimento do modo de ação destes complexos requer o estudo de suas interações com biomoléculas presentes no meio biológico. Neste cenário, o presente trabalho teve por objetivo investigar a interação de três complexos de dirutênio-Faines, ou RuFaines, [Ru<sub>2</sub>(ibp)<sub>4</sub>CI], [Ru<sub>2</sub>(ceto)<sub>4</sub>CI] e [Ru<sub>2</sub>(npx)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (ibp = ibuprofenato, ceto = cetoprofenato e npx = naproxenato), e também do precursor [Ru<sub>2</sub>(O<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>CI], RuAc, com as principais proteínas presentes no soro humano, transferrina e albumina.

Os complexos foram sintetizados e caracterizados conforme metodologias desenvolvidas no grupo. A interação destes complexos com a transferrina, em suas formas apo e holo, e com a albumina foi avaliada por técnicas como espectroscopia eletrônica, dicroísmo circular, fluorescência, e realizaram-se estudos de ultrafiltração com análise do aduto formado por ICP-OES e espectrometria de massas. Além disso, fez-se um estudo de captação celular dos complexos RuFaines por células de glioma humano da linhagem U-87.

Os resultados demonstraram que os complexos de dirutênio-Faines interagem com ambas as proteínas séricas (transferrina (apo e holo) e albumina), de modo semelhante, mas que é distinto daquele observado para o complexo RuAc. A presença de íons Fe(III) nos sítios específicos da transferrina não afetou a interação dos complexos RuFaines, enquanto que um comportamento diferente foi observado para o RuAc. Verificou-se que todas as proteínas avaliadas (albumina, apo-transferrina e holo-transferrina) apresentam capacidades similares de retenção dos complexos (~ 70% da quantidade de Ru adicionada inicialmente), independentemente da natureza do ligante carboxilato coordenado. Estudos de captação celular mostraram que a interação dos complexos RuFaines com a transferrina não contribuiu para modificar a capacidade de entrada desses complexos na célula, em comparação com os metalofármacos livres. Em alguns casos, inclusive, a formação de aduto com a apo-transferrina teve um efeito contrário, diminuindo a captação de rutênio. Dessa forma, concluiu-se que o ciclo da transferrina provavelmente não é a principal rota de entrada nas células para os complexos estudados.

**Palavras-chave:** rutênio, anti-inflamatórios não esteroides, metalofármaco, albumina, transferrina, captação celular, glioma.

#### ABSTRACT

SANCHES, R. N. F. **Study on the interaction of diruthenium-antiinflamatory metallodrugs with albumin and transferrin serum proteins**. 2016. (196p). PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Ruthenium metallodrugs have shown promising antitumor activity against to several tumor types. Our research group is dedicated to study compounds containing the mixed-valence Ru<sub>2</sub>(II,III) dimetallic center coordinated to NSAIDs (nonsteroidal anti-inflammatory drugs) derived ligands, and have demonstrated the potential of these complexes against glioma. The understanding of the mode of action of these complexes requires the study of their interactions with biomolecules present in biological environment. In this scenario, the present work aimed to investigate the interaction of three complexes of diruthenium-NSAIDs, or RuNSAIDs, [Ru<sub>2</sub>(ibp)<sub>4</sub>Cl], [Ru<sub>2</sub>(ceto)<sub>4</sub>Cl] and [Ru<sub>2</sub>(npx)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (ibp = ibuprofenate, ceto = ketoprofenate, npx = naproxenate), and also of the precursor [Ru<sub>2</sub>(O<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Cl], RuAc, with the major proteins present in the human serum, transferrin and albumin.

The complexes were synthesized and characterized according to methods developed in our group. The interaction of these complexes with transferrin, in the two forms apo and holo, and with albumin was evaluated by techniques as electronic spectroscopy, circular dichroism, fluorescence, and ultrafiltration studies accompanied by analysis of adducts by ICP-OES and mass spectrometry. Moreover, cellular uptake studies of the RuNSAIDs complexes by U-87 human glioma cells line were performed.

The results demonstrated that the diruthenium-NSAIDs complexes interact with both proteins (transferrin (apo and holo) and albumin), in a similar way, but that is distinct of that observed for the RuAc complex. The presence of Fe(III) ions in transferrin specific binding

sites did not affect the interaction of the RuNSAID complexes with the protein, while a different behavior was shown by RuAc. All the proteins studied here (albumin, apotransferrin and holo-transferrin) showed similar capabilities for retention of the complexes (~ 70 % of the initial amount of Ru added), independently of the nature of the coordinated carboxylate ligand. Cellular uptake studies showed that the interaction of the RuNSAIDs complexes with transferrin did not contribute to modify the internalization capacity of these complexes, in comparison with the free metallodrugs. In some cases, the adduct formation with apo-transferrin showed an opposite effect, leading to the decrease of ruthenium uptake. The findings led to the conclusion that transferrin cycle probably is not the main entry way to the cells for the studied complexes.

**Keywords:** ruthenium, nonsteroidal anti-inflammatory drug, metallodrugs, albumin, transferrin, cellular uptake, glioma.

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

apoTf	Apo-transferrina
Asn, N	Aminoácido asparagina
Asp, D	Aminoácido aspartato
Aspy	Ânion derivado do fármaco ácido acetilsalicílico
CD	Dicroísmo circular
Cet	Ânion derivado do fármaco cetoprofeno
Cis-Pt	Cisplatina, cis-[PtCl <sub>2</sub> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] (cis-diamindicloridoplatina(II))
Cys, C	Aminoácido cisteína
Dicl	Ânion derivado do fármaco diclofenaco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTAF	5-(4,6-diclorotriazinil) aminofluoresceína)
FAINE	Fármaco anti-inflamatório não esteroide
Feno	Ânion derivado do fármaco fenoprofeno
FI	Fluoresceína
Fl-aTf	Apo-transferrina marcada com o fluoróforo DTAF
FTIR	Espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de Fourier
GBM	Glioblastoma
Gly, G	Aminoácido glicina
HCC	Ânion derivado do ácido $lpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico
HCCA	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico
Hcet	Fármaco cetoprofeno
Hibp	Fármaco ibuprofeno
His, H	Aminoácido histidina
Hmelox	Ânion derivado do fármaco meloxicam
Hnpx	Fármaco naproxeno
HSA	Albumina sérica humana
{HSA-varf}	Aduto da albumina com a varfarina, na razão molar de 1:1
hTf	Holo-transferrina
lbp	Ânion derivado do fármaco ibuprofeno
ICP-OES	Espetrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

Im	Imidazol
Ind	Indazol
Lys, L	Aminoácido lisina
MALDI-MS	Espectrometria de massas com ionização por dessorção a laser auxiliada por
	matriz
Npx	Ânion derivado do fármaco naproxeno
rTf	Receptor da transferrina
Ru <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> CR	Designação genérica para os tetracarboxilatos de dirutênio(II,III) avaliados
	neste trabalho: RuAc, Ruibp, Ruceto e Runpx
RuAc	Tetraquis(acetato)cloridodirutênio (II,III), [Ru <sub>2</sub> (µ-O <sub>2</sub> CCH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Cl]
RuAc-aquo	Tetraquis(acetato)diaquodirutênio(II,III), $[Ru_2(\mu-O_2CCH_3)_4(H_2O)_2]^+$
Ruasp	Tetraquis(aspirinato)cloridodirutênio(II,III), [Ru <sub>2</sub> (asp) <sub>4</sub> Cl]
Ruceto	Tetraquis(cetoprofenato)cloridodirutênio(II,III), [Ru <sub>2</sub> (cet) <sub>4</sub> Cl]
RuFaine(s)	Designação genérica para os complexos de dirutênio com ligantes derivados
	dos fármacos Hibp, Hcet e Hnpx - Ruibp, Ruceto e Runpx.
Ruibp	Cloridotetraquis(ibuprofenato)dirutênio(II,III), [Ru <sub>2</sub> Cl(ibp) <sub>4</sub> ]
Ruind	Hexafluorofosfato de diaquocloridotetraquis(indometacinato)dirutênio(II,III),
	$[Ru_2(H_2O)_2(ind)_4]PF_6$
Runpx	Hexafluorofosfato de diaquocloridotetraquis(naproxenato)dirutênio(II,III),
	[Ru <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (npx) <sub>4</sub> ]PF <sub>6</sub>
S	Molécula de solvente
SA	Ácido sinapínico
Ser, S	Aminoácido serina
Sulin	Ânion derivado do fármaco sulindaco
Tf	Transferrina, referindo-se tanto à apo quanto à holo
Thr <i>,</i> T	Aminoácido treonina
Trp <i>,</i> W	Aminoácido triptofano
Tyr, Y	Aminoácido tirosina
UV-Vis	Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Visível
Varf	Varfarina

## SUMÁRIO

1.	INTRO	DUÇÃO	16
	1.1. Co	omplexos metálicos em Química Medicinal	16
	1.2. Co	omplexos dimetálicos de Rutênio	18
	1.3. In	teração dos metalofármacos com o meio biológico	25
	1.3.1.	Albumina	26
	1.3.2.	Transferrina	29
	1.3.2.1	Características estruturais	30
	1.3.2.2	. Funções biológicas	33
	1.3.2.3	Ciclo da transferrina	34
	1.3.2.4	Ciclo da transferrina para entrega direcionada do fármaco	36
	1.3.3.	Interação dos metalofármacos de rutênio com alvos biológicos	
2.	OBJET	IVOS	42
3.	PROCE	DIMENTOS EXPERIMENTAIS	43
	3.1. Re	eagentes e solventes	43
	3.2. Té	cnicas aplicadas	44
	3.2.1.	Análise elementar	44
	3.2.2.	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido (ICP-OES)	44
	3.2.3.	Espectroscopia eletrônica	45
	3.2.4.	Espectroscopia vibracional no infravermelho	45
	3.2.5.	Espectroscopia de dicroísmo circular	45
	3.2.6.	Susceptibilidade magnética	46
	3.2.7.	Espectroscopia de fluorescência	48
	3.2.8.	Espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS)	49
	3.3. Síi	ntese dos tetracarboxilatos de dirutênio(II,III)	49

3	.4. Estu	udos com Transferrina (apo e holo)50
	3.4.1.	Espectroscopia eletrônica50
	3.4.1.1.	Estudos cinéticos50
	3.4.1.2.	Cálculos das constantes de ligação52
	3.4.2.	Espectroscopia de dicroísmo circular53
	3.4.3.	Espectroscopia de fluorescência55
	3.4.3.1.	Fluorescência intrínseca55
	3.4.3.2. diclorot	apoTf marcada com a sonda fluorescente DTAF (5-(4,6- riazinil)aminofluoresceína))56
	3.4.4.	Ultrafiltração e análise por MALDI-MS e ICP-OES58
	3.4.5.	Captação celular59
3	.5. Estu	udos com Albumina63
	3.5.1.	Espectroscopia de Fluorescência64
	3.5.1.1.	Fluorescência intrínseca64
	3.5.1.2. da HSA	Estudos competitivos entre os complexos Ru <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> CR e varfarina pelo sítio I 65
	3.5.2.	Ultrafiltração e análise por MALDI-MS e ICP-OES67
4.	RESULT	ADOS E DISCUSSÃO68
4	.1. Car	acterização dos complexos68
4	.2. Estu	udos com transferrina (apo e holo)72
	4.2.1.	Espectroscopia eletrônica72
	4.2.1.1.	Cinética72
	4.2.1.2.	Constantes de ligação85
	4.2.2.	Espectroscopia de dicroísmo circular103
	4.2.3.	Espectroscopia de Fluorescência110
	4.2.3.1.	Fluorescência intrínseca110
	4.2.3.2.	apoTf marcada com a sonda fluorescente DTAF130

	4.2.4.	Ultrafiltração134	4
	4.2.5.	Captação celular14	6
4	.3. Estu	udos com HSA15	1
	4.3.1.	Espectroscopia de Fluorescência152	2
	4.3.1.1.	Fluorescência intrínseca152	2
	4.3.1.2. da HSA	Estudos competitivos entre os complexos Ru <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> CR e varfarina pelo sítio  163	
	4.3.2.	Ultrafiltração e análise por MALDI-MS e ICP16	8
5.	CONSID	ERAÇÕES FINAIS170	6
6.	REFERÊN	NCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
ANEXO – SÚMULA CURRICULAR			

#### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. Complexos metálicos em Química Medicinal

A utilização de complexos metálicos para o tratamento e diagnóstico de doenças se tornou um campo de pesquisa em constante crescimento desde o advento da cisplatina. Embora metais sejam utilizados com fins medicinais desde os tempos mais remotos, a descoberta da propriedade de inibição celular do complexo *cis*-diamindicloridoplatina(II) sobre *E. coli*, e o sucesso de sua aplicação como agente antitumoral foi o grande marco no desenvolvimento da pesquisa relacionada à Química Inorgânica Medicinal [1], [2].

Atualmente, diversos complexos metálicos têm sido utilizados para o tratamento e diagnóstico de doenças, além de haver extensiva pesquisa sobre este tema. Em uso clínico, por exemplo, têm-se os compostos de platina (cisplatina, oxaliplatina, carboplatina, nedaplatina, entre outros), que são utilizados no tratamento de alguns tipos de tumores; compostos de ouro (auranofina, [Au(I)tiomalato]) são utilizados para o tratamento de artrite reumatoide; compostos de gadolínio e tecnécio são usados para o diagnóstico por imagem e tecnécio é usado como radiofármaco [1], [3]–[5]. Em relação à pesquisa, são inúmeros os trabalhos que têm por objetivo o desenvolvimento de novos complexos metálicos para o tratamento e diagnóstico de doenças, com propriedades melhoradas em relação aos fármacos ou metalofármacos em uso clínico [6].

Dentro deste contexto, os complexos de rutênio surgem como uma alternativa aos tradicionais metalofármacos de platina para o tratamento de tumores. Embora sejam ativos e largamente utilizados como agentes quimioterápicos, os compostos de platina apresentam efeitos colaterais severos e os tumores desenvolvem resistência ao tratamento. Os complexos de rutênio, por outro lado, apresentam menor toxicidade, maior seletividade para tumores, são ativos contra algumas linhagens resistentes à cisplatina, inibem a metástase e apresentam propriedades antiangiogênicas [2], [7]. A menor toxicidade dos compostos de rutênio comparada com os compostos de platina não está bem elucidada ainda, mas tem sido associada em parte à habilidade do rutênio mimetizar o ferro na ligação a biomoléculas e em parte ao mecanismo de ativação por redução que tem sido proposto para alguns deles [7]–[9].

Os principais representantes dessa nova categoria de compostos baseados em rutênio são os complexos HIm[trans-RuCl<sub>4</sub>(DMSO)Im], NAMI-A e HInd[trans-RuCl<sub>4</sub>(ind)<sub>2</sub>], KP1019 (Im = imidazol, DMSO = dimetilsulfóxido, ind = indazol), embora pesquisas anteriores com complexos análogos à cisplatina, contendo ligantes cloreto e amônia em um primeiro momento ([RuCl<sub>3</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]), e depois substituindo-se os ligantes amônia por dimetilsulfóxido (cis-[RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>4</sub>] e trans-[RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>4</sub>]), já tivessem demonstrado a potencialidade desses compostos como agentes antitumorais [7]. NAMI-A e KP1019 (que tem uma versão solúvel denominada NKP1339, Na[*trans*-RuCl<sub>4</sub>(ind)<sub>2</sub>]), apresentam atividade mais antimetastática e citotóxica, respectivamente, completaram com sucesso a fase I de ensaios clínicos e estão indo para a fase II [10]–[12]. Além destes complexos de Ru(III), compostos organometálicos de Ru(II) têm sido largamente explorados como agentes antitumorais, a partir dos trabalhos de Sadler e Dyson, que foram os primeiros a idealizar complexos com a estrutura denominada "piano-stool" ou "half-sandwich", com uma estrutura geral [(n<sup>6</sup>areno)Ru(X)(L)] (X = ligante monodentato e L = ligante bidentado) [4]. Dentre os organometálicos, um dos mais representativos é o RAPTA-T, [Ru(n<sup>6</sup>-tolueno)Cl<sub>2</sub>(PTA)] (PTA = 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano). A Figura 1.1 mostra as estruturas desses complexos principais.

A vantagem de se trabalhar com complexos metálicos em relação aos fármacos orgânicos tradicionais é a variedade química e biológica que eles proporcionam. Esta diversidade vem da possibilidade de se escolher o metal, seu estado de oxidação, o tipo e número de ligantes coordenados e a geometria do complexo [13].



Figura 1.1. Principais representantes dos complexos de rutênio que apresentam atividade antitumoral.

#### 1.2. Complexos dimetálicos de Rutênio

Outra classe de compostos de rutênio, além dos monoméricos de Ru(III) e organometálicos de Ru(II), é a dos complexos diméricos de Ru<sub>2</sub> com ligação múltipla metalmetal. As espécies dimetálicas de rutênio termodinamicamente mais estáveis são aquelas que contêm um centro de valência mista Ru<sub>2</sub>(II,III), com ordem de ligação metal-metal de 2,5, estabilizado pela coordenação de quatro ligantes carboxilatos [14], [15]. Esses tetracarboxilatos (Figura 1.2) têm sido estudados desde a sua descoberta por Stephenson e Wilkinson [16], [17] para os mais diversos tipos de aplicação, tais como: síntese de novos compostos [18], cristais líquidos [19], catalisadores, materiais magnéticos supramoleculares [20], etc, mas pouco foco tem sido dado a aplicações biológicas. Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa tem feito alguns avanços [7], [8]. Partindo do precursor [Ru<sub>2</sub>( $\mu$ -O<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Cl] (RuAc), nosso grupo de pesquisa tem sintetizado e caracterizado tetracarboxilatos de Ru<sub>2</sub>(II,III), onde os carboxilatos são derivados de fármacos anti-inflamatórios não esteroides (Faines), estudado sua atividade biológica, sua estabilidade e reatividade com biomoléculas.



Figura 1.2. Estrutura geral dos tetracarboxilatos de Ru<sub>2</sub>(II,III).

Grande parte dos Faines são moléculas que têm em comum o grupamento de ácido carboxílico, como os ilustrados na Figura 1.3. São utilizados para o tratamento da dor, inflamação e febre; seu modo de ação é atribuído à inibição da enzima ciclooxigenase (COX), que se apresenta em duas isoformas denominadas COX-1, que é fisiologicamente constitutiva, está presente em quase todos os tecidos saudáveis, é responsável pela proteção do sistema gástrico e a COX-2, presente quando processos inflamatórios são desencadeados e superexpressa em muitos tipos de tumores [7], [21].

Os Faines também apresentam propriedades antitumorais. A redução do risco de câncer de cólon e outros órgãos do sistema gastrointestinal, mama, próstata, pulmão e pele foi atribuída ao uso prolongado de Faines como aspirina. Aspirina, ibuprofeno, sulindaco e indometacina foram capazes de reduzir tumores gástricos quimicamente induzidos e Faines

inibiram o crescimento de tumores transplantados e câncer de pele induzido em modelos animais. O efeito anticâncer dos Faines, entretanto, é reversível e a recorrência aumenta logo após a descontinuação do uso dos fármacos. Estudos *in vitro* também demonstraram a ação antiproliferativa e de indução da apoptose em diversas linhagens celulares [7].



Figura 1.3. Estrutura dos fármacos anti-inflamatórios não esteroides (Faines) utilizados neste trabalho. Hcet = cetoprofeno, Hibp = ibuprofeno, Hnpx = naproxeno.

A complexação de fármacos a centros metálicos apresenta uma série de vantagens: (i) a estabilidade da ligação do fármaco com o metal pode evitar a sua degradação antes de sua chegada ao alvo específico; (ii) o complexo pode ter características de polaridade melhores que do ligante e metal livres para o meio no qual vai agir; (iii) a atividade dos ligantes pode ser sinergicamente reforçada pela atividade do metal e (iv) o complexo metálico tem o potencial de entregar seletivamente a espécie ativa ao seu sítio de ação através de diversos processos biológicos [22].

Um breve histórico dos estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa no que diz respeito aos tetracaboxilatos de dirutênio(II,III) é mostrado a seguir.

 2000 [23] Síntese e caracterização do [Ru₂(ibp)₄Cl], Ruibp e avaliação das atividades antiinflamatória e ulcerogênica do complexo e do fármaco livre (HIbp).
 O complexo Ruibp apresentou atividade anti-inflamatória similar à do fármaco Hibp, mas com menor efeito ulcerogênico. 2008 [24], Síntese e caracterização dos complexos [Ru<sub>2</sub>(ibp)<sub>4</sub>Cl] (por um método
[25] modificado em relação ao publicado anteriormente), [Ru<sub>2</sub>(npx)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>, Runpx, [Ru<sub>2</sub>(aspy)<sub>4</sub>Cl] (aspy = aspirinato), e [Ru<sub>2</sub>(ind)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (ind = indometacina), e avaliação dos efeitos sobre a proliferação de células tumorais Hep2, T4/83 e C6 de glioma de rato.

Os complexos Ruibp e Runpx diminuíram de forma significativa a proliferação de células C6 de glioma de rato, mais do que os fármacos de partida (Hibp e Hnpx), e nenhum dos complexos (Ruibp, Runpx, Ruasp e Ruind) tiveram influência significativa sobre as linhagens Hep2 e T4/83. RuAc não foi apresentou atividade antiproliferativa sobre células C6. Os complexos RuAc, Ruibp e Runpx não mostraram atividade citotóxica.

2009 [26] Síntese e caracterização dos complexos [Ru<sub>2</sub>Cl(sulin)<sub>4</sub>], [Ru<sub>2</sub>Cl(dicl)<sub>4</sub>] e [Ru(DMSO)<sub>2</sub>(Hmelox)<sub>2</sub>] (sulin, dicl e Hmelox = ânions derivados dos fármacos sulindaco, diclofenaco e meloxicam, respectivamente), avaliação da interação destes complexos e do Ruibp com HSA e atividade contra células de leucemia da linhagem K562.

Os complexos interagiram com a HSA, o que foi evidenciado pela diminuição do conteúdo de  $\alpha$ -hélice, sem provocar a sua clivagem. Todos os compostos apresentaram atividade antiproliferativa contra células da linhagem K562.

2010 [27] Estudo dos efeitos da presença do complexo Ruibp sobre a distribuição do ciclo celular de células C6 de glioma de rato, potencial de membrana mitocondrial, geração de espécies reativas e expressão de mRNA e proteínas E2F1, ciclina D1, c-myc, pRb, p21, p27, p53, Ku70, Ku80, Bax, Bcl2, COX1 e COX2.
Observou-se o aumento da expressão dos inibidores de quinase dependentes de ciclina p21 e p27, a diminuição do potencial de membrana mitocondrial e o leve aumento na apoptose que foi acompanhada pela diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl2 e aumento da expressão de COX-1 em resposta à diminuição da produção de prostaglandina E2. De modo geral, esses resultados

mostraram que o complexo Ruibp tem alguma influência sobre o desencadeamento de mecanismos apoptóticos, e de interrupção do ciclo celular, além de inibir a COX-1.

2012 [28], Síntese e caracterização do complexo [Ru₂(ceto)₄Cl], Ruceto, estudo do efeito dos compostos Ruibp, Runpx e Ruceto sobre células de câncer de cólon HT-29 (altos níveis de COX-2) e Caco-2 (baixos níveis de COX-2). Os compostos tiveram pouca influência sobre a proliferação das duas linhagens celulares avaliadas, e inibiram apenas parcialmente a produção/atividade de MMP-2 e MMP-9 pelas células HT-29, indicando que a inibição da COX-2 pode estar apenas parcialmente envolvida nos efeitos farmacológicos desses complexos.

2012 [29], Estudo termodinâmico da substituição axial de ligantes H<sub>2</sub>O por Cl<sup>-</sup> no complexo
[30] [Ru<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, RuAc-aquo, e cinética da reação com os aminoácidos histidina, glicina, triptofano e cisteína.

Foram calculados os parâmetros termodinâmicos (K,  $\Delta H^{\circ}$ ,  $\Delta S^{\circ} e \Delta S^{\circ}$ ) da substituição axial de duas moléculas de H<sub>2</sub>O por Cl<sup>-</sup> no RuAc-aquo, e os valores das constantes de equilíbrio foram baixas (K<sub>1</sub> = 18 mol<sup>-1</sup> L e K<sub>2</sub> = 3,3 mol<sup>-1</sup> L). Obtiveram-se também os parâmetros cinéticos das reações deste complexo com os aminoácidos His, Trp, Gly e Cys. Todas as reações mostraram cinéticas rápidas, e os valores das constantes de equilíbrio foram da ordem de 10<sup>2</sup> (Gly e Trp), 10<sup>4</sup> (Cys) e 10<sup>6</sup> (His).

2013 [29], Estudos cinéticos e mecanísticos das reações do RuAc-aquo com agentes
[31] redutores biologicamente relevantes.

A reação entre RuAc-aquo e gluationa e ácido ascórbico consiste em uma etapa inicial de substituição axial de uma molécula de água pela molécula do agente redutor, seguida pela redução do centro dimetálico de Ru<sup>5+</sup> para Ru<sup>4+</sup>, com a oxidação do agente redutor. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos também foram obtidos.

2014 [32] Síntese e caracterização do complexo [Ru<sub>2</sub>Cl(feno)<sub>4</sub>] (feno = fenoprofenato), estabilidade no estado sólido dos complexos Ruibp e Ruceto, lipofilicidade destes e do complexo RuAc e dos fármacos de partida (ibuprofeno e cetoprofeno).

Os complexos Ruibp e Ruceto são insolúveis em água, e na presença de cossolventes (etanol, metanol e 2-propanol), apenas em proporções superiores a 60:40 cossolvente:água é que se observou um aumento significativo da solubilidade. A lipoficidade destes complexos é próxima da observada para os fármacos de partida.

2014 [33] Interação do complexo RuAc com lisozima de clara de ovo de galinha avaliada por UV-Vis e ESI-MS e determinação da estrutura do aduto por difração de raios-X.

A proteína se liga a duas unidades do complexo RuAc. Cada unidade perde dois ligantes acetato que são substituídos por um aspartato da proteína (Asp101 e Asp 119) e por duas moléculas de H<sub>2</sub>O, mantendo o núcleo dimetálico.

## 2014 [34] Atividade antiproliferativa do Ruibp sobre células de glioma humano e atividade do complexo in vivo

Assim como com células C6 de glioma de rato, o complexo Ruibp mostrou atividade antiproliferativa sobre células de glioma humano das linhagens A172, U87MG, U138MG e U251MG, e induziu a apoptose nas mesmas células. Células C6 de glioma de rato foram cultivadas e injetadas em ratos Wistar. O tumor induzido foi tratado com o Ruibp por duas vias de administração, intraperitoneal e através de uma bomba osmótica. A redução da área do tumor foi de 41% para administração intraperitoneal com alterações dos níveis de leucócitos no sangue, e de 45% para a administração via bomba osmótica diretamente no tumor, sem alterações dos leucócitos. Esses resultados mostraram de forma inequívoca a potencialidade do metalofármaco Ruibp para o tratamento do GBM (glioblastoma). 2015 [35] Estudos espectroscópicos da interação do RuAc, Ruibp e Ruceto com albumina sérica humana.

A interação foi avaliada por espectroscopia eletrônica, dicroísmo circular, fluorescência e ultrafiltração (com análise da fase proteica por MALDI-MS e ICP). Os estudos de CD demonstraram a desestabilização do conteúdo de  $\alpha$ -hélice da HSA sob interação com os complexos. Os demais resultados estão discutidos nesta tese.

Os estudos realizados até o momento mostram a potencialidade da utilização dos metalofármacos do tipo RuFaines para o tratamento de gliomas, que são os tumores cerebrais mais comuns. O glioblastoma (GBM), classificado como grau IV pela Organização Mundial da Saúde, representa 60 – 70% de todos os casos de gliomas malignos. A estratégia terapêutica tradicional para tratar esse tipo de câncer envolve a remoção cirúrgica do tumor, seguida de radioterapia e quimioterapia com temozolamida. A sobrevida média do paciente, no entanto, é de apenas 12 meses. As razões para isso são atribuídas à não especificidade da radioterapia e quimioterapia, juntamente com a resistência celular ao tratamento, que favorece a reincidência do tumor após 32 a 36 semanas [7], [36].

O modo de ação dos metalofármacos de rutênio em geral ainda não é conhecido, e um grande esforço tem sido feito no sentido de se elucidar os mecanismos envolvidos, inclusive em nosso grupo de pesquisa. Especula-se, porém, que o DNA não seja o alvo principal, diferente do que ocorre com a cisplatina [37]. Supõe-se que o modo de ação dos complexos de Ru(III) seja o seguinte: administração intravenosa; degradação (hidrólise, redução) no sangue acompanhada pela reação com as proteínas séricas e outros alvos biológicos; transporte para dentro da célula através de endocitose mediada pelo receptor da transferrina (ciclo da transferrina) e efeito EPR – *enhanced permeability and retention*  (caminho da albumina); liberação do complexo causada pela influência do pH, ATP e citrato; redução na célula hipóxica; ligação ao alvo específico [38].

Para se ter uma ideia melhor sobre o modo de ação dos fármacos, é necessário saber o que acontece com eles desde sua entrada no organismo até sua chegada ao alvo específico.

#### 1.3. Interação dos metalofármacos com o meio biológico

Todo fármaco, ao entrar no organismo, acaba sendo transportado pelo sangue, independente da via de administração (oral, intravenosa, sublingual, subcutânea ou intramuscular), e antes de atingir o seu alvo encontra uma diversidade imensa de substâncias presentes no sangue. Falando apenas das proteínas, o proteoma do plasma inclui aproximadamente 100.000 proteínas com concentrações que variam até 12 ordens de magnitude. Os maiores componentes proteicos são mostrados na Figura 1.4 [5]. Duas das principais proteínas presentes no plasma são a albumina (HSA, *human serum albumin*) e a transferrina (Tf).



Figura 1.4. Principais proteínas plasmáticas que podem ser separadas por técnicas eletroforéticas. Adaptado da referência 5.

Entender as interações de um candidato a metalofármaco com as proteínas séricas é de extrema importância, visto que essas interações podem ter influência em sua farmacocinética e no seu modo de ação, mesmo que estas proteínas não sejam o alvo final. Essas interações podem estar envolvidas no surgimento de efeitos colaterais indesejados ou até mesmo na redução da toxicidade, podem modificar a estrutura original da molécula, aumentar a sua solubilidade no plasma e protegê-la contra a metabolização antes da chegada ao alvo. Além disso, influenciam diretamente o transporte, armazenamento e entrega do fármaco ao seu sítio de ação. A concentração da forma livre (ativa) do fármaco depende de sua afinidade com as proteínas plasmáticas [39]–[44]. O perfil cinético da interação fármaco-proteína é crítico para a eficácia do fármaco porque um transporte eficiente requer altas velocidades de ligação e dissociação, resultando em moderada afinidade [42].

#### 1.3.1. Albumina

A albumina sérica humana, HSA, é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo com uma concentração de 40 – 45 g L<sup>-1</sup> ( $\approx$  600 µmol L<sup>-1</sup>), representando aproximadamente 52% da quantidade de proteína total, e é sintetizada e secretada pelo fígado [39]. Pode se ligar reversivelmente a uma grande variedade de substâncias endógenas e exógenas, tais como ácidos graxos, hormônios e fármacos, e por essa razão, no que diz respeito à interação com fármacos, pode acabar reduzindo a sua biodisponibilidade. A sua principal função é transportar essas moléculas aos seus alvos além de servir como um reservatório natural para elas; além disso, é a principal responsável pela manutenção da pressão osmótica plasmática e do pH do sangue [40], [45]. A HSA frequentemente aumenta a solubilidade de drogas hidrofóbicas no plasma [46]–[49]. Por isso, tem grande influência sobre aspectos como absorção, metabolismo, distribuição e eliminação de drogas. Essa propriedade tem sido bastante investigada pelo potencial de utiliza-la para entrega direcionada a um alvo específico, como com complexos antitumorais Ru(II)-arenos [41], [44].

É constituída por uma única cadeia polipeptídica de 585 aminoácidos, e tem massa molar de 66 kDa. Sua estrutura consiste de 3 domínios helicoidais homólogos (denominados I, II e III), e cada domínio é dividido em 2 subdomínios (A e B) [49], [50]. Seu formato se assemelha a um coração com dimensões aproximadas de 80 x 80 x 30 Å. Os subdomínio A e B têm 6 e 4  $\alpha$ -hélices, respectivamente, conectados por *loops* flexíveis. Todos os resíduos de cisteína estão envolvidos na formação de pontes dissulfeto, exceto o Cys-34 [39]. Seu ponto isoelétrico é 5,92 [41], então no pH fisiológico de 7,4 ela está negativamente carregada. A Figura 1.5 mostra a estrutura da HSA e seus sítios de ligação para variados fármacos.



Figura 1.5. Estrutura da HSA com destaque para alguns dos seus sítios de ligação. Adaptada da referência 50.

A molécula de HSA tem pelo menos dois sítios importantes denominados sítios de Sudlow I e II e os fármacos geralmente se ligam a um desses sítios com alta afinidade [44], mas podem existir sítios secundários de baixa afinidade. A faixa de valores de constantes de afinidade é de 10<sup>4</sup> a 10<sup>6</sup> L mol<sup>-1</sup> [33], [41]. Além desses sítios principais, há também os sítios de ligação de ácidos graxos (FA1 – FA9) [51].

O sítio I é conhecido como o sítio varfarina-azapropazona e está localizado no subdomínio IIA. A parede interna do sítio é formada por cadeias laterais hidrofóbicas e a sua entrada é rodeada por resíduos positivamente carregados [2]. A principal característica desse sítio é a ligação de ácidos dicarboxílicos ou ânions heterocíclicos volumosos com uma carga negativa localizada no meio da molécula. Ele é espaçoso, quando comparado ao sítio II, pois pode acomodar moléculas tão grandes quanto bilirrubina e porque existem exemplos de casos de dois ligantes diferentes acomodados nesse mesmo sítio, indicando que existem outros sítios individuais que às vezes são independentes e às vezes influenciam-se mutuamente. Outras evidências também sugerem que ele é flexível, como o fato de ligantes com diferentes estruturas ligaram-se com alta afinidade. Fármacos que se ligam a esse sítio incluem varfarina, valproato e azapropazona [39], [48], [49], [52].

O sítio II está localizado no subdomínio IIIA e é conhecido como indolbenzodiazepina. Ligantes que se ligam ao sítio II são em geral ácidos carboxílicos aromáticos com o grupo ácido negativamente carregado no final da molécula longe do centro hidrofóbico. Ligantes que tendem a se ligar nessa região incluem o ibuprofeno, flurbiprofeno e diazepam, e os fármacos anti-inflamatórios não esteroides em geral. Ele parece menor que o sítio I, porque aparentemente não se liga a moléculas grandes (como bilirrubina ou porfirinas, por exemplo), e menos flexível, pois frequentemente a ligação é estereosseletiva (um exemplo dessa característica é que L-triptofano se liga com afinidade 100 vezes maior que o D-triptofano) [39], [48], [49], [52].

Alguns destaques dos sítios de ligação de ácidos graxos são: FA1 tem alta afinidade pelo grupo Heme-Fe(III); FA3 e FA4 contribuem para o sítio II de Sudlow e FA7 corresponde ao sítio I; FA2 e FA6 são sítios secundários de ligação do ibuprofeno. O sítio FA1 e os sítios FA2, FA3-FA4, FA6 e FA7 são alostericamente acoplados. Ibuprofeno e varfarina agem como efetores alostéricos [51].

Reações competitivas resultam no deslocamento de um fármaco por outro de seu sítio de alta afinidade. Devido à ligação de fármacos à HSA não ser seletiva, pode ocorrer competição entre drogas adicionadas simultaneamente [39], [48], [49], [53].

#### 1.3.2. Transferrina

As transferrinas são uma família de proteínas cuja função primária é o transporte de ferro no organismo. Fazem parte dessa família a transferrina sérica (encontrada no sangue e em outros fluidos em mamíferos incluindo bile, líquido amniótico, fluido cérebro-espinhal, linfa, colostro e leite), ovotransferrina (presente na clara de ovos), lactoferrina (presente no leite, lágrimas, saliva, muco e glóbulos brancos do sangue) e a melanotransferrina (encontrada em células de melanoma, e que parece facilitar a captação de ferro para essas células). Todos os membros dessa família são estruturalmente bastante semelhantes. O padrão de enovelamento da cadeia polipeptídica é o mesmo em todos os casos. Essas proteínas possuem a capacidade de ligar-se forte (K  $\approx 10^{22}$  mol<sup>-1</sup> L), mas reversivelmente a dois íons Fe(III) junto com dois ânions CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> [54]–[57].

#### **1.3.2.1.** Características estruturais

A Figura 1.6 mostra a estrutura da holo-transferrina sérica humana (hTf). A hTf é uma glicoproteína monomérica, com uma massa molar de aproximadamente 80 kDa, e é constituída de 679 aminoácidos [54], [58]. A molécula é estabilizada por 19 pontes intracadeia de dissulfeto e é protegida por três cadeias laterais de carboidratos, das quais duas são N-glicosiladas (Asn-413 e Asn-611) e a terceira é O-glicosilada (Ser-32) [58].

A molécula de Tf é dividida em 2 lobos interligados denominados Lobo N (ou aminoterminal, aminoácidos 1-331) e Lobo C (ou carboxila-terminal, aminoácidos 339-679), que são conectados por uma curta cadeia polipeptídica [54], [55], [58], [59]. Os dois lobos apresentam aproximadamente 40% de homologia entre eles, e esta semelhança é refletida na estrutura terciária da proteína [55], [56]. Embora cineticamente distintos, o enovelamento dos dois lobos C e N são equivalentes [59].



Figura 1.6. Estrutura da transferrina humana (PDB: 3QYT), com destaque para o sítio de ligação do Fe(III) (Adaptado de [60]).Os aminoácidos escritos entre () são os do lobo C e os sem () do lobo N.

[30]

Cada lobo (C e N) é dividido em dois domínios de tamanhos similares, com segmentos alternantes de  $\alpha$ -hélice e folha- $\beta$ , e que são conectados por um *hinge* (uma curta cadeia polipeptídica que não apresenta estrutura secundária definida e que confere mobilidade aos domínios): os domínios N<sub>1</sub> (aminoácidos 1-92 e 247-331) e C<sub>1</sub> (aminoácidos 339-425 e 573-679) são compostos por duas seções descontínuas da cadeia polipeptídica, enquanto os domínios N<sub>2</sub> (aminoácidos 93-246) e C<sub>2</sub> (aminoácidos 426-572) são compostos por um único segmento do polipeptídeo. Os domínios interagem para formar uma cavidade hidrofílica, onde estão localizados os sítios de ligação do metal [56], [58], [59]. O ponto isoelétrico da transferrina está entre 6,7 – 6,8 [41] [61], e portanto ela está negativamente carregada no pH fisiológico de 7,4.

Nos dois sítios de ligação (localizados nos lobos C e N), o Fe(III) está hexacoordenado em um arranjo octaédrico distorcido. Ele é coordenado por 4 resíduos de aminoácidos altamente conservados: um aspartato (o único ligante do domínio N<sub>1</sub> ou C<sub>1</sub>), uma tirosina (localizada no *hinge* próximo ao domínio N<sub>2</sub> ou C<sub>2</sub>), uma segunda tirosina (localizada no domínio N<sub>2</sub> ou C<sub>2</sub>) e uma histidina (localizada no *hinge* próximo ao domínio N<sub>1</sub> ou C<sub>1</sub>). As estruturas desses aminoácidos são mostradas na Figura 1.7. Além disso, o sítio de ligação requer dois átomos de oxigênio que são doados por um ânion carbonato bidentado, para estabilizar o íon Fe(III); o ânion carbonato, por sua vez, está ligado à proteína por um resíduo de arginina conservado; não ocorre ligação do ferro com a proteína na ausência do ânion carbonato ou de algum ânion substituto adequado [55], [56], [58]. Cada lobo se liga a um único íon Fe(III) com alta afinidade (K  $\approx 10^{22}$  mol<sup>-1</sup> L) [57].

O ambiente do sítio de ligação é propício para a coordenação do íon Fe(III): três ligantes aniônicos, 2 Tyr e 1 Asp compensam a carga +3 do metal; o quarto ligante é uma His neutra. A carga do  $CO_3^{2-}$  é quase exatamente compensada pelas cargas positivas em seu sítio

de ligação à proteína, com um resíduo de Arg positivo e o N terminal de uma α-hélice (nº 5) com uma carga de pelo menos +0,5. O ânion encaixa-se perfeitamente no espaço entre o metal e a proteína e forma uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo o resíduo da Arg, um Thr conservado no *loop* que precede a hélice 5 e principalmente grupos N-H da cadeia Nterminal da hélice 5 [54].



Figura 1.7. Estrutura dos aminoácidos do sítio de ligação do ferro na Tf.

Dados cinéticos e espectroscópicos indicam que a ligação do ânion à proteína precede a ligação do metal. Então, o papel do ânion na ligação do metal é duplo. Primeiro, ele neutraliza as cargas positivas locais, que do contrário poderiam repelir o cátion metálico, e segundo, ele parcialmente prepara o sítio de ligação do metal na apoproteína pela adição de mais dois pontos de coordenação em potencial (dois átomos de oxigênio) aos dois ligantes tirosinatos já associados com os domínios 2 [54].

Conforme foi mencionado anteriormente, os domínios de cada lobo da proteína são conectados por *hinges* que favorecem a flexibilidade molecular e este parece ser um fator vital na função da proteína. Foi demonstrado através de diversas técnicas que uma grande mudança conformacional acompanha a captação e a liberação de ferro pela transferrina [54]. Na apoproteína, ambos os lobos adotam uma conformação "aberta", em que a abertura entre os dois domínios é bastante ampla. Após a ligação com o ferro, os domínios giram um em relação ao outro com um movimento de torção ao redor do *hinge*, em aproximadamente 60°, para produzir uma conformação "fechada" da proteína férrica. As conformações aberta e fechada do lobo N são mostradas na Figura 1.8 [55], [59].



Figura 1.8. Conformações adotadas pela proteína antes e após a coordenação do íon Fe(III) (mostrado apenas o Lobo N). Adaptado da referência 55.

No soro humano, a concentração de transferrina é de aproximadamente 2,5 mg mL<sup>-1</sup> (35 μmol L<sup>-1</sup>), com 30% dos sítios de ligação ocupados com ferro [56], [62], havendo, portanto, a potencialidade para ligação a outras espécies, como Ti(IV), Cr(III), Ru(III) e Bi(III) por exemplo [55], [63]. Aliás, a transferrina se liga a pelo menos outros 30 íons metálicos [41], [43].

#### 1.3.2.2. Funções biológicas

As transferrinas desempenham algumas funções nos organismos vivos. Dentre elas, podem-se destacar:

*Transporte e regulação do metabolismo do ferro:* O ferro é um metal essencial para todos os organismos vivos. Ele desempenha um papel central na replicação do DNA, pois é o cofator da enzima chave ribonucleotídeo redutase; é também um cofator para o grupo heme. No entanto, ferro livre pode ser tóxico, promovendo a formação de radicais livres via reações de Fenton e Haber-Weiss, além de participar de diversas reações que causam danos aos tecidos. Por essas razões é vital que o ferro seja transportado em uma forma redox inativa. Assim, o papel primário da Tf é o transporte seguro de Fe pelo corpo de forma que ele esteja disponível para as células em crescimento, e de forma que a deposição de agregados insolúveis de hidróxido de ferro(III) seja evitada. A transferrina sérica é a proteína que transporta íons Fe(III) através do sangue, entre sítios de captação, utilização e armazenamento. Ela conserva e controla os níveis de ferro disponível nos fluidos corporais participando assim da regulação do metabolismo do ferro [54]–[56], [58].

Atividade antimicrobiana: a transferrina desempenha uma função bacteriostática, diminuindo a disponibilidade de ferro para microorganismos. Além disso, estudos têm mostrado que a apoTf é capaz de reduzir a adesão de bactérias a superfícies [55], [56], [58].

*Crescimento celular:* a transferrina apresenta efeitos de promoção do crescimento celular independente do seu papel de transporte com ferro, pois o mesmo foi observado com a apoTf [56], [58].

*Transporte de outros íons metálicos:* a transferrina pode estar envolvida no transporte de muitos outros íons metálicos que não o ferro, incluindo íons metálicos para fins terapêuticos, íons metálicos usados em diagnóstico por imagem, e até mesmo íons metálicos tóxicos [58], [63].

#### 1.3.2.3. Ciclo da transferrina

A transferrina humana é sintetizada no fígado e secretada no plasma. Ela capta Fe(III) do intestino e entrega este ferro às células pela ligação ao receptor específico (rTf) na superfície celular. O receptor da Tf, uma glicoproteína dimérica transmembrana de 180 kDa, liga-se preferencialmente à transferrina diférrica (comparada com a Tf monoférrica e na forma apo) em pH 7,4. Em seguida, o complexo Tf-rTf é internalizado por endocitose. Uma
bomba de prótons dependente de ATP força íons H<sup>+</sup> dentro do endossoma reduzindo o pH para 5,5. A liberação do Fe(III) é resultado primeiro da protonação e dissociação do ânion sinergístico, seguida da protonação dos ligantes His e/ou Tyr, e por último a liberação do ferro [54], [58], [59], [64].

Para que o ferro seja transportado para o citosol pelo transportador DMT1, ele deve ser reduzido a Fe(II); não está claro ainda, no entanto, se a redução do Fe(III) precede ou segue a sua liberação da transferrina. O ferro é então utilizado como um cofator pelo heme e ribonucleotídeo redutase ou é estocado na ferritina [56], [59], [64].

Sob condições de baixo pH, o rTf altera sua conformação para permitir que a apoTf permaneça ligada. As características da ligação apoTf-rTf são tais que a apoTf é liberada apenas quando o complexo alcança a superfície da célula. A molécula de apoTf circula novamente até encontrar ferro livre no intestino ou nos sítios de degradação da hemoglobina, e então o ciclo de transporte do Fe(III) é continuado. Estima-se que uma molécula de Tf possa participar do ciclo de transporte do ferro aproximadamente 100 vezes [54], [58], [59]. A Figura 1.9 mostra esquematicamente o ciclo da transferrina.

O ciclo inteiro da transferrina pode levar apenas 4 – 5 min (como mostrado em células K562 com aproximadamente 150.000 receptores), mas em média, o tempo do ciclo completo é de 10 min. A rápida reciclagem da transferrina leva a números muito altos de retorno da molécula, dando valores da ordem de 2 x  $10^4$  moléculas de transferrina internalizadas por minuto por célula [62].



Figura 1.9. Ciclo da transferrina. A hTf liga-se ao seu receptor específico (rTf) na superfície celular. Este complexo (hTf-rTf) localiza-se em uma depressão revestida por clatrina, que sofre invaginação iniciando assim a endocitose. O endossomo é acificado através de uma bomba de prótons. O pH reduzido (5,5) promove mudanças conformacionais da proteína resultando na liberação do íon Fe(III) da hTf, que é então levado pelo transportador DMT1 para o citosol onde será utilizado ou armazenado. Em células não eritroides, o Fe é armazenado na ferritina ou hemossiderina. O complexo apoTf-rTf retorna à superfície celular, onde são dissociados em pH neutro. Adaptada da referência 65.

## 1.3.2.4. Ciclo da transferrina para entrega direcionada do fármaco

Uma estratégia para melhorar o índice terapêutico de fármacos é entregá-los especificamente a células alvo definidas, mantendo-o dessa forma longe das células saudáveis que são sensíveis aos seus efeitos tóxicos. Isto permitiria um tratamento mais efetivo com uma melhor tolerância. Exemplos incluem sistemas de entrega baseados em polímeros carregadores, lipossomas e um sistema ligante-receptor. Este último tem recebido maior atenção nos últimos anos devido ao potencial de não-imunogenicidade e a possibilidade de direcionamento de ligantes específicos a um alvo específico pela utilização

da interação de ligantes naturalmente existentes com seus receptores. O ciclo da transferrina tem sido explorado neste contexto [56], [66].

O plasma sanguíneo contém uma concentração de aproximadamente 30 μmol L<sup>-1</sup> de transferrina. Na transferrina sérica normal, apenas 30% dos sítios de ligação estão saturados com Fe(III), o que leva a uma concentração de aproximadamente 40 μmol L<sup>-1</sup> de sítios de ligação vagos [55]. Essa disponibilidade, aliada ao fato de que células tumorais apresentam um número muito maior de receptores da transferrina devido à maior demanda por ferro, abre a oportunidade de se explorar o ciclo da transferrina como uma possível rota de entrega direcionada do fármaco [41], [43], [58], [67].

Células tumorais frequentemente carregam elevados níveis de rTf comparadas com as correspondentes células normais [62]. O nível de expressão varia dependendo do tipo de célula. O rTf está presente na maioria das células em proliferação. Tecidos que expressam altos níveis de receptores incluem a medula óssea, epitélio intestinal e epiderme, e também linhagens celulares de carcinoma, que podem expressar mais de 100.000 rTf por célula. Células que não estão se dividindo podem ter níveis extremamente baixos de expressão de rTf [58]. Outros estudos determinaram o número de receptores em uma variedade de tipos de células humanas, e seus números variaram de 40.000 a 2.800.000 em células tumorais comparadas a aproximadamente 45.000 a 400.000 presentes em reticulócitos [5].

A Tf pode ser usada como um ligante direcionador de agentes anticâncer, proteínas ou genes para um determinado alvo específico, como células malignas primárias em proliferação que expressam níveis maiores de receptores. Isto é alcançado pela conjugação da transferrina com drogas, proteínas, sistemas híbridos com macromoléculas e lipossomas. Conjugados de drogas anticâncer e transferrina podem melhorar significativamente a seletividade e a toxicidade e superar o problema de resistência à droga, melhorando dessa forma o tratamento [56]. Diversas evidências têm demonstrado que tumores em animais e humanos capturam transferrina e albumina para suprir a alta demanda de Fe(III) e aminoácidos quando estão em rápido crescimento [5].

No caso do tratamento de gliomas, alguns estudos estão sendo feitos no sentido de se utilizar a ciclo da transferrina. Os capilares cerebrais expressam grandes quantidades de rTf para mediar a entrega de ferro ao cérebro e também os neurônios. A barreira hematoencefálica (BHE) também expressa altos níveis desse receptor. Outros tecidos saudáveis do cérebro, no entanto, geralmente não estão em rápida proliferação e expressam apenas pequenas quantidades de rTf, com níveis quase indetectáveis. Por essa razão, a hTf é um ligante de direcionamento, que tem sido usado com sucesso para a entrega de nanocarregadores ao cérebro. Lipossomos conjugados a esta proteína puderam aumentar a permeação na BHE de fármacos encapsulados e assim aumentar a eficácia terapêutica do tratamento de glioma *in vivo* [5], [68], [69].

Outro exemplo de aplicação desta estratégia para o tratamento de glioblastoma é o medicamento denominado TransMID<sup>®</sup> (Tf-CRM107), que consiste de uma imunotoxina (toxina da difteria) conjugada a hTf através de um *cross-linker* de lisina e um tioéster, e está em estágios avançados de avaliação clínica. O conjugado é internalizado por endocitose pelo rTf, e dentro da célula a ligação tioéster é clivada e libera a toxina que mata a célula do glioblastoma [5].

Além desses, pode-se citar os radiofármacos a base de citrato de <sup>67</sup>Ga(III) e <sup>68</sup>Ga(III)usados para detectar tumores. Quando o citrato de gálio entra na corrente sanguínea, ele se liga rapidamente à transferrina através dos sítios de ligação do Fe(III). A distribuição é feita principalmente através do ciclo da transferrina [5].

#### 1.3.3. Interação dos metalofármacos de rutênio com alvos biológicos

As interações de metalofármacos de rutênio com alvos biológicos como as proteínas séricas albumina e transferrina, além do DNA, têm sido objeto de estudo em diversos grupos de pesquisa pelo mundo. O objetivo é avaliar como essas interações afetam o modo de ação dos metalofármacos, já que este mecanismo é pouco conhecido.

O complexo NAMI-A não é citotóxico, mas apresenta ação antimetastática. Essa ação é atribuída ao aumento da adesão celular, inibição da mobilidade da célula cancerosa dependente da integrina e capacidade de invasão, e inibição da neoangiogênese no tecido tumoral [11]. Verificou-se que este complexo não é internalizado pelas células, o que indica que ele age em nível extracelular. NAMI-A se mostrou altamente citotóxico apenas contra algumas linhagens celulares de leucemia, mas ainda assim a captação de Ru pelas células foi mínima [10].

Em relação à interação com HSA, NAMI-A é capaz de se ligar em uma razão de 5 moléculas de complexo / proteína, principalmente através de nitrogênios imidazólicos de resíduos de His nos domínios IIA e IIIA [70]. Um estudo para avaliar a preferência de ligação do complexo entre HSA e Tf mostrou que, em uma solução com concentrações equimolares das duas proteínas e do complexo, NAMI-A se liga em maior extensão à HSA, e comparando as formas apo e holo da Tf, ele se liga em maior extensão à hTf. Neste mesmo trabalho, a interação do complexo com soro humano mostrou que 98% do complexo permanece ligado às proteínas séricas. A constante de Stern-Volmer para a interação com hTf foi de (1,03  $\pm$  0,01) x 10<sup>4</sup> mol<sup>-1</sup> L e para apoTf foi de (1,28  $\pm$  0,03) x 10<sup>4</sup> mol<sup>-1</sup> L mostrando que o complexo pode se ligar a outros sítios que não os específicos do Fe(III) [10].

Em relação à atividade do complexo sob a interação com as proteínas, estudos demonstraram que células de carcinoma oral humano KB e camundongos CBA implantados

com células de carcinoma mamário, respectivamente, com adutos HSA-NAMI-A e Tf-NAMI-A resultaram em substancial redução da atividade biológica em comparação ao complexo administrado sozinho [43].

O complexo KP1019 (e sua versão solúvel NKP1339) é ativo contra diversos tumores primários, inclusive o tumor colorretal resistente à cisplatina [45]. A interação do complexo com a HSA inicia-se rapidamente de maneira não-covalente, mas após longo tempo de incubação a interação muda para a coordenação do metal à proteína. A razão estequiométrica determinada por espectroscopia de dicroísmo circular e confirmada por ICP foi de 4 ânions do complexo para 1 molécula de HSA [45]. Com a apoTf, KP1019 interage através dos sítios do Fe(III), mantendo os ligantes indazóis coordenados ao Ru(III) [67], e a proteína é capaz de reter até 10 moléculas do complexo. [70], [71]. As constantes de estabilidade dos adutos formados com HSA e apoTf foram estimadas em 9,9 x  $10^3$  mol<sup>-1</sup> L e 6,5 x  $10^3$  mol<sup>-1</sup> L, respectivamente [72].

Estudos com células de câncer colorretal mostraram que a captação do aduto apoTf-KP1019 foi reduzida em 50% em relação ao complexo livre, e também que sua atividade na inibição do crescimento é menor [43]. Em outro estudo, com células de câncer de cólon humano da linhagem SW707, observou-se que o aduto com a hTf apresentou maior atividade antiproliferativa que o complexo livre [67]. A captação celular avaliada com células SW480 mostrou que o complexo KP1019 conjugado à apoTf é menos internalizado do que o complexo livre, que por sua vez é menos do que o complexo conjugado à hTf. Nesse caso se concluiu que o ciclo da transferrina é a principal rota de entrada do complexo nas células [70].

Dos complexos organometálicos, RAPTA-T é um dos mais representativos. Ele apresenta propriedades antimetastáticas e anti-angiogênicas, assim como o NAMI-A. RAPTA-

T liga-se em maior extensão à hTf (maior razão molar hTf:complexo de 1:1,4) do que à apoTf (1: 1,1), e ambas em maior extensão ainda quando comparado à cisPt (1: 0,38). Na interação com HSA, RAPTA-T (1:0,64) se liga mais do que a cisPt (1:0,35). Foi verificado que RAPTA-T tem uma preferência cinética pela Tf em relação à HSA, mas deve-se lembrar que a concentração de HSA é aproximadamente 20 vezes maior que a de Tf no sangue, o que pode favorecer a sua ligação ao metal, como no caso do KP1019. A formação de adutos é favorecida em maiores concentrações de proteína e metal. A maior afinidade do RAPTA-T pela hTf pode indicar que o Fe(III) favorece a interação entre o complexo e a proteína por manter a conformação da proteína de maneira que a formação do aduto é facilitada [41].

#### 2. OBJETIVOS

Tendo em vista a relevância do desenvolvimento de candidatos a fármacos para o tratamento de tumores, e a importância de se conhecer as interações que precedem a sua chegada ao alvo específico, o presente trabalho teve como objetivo contribuir com a pesquisa do grupo, adicionando conhecimentos relativos às interações com as principais proteínas séricas, que possam futuramente auxiliar na elucidação do mecanismo de ação dos metalofármacos de rutênio com ligantes derivados de fármacos anti-inflamatórios não esteroides.

Para isso, as seguintes metas foram estabelecidas: (i) Síntese do complexo precursor [Ru<sub>2</sub>(µ-O<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Cl], RuAc, e derivados com fármacos ibuprofeno, cetoprofeno e naproxeno por metodologias desenvolvidas no grupo; (ii) Caracterização dos complexos empregando diferentes técnicas instrumentais; (iii) Investigação da cinética e das constantes de estabilidade das interações dos complexos com a transferrina em suas formas apo e holo, por espectroscopia eletrônica; (iv) Avaliação da estabilidade da estrutura secundária da apoTf frente à interação com os complexos, por espectroscopia de dicroísmo circular; (v) Investigação das alterações conformacionais da transferrina (apo e holo) e da HSA sob interação com os complexos, obtendo-se informações sobre o possível sítio de ligação na proteína, e estimativa da constante de afinidade da interação por espectroscopia de fluorescência; (vi) Estimativa da estequiometria dos adutos formados entre transferrina (apo e holo) e HSA e os complexos usando-se as técnicas de ultrafiltração, MALDI-MS e ICP; (vii) Avaliação da captação dos complexos por células de glioma humano da linhagem U-87MG quando conjugados à transferrina.

# 3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

# **3.1.** Reagentes e solventes

- Ácido 2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanoico (naproxeno) Rhamus
- Ácido 2-(3-benzoilfenil)propanoico (cetoprofeno) Sigma-Aldrich
- Ácido acético, grau de pureza p.a. Merck
- Ácido 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoico (ibuprofeno) Natural Pharma
   Produtos Farmacêuticos Ltda.
- Albumina sérica humana (HSA) grau de pureza 96% Sigma Aldrich
- Anidrido acético, grau de pureza p.a. Merck
- Apo-transferrina humana (apoTf), grau de pureza 98% Sigma Aldrich
- Bicarbonato de sódio, grau de pureza p.a. Merck
- Brometo de potássio, grau espectroscópico PIKE Tecnologia
- Cloreto de lítio, pureza 99% Sigma Aldrich
- Cloreto de rutênio(III).n H<sub>2</sub>O Sigma Aldrich
- Cloreto de sódio, grau de pureza pa Synth
- Dimetilsulfóxido, grau de pureza pa Synth
- DTAF (5-(4,6-diclorotriazinil)aminofluoresceína)) Invitrogen
- Etanol absoluto, grau de pureza p.a. Synth e Merck
- Fluoresceína, grau de pureza pa Cromoline Química Fina
- Fosfato de sódio monobásico anidro, grau de pureza p.a. Synth
- Gás nitrogênio, grau de pureza industrial White Martins
- Gás oxigênio, grau de pureza medicinal White Martins

- Hepes (Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico), grau de pureza
   99% Avocado
- Hexafluorofostafo de amônio, pureza 99,99% Aldrich
- Holo-transferrina humana (hTf), grau de pureza 98% Sigma Aldrich
- Lisina Fluka
- Pentóxido de fósforo Vetec Química
- Solução padrão de rutênio para absorção atômica 1000 ppm Sigma Aldrich
- Sulfato ferroso amoniacal, grau de pureza pa Carlo Erba
- Tris(hidroximetil)aminometano Sigma Aldrich
- Varfarina, grau de pureza 98% Sigma Aldrich

# 3.2. Técnicas aplicadas

# 3.2.1. Análise elementar

Os percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram determinados por análise elementar no equipamento Elementar Analyzer CHN, modelo 2400 da Perkin-Elmer no laboratório da Central Analítica do IQ-USP.

# 3.2.2. Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido (ICP-OES)

A concentração de Ru nas amostras foi determinada no espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado - Spectro, modelo Arcos com visão radial (SOP), no laboratório da Central Analítica do IQ-USP.

#### 3.2.3. Espectroscopia eletrônica

Para aplicar-se a correção do efeito de filtro interno no experimento de interação da hTf com os complexos de Ru<sub>2</sub> por espectroscopia de fluorescência, os espectros eletrônicos de absorção das soluções foram registrados no espectrofotômetro Perkin Elmer, Lambda25, no intervalo de 250 a 400 nm. Nos demais experimentos, utilizou-se o espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1650PC, no intervalo de 190 a 1100 nm. Em ambos, utilizaram-se cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm.

#### 3.2.4. Espectroscopia vibracional no infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho (4000 a 400 cm<sup>-1</sup>) foram registrados no aparelho ABB Bomem – série MB, modelo 102, pela técnica de reflectância difusa. As amostras, no estado sólido, foram maceradas e misturadas com brometo de potássio (KBr) em almofariz de ágata e introduzidas no porta amostra. Os espectros obtidos foram registrados no modo transmitância.

## 3.2.5. Espectroscopia de dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular foram registrados no espectropolarímetro JASCO, modelo J-815, com controlador de temperatura Peltier, no laboratório da Central Analítica. Para as análises de caracterização dos complexos, utilizou-se o intervalo de 200 – 600 nm, temperatura ambiente, e cubetas de 1 ou 10 mm de caminho óptico. As soluções foram preparadas em água (RuAc) ou etanol (Ruibp, Ruceto e Runpx), em concentrações de 0,1 (RuAc, Ruibp e Ruceto) ou 0,05 mmol L<sup>-1</sup> (Runpx). Para as análises de interação dos complexos com a transferrina, utilizou-se o intervalo de 200 – 260 nm, a 37°C e cubetas de 1 mm de caminho óptico, e as amostras foram preparadas conforme o item 3.4.2.

## 3.2.6. Susceptibilidade magnética

As medidas de susceptibilidade magnética foram realizadas utilizando-se o método de Faraday, com auxílio de uma balança analítica Shimadzu modelo AUW-220D. Como padrão utilizou-se o tetra(tiociano)cobaltato de mercúrio(II), Hg[Co(SCN)<sub>4</sub>], que apresenta o valor de susceptibilidade ( $\chi_p$ ) tabelado em 16,44 x 10<sup>-6</sup> unidades CGS/Gauss a 20°C e  $\theta$  = +10°. As medidas das massas da amostra, do padrão e do porta-amostra foram efetuadas em triplicata, na presença e ausência de campo magnético (1 Tesla) e em temperatura ambiente. Os valores de susceptibilidade magnética das amostras foram calculados com base no procedimento descrito a seguir [25]:

A partir dos valores de massas (~ 20 mg) da amostra e do padrão, calculou-se a medida da susceptibilidade magnética por unidade de massa da amostra ( $\chi_a$ ) de acordo com a equação 3.1. Nesta equação, os termos  $\chi_a \in \chi_p$  são as susceptibilidades magnéticas por unidade de massa da amostra e do padrão, respectivamente,  $m_a e m_p$  são as massas da amostra e do padrão, respectivamente,  $\Delta_a e \Delta_p$  são as diferenças entre as massas da amostra (*a*) e padrão (*p*) com campo magnético e sem campo magnético,  $\delta_a e \delta_b$  são as diferenças entre as massas do porta-amostra da amostra (*a*) e do padrão (*p*) com campo magnético e sem campo magnético.

$$\chi_a = \chi_p \left( \frac{\Delta_a - \delta_a}{\Delta_p - \delta_p} \right) \left( \frac{m_p}{m_a} \right) \qquad \qquad Eq. 3.1$$

Em seguida, o valor da susceptibilidade magnética molar da amostra ( $\chi_M$ ) pôde ser calculado utilizando-se a equação 3.2, sendo MM a massa molar do composto:

$$\chi_M = \chi_a \times MM \qquad \qquad Eq. 3.2$$

Na sequência determinou-se o valor da susceptibilidade magnética molar corrigida da amostra ( $\chi'_M$ ) (Eq. 3.3), levando em consideração a contribuição diamagnética de íons e ligantes presentes no complexo, sendo estas correções diamagnéticas estimadas usando-se as constantes de Pascal [29]. Os valores utilizados como correção diamagnética são mostrados na Tabela 3.1.

$$\chi_{M} = \chi_{M} - correções diamagnéticas Eq. 3.3$$

Íons / Ligantes	Valor da correção (10 <sup>-6</sup> unidades CGS)
H <sub>2</sub> O	-13
Ru <sup>2+</sup>	-23
Naproxenato	-74
Hexafluorofosfato (PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> )	-64
Acetato (CH₃COO⁻)	-30
Ibuprofenato (C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> COO <sup>-</sup> )	-86,6
Cetoprofenato (C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> OCOO <sup>-</sup> )	-40,2
Cl	-20,1

Tabela 3.1. Contribuição magnética dos íons.

O valor do momento magnético efetivo da amostra ( $\mu_{ef}$ ) foi calculado utilizando-se a equação 3.4, sendo T a temperatura em Kelvin.

$$\mu_{ef} = 2,84\sqrt{\chi'_M \times T} \qquad \qquad Eq. 3.4$$

Por fim, o número de elétrons desemparelhados da amostra (*n*) pode ser estimado pela equação 3.5.

$$\mu = \sqrt{n(n+2)} \qquad \qquad Eq. 3.5$$

## 3.2.7. Espectroscopia de fluorescência

Os espectros de emissão das amostras dos experimentos de avaliação da fluorescência intrínseca da transferrina (apo e holo) e da HSA sob a interação com os complexos Ru<sub>2</sub> foram registrados no Fluorímetro Varian, modelo Cary Eclipse, acoplado ao banho termostático Lauda Master Proline RP 845, usando-se cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. Os parâmetros instrumentais foram:  $\lambda_{emissão}$ : 310 – 400 nm,  $\lambda_{excitação}$ : 295 nm, velocidade de scan (*scan rate*): 120 nm min<sup>-1</sup>, tempo de aquisição (*averaging time*): 0,5 s, abertura das fendas de excitação e emissão (*slit widht excitation / emission*): 10 / 10 nm, intervalo dos dados (*data interval*): 1 nm e voltagem da fotomultiplicadora (*PMT voltage*): 610 V – 650 V (exceto para estudos com hTf, onde utilizou-se 730 V).

Para os estudos competitivos entre varfarina e complexos Ru<sub>2</sub> utilizou-se o mesmo equipamento com  $\lambda_{emissão}$ : 330 – 450 nm,  $\lambda_{excitação}$ : 310 nm, abertura das fendas de excitação e emissão (*slit widht excitation / emission*): 5 nm / 10 nm, voltagem da fotomultiplicadora (*PMT voltage*): 700 V – 750 V e demais condições iguais às dos experimentos anteriores. Esses experimentos foram realizados no Laboratório do Prof. Erick Leite Bastos.

As medidas de emissão do experimento de interação da apotransferrina fluorescente (Fl-aTf) com os complexos Ru<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CR foram registradas no Fluorímetro FLUOstar Optima (BMG Labtech) Microplate Reader usando-se microplacas de 96 poços de poliestireno. Os parâmetros instrumentais foram:  $\lambda_{excitação}$  = 485 nm e  $\lambda_{emissão}$  = 520 nm. O experimento foi realizado no Laboratório do Prof. Breno Pannia Espósito.

#### 3.2.8. Espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS)

Os espectros de massas foram registrados no equipamento Bruker Ultraflextreme (método de ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz e analisador do tipo tempo de voo), no laboratório na Central Analítica do IQ-USP. As amostras foram diluídas na matriz ácido sinapínico, SA, em uma proporção de 1µL:2µL (amostra:matriz), para análise na faixa de razão m/z 20000 – 200000, e na matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, HCCA, dissolvida em meio 30% acetonitrila e 0,1% ácido trifluoroacético, na proporção de 1µL:2µL (amostra:matriz), para análise na faixa de razão m/z 600 – 4000. Na placa foi aplicado 1 µL da mistura.

## 3.3. Síntese dos tetracarboxilatos de dirutênio(II,III)

O complexo precursor  $[Ru_2(\mu-O_2CCH_3)_4Cl]$  (RuAc), foi sintetizado conforme descrito na literatura [17], assim como os complexos  $[Ru_2(ibp)_4Cl]$  (Ruibp) [24] e  $[Ru_2(cet)_4Cl]$  (Ruceto) [28]. O complexo  $[Ru_2(npx)_4(H_2O)_2]PF_6$  foi sintetizado conforme o método descrito na literatura [24] com algumas modificações. O procedimento usado é descrito a seguir.

A uma solução contendo 0,2010 g (0,3245 mmol) de [Ru<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (sintetizado conforme método descrito em trabalho anterior do grupo por outro aluno [25]) em 30 mL de água deionizada, foram adicionados 20 mL de etanol absoluto, uma solução contendo 0,2990 g (1,299 mmol) de naproxeno em 25 mL de etanol absoluto e uma solução contendo 0,4500 g de NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> em 10 mL de água deionizada. A solução foi mantida sob agitação, fluxo de N<sub>2</sub> através do meio reacional e aquecimento em banho maria à temperatura de aproximadamente 60°C durante 3 h. Após esse período o sobrenadante foi removido, o produto aderido foi lavado com água deionizada, dissolvido em aproximadamente 15 mL de etanol absoluto e transferido para um béquer. A solução foi mantida em congelador até o dia seguinte e depois foi filtrada em papel de filtro simples. O filtrado foi evaporado sob atmosfera de N<sub>2</sub>, em banho maria à temperatura de aproximadamente 50°C. Após a completa secagem do produto, o mesmo foi novamente lavado com água deionizada, e em seguida mantido em dessecador com P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e sílica-gel. Rendimento: 81,4%.

#### **3.4.** Estudos com Transferrina (apo e holo)

Nos estudos com as proteínas utilizou-se solução de tampão fisiológico pH 7,4 como meio de diluição, com a seguinte composição: 0,004 mol L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,025 mol L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> e 0,1 mol L<sup>-1</sup> NaCl. Em alguns casos, utilizou-se uma solução com o dobro das concentrações, e essa solução foi denominada tampão fisiológico 2x. A composição nesse caso foi de: 0,008 mol L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 mol L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> e 0,2 mol L<sup>-1</sup> NaCl.

As soluções das proteínas foram preparadas pesando-se uma quantidade da mesma e dissolvendo-se em água ou tampão fisiológico, e as concentrações foram calculadas com base em sua massa molar de aproximadamente 80 kDa.

A incubação das amostras nas temperaturas de 10 e 25°C foi feita em banho ultratermostático e a 37°C na incubadora Tecnal, modelo TE420.

## 3.4.1. Espectroscopia eletrônica

## 3.4.1.1. Estudos cinéticos

Para avaliação da cinética de interação entre a apoTf e RuAc, transferiu-se 1000  $\mu$ L de solução de RuAc (1 mmol L<sup>-1</sup>) para um compartimento da cubeta tandem, e 1000  $\mu$ L de solução de apoTf (1 mmol L<sup>-1</sup>) para o outro compartimento, ambos em tampão fisiológico pH 7,4. A cubeta foi deixada no porta-amostras do espectrofotômetro por cerca de 10 min para

estabilização da temperatura (37°C), e fez-se o registro do espectro antes da mistura. As soluções foram então misturadas e imediatamente iniciaram-se os registros dos espectros eletrônicos com o tempo, até o período máximo de 24h. A concentração final das soluções ficou sendo a metade da inicial (0,5 mmol L<sup>-1</sup>, razão molar apoTf:RuAc de 1:1).

Para avaliação da cinética de interação entre hTf e RuAc, transferiram-se 480  $\mu$ L de solução de hTf em tampão fisiológico pH 7,4 (0,105 mmol L<sup>-1</sup>) para uma cubeta de microvolume de 1,0 cm de caminho óptico. Aguardou-se o tempo de 5 min para estabilização da temperatura (37°C) e registrou-se o espectro. Adicionaram-se 20  $\mu$ L de solução de RuAc em água (2,5 mmol L<sup>-1</sup>). Após homogeneização, os espectros eletrônicos foram registrados com o tempo por um período de 2 h. A concentração final da solução foi de 0,1 mmol L<sup>-1</sup> de hTf e 0,1 mmol L<sup>-1</sup> de RuAc, razão molar hTf:RuAc de 1:1.

Para avaliação da cinética de interação entre apoTf (e hTf) e os complexos Ruibp, Ruceto e Runpx, utilizou-se o mesmo procedimento: transferiram-se 490 μL de solução de Tf em tampão fisiológico pH 7,4 (apoTf 0,1 mmol L<sup>-1</sup> ou hTf 0,05 mmol L<sup>-1</sup>) para uma cubeta de microvolume de 1,0 cm de caminho óptico. Aguardou-se o tempo de 5 min para estabilização da temperatura (37°C) e registrou-se o espectro. Adicionaram-se 10 μL de solução do complexo (Ruibp, Ruceto ou Runpx) em etanol (5 mmol L<sup>-1</sup> para apoTf, e 2,5 mmol L<sup>-1</sup> para hTf). Após homogeneização, os espectros eletrônicos foram registrados com o tempo por um período de 2 h. A concentração final da solução foi de 0,1 mmol L<sup>-1</sup> de apoTf e 0,1 mmol L<sup>-1</sup> de complexo, ou 0,05 mmol L<sup>-1</sup> de hTf e 0,05 mmol L<sup>-1</sup> de complexo, razão molar apoTf:RuAc e hTf:RuAc de 1:1, com concentração de etanol de 2% v/v.

## 3.4.1.2. Cálculos das constantes de ligação

Para estimar as constantes de ligação da apoTf e hTf aos complexos, realizaram-se titulações espectrofotométricas, mantendo-se fixa a quantidade de proteína, e variando a razão molar proteína:complexo de 1:0 até 1:10, com incrementos de 0,5. O experimento foi realizado em duplicata.

Transferiram-se os volumes de solução de proteínas em tampão fisiológico pH 7,4 dados na Tabela 3.2 para uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. A cubeta foi colocada no espectrofotômetro por aproximadamente 10 min para estabilização da temperatura (37°C). Em seguida adicionaram-se 20 alíquotas de solução de complexos com as concentrações dadas na Tabela 3.2 sucessivamente, aguardando-se 5 min e registrando-se o espectro eletrônico após cada adição. No caso do experimento com RuAc, o mesmo procedimento foi realizado utilizando-se apenas tampão fisiológico no lugar da solução de proteína. As soluções de RuAc foram preparadas em tampão fisiológico pH 7,4 e a dos complexos RuFaines em uma mistura de água/etanol, na proporção de 40 / 60% (v/v).

		Volume de solução de proteína (mL)	Concentração da solução de proteína (mol L <sup>-1</sup> )	Volume da alíquota de solução de complexo adicionada (µL)	Concentração da solução de complexo utilizada como titulante (mol L <sup>-1</sup> )
	RuAc	2,33	1,08 x 10 <sup>-3</sup>	46	2,72 x 10 <sup>-3</sup>
оTf	Ruibp	2,30	2,09 x 10⁻⁵	20	1,21 x 10 <sup>-3</sup>
apo	Ruceto	2,30	2,09 x 10⁻⁵	18,3	1,31 x 10 <sup>-3</sup>
	Runpx	2,40	2,05 x 10 <sup>-5</sup>	18,8	1,23 x 10 <sup>-3</sup>

Tabela 3.2. Volumes e concentrações das soluções de proteínas e complexos utilizadas nos experimentos de determinação das constantes de ligação dos adutos formados nas reações entre Tf e Ru<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CR.

		Volume de solução de proteína (mL)	Concentração da solução de proteína (mol L <sup>-1</sup> )	Volume da alíquota de solução de complexo adicionada (µL)	Concentração da solução de complexo utilizada como titulante (mol L <sup>-1</sup> )
	RuAc	2,35	5,33 x 10 <sup>-5</sup>	40	1,27 x 10 <sup>-3</sup>
Τf	Ruibp	2,18	1,63 x 10⁻⁵	20	8,86 x 10 <sup>-4</sup>
<u>م</u>	Ruceto	2,30	1,60 x 10 <sup>-5</sup>	20	9,19 x 10 <sup>-4</sup>
	Runpx	2,30	1,60 x 10 <sup>-5</sup>	20	9,02 x 10 <sup>-4</sup>

## 3.4.2. Espectroscopia de dicroísmo circular

As medidas de espectroscopia de dicroísmo circular foram realizadas na região do ultravioleta (190-260 nm), variando-se a razão molar proteína:complexo de 1:0 até 1:20. Todas as medidas foram realizadas a 37°C, com velocidade de varredura de 50 nm min<sup>-1</sup>, acúmulo de 3 espectros, largura de banda de 1 nm e DIT (*data integration time*) de 0,5 s. A concentração de apoTf foi mantida constante (5  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) e a dos complexos foi variada (0 a 100  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>).

Para o sistema apoTf / RuAc, as soluções estoque foram preparadas em tampão fisiológico pH 7,4. Transferiram-se 100  $\mu$ L de solução de apoTf (2,0 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) para 11 poços de uma microplaca acrílica de 96 poços, volumes entre 0 e 300  $\mu$ L de solução de RuAc (0,1 mmol L<sup>-1</sup> ou 1 mmol L<sup>-1</sup>) e quantidade suficiente de tampão fisiológico pH 7,4 para completar 400  $\mu$ L. A placa foi mantida em incubadora (37°C) por 30 min, e em seguida registraram-se os espectros de dicroísmo circular.

Para os sistemas apoTf / RuFaines, a solução estoque de apoTf foi preparada em tampão fisiológico pH 7,4 e as dos complexos Ruibp, Ruceto e Runpx em etanol. Para cada

sistema, transferiram-se 360  $\mu$ L de apoTf (5,75  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) para 11 poços de uma microplaca acrílica de 96 poços, volumes entre 0 e 40  $\mu$ L de soluções dos complexos (0,1 mmol L<sup>-1</sup> ou 1 mmol L<sup>-1</sup>) e quantidade suficiente de etanol para completar 400  $\mu$ L, de maneira que a concentração final de etanol foi 10% v/v em todas as amostras. A placa foi mantida em incubadora (37°C) por 24 h, e em seguida registraram-se os espectros de dicroísmo circular.

Os espectros foram registrados em unidades de *mdeg* (*milidegrees* ou miligraus); no entanto, a escala deve ser normalizada em termos de elipticidade molar da molécula toda ou de uma unidade de repetição (ligação peptídica). Por isso, os espectros registrados em *mdeg* foram convertidos a  $[\theta]_{MRW}$  (graus cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>) através das relações a seguir.

A elipticidade molar residual média em dado comprimento de onda  $\lambda$  ([ $\theta$ ]<sub>MRW, $\lambda$ </sub>) é calculada pela Equação 3.6, onde  $\theta_{\lambda}$  é a elipticidade (em graus) no  $\lambda$  determinado, d é o comprimento do caminho ótico (cm) e c é a concentração (g/mL). A massa média do resíduo (MRW, *mean residue weight*) para a ligação peptídica é calculada pela fórmula: *MRW* = M/(N-1), onde M é a massa molar da cadeia polipeptídica (em Da) e N é o número de aminoácidos na cadeia; o número de ligações peptídicas na cadeia é N-1 [73].

$$[\theta]_{MRW,\lambda} = MRW \times \frac{\theta_{\lambda}}{10} \times d \times c \qquad \qquad Eq. 3.6$$

A estimativa das frações de cada tipo de estrutura secundária foi realizada usando-se os programas CDSSTR, CONTIN e SELCON3, implementados no pacote CDPro [74], disponível *online* no endereço http://sites.bmb.colostate.edu/sreeram/CDPro/. A unidade utilizada nesses programas é a absortividade molar diferencial  $\Delta \varepsilon$ . A relação matemática entre  $[\theta]_{MRW,\lambda}$  e  $\Delta \varepsilon$  é definida como  $[\theta]_{MRW,\lambda}$  = 3298 x  $\Delta \varepsilon$  [73]. Os espectros foram previamente convertidos a  $\Delta \varepsilon$  e os dados foram tratados nos programas em seguida. Foi feita a média aritmética dos resultados encontrados nos três programas, conforme indicado na literatura [74].

## 3.4.3. Espectroscopia de fluorescência

#### 3.4.3.1. Fluorescência intrínseca

Os espectros de emissão foram registrados no intervalo de 310 – 400 nm, com excitação em 295 nm (seletiva para Trp), variando-se a razão molar proteína:complexo de 1:0 até 1:10 ou 1:20. As medidas foram realizadas em 10, 25 e 37°C, nas condições instrumentais citadas no item 3.2.7. As concentrações de apoTf e hTf foram mantidas constantes (1  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) e as dos complexos foi variada (0 a 10 ou 20  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>). A seguir o procedimento detalhado para cada sistema.

ApoTf / RuAc. Transferiu-se 1,0 mL de solução de apoTf (2,0 x  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão fisiológico pH 7,4 2x) para 13 microtubos de 2 mL. Em seguida adicionaram-se alíquotas de volume entre 0 e 800 µL de solução de RuAc (5,0 x  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em água), e volume de água suficiente para completar 2 mL. As amostras foram incubadas nas temperaturas de 10 e 25°C por 24 h, e em seguida registraram-se seus espectros de absorção e emissão.

ApoTf / RuFaines. Transferiu-se 1,0 mL de solução de apoTf (2,0 x  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão fisiológico pH 7,4 2x) para 13 microtubos de 2 mL. Em seguida adicionaram-se 960  $\mu$ L de água e 40,0  $\mu$ L de soluções de RuFaine em etanol (com concentrações variando de 2,5 x  $10^{-5}$  a 1,0 x  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>). As amostras foram incubadas nas temperaturas de 10 e 25°C por 24 h, e em seguida registraram-se seus espectros de absorção e emissão.

hTf / RuAc e apoTf / RuAc (37°C). Transferiu-se 1,0 mL de solução de Tf (2,0 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> em tampão fisiológico pH 7,4 2x) para 15 microtubos de 2 mL. Em seguida adicionaram-se alíquotas de volume entre 0 e 1000  $\mu$ L de solução de RuAc (2,0 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> em água), e

volume de água suficiente para completar 2 mL. As amostras foram incubadas a 37°C por 24 h, e em seguida registraram-se seus espectros de absorção e emissão.

hTf / RuFaines e apoTf / RuFaines (37°C). Transferiu-se 1 mL de solução de Tf (2,0 x  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão fisiológico pH 7,4 2x) para 15 microtubos de 2 mL. Em seguida adicionaram-se 960 µL de água e 40,0 µL de soluções de RuFaine em etanol (com concentrações variando de 1,0 x  $10^{-5}$  a 5,0 x  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>). As amostras foram incubadas a 37°C por 24 h, e em seguida registraram-se seus espectros de absorção e emissão.

Quando a absorbância da solução foi maior que 0,1, a intensidade de emissão foi corrigida pela equação 3.7 para considerar o efeito de filtro interno [75], [76]. Os termos  $F_{corr}$  e  $F_{obs}$  referem-se às intensidades corrigida e observada, respectivamente, os termos  $A_{ex}$  e  $A_{em}$  são as absorbâncias registradas em caminho óptico de 1,0 cm nos comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente.

$$F_{corr} = F_{obs} \times 10^{\frac{A_{ex} + A_{em}}{2}} \qquad \qquad Eq. 3.7$$

# 3.4.3.2. apoTf marcada com a sonda fluorescente DTAF (5-(4,6diclorotriazinil)aminofluoresceína))

#### Preparação da apoTf fluorescente (Fl-aTf)

A apoTf marcada com a sonda fluorescente (FI-aTf) foi preparada conforme o procedimento descrito na literatura [77]. 16 mg de apoTf foram dissolvidos em 2,0 mL de solução de NaHCO<sub>3</sub> 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 8,3. Adicionaram-se 20,0  $\mu$ L de solução de DTAF 10 mmol L<sup>-1</sup> (em DMSO) e a solução foi incubada a 37°C por 30 min, ao abrigo da luz, com agitação suave. Adicionaram-se 20,0  $\mu$ L de lisina 0,5 mol L<sup>-1</sup> pH ~ 8 (em solução de NaHCO<sub>3</sub> 100 mmol L<sup>-1</sup>). A solução foi transferida para uma membrana de diálise (*cutoff* 12000 Da,

Sigma) e foi dialisada contra tampão HBS pH 7,4 (20 mmol L<sup>-1</sup> Hepes, 150 mmol L<sup>-1</sup> NaCl) em geladeira, ao abrigo da luz, por aproximadamente 20 h, com agitação.

A concentração do marcador fluorescente da FI-aTf foi determinada através da comparação da sua fluorescência com a de uma solução padrão de Fluoresceína (FI). Mediram-se as emissões de uma solução de FI-aTf ( $\approx 5 \mu$ mol L<sup>-1</sup>, obtida da diluição de 50  $\mu$ L / 1000  $\mu$ L em HBS) e de uma solução de FI 5  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>. Calculou-se a concentração de FI-aTf pela fórmula a seguir, onde [FI-aTf] e [FI] são as concentrações da apoTf fluorescente e fluoresceína, respectivamente, e *I*<sub>FI-aTf</sub> e *I*<sub>FI</sub> são as intensidades de emissão das soluções de FI-aTf e FI, respectivamente.

$$[Fl - aTf] = \frac{[Fl] \times I_{Fl - aTf}}{I_{Fl}}$$

A reação entre apoTf e DTAF tem uma estequiometria de 1:1. Os resultados das medidas de fluorescência são mostrados na Tabela 3.3 para o cálculo da concentração de fluoróforo.

Amostro	Intensidade de emissão (u.a.)		
Amostra	Leitura 1	Leitura 2	Média
Fluoresceína 5 µmol L <sup>-1</sup>	20100	19068	19584
Fl-aTf 5 $\mu$ mol L <sup>-1</sup>	24323	24471	24397

Tabela 3.3. Medidas da fluorescência emitida pelas soluções de FI-Tf e FI.

A concentração calculada de FI-aTf foi de 4,0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, e a concentração inicial, considerando a diluição foi de 80,3  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>. A concentração de apoTf, calculada pela massa de proteína pesada na preparação (16,0 mg / 2 mL) é de 100  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>. A razão molar proteína:fluoróforo é de 1:0,80. A razão determinada na referência 74 foi de 1:0,84.

## Interação dos compostos com FI-aTf

O experimento de interação dos compostos RuAc, Ruibp, Runpx, Ru(III) (proveniente de uma solução padrão de absorção atômica) e Fe(II) (proveniente do sal  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O)$  com a FI-aTf foi realizado como segue:

Os complexos Runpx e Ruibp foram dissolvidos em DMSO. O complexo RuAc e o sal Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O foram dissolvidos em água deionizada. A solução padrão de Ru(III) foi diluída em água deionizada. Essas soluções foram diluídas em Fl-aTf 4 µmol L<sup>-1</sup> em concentrações variando de 0 a 150 µmol L<sup>-1</sup> (em Ru ou Fe), em tampão fisiológico pH 7,4 em uma microplaca de 96 poços. Em paralelo, foram preparadas soluções contendo Fluoresceína no lugar da Fl-aTf. A microplaca foi incubada por 1 h a 37°C. Após esse período, registrou-se a fluorescência emitida em 520 nm, com  $\lambda_{exc}$  = 485 nm, a 37°C, no leitor de microplacas FLUOstar Optima. A concentração final de DMSO foi de 5% (v/v).

O efeito de filtro interno foi corrigido descontando-se a supressão observada nas soluções de fluoresceína, contendo a mesma concentração Fl-aTf.

## 3.4.4. Ultrafiltração e análise por MALDI-MS e ICP-OES

300 µL das soluções estoque do complexo RuAc (2,0 mmol L<sup>-1</sup> em água deionizada) e do padrão de absorção atômica de Ru(III) (4,0 mmol L<sup>-1</sup> em água deionizada), e dos complexos Ruibp, Ruceto e Runpx (2,0 mmol L<sup>-1</sup> em etanol) foram diluídas em 1000 µL de solução de apoTf ou hTf (0,06 mmol L<sup>-1</sup> em tampão fisiológico pH 7,4 2x) e 700 µL de água deionizada, dando soluções contendo proteínas e complexos em uma razão molar proteína:complexo de 1:10 (ou 1:20, no caso da solução de Ru(III)), e contendo 15% etanol v/v, no caso das amostras de RuFaines. As soluções foram incubadas por 15 min a 37°C. Após esse período as soluções foram transferidas para tubos Amicon<sup>®</sup> Ultra-4 30K e centrifugadas por 3 – 6 min a 7000 rpm na centrífuga Hermle, modelo Z 383. O concentrado proteico foi lavado 2 vezes com tampão fisiológico para garantir a remoção de complexo que não interagiu com as proteínas. As soluções concentradas (aproximadamente 500 μL) foram então transferidas para microtubos e diluídas a um volume final de 2,0 mL com tampão fisiológico.

As amostras assim preparadas foram analisadas por MALDI-TOF-MS conforme descrito no item 3.2.8. Para determinação da concentração de Ru, 1000 µL de cada amostra foi diluída a 25,0 mL em HCl 3,3% e analisadas por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), no Laboratório da Central Analítica do IQ-USP.

#### 3.4.5. Captação celular

O procedimento adotado baseou-se na referência 70. Estes experimentos foram realizados no laboratório de Metabolismo de Células Tumlorais do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB).

As condições de concentração e tempo de incubação foram escolhidas com base nos resultados obtidos em estudos de atividade antiproliferativa em colaboração com o ICB (ainda não publicados). De acordo com esse trabalho, foram selecionadas as concentrações dos complexos que exibem o melhor desempenho quanto à atividade antiproliferativa de células de glioma humano da linhagem U-87MG: Ruibp, 100 μmol L<sup>-1</sup>, Ruceto e Runpx, 200 μmol L<sup>-1</sup>, após 72 h de incubação.

A concentração de Tf foi calculada de forma a manter a razão molar proteína:complexo em 1:2 (tratamentos 1, 2 e 5) [70], mas também realizaram-se testes com a concentração de Tf próxima da encontrada em condições fisiológicas (tratamentos 3 e 4). A presença de Fe(III) no seu sítio de ligação também foi avaliada pela sua adição (na forma sulfato ferroso amoniacal) à apoTf na razão molar proteína:Fe(III) de 1:0,33, que é a condição encontrada naturalmente (tratamentos 2 e 4), além de se utilizar a hTf.

## Cultivo das células e plaqueamento

Células de glioma humano da linhagem U-87 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 50 U/mL – Streptomicina 50  $\mu$ g/mL). As células foram incubadas em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% de ar até atingirem a fase de crescimento exponencial.

As células foram então removidas do frasco com uma solução de tripsina e semeadas em uma placa de 24 poços em triplicata para cada tratamento, com uma densidade de 3 x  $10^4$  células / poço em 500 µL de meio de cultura. Após o período de aderência (aproximadamente 16 h), foram aplicados os tratamentos.

## Preparação dos tratamentos

As células foram tratadas com os complexos Ruibp, Ruceto e Runpx e seus conjugados com apoTf e hTf. A Tabela 3.4 relaciona as concentrações usadas. As soluções estoque de apoTf e hTf foram preparadas em tampão fisiológico pH 7,4 e as soluções dos complexos RuFaines em etanol.

Para o tratamento 1, diluiu-se 75  $\mu$ L de solução de apoTf (1,0 mmol L<sup>-1</sup> para Ruibp e 2,0 mmol L<sup>-1</sup> para Ruceto e Runpx), 60  $\mu$ L de solução de tampão fisiológico e 15  $\mu$ L de solução de RuFaine (10 mmol L<sup>-1</sup> para Ruibp e 20 mmol L<sup>-1</sup> para Ruceto e Runpx) em 1350  $\mu$ L de meio de cultura.

Tratamento	Ruibp	Ruceto e Runpx
1	ApoTf (50 μM) + Ruibp (100 μM)	ApoTf (100 μM) + RuFaine (200 μM)
2	ApoTf (50 μM) 30% Fe + Ruibp (100	ApoTf (100 μM) 30% Fe + RuFaine
2	μΜ)	(200 μM)
2	ApoTf conc. fisiológica (40 μM) +	ApoTf conc. fisiológica (40 μM) +
3	Ruibp (100 μM)	Rufaine (200 μM)
Λ	ApoTf conc. Fisiológica 30% Fe (40	ApoTf conc. Fisiológica 30% Fe (40
4	μM) + Ruibp (100 μM)	μM) + Rufaine (200 μM)
5	HoloTf (50 μM) + Ruibp (100 μM)	HoloTf (100 $\mu$ M) + RuFaine (200 $\mu$ M)
6	Ruibp (100 μM)	Rufaine (200 μM)
7	Controle (etanol / tampão)	Controle (etanol / tampão)

Tabela 3.4. Tratamentos aplicados às células U-87 para avaliação da captação celular dos complexos RuFaines.

Para o tratamento 2, diluiu-se 75 µL de solução de apoTf (1,0 mmol L<sup>-1</sup> para Ruibp e 2,0 mmol L<sup>-1</sup> para Ruceto e Runpx), 5 µL de solução de sulfato ferroso amoniacal (5 mmol L<sup>-1</sup> para Ruibp e 10 mmol L<sup>-1</sup> para Ruceto e Runpx), 55 µL de solução de tampão fisiológico e 15 µL de solução de RuFaine (10 mmol L<sup>-1</sup> para Ruibp e 20 mmol L<sup>-1</sup> para Ruceto e Runpx) em 1350 µL de meio de cultura.

Para o tratamento 3, diluiu-se 30  $\mu$ L de solução de apoTf (2,0 mmol L<sup>-1</sup>), 105  $\mu$ L de solução de tampão fisiológico e 15  $\mu$ L de solução de RuFaine (10 mmol L<sup>-1</sup> para Ruibp e 20 mmol L<sup>-1</sup> para Ruceto e Runpx) em 1350  $\mu$ L de meio de cultura.

Para o tratamento 4, diluiu-se 30  $\mu$ L de solução de apoTf (2,0 mmol L<sup>-1</sup>), 2  $\mu$ L de solução de sulfato ferroso amoniacal (10 mmol L<sup>-1</sup>), 103  $\mu$ L de solução de tampão fisiológico e 15  $\mu$ L de solução de RuFaine (10 mmol L<sup>-1</sup> para Ruibp e 20 mmol L<sup>-1</sup> para Ruceto e Runpx) em 1350  $\mu$ L de meio de cultura.

Para o tratamento 5, diluiu-se 75  $\mu$ L de solução de hTf (1,0 mmol L<sup>-1</sup> para Ruibp e 2,0 mmol L<sup>-1</sup> para Ruceto e Runpx), 60  $\mu$ L de solução de tampão fisiológico e 15  $\mu$ L de solução de RuFaine (10 mmol L<sup>-1</sup> para Ruibp e 20 mmol L<sup>-1</sup> para Ruceto e Runpx) em 1350  $\mu$ L de meio de cultura.

Para o tratamento 6, diluiu-se 15 μL de solução de RuFaine (10 mmol L<sup>-1</sup> para Ruibp e 20 mmol L<sup>-1</sup> para Ruceto e Runpx) e 135 μL de solução de tampão fisiológico em 1350 μL de meio de cultura.

Para o tratamento 7 (controle), diluiu-se 15  $\mu$ L de etanol e 135  $\mu$ L de solução de tampão fisiológico em 1350  $\mu$ L de meio de cultura.

Todas as soluções foram preparadas diluindo-se primeiro a solução etanólica do complexo na solução da proteína em tampão fisiológico, e posteriormente a solução do aduto foi diluída no meio de cultura, exceto para o tratamento 6, em que utilizou-se o complexo livre, e nesse caso a solução etanólica do complexo foi diluída diretamente no meio de cultura. As soluções dos complexos foram preparadas momentos antes da aplicação nas células. A concentração final de etanol foi de 1% v/v.

#### Aplicação dos tratamentos

A solução de meio de cultivo foi removida de cada poço da placa contendo as células aderidas, e foi substituída por 500 µL da solução de tratamento, após lavagem das células com aproximadamente 300 µL de solução de PBS (solução tampão salina fosfatada 0,01 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4). Cada tratamento foi aplicado em triplicata. As células foram incubadas novamente em estufa 37°C / 5% CO<sub>2</sub> / 95% ar até a próxima troca de meio de cultivo. Esse procedimento foi realizado 3 vezes, a cada 24 h, até que o tempo total de incubação de 72 h fosse completado, ou seja, nos tempos 0, 24 e 48 h, com o objetivo de garantir o suprimento de nutrientes às células.

### Contagem das células e preparação das amostras para análise de Ru por ICP

Após 72 h de incubação, removeu-se o meio de cultura de todos os poços e fez-se a lavagem das células com solução de PBS. As células foram coletadas com 500 μL de tripsina, que foram transferidos para um microtubo contendo 500 μL de meio de cultura. Realizou-se a contagem de células utilizando-se uma câmara de Neubauer.

As suspensões foram centrifugadas a 1750 rpm por 2 min para isolar o pellet de células. Removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de solução de PBS para lavar qualquer complexo não aderido às células. Este procedimento foi repetido 3 vezes, ressuspendendo-se as células em PBS. Na segunda lavagem, os conteúdos dos 3 microtubos (provenientes dos 3 poços da placa) foram reunidos em um único. Após a centrifugação, removeu-se o sobrenadante da última lavagem, e o pellet de células foi congelado até o momento da análise de Ru por ICP-OES

Na Central Analítica, adicionaram-se 1 mL de ácido nítrico concentrado (65%) e 10 gotas de ácido clorídrico concentrado (37%), e a mistura foi aquecida em sistema fechado na temperatura de 90°C até completa digestão (cerca de 1h). Em seguida a amostra foi diluída a 10 mL com água deionizada. A concentração de Ru foi determinada por ICP-OES.

#### 3.5. Estudos com Albumina

Nos estudos com HSA utilizou-se solução de tampão fisiológico pH 7,4 como meio de diluição, com a seguinte composição: 0,004 mol  $L^{-1}$  NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,025 mol  $L^{-1}$  NaHCO<sub>3</sub> e 0,1 mol

L<sup>-1</sup> NaCl. Em alguns casos, utilizou-se uma solução com o dobro das concentrações, e essa solução foi denominada tampão fisiológico 2x. A composição nesse caso foi de: 0,008 mol L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 mol L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> e 0,2 mol L<sup>-1</sup> NaCl.

As soluções das proteínas foram preparadas pesando-se uma quantidade da mesma e dissolvendo-se em água ou tampão fisiológico, e as concentrações foram calculadas com base em sua massa molar de aproximadamente 66 kDa.

A incubação das amostras nas temperaturas de 10 e 25°C foi feita em banho ultratermostático e a 37 e 45°C na incubadora Tecnal, modelo TE420.

### 3.5.1. Espectroscopia de Fluorescência

## 3.5.1.1. Fluorescência intrínseca

Os espectros de emissão foram registrados no intervalo de 310 – 400 nm, sob excitação em 295 nm (seletiva para Trp), variando-se a razão molar proteína:complexo de 1:0 até 1:20 (faixa alta) e 1:0,2 até 1:2 (faixa baixa). As medidas foram realizadas em 10, 25, 37 e 45°C, nas condições instrumentais citadas no item 3.2.7. A seguir o procedimento detalhado para cada sistema.

HSA / RuAc (faixa alta). Transferiu-se 100  $\mu$ L de solução de HSA (4,0 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> em água deionizada) para microtubos de 2 mL. Em seguida adicionaram-se alíquotas de volume entre 0 e 800  $\mu$ L de solução de RuAc (1,0 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> em água), 1000  $\mu$ L de tampão fisiológico pH 7,4 2x e volume de água suficiente para completar 2 mL. As amostras foram incubadas nas temperaturas de 10, 25, 37 e 45°C por 24 h, e em seguida registraram-se seus espectros de absorção e emissão.

HSA / RuFaines (faixa alta). Transferiu-se 100  $\mu$ L de solução de HSA (4,0 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> em ´gua deionizada) para microtubos de 2 mL. Em seguida adicionaram-se 1000  $\mu$ L de tampão fisiológico pH 7,4 2x, 860  $\mu$ L de água deionizada e 40,0  $\mu$ L de soluções de RuFaine em etanol (com concentrações variando de 5,0 x 10<sup>-5</sup> a 2,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>). As amostras foram incubadas nas temperaturas de 10, 25 e 37°C por 24 h, e em seguida registraram-se seus espectros de absorção e emissão.

HSA / RuFaines (faixa baixa). Transferiram-se 1000 µL de solução de HSA (8,0 x  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão fisiológico pH 7,4 2x para microtubos de 2 mL. Em seguida adicionaramse 960 µL de água deionizada e 40,0 µL de soluções de RuFaine em etanol (com concentrações variando de 4,0 x  $10^{-5}$  a 4,0 x  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>). As amostras foram incubadas na temperatura de 37°C por 24 h, e em seguida registraram-se seus espectros de absorção e emissão.

# 3.5.1.2. Estudos competitivos entre os complexos Ru<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CR (RuAc, Ruibp, e Ruceto) e varfarina pelo sítio I da HSA

A varfarina é um fármaco anticoagulante que se liga especificamente ao sítio I da HSA com alta afinidade. O seu deslocamento da HSA tem sido usado para monitorar a interação de outras moléculas ligantes com a proteína. O aduto Albumina-Varfarina {HSA-varf} foi preparado misturando-se concentrações equimolares das duas substâncias, e deixando-se reagir a 37°C por 30 min [46]. Para a solução de {HSA-varf} de concentração 8 µmol L<sup>-1</sup>, diluíram-se 3,78 mL de solução de HSA (423 µmol L<sup>-1</sup> em tampão fisiológico pH 7,4 2x) e 164 µL de solução de varfarina (9,7 mmol L<sup>-1</sup> em etanol) em tampão fisiológico pH 7,4 2x, completando-se o volume a 200 mL em balão volumétrico. Para a solução de {HSA-varf} de concentração 4 µmol L<sup>-1</sup>, diluíram-se 2,0 mL de solução de HSA (400 µmol L<sup>-1</sup> em tampão fisiológico pH 7,4 2x) e 100 µL de solução de varfarina (8,0 mmol L<sup>-1</sup>

fisiológico pH 7,4 2x, completando-se o volume a 200 mL em balão volumétrico. O procedimento detalhado para cada sistema é descrito a seguir.

{HSA-varf} / RuAc (faixa alta). Transferiram-se 1000 µL de solução de {HSA-varf} (4,0 x  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão fisiológico pH 7,4 2x) para microtubos de 2 mL. Em seguida adicionaram-se alíquotas de volume entre 0 e 800 µL de solução de RuAc (1,0 x  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> em água deionizada), e água deionizada suficiente para completar 2 mL. As amostras foram incubadas na temperatura de 37°C por 24 h, e em seguida registraram-se seus espectros de absorção e emissão.

{HSA-varf} / RuAc (faixa baixa). Transferiram-se 1000 µL de solução de {HSA-varf} (8,0 x  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão fisiológico pH 7,4 2x) para microtubos de 2 mL. Em seguida adicionaram-se alíquotas de volume entre 0 e 800 µL de solução de RuAc (2,0 x  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em água) e volume de água suficiente para completar 2 mL. As amostras foram incubadas na temperatura de 37°C por 24 h, e em seguida registraram-se seus espectros de absorção e emissão.

{HSA-varf} / RuFaines (faixa alta). Transferiram-se 1000 µL de solução de {HSA-varf} (4,0 x  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão fisiológico pH 7,4 2x) para microtubos de 2 mL. Em seguida adicionaram-se 960 µL de água deionizada e 40,0 µL de soluções de RuFaine em etanol (com concentrações variando de 5,0 x  $10^{-5}$  a 2,0 x  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>). As amostras foram incubadas na temperatura de 37°C por 24 h, e em seguida registraram-se seus espectros de absorção e emissão.

{HSA-varf} / RuFaines (faixa baixa). Transferiram-se 1000  $\mu$ L de solução de HSA (8,0 x  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão fisiológico pH 7,4 2x) para microtubos de 2 mL. Em seguida adicionaram-se 960  $\mu$ L de água deionizada e 40,0  $\mu$ L de soluções de RuFaine em etanol (com concentrações variando de 4,0 x  $10^{-5}$  a 4,0 x  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>). As amostras foram incubadas na

temperatura de 37°C por 24 h, e em seguida registraram-se seus espectros de absorção e emissão.

## 3.5.2. Ultrafiltração e análise por MALDI-MS e ICP-OES

1000 μL das soluções estoque do complexo RuAc (3 mmol L<sup>-1</sup> em água deionizada) e do padrão de absorção atômica de Ru(III) (6 mmol L<sup>-1</sup> em água deionizada), foram misturadas a 1000 μL de solução de HSA (0,3 mmol L<sup>-1</sup> em água deionizada), 300 μL de tampão fisiológico pH 7,4 e 700 μL de água deionizada, dando soluções contendo HSA e RuAc em uma razão molar de 1:10 (HSA:Ru<sub>2</sub>) e HSA e Ru(III) em uma razão molar de 1:20 (HSA:Ru).

600 μL de soluções dos complexos Ruibp, Ruceto e Runpx (1 mmol L<sup>-1</sup> em etanol) foram misturadas a 1000 μL de solução de HSA (0,06 mmol L<sup>-1</sup> em água deionizada), 300 μL de tampão fisiológico pH 7,4 e 700 μL de água deionizada, dando soluções contendo HSA e complexos em uma razão molar de 1:10 (HSA:Ru<sub>2</sub>), com 20% etanol v/v.

As soluções foram incubadas por 24 h a 37°C e após esse período foram transferidas para tubos Amicon<sup>®</sup> Ultra-4 30K e centrifugadas por 3 – 6 min a 7000 rpm (centrífuga Hermle Z383). O concentrado proteico foi lavado 2 vezes com tampão fisiológico (contendo 20% etanol v/v no caso dos RuFaines) para garantir a remoção de complexo que não interagiu com a proteína. As soluções concentradas (aproximadamente 500 μL) foram então transferidas para microtubos e diluídas a um volume final de 2,0 mL com tampão fisiológico.

As amostras assim preparadas foram analisadas por MALDI-TOF-MS conforme descrito no item 3.2.8. Para determinação da concentração de Ru, 1 mL de cada amostra foi diluída a 25 mL em HCl 3,3% e analisadas por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), no Laboratório da Central Analítica do IQ-USP.

## 4. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

# 4.1. Caracterização dos complexos

Os complexos utilizados nos estudos foram sintetizados por métodos descritos na literatura e caracterizados usando-se as técnicas de análise elementar, espectroscopia vibracional no infravermelho, espectroscopia eletrônica em solução, espectroscopia de dicroísmo circular e susceptibilidade magnética. Os resultados encontrados nas análises de caracterização confirmam a identidade e pureza dos complexos sintetizados. Os principais encontram-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Resultados das análises de caracterização e comparação com as atribuições reportadas na literatura.

	Análise elementar		
		% CH (experime	ntal / calculada)
	Formula molecular	С	н
RuAc	[Ru <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> Cl]: Ru <sub>2</sub> C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub> Cl	20,5 / 20,3	2,5 / 2,6
Ruibp	Ru <sub>2</sub> Cl(ibp) <sub>4</sub> ]: Ru <sub>2</sub> C <sub>52</sub> H <sub>68</sub> O <sub>8</sub> Cl	59,5 / 59,0	6,7 / 6,5
Ruceto	[Ru <sub>2</sub> (ceto) <sub>4</sub> Cl]: Ru <sub>2</sub> C <sub>64</sub> H <sub>52</sub> O <sub>12</sub> Cl	59,7 / 61,5	4,7 / 4,2
Runpx	[Ru <sub>2</sub> (npx) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub> :Ru <sub>2</sub> C <sub>56</sub> H <sub>56</sub> O <sub>14</sub> PF <sub>6</sub>	52,7 / 51,7	4,9 / 4,3

	Principais bandas no espectro vibracional FTIR			
	Número de onda (cm <sup>-1</sup> ) (Experimental / reportado na literatura)			
	Modos vibracionais			
	ν <sub>as</sub> (COO <sup>-</sup> )	ν <sub>s</sub> (COO⁻)	δ <b>(OCO)</b>	ν (Ru-O)
RuAc	1446 / 1444 [78]	1402 / 1402 [78]	694 / 690 [16]	407 / 405 [79]
Ruibp	1464 / 1465 [24]	1409 / 1409 [24]	740 / 740 [24]	556, 493 / 555, 492 [24]

	Número de onda (cm <sup>-1</sup> ) (Experimental / reportado na literatura)			
	Modos vibracionais			
	v <sub>as</sub> (COO <sup>-</sup> )	ν <sub>s</sub> (COO⁻)	δ <b>(ΟCO)</b>	ν (Ru-O)
Ruceto	1471 / 1472 [28]	1409 / 1407 [28]	716 / 715 [28]	484 / 485 [28]
Runpx	1458 / 1459 [24]	1410 / 1410 [24]	711 / 711 [24]	557, 477/ 557, 474 [24]

 $\lambda$ máx. (nm) (Experimental / reportado na literatura)

	$\pi$ (Ru-O, Ru <sub>2</sub> ) $ ightarrow \pi^{*}$ (Ru <sub>2</sub> )	$\delta$ (Ru <sub>2</sub> ) $\rightarrow$ $\delta$ *(Ru <sub>2</sub> )
RuAc	425 / 425 [15] (em água)	990 / 1000 [15] (em água)
Ruibp	428 / 428 [24] (em metanol)	991 / 981 [25] (em metanol)
Ruceto	438 / 437 [28] (em etanol)	980 / 990 [28] (em etanol)
Runpx	428 / 429 [24] (em metanol)	975 / 981 [24] (em metanol)

	Momento magnético efetivo por unidade Ru <sub>2</sub>		
	µeff (M.B.) (temperatura)	Valor reportado na literatura	
RuAc	3,9 (24°C)		
Ruibp	3,9 (26°C)	3,4 – 4,4 M.B. (temperatura	
Ruceto	3,7 (24°C)	ambiente) [15]	
Runpx	4,0 (26°C)		

Os resultados encontrados nas análises elementares de C e H concordam com as composições moleculares esperadas para cada complexo.

Na análise por FTIR, as bandas mais importantes para confirmação da estrutura do composto são as bandas dos modos vibracionais de estiramento simétrico (v<sub>s</sub>) e assimétrico (v<sub>as</sub>) do grupamento carboxilato, que ocorrem na faixa de 1400 – 1480 cm<sup>-1</sup>. A diferença entre elas ( $\Delta v = v_{as} - v_s$ ) indica o modo de coordenação deste ligante ao metal. No caso dos tetracarboxilatos de dirutênio(II,III) o valor de  $\Delta v$  encontra-se na faixa de 40 – 70 cm<sup>-1</sup>, e esse valor relativamente baixo sugere a coordenação simétrica em ponte do grupamento ao núcleo dimetálico. Além dessas, na região de baixa energia (400 – 560 cm<sup>-1</sup>) aparecem bandas relativas ao estiramento da ligação Ru-O ( $v_{Ru-O}$ ), que confirmam a coordenação do carboxilato ao rutênio [15], [24]. Essas bandas foram detectadas em todos os compostos em números de onda coincidentes com as atribuições propostas na literatura. A ausência da banda relativa ao estiramento simétrico da carbonila de ácido carboxílico ( $v_{c=0 \ dicido}$ ), que ocorre na região de 1690 - 1730 cm<sup>-1</sup> (1720 cm<sup>-1</sup> para Hibp, 1728 cm<sup>-1</sup> para Hnpx e 1698 cm<sup>-1</sup>

Os espectros eletrônicos mostram duas bandas de absorção principais, que são atribuídas às transições eletrônicas  $\pi$  (Ru-O, Ru<sub>2</sub>)  $\rightarrow \pi^*$ (Ru<sub>2</sub>) (420 – 450 nm) e  $\delta$  (Ru<sub>2</sub>)  $\rightarrow \delta^*$ (Ru<sub>2</sub>) (aproximadamente 1000 nm). Essas bandas evidenciam a presença da estrutura em gaiola e a ligação múltipla metal-metal [15].

O momento magnético efetivo calculado encontra-se na faixa de 3,6 a 4,4 M.B., o que confirma a presença de 3 elétrons desemparelhados no complexo, em concordância com a distribuição eletrônica proposta para o centro dimetálico Ru<sub>2</sub>. Nos complexos de valência mista Ru<sub>2</sub>(II,III) os 11 elétrons do metal encontram-se distribuídos nos orbitais da seguinte maneira:  $\sigma^2 \pi^4 \delta^2 (\pi^* \delta^*)^3$ . A quase degenerescência dos orbitais  $\pi^*$  e  $\delta^*$  em decorrência da coordenação em ponte dos carboxilatos favorece a configuração eletrônica de spin alto (S = 3/2) levando ao alto momento magnético [15], [80].
A técnica de dicroísmo circular detecta a presença de assimetria estrutural na molécula. Moléculas quirais podem absorver em diferentes extensões a luz circularmente polarizada à direita e à esquerda, resultando em um feixe de luz elipticamente polarizado [73]. Os fármacos usados nas sínteses dos complexos – Hibp, Hcet e Hnpx – são moléculas orgânicas quirais que podem existir nas suas formas S e R. As formas comercialmente disponíveis dos fármacos Hibp e Hcet são misturas racêmicas, ou seja, contém quantidades iguais dos dois enantiômeros. Já o fármaco Hnpx é comercialmente disponibilizado apenas em sua forma S, pois esta apresenta maior atividade biológica que a forma R [81]. O espectro CD deste fármaco mostrou sinais em 213 e 236 nm, o que confirma a existência predominante de uma das formas enantioméricas.

Espectros de CD dos complexos são mostrados na Figura 4.1. Os complexos, sendo sintetizados a partir de moléculas quirais, poderiam, em tese, também apresentar quiralidade, o que do ponto de vista de interações com biomoléculas, seria algo importante a se considerar. Não foram observados sinais de dicroísmo circular nos espectros dos complexos RuAc, Ruibp e Ruceto. Com base nos estudos realizados com o análogo de molibdênio-ibuprofenato, cuja estrutura cristalina mostrou a existência de unidades [Mo<sub>2</sub>(R-ibp)<sub>2</sub>(S-lbp)<sub>2</sub>] centrossimétricas, pode-se supor que as espécies formadas tenham uma estrutura similar [35], [82]. No caso do Runpx observou-se uma banda negativa em 219 nm e uma positiva em 236 nm. Considerando que as moléculas ligantes apresentam configuração S, a estrutura do complexo formado é [Ru<sub>2</sub>(S-npx)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>, que é quiral, e, portanto, conforme observado, apresenta sinal no espectro de CD.



Figura 4.1. Espectros de dicroísmo circular dos complexos RuAc (0,1 mmol L<sup>-1</sup> em água), Ruibp (0,1 mmol L<sup>-1</sup> em etanol), Ruceto (0,1 mmol L<sup>-1</sup> em etanol) e Runpx (0,05 mmol L<sup>-1</sup> em etanol), à temperatura ambiente.

# 4.2. Estudos com transferrina (apo e holo)

### 4.2.1. Espectroscopia eletrônica

#### 4.2.1.1. Cinética

As reações entre os complexos de Ru e a transferrina nas suas formas apo e holo foram acompanhadas com o tempo por espectroscopia de absorção eletrônica. A região avaliada foi de 300 – 800 nm, com concentrações equimolares dos complexos e proteínas. O objetivo desse experimento foi avaliar se haveria reação e a sua velocidade. Em todos os casos estudados os espectros eletrônicos mostraram uma série de modificações ao longo do tempo, mostrando que a interação entre complexos Ru<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CR e proteínas ocorre e é relativamente rápida.

Os tetracaboxilatos de dirutênio(II,III) apresentam algumas bandas de transições eletrônicas características que já foram atribuídas na literatura com base em cálculos teóricos [80], [83], e são independentes do carboxilato coordenado [84]. As principais são a

banda no intervalo de 430 – 460 nm, atribuída à transição  $\pi(\text{Ru-O},\text{Ru}_2) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$  ( $\epsilon = 1000$ ) e a banda em aproximadamente 1000 nm, atribuída à transição  $\delta(\text{Ru}_2) \rightarrow \delta^*(\text{Ru}_2)$  [15], [79], [84]. Essas duas bandas são as que caracterizam a ligação metal-metal e a estrutura em gaiola do complexo. Além dessas, outras bandas que aparecem são atribuídas a interações com o ligante axial, como a banda intensa em aproximadamente 300 nm. Um resumo das atribuições encontradas na literatura é mostrado na Tabela 4.2. A

Figura **4.2** mostra o espectro eletrônico do RuAc em água, com as atribuições das bandas principais.

Atribuição	Comprimento de onda (nm)		
$\pi(Cl) \rightarrow \pi^*(Ru_2)$ , 7e <sub>u</sub> $\rightarrow$ 6e <sub>g</sub>	322		
$\pi(\text{Ru-O,Ru}_2) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2), 6\mathbf{e}_u \rightarrow 6\mathbf{e}_g$	430 – 460		
$n(O) \rightarrow \pi^*(Ru_2)$ , $1a_{1u} \rightarrow 6e_g$	444		
$n(O) \rightarrow \delta^*(Ru_2), 4e_g \rightarrow 2b_{1u}$			
$\pi$ (Ru-O, Ru <sub>2</sub> ) $\rightarrow$ $\sigma$ *(Ru-O), 6 $\mathbf{e}_{u}$ $\rightarrow$ 4b <sub>2u</sub> ou 5b <sub>1g</sub>	≈ 450		
$\sigma(\text{Ru-Cl}) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$ , 5a <sub>2u</sub> $\rightarrow$ 6e <sub>g</sub>	560		
$\delta^*(Ru_2) \rightarrow \sigma^*(Ru-O)$ , $2b_{1u} \rightarrow 5b_{1g}$ ou $4b_{2u}$	570		
$\pi^*(Ru_2) \rightarrow \sigma^*(Ru-O)$ , 6 $\mathbf{e}_g \rightarrow 5b_{1g}$ ou $4b_{2u}$	570		
$\delta(Ru_2) \rightarrow \pi^*(Ru_2)$ , $2b_{2g} \rightarrow 6\mathbf{e}_g$	≈ 630		
$\delta$ (Ru <sub>2</sub> ) $\rightarrow$ $\delta^{*}$ (Ru <sub>2</sub> ), 2b <sub>2g</sub> $\rightarrow$ 2b <sub>1u</sub>	1000		

Tabela 4.2. Transições eletrônicas observadas no complexo [Ru<sub>2</sub>(OCCH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Cl], conforme compiladas na referência 15.

O complexo RuAc no estado sólido apresenta estrutura polimérica, em que as unidades contendo o centro dimetálico  $[Ru_2(CH_3COO)_4]^+$  são ligadas em ponte através do ligante cloreto. Em solução, dependendo do solvente empregado, o íon cloreto se dissocia, permitindo que moléculas do solvente coordenem-se nas posições axiais. As espécies

presentes podem ser do tipo  $[Ru_2(CH_3COO)_4Cl_2]^-$ ,  $[Ru_2(CH_3COO)_4Cl(S)]$  ou  $[Ru_2(CH_3COO)_4(S)_2]^+$ , de acordo com a concentração de cloreto no meio [15], [30].



Figura 4.2. Espectro eletrônico de uma solução do RuAc em água (1 mmol L<sup>-1</sup>), temperatura ambiente, com as atribuições das bandas principais.

As bandas na região do visível são pouco sensíveis ao ligante axial [84], embora se observe um deslocamento batocrômico quando as posições axiais são ambas ocupadas por ligantes cloreto, em relação à espécie coordenada a duas moléculas de água [30]. Já a banda na região do UV em  $\approx$  300 nm é bastante sensível ao ligante axial. A intensidade desta banda praticamente dobra quando se observa o complexo dicloro em relação ao monocloro, o que sugere uma banda de transferência de carga do ligante axial para o metal [84].

Primeiramente, a estabilidade do complexo RuAc foi avaliada em diversos meios – tampão fisiológico pH 7,4, tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,4, tampão Hepes (Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico 50 mmol L<sup>-1</sup>) pH 7,4, tampão tris (Tris(hidroximetil)aminometano 10 mmol L<sup>-1</sup> e NaCl 10 mmol L<sup>-1</sup>) pH 7,4, tampão acetato de

amônio pH 7,4 e água. O complexo apresentou maior estabilidade em água, e dentre os tampões de pH 7,4, o tampão fisiológico foi o que influenciou menos o espectro eletrônico do RuAc. Nos demais, observou-se a forte interação entre o complexo e os componentes do meio, levando ou à formação de novas espécies ou degradação do complexo. A estabilidade dos complexos contendo ligantes carboxilatos derivados dos fármacos (RuFaines) não foi avaliada porque eles são insolúveis nesses meios.

A reação entre apoTf e RuAc foi acompanhada por 24 h a 37°C, e de forma similar à observada com HSA [29], os resultados indicam que a reação se dá em duas etapas, sendo a primeira muito rápida e a segunda mais lenta. Antes da mistura das soluções, o espectro mostrava o  $\lambda_{máx}$  da transição  $\pi(Ru-O, Ru_2) \rightarrow \pi^*(Ru_2)$  em 418 nm, o que indica a predominância da espécie catiônica diaqua,  $[Ru_2(OAc)_4(H_2O)_2]^+$  [30] (Figura 4.3a). Após a mistura, uma série de modificações ocorre, mas não são bem visualizadas devido à alta absorbância na região do UV que acaba se sobrepondo às bandas na região do visível.

No espectro diferencial obtido após a subtração do espectro da solução antes da mistura (Figura 4.3b e c), observam-se as seguintes modificações: (i) deslocamento do  $\lambda_{máx}$  de 450 para 467 nm nas primeiras 2 h, com diminuição da absorbância; (ii) deslocamento do  $\lambda_{máx}$  de 468 para 481 nm de 3 h a 24h, com aumento da absorbância; (iii) O  $\lambda_{máx}$  fica estável em aproximadamente 480 nm a partir de 7 h de reação, com aumento da absorbância; (iv) no UV, a intensidade da banda em aproximadamente 310 nm aumenta muito e como consequência, se sobrepõe a todas as outras. Essa banda também se desenvolve quando o complexo está sozinho em tampão fisiológico, mas na presença da proteína essa evolução é muito mais rápida e a intensidade é bem maior; (v) a partir da mistura das soluções até duas h de reação, estabelece-se um equilíbrio de espécies, que é evidenciado pela presença de dois pontos isosbésticos, 428 e 465 nm, cujas absorbâncias permanecem constantes durante

o período inicial, e depois desse tempo outras reações ocorrem e (vi) observa-se um ombro em aproximadamente 550 nm.



Figura 4.3. (a) Espectros eletrônicos do RuAc e da apoTf antes da mistura (1 mmol L<sup>-1</sup>) registrados na cubeta tandem (caminho óptico 4,375 mm), e após mistura (ambos a 0,5 mmol L<sup>-1</sup>, caminho óptico 8,75 mm) com o tempo (até 24 h), em tampão fisiológico pH 7,4, a 37°C. (b) Espectros diferenciais obtidos após subtração do espectro registrado antes da mistura, do tempo de 2 min a 2 h e (c) de 3 a 24h.

De modo geral, a interação se inicia rapidamente, mas não atinge o equilíbrio em 24 h. Considerando que o ciclo da transferrina dura em média 10 min [62], as reações que ocorrem depois desse período não serão exploradas, uma vez que se espera que o complexo já tenha sido entregue às células.

Outro fato interessante de se notar é que a absorbância em 418 – 450, região da transição  $\pi(\text{Ru-O}, \text{Ru}_2) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$  que caracteriza a estrutura em gaiola do complexo, não sofre diminuição significativa, indicando que a maior parte do complexo presente mantém sua estrutura intacta, mesmo após a interação com a proteína. No entanto, foi verificado em estudos cristalográficos que o complexo RuAc ao interagir com a proteína lisozima da clara de ovo de galinha perde dois dos ligantes acetato e coordena-se aos aminoácidos Asp101 e Asp119, mantendo o centro dimetálico [33].

O ombro observado em aproximadamente 550 nm parece ser característico da interação do RuAc com apoTf, e surge também na interação com a HSA [29], com os aminoácidos glicina, histidina, cisteína e triptofano [30] e com a lisozima [33]. Aliás, o perfil espectral observado de aparentemente estarem havendo duas reações é bastante similar ao que ocorre com a glicina. Na reação com a glicina, duas etapas estão envolvidas, sendo a primeira a substituição de uma molécula de água da espécie diaquo por uma molécula de glicina através do grupo carboxilato, que depois é trocado intramolecularmente pelo N do grupo amino-terminal (primeira hora de reação), seguida de uma etapa de lenta decomposição do produto formado (de 1 – 10h de reação) [30]. Aqui se observa comportamento similar, mas em vez da decomposição do produto formado, observa-se a formação de um produto secundário.

Na Tabela 4.2 há uma atribuição para a banda em 560 nm relativa a uma transição envolvendo o ligante axial cloreto ( $\sigma$ (Ru-Cl)  $\rightarrow \pi^*$ (Ru<sub>2</sub>)). Obviamente, a mudança do ligante

pode alterar os níveis de energia dos orbitais moleculares envolvidos na transição, e então a energia dessa transição pode não ser mais a mesma. Porém, pode-se supor que a banda observada nessa região seja relativa a uma transição decorrente da interação pela posição axial do complexo, visto que, juntamente com ela, observa-se o aumento da absorbância na região do UV-próximo (~ 310 nm), e evidências de que a estrutura do centro dimetálico está sendo mantida. É provável que a interação axial se dê pela coordenação do metal a átomos de N presentes em aminoácidos como His por exemplo, porque sabe-se que ligantes doadores de N formam complexos com ligações fortes com Ru [41].

Os complexos com ligantes derivados dos FAINEs Ruibp e Ruceto apresentam baixa solubilidade em meio aquoso, conforme relatado anteriormente [32], e testes explanatórios mostraram que o Runpx apresenta o mesmo comportamento. No entanto, na presença de apoTf, a solubilidade dos complexos é aumentada, conforme já observado com outros fármacos pouco solúveis, que em presença de proteínas (HSA, principalmente) têm sua solubilidade aumentada, com diminuição da toxicidade, mas com implicações na sua farmacocinética [39], [46], [85]. A presença de proteína no meio evita a precipitação do complexo. Testes realizados com Ruibp com um excesso do complexo de 100 vezes em relação à proteína, mostraram que o complexo ainda se mantém disperso mesmo em baixas concentrações de apoTf.

A reação entre apoTf e os complexos RuFaines foi acompanhada por 2 h a 37°C. Os espectros registrados são mostrados nas Figuras 4.4 a 4.6. A solução obtida da mistura da apoTf com os complexos ficou levemente turva, o que explica a alta absorbância em todo o intervalo avaliado, mas não foi filtrada, pois verificou-se anteriormente que a filtração não reduziu a turbidez. Em todos os casos, observou-se que a interação é rápida e o produto é estável no período avaliado. Praticamente não houve alterações dos espectros com o

[78]

tempo. Nos três casos, observou-se o surgimento de dois ombros: um na região entre 450 – 470 nm e outro na região de 570 – 580 nm (para Ruibp e Ruceto; nos espectros do Runpx esse ombro não foi visualizado). A banda presente na região de 450-470 nm tem a contribuição da banda da transição  $\pi$  (Ru-O, Ru<sub>2</sub>)  $\rightarrow \pi^*$  (Ru<sub>2</sub>), que no complexo sozinho em solvente orgânico aparece na região 425 – 440 nm.

Conforme mencionado anteriormente, a natureza do ligante equatorial não tem influência sobre as transições eletrônicas observadas. Dessa forma, comparando-se os espectros das misturas apoTf / RuFaines com o do sistema apoTf / RuAc, pode-se dizer que as bandas observadas nessas duas regiões são bandas presentes no cromóforo formado pela união dessas duas espécies, embora provavelmente haja uma contribuição maior da banda do complexo livre na região de 450 – 470 nm. Não foi possível calcular o espectro diferencial nesse caso porque o complexo sozinho precipita nas condições empregadas nesse ensaio (tampão fisiológico pH 7,4, 2% v/v etanol). Os espectros dos complexos mostrados nas figuras são em solvente orgânico (metanol ou etanol), apenas para fins de comparação.



Figura 4.4. Espectros eletrônicos da apoTf (0,1 mmol L<sup>-1</sup>), da mistura após a adição do complexo Ruibp em concentração equimolar com o tempo (até 2 h), em tampão fisiológico pH 7,4 com 2% etanol v/v, a 37°C, e espectro do Ruibp em metanol (0,1 mmol L<sup>-1</sup>).



Figura 4.5. Espectros eletrônicos da apoTf (0,1 mmol L<sup>-1</sup>), da mistura após a adição do complexo Ruceto em concentração equimolar com o tempo (até 2 h), em tampão fisiológico pH 7,4 com 2% etanol v/v, a 37°C, e espectro do Ruceto em etanol (0,1 mmol L<sup>-1</sup>).



Figura 4.6. Espectros eletrônicos da apoTf (0,1 mmol L<sup>-1</sup>), da mistura após a adição do complexo Runpx em concentração equimolar com o tempo (até 2 h), em tampão fisiológico pH 7,4 com 2% etanol v/v, a 37°C, e espectro do Runpx em etanol (0,1 mmol L<sup>-1</sup>).

A reação entre os complexos Ru<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>CR e a hTf também foi acompanhada por 2 h a

37°C. Os espectros registrados são mostrados nas Figuras 4.7 a 4.10.

Assim como com a apoTf, em todos os casos avaliados (hTf na presença de RuAc, Ruibp, Ruceto e Runpx) observou-se a solubilização do complexo no meio aquoso tamponado na presença da proteína, o que não ocorre na sua ausência. Observou-se também que a solução apresentou-se mais límpida do que no caso anterior, mas a passagem de um laser ainda revela a presença de partículas coloidais suspensas, o que é de se esperar devido ao tamanho da macromolécula. A reação entre a proteína e os complexos é rápida; os espectros eletrônicos registrados com o tempo não mostraram alterações significativas.

A hTf possui íons Fe(III) em seus dois sítios de ligação. O Fe coordenado à proteína mostra uma banda de transferência de carga tirosinato-metal (LMCT) característica em 467 nm [86]–[88]. Outros metais coordenados a um dos sítios do ferro também exibem bandas nessa região do espectro (400 – 500 nm,  $\varepsilon \approx 4 - 9 \times 10^3$  mol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup>) e por isso a presença de uma banda nessa região é diagnóstica para a coordenação ao sítio específico [88].

Comparando-se os espectros diferenciais, o perfil do espectro após a mistura do RuAc com a hTf (Figura 4.7) é semelhante em alguns aspectos ao do sistema RuAc / apoTf (Figura 4.3). Observam-se as bandas em ~ 470 nm e 550 nm, mas as intensidades são bem diferentes. Com a apoTf, a banda em 450 nm tem mais que o dobro da intensidade da banda em 550 nm, e no caso da hTf a banda em 547 mostra-se um pouco mais intensa que a de 470 nm. Com a apoTf, a banda na região do UV-próximo que se destaca está em torno de 315 nm e é muito mais intensa, enquanto que com a hTf a banda aparece em 339 nm com menor intensidade. A reação inicia-se rapidamente, mas não atinge o equilíbrio dentro de 2 h. As variações observadas são mínimas. Ao contrário do que ocorre com a apoTf, a abs na região acima de 400 nm diminui com o tempo. Observa-se um ponto isosbéstico em 396 nm indicando um equilíbrio. Não é possível dizer se o ombro observado em 470 nm que diminui com o tempo é relativo a alguma transição do complexo, onde esteja havendo troca do ligante axial, pois esta banda também pode estar relacionada à transição LMCT do Fe(III) coordenado, cuja diminuição indicaria a saída do metal do seu sítio específico. A banda em 339 nm, por outro lado, não aparece no espectro das espécies separadas então sugere-se que seja relativa ao cromóforo resultante da reação, provavelmente envolvendo a coordenação do centro dimetálico de Ru<sub>2</sub> a resíduos de aminoácidos da proteína, pois sabese que nessa região aparecem bandas características de transições de transferência de carga Ligante-Metal de complexos de Ru [89]. É interessante notar que o modo de interação entre RuAc e transferrina é influenciado pela presença do Fe(III) coordenado no seu sítio específico.



Figura 4.7. (a) Espectros eletrônicos da hTf (0,1 mmol L<sup>-1</sup>), do RuAc (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) e da mistura após a adição do complexo à proteína em concentração equimolar com o tempo (até 120 min), em tampão fisiológico pH 7,4, a 37°C. (b) Espectros diferenciais obtidos após subtração dos espectros da hTf e do RuAc.

As reações entre hTf e os complexos com ligantes derivados dos FAINEs foram acompanhadas por 2 h a 37°C. Os espectros diferenciais (figuras 4.8 a 4.10) são muito semelhantes aos espectros observados da apoTf com os mesmos complexos, o que indica

que o modo de interação é semelhante e não envolve a coordenação ao sítio específico do Fe(III), o que é de se esperar considerando que os ligantes derivados dos fármacos são hidrofóbicos e volumosos, e portanto, não teriam afinidade pelo sítio polar do Fe(III), além de que impedimentos estéricos evitariam a entrada dos complexos nessa região da proteína. As interações são rápidas e os produtos são estáveis por 2 h.



Figura 4.8. (a) Espectros eletrônicos da hTf (0,05 mmol L<sup>-1</sup>) e da mistura após a adição do complexo Ruibp em concentração equimolar com o tempo (até 120 min), em tampão fisiológico pH 7,4 com 2% etanol v/v, a 37°C. (b) Espectros diferenciais obtidos após subtração do espectro da hTf.



Figura 4.9. (a) Espectros eletrônicos da hTf (0,05 mmol L<sup>-1</sup>) e da mistura após a adição do complexo Ruceto em concentração equimolar com o tempo (até 120 min), em tampão fisiológico pH 7,4 com 2% etanol v/v, à temperatura de 37°C. (b) Espectros diferenciais obtidos após subtração do espectro da hTf.



Figura 4.10. (a) Espectros eletrônicos da hTf (0,05 mmol L<sup>-1</sup>) e da mistura após a adição do complexo Runpx em concentração equimolar com o tempo (até 120 min), em tampão fisiológico pH 7,4 com 2% etanol v/v, à temperatura de 37°C. (b) Espectros diferenciais obtidos após subtração do espectro da hTf.

# 4.2.1.2. Constantes de ligação

Para estimar as constantes de afinidade entre os complexos e a transferrina (apo e holo), foram feitas titulações das proteínas com os complexos, em meio tampão fisiológico pH 7,4, a 37°C, acompanhando-se as alterações por espectroscopia eletrônica. A espectroscopia UV-Vis é uma técnica adequada para acompanhar o equilíbrio e a cinética de reações químicas, desde que uma das espécies envolvidas absorva nessa região [90].

Na literatura [91]–[94], geralmente o tratamento dos dados para essa estimativa segue a equação de Benesi-Hildebrand [95], proposta no trabalho onde foram determinadas as constantes de equilíbrio das interações do I<sub>2</sub> a moléculas aromáticas (A). A equação conforme apresentada no artigo (Eq. 4.1., onde [I<sub>2</sub>] é a concentração molar de I<sub>2</sub>,  $\ell$  é caminho óptico em cm, Abs é absorbância, K é a constante de equilíbrio para a formação do complexo I<sub>2</sub>A,  $\varepsilon_c$  é o coeficiente de extinção molar do complexo I<sub>2</sub>A e [A] é a fração molar da espécie aromática) considera que a estequiometria do complexo formado é de 1:1 e que a [A] >>> [I<sub>2</sub>A]. Após os devidos rearranjos obtém-se a equação conforme mostrada na Eq. 4.1.

$$\frac{[I_2] \times \ell}{Abs} = \frac{1}{K \cdot \varepsilon_c} \times \frac{1}{[A]} + \frac{1}{\varepsilon_c} \qquad \qquad Eq. 4.1$$

A equação acima tem sido muito utilizada para estimarem-se as constantes de equilíbrio de diversos sistemas, substituindo-se [I<sub>2</sub>] pela concentração do ligante, [L] e a [A] pela concentração do substrato, [S]. No entanto, as considerações aplicadas aos sistemas estudados por Benesi e Hildebrand podem não ser coerentes com outros sistemas estudados, principalmente a suposição de que [S] >>> [Complexo].

Por essa razão, é necessário retornar à dedução da equação empregada. De acordo com Perkampus [90], se o equilíbrio entre as substâncias X e Y para formar XY é X + Y  $\rightarrow$  XY, a constante de equilíbrio termodinâmico é expressa pela equação 4.2, onde *a* é a atividade do

componente, c é a concentração e f é o coeficiente de atividade da substância. Se as soluções são bastante diluídas, pode-se assumir que as soluções são ideais, e , neste caso, os coeficientes de atividade seriam equivalentes a 1 com uma boa aproximação e a constante de equilíbrio pode ser determinada sem ambiguidade, usando a relação de concentrações no equilíbrio.

$$Ka = \frac{a_{XY}}{a_X \times a_Y} = \frac{c_{XY}}{c_X \times c_Y} \times \frac{f_{XY}}{f_X \times f_Y} = Kc \frac{f_{XY}}{f_X \times f_Y} \qquad Eq. 4.2$$

A lei de Lambert-Beer estabelece que  $A = \varepsilon \times b \times c$ , onde A é a absorbância,  $\varepsilon$  é a absortividade molar, b é o caminho óptico e c a concentração. A absorbância num dado comprimento de onda é a soma das contribuições de todas as espécies absorventes no meio. A densidade óptica D (A / b) no equilíbrio, para uma dada concentração inicial  $c_{0x}$ ,  $c_{0y}$  é expressa pela Eq. 4.3.

$$D = \frac{A_{\lambda}}{b} = (c_{0X} - c_{XY})\varepsilon_X + (c_{0Y} - c_{XY})\varepsilon_Y + c_{XY}\varepsilon_x \qquad Eq. 4.3$$

No caso em estudo, trata-se da formação de um aduto genérico Ru-proteína. Geralmente, a formação de complexos em solução pode ser descrita pela Eq. 4.4, onde *D* representa a espécie doadora de elétrons e *A* a espécie aceptora, gerando o complexo  $D_mA_n$ .

$$mD + nA \rightleftharpoons D_m A_n \qquad Eq. 4.4$$

A constante e equilíbrio para a reação acima pode ser expressa pela Eq. 4.5., onde  $c_{DA}$ é a concentração do complexo  $D_mA_n$ ,  $c_{OD}$  é a concentração inicial do doador D e  $c_{OA}$  é a concentração inicial do aceptor A.

$$Kc = \frac{c_{DA}}{(c_{0D})^m \times (c_{0A})^n} = \frac{c_{DA}}{[c_{0D} - m(c_{DA})]^m \times [c_{0A} - n(c_{DA})]^n} \qquad Eq. 4.5$$

Um complexo 1:1 é o mais comum e a equação acima pode ser simplificada, com m=n=1, conforme Eq. 4.6.

$$Kc = \frac{c_{DA}}{(c_{0D} - c_{DA}) \times (c_{0A} - c_{DA})} Eq.4.6$$

A medida da absorbância experimental  $A_e$  em um comprimento de onda selecionado é devido à composição no equilíbrio, conforme Eq. 4.7.  $\varepsilon_D$ ,  $\varepsilon_A$  e  $\varepsilon_{DA}$  são as absortividades molares das espécies doadora, aceptora e do complexo, respectivamente.

$$A_e = [\varepsilon_D \times (c_{0D} - c_{DA}) \times b] + [\varepsilon_A \times (c_{0A} - c_{DA}) \times b] + [\varepsilon_{DA} \times c_{DA} \times b] \qquad Eq. 4.7$$

Isolando  $c_{DA}$  obtém-se a relação da Eq. 4.8, onde  $\Delta A = A_e - \varepsilon_D c_{0D} b - \varepsilon_A c_{0A} b =$  $A_e - A_D - A_A, \Delta A/b = D'$ é a densidade óptica e  $\Delta \varepsilon = \varepsilon_{DA} - \varepsilon_D - \varepsilon_A$ .

$$c_{DA} = \frac{A_e - (\varepsilon_D c_{0D} + \varepsilon_A c_{0A}) \cdot b}{(\varepsilon_{DA} - \varepsilon_D - \varepsilon_A) \cdot b} = \frac{\Delta A}{\Delta \varepsilon \cdot b} = \frac{D'}{\Delta \varepsilon} \qquad Eq. 4.8$$

Para obter uma relação linear para uma avaliação, inverte-se a Eq. 4.6, obtendo-se a Eq. 4.9.

$$\frac{1}{Kc} = \frac{c_{0D} \cdot c_{0A}}{c_{DA}} - (c_{0D} + c_{0A}) + c_{DA} \qquad Eq. 4.9$$

Considerando que, normalmente, trabalha-se com um excesso de doador nesses estudos, pode-se considerar que  $c_{OD} + c_{OA} >>> c_{DA}$ , então desconsidera-se o último termo  $c_{DA}$ . Substituindo na Eq. 4.9 o termo  $c_{DA}$  conforme deduzido na Eq. 4.8, obtém-se a Eq. 4.10.

$$\frac{1}{Kc} = \frac{c_{0D} \cdot c_{0A} \cdot b\Delta\varepsilon}{\Delta A} - (c_{0D} + c_{0A}) \qquad Eq. 4.10$$

E após transformação e conversão, obtém-se a Eq. 4.11.

$$\frac{c_{0D} \cdot c_{0A} \cdot b}{(c_{0D} + c_{0A})\Delta A} = \frac{1}{Kc\Delta\varepsilon} \times \frac{1}{c_{0D} + c_{0A}} + \frac{1}{\Delta\varepsilon} \qquad Eq. 4.11$$

Se o lado esquerdo da equação é plotado contra  $1/(c_{0D} + c_{0A})$ ,  $(Kc\Delta\varepsilon)^{-1}$  é obtido da inclinação da reta, e  $(\Delta\varepsilon)^{-1}$  do intercepto. Se os  $\varepsilon_A$  e  $\varepsilon_D$  são conhecidos,  $\varepsilon_{DA}$  e Kc podem ser calculados.

Outra aproximação ainda pode ser feita: considerando que há um excesso de doador (ligante), então c<sub>od</sub> >> c<sub>oA</sub>. A equação pode ser reduzida à Eq. 4.12.

$$\frac{c_{0A} \cdot b}{\Delta A} = \frac{1}{Kc\Delta\varepsilon} \times \frac{1}{c_{0D}} + \frac{1}{\Delta\varepsilon} \qquad \qquad Eq. 4.12$$

A equação acima é a conhecida equação de Benesi-Hildebrand. Na equação original, assume-se que os reagentes não absorvam no comprimento de onda considerado, isto é,  $A_A$ ,  $A_D$ ,  $\varepsilon_A$  e  $\varepsilon_D$  são iguais a 0. Aqui mantem-se  $\Delta A$  e  $\Delta \varepsilon$  porque como é observado nos resultados, os reagentes absorvem em menor extensão, mas ainda absorvem, então essa aproximação não é válida para o sistema em estudo.

Outra equação encontrada na literatura (Eq. 4.13) é a descrita por Stephanos [96], [97], que em seus trabalhos foi aplicada a dados de espectroscopia eletrônica. Assim como no caso anterior, considera-se que a estequiometria do produto formado é 1:1, e que efeitos de interações fracas não coordenantes como no caso de interações hidrofóbicas, resultariam em não-linearidade da curva. Nesta equação,  $A_0$  é a absorbância da solução com a concentração inicial da proteína,  $A_{\infty}$  é absorbância da solução contendo a proteína ligada, Aé absorbância registrada em diferentes concentrações do ligante,  $L_0$  é a concentração do ligante adicionada.

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{A_\infty - A_0} + \frac{1}{K[A_\infty - A_0]} \times \frac{1}{[L_0]} \qquad Eq. 4.13$$

Posteriormente a equação acima foi aplicada a estudos de fluorescência nos trabalhos de Guchhait *et. al.* [93], [98], substituindo-se as absorbâncias por intensidades de fluorescência. Nesses trabalhos, o fato de se obterem correlações lineares quando plota-se  $1/[L_0] \times 1/A-A_0$  é indicativo de que a estequiometria da reação é 1:1 conforme pressuposto. Para checar essa atribuição, os dados também são tratados utilizando-se a Eq. 4.14, que modifica a Eq. 4.13 para considerar que a estequiometria do produto formado é 1:2. O fato de não se obter uma correlação linear confirma a suposição anterior de que o produto tem estequiometria 1:1.

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{A_\infty - A_0} + \frac{1}{K[A_\infty - A_0]} \times \frac{1}{[L_0]^2} \qquad Eq. 4.14$$

A reação entre a proteína apoTf (*P*) e os complexos de Ru (ligantes da proteína, *L*), pode ser expressa pela equação química

$$mP + nL \rightleftharpoons P_m L_n$$

Com uma constante de equilíbrio

$$K = \frac{[P_m L_n]}{[P]^m [L]^n}$$

Considerando que a reação tenha estequiometria 1:1 (m=n=1), a constante de equilíbrio foi estimada pelas equações 4.11 (onde se considera que a concentração dos reagentes é bem maior do que do produto), 4.12 (equação de Benesi-Hildebrand, que além da suposição anterior, considera ainda que a concentração do ligante, nesse caso de complexo, é bem maior que a do substrato, nesse caso a proteína) e a 4.14.

Tendo em vista que a reação foi estudada em condições específicas e que o equilíbrio não foi de fato alcançado (pelo menos no caso das reações com o complexo RuAc), as constantes estimadas representam apenas constantes de afinidade aparentes ( $K_{aap}$ ).

Para fins de comparação, os dados foram tratados usando-se as equações 4.11, 4.12 e 4.13, e os gráficos das titulações e curvas obtidas das equações são mostrados nas figuras 4.11 a 4.18. A Tabela 4.3 traz os resultados calculados para as constantes de afinidade.



Figura 4.11. Espectros eletrônicos registrados na titulação da apoTf (concentração inicial 1,075 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>) com RuAc, variando a concentração de complexo de 0 a 0,77 mmol L<sup>-1</sup> (razão molar apoTf:RuAc de 1:0 a 1:10) com incrementos de 1,25 x 10<sup>-7</sup> mol. Meio: tampão fisiológico pH 7,4, temperatura: 37°C. (a) Em azul são mostrados os espectros da mistura após adições sucessivas de complexo a uma quantidade fixa de proteína, e em vermelho os espectros do RuAc nas mesmas condições, na ausência de proteína. (b) Espectros diferenciais obtidos após a subtração dos espectros da apoTf e do RuAc não reagido nas mesmas condições.



Figura 4.12. Gráficos das equações (a) 4.11, (b) 4.12 e (c) 4.13, aplicados aos dados registrados em 450 nm, para o sistema apoTf / RuAc.

No caso dos complexos com ligantes derivados dos FAINEs, não foi possível registrar espectros eletrônicos dos complexos sozinhos em tampão fisiológico pH 7,4 devido à baixa

[90]

solubilidade deles nesse meio. Mas para apenas ter-se uma ideia da intensidade da absorbância na região espectral estudada, registrou-se o espectro eletrônico de uma solução de concentração aproximadamente 1,2 mmol L<sup>-1</sup> em meio etanol/água 60/40, e calculou-se o espectro eletrônico para as concentrações usadas na titulação, com base na lei de Lambert-Beer, que estabelece que a concentração é diretamente proporcional à absorbância.

O comprimento de onda escolhido para os cálculos foi o que apresentou menor interferência das bandas do complexo. No caso do sistema apoTf / RuAc, fez-se o desconto da absorbância do complexo livre na mesma concentração, e no caso dos sistemas apoTf / RuFaines, escolheu-se o comprimento de onda entre 580 – 590 nm, nos quais o complexo livre não absorve.



Figura 4.13. Espectros eletrônicos registrados na titulação da apoTf (concentração inicial 2,09 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) com Ruibp, variando a concentração de complexo de 0 a 0,18 mmol L<sup>-1</sup> (razão molar apoTf:Ruibp de 1:0 a 1:10) com incrementos de 2,4 x 10<sup>-8</sup> mol. Meio: tampão fisiológico pH 7,4, temperatura: 37°C. (a) Espectros da mistura após adições sucessivas de complexo à uma quantidade fixa de proteína. (b) Em vermelho, espectro do Ruibp 1,2 mM em meio etanol/água 60/40 e em preto, espectros simulados para cada concentração usada na titulação, calculados com base no espectro da solução de 1,2 mM.



Figura 4.14. Gráficos das equações (a) 4.11, (b) 4.12 e (c) 4.13, aplicados aos dados registrados em 582 nm, para o sistema apoTf/Ruibp.



Figura 4.15. Espectros eletrônicos registrados na titulação da apoTf (concentração inicial 2,09 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) com Ruceto, variando a concentração de complexo de 0 a 0,18 mmol L<sup>-1</sup> (razão molar apoTf:Ruceto de 1:0 a 1:10) com incrementos de 2,4 x 10<sup>-8</sup> mol. Meio: tampão fisiológico pH 7,4, temperatura: 37°C. (a) Espectros da mistura após adições sucessivas de complexo à uma quantidade fixa de proteína. (b) Em vermelho, espectro do Ruceto 1,3 mM em meio etanol/água 60/40 e em preto, espectros simulados para cada concentração usada na titulação, calculados com base no espectro da solução de 1,3 mM.



Figura 4.16. Gráficos das equações (a) 4.11, (b) 4.12 e (c) 4.13, aplicados aos dados registrados em 590 nm, para o sistema apoTf/Ruceto.



Figura 4.17. Espectros eletrônicos registrados na titulação da apoTf (concentração inicial 2,05 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) com Runpx, variando a concentração de complexo de 0 a 0,17 mmol L<sup>-1</sup> (razão molar de apoTf:Runpx de 1:0 a 1:10) com incrementos de 2,46 x 10<sup>-8</sup> mol. Meio: tampão fisiológico pH 7,4, temperatura: 37°C. (a) Espectros da mistura após adições sucessivas de complexo à uma quantidade fixa de proteína. (b) Em vermelho, espectro do Runpx 1,2 mM em meio etanol/água 60/40 e em preto, espectros simulados para cada concentração usada na titulação, calculados com base no espectro da solução de 1,2 mM.



Figura 4.18. Gráficos das equações (a) 4.11, (b) 4.12 e (c) 4.13, aplicados aos dados registrados em 580 nm, para o sistema apoTf/Runpx.

Tabela	4.3.	Constantes	de	afinidade	aparentes	calculadas	para	OS	sistemas	apoTf /	Ru <sub>2</sub> -
$CO_2CR$											

С	omplexo	RuAc			
Equa	ção / $\lambda$ máx.	450 nm			
4.11	K (mol⁻¹L)	564			
	R²	0,9943			
4.12	K (mol⁻¹L)	439			
	R <sup>2</sup>	0,9979			
4.13	K (mol⁻¹L)	807			
	R²	0,9979			
4.15	K (mol⁻¹L)	950			
	Covariância	0,0006			

Ao aplicar-se as equações anteriores aos dados, obtiveram-se valores negativos de constantes de afinidade para os sistemas apoTf / RuFaines, o que não tem significado físico. Conforme verificado, as equações acima, embora bastante utilizadas, assumem alguns pressupostos que podem não ser verdadeiros para os sistemas em estudo aqui. O ideal seria tratar os dados com equações não-lineares que não fazem tais aproximações, como  $[Reagentes]_{livre} \approx [Reagentes]_{adicionada}$ , onde possam ser usados os valores conhecidos das concentrações de ligante e substrato realmente utilizados na análise [99].

Tendo isso em mente, os dados foram novamente tratados, mas agora usando-se as equações seguintes, nas quais a única suposição feita é de que a estequiometria do aduto é 1:1 (Eq. 4.15) ou 1:2 (Eq. 4.16). O ajuste dos dados a essas equações foi feito usando-se o programa MatLab, (com os arquivos necessários para esses cálculos disponibilizados online como material suplementar) ou através dos aplicativos disponibilizados em http://app.supramolecular.org/bindfit, que utilizam a mesma metodologia. O que o autor sugere é que se apliquem os dois modelos e avalie-se qual descreve melhor os dados. Como parâmetro de qualidade do ajuste avaliou-se a covariância obtida: valores menores que 0,001 foram considerados bons, menores que 0,0001 muito bons e acima de 0,01 foram considerados bons, menores que 0,0001 muito bons e acima de 0,01 foram considerados ruins [99].

$$\frac{\Delta A_{obs}}{\varepsilon_{\Delta PL}} = \frac{1}{2} \left( P_0 + L_0 + \frac{1}{K_a} \right) - \sqrt{\left( P_0 + L_0 + \frac{1}{K_a} \right)^2 + 4[P_0][L_0]} \qquad Eq. 4.15$$

Onde  $P_0$  e  $L_0$  representam as concentrações iniciais de proteína (apoTf) e de ligante (complexos Ru<sub>2</sub>),  $\Delta A_{obs}$  é a variação da absorbância observada em dado comprimento de onda e  $\varepsilon_{\Delta PL}$  é a variação da absortividade molar.

No caso da formação de um aduto com estequiometria 1:2, calculam-se duas constantes,  $K_1 \in K_2$ , relativas aos dois equilíbrios sucessivos:

$$P + L \rightleftharpoons PL \quad K_1 = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad e \quad PL + L \rightleftharpoons PL_2 \quad K_2 = \frac{[PL_2]}{[PL][L]}$$
$$[L]^3(A) + [L]^2(B) + [L](C) - [L]_0 = 0 \qquad Eq. 4.16$$
$$Com: A = (K_1K_2), B = \{K_1(2K_2[P]_0 - K_2[L]_0 + 1)\} e C = \{K_1([P]_0 - [L]_0) + 1\}$$

Para o sistema apoTf / RuAc, o modelo que melhor descreveu os dados foi o que considera a formação de um aduto de estequiometria 1:1 (Figura 4.19), com uma constante de 950 mol<sup>-1</sup> L. Este resultado apresenta a mesma ordem de grandeza daqueles obtidos pelas equações lineares discutidas anteriormente. O modelo 1:2 não se ajustou aos dados.

Para os sistemas apoTf / RuFaines, no entanto, nenhum dos dois modelos se ajustou aos dados. Os valores de constantes obtidos (próximos de zero) e a covariância do ajuste mostram que o modelo 1:1 não descreve bem os dados.



Figura 4.19. Variação da absorbância em 450 nm do sistema apoTf / RuAc, e ajuste da equação 4.15.

O que esses dados mostraram, embora não tenha sido possível estimar-se as constantes de ligação para os sistemas apoTf/RuFaines, é que a presença da proteína aumenta a solubilidade do complexo no meio, e que essa interação é relativamente fraca, pois a constante de ligação aparentemente é baixa. De acordo com a literatura [99], as condições experimentais deveriam ser ajustadas aumentando-se a concentração inicial de proteína e aumentando-se o intervalo de aquisição de dados até altas razões molares. No

entanto, para essa técnica isso seria impraticável pois a absorbância excederia o limite de 1,0, em que a lei de Beer se aplica.

A hTf também foi titulada com soluções os complexos Ru<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CR com o objetivo de se calcular as constantes de ligação pelo mesmo método usado com a apoTf. Os espectros eletrônicos e gráficos das equações são mostrados nas figuras 4.20 a 4.27, e as constantes calculadas na Tabela 4.4.



Figura 4.20. Espectros eletrônicos registrados na titulação da hTf (concentração inicial 5,33 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) com RuAc, variando a concentração de complexo de 0 a 0,38 mmol L<sup>-1</sup> (razão molar hTf:RuAc de 1:0 a 1:10) com incrementos de 6,26 x 10<sup>-8</sup> mol. Meio: tampão fisiológico pH 7,4, temperatura: 37°C. (a) Em azul são mostrados os espectros da mistura após adições sucessivas de complexo à uma quantidade fixa de proteína, e em vermelho os espectros do RuAc nas mesmas condições, na ausência de proteína. (b) Espectros diferenciais obtidos após a subtração dos espectros da hTf e do RuAc não reagido nas mesmas condições.



Figura 4.21. Gráficos das equações (a) 4.11, (b) 4.12, (c) 4.13 e (d) 4.15, aplicados aos dados registrados em 343 nm, para o sistema hTf/RuAc.

Para o sistema hTf / RuAc, os valores calculados ficaram próximos dos verificados com a apoTf, exceto que para a equação 4.15 o valor de *K* foi aproximadamente a metade daquele observado com a apoTf, o que pode estar indicando que a interação é mais fraca quando o Fe(III) está coordenado ao seu sítio específico conforme proposto com base no estudo cinético. No entanto, é bom destacar que a banda monitorada para o cálculo com a hTf (343 nm) sofre maior alteração com o tempo do que a observada no cálculo com a apoTf (450 nm). Além disso, a covariância do ajuste mostrou um valor superior a 0,001, o que

mostra que mesmo esta equação não está descrevendo bem os dados. Da mesma forma que com a apoTf, os resultados para os sistemas hTf / RuFaines retornaram constantes negativas ou iguais a zero na maior parte dos casos.



Figura 4.22. Espectros eletrônicos registrados na titulação da hTf (concentração inicial 1,6 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) com Ruibp, variando a concentração de complexo de 0 a 0,14 mmol L<sup>-1</sup> (razão molar hTf:Ruibp de 1:0 a 1:10) com incrementos de 1,8 x 10<sup>-8</sup> mol. Meio: tampão fisiológico pH 7,4, temperatura: 37°C. (a) Espectros da mistura após adições sucessivas de complexo à uma quantidade fixa de proteína. (b) Espectros diferenciais obtidos após a subtração do espectro da hTf.



Figura 4.23. Gráficos das equações (a) 4.11, (b) 4.12 e (c) 4.13, aplicados aos dados registrados em 582 nm, para o sistema hTf/Ruibp.



Figura 4.24. Espectros eletrônicos registrados na titulação da hTf (concentração inicial 1,6 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) com Ruceto, variando a concentração de complexo de 0 a 0,14 mmol L<sup>-1</sup> (razão molar hTf:Ruceto de 1:0 a 1:10) com incrementos de 1,8 x 10<sup>-8</sup> mol. Meio: tampão fisiológico pH 7,4, temperatura: 37°C. (a) Espectros da mistura após adições sucessivas de complexo à uma quantidade fixa de proteína. (b) Espectros diferenciais obtidos após a subtração do espectro da hTf.



Figura 4.25. Gráficos das equações (a) 4.11, (b) 4.12 e (c) 4.13, aplicados aos dados registrados em 590 nm, para o sistema hTf/Ruceto.



Figura 4.26. Espectros eletrônicos registrados na titulação da hTf (concentração inicial 1,6 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) com Runpx, variando a concentração de complexo de 0 a 0,13 mmol L<sup>-1</sup> (razão molar hTf:Rnpx de 1:0 a 1:10) com incrementos de 1,8 x 10<sup>-8</sup> mol. Meio: tampão fisiológico pH 7,4, temperatura: 37°C. (a) Espectros da mistura após adições sucessivas de complexo à uma quantidade fixa de proteína. (b) Espectros diferenciais obtidos após a subtração do espectro da hTf.



Figura 4.27. Gráficos das equações (a) 4.11, (b) 4.12 e (c) 4.13, aplicados aos dados registrados em 580 nm, para o sistema hTf/Runpx.

C	Complexo	RuAc
Equa	ação / $\lambda$ máx.	343 nm
4.11	K (mol⁻¹L)	515
	R <sup>2</sup>	0,9897
4.12	K (mol⁻¹L)	720
	R²	0,9974
4.13	K (mol⁻¹L)	1509
	R <sup>2</sup>	0,9974
4.15	K (mol⁻¹L)	444
	Covariância	0,0017

Tabela 4.4. Constantes de afinidade aparentes calculadas para os sistemas hTf / Ru<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CR.

Os resultados obtidos por espectroscopia eletrônica mostraram que existe uma interação entre a transferrina, seja ela em sua forma apo ou holo, com os complexos Ru<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CR, que esta interação ocorre rapidamente, que o produto é relativamente estável, que ele apresenta características espectrais distintas que indicam que a ligação metal-metal está sendo mantida, embora não se possa afirmar que os ligantes equatoriais estejam se mantendo coordenados. Os resultados também indicam que a interação com a proteína se dá principalmente pelas posições axiais dos complexos. A técnica, no entanto, não foi adequada para estimar as constantes de afinidade para os sistemas Tf / RuFaines, e as obtidas para os sistemas Tf / RuAc dão apenas indicações quanto à estabilidade do aduto formado. A ordem de grandeza dos valores calculados (10<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> L) são menores que aquelas determinadas para a interação do KP1019 com a apoTf (10<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> L) [72]. Os compostos não mostraram saturação da proteína nas condições analíticas empregadas, ou seja, não foi atingida a estabilidade do sinal que indicaria o término da reação, no sentido de que a quantidade máxima de produto fosse obtida. Este fato indica que as afinidades são baixas. Devido ao modelo de interação 1:1 não ser aplicável para descrever os dados, a ausência de uma saturação discernível não pode ser atribuída apenas a uma baixa afinidade, mas provavelmente também como consequência da existência de múltiplos sítios de ligação. Estes podem ser sítios secundários bem definidos, ou cavidades hidrofóbicas, ou superfícies que se ligam de maneira inespecífica [42].

## 4.2.2. Espectroscopia de dicroísmo circular

Outro aspecto da interação entre a apoTf e os complexos dimetálicos de rutênio investigado foi a sua influência sobre a estrutura secundária da proteína. Este é um aspecto importante, se levarmos em conta que a sua atividade depende da ligação ao receptor específico localizado na membrana celular, o que, por sua vez, depende da conformação da proteína, e que se não for mantida, pode comprometer o desempenho da sua função. Embora a conformação da proteína não seja observada diretamente, alterações na estrutura secundária podem indicar a manutenção ou não da sua estrutura terciária.

A luz plano-polarizada pode ser vista como sendo composta por duas componentes circularmente polarizadas à esquerda e à direita de igual magnitude. Algumas moléculas apresentam a propriedade de dicroísmo circular, na qual ela absorve em diferentes extensões cada uma dessas componentes. A técnica, então, se baseia na diferença de absorção que uma molécula apresenta em relação à radiação circularmente polarizada à direita e à esquerda. A radiação resultante possui uma polarização elíptica. A propriedade de dicroísmo circular é uma consequência da assimetria estrutural de uma molécula [73]. O esqueleto peptídico das proteínas é intrínsecamente assimétrico, o que lhe confere a propriedade de dicroísmo.

As proteínas absorvem em algumas regiões distintas. Na região do ultravioleta distante (abaixo de 240 nm), a absorção é devido principalmente às ligações peptídicas. A banda em aproximadamente 220 nm é devido a transição n  $\rightarrow \pi^*$ , e a banda mais intensa em 190 nm é atribuída à transição  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Os diferentes elementos de estruturas secundárias ( $\alpha$ -hélice, folha- $\beta$ , etc.) geram padrões característicos no espectro de dicroísmo dessa região. Na região do ultravioleta próximo (260 – 320 nm), as absorções são atribuídas a transições das cadeias laterais aromáticas dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina. Pontes dissulfeto também absorvem nessa região. Cofatores não proteicos ligados à proteína podem absorver na região do visível, como, por exemplo, grupos heme, que absorvem em aproximadamente 410 nm, com outras bandas no intervalo de 350 – 650 nm [73]. A ligação de outras moléculas à proteína também pode gerar bandas em qualquer região do espectro, pela indução de assimetria estrutural numa determinada região. É o que ocorre, por exemplo, quando o íon Fe(III) se coordena aos seus sítios de ligação na transferrina. Surgem duas bandas na região do visível, uma negativa em 455 nm e uma positiva em 360 nm [100].

Na análise de proteínas, é possível estimar-se o conteúdo de cada tipo de estrutura secundária (α-hélice, folha-β, turns) com base nos padrões espectrais conhecidos desses elementos, e é com este objetivo que este estudo foi feito. A transferrina foi avaliada por dicroísmo circular, adicionando-se concentrações variadas dos complexos RuAc, Ruibp, Ruceto e Runpx, e observando-se as alterações no seu espectro CD. As estimativas foram feitas por 3 métodos que empregam diferentes algoritmos, SELCON3, CDSSTR e CONTIN/LL, que estão implementados no pacote de programas CDPro, disponível online (http://sites.bmb.colostate.edu/sreeram/CDPro/). As médias obtidas de cada elemento pelos 3 métodos foi utilizada como resultado final.

Os cálculos consideram que o espectro de CD de uma proteína na região de 190 – 240 nm é uma combinação linear dos espectros de cada elemento de estrutura secundária. A Figura 4.28 mostra espectros associados a cada um desses elementos. Para estimar-se o conteúdo de cada tipo, o programa utiliza algoritmos que comparam o espectro da amostra com os espectros de um banco de dados de proteínas ricas em  $\alpha$ -hélice, ou folha- $\beta$  ou ambas, cujas estruturas tenham sido determinadas por cristalografia de raios-X [73], [74].



Figura 4.28. Espectros de CD na região do UV distante associados a cada tipo de estrutura secundária. Linha sólida (azul)  $\alpha$ -hélice; linha tracejada longa (rosa), folha- $\beta$  antiparalela; linha pontilhada (amarela),  $\beta$ -turns, linha tracejada cruzada, hélice 3<sub>1</sub>; linha tracejada curta (verde), estrutura irregular. Adaptada da referência 73.

Os espectros registrados para cada sistema e as estimativas dos conteúdos de cada tipo de estrutura secundária são mostrados nas figuras 4.29 a 4.32. Observando-se os espectros de CD dos diferentes sistemas, nota-se que a adição de concentrações crescentes dos complexos não produziu uma variação sistemática no perfil dos espectros; antes observa-se que a intensidade das bandas em 208 e 222 nm variam aleatoriamente. Essas variações poderiam, em tese, ser atribuídas a modificações na estrutura secundária da proteína na presença dos complexos. A estimativa do conteúdo de cada tipo de estrutura secundária, então, será de grande valor para avaliar a extensão dessas modificações.

Para o sistema apoTf / RuAc (Figura 4.29), inicialmente há um decréscimo no conteúdo de  $\alpha$ -hélice (0,22 para 0,20), que aumenta à medida em que a concentração de complexo também aumenta, até que por volta da razão molar apoTf:RuAc de 1:10, ela está novamente no mesmo nível inicial. A variação total, considerando a proteína nativa e a proteína contendo excesso de complexo de 50 vezes foi de 0,02. As variações no conteúdo de  $\alpha$ -hélice foram acompanhadas por variações equivalentes no conteúdo de folha- $\beta$ , e as estruturas randômica e *turns* permaneceram aproximadamente constantes.



Figura 4.29. (a) Espectros de dicroísmo circular do sistema apoTf/RuAc, com concentração de apoTf fixa (5 μmol L<sup>-1</sup>) e concentrações crescentes de RuAc. Meio tampão fisiológico pH 7,4, 30 min de incubação a 37°C. (b) Médias das estimativas das frações dos diferentes tipos de estrutura secundária obtidas pelos métodos CDSSTR, Contin/LL e Selcon3. As barras de erro representam o desvio padrão das determinações realizadas pelos três métodos.

No sistema apoTf / Ruibp (Figura 4.30), o conteúdo dos diferentes elementos permanece aproximadamente constante até a razão molar apoTf:Ruibp de 1:5. Acima disso, nas razões molares 1:10 e 1:20, observa-se o decréscimo do conteúdo de  $\alpha$ -hélice (de 0,23


para 0,18 em 1:20, em relação ao registrado na proteína nativa), acompanhado pelo aumento dos demais tipos de estrutura secundária.

Figura 4.30. (a) Espectros de dicroísmo circular do sistema apoTf/Ruibp, com concentração de apoTf fixa (5 μmol L<sup>-1</sup>) e concentrações crescentes de Ruibp. Meio tampão fisiológico pH 7,4 com 10% etanol v/v, 24 h de incubação a 37°C. (b) Médias das estimativas das frações dos diferentes tipos de estrutura secundária obtidas pelos métodos CDSSTR, Contin/LL e Selcon3. As barras de erro representam o desvio padrão das determinações realizadas pelos três métodos.

O sistema apoTf / Ruceto (Figura 4.31), assim como no caso anterior, manteve-se aproximadamente constante até a razão molar apoTf:Ruceto de 1:5, embora tenha-se observado uma oscilação maior do conteúdo de  $\alpha$ -hélice em torno de um valor médio nas razões molares de 1:1,5 a 1:3, com a variação correspondente no conteúdo da estrutura randômica. Na razão molar apoTf:Ruceto de 1:20, o conteúdo de  $\alpha$ -hélice diminuiu 0,03 (0,20) em relação ao registrado na proteína nativa (0,23), acompanhado pelo aumento do conteúdo de folha- $\beta$  (de 0,25 para 0,28). No caso do sistema apoTf / Runpx (Figura 4.32), o conteúdo dos diferentes elementos de estrutura secundária permaneceu constante em todo o intervalo de concentrações estudado.



Figura 4.31. (a) Espectros de dicroísmo circular do sistema apoTf/Ruceto, com concentração de apoTf fixa (5 μmol L<sup>-1</sup>) e concentrações crescentes de Ruceto. Meio tampão fisiológico pH 7,4 com 10% etanol v/v, 24 h de incubação a 37°C. (b) Médias das estimativas das frações dos diferentes tipos de estrutura secundária obtidas pelos métodos CDSSTR, Contin/LL e Selcon3. As barras de erro representam o desvio padrão das determinações realizadas pelos três métodos.



Figura 4.32. (a) Espectros de dicroísmo circular do sistema apoTf/Runpx, com concentração de apoTf fixa (5 μmol L<sup>-1</sup>) e concentrações crescentes de Runpx. Meio tampão fisiológico pH 7,4 com 10% etanol v/v, 24 h de incubação a 37°C. (b) Médias das estimativas das frações dos diferentes tipos de estrutura secundária obtidas pelos métodos CDSSTR, Contin/LL e Selcon3. As barras de erro representam o desvio padrão das determinações realizadas pelos três métodos.

De modo geral, a presença dos complexos não afetou de forma significativa a estrutura secundária da proteína, até a razão molar proteína:complexo de 1:30 (para o sistema apoTf / RuAc) e 1:10 (para os sistemas apoTf / Ruibp e apoTf / Ruceto). O sistema apoTf / Runpx não apresentou alterações no intervalo de concentrações estudado (até razão molar proteína:complexo 1:20). A maior variação foi observada no sistema apoTf / Ruibp (diminuição de 0,05 no conteúdo de  $\alpha$ -hélice, comparando-se a proteína nativa e a proteína na presença de excesso de 20 vezes de complexo). Pode-se concluir então que os complexos não estão provocando a desnaturação da proteína, embora não se possa afirmar que sua estrutura terciária está sendo mantida.

Estudos de CD mostraram que a interação da apoTf com íons Fe(III) e Al(III) (que se liga nos sítios específicos do ferro) não altera significativamente sua estrutura secundária, embora tenha se observado uma pequena diminuição no conteúdo de  $\alpha$ -hélice na presença de Al(III). Esses resultados indicam que íons metálicos podem entrar nos sítios de ligação pré-formados específicos do ferro sem que hajam mudanças significativas na estrutura secundária da proteína [55], [101]. Por outro lado, a entrada de íons Fe(III) nos sítios específicos da apoTf, leva a mudanças conformacionais consideráveis em sua estrutura terciária, que passa a adotar uma conformação mais fechada quando na sua forma holo do que em sua forma apo. No entanto, a região que se movimenta para alternar essas conformações (aberta e fechada) é uma região sem estrutura definida localizada entre os dois lobos da proteína, e justamente por isso é flexível [59], [60], [102], [103]. As alterações conformacionais poderiam ser vistas na região aromática do espectro CD (260 – 320 nm), no entanto não foram encontradas as condições ideais para essa avaliação dos sistemas apoTf / Ru<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CR. A interação dos complexos RuAc, Ruibp e Ruceto com a HSA foi avaliada por CD também em condições similares, e mostrou alterações muito mais pronunciadas em menores razões molares. A diminuição do conteúdo de  $\alpha$ -hélice foi de 9% para o sistema HSA / RuAc, 13% para o sistema HSA / Ruibp e 14% para o sistema HSA / Ruceto, comparando-se a proteína nativa com a proteína contendo um excesso de complexo de 5 vezes [26], [29], [35]. A estrutura secundária da apoTf, é, portanto, mais estável que a da albumina frente à interação com os mesmos complexos.

## 4.2.3. Espectroscopia de Fluorescência

## 4.2.3.1. Fluorescência intrínseca

A fluorescência intrínseca das proteínas provém dos resíduos dos aminoácidos triptofano, fenilalanina e tirosina, e em grande parte delas, a fluorescência é devida quase exclusivamente ao triptofano, porque fenilalanina tem um rendimento quântico muito baixo e a tirosina é quase totalmente suprimida se ela está ionizada ou próxima a um grupo amino, um grupo carboxil ou resíduo de triptofano [49].

A emissão do indol do triptofano é bastante sensível a mudanças no microambiente local e pode ser usada para monitorar interações com várias espécies [43]. Em geral, observa-se a supressão da fluorescência da proteína sob a interação com uma molécula ligante, e a literatura está repleta de exemplos [43], [46], [104]–[106], mas um aumento da emissão também é possível, e pode indicar que tipos de alterações estão ocorrendo ao redor dos aminoácidos emitentes [101], [107], [108]. Deslocamentos do  $\lambda_{máx}$  da banda de emissão são um importante indício de alterações da polaridade no microambiente do Trp. O indol tem um máximo de absorção em torno de 280 nm, e emite em aproximadamente 340 nm. No entanto, se o ambiente no qual o resíduo está inserido for mais polar, o  $\lambda_{máx}$  da transição será deslocado para o vermelho, enquanto que se o ambiente for menos polar, a tendência é que o  $\lambda_{máx}$  da transição seja deslocado para o azul. Em estudos com proteínas, a excitação em 295 nm é seletiva apenas para os resíduos de Trp, enquanto que a excitação em 280 nm excita tanto Trp como Tyr [75]. Nos estudos realizados optou-se por utilizar o  $\lambda$ exc. de 295 nm.

A Tf possui 8 resíduos de Trp. A existência de diversos potenciais sítios de ligação (19 resíduos de His estão disponíveis na Tf [61]) e a presença de mais de 1 Trp na proteína, não permitem que se conclua qual região da molécula está envolvida na interação com o complexo metálico, mas dá alguns indícios sobre o que está acontecendo na interação e é possível ter-se uma estimativa da afinidade global [43]. A Figura 4.33 ilustra a localização destes aminoácidos na apoTf.



Figura 4.33. Estrutura da apoTf, com destaque para os aminoácidos Trp (vermelho) e His (azul). PDB: 2HAU.

A supressão da fluorescência pode envolver diversos tipos de interações moleculares, tais como transferência de energia, reações no estado excitado, rearranjos moleculares, formação de complexo não fluorescente no estado fundamental e supressão colisional, ou uma combinação de diferentes fatores [43], [46]. Estes mecanismos são classificados em dinâmico ou estático, dependendo do momento em que a supressão ocorre. Supressão dinâmica ocorre quando o fluoróforo excitado interage com a molécula do supressor (seja por colisão ou qualquer outro tipo de interação) e esse encontro desativa a molécula excitada; o tempo de vida do estado excitado então é diminuído em decorrência desta interação. Supressão estática ocorre quando o supressor interage com o fluoróforo no estado fundamental formando um complexo não fluorescente ou com uma fluorescência menor que a do fluoróforo livre, e a supressão ocorre simplesmente porque o número de moléculas de fluoróforo disponíveis para serem excitadas diminuiu; o tempo de vida do estado estado estado supressa diminuiu; o tempo de vida do estado estado excitados diminuiu; o tempo de vida do estado estado excitados diminuiu; o tempo de vida do estado estado estados diminuiu; o tempo de vida do estado estado excitados diminuiu; o tempo de vida do estado estado excitados diminuiu; o tempo de vida do estado estado escitados diminuiu; o tempo de vida do estado estado excitados diminuiu; o tempo de vida do estado estado excitados diminuiu; o tempo de vida do estado estado excitados diminuiu; o tempo de vida do estado estado estado excitados diminuiu; o tempo de vida do estado estado

A fluorescência intrínseca da apoTf foi avaliada sob a adição de concentrações crescentes dos complexos RuAc, Ruibp, Ruceto e Runpx, variando-se a razão molar proteína:complexo de 1:0 até 1:20, em diferentes temperaturas. Os espectros de emissão registrados em 25°C são mostrados nas figuras 4.34 a 4.37.

O  $\lambda_{máx}$  da banda de emissão da apoTf na ausência dos complexos (332 nm) indica que o microambiente ao redor do Trp é predominantemente não polar [101]. Apenas para ter-se uma ideia, o triptofano (aminoácido livre) em água emite em 350 nm, quando excitado em 280 nm [75].



Figura 4.34. Espectros de emissão da apoTf (1 μmol L<sup>-1</sup>) na ausência e presença de RuAc (concentrações de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15 e 20 μmol L<sup>-1</sup>), após 24 h de incubação a 25°C, em meio tampão fisiológico pH 7,4, λexc. 295 nm.



Figura 4.35. Espectros de emissão da apoTf (1 μmol L<sup>-1</sup>) na ausência e presença de Ruibp (concentrações de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15 e 20 μmol L<sup>-1</sup>), após 24 h de incubação a 25°C, em meio tampão fisiológico pH 7,4, 2% etanol v/v, λexc. 295 nm.



Figura 4.36. Espectros de emissão da apoTf (1 μmol L<sup>-1</sup>) na ausência e presença de Ruceto (concentrações de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15 e 20 μmol L<sup>-1</sup>), após 24 h de incubação a 25°C, em meio tampão fisiológico pH 7,4, 2% etanol v/v, λexc. 295 nm.



Figura 4.37. Espectros de emissão da apoTf (1  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) na ausência e presença de Runpx (concentrações de 0,5, 1 e 2  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>), após 24 h de incubação a 25°C, em meio tampão fisiológico pH 7,4, 2% etanol v/v,  $\lambda$ exc. 295 nm.

Nos sistemas apoTf / RuAc, apoTf / Ruibp e apoTf / Ruceto, observou-se um pequeno deslocamento hipsocrômico da banda de emissão da proteína, que variou de 3 – 6 nm. O aumento da energia da transição indica que pode estar havendo interação nas proximidades do resíduo de triptofano, com diminuição da polaridade no microambiente [75]. No caso dos complexos com os ligantes derivados dos fármacos, os próprios ligantes possuem um caráter mais apolar, e a sua entrada na matriz da proteína pode ter causado essa diminuição da polaridade que foi sentida pelos indois dos resíduos de Trp. No entanto, no caso do complexo RuAc, que apresenta um caráter mais polar devido aos ligantes serem menores e menos polarizáveis em comparação com os fármacos, e as posições axiais do centro dimetálico estarem mais expostas, essa possibilidade não parece ser plausível. Uma explicação para o deslocamento observado seria que, após a interação com o complexo, o que também se aplica no caso dos complexos com derivados dos FAINEs, a proteína assume uma conformação tal que diminui a acessibilidade do solvente às regiões mais internas da matriz proteica, de forma que os resíduos de Trp ficam mais expostos às cadeias laterais dos aminoácidos do que ao solvente, e a polaridade do meio diminui.

Um comportamento inverso foi observado na interação da apoTf com NAMI-A: a adição do complexo à apoTf provocou um deslocamento batocrômico, que indica que a vizinhança do resíduo triptofanil tornou-se mais polar. Atribuiu-se as mudanças na polaridade a uma possível desnaturação parcial da proteína (o que exporia mais os resíduos de Trp ao solvente) ou aumento da densidade eletrônica na cavidade hidrofóbica da proteína sob a interação com o complexo de Ru [43].

A ausência do deslocamento batocrômico, então, no caso dos complexos estudados no presente trabalho, confirma o resultado obtido por dicroísmo circular, no qual não se observou alterações significativas na estrutura secundária da proteína, o que quer dizer que ela manteve o seu enovelamento.

O sistema apoTf / Runpx não pôde ser avaliado por esta técnica, pois conforme se observa na Figura 4.37, o complexo livre tem uma banda de emissão intensa com  $\lambda_{máx}$  em 357 nm que se sobrepõem à banda da proteína com  $\lambda_{máx}$  em 332 nm. Os espectros com baixas razões molares de apoTf : Runpx (1:1 e 1:2), mostraram a diminuição da banda em 332 nm com o aumento de uma banda em 348 nm, que provalvemente é resultado dessa sobreposição.

O complexo que provocou maior supressão da fluorescência intrínseca da apoTf na razão molar proteína:complexo máxima de 1:10 foi o RuAc (38%) (Figura 4.38), embora até a razão molar de 1:5, o Ruceto tenha sido mais eficiente. O que suprimiu menos foi o Ruibp, atingindo o máximo na razão molar proteína:complexo de 1:5 (10%). Uma observação importante a ser feita é que as soluções de apoTf com os complexos Ruibp e Ruceto, principalmente em maiores concentrações, apresentaram altos valores de absorbância (> 0,1), o que tornou necessária a correção para o efeito de filtro interno. As curvas de supressão dos sistemas apoTf / Ruibp e Ruceto mostram que, após a correção e acima da razão molar proteína:complexo de 1:5, a fluorescência mostrou uma tendência de aumento e não diminuição como era de se esperar. Não há evidências de que em maiores concentrações de complexo a proteína tenha assumido uma conformação tal que provocasse um aumento da emissão, e o complexo livre, embora tenha alguma fluorescência intrínseca, é muito baixa quando comparada à da proteína (Figuras 4.35 e 4.36). Algumas propostas para explicar esse comportamento são: (i) provavelmente foi consequência da ineficiência do modelo matemático em corrigir adequadamente a fluorescência observada, (ii) a formação de partículas suspensas pode ter interferido no sinal observado ou (iii) o complexo ligado à proteína teve a sua emissão aumentada. Este último fator foi considerado pelo fato de que a literatura relata exemplos em que moléculas não-fluorescentes ou pouco fluorescentes, passam a emitir ou têm a sua emissão aumentada pela interação com proteínas. Um exemplo é a varfarina, um fármaco anti-coagulante que é também muito utilizado em experimentos competitivos, que na forma pura tem um máximo de excitação em 309 nm, com o máximo de emissão em 389 nm. Quando interage com a albumina especificamente pelo sítio I, o  $\lambda_{máx}$  de excitação passa para 317 nm, e o  $\lambda$ máx. de emissão para 379 nm. Nessa condição, a fluorescência do complexo varfarina-HSA é aproximadamente 15 vezes maior do que a da varfarina livre na mesma concentração [110].



Figura 4.38. Fluorescência relativa da apoTf (1 μmol L<sup>-1</sup>) na presença dos complexos RuAc, Ruibp e Ruceto (concentrações de 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 3, 4, 5 e 10 μmol L<sup>-1</sup>), antes e após a correção do efeito de filtro interno. Dados registrados a 37°C, meio tampão fisiológico pH 7,4 (com 2% etanol v/v no caso dos RuFaines), após 24 h de incubação a 37°C.

Uma próxima etapa na análise dos resultados foi avaliá-los usando-se a equação de Stern-Volmer (Eq. 4.17), que descreve a variação da fluorescência em função da concentração de supressor em um processo colisional. Na equação, os termos  $F_0$  e Freferem-se à intensidade de emissão na ausência e na presença de supressor, respectivamente,  $k_q$  é a constante de supressão bimolecular,  $\tau_0$  é o tempo de vida do estado excitado na ausência de supressor, [Q] é a concentração do supressor e  $K_{SV}$  é a constante de Stern-Volmer [109], [111]. A constante  $K_{SV}$  indica a sensibilidade do fluoróforo ao supressor. Quanto maior, mais sensível ele é. Quando o mecanismo de supressão é estático, ou seja, a supressão é observada devido à formação de um complexo não fluorescente, o gráfico de Stern-Volmer também mostra uma correlação linear, mas  $K_{SV}$  passa a ter o significado de uma constante de associação  $K_a$  (Eq. 4.18), considerando a formação de um complexo com estequiometria 1:1, e que a [Q]<sub>livre</sub>  $\approx$  [Q]<sub>adicionado</sub> [75]. A Figura 4.39 mostra os gráficos para os sistemas estudados.

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \qquad Eq. 4.17$$

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_a[Q]$$
 Eq. 4.18



Figura 4.39. Gráficos de Stern-Volmer para os sistemas apoTf / Ru-CO<sub>2</sub>CR, com razões molares variando de 1:0 a 1:10. [apoTf] = 1 μM, meio: tampão fisiológico pH 7,4 (com 2% etanol v/v para os RuFaines), após 24 h de incubação a 37°C.

O gráfico de F<sub>0</sub>/F x [Q] mostra uma correlação linear quando o supressor é eficiente

(ou seja, é capaz de suprimir completamente a fluorescência do fluoróforo) e quando não há

a formação de um complexo não-fluorescente no estado fundamental (ausência de supressão estática). Quando ambos os mecanismos ocorrem, observa-se uma curvatura para cima no gráfico de Stern-Volmer, e a correlação entre os dados é descrita pela equação 4.19, onde  $K_{SV}$  é o componente dinâmico e V é o componente estático [109], [111]. A interpretação da constante de supressão estática V nessa equação é que ela representa um elemento de volume ativo ao redor do fluoróforo excitado. Supõe-se que a supressão instantânea ocorre quando a molécula do supressor se encontra dentro deste volume no momento da absorção do fóton. Comumente o termo referente à supressão estática é expresso como ( $1 + K_a[Q]$ ), onde  $K_a$  é a constante de associação para a formação de um complexo 1:1 não fluorescente. Em baixas concentrações de Q, exp(V[Q]) é aproximadamente igual a 1 + V[Q] [109].

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_{SV}[Q])e^{V[Q]} \qquad Eq. 4.19$$

Se o gráfico mostra curvatura para baixo, as razões do desvio podem ser: supressor ineficiente (o fluoróforo apresenta emissão residual após ser saturado pelo ligante), heterogeneidade da emissão dos fluoróforos no meio [109], diferenças na acessibilidade dos fluoróforos ao supressor, efeito de filtro interno (absorção da radiação de excitação e/ou emissão) [112], [113].

Observou-se nos três sistemas o desvio da linearidade do gráfico Stern-Volmer, com os pontos mostrando uma curvatura para baixo. Efeitos de filtro interno foram corrigidos matematicamente, e, no caso do sistema apoTf / RuAc, este efeito não foi tão importante, pois a absorbância não ultrapassou o limite de 0,1 [114] mesmo para a solução mais concentrada. Já a heterogeneidade de fluoróforos é esperada, visto que a apoTf possui 8 resíduos de Trp, localizados em diferentes ambientes.

Um estudo realizado com formas mutantes do lobo N da apoTf (estruturalmente equivalente ao lobo N da Tf inteira [115]), que possui 3 resíduos de Trp (W8, W128 e W264) mostraram que o ambiente no qual esses resíduos estão inseridos possuem características distintas quanto à polaridade. A absorção e emissão desses resíduos refletem essas características do seu microambiente. O resíduo W8 está enterrado em uma cavidade hidrofóbica e é pouco acessível ao solvente. Sua emissão é suprimida por três resíduos de fenilalanina que o rodeiam e pontes dissulfeto, então sua contribuição à emissão total é baixa. O resíduo W128 dá uma contribuição intermediária à emissão total, e está localizado próximo ao sítio do Fe(III). Sua contribuição à emissão é maior que a do W8 e menor que a do W264, por estar localizado próximo a um resíduo de histidina (H119), em que o imidazol suprime parcialmente a emissão do Trp. Já o resíduo W264 está localizado na superfície da proteína, logo, acessível ao solvente, e verificou-se que ele é o responsável pela maior contribuição à emissão de fluorescência do lobo N da Tf [116]. No lobo C, existem 5 resíduos de Trp (posições 344, 358, 441, 460 e 550). O resíduo W344 é equivalente ao W8, tanto em ambiente quanto em contribuição à emissão, W460 é equivalente ao W128, também localizado próximo ao sítio do Fe(III) e W550 é equivalente ao W264, localizado próximo à superfície da molécula, mas sua contribuição à emissão é baixa em contraste com o W264. W344 e W550 dão uma contribuição igual à emissão total ( $\approx$  15%), enquanto W441 e W460 contribuem aproximadamente com o dobro (30%) [57].

Os pontos correspondentes às menores concentrações dos complexos mostraram uma correlação linear, embora os valores de R<sup>2</sup> não tenham ficado tão bons. Apenas para se ter uma ideia da sensibilidade da proteína aos complexos, calcularam-se os valores de  $K_{SV}$  e  $k_a$  para os sistemas estudados (Tabela 4.5). O tipo de mecanismo de supressão é uma informação importante para saber que tipo de interação entre as espécies está ocorrendo. Se a supressão se dá por um mecanismo colisional (dinâmico), então não está havendo interação química entre as espécies, enquanto que na supressão estática um complexo não fluorescente (ou com menor rendimento quântico) se forma no estado fundamental.

Compleme	Parametros calculados				
Complexo		10°C	25°C	37°C	
RuAc	<i>K<sub>sv</sub></i> (10 <sup>5</sup> mol <sup>-1</sup> L)	0,80 ± 0,02	$1,0 \pm 0,1$	1,54 ± 0,08	
	<i>kq</i> (x 10 <sup>13</sup> mol <sup>-1</sup> L s <sup>-1</sup> )	1,3	1,7	2,6	
	R <sup>2</sup>	0,9979	0,9717	0,9814	
	$K_d$ (10 <sup>-7</sup> mol L <sup>-1</sup> )	7,1 ± 1,1	10,8 ± 1,3	6,6 ± 1,2	
	F <sub>c</sub>	0,67	0,63	0,62	
	R <sup>2</sup>	0,9895	0,9954	0,9837	
Ruibp	<i>K<sub>SV</sub></i> (10 <sup>5</sup> mol <sup>-1</sup> L)			1,00 ± 0,06	
	<i>kq</i> (x 10 <sup>13</sup> mol <sup>-1</sup> L s <sup>-1</sup> )	Nd	Nd	1,7	
	R <sup>2</sup>			0,9845	
	$K_d$ (10 <sup>-7</sup> mol L <sup>-1</sup> )			2,5 ± 1,2	
	F <sub>c</sub>	Nd	Nd	0,87	
	R <sup>2</sup>			0,9822	
Ruceto	<i>K<sub>SV</sub></i> (10 <sup>5</sup> mol <sup>-1</sup> L)			3,4 ± 0,4	
	<i>kq</i> (x 10 <sup>13</sup> mol <sup>-1</sup> L s <sup>-1</sup> )	Nd	Nd	5,7	
	R <sup>2</sup>			0,9567	
	$K_d$ (10 <sup>-8</sup> mol L <sup>-1</sup> )			9,6 ± 7,6	
	F <sub>c</sub>	Nd	Nd	0,67	
	R <sup>2</sup>			0,9528	

Tabela 4.5. Valores calculados dos parâmetros das equações de Stern-Volmer (4.17) e 4.20.

Nd = Não determinado

O método mais eficaz para diferenciar os dois mecanismos é a medição do tempo de vida de fluorescência: quando o mecanismo é colisional, o tempo de vida varia de acordo

com a concentração de supressor, e o gráfico da equação de Stern-Volmer mostra uma correlação linear quando plota-se  $\tau_0/\tau \times [Q]$ . No entanto, esta técnica nem sempre está disponível, e as alternativas são medir a dependência da constante  $K_{SV}$  com a temperatura ou com a viscosidade. Temperaturas mais altas geralmente aumentam a velocidade de difusão do supressor colisional, resultando em aumento da constante  $K_{SV}$ . Se o mecanismo é estático, o aumento da temperatura provoca a dissociação de complexos de ligações fracas, resultando em diminuição da constante  $K_{SV}$  [75]. Os sistemas foram avaliados em diferentes temperaturas com o objetivo de identificar-se o mecanismo de supressão. Os gráficos são mostrados na Figura 4.40.

Apenas para o sistema apoTf / RuAc foi possível calcular valores de  $K_{SV}$  para a região linear em baixas concentrações de complexo, nas 3 temperaturas (10, 25 e 37°C). Os resultados mostraram uma tendência crescente com o aumento da temperatura, o que sugere um mecanismo dinâmico. No entanto, os valores para as constantes de supressão bimoleculares  $k_q$  (calculados considerando o tempo de vida de fluorescência da apoTf na ausência de supressor de 6 x 10<sup>-9</sup> s [43]) apresentaram valores da ordem de 10<sup>13</sup> mol<sup>-1</sup> L s<sup>-1</sup>, o que está 3 ordens de magnitude acima do limite difusional de 10<sup>10</sup> mol<sup>-1</sup> L s<sup>-1</sup>. Valores tão altos sugerem o mecanismo de supressão estático, envolvendo algum tipo de ligação [43], [75]. Além disso, conforme verificado por espectroscopia eletrônica, o surgimento de bandas ausentes nos espectros da proteína e do complexo livre, indica claramente a formação de uma nova espécie. A possível explicação para o aumento das constantes com o aumento da temperatura é que o aduto formado torna-se mais estável com o aumento da temperatura, ou que a supressão se inicie por um processo dinâmico e ainda que ambos os processos estejam presentes. Estudos com HSA demonstraram o mesmo comportamento [35]. Os gráficos dos sistemas apoTf / RuFaines não apresentaram correlação linear em qualquer intervalo de concentrações, exceto para a temperatura de 37°C. Nesses sistemas, observou-se um aumento da fluorescência nas temperaturas de 10 e 25°C, mas sem qualquer correlação com a concentração do complexo. As causas prováveis já foram apontadas anteriormente.



Figura 4.40. Gráficos de Stern-Volmer em diferentes temperaturas dos sistemas (a) apoTf / RuAc, (b) apoTf / Ruibp e (c) apoTf / Ruceto. [apoTf] = 1  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, [Ru<sub>2-</sub>CO<sub>2</sub>CR] = 0 a 20  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, meio tampão fisiológico pH 7,4 (com 2% etanol v/v no caso dos RuFaines).

Considerando que a supressão tenha sido observada em virtude da formação de um complexo não fluorescente no estado fundamental, a constante  $K_{SV}$  assume o significado de uma constante de afinidade aparente ( $K_{app}$ ), uma vez que o número de sítios de ligação e o modo de ligação (covalente ou não covalente) são desconhecidos. Na interação com NAMI-

A, o valor obtido foi de 1,3 x  $10^4$  M<sup>-1</sup>, uma ordem de grandeza menor dos determinados aqui [43].

Para estimar a constante de afinidade dos adutos formados, os dados foram tratados usando-se a equação 4.20 [107], equivalente à equação 4.15, e que considera que a estequiometria do aduto formado é 1:1. Nessa equação  $F_0$ ,  $F \in F_c$  são as intensidades de emissão da proteína na ausência de complexo, na presença de complexo, e da proteína saturada com complexo, respectivamente;  $[P]_t \in [L]_a$  são as concentrações de proteína e de ligante (complexo) adicionados, respectivamente e  $K_d$  é a constante de dissociação. Os gráficos são mostrados na Figura 4.41, e os parâmetros calculados estão na Tabela 4.5.

$$F_0 - F = (F_0 - F_c) \times \frac{[P]_t + [L]_a + K_d - \sqrt{([P]_t + [L]_a + K_d)^2 - 4[P]_t[L]_a}}{2[P]_t} \quad Eq. 4.20$$



Figura 4.41. Gráficos da equação 4.20 para os sistemas (a) apoTf / RuAc nas temperaturas de 10, 25 e 37°C, e (b) apoTf / Ruceto e apoTf / Ruibp, na temperatura de 37°C.

Os valores calculados de constantes de dissociação ( $K_d$ ) foram todos da ordem de 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>, um valor que indica uma alta afinidade entre complexos e proteína. No entanto, esses altos valores parecem contradizer os resultados obtidos por espectroscopia eletrônica,

que indicaram afinidades baixas a moderadas. As possíveis causas desse desvio nos resultados, são: (i) a variação do sinal observado aqui pode estar relacionada não apenas à formação de um aduto não fluorescente no estado fundamental (supressão estática), mas também ter a contribuição de um mecanismo de supressão dinâmico (colisional) que não pôde ser excluído para uma melhor avaliação da constante de dissociação; (ii) no caso dos sistemas apoTf / RuFaines, a correção matemática do efeito de filtro interno pode não ter sido eficiente para dar resultados corrigidos confiáveis e (iii) os estudos de espectroscopia eletrônica observavam as interações do complexo, enquanto que os estudos de fluorescência observam alterações na proteína.

Em relação a esses valores, a ligação com as proteínas plasmáticas torna-se importante quando as constantes são da ordem de  $10^7 - 10^9$  M, porque nesse caso, a maior fração do fármaco administrado estará ligado às proteínas [5], e isso pode estar acontecendo aqui.

Diversas equações são encontradas na literatura para lidar com algumas das questões observadas nos experimentos aqui. Por exemplo, no caso de mecanismos estático e dinâmico combinados, a equação 4.18 pode ser aplicada para distingui-los, no entanto, ela não considera a existência de heterogeneidade dos fluoróforos emitentes [109]. A acessibilidade de diferentes fluoróforos na molécula pode ser avaliada aplicando-se a equação 4.21 (equação de Lehrer, modificação da equação de Stern-Volmer), onde é possível calcular a fração dos fluoróforos que é acessível, no entanto essa equação se aplica apenas quando a supressão é exclusivamente colisional, e não existe supressão estática [111]. Nessa equação, os termos  $F_0$  e F referem-se à intensidade de emissão na ausência e presença de supressor, respectivamente,  $\alpha$  é a fração acessível dos fluoróforos,  $K_{SV}$  é a constante de Stern-Volmer e [Q] é a concentração do supressor.

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{\alpha} + \frac{1}{\alpha \times K_{SV} \times [Q]} \qquad \qquad Eq. \, 4.21$$

Outro tratamento dos dados bastante difundido na literatura [105], [117]-[122] é o uso da equação 4.22 (linearização da equação de Hill), onde, conforme essas referências, é possível calcular a constante de associação e o número de sítios de ligação. A aplicação dessa equação, no entanto, faz algumas suposições que podem não ser válidas: a primeira é que  $[Q]_{livre} \approx [Q]_{adicionado}$  e a segunda é que o aduto formado não é fluorescente [76]. Outro problema com ela é a interpretação do coeficiente angular n, que é normalmente tratado como o número de sítios de ligação na molécula. Este coeficiente só terá esse significado quando os sítios possuírem cooperatividade infinita, ou seja, existirem basicamente duas populações de espécies: moléculas livres e moléculas com n ligantes. Como essa condição não é comum, o coeficiente angular *n* (coeficiente de Hill) dá apenas uma indicação quanto à cooperatividade de ligação dos sítios: se n > 1, então a presença de um ligante favorece a ligação de outros (cooperatividade positiva), se n < 1, então a presença de um ligante desfavorece a ligação de outros (cooperatividade negativa) e se n = 1, a presença de um ligante não tem influência sob a ligação de outros (situação de não-cooperatividade) [107], [123]. Nesta equação, o termo  $K_a$  refere-se a uma constante de associação, e os demais termos são os mesmos já relatados.

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + n \log[Q] \qquad \qquad Eq. 4.22$$

Os estudos também foram feitos com a hTf, apenas na temperatura de 37°C. A presença de íons Fe(III) coordenados suprime a fluorescência intrínseca da apoTf em aproximadamente 78% (conforme já relatado na literatura, [57]). Os espectros de emissão da apoTf e hTf nas mesmas condições são mostrados na Figura 4.42. As emissões dos resíduos W128 e W460 nos lobos N e C, respectivamente, são as mais suprimidas quando os

íons Fe(III) entram em seus sítios de ligação, conforme demonstrado em experimentos usando formas mutantes da transferrina [57], [116]. A supressão da emissão da proteína pela ligação com o íon Fe(III) envolve mecanismos estático e dinâmico. Estático porque a ligação do íon Fe provoca um rearranjo tal que diminui parcialmente o rendimento quântico dos resíduos de Trp, e dinâmico porque também ocorre transferência de energia ressonante (RET, *resonance energy transfer*), dos resíduos de Trp e da banda de absorção no UV formada pela interação dos tirosinatos com o ferro.



Figura 4.42. Espectros de emissão da apoTf e hTf, ambas em concentração de 1  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, meio tampão fisiológico pH 7,4, 37°C,  $\lambda_{excitação}$ : 295 nm, voltagem da fotomultiplicadora: 620V.

Os espectros de emissão dos sistemas estudados são mostrados na Figura 4.43. Nos estudos realizados entre hTf e os complexos a voltagem da fotomultiplicadora foi ajustada para obter um sinal mais intenso. Por essa razão, nos sistemas hTf / RuFaines, os espectros de emissão das amostras contendo maiores concentrações de complexo mostraram uma intensidade maior quando comparados aos espectros registrados com a apoTf. De imediato se observa que a variação na emissão provocada pelas concentrações crescentes dos complexos é bem menor que as observadas com a apoTf.

Comparando-se a fluorescência relativa dos complexos interagindo com as formas apo e holo da transferrina (Figura 4.44), observa-se que a supressão provocada pelos três complexos é menor na hTf, em qualquer concentração. Os complexos RuFaines começam a aumentar a fluorescência observada em menores concentrações do que as verificadas com a apoTf. A maior supressão provocada pelo RuAc foi de 7%, na razão molar proteína:complexo máxima de 1:10; o Ruibp atingiu o máximo de 4% na razão molar proteína:complexo de 1:1,2 e o Ruceto também reduziu no máximo em 7%, na razão molar proteína:complexo 1:1,2. De modo geral, esses resultados indicam que a interação dos complexos com a holotransferrina é menor do que a observada com a apoTf.

Primeiramente, a menor supressão observada é consequência da coordenação dos íons Fe(III) aos seus sítios. Conforme relatado na literatura [57], [115], [116], dois dos oito resíduos de Trp estão envolvidos diretamente na ligação dos íons, e a emissão é suprimida por processos estático e dinâmico. Logo, grande parte da emissão já é suprimida por esta interação.



Figura 4.43. Espectros de emissão da hTf (1  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) na ausência e presença dos complexos RuAc, Ruibp e Ruceto (concentrações de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15 e 20  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>), após 24 de incubação a 37°C, em meio tampão fisiológico pH 7,4 (com 2% etanol v/v no caso dos RuFaines),  $\lambda_{exc}$  295 nm, voltagem PMT: 730 V.



Figura 4.44. Fluorescência relativa da hTf (1 μmol L<sup>-1</sup>) na presença dos complexos RuAc,
Ruibp e Ruceto (concentrações de 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 3, 4, 5 e 10 μmol L<sup>-1</sup>), após a correção do efeito de filtro interno. Dados registrados a 37°C, meio tampão fisiológico pH 7,4 (com 2% etanol v/v no caso dos RuFaines), após 24 h de incubação a 37°C.

Outro ponto é que a proteína adota uma conformação fechada (Figura 4.45) sob a interação com os íons Fe(III), o que pode impedir que outras moléculas entrem na matriz proteica. Na transferrina em sua forma apo, os ligantes do sítio do Fe(III) estão em contato direto com o meio, e na forma holo, os íons Fe(III) são aprisionados em seus sítios e ficam distantes aproximadamente 10 Å da superfície da molécula [124].



Figura 4.45. Representação das conformações aberta e fechada do Lobo-C da transferrina, sob a interação com o íon Fe(III). Adaptada da referência 124.

Levando em conta as alterações conformacionais envolvidas na ligação do Fe(III), as

interações da hTf com os complexos provavelmente envolvem apenas ligações superficiais,

que afetam os Trps mais expostos. RuAc provalvemente não penetra a matriz da proteína porque ele está positivamente carregado e não terá afinidade por regiões hidrofóbicas onde se encontram os outros Trps. Os complexos RuFaines provavelmente não penetrarão a matriz proteica devido a impedimentos estéricos.

A maior diferença observada em relação à capacidade de supressão entre apoTf e hTf foi para o RuAc, mostrando que a interação deste complexo provavelmente envolve os sítios de ligação do Fe, pois a sua interação foi a mais afetada pela entrada dos íons metálicos aos seus sítios. Essa tendência foi indicada nos estudos de espectroscopia eletrônica, que revelou a menor interação do RuAc com a hTF do que com a apoTf. Conforme mencionado anteriormente, a carga positiva do RuAc nas condições experimentais empregadas  $([Ru_2(CH_3CO_2)_4(H_2O)_2]^+)$  favorece a sua interação através desses sítios.

Já no caso dos complexos RuFaines, o esperado de acordo com os resultados obtidos por espectroscopia eletrônica seria que a interação fosse a mesma, uma vez que, por UV-Vis, as variações espectrais foram praticamente as mesmas observadas para as duas formas da Tf. A razão para a diferença observada aqui é o fato de que os resíduos de Trp que são observados por espectroscopia de fluorescência não estavam mais visíveis para a técnica, o que não implica necessariamente que a interação dos complexos RuFaines tenha sido drasticamente diminuída. O aumento da fluorescência verificado em menores concentrações nesse estudo se deve ao aumento da sensibilidade do detector.

## 4.2.3.2. apoTf marcada com a sonda fluorescente DTAF

Outra forma de avaliar a interação de ligantes com proteínas é a inclusão de sondas fluorescentes que se ligam a um sítio específico, e observar as alterações do espectro de emissão da sonda sob a interação com o ligante de interesse [75].

A sonda utilizada neste experimento foi a 5-(4,6-diclorotriazinil)aminofluoresceína) – DTAF, e sua estrutura é mostrada na Figura 4.46. Ela se liga ao aminoácido Lys-569 no lobo C-terminal da apoTf, que se encontra a uma distância de 20-25 Å do íon de Fe(III) ligado. Este resíduo de Lys é um sítio aniônico que está envolvido na liberação do Fe. Quando o Fe se coordena ao seu sítio de ligação na transferrina marcada com o fluoróforo, observa-se a diminuição da emissão [77]. A supressão da fluorescência da sonda é observada, então, quando alguma espécie se liga à proteína nas proximidades desse sítio. Este experimento foi realizado com o objetivo de avaliar se os complexos Ru<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CR poderiam estar interagindo com a apoTf através do sítio de ligação do Fe.



Figura 4.46. Estrutura da sonda fluorescente DTAF.

As curvas de supressão corrigidas dos compostos analisados são mostradas na Figura 4.47. Os padrões de Fe e Ru e o complexo RuAc foram os que mais suprimiram a fluorescência da FI-aTf.

O padrão de Fe analisado como controle mostrou uma supressão máxima da fluorescência com uma razão molar proteína:Fe de 1:6. O estado de oxidação do ferro na solução utilizada é Fe(II), mas ele é instável e nas condições experimentais empregadas ele sofre oxidação a Fe(III). A constante de ligação do Fe(III) nos sítios específicos é bastante elevada (ambas da ordem de 10<sup>22</sup> L mol<sup>-1</sup>) [57], então, baixas concentrações do metal já são

suficientes para metalar a proteína. O padrão de Ru(III), por outro lado, só atingiu supressão similar com excesso molar de 37,5 vezes em relação à proteína. Os íons de Ru(III) se ligam aos sítios específicos de Fe(III), mas com menor afinidade. Estudos de dicroísmo circular mostraram o surgimento de duas bandas no espectro de CD da apoTf (positiva em 330 nm e negativa em 490 nm) com adições sucessivas de complexo de Ru(III)-NTA até atingir a saturação com a razão molar apoTf:Ru de 1:2, e bandas em 290 e 245 nm no espectro eletrônico que são atribuídas a transições intraligantes do metal coordenado a grupos tirosinatos, além de ombros em 390 e 340 nm atribuídas a bandas de transferência de carga ligante-metal, dando evidências da coordenação de íons Ru(III) aos sítios específicos de Fe(III) [125].



Figura 4.47. Fluorescência relativa das soluções contendo os compostos de Ru e Fe e Fl-aTf, após 1 h de reação, a 37°C, em tampão fisiológico pH 7,4. [Fl-aTf] = 4  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>.

O complexo RuAc suprimiu a fluorescência da sonda, mas não de forma tão eficiente quando o Fe(III) ou Ru(III), indicando que sua interação com a apoTf envolve os sítios de

[132]

ligação do Fe(III), mas que essa interação deve ser mais fraca que com os íons citados. Esse resultado está de acordo com a observação feita no estudo da fluorescência intrínseca da apoTf. O complexo KP1019 interage com a apoTf pelos sítios específicos do Fe(III) também [70], [89] e em outros sítios não específicos, com afinidade moderada (da ordem de 10<sup>4</sup> L mol<sup>-1</sup>) [71].

O complexo Ruibp não suprimiu a emissão, confirmando a hipótese de que ele não interage pelo sítio do Fe(III). O Runpx nas concentrações mais baixas suprimiu a fluorescência em um nível similar ao RuAc, mas conforme a concentração foi aumentada, ele acabou aumentando a intensidade da emissão. O fato de os complexos com fármacos não provocarem a supressão da fluorescência evidencia que estes compostos não estão interagindo na região próxima ao sítio de ligação do Fe, ao contrário do complexo RuAc. Este fato pode ser explicado levando-se em conta (i) o tamanho dos complexos com fármacos como ligantes, que é maior que o sítio que normalmente acomoda 1 íon Fe(III), e, portanto, apresentam impedimentos estéricos para acessar essa região da proteína, e (ii) a polaridade da molécula contendo os fármacos. Como os fármacos apresentam caráter mais apolar em relação ao sítio do Fe, é de se esperar que a afinidade entre os complexos e esse sítio seja baixa.

O aumento da intensidade da fluorescência pode ser decorrente de alterações conformacionais da proteína sob a interação com os complexos RuFaines. A interação dos complexos com regiões hidrofóbicas da proteína pode ter modificado o microambiente próximo à sonda, de forma que maior parte da energia fosse emitida como fótons, e não transferida por mecanismos não radiativos.

## 4.2.4. Ultrafiltração

Ultrafiltração é uma técnica de separação por membrana usada para separar substâncias de acordo com o seus respectivos tamanhos e massas molares. É idealmente adequada para separar sais e outros solutos de baixa massa molecular de espécies de alta massa molecular. Esta técnica é baseada na aplicação de uma pressão diferencial através de uma membrana semipermeável, que impele materiais permeáveis através desta. A força centrífuga é usada para criar a pressão diferencial sobre a amostra e facilitar o processo de separação. Membranas usadas em filtração molecular têm diâmetros de poro variando de 1 a 1000 Å e geralmente separam partículas de até 10<sup>6</sup> Da. Partículas com massa molecular ou tamanho menor que o *cut-off* da membrana passam através desta e emergem como permeado. Solutos com maior massa molecular são retidos pela membrana e são concentrados durante o processo de filtração [126].

Esse experimento foi feito com o objetivo de avaliar a capacidade de retenção dos complexos de Ru pela transferrina (apo e holo). Para fins de comparação, o ensaio também foi realizado com um padrão de Ru(III). Foram preparadas soluções contendo as proteínas e excesso de 10 vezes dos complexos, em meio tampão fisiológico pH 7,4. Os dispositivos usados possuem membrana de *cut-off* 30 kDa. Dessa forma, solutos de massas molares menores que 30 kDa passam através dela. Os complexos de Ru avaliados possuem membrana, assim como a fração de complexo ligada a ela. Dessa forma é então fica retida na membrana, assim como a fração de complexo ligada a ela. Dessa forma é possível separar a fração de complexo ligado à proteína da fração livre, e quantificar o conteúdo de Ru ligado à proteína, para uma estimativa da estequiometria dos adutos formados.

A concentração de Ru foi determinada na fase proteica por ICP-OES. Os resultados encontrados são mostrados na Tabela 4.6. A concentração molar de Ru foi dividida pela concentração molar de Tf para se obter a razão molar Ru:proteína. É bom ressaltar, porém, que esses valores são uma média da quantidade de Ru retida pela proteína, e que pode não representar a estequiometria real dos adutos formados, uma vez em que em solução podem existir espécies com mais ou menos moléculas de complexo ligadas.

Analisando os resultados, verificou-se que o RuAc interage praticamente com a mesma razão molar proteína:complexo tanto na apoTf quanto na hTf. Nesses sistemas, 1 molécula de proteína interage em média com 4,5 mols de Ru, o que corresponderia a 2 moléculas do complexo (pois 1 mol RuAc, tem 2 mol Ru).

Amostra	$Ru, mg L^{-1}$	[Ru], mmol L <sup>-1</sup>	[Tf], mmol L <sup>-1</sup>	Razão molar (Tf : Ru)
apoTf + Ru	20,49	0,20	0,03	1:6,7
apoTf + RuAc	14,67	0,14	0,03	1:4,7
apoTf + Ruibp	39,65	0,39	0,03	1:13
apoTf + Ruceto	40,22	0,40	0,03	1:13
apoTf + Runpx	40,53	0,40	0,03	1:13
hTf + Ru	7,45	0,074	0,03	1:2,5
hTf + RuAc	13,20	0,13	0,03	1:4,3
hTf + Ruibp	41,07	0,41	0,03	1:14
hTf + Ruceto	36,83	0,36	0,03	1:12
hTf + Runpx	40,59	0,40	0,03	1:13

Tabela 4.6. Concentração de Ru ligado à Tf, determinada por ICP-OES.

<sup>\*</sup> Concentração determinada na análise por ICP-OES.

Para os complexos com ligantes derivados dos fármacos, a natureza do ligante equatorial parece não ter influenciado na capacidade de interação com a proteína. Todos os complexos RuFaines apresentaram em média 13 mols de Ru por mol de proteína, o que corresponde a aproximadamente 7 mols de complexo RuFaine.

Esses resultados revelam que para os RuFaines, o número de sítios de ligação na Tf é o mesmo, independente de estar o Fe(III) coordenado ao seu sítio de ligação. Para o RuAc o resultado foi inesperado. As análises por outras técnicas indicaram que a sua interação com a Tf envolve os sítios do Fe(III). O que pode estar acontecendo é que a alteração conformacional da hTf em relação à apoTf pode ter provido um sítio de ligação que antes era inacessível e/ou inexistente e então o número de sítios permanece o mesmo, mas não o sítio em si. Interações não específicas podem ter levado à manutenção do número de mols ligado à hTf. Já para os RuFaines, os resultados reforçam a suposição de que esses complexos estejam interagindo com regiões superficiais da molécula, e então a presença de Fe(III) não interfere no número de sítios, embora não se possa descartar que os sítios, assim como no caso do RuAc, podem não ser os mesmos.

De modo geral, cerca de 70% dos complexos RuFaines e 20% do complexo RuAc, permaneceram retidos na fase proteica. Um experimento similar foi feito com apoTf e NAMI-A, mas a técnica de separação foi FPLC (*fast protein liquid chromatography*), e a razão molar proteína:complexo empregada foi de 1:20. Após 48 h de incubação, 56% de Ru adicionado inicialmente permaneceram retidos na proteína [43]. Para o KP1019, 10 mols de Ru permanecem ligados à apoTf quando o excesso de complexo é de 10 vezes em relação à proteína, ou seja, 100 % de retenção. A técnica usada nesse último caso foi eletroforese capilar hifenada a plasma indutivamente acoplado e espectrometria de massas [71].

Apenas para o Ru(III) foi observada uma diferença significativa na estequiometria estimada com base nos resultados de ICP: interagindo com a apoTf, aproximadamente 7 mols se ligam à proteína, enquanto que com a hTf, apenas 2. A diferença pode estar no fato de que o Ru(III) pode ligar-se ao sítio do Fe, conforme relatado na literatura [125], e ainda a conformação da proteína, sendo mais aberta no caso da sua forma apo, pode favorecer a coordenação dos íons nas regiões mais internas, enquanto que a conformação mais fechada da forma holo pode impedir a entrada dos íons Ru(III) [55].

As mesmas amostras foram analisadas por MALDI-MS. Através da análise de espectrometria de massas, foi também possível obter informações sobre o tipo de interação existente. Os espectros registrados são mostrados nas Figuras 4.48 a 4.57.



Figura 4.48. Espectro de massas MALDI-TOF-MS da apoTf na presença de Ru(III), razão molar 1:20 (apoTf : Ru), após ultrafiltração e da apoTf sem complexo. Ambas em tampão fisiológico pH 7,4, e após 15 min de incubação a 37°C.



Figura 4.49. Espectro de massas MALDI-TOF-MS da apoTf na presença de RuAc, razão molar 1:10 (apoTf : RuAc), após ultrafiltração e da apoTf sem complexo. Ambas em tampão fisiológico pH 7,4, e após 15 min de incubação a 37°C.



Figura 4.50. Espectro de massas MALDI-TOF-MS da apoTf na presença do complexo Ruibp, razão molar 1:10 (apoTf : Ruibp), após ultrafiltração e da apoTf sem complexo. Ambas em tampão fisiológico pH 7,4, e após 15 min de incubação a 37°C, nas faixas de baixa razão m/z (a) e alta razão m/z (b).



Figura 4.51. Espectro de massas MALDI-TOF-MS da apoTf na presença do complexo Ruceto, razão molar 1:10 (apoTf : Ruceto), após ultrafiltração e da apoTf sem complexo. Ambas em tampão fisiológico pH 7,4, e após 15 min de incubação a 37°C, nas faixas de baixa razão m/z (a) e alta razão m/z (b).



Figura 4.52. Espectro de massas MALDI-TOF-MS da apoTf na presença do complexo Runpx, razão molar 1:10 (apoTf : Runpx), após ultrafiltração e da apoTf sem complexo. Ambas em tampão fisiológico pH 7,4, e após 15 min de incubação a 37°C, nas faixas de baixa razão m/z (a) e alta razão m/z (b).



Figura 4.53. Espectro de massas MALDI-TOF-MS da hTf na presença de Ru(III), razão molar 1:20 (hTf : Ru), após ultrafiltração e da hTf sem complexo. Ambas em tampão fisiológico pH 7,4, e após 15 min de incubação a 37°C.



Figura 4.54. Espectro de massas MALDI-TOF-MS da hTf na presença de RuAc, razão molar 1:10 (hTf : RuAc), após ultrafiltração e da hTf sem complexo. Ambas em tampão fisiológico pH 7,4, e após 15 min de incubação a 37°C.



Figura 4.55. Espectro de massas MALDI-TOF-MS da hTf na presença do complexo Ruibp, razão molar 1:10 (hTf : Ruibp), após ultrafiltração e da hTf sem complexo. Ambas em tampão fisiológico pH 7,4, e após 15 min de incubação a 37°C, nas faixas de baixa razão m/z (a) e alta razão m/z (b).



Figura 4.56. Espectro de massas MALDI-TOF-MS da hTf na presença do complexo Ruceto, razão molar 1:10 (hTf : Ruceto), após ultrafiltração e da hTf sem complexo. Ambas em tampão fisiológico pH 7,4, e após 15 min de incubação a 37°C, nas faixas de baixa razão m/z (a) e alta razão m/z (b).



Figura 4.57. Espectro de massas MALDI-TOF-MS da hTf na presença do complexo Runpx, razão molar 1:10 (hTf : Runpx), após ultrafiltração e da hTf sem complexo. Ambas em tampão fisiológico pH 7,4, e após 15 min de incubação a 37°C, nas faixas de baixa razão m/z (a) e alta razão m/z (b).

As variações observadas na razão m/z das proteínas estão resumidas na Tabela 4.7. Não foram observados incrementos na razão m/z dos picos das proteínas que indicassem a entrada dos complexos, exceto para RuAc e Ru(III) com a apoTf, ainda que a estimativa da razão molar proteína:Ru com base nessa variação tenha sido menor do que a baseada nos resultados de ICP.

Os tipos de interações que podem ocorrer entre complexos e proteínas são: (a) formação de uma ligação covalente com coordenação do íon à proteína e (b) interações não covalentes fracas, que incluem ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas [49]. No caso dos complexos de RuFAINEs, é possível supor a ocorrência de interações fracas que explicariam a presença dos complexos na fase proteica. Ao mesmo tempo, elas explicam porque não se detecta aumento de m/z no espectro de massas, uma vez que os componentes dos adutos Ru / Tf não tenderiam a ficar unidos no processo de preparação da amostra para análise e / ou ionização. Já o RuAc, por
ter ligantes menores, pode interagir através da coordenação do centro Ru<sub>2</sub> a alguma cadeia lateral dos aminoácidos da proteína, o que explica uma interação mais forte com ela, que se mantém parcialmente na análise por MALDI-MS.

Tabela 4.7. Sinais observados na faixa alta de razão m/z da Tf na presença dos complexos de Ru<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CR.

Amostra	Resultado (m/z)	Diferença (m/z)	MM da espécie	n° de íons complexos/ proteína
hTf	79522,669	-	-	-
hTf+Ru	79527,839	5,170	-	-
hTf+RuAc	79821,956	299,287	438,3	0,77
hTf+Ruibp	79476,278	-46,391	1023,2	-0,03
hTf+Ruceto	79517,513	-5,156	1219,3	-0,03
hTf +Runpx	79522,669	0,000	1119,1	-0,01
Amostra	Resultado (m/z)	Diferença (m/z)	MM da espécie	n° de íons complexos/ proteína
<b>Amostra</b> apoTf	<b>Resultado</b> (m/z) 79435,053	Diferença (m/z) -	MM da espécie -	n° de íons complexos/ proteína
Amostra apoTf apoTf+Ru	<b>Resultado</b> (m/z) 79435,053 79759,988	Diferença (m/z) - 324,935	MM da espécie -	n° de íons complexos/ proteína - -
Amostra apoTf apoTf+Ru apoTf+RuAc	Resultado (m/z) 79435,053 79759,988 79987,320	Diferença (m/z) - 324,935 552,267	MM da espécie - - 438,3	n° de íons complexos/ proteína - - 1,17
Amostra apoTf apoTf+Ru apoTf+RuAc apoTf+Ruibp	Resultado (m/z) 79435,053 79759,988 79987,320 79465,971	Diferença (m/z) - 324,935 552,267 30,918	MM da espécie - - 438,3 1023,2	n° de íons complexos/ proteína - - 1,17 0,03
Amostra apoTf apoTf+Ru apoTf+RuAc apoTf+Ruibp apoTf+Ruceto	Resultado (m/z) 79435,053 79759,988 79987,320 79465,971 79548,447	Diferença (m/z) - 324,935 552,267 30,918 113,394	MM da espécie - 438,3 1023,2 1219,3	n° de íons complexos/ proteína - - 1,17 0,03 0,09

A análise na faixa de baixa razão m/z detectou os complexos na fase proteica, o que é evidência de que eles estavam interagindo com a proteína. Caso contrário, eles teriam passado para a fase ultrafiltrada. Diversos sinais com padrão isotópico do Ru foram detectados na faixa de baixa razão m/z, cujas atribuições são dadas nas Figuras 4.50 a 4.52 e 4.55 a 4.57, e resumidas nas Tabelas 4.8 e 4.9.

Amostra	m/z observado	Atribuição proposta	m/z calculado
hTf+Ruibp	1024,2	[Ru <sub>2</sub> (ibp) <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1024,3
	956,0	$[Ru_2(HCCA)_4]^+$	956,0
	1021,0	$[Ru_2(ceto)(HCCA)_3]^+$	1021,0
hTf, Ducata	1086,0	$[Ru_2(ceto)_2(HCCA)_2]^+$	1086,0
nn+Rucelo	1151,1	$[Ru_2(ceto)_3(HCCA)]^+$	1151,1
	1216,1	$[Ru_2(ceto)_4]^+$	1216,1
	1274,1	$[Ru_2(ceto)_4Cl] + Na^+$	1274,1
	956,0	$[Ru_2(HCCA)_4]^+$	956,0
hTf +Runpx	997,0	[Ru₂(npx)(HCCA)₃] <sup>+</sup>	997,0
	1038,1	[Ru <sub>2</sub> (npx) <sub>2</sub> (HCCA) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	1038,0
	1079,1	[Ru <sub>2</sub> (npx) <sub>3</sub> (HCCA)] <sup>+</sup>	1079,10
	1120,3	[Ru <sub>2</sub> (npx) <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1120,15
	1137,1	[Ru <sub>2</sub> (npx) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O)] <sup>+</sup>	1138,2
	1178,1	[Ru <sub>2</sub> (npx) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O)(OH)] + Na <sup>+</sup>	1178,2

Tabela 4.8. Atribuição dos sinais observados nos espectros de massas MALDI-TOF-MS na faixa de baixa razão m/z, para os sistemas hTf / Ru<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CR

Tabela 4.9. Atribuição dos sinais observados nos espectros de massas MALDI-TOF-MS na faixa de baixa razão m/z, para os sistemas apoTf / Ru<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CR

Amostra	m/z observado	Atribuição proposta	m/z calculado
apoTf+Ruibp	1024,2	[Ru <sub>2</sub> (ibp) <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1024,3
	956,0	$[Ru_2(HCCA)_4]^+$	956,0
	1021,0	$[Ru_2(ceto)(HCCA)_3]^+$	1021,0
apoTf+Ruceto	1086,0	[Ru <sub>2</sub> (ceto) <sub>2</sub> (HCCA) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	1086,0
	1216,1	[Ru <sub>2</sub> (ceto) <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1216,1
	1274,1	$[Ru_2(ceto)_4Cl] + Na^+$	1274,1
	956,0	[Ru₂(HCCA)₄] <sup>+</sup>	956,0
	997,0	[Ru₂(npx)(HCCA)₃] <sup>+</sup>	997,0
apoTf+Runpx	1038,1	[Ru <sub>2</sub> (npx) <sub>2</sub> (HCCA) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	1038,0
	1079,1	[Ru <sub>2</sub> (npx) <sub>3</sub> (HCCA)] <sup>+</sup>	1079,10
	1120,3	[Ru <sub>2</sub> (npx) <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1120,15

No experimento de interação do Ruibp com hTf e com apoTf, verificou-se que a espécie de Ru predominante em solução é o tetracarboxilato [Ru<sub>2</sub>(ibp)<sub>4</sub>]<sup>+</sup>. Outros sinais com padrão isotópico do Ru aparecem na interação com a apoTf, mas são bem menos intensos

No experimento de interação do Ruceto com hTf, aparece o sinal relativo ao tetracarboxilato [Ru<sub>2</sub>(ceto)<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, mas com baixa intensidade quando comparado aos demais; na apoTf esse sinal é quase imperceptível. Todavia, aparecem sinais relativos a espécies que têm os ligantes cetoprofenatos progressivamente substituídos por moléculas desprotonadas do ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, HCCA, que é a matriz usada na ionização por MALDI (Figura 4.58). A análise dos complexos na ausência de proteínas (dissolvidos em etanol) mostrou os mesmos sinais, o que revela que essa substituição não é consequência da interação com as proteínas. A presença dessas espécies, no entanto, e a ausência ou baixa intensidade do sinal da espécie [Ru<sub>2</sub>(ceto)<sub>4</sub>]<sup>+</sup> indicam a menor estabilidade desse complexo frente à matriz, quando comparado ao Ruibp. Ele tende a sofrer substituição com maior facilidade. Um estudo realizado com o RuAc interagindo com a lizosima de ovo de galinha, onde foi obtido um cristal desse aduto e caracterizado por difração de raios-X mostrou que o complexo RuAc perde 2 ligantes acetato e se coordena à proteína por uma cadeia lateral de um aspartato em ponte, e duas posições da esfera de coordenação são ocupadas por moléculas de água [33]. De fato, se os ligantes cetoprofenatos são lábeis o suficiente, é possível supor que a troca de ligantes equatoriais também possa ocorrer com o Ruceto. Aparece ainda, com as duas proteínas, um sinal relativo a um aduto do complexo com um íon Na<sup>+</sup> ([Ru<sub>2</sub>(ceto)<sub>4</sub>Cl]+Na<sup>+</sup>) com baixa intensidade, mas mais intenso que o da espécie [Ru<sub>2</sub>(ceto)<sub>4</sub>]<sup>+</sup>. Em MALDI-MS é bastante comum a formação de adutos entre os íons ou moléculas da amostra e íons como H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, de acordo com as espécies presentes no meio [127], de forma que é razoável supor que houve a formação de um aduto com Na $^{\star}$ 

nesse caso. É bom ressaltar, porém, que o sinal mais intenso no espectro ESI-MS deste complexo é o relativo à unidade [Ru<sub>2</sub>(ceto)<sub>4</sub>]<sup>+</sup> [28], confirmando que o processo de ionização auxiliado por matriz utilizado nesse experimento provocou a substituição dos ligantes cetoprofenatos.

Na interação do Runpx com a apoTf o sinal da espécie  $[Ru_2(npx)_4]^+$  aparece com uma intensidade alta, mas também são vistos sinais relativos à substituição progressiva dos ligantes naproxenatos por HCC<sup>-</sup>. Comparado ao Ruceto, sua estabilidade é maior, mas a presença das espécies substituídas mostra que esse complexo também não é tão estável quanto o Ruibp. Na interação com a hTf, aparecem ainda sinais das espécies coordenadas a duas moléculas de água e formando um aduto com Na<sup>+</sup>.



Figura 4.58. Formula estrutural do ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, HCCA, matriz usada na análise por MALDI-MS na faixa de baixa razão m/z. Massa molar: 189,17 g mol<sup>-1</sup>.

# 4.2.5. Captação celular

Os resultados apresentados até agora mostraram que os complexos Ru<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CR interagem com a transferrina, seja ela em sua forma apo ou holo. Uma das grandes motivações para o interesse em se estudar a interação não apenas de metalofármacos, mas candidatos a fármacos antitumorais em geral com a transferrina, advém do fato de que esta proteína, por ser uma transportadora natural de Fe(III), e de que as células tumorais superexpressam seus receptores por apresentarem alta demanda por este metal como consequência de seu crescimento descontrolado, poderia ser usada para a entrega direcionada ao alvo. Por essa razão, tem sido proposto que o acúmulo de complexos de rutênio nos tumores pode ser mediado por esta proteína plasmática [5], [67], [70].

A questão que surge, com base nesses resultados e de tantos relatos na literatura é: Esta proteína está de fato facilitando a entrada dos complexos na célula? Para tentar responder esta questão foi realizado o experimento descrito a seguir.

Primeiramente, as condições de concentração e tempo de incubação foram escolhidas com base nos resultados obtidos em estudos de atividade antiproliferativa em colaboração com o ICB (ainda não publicados). De acordo com esse trabalho, foram selecionadas as concentrações dos complexos que exibem o melhor desempenho quanto à atividade antiproliferativa de células de glioma humano da linhagem U-87: Ruibp, 100 µmol L<sup>-1</sup>, Ruceto e Runpx, 200 µmol L<sup>-1</sup>, após 72 h de incubação.

A concentração de Tf foi calculada de forma a manter a razão molar proteína:complexo em 1:2 (tratamentos 1, 2 e 5) [70], mas também realizaram-se testes com a concentração de Tf próxima da encontrada em condições fisiológicas (tratamentos 3 e 4). A presença de Fe(III) no seu sítio de ligação também foi avaliada pela sua adição (na forma sulfato ferroso amoniacal) à apoTf na razão molar proteína:Fe(III) de 1:0,33, que é a condição encontrada naturalmente (tratamentos 2 e 4), além de se utilizar a hTf.

A concentração de Ru determinada or ICP-OES é expressa em  $\mu$ g de Ru / 10<sup>4</sup> células, e os resultados para os três complexos são mostrados nas figuras 4.59 a 4.60.



Figura 4.59. Captação do complexo Ruibp por células de glioma humano da linhagem U-87, após 72 h de incubação a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO<sub>2</sub>. [Ruibp] inicial: 100  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>.



Figura 4.60. Captação do complexo Ruceto por células de glioma humano da linhagem U-87, após 72 h de incubação a 37°C, atmosfera úmida e 5%  $CO_2$ . [Ruceto] inicial: 200 µmol L<sup>-1</sup>.



Figura 4.61. Captação do complexo Runpx por células de glioma humano da linhagem U-87, após 72 h de incubação a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO<sub>2</sub>. [Runpx] inicial: 200 μmol L<sup>-1</sup>.

Para o complexo Ruibp a maior captação foi observada com o complexo livre e com o aduto com hTf, cujos resultados foram praticamente iguais. A captação dos adutos com apoTf foi menor, embora tenha apresentado um resultado próximo do observado para o complexo livre e hTf. Esses resultados mostram que a conjugação com a Tf não facilitou a entrada dos complexos nas células, e no caso da apoTf, ainda diminuiu um pouco a capacidade de internalização do complexo, embora não possa ser considerado significativo. De modo geral, a interação com a transferrina não influenciou a captação do complexo pelas células, indicando que o mecanismo de internalização não está envolvendo o ciclo da transferrina, através da ligação ao receptor específico e internalização por endocitose.

Para o complexo Ruceto, a maior captação foi observada com o aduto Ruceto-apoTf, quando a concentração da proteína foi próxima da condição fisiológica, seguido pelo aduto com hTf. O complexo livre teve uma captação similar à observada nas demais condições. Para este complexo, a conjugação com a hTf facilitou a sua entrada nas células, embora não se possa afirmar que com a apoTf esse comportamento também seja observado, visto que o nível de captação do aduto com apoTf em concentração maior (100 μmol L<sup>-1</sup>) foi praticamente o mesmo que o observado para o complexo livre.

Os resultados para o complexo Runpx foram semelhantes aos encontrados para o Ruibp. A captação de complexo livre foi a maior observada, seguida pelo aduto com hTf. A menor captação foi verificada com o aduto com a apoTf. Neste caso também, a conjugação com a Tf não facilitou a entrada do complexo nas células, e no caso da apoTf, a diminuição da capacidade de internalização do complexo foi maior do que com Ruibp. Novamente, esses resultados indicam que o mecanismo de internalização não está envolvendo o ciclo da transferrina, através da ligação ao receptor específico e internalização por endocitose, e nesse caso, a interação com a proteína está desfavorecendo a captação do complexo pelas células.

Em todos os casos, a adição de Fe em concentração próxima da encontrada fisiologicamente não aumentou a captação.

A diminuição da captação dos complexos de Ru conjugados com a apoTf pode ser explicada considerando que o receptor específico não tem afinidade pela proteína quando os íons Fe(III) estão ausentes. O receptor tem alta afinidade pela proteína carregada com dois íons Fe(III) em seus sítios, que adota uma conformação tal que é reconhecida por ele e internalizada por endocitose [55].

O mesmo resultado foi verificado em diversos trabalhos em que a influência da conjugação dos complexos de Ru com apoTf e hTf foi avaliada quanto à atividade antiproliferativa, citotoxicidade ou captação celular. Estudos com o complexo KP 1019 e seu análogo de imidazol (em lugar do indazol) em células de câncer de cólon humano da linhagem SW707 mostraram que os complexos ligados à hTf apresentaram maior atividade

antiproliferativa que os complexos livres, e que dos adutos de apoTf, KP1019 foi menos ativo que o complexo livre e o análogo foi mais ativo. A justificativa é que o tamanho do análogo é menor, e ao se ligar à proteína ela assume uma conformação similar àquela adotada quando o Fe(III) entra em seu sítio, e então ela tem afinidade pelo receptor [67]. Em relação à captação celular, um estudo com células SW480 mostrou que o complexo KP1019 conjugado à apoTf é menos internalizado do que o complexo livre, que por sua vez é menos do que o complexo conjugado à hTf. Nesse caso se concluiu que o ciclo da transferrina é a principal rota de entrada do complexo nas células [70], diferente do que foi verificado neste trabalho com os complexos RuFaines.

Dentre os organometálicos, as duas tendências foram observadas: a ligação com a hTf facilitou (complexos denominados TM34 e TM85 [37]) ou não (complexo [( $\eta_{6^-}$  areno)Ru(en)Cl][PF<sub>6</sub>], areno = p-cimeno ou bifenila [128], e complexo denominado TM102 [37]) a entrada dos complexos, embora a atividade antiproliferativa ou citotóxica tenha se mantido a mesma que dos complexos livres.

Essa diversidade de resultados mostra que a proposta de que a transferrina pode ser usada como um carregador natural para os complexos de Ru, em razão de o Ru pertencer ao mesmo grupo do ferro levando a similaridades no modo de interação com a proteína deve ser estudada caso a caso, pois não se aplica a todos os complexos de Ru.

#### 4.3. Estudos com HSA

A interação dos complexos com HSA também foi investigada. Os estudos já foram publicados [35], exceto os resultados dos estudos competitivos com varfarina e estudos de ultrafiltração para o complexo Runpx.

[151]

## 4.3.1. Espectroscopia de Fluorescência

## 4.3.1.1. Fluorescência intrínseca

Assim como com a transferrina, a fluorescência intrínseca da HSA foi monitorada sob a adição de diversas concentrações dos complexos, com o objetivo de avaliar as interações entre eles. O grande diferencial, entretanto, é que a HSA possui apenas 1 resíduo de Trp (W214), localizado em um sítio de ligação denominado sítio I de Sudlow no subdomínio IIA, que tem afinidade por diversas moléculas de fármacos (Figuras 1.5 e 4.62). A existência de apenas 1 resíduo emitente simplifica a interpretação dos resultados, além de dar indícios sobre a região de interação, como tem sido proposto em diversos trabalhos na literatura [2], [121], [122], [129].

A fluorescência intrínseca da HSA foi avaliada sob a adição de concentrações crescentes dos complexos RuAc, Ruibp e Ruceto, variando-se a razão molar proteína:complexo de 1:0 até 1:20, em diferentes temperaturas. Os espectros de emissão registrados em 25°C são mostrados nas figuras 4.63 a 4.65.



4.62. Estrutura da HSA, com destaque para os aminoácidos Trp (vermelho) e His (azul). PDB: 1AO6.



Figura 4.63. Espectros de emissão da HSA (2,0 μmol L<sup>-1</sup>) na ausência e presença de RuAc (concentrações de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0, 16,0, 20,0, 30,0 e 40,0 μmol L<sup>-1</sup>), após 24h de incubação a 25°C, em meio tampão fisiológico pH 7,4, λexc. 295 nm.



Figura 4.64. Espectros de emissão da HSA (2,0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) na ausência e presença de Ruibp (concentrações de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0, 16,0, 20,0, 30,0 e 40,0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>), após 24h de incubação a 25°C, em meio tampão fisiológico pH 7,4 com 2% etanol v/v,  $\lambda$ exc. 295 nm.



Figura 4.65. Espectros de emissão da HSA (2,0 μmol L<sup>-1</sup>) na ausência e presença de Ruceto (concentrações de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0, 16,0, 20,0, 30,0 e 40,0 μmol L<sup>-1</sup>), após 24h de incubação a 25°C, em meio tampão fisiológico pH 7,4 com 2% etanol v/v, λexc. 295 nm.

O  $\lambda_{max}$  de emissão da HSA de  $\approx$  341 nm (para  $\lambda_{exc}$  = 295 nm) mostra que o ambiente do triptofano W214 nesta proteína é mais polar do que a média observada para os resíduos de Trp da transferrina, cujo  $\lambda_{max}$  de emissão foi de 332 nm. Dos três complexos avaliados, apenas o RuAc provocou um pequeno deslocamento hipsocrômico do  $\lambda$  de emissão ( $\Delta \lambda$  = 2 nm), mostrando que o enovelamento da proteína não foi significativamente modificado na presença do complexo, embora possa-se inferir que o microambiente ao redor deste resíduo ficou ligeiramente menos polar sob a interação com o complexo.

Os três complexos suprimiram a fluorescência da HSA, mas verificou-se uma contribuição significativa de efeito de filtro interno no caso da supressão provocada pelos RuFaines. As curvas de fluorescência relativa corrigidas (Figura 4.66) mostram que apenas o complexo RuAc suprimiu a emissão em todo o intervalo de concentrações estudado, enquanto Ruceto suprimiu até a razão molar proteína:complexo de 1:6 e Ruibp até razão

molar de 1:1,5. A supressão da emissão, após as devidas correções, indica que a ligação do complexo com a proteína provocou alterações estruturais nas proximidades do sítio hidrofóbico do Trp [130].

O mesmo comportamento foi verificado na interação dos RuFaines com a transferrina, onde acima da razão molar proteína:complexo de 1:5 a fluorescência mostrou uma tendência de aumento e não de diminuição. Com HSA, no entanto, tal comportamento pode ter sido consequência de alterações estruturais da proteína, pois verificou-se por dicroísmo circular a diminuição de 13% do conteúdo de  $\alpha$ -hélice com aumento dos demais elementos de estrutura secundária quando a razão molar HSA : RuFaine foi de 1:5 [29], [35]. Além disso, as propostas feitas no caso da transferrina também se aplicam aqui: (i) ineficiência do modelo matemático em corrigir adequadamente a fluorescência observada, (ii) a formação de partículas suspensas pode ter interferido no sinal observado ou (iii) o complexo ligado à proteína teve a sua emissão aumentada.



Figura 4.66. Fluorescência relativa da HSA (2 µmol L<sup>-1</sup>) na presença dos complexos RuAc, Ruibp e Ruceto (concentrações de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0, 16,0, 20,0, 30,0 e 40,0 µmol L<sup>-1</sup>), após a correção do efeito de filtro interno. Dados registrados a 37°C, meio tampão fisiológico pH 7,4 (com 2% etanol v/v no caso dos RuFaines), após 24 h de incubação a 37°C.

O mecanismo de supressão do sistema HSA / RuAc foi avaliado através da análise do gráfico de Stern-Volmer em diferentes temperaturas, pois espera-se uma dependência inversa da constante  $K_{SV}$  com a temperatura quando o mecanismo de supressão envolve a formação de um complexo não fluorescente no estado fundamental – supressão estática [75], [109]. A Figura 4.67 mostra os gráficos obtidos e a Tabela 4.10 resume os parâmetros calculados.



Figura 4.67. Gráficos de Stern-Volmer em diferentes temperaturas do sistema HSA / RuAc. [HSA] = 2  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, [RuAc] = 0 a 20  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, meio tampão fisiológico pH 7,4.

De modo geral, os dados mostraram boa linearidade no intervalo de concentrações usado ( $r^2 > 0,99$ ), que variou até 20 µmol L<sup>-1</sup> de complexo. Apenas para fazer uma comparação, no sistema apoTf / RuAc, em que a concentração máxima foi 10 µmol L<sup>-1</sup> de complexo, a partir da concentração de 1 µmol L<sup>-1</sup> os pontos já começaram a desviar-se da linearidade, exibindo curvatura baixo. A razão para esse comportamento foi atribuída à presença de múltiplos centros emitentes, e essa suposição foi confirmada aqui, pois na presença de apenas 1 fluoróforo emitente os pontos não apresentaram a mesma tendência.

Os valores calculados da constante  $K_{SV}$  aumentaram pouco com o aumento da temperatura, o que indica que a supressão inicia-se por um mecanismo dinâmico. No entanto, os valores calculados das constantes de supressão bimolecular  $k_a$  apresentaram valores da ordem 10<sup>12</sup> mol<sup>-1</sup> L s<sup>-1</sup>, que estão 2 ordens e magnitude acima do limite difusional, o que indica um mecanismo de supressão estático, com a formação de um aduto não fluorescente no estado fundamental [75], [107], [122], [131]. Outras evidências sustentam a hipótese de que esteja se formando um aduto, como os resultados de interação por espectroscopia eletrônica [35] e os estudos de ultrafiltração (que serão mostrados no próximo item). Este comportamento pode ter sido resultado da formação de um aduto que se torna mais estável com o aumento da temperatura, ou os ácidos graxos e globulinas presentes na HSA utilizada competem com o RuAc pelos sítios de ligação hidrofóbicos da proteína, afetando assim o mecanismo de supressão. Comportamento semelhante foi observado no estudo da interação de um complexo organometálico de Ru(II) com HSA, mas nesse trabalho também foi utilizada a HSA livre de ácidos graxos. Com essa proteína, os valores das constantes K<sub>SV</sub> diminuíram com o aumento da temperatura, e com a HSA contendo ácidos graxos os valores de K<sub>SV</sub> aumentaram com o aumento da temperatura. Em todos os casos, os valores de  $k_a$  foram da ordem de 10<sup>12</sup> mol<sup>-1</sup> L s<sup>-1</sup> [2].

Outros compostos de rutênio interagindo com HSA apresentaram constantes  $K_{SV}$  da mesma ordem de grandeza, como os organometálicos denominados TM34, TM85 ( $K_{SV} \approx 10^4$  mol<sup>-1</sup> L) [2], [132], um complexo de Ru(III)-Salan (4,8 x  $10^4$  mol<sup>-1</sup> L para o componente dinâmico e 1,2 x  $10^5$  mol<sup>-1</sup> L para o componente estático [130]) e KP1339 (4,6 x  $10^4$  mol<sup>-1</sup> L) [45].

No caso da interação da HSA com os complexos RuFaines, não foi possível avaliar o mecanismo de supressão pelo mesmo método porque os pontos no gráfico de  $F_0/F$  versus

[Complexo] não apresentaram correlação linear (Figura 4.68). Apenas os pontos em baixas concentrações a 37°C mostraram alguma linearidade aparente. O experimento foi feito novamente variando-se a razão molar proteína:complexo até 1:2 em 37°C (Figura 4.69).



Figura 4.68. Gráficos de Stern-Volmer em diferentes temperaturas dos sistemas (a) HSA / Ruibp e (b) HSA / Ruceto. [HSA] = 2  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, [RuFaines] = 0 a 40  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, meio tampão fisiológico pH 7,4 com 2% etanol v/v.

Para o Ruceto, os pontos até razão molar proteína:complexo de 1:1,5 ([Ruceto] = 3,0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) mostraram correlação linear, o valor de  $K_{SV}$  foi da mesma ordem de grandeza que para ao sistema HSA/RuAc, mas com um valor um pouco maior, indicando que este complexo causa maior perturbação no ambiente do Trp, o que está de acordo com os estudos de dicroísmo circular, que mostraram maior alteração na estrutura secundária da proteína frente à interação com Ruceto do que com RuAc [29], [35].



Figura 4.69. Gráficos de Stern-Volmer HSA / Ruibp e HSA / Ruceto, para dados registrados a 37°C. [HSA] = 4  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, [RuFaines] = 0 a 8,0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, meio tampão fisiológico pH 7,4 com 2% etanol v/v.

No caso do Ruibp, não se observou supressão da fluorescência do Trp-214, o que indica que o complexo não está interagindo com a HSA através do sítio I no subdomínio IIA. Sabe-se que o sítio primário de interação do ibuprofeno na HSA é o sítio II no subdomínio IIIA [50]. A constante de dissociação  $K_d$  foi reportada como 1 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> [40]. Logo, é possível que o complexo contendo ibuprofenato como ligante esteja interagindo em alguma região próxima a esse sítio.

As constantes de dissociação do sistema HSA / RuAc nas 4 temperaturas foram avaliadas através do gráfico da equação não linear 4.20, supondo a formação de um aduto de estequiometria 1:1. Os gráficos são mostrados na Figura 4.70 e os parâmetros calculados na Tabela 4.10. Os valores das constantes  $K_d$  ficaram muito próximos, todos da ordem de 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>, indicando que a estabilidade dos adutos não é afetada no intervalo de temperaturas avaliado.

No caso do sistema HSA / Ruceto, calculou-se o valor de  $K_d$  apenas a 37°C, e seu valor foi uma ordem de magnitude menor que o calculado para o RuAc, indicando que o sistema HSA / Ruceto é um pouco mais estável quanto à dissociação do que HSA / RuAc. A equação usada não descreveu o comportamento dos dados do sistema HSA/Ruibp (Figura 4.71).



Figura 4.70. Gráficos da equação 4.20 para o sistema HSA / RuAc nas temperaturas de 10, 25, 37 e 45°C.



Figura 4.71. Gráficos da equação 4.20 para o sistema HSA / RuFaines a 37 °C.

Comployo	Parâmetros calculados					
Complexo		10°C	25°C	37°C	45°C	
	<i>K<sub>sv</sub></i> (10 <sup>4</sup> mol <sup>-1</sup> L)	3,29 ± 0,06	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1	4,0 ± 0,1	
	<i>kq</i> (x 10 <sup>12</sup> mol <sup>-1</sup> L s <sup>-1</sup> )	3,3	3,4	3,5	4,0	
	R <sup>2</sup>	0,9973	0,9925	0,9860	0,9938	
	$K_d$ (10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup> )	9±1	7 ± 1	7,8 ± 0,8	9±1	
RuAc	F <sub>c</sub>	0,40	0,43	0,41	0,34	
	R <sup>2</sup>	0,9944	0,9848	0,9953	0,9946	
	⊿H (kJ mol⁻¹)	-0,6	-12,6	-19,4	-	
	$\Delta S$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	+94,3	+56,7	+35,3	-	
	⊿G (kJ mol <sup>-1</sup> )	-27,3	-29,5	-30,3	-30,6	
	<i>K<sub>sv</sub></i> (10 <sup>4</sup> mol <sup>-1</sup> L)			4,2 ± 0,2		
Ruceto -	<i>kq</i> (x 10 <sup>13</sup> mol <sup>-1</sup> L s <sup>-1</sup> )	nd	nd	4,2	nd	
	R <sup>2</sup>			0,9810		
	$K_d$ (10 <sup>-7</sup> mol L <sup>-1</sup> )			3 ± 2		
	F <sub>c</sub>	nd	nd	3,5	nd	
	R <sup>2</sup>			0,9870		

Tabela 4.10. Valores calculados dos parâmetros das equações de Stern-Volmer (4.17) e 4.20.

Nd = Não determinado

Com base nos valores de Kd calculados para o sistema HSA / RuAc, obtiveram-se os valores das constantes de associação ( $K_a = 1/K_d$ ) em cada temperatura, e então calcularam-se, conforme as equações 4.23 e 4.24, as variações de entalpia ( $\Delta$ H), entropia ( $\Delta$ S) e energia livre ( $\Delta$ G) da reação, tendo como referência a temperatura de 45°C [133], [134]. Nas equações, T é a temperatura do experimento em Kelvin e *R* é a constante dos gases (8,314 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>).

$$ln\frac{K_{a2}}{K_{a1}} = \frac{1}{R} \left( \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \Delta H$$
 Eq. 4.23

$$\Delta G = -RT ln Ka = \Delta H - T \Delta S \qquad \qquad Eq. 4.24$$

Os tipos de interações que podem ocorrer entre complexos e proteínas, conforme já mencionado, são: a formação de uma ligação covalente com coordenação do íon à proteína e interações não covalentes fracas, que incluem ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas [49], [133], [135], [136]. A ligação de pequenas moléculas ligantes a proteínas pode ser interpretada com base no modelo conceitual envolvendo duas etapas: na primeira há uma penetração mútua das camadas de hidratação das duas espécies, que interagem num primeiro momento por interações hidrofóbicas e a molécula ligante é parcialmente imobilizada nessa condição, de modo que moléculas do solvente são deslocadas, e essa etapa é então dirigida por entropia; na segunda etapa se estabelece a interação propriamente dita, que pode ser de um dos tipos mencionados anteriormente, e essa etapa é dirigida por entalpia. Os tipos de interações principais entre as espécies podem ser avaliados com base nos valores dos parâmetros termodinâmicos. Em um processo espontâneo ( $\Delta G < 0$ ), quando  $\Delta H < 0$  ou  $\Delta H \approx 0$  e  $\Delta S > 0$ , as interações são predominantemente eletrostáticas; quando  $\Delta H < 0$  e  $\Delta S < 0$ , as interações podem ser forças de van der Waals ou ligações de hidrogênio e quando  $\Delta H > 0$  e  $\Delta S < 0$ , as interações são predominantemente hidrofóbicas [137].

Na interação da HSA com o RuAc, os valores  $\Delta$ G foram negativos em todas as temperaturas, mostrando a espontaneidade reação. Todos os valores de  $\Delta$ H foram negativos ou próximos de zero, e os valores de  $\Delta$ S positivos, mostrando que a reação é dirigida por entropia e entalpia. De acordo com o modelo proposto por Ross e Subramanian [137], as variações observadas dos parâmetros termodinâmicos indicam que o tipo principal de interação é eletrostático, o que é razoável propor uma vez que a espécie do complexo predominante em solução é positivamente carregada, [Ru<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, e que, no pH de 7,4 a proteína está negativamente carregada, pois seu pl é de 5,92 [41].

# 4.3.1.2. Estudos competitivos entre os complexos Ru<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CR e varfarina pelo sítio I da HSA

Conforme mencionado anteriormente, a molécula de HSA tem pelo menos dois sítios importantes de ligação de fármacos ácidos denominados sítios de Sudlow I e II, e os FAINEs geralmente se ligam a um desses sítios com alta afinidade. O sítio I é conhecido como o sítio varfarina-azapropazona e está localizado no subdomínio IIA da molécula de HSA [48], [49], [52], [138].

Varfarina (Figura 4.72) é um fármaco anticoagulante que se liga especificamente ao sítio I de Sudlow com alta afinidade (constante de dissociação,  $K_d = 4 \ \mu \text{mol L}^{-1}$ ) [46], [139]. Quando a varfarina interage com a HSA, a intensidade de emissão em aproximadamente 380 nm sob excitação em 305 - 335 nm aumenta cerca de 15 vezes em relação àquela observada para a molécula não ligada em soluções aquosas. Essa diferença na intensidade da fluorescência emitida pela varfarina ligada e não ligada tem sido largamente usada para determinar a constante de dissociação da interação varfarina/HSA e monitorar o deslocamento da varfarina de seu sítio de ligação por fármacos competitivos [45], [140], indicando um dos possíveis sítios de ligação deste novo composto na proteína. Varfarina, ibuprofeno e digitoxina, são considerados marcadores dos sítios I, II e III, respectivamente [49].



Figura 4.72. Fórmula estrutural da varfarina.

De acordo com os resultados dos experimentos onde a fluorescência intrínseca da HSA foi monitorada, os complexos RuAc e Ruceto suprimiram a emissão, indicando que pelo menos um dos sítios de interação destes complexos na HSA é próximo ao sítio I no subdomínio IIA e o Ruibp não suprimiu, indicando que seu sítio de interação não envolve o sítio I. Para confirmar essa hipótese, realizou-se o estudo para verificar a competição entre os compostos citados e a varfarina pelo sítio I da HSA. A supressão da emissão do aduto {HSA-varf} indica o deslocamento da varfarina do seu sítio de alta afinidade [45].

Os espectros de emissão e gráficos da equação de Stern-Volmer são mostrados nas Figuras 4.73 a 4.75. Conforme era esperado, RuAc e Ruceto suprimiram a fluorescência do aduto {HSA-varf} indicando não apenas que interagem nas proximidades do sítio I, mas também que sua afinidade é maior, pois foram capazes de desloca-la de seu sítio, embora deva se levar em conta que neste experimento a razão molar HSA:varfarina foi mantida em 1: 1 enquanto a razão molar HSA:Complexos variou até 1:20.

O resultado inesperado foi a supressão pelo Ruibp, que não foi observada no experimento onde a fluorescência intrínseca da HSA foi monitorada. A possível causa para esse comportamento é que a ligação do Ruibp em seu sítio de interação (embora não seja o sítio I, com base nos resultados dos experimentos de fluorescência intrínseca) pode ter modulado alostericamente a interação da varfarina, deslocando-a do sítio I. Interações da proteína com diferentes ligantes ao mesmo tempo geralmente resultam em aumento da concentração livre dos ligantes em questão [39]. A albumina possui diversos sítios que se ligam com alta afinidade a ácidos graxos (denominados FA1 a FA9) e fármacos (sítio I de Sudlow, correspondente ao FA7 e sítio II de Sudlow, formado pelos sítios FA3 e FA4), embora não se limite a esses sítios (Figura 4.62). O sítio primário de interação do ibuprofeno é o sítio II no subdomínio IIIA, o secundário corresponde ao sítio FA6 e há ainda um terciário de baixa afinidade que corresponde ao FA2. O sítio primário da varfarina é o sítio I de Sudlow (FA7), e o secundário é o FA2. A ligação a este sítio induz mudanças conformacionais na proteína. Os



sítios FA1, FA2, FA3-FA4 (sítio II de Sudlow), FA6 e FA7 (sítio I de Sudlow) são alostericamente acoplados, e ibuprofeno e varfarina agem como efetores alostéricos [51].

Figura 4.73. (a) Espectros de emissão das soluções contendo o aduto {HSA-varf} após adição de RuAc nas concentrações 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 30 e 40 µmol L<sup>-1</sup> e incubação por 24 h a 37°C. [HSA] = 2 µmol L<sup>-1</sup>. [varf] = 2 µmol L<sup>-1</sup>. λexc = 335 nm. Meio: tampão fisiológico pH 7,4. (b) Gráfico da equação de Stern-Volmer para a emissão em 381 nm.



Figura 4.74. (a) Espectros de emissão das soluções contendo o aduto {HSA-varf} após adição de Ruibp nas concentrações 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 30 e 40 µmol L<sup>-1</sup> e incubação por 24 h a 37°C. [HSA] = 2 µmol L<sup>-1</sup>. [varf] = 2 µmol L<sup>-1</sup>. λexc. = 335 nm. Meio: tampão fisiológico pH 7,4 com 2% etanol v/v. (b) Gráfico da equação de Stern-Volmer para a emissão em 381



Figura 4.75 . (a) Espectros de emissão das soluções contendo o aduto {HSA-varf} após adição de Ruceto nas concentrações 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 30 e 40 µmol L<sup>-1</sup> e incubação por 24 h a 37°C. [HSA] = 2 µmol L<sup>-1</sup>. [varf] = 2 µmol L<sup>-1</sup>. λexc. = 335 nm. Meio: tampão fisiológico pH 7,4 com 2% etanol v/v. (b) Gráfico da equação de Stern-Volmer para a emissão em 381 nm.

Outra observação importante a ser feita é que Ruceto e Ruibp apresentaram emissão na região do espectro avaliada, embora baixa quando comparada à intensidade de emissão do aduto {HSA-varf}, mas não tão baixas que pudessem ser desconsideradas. Como consequência, os pontos no gráfico de Stern-Volmer nas maiores concentrações de complexo, após a correção do efeito de filtro interno, apresentaram a tendência inversa de aumento da fluorescência, assim como observado no experimento de fluorescência intrínseca. Para tentar contornar este problema e o da alta absorbância das soluções, o experimento foi repetido variando a razão molar HSA:complexos até 1:2. Os gráficos de Stern-Volmer são mostrados na Figura 4.76, e os valores de  $K_{SV}$  e  $k_q$  calculados na Tabela 4.11. O valor da constante de supressão bimolecular ( $k_q$ ) foi calculado considerando-se o tempo de vida do fluoróforo no estado excitado ( $\tau_0$ ) igual a 2,23 ns [141]. O valor de  $K_{SV}$ calculado para o sistema {HSA-varf} / RuAc ficou bastante próximo do determinado para o sistema HSA / RuAc. Já para o Ruceto o valor determinado foi menor, mas na mesma ordem de grandeza.



Figura 4.76. Gráficos de Stern-Volmer dos sistemas {HSA-varf} / RuAc, {HSA-varf} / Ruibp e {HSA-varf} / Ruceto, após 24 h de incubação a 37°C, com [HSA] = 4 µmol L<sup>-1</sup>, [varf] = 4 µmol L<sup>-1</sup>, [Complexos] = 0,8, 1,6, 2,0, 2,4, 3,2, 4,0, 4,8, 5,6, 6,0, 6,4, 7,2 e 8,0 µmol L<sup>-1</sup>, em tampão fisiológico pH 7,4 (com 2% etanol v/v no caso dos RuFaines).

Tabela 4.11. Constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) e constantes de supressão bimolecular ( $k_q$ ) calculadas.

Complexo	Parâmetros calculados		
	$K_{SV}$ (10 <sup>4</sup> mol <sup>-1</sup> L)	3,3 ± 0,1	
RuAc	<i>kq</i> (x 10 <sup>13</sup> mol <sup>-1</sup> L s <sup>-1</sup> )	1,4	
	R <sup>2</sup>	0,9867	
	$K_{SV}$ (10 <sup>4</sup> mol <sup>-1</sup> L)	2,9 ± 0,1	
Ruibp	<i>kq</i> (x 10 <sup>13</sup> mol <sup>-1</sup> L s <sup>-1</sup> )	1,3	
	R <sup>2</sup>	0,9737	
	$K_{SV}$ (10 <sup>4</sup> mol <sup>-1</sup> L)	2,6 ± 0,1	
Ruceto	<i>kq</i> (x 10 <sup>13</sup> mol <sup>-1</sup> L s <sup>-1</sup> )	1,2	
	R <sup>2</sup>	0,9737	

### 4.3.2. Ultrafiltração e análise por MALDI-MS e ICP

Um experimento similar ao realizado com a transferrina foi feito com o objetivo de avaliar a capacidade de retenção dos complexos Ru<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CR pela albumina humana. Soluções contendo HSA e os complexos RuAc, Ruibp, Ruceto e Runpx e o padrão de Ru(III) de absorção atômica com um excesso de 10 vezes em relação à proteína (20 vezes no caso do padrão de Ru(III)) foram incubadas por 24 h a 37°C, e a fração proteica, que inclui HSA livre e HSA ligada aos complexos, foi separada da fração de complexo livre por ultrafiltração e analisada por ICP-OES e MALDI-MS.

A concentração de Ru foi determinada na fase proteica por ICP-OES. Os resultados encontrados são mostrados na Tabela 4.12. A concentração molar de Ru foi dividida pela concentração molar de HSA para se obter a razão molar Ru / proteína. Os quatro complexos (RuAc, Ruibp, Ruceto e Runpx) ficaram retidos em extensões similares, cerca de 14 mols de Ru por molécula de proteína, o que corresponde a 7 mols de complexo / HSA. Em todos os casos, portanto, cerca de 70% da quantidade inicial de complexo adicionada foram retidos pela proteína. Esses resultados mostram a alta capacidade de retenção da HSA nas condições experimentais empregadas, além de que a natureza dos ligantes equatoriais não parece ter influenciado significativamente na capacidade de saturação. O mesmo resultado foi encontrado para os complexos RuFaines interagindo com a Tf (apo e holo), mas não para o RuAc. A HSA, portanto, contém mais sítios de ligação para o RuAc do que a Tf.

A quantidade de Ru retida na amostra do padrão de Ru(III) foi menor do que a determinada para os complexos Ru<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CR (cerca de 9 mols), embora quando comparado ao número de mols de complexo Ru<sub>2</sub>, tenha sido maior. A estrutura do Ru(III) do padrão não é exatamente conhecida, mas supõem-se que os íons Ru(III) estejam coordenados a ligantes Cl<sup>-</sup> (pois o meio do padrão é HCI). Este complexo, portanto, foi retido com maior eficiência

pela proteína, provavelmente devido à labilidade desses ligantes que favorece a coordenação do centro metálico aos resíduos de aminoácidos das cadeias laterais da HSA, como histidinas por exemplo.

Amostra	Ru,mg L <sup>-1*</sup>	[Ru],mmol L <sup>-1</sup>	[HSA],mmol L <sup>-1</sup>	Razão molar (HSA : Ru)
HSA + Ru	134,5	1,33	0,15	1:8,9
HSA + RuAc	207,0	2,04	0,15	1:14
HSA + Ruibp	47,76	0,47	0,030	1:16
HSA + Runpx	47,86	0,47	0,030	1:16
HSA + Ruceto	40,02	0,40	0,030	1:13

Tabela 4.12. Concentração de Ru ligado à HSA, determinada por ICP-OES.

<sup>\*</sup> Concentração determinada na análise por ICP-OES.

Os espectros de massas MALDI-TOF-MS das amostras são mostrados nas figuras 4.77 a 4.81, e as variações observadas nos sinais de razão m/z na Tabela 4.13.

O espectro de massas da HSA mostrou os picos principais em m/z 66628 correspondente à espécie  $[HSA]^+$  e em m/z 33347 correspondente a  $[HSA]^{2+}$ , sendo os resultados próximos aos encontrados na literatura [142]-[147]. Os dois picos deslocaram-se para maiores valores de m/z após a incubação na presença do padrão de Ru(III), com variações que indicam a entrada de pelo menos 4 íons de Ru(III) (m/z = 506 para  $[M]^+$  e 213 para  $[M]^{2+}$ ).

A diferença observada na amostra de RuAc (m/z = 1953 para [M]<sup>+</sup> e 982 para [M]<sup>2+</sup>) é compatível com a presença de aproximadamente 4 moléculas do complexo positivamente carregadas,  $[Ru_2(CH_3CO_2)_4]^+$ , de massa 439 Da, para cada molécula de proteína. Não foi possível analisar essas amostras na faixa baixa de razão m/z para tentar detectar a unidade  $[Ru_2(CH_3CO_2)_4]^+$  porque a massa molar dessa espécie está abaixo do limite do equipamento.

Nos experimentos de interação dos RuFaines com a HSA, os complexos foram dissolvidos em etanol absoluto e essas soluções foram adicionadas à solução de proteína, pois eles são praticamente insolúveis em meio aquoso. A presença da proteína, no entanto, favorece a solubilização dos complexos no meio. Primeiramente, as soluções foram preparadas em baixas concentrações (4  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> HSA e 40  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> RuFaines, 2% etanol v/v), e não foram observadas variações que indicassem a ligação de nem mesmo 1 molécula de complexo à proteína. Por isso o experimento foi realizado em concentrações maiores (0,030 mmol L<sup>-1</sup> HSA e 0,3 mmol L<sup>-1</sup> RuFaines, 20% etanol v/v). Essa concentração de 20% etanol foi necessária para garantir a solubilização do complexo no meio. De acordo com a literatura [148], onde foram estudados os efeitos do etanol sobre a estrutura e solubilidade da albumina bovina, somente a partir da concentração de 30% de etanol no meio é que começam a ocorrer modificações estruturais da proteína. A integridade estrutural da HSA em nossos experimentos foi verificada comparando-se os espectros de dicroísmo circular da proteína em tampão fisiológico e da proteína na presença de 20% de etanol (v/v) no mesmo tampão. Não foram observadas alterações significativas. Dessa forma concluiu-se que a concentração de etanol usada não provocou a desnaturação da proteína.

Mesmo para o experimento com concentrações maiores de proteína e complexos, no entanto, os espectros de massas não mostraram alterações que indicassem a presença dos complexos (Figura 4.79b a Figura 4.81b). As pequenas diferenças observadas em m/z não puderam ser atribuídas a nenhuma espécie de Ru ou mesmo de fármaco ligante livre. Fragmentos dos complexos, entretanto, foram detectados pela análise das mesmas amostras na faixa de baixa razão m/z (Figura 4.79a a Figura 4.81a).



Figura 4.77. Espectro de massas MALDI-TOF-MS da HSA na presença do padrão de Ru(III), razão molar 1:20 (HSA:Ru), após ultrafiltração e da HSA sem Ru(III). Ambas em tampão fisiológico pH 7,4, e após 24 h de incubação a 37°C.



Figura 4.78. Espectro de massas MALDI-TOF-MS da HSA na presença do complexo RuAc, razão molar 1:10 (HSA:RuAc), após ultrafiltração e da HSA sem complexo. Ambas em tampão fisiológico pH 7,4, e após 24 h de incubação a 37°C.



Figura 4.79. Espectro de massas MALDI-TOF-MS da HSA na presença do complexo Ruibp, razão molar 1:10 (HSA:Ruibp), após ultrafiltração e da HSA sem complexo, na faixa de baixa razão m/z (a) e alta razão m/z (b). Ambas em tampão fisiológico pH 7,4 com 20% etanol v/v, e após 24 h de incubação a 37°C.



Figura 4.80. Espectro de massas MALDI-TOF-MS da HSA na presença do complexo Ruceto, razão molar 1:10 (HSA:Ruceto), após ultrafiltração e da HSA sem complexo, na faixa de baixa razão m/z (a) e alta razão m/z (b). Ambas em tampão fisiológico pH 7,4 com 20% etanol v/v, e após 24 h de incubação a 37°C.



Figura 4.81. Espectro de massas MALDI-TOF-MS da HSA na presença do complexo Runpx, razão molar 1:10 (HSA:Runpx), após ultrafiltração e da HSA sem complexo, na faixa de baixa razão m/z (a) e alta razão m/z (b). Ambas em tampão fisiológico pH 7,4 com 20% etanol v/v, e após 24 h de incubação a 37°C.

Amostra	m/z [HSA- RuFaines] <sup>+</sup>	m/z [HSA- RuFaines] <sup>2+</sup>	Diferença observada no sinal com carga +1 (Da)	Diferença observada no sinal com carga +2 (Da)
HSA	66628	33347	-	-
HSA + Ru	67134	33560	506	213
HSA + RuAc	68581	34329	1953	982
HSA (20% etOH)	66513	33267	-	-
HSA + Ruibp	66598	33314	85	94
HSA + Ruceto	67089	33540	576	546
HSA + Runpx	66994	33444	481	354

Tabela 4.13. Resumo dos resultados obtidos por MALDI-TOF-MS das interações da HSA com Ru-FAINEs, em soluções a 20% etanol.

Na amostra contendo HSA / Ruibp, observaram-se dois fragmentos com o padrão isotópico do Ru, ambos contendo a unidade central  $[Ru_2(ibp)_4]^+$ . Nas amostras de HSA / Ruceto e HSA / Runpx, foram vistos novamente os fragmentos observados nos experimentos com transferrina, onde os ligantes derivados dos fármacos foram progressivamente substituídos por moléculas da matriz HCCA desprotonada. As atribuições propostas para a composição desses fragmentos são apresentadas na Tabela 4.14. As mesmas considerações em relação à estabilidade dos complexos feitas no experimento com a transferrina se aplicam aqui.

Embora não se tenha observado um aumento em m/z do sinal da HSA conforme se esperava, os complexos estavam presentes na fase proteica que ficou retida na ultrafiltração, o que é evidência de que eles estavam interagindo com a proteína. Caso contrário, eles teriam passado pelo filtro.

Amostra	m/z observado	Atribuição proposta	m/z calculado
	1024,3	[Ru2(ibp)4] <sup>+</sup>	1024,3
HSA + Ruibp	1100,3	$[[Ru_2(ibp)_4(H_2O)Cl] + Na^+$	1100,3
	956,0	[Ru <sub>2</sub> (HCCA) <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	956,0
HSA + Ruceto	1021,0	$[Ru_2(ceto)(HCCA)_3]^+$	1021,0
	1086,0	$[Ru_2(ceto)_2(HCCA)_2]^+$	1086,0
	1151,1	$[Ru_2(ceto)_3(HCCA)]^+$	1151,1
	996,9	[Ru <sub>2</sub> (npx)(HCCA) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	997,0
HSA + Runpx	1038,0	[Ru <sub>2</sub> (npx) <sub>2</sub> (HCCA) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	1038,0
	1079,0	[Ru₂(npx)₃(HCCA)] <sup>+</sup>	1079,1
	1120,0	[Ru <sub>2</sub> (npx) <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1120,1

Tabela 4.14. Atribuições propostas para os fragmentos observados nos espectros de massas das amostras de HSA + RuFaines, registrados em baixa faixa de razão m/z.

Assim como na interação com transferrina, no caso dos complexos RuFaines, é possível supor a ocorrência de interações fracas que explicariam a presença dos complexos na fase proteica. Ao mesmo tempo, elas explicam porque não se detecta aumento de m/z no espectro de massas, uma vez que os componentes dos adutos complexo de Ru / HSA não tenderiam a ficar unidos no processo do experimento de espectrometria de massas.

No caso do Ru(III) proveniente do padrão, o íon está muito mais disponível para interagir com a proteína através da coordenação a aminoácidos como histidina, cisteína e metionina, que são os aminoácidos preferenciais para coordenação de metais [149]. É possível, portanto, que a interação seja mais forte nesse caso do que nos outros. Dessa forma, o número de íons ligados à HSA estimado pelo resultado de MALDI-TOF-MS (5 íons por molécula de proteína) ficou mais próximo daquele estimado por ICP-OES do que os demais.

No caso do RuAc, os ligantes acetato são menores que os fármacos dos outros complexos, o que deixaria as posições axiais da gaiola mais acessíveis à interação por coordenação às cadeias laterais dos aminoácidos da proteína. Então a interação desta espécie com a proteína seria mais forte do que a interação dos complexos com ligantes derivados dos fármacos, o que está de acordo com os resultados encontrados para a constante de afinidade avaliada por espectroscopia de fluorescência [35].

No caso dos complexos RuFaines, os ligantes equatoriais são volumosos em relação ao acetato, e então é provável que existam impedimentos estéricos que inviabilizem a coordenação do complexo pelas posições axiais à proteína. Além disso, devido a maior hidrofobicidade dos ligantes, o complexo terá a tendência de interagir com regiões hidrofóbicas da proteína, através de interações não covalentes, que são mais fracas.

# 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo principal deste trabalho foi contribuir com a linha de pesquisa do grupo no que diz respeito aos conhecimentos relativos às interações com as principais proteínas séricas, albumina e transferrina, que possam auxiliar na elucidação do mecanismo de ação dos metalofármacos de rutênio com ligantes derivados de Faines.

O complexo precursor RuAc foi sintetizado conforme método descrito na literatura, e os complexos contendo ligantes derivados de Faines (Ruibp, Ruceto e Runpx) foram sintetizados de acordo com metodologias desenvolvidas no grupo. As análises de caracterização confirmaram a identidade e estrutura propostas para cada um deles, revelando a presença da unidade dimetálica Ru<sub>2</sub>(II,III) coordenada a 4 ligantes carboxilatos. A análise de dicroísmo circular mostrou que os complexos provavelmente apresentam dois ligantes (*S*) e dois ligantes (*R*), em consequência da utilização de misturas racêmicas dos fármacos orgânicos, com exceção do Runpx, cujos ligantes são predominantemente estereoisômeros *S*.

As análises espectroscópicas da interação dos complexos com apoTf mostraram que a reação entre as espécies inicia-se rapidamente e, no caso dos complexos RuFaines, atinge o equilíbrio quase que imediatamente. Para o RuAc, a reação não atingiu o equilíbrio dentro de 24 h de monitoramento, embora tenha-se observado que esta ocorre em duas etapas, sendo a primeira nas duas primeiras horas e a segunda, a partir de 3 h de reação. As alterações espectrais observadas no caso do RuAc são muito semelhantes àquelas previamente verificadas nas interações com aminoácidos e albumina, indicando que provavelmente ocorre a coordenação do metal aos resíduos de aminoácidos da proteína. Já no caso dos RuFaines, essa interação por coordenação direta é menos provável devido a impedimentos estéricos e a menor polaridade dos ligantes.

A presença de Fe(III) na Tf alterou o modo de interação do complexo RuAc com esta proteína, indicando que os sítios do Fe(III) podem estar envolvidos na interação do RuAc com a apoTf. Esta suposição foi confirmada por espectroscopia de fluorescência usando-se a FI-aTf. As modificações espectrais observadas nos sistemas RuFaines / hTf foram bastante similares àquelas com a apoTf, indicando que o modo de interação dos RuFaines com a proteína não é afetado pela presença de íons Fe(III) em seu sítio, o que também foi confirmado por espectroscopia de fluorescência usando-se a FI-aTf.

As constantes de afinidade dos complexos RuAc e RuFaines à Tf foram da ordem 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> mol<sup>-1</sup> L, quando avaliadas por espectroscopia de fluorescência. Esses valores relativamente altos mostraram que as interações dos complexos com a apoTf são mais fortes do que com a albumina, que foram da ordem de 10<sup>6</sup> mol<sup>-1</sup> L. Em todos os casos, porém, a presença de múltiplos centros emitentes da apoTf faz com que a análise detalhada desses sistemas por esta técnica seja dificultada.

A estrutura secundária da apoTf é mantida na presença de até 10 mols de complexo por mol de proteína (ou 50, no caso do RuAc), indicando que a presença dos complexos não está causando a sua desnaturação, conforme verificado por espectroscopia de dicroísmo circular.

Estudos de ultrafiltração e análise da fase proteica por ICP-OES e MALDI-MS, mostraram que capacidade de retenção dos complexos Ru<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>CR pelas proteínas Tf e HSA é similar, em torno de 70%, indicando a importância delas na solubilização dos RuFaines, que em sua ausência, precipitam nas condições fisiológicas simuladas empregadas. Os estudos de captação celular mostraram que o ciclo da transferrina não parece ser a principal rota de entrada dos complexos RuFaines nas células. Aliás, os resultados dos estudos *in vitro*, onde as atividades citotóxicas e antiproliferativas dos complexos Ruibp e Runpx foram avaliadas, mostraram que os complexos não são citotóxicos, mas inibem a proliferação celular, de modo similar ao observado com o NAMI-A, que apresenta ação antimetastática. Para este complexo, a captação celular é reduzida, e sua ação se dá no meio extracelular. Pode-se especular um mecanismo de ação similar para os RuFaines, embora estudos *in vivo* também demonstraram que o Ruibp é ativo contra tumor primário.
### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- S. Medici, M. Peana, V. Marina, J. I. Lachowicz, G. Crisponi, M. Antonietta, V. M. Nurchi, J. I. Lachowicz, G. Crisponi, and M. A. Zoroddu, "Noble metals in medicine: Latest advances," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 284, pp. 329–350, 2015.
- [2] T. S. Morais, F. C. Santos, T. F. Jorge, L. Côrte-Real, P. J. A. Madeira, F. Marques, M. P. Robalo, A. Matos, I. Santos, and M. H. Garcia, "New water-soluble ruthenium(II) cytotoxic complex: Biological activity and cellular distribution.," J. Inorg. Biochem., vol. 130, pp. 1–14, Jan. 2014.
- [3] G. Colotti, A. Ilari, A. Boffi, and V. Morea, "Metals and metal derivatives in medicine.," *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 13, no. 2, pp. 211–21, 2013.
- [4] L. Ronconi and P. J. Sadler, "Using coordination chemistry to design new medicines," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 251, no. 13–14, pp. 1633–1648, Jul. 2007.
- [5] F. Kratz and B. Elsadek, "Clinical impact of serum proteins on drug delivery.," J. Control. Release, vol. 161, no. 2, pp. 429–45, Jul. 2012.
- [6] A. Casini, "Exploring the mechanisms of metal-based pharmacological agents via an integrated approach.," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 109, pp. 97–106, Apr. 2012.
- [7] D. de Oliveira Silva, "Perspectives for novel mixed diruthenium-organic drugs as metallopharmaceuticals in cancer therapy.," *Anticancer. Agents Med. Chem.*, vol. 10, no. 4, pp. 312–23, May 2010.
- [8] D. de Oliveira Silva, "Ruthenium Compounds targeting Cancer Therapy," in *Frontiers in Anti-Cancer Drug Discovery, Vol. 4*, E. Atta-ur-Rahman, M.I. Choudhary, Ed. Bentham Science Publishers, Sharjah, U.A.E., 2014, pp. 88–156.
- [9] J. C. Dabrowiak, *Metals in Medicine*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2009.
- [10] K. Śpiewak and M. Brindell, "Impact of low- and high-molecular-mass components of human serum on NAMI-A binding to transferrin.," J. Biol. Inorg. Chem., vol. 20, no. 4, pp. 695–703, Jun. 2015.
- [11] R. Trondl, P. Heffeter, C. R. Kowol, M. a. Jakupec, W. Berger, and B. K. Keppler, "NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application," *Chem. Sci.*, vol. 5, no. 8, pp. 2925–2932, 2014.
- [12] M. Matczuk, M. Kupiec, J. Legat, K. Pawlak, A. R. Timerbaev, and M. Jarosz, "A shotgun

metalloproteomic approach enables identification of proteins involved in the speciation of a ruthenium anticancer drug in the cytosol of cancer cells," *Analyst*, vol. 140, no. 10, pp. 3492–3499, 2015.

- [13] N. P. E. Barry and P. J. Sadler, "Challenges for Metals in Medicine : To Shape the Future," *ACS Nano*, vol. 7, no. 7, pp. 5654–5659, 2013.
- [14] F. A. Cotton, C. A. Murillo, and R. A. Walton, *Multiple Bonds Between Metal Atoms*, 3rd ed. Berlin: Springer, 2005.
- [15] M. A. S. Aquino, "Diruthenium and diosmium tetracarboxylates : synthesis , physical properties and applications," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 170, pp. 141–202, 1998.
- [16] T. A. Stephenson and G. Wilkinson, "New Ruthenium Carboxylate Complexes," J. Inorg. Nucl. Chem., vol. 28, pp. 2285–2291, 1966.
- [17] R. Mitchell, A. Spencer, and G. Wilkinson, "Carboxylato-triphenylphosphine complexes of ruthenium, cationic triphenylphosphine complexes derived from them, and their behaviour as homogeneous hydrogenation catalysts," J. Chem. Soc., Dalt. Trans., pp. 846–854, 1973.
- [18] B. R. Groves, D. I. Arbuckle, E. Essoun, T. L. Lundrigan, R. Wang, and M. A. S. Aquino, "Chiral Induction at Octahedral Ru(II) via the Disassembly of Diruthenium(II,III) Tetracarboxylates Using a Variety of Chiral Diphosphine Ligands.," *Inorg. Chem.*, vol. 52, no. 19, pp. 11563–11572, Sep. 2013.
- [19] T. Bottazzi, F. Cecchi, A. Zelcer, B. Heinrich, B. Donnio, D. Guillon, and F. D. Cukiernik, "Thermotropic mesomorphism of mixed-valent diruthenium aliphatic carboxylates with axial anion bearing two aliphatic chains," *J. Coord. Chem.*, vol. 66, no. 19, pp. 3380–3390, Sep. 2013.
- [20] R. Fishman, S. Okamoto, and J. Miller, "Molecule-based magnets with diruthenium building blocks in two and three dimensions," *Phys. Rev. B*, vol. 80, no. 14, p. 140416, Oct. 2009.
- [21] C. L. Kummer and T. C. R. B. Coelho, "Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais," *Rev. Bras. Anestesiol.*, vol. 52, no. 4, pp. 498–512, 2002.
- [22] R. Cini, G. Tamasi, S. Defazio, M. Corsini, P. Zanello, L. Messori, G. Marcon, F. Piccioli, and P. Orioli, "Study of Ruthenium(II) Complexes with Anticancer Drugs as Ligands. Design of Metal-Based Phototherapeutic Agents," *Inorg. Chem.*, vol. 42, no. 24, pp. 8038–8052, 2003.
- [23] A. Andrade, S. F. Namora, R. G. Woisky, G. Wiezel, R. Najjar, J. A. A. Sertié, and D. de

Oliveira Silva, "Synthesis and characterization of a diruthenium-ibuprofenato complex comparing its anti-inflammatory activity with that of a copper(II)-ibuprofenato complex.," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 81, no. 1–2, pp. 23–7, Jul. 2000.

- [24] G. Ribeiro, M. Benadiba, A. Colquhoun, and D. de Oliveira Silva, "Diruthenium(II,III) complexes of ibuprofen, aspirin, naproxen and indomethacin non-steroidal anti-inflammatory drugs: Synthesis, characterization and their effects on tumor-cell proliferation," *Polyhedron*, vol. 27, no. 3, pp. 1131–1137, Feb. 2008.
- [25] G. Ribeiro, "Complexos de dirutênio com os fármacos ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, naproxeno, indometacina e com ácido g-linolênico: Síntese, caracterizaçao, avaliaçao da ação antiproliferativa sobre células tumorais e estudo da interação da unidade dimetálica co," Tese (Doutorado). Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 2006.
- [26] R. R. P. Dos Santos, "Metalofármacos de rutênio: síntese, caracterização, atividade frente à linhagem celular K562 e estudos de interação com albumina de soro humana (HSA)," Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 2009.
- [27] M. Benadiba, R. R. P. Dos Santos, D. D. O. Silva, and A. Colquhoun, "Inhibition of C6 rat glioma proliferation by [Ru2Cl(Ibp)4] depends on changes in p21, p27, Bax/Bcl2 ratio and mitochondrial membrane potential.," J. Inorg. Biochem., vol. 104, no. 9, pp. 928– 35, Sep. 2010.
- [28] R. L. S. R. Santos, A. Bergamo, G. Sava, and D. de Oliveira Silva, "Synthesis and characterization of a diruthenium(II,III)–ketoprofen compound and study of the in vitro effects on CRC cells in comparison to the naproxen and ibuprofen derivatives," *Polyhedron*, vol. 42, no. 1, pp. 175–181, Jul. 2012.
- [29] R. L. S. R. Santos, "Metalofármacos de Dirutênio(II,III): Síntese, Caracterização e Interações com Biomoléculas e Ciclodextrina," Tese (Doutorado). Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 2012.
- [30] R. L. S. R. Santos, R. van Eldik, D. de Oliveira Silva, R. Van Eldik, and D. D. O. Silva, "Thermodynamics of axial substitution and kinetics of reactions with amino acids for the paddlewheel complex Tetraquis(acetato)chloridodiruthenium(II,III).," *Inorg. Chem.*, vol. 51, no. 12, pp. 6615–25, Jun. 2012.
- [31] R. L. S. R. Santos, R. van Eldik, and D. de Oliveira Silva, "Kinetic and mechanistic studies on reactions of diruthenium(II,III) with biologically relevant reducing agents.," *Dalton Trans.*, vol. 42, no. c, pp. 16796–805, 2013.
- [32] I. de M. Costa, "Estudo de propriedades físico-químicas de metalofármacos de dirutênio com anti-inflamatórios não esteroides," Tese (Doutorado). Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 2014.

- [33] L. Messori, T. Marzo, R. N. F. N. F. Sanches, Hanif-Ur-Rehman, D. De Oliveira Silva, and A. Merlino, "Unusual structural features in the lysozyme derivative of the Tetraquis(acetato)chloridodiruthenium(II,III) complex.," Angew. Chem. Int. Ed. Engl., vol. 53, no. 24, pp. 6172–5, Jun. 2014.
- [34] M. Benadiba, I. de M Costa, R. L. S. R. Santos, F. O. Serachi, D. de Oliveira Silva, and A. Colquhoun, "Growth inhibitory effects of the Diruthenium-Ibuprofen compound, [Ru2Cl(Ibp) 4], in human glioma cells in vitro and in the rat C6 orthotopic glioma in vivo.," J. Biol. Inorg. Chem., vol. 19, no. 6, pp. 1025–35, 2014.
- [35] R. L. S. R. Santos, R. N. F. Sanches, and D. de Oliveira Silva, "Spectroscopic studies on interactions of the Tetraquis(acetato)chloridodiruthenium(II,III) complex and the Ru <sub>2</sub> (II,III)-NSAID-derived metallodrugs of ibuprofen and ketoprofen with human serum albumin," J. Coord. Chem., vol. 68, no. 17–18, pp. 3209–3228, Aug. 2015.
- [36] D. J. Yoon, B. H. Kwan, F. C. Chao, T. P. Nicolaides, J. J. Phillips, G. Y. Lam, A. B. Mason, W. A. Weiss, and D. T. Kamei, "Intratumoral therapy of glioblastoma multiforme using genetically engineered transferrin for drug delivery.," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 11, pp. 4520–7, 2010.
- [37] L. Côrte-Real, F. Mendes, J. Coimbra, T. S. Morais, A. I. Tomaz, A. Valente, M. H. Garcia, I. Santos, M. Bicho, and F. Marques, "Anticancer activity of structurally related ruthenium(II) cyclopentadienyl complexes," *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 19, no. 6, pp. 853–867, 2014.
- [38] F. Piccioli, S. Sabatini, L. Messori, P. Orioli, C. G. Hartinger, and B. K. Keppler, "A comparative study of adduct formation between the anticancer ruthenium(III) compound HInd trans-[RuCl4(Ind)2] and serum proteins," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 98, no. 6, pp. 1135–42, Jun. 2004.
- [39] U. Kragh-Hansen, V. T. G. Chuang, and M. Otagiri, "Practical aspects of the ligandbinding and enzymatic properties of human serum albumin.," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 25, no. 6, pp. 695–704, Jun. 2002.
- [40] G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, and P. Ascenzi, "Human serum albumin: from bench to bedside.," *Mol. Aspects Med.*, vol. 33, no. 3, pp. 209–90, Jun. 2012.
- [41] M. Groessl, M. Terenghi, A. Casini, L. Elviri, R. Lobinski, and P. J. Dyson, "Reactivity of anticancer metallodrugs with serum proteins: new insights from size exclusion chromatography-ICP-MS and ESI-MS," J. Anal. At. Spectrom., vol. 25, no. 3, pp. 305– 313, 2010.
- [42] S. S. Gustafsson, L. Vrang, Y. Terelius, and U. H. Danielson, "Quantification of interactions between drug leads and serum proteins by use of 'binding efficiency,"

Anal. Biochem., vol. 409, no. 2, pp. 163–175, 2011.

- [43] O. Mazuryk, K. Kurpiewska, K. Lewiński, G. Stochel, and M. Brindell, "Interaction of apo-transferrin with anticancer ruthenium complexes NAMI-A and its reduced form.," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 116, pp. 11–8, Nov. 2012.
- [44] H. Vahedian-Movahed, M. R. Saberi, and J. Chamani, "Comparison of binding interactions of lomefloxacin to serum albumin and serum transferrin by resonance light scattering and fluorescence quenching methods," J. Biomol. Struct. Dyn., vol. 28, no. 4, pp. 483–502, 2011.
- [45] O. Dömötör, C. G. Hartinger, A. K. Bytzek, T. Kiss, B. K. Keppler, and É. A. Enyedy, "Characterization of the binding sites of the anticancer ruthenium (III) complexes KP1019 and KP1339 on human serum albumin via competition studies," J. Biol. Chem., vol. 18, pp. 9–17, 2013.
- [46] T. S. Morais, F. Santos, L. Côrte-Real, F. Marques, M. P. Robalo, P. J. A. Madeira, and M. H. Garcia, "Biological activity and cellular uptake of [Ru(η(5)-C(5)H(5))(PPh(3))(Me(2)bpy)][CF(3)SO(3)] complex.," J. Inorg. Biochem., vol. 122, pp. 8–17, Jan. 2013.
- [47] Y. Ni, S. Su, and S. Kokot, "Spectrofluorimetric studies on the binding of salicylic acid to bovine serum albumin using warfarin and ibuprofen as site markers with the aid of parallel factor analysis.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 580, no. 2, pp. 206–15, Nov. 2006.
- [48] T. Wybranowski, M. Cyrankiewicz, B. Ziomkowska, and S. Kruszewski, "The HSA affinity of warfarin and flurbiprofen determined by fluorescence anisotropy measurements of camptothecin.," *Biosystems.*, vol. 94, no. 3, pp. 258–62, Dec. 2008.
- [49] G. Zhang, N. Zhao, and L. Wang, "Fluorescence spectrometric studies on the binding of puerarin to human serum albumin using warfarin, ibuprofen and digitoxin as site markers with the aid of chemometrics," J. Lumin., vol. 131, no. 12, pp. 2716–2724, Dec. 2011.
- [50] J. Ghuman, P. a Zunszain, I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, M. Otagiri, and S. Curry, "Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin.," J. Mol. Biol., vol. 353, no. 1, pp. 38–52, Oct. 2005.
- [51] P. Ascenzi, Y. Cao, G. R. Tundo, M. Coletta, G. Fanali, and M. Fasano, "Ibuprofen and warfarin modulate allosterically ferrous human serum heme-albumin nitrosylation.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 411, no. 1, pp. 185–9, Jul. 2011.
- [52] J. P. Villamor and A. M. L. Zatón, "Data plotting of warfarin binding to human serum albumin.," *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 48, no. 1, pp. 33–41, Mar. 2001.

- [53] I. Goncharova, S. Orlov, and M. Urbanová, "The location of the high- and low-affinity bilirubin-binding sites on serum albumin: Ligand-competition analysis investigated by circular dichroism.," *Biophys. Chem.*, vol. 180–181, pp. 55–65, 2013.
- [54] E. N. Baker and P. F. Lindley, "New perspectives on the structure and function of transferrins," J. Inorg. Biochem., vol. 47, no. 3–4, pp. 147–60, 1992.
- [55] W. R. Harris and L. Messori, "A comparative study of aluminum(III), gallium(III), indium(III), and thallium(III) binding to human serum transferrin," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 228, no. 2, pp. 237–262, Jun. 2002.
- [56] H. Li and Z. M. Qian, "Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery," *Med. Res. Rev.*, vol. 22, no. 3, pp. 225–250, 2002.
- [57] N. G. James, S. L. Byrne, A. N. Steere, V. C. Smith, R. T. A. Macgillivray, and A. B. Mason, "Inequivalent Contribution of the Five Tryptophan Residues in the C-lobe of Human Serum Transferrin to the Fluorescence Increase when Iron is Released," *Biochemistry*, vol. 48, no. 13, pp. 2858–2867, 2009.
- [58] P. T. Gomme, K. B. McCann, and J. Bertolini, "Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions.," *Drug Discov. Today*, vol. 10, no. 4, pp. 267–73, Feb. 2005.
- [59] J. Wally, P. J. Halbrooks, C. Vonrhein, M. a Rould, S. J. Everse, A. B. Mason, and S. K. Buchanan, "The crystal structure of iron-free human serum transferrin provides insight into inter-lobe communication and receptor binding.," J. Biol. Chem., vol. 281, no. 34, pp. 24934–44, Aug. 2006.
- [60] W. R. Harris, "Anion binding properties of the transferrins. Implications for function.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1820, no. 3, pp. 348–61, Mar. 2012.
- [61] "UniProtKB P02787 (TRFE\_HUMAN)." [Online]. Available: http://www.uniprot.org/uniprot/P02787. [Accessed: 01-Jan-2013].
- [62] E. Wagner, D. Curiel, and M. Cotten, "Delivery of drugs, proteins and genes into cells using transferrin as a ligand for receptor-mediated endocytosis," Adv. Drug Deliv. Rev., vol. 14, no. 1, pp. 113–135, Apr. 1994.
- [63] J. B. Vincent and S. Love, "The binding and transport of alternative metals by transferrin.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1820, no. 3, pp. 362–78, Mar. 2012.
- [64] Y. Cheng, O. Zak, P. Aisen, S. C. Harrison, and T. Walz, "Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin," *Cell*, vol. 116, pp. 565–576, 2004.
- [65] N. C. Andrews, "Iron homeostasis: insights from genetics and animal models.," Nat.

Rev. Genet., vol. 1, no. December, pp. 208–217, 2000.

- [66] S. Tortorella and T. C. Karagiannis, "Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis: A Useful Target for Cancer Therapy," J. Membr. Biol., vol. 247, no. 4, pp. 291–307, 2014.
- [67] F. Kratz, B. K. Keppler, M. Hartmann, L. Messori, and M. R. Berger, "Comparison of the Antiproliferative Activity of Two Antitumour Ruthenium(III) Complexes With Their Apotransferrin and Transferrin-Bound Forms in a Human Colon Cancer Cell Line," *Met. Based. Drugs*, vol. 3, no. 1, pp. 15–23, 1996.
- [68] Z. Pang, H. Gao, Y. Yu, J. Chen, L. Guo, J. Ren, Z. Wen, J. Su, and X. Jiang, "Brain delivery and cellular internalization mechanisms for transferrin conjugated biodegradable polymersomes," *Int. J. Pharm.*, vol. 415, no. 1–2, pp. 284–292, 2011.
- [69] C. Zheng, C. Ma, E. Bai, K. Yang, and R. Xu, "Transferrin and cell-penetrating peptide dual-functioned liposome for targeted drug delivery to glioma," *Int J Clin Med*, vol. 8, no. 2, pp. 1658–1668, 2015.
- [70] M. Pongratz, P. Schluga, M. A. Jakupec, V. B. Arion, C. G. Hartinger, G. Allmaier, and B. K. Keppler, "Transferrin binding and transferrin-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy," J. Anal. At. Spectrom., vol. 19, no. 1, pp. 46–51, 2004.
- [71] K. Polec-Pawlak, J. K. Abramski, O. Semenova, C. G. Hartinger, A. R. Timerbaev, B. K. Keppler, and M. Jarosz, "Platinum group metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis inductively coupled plasma-mass spectrometry: a further insight into the reactivity of a novel antitumor ruthenium(III) complex toward human serum proteins.," *Electrophoresis*, vol. 27, no. 5–6, pp. 1128–35, Mar. 2006.
- [72] A. R. Timerbaev, A. V Rudnev, O. Semenova, C. G. Hartinger, and B. K. Keppler, "Comparative binding of antitumor indazolium [trans-tetrachlorobis(1Hindazole)ruthenate(III)] to serum transport proteins assayed by capillary zone electrophoresis.," Anal. Biochem., vol. 341, no. 2, pp. 326–33, Jun. 2005.
- [73] S. M. Kelly, T. J. Jess, and N. C. Price, "How to study proteins by circular dichroism," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1751, no. 2, pp. 119–39, Aug. 2005.
- [74] N. Sreerama and R. W. Woody, "Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set.," *Anal. Biochem.*, vol. 287, no. 2, pp. 252–260, 2000.
- [75] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd editio. Baltimore: Springer, 2006.
- [76] M. van de Weert, "Fluorescence quenching to study protein-ligand binding: common

errors.," J. Fluoresc., vol. 20, no. 2, pp. 625–9, Mar. 2010.

- [77] W. Breuer and Z. I. Cabantchik, "A fluorescence-based one-step assay for serum nontransferrin-bound iron.," *Anal. Biochem.*, vol. 299, no. 2, pp. 194–202, Dec. 2001.
- [78] M. Mukaida, T. Nomura, and T. Ishimori, "synthesis of formato-, acetato- benzoato-, and chlorosubstituted acetatoruthenium complexes, and their properties," *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 45, pp. 2143–2147, 1972.
- [79] V. Miskowski, T. Loehr, and H. Gray, "Electronic and vibrational spectra of Ru2 (carboxylate) 4+ complexes. Characterization of a high-spin metal-metal ground state," *Inorg. Chem.*, vol. 26, no. 7, pp. 1098–1108, 1987.
- [80] J. G. Norman, G. E. Renzoni, and D. A. Caselb, "Electronic Structure of Ru2(O2CR)4+ and Rh2(O2CR)4+ Complexes," J. Am. Chem. Soc., vol. 101, no. 18, pp. 5256–5267, 1979.
- [81] W. F. Kean, C. J. L. Lock, and H. E. Howard-Lock, "Chirality in antirheumatic drugs.," Lancet, vol. 338, pp. 1565–1568, 1991.
- [82] F. A. Cotton and D. D. O. Silva, "Preparation and crystal structure of a dimolybdenum(II) complex with the drug ibuprofen," *Inorganica Chim. Acta*, vol. 249, pp. 57–61, 1996.
- [83] M. A. Castro, A. E. Roitberg, and F. D. Cukiernik, "Theoretical and experimental studies of diruthenium tetracarboxylates structure, spectroscopy, and electrochemistry.," *Inorg. Chem.*, vol. 47, no. 11, pp. 4682–90, Jun. 2008.
- [84] V. Miskowski and H. Gray, "Electronic spectra of Ru2 (carboxylate) 4+ complexes. Higher energy electronic excited states," *Inorg. Chem.*, vol. 27, no. 14, pp. 2501–2506, 1988.
- [85] D. E. Epps, T. J. Raub, V. Caiolfa, A. Chiari, and M. Zamai, "Determination of the affinity of drugs toward serum albumin by measurement of the quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence of the protein.," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 51, no. 1, pp. 41– 8, Jan. 1999.
- [86] R. J. Hilton, M. C. Seare, N. D. Andros, Z. Kenealey, C. M. Orozco, M. Webb, and R. K. Watt, "Phosphate inhibits in vitro Fe3+ loading into transferrin by forming a soluble Fe(III)-phosphate complex: a potential non-transferrin bound iron species.," J. Inorg. Biochem., vol. 110, pp. 1–7, May 2012.
- [87] M. S. Navati, U. Samuni, P. Aisen, and J. M. Friedman, "Binding and release of iron by gel-encapsulated human transferrin: evidence for a conformational search.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 7, pp. 3832–7, Apr. 2003.

- [88] Z. M. Qian, H. Li, H. Sun, and K. Ho, "Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 54, no. 4, pp. 561– 587, 2002.
- [89] F. Kratz, M. Hartmann, B. Keppler, and L. Messori, "The binding properties of two antitumor ruthenium(III) complexes to apotransferrin.," J. Biol. Chem., vol. 269, no. 4, pp. 2581–8, Jan. 1994.
- [90] H. H. PERKAMPUS, UV-Vis Spectroscopy and Its Applications. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992.
- [91] S. Jana, S. Dalapati, S. Ghosh, and N. Guchhait, "Binding interaction between plasma protein bovine serum albumin and flexible charge transfer fluorophore: A spectroscopic study in combination with molecular docking and molecular dynamics simulation," J. Photochem. Photobiol. A Chem., vol. 231, no. 1, pp. 19–27, Mar. 2012.
- [92] K. Ghosh, S. Ray, D. Ghosh, and B. Ray, "Chemical structure of the arabinogalactan protein from gum ghatti and its interaction with bovine serum albumin," *Carbohydr. Polym.*, vol. 117, pp. 370–6, Mar. 2015.
- [93] A. Samanta, B. K. Paul, and N. Guchhait, "Spectroscopic probe analysis for exploring probe-protein interaction: A mapping of native, unfolding and refolding of protein bovine serum albumin by extrinsic fluorescence probe," *Biophys. Chem.*, vol. 156, no. 2–3, pp. 128–139, Jul. 2011.
- [94] A. Singha Roy, D. R. Tripathy, A. Chatterjee, and S. Dasgupta, "The influence of common metal ions on the interactions of the isoflavone genistein with bovine serum albumin," *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 102, pp. 393–402, Feb. 2013.
- [95] J. H. Hildebrand and H. A. Benesi, "Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 71, no. 8, pp. 2703–2707, 1949.
- [96] J. J. Stephanos, "Drug-protein interactions: Two-site binding of heterocyclic ligands to a monomeric hemoglobin," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 62, no. 3, pp. 155–169, May 1996.
- [97] J. J. Stephanos, S. A. Farina, and A. W. Addison, "Iron ligand recognition by monomeric hemoglobins," *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, vol. 1295, no. 2, pp. 209–221, Jul. 1996.
- [98] S. Jana, S. Dalapati, S. Ghosh, and N. Guchhait, "Study of microheterogeneous environment of protein Human Serum Albumin by an extrinsic fluorescent reporter: A spectroscopic study in combination with Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation," J. Photochem. Photobiol. B Biol., vol. 112, pp. 48–58, Jul. 2012.

- [99] P. Thordarson, "Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 3, pp. 1305–1323, Mar. 2011.
- [100] B. Nagy and S. S. Lehrer, "Circular dichroism of iron, copper, and zinc complexes of transferrin.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 148, no. 1, pp. 27–36, Jan. 1972.
- [101] S. Tang, R. MacColl, and P. J. Parsons, "Spectroscopic study of the interaction of aluminum ions with human transferrin.," J. Inorg. Biochem., vol. 60, no. 3, pp. 175–85, Nov. 1995.
- [102] S. L. Mecklenburg, R. J. Donohoe, and G. a Olah, "Tertiary structural changes and iron release from human serum transferrin.," J. Mol. Biol., vol. 270, no. 5, pp. 739–50, Aug. 1997.
- [103] P. G. Thakurta, D. Choudhury, R. Dasgupta, and J. K. Dattagupta, "Tertiary structural changes associated with iron binding and release in hen serum transferrin: a crystallographic and spectroscopic study.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 316, no. 4, pp. 1124–31, Apr. 2004.
- [104] J. Chamani, H. Vahedian-Movahed, and M. R. Saberi, "Lomefloxacin promotes the interaction between human serum albumin and transferrin: a mechanistic insight into the emergence of antibiotic's side effects.," J. Pharm. Biomed. Anal., vol. 55, no. 1, pp. 114–24, Apr. 2011.
- [105] S. Sarzehi and J. Chamani, "Investigation on the interaction between tamoxifen and human holo-transferrin: determination of the binding mechanism by fluorescence quenching, resonance light scattering and circular dichroism methods.," Int. J. Biol. Macromol., vol. 47, no. 4, pp. 558–69, Nov. 2010.
- [106] H. Du, J. Xiang, Y. Zhang, and Y. Tang, "A spectroscopic and molecular modeling study of sinomenine binding to transferrin.," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 17, no. 6, pp. 1701–4, Mar. 2007.
- [107] M. van de Weert and L. Stella, "Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology," J. Mol. Struct., vol. 998, no. 1–3, pp. 144–150, Jul. 2011.
- [108] X. Xu, W. Liu, J. Zhong, L. Luo, C. Liu, S. Luo, and L. Chen, "Binding interaction between rice glutelin and amylose: Hydrophobic interaction and conformational changes," Int. J. Biol. Macromol., vol. 81, pp. 942–950, 2015.
- [109] M. Eftink and C. Ghiron, "Fluorescence Quenching Studies with Proteins," Anal. Biochem., vol. 114, pp. 199–227, 1981.
- [110] M. Poór, Y. Li, S. Kunsági-Máté, J. Petrik, S. Vladimir-Knežević, and T. Kőszegi,

"Molecular displacement of warfarin from human serum albumin by flavonoid aglycones," J. Lumin., vol. 142, pp. 122–127, Oct. 2013.

- [111] L. Mátyus, J. Szöllosi, and A. Jenei, "Steady-state fluorescence quenching applications for studying protein structure and dynamics.," J. Photochem. Photobiol. B., vol. 83, no. 3, pp. 223–36, Jun. 2006.
- [112] M. A. R. B. Castanho and M. J. E. Prieto, "Fluorescence quenching data interpretation in biological systems. The use of microscopic models for data analysis and interpretation of complex systems," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1373, no. 1, pp. 1–16, Aug. 1998.
- [113] E. Alarcón, A. Aspée, E. B. Abuin, and E. A. Lissi, "Evaluation of solute binding to proteins and intra-protein distances from steady state fluorescence measurements.," *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 106, pp. 1–17, Jan. 2012.
- [114] M. Van De Weert, "Fluorescence Quenching to Study Protein-ligand Binding: Common Errors," J. Fluoresc., vol. 20, no. 6, pp. 625–629, Aug. 2010.
- [115] N. G. James, J. a Ross, A. B. Mason, and D. M. Jameson, "Excited-state lifetime studies of the three tryptophan residues in the N-lobe of human serum transferrin.," *Protein Sci.*, vol. 19, no. 1, pp. 99–110, Jan. 2010.
- [116] Q. He, A. B. Mason, B. A. Lyons, B. M. Tam, V. Nguyen, R. T. A. Macgillivray, and R. C. Woodworth, "Spectral and metal-binding properties of three single-point tryptophan mutants of the human transferrin N-lobe," *Biochem. J.*, vol. 354, pp. 423–429, 2001.
- [117] X. L. Wei, J. B. Xiao, Y. Wang, and Y. Bai, "Which model based on fluorescence quenching is suitable to study the interaction between trans-resveratrol and BSA?," *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 75, no. 1, pp. 299–304, Jan. 2010.
- [118] X. Gao, Y. Tang, W. Rong, X. Zhang, W. Zhao, and Y. Zi, "Analysis of Binding Interaction between Captopril and Human Serum Albumin," Am. J. Anal. Chem., vol. 02, no. 02, pp. 250–257, 2011.
- [119] S. Bi, D. Song, Y. Tian, X. Zhou, Z. Liu, and H. Zhang, "Molecular spectroscopic study on the interaction of tetracyclines with serum albumins.," *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 61, no. 4, pp. 629–36, Feb. 2005.
- [120] A. Kathiravan, G. Paramaguru, and R. Renganathan, "Study on the binding of colloidal zinc oxide nanoparticles with bovine serum albumin," J. Mol. Struct., vol. 934, no. 1–3, pp. 129–137, Sep. 2009.
- [121] H.-N. Hou, Z.-D. Qi, Y.-W. Ouyang, F.-L. Liao, Y. Zhang, and Y. Liu, "Studies on interaction between Vitamin B12 and human serum albumin.," *J. Pharm. Biomed.*

Anal., vol. 47, no. 1, pp. 134–9, May 2008.

- [122] N. Bijari, Y. Shokoohinia, M. R. Ashrafi-Kooshk, S. Ranjbar, S. Parvaneh, M. Moieni-Arya, and R. Khodarahmi, "Spectroscopic study of interaction between osthole and human serum albumin: Identification of possible binding site of the compound," *J. Lumin.*, vol. 143, pp. 328–336, Nov. 2013.
- [123] S. P. Boulos, T. A. Davis, J. A. Yang, S. E. Lohse, A. M. Alkilany, L. A. Holland, and C. J. Murphy, "Nanoparticle-protein interactions: a thermodynamic and kinetic study of the adsorption of bovine serum albumin to gold nanoparticle surfaces.," *Langmuir*, vol. 29, no. 48, pp. 14984–96, 2013.
- [124] J.-M. El Hage Chahine, M. Hémadi, and N.-T. Ha-Duong, "Uptake and release of metal ions by transferrin and interaction with receptor 1.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1820, no. 3, pp. 334–47, Mar. 2012.
- [125] F. Kratz and L. Messori, "Spectral characterization of ruthenium (III) transferrin.," Journal of inorganic biochemistry, vol. 49, no. 2. pp. 79–82, 01-Feb-1993.
- [126] M. F. Mesko, C. A. Hartwig, C. A. Bizzi, J. S. F. Pereira, P. A. Mello, and E. M. M. Flores, "Sample preparation strategies for bioinorganic analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry," *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 307, pp. 123–136, Oct. 2011.
- [127] R. Knochenmuss, "Ion formation mechanisms in UV-MALDI.," Analyst, vol. 131, no. 9, pp. 966–86, Sep. 2006.
- [128] W. Guo, W. Zheng, Q. Luo, X. Li, Y. Zhao, S. Xiong, and F. Wang, "Transferrin serves as a mediator to deliver organometallic ruthenium(II) anticancer complexes into cells.," *Inorg. Chem.*, vol. 52, no. 9, pp. 5328–38, May 2013.
- [129] L. Trynda-Lemiesz, B. K. Keppler, and H. Koztowski, "Studies on the interaction between human serum albumin and imidazolium [ transtetrachlorobis(imidazol)ruthenate(III)]," J. Inorg. Biochem., vol. 73, pp. 123–128, 1999.
- [130] C. P. Matos, A. Valente, F. Marques, P. Adão, M. Paula Robalo, R. F. M. de Almeida, J. C. Pessoa, I. Santos, M. Helena Garcia, and A. I. Tomaz, "New polydentate Ru(III)-Salan complexes: Synthesis, characterization, anti-tumour activity and interaction with human serum proteins," *Inorganica Chim. Acta*, vol. 394, pp. 616–626, Jan. 2013.
- [131] J. R. Albani, *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*, 1a ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007.
- [132] A. I. Tomaz, T. Jakusch, T. S. Morais, F. Marques, R. F. M. de Almeida, F. Mendes, E. A. Enyedy, I. Santos, J. C. Pessoa, T. Kiss, and M. H. Garcia, "[Rull(η<sup>5</sup>-C₅H₅)(bipy)(PPh₃)]<sup>+</sup>, a

promising large spectrum antitumor agent: cytotoxic activity and interaction with human serum albumin.," J. Inorg. Biochem., vol. 117, pp. 261–9, Dec. 2012.

- [133] S. Bi, L. Yan, Y. Sun, and H. Zhang, "Investigation of ketoprofen binding to human serum albumin by spectral methods.," *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 78, no. 1, pp. 410–4, Jan. 2011.
- [134] I. M. Klotz and J. M. Urquhart, "The Binding of Organic Ions by Proteins. Effect of Temperature," J. Am. Chem. Soc., vol. 71, pp. 847–851, 1949.
- [135] S. R. Feroz, S. B. Mohamad, Z. S. D. Bakri, S. N. a Malek, and S. Tayyab, "Probing the interaction of a therapeutic flavonoid, pinostrobin with human serum albumin: multiple spectroscopic and molecular modeling investigations.," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, p. e76067, Jan. 2013.
- [136] M. E. Pacheco and L. Bruzzone, "Interactions between imazethapyr and bovine serum albumin: Spectrofluorimetric study," J. Lumin., vol. 132, no. 10, pp. 2730–2735, Oct. 2012.
- [137] P. D. Ross and S. Subramanian, "Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability.," *Biochemistry*, vol. 20, no. 11, pp. 3096–102, May 1981.
- [138] S. Kasai-Mortia, T. Horie, and S. Awazu, "Influence of the NB transition of human serum albumin on the structure of the warfarin-binding site," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 915, pp. 277–283, 1987.
- [139] G. Sudlow, D. J. Birkett, and D. N. Wade, "Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin," *Mol. Pharmacol.*, vol. 11, no. 6, pp. 824–32, Nov. 1975.
- [140] R. Henry and W. Wosilait, "Drug displacement of warfarin from human serum albumin: A fluorometric analysis," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 33, pp. 267–275, 1975.
- [141] M. P. Thomas, G. Nelson, G. Patonay, and I. M. Warner, "Analysis of drug binding sites on human serum albumin using multidimensional fluorescence measurements," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 43, no. 4–5, pp. 651–660, Jan. 1988.
- [142] Y. Ke, S. Kumar, H.-F. Wu, Z.-Y. Chen, S. K. Kailasa, H.-F. Wu, and Z.-Y. Chen, "High resolution detection of high mass proteins up to 80,000 Da via multifunctional CdS quantum dots in laser desorption/ionization mass spectrometry.," *Talanta*, vol. 83, no. 1, pp. 178–84, Nov. 2010.
- [143] H. Wang, W. Huang, J. Orwenyo, A. Banerjee, G. R. Vasta, and L. Wang, "Design and

synthesis of glycoprotein-based multivalent glyco-ligands for influenza hemagglutinin and human galectin-3.," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 21, no. 7, pp. 2037–44, Apr. 2013.

- [144] J. Zhang, D. Chatterjee, P. J. Brennan, J. S. Spencer, and A. Liav, "A modified synthesis and serological evaluation of neoglycoproteins containing the natural disaccharide of PGL-I from Mycobacterium leprae.," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 20, no. 11, pp. 3250–3, Jun. 2010.
- [145] S. Crobu, M. Marchetti, and G. Sanna, "Studies of interaction between Rh(I) and human serum albumin in a 'nanostructured biocatalyst' active in the hydroformylation reaction.," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 100, no. 9, pp. 1514–20, Sep. 2006.
- [146] L. Frost, M. Chaudhry, T. Bell, and M. Cohenford, "In vitro galactation of human serum albumin: analysis of the protein's galactation sites by mass spectrometry.," Anal. Biochem., vol. 410, no. 2, pp. 248–56, Mar. 2011.
- [147] Y. J. Chiou, K. B. Tomer, and P. C. Smith, "Effect of nonenzymatic glycation of albumin and superoxide dismutase by glucuronic acid and suprofen acyl glucuronide on their functions in vitro.," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 121, no. 2, pp. 141–59, Jul. 1999.
- [148] H. Yoshikawa, A. Hirano, T. Arakawa, and K. Shiraki, "Effects of alcohol on the solubility and structure of native and disulfide-modified bovine serum albumin.," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 50, no. 5, pp. 1286–91, Jun. 2012.
- [149] A. Casini, A. Guerri, C. Gabbiani, and L. Messori, "Biophysical characterisation of adducts formed between anticancer metallodrugs and selected proteins: new insights from X-ray diffraction and mass spectrometry studies.," J. Inorg. Biochem., vol. 102, no. 5–6, pp. 995–1006, 2008.

### ANEXO – SÚMULA CURRICULAR

### 1. DADOS PESSOAIS

Rute Nazaré Fernandes Sanches Nascimento: Manaus, AM, 12 de setembro de 1983.

## 2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

<u>DOUTORADO</u>: Ciências (Química) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), período de 02/2010 a 02/2016.

<u>GRADUAÇÃO</u>: Bacharelado em Ciências com Habilitação em Química – Faculdades Oswaldo Cruz, período de 02/2003 a 12/2006.

CURSO TÉCNICO: Química – Escola Técnica Oswaldo Cruz, período: 01/2001 a 07/2002.

## 3. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL E ATIVIDADES CIENTÍFICAS

Instituto de Química da Universidade de São Paulo - Laboratório de Química Inorgânica Sintética e Estrutural, Bioinorgânica e Metalofármacos

Pesquisador - Bolsista do Programa de Pós graduação de Química (Doutorado Direto) - 02/2010 a 02/2016

- Desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado: "Estudos da Interação de Metalofármacos de Rutênio com Transferrina e com Bases Nitrogenadas";
- Estágio do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino na disciplina de Química Geral e Inorgânica Básica, no curso de graduação de Oceanografia (02/2015 – 07/2015);
- Estágio do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino na disciplina de Química Inorgânica, no curso de graduação de Engenharia Química (02/2014 – 07/2014);
- Estágio do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino na disciplina de Química dos Elementos, no curso de graduação em Química (08/2012 – 12/2012, 08/2011 – 12/2011 e 08/2010 – 12/2010).

### Faculdades Oswaldo Cruz

Coordenadora e Professora do Curso de Extensão de Determinação da Incerteza de Medição de Ensaios Químicos – curso de curta duração (20h) - 09/2014

- Planejamento do programa do curso;
- Elaboração do material didático e ministração das aulas.

## Oswaldo Cruz Labservice S/C Ltda.

### Analista Responsável - 12/2007 – 05/2010

- Responsabilidade técnica das atividades químicas desenvolvidas na empresa e coordenação do Laboratório de Análises Físico Químicas;
- Elaboração e revisão de procedimentos operacionais;
- Implantação de rotinas de controle de qualidade analítica (cálculo de incerteza, validação de métodos, análises de controle para avaliação da garantia dos resultados analíticos);
- Elaboração de relatórios de ensaio, emissão de certificados analíticos, atendimento técnico a clientes.

# L.A. Falcão Bauer - C.T.C.Q. Ltda.

Química (Qualidade) (01/2007 a 12/2007), Técnica Química (03/2003 a 12/2006) e Auxiliar Técnica Química (07/2002 a 03/2003)

- Organização da documentação da qualidade do laboratório, elaboração e revisão de procedimentos operacionais de ensaios e procedimentos e planilhas para cálculos de incerteza e validação de métodos;
- Supervisão de uma das divisões do laboratório químico, na área de análises de materiais da construção civil e ensaios especiais;
- Elaboração de relatórios de ensaio, emissão de certificados analíticos, atendimento técnico a clientes;
- Participação da comissão de estudos de análises químicas em materiais da construção civil (revisão e criação de normas técnicas - ABNT).

#### 4. BOLSAS DE ESTUDO

- <u>2010-2014</u>: Bolsa de Doutorado Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- <u>2015</u>: Bolsa de Monitoria/Estágio Programa de Aperfeiçoamento do Ensino na disciplina de Química Geral e Inorgânica Básica, no curso de graduação de Oceanografia (02/2015 – 07/2015)
- <u>2014</u>: Bolsa de Monitoria/Estágio Programa de Aperfeiçoamento do Ensino na disciplina de Química Inorgânica, no curso de graduação de Engenharia Química (02/2014 – 07/2014)
- <u>2012 e 2011</u>: Bolsa de Monitoria/Estágio Programa de Aperfeiçoamento do Ensino na disciplina de Química dos Elementos, no curso de graduação em Química (08/2012 – 12/2012 e 08/2011).

### 5. PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

Para lista completa, acessar o Currículo Lattes: http://lattes.cnpq.br/6370263627266121.

Artigos completos publicados em periódicos

SANTOS, R.L.S.R.; <u>SANCHES, R.N.F.</u>; DE OLIVEIRA SILVA, D. Spectroscopic studies on interactions of the Tetraquis(acetato)chloridodiruthenium(II,III) complex and the Ru<sub>2</sub>(II,III)-NSAID-derived metallodrugs of ibuprofen and ketoprofen with human serum albumin. *Journal of Coordination Chemistry*, v. 68, p. 3209-3228, 2015.

MESSORI, L.; MARZO, T.; <u>SANCHES, R.N.F.</u>; REHMAN, H.U.; DE OLIVEIRA SILVA, D.; MERLINO, A. Unusual Structural Features in the Lysozyme Derivative of the Tetraquis(acetato)chloridodiruthenium(II,III) Complex. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 53, p. 6172 – 6175, 2014.

### Resumos publicados em anais de congressos

<u>SANCHES, R.N.F.</u>; DE OLIVEIRA SILVA, D. Interactions of diruthenium-ibuprofenate anticancer metallodrug and the non-drug diruthenium-acetate with human apotransferrin investigated by spectroscopic studies. *In: International Conference on BioInorganic Chemistry ICBIC* 16,

2013, Grenoble (França). J Biol Inorg Chem (2014) 19 (Suppl 1):S1–S696. Home Page: [http://www.icbic16.com/download/PostersMd.pdf].

<u>SANCHES, R.N.F.</u>; DE OLIVEIRA SILVA, D. Interação de um metalofármaco antitumoral de rutênio com apo-transferrina humana. *In: II Congresso Institucional do Instituto de Química da USP*, 2012, Guarujá (SP).

<u>SANCHES, R.N.F.</u>; DE OLIVEIRA SILVA, D. Preliminary studies on the interaction of a ruthenium-ibuprofen antitumor metallodrug with human serum apotransferrin. *In: The 6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry BrazMedChem*, 2012, Canela (RS). **The 6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry BrazMedChem 2012**. Home Page: [http://www.ufrgs.br/brazmedchem2012/docs/Brazmedchem\_ebook.pdf].

<u>SANCHES, R.N.F.</u>; DE OLIVEIRA SILVA, D. Estudos preliminares da interação do complexo dimetálico Tetraquis(acetato)clorodirutênio(II,III) com apo-transferrina humana. *In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química,* 2011, Florianópolis (SC). **34ª RASBQ Livro de Resumos, 2011.** Home Page: [http://sec.sbq.org.br/cdrom/34ra/resumos/T2684-1.pdf].