



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas
Mestrado



ADRIANA PEREIRA MUNDIM GUEDES

**Estudo espectroscópico da interação entre as proteínas séricas humanas
Albumina e transferrina com o potencial agente quimioterapêutico cloreto de
cis-tetraminodiclorutênio (III)**

Goiânia

2013

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

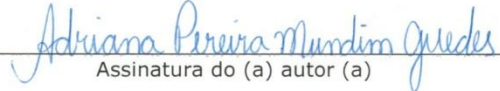
Autor (a):	Adriana Pereira Mundim Guedes.		
E-mail:	adriana_quimica@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.		Sigla: CAPES	
País:	Brasil	UF: DF	CNPJ: 00889834/0001-08
Título:	Estudo espectroscópico da interação entre as proteínas séricas humanas albumina e transferrina com o potencial agente quimioterapêutico cloreto de <i>cis</i> -tetraminodiclororutênio (III)		
Palavras-chave:	Complexos de rutênio (III), proteínas séricas, interação, UV-vis, espectroscopia de Fluorescência, Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).		
Título em outra língua:	Spectroscopic study of the interaction between human serum proteins albumin and transferrin with the potential chemotherapeutic agent <i>cis</i> -tetraminodiclororutênio chloride (III)		
Palavras-chave em outra língua:	Ru(III) complex, serum proteins, interaction, UV-vis, Fluorescence spectroscopy, Electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR).		
Área de concentração:	Fármacos e Medicamentos		
Data defesa:	(13/09/2013)		
Programa de Pós-Graduação:	Ciências Farmacêuticas		
Orientador (a):	Prof ^a . Dr ^a . Elisângela de Paula Silveira Lacerda.		
E-mail:	silveiralacerda@gmail.com		
Co-orientador (a):	Prof. Dr. Ernanni Damião Vieira.		
E-mail:	ernanni.dvieira@gmail.com		

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.


 Assinatura do (a) autor (a)

Data: 12 / 12 / 2013

ADRIANA PEREIRA MUNDIM GUEDES

Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas

**Estudo espectroscópico da interação entre as proteínas séricas humanas
Albumina e transferrina com o potencial agente quimioterapêutico cloreto de
cis-tetraminodiclorutênio (III)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisângela de Paula Silveira Lacerda.

Co-orientador: Prof. Dr. Ernanni Damião Vieira.

Goiânia

2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
(GPT/BC/UFG)**

G924e Guedes, Adriana Pereira Mundim.
Estudo espectroscópico da interação entre as proteínas séricas humanas albumina e transferrina com o potencial agente quimioterapêutico cloreto de *cis*- tetraminodichlororutênio (III) [manuscrito] / Adriana Pereira Mundim Guedes. - 2013.
xv, 77 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisângela de Paula Silveira Lacerda.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2013.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

1. Câncer – Tratamento. 2. Rutênio (III). 3. Albumina – Humana.
4. Albumina – Bovina. I. Título.

CDU: 616-006.04:596.46

Dedico à minha mãe, pelo seu amor, apoio, incentivo e seus esforços para que eu chegasse até aqui. Ao meu pai pelo seu apoio, incentivo e confiança. Aos meus irmãos que me apoiaram nas minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dr^a. Elisângela de Paula Silveira Lacerda, pela credibilidade, confiança, liberdade de trabalho e expressão, amizade e principalmente sua orientação aliada ao crescimento profissional durante essa caminhada.

Ao Prof. Ernanni Damião Vieira, pela amizade, aos conhecimentos adquiridos durante sua co-orientação, perseverança, paciência e empenho para que este trabalho pudesse chegar ao fim.

A Prof^a Dr^a Letícia Regina de Souza Teixeira e sua aluna Darliene A. Martins pela colaboração nos trabalhos envolvendo Fluorescência, pela atenção e ao espaço físico concedido do seu laboratório de química Inorgânica na UFMG-MG para a realização dos experimentos de fluorescência.

Aos colegas e amigos do laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Paula, Aliny, Flávia, Thallita, Lorena, Wanessa, Raquel e Francielly pela disposição em colaborar, companhia, amizade e o incentivo.

Em especial quero agradecer as minhas amigas Paula e Aliny que estiveram presentes na minha vida em todos os momentos, tanto pessoal quanto profissional, trazendo palavras de incentivo, apoio, paciência, confiança, esclarecimentos e companhia. Agradeço a colaboração, discussões científicas e disposição para o desenvolvimento do meu trabalho.

À minha querida família que sempre mim incentivou nas minhas escolhas, em especial quero agradecer a minha mãe ao seu amor incondicional, dedicação, incentivo profissional, cuidados, as palavras de conforto, quem não mediu esforços para me ajudar a seguir e chegar até o fim do mestrado.

Ao meu namorado pela paciência, compreensão e incentivo, apesar da distância sempre esteve comigo nos momentos mais difíceis durante o mestrado.

Agradeço ao programa de Pós-graduação em Farmácia, em especial a secretária Fernanda, que com sua paciência e atenção, sempre muito prestativa e disposta a ajudar.

À CAPES pela bolsa concedida.

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível".

(Charles Chaplin)

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 Propriedades anticancerígenas de Metalofármacos	1
1.2 Complexos de rutênio como agente anticâncer	2
1.3 Possíveis mecanismos de ação dos complexos de rutênio	6
1.4 Complexo de rutênio (III) <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NH ₃) ₄]Cl (CTRu(III))	8
1.5 Interação com Biomoléculas	10
1.6 Transferrina sérica humana (hsTf)	11
1.7 Albumina sérica humana (hsA)	15
1.8 Fluorescência das Proteínas	17
1.9 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica	18
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4. METODOLOGIA	24
4.1 Materiais	24
4.2 Síntese do composto	24
4.3 Preparação de hsA e bsA	24
4.4 Preparação da apo-hsTf	25
4.5 Instrumentação	25
4.5.1 Espectroscopia de absorção na região do UV-visível	25

4.5.2 Espectroscopia de Fluorescência	25
4.5.3 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	26
4.6 Métodos	26
4.6.1 Preparação das amostras para estudo de Espectroscopia UV-visível	26
4.6.1.1 CTRu(III) em tampão fosfato	26
4.6.1.2 CTRu(III) com hsA, bsA e apo-Tf	27
4.6.2 Preparação de amostras para estudo de Fluorescência das proteínas hsA e bsA	27
4.6.3 Preparação de amostras para estudo de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	28
4.6.3.1 CTRu(III) em tampão fosfato	28
4.6.3.2. CTRu(III) em hsA e bsA	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Análises espectroscópica da interação do complexo CTRu(III) com as proteínas hsA, bsA e apo-Tf	29
5.1.1 Espectroscopia de absorção no UV-visível do complexo CTRu(III) em tampão fosfato	29
5.1.2 Estudos de interação do complexo CTRu(III) na presença das proteínas hsA, bsA e apo-transferrina por espectroscopia de absorção no UV-vís	34
5.1.3 Estudo de interação com as proteínas hsA e bsA por Espectroscopia de Fluorescência	37
5.1.4 Abordagem geral para caracterizar os processos de troca de ligante do complexo CTRu(III) em tampão e na presença das proteínas hsA e bsA por Ressonância Paramagnética Eletrônica	41

(RPE)	
5.1.4.1 Processo de troca de ligante do CTRu(III) em solução tampão	42
5.1.4.2 Interação por troca de ligante para CTRu(III) em solução tampão com bsA e hsA	45
6. CONCLUSÕES	51
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais compostos de platina utilizados na terapia do câncer.	1
Figura 2	Estrutura dos compostos anticâncer NAMI-A e KP1019.	3
Figura 3	Compostos areno Ru(II) (banquinho de piano) desenvolvidos pelos grupos de Sadler e Dyson.	4
Figura 4	Esquema proposto para o modo de ação de KP1019.	6
Figura 5	Estrutura do complexo cloreto <i>cis</i> -tetraminodiclororutênio (III) (CTRu (III)).	9
Figura 6	Estrutura da transferrina sérica humana e os sítios de ligação do metal nos resíduos do lóbulo-N da transferrina.	12
Figura 7	Captação celular de ferro pelo ciclo da transferrina.	13
Figura 8	Captação celular de ferro e rutênio pelo ciclo da transferrina.	14
Figura 9	Estrutura tridimensional da albumina sérica humana (hsA).	16
Figura 10	Níveis de energia de um elétron desemparelhado em função do campo magnético externo.	20
Figura 11	Espectros de RPE típicos para sistemas paramagnéticos.	21
Figura 12	Espectro de absorção no UV-visível de CTRu(III) em tampão fosfato no período de 24 horas à temperatura de 25 °C.	30
Figura 13	Ilustração esquemática da reação de substituição de CTRu(III) em tampão fosfato.	31
Figura 14	Espectro de absorção no UV-visível de CTRu(III) em tampão fosfato no período de 24 horas à temperatura de 37 °C.	32
Figura 15	Distribuição da absorbância em função do tempo de reação sob efeito da temperatura do complexo CTRu (III) em tampão.	33
Figura 16	Espectros UV-vis em dependência do tempo de 200 μ m CTRu(III) em 20 μ M hsA (A), 20 μ M bsA (B) e 20 μ M apo-hsTf, coletados no período de 24 horas.	36
Figura 17	Espectros de fluorescência de (A) hsA (2 μ M) e (B) bsA (2 μ M)	39

tratado com diferentes concentrações de CTRu(III).

- | | | |
|------------------|---|----|
| Figura 18 | Espectro RPE banda-X de CTRu(III) (6mM) em tampão resfriado à aproximadamente 250K no período de 24h. | 43 |
| Figura 19 | Espectro RPE banda-X de CTRu (III) (6mM) com bsA (2 mM) à aproximadamente 250K no período de 24h. | 46 |
| Figura 20 | Espectro RPE banda-X de CTRu(III) (6mM) com hsA (2mM) à aproximadamente 250K no período de 24h. | 48 |

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1** Reação de substituição de complexo *cis*-[Ru(NH₃)₄Cl₂]Cl em tampão fosfato (pH 7.4). 44
- Esquema 2** Representação da reação do complexo com bsA. 47
- Esquema 3** Resumo das principais vias de reações para o complexo CTRu (III) na presença de hsA, conforme determinado em estudos de EPR. 50

LISTA DE TABELA

Tabela 1 Valores de IC ₅₀ para o composto <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NH ₃) ₄]Cl em diferentes linhagens celulares.	10
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A549: Carcinoma de pulmão

A-20: Linhagem de células de linfoma murino

CTRu(III): cloreto *cis*-tetraminodiclororutênio(III)

DCZ: desdobramento de campo zero

EPR: efeito de permeabilidade e retenção

DNA: Ácido desoxirribonucléico

G1: Fase G1 do Ciclo Celular

hsA: Albumina sérica humana

hsTf: Transferrina sérica humana

IC₅₀: Concentração que inibe 50% da viabilidade celular

Jurkat: Linhagem de células de Leucemia Aguda

K562: Linhagem de células de Leucemia Mielóide Crônica Humana

KP1019: Indazol *trans*-[tetraclorobis (1*H*-indazol)rutenato(III)]

MRC-5: Linhagem de célula normal de fibroblasto de pulmão humano

NAMI-A: ImH[*trans*-RuCl₄(DMSO)Im]

PBMC: Células Mononucleares de Sangue Periférico

Tampão fosfato: Solução salina tamponada com fosfato

RM175: [(η⁶-C₆H₅C₆H₅)-Ru(en)Cl] PF₆, en=etilenodiamina

RPE: Ressonância paramagnética eletrônica

RAPTA: [(η⁶-C₆H₅C₆H₅)-RuCl₂(PTA)] PTA= 1,3,5-triazo-7-fosfotriciclo[3.3.1.1]decano

SK-BR-3: Linhagem de células adenocarcinoma de mama

S-180: linhagem de células de sarcoma murino de camundongo

Trp: triptofano

UFG: Universidade Federal de Goiás

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UV-vis: espectro ultra-violeta ao visível

Resumo

Motivado pela perspectiva de complexos de rutênio podem ser utilizados no tratamento do câncer, o nosso grupo de pesquisa testou a Hipótese que alguns complexos de Ru (III) são capazes de interagir com as proteínas do soro, particularmente albumina e transferrina. O complexo de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (CTRu(III)) foi testado contra diferentes tipos de células tumorais, obtendo bons resultados. A partir de resultados promissores obtidos com este composto, estudos subsequentes são necessários para a compreensão do mecanismo pelo qual ele exerce sua especificidade para células de tumor. Neste artigo, apresentamos a aplicação de espectroscopia de absorção UV-vis, fluorescência e ressonância paramagnética eletrônica (RPE), para estudar a interação do complexo CTRu(III) com albumina sérica humano (hsA) e a albumina sérica bovina (bsA). Medidas de fluorescência revelaram uma forte ligação do complexo com as proteínas com K_{sv} de $1,32 \times 10^5$ e $3,71 \times 10^5$ para hsA e bsA, respectivamente. Espectros de RPE de complexos de Ru (III) mono-nucleares em tampão mostraram um decréscimo significativo na intensidade do sinal global após a primeira passo de aquação, que é consistente com a formação de dímeros de oxo complexos de Ru (III). Os espectros de RPE revelaram que a ligação à bsA é muito rápida, a ligação covalente à proteína ocorre através de troca dos ligantes com cadeias laterais de proteínas, provavelmente com o imidazol da histidina. Por outro lado, o complexo se liga não covalentemente na hsA, provalente como produto da oligomerização do complexo no bolso de ligação hemin. Além disso, duas espécies são formadas lentamente por ligação covalente do complexo com os resíduos histidina, produzindo uma espécie de simetria axial e a outra de simetria rômica. Essas ligações parecem surgir pela interação do complexo com o resíduo histidina localizado no sítio de ligação Sudlow II.

Palavra-chave: Complexos de rutênio (III), proteínas séricas, interação, UV-vis, espectroscopia de Fluorescência, Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).

Abstract

Motivated by the perspective of ruthenium complexes to be used in cancer treatment, our research group has tested the hypothesis that some complexes of Ru (III) are able to interact with serum proteins, particularly albumin and transferrin. The Complex *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (CTRu(III)) have been tested against different kind of tumor cells, obtaining good results. Starting from promising results obtained with this compound, subsequent studies are required to understanding the mechanism by which it exerts specificity for tumor cells. In this article, we report the first application of absorption UV-Vis, Fluorescence and Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy, to study the complex CTRu(III) interaction with human serum albumin (hsA) and bovine serum albumin (bsA). Fluorescence measurements revealed strong proteins-bound complex with K_{sv} of 1.32×10^5 and 3.71×10^5 for hsA and bsA, respectively. EPR spectra from mono-nuclear Ru(III) complexes in buffer, showed a significant decrease in the overall signal intensity following the first aquation step, is consistent with the formation of oxo-bridged Ru(III) dimers. EPR spectra revealed that the BSA very rapid binding to the protein via covalent binding through ligand-exchange with protein side chains, likely with histidine imidazoles. On the other hand, the complex binds non-covalently in hsA, probably as a product of the oligomerization of the complex in heme-binding pocket. Furthermore, two species are slowly formed by covalent binding of the complex with the histidine residues, producing a species of axial symmetry and the other rhombic symmetry. These bonds seem to arise from the interaction of the complex with the histidine residue located in the binding Sudlow's site II.

keywords: Ru(III) complex, serum proteins, interaction, UV-vis, Fluorescence spectroscopy, Electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR).

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Propriedades anticancerígenas de metalofármacos

Os complexos metálicos despertaram grande interesse em aplicações oncológicas após a descoberta da atividade antitumoral do complexo de platina (cisplatina) por Rosenberg e colaboradores no final dos anos 60 (KOSTOVA, 2006). Essa descoberta foi um marco na história da química medicinal, a qual inicialmente se dedicava principalmente ao estudo de compostos orgânicos e produtos naturais. A cisplatina mostrou-se eficiente no tratamento de câncer ovariano e testicular, no entanto, problemas associados ao seu uso, tais como a elevada toxicidade e resistência ao tratamento, levaram ao desenvolvimento de novas pesquisas envolvendo complexos metálicos (SCOLARO et al., 2007; HARTINGER et al., 2006; KOSTOVA, 2006).

Novos complexos similares à cisplatina foram sintetizados e avaliados, com o propósito de reduzir a toxicidade bem como ampliar sua utilização para o tratamento de outros tipos de câncer. Destes apenas dois complexos de platina (II), além da cisplatina, foram aprovados para a aplicação clínica em todo o mundo, a carboplatina e a oxaliplatina (**Figura 1**), enquanto a lobaplatina, nedaplatina e heptaplatina foram aprovados como agente antitumoral apenas no Japão, China e Coréia do Sul, respectivamente (HARTINGER et al., 2006).

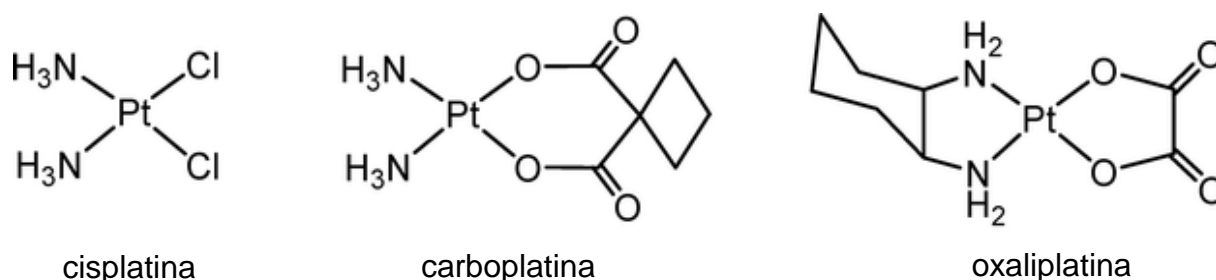


Figura 1 - Principais compostos de platina utilizados na terapia do câncer. Fonte: (SÜSS-FINK, 2010).

O mecanismo de ação proposto para os compostos de platina envolve a entrada da cisplatina na célula e conseqüente hidrólise do complexo, seguido de ligação ao DNA. Em alguns casos o produto da hidrólise desses complexos se liga a

duas bases de guanina do DNA, que pode provocar uma distorção na estrutura do DNA, que não é reparado pelos mecanismos enzimáticos e então desencadeando a morte celular via apoptose (LEVINA et al., 2009).

Como o uso clínico de fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, novas pesquisas foram desenvolvidas em busca de novos compostos citotóxicos com perfis de toxicidade mais aceitáveis, como o uso de metais de transição dos Grupos 8, 9 e 10 da tabela periódica, que possuem propriedades semelhantes às da platina. Os elementos desses grupos são subdivididos em dois grupos, o grupo do ferro, que representa os metais de transição 3d (cobalto, ferro e níquel) e o grupo da platina representando os metais de transição 4d e 5d (rutênio, ródio, paládio, irídio, ósmio e platina). Milhares de complexos desses metais foram sintetizados com uma variedade de ligantes diferentes e testados suas atividades biológicas, alguns deles mostraram-se ativos em testes *in vitro* contra diferentes tipos de linhagens de células tumorais, dentre eles, os complexos de rutênio mostraram serem os mais promissores (KOSTOVA, 2006).

1.2 Complexos de rutênio como agente anticâncer

Os complexos de rutênio surgiram para oferecer novas perspectiva, atraindo um considerável interesse dos pesquisadores para aplicação no tratamento de vários tipos de câncer. Exibindo propriedades interessantes para sua aplicação como um metalofármaco tais como, a acessibilidade aos estados de oxidação (II), (III) e (IV) sob condições fisiológicas adequadas, cinética de substituição similar ao da platina, geometria octaédrica, toxicidade em geral menor quando comparada à cisplatina, capacidade de mimetizar o ferro na ligação com biomoléculas, tais como albumina e transferrina. Acredita-se que a menor toxicidade dos complexos de rutênio esteja relacionada com a sua capacidade de se ligar a transferrina nos sítios de ligação do ferro ou em outro sítio não específico, e também pela possível ativação por redução no interior da célula. Tais propriedades o torna promissor na utilização como fármaco na terapia do câncer (ALLARDYCE et al., 2001; ANG & DYSON, 2006; JAKUPEC et al., 2008).

Os primeiros compostos de Ru (III) testados como agentes anticancerígenos foram desenvolvidos por M. Clarke no começo dos anos 80. A primeira investigação

sistemática de complexos de rutênio e suas propriedades antitumorais foram realizadas na década de 80 com os compostos *fac*-[RuCl₃(NH₃)₃] e *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (CLARKE, 1980). Outros esforços levaram ao desenvolvimento de novos complexos sintéticos, como o imidazol [*trans*-RuCl₄(1*H*-imidazol)(DMSO)] (NAMI-A) desenvolvido por SAVA e colaboradores (SAVA et al., 1999), e o complexo indazol [*trans*-RuCl₄(1*H*-indazol)₂] (KP1019) descoberto por Keppler e seus colaboradores (KEPPLER, 1993) (**Figura 2**). Na fase pré-clínica, NAMI-A mostrou-se eficaz contra tumores em metástase, prevenindo a formação de metástase e inibindo seu crescimento, enquanto KP1019 apresentou atividade notável contra tumores colorretais e tumores humanos primários de resistência à cisplatina (SAVA et al., 1999; HARTINGER et al., 2006; BERGAMO & SAVA, 2007; LEVINA et al., 2009; GIANFERRARA et al., 2009; BERGAMO et al., 2012).

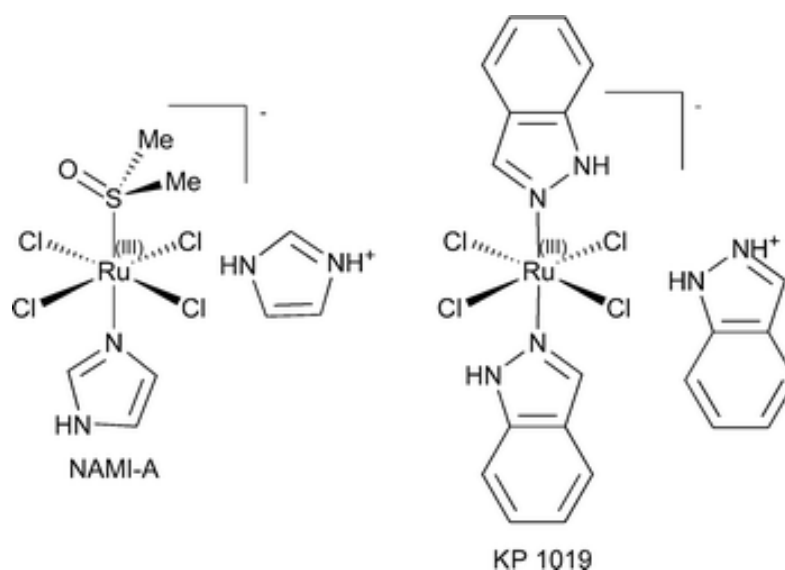


Figura 2 - Estrutura dos compostos de rutênio anticâncer [*trans*-RuCl₄(1*H*-imidazol)(DMSO)] (NAMI-A) e indazol [*trans*-RuCl₄(1*H*-indazol)₂] (KP1019). Fonte: (GIANFERRARA et al., 2009).

Outros compostos de rutênio com estado de oxidação 2+ vêm sendo avaliados como agentes antitumorais, dentre eles tem-se os complexos arenos Ru(II) (conhecidos como banquinho de piano, pela semelhança da estrutura química do complexo com um banquinho de piano), desenvolvidos por Dyson e colaboradores [(η⁶-C₆H₅C₆H₅)-Ru(en)Cl] PF₆, en=etilenodiamina (RM175) e Sadler e colaboradores [(η⁶-C₆H₅C₆H₅)-RuCl₂(PTA)] PTA= 1,3,5-triazo-7-fosfotriciclo [3.3.1.1] decano (RAPTA-C) (**Figura 3**) (LEVINA et al., 2009).

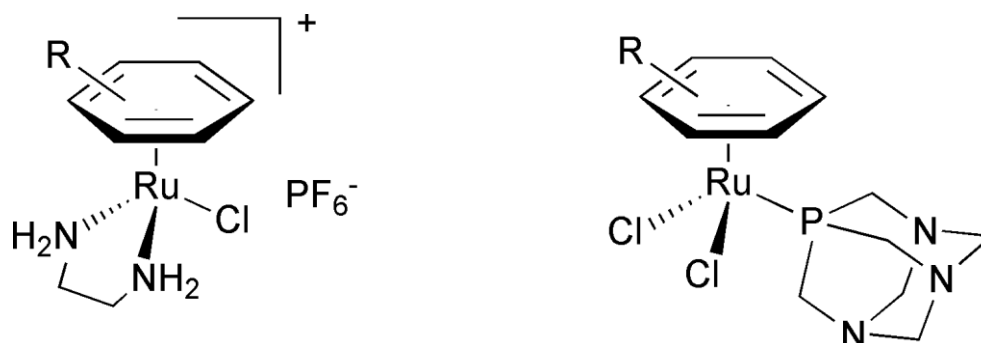


Figura 3 - Compostos areno Ru(II) (banquinho de piano) desenvolvidos pelos grupos de Sadler tem-se o RM175, $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_5)\text{-Ru(en)Cl}] \text{PF}_6$ en=etilenodiamina (esquerda), e RAPTA-C, $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_5)\text{-RuCl}_2(\text{PTA})]$ PTA= 1,3,5-triazo-7-fosfotriciclo[3.3.1.1]decano, de Dyson (direita). Fonte: (GIANFERRARA et al., 2009).

Os compostos com ligantes arenos estabilizam e dão um caráter mais hidrofóbico ao composto, o que pode aumentar o reconhecimento e o transporte da droga através da membrana celular (MORRIS et al., 2001). Uma outra função recentemente descoberta sobre os complexos areno-Ru(II) é a inibição de vários tipos de enzimas envolvidas na progressão tumoral (tioredoxina redutase e catpepsina B) ou no desenvolvimento de resistência aos fármacos anticancerígenos (glutationa S-transferase) (ANG et al., 2007, CASINI et al., 2008).

Alguns complexos do tipo RAPTA ($[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-areno})\text{L}]$) demonstraram atividade antimetastática semelhante ao NAMI-A (BERGAMO et al., 2008, ANG et al., 2011). Os compostos arenos do tipo $[\text{RuX}(\eta^6\text{-areno})(\text{en})]^+$ onde X é um haleto, como $\text{RuCl}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_5)(\text{en})\text{PF}_6$ (RM175) e $[\text{RuCl}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_5)(\text{en-Et})\text{PF}_6$, en= etilenodiamina, inibiram o crescimento das células tumorais de câncer no ovário (A2780). Além disso, os compostos $[\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{en})\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{en})\text{PF}_6$ possuem a capacidade de inibir as enzimas que atuam nos processos de replicação e empacotamento de DNA, as Topoisomerases I e II (MORRIS et al., 2001; ANG et al., 2011). Apesar de nenhum destes compostos terem completado ainda os ensaios clínicos, tais propriedades os tornam interessante na aplicação antitumoral.

Vários estudos com um grande número de complexos de rutênio foram realizados para determinar o seu modo de ação e a relação entre estrutura atividade. No entanto, muitos detalhes são ainda desconhecidos, e seu esclarecimento continua sendo um desafio para a pesquisa. Pouco se sabe sobre o

mecanismo de ação dos potenciais metalofármacos NAMI-A e KP1019, mas uma importante descoberta é de que a eficiência de ligação ao DNA é muito pequena quando comparado ao da cisplatina, tal comportamento caracteriza um diferente mecanismo de ação desses compostos no interior das células tumorais (MALINA et al., 2001).

Estudos relataram que NAMI-A e KP1019 são ativos contra células tumorais, interagindo em diferentes componentes celulares de DNA, em que o NAMI-A modifica a invasão e metástase das células ou por ativação dos mecanismos celulares de suicídio, devido à interação com moléculas responsáveis pela sobrevivência celular. O KP1019 promove a apoptose da célula através da via mitocondrial (BERGAMO & SAVA, 2001).

Como os complexos de rutênio possuem propriedades químicas e estruturais diferentes dos complexos de platina, o modo de ação dos fármacos à base de rutênio contra a célula tumoral é supostamente diferente dos compostos de platina. A partir de estudos desenvolvidos sobre o comportamento químico de K1019, tais como: hidrólise, redução, reatividade com as proteínas e DNA, e a atividade biológica *in vitro* e *in vivo*, tem-se representado na **Figura 4** um esquema do modo de ação proposto para KP1019 por HARTINGER et al., 2006. O modo de ação diferente para o composto KP1019 pode ser explicado pelo fato de apresentar atividade contra tumores resistentes à cisplatina e também pela sua baixa toxicidade quando comparado aos compostos de platina, tornando-o atraente para seu uso clínico.

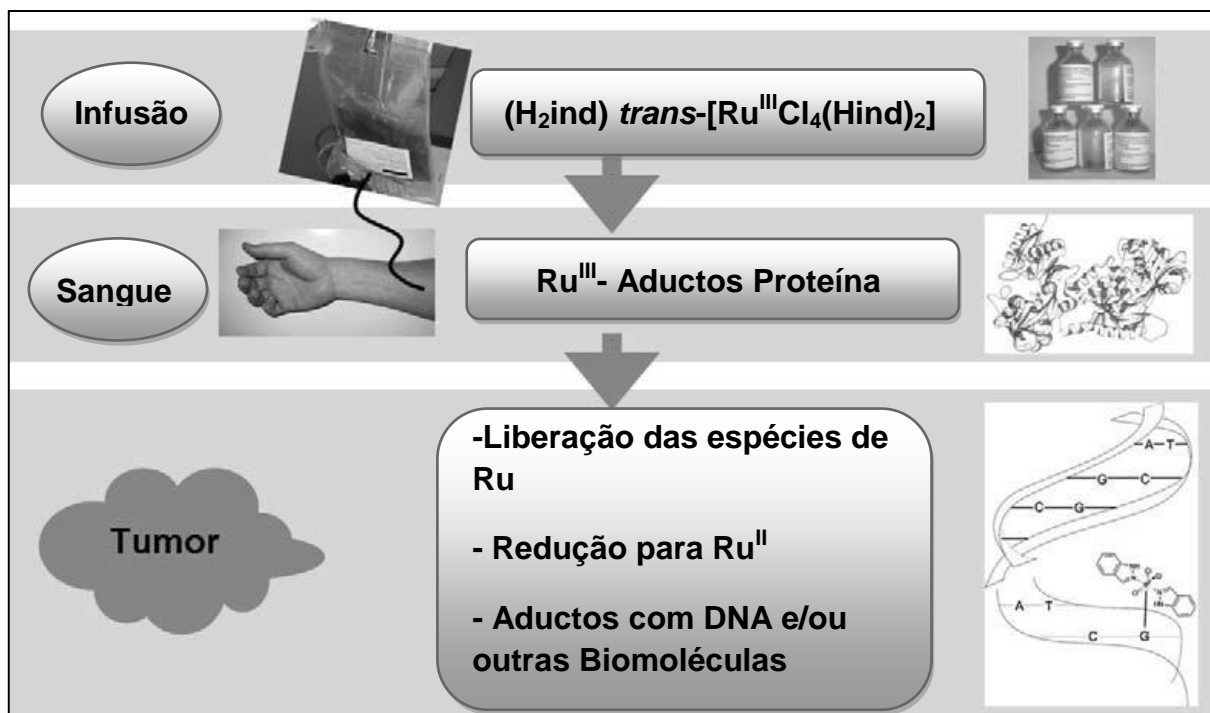


Figura 4 - Esquema proposto para o modo de ação de KP1019: o composto KP1019 administrado via intravenosa, se liga aos aductos das proteínas presentes na corrente sanguínea, na célula tumoral sofre redução e se liga aos aductos do DNA ou a outras biomoléculas, levando a apoptose da célula. Fonte: (HARTINGER et al., 2006), modificado.

Segundo BERGAMO & SAVA (2011), o NAMI-A seria hoje o melhor modelo de fármaco para se estudar e para o qual é obrigatório entender o mecanismo de ação. As metástases representam o aspecto mais importante dos tumores malignos, pois não há fármaco no mercado capaz de controlar o crescimento de tumores. Então, a metástase seria o alvo para a quimioterapia inovadora. Dos compostos de rutênio existentes hoje, NAMI-A é o mais eficiente, com propriedade seletiva para metástases pulmonares com alta eficiência.

1.3 Possíveis mecanismos de ação dos complexos de rutênio

A atividade biológica e o mecanismo de ação dos complexos metálicos podem ser ajustados pela escolha adequada do metal, estado de oxidação e os ligantes. Tais propriedades tornam uma tarefa difícil para o esclarecimento do seu mecanismo de ação. A atividade antitumoral dos complexos está ligada a inúmeros fatores, dentre eles estão, os parâmetros termodinâmicos e cinéticos do complexo, a natureza dos ligantes inertes e a cinética de ativação do composto (GIANFERRARA et al., 2009).

Embora o mecanismo de ação antitumoral dos complexos de rutênio não tenha sido identificado, vários fatores são responsáveis por sua atividade farmacológica tais como, ativação por redução, hidrólise de grupos de saída, transporte pela transferrina e ligação ao DNA (TAN et al., 2008).

Na hidrólise, os grupos de saída são substituídos por moléculas de água. Tal propriedade pode influenciar significativamente na atividade antitumoral do complexo, um ligante fortemente ligado pode tornar o fármaco inativo, enquanto que um ligante lábil pode ser facilmente hidrolisado ou substituído (TAN et al., 2008).

A hipótese de ativação por redução sugere que os complexos de Ru(III) podem servir como pró-fármacos que são ativados (reduzidos) no interior de células tumorais. Como as células tumorais possuem um metabolismo acelerado, geralmente tem-se um menor teor de O₂ (hipóxia). O excesso de ácido láctico provocado pela glicólise realizada para obtenção de energia, diminui o pH nas células tumorais, levando a redução do centro metálico do complexo de Ru(III) para Ru(II), tornando este complexo ativo no interior da célula (CLARKE, 2003; HARTINGER et al., 2006).

Em contrapartida, a hipótese de ativação de compostos de Ru(III) por redução nos tecidos tumorais em condições de hipóxia, não explica a atividade antitumoral de NAMI-A, que é um potencial fármaco seletivo para células metastáticas pulmonares, o qual se trata de um tecido mais oxigenado no corpo humano. Além disso, essa hipótese também não pode ser aplicada para os complexos de rutênio(II), uma vez que possuem estado de oxidação 2+, eles não têm a necessidade de serem reduzidos para se tornarem ativos (BERGAMO et al., 2012).

O transporte de complexos de rutênio(III) pela transferrina é um outro mecanismo estudado com vários compostos de rutênio, o qual se baseia no transporte do fármaco para o interior das células cancerígenas através do ciclo da transferrina. A seletividade do fármaco estaria relacionada ao diferente metabolismo apresentado pelas células cancerígenas, as quais necessitam de grande quantidade de ferro, com isso os receptores da transferrina estariam mais expressos, resultando no acúmulo de complexos Ru(III) em células tumorais. Neste caso, a transferrina atuaria como um "cavalo de tróia", transportando complexos de rutênio e não o ferro, para o interior da célula (HARTINGER et al., 2006).

O DNA é um suposto alvo para os potenciais fármacos antitumorais à base de rutênio. Devido a diferenças geométricas entre os complexos, os compostos de

rutênio podem se ligar ao DNA de forma diferente, quando comparado à cisplatina e seus análogos. Embora o alvo farmacológico para os compostos antitumorais de rutênio não tenha sido desvendado, existem inúmeras evidências que indicam que a citotoxicidade de muitos complexos de rutênio está relacionada com a sua capacidade de se ligar ao DNA. No entanto tem sido relatado algumas exceções, como os compostos NAMI-A e KP1019, em que a atividade citotóxica de NAMI-A está relacionada com a interação com moléculas essenciais para a sobrevivência da célula, já o KP1019 tem como alvo a via mitocondrial (BERGAMO & SAVA, 2001; CLARKE, 2003; BRABEC & NOVÁKOVÁ, 2006).

Embora não tenha sido completamente elucidado o mecanismo de ação de KP1019 e NAMI-A, acredita-se ser ativado pela dissociação do cloreto, por uma redução para um complexo mais lábil Ru(II), ou seja uma ligação direta de rutênio em um alvo biológico. Acredita-se que os compostos arenos Ru(II) do tipo $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{quel})\text{X}]^+$ (onde quel é um ligante quelante diamino, e X é um haleto) serem ativados pela dissociação do ligante aniônico para dar aductos monofuncionais para se ligarem ao DNA, preferencialmente a N(7) de guanina. Do mesmo modo, a ativação de RAPTA-C, com propriedades antimetastática *in vivo*. A evidência experimental sugere que o mecanismo de ação dos compostos RAPTA é o DNA. Alguns compostos RAPTA, foram capazes de inibir a enzima catepsina, provavelmente após ativação por aquação (GIANFERRARA et al., 2009).

1.4 Complexo de rutênio (III) *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (CTRu(III))

Devido à forte estabilização do campo ligante, em solução aquosa tem-se geralmente estruturas octaédricas e frequentemente bastante inertes. As vantagens de se utilizar complexos de rutênio com ligante amina para o desenvolvimento de potenciais fármacos incluem: métodos confiáveis para sintetizar complexos estáveis com estrutura previsível, habilidades de ajustar afinidades de ligantes, transferência eletrônica, as taxas de substituição e potenciais de redução (CLARKE, 2003).

O complexo de rutênio (III) com ligante amina, *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (**Figura 5**) é muito similar ao da cisplatina, este poderia apresentar uma atividade citotóxica para células tumorais, similar ou superior ao da cisplatina. Com o propósito de se estudar a atividade antitumoral do complexo, testes biológicos (*in vitro* e *in vivo*)

foram desenvolvidos e resultados promissores foram obtidos para diferentes linhagens tumorais, em especial às células leucêmicas (LIMA et al., 2010b).

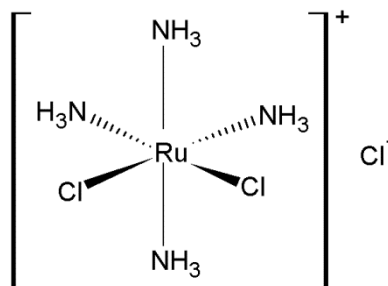


Figura 5 - Estrutura química do complexo de rutênio com atividade antitumoral, cloreto de *cis*-tetraminodichlororutênio(III) (CTRu(III)).

Estudos realizados em testes *in vitro* com a linhagem de células tumorais sarcoma 180 (S-180), o composto mostrou-se citotóxico com uma concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (IC_{50}) de 63 μM . O complexo induziu morte celular por apoptose, apresentando dano no DNA e alterações no ciclo celular com aumento do número de células em fase G_1 (LIMA et al., 2010a). Em estudos realizados *in vivo* com células tumorais S-180 o efeito antitumoral mostrou-se satisfatório, com redução do volume do tumor e aumento do tempo de vida dos animais tratados com CTRu(III) (MENEZES et al., 2007).

Na avaliação de citotoxicidade em linhagem de célula tumoral de leucemia mieloide crônica (K562) e em linhagem de célula normal de fibroblasto de pulmão humano (MRC-5) a IC_{50} foi de 10,74 μM e >383 μM respectivamente, sugerindo atividade citotóxica seletiva para células tumorais (LIMA et al., 2010b). Em outro estudo realizado por SILVEIRA-LACERDA et al. (2010), com células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC), observou-se baixa citotoxicidade em testes *in vitro*, corroborando com o resultado encontrado para MRC-5. Em análise do ciclo celular com as células K562, provou um aumento na proporção de células em sub- G_1 e ativação de caspase 3, os quais estão envolvidos na ativação da apoptose (RIBEIRO et al., 2009; LIMA et al., 2010; SILVEIRA-LACERDA et al., 2010).

O complexo CTRu(III) também mostrou-se promissor com outras linhagens de células tumorais, induziu um grau de citotoxicidade elevada em testes *in vitro* contra célula tumoral de leucemia linfoblástica T (Jurkat) com IC_{50} de 1,982 μM e uma citotoxicidade muito baixa para células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

com IC₅₀ de 8157 µM (SILVEIRA-LACERDA et al., 2010). Com moderada citotoxicidade contra células tumorais de linfoma B (A-20) e adenocarcinoma de células mamárias (SK-BR-3) com IC₅₀ de 13 µM e 13,53 µM respectivamente (SILVEIRA-LACERDA et al., 2010). Baixo efeito citotóxico (somente em concentrações elevadas) em células de carcinoma de pulmão (A549) com IC₅₀ >383 µM (LIMA et al., 2011). Em resumo tem-se na **Tabela 1** as IC₅₀ encontradas com o composto CTRu(III) frente às diferentes linhagens celulares.

Tabela 1 - Valores de IC₅₀ para o composto *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl em linhagens de células tumorais humana (Jurkat, K562, A-20, SK-BR-3, A549), linhagem de célula tumoral de animal (S-180) e em linhagens de células normais (MRC-5 e PBMC).

Linhagens celulares	IC ₅₀ de <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NH ₃) ₄]Cl
Jurkat	1,982 µM
K562	10,74 µM
A-20	13 µM
SK-BR-3	13,53 µM
S-180	63 µM
A549	>383 µM
MRC-5	>383 µM
PBMC	8157 µM

A partir desses estudos realizados com o composto de CTRu(III), torna-se necessário avaliar a interação do complexo com as proteínas séricas humana, pois se trata de um composto com potencial agente anticancerígeno que apresenta seletividade para células tumorais. Tal propriedade pode estar relacionada com a possível interação do complexo com as proteínas do soro.

1.5 Interação com biomoléculas

A maioria das biomoléculas, como as proteínas e os ácidos nucléicos, possuem em suas estruturas átomos de nitrogênio e de enxofre, os quais são doadores de elétrons, sendo assim, adequados para fazerem ligações com os complexos de rutênio, no sangue. Proteínas do soro, em particular a albumina e a transferrina, são conhecidas como parceiras primárias para os compostos metálicos administrados por via intravenosa (HARTINGER et al., 2006).

Vários estudos mostraram que o complexo NAMI-A interage com a albumina e a transferrina, as duas proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo. A ligação deste possível fármaco com as proteínas plasmáticas pode influenciar significativamente na sua distribuição e biodisponibilidade, mostrando um assunto relevante para ser estudado. Sugere-se que o complexo NAMI-A primeiramente sofre hidrólise dos ligantes cloreto e em seguida liga-se lentamente à albumina, o qual essa ligação impede a redução do centro metálico de rutênio (BRINDELL et al., 2008).

Alguns complexos de Ru(III) exibem maior afinidade pela transferrina sérica humana (hsTf) e albumina sérica humana (hsA) do que a cisplatina e essa hipótese de que os complexos de Ru(III) podem interagir com as proteínas do soro é um passo importante como mediador do complexo para inibir o tumor alvo (MESSORI et al., 2000; TIMERBAEV et al., 2005; HARTINGER et al., 2005; CETINBAS et al., 2010; WEBB et al., 2012).

1.6 Transferrina sérica humana (hsTf)

O rápido desenvolvimento das indústrias farmacêuticas e a descoberta de novos fármacos levaram ao surgimento de vários medicamentos terapêuticos para o tratamento de uma série de doenças. No entanto, atualmente os principais problemas associados à administração sistêmica de fármacos são: a falta de fármacos específicos, afinidade para sítios patológicos, toxicidade, biodistribuição de fármacos e outros efeitos secundários resultantes de altas doses. (QIAN et al., 2002). Uma estratégia atrativa para aumentar o índice terapêutico dos fármacos é proporcionar a estes agentes uma seletividade para as células alvo, assim mantê-los longe de células saudáveis, que são sensíveis aos efeitos tóxicos dos fármacos (QIAN et al., 2002).

Estudos envolvendo a interação de fármacos com a transferrina receberam maior atenção para o direcionamento de fármacos uma vez que esta proteína pode alcançar sítios específicos devido às elevadas quantidades de seus receptores presentes na superfície celular. A eficiente absorção de transferrina pela via celular torna-a interessante para o transporte de fármacos antitumorais, pois em proliferação de células malignas os receptores transferrina superexpressam (KIRCHEIS et al., 2002).

A transferrina é uma glicoproteína de massa molecular 80 KDa sintetizada e metabolizada principalmente no fígado, é responsável pelo transporte sanguíneo de ferro. A transferrina presente no soro humano tem a função de transportar ferro a partir da circulação sistêmica para os locais de consumo, para as células e tecidos. Também está envolvida no transporte de outros inúmeros íons metálicos diferentes de ferro, incluindo íons metálicos terapêuticos e alguns íons metálicos tóxicos (QIAN et al., 2002).

Cada molécula de transferrina (**Figura 6**) é formada por uma cadeia polipeptídica que se dobra formando dois lóbulos estruturalmente semelhantes com funções diferentes, designado como lóbulo-C e lóbulo-N. Cada lóbulo é dividido em dois domínios que se ligam formando uma fenda hidrofílica profunda contendo um local de ligação do ferro. O sítio de ligação do ferro(III) é formado pela coordenação de quatro resíduos ao ferro, um aspartato, uma histidina e duas tirosinas. Além disso, dois oxigênios do ligante aniônico bidentado carbonato (CO_3^{2-}), são necessários para completar a geometria octaédrica do Fe^{3+} coordenado (PRINCIOTTO & ZAPOLSKI, 1975; QIAN et al., 2002).

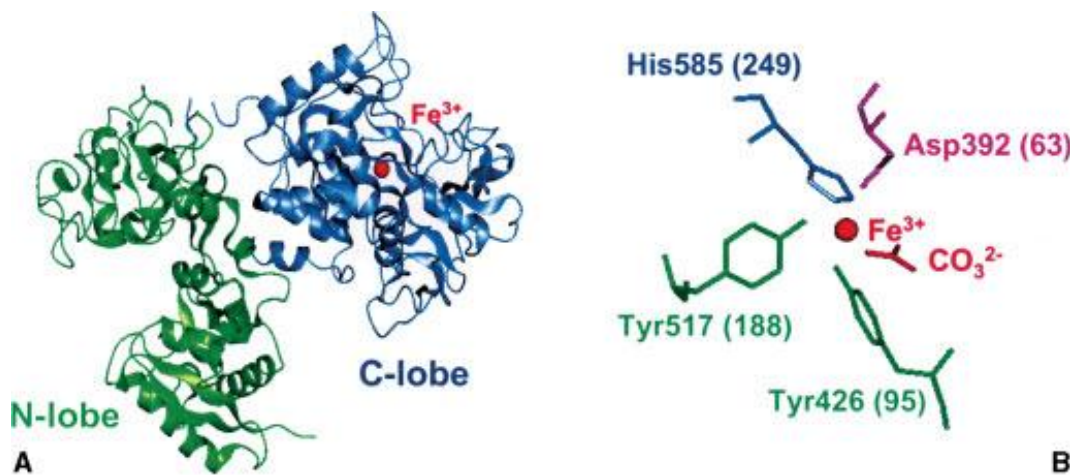


Figura 6 - (A) Estrutura cristalina da transferrina sérica humana. O lóbulo-C, que contém Fe^{3+} ligado aos resíduos da proteína, é mostrada ao lado na forma fechada (azul) e na forma aberta (verde). (B) Os sítios de ligação do metal nos resíduos do lóbulo-N da transferrina sérica humana. Fonte: (LI & QIAN, 2002).

No ciclo da transferrina (**Figura 7**), o ferro(III) encontra-se complexado a transferrina (Holo-Tf) e sua internalização para dentro da célula é iniciada pela ligação do complexo a um receptor transferrina (TfR) presente na superfície da maioria das células. A interação entre a transferrina complexada e o receptor

específico é facilitada pelo pH extracelular de 7,4, a partir desta interação se inicia a captação de ferro pela célula. Dentro do citosol o complexo é internalizado para dentro da célula por endocitose, dentro deste endossoma, a bomba de prótons reduz o pH, provocando a liberação do ferro. O ferro é levado para fora do endossoma pelo transportador do íon metálico divalente Fe^{2+} (DMT1) e o complexo apo-Tf / TfR é reciclado de volta para a superfície da célula, quando então apo-Tf se dissocia do receptor na superfície da célula (ROESER, 1970; GROTTTO, 2008; GUYTON 2006, DANIELS et al, 2006).

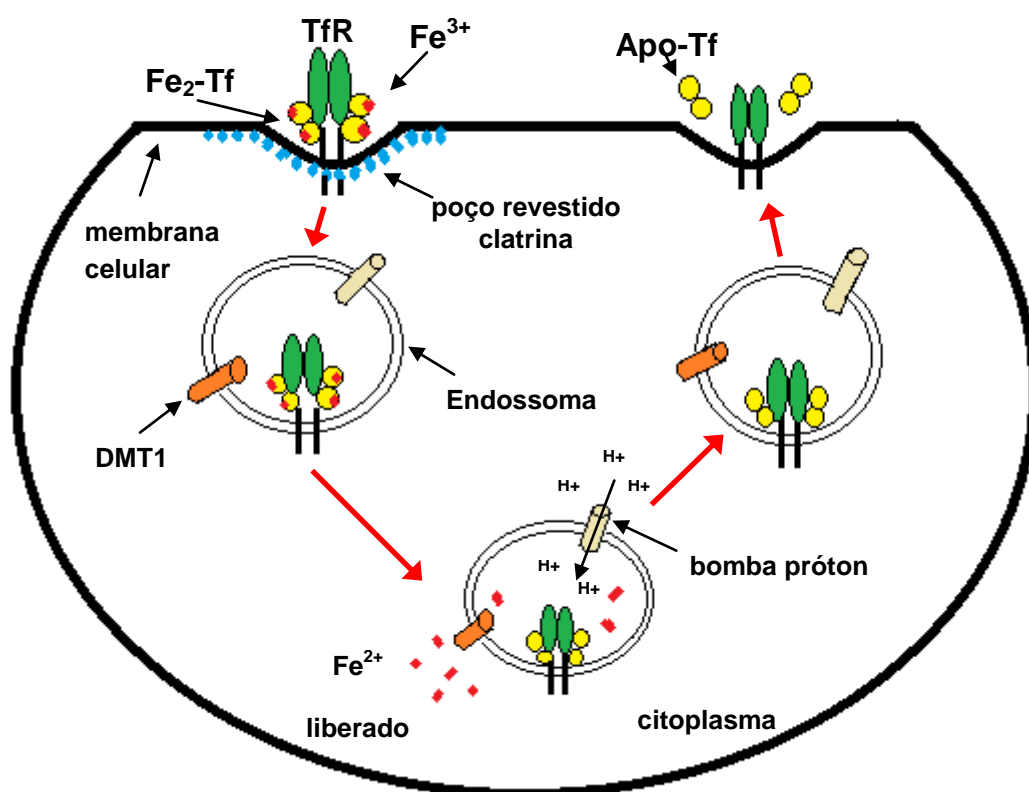


Figura 7 - Captação celular de ferro pelo ciclo da transferrina através de endocitose mediada por receptor. Fonte: (DANIELS et al., 2006), modificado.

Na corrente sanguínea, a transferrina é saturada com apenas cerca de 30% de Fe^{3+} , permitindo hTf se ligar a outros íons metálicos e transportá-los para as células (**Figura 8**). Devido essa capacidade, muitos estudos focaram na estratégia de desenvolvimento de novas drogas que exploram a função natural de hTf (MAZURYK et al., 2012). Apesar de apenas cerca de 1% dos complexos de Ru(III) (por exemplo KP1019) ligar-se a hTf na corrente sanguínea, a menor toxicidade apresentada pelos complexos de Ru (III) em comparação a cisplatina tem sido

atribuída à sua acumulação relativamente seletiva em células cancerígenas através do ciclo de transferrina (SULYOK et al., 2005; HARTINGER et al., 2006).

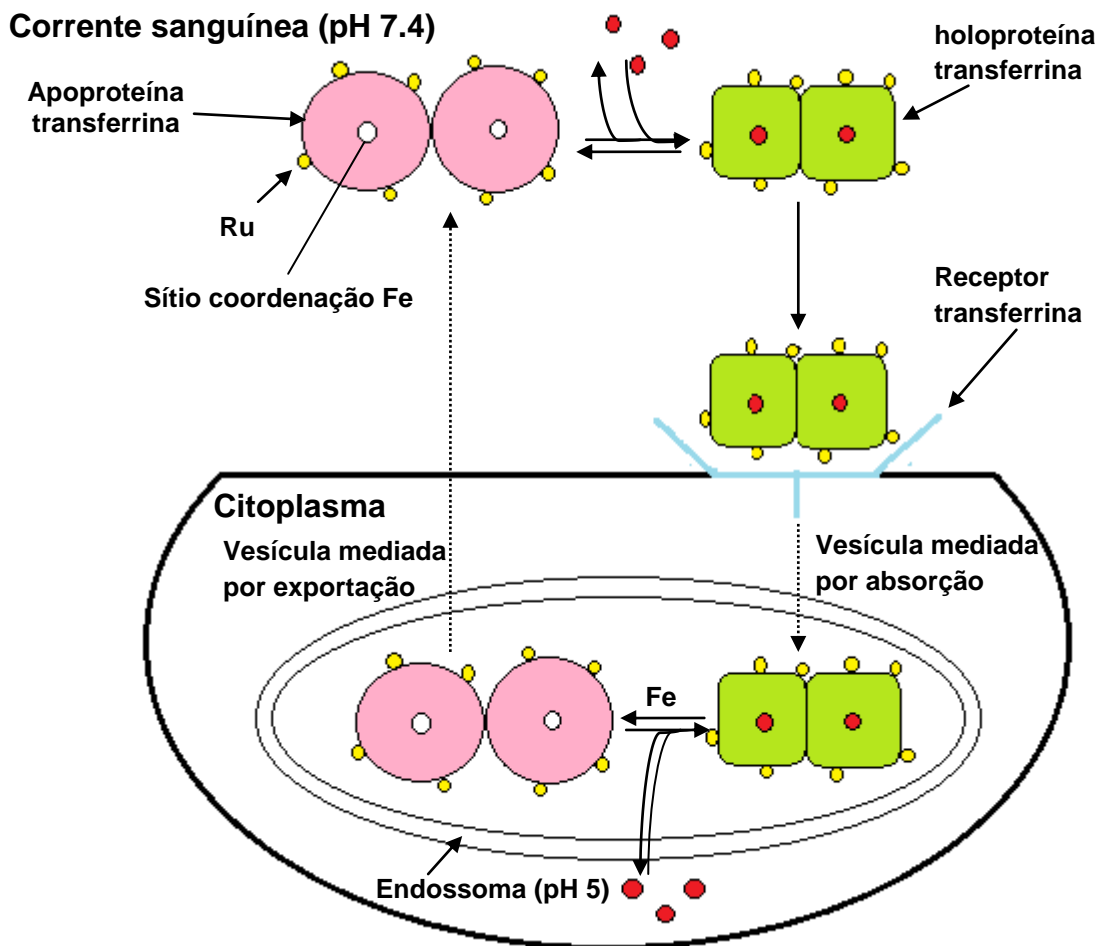


Figura 8 - Captação celular de ferro e rutênio pelo ciclo da transferrina através de endocitose mediada por receptor. Fonte: (PAGE et al. 2009), modificado.

Com o rápido desenvolvimento de células malignas a necessidade de ferro aumenta, sendo assim, os receptores transferrina superexpressam em sua superfície (RICHARDSON et al., 1997; KRATZ & BEYER, 1998; KIRCHEIS et al., 2002). Esta propriedade permite a utilização de hTf como um sistema eficaz na entrega de fármacos baseados em metais para as células cancerígenas, deixando as células normais relativamente inalteradas e, conseqüentemente, minimizando os efeitos colaterais (HARTINGER et al., 2006; KOSTOVA, 2006; CLARKE et al., 2003).

1.7 Albumina sérica humana (hsA)

A albumina sérica humana (hsA) é a proteína mais abundante no plasma, presente em concentrações de 40 mg mL^{-1} , sendo produzida no fígado. Possui estrutura globular monomérica de 66 KDa, contém 585 aminoácidos distribuídos em três domínios estruturalmente semelhantes (I, II e III), cada um contendo dois subdomínios (A e B), sua estrutura tridimensional pode ser visualizada na **Figura 9**. A sequência de aminoácidos de hsA contém um total de 17 pontes dissulfeto, um tiol livre de Cys34 e apenas um resíduo de triptofano (Trp) na posição 214 (LEMIEZ-TRYNDA et al., 2000; ESPÓSITO et al., 2002).

A hsA apresenta em sua estrutura sete sítios de ligação com diferentes afinidades para ácidos graxos de cadeias longas (CURRY, 2011). Os principais sítios de ligação são os sítios de Sudlow I e II, os ânions heterocíclicos volumosos, como o fármaco anticoagulante warfarina, se ligam no sítio Sudlow I (localizado no subdomínio II A), já o sítio Sudlow II (localizado no subdomínio III A) tem preferência por carboxilatos aromáticos com uma conformação estendida, como o ibuprofeno (FASANO et al., 2005). Além disso, tem-se no subdomínio IB uma cavidade hidrofóbica profunda, conhecida como sítio de ligação hemin, que possui três resíduos básicos em sua estrutura para coordenar aos dois grupos propionato da hemina, o que corresponde também a um sítio de ligação de ácidos graxos (ZUNSZAIN et al., 2003).

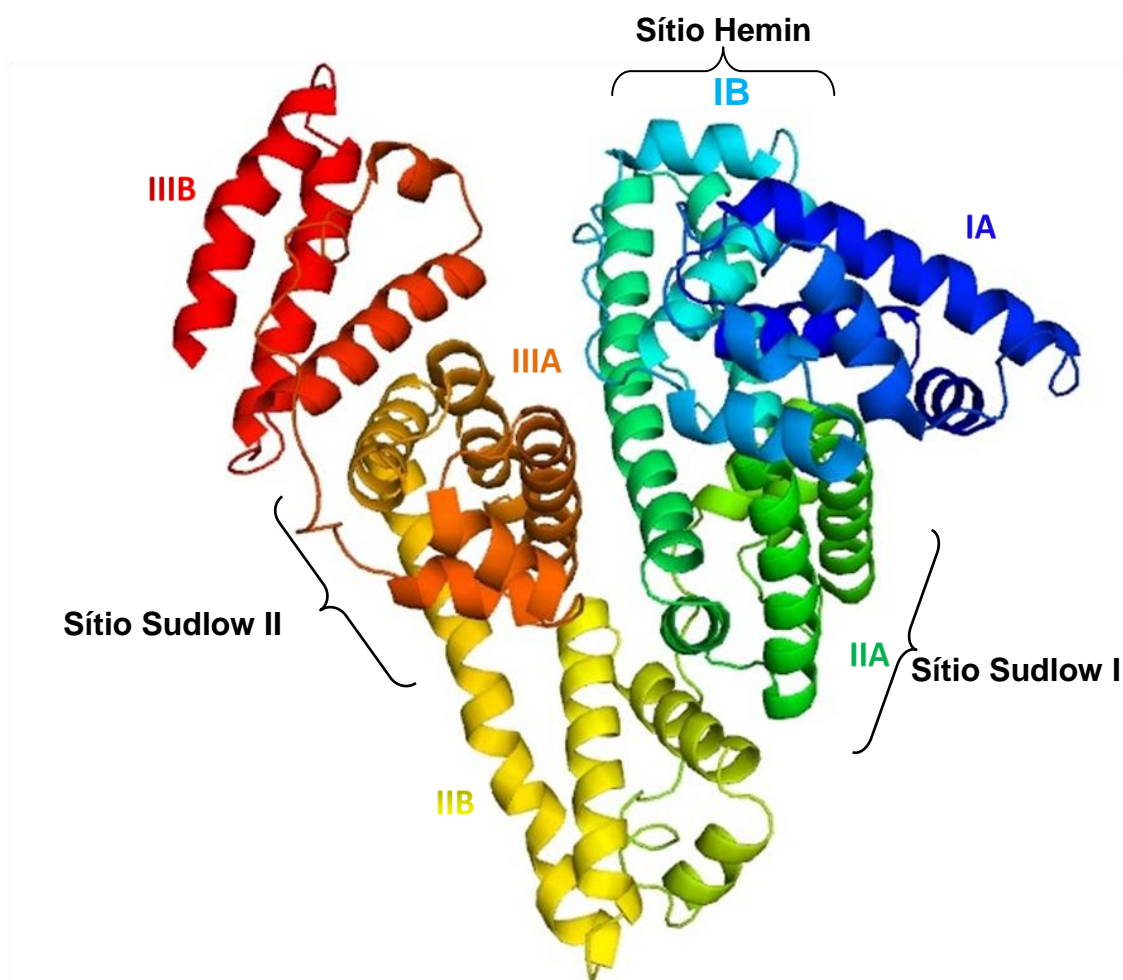


Figura 9 - Estrutura tridimensional da albumina sérica humana (hsA). A hsA é disposta em três domínios homólogos. Cada domínio é constituído por dois subdomínios designados como A e B com com três domínios estruturalmente semelhantes (I, II, III). Principais sítios de ligação sítio Sudlow I e II. A figura foi construída usando o programa Pymol. As coordenadas da estrutura foram obtidas a partir do banco de dados de proteínas RCSB, PDB com o código identificador 1AO6. Fonte: www.rcsb.org.

As proteínas do soro bovino (bsA) e humana (hsA) exibem aproximadamente 76% de homologia em sua sequência de aminoácidos (HUANG et al., 2004), uma das principais diferenças entre as duas proteínas é que a bsA tem dois resíduos triptofanos (Trp-135 e Trp-214) e a hsA apenas um (Trp-214). O Trp-214 localizado no bolso hidrofóbico (subdomínio II A) e o Trp-135 localiza-se na superfície da proteína (subdomínio I A) (GELAMO et al., 2002).

A albumina possui funções fisiológicas e farmacológicas importantes no organismo. Dentre as funções fisiológicas tem-se, a manutenção da pressão osmótica no sangue, carregada negativamente ela atrai íons de sódio e outros íons osmoticamente ativo, levando a retenção de água. Realiza o transporte, metabolismo e distribuição de várias substâncias endógenas e exógenas tais como,

hormônios, aminoácidos, ácidos graxos, hemina, tiroxina, drogas e cátions metálicos. Serve como um solubilizador e transportador destes compostos (ESPÓSITO et al. 2002, QUINLAN et al., 2005).

Albumina, como a proteína transportadora mais abundante no sistema circulatório, desempenha um papel importante na ligação e entrega de fármacos em muitos sítios de ligação, frequentemente também aumenta a solubilidade de medicamentos hidrofóbicos no plasma. Uma vez que hsA serve como um meio de transporte do fármaco na corrente sanguínea, é importante estudar as interações de potenciais fármacos com esta proteína (QUINLAN, et al., 2005; BECKFORD, 2010). Sua estrutura flexível e uma variedade de sítios de ligação, permite hsA se ligar reversivelmente a diversas espécies químicas endógenas e exógenas (PETERS, 1985; KRATZ, 1993, PURCELL et al., 2000). A distribuição e o metabolismo de muitos compostos biologicamente ativos no organismo são correlacionados com as suas afinidades com hsA. Assim, a investigação de moléculas que se ligam à albumina é imprescindível e de fundamental importância (ZSILA et al., 2003).

O efeito do aumento de permeabilidade e retenção (EPR) em tecidos tumorais pode contribuir no tratamento contra o câncer (TOMAZ et al., 2012). De acordo com o conceito de EPR, macromoléculas biocompatíveis acumulam em concentrações muito elevadas nos tecidos tumorais em relação aos tecidos normais, sendo explorado anomalias de vascularização do tumor, a diminuição da depuração de macromoléculas e partículas lipídicas a partir do espaço intersticial do tecido tumoral contribue para a retenção de drogas no tumor por longos períodos de tempo (MAEDA et al., 2000; MAEDA, 2001). Tal efeito pode ser observado com a macromolécula albumina, como muitos fármacos possuem um tamanho molecular pequeno, quando ligado à proteína seu tamanho molecular será maior, sendo assim ideal para acumular-se em tecidos tumorais (MAEDA et al., 2000; KRATZ, 2008; TOMAZ et al., 2012).

1.8 Fluorescência das proteínas

Em algumas moléculas a absorção de um fóton é seguida por emissão de luz de um comprimento de onda maior (menor energia). Esta emissão é chamada de fluorescência. Em geral a fluorescência intrínseca de muitas proteínas é causado por três fluoróforos – triptofano, tirosina e fenilalanina (em ordem de maior para menor

intensidades de fluorescência). A fluorescência de cada um deles pode ser distinguida pela excitação e observação em comprimentos de onda apropriados (LAKOWICZ, 1999).

Em sistemas biológicos, a supressão é definida como um processo de redução da intensidade da fluorescência de uma determinada espécie na presença de um agente supressor, normalmente ocorre quando se tem colisão, transferência de energia e formação de complexos. Existem dois processos de supressão: dinâmico e estático. Em ambos, faz-se necessário a existência de contato entre um fluoróforo e um agente supressor, pois um fluoróforo isolado não perde sua fluorescência. A interação entre os complexos de Ru (III) com a albumina pode ser avaliada pela técnica de fluorescência, visto que a albumina é fluorescente e o composto é um agente supressor. Os resíduos de triptofano presentes na hsA e bsA são altamente fluorescentes. Essa fluorescência intrínseca (fluoróforo contido na macromolécula) das proteínas pode ser utilizada para detalhar sítios de interação com a droga.

A supressão dinâmica pode ser descrita pela equação de Stern-Volmer, considerando o tempo de vida do processo:

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

Onde:

F_0 = intensidade de fluorescência na ausência do agente de extinção;

F = intensidade de fluorescência na presença do agente de extinção;

K_{sv} = constante de supressão de Stern-Volmer;

$[Q]$ = a concentração de agente de extinção.

1.9 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) em termos de conceito ela é uma técnica muito semelhante à ressonância magnética nuclear (RMN). Ambas lidam com interações entre a radiação eletromagnética e os momentos magnéticos; no caso do RPE, os momentos magnéticos surgem de

elétrons, em vez de núcleos, sendo utilizada em sistemas paramagnéticos (WEIL et al., 2007).

RPE é uma técnica espectroscópica de interação radiação-matéria, onde a radiação está na faixa de frequência de microondas do espectro eletromagnético e a matéria são substâncias paramagnéticas que possuem elétrons com spin desemparelhados. A energia absorvida pelos elétrons desemparelhados de um átomo, molécula ou íon, pode ser observada com base no efeito *Zeeman*, o que é possível ser verificado pela interação da radiação eletromagnética (radiação de microondas) de substâncias paramagnéticas, quando na presença de um campo magnético externo. Na presença de campo magnético os spins eletrônicos alinham-se com o campo de forma quantizada em dois estados energéticos diferentes, o estado fundamental com uma maior população de spin e o excitado com uma menor.

A função da microonda é bombear os elétrons do estado fundamental para o excitado. No caso, a transição entre os dois estados de spin somente será possível quando a frequência da microonda aplicada for igual à energia de transição entre os níveis, obedecendo à condição de ressonância segundo a lei de *Planck*: $\Delta E = h\nu = g\beta B_0$, onde g é o fator de interação do elétron com o campo magnético e β é uma constante conhecida como magneton de Bohr e B_0 é o campo magnético (**Figura 10**). O espectro é observado segundo as condições físico-químicas do micro ambiente em que se encontra a substância paramagnética, pois são estes quem governam a dinâmica de relaxação dos spins eletrônicos, tem-se relaxação spin-rede e relaxação spin-spin.

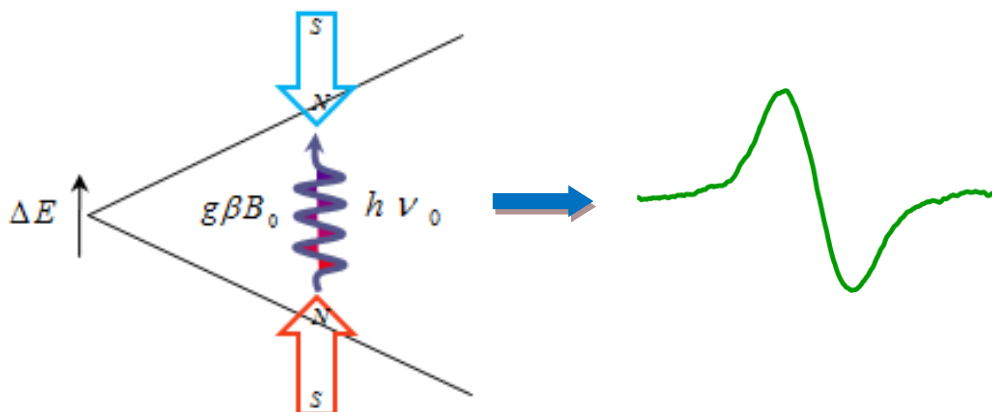


Figura 10 - Níveis de energia de um elétron desemparelhado quando aplicado um campo magnético externo. Um espectro é gerado quando a energia de frequência microondas corresponde exatamente à diferença entre os dois estados de energia do elétron desemparelhado. Fonte: (CETINBAS, 2009), modificado.

Diferentes espécies paramagnéticas podem ser caracterizadas com base nos parâmetros espectroscópicos: a intensidade de absorção de microondas pelos sítios paramagnéticos acessados; o fator g o qual reflete a simetria do sítio e a largura de linha pico-a-pico que está associada a dinâmica sentida pelo sítio paramagnético. Características espectrais de sítios paramagnéticos tais como frequência de ressonância, forma, desdobramento e largura linha são sensíveis a distribuição eletrônica, movimento e orientação molecular, bem como a natureza do meio em que estão inseridas as substâncias paramagnéticas (EARLE et al., 2006).

Em sistemas biológicos, as espécies paramagnéticas podem ser formadas e estabilizadas em soluções congeladas, policristalinas ou vítrea. A maioria dos sistemas são anisotrópicos, e portanto a separação dos níveis de energia e da magnitude das propriedades observáveis dependem fortemente da orientação do campo magnético aplicado (WEIL et al., 2007). O espectro de pó é determinado por valores g anisotrópicos que é dado por contribuições de todas as moléculas em suas orientações específicas com relação ao campo magnético aplicado. Cada centro paramagnético exibe sua própria posição de ressonância dependente de sua orientação local; assim o espectro resultante de pó ou solução congelada é usualmente largo, pois o mesmo é um envelope representando uma distribuição de todos os possíveis campos ressonantes. Além disso, todas as orientações tem a mesma probabilidade e a intensidade total da linha de RPE é dada pela soma das contribuições da orientação de cada molécula individual (BENATTI et al., 2009).

As diferenças são quantificadas em termos de "valor g ", onde g é o o fator de interação do elétron com o campo magnético, que é calculado pela equação abaixo:

$$g_i = \frac{h\nu}{\beta_e B_i} = 714,484 \frac{\nu}{B_i} \quad (2)$$

onde h = constante de Planck, ν = freqüência de microonda em GigaHertz (GHz), β_e = magneton de Bohr, B_i = campo magnético externo medido em Gauss (G) e $i=x, y$ e z .

Os valores g de uma molécula paramagnética são medidos ao longo dos eixos x, y e z orientados na molécula, pois o acoplamento spin orbital é dependente de sua direção, definindo um sistema com os *valores g* correspondentes de cada eixo (g_x, g_y e g_z). Em amostras em pó ou congeladas, moléculas individuais são fixadas em um ponto, e o espectro de RPE resultante é a média ponderada de todas as possíveis orientações. O correspondente espectro de RPE (**Figura 11**) é classificado de acordo com a simetria de cada molécula paramagnética, podendo ser anisotrópico ($g_x = g_y = g_z$), uniaxial ($g_x = g_y \neq g_z$) e rômbrica ($g_x \neq g_y \neq g_z$).

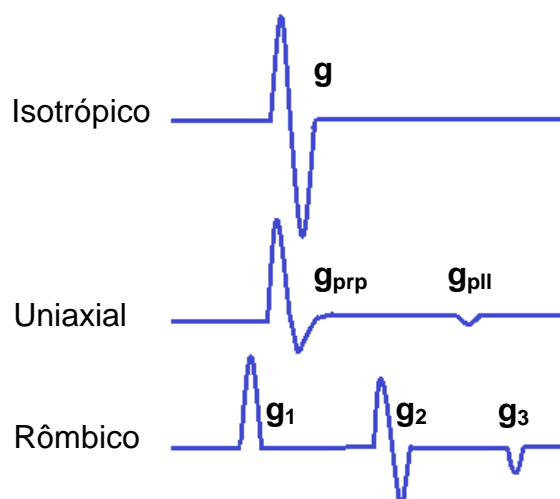


Figura 11 - Espectros de RPE típicos para sistemas paramagnéticos com simetria isotrópica ($g_x = g_y = g_z = g$), simetria uniaxial ($g_x = g_y \neq g_z$), onde g_{prp} (g perpendicular) corresponde a $g_x=g_y$ e g_{pll} (g paralelo) corresponde a g_z . Simetria rômbrica ($g_x \neq g_y \neq g_z$), o qual são geralmente representados por g_1, g_2 e g_3 . Fonte: (CETINBAS, 2009), modificado.

A espectroscopia de RPE é uma das técnicas mais apropriada para se estudar o comportamento eletrônico e mudança estrutural de complexos de Ru(III) em condições biologicamente relevantes. Pode-se observar mudanças no estado de oxidação do metal, em que somente sistemas contendo Ru(III) apresenta propriedades paramagnéticas, pois neste estado de oxidação tem-se um elétron desemparelhado, em outros estados como Ru(II), o spin eletrônico apresenta emparelhado. Além disso, é possível detectar mudanças no campo ligante, pois os valores g são medidos ao longo dos eixos principais do complexo (x , y e z), mudanças no campo ligante do centro paramagnético Ru(III) pode causar alterações nos valores de g , o qual é a principal distinção de mudança no espectro de RPE.

2. JUSTIFICATIVA

A partir de resultados promissores obtidos em trabalhos anteriores com o complexos CTRu(III) como agente antitumoral, o mecanismo pelo qual ele exerce sua especificidade para células tumorais ainda não foi elucidada. A avaliação cuidadosa da interação do complexo de Ru(III) com as proteínas presentes no soro e as espécies formadas após a sua administração intravenosa é muito importante para entender o modo de ação do possível fármaco.

Neste trabalho pretende-se estudar pela primeira vez, a interação do complexo de Ru (III) (CTRu(III)), com a bsA e com as principais proteínas do soro humano hsTf (apo-hsTf) e hsA. Este conhecimento irá ajudar a caracterizar o complexo de Ru (III) com respeito à sua atividade antitumoral e os processos a que é submetido antes de entrar nas células tumorais, como sua propriedade cinética (reações de substituição em função das trocas de ligantes) que, em última análise orientam desenvolvimento de possíveis fármacos anticâncer à base de metais, com eficácia clínica melhorada.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar os possíveis complexos de rutênio(III) formados, produtos das reações de trocas de ligantes em solução tampão fosfato em pH 7,4 e ligados às proteínas albumina e transferrina; avaliar o comportamento do complexo de Ru (III) em solução tampão e na presença das proteínas séricas humana transferrina e albumina, e proteína sérica bovina, utilizando técnicas espectroscópicas de absorção no UV-visível, ressonância paramagnética eletrônica e fluorescência.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o comportamento do complexo cloreto *cis*-tetraminodicloro rutênio(III) em tampão fosfato com pH 7,4 utilizando espectroscopia de absorção no UV-visível (na região de 240-800nm) no período de 24 horas;
- Estudar a possível interação do complexo CTRu(III) e sua cinética de complexação com a proteína sérica humana albumina e apo-transferrina, e a albumina sérica bovina, durante 24 horas de reação utilizando espectroscopia de absorção UV-visível;
- Avaliar o comportamento e as estruturas químicas obtidas do complexo CTRu(III) em tampão fosfato com pH 7,4 utilizando ressonância paramagnética eletrônica (RPE) no período de 24 horas;
- Estudar as interações e os produtos estruturais obtidos da reação do complexo CTRu(III) com as proteínas sérica humana albumina e transferrina, e albumina bovina, no período de 24 horas utilizando ressonância paramagnética eletrônica (RPE);

- Determinar a simetria e estado de oxidação das espécies formadas a partir da troca de ligantes do complexo com a água do tampão ou com os ligantes das proteínas;
- Determinar a constante de supressão de fluorescência das proteínas hsA e bsA na presença de concentrações crescentes do complexo CTRu(III), por espectroscopia de Fluorescência.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

Todos os reagentes e as proteínas liofilizadas, Albumina (hsA), (bsA) e apo-transferrina (apo-hsTf) foram adquiridas comercialmente (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). A solução salina tamponada com fosfato foi adquirida da Embriocare (Embriocare, Cutilab, Brasil), foi utilizada para dissolver o composto e as proteínas. Filtros Amicon para centrífuga da Millipore (limite de massa molecular de 30 kDa), foram usados na preparação de amostras para experimentos de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE). A preparação das amostras para RPE do complexo com as proteínas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por CETINBAS et al., 2010.

4.2 Síntese do composto

O composto Cloreto de *cis*-tetraminodichlororutênio(III) (CTRu(III)) foi sintetizado no Laboratório de Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso e encaminhado ao Laboratório de Genética Molecular e Citogenética para realização deste trabalho.

4.3 Preparação de hsA e bsA

As proteínas comerciais liofilizadas, hsA e bsA da Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo), foram dissolvidas em solução salina de tampão fosfato e utilizadas sem tratamento prévio de purificação ou remoção de metal.

4.4 Preparação da apo-hsTf

A apo-hsTf comercial não está totalmente livre de ferro, necessitando primeiramente remover o ferro para estudos de interação com os complexos de Ru(III). Desta forma, o ferro foi removido usando um protocolo similar ao descrito por Mason et al., 2003. A proteína liofilizada foi dissolvida em tampão de remoção de ferro (500mM acetato de sódio contendo 1mM EDTA e 1mM NTA, pH 4,5), concentrado para um volume mínimo usando filtro amicon na centrífuga. A proteína concentrada foi ressuspensa em tampão de remoção de ferro e este processo foi repetido até que a descoloração da proteína concentrada fosse obtida. Uma sequencial diluição e concentração em 100 mM KCl, 100mM NaClO₄ e finalmente em 100mM KCl foi realizado para garantir a remoção de alguns resíduos de agentes quelantes (EDTA e NTA) na proteína. Após concentração final, o concentrado de proteína foi trocada para tampão fosfato [20mM NaHCO₃, 150mM NaCl, 50mM 4-(2-hidroxietil) -1- ácido piperazinaetanosulfônico) (HEPES), pH 7,4], diluído e concentrado por duas vezes em tampão fosfato.

4.5 Instrumentação

4.5.1 Espectroscopia de absorção na região do UV-visível

Os espectros de absorção no ultravioleta-visível (UV-visível) foram obtidos utilizando um espectrofotômetro UV-visível Cary 50 (Varian) do laboratório de genética molecular e Citogenética (LGMC), localizado no Instituto de Ciências Biológicas-UFG. As medidas foram realizadas utilizando cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm e volume de 0,7 mL, na região espectral compreendida entre 240 e 800nm.

4.5.2 Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de fluorescência foram obtidos através de um espectrofotômetro de emissão Shimadzu RF 5301PC do Instituto de Química-UFMG. O composto e as proteínas hsA ou bsA foram dissolvidas em tampão fosfato nas concentrações de 8

μM e $2 \mu\text{M}$ respectivamente. A leitura foi realizada na faixa de 220 a 700 nm, com uma excitação em 285 nm.

4.5.3 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Os espectros de RPE foram coletados usando espectrômetro de Bruker ESP-300 do Instituto de Física-UFG, operando em banda-X (aproximadamente 9,41 GHz). As medidas foram conduzidas à temperatura de aproximadamente 250 K, usando um Bruker ER4112HV sistema de controle da temperatura com nitrogênio e um criostato de fluxo contínuo. As amostras foram colocadas em tubos de quartzo com diâmetro de 4 mm com volume de amostra de 600 μL . Todos os espectros foram medidos nos seguintes parâmetros: potência de microondas de 5 mW, 16 varreduras, modulação de frequência de 100 KHz, modulação de amplitude 5 G, intervalo de varredura do campo magnético 6000 G, tempo de varredura de 168 s e detector da constante de tempo de 41 ms.

A intensidade do sinal apresentada nos inserte das figuras foi medida a partir de cálculos da área sob a curva da linha do valor g em análise.

4.6 Métodos

4.6.1 Preparação das amostras para estudo de Espectroscopia UV-visível

4.6.1.1 CTRu(III) em tampão fosfato

Ao analisar o comportamento espectral do composto em tampão fosfato, foi preparado uma solução estoque do composto a $200\mu\text{M}$ em tampão fosfato (pH 7,4) e imediatamente levado para a leitura do primeiro intervalo espectral de 240-800 nm. As medidas foram realizadas em diferentes períodos de tempo (10min, 30min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 12h e 24h) à temperatura ambiente. Experimentos semelhantes foram realizados a temperatura de 37°C nos intervalos de tempo de: 30min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h e 12h.

4.6.1.2 CTRu(III) com hsA, bsA e apo-Tf

A interação do complexo CTRu (III) com as proteínas do soro, apotransferrina (apo-Tf), albumina sérica humana (hsA) e bovina (bsA), foi analisada por espectroscopia de absorção eletrônica UV-visível. A varredura do espectro foi realizada na faixa espectral de 240-800 nm à temperatura ambiente. A solução estoque do complexo à 200 μM foi preparada em tampão fosfato e, imediatamente antes da primeira varredura foi misturado com 20 μM de hsA, apo-Tf ou bsA. Alíquotas de 0,6 mL foram transferidas para uma cubeta de quartzo e os dados coletados em diferentes tempos (0, 30min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 12h e 24h) ao longo de um período de 24 horas. A concentração usada para as proteínas foi determinada espectroscopicamente usando a absorvidade molar (280 nm) de 40402 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ hsA e 43776 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ de bsA.

4.6.2 Preparação de amostras para estudo de Fluorescência das proteínas hsA e bsA

Uma análise quantitativa do potencial de interação entre o complexo CTRu(III) e hsA ou bsA foi realizada por titulação fluorométrica. Inicialmente foi preparada solução estoque de CTRu(III) na concentração de $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato. Posteriormente, a solução foi diluída para a concentração de $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. As soluções de bsA e hsA na concentração de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas em tampão fosfato.

Uma solução de 2 mL de bsA ou hsA ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato (pH 7,4) foi titulada com alíquotas de 0,1 mL da solução do composto ($8 \mu\text{mol L}^{-1}$). Os espectros de emissão de fluorescência foram registrados à temperatura de 25 °C, na faixa espectral de 220-700 nm com excitação no comprimento de onda de 285 nm. Todas as medições foram feitas com uma fenda de entrada de 10 nm e uma fenda de saída de 10 nm até 5 nm para a hsA, com a bsA foi realizada com fenda de entrada e saída de 5 nm. Após a adição do composto em estudo, a constante de supressão (K_{sv}) de fluorescência do triptofano foi determinada utilizando a equação de Stern-Volmer (**Equação 1**).

O gráfico (F_0/F vs [composto]) são apresentados no insertes das figuras, por uma reta, com o coeficiente angular da reta e a constante de supressão (K_{sv}).

4.6.3 Preparação de amostras para estudo de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

4.6.3.1 CTRu(III) em tampão fosfato

O composto CTRu(III) foi dissolvido em tampão fosfato (pH 7,4) para a concentração de 6mM. A solução estoque do complexo foi incubada a 37°C e alíquotas de 540 µL foram retiradas em diferentes períodos de tempo, em seguida adicionados às amostras 10% por volume de glicerol. Todas as amostras foram colocadas em tubos de quartzo e imediatamente resfriadas em nitrogênio líquido em seguida, colocadas na cavidade do RPE.

4.6.3.2. CTRu(III) em hsA e bsA

Na preparação da solução estoque, uma solução de 2 mM da proteína dissolvida em tampão fosfato foi combinada com a solução de 6 mM do complexo. A solução resultante foi incubada a 37 °C e alíquotas foram retiradas em diferentes tempos durante 24 horas. Alíquotas de 1,2 mL foram retiradas em diferentes períodos e seu volume completado para 4 mL com tampão fosfato. Cada 4 mL da solução foi concentrada para um volume mínimo de 200 µL usando um filtro Amicon para centrifuga da Millipore (massa molecular limite de 30 KDa), centrifugando à 8°C e 4500rpm por aproximadamente 30 minutos ou até que o volume mínimo de 200µL fosse alcançado. O produto resultante do filtrado foi então diluído para 540 µL com tampão fosfato e em seguida adicionado 60 µL de glicerol. Por fim, foi transferido para o tubo de quartzo, imediatamente resfriado em nitrogênio líquido e medidos no RPE.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises espectroscópica da interação do complexo CTRu(III) com as proteínas hsA, bsA e apo-Tf

5.1.1 Espectroscopia de absorção no UV-visível do complexo CTRu(III) em tampão fosfato

Os espectros eletrônicos de absorção do complexo CTRu(III) foram coletados em diferentes períodos de tempo (0, 30min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 12h e 24h) após a dissolução de CTRu(III) no tampão fosfato (pH 7,4) à temperatura ambiente (25 °C). Os espectros de CTRu(III) em tampão fosfato (**Figura 12**), são caracterizados pela presença de duas bandas intensas em torno de 351nm e 311nm, referentes à transferência de carga de Ligante-metal (TCLM). Essas bandas começaram a sofrer alterações nos primeiros minutos de reação, com decréscimo da banda em 351nm, que pode ser atribuído ao processo de dissociação do ligante cloreto do complexo (Cl-Ru), após duas horas de reação a banda em 311 nm sofre deslocamento para região de maior energia e aumenta a intensidade de absorção. Uma nova banda na região visível em 442 nm começou a se desenvolver após seis horas de reação, acompanhado pela mudança de coloração da solução, sendo atribuída a banda de transição d-d. Tais mudanças espectrais podem ser atribuídas ao processo de hidrólise, isto é, labilização de um ou mais ligantes cloreto por moléculas de água na esfera de coordenação do metal, conduzindo à formação de aqua oxo e/ou hidroxocomplexos de rutênio ligados em ponte (TFOUNI, 2000; BRINDELL et al., 2008; WEBB & WALSBY, 2011).

O espectro resultante da reação de 24 h é caracterizado por uma banda larga e intensa em 295 nm com uma absorvidade molar (ϵ) de $1117 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, um ombro em 351nm ($\epsilon = 357 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) e uma banda de transição proibida em 442nm ($\epsilon = 141 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).

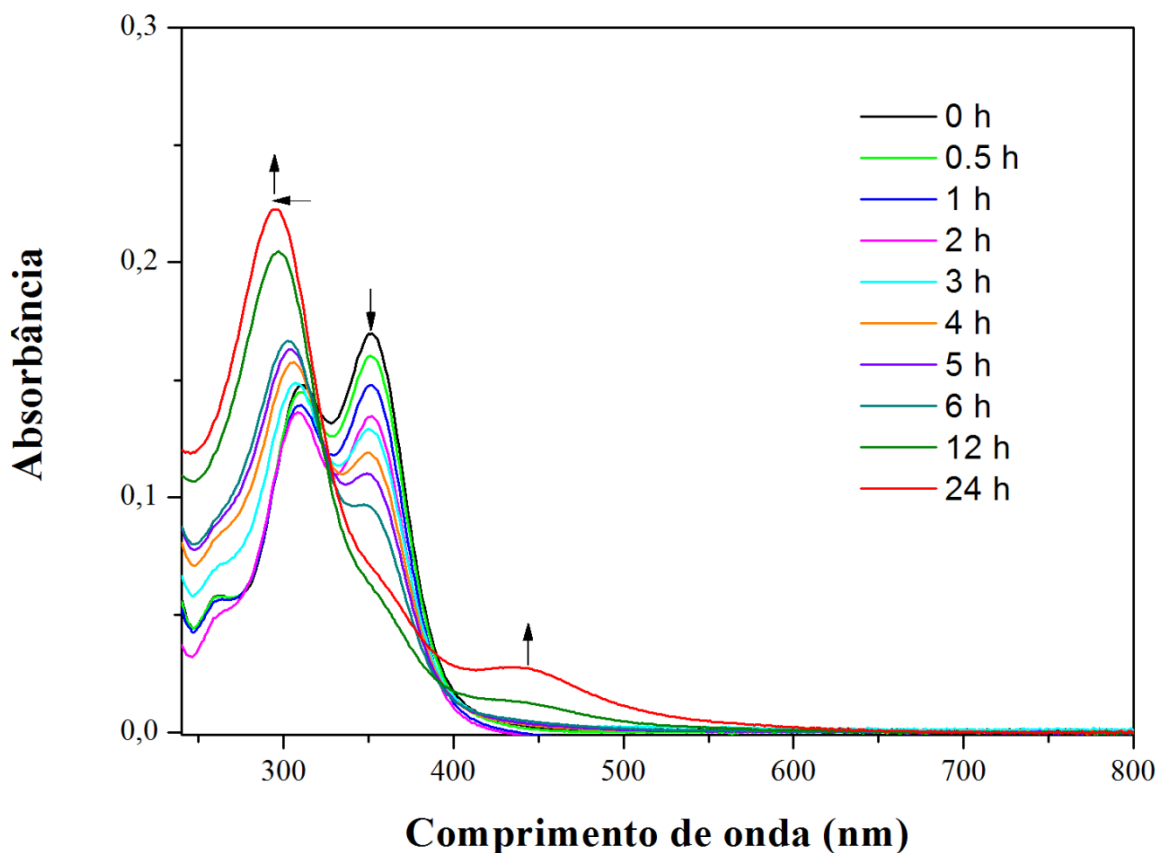


Figura 12 - Espectro de absorção no UV-visível de CTRu(III) (200 μM) em tampão fosfato à temperatura de 25 °C. Os espectros foram coletados em diferentes tempos: 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 horas à temperatura de 25°C. As setas indicam a direção das variações do espectro.

O complexo CTRu(III) tem em sua estrutura dois tipos de ligantes, amina e cloro, que são ligantes σ e π doadores, os ligantes cloretos são os grupos de saída do complexo octaédrico, pois o NH_3 é um doador σ mais forte do que o Cl , ele aumenta a densidade eletrônica no metal e conseqüentemente facilita a cisão da ligação Ru-Cl e entrada de um ligante mais lábil que é a água (SHRIVER & ATKINS, 2003). Esse processo pode ser identificado no espectro de CTRu(III) no tampão (**Figura 12**) pela redução da banda em 351nm, correspondente a transferência de carga dos ligantes cloretos para o centro metálico Ru (SEDDON & SEDDON, 1984). Além disso, o Ru(III) d^5 de configuração (t_{2g}^5), é um ácido duro, bastante inerte em relação à troca de ligantes, esse fato torna o metal um receptor de elétrons π , e o rutênio (III) tende a ser estabilizado por ligantes que atuem como bases duras, ou seja, com ligantes muito eletronegativos. Neste caso, observamos que por ser (t_{2g}^5) spin baixo o rutênio tende a formar complexos estáveis com ligante $\text{NH}_3 > \text{H}_2\text{O} > \text{OH}^- > \text{Cl}^-$, ficando evidente que o ligante a sair da esfera de coordenação seja o cloro.

O surgimento de uma banda fraca na região visível em 442nm pode ser atribuído a transição d-d, referente ao orbital d do centro metálico que sofre influência do campo ligante caracterizando a reação de hidrólise. O esquema de hidrólise do complexo *cis*-[Ru(NH₃)₄Cl₂]Cl (CTRu(III)) é ilustrado na **Figura 13**.

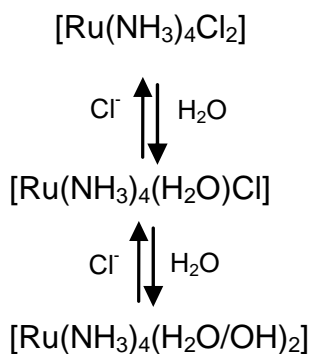


Figura 13 - Ilustração esquemática da reação de substituição envolvendo o complexo CTRu(III) em tampão fosfato (pH 7.4).

A fase de hidrólise mostrou ser um passo importante na ativação da cisplatina pois os aqua-complexos são geralmente mais lábeis do que os complexos correspondentes com cloro (BECKFORD, 2010). Outros trabalhos também relataram processo de hidrólise com NAMI-A e complexos de platina (II), demonstrando que os aqua-complexos são mais lábil do que o complexo ligado ao cloro, evidenciando que a etapa de hidrólise é importante na ativação do composto, para se ligar ao DNA e/ou outras biomoléculas no interior da célula (KUNG et al., 2001; MESSORI et al., 2000; BRINDELL et al., 2007; BUGARCIC et al., 2007; CHEN et al., 2007).

Ao analisar o efeito da temperatura no processo de hidrólise, a solução de complexo em tampão fosfato foi incubada à 37°C (**Figura 14**), observa-se uma cinética de reação mais rápida quando comparado a temperatura de 25 °C, em duas horas de incubação a banda em 351 nm desaparece, acompanhado pelo surgimento de uma banda em aproximadamente 442 nm após duas horas de reação. Após 6h de incubação à 37°C a estabilidade química do complexo é perdida.

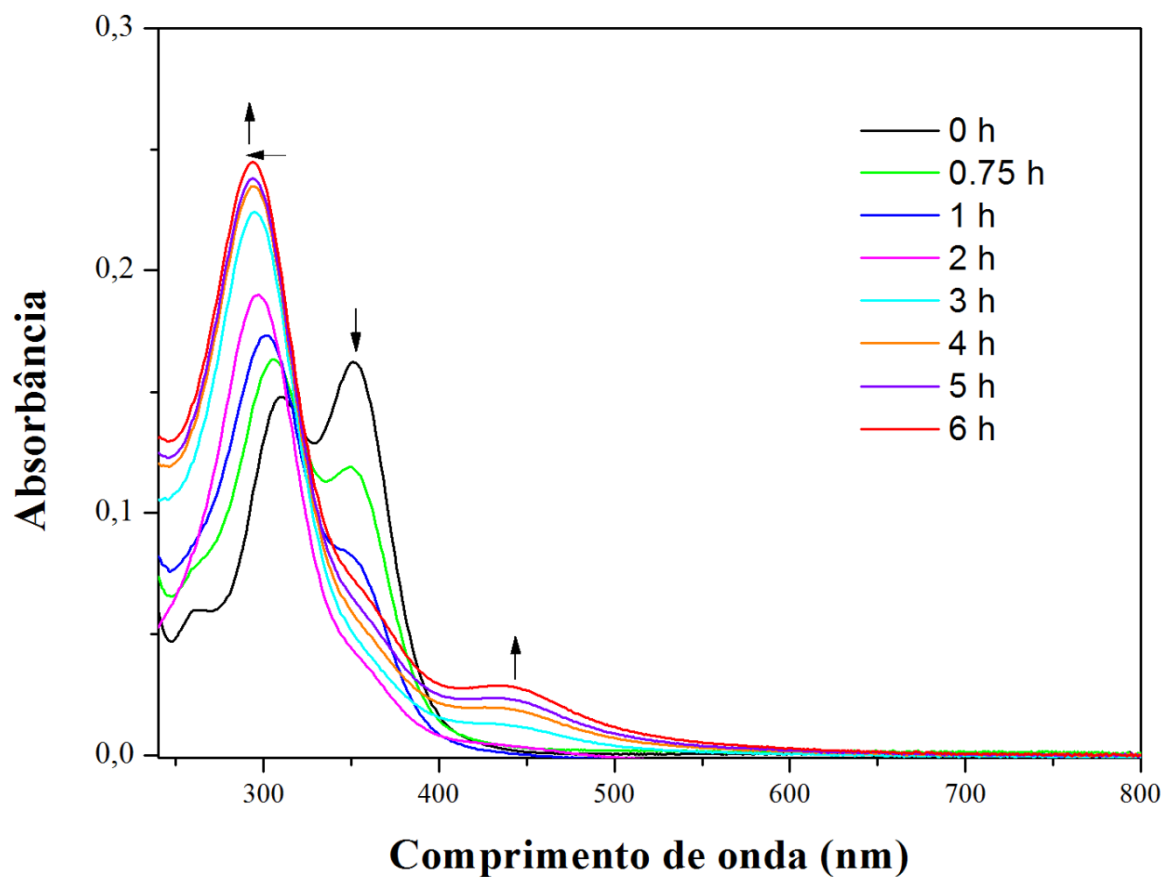


Figura 14 - Espectro de absorção no UV-visível de CTRu(III) ($200 \mu\text{M}$) em tampão fosfato . Os espectros foram coletados em diferentes tempos: 0, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6 horas à temperatura de 37°C . As setas indicam a direção das variações do espectro.

As mudanças espectrais observadas em determinados comprimentos de onda (351 nm e 442 nm) nas temperaturas de 25°C e 37°C , com a absorbância em função do tempo, foram plotados no gráfico da **Figura 15**.

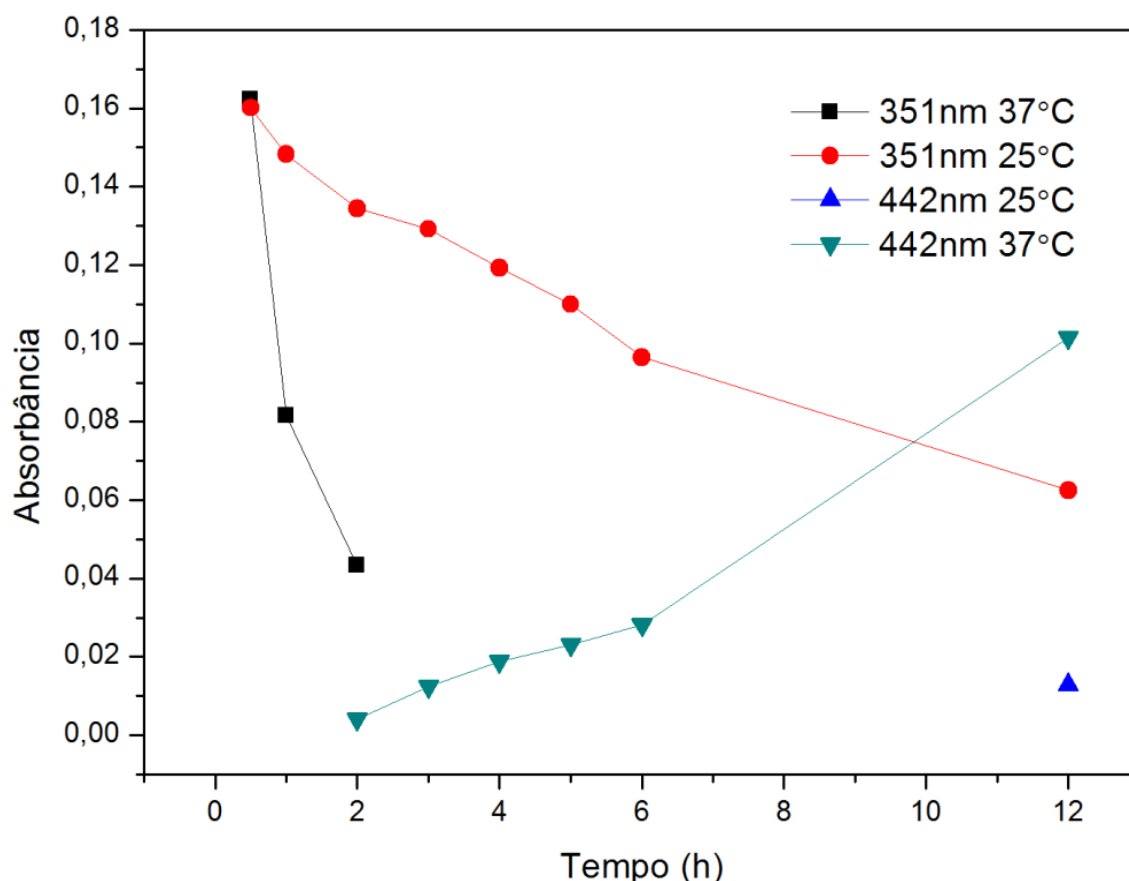


Figura 15 - Distribuição da absorbância em função do tempo de reação sob efeito da temperatura do complexo CTRu(III). Em 351 nm tem-se a banda de transição do íon cloreto e em 442 nm a banda correspondente à transição d-d, o qual foram analisadas nos tempos de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 12 horas nas temperaturas de 25°C e 37°C.

Na temperatura de 37°C foi possível observar uma cinética de reação de substituição mais rápida, nas primeiras 2 horas de reação a banda em 351nm teve seu decréscimo total, com o surgimento da banda de transição d-d após 2 horas de reação, enquanto que, à temperatura de 25°C somente surgiu em aproximadamente 12 horas de reação. Esta cinética rápida pode ser atribuída à instabilidade do complexo de conformação espacial Cis, que se torna mais lábil com o aumento da temperatura.

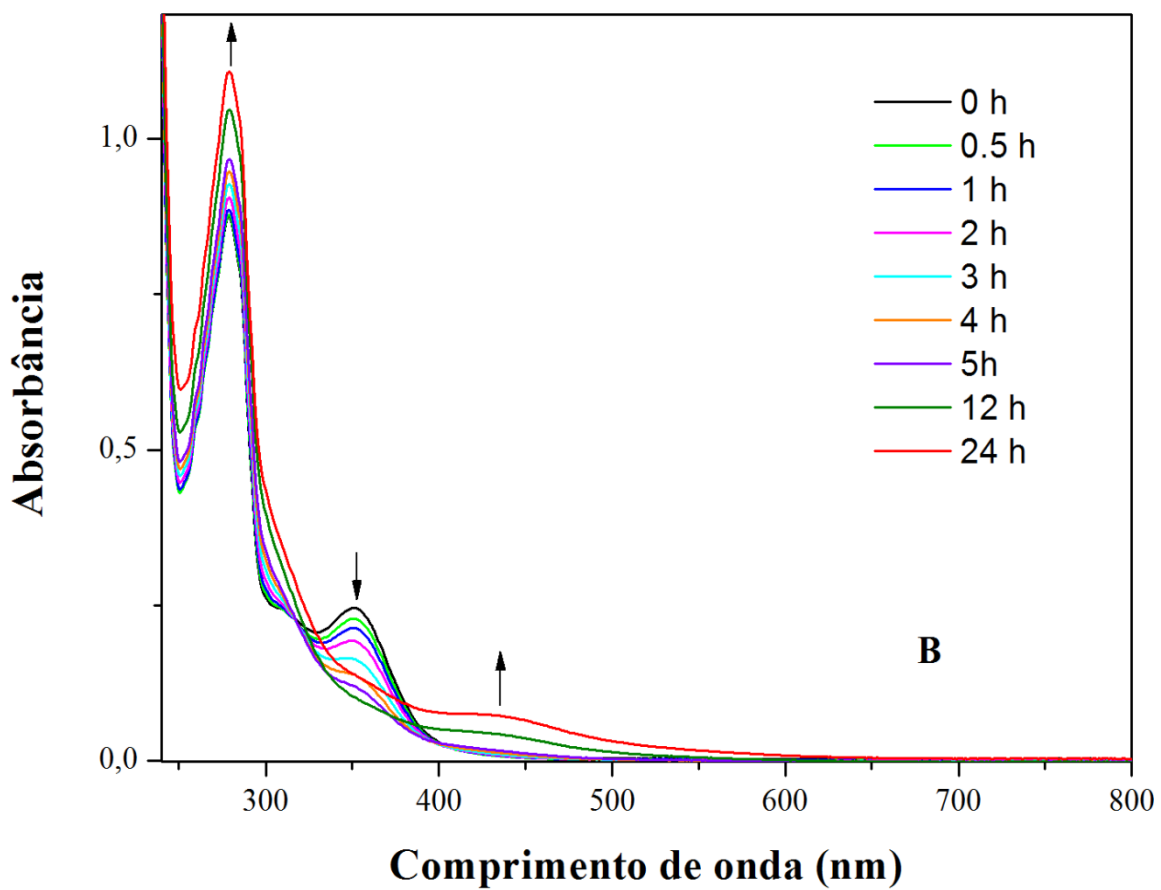
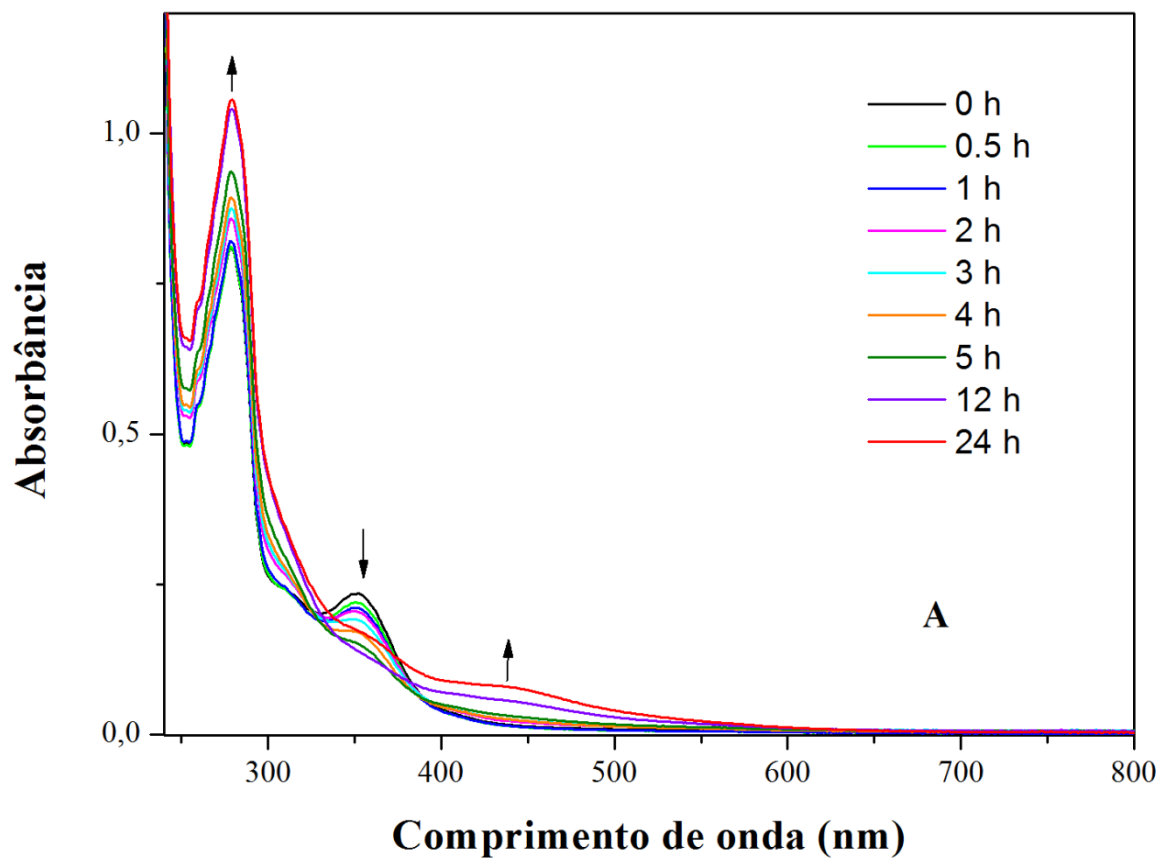
Vale ressaltar que em condições fisiológicas (37°C e pH 7,4) o comportamento cinético de hidrólise do composto, pode ser comparado com as possíveis aplicações *in vivo*. Se tratando de uma cinética relativamente rápida à temperatura de 37°C, o composto torna-se interessante para utilização contra células tumorais, que possuem um metabolismo rápido, exigindo a produção de um fármaco que possa ter uma ação rápida para impedir o crescimento tumoral. Como a cinética de reação do composto CTRu(III) à temperatura ambiente é lenta, a

preparação da solução do composto poderá ser realizada a temperatura de 25°C antes de ser administrada na corrente sanguínea.

5.1.2 Estudos de interação do complexo CTRu(III) na presença das proteínas hsA, bsA e apo-transferrina por espectroscopia de absorção no UV-vís

A fim de verificar a interação entre o complexo CTRu(III) com as proteínas hsA, bsA e apo-transferrina, medidas de espectroscopia de absorção UV-vis foram realizadas na presença de cada proteína. As medidas espectroscópicas foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C) com um pH de 7,4 em função do processo de hidrólise ser relativamente lento a essa temperatura, permitindo a preparação do composto e seu estudo espectroscópico.

Os espectros do complexo CTRu(III) na presença das proteínas hsA, bsA e apo-hsTf são apresentados nas **Figuras 16A, 16B e 16C** respectivamente. Nas primeiras três horas de reação os espectros apresentam um comportamento espectral semelhante ao discutido anteriormente com o complexo no tampão (**Figura 12**), em que o processo envolvendo a troca dos ligantes cloretos pela água não muda significativamente pela presença das proteínas. No entanto, tem-se o deslocamento da banda em 311nm (provavelmente dos ligantes amínicos) para a região característica das proteínas, em torno de 284nm (apo-hsTf) e 280nm (hsA e bsA), seguido pelo aumento da sua intensidade. Os espectros de CTRu(III) com a apo-hsTf (**Figuras 16C**) tem um comportamento espectral diferente das outras proteínas após 24 horas de reação, apresenta um alargamento de banda em 284nm e o surgimento da banda d-d na região visível em 437nm.



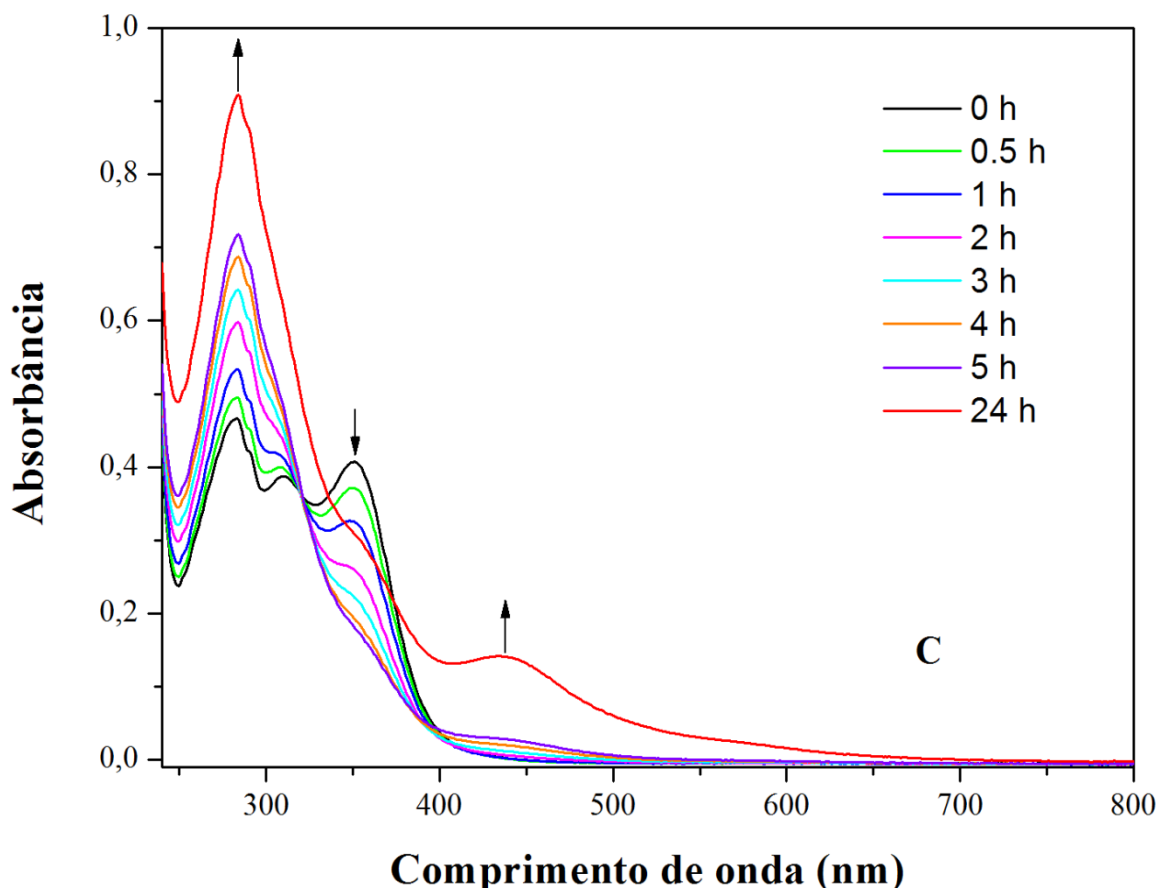


Figura 16 - Espectros UV-vis em dependência do tempo de 200 μM CTRu(III) em 20 μM hsA (A), 20 μM bsA (B) e 20 μM apo-hsTf (C), coletados em diferentes tempos: 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 12 e 24 horas para hsA e bsA, e 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 e 24 horas para apo-hsTf à temperatura de 25°C e pH 7.4. Estes espectros apresentam um deslocamento da banda 311nm para à esquerda, seguido por aumento da sua intensidade. As setas indicam a direção das variações do espectro.

No espectro do complexo CTRu(III) na presença das proteínas hsA e bsA observa-se um comportamento espectral semelhante para ambas (**Figuras 16A e 16B**), tal fato pode ser explicado pela semelhança de suas estruturas, com uma homologia em sua sequência de 76% (HUANG et al., 2004). A mudança nos comprimentos de onda nos espectros de absorção indicam a interação entre o componente proteico e o metal. O aumento de intensidade da banda em torno de 280nm, região correspondente a absorção eletrônica característica do resíduo triptofano da proteína estudada (LEHNINGER, 2011), caracteriza uma mudança na estrutura da proteína, possivelmente devido à uma ligação dos resíduos da proteína ao centro metálico rutênio após reação de hidrólise.

O espectro de CTRu(III) na presença de apo-transferrina (**Figura 16C**) apresenta um perfil de espectro final diferente do complexo em tampão e das proteínas hsA e bsA, com um alargamento da banda em 284 nm região característica

do resíduo tirosina presente na proteína (LEHNINGER, 2011), possivelmente em função da forma de interação diferente entre o complexo e a proteína.

5.1.3 Estudo de interação com as proteínas hsA e bsA por Espectroscopia de Fluorescência

Após analisar o comportamento estrutural e químico do complexo em tampão e na presença das proteínas por espectroscopia de absorção no UV-vís, a constante de supressão das proteínas fluorescentes hsA e bsA foram determinadas utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência, com o objetivo de confirmar a existência de interações, compreender a natureza e a intensidade dessa interação do complexo com as proteínas, medindo sua constante de supressão com o aumento da concentração do complexo dissolvido em solução tampão fosfato (pH 7.4) à 25 °C.

Espectroscopia de fluorescência é um método poderoso para o estudo de interações moleculares envolvendo proteínas. Ao medir a extinção de fluorescência intrínseca de hsA e bsA, a acessibilidade dos grupos fluoróforos das proteínas pode ser estimada. A análise qualitativa da ligação do composto à hsA ou bsA pode ser detectada por análise de espectros de fluorescência.

A conformação de bsA deveria ser similar à hsA, devido a 76% de homologia na sequência de aminoácidos (HUANG et al., 2004). No entanto, do ponto de vista espectroscópico uma das principais diferenças entre as duas proteínas é que a bsA tem dois resíduos de triptofano (Trp-135 e Trp-214) e a hsA apenas um (Trp-214). O Trp-214 localizado dentro de um bolso hidrofóbico (subdomínio II A) e o Trp-135 localiza-se na superfície da proteína (subdomínio I A) (GELAMO et al., 2002).

As mudanças na intensidade de fluorescência dos espectros de emissão da bsA e hsA durante a titulação de CTRu (III) são observadas nas **Figuras 17A e 17B**, respectivamente. O espectro inicial (em preto) é referente a emissão de fluorescência das proteínas livres, na ausência do agente supressor. A solução de bsA, possui uma intensidade máxima de fluorescência em 343 nm, já a hsA sua intensidade máxima de fluorescência é em 334 nm, quando comprimento de onda de excitação é de 285nm.

A partir de uma concentração fixa de proteína, foi titulado com diferentes quantidades de complexo (tal como descrito em Materiais e Métodos), sendo

observado uma notável diminuição da fluorescência dos resíduos triptofano da hsA (**Figura 17A**) e bsA (**Figura 17B**). Os dados de supressão da fluorescência foram analisados pela equação (1).

Os valores de K_{sv} encontrados para o composto CTRu(III) com hsA e bsA foram de $1,32 \times 10^5$ e $3,71 \times 10^5$ respectivamente, indicando forte interação do composto com as proteínas. O máximo de emissão do triptofano é altamente sensível ao ambiente em que se encontra, o deslocamento para o azul indica que na presença de um complexo, o resíduo Trp foi colocado num ambiente hidrofóbico e menos exposto ao solvente (ZHANG et al., 2008).

Os espectros de fluorescência mostram uma diminuição progressiva na intensidade de fluorescência com um ligeiro desvio de emissão para um comprimento de onda mais curto (deslocamento para o azul) de 334nm para 328 nm (hsA) e 342nm para 334nm (bsA). Isto indica que a ligação de CTRu(III) à hsA ou bsA causa a supressão da fluorescência intrínseca do triptofano. Isso também implica que, as mudanças conformacionais nas proteínas são induzidas pelo complexo de acordo com as condições experimentais.

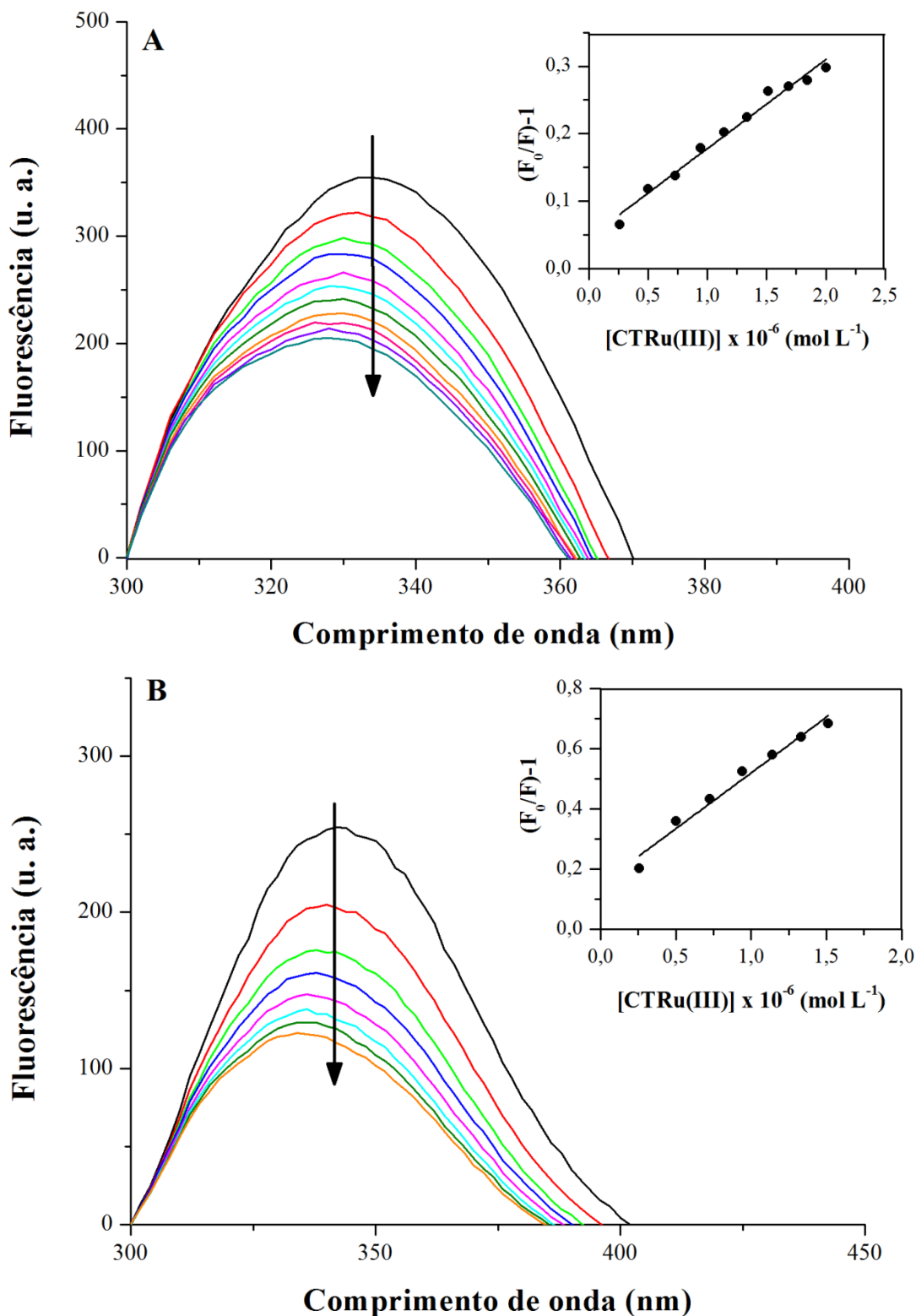


Figura 17 - Espectros de fluorescência de (A) hSA (2 μ M) e (B) bsA (2 μ M) tratado com diferentes concentrações de CTRu(III). No painel (A) têm-se as curvas correspondentes às concentrações de 0,26—2,00 μ M do complexo, à temperatura de 25 °C. O painel (B) corresponde as curvas nas concentrações de 0,26—1,51 μ M, à temperatura de 25 °C. A seta evidencia o efeito de supressão com a adição do complexo. Inserte em (A) e (B) o gráfico $(F_0 / F \text{ vs } [\text{composto}])$, representado por uma linha reta, com a inclinação e a constante de supressão (K_{SV}) com valores de $1,32 \times 10^5$ (hSA) e $3,71 \times 10^5$ (bsA).

Considerando que o tempo de vida (τ_0) do triptofano na albumina é igual a 10^{-8} s (LAKOWICZ, 1999). Os valores da constante de supressão biomolecular (k_q) foram determinados utilizando a equação,

$$k_q = \frac{K_{sv}}{\tau_0} \quad (3)$$

O valor de k_q depende da probabilidade de colisão entre a proteína e o composto, reflete a eficácia de supressão ou a acessibilidade do triptofano para o supressor que é o CTRu(III). O valor máximo de k_q para uma difusão controlada é de $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (LAKOWICZ, 1999). O valor de k_q encontrado para hsA e bsA com o composto CTRu(III) foi da ordem de $\sim 10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, sendo este maior do que o valor limite, isto indica que o processo não ocorre inteiramente por difusão, devendo haver algum tipo de interação mais específica entre o composto e a albumina (KANDAGAL et al., 2006).

Os valores obtidos para K_{sv} indicam forte interação de CTRu (III) com hsA e bsA, com valores da constante de supressão na ordem de grandeza de 10^5 ($1,32 \times 10^5$ com hsA e $3,71 \times 10^5$ com a bsA), tais valores são comparáveis ou até mesmo superiores aos valores encontrados na literatura com outros compostos inorgânicos tais como, os complexos de cobre e níquel, com valores na ordem de 10^4 (WU et al., 2008). Os compostos de platina (II) possuem uma afinidade moderada com hsA com valores que variam de 10^3 a 10^4 (ALEKSENKO et al., 2007; YUE et al., 2009). O complexo de rutênio [(Cymene) Ru (ATCS) Cl]PF₆ possui uma constante de ligação com hsA igual a $1,21 \times 10^5$ (BECKFORD, 2010).

Esses resultados evidenciam a ocorrência de interação entre o CTRu(III) com a hsA e bsA. No entanto não é possível definir o tipo de interação, se é dinâmico (colisional) ou estático (formação de complexo fluoróforo-supressor), pois seria necessário fazer outros estudos de fluorescência com variação de temperatura. Tanto para a supressão de fluorescência dinâmica quanto estática se requer um contato entre o fluoróforo e o agente supressor.

A fluorescência da transferrina não foi possível ser identificada, apesar de apresentar o grupo fluoróforo tirosina a sua fluorescência é muito baixa não podendo ser medida no espectrofotômetro de fluorescência utilizado.

5.1.4 Abordagem geral para caracterizar os processos de troca de ligante do complexo CTRu(III) em tampão e na presença das proteínas hSA e bsA por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Embora tenha sido possível avaliar a ocorrência de hidrólise por espectroscopia de absorção UV-vis e o modo de interação com base na Fluorescência, outras técnicas são necessárias para nos dar maiores informações do composto, como o estado de oxidação, geometria e o mecanismo de interação do complexo com as proteínas. Tais estudos, podem ser realizados utilizando espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).

A técnica de RPE se baseia na detecção de transições induzidas pela radiação eletromagnética na faixa de microondas entre os níveis de energia do spin eletrônico das espécies paramagnética na presença de um campo magnético estático. Por causa de sua seletividade, os estudos de RPE tem a vantagem de revelar informações detalhada do meio e processos dinâmicos nos quais estão envolvidos as espécies paramagnéticas em estudo.

As características espectrais tais como, frequência de ressonância, forma, desdobramento e largura linha, são sensíveis a distribuição eletrônica, movimento e orientação molecular, bem como a natureza do meio em que as substâncias paramagnéticas estão inseridas (EARLE et al., 2006). Cada centro paramagnético exibe sua própria posição de ressonância a qual depende de sua orientação local; assim o espectro de pó ou solução congelada é geralmente largo, pois o mesmo é um envelope representando uma distribuição de todos os possíveis campo ressonantes. Em um espectro de pó, todas as orientações tem a mesma probabilidade e a intensidade total da linha de RPE é dada pela soma das contribuições da orientação de cada molécula individual (BENATTI et al., 2009).

Com o uso técnica de RPE pode-se determinar a espécie e simetria dos complexos formados por processos de troca de ligante do centro paramagnético Ru (III) (spin baixo d^5 , $S=1/2$). Além disso, é possível monitorar a redução da intensidade do sinal como consequência dos processos envolvidos na formação de espécies diamagnéticas, redução de Ru (III) para Ru(II) (baixo spin d^6 , $S=0$) ou dimerização do complexo monometálico para dar espécies bimetalicas antiferromagnéticas acopladas. Por outro lado, espécies binucleares de Ru (III), podem fazer o acoplamento ferromagnético com Spin efetivo $S=1$. Neste caso,

existe uma interação adicional, chamada Desdobramento de Campo Zero (DCZ), que ocorre pelo desdobramento dos níveis de energia eletrônico na ausência de um campo magnético externo (BENATTI et al., 2009; CAMPBELL et al., 1984). No presente estudo, os espectros são caracterizados pela intensidade de sinal e os valores de g , que permitem a identificação de espécies produzidas por troca de ligantes e processos de oligomerização.

5.1.4.1 Processo de troca de ligante do CTRu(III) em solução tampão

A técnica espectroscópica de RPE foi usada para identificar as espécies formadas pela hidrólise do complexo CTRu(III), sob condições fisiológicas, como descrito em materiais e métodos. Como a concentração de íons cloreto na solução influencia no processo de troca de ligante, a solução tampão utilizada foi em concentração de íons cloreto igual a encontrada no soro humano (WEBB & WALSBY, 2011). Dentre as várias concentrações de complexo em solução testadas, a que apresentou melhor sinal no RPE foi de 6mM.

A **Figura 18** mostra os espectros de RPE em banda-X (~9,5 GHz) do complexo CTRu(III) em tampão, medidos à aproximadamente 250K em função do tempo de incubação. O espectro é caracterizado pela presença de uma espécie com valores g e forma de linha de simetria rômica ($g_1 \neq g_2 \neq g_3$), os quais foram calculados com base na frequência de microonda (ν) medida em GHz e campo magnético (B) medido em gauss usando a equação (PILBROW, 1978),

$$g = 714,484 \frac{\nu}{B} \quad (2)$$

A forma de linha espectral e os valores de g ($g_1 = 2,60$ (3), $g_2 = 2,34$ (3), $g_3 = 1,73$ (2)) não mudam significativamente com o tempo de incubação. No entanto, há um aumento na intensidade da linha de campo baixo (g_1), nas primeiras duas horas de incubação (inserte da **Figura 18**), caracterizando o aumento de espécies hidrolizadas se formando em solução. Nesse intervalo a espécie rômica tornou-se mais evidente apresentando um espectro com largura de linha mais estreita (**Figura 18**).

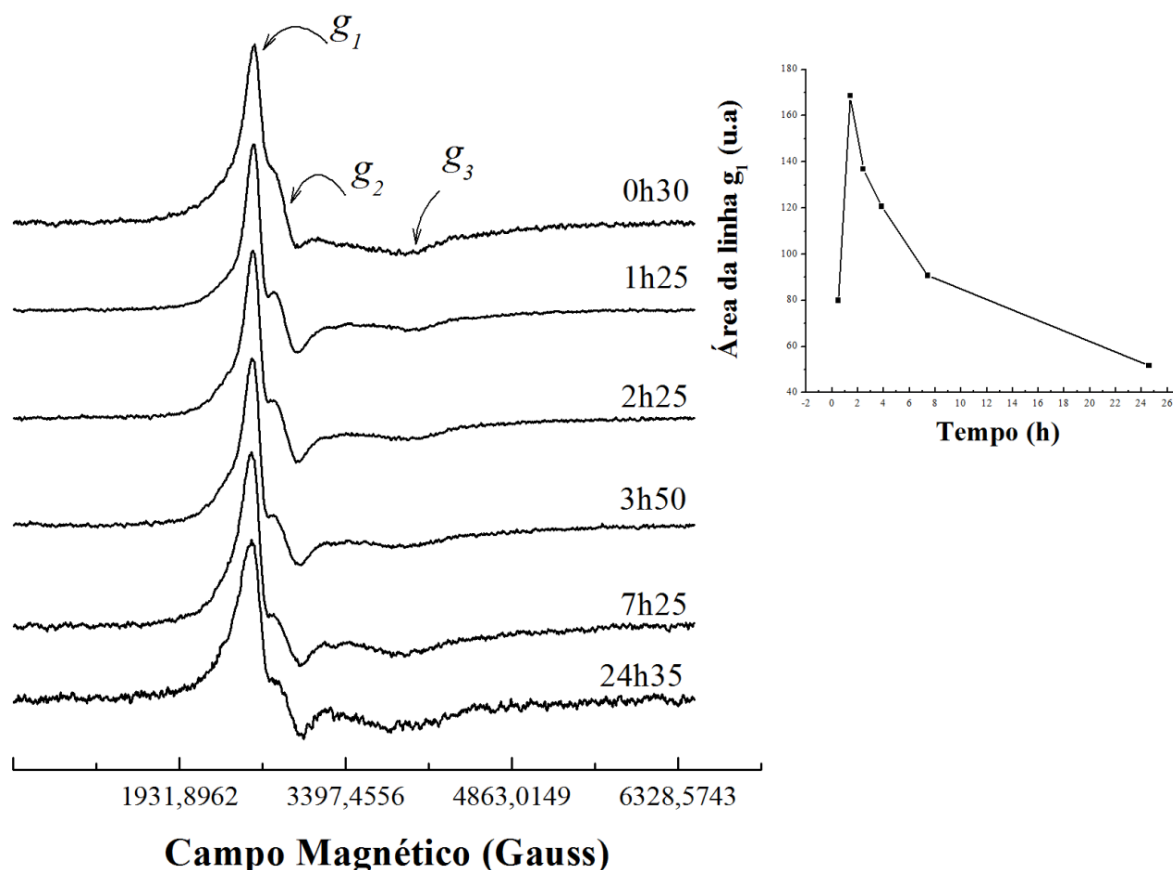
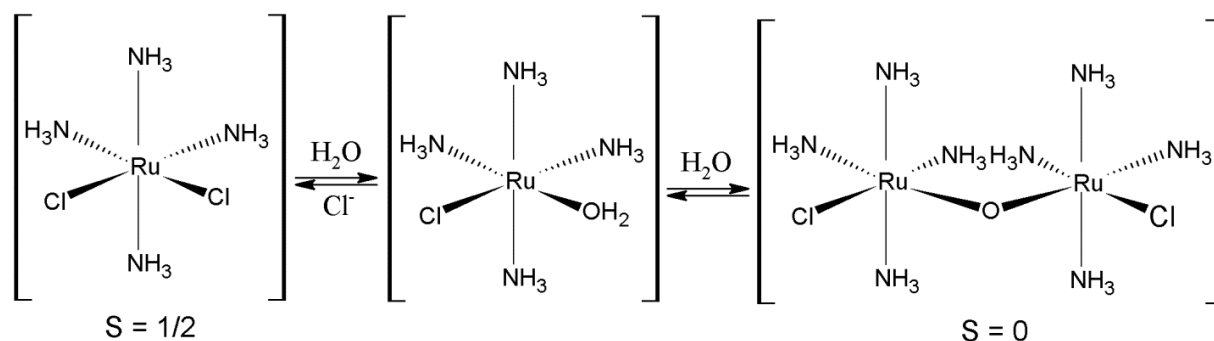


Figura 18 - Espectro RPE banda-X de CTRu(III) (6mM) em tampão resfriado à aproximadamente 250K no período de 24h. Os valores g ($g_1 \neq g_2 \neq g_3$) indicam simetria rômbrica do complexo. Parâmetros RPE: (potência de micro-ondas 5 mW, 16 scans). Insete: mudança de intensidade do sinal g_1 em dependência do tempo, medidos pela área sob a curva dos espectros de RPE de CTRu(III) em tampão fosfato.

O aumento da intensidade do sinal em g_1 pode estar relacionado com o processo de hidrólise do complexo *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl em tampão, em que a dissociação dos ligantes ocorre em duas horas de reação, resultando no aumento de espécies hidrolizadas se formando em solução. Este mecanismo é comum na cinética de complexos de rutênio ao interagir com solventes (ALESSIO et al., 1991; PAULA et al., 2008). De fato, essas informações corroboram com os resultados obtidos nos espectros de UV-vis com a diminuição da banda em 351nm e o aparecimento da banda de transição d-d na região do visível em 442 nm (**Figuras 12**).

Após reação de hidrólise do complexo, tem-se uma diminuição considerável na intensidade do sinal de RPE (insete da **Figura 18**), com a qual pode-se estimar o número de sítios acessados pela microonda através da área da absorção da linha de ressonância (POOLE, 1967). Como não há substâncias redutoras ou oxidantes em

solução que conduzam ao processo de redução para formar espécies Ru (II) ou oxidação para produzir complexos Ru (IV), a diminuição do sinal pode estar relacionada com o processo de oligomerização dos produtos de aquação, para obter espécies em ponte com -oxo ou -hidroxo (**Esquema 1**) (SAVA et al., 2002; BACAC et al., 2004; CETINBAS et al., 2010; WEBB & WALSBY, 2011). Isso pode levar a perda de espécies paramagnéticas, uma vez que o acoplamento antiferromagnético entre os centros adjacentes de Ru(III) ($S=1/2$) pode produzir um spin efetivo $S=0$. Além disso, foi observado uma nítida mudança na coloração da solução de amarelo para marron escuro sugerindo a formação de espécies oligoméricas em solução; fenômeno este também observado com os compostos NAMI-A e análogos de piridina (IVANOV et al., 1998; WEBB & WALSBY, 2011; WEBB et al., 2012).



Esquema 1 - Reação de substituição de complexo $cis-[Ru(NH_3)_4Cl_2]Cl$ em tampão fosfato (pH 7.4), que consiste na troca de ligantes cloreto na posição equatorial, pelas moléculas de água no intervalo de tempo de incubação entre 30 e 1h30 minutos. Depois disto, o complexo de $1/2$ ($S = 1/2$) liga-se a outro complexo, formando um composto polinuclear com spin 0 ($S=0$).

Após 24h de incubação a única espécie mononuclear de Ru(III) formada ainda é observada; diferentemente de outros complexos já estudados, os quais produz até quatro espécies nas primeira horas de incubação (SAVA et al., 2002; WEBB et al., 2012). Sabe-se que a formação de complexo polinuclear de Ru(III) pode reduzir sua atividade biológica (POOLE, 1967; BACAC et al., 2004). Após 24h de incubação, ainda observa cerca de 56% do complexo mononuclear na solução tampão, isto deve estar associado a seu potencial anti-câncer verificado nos ensaio *in vivo* e *in vitro* (MENEZES et al., 2007; RIBEIRO et al., 2009; LIMA et al., 2010a; LIMA et al., 2010b; SILVEIRA-LACERDA et al., 2010; LIMA et al., 2011).

5.1.4.2 Interação por troca de ligante para CTRu(III) em solução tampão com bsA e hsA

Para os experimentos envolvendo CTRu(III) com as proteínas bsA e hsA, a incubação foi seguida por ultrafiltração com uma filtro amicon (limite de peso molecular de 30 KDa) a fim de isolar a fração de complexo ligado a proteína, evitando assim a presença de espécies do complexo não ligada.

Interação de CTRu(III) com bsA

A **Figura 19** mostra os espectros de RPE de CTRu (III) em solução salina de tampão fosfato contendo bsA. Os espectros de RPE mostram que a espécie formada apresenta uma simetria rômica com valores g [$g_1=2.60(3)$, $g_2=2.35(3)$, $g_3=1.71(3)$], que não se alteram ao longo do tempo de incubação. Nas primeiras duas horas de reação, notou-se um aumento na intensidade do sinal de RPE (inserte da **Figura 19**), indicando a formação de espécies resultante da interação do complexo com os resíduos da proteína. No entanto, após esse período, a intensidade do sinal diminui (inserte da **Figura 19**), possivelmente devido à algumas interações fracas do complexo à proteína que são perdidas durante este período (WEBB & WALSBY, 2011). No intervalo entre 5 e 26 horas a intensidade de sinal do espectros de RPE volta aumentar (inserte da **Figura 19**), mostrando uma interação estável possivelmente com resíduo histidina da bsA, devido a sua maior afinidade por este resíduo (BAL et al., 1998; TAN et al., 2008).

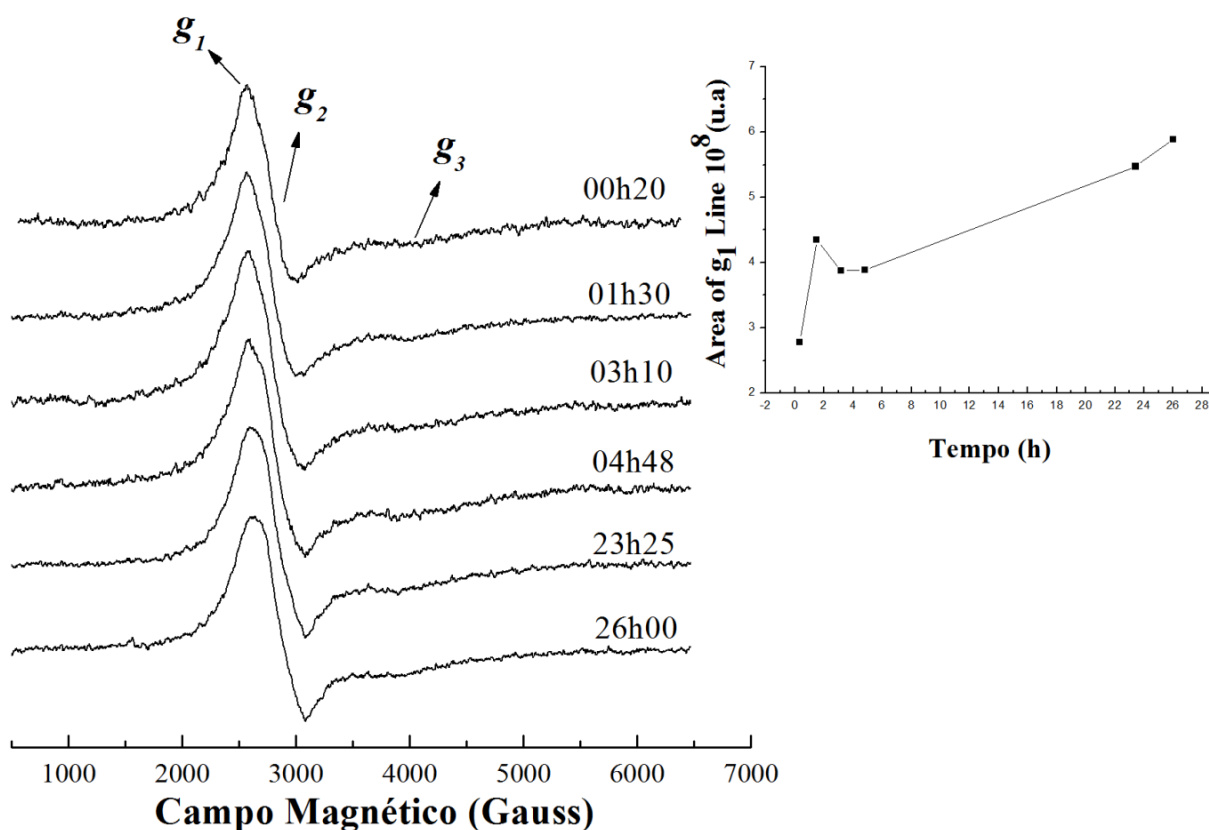
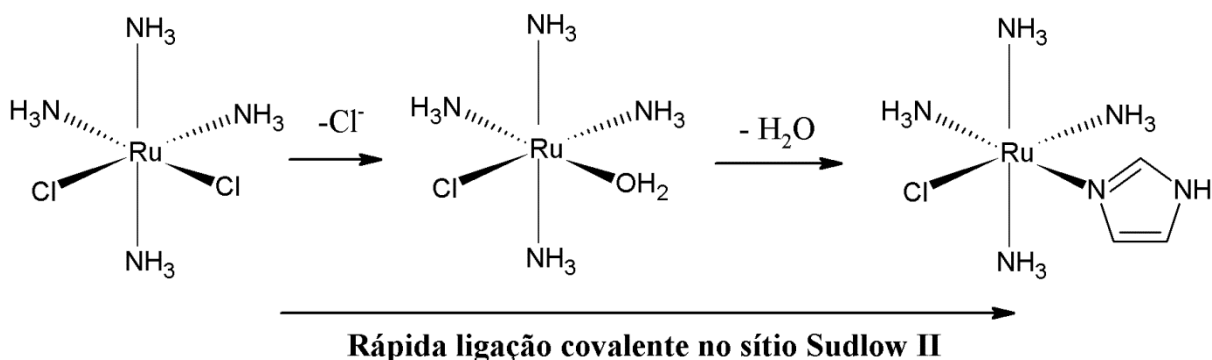


Figura 19 - Espectro RPE banda-X de CTRu (III) (6mM) com bsA (2 mM) à aproximadamente 250 K no período de 24 h. Os valores de g ($g_1= 2,60(3)$, $g_2=2,35(3)$ e $g_3=1,71(3)$) indicam simetria rômica do complexo. Parâmetros RPE: (potência de microondas 5 mW, 16 scans). Insete: mudança na intensidade do sinal g_1 em dependência do tempo, medidos pela área sob a curva dos espectros de RPE do complexo com bsA.

Os valores de g do aducto-bsA são da mesma ordem de grandeza do complexo em tampão, indicando que essa interação não leva a distorções significativas no campo cristalino do complexo. As perturbações que podem ocorrer nesta interação está refletindo apenas na forma de linha do espectro.

A reação de hidrólise que ocorre no complexo em solução se dá pela substituição dos ligantes na posição equatorial $\{Cl^- \rightarrow H_2O \rightarrow His\}$ para formar a espécie assinalada como [aducto-bsA] (**Esquema 2**).



Esquema 2 - Representação da reação do complexo com bsA, formando uma única espécie resultante da ligação covalente do aqua-complexo com o imidazol da histidina.

A ligação covalente do resíduo da bsA na posição equatorial do complexo CTRu(III) se forma rapidamente, sendo essa ligação favorável e estável, o que pode ser observado na intensidade do espectro de RPE que se mantém após 24 horas de incubação (inserte da Figura 19).

A atribuição da ligação do complexo ao resíduo histidina foi fundamentada em outros trabalhos que estudaram esse tipo de interação, mostrando que a maioria dos complexos metálicos, principalmente complexos de rutênio, se ligam ao resíduo histidina da bsA, no qual se tornam mais expostos para interagir em solução (MESSORI et al., 2000).

Interação de CTRu (III) com hSA

Ao analisar o espectro de RPE do composto na presença da proteína hSA (**Figura 20**), foi possível identificar três espécies: HSA-Ru-1 caracterizada por um espectro de simetria axial com valores g [$g_{\text{perpendicular}} (g_{\text{prp}})=4.13(4)$, $g_{\text{paralelo}} (g_{\text{pll}})=2.04(2)$], HSA-Ru-2 também de simetria axial, [$g_{\text{prp}}=2.50(3)$, $g_{\text{pll}}=1.96(2)$] e HSA-Ru-3 de simetria rômica [$g_1=2.56(3)$, $g_2=2.31(2)$, $g_3=1.71(2)$]. As espécies HSA-Ru-1 e HSA-Ru-2 se formam rapidamente, sendo que HSA-Ru-1 alcança sua saturação nos primeiros 30 minutos de incubação em seguida, diminui em função do tempo de incubação (veja inserte A na **Figura 20**). Já o espectro referente à espécie HSA-Ru-3 aumenta com o tempo (inserte B na **Figura 20**), indicando alta afinidade a este sítio de coordenação. A forma de linha dos espectros de RPE, como um todo, é similar àquela encontrada na literatura com outros compostos de Ru(III), como o NAMI-A (WEBB & WALSBY, 2011; WEBB et al., 2012). Isto sugere que o complexo

CTRu(III) deve ter o mesmo modo de interação com a hSA quanto aquele observado com o NAMI-A.

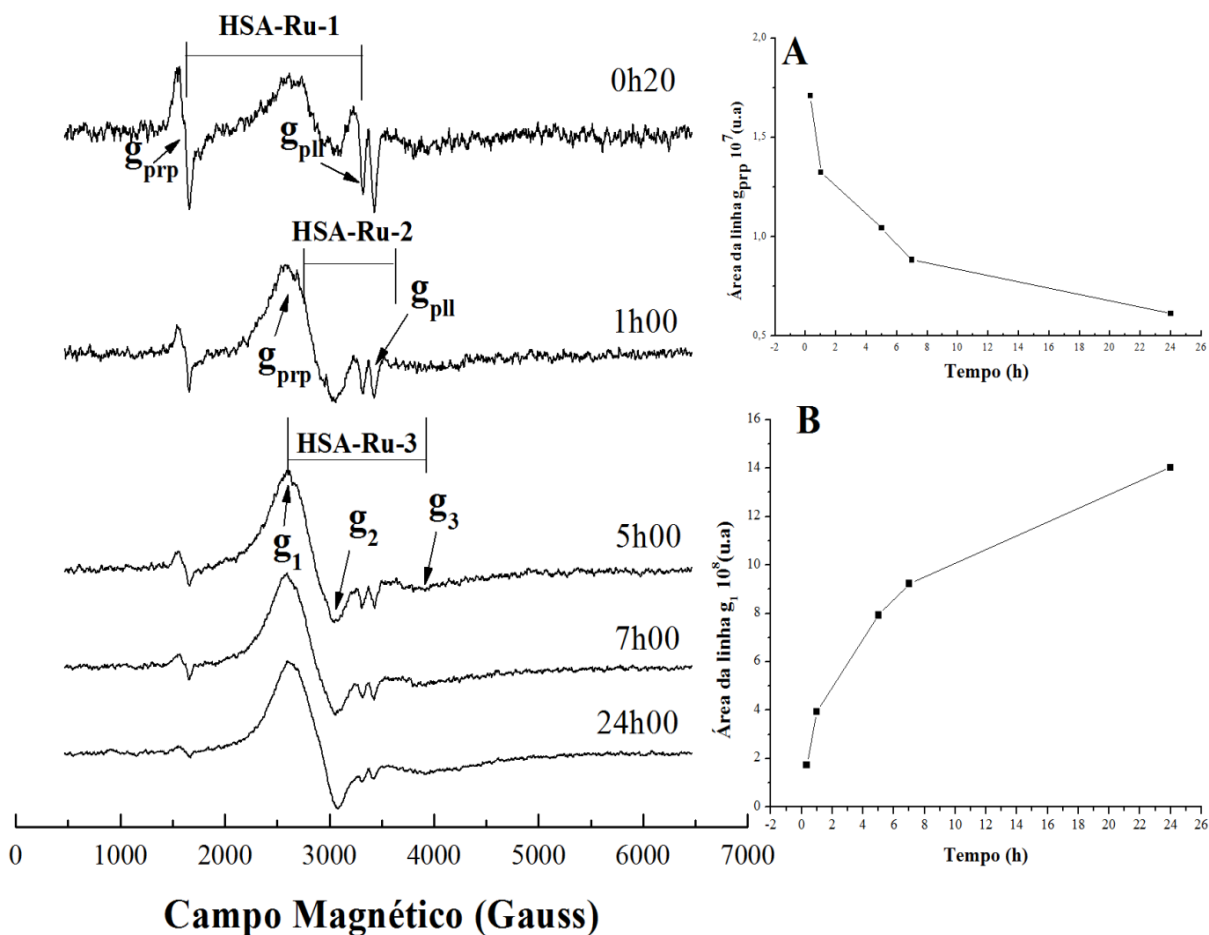
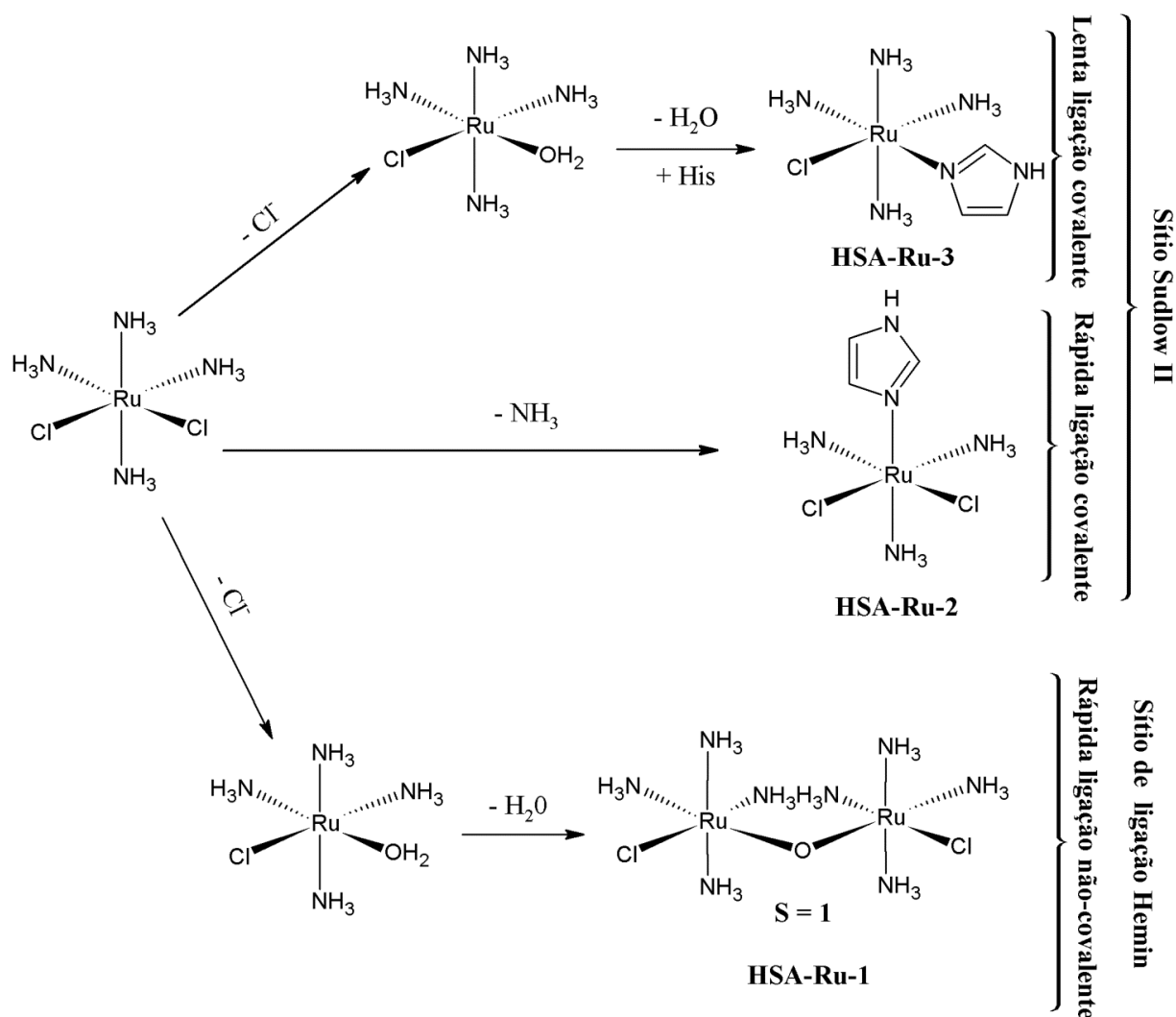


Figura 20 - Espectro RPE banda-X de CTRu(III) (6mM) com hSA (2mM) à aproximadamente 250 K no período de 24 h. Os valores g [$g_{prp}=4.13(4)$, $g_{pll}=2.04(2)$] relacionado com a HSA-Ru-1, [$g_{prp}=2.50(3)$, $g_{pll}=1.96(2)$] HSA-Ru-2 e [$g_1=2.56(3)$, $g_2=2.24(2)$, $g_3=1.71(2)$] HSA-Ru-3. Parâmetros RPE: (potência de microondas 5 mW, 16 scans). Inset: apresenta no painel (A) mudança de intensidade sinal da linha g_{prp} em dependência do tempo, no painel (B) mudança de intensidade do sinal da linha g_1 em dependência do tempo, medidas pela área sob a curva dos espectros de RPE do complexo com hSA.

A espécie HSA-Ru-3 parece surgir da interação do complexo com o resíduo histidina na região do domínio IIB, pela troca de ligante no plano equatorial do mesmo, para formar um aducto HSA-Ru-3. Isto pode ser observado na variação do valor g_2 . Por outro lado, as espécies de HSA-Ru-2 com valores g [$g_{prp}=2.50(3)$, $g_{pll}=1.96(2)$] sugerem que a ligação ocorre pela troca do ligante amina na posição axial com algum dos resíduos histidina do subdomínio IIIA da proteína, formando um aducto HSA-Ru-2. Isto pode estar ocorrendo na região próxima ao sítio de ligação chamado Sudlow II ou sítio de droga II (ZUNSZAIN et al., 2003; PETITPAS et al.

2003). Este é o mesmo tipo de interação também foi reportado por Webb e colaboradores (WEBB & WALSBY, 2011; WEBB et al., 2012).

A espécie HSA-Ru-1 parece surgir de uma ligação não-covalente diferente das demais espécies. A simetria e seus valores g anisotrópicos são típicos de um complexo binuclear com acoplamento ferromagnético de spin efetivo $S=1$, que surgem a partir de transições dentro dos dubletos de Kramers no baixo limite de campo Zeeman (CASTNER et al., 1960; PILBROW, 1978). A interação fraca com o campo magnético remove a degenerescência dos dubletos, a esta interação chama-se desdobramento de campo zero (DCZ) (BOCA, 2004). Estudos sobre as propriedades magnéticas de Complexos Metálico de Ru(III) com ligação metal-metal em solução congelada ou pó tem mostrado que suas interações são todas do tipo DCZ com larga anisotropia nos valores g ($g_{prp} \sim 4$ e $g_{pII} \sim 2$) (COTTON et al., 1975; TELSER et al., 1984; CHEN et al., 2005). Isso deve ser o tipo de interação que pode estar ocorrendo no sítio de ligação hemin localizado no subdomínio IA da hsA (ZUNSZAIN et al., 2003) para a formação da espécie HSA-Ru-1. Aqui, a oligomerização do complexo no bolso de ligação hemin é favorecida pela interação ferromagnética de DCZ. No entanto, as interações do complexo com os resíduos histidina para formar as espécies HSA-Ru-2 e HSA-Ru-3, parece interferir na conformação estrutural da proteína, desestabilizando a espécie HSA-Ru-1 no sítio hospedeiro e conseqüentemente provocando a sua diminuição ao longo do tempo de incubação (**Esquema 3**).



Esquema 3 - Resumo das principais vias de reações para o complexo CTRu (III) na presença de hsa, conforme determinado em estudos de RPE.

Essa interação do complexo com as proteínas o torna interessante para sua seletividade antitumoral, pois a ligação do complexo na hsa o impede de reagir com outros componentes reativos presentes no soro mantendo-o na sua forma inativa (Ru (III)), facilitando a entrega do composto com maior eficiência no tumor alvo (CETINBAS et al., 2010; WEBB et al., 2012; TOMAZ et al., 2012).

Além disso, a interação do complexo com a albumina é vantajoso, pois hsa é conhecida por acumular em tecido maligno e com inflamação devido a um sistema de vazamento capilar combinado com um sistema de compensação ausente ou comprometido, esse maior efeito de permeabilidade e retenção (EPR) pode ser usado para entregar a droga com maior eficiência no tumor alvo (TOMAZ et al., 2012).

Foram realizados experimentos de RPE com a transferrina, no entanto a relação sinal-ruído dos espectros não foi satisfatória, necessitando repetir os experimentos modificando os valores dos parâmetros de RPE.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Neste trabalho foram utilizadas pela primeira vez, a espectroscopia de fluorescência, RPE e UV-visível para estudar a interação do CTRu(III) com as proteínas, o que foi possível investigar reações de substituição de ligantes cloretos e amina do complexo CTRu(III) com as proteínas séricas humana e bovina.
- ✓ Através do UV-visível verificamos a ocorrência de hidrólise do complexo, que apresentou cinética de reação relativamente rápida à temperatura de 37°C com surgimento de banda d-d na região visível no período de 24 horas de incubação.
- ✓ Usando as medidas de supressão da fluorescência foi verificado a interação do complexo com as proteínas hsA e bsA, com uma constante de supressão superior ao encontrada na literatura.
- ✓ Para saber mais sobre o estado de oxidação, a simetria e o mecanismo de interação do complexo com as proteínas, foi utilizada a espectroscopia de RPE. Através da espectroscopia de RPE foi possível sugerir a formação das espécies $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O}/\text{OH})]$, o produto da reação de hidrólise do complexo em solução tampão, seguido por dimerização com a perda de espécies paramagnéticas Ru (III).
- ✓ Interessantemente, na presença de bsA é observado um aumento na estabilidade do complexo, evitando o processo de oligomerização entre os centros de Ru (III), formando uma ligação estável, possivelmente com algum resíduo de histidina da proteína.
- ✓ Na presença de hsA as medidas de RPE mostraram três modos de interação. Inicialmente, o complexo liga-se não covalentemente com a proteína formando as espécies HSA-Ru-1, como um produto da oligomerização do complexo no sítio de ligação hemin. Por outro lado, duas espécies estão sendo lentamente formadas por ligações covalentes do complexo com os resíduos de histidina, que produzem uma espécie de simetria axial (HSA-Ru-

2) e e a outra de simetria rômica (HSA-Ru-3). Estas ligações parecem surgir a partir da interação do complexo com o resíduo de histidina localizado no sítio de ligação Sudlow II.

- ✓ A partir de resultados interessantes obtidos utilizando várias técnicas espectroscópicas, evidenciando uma afinidade de ligação do complexo CTRu(III) com as proteínas transportadoras presentes no soro, acredita-se que essa ligação às proteínas esteja relacionada com o mecanismo de entrada do complexo nas células tumorais para atuarem como potencial agente antitumoral com maior especificidade.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Mais estudos serão necessários, uma vez que não podemos dizer precisamente em quais subdomínios, o tipo de ligação e que resíduos de histidinas ligam ao complexo. Estudos usando Dicroísmo circular (CD) e difração de raio-X serão realizados a fim de elucidar estas e outras questões a respeito deste interessante sistema. Paralelamente ensaios *in vitro* serão conduzidos para verificar se essa ligação contribui para o aumento da citotoxicidade para células tumorais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEKSENKO, S. S. et al. **Characterization of interactions between human serum albumin and tumor - inhibiting amino alcohol platinum (II) complexes using capillary electrophoresis.** J. Chromatogr. A, v.1155, p. 218-221, 2007.

ALESSIO, E. et al. **Synthesis, molecular structure, and chemical behavior of hydrogen trans-bis(dimethyl sulfoxide)tetrachlororuthenate(III) and mer-trichlorotris(dimethyl sulfoxide)ruthenium(III): the first fully characterized chloride-dimethyl sulfoxide-ruthenium(III) complexes.** Inorg. Chem., v. 30, p. 609-618, 1991.

ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J.; **Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects.** Platinum Metals Rev., v. 45, p. 62-69, 2001.

ALMEIDA, V. L. de et al. **Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução.** Química Nova, v. 28, p. 118-129, 2005.

ANG, W. H.; DYSON, P. J. **Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: towards targeted chemotherapy.** Eur. J. Inorg. Chem., p. 4003-4018, 2006.

ANG, W. H. et al. **Strategy to tether organometallic ruthenium - arene anticancer compounds to recombinant human serum albumin.** Inorg. Chem., v.46, p. 9048-9050, 2007.

ANG, W. H. et al. **Organometallic ruthenium -based antitumor compounds with novel modes of action.** J. Organomet. Chem., v. 696, p. 989-998, 2011.

BACAC, M. et al. **The hydrolysis of the anti-cancer ruthenium complex NAMI-A affects its DNA binding and antimetastatic activity: an NMR evaluation.** J. Inorg. Biochem., v.98, p. 402-412, 2004.

BAL, W. et al. **Multi-metal binding site of serum albumin.**J. Inorg. Biochem., v. 70, p. 33-39, 1998.

BECKFORD, F. A. **Reaction of the Anticancer Organometallic Ruthenium Compound, $[\eta^6\text{-p-Cymene})\text{Ru}(\text{ATSC})\text{Cl}]\text{PF}_6$ with Human Serum Albumin.** Int. J. Inorg. Chem., p. 1-7, 2010.

BENATTI, M.; MURPHY, D. M. **Electron paramagnetic Resonance: A Practitioner's Toolkit**. New Jersey: Wiley & Sons, 2009. 203-207 p.

BERGAMO, A.; SAVA, G. **Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy**. Dalton Trans., p. 1267-1272, 2007.

BERGAMO, A.; SAVA, G. **Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs**. Dalton Trans., v. 40, p. 7817-7823, 2011.

BERGAMO, A. et al. **Approaching tumour therapy beyond platinum drugs status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates**. J. Inorg. Biochem., v. 106, p. 90-99, 2012.

BOCA, R. **Zero-field splitting in metal complexes**. Coord. Chem. Rev., v. 248, p. 757-815, 2004.

BRABEC, V.; NOVÁKOVÁ, O. **DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity**. Drug Resistance Updates, v. 9, p. 111-122, 2006.

BRATSOS, I. et al. **Ruthenium anticancer compounds: challenges and expectations**. Chimia, v. 61, p. 692-697, 2007.

BRINDELL, M. et al. **Kinetics and mechanism of the reduction of (ImH)[*trans*-RuCl₄(dmsO)(Im)] by ascorbic acid in acidic aqueous solution**. J. Biol. Chem., v. 12, p. 809-819, 2007.

BRINDELL, M. et al. **The reduction of (ImH)[*trans*-Ru^{III}Cl₄(dmsO)(Im)] under physiological conditions: preferential reaction of the reduced complex with human serum albumin**. J. Biol. Chem., v. 13, p. 909-918, 2008.

BUGARCIC, Z. D. et al. **Kinetics and mechanism of the substitution reactions of [Pt(Cl)(bpma)]⁺, [PtCl(gly-met-S,N,N)] and their aqua analogues with L-methionine, glutathione and 5'-GMP**. J. Biol. Inorg. Chem., v.12, p. 1141-1150, 2007.

CAMPBELL, I. D.; RAYMOND, A.; DWEK, R. A. **Biological Spectroscopy**. Benjamin-Cummings Publishing Company, California, EUA, 1984. 207-210 p.

CASINI, A. et al. **Emerging protein targets for anticancer metallodrugs: Inhibition of thioredoxin reductase and cathepsin B by antitumor ruthenium(II) - arene compounds.** J. Med. Chem., v. 51, p. 6773-6781, 2008.

CASTNER, T. et al. **Note on the Paramagnetic Resonance of Iron in Glass.** J. Chem. Phys., v. 32, p. 668-673, 1960.

CETINBAS, N. **Interactions of anti-cancer Ru(III)-complexes with serum proteins,** Burnaby, BC, Canadá, 2009. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Simon Fraser University, 2009.

CETINBAS, N. et al. **Serum-protein interactions with anticancer Ru(III) complexes KP1019 and KP418 characterized by EPR.** J. Biol. Inorg. Chem., v. 15, p. 131-145, 2010.

CHEN, J. et al. **A theoretical study on the hydrolysis process of the antimetastatic ruthenium(III) complex NAMI-A.** J. Phys. Chem. B, v. 111, p. 7862-7869, 2007.

CHEN, W-Z. et al. **Proof of Large Positive Zero-Field Splitting in a Ru₂⁵⁺ Paddlewheel.** J. Am. Chem. Soc., v. 127, 12691-12696, 2005.

CLARKE, M. J. et al. **Reduction and subsequent binding of ruthenium ions catalyzed by subcellular components.** J. Inorg. Biochem., v.12 , p.79-87, 1980.

CLARKE, M. J. **Ruthenium metallopharmaceuticals.** Coord. Chem. Rev., v. 236, p. 209-233, 2003.

COTTON, F. A.; PEDERSEN, E. **Magnetic and electrochemical properties of transition metal complexes with multiple metal-to-metal bonds. II. Tetrabutyratodiruthenium (n+) with n = 0 and 1.** Inorg. Chem., v. 14, p. 388-391, 1975.

CURRY, S. **X-Ray Crystallography of Albumin.** In: M Otagiri (ed) Human serum albumin—new insights on its structural dynamics, functional impacts and pharmaceutical applications. Sojo University Publishing Center, Kumamoto, 2011 (p1-29 in published version).

DANIELS, T. R. et al. **The transferrin receptor part II: Targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells.** Clin. Immunol., v. 121, p. 159-176, 2006.

EARLE, K. A.; BUDIL, D. E. In: SCHLICK, H. (Ed). **Advanced ESR Methods in polymer Research**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006. 52-83 p.

ESPÓSITO, B. P.; NAJJAR, R. **Interactions of antitumoral platinum-group metallodrugs with albumin**. *Coord. Chem. Rev.*, v. 232, p. 137-149, 2002.

FASANO, M. et al. **The Extraordinary Ligand Binding Properties of Human Serum Albumin**. *IUBMB Life*, v. 57, p. 787–796, 2005.

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. **A química inorgânica na terapia do câncer**. *Cadernos temáticos de química nova na escola*, v. 6, p. 13-18, 2005.

FREIFELDER, D. **Physical Biochemistry: Applications to biochemistry and Molecular Biology**. San Francisco: W. H. Freeman, 1976. 410-443 p.

GELAMO, E.L. et al. **Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling**. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1594, p. 84-99, 2002.

GIANFERRARA, T.; BRATSOS, I.; ALESSIO, E. **A categorization of metal anticancer compounds based on their mode of action**. *Dalton Trans.*, v. 37, p. 588-598, 2009.

GROTTO, H. Z. W. **Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase**. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, v. 30, p. 390-397, 2008.

GUYTON, A.C; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia Médica**, 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 424-246 p.

HARRIS, W. R. **Binding of Vanadate to Human Serum Transferrin**. *J. Inorg. Biochem.*, v. 22, p. 201-218, 1984.

HARTINGER, C. G. et al. **Interactions of a novel ruthenium-based anticancer drug (KP1019 or FFC14a) with serum proteins significance for the patient**. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, v. 43, p. 583-585, 2005.

HARTINGER, C.G. et al. **From bench to bedside - preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium *trans*-[tetrachlorobis(1*H*-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A).** J. Inorg. Biochem., v. 100, p. 891-904, 2006.

HUANG, B. X.; KIM, H. Y. **Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry.** J. Am. Soc. Mass Spectrom., v. 15, p. 1237-1247, 2004.

IVANOV, A. I. et al. **Cisplatin Binding Sites on Human Albumin.** J. Biol. Chem., v. 273, p. 14721-14730, 1998.

JAKUPEC, M. A. et al. **Antitumour metal compounds: more than theme and variations.** Dalton Trans, p. 183-194, 2008.

KANDAGAL, P. B. et al. **Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach.** J. Pharm. Biomed. Anal., v. 41, p. 393-399, 2006.

KEPPLER, B. K. **Metal complexes in cancer chemotherapy.** VCH, Weinheim, Germany, 1993.

KIRCHEIS, R. et al. **Tumor targeted gene delivery an attractive strategy to use highly active effector molecules in cancer treatment.** Gene Ther, v. 9, p. 731-735, 2002.

KOSTOVA, I. **Ruthenium complexes as anticancer agents.** Curr. Med. Chem., v. 13, p. 1-23, 2006.

KRATZ, F.; MESSORI, L. **Spectral Characterization of Ruthenium(III) transferrin.** J. Inorg. Biochem., v. 49, p. 79-82, 1993.

KRATZ, F. et al. **The Binding Properties of Two Antitumor Ruthenium(III) Complexes to Apotransferrin.** J. Biol. Chem., v. 28, p. 2581-2588, 1994.

KRATZ, F.; BEYER, U. **Serum proteins as drug carries of anticancer agents.** Drug Delivery, v. 5, p. 281-299, 1998.

KRATZ, F. **Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles.** J. Controlled Release, v. 132, p. 171-183, 2008.

KUNG, A. et al. **Hydrolysis of the tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes HIm *trans*-[RuCl₄(im)₂] and HInd *trans*-[RuCl₄(ind)₂] investigated by means of HPCE and HPLC-MS.** J. Biol. Inorg. Chem., v. 6, p. 292–299, 2001.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** 2. ed. New York: Plenum Press, 1999. 237-265 p.

LEMIESZ - TRYNDA, L. et al. **Studies on the interactions between human serum albumin and *trans*-indazolium (bisindazole) tetrachlororuthenate (III).** J. Inorg. Biochem., v. 78, p. 341-346, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 5. ed. New York: Artmed, 2011. 76 p.

LEVINA, A.; MILTRA, A.; LAY, P. A. **Recent developments in ruthenium anticancer drugs.** Metallomics, v. 1, p. 458-470, 2009.

LIMA, A. P. de et al. **The ruthenium complex *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride induces apoptosis and damages DNA in murine sarcoma 180 cells.** J. Biosci., v. 35, p. 371-378, 2010a.

LIMA, A. P. de et al. **The compound *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride induces caspase-mediated apoptosis in K562 cells.** Toxicol. in Vitro, v. 24, p. 1562-1568, 2010b.

LIMA, A. P. de et al. **Induction of cell Cycle Arrest and Apoptosis by Ruthenium Complex *cis*-(Dichloro)tetrammineruthenium(III) Chloride in Human Lung Carcinoma Cells A549.** Biol. Trace Elem. Res., 2011.

LI, H.; QIAN, Z. M. **Transferrin / Transferrin receptor-mediated drug delivery.** Med. Res. Rev., v. 22, p. 225-250, 2002.

MAEDA, H. et al. **Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review.** J. Controlled Release, v. 65, p. 271-284, 2000.

MAEDA, H. **The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting.** *Adv. Enzyme Regul.*, v. 41, p. 189-207, 2001.

MALINA, J. et al. **Biophysical analysis of natural, double-helical DNA modified by anticancer heterocyclic complexes of ruthenium(III) in cell-free media.** *J. Biol. Inorg. Chem.*, v. 6, p. 435-445, 2001.

MARCON, G. et al. **Reactions of gold(III) complexes with serum albumin.** *Eur. J. Biochem.*, v. 270, p. 4655-4661, 2003.

MAZURYK, O. et al. **Interaction of apo-transferrin with anticancer ruthenium complex NAMI-A and its reduced form.** *J. Inorg. Biochem.*, v. 116, p. 11-18, 2012.

MENEZES, C. S. R. et al. **Analysis *in vivo* of antitumor activity, Cytotoxicity and Interaction between plasmid DNA and the cis-dichlorotetraammineruthenium(III) chloride.** *Chem. Biol. Interact.*, v. 167, p. 116-124, 2007.

MESSORI, L.; KRATZ, F.; ALESSIO, E. **The interaction of the antitumor complexes Na[*trans*-RuCl₄(DMSO)(Im)] and Na[*trans*-RuCl₄(DMSO)(Ind)] with apotransferrin: a spectroscopic study.** *Met.-Based Drugs*, v. 3, p. 1-9, 1996.

MESSORI, L. et al. **Binding of Antitumor Ruthenium(III) Complexes to Plasma Protein.** *Met.-Based Drugs*, v. 7, p. 335-342, 2000.

MORRIS, R. E. et al. **Inhibition of cancer cell growth by ruthenium(II) arene complexes.** *J. Med. Chem.*, v. 44, p. 3616-3621, 2001.

PAULA, Q. A. de et al. **Analyzing Ru(III)-dms and Ru(III)-dms motifs in compounds used in the synthesis of the antimetastatic agents.** *J. mol. struct.*, v. 891, p. 64-74, 2008.

PAGE, S. M.; BOSS, S. R.; BARKER, P. D. **Tuning heavy metal compounds for anti-tumor activity: is diversity the key to ruthenium's success?.** *Future Med. Chem.*, v. 1, p. 541-559, 2009.

PETERS, T. Jr. **Serum Protein**, *Adv. Protein Chem.*, v. 37, p. 161-245, 1985.

PETITPAS, I. et al. **Structural basis of albumin–thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia.** PNAS, v. 100, p. 6440-6445, 2003.

PILBROW, J. R. **Effective g Values for $S= 3/2$ and $S= 5/2$.** J. Magn. Reson., v. 31, p. 479-490, 1978.

POOLE, Jr. C. P. **Electron Spin Resonance: A Comprehensive Treatise on Experimental Techniques The Characteristics of Spectral Line Shapes.** John Wiley & Sons, Inc. New York, 1967, 775-849 p.

PRINCIOTTO, J. V.; ZAPOLSKI, E. J. **Difference between the two iron-binding sites of transferrin.** Nature, v. 255, p. 87-88, 1975.

PURCELL, M.; NEAULT, H. A.; RIAHI, T. **Interaction of taxol with human serum albumin.** Biochim. Biophys. Acta, v. 1478, p. 61-68, 2000.

QIAN, Z. M.; LI, H.; SUN, H.; HO, K. **Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway.** Pharmacol. Rev., v.54 p. 561-587, 2002.

QUINLAN, G. J.; MARTIN, G. S.; EVANS, T. W. **Albumin: biochemical properties and therapeutic potential.** Hepatology, v. 41, p. 1211-1219, 2005.

RCSB-PDB. Banco de dados de proteínas. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1AO6>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

RIBEIRO, A. de S. B. B. et al. **Mutagenic and Genotoxic Effects of *cis*-(Dichloro)tetraammineruthenium(III) Chloride on Human Peripheral Blood Lymphocytes.** Biol. Trace Elem. Res., v. 130, p. 249-261, 2009.

RICHARDSON, D. R. **Mobilization of iron from neoplastic cells by some iron chelators is an energy - dependent process.** Biochim. Biophys. Acta, v. 1320, p. 45-57, 1997.

ROESER, H. P. et al. **The role of Ceruloplasmin in Iron Metabolism.** J. Clin. Invest., v.49, p. 2408-2417, 1970.

SCOLARO, C. et al. **Tuning the hydrophobicity of ruthenium(III)-arene (RAPTA) drugs to modify uptake, biomolecular interactions and efficacy.** Dalton Trans., v. 43, p. 5065-5072, 2007.

SAVA, G. et al. **Reduction of lung metastasis by ImH[*trans*-RuCl₄(DMSO)Im]: mechanism of the selective action investigated on mouse tumors.** Anticancer Drugs, v. 10, p. 129-138, 1999.

SEDDON, E. A.; SEDDON, K. R. **The chemistry of ruthenium.** New York: ELSEVIER, 1984. 600 p.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química Inorgânica.** 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2003.

SILVEIRA-LACERDA, E. de P. et al. **The Ruthenium Complex *cis*-(Dichloro)tetraammineruthenium(III) Chloride Presents Immune Stimulatory Activity on Human Piripheral Blood Mononuclear Cells.** Biol. Trace Elem. Res., v. 133, p. 270-283, 2010.

SILVEIRA-LACERDA, E. de P. et al. **The Ruthenium Complex *cis*-(Dichloro)tetraammineruthenium(III) Chloride Presents Selective Cytotoxicity Against Murine B Cell Lymphoma (A-20), Murine Ascitic Sarcoma 180 (S-180), Human Breast Adenocarcinoma (SK-BR-3), and Human T Cell Leukemia (Jurkat) Tumor Cell Lines.** Biol. Trace Elem. Res., v. 135, p. 98-111, 2010.

SULYOK, M. et al. **Two dimensional separation schemes for investigation of the interaction of an anticancer ruthenium(III) compound with plasma protein.** J. Anal. At. Spectrom., v. 20, p. 856-863, 2005.

SÜSS-FINK, G. **Arene ruthenium complexes as anticancer agents.** Dalton Trans., v. 39, p. 1673-1688, 2010.

TFOUNI, E. **Photochemical reactions of ammineruthenium(II) complexes.** Coord. Chem. Rev., v. 196, p. 281-305, 2000.

TAN, C. et al. **Differences in structure, physiological stability, electrochemistry, cytotoxicity, DNA and protein binding properties between two Ru(III) complexes.** J. Inorg. Biochem., v. 102, p. 347-358, 2008.

TELSER, J.; DRAGO, R. S. **EPR spectra and bonding in the 2:1 base adducts of $\text{Rh}_2(\text{carboxylate})^{4+}$** . *Inorg. Chem.*, v. 23, p. 3120-3124, 1984.

TIMERBAEV, A. R. et al. **Comparative binding of antitumor indazolium [*trans*-tetrachlorobis(1*H*-indazole)ruthenate(III)] to serum transport proteins assayed by capillary zone electrophoresis**. *Anal. Biochem.*, v. 341, p. 326-333, 2005.

TOMAZ, I. A. et al. **$[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{bipy})(\text{PPh}_3)^+$, a promising large spectrum antitumor agent: Cytotoxic activity and interaction with human serum albumin**. *J. Inorg. Biochem.*, v. 117, p. 261-269, 2012.

ZHANG, G. et al. **Study of the interaction between icariin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy**. *J. Mol. Struct.*, v. 881, p.132-138, 2008.

ZSILA, F.; BIKÁDI, Z.; SIMONYI, M. **Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modelling methods**. *Biochem. Pharmacol.*, v. 65, p. 447-456, 2003.

ZUNSZAIN, P. A. et al. **Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid**. *BMC Struct. Biol.*, v. 3, p. 1-9, 2003.

WEBB, M. I. et al. **Pyridine Analogues of the Antimetastatic Ru(III) Complex NAMI-A Targeting Non-Covalent Interaction with Albumin**. *Inorg. Chem.*, v. 51, p. 954-966, 2012.

WEBB, M. I.; WALSBY, C. J. **Control of ligand-exchange processes and the oxidation state of the antimetastatic Ru(III) complex NAMI-A by interactions with human serum albumin**. *Dalton Trans.*, v. 40, p. 1322-1331, 2011.

WEIL, J. A.; BOLTON, J. R. **Electron Paramagnetic Resonance**. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. 1-43 p.

WU, S. S. et al. **Synthesis, crystal structure and interaction with DNA and HSA of (N,N'-dibenzylethane-1,2-diamine) transition metal complexes**. *J. Inorg. Biochem.*, v. 102, p. 2026-2034, 2008.

YUE, Y.; CHEN, X.; QIN, J.; YAO, X. **Spectroscopic investigation on the binding of antineoplastic drug oxaliplatin to human serum albumin and molecular modelig**. *Colloids Surf. B*, v. 69, p. 51-57, 2009.