

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

MARIANA PEDRINHA ABBOTT

**Modificações Oxidativas em Proteínas em Presença
de Complexos de Cobre(II)**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
03/08/2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIANA PEDRINHA ABBOTT

**Modificações Oxidativas em Proteínas em Presença
de Complexos de Cobre(II)**

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

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Ana Maria da Costa Ferreira

São Paulo
2007

Agradecimentos

Agradeço a Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu laboratório, pelas oportunidades que me deu em seu grupo de pesquisa e principalmente pela sua valiosa orientação.

Às Professoras Denise Oliveira Silva e Vera Regina Constantino e aos seus alunos pelas discussões e incentivo.

À Profa. Ohara Augusto pelo uso irrestrito do oxígrafo. À Profa. Alícia Kowaltowski e todas as pessoas de seu laboratório, pela contribuição nos experimentos de SDS-PAGE e pela imensa ajuda na realização de experimentos de respiração mitocondrial.

Aos funcionários do bloco 2, Cida e Sônia pela contribuição.

Aos funcionários do IQ-USP, principalmente da secretaria e da central analítica.

Aos amigos que fazem ou já fizeram parte do grupo, Vivian, Saulo, Kelly, Giselle e Wendel, por todas as discussões científicas e colaborações.

Aos amigos da salinha, Otávio, André e Sérgio, pela agradável convivência.

Às minha amigas Karina e Renata pelas discussões científicas, colaborações e, principalmente pela amizade e apoio durante todo esse tempo.

À minha família paulista, Fifi, Gugu e Gil, por toda a amizade e apoio em todos os momentos.

Ao Bruno pela sua grande amizade e principalmente, por sempre ter me incentivado.

A toda minha família, minhas avós, minha irmã, meus tios e primos, pelo apoio e incentivo e por todas as visitas que sempre me ajudaram tanto.

Especialmente aos meus pais que sempre me incentivaram e me apoiaram em todos os momentos da minha vida, pela dedicação, amor e amizade sempre presentes.

A CAPES pela bolsa concedida durante o doutorado.

A FAPESP pelo apoio financeiro ao laboratório.

RESUMO

Abbott, M.P. - Modificações Oxidativas em Proteínas em Presença de Complexos de Cobre(II). 2007. (130 p.) Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho alguns complexos diimínicos de cobre(II) com ligantes do tipo base de Schiff, já estudados em nosso laboratório, além de um novo complexo de zinco foram sintetizados e caracterizados por análise elementar, espectroscopias UV/Vis, Infravermelho e de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR). Estudos sobre a reatividade destes complexos de cobre(II) frente à oxidação de carboidratos por oxigênio molecular foram então realizados. Estes estudos envolveram várias etapas, com variação das concentrações do catalisador, do substrato e do tampão e variação do pH, verificando-se a influência de cada um destes fatores na cinética de reação. Para tentar entender a interação da albumina bovina (BSA) com os complexos diimínicos de cobre(II) estudados, foram realizados experimentos utilizando-se a técnica de dicroísmo circular e espectroscopia eletrônica. A estabilidade termodinâmica relativa dos vários compostos foi assim determinada, estimando-se os respectivos valores das constantes de estabilidade. Experimentos sobre a atividade oxidante destes complexos frente à albumina bovina, causando danos oxidativos à proteína, também foram efetuados, determinando-se a formação de grupos carbonil na proteína, que foram monitorados espectrofotometricamente, através da obtenção das correspondentes dinitrofenil-hidrazonas, pela reação com dinitrofenil-hidrazina (DNPH). Através da técnica de EPR, foram realizados estudos para a detecção e identificação de espécies radiculares na interação da albumina com os complexos de cobre(II) em presença de peróxido de hidrogênio, com o uso de um captador de spin apropriado. Estudos sobre as possíveis interações dos complexos de cobre(II) com a albumina humana (HSA) e com o plasma sanguíneo foram realizados através das técnicas de EPR e SDS-PAGE. Além disso, a reatividade dos complexos de cobre(II) frente a glutatona, um agente redutor presente em alta concentração no citosol, foi investigada através de experimentos de fluorescência. Finalmente, a influência dos complexos imínicos de cobre(II) sobre a respiração mitocondrial foi investigada, já que estes complexos se mostraram indutores eficientes de apoptose frente a diferentes células tumorais. Para este estudo utilizou-se um oxígrafo para monitorar o consumo de oxigênio durante a respiração mitocondrial, em presença dos complexos de cobre estudados.

Palavras-Chaves: cobre; ligantes bases de Schiff; processos oxidativos; albumina; espécies reativas de oxigênio; métodos espectroscópicos.

Abstract

Abbott, M.P. – Oxidative Modifications in Proteins in the Presence of Copper(II) Complexes. 2007. (130 pp.) Ph.D. Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this work some copper(II) complexes with Schiff base ligands, already studied in our laboratory, have been prepared, as well as a new similar zinc complex. After being characterized, especially by spectroscopic techniques (UV/Vis, IR, and EPR), these complexes had their reactivity as catalysts for the oxidation of carbohydrates by molecular oxygen verified. The influence of different factors on the kinetics of reaction, such as variation of the catalyst concentration, substrate concentration, buffer concentration and pH of the solution, was investigated. In order to understand the possible interactions of the copper(II) complexes studied with the protein albumine, studies using CD and electronic spectroscopies were carried out by adding the copper complexes to bovine serum albumine (BSA), and determining the corresponding relative stability constants for each complex. The activity of such copper complexes as oxidant agents toward the protein was also verified, with the formation of carbonyl groups in the protein observed by monitoring spectrophotometrically the corresponding dinitrophenylhydrazones, after reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH). By using EPR spectroscopy and an appropriate spin scavenger, reactive oxygen species were detected and identified as a result of the oxidative damage to the protein occurring in the presence of the copper complexes and hydrogen peroxide. Interactions of the human serum protein (HSA) and human plasma with the copper complexes studied were verified by EPR and SDS-PAGE techniques. Additionally, the reactivity of these complexes toward the reductive agent glutathione, present in the cytosol at high concentration, was investigated by fluorescence measurements. Finally, the influence of the complexes in the mitochondrial respiration was verified, since those compounds are able to induce efficiently apoptosis in the presence of different tumoral cells, monitoring the oxygen consumption with a selective oxygen electrode.

Keywords: copper; Schiff base ligands; oxidative processes; albumine; reactive oxygen species; spectroscopy.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Principais sítios de ligação da albumina.
- Figura 2.** Exemplo da formação da base de Schiff ou imina.
- Figura 3** – Espectro vibracional do composto $[\text{Cu}(\text{apzhist})\text{OH}]^+$
- Figura 4** – Espectro vibracional do composto $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$
- Figura 5** – Espectro vibracional do composto $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^+$
- Figura 6** - Espectro vibracional para o composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$
- Figura 7** – Espectro vibracional para o composto $[\text{Cu}(\text{isami})\text{H}_2\text{O}]^+$
- Figura 8** – Espectro vibracional para o composto $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$
- Figura 9** – Espectro eletrônico do composto $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$
- Figura 10** – Espectro eletrônico do composto $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^+$
- Figura 11** – Espectro eletrônico do composto $[\text{Cu}(\text{apzhist})\text{OH}]^+$
- Figura 12** – Espectro eletrônico do composto $[\text{Cu}(\text{isami})]^+$
- Figura 13** – Espectro eletrônico do composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$
- Figura 14** – Espectro eletrônico do composto $[\text{Cu}(\text{apzhist})\text{OH}]^+$
- Figura 15** – Espectro eletrônico do composto $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$
- Figura 16** – Espectro eletrônico do composto $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$
- Figura 17** – Espectro eletrônico para o composto $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$
- Figura 18** – Consumo de oxigênio para oxidação da galactose
- Figura 19** – Consumo de oxigênio para oxidação da frutose
- Figura 20** – Consumo de oxigênio para oxidação da glicose
- Figura 21** – Consumo de oxigênio para oxidação da galactose
- Figura 22** – Consumo de oxigênio para oxidação da frutose
- Figura 23** – Consumo de oxigênio para oxidação da glicose
- Figura 24** – Gráfico de velocidade inicial em função da concentração de catalisador, para o consumo de oxigênio na oxidação da glicose e galactose catalisada pelo $[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]^+$
- Figura 25** - Gráfico de velocidade inicial para o consumo de oxigênio na oxidação da frutose catalisada pelo $[\text{Cu}(\text{isaen})]^+$

Figura 26 – Velocidade inicial da oxidação da galactose catalisada por $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$ e $[\text{Cu}(\text{apyepy})\text{OH}]^+$ em função da concentração de catalisador

Figura 27 – Velocidade inicial da oxidação da glicose catalisada por $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$ e $[\text{Cu}(\text{apyepy})\text{OH}]^+$ em função da concentração de catalisador

Figura 28 - Velocidade inicial da oxidação da frutose catalisada por $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$ e $[\text{Cu}(\text{apyepy})\text{OH}]^+$ em função da concentração de catalisador

Figura 29 – Consumo de oxigênio durante a oxidação da galactose, em função da concentração do substrato.

Figura 30 - Gráfico de velocidade inicial *versus* concentração da galactose.

Figura 31 – Consumo de oxigênio durante a variação da concentração da galactose, durante a sua oxidação.

Figura 32 - Gráfico de velocidade inicial *versus* concentração da galactose.

Figura 33 - Consumo de oxigênio durante a variação da concentração da galactose, durante a sua oxidação.

Figura 34 - Gráfico de velocidade inicial x concentração da galactose.

Figura 35 – Consumo de oxigênio durante a oxidação da galactose, variando-se a concentração do tampão.

Figura 36 – Gráfico de velocidade inicial para oxidação da galactose, variando-se a concentração do tampão.

Figura 37 - Consumo de oxigênio durante a oxidação da galactose, variando-se o pH.

Figura 38 – Gráfico de velocidade inicial para oxidação da galactose, variando-se o pH.

Figura 39 - Espectro de CD para o composto $[\text{Cu}(\text{isaen})\text{OH}]^+$ (1,5 mM) adicionado a BSA (0,7 mM), em tampão fosfato 10 mM, pH = 7,3.

Figura 40 - Espectro de CD para o composto $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ (1,5 mM) adicionado a BSA (0,7 mM) em tampão fosfato 10 mM, pH = 7,3.

Figura 41 - Espectro de CD para $[\text{Cu}(\text{isaquin})]^+$ (1,5 mM) adicionado a BSA (0,7 mM) em tampão fosfato 10 mM, pH = 7,3.

Figura 42 - Espectro de CD para $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ (1,5 mM) adicionado a BSA (0,7 mM) em tampão fosfato 10 mM, pH = 7,3.

Figura 43 - Espectro de CD para $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (1,5 mM) em BSA (0,7 mM) em tampão fosfato 10 mM pH = 7,3.

Figura 44. Curva de calibração para o complexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, onde $y = 6,4x + 0,32$, com $R = 0,998$.

Figura 45. Espectros eletrônicos do $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ (1,5 mM) na presença de concentrações crescentes de albumina bovina (BSA) em tampão fosfato 10 mM (pH = 7,3), $T = (25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$

Figura 46. Espectros eletrônicos do $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (1,5 mM) na presença de concentrações crescentes de albumina bovina (BSA) em tampão fosfato 10 mM (pH = 7,3), $T = (25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$

Figura 47. Espectros eletrônicos do $[\text{Cu}(\text{isami})]^+$ (1,5 mM) na presença de concentrações crescentes de albumina bovina (BSA) em tampão fosfato 10 mM (pH = 7,3), $T = (25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$

Figura 48. Espectros eletrônicos do $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ (1,5 mM) na presença de concentrações crescentes de albumina bovina (BSA) em tampão fosfato 10 mM (pH = 7,3), $T = (25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$

Figura 49. Espectros eletrônicos do $[\text{Cu}(\text{isaen})]^+$ (1,5 mM) na presença de concentrações crescentes de albumina bovina (BSA) em tampão fosfato 10 mM (pH = 7,3), $T = (25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$

Figura 50. Espectros eletrônicos do $[\text{Cu}(\text{isapn})]^+$ (1,5 mM) na presença de concentrações crescentes de albumina bovina (BSA) em tampão fosfato 10 mM (pH = 7,3), $T = (25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$

Figura 51. Espectro de EPR do $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ em presença e ausência de HSA e plasma sanguíneo.

Figura 52. Espectro de EPR do $[\text{Cu}(\text{isami})]^+$ em presença e ausência de HSA e plasma sanguíneo.

Figura 53. Espectro de EPR do $[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]$ na presença e na ausência de HSA e plasma sanguíneo.

Figura 54. Espectro de EPR de $[\text{Cu}(\text{isaen})]^+$ em presença e ausência de HSA e plasma sanguíneo.

Figura 55. Espectro de EPR de $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^+$ em presença e ausência de HSA e plasma sanguíneo.

Figura 56. Espectro de EPR de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ em presença e ausência de HSA e plasma sanguíneo.

Figura 57. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%. MW: marcador de peso molecular; canaleta 1: plasma; canaleta 2: plasma + $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$; canaleta 3: plasma + $[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]^+$; canaleta 4: plasma + $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$; canaleta 5: plasma + $[\text{Cu}(\text{isami})]^+$; canaleta 6: plasma + $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$; canaleta 7: plasma + $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$.

Figura 58. Espectro de emissão de fluorescência dos complexos de cobre(II) em presença de glutatona.

Figura 59. Espectro de emissão de fluorescência dos complexos de cobre(II) em presença de glutatona.

Figura 60. Espectro de absorvância para monitoramento da formação de grupos carbonílicos na proteína.

Figura 61. Dano oxidativo à albumina bovina induzido por complexos de cobre(II)
[H_2O_2] = 1,0 mM, [BSA]=5,0 mM, [CuL] = 300 μM , tampão fosfato 50 mM, pH = 7,3,
T = 37,0°C

Figura 62. Dano oxidativo à albumina bovina induzido por complexos de cobre(II)
[H_2O_2] = 2,5 mM, [BSA]=5,0 mM, [CuL] = 300 μM , tampão fosfato 50 mM, pH = 7,3,
T = 37,0°C

Figura 63. Dano oxidativo à albumina humana induzido por complexos de cobre(II)
[H_2O_2] = 0,75 mM, [BSA] = 75 μM , [CuL] = 75 μM , tampão fosfato 50 mM, pH = 7,3,
T = 37,0°C

Figura 64. Espectros de EPR de soluções contendo BSA, CuL, H_2O_2 , usando DMPO como captador de spin, após 5 minutos de reação.

Figura 65. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12%, usando $[CuL]=0,75mM$ (Cu/HSA 1:1) e $[H_2O_2]=7,5mM$. A HSA foi desnaturada utilizando-se SDS 10%.. MW: Marcador de peso molecular BioRad. Canaletas: 1: HSA, 2: HSA + H_2O_2 , 3: HSA + $[Cu(H_2O)_4]^{2+}$, 4: HSA + $[Zn(isaepy)Cl_2]$ 5: HSA + $[Cu(isaen)]^+$, 6: HSA + $[Cu(apyhist)H_2O]^{2+}$, 7: HSA, 8: HSA + H_2O_2 , 9: HSA + $[Cu(H_2O)_4]^{2+}$, 10: HSA + $[Zn(isaepy)Cl_2]$, 11: HSA + $[Cu(isaepy)_2]^{2+}$, 12: HSA + $[Cu(isapn)]$, 13: HSA + $[Cu(isami)]^+$.

Figura 66. Controle da respiração mitocondrial

Figura 67. Respiração mitocondrial sob influência do composto $[Cu(H_2O)_4]^{2+}$

Figura 68. Respiração mitocondrial sob influência do composto $[Cu(isaepy)_2]^{2+}$

Figura 69. Respiração mitocondrial sob influência do composto $[Cu(isaen)]^+$

Figura 70. Respiração mitocondrial sob influência do composto $[Cu(isapn)]^{2+}$

Figura 71. Respiração mitocondrial sob influência do composto $[Cu(isami)]^+$

Figura 72. Respiração mitocondrial sob influência de $[Cu(apyhist)H_2O]^{2+}$

Figura 73 – Respiração mitocondrial sob influência de $[Zn(isaepy)Cl_2]$

Figura 74. Respiração mitocondrial sob influência do composto $[Cu(H_2O)_4]^{2+}$

Figura 75. Respiração mitocondrial sob influência do composto $[Cu(isaepy)_2]^{2+}$

Figura 76. Respiração mitocondrial sob influência do composto $[Cu(isami)]^{2+}$

Figura 77. Respiração mitocondrial sob influência do composto $[Cu(isapn)]^{2+}$

Figura 78. Respiração mitocondrial sob influência do composto $[Cu(isaen)H_2O]^+$

Figura 79. Respiração mitocondrial sob influência do composto $[Cu(apyhist)H_2O]^{2+}$

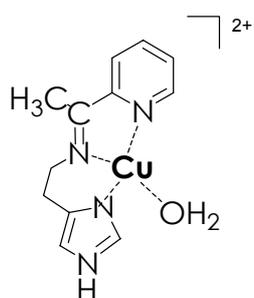
Figura 80. Respiração mitocondrial sob influência do composto $[Zn(isaepy)Cl_2]$

LISTA DE ABREVIATURAS

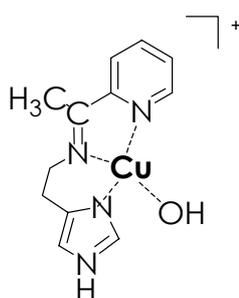
UV/Vis	ultravioleta-visível
ϵ	absortividade molar (em $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
$\lambda_{\text{máx}}$	comprimento de onda de absorção máxima
IR	infravermelho
CD	dicroísmo circular
EPR	ressonância paramagnética eletrônica
DMPO	5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido
TEMPOL	N,N,N',N'-tetrametilenodiamina
DPPH	α, α' -difeníl- β -picrilhidrazil
DMSO	dimetil sulfóxido
DNP	2,4 – dinitrofenilhidrazina
DNPH	2,4 – dinitrofenilhidrazona
EROS	espécies reativas de oxigênio
HSA	albumina humana
BSA	albumina bovina
isa	isatina
en	etilenodiamina
pn	1,3-diaminopropano
epy	2-(2-aminoetilpiridina)
apy	2-acetilpiridina
apz	acetilpirazina
hist	histamina dihidroclorato
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida em fase denaturante
CCCP	carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona

Estruturas dos complexos preparados e estudados

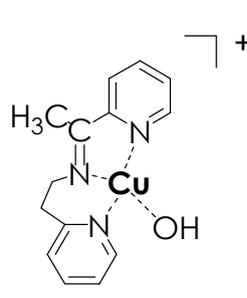
Série das pirazinas e piridinas



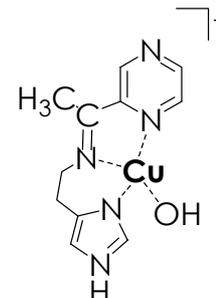
$[\text{Cu}(\text{apy-hist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$



$[\text{Cu}(\text{apy-hist})\text{OH}]^{2+}$

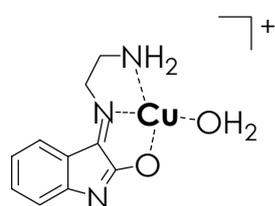


$[\text{Cu}(\text{apy-epy})\text{OH}]^{+}$

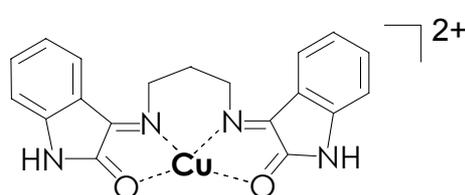


$[\text{Cu}(\text{apz-hist})\text{OH}]^{+}$

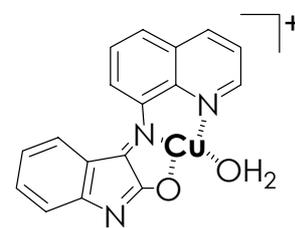
Série da isatina



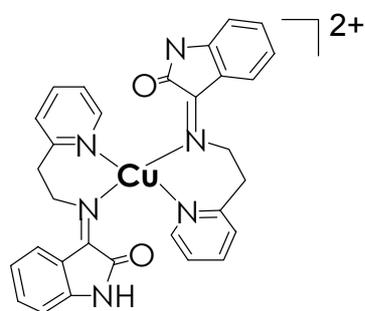
$[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]^{+}$



$[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$



$[\text{Cu}(\text{isami})(\text{H}_2\text{O})]^{+}$



$[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$



$[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$

1. Introdução

1.1. O cobre no meio biológico

O organismo apresenta um mecanismo homeostático, por meio do qual mantêm as concentrações dos elementos traços em níveis praticamente constantes no organismo. Quando o elemento é essencial, sua atividade benéfica cresce com a concentração, até atingir um nível de saturação, determinado por esse organismo. Nesse nível todo o excesso é eliminado, contudo, quando por alguma razão a concentração se eleva a ponto de tornar o mecanismo de defesa ineficiente, o caráter tóxico se manifesta [1-3].

A toxicidade dos metais é um problema extremamente complexo [1,2]. Relaciona-se com pelo menos três tipos de influência: bloqueio de grupos funcionais essenciais à atuação de uma biomolécula, deslocamento de outros metais presentes no sistema e modificações na conformação de sítios ativos e na estrutura quaternária de proteínas.

A importância do cobre como elemento essencial aos seres vivos pode ser avaliada pelo grande número de proteínas e enzimas dependentes desse metal, participando de inúmeros processos biológicos, onde desempenham funções variadas [4]. Na enzima Cu,ZnSOD, o cobre tem papel antioxidante, catalisando a dismutação de radicais superóxido, enquanto nas oxidases, como tirosinase, catecol oxidase, amina oxidase ou galactose oxidase, catalisa a oxidação de vários substratos pelo oxigênio molecular, levando à formação de produtos carbonílicos (aldeídos, quinonas, etc.) e peróxido de hidrogênio. Em todas estas enzimas, participa de ciclos catalíticos envolvendo os estados de oxidação Cu(I) e Cu(II). Em sistemas-modelos apresenta alta reatividade frente a espécies paramagnéticas (radicais) como íons superóxido $O_2^{\bullet-}$, $^{\bullet}NO$, radical fenoxil, o-semiquinona, etc. [5].

O corpo humano contém cerca de 80 mg de cobre, e apenas cerca de $10^{-18}M$ destes íons estão livres no organismo, ou seja, sem estar ligado a uma proteína carreadora ou aminoácido. Isto significa menos de 1 cobre livre por célula [6]. O teor médio recomendado pelo conselho de nutrição dos EUA para uma dieta correta é de 1,0 a 3,0 mg, ingerido provavelmente coordenado a aminoácidos ou pequenos

peptídeos [7]. O cobre pode ser encontrado em carnes, frutos do mar, em muitos vegetais e cereais. Os teores mínimos em vários fluidos são, em $\mu\text{g}/100\text{ mL}$: soro (72), plasma (75), eritrócitos (71), fluido espinhal (6), saliva (10) e fluidos digestivos (63) [8].

O cobre também é encontrado em muitos tecidos, em teores mínimos diferentes. O cérebro e o coração contêm mais cobre, cerca de $360\ \mu\text{g}/\text{g}$ de resíduo de tecido, em relação a todos os demais, com exceção do fígado, que contém cerca de $700\ \mu\text{g}/\text{g}$, e é o responsável pelo armazenamento de cobre no organismo.

A absorção do cobre é limitada no estômago e intestino delgado. O transporte de cobre para a mucosa intestinal é um processo mediado por vários fatores.

Uma vez que o cobre entra na corrente sanguínea, ele fica ligado a uma variedade de proteínas e compostos de baixo peso molecular. Mais do que 90% do cobre no plasma sanguíneo está presente incorporado à ceruloplasmina. O restante 5 a 10% está coordenado a albumina e aminoácidos. Estudos detalhados revelaram que o composto de cobre encontrado no soro está na forma principalmente de um complexo 1:2 de Cu-Histidina [9]. Um outro estudo revelou a presença de Cu-Histidina formando um complexo ternário com a albumina [10,11]. O sítio primário de ligação de cobre com a albumina é bem caracterizado, é pentacoordenado utilizando um nitrogênio amino-terminal, o grupo carboxil da cadeia lateral do ácido aspártico, dois nitrogênios provenientes de peptídeos e um nitrogênio imidazólico do resíduo de histidina, na terceira posição [12].

Existem pelo menos dois caminhos de transporte do cobre através da membrana celular. O primeiro caminho envolve a liberação de cobre através da ceruloplasmina [13,14]. O cobre é reduzido na superfície redutora da célula e entra na célula através de uma proteína transportadora, independente de energia. A natureza desta proteína e o seu exato papel não estão bem estabelecidos [15]. O segundo caminho está relacionado ao cobre não incorporado à ceruloplasmina, mas sim, ao cobre ligado a histidina, albumina e outros complexos de baixo peso molecular [7].

Uma proteína transportadora com alta afinidade por cobre (Ctr1) está presente na membrana celular, e transfere cobre ao citoplasma, onde pequenas proteínas

específicas, denominadas chaperonas, conduzem íons metálicos à enzimas de cobre citosólicas ou organelas. A chaperona Hah1 transfere o cobre a duas ATPases homólogas, a ATP7A e a ATP7B localizadas no complexo de Golgi, que se encarrega de entregar cobre à proteínas do caminho de secreção, ou movendo-se através da membrana citoplasmática para excretar o excesso de cobre da célula [16,17].

Particularmente complexa é a distribuição do cobre na mitocôndria. O metal é entregue a esta organela pela chaperona Cox17, localizada no citosol e no espaço intermembrana da mitocôndria. A Cox17 parece ser fundamental na inserção do cobre na enzima mitocondrial citocromo c oxidase, que na sua forma ativa possui três íons de cobre. A citocromo c oxidase é o complexo IV da cadeia de transporte de elétrons, e mutações da Cox17 resultam em disfunções na cadeia respiratória. Além disso, duas proteínas mitocondriais chamadas SCO1 e SCO2 participam da transferência do metal da Cox17 à citocromo c oxidase. O complexo sistema do transporte e da entrega de cobre à mitocôndria inclui ainda a bomba ATP7B (ou ATP7A), cuja função na organela ainda não está bem estabelecida, parece estar envolvida na saída do cobre da mitocôndria, controlando então a concentração do cobre intramitocondrial [16,19]

O cobre está então, distribuído em todas as organelas celulares incluindo o núcleo, as mitocôndrias, os lisossomas, o retículo endoplasmático e o citosol [20]. As proteínas de cobre estão assim localizadas em todo o compartimento celular: superóxido dismutase no citosol e possivelmente nos peroxissomas [21], lisil oxidase no complexo de Golgi e em organelas secretórias [22] e metalotioneína no citosol, núcleo e lisossomas [23]. Deste modo, o tráfego intracelular de cobre desempenha um papel vital na distribuição de cobre para as proteínas de cobre.

O fluxo de cobre no organismo pode ser alterado em pequenas quantidades sem grandes danos, porém, grandes alterações podem provocar distúrbios graves e até mesmo doenças, como por exemplo, a doença de Wilson e a síndrome de Menkes. A doença de Wilson envolve a acumulação patológica de cobre no fígado e no cérebro sendo letal se não tratada [24]. A sua terapia envolve a administração de agentes quelantes específicos ao cobre, em particular a D-penicilamina [25]. A

síndrome de Menkes envolve o armazenamento insuficiente de cobre, e é causada por uma disfunção hereditária no transporte intracelular de cobre, gerando uma falta sistêmica deste elemento no organismo. Caso a síndrome não seja tratada a tempo por suplementação de cobre, uma degradação rápida e eventualmente fatal ocorre no sistema nervoso central [26].

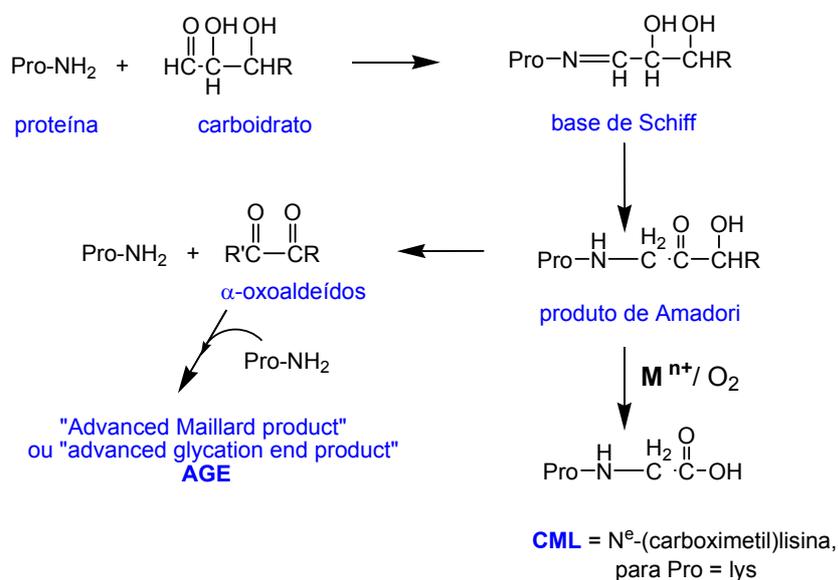
1.2. Oxidação e glicação de proteínas

A oxidação de proteínas é um processo bastante complexo, definido como a modificação covalente de uma proteína [27], induzida diretamente por espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio [28,29], ou indiretamente pela reação de produtos secundários do estresse oxidativo [30]. Dentre os diferentes agentes capazes de causar a oxidação de proteínas, destacam-se: o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) [31], o ácido hipocloroso (HOCl) [32], oxigênio singlete [33], xenobióticos (como paraquat, tetracloreto de carbono e acetaminofeno), metais de transição (especialmente, ferro e cobre) [34,35], luz UV, radiação γ em presença de oxigênio, ozônio, enzimas óxido-redutases, neutrófilos ativados e ainda produtos da oxidação de lipídios, carboidratos ou aminoácidos [36, 37].

O termo *glicação* refere-se à glicosilação não-enzimática de proteínas, correspondendo a processos naturais ou fisiológicos, através de reações denominadas de Maillard, em que grupos carbonil de carboidratos, como a glucose, se condensam a grupos amino em proteínas, formando *bases de Schiff*, principalmente na sua forma glicosilamina cíclica, embora esquematicamente sejam ilustradas pela forma acíclica, mais reativa. Estas bases de Schiff sofrem, em seguida, rearranjos aos chamados produtos de Amadori, como a frutossamina, representando os chamados produtos iniciais de glicação [38]. Estes *compostos de Amadori*, por sua vez, são degradados a compostos α -dicarbonílicos, como glioxal, metilglioxal ou 3-deoxiglucosona, que são ainda mais reativos frente a proteínas, dando os chamados produtos finais de glicação avançada (**AGEs** = *advanced glycation end products*) [39] ou, em presença de íons metálicos, como cobre ou ferro, podem ser oxidados pelo oxigênio molecular a ácidos carboxílicos, como fórmico,

acético, glicólico, glucônico, etc. Reações de Maillard ou de glicação levariam então à formação de pigmentos castanhos denominados melanoidinas, e/ou compostos fluorescentes e à interligação de proteínas por ligações cruzadas inter- e intramoleculares (*protein-protein crosslinking*), através de interações entre grupos amino de aminoácidos, peptídeos ou proteínas, com açúcares redutores [40]. Estas reações ocorrem também na manipulação, cozimento ou armazenamento de alimentos como, por exemplo, ao assar massas ou carnes, sendo responsáveis por mudanças no aroma, sabor, coloração ou textura desses alimentos [41]. No Esquema 1 são mostradas estas reações.

Esquema 1 - Glicação não-enzimática de proteínas ou reação de Maillard



Este processo de *glicação* é particularmente aumentado em condições patológicas, como em diabetes [42], quando a concentração de açúcares é alta, e pode ser monitorado principalmente em proteínas de longa vida, como colágeno ou lente cristalino. Neste caso, tem sido mais usado o termo *glicoxidação*, já que ocorre através de etapas envolvendo espécies muito reativas, como radicais livres de oxigênio ou nitrogênio, formadas por ação de íons metálicos ou peroxinitrito, diretamente sobre a proteína e/ou produtos de sua glicação [43]. In vitro, a incubação de proteínas com glicose leva também, através da formação de bases de

Schiff e produtos de Amadori, à geração dos **AGEs**, caracterizados por fluorescência, coloração castanha e ligação cruzada intra- e intermoleculares com proteínas.

Há controvérsias se o estresse oxidativo é um processo primário ou secundário na degradação de proteínas [44]. Alguns processos ocorrem através de compostos carbonílicos formados em etapas não-oxidativas e, assim, a glicação parece advir também de um estresse carbonílico, em vez de unicamente por um estresse oxidativo. De fato, nas diabetes e na uremia, há um aumento acentuado nos produtos de glicoxidação e de lipoxidação, mas também nos produtos de reações entre proteínas e compostos dicarbonílicos formados por mecanismos não-oxidativos (que não requerem oxigênio para ocorrer). A inativação acentuada de diversas proteínas (glutathione redutase, lactato desidrogenase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi verificada em presença de metilglioxal ou glioxal, independente da presença de oxigênio, íons metálicos, SOD ou catalase, indicando que o processo não é mediado apenas por espécies radicalares [45]. O processo global parece envolver três componentes: a reação de adição não-oxidativa do açúcar com a proteína (*glicação*) e duas etapas oxidativas, a *glicosilação autoxidativa* em que radicais gerados a partir dos carboidratos ou açúcares interagem com a proteína e a *autoxidação da proteína glicada* (proteína ligada ao açúcar, produzida na glicação). As duas últimas reações são, mais recentemente, denominadas *glicoxidação*.

A *glicoxidação* envolve a oxidação da glicose via intermediários dicarbonílicos e de açúcares ligados a proteínas (adutos enaminol ou produtos de Amadori). Processos de formação de AGEs e processos oxidativos interagem sinergicamente para produzir modificações deletérias aos tecidos, com possível envolvimento de metais com propriedades redox [46]. Estudos recentes mostraram que glicose aumenta a oxidação de lipoproteínas (LDL) catalisada principalmente por íons cobre, em pacientes diabéticos (com hiperglicemia). Essa atividade da glicose está ligada à sua capacidade de redução do cobre coordenado à LDL; ela parece não ter efeito nas etapas de oxidação independentes do metal [47].

1.3. O papel do cobre em processos oxidativos no meio biológico

Cobre é um metal essencial para funções importantes no meio biológico, presente no sítio ativo de inúmeras enzimas participantes do metabolismo do oxigênio [48]. Na enzima Cu,Zn SOD, o cobre tem papel antioxidante, catalisando a dismutação de radicais superóxido, enquanto nas oxidases, como tirosinase, catecol oxidase, amina oxidase ou galactose oxidase, catalisa a oxidação de vários substratos pelo oxigênio molecular, levando à formação de produtos carbonílicos (aldeídos, quinonas, etc.) e peróxido de hidrogênio [49]. Em todas estas enzimas, participa de ciclos catalíticos envolvendo os estados de oxidação Cu(I) e Cu(II).

Entretanto, íons de cobre podem também participar de etapas redox envolvendo espécies reativas de oxigênio, as chamadas reações tipo-Fenton, capazes de causar danos oxidativos a inúmeros substratos biológicos: carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos [50]. Esta característica é fortemente dependente do ambiente em que os íons de cobre estão inseridos, isto é, do ligante ao qual está coordenado, e tem sido utilizada no desenvolvimento de metalofármacos [51]. Em sistemas-modelos apresenta uma alta reatividade frente a espécies paramagnéticas (radicalares) como íons superóxido O_2^- , $\cdot NO$, radical fenoxil, o-semiquinona, entre outros [52].

O papel relevante que íons de cobre parecem desempenhar na peroxidação lipídica já é bastante conhecido [53]. Lipoproteínas de baixa densidade (LDL) coordenam íons de cobre(II) e são capazes de reduzi-los a íons cobre(I), tendo sido proposto que esta é uma das etapas limitantes da velocidade na oxidação destas proteínas. Estudos muito recentes indicam que a atividade redox do cobre coordenado à albumina humana (sítio terminal, motivo Asp-Ala-His), monitorada pela oxidação de ascorbato, é bastante aumentada e acompanhada de rearranjos conformacionais profundos, além da oxidação do grupo Cys-34, quando ácidos graxos não-esterificados se ligam à proteína [54].

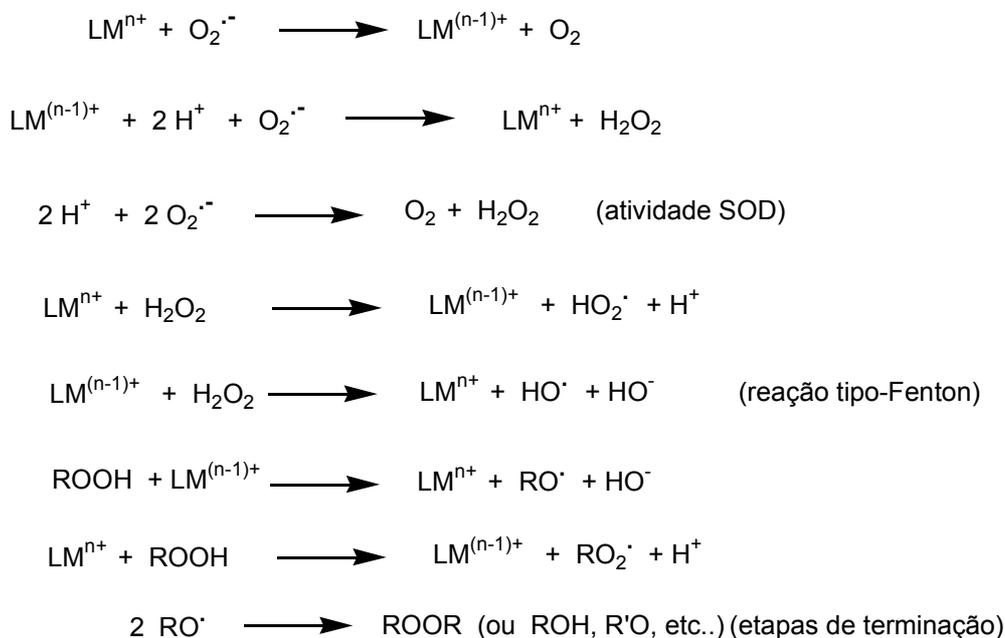
Inúmeros relatos sobre o papel preponderante desempenhado por íons metálicos, especialmente o cobre, na glicação e glicoxidação de proteínas têm mostrado resultados conflitantes. Íons de cobre mediam a decomposição de

compostos de Amadori, formados a partir de proteínas ou peptídeos glicosados, originando glucosona, arabinose e um N^α-formil peptídeo, R-NH-CHO [55, 56]. A própria glucosona ou a arabinose formadas poderiam ocasionar novo processo de glicoxidação da proteína, facilitado em presença de íons cobre.

Por outro lado, evidências de que uma dieta deficiente em cobre pode ocasionar aumento da glicação de proteínas também têm sido descritas na literatura [57]. Estudos recentes mostraram que a concentração de hemoglobina glicada, Hb A_{1c}, e *frutosamina*, um composto de Amadori, formados no início da glicação de proteínas é maior em ratos submetidos a dietas pobres em cobre (0,4 mg Cu/kg ração balanceada), se comparado a ratos submetidos a uma dieta normal (6,4 mg Cu/kg de ração balanceada).

Adicionalmente, espécies radicalares parecem ser participantes ativos no processo de glicoxidação. A principal espécie radicalar em sistemas biológicos oxigenados é o radical superóxido ($O_2^{\cdot-} + H^+ \rightleftharpoons HO_2^{\cdot}$) formado na cadeia transportadora de elétrons de mitocôndrias, cloroplastos e retículo endoplasmático. Embora este radical seja relativamente não-reativo, em comparação com outras espécies, no meio biológico ele pode ser convertido em ROO[·] (peróxil), RO[·] (alcoxil), ou HO[·] (hidroxil), muito mais reativos, especialmente este último. Também pode reagir com o óxido nítrico, [·]NO, dando o chamado peroxinitrito, ($O=NOO^{\cdot-} + H^+ \rightleftharpoons O=NOOH$). Radicais hidroxil podem se originar nas chamadas reações tipo-Fenton, em que íons metálicos participantes de ciclos redox são reduzidos pelo radical superóxido e posteriormente reoxidados pelo produto de sua dismutação, o peróxido de hidrogênio [58]. Íons metálicos de importância biológica, notadamente o ferro e o cobre, são capazes de clivar peróxidos orgânicos (ROOH) quando nas suas formas reduzidas (Cu^I ou Fe^{II}), com formação de outros radicais (RO[·] ou ROO[·]) que propagam a reação em cadeia, até a geração de produtos finais estáveis, em etapas de terminação da reação em cadeia, dando origem ao chamado estresse oxidativo, conforme mostrado no Esquema 2.

Esquema 2 – Etapas de estresse oxidativo envolvendo íons metálicos e espécies reativas de oxigênio



onde M = Fe ou Cu

Mostrou-se que a formação de N^ε-(carboximetil)lisina (**CML**) a partir de produtos de Amadori é mediada por radicais hidroxil [56]. A incubação de albumina altamente glicada, contendo altos teores de produtos de Amadori (mas não CML), com íons de ferro(II) levou à formação de CML, que foi acentuada em presença de peróxido de hidrogênio.

Também a ocorrência de ligações cruzadas (*cross-linking*) em peptídeos β-amilóides depositados, contendo AGEs e acumulando íons de cobre ou ferro, foi observada. Estes depósitos in vivo estão relacionados ao Mal de Alzheimer [59, 60]. Estudos em que peptídeos β-amilóides sintéticos foram incubados com glucose ou frutose mostraram a formação de oligômeros, com alta massa molecular e com ligações cruzadas, e que é acelerada em presença de quantidades micromolares de cobre ou ferro [61]. A formação de AGEs neste sistema pode ser inibida por antioxidantes ou por quelantes capazes de inativar o ciclo redox do metal.

Assim, diferentes ligantes coordenados a íons de ferro ou cobre podem interferir de maneira diferenciada em suas propriedades catalíticas, através de diferenças nos potenciais redox, estabilizando mais a forma reduzida ou a oxidada. Poder-se-ia, portanto, modular as propriedades do metal utilizando diversos ligantes. No caso do cobre, é mais provável a formação da espécie [LCu·OH] [62], já que danos oxidativos sítio-específicos têm sido verificados, indicando a formação de tal espécie “engaiolada”, em vez de radicais hidroxil “livres”, embora em presença de agentes redutores, como ascorbato ou glutatona, estes radicais livres tenham sido detectados [63].

Na oxidação de proteínas, catalisada por metais de transição, a localização do íon ativo é extremamente importante e resíduos, como His, Lys, Cys ou Met, capazes de coordenar esses íons metálicos, especialmente de cobre, podem sofrer reações localizadas (*site-specific reactions*). Isto foi observado, por exemplo, na oxidação da enzima Cu,Zn SOD, em que grupos His foram oxidados a 2-oxo-His, com concomitante redução e mobilização do cobre [64].

Outra fonte destas espécies radicalares ou de espécies com reatividade semelhante a espécies radicalares, *in vivo* e/ou *in vitro*, é a oxidação catalisada por íons metálicos de grande variedade de biomoléculas, incluindo açúcares e aminas.

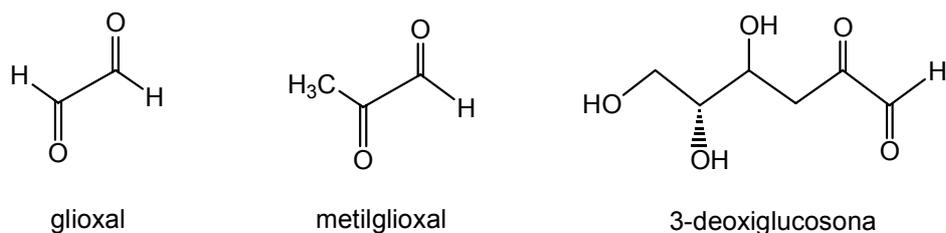
A oxidação catalisada de açúcares e de produtos da glicação de proteínas catalisada por íons metálicos pode gerar radicais que iniciam e propagam os danos oxidativos às proteínas. Proteínas glicadas podem coordenar até 3 vezes mais cobre que a proteína normal [65]. Durante a incubação de proteínas com glucose já foi demonstrada a formação de uma série de produtos oxidados, como hidroperóxidos de aminoácidos alifáticos, L-dopa, ditirosina, produtos da hidroxilação de fenilalanina, etc.

Glioxal e arabinose, por exemplo, principais produtos da autooxidação da glucose, podem formar N^ε-(carboximetil)lisina (**CML**) e participar da geração de pentosidina fluorescente, respectivamente [27, 66].

Metilglioxal e 3-deoxiglucosona (vide Esquema 3), que são observados *in vivo*, podem participar de reações autoxidativas contribuindo para o escurecimento de proteínas em reações de Maillard. A inibição da interligação de proteínas (como no

colágeno) foi observada sob atmosfera de nitrogênio ou em presença de agentes quelantes, confirmando a importância de eventos oxidativos e catalisados, isto é, oxidações catalisadas por íons metálicos em presença de oxigênio molecular.

Esquema 3 - Compostos α -dicarbonílicos, usualmente formados em reações de glicação.



Glioxal e metilglioxal são metabólitos fisiológicos. Glioxal é formado lentamente e espontaneamente na degradação oxidativa da glicose [67], ou de proteínas glicadas [68], e ainda na peroxidação lipídica. Metilglioxal, além de ser formado na degradação enzimática e não-enzimática de proteínas glicadas, é liberado no metabolismo da aminoacetona, um metabólito da glicina e metionina [69].

Ambos estes compostos são detoxificados pelo sistema glicoxalase I e II, enzimas de zinco que têm glutatona como cofator, e estão presentes no citosol de todas as células, sendo convertidos a glicolato e D-lactato, respectivamente [70]. Juntamente com a 3-deoxiglicose, são acumulados em células submetidas a estresse oxidativo (por exemplo, tratadas com H_2O_2 30 mM ou 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 75 μM). Esse acúmulo de glioxal, metilglioxal e outros α -oxoaldeídos pode levar à modificação do DNA, dando lugar a mutagenese e apoptose, além de modificações de proteínas, com sua conseqüente degradação e inibição de enzimas [71].

1.4. A Albumina

A albumina tem sido uma das proteínas mais estudadas devido à sua estabilidade, baixo custo e utilidade. Esta proteína foi reconhecida como principal componente do sangue antes de 1839. Pesquisas anteriores referem-se à proteína

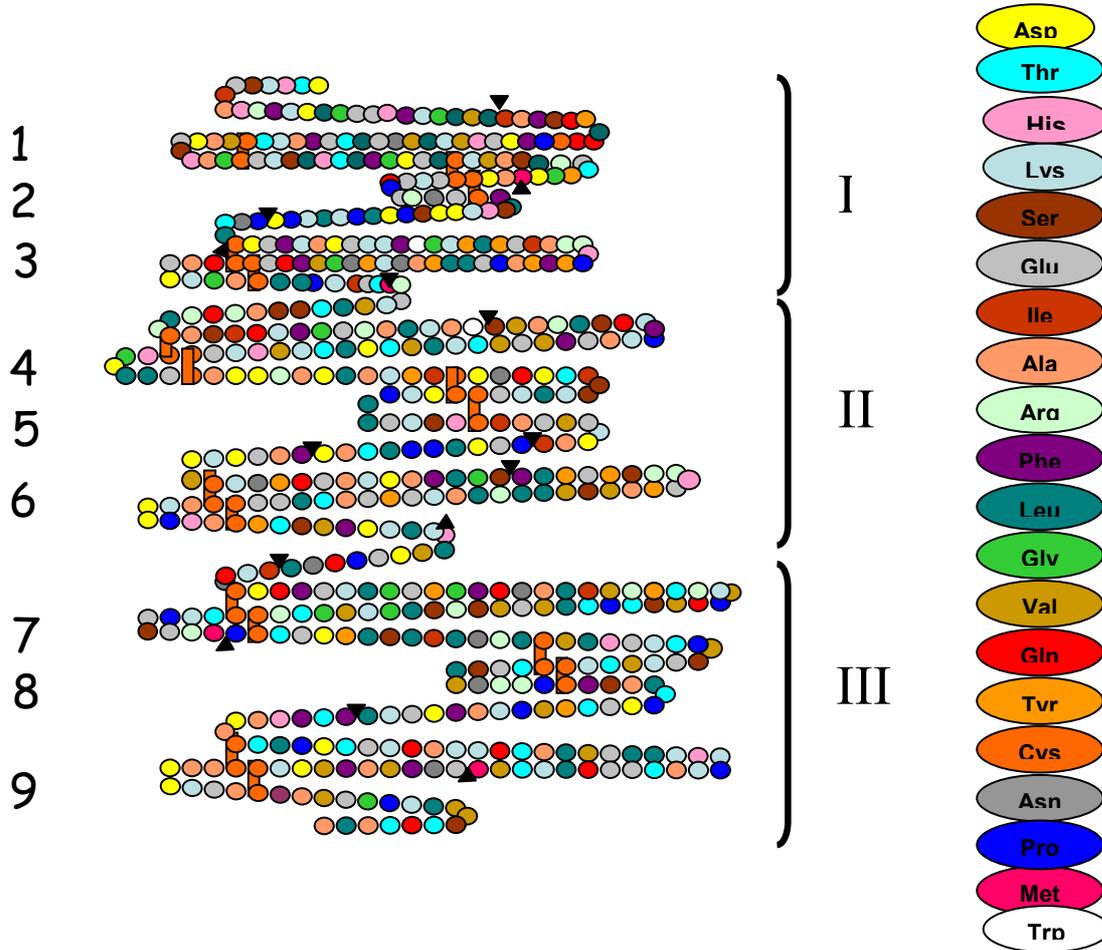
como *albúmem* derivado do latim *albus* após a cor branca dos precipitados floculentos produzidos por várias proteínas.

A albumina é a proteína mais abundante no sistema circulatório com concentração sanguínea típica de 5g/100mL contribuindo em 80% da pressão osmótica sanguínea, além disso, a albumina é a responsável pela manutenção do pH do sangue [72].

Esta proteína pode ser considerada um quelante fisiológico. É sintetizada no fígado tendo meia vida de 21 dias. A albumina também tem a função de atuar como um transportador não específico para uma variedade de moléculas e íons como o hormônio estrogênio, drogas como as sulfonamidas, penicilina, aspirina ou cortisonas, ácidos graxos livres e metais como Ca, Mg, Cu e Zn, entre outros [73]. Esta diversidade ocorre porque a albumina possui vários sítios passíveis de ligação em sua molécula.

Esta proteína é constituída de 585 aminoácidos arranjados em uma única cadeia polipeptídica, contendo 17 pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína e um grupo SH livre (Cys 34). A molécula pode ser dividida em três domínios de estrutura similar com 9 alças. Pelo Esquema 4 pode-se observar a seqüência de aminoácidos e das pontes dissulfeto para a albumina bovina. Através desse esquema, notamos a presença das 9 alças organizadas nos 3 domínios, semi-autônomos, mas homólogos. Este esquema foi proposto com base no alinhamento vertical das seqüências Cys-Cys que ocorrem nas alças duplas. Os triângulos pretos mostrados no Esquema 2 representam os sítios de clivagem específica para produzir os respectivos fragmentos. A albumina é constituída de uma única cadeia polipeptídica e, portanto, não é composta por subunidades [74].

Esquema 4. Seqüência de aminoácidos e de pontes dissulfeto para albumina bovina.



Adaptado de Theodore Peters, Jr., *Adv. Protein Chem.*, 17, 161-245, **1985**.

Em geral, as albuminas de mamíferos possuem um baixo conteúdo de triptofano e metionina e um alto conteúdo de cisteína e de aminoácidos carregados como os ácidos aspártico e glutâmico, além da lisina. A albumina bovina apresenta dois triptofanos (Trp 134 e Trp 212) o que a diferencia da albumina humana que apresenta apenas um triptofano (Trp 214). Além disso, a diferença entre a BSA e a HSA no sítio N- terminal resume-se a um aminoácido, sendo Asp-Thr-His para a BSA e Asp-Ala-His para HSA. Comparativamente existe uma seqüência homóloga de 76% entre as albuminas bovina e humana.

A molécula de albumina em solução pode ser considerada uma elipse de 41Å x 141Å, na forma de um charuto grosso, o volume do seu interior não é preenchido

somente pela cadeia peptídica constituinte da proteína, mas também por moléculas de água que são afetadas pela proximidade da proteína [75].

A albumina possui uma distribuição de carga assimétrica em sua estrutura primária. A pH neutro, Peters [74] calculou uma carga total de -10, -8 e 0 para os domínios I, II e III, respectivamente para a albumina humana, sendo que uma distribuição semelhante está presente em outras albuminas. Portanto, a carga negativa é bem alta no sítio N-terminal e menor no domínio C-terminal proporcionando, então, uma molécula com assimetria elétrica ou de cargas.

Dados de cristalografia mais recentes sugerem que a forma correta para albumina é a de um coração que se aproxima de um triângulo equilátero de 80 Å de lado e 30 Å de profundidade. Uma visão geral da propriedade de ligação da albumina está ilustrada na Figura 1.

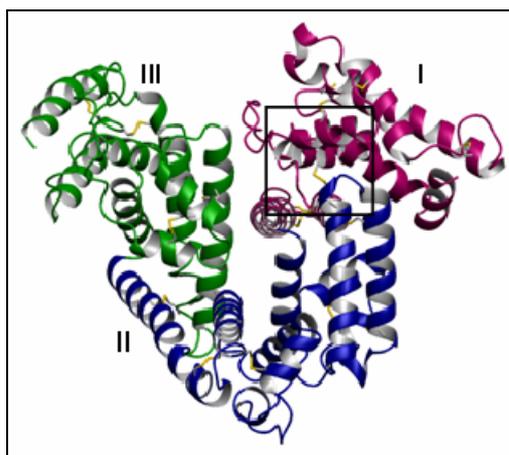


Figura 1. Principais sítios de ligação da albumina.

A posição de sítios de ligação para marcadores farmacêuticos importantes como diazepam, ibuprofeno, aspirina e warfarina e para marcadores endógenos como triptofano e bilirrubina também é mostrada. Em termos de metais temos dois sítios importantes, a cisteína 34 (Cys 34), que é considerada sítio de ligação para metais pesados como ouro e mercúrio, e o sítio amino-terminal importante para o cobre(II) [76].

Tanto a albumina bovina quanto a humana apresentam uma seqüência N-terminal X-Y-His que constitui um forte sítio fisiológico de coordenação para íons de

cobre(II). Este sítio é estável, pois, os 4 nitrogênios do tri-peptídeo amino-terminal formam uma forte coordenação quadrado planar com o metal.

Além do sítio N-terminal, estudos indicam que existe um segundo sítio não específico de coordenação para íons cobre(II) [77]. Este segundo sítio foi descrito como sendo multi-metal, já que Zn(II), Ni(II) e Cd(II), também são capazes se coordenar. Outros estudos mostraram que em pH alto (~9,0) um segundo íon de cobre(II) se liga a proteína numa conformação tetragonal, através de uma ligação tiolato, provavelmente pela deprotonação da Cys-34 [78].

A albumina é sem dúvida uma molécula extraordinária, de múltiplas funções e aplicações. Ainda que a função exata da albumina seja questionada, muitos dados ainda suportam a noção de que o papel principal da albumina no sistema circulatório é auxiliar no transporte, metabolismo e distribuição de ligantes exógenos e endógenos.

1.5. Complexos de cobre com ligantes imínicos

As bases de Schiff constituem uma classe de compostos orgânicos que possuem o grupo imina ($RR'C=N-R''$), formado pela condensação do grupo amina primário de uma molécula com o grupo aldeído ou cetona de outra. A reação da síntese da imina é reversível, envolvendo um intermediário carbinolamina, e a eliminação de moléculas de água [79-84], como esquematizado na Figura 2.

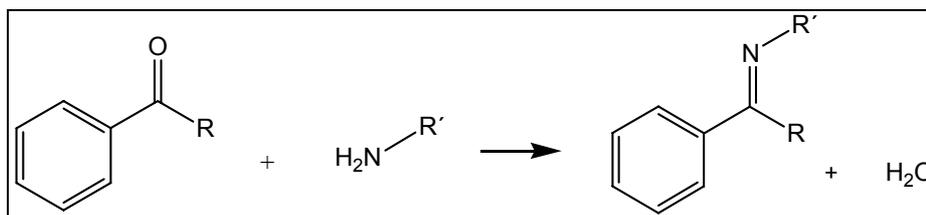


Figura 2. Exemplo da formação da base de Schiff ou imina.

As iminas formam muito facilmente complexos de coordenação estáveis, com a maioria dos metais de transição, reagindo rapidamente e sendo isoladas do meio reacional sem grandes dificuldades. A estabilidade térmica e a facilidade de formar complexos metálicos em diferentes estados de oxidação possibilitam a utilização destes compostos em diversos processos catalíticos [85] e também em estudos

bioinorgânicos [86]. Iminas contendo grupos usuais no meio biológico, como imidazol ou piridina, têm sido muito estudadas como ligantes de metais essenciais em compostos miméticos do sítio ativo de metaloproteínas [87,88].

Em nosso laboratório, diferentes complexos de cobre, ferro ou manganês com ligantes do tipo base de Schiff têm sido estudados [89], com a finalidade de verificar a estrutura e a reatividade desses compostos em processos catalíticos, especialmente aqueles envolvendo oxidação de substratos específicos, por oxidantes presentes no meio biológico (oxigênio ou peróxido de hidrogênio).

Estudos mais recentes em nosso laboratório sobre complexos de cobre com ligantes imínicos derivados de oxindóis mostraram que estes são bons agentes citotóxicos frente a diferentes células tumorais, com potencial aplicação como agentes antitumorais [90]. Já foi verificado em estudos anteriores que estes complexos catalisam a oxidação de carboidratos e podem causar danos oxidativos apreciáveis às proteínas HSA e BSA, num processo modulado pelo ligante [91].

Particularmente, tem grande interesse a isatina (2,3-dioxindolina) que é um oxindol endógeno encontrado em flúidos, no cérebro e em tecidos periféricos de mamíferos. Apresenta uma extensa gama de efeitos biológicos, incluindo ação antibacteriana, fungicida, antiviral e antiproliferativa e também atividade pró-apoptótica [92]. Sua concentração no sangue excede 1 μM , enquanto as concentrações em tecidos variam de 0,1 a 10 μM . Isatina tem um largo espectro de efeitos metabólicos e de comportamento, aumentando o estresse e sendo ansiogênico em baixas doses e sedativo em altas doses [93]. Além disso, a isatina exibe um interessante equilíbrio ceto-enólico que pode influenciar seus modos de coordenação, dando origem a complexos catiônicos ou neutros, com variadas formas estruturais e diferentes reatividades [94].

Alguns complexos de cobre(II) e outros metais de transição com isatina, ou seus derivados, foram descritos na literatura [95-98]. Compostos com ligantes do tipo quinolina-hidrazonas derivados da isatina foram sintetizados, e suas propriedades espectroscópicas e magnéticas foram investigadas [99, 100]. Mais recentemente, complexos de cobre(II) com isatina-tiosemicarbazona (relacionados com a droga antiviral metilsazona) foram preparados por métodos de condensação

usuais ou eletroquimicamente, sendo caracterizados por diferentes técnicas espectroscópicas [101-105]. Este tipo de complexos foi identificado como causador de significativa inibição de células humanas leucêmicas [106].

1.6. O cobre e o processo apoptótico

Sabe-se que o cobre é um metal de transição que devido à sua atividade redox atua como cofator em inúmeras enzimas e proteínas, desempenhando um papel fundamental no metabolismo celular. Por outro lado, também está envolvido em processos de dano celular, que podem gerar inúmeras doenças e até a morte celular, por necrose ou apoptose [107, 108].

A morte celular programada, chamada apoptose [109-111], é caracterizada por um imediato encolhimento celular diminuindo o contato entre as células. As organelas do citoplasma, tais como ribossomos, mitocôndrias, etc, permanecem intactas, sugerindo que a célula desempenha sua atividade metabólica por um tempo considerável. Como a membrana celular permanece intacta as organelas não saem da célula, e, portanto, não é observado processo inflamatório. O DNA (ou cromatina) se condensa principalmente perto das membranas, chegando a deixar as células com formatos pontiagudos. Juntamente com a condensação ocorre a fragmentação nuclear e posterior fragmentação celular gerando os chamados corpos apoptóticos. Estes fragmentos podem ou não ter fragmentos do núcleo original. Estes fragmentos podem ser removidos por macrófagos ou podem ser fagocitados por células epiteliais.

Existem essencialmente três situações em que se pode esperar que ocorra a apoptose:

- a) Suicídio celular utilitário: a morte de uma única célula ocorre para o bem da maioria. Neste caso, células perfeitamente saudáveis são instruídas pelo ambiente em que se encontram a se autodestruir, pois existem células demais presentes, ou é necessário mais espaço para reposicionamento ou reorganização dos tecidos. Isto ocorre extensivamente durante o desenvolvimento embrionário, ou em tecidos adultos no processo de

cicatrização, por exemplo. Uma observação importante nesta situação é que envolve a remoção de células saudáveis, não existe nenhuma indução a dano e, portanto, não ocorre mecanismo de reconhecimento ou resposta a danos;

- b) Senescência: as células reconhecem que estão velhas e iniciam a programação da sua morte. Outro mecanismo estudado é que, nos tecidos, outras células reconhecem o envelhecimento de uma célula e sinalizam para que ocorra o início da apoptose;
- c) Dano celular: as células podem detectar níveis muito baixos de dano a estruturas vitais como DNA ou membranas e, em vez de tentar reparar o dano, cometem suicídio. Reparar o dano leva a um risco de cometer algum erro ou mudar o DNA, o que poderia dar origem a uma mutação.

A apoptose pode ser chamada de morte programada da célula e este tipo de morte celular é bem mais complexo do que a necrose [112,113], já que envolve processos controlados e programados para cada célula individual. A Tabela 1 apresenta as principais diferenças entre necrose e apoptose.

Tabela 1. Diferenças gerais entre necrose e apoptose

Apoptose	Necrose
Afeta células isoladas	Afeta clusters celulares
Não há resposta inflamatória	Ocorre inflamação
Membrana celular intacta	Ocorre ruptura da membrana celular
Encolhimento celular	Inchamento celular
Perda de contato entre as células	Modificações nas membranas
Estrutura das organelas é mantida	Perda da estrutura das organelas
Condensação do citoplasma e do DNA	Aumento da mitocôndria
Fragmentação do núcleo	Ruptura celular imediata
Remoção por fagocitose	Remoção por macrófagos

A apoptose pode se dar por duas vias: o caminho extrínseco, onde receptores específicos para morte celular localizados na membrana celular são ativados, e o caminho intrínseco, onde a mitocôndria está primariamente envolvida. Acredita-se que os principais fatores causadores da apoptose são desequilíbrio no estado redox da célula, o que envolve disfunções na mitocôndria, e produção de ROS, com conseqüente geração de estresse oxidativo [114].

Considerando que em um sistema celular o valor do pH é constante, o estado redox depende essencialmente do equilíbrio entre três pares redox: o sistema nicotinamida/dinucleotídeo fosfato, $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, que tem o potencial mais negativo e, assim, constitui fonte principal de elétrons para os outros sistemas; o sistema tioredoxina, $\text{Trx}_{\text{red}}/\text{Trx}_{\text{oxid}}$, e o sistema glutationa, $\text{GSSG}/2\text{GSH}$, considerado o principal sistema tampão redox celular, por estar presente em maior quantidade com relação aos outros, apesar de seu potencial não ser o menor [115]. Alterando-se o equilíbrio redox deste último par ($\text{GSSG}/2\text{GSH}$), pode-se alterar todo o funcionamento celular, pois a glutationa representa um cofator de muitas reações essenciais à célula.

A morte celular é quase sempre associada a um ambiente oxidante, ao contrário do crescimento, que é associado a um ambiente redutor [116, 117]. Numerosas espécies pró-oxidantes são capazes de induzir a apoptose aumentando a concentração de ROS e outras espécies oxidantes, que então iniciam uma cascata de sinalizadores de morte bastante complexa, envolvendo proteínas como caspases (proteases de cisteína) [118], p38, p53 e p21, e proteínas kinases (JNK) [119], entre outras proteínas capazes de regular o ciclo celular.

Fica claro que a participação da mitocôndria na apoptose é extremamente importante [120]. Muitos estudos mostraram que durante a apoptose a disfunção mitocondrial parece ser, principalmente, o resultado de uma permeabilização específica da membrana externa para moléculas grandes, incluindo a citocromo c. A perda da citocromo c da membrana interna para a membrana externa resulta no prejuízo da respiração mitocondrial, bloqueando o transporte de elétrons entre o complexo III (citocromo c redutase) e o complexo IV (citocromo c oxidase) da cadeia respiratória. Além disso, quando liberada, a citocromo c promove a ativação da pró-caspase-9 que ativa a caspase-3, e o subsequente co-envolvimento de outras caspases na cascata de reações, que resulta nos fenótipos apoptóticos observados na célula [121, 122].

Os danos provocados por ROS são causados principalmente pela alta reatividade destas espécies frente à oxidação de cadeias hidrocarbônicas dos ácidos graxos insaturados, dos resíduos de aminoácidos de proteínas, de carboidratos e de

bases nitrogenadas dos ácidos nucléicos. Os danos oxidativos causados por ROS levam, em casos extremos, a alterações e ao comprometimento da função de todas as estruturas e macromoléculas celulares, com conseqüente morte celular [123-127]. Apenas em baixas concentrações as espécies reativas de oxigênio são reconhecidas como mensageiras no processo de tradução de sinal celular, por duas maneiras: fosforilação de proteínas ou mudança de grupos tióis nas proteínas [128, 129].

A geração desequilibrada de ROS no meio e suas conseqüências celulares, como a apoptose, podem ser causadas pela presença de metais em excesso na célula, como o cobre. Uma das conseqüências de altos níveis de cobre nas células é o aumento da taxa de formação de espécies reativas, como ROS, levando a danos oxidativos, com destruição da bicamada lipídica, alterando funções protéicas e gênicas. Íons de cobre também podem participar da ativação da apoptose, embora seu mecanismo de ação não seja bem conhecido [21]. Recentemente, foi identificada uma proteína celular que se liga ao cobre, a Prion proteína (PrP^c), que regula o nível de peróxido de hidrogênio intracelular, prevenindo a apoptose induzida por cobre [130, 131]. O cobre se liga à Prion em um sítio majoritário de Cu(II), identificado no N-terminal, e esta proteína tem uma participação direta no metabolismo do cobre no cérebro. Embora a função fisiológica fundamental desta proteína não esteja bem definida, sabe-se que sua deficiência resulta em fenótipos neuronais sensíveis ao estresse oxidativo induzido por O₂⁻ e H₂O₂. Este fato mostra que o organismo tem mecanismos de intenso controle do cobre, especialmente em células neuronais, para evitar a apoptose indesejada em células saudáveis por ação deste elemento.

A necessidade de busca por terapias anti-tumorais mais baratas e simples teve como conseqüência o aumento da pesquisa por drogas pró-apoptóticas baseadas em complexos metálicos, além da possibilidade de elucidar a ação dos metais no organismo, através do estudo de complexos estáveis [132, 133].

Os complexos de cobre têm sido os mais estudados com o objetivo de se projetar novas drogas antitumorais, elucidando o papel dos complexos na indução da apoptose. Complexos de Cu²⁺ e Zn²⁺ com prodigiosina foram sintetizados com o objetivo de se avaliar a clivagem do DNA mediada por cobre [134-136]. Compostos naturais, presentes no chá verde, como o Galato de epigalocatequina, mostraram

atividade de inibição de proliferação de células do adenoma de próstata humana (PCA) bastante aumentada na presença de íons cobre(II) [137]. A amicacina, um antibiótico aminoglicosídeo, teve sua atividade danosa ao DNA aumentada ao ser complexada a cobre(II), indicando que a ligação com o metal pode gerar ROS, que seriam as responsáveis pelo aumento da sua atividade [138]. Estes e outros resultados semelhantes levaram a estudos cada vez mais intensos neste campo. Apesar do mecanismo de ação do cobre nas células tumorais ainda ser obscuro, alguns pesquisadores crêem que a apoptose não é devida a danos oxidativos mediados por cobre em proteínas. Concluem que certos tipos de ligantes orgânicos agem se coordenando ao cobre presente naturalmente em células tumorais, formando um potente inibidor de proteasoma e indutor de apoptose, nas concentrações de cobre encontradas nestes tecidos [139].

Diversos complexos de cobre(II) tiveram deste modo suas atividades biológicas avaliadas, especialmente relacionadas a danos ao DNA e à apoptose [140-143]. Particularmente, alguns destes complexos podem gerar eficientemente ROS, durante a catálise de substratos endógenos, que subseqüentemente atacam biomoléculas, disparando o estresse oxidativo [144-146]. Este estresse oxidativo conduzido por espécies parcialmente reduzidas de oxigênio pode ser amplificado pela reatividade do cobre [147-149], levando à injúria de moléculas essenciais como proteínas, lipídeos e DNA, sendo um importante estímulo para a apoptose [123]. A partir destes estudos fica claro que alguns complexos de cobre podem interferir no ciclo celular em diferentes níveis, causando a apoptose (o que é muito interessante quando se trata de células tumorais), mas o mecanismo de seu modo de ação permanece ainda sem elucidação.

Todos estes fatores estimulam estudos biológicos intensos de alguns complexos imínicos de cobre(II) como causadores da apoptose celular [150]. Por esta razão, também nos interessamos pelo estudo de compostos imínicos, contendo grupos imidazol, piridina, pirazina ou indol, que apresentam atividade catalítica frente a substratos biológicos, com implicações biológicas.

2. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi a investigação da reatividade de complexos de cobre(II) com ligantes diimínicos em processos oxidativos, especialmente na oxidação de proteínas. Inicialmente, sabendo-se que a oxidação de carboidratos inicia a glicoxidação de proteínas e que íons metálicos como cobre podem estar envolvidos neste processo, complexos de cobre(II) com ligantes do tipo base de Schiff, com propriedades redox diversificadas e moduladas pelo ligante, foram preparados e utilizados para o estudo cinético da oxidação de carboidratos simples, como glucose, frutose e galactose, afim de se determinar a eficiência destes complexos como catalisadores deste processo.

Adicionalmente, a interação destes complexos de cobre com a proteína albumina (HSA e BSA) foi investigada, principalmente através de técnicas espectroscópicas (CD, EPR, UV/Vis) e de SDS-PAGE, para verificação do sítio preferencial de coordenação ou inserção do metal. A estabilidade termodinâmica relativa destes compostos foi determinada, através das respectivas constantes de estabilidade, comparadas à da espécie cobre-albumina [Cu-BSA].

A detecção e a identificação de possíveis danos oxidativos às proteínas e outras biomoléculas, com conseqüente formação de grupos carbonílicos, clivagem e/ou geração de radicais livres, pela ação dos complexos de cobre, tanto em presença como na ausência de peróxido de hidrogênio, também foram investigadas. Para estes estudos as técnicas espectroscópicas de UV/Vis, EPR e SDS-PAGE foram utilizadas.

Por fim, estudos sobre a influência dos complexos de cobre(II) estudados na respiração mitocondrial foram realizados com o objetivo de elucidar melhor a participação do metal e do ligante no processo de apoptose, já que muitos destes compostos mostraram anteriormente atividade pró-apoptótica, dependente do ligante, com geração de espécies reativas de oxigênio.

3. Parte Experimental

3.1. Reagentes:

Os reagentes utilizados nas várias sínteses foram obtidos da Merck ou da Sigma/Aldrich Chemical Co. A água para preparo de todas as soluções foi deionizada em aparelho Barnstead, modelo D 4700. O sistema deionizador é composto por um conjunto de 4 filtros cilíndricos, contendo resina para captura de íons e carvão ativado para captura de material orgânico.

3.2. Métodos e Instrumentação:

- **Análise Elementar:**

A análise elementar de C, N e H dos complexos sintetizados foi realizada pela Central Analítica do IQ-USP, em um ELEMENTAR ANALYZER CHN modelo 2400 da Perkin Elmer, que permite a determinação de porcentagens de carbono, nitrogênio e hidrogênio, com erro absoluto entre 0,3 e 0,5.

- **Espectroscopia Eletrônica:**

Os espectros de absorção na região do visível e ultravioleta foram obtidos em um espectrofotômetro UV/Visível, modelo 1650 PC da SHIMADZU, utilizando-se cubetas de quartzo, de caminho óptico de 1,00 cm.

- **Espectroscopia no Infravermelho:**

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro MB 102, da ABB Bomem, por reflectância, na região de 4000 a 400 cm^{-1} , a partir de pequenas porções dos complexos sintetizados, triturados e homogeneizados com KBr anidro.

- Consumo de oxigênio:

O consumo de oxigênio durante as reações de oxidação de carboidratos na presença de complexos de cobre, foi monitorado através de um oxígrafo da marca GILSON (MedicalElectronics Inc. USA), que permite a verificação do oxigênio consumido no meio reacional. Este equipamento é composto por uma cela de volume igual a 1,8 mL, que está conectada a um eletrodo sensível ao oxigênio, o chamado eletrodo de Clark (Pt, com referência interna de Ag/AgCl), envolto por uma membrana de poliestireno e com uma gota de solução saturada de KCl entre o eletrodo e a membrana, para passagem da corrente elétrica. A cela possui uma tampa com pequeno orifício para evitar a troca gasosa com o meio e possui também um pequeno agitador magnético, além de ser termostaticada por a um banho que mantém a temperatura constante.

Já nos experimentos de determinação da influência dos complexos de cobre(II) na respiração mitocondrial utilizou-se um instrumento semelhante, o oxígrafo DW1 Oxygen Electrode Chamber, da Hansatech Instruments, operando a 37°C.

- Dicroísmo Circular:

As medidas foram efetuadas em um espectropolarímetro JASCO J-720, no intervalo de 300 a 650 nm, utilizando-se uma cela de quartzo esférica, de 1,00 cm de caminho óptico. Nestas medidas, adições de solução do complexo de cobre estudado eram adicionadas a uma solução da proteína albumina, sendo o espectropolarograma registrado em seguida.

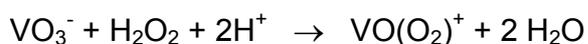
- Ressonância Paramagnética Eletrônica:

Os espectros de EPR foram registrados em um espectrômetro EPR da BRUKER, modelo EMX, operando na banda X ($\nu = 9,33$ GHz), com potência de 20mW e modulação de frequência de 100 kHz. Para as medidas de detecção de espécies radicalares em solução, utilizou-se tempol ($38\mu\text{M}$) como padrão e 5,5'-dimetilpirrolina-N-óxido (DMPO) como captador de spin. Para as medidas envolvendo o metal cobre, utilizou-se DPPH para calibração do campo magnético ($g = 2,0036$).

- Análise de Peróxido de Hidrogênio:

As soluções de peróxido de hidrogênio foram analisadas pelo método do vanadato, que é um método indireto e consiste na obtenção de um peroxo estável de vanádio(V), $\text{VO}(\text{O}_2)^+$, de coloração avermelhada. Esta espécie é resultante da adição de soluções de peróxido de hidrogênio a uma solução de vanádio, em meio fortemente ácido (H_2SO_4 0,5 M).

A equação química para o processo é a seguinte:



A análise é realizada espectrofotometricamente, com λ_{max} entre 450 e 460 nm e absorvidade molar $\varepsilon = 360 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

- SDS-PAGE

Os experimentos de SDS-PAGE unidimensional foram realizados utilizando-se o equipamento mini-VE Vertical Electrophoresis System, da Amersham Biosciences. O gel de poliacrilamida a 12% foi corrido por 3 horas, a 100mV e 25mA.

- Medidas de Fluorescência:

Para realização destes experimentos utilizou-se um espectrofluorímetro SPEX-fluorolog 2 e cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm, velocidade de varredura de 1 nm/s, com fenda de 0,5 nm para excitação e 2,0 nm para emissão.

- Determinação da formação de grupos carbonil

Danos oxidativos à albumina bovina foram estimados pela formação de grupos carbonil, monitorados através da obtenção das correspondentes dinitrofenil-hidrazonas, pela reação com dinitrofenil-hidrazina (DNPH). Os respectivos espectros de absorção na região do visível foram obtidos em um espectrofotômetro UV/Vis modelo 1650 PC da SHIMADZU, utilizando-se cubetas de quartzo de caminho óptico de 1,00 cm. Estes derivados hidrazonas são estáveis, apresentando forte coloração amarela ou laranja, podendo ser estimados espectrofotometricamente em $\lambda = 360$ -

390 nm. O valor de absorvidade molar ($\epsilon = 2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) foi utilizado para quantificar a formação de grupos carbonil.

3.3. Sínteses

Foram sintetizados vários complexos de cobre(II) do tipo diimínico, anteriormente estudados em nosso laboratório, além da síntese de um novo composto de zinco, baseados em método geral descrito na literatura [151].

- Complexos de Cobre:

a) **[Cu(apzhist)OH]ClO₄**

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 4 mmols (736 mg) de histamina di-hidroclorato dissolvidos em 50 mL de metanol a 2 mmols (740 mg) de perclorato de cobre(II) hexa-hidratado dissolvidos em 10 mL de água deionizada. O pH da solução foi ajustado de 3 para 9 com uma solução saturada de bicarbonato de sódio e, nessa etapa, a solução azul claro foi escurecendo até azul marinho. Foram adicionados então 2 mmols (244 mg) de acetilpirazina previamente destilada, dissolvidos em 15 mL de metanol, gota a gota. Após uma hora de reação a solução resultante foi levada para o freezer e mantida a -4°C por aproximadamente 1 hora. O precipitado roxo obtido foi filtrado e lavado com água deionizada e metanol gelados, e posteriormente seco em dessecador à vácuo. O rendimento foi de 77%.

b) **[Cu(apyhist)OH]ClO₄**

Em um balão foram adicionados 4 mmols (736 mg) de histamina di-hidroclorato dissolvidos em 50 mL de metanol a 2 mmols (740 mg) de perclorato de cobre(II) hexa-hidratado dissolvidos em 10 mL de água deionizada, sob agitação. O pH da solução foi ajustado para 9 com uma solução saturada de bicarbonato de sódio, sendo que nessa etapa foi observado um escurecimento gradual da solução azul claro até azul marinho. Foram adicionados, em seguida, 2 mmols (0,207 mL) de acetilpiridina dissolvidos em 15 mL de metanol, gota a gota. Após uma hora de reação a solução resultante foi levada para o freezer e mantida a -4°C por

aproximadamente 1 hora. O precipitado violeta obtido foi filtrado e lavado com água deionizada e metanol gelados, sendo depois seco em dessecador a vácuo. O rendimento foi de 69%.

c) [Cu(apyhist)H₂O](ClO₄)₂

Em um balão, 4 mmols (736 mg) de histamina di-hidroclorato dissolvidos em 50 mL de metanol foram adicionados a 2 mmols (740 mg) de perclorato de cobre(II) hexa-hidratado dissolvidos em 10 mL de água deionizada, sob agitação. O pH da solução foi ajustado de 3 para 6 com uma solução saturada de bicarbonato de sódio e, nessa etapa, a solução azul claro foi escurecendo até azul escuro. Foram então adicionados 2 mmols (244 mg) de acetilpirazina dissolvida em 15 mL de metanol, gota a gota. Após uma hora de reação a solução resultante foi levada para a geladeira, sem nenhum precipitado aparente. Após 6 dias, cristais verde escuro brilhantes foram observados, filtrados e lavados com água deionizada e metanol gelados, e então secos em dessecador à vácuo. O rendimento foi de 52%.

d) [Cu(isaepy)₂](ClO₄)₂

Dissolveu-se 10 mmol de isatina em 25 mL de etanol e 25 mL de diclorometano. Adicionou-se então, lentamente, 10 mmol de 2-(2-aminoetil)piridina à solução de isatina e, em seguida, ajustou-se o pH para 5,5 com HCl concentrado, mantendo-se a solução resultante sob agitação constante durante 24 horas. Após esse período houve a formação de um sólido amarelo claro. Adicionou-se então, lentamente, 5 mmol de perclorato de cobre(II) hexa-hidratado dissolvidos em 5 mL de água destilada, ajustou-se o pH em 7,5 com solução saturada de NaOH e manteve-se a solução resultante sob agitação por 12 horas. Formou-se um fino precipitado marrom, que foi filtrado e lavado com etanol e éter etílico gelados. Secou-se o composto obtido em dessecador a pressão reduzida. O rendimento foi de 68%.

e) $[\text{Cu}(\text{isami})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$

Dissolveu-se 4 mmol de isatina em 30 mL de etanol e diclorometano (10%), sendo o pH ajustado para 5 com HCl concentrado. Adicionou-se em seguida uma solução de 4 mmol de 8-aminoquinolina em 10 mL de etanol e manteve-se a agitação por 20 horas, à temperatura ambiente. Adicionou-se então 4 mmol de perclorato de cobre(II) hexa-hidratado dissolvidos em 5 mL de água destilada e imediatamente formou-se um precipitado marrom claro. Manteve-se a agitação por mais 4 horas e o balão foi colocado na geladeira por 24 horas. Filtrou-se e lavou-se com etanol e éter etílico gelados. Secou-se o composto final obtido em dessecador, sob pressão reduzida. O rendimento foi de 74%.

- Complexo de zinco:

$[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$

Dissolveu-se 10 mmol de isatina em 35 mL de etanol e 35 mL de diclorometano. Adicionou-se, lentamente, 10 mmol de 2-(2-aminoetil)piridina, dissolvida em 5 mL de etanol à solução de isatina e, em seguida, ajustou-se o pH para 5,5 com HCl concentrado, e manteve-se sob agitação constante durante 24 horas. Após esse período observou-se a formação de um sólido amarelo claro. Adicionou-se lentamente 5 mmol de cloreto de zinco dissolvido em 5 mL de água destilada, ajustou-se o pH em 7,5 com solução saturada de NaOH e manteve-se a agitação por mais 3 horas. Formou-se um fino precipitado laranja, que foi filtrado e lavado com etanol e éter etílico gelados. Secou-se o composto obtido em dessecador a pressão reduzida. O rendimento foi de 78%.

3.4. Reatividade dos complexos de cobre(II) frente à oxidação de carboidratos por oxigênio molecular

Para estes estudos foram escolhidos três carboidratos, frutose, glucose e galactose, e três complexos de cobre(II), $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$, $[\text{Cu}(\text{apyepy})\text{OH}]^+$ e $[\text{Cu}(\text{isaen})]^+$, para atuarem como catalisadores na oxidação pelo oxigênio molecular. Este último composto foi utilizado como parâmetro de comparação para os outros

dois complexos, já que em estudos anteriores em nosso laboratório [152], foi um dos mais reativos dentro da série de catalisadores então estudados.

Foram preparadas soluções de concentração 0,5 mM de cada complexo em tampão carbonato 150 mM e soluções de concentração 1,0M de cada carboidrato.

Nestes estudos foi utilizado um oxígrafo GILSON, que é um equipamento que permite o monitoramento do consumo de oxigênio durante uma reação. O tampão, o catalisador e o substrato foram adicionados na cela do oxígrafo, nesta ordem, em volumes precisos para obter-se a concentração final desejada. O tempo de aquisição de cada curva variou entre 15 e 30 minutos, a temperatura foi mantida sempre constante a 25,0°C, controlada por um banho termostatizado, e o pH foi mantido em 12 pelo uso do tampão carbonato 150 mM, exceto quando houve variação do pH, dando prosseguimento ao estudo.

Estes experimentos foram divididos em etapas, sendo que em todas elas o oxígrafo foi calibrado sempre com o agente redutor ditionito de sódio, para obter o fundo de escala (zero % de oxigênio dissolvido), antes de ser efetuada qualquer medida. Todas as medidas foram feitas pelo menos em duplicatas, sendo que algumas foram repetidas mais vezes.

Na primeira parte, variou-se a concentração do catalisador (complexo de cobre(II)), mantendo-se a concentração dos carboidratos constante em 1,0M e utilizando tampão carbonato 150 mM, pH=12,0 e temperatura de 25,0°C, e o tempo de corrida foi de 30 minutos. Neste caso, monitorou-se a reação de cada catalisador $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$, $[\text{Cu}(\text{apyepy})\text{OH}]^+$ e $[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]^+$, com cada um dos três substratos: frutose, glucose e galactose.

Na segunda etapa, o carboidrato escolhido para o estudo foi a galactose e, então, variou-se sua concentração, mantendo-se constante a concentração do catalisador em 0,1 mM, utilizando tampão carbonato 150 mM, pH=12,0 e temperatura de 25,0°C. O tempo de medida foi de 15 minutos e os catalisadores usados foram os mesmos da etapa anterior, isto é, $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$, $[\text{Cu}(\text{apyepy})\text{OH}]^+$ e $[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]^+$.

Para dar continuidade ao estudo escolheu-se como catalisador para esta nova fase apenas o $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$, e o carboidrato continuou sendo a galactose. Agora,

variou-se a concentração do tampão carbonato, mantendo-se constante a concentração do catalisador em 0,1mM e do substrato (carboidrato) em 1,0M. A temperatura foi mantida constante em 25,0°C e o pH=12,0.

Na última etapa o catalisador e o substrato utilizados foram respectivamente $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$ e a galactose, e variou-se o pH utilizando-se tampão carbonato 150 mM, para pH=12,0; pH=11,0 e pH=10,0, e tampão fosfato 150 mM para pH=9,0 e pH=8,0. A concentração do catalisador foi mantida constante em 0,1mM e a concentração do substrato (carboidrato) em 1,0M. A temperatura foi também mantida constante em 25,0°C.

3.5. Interação dos complexos de cobre(II) com biomoléculas

3.5.1. Estabilidade termodinâmica: medidas de Dicroísmo Circular

Para as medidas de estabilidade termodinâmica foram utilizados os seguintes complexos de cobre(II):

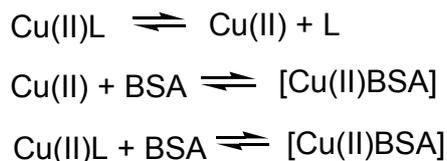
- $[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]^+$
- $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{isami})\text{H}_2\text{O}]^+$
- $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$

Foi determinada a constante de estabilidade termodinâmica relativa para cada complexo de cobre(II) separadamente, utilizando albumina bovina (BSA) como ligante competitivo, baseado em estudos semelhantes.

Foram adicionados em uma cela esférica de quartzo solução de BSA 0,7 mM e tampão fosfato 10 mM com pH = 7,3 e o primeiro espectro foi registrado no intervalo de 350 a 650 nm. Em seguida, foram sendo adicionadas quantidades crescentes de complexo de cobre e, depois de cada adição, um novo espectro foi registrado. O mesmo procedimento foi repetido para cada complexo de cobre(II) estudado.

Utilizou-se como controle o aqua-complexo, $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, que corresponderia ao máximo de metal inserido na proteína, em cada caso.

A capacidade de competição entre as bases de Schiff e a albumina bovina na coordenação de íons cobre(II) foi comparada para determinar a correspondente constante de estabilidade relativa, levando-se em conta os seguintes equilíbrios:



Sendo a constante β definida para cada complexo de cobre(II) como se segue:

$$\beta_{\text{rel}} = \frac{K_{\text{Cu(II)BSA}}}{K_{\text{Cu(II)L}}} = \frac{[\text{Cu(II)BSA}] \cdot [\text{L}]}{[\text{BSA}][\text{Cu(II)L}]}$$

onde:

$$[\text{L}] = [\text{Cu(II)BSA}]$$

$$[\text{Cu(II)L}] = [\text{Cu(II)}]_0 - [\text{Cu(II)BSA}]$$

$$[\text{BSA}] = [\text{BSA}]_0 - [\text{Cu(II)BSA}]$$

Utilizando os espectros de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ como referência, uma curva analítica foi construída, do sinal de CD versus concentração de cobre inserida na proteína, e, assim, foi possível calcular o valor de $[\text{Cu(II)BSA}]$ obtido para cada composto, pois:

$$y = ax + b$$

onde: y = amplitude em cm da banda CD observada e $x = [\text{Cu(II)BSA}]$

Para cada ponto teremos um valor de y que fornecerá um valor de β_{rel} , e assumindo que $\log K = 16,2$ para $[\text{Cu(II)BSA}]$ [153, 154], obteremos um valor médio de $\log K$ para cada composto de cobre(II).

3.5.2. Estudo espectrofotométrico dos complexos de cobre(II) na presença de BSA

Para avaliar melhor e complementar os dados obtidos com os experimentos de dicroísmo circular (CD), monitorou-se por espectroscopia UV/Vis os complexos de cobre(II) titulados com quantidades crescentes de albumina bovina.

Para este estudo foram utilizados os seguintes complexos de cobre(II):

- $[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]^+$
- $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{isami})\text{H}_2\text{O}]^+$
- $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$

As condições utilizadas foram: $[\text{CuL}] = 0,15 \text{ mM}$; $[\text{BSA}] = 0,7 \text{ mM}$; Tampão fosfato 50mM pH = 7,3 e $T = 25,0^\circ\text{C}$.

Em uma cubeta de quartzo com 2,0 mL de solução do CuL estudado foram feitas adições de 100, 200, 400, 800 e 1000 μL de solução de BSA. Após cada adição o respectivo espectro foi registrado.

3.5.3. Interação dos complexos de cobre(II) com plasma sanguíneo e albumina humana: Medidas de EPR

Medidas de EPR foram feitas para verificar a interação dos complexos de cobre(II) com albumina humana e plasma sanguíneo.

Para estes estudos foram utilizados os seguintes complexos de cobre(II):

- $[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]^+$
- $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{isami})\text{H}_2\text{O}]^+$

- $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$

Condições experimentais:

$[\text{HSA}] = 0,6 \text{ mM}$; $[\text{CuL}] = 300 \text{ }\mu\text{M}$; Tampão fosfato 50 mM $\text{pH} = 7,3$ e $T = 77\text{K}$.

Plasma sanguíneo após 12 horas de jejum

Todas as medidas foram feitas seguindo o mesmo procedimento.

Em um eppendorff, foram adicionados $200 \text{ }\mu\text{L}$ de CuL e $800 \text{ }\mu\text{L}$ do substrato (HSA ou plasma). A mistura foi agitada e uma alíquota foi retirada e congelada com nitrogênio líquido para a realização da primeira medida. O restante da mistura reacional foi incubado a $37,0^\circ\text{C}$. As medidas foram repetidas a cada 5 minutos, até completar 60 minutos de incubação, tanto para os experimentos com o plasma sanguíneo como com albumina (HSA).

3.5.4. Experimentos de SDS-PAGE

Este experimento foi realizado para verificar a possível interação dos complexos de cobre(II) com outras proteínas do plasma além albumina.

Para este estudo foram utilizados os seguintes complexos de cobre(II):

- $[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]^+$
- $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{isami})\text{H}_2\text{O}]^+$
- $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$

Condições experimentais:

O marcador de peso molecular utilizado foi prestained SDS-PAGE standards – Broad Range Da Bio-Rad, com faixa de 201 a 7 KDa.

[CuL] = 1,5 mM; [HSA] no plasma = 0,6 mM.

No eppendorff , com $V_{final} = 10\mu\text{L}$:

Plasma = 1,0 μL ; CuL = 7,0 μL ; Azul de bromo fenol = 1,0 μL ; SDS = 1,0 μL

Em um eppendorff adicionou-se plasma + CuL e incubou-se as amostras em banho-maria por 30 minutos, a 37,0°C. Adicionou-se azul de bromofenol e SDS (10%) agitou-se. Aplicaram-se então as amostras no gel de poliacrilamida (12%). Deixou-se correr o gel por 3 horas, a 100 mV e 25 mA. Após a corrida, o gel foi cuidadosamente transferido para um recipiente e corado com uma solução de corante *Comassie blue*, por 30 minutos. O gel foi então descorado com solução de metanol/ácido acético (30%/10%) e seco para determinação das bandas.

3.5.5. Fluorescência dos complexos de cobre(II) na presença de glutathione (GSH)

As medidas de fluorescência foram feitas para verificar a estabilidade dos complexos de cobre frente a um agente redutor presente em grandes concentrações nas células.

Para este estudo foram utilizados os seguintes complexos de cobre(II):

- $[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]^+$
- $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{isami})\text{H}_2\text{O}]^+$
- $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$

Condições experimentais: [CuL] = 0,5 mM; [GSH] = 10,0 mM; Tampão fosfato 50 mM pH = 7,3.

As amostras contendo os complexos de cobre(II) na presença e na ausência de glutathiona (GSH) foram excitadas utilizando-se o comprimento de onda 336 nm. Os espectros foram registrados na faixa de 500-750 nm, monitorando-se a emissão característica de complexos de cobre(I)-tiolato em torno de 650 nm [155].

3.6. Danos a biomoléculas em presença de complexos de cobre(II)

3.6.1. Danos oxidativos à albumina na presença de complexos de cobre(II)

Para este estudo foram utilizados os seguintes complexos de cobre(II):

- [Cu(isaen)H₂O]⁺
- [Cu(isapn)]²⁺
- [Cu(isaquin)H₂O]⁺
- [Cu(isaepy)₂]²⁺
- [Cu(apyhist)H₂O]²⁺
- [Cu(H₂O)₄]²⁺

Para este estudo foram feitos três experimentos, nas seguintes condições experimentais:

a) Experimento 1:

Tampão fosfato 50 mM pH = 7,3; [H₂O₂] = 1,0 mM; [BSA] = 5,0 mM; [CuL] = 300 μM; T = 37,0 °C.

b) Experimento 2:

Tampão fosfato 50 mM pH = 7,3; [H₂O₂] = 2,5 mM; [BSA] = 5,0 mM ; [CuL] = 300 μM ; T = 37,0 °C.

c) Experimento 3 :

Tampão fosfato 50 mM pH = 7,3; [H₂O₂] = 0,75 mM; [HSA] = 75 μM ; [CuL] = 75 μM ;
T = 37,0 °C.

O procedimento experimental, baseado em protocolo descrito [155] na literatura, foi o mesmo para os experimentos 1 e 2.

Adicionou-se em um eppendorff, com volume total de 1,00 mL:

300 μL de tampão fosfato + 300 μL de BSA + 200 μL de CuL + 200 μL de H₂O₂

As amostras foram incubadas a 37 °C, por 30 minutos. Adicionou-se então a todas as amostras 1 mL de DNPH (dinitrofenilhidrazina, solução 1 mM em HCl 1 M) e incubou-se por mais 30 minutos, na mesma temperatura. As amostras foram retiradas do banho e, após resfriadas, foram adicionados 1,5 mL de NaOH 1 M. Após 5 minutos mediu-se a absorbância em 360 nm [156].

Todas as medidas, inclusive as dos controles, foram feitas em duplicata e os controles utilizados foram:

Tampão + BSA/HSA + CuL e Tampão + BSA/HSA + H₂O₂

3.6.2. Estudos de EPR

a) Determinação da presença de radicais livres

Estudos de EPR foram necessários para verificar a possível presença de radicais nos estudos de danos oxidativos à albumina bovina.

Para este estudo foram utilizados os seguintes complexos de cobre(II):

- [Cu(isaen)H₂O]⁺
- [Cu(isapn)]²⁺
- [Cu(isaquin)H₂O]⁺
- [Cu(isaepy)₂]²⁺
- [Cu(apyhist)H₂O]²⁺
- [Cu(H₂O)₄]²⁺

Condições experimentais:

Tampão fosfato 50 mM pH = 7,3; [H₂O₂] = 10 mM; [BSA] = 50 mM; [CuL] = 300 μM
[DMPO] = 40 mM; T = 25,0 °C.

Para a medida do controle, adicionou-se em um eppendorff 240 μL de tampão fosfato + 150 μL de BSA + 100 μL de CuL + 10 μL de DMPO.

Para as medidas experimentais, adicionou-se em um eppendorff 140 μL de tampão fosfato + 150 μL de BSA + 100 μL de CuL + 100 μL de H₂O₂ + 10 μL de DMPO.

Os eppendorfs foram agitados e uma alíquota foi retirada e transferida para uma cela chata de quartzo de 0,1 cm. Os espectros de EPR foram registrados para cada medida efetuada.

b) Verificação de Interações cobre-proteína

Medidas de EPR também foram feitas para verificar a interação dos complexos de cobre(II) com albumina humana e com plasma sanguíneo.

Para este estudo foram utilizados os seguintes complexos de cobre(II):

- [Cu(isaen)H₂O]⁺
- [Cu(isapn)]²⁺
- [Cu(isami)H₂O]⁺
- [Cu(isaepy)₂]²⁺
- [Cu(apyhist)H₂O]²⁺
- [Cu(H₂O)₄]²⁺

Condições experimentais:

[HSA] = 0,6 mM; [CuL] = 300 μM; Tampão fosfato 50 mM pH = 7,3; T = 77K.

Plasma sanguíneo após 12 horas de jejum

Todas as medidas foram feitas seguindo o mesmo procedimento. Em um eppendorff foram adicionados 200 μL de CuL e 800 μL do substrato (HSA ou plasma), a mistura foi agitada e uma alíquota foi retirada e congelada com nitrogênio líquido para a realização da primeira medida. O restante da mistura reacional foi incubado a 37,0°C. As medidas foram repetidas a cada 5 minutos até completar 60 minutos de incubação, tanto para o plasma sanguíneo como para albumina (HSA).

3.6.3. SDS-PAGE em presença de H_2O_2

Este experimento foi realizado para verificar o possível dano oxidativo à albumina humana em presença de peróxido de hidrogênio.

Para este estudo foram utilizados os seguintes complexos de cobre(II):

- $[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]^+$
- $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{isami})\text{H}_2\text{O}]^+$
- $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$
- $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$

Condições experimentais:

O marcador de peso molecular utilizado foi prestained SDS-PAGE standards – Broad Range Da Bio-Rad, com faixa de 201 a 7 KDa.

$$[\text{CuL}] = 7,5 \times 10^{-5} \text{ M}; [\text{HSA}] = 7,5 \times 10^{-5} \text{ M}; [\text{H}_2\text{O}_2] = 7,5 \times 10^{-4} \text{ M}$$

No eppendorff, com $V_{\text{final}} = 10\mu\text{L}$:

CuL = 2,0 μL ; HSA = 2,0 μL ; H_2O_2 = 2,0 μL ; Tampão = 1,0 μL ; Azul de bromo fenol = 1,0 μL ; SDS = 1,0 μL .

Em um eppendorff adicionou-se HSA + CuL + H_2O_2 + tampão e incubou-se as amostras em banho-maria por 30 minutos, a 37,0°C. Adicionou-se azul de

bromofenol e SDS (10%), agitou-se e aplicou-se as amostras no gel de poliacrilamida (12%). Deixou-se correr o gel por 3 horas, a 100 mV e 25 mA. Após a corrida, o gel foi cuidadosamente transferido para um recipiente e corado com uma solução de corante *Comassie blue*, por 30 minutos. O gel foi então descorado com solução de metanol/ácido acético (30%/10%) e seco para determinação das bandas.

3.6.4. Influência de complexos de cobre(II) na respiração mitocondrial

Estes experimentos foram realizados para verificar a influência dos complexos estudados na respiração mitocondrial, uma vez que estudos anteriores mostraram sua eficiente atividade biológica como agente indutor de apoptose frente a diferentes células tumorais [ref]

Para estes estudos foram utilizados os seguintes complexos de cobre(II):

- $[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]^+$
- $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{isami})\text{H}_2\text{O}]^+$
- $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$
- $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$
- $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$

A extração das mitocôndrias de fígado de camundongo foi realizada no laboratório da Prof.^a Alicia J. Kowaltowski, de acordo com normas estabelecidas e protocolo utilizado neste laboratório.

Foram realizados dois tipos de experimentos:

Experimento 1:

Na cela do oxígrafo foram adicionados os seguintes substratos e os complexos de cobre(II) na seguinte ordem:

- a) 990 μL de tampão + 1,0 μL de succinato (1,0M pH=7,0 ~7,5)
- b) 8,9 μL de mitocôndrias (0,5 μg /mL)
- c) 5,0 μL de ADP (200 mM)
- d) 130 μL de CuL (0,75 μM)
- e) 2,0 μL de oligomicina (0,25 mg/mL)
- f) 2,0 μL de CCCP (0,1 mM)

Experimento 2:

Na cela do oxígrafo forma adicionados os seguintes substratos e os complexos de cobre(II) na seguinte ordem:

- a) 990 μL de tampão + 1,0 μL de succinato (1,0M pH=7,0 ~7,5)
- b) 8,9 μL de mitocôndrias (0,5 μg /mL)
- c) 130 μL de CuL (0,75 μM)
- d) 5,0 μL de ADP (200 mM)
- e) 2,0 μL de oligomicina (0,25 mg/mL)
- f) 2,0 μL de CCCP (0,1 mM)

Logo após cada adição, o consumo de oxigênio foi monitorado utilizando-se um oxígrafo, com cela termostatizada e eletrodo seletivo de oxigênio.

A determinação da quantidade de proteína mitocondrial extraída do fígado do rato foi feita utilizando-se o método de Lowry [157].

O controle foi feito adicionando-se todos os substratos, na mesma ordem, exceto os complexos de cobre.

4. Resultados e Discussão:

4.1 Sínteses:

Todos os complexos obtidos foram caracterizados por análise elementar, espectroscopias UV/Vis e Infravermelho e os resultados serão discutidos a seguir.

4.1.1 Análise Elementar:

Tabela 2 – Resultados da Análise Elementar para os complexos de cobre (II) preparados

	%C	%H	%N
[Cu(apzhist)OH]ClO ₄ C ₁₁ H ₁₆ N ₅ OCu.ClO ₄ MM = 413,27 g.mol ⁻¹	32,90 (31,96)	3,53 (3,90)	18,03 (16,95)
[Cu(apyhist)OH]ClO ₄ C ₁₂ H ₁₅ N ₄ OCu.ClO ₄ MM = 394,20 g.mol ⁻¹	36,69 (36,56)	3,62 (3,84)	14,50 (14,21)
[Cu(apyhist)H ₂ O](ClO ₄) ₂ C ₁₂ H ₁₆ N ₄ OCu.(ClO ₄) ₂ MM = 494,69 g.mol ⁻¹	29,26 (29,14)	3,50 (3,26)	11,30 (11,33)
[Cu(isaepy) ₂](ClO ₄) ₂ C ₃₀ H ₂₆ N ₆ O ₂ Cu(ClO ₄) ₂ MM = 765 g/mol	45,73 (44,98)	3,48 (3,76)	10,21 (10,45)
[Cu(isami)(H ₂ O)]ClO ₄ C ₁₇ H ₁₂ N ₃ O ₂ Cu(ClO ₄)H ₂ O MM = 453,31 g/mol	43,02 (43,32)	2,72 (3,00)	8,65 (8,92)
[Zn(isaepy)Cl ₂] C ₁₅ H ₁₃ N ₃ OZnCl ₂ MM = 387,56 g/mol	45,16 (45,48)	3,57 (3,38)	11,33 10,84

Os valores entre parênteses são valores calculados, considerando a fórmula mínima indicada.

Observando-se os dados da Tabela 2, pode-se perceber que os valores experimentais são bem próximos dos valores calculados, indicando que as sínteses ocorreram de forma bastante satisfatória.

Os cinco compostos de cobre sintetizados e o composto de zinco contêm um ligante imínico tridentado e possuem, além disso, no seu sítio adicional de coordenação, o íon hidroxila ou uma molécula de água. Todos eles foram isolados como espécies catiônicas, tendo perclorato como contra-íon. No caso do composto de zinco, que foi preparado com o ligante (isaepy) correspondente ao complexo de cobre mais reativo, a esfera de coordenação do metal se completou com a coordenação de dois ligantes cloro, obtendo-se uma espécie neutra.

Anteriormente, estes complexos de cobre já haviam sido preparados e caracterizados em nosso laboratório [158] e, devido a suas reatividades muito significativas frente a processos oxidativos, foram escolhidos para estudos mais aprofundados. Sua estrutura é tetragonal com alguma distorção tetraédrica, determinada por dados de espectroscopia EPR.

Em seguida, procedeu-se à sua caracterização principalmente por técnicas espectroscópicas, visando comprovar e comparar nossos dados com os anteriores.

4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho:

A radiação infravermelha corresponde aproximadamente à faixa do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e de microondas. A faixa de radiação que é mais amplamente utilizada situa-se entre 4000 e 400 cm^{-1} .

Embora o espectro de infravermelho seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem na mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. A presença destas bandas características de certos grupos permite a obtenção de informações estruturais úteis através da discussão de espectros de infravermelho, utilizando-se tabelas e espectros descritos na literatura.

Os espectros vibracionais dos complexos sintetizados foram obtidos por reflectância, a partir de aproximadamente 1,2 mg do complexo triturados e

homogeneizados com 200 mg de KBr anidro. A faixa de obtenção dos espectros foi a usual, de 4000 a 400 cm^{-1} .

As frequências vibracionais características das ligações presentes nos complexos estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Principais bandas de absorção no infravermelho para os complexos sintetizados em cm^{-1} .

	νOH	$\nu\text{C=N}$ $\nu\text{C=C}$	$\nu\text{C=N}$ $\nu\text{C-N}$	νClO_4^- δClO_4^-	$\nu\text{N-H}$	$\delta\text{N-H}$	$\nu\text{C=O}$
$[\text{Cu}(\text{apzhist})\text{OH}]\text{ClO}_4$	3449	1475	1629 1092	1089 626	3434 3498	1147	
$[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]\text{ClO}_4$	3450	1455	1629	1089 626	3490 3429	1143	
$[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$	3460	1499	1624 1092	1099 621	3511 3456	1143	
$[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$	3438	1597	1614	1094 624	3354	1725	
$[\text{Cu}(\text{isami})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$	3409	1590	1616	1084	3196 1511		1706
$[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$			1608		3203		1735
		1487					

ν , estiramento; δ , deformação

As frequências vibracionais descritas acima foram identificadas por comparações com espectros e tabelas descritos na literatura, para compostos semelhantes.

Espectros infravermelhos de compostos heteroaromáticos caracterizam-se por apresentarem bandas intensas de deformação CH fora do plano e da deformação angular de anéis, que podem ser correlacionadas com o modo de substituição do anel. As vibrações de deformação CH fora do plano originam absorções entre 700 e 1200 cm^{-1} , enquanto para deformações no plano as absorções estão entre 1000 e 1500 cm^{-1} .

As vibrações de deformação C-C fora do plano apresentam absorções abaixo de 1000 cm^{-1} . As vibrações correspondentes ao esqueleto dos complexos, envolvendo a deformação axial da ligação C-C do anel, encontram-se na região entre 1300 e 1600 cm^{-1} .

Para os complexos sintetizados $[\text{Cu}(\text{apzhist})\text{OH}]\text{ClO}_4$, $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]\text{ClO}_4$ e $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ observou-se uma banda em torno de 1143 cm^{-1} , de forte intensidade, atribuída à deformação angular do N-H no plano, característica do anel imidazol, contido no ligante histamina.

As bandas observadas em torno de 1090 cm^{-1} e 630 cm^{-1} podem ser atribuídas ao ânion perclorato, revelando que este não está coordenado ao cobre(II), indicando seu caráter iônico nos complexos sintetizados.

As demais bandas apresentadas na Tabela 3 são características dos compostos do tipo base de Schiff, sendo que as bandas em torno de 3450 cm^{-1} podem ser atribuídas ao íon hidroxila e/ou a moléculas de água presentes nos complexos sintetizados [159-166].

Os espectros vibracionais correspondentes aos complexos de cobre(II) e ao complexo de zinco sintetizados encontram-se a seguir, nas Figuras 3 a 8.

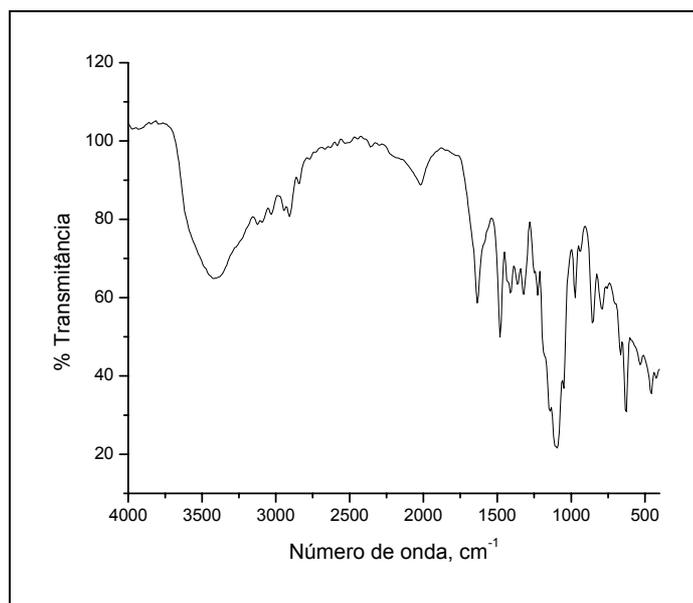


Figura 3 – Espectro vibracional do composto $[\text{Cu}(\text{apzhist})\text{OH}]^+$

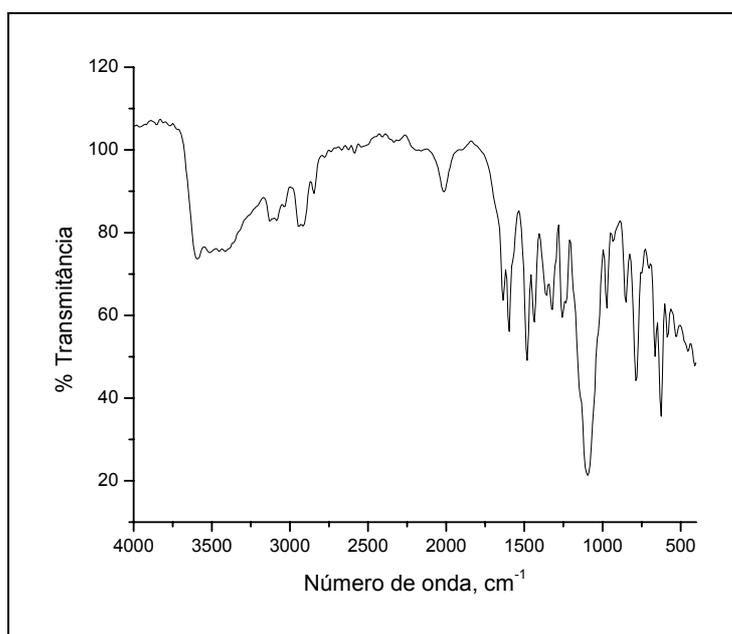


Figura 4 – Espectro vibracional do composto $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$

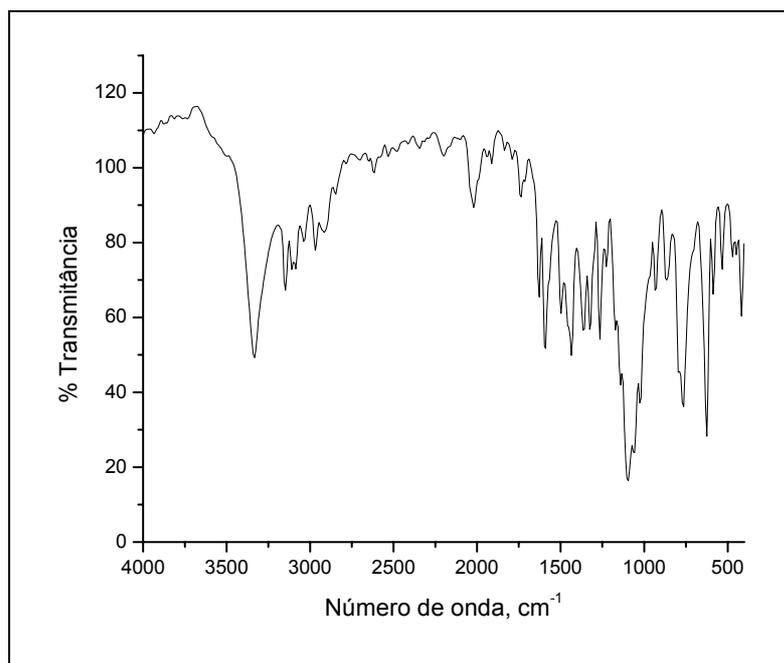


Figura 5 – Espectro vibracional do composto [Cu(apyhist)H₂O]⁺

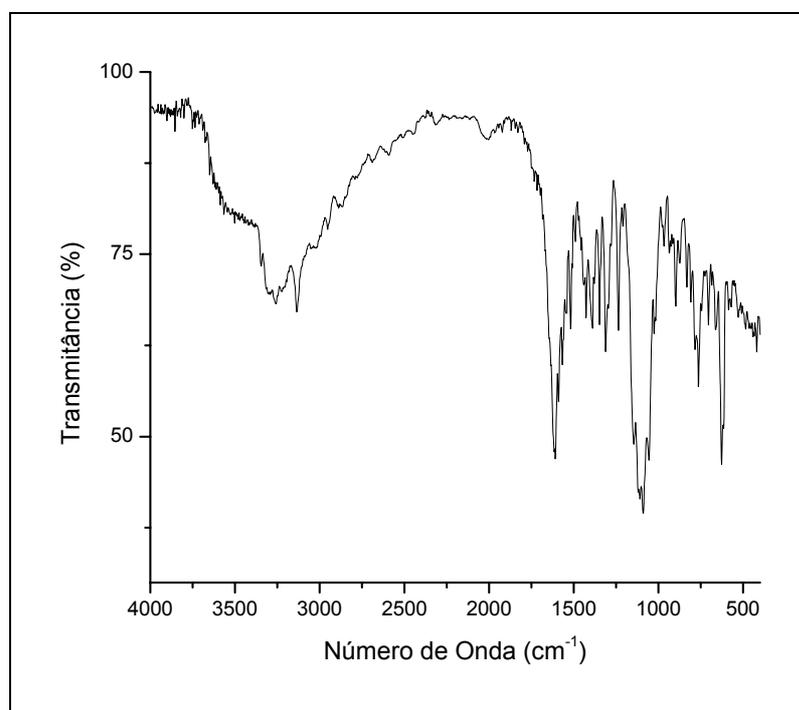


Figura 6 - Espectro vibracional para o composto [Cu(isaepy)₂]²⁺

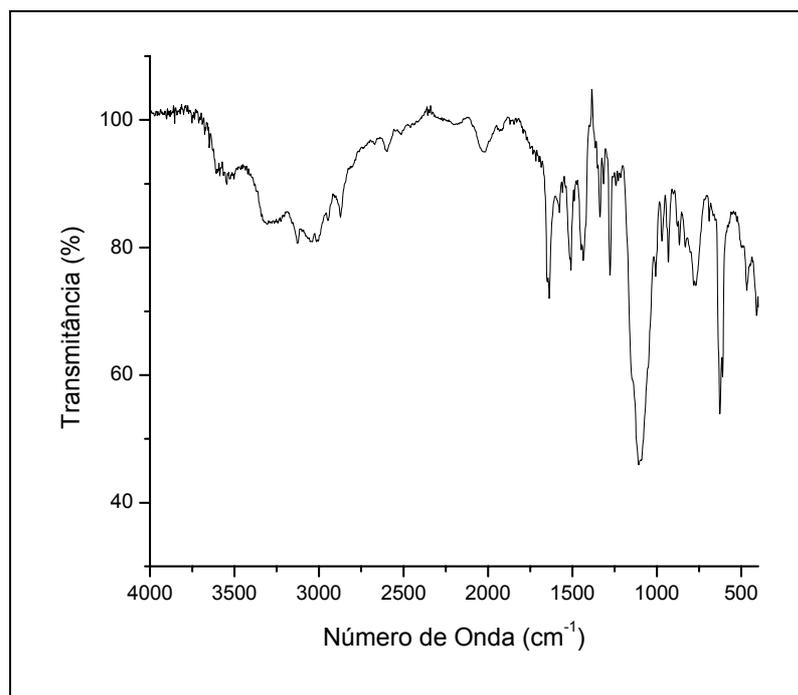


Figura 7 – Espectro vibracional para o composto [Cu(isami)H₂O]⁺

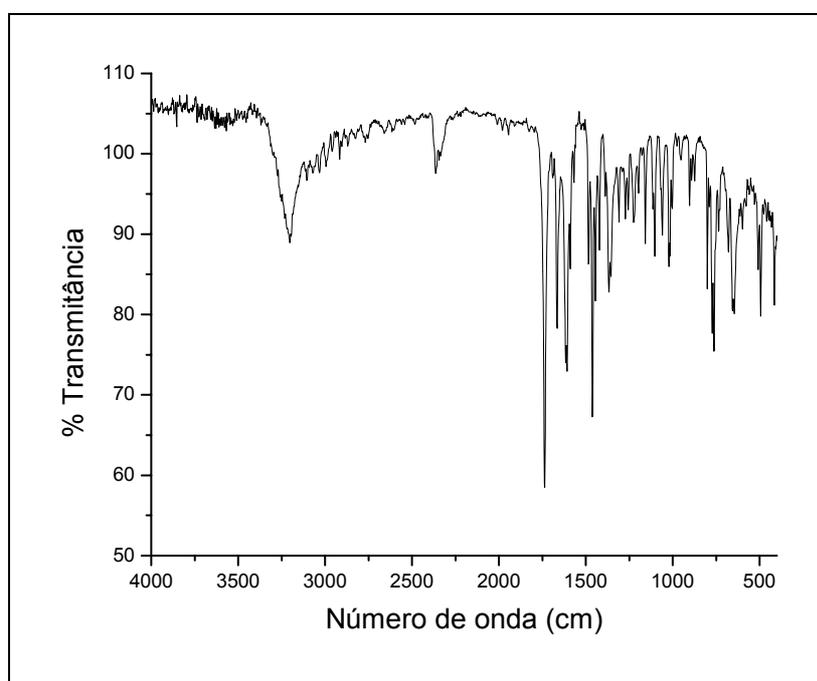


Figura 8 – Espectro vibracional para o composto [Zn(isaepy)Cl₂]

4.1.3 Espectroscopia Eletrônica:

A espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV/Vis) constitui uma técnica eficaz para fornecer informações sobre a estrutura eletrônica de complexos metálicos e de compostos puramente orgânicos. A absorção de energia é quantizada e conduz à passagem dos elétrons de orbitais do estado fundamental, para orbitais de maior energia em um estado excitado. A espectroscopia no ultravioleta é limitada, na maior parte, aos sistemas conjugados.

As características principais de uma banda de absorção são a sua posição e a sua intensidade. A posição da absorção corresponde ao comprimento de onda da radiação, cuja energia é igual à necessária para que ocorra a transição eletrônica. Já a intensidade de absorção depende da probabilidade de interação entre a energia radiante e o sistema eletrônico, de modo a permitir a passagem do estado fundamental a um estado excitado, e da polaridade do estado excitado.

Nos espectros UV/Vis de complexos metálicos, as principais bandas de absorção registradas são atribuídas basicamente a três tipos de transições eletrônicas [167]. As absorções na região do ultravioleta de alta energia estão relacionadas com as transições internas dos ligantes, LT ($n \rightarrow \pi$ e $\pi \rightarrow \pi^*$), onde n é o orbital não ligante, π é o orbital ligante e π^* é orbital anti-ligante. As bandas que aparecem na região do ultravioleta próximo estão relacionadas às transições de transferência de carga, CT. Em uma transição, um elétron é movido entre orbitais que são predominantemente ligantes e orbitais que são predominantemente metálicos. A transição é então classificada como transição de transferência de carga do ligante para o metal, LMCT ($\pi \rightarrow d\pi$) ou como transferência de carga do metal para o ligante, MLCT ($d\pi \rightarrow \pi^*$). Este tipo de transição é normalmente mais observado em complexos com ligantes que possuem orbitais π^* semipreenchidos, especialmente ligantes aromáticos. O outro tipo de transição observada na região do visível são as transições d-d, de menor intensidade.

Para os ligantes orgânicos do tipo bases de Schiff, as transições LT $\pi \rightarrow \pi^*$, referentes aos grupos cromóforos C=N, C=C, são registradas na literatura [168] na região entre 196 – 313 nm, com coeficientes de absorvidade molar (ϵ) maiores que

$10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, indicando transições completamente permitidas pelas regras de seleção (Laporte e spin). Nos complexos, estas bandas podem sofrer deslocamentos devido à presença do íon metálico.

As bandas referentes às transições LMCT ($\pi \rightarrow d\pi$) aparecem na região de 320 – 450 nm, com ϵ característicos de cerca $10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Estas bandas também são permitidas pelas regras de seleção e se caracterizam por intensas absorções na região do visível e UV próximo [167].

Os complexos de cobre(II), com configuração d^9 , apresentam invariavelmente uma geometria octaédrica com distorção tetragonal. Esse fato é consequência do princípio de Jahn-Teller, que prevê a perda de degenerescência para sistemas não-lineares, sempre que ocorrer ganho de energia. Um complexo d^9 octaédrico é degenerado, pois o elétron desemparelhado pode ocupar tanto orbital $d_{x^2-y^2}$ como o orbital d_{z^2} . As distorções tetragonais abaixam a energia da configuração d_{z^2} . A distorção com relação à geometria quadrado planar, onde o elétron fica no orbital d_{z^2} , estabiliza a molécula e é responsável pela resposta extrema ao teorema de Jahn-Teller, que se refere à degenerescência das configurações quando os orbitais estão ocupados [167].

Em virtude do efeito Jahn-Teller, os complexos de cobre(II) apresentam em geral uma geometria D_{4h} alongada, com os ligantes axiais bastante afastados, favorecendo a coordenação no plano xy e convertendo-se com facilidade em estruturas quadrado planares, de acordo com o diagrama de níveis de energia abaixo.

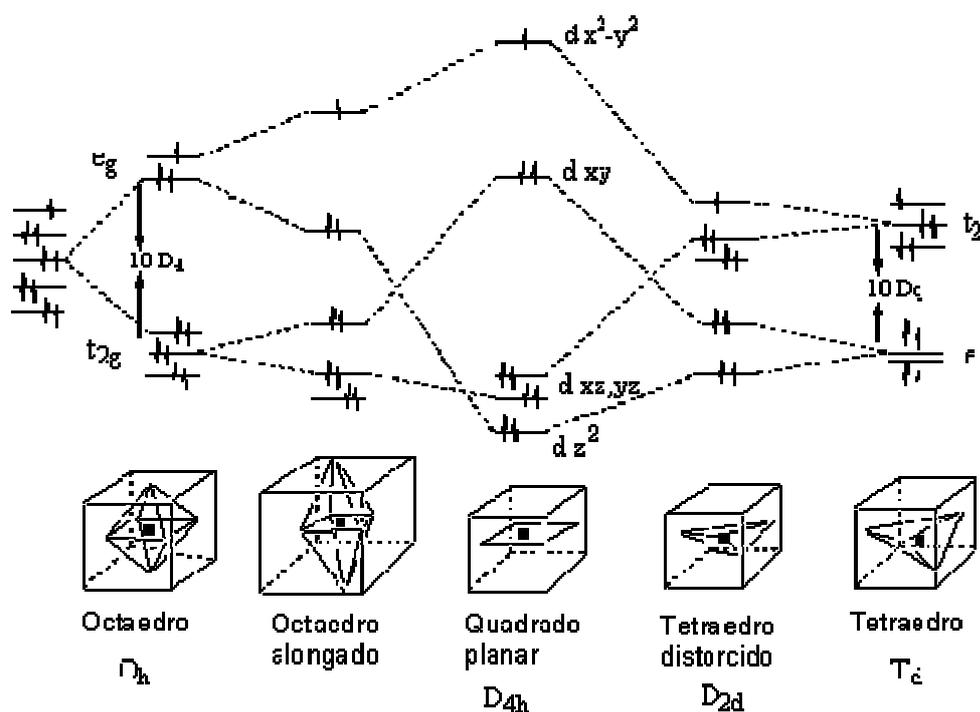


Diagrama de níveis de energia para o íon Cu(II) d^9 em vários campos ligantes.

No estado reduzido, complexos de cobre(I) apresentam configuração d^{10} com camada totalmente preenchida e têm preferência por geometrias tetraédricas, que garantem maior estabilização pela EECL (Energia de estabilização do campo ligante), que para complexos d^5 e d^{10} é zero. O estado de energia fundamental do cobre(II) é dado por $M_L = L = 2$; $M_S = S = 1/2$; $2S + 1 = 2 \therefore {}^2D$. As transições eletrônicas devido ao desdobramento do campo ligante ocorrerão entre os termos: ${}^2B_{2g} \leftarrow {}^2B_{1g}$ e ${}^2E_g \leftarrow {}^2B_{1g}$. Elas aparecem como bandas largas e sobrepostas em solução e, conforme esperado, observa-se somente uma banda na região do visível para os desdobramentos do cobre(II).

A partir de soluções aquosas de concentração $10^{-4}M$ dos complexos de cobre sintetizados, os espectros eletrônicos foram registrados, apresentando duas bandas de absorção na região de alta energia e uma banda de absorção na região de baixa energia. Estes resultados confirmaram os resultados de estudos anteriores [158].

A absorvidade molar (ϵ) característica do complexo de zinco, preparado pela primeira vez neste trabalho, foi obtida a partir do coeficiente angular do gráfico de

absorção *versus* concentração da espécie (em comprimentos de onda onde havia absorção do complexo). Foram empregadas soluções com concentração inicial de 1,25 mM, fazendo-se as devidas diluições, de modo a obter pontos onde a absorção variasse de 0,1 a ~1, para o máximo das bandas existentes.

Os valores de comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) e absorvidade molar (ϵ) obtidos são mostrados na Tabela 4, abaixo.

Tabela 4 – Bandas de absorção e valores de ϵ para os complexos de cobre (II) sintetizados

	LT			LMCT		d-d
	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
	ϵ ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	ϵ ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	ϵ ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
[Cu(apzhist)OH]ClO ₄	214	290			638	
	15,8	4,9			55	
[Cu(apyhist)OH]ClO ₄	208	282			642	
	27,7	6,9			62	
[Cu(apyhist)H ₂ O](ClO ₄) ₂	208	282			632	
	31,5	10,0			84	
[Cu(isaepy) ₂](ClO ₄) ₂	242	247	260	301		NO
	15,9	15,2	8,3	479		
[Cu(isami)(H ₂ O)]ClO ₄	210	244		300	420	547
	66,8	33,1		912	102	527
[Zn(isaepy)Cl ₂]	206	242	248			
	21	28	25			
	300	410				
	70	12				

De acordo com os dados obtidos e informações da literatura para compostos semelhantes, pode-se dizer que os complexos sintetizados apresentam estrutura tetragonal ligeiramente distorcida.

Os espectros eletrônicos dos complexos de cobre(II) sintetizados e do novo complexo de zinco são mostrados nas Figuras 9 a 17, a seguir.

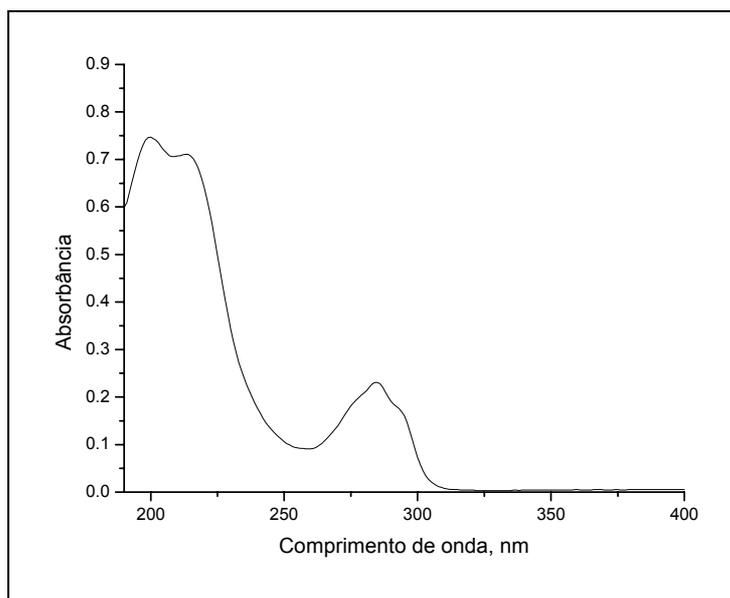


Figura 9 – Espectro eletrônico do composto $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$

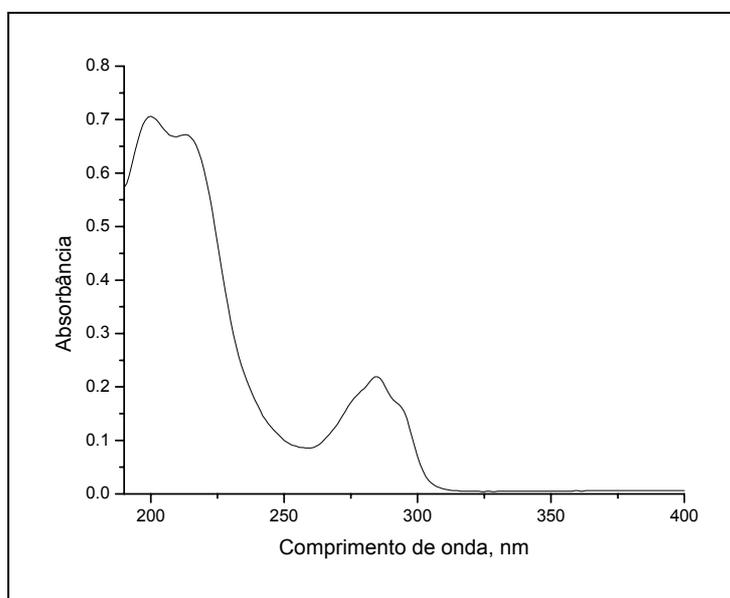


Figura 10 – Espectro eletrônico do composto $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^+$

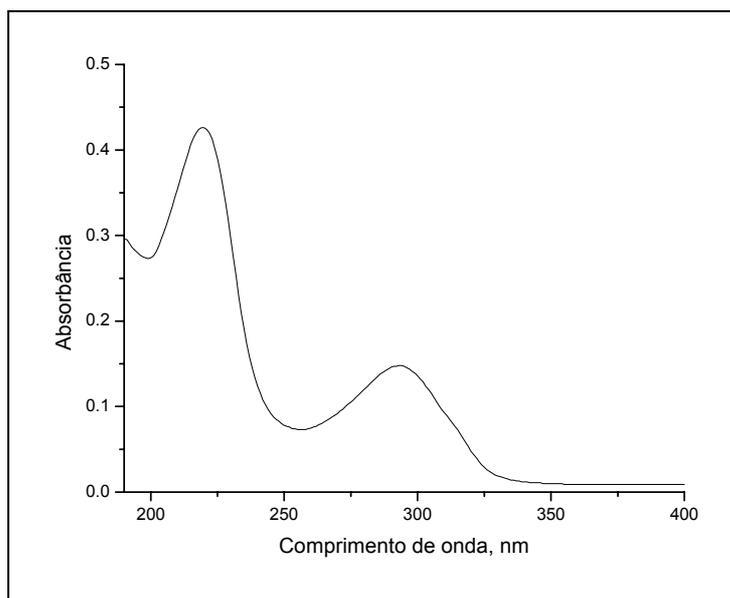


Figura 11 – Espectro eletrônico do composto [Cu(apzhist)OH]⁺

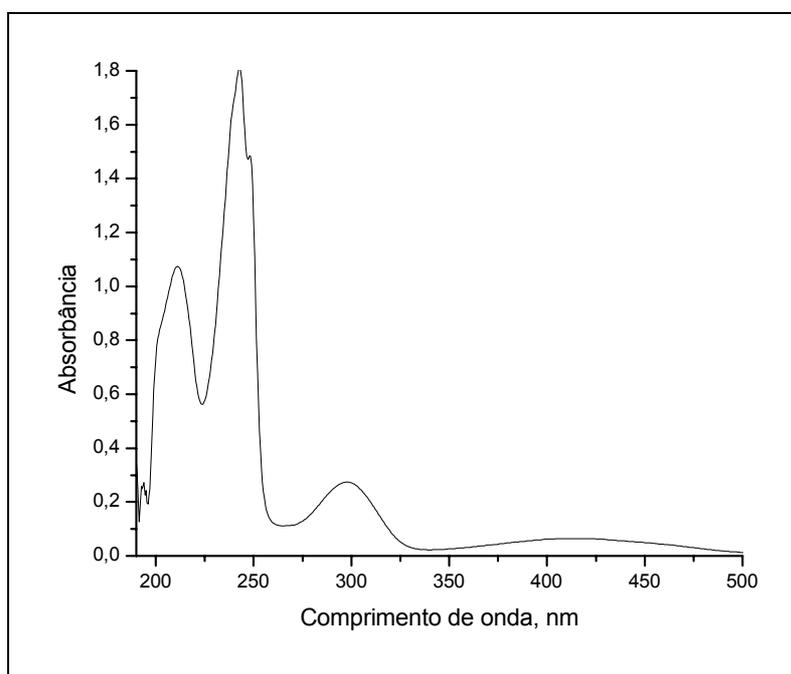


Figura 12 – Espectro eletrônico do composto [Cu(isami)]⁺

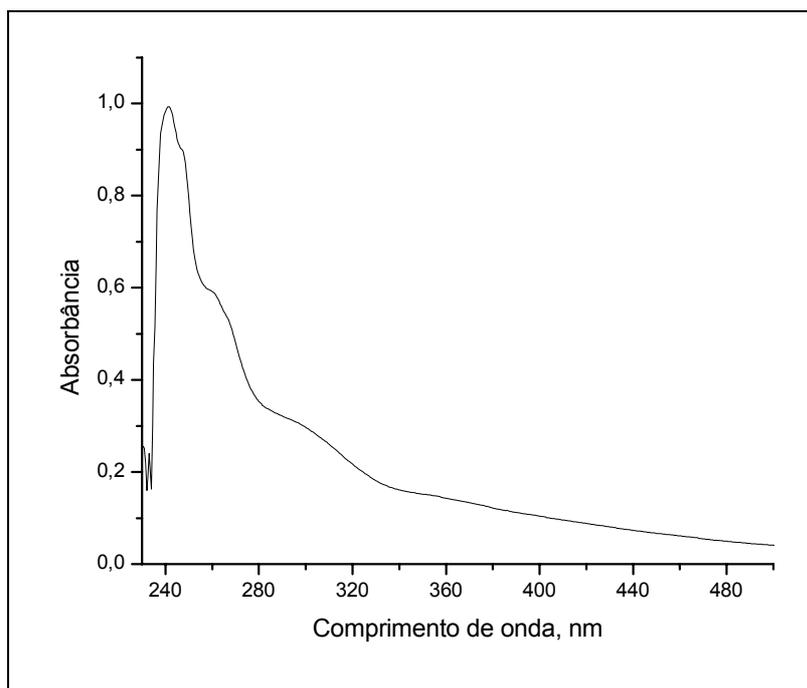


Figura 13 – Espectro eletrônico do composto [Cu(isaepy)₂]²⁺

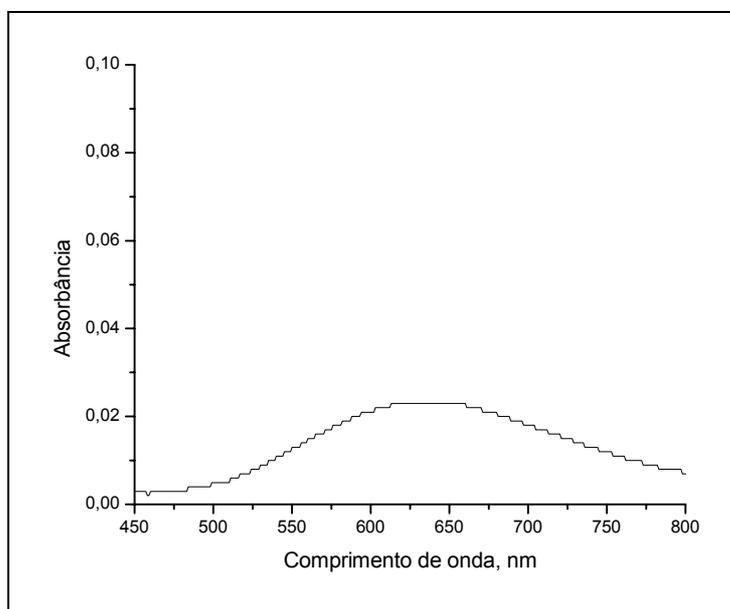


Figura 14 – Espectro eletrônico do composto [Cu(apzhist)OH]⁺

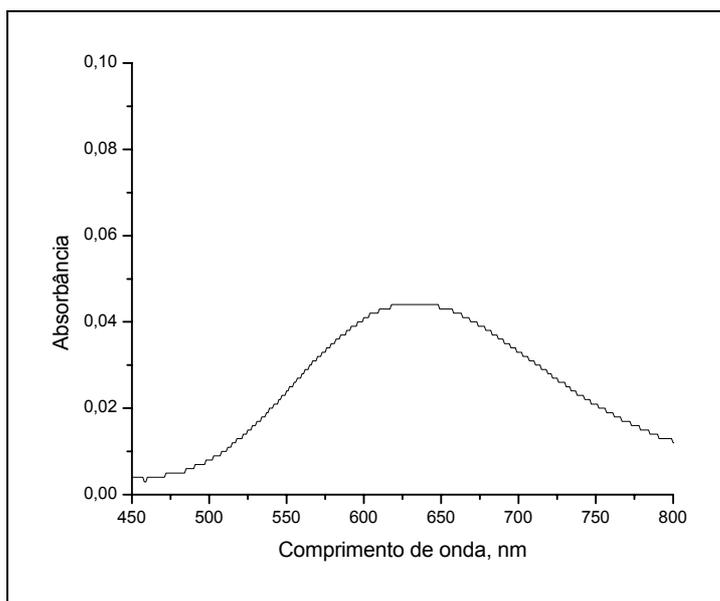


Figura 15 – Espectro eletrônico do composto $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$

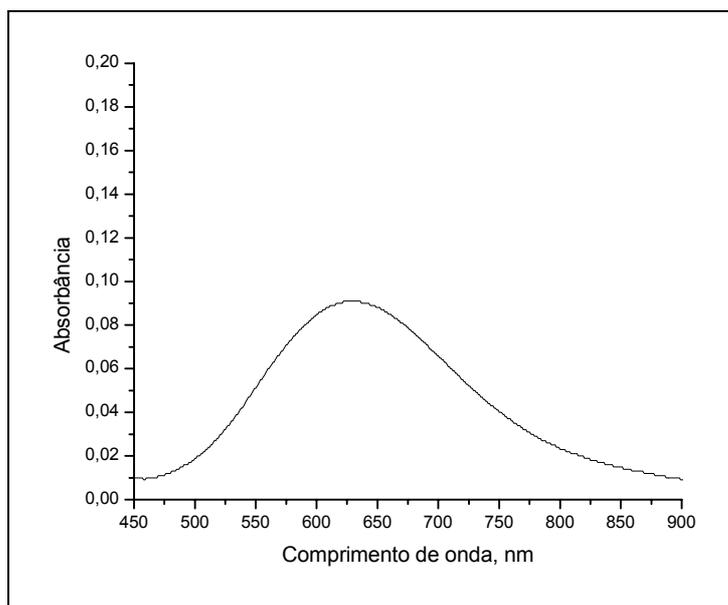


Figura 16 – Espectro eletrônico do composto $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$

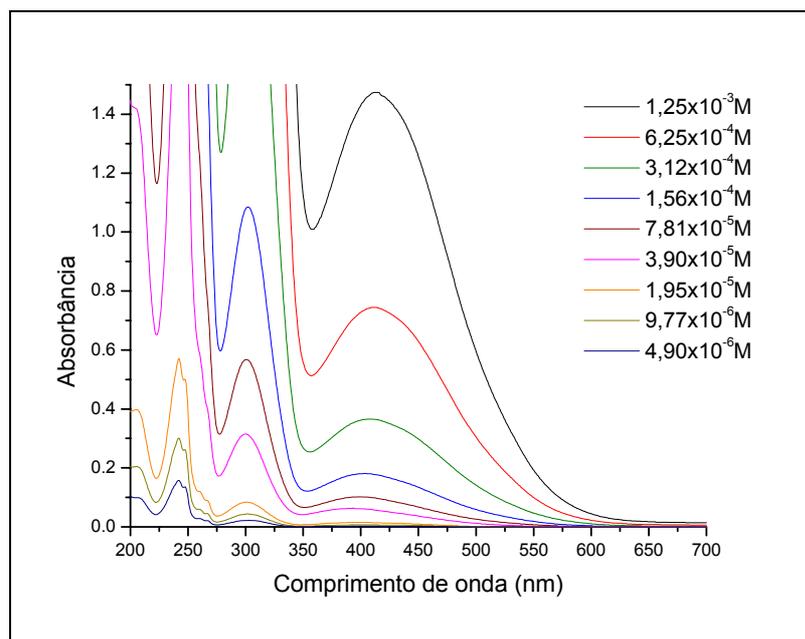


Figura 17 – Espectro eletrônico para o composto $[Zn(isaepy)Cl_2]$

4.2. Reatividade dos complexos de cobre(II) frente à oxidação de carboidratos:

A oxidação de carboidratos catalisada por íons metálicos pode provocar danos oxidativos as proteínas, com a participação de espécies reativas de oxigênio [169]. Por esta razão, iniciamos nossos estudos pela investigação da reatividade dos compostos de cobre(II) estudados frente a carboidratos usuais: glicose, frutose e galactose.

Mediu-se o consumo de oxigênio durante as reações de oxidação de carboidratos utilizando-se um oxígrafo, com eletrodo seletivo de oxigênio e controle de temperatura. O oxígrafo é um equipamento que permite o monitoramento da concentração de oxigênio dissolvido no meio reacional. É composto por uma cela de volume igual a 1,8 mL, que está conectada a um eletrodo sensível à oxigênio, o chamado eletrodo de Clark (Pt, com referência interna de Ag/AgCl), envolto por uma membrana de poliestireno e com uma gota de solução saturada de KCl entre o eletrodo e a membrana. A cela possui uma tampa com pequeno orifício para evitar a troca gasosa com o meio e possui também um pequeno agitador magnético, para garantir a homogeneidade da solução, além de ser acoplada a um banho termostaticado, que mantém sua temperatura constante. Utilizou-se o agente redutor ditionito de sódio para calibrar o oxígrafo entre 0 e 100% de oxigênio dissolvido no meio. A solubilidade do oxigênio em água pura a 25°C é de 244 $\mu\text{mol/L}$ ou a 37°C é de 198 $\mu\text{mol/L}$ [170].

O método utilizado para o tratamento de dados cinéticos foi o de Michaelis-Menten, numa analogia com a cinética enzimática. Este método considera que para muitas enzimas a velocidade de reação (v) varia com a concentração do substrato, obedecendo a uma curva de saturação hiperbólica e sendo definida como o número de mols de produtos formados por litro por segundo. Para uma concentração fixa de enzima, v é quase independente da variação da concentração de substrato, quando esta é suficientemente alta. A inclinação da curva no seu início fornece a constante de reação observada (k_{obs}), a partir de valores de k_{obs} pode-se avaliar a eficiência de catalisadores sem a necessidade de muitos cálculos.

Considerando-se que o processo catalítico ocorre através das etapas abaixo: uma enzima E, combina-se com um substrato S formando um complexo ES, com constante de velocidade k_1 . O complexo ES formado pode dissociar-se em E + S, com constante de velocidade k_2 , ou formar o produto P, com constante de velocidade k_3 . A constante de Michaelis K_m , a velocidade máxima $V_{m\acute{a}x}$ e a constante de eficiência do catalisador k_{cat} podem então ser deduzidas a partir da curva do inverso das velocidades iniciais de reação *versus* o inverso das concentrações de substrato ($1/v_i$ *versus* $1/[substrato]$), onde $k_{cat} = v_{m\acute{a}x}/[cat]$, o coeficiente linear da reta é dado por $1/v_{m\acute{a}x}$, e o coeficiente angular é $K_m/v_{m\acute{a}x}$ [171].

Na etapa inicial foram obtidas curvas de consumo de oxigênio em volt (V) x tempo (s). Estas curvas foram tratadas sabendo-se que a solubilidade do oxigênio em água pura a 25°C é de 244 $\mu\text{mol/L}$ ou a 37°C é de 198 $\mu\text{mol/L}$ [170], e então obteve-se novas curvas de oxigênio, agora em $\mu\text{mol/L}$ de O_2 x tempo (s). Os dados sobre a variação da concentração do catalisador foram tratados aplicando-se regressão linear nos pontos iniciais das curvas cinéticas obtidas e extraíndo-se as respectivas velocidades iniciais de reação, através da tangente do ângulo formado, e a partir daí obtendo-se os valores de k_{obs} .

As várias curvas obtidas estão apresentadas nas Figuras 18 a 23 a seguir, agrupadas para cada complexo de cobre usado como catalisador.

- Composto $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$:

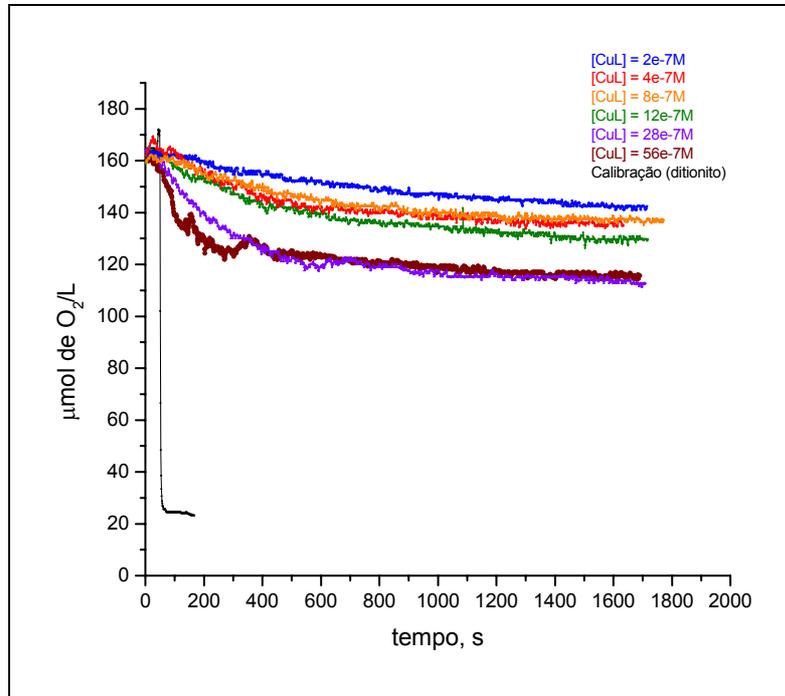


Figura 18 – Consumo de oxigênio para oxidação da galactose

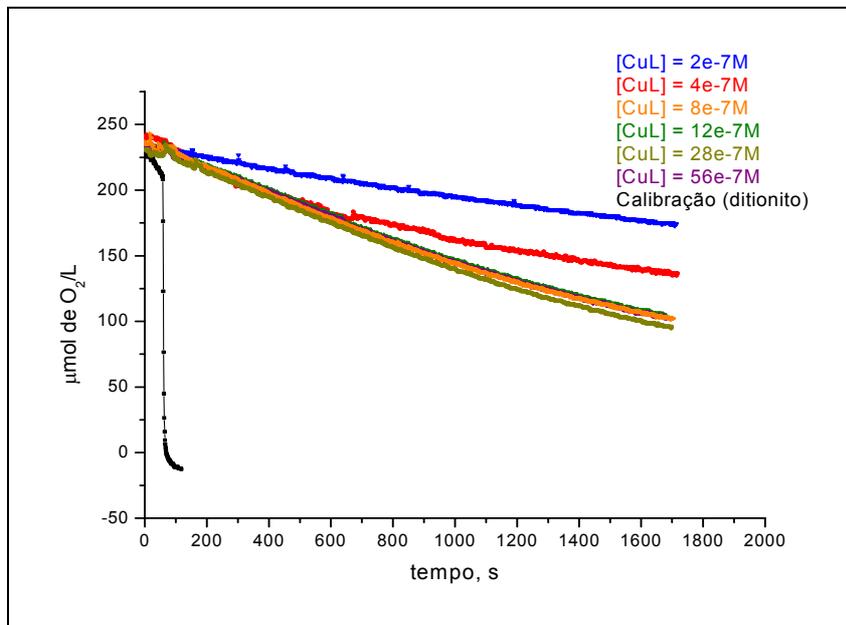


Figura 19 – Consumo de oxigênio para oxidação da frutose

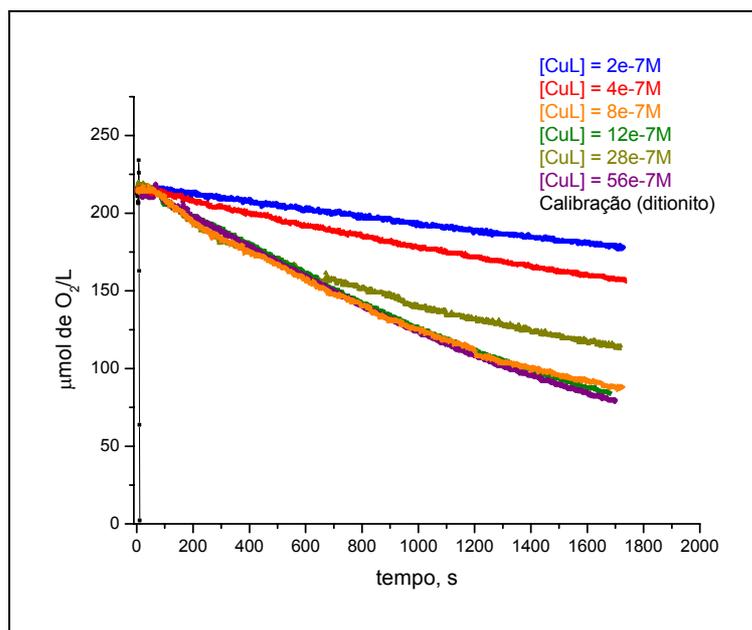


Figura 20 – Consumo de oxigênio para oxidação da glicose

- **Composto [Cu(apyepy)OH]:**

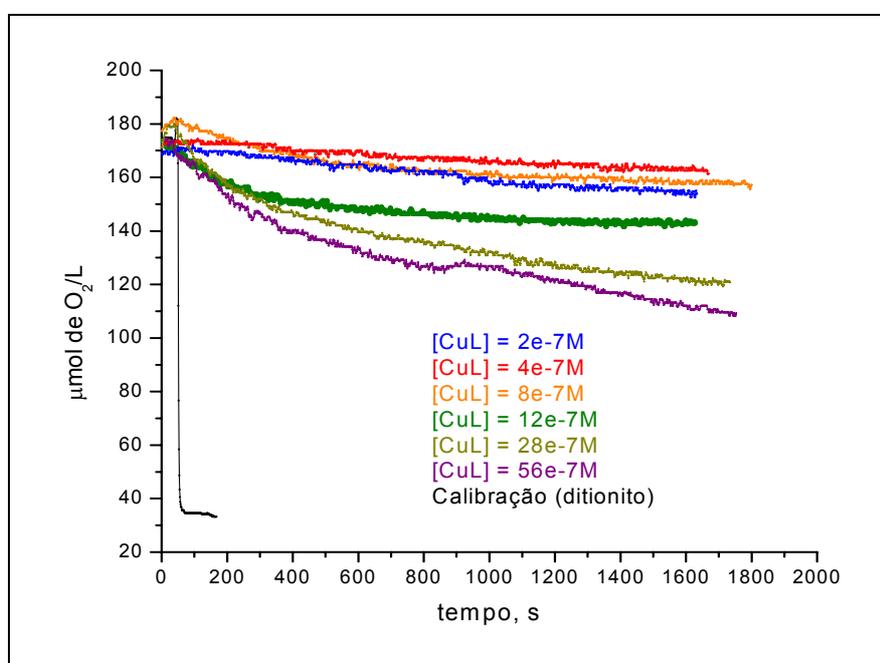


Figura 21 – Consumo de oxigênio para oxidação da galactose

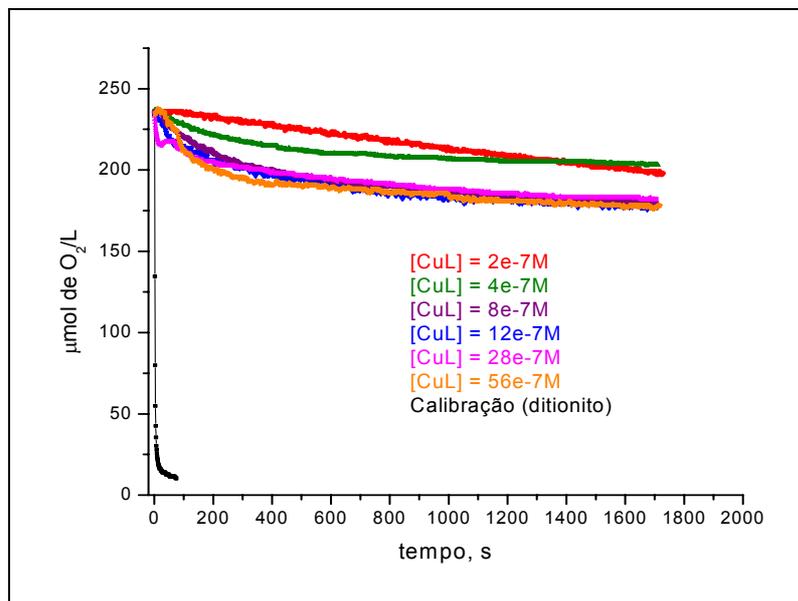


Figura 22 – Consumo de oxigênio para oxidação da frutose

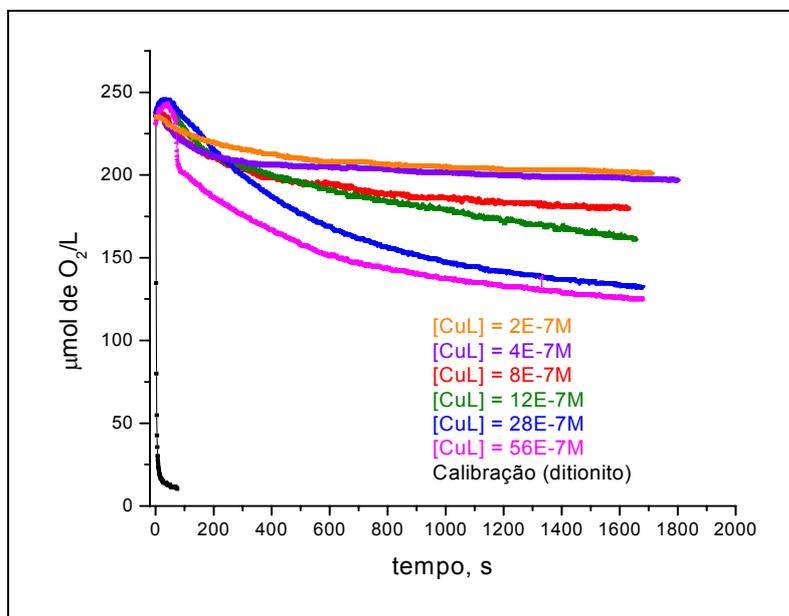


Figura 23 – Consumo de oxigênio para oxidação da glicose

A partir das curvas de consumo de oxigênio (coeficiente angular) foi possível obter novas curvas, agora de velocidade inicial ($\mu\text{mol/L de O}_2 \text{ s}^{-1}$) x concentração do catalisador (mol/L), que estão mostradas nas Figuras 24 a 28 a seguir.

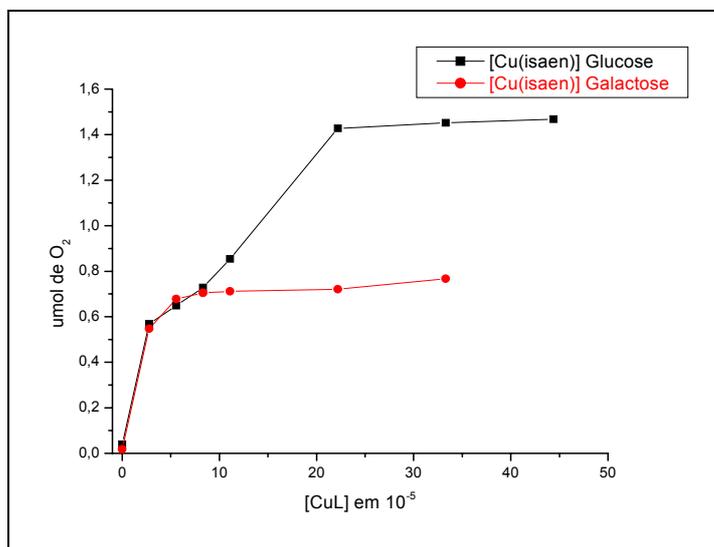


Figura 24 – Gráfico de velocidade inicial em função da concentração de catalisador, para o consumo de oxigênio na oxidação da glicose e galactose catalisada pelo $[\text{Cu(isaen)H}_2\text{O}]^+$

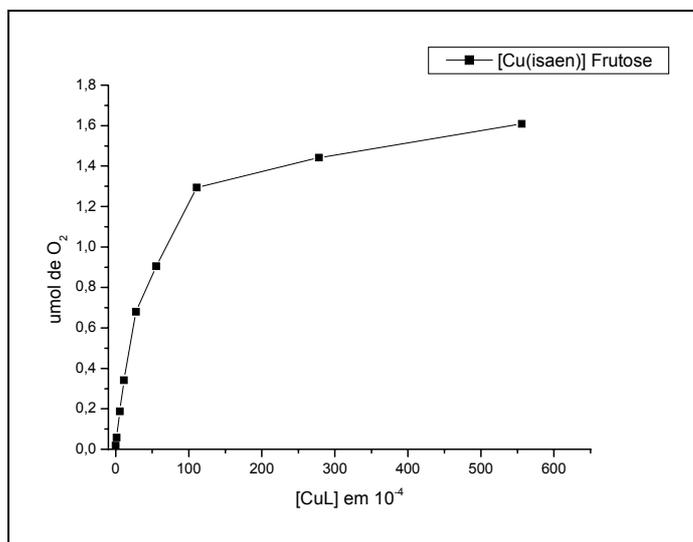


Figura 25 - Gráfico de velocidade inicial para o consumo de oxigênio na oxidação da frutose catalisada pelo $[\text{Cu(isaen)}]^+$

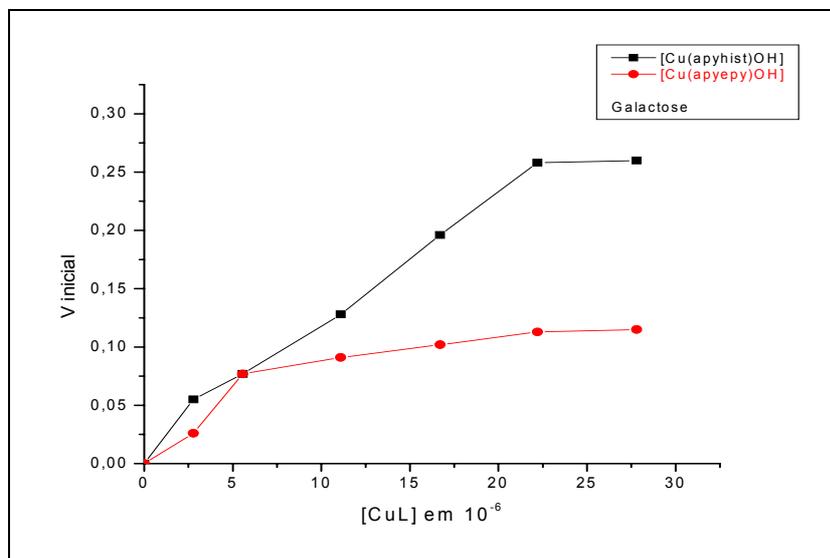


Figura 26 – Velocidade inicial da oxidação da galactose catalisada por $[Cu(apyhist)OH]^+$ e $[Cu(apyepy)OH]^+$ em função da concentração de catalisador

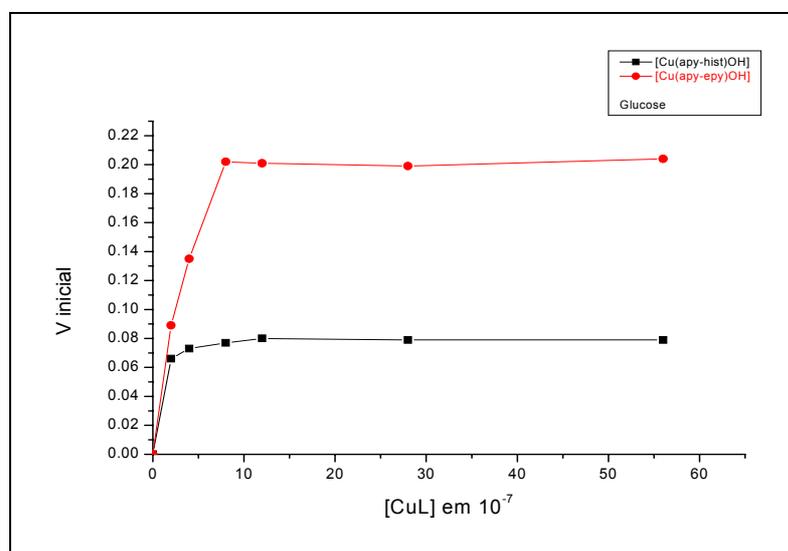


Figura 27 – Velocidade inicial da oxidação da glicose catalisada por $[Cu(apyhist)OH]^+$ e $[Cu(apyepy)OH]^+$ em função da concentração de catalisador

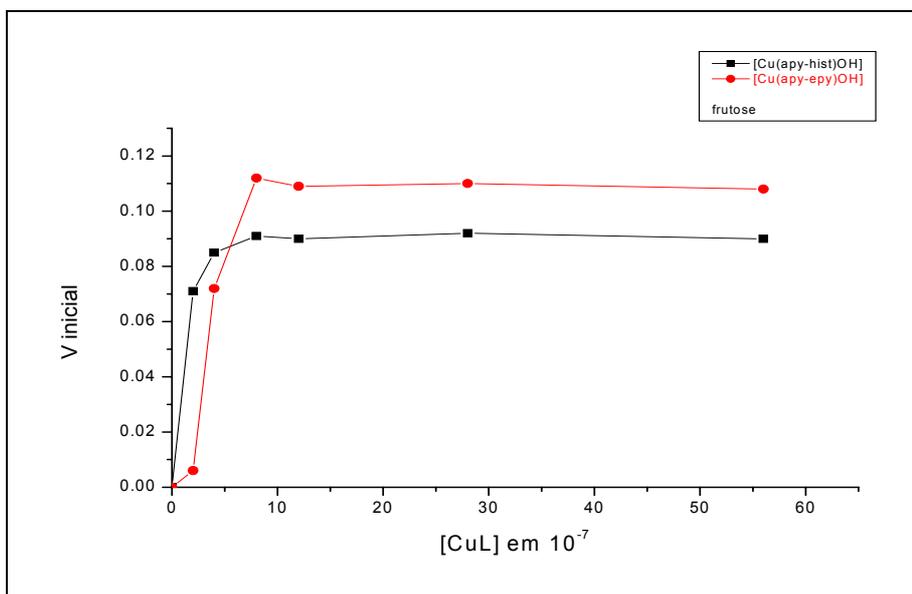


Figura 28 - Velocidade inicial da oxidação da frutose catalisada por $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$ e $[\text{Cu}(\text{apyepy})\text{OH}]^+$ em função da concentração de catalisador

Através da regressão linear das curvas de velocidade inicial x concentração do catalisador obteve-se valores de k_{obs} para cada reação monitorada. Os dados obtidos estão descritos na Tabela 5 abaixo:

Tabela 5 – Valores de k_{obs} (10^{-2} s^{-1}) para os complexos de cobre estudados.

Complexos	D-frutose	D-glicose	D-galactose
$[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]^+$	$11,3 \pm 0,5$	$1,50 \pm 0,06$	$1,90 \pm 0,07$
$[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{OH}]^+$	$0,98 \pm 0,04$	$1,80 \pm 0,06$	$1,10 \pm 0,05$
$[\text{Cu}(\text{apyepy})\text{OH}]^+$	$0,81 \pm 0,04$	$2,40 \pm 0,07$	$1,40 \pm 0,05$

Analisando-se as curvas obtidas pode-se perceber que o carboidrato que possui maior velocidade inicial durante sua oxidação catalisada é a galactose.

A partir desta observação foi possível dar prosseguimento ao estudo de reatividade dos complexos de cobre(II). Para esta fase do estudo apenas o carboidrato que possui maior velocidade inicial no processo de oxidação (galactose) foi utilizado.

Variando-se a concentração da galactose e mantendo-se constante a concentração dos catalisadores (complexos) em 1×10^{-4} M, utilizando tampão carbonato 150 mM, além da temperatura em 25°C e $\text{pH}=12$, novas curvas de consumo de oxigênio e velocidade inicial foram obtidas, a partir dos respectivos valores de k_{obs} .

As curvas obtidas e os valores de k_{obs} estão apresentados nas Figuras 29 a 34 a seguir, agrupadas por complexos de cobre(II).

- **Composto $[\text{Cu}(\text{isaen})]^+$:**

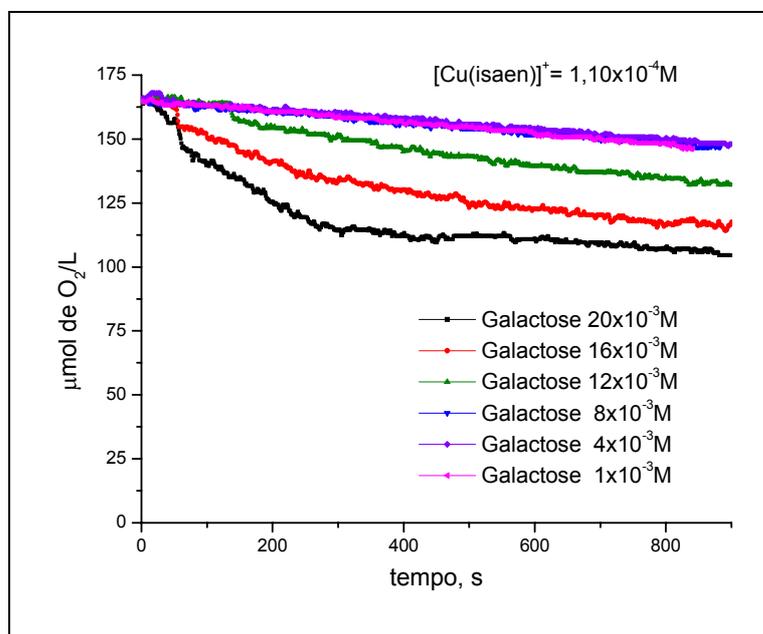


Figura 29 – Consumo de oxigênio durante a oxidação da galactose, em função da concentração do substrato,

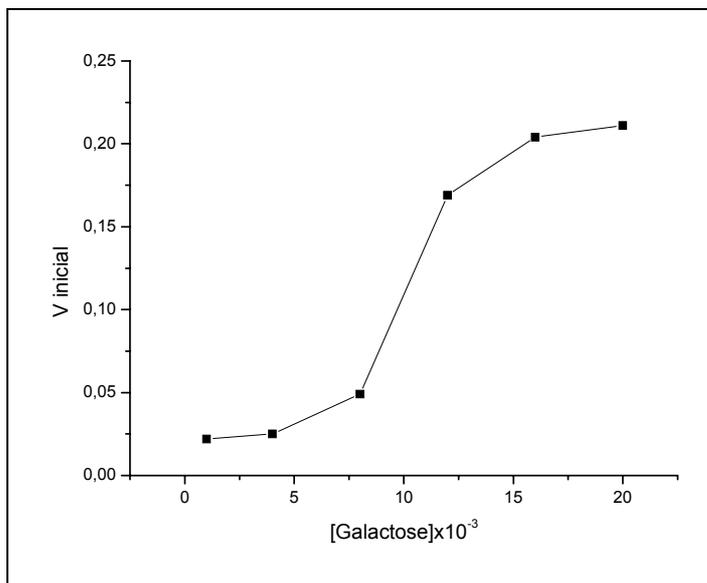


Figura 30 - Gráfico de velocidade inicial *versus* concentração da galactose.

A partir da regressão linear o valor de k_{obs} obtido para este processo foi de $1,3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

- **Composto [Cu(apyepy)OH]⁺:**

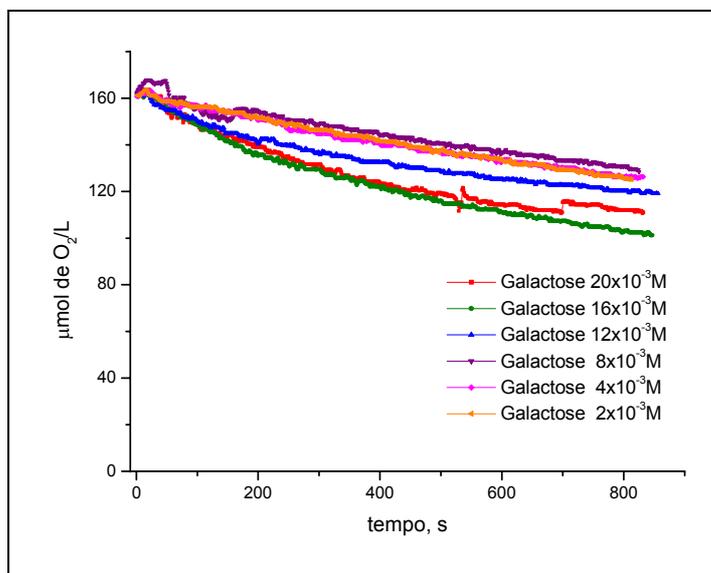


Figura 31 – Consumo de oxigênio durante a variação da concentração da galactose, durante a sua oxidação.

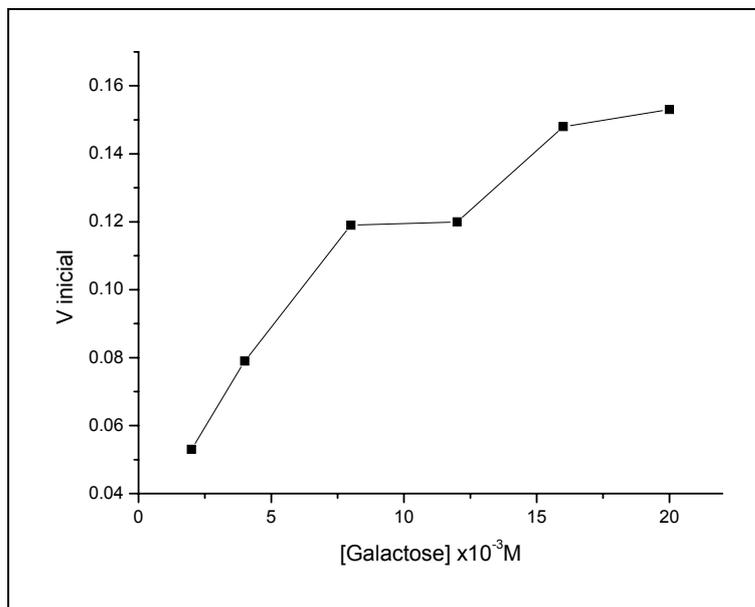


Figura 32 - Gráfico de velocidade inicial *versus* concentração da galactose.

A partir da regressão linear o valor de k_{obs} obtido para este processo foi de $1,1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$

- **Composto [Cu(apyhist)OH⁺]:**

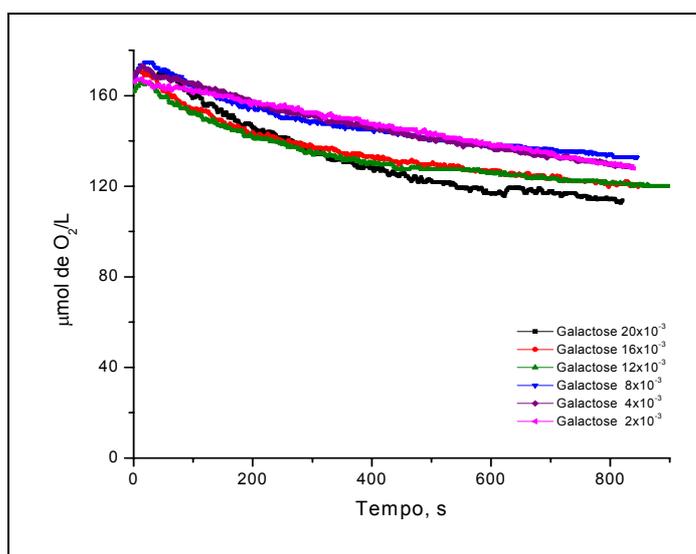


Figura 33 - Consumo de oxigênio durante a variação da concentração da galactose, durante a sua oxidação.

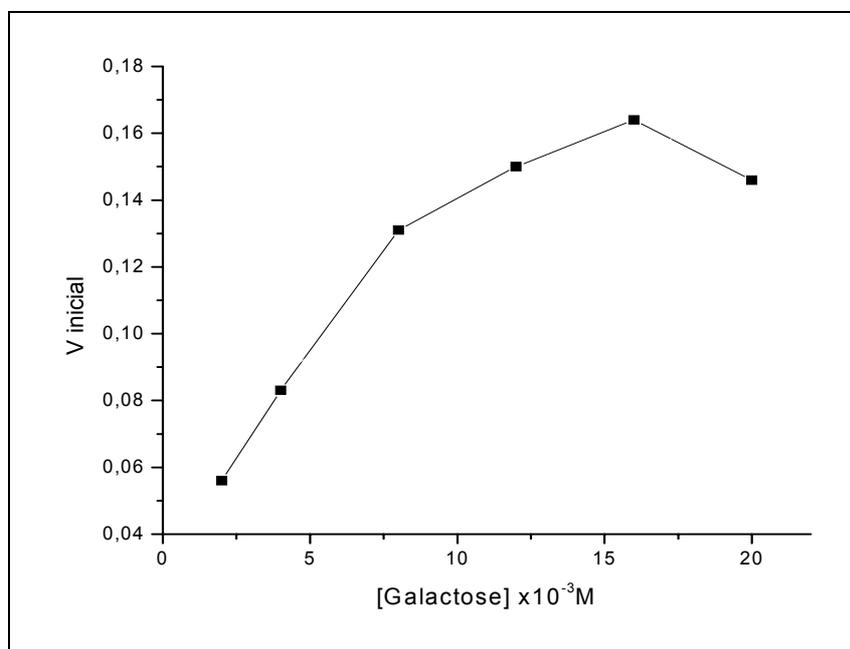


Figura 34 - Gráfico de velocidade inicial x concentração da galactose.

A partir da regressão linear o valor de k_{obs} obtido para este processo foi de $0,9 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$

Com os resultados obtidos para os dois complexos de cobre escolhidos para este estudo e comparando-se com aqueles anteriormente obtidos para o composto $[\text{Cu}(\text{isaen})]^+$, utilizado como referência, verificou-se que o composto $[\text{Cu}(\text{apy-hist})\text{OH}]^+$ atua como melhor catalisador na oxidação da galactose.

A partir daí, utilizando-se como catalisador apenas o $[\text{Cu}(\text{apy-hist})\text{OH}]^+$, variou-se a concentração do tampão carbonato, mantendo-se constante as concentrações do catalisador e do carboidrato, a 25°C e $\text{pH}=12$.

As curvas obtidas são mostradas nas Figuras 35 e 36 a seguir.

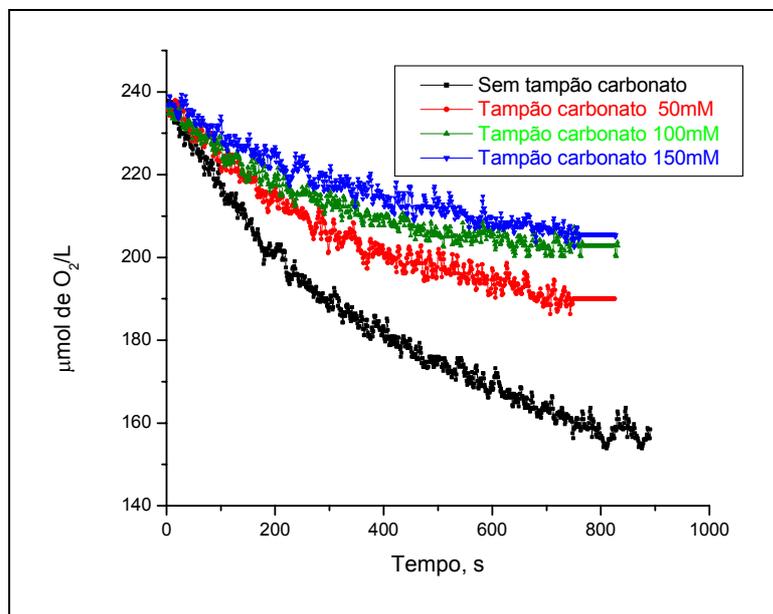


Figura 35 – Consumo de oxigênio durante a oxidação da galactose, variando-se a concentração do tampão.

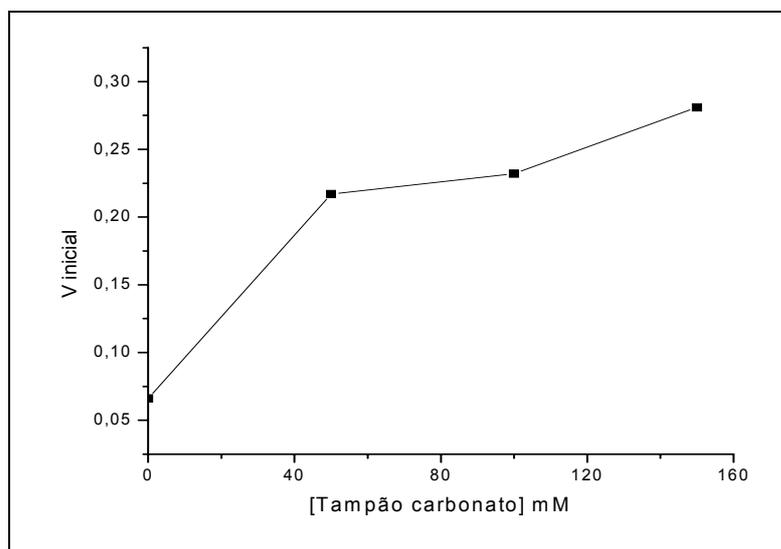


Figura 36 – Gráfico de velocidade inicial para oxidação da galactose, variando-se a concentração do tampão.

Pode-se observar que a velocidade inicial aumenta com a concentração de tampão crescente. O ponto zero refere-se ao estudo em pH=12 ajustado com hidróxido de sódio.

Por fim variou-se o pH, mantendo-se constante as concentrações do complexo, carboidrato e tampão carbonato. Novas curvas de consumo de oxigênio e velocidade inicial foram obtidas e estão mostradas nas Figuras 37 e 38 a seguir.

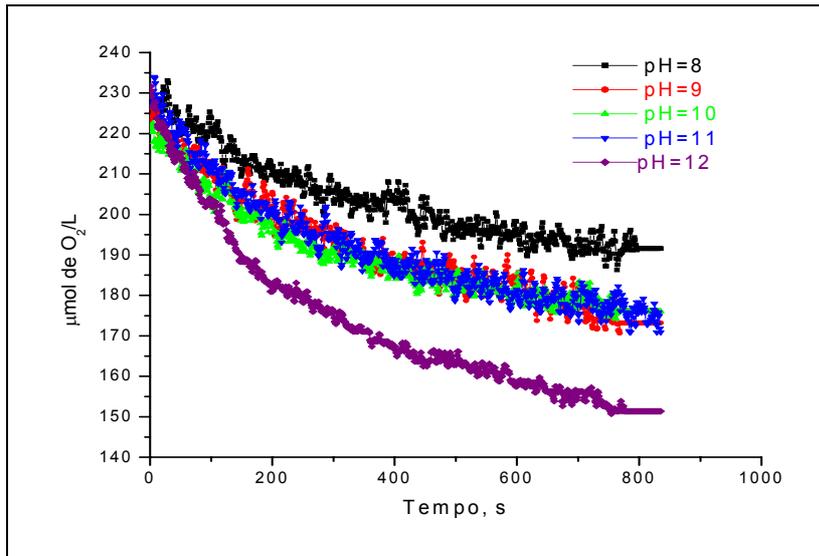


Figura 37 - Consumo de oxigênio durante a oxidação da galactose, variando-se o pH.

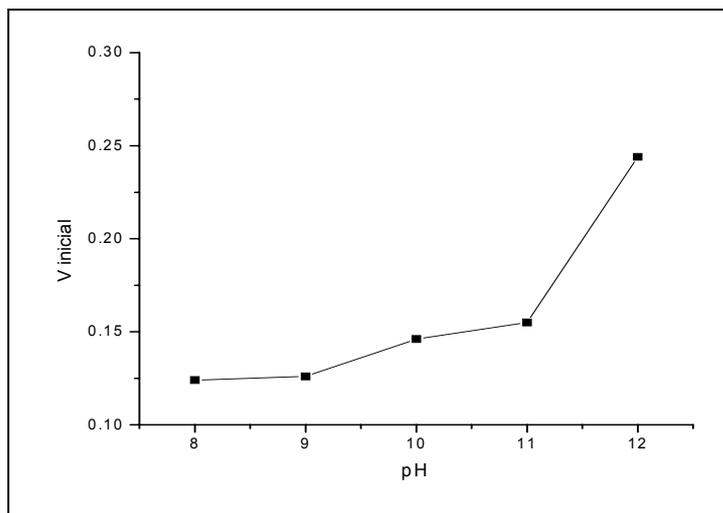


Figura 38 – Gráfico de velocidade inicial para oxidação da galactose, variando-se o pH.

Observa-se a velocidade inicial é dependente do pH do meio, aumentando com o pH crescente a partir de pH 8, e apresentou um aumento acentuado em pH>11.

A lei cinética verificada para estes compostos foi a mesma anteriormente determinada para compostos similares [J Mol Cat 2004]. Os valores de k_{obs} foram muito semelhantes, quando o substrato utilizado era D-glicose ou D-galactose. Entretanto, no caso da D-frutose o composto $[Cu(isaen)H_2O]^+$ foi muito mais eficiente que os outros, com constante de velocidade uma ordem de grandeza maior. O complexo de cobre, presente em concentrações μ molares, parece ser importante para iniciar o processo de oxidação do carboidrato, que depois se propaga predominantemente pelas espécies reativas de oxigênio formadas. A reação só é significativa em pH alto, pois a espécie reativa do carboidrato é o enol.

4.3. Interação dos complexos de cobre(II) com biomoléculas

4.3.1. Estabilidade Termodinâmica: Medidas de Dicroísmo Circular:

Para tentar compreender as possíveis interações entre a albumina e os complexos de cobre(II), verificando-se os sítios de ligação do metal e a influência do ligante, escolheu-se a técnica de Dicroísmo Circular.

O Dicroísmo Circular é uma técnica espectroscópica que depende da assimetria estrutural da molécula e pode ser definido como a interação entre a diferença de absorção entre a luz polarizada à esquerda com a luz polarizada à direita com uma molécula opticamente ativa, produzindo então um espectro característico. Uma molécula opticamente ativa pode interagir com os componentes da luz circularmente polarizada [172] de maneira diversificada. A técnica de CD detecta essa interação pela diferença de absorção, por meio da polarização circular, onde primeiramente o feixe de radiação deve ser plano polarizado e, em segundo lugar, o feixe polarizado deve passar por um dispositivo que o desdobre em componentes polarizados circularmente a direita e à esquerda, atrasando um componente em relação ao outro em exatamente $\frac{1}{4}$ de comprimento de onda [173].

Esta técnica é muito empregada no estudo de mudanças conformacionais, vizinhanças locais, interações de ligantes com proteínas ou outras biomoléculas e também como uma estimativa qualitativa da estrutura secundária [174].

A estabilidade termodinâmica dos complexos diimínicos de cobre(II) foi estimada utilizando-se esta técnica e a albumina bovina (BSA) foi utilizada como quelante fisiológico de cobre(II), competitivo nos vários equilíbrios considerados.

Estudos na literatura relatam que a inserção de íons cobre(II), adicionados como o íon aqua-complexo, no grupo N-terminal da albumina (sítio I) ocasiona variações nas transições eletrônicas próximas a 564 nm [175]. A amplitude dessa banda característica negativa de Cotton corresponde à formação de uma espécie [Cu(II)BSA] e é diretamente proporcional à sua concentração. A albumina bovina foi então titulada com quantidades crescentes dos diferentes complexos de cobre(II) com ligantes imínicos, sendo os espectros obtidos monitorados no intervalo de 300 a

650 nm. A estabilidade termodinâmica de cada complexo estudado foi deduzida a partir da regressão da amplitude CD, a 564 nm, versus a concentração da espécie [Cu(II)BSA] formada, conforme explicado anteriormente.

Nas Figuras 39 a 43 estão os espectros de CD obtidos para os complexos de cobre(II) estudados. A curva analítica para [Cu(H₂O)₄]²⁺ encontra-se na Figura 44.

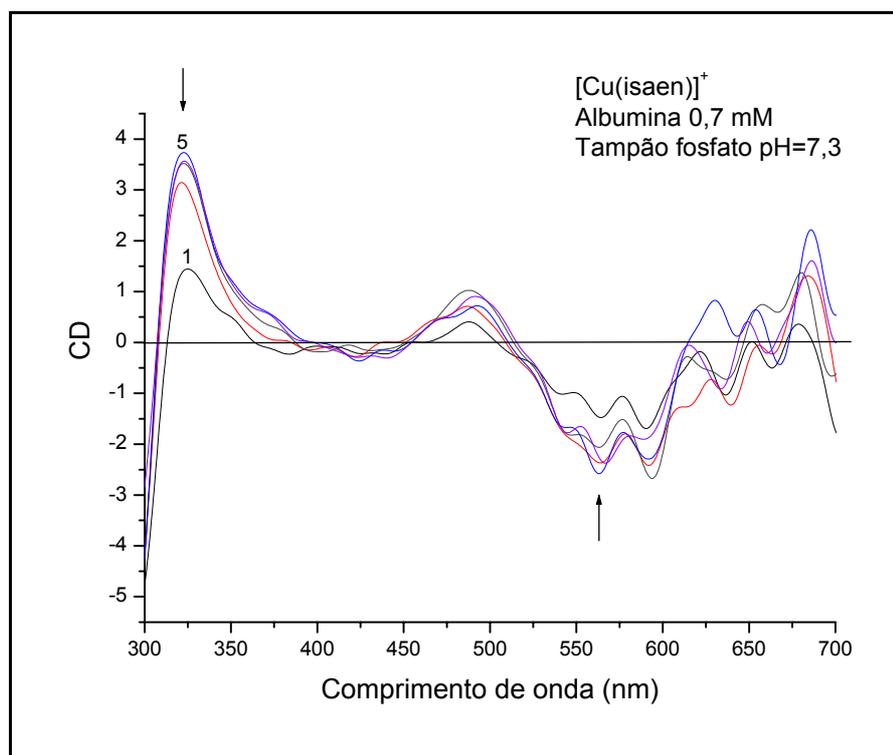


Figura 39. Espectro de CD para o composto [Cu(isaen)OH]⁺ (1,5 mM) adicionado a BSA (0,7 mM), em tampão fosfato 10 mM, pH = 7,3.

Volume adicionado de CuL (mL): (1) 0,0 (2) 0,1 (3) 0,2 (4) 0,3 (5) 0,4 (6) 0,5

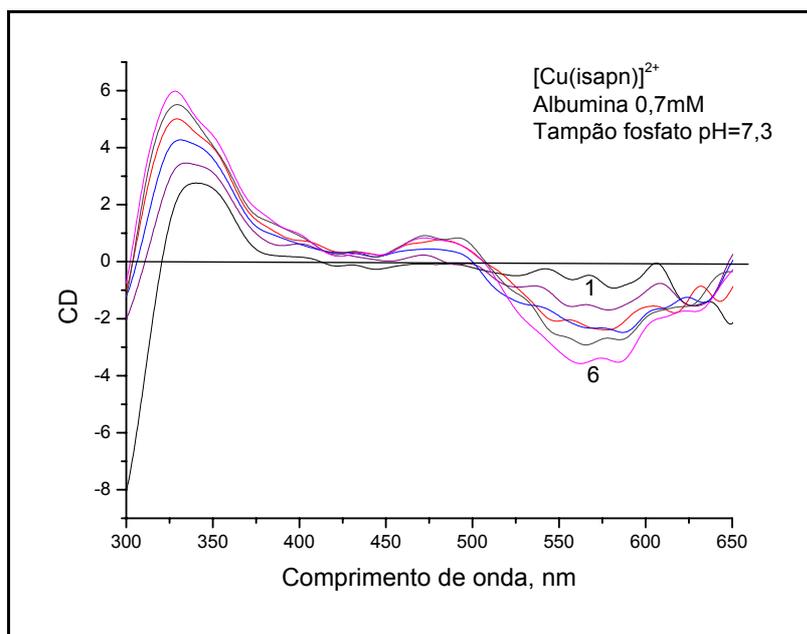


Figura 40. Espectro de CD para o composto $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ (1,5 mM) adicionado a BSA (0,7 mM) em tampão fosfato 10 mM, pH = 7,3.

Volume adicionado de CuL (mL): (1) 0,0 (2) 0,1 (3) 0,2 (4) 0,3 (5) 0,4 (6) 0,5

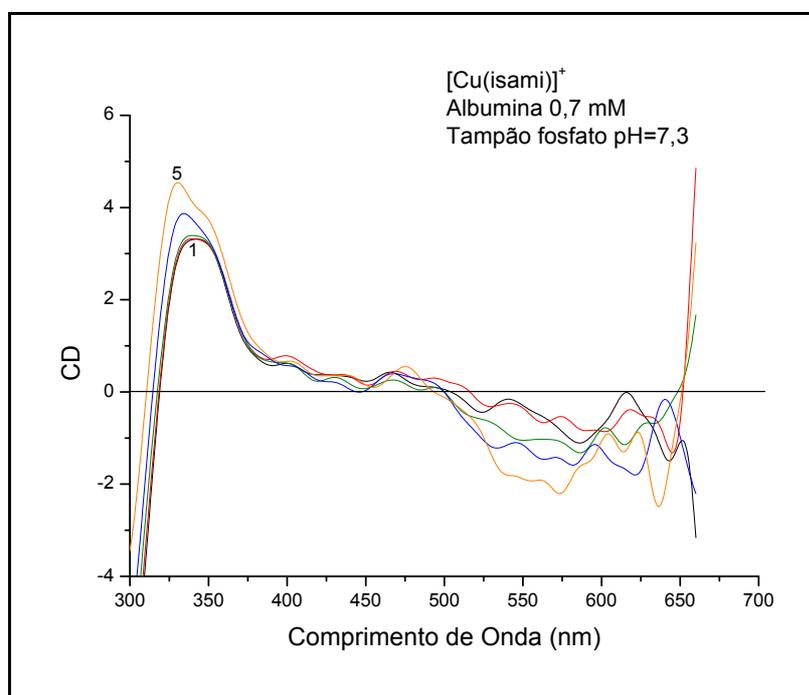


Figura 41. Espectro de CD para $[\text{Cu}(\text{isaquin})]^+$ (1,5 mM) adicionado a BSA (0,7 mM) em tampão fosfato 10 mM, pH = 7,3.

Volume adicionado de CuL (mL): (1) 0,0 (2) 0,1 (3) 0,2 (4) 0,3 (5) 0,4 (6) 0,5.

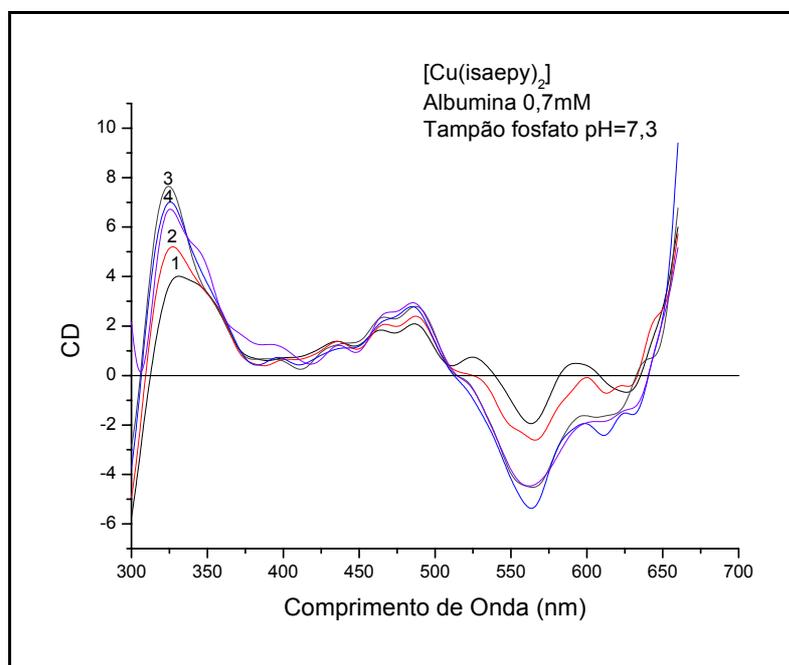


Figura 42. Espectro de CD para $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ (1,5 mM) adicionado a BSA (0,7 mM) em tampão fosfato 10 mM, pH = 7,3.

Volume adicionado de CuL (mL): (1) 0,0 (2) 0,1 (3) 0,2 (4) 0,3 (5) 0,4 (6) 0,5

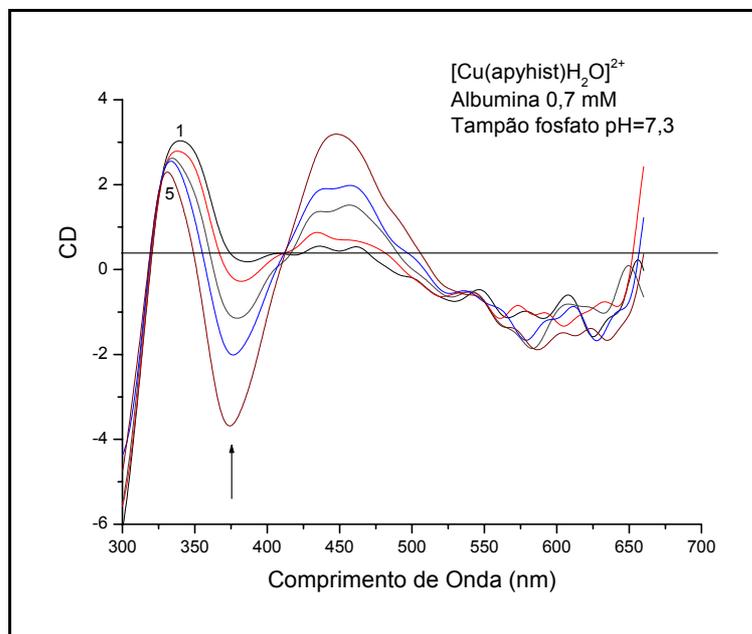


Figura 43. Espectro de CD para $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (1,5 mM) em BSA (0,7 mM) em tampão fosfato 10 mM pH = 7,3.

Volume adicionado de CuL (mL): (1) 0,0 (2) 0,1 (3) 0,2 (4) 0,3 (5) 0,4 (6) 0,5

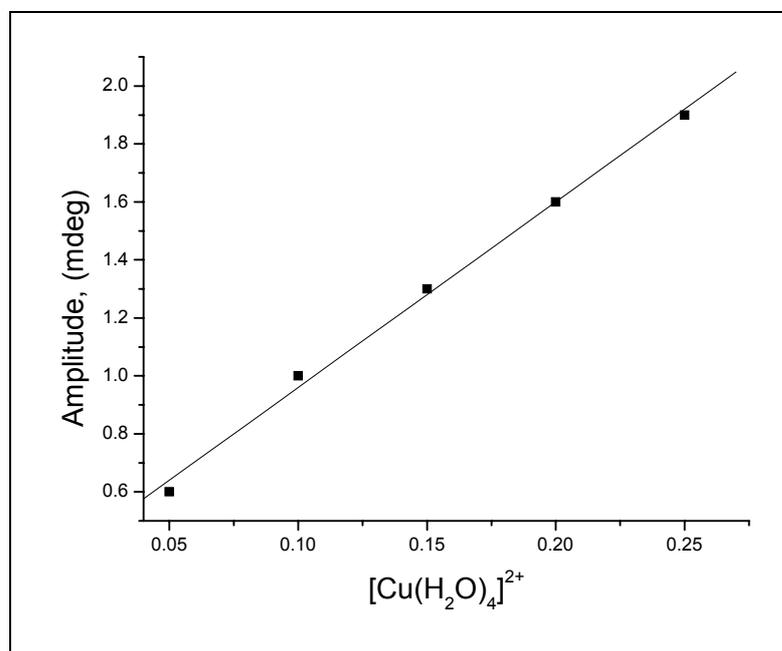


Figura 44. Curva de calibração para o complexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, onde $y = 6,4x + 0,32$, com $R = 0,998$.

A constante de estabilidade relativa ($\log K$) foi determinada em cada caso, através da capacidade de competição entre os complexos diimínicos e a albumina bovina ($\log K = 16,2$), na coordenação dos íons de cobre, como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Determinação da constante de estabilidade relativa para espécies [CuL], na presença de albumina bovina ($\lambda = 564$ nm).

[CuL]	Amplitude (cm)	[BSA] (mM)	[CuL] (mM)	[Cu(BSA)] (mM)	β_{rel}	log K
[Cu(isaen)H ₂ O] ⁺	0,3	0,68	0,05	0,042	3,45	15,7
	0,7	0,66	0,10	0,095	3,22	15,7
	1,1	0,64	0,15	0,147	14,6	15,0
	1,1	0,62	0,20	0,147	0,90	16,2
	1,8	0,60	0,25	0,243	23,4	14,8
[Cu(isapn)] ²⁺	0,3	0,68	0,05	0,047	1,17	16,1
	0,7	0,66	0,10	0,098	8,57	15,2
	0,7	0,64	0,15	0,098	0,35	16,6
	1,0	0,62	0,20	0,137	0,65	16,4
	1,4	0,60	0,25	0,180	1,10	16,1
[Cu(isami)] ⁺	0,3	0,68	0,05	0,047	1,17	16,3
	0,4	0,66	0,10	0,059	0,14	17,0
	0,8	0,64	0,15	0,111	0,58	16,4
	0,8	0,62	0,20	0,111	0,27	16,8
	1,4	0,60	0,25	0,180	1,10	16,1
[Cu(apyhist)H ₂ O] ²⁺	0,1	0,68	0,05	0,021	0,02	17,8
	0,4	0,66	0,10	0,060	0,15	17,0
	0,4	0,64	0,15	0,060	0,07	17,4
	0,4	0,62	0,20	0,060	0,05	17,5
	0,5	0,60	0,25	0,070	0,06	17,4

Observando-se o espectro de CD da Figura 46 verifica-se que o complexo [Cu(apyhist)H₂O]²⁺ apresenta um comportamento diferente do de outros complexos estudados. Este complexo apresenta uma banda adicional em aproximadamente 370 nm, indicando interação com outro sítio da albumina, além do sítio I, que já é bem caracterizado por bandas de CD em 560 e 475 nm, devido a transições d-d, e de uma banda em 320 nm devido à transferência de carga de n-peptídeo deprotonado → Cu(II). Para este composto [Cu(apyhist)H₂O]²⁺ calculou-se a constante de estabilidade relativa neste comprimento de onda (370 nm). Os valores correspondentes encontram-se na Tabela 7.

A Tabela 8 mostra os valores médios das constantes obtidas para todos os complexos de cobre(II) estudados.

Tabela 7. Determinação da constante de estabilidade relativa para espécies [CuL], na presença de albumina bovina ($\lambda = 370$ nm)

[CuL]	Amplitude (cm)	[BSA] (mM)	[CuL] (mM)	[Cu(BSA)] (mM)	β_{rel}	log K
[Cu(apyhist)H ₂ O] ²⁺	0,6	0,66	0,10	0,085	0,83	16,3
	1,1	0,64	0,15	0,149	45,31	14,5
	1,5	0,62	0,20	0,193	12,67	15,1
	1,9	0,60	0,25	0,245	34,3	14,7

Tabela 8. Constante de Estabilidade para os Complexos de Cobre(II) Estudados.

CuL	λ (nm)	Log K
[Cu(apy-hist)H ₂ O] ²⁺	370	17,4
[Cu(isapn)] ²⁺	563	16,1
[Cu(isaen)H ₂ O] ⁺	565	15,5
[Cu(isaepy) ₂] ²⁺	565	-
[Cu(isami)] ⁺	565	16,5

O valor da constante de estabilidade referente ao complexo [Cu(isaepy)₂]²⁺ não pode ser obtido, uma vez que os valores de amplitude em seus espectros de CD foi maior do que para o aqua-complexo. Isto indica que o complexo pode ter se inserido na albumina como um todo, isto é, incluindo o ligante, e não apenas perdendo cobre para a proteína. Este mesmo comportamento foi anteriormente observado para o composto [Cu(apzpn)]²⁺ [85].

Para o complexo [Cu(isaquin)]⁺ observa-se um valor de constante ligeiramente maior do que o valor da constante para formação de [Cu(II)BSA], que é log K=16,2, revelando uma estabilidade grande do complexo diimínico de cobre(II), comparável à da própria espécie cobre-albumina. Para os complexos [Cu(isapn)]²⁺ e [Cu(isaen)H₂O]⁺ os valores das constantes de estabilidade verificados são da mesma ordem do observado para a constante de formação de [Cu(II)BSA], podendo também ser competitivos no meio biológico.

4.3.2. Estudo espectrofotométrico dos complexos de cobre(II) na presença de BSA

Para avaliar melhor os resultados obtidos com os experimentos de dicroísmo circular, monitorou-se a transição d-d dos complexos de cobre(II) na presença de albumina bovina, nas mesmas condições anteriores. Nas Figuras 45 a 50 encontram-se os espectros registrados para cada complexo.

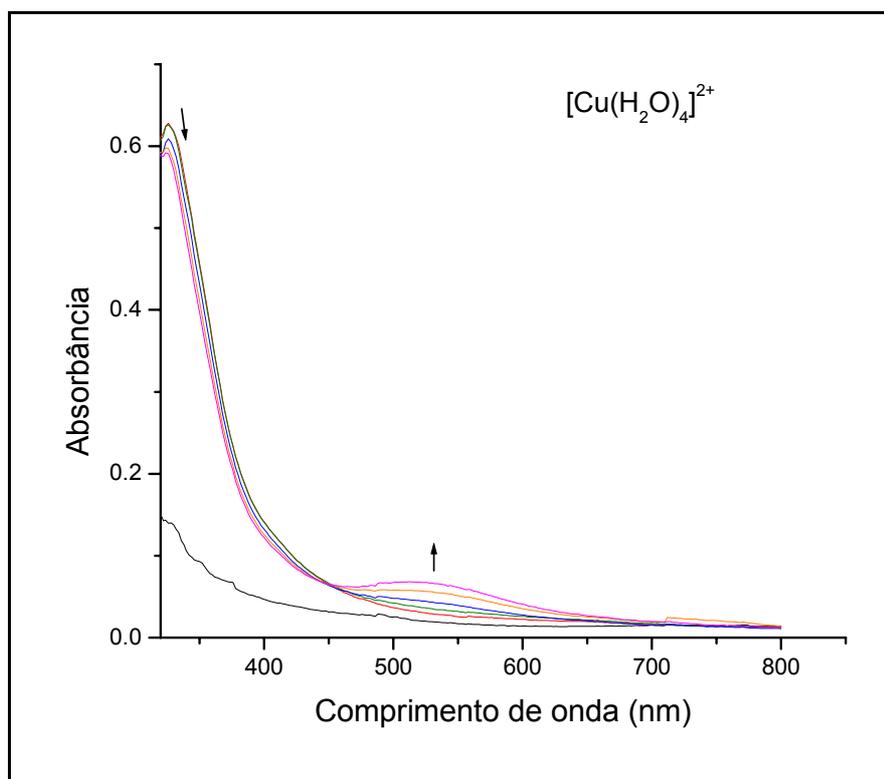


Figura 45. Espectros eletrônicos do $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ (1,5 mM) na presença de concentrações crescentes de albumina bovina (BSA) em tampão fosfato 10 mM (pH = 7,3), $T = (25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$

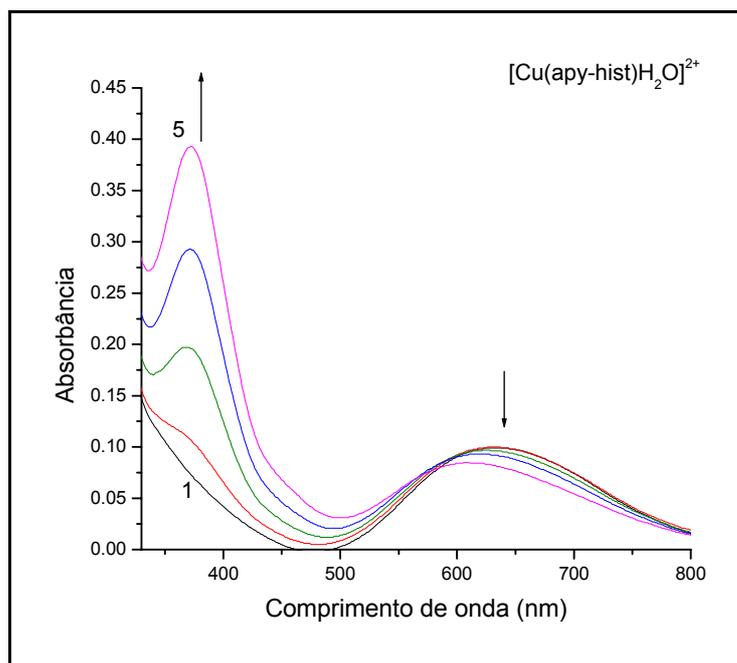


Figura 46. Espectros eletrônicos do $[\text{Cu}(\text{apy-hist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (1,5 mM) na presença de concentrações crescentes de albumina bovina (BSA) em tampão fosfato 10 mM (pH = 7,3), $T = (25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$

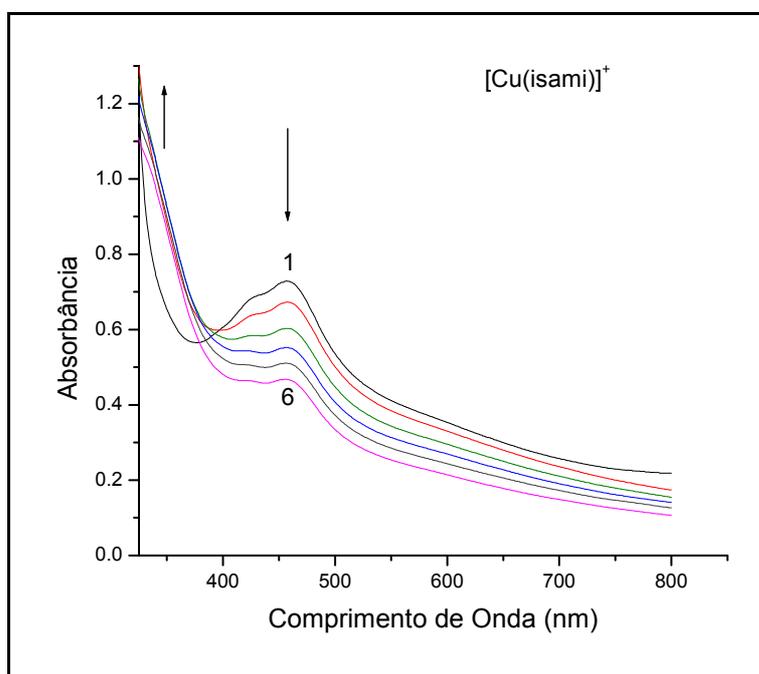


Figura 47. Espectros eletrônicos do $[\text{Cu}(\text{isami})]^+$ (1,5 mM) na presença de concentrações crescentes de albumina bovina (BSA) em tampão fosfato 10 mM (pH = 7,3), $T = (25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$

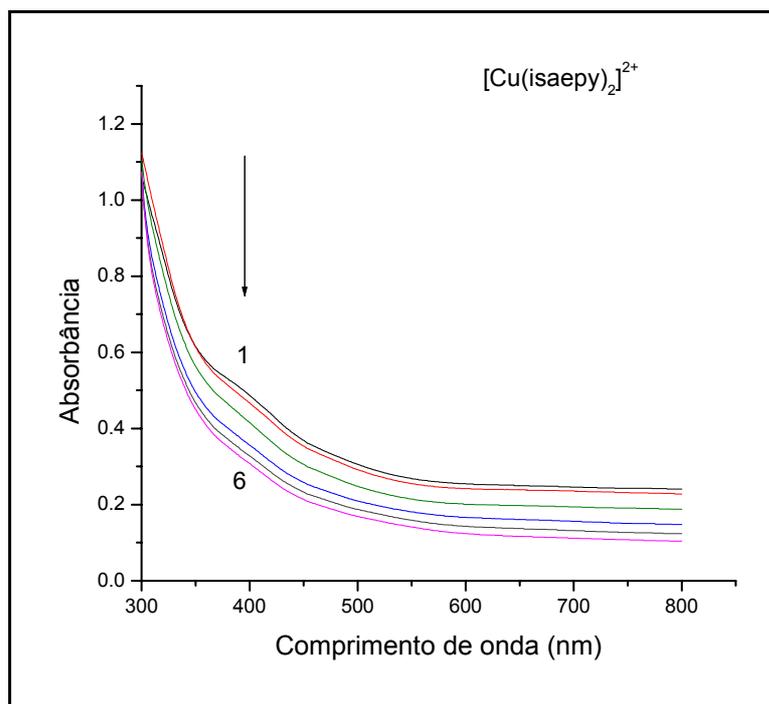


Figura 48. Espectros eletrônicos do $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ (1,5 mM) na presença de concentrações crescentes de albumina bovina (BSA) em tampão fosfato 10 mM (pH = 7,3), $T = (25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$

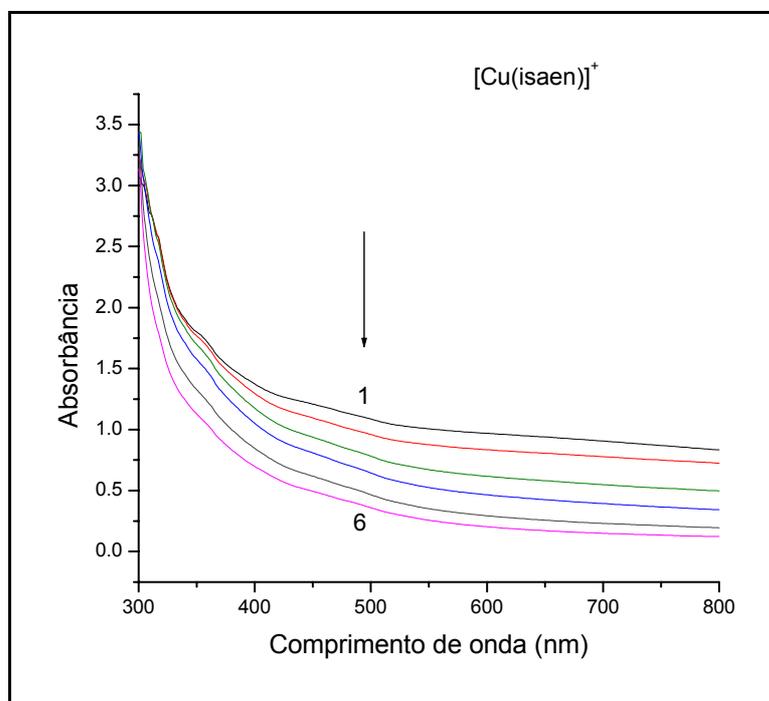


Figura 49. Espectros eletrônicos do $[\text{Cu}(\text{isaen})]^+$ (1,5 mM) na presença de concentrações crescentes de albumina bovina (BSA) em tampão fosfato 10 mM (pH = 7,3), $T = (25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$

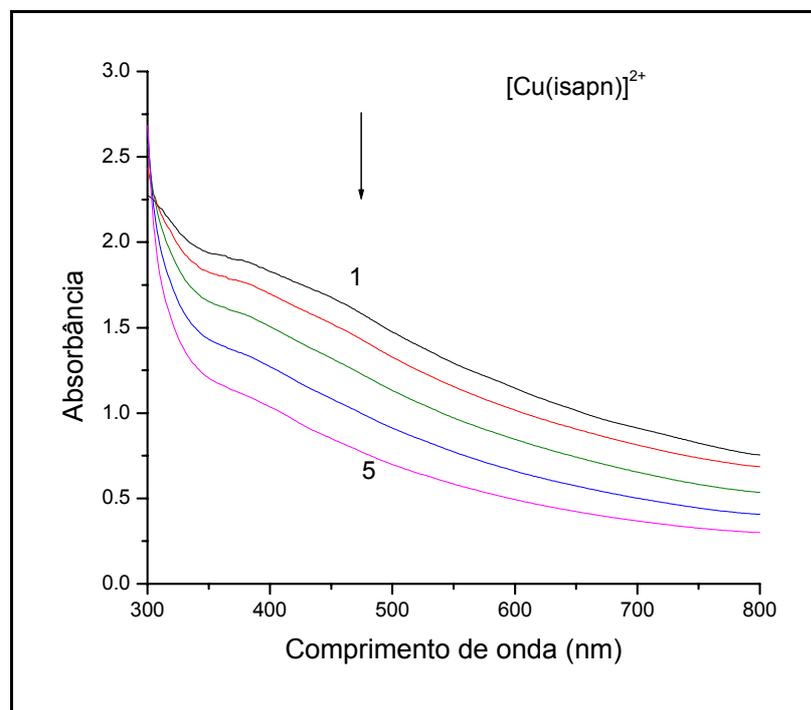


Figura 50. Espectros eletrônicos do $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ (1,5 mM) na presença de concentrações crescentes de albumina bovina (BSA) em tampão fosfato 10 mM (pH = 7,3), $T = (25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$

Para o aqua-complexo observa-se o surgimento de uma banda em aproximadamente 560 nm correspondente à formação do composto $[\text{Cu}(\text{II})\text{BSA}]$. Neste mesmo espectro observa-se um ponto isobéptico em 450 nm e uma discreta diminuição da banda em 330 nm, correspondente aos aminoácidos presentes na albumina.

Para o complexo $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, além da diminuição da intensidade da banda d-d, observa-se também seu deslocamento para um comprimento de onda menor. Outra observação é a formação de uma banda intensa com o máximo em 370 nm, confirmando que a espécie resultante da interação deste complexo com a albumina bovina é a mesma observada por dicroísmo circular.

Para os outros complexos estudados não foi possível adquirir nenhuma informação adicional, já que a banda d-d destes complexos não é visível, isto é, não é bem definida, por ser muito larga. Observando-se os espectros destes complexos

(vide banda em ~450 nm) parece ter ocorrido apenas uma diluição, ao se adicionar albumina.

4.3.4. Estudos de EPR

Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) é uma técnica poderosa para estudar complexos com elétrons desemparelhados. Há várias técnicas de EPR, cada uma com vantagens distintas. A mais popular, devido à sua viabilidade, é a espectroscopia EPR de onda contínua, onde a radiação de microondas (GHz) é aplicada à amostra continuamente [176]. O EPR baseia-se no fato de que um spin eletrônico pode adotar duas orientações ao longo da direção definida por um campo magnético aplicado β . A diferença de energia entre os estados $m_s = + 1/2$ e $-1/2$ é:

$$\Delta E = g \mu \beta \quad (3)$$

onde o valor de g depende da identidade da partícula e μ é o momento magnético (Shirever). Para o elétron livre, g_e é 2.0023. O fator g em um complexo difere de g_e por uma quantidade que depende da habilidade do campo aplicado de induzir campos magnéticos locais no complexo. Se $g > g_e$, o campo local é maior do que o aplicado; se $g < g_e$, o campo local é menor. O sinal e a magnitude dos campos locais induzidos dependem da separação dos níveis de energia do complexo. Quanto mais próximos eles estão, mais fácil é para o campo aplicado induzir a circulação dos elétrons de orbital e conseqüentemente produzir um campo magnético local. O valor de g indica a simetria do ambiente ligante e dá uma indicação da disponibilidade sobre os níveis de energia do complexo. As linhas observadas em um espectro de EPR podem ser desdobradas pela interação do spin eletrônico com o spin nuclear de átomos vizinhos que apresentem momento magnético. Em íons metálicos paramagnéticos, o desdobramento dominante vem do próprio íon metálico chamado estrutura hiperfina (caracterizada pelo parâmetro A). O espectro apresenta-se usualmente com muitas linhas, porque os valores de g e as constantes hiperfinas são anisotrópicas, isto é, possuem valores diferentes dependendo do eixo de simetria. Por exemplo, para o íon cobre com momento nuclear $I = 3/2$ o sinal hiperfino será desdobrado em $n = 2I + 1 = 4$ linhas.

A anisotropia espectral é muito importante na interpretação dos espectros de íons dos metais de transição e usualmente é especificada por três valores de g e de A : A_{zz} , A_{xx} e A_{yy} , g_{zz} , g_{xx} e g_{yy} . Em alguns casos o sistema molecular apresenta simetria axial e os valores são designados: $A_{//} = A_{zz}$ e $A_{\perp} = A_{xx} = A_{yy}$, e analogamente, $g_{//} = g_{zz}$ e $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$.

Deste modo, a interpretação dos espectros de EPR permite obter informações sobre a configuração eletrônica de íons metálicos paramagnéticos, seu estado de oxidação e suas características estruturais, como por exemplo, distorções ao redor do íon [177].

As possíveis interações entre os complexos de cobre(II) com o plasma sanguíneo e a albumina humana foram investigadas utilizando-se a técnica de EPR. Para todos complexos estudados os espectros de EPR foram registrados a baixa temperatura (77K), em geral com ganho de 10^3 , 15G de intensidade de modulação, constante de tempo 20,48ms e acúmulo de 4 scans ou varreduras. Os espectros registrados estão mostrados nas Figuras 51 a 56 a seguir e os parâmetros determinados estão relacionados nas Tabelas 9 a 14 a seguir.

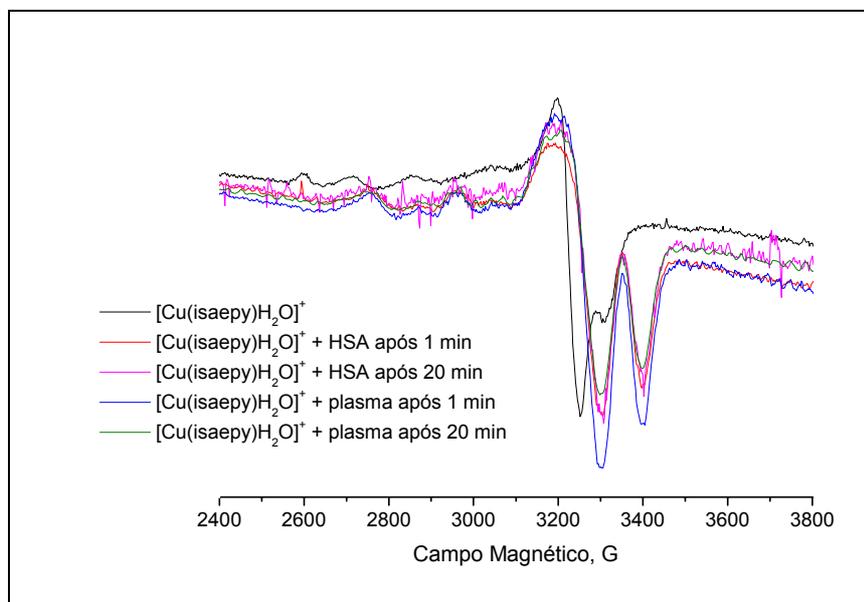


Figura 51. Espectro de EPR do $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ em presença e ausência de HSA e plasma sanguíneo.

Tabela 9. Parâmetros de EPR determinados para $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2\text{H}_2\text{O}]^{2+}$

$[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$				
	$^1A_{//}$ (10^{-4} cm^{-1})	$^2A_{//}$ (10^{-4} cm^{-1})	$^3A_{//}$ (10^{-4} cm^{-1})	g_{\perp}
CuL	195	NO	NO	2,072
HSA após 1min	195	206	NO	2,057
HSA após 20 min	195	206	171	2,057
Plasma após 1 min	195	206	171	2,054
Plasma após 20 min	195	206	171	2,054

NO =
não
obser
vado

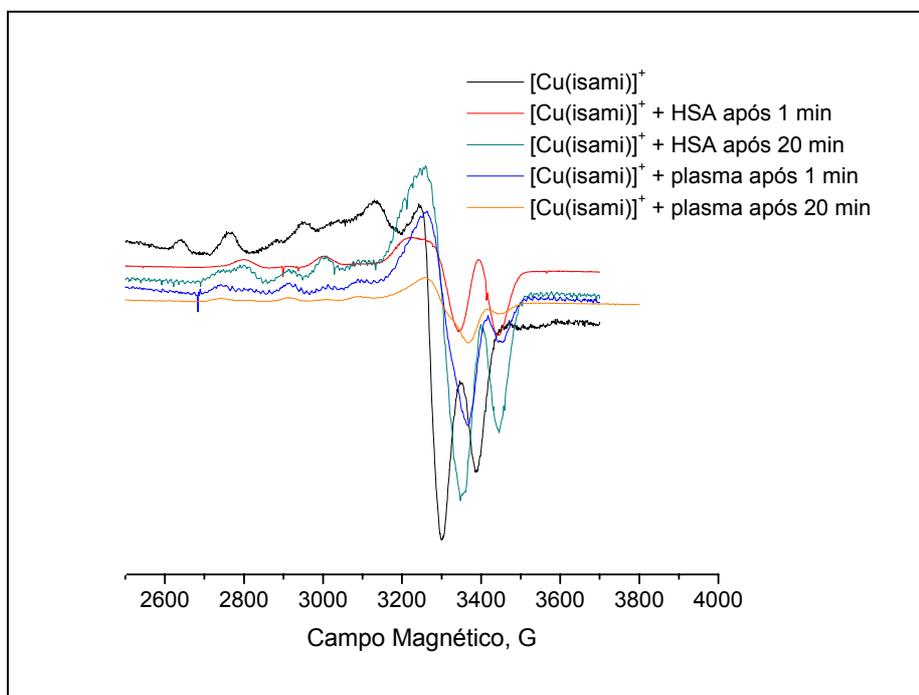


Figura 52. Espectro de EPR do $[\text{Cu}(\text{isami})]^+$ em presença e ausência de HSA e plasma sanguíneo.

Tabela 10. Parâmetros de EPR determinados para $[\text{Cu}(\text{isami})]^+$

$[\text{Cu}(\text{isami})]^+$				
	$^1A_{//}$ (10^{-4} cm^{-1})	$^2A_{//}$ (10^{-4} cm^{-1})	$^3A_{//}$ (10^{-4} cm^{-1})	g_{\perp}
[CuL]	185	NO	NO	2,078
HSA após 1 min	185	205	NO	2,055
HSA após 20 min	NO	205	171	2,055
Plasma após 1 min	185	205	NO	2,057
Plasma após 20 min	NO	205	171	2,057

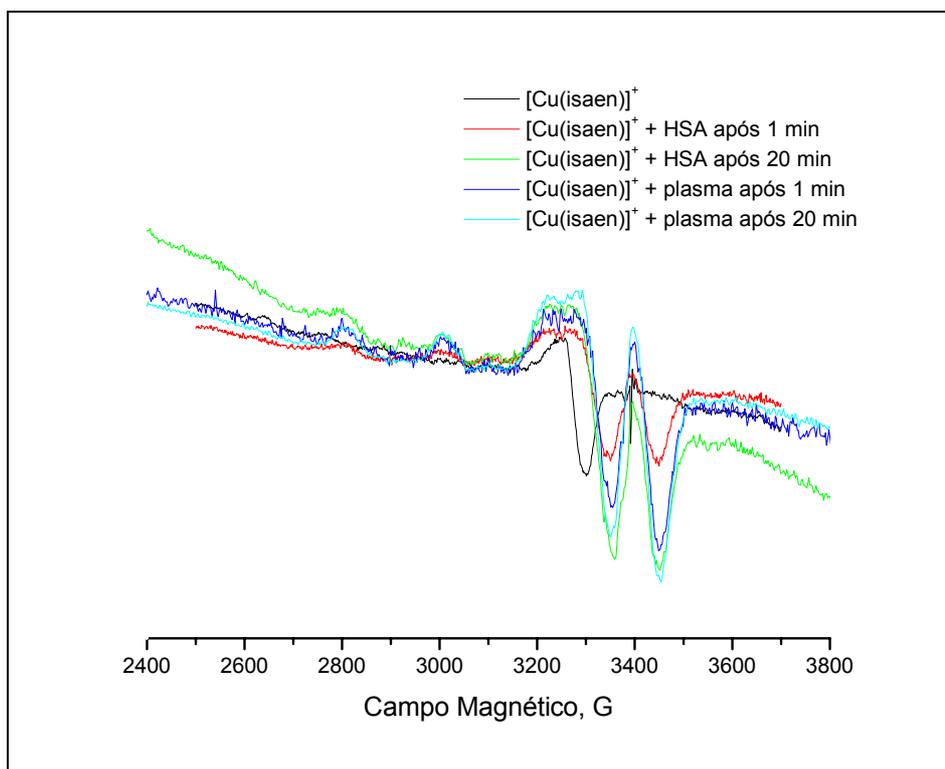


Figura 53. Espectro de EPR do $[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]$ na presença e na ausência de HSA e plasma sanguíneo.

Tabela 11. Parâmetros de EPR para $[\text{Cu}(\text{isaen})]^+$

$[\text{Cu}(\text{isaen})]^+$			
	$^1A_{//}$ (10^{-4} cm^{-1})	$^2A_{//}$ (10^{-4} cm^{-1})	g_{\perp}
CuL	NO	NO	2,077
HSA após 1min	195	206	2,051
HSA após 20 min	195	206	2,052
Plasma após 1 min	195	206	2,047
Plasma após 20 min	195	206	2,047

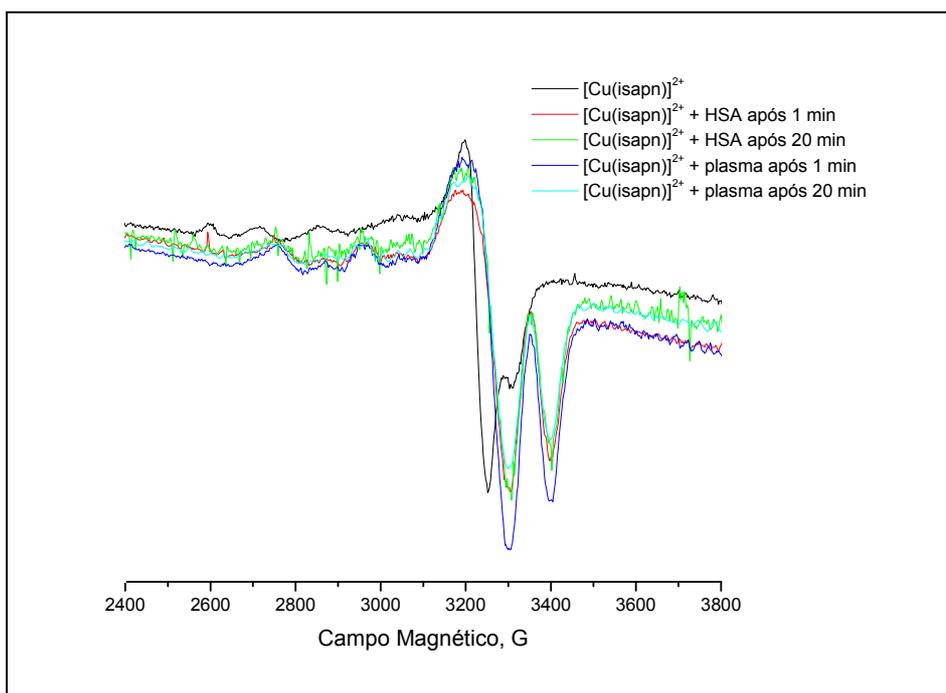


Figura 54. Espectro de EPR de $[\text{Cu}(\text{isaen})]^+$ em presença e ausência de HSA e plasma sanguíneo.

Tabela 12. Parâmetros de EPR para $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$

$[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$			
	$^1A_{//}$ (10^{-4} cm^{-1})	$^2A_{//}$ (10^{-4} cm^{-1})	g_{\perp}
CuL	187	NO	2,072
HSA após 1min	187	205	2,054
HSA após 20 min	187	205	2,052
Plasma após 1 min	187	205	2,054
Plasma após 20 min	187	205	2,055

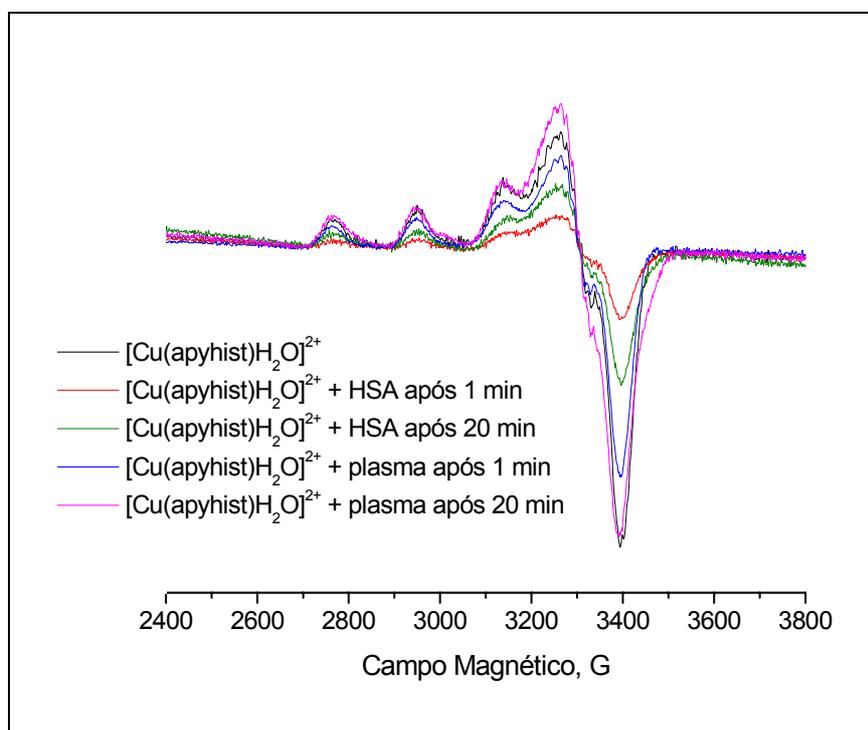


Figura 55. Espectro de EPR de $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ em presença e ausência de HSA e plasma sanguíneo.

Tabela 13. Parâmetros de EPR para $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$

$[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$		
	$^1A_{//}$ (10^{-4} cm^{-1})	g_{\perp}
CuL	NO	2,095
HSA após 1min	187	2,051
HSA após 20 min	187	2,052
Plasma após 1 min	187	2,054
Plasma após 20 min	187	2,054

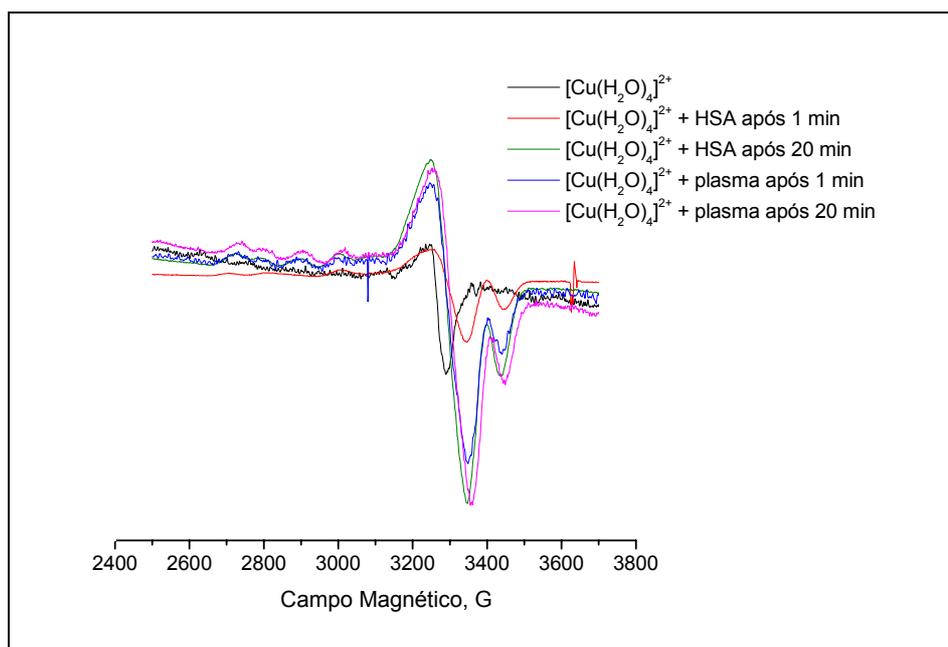


Figura 56. Espectro de EPR de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ em presença e ausência de HSA e plasma sanguíneo.

Tabela 14. Parâmetros de EPR para $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$

$[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$				
	$^1A_{//}$ (10^{-4} cm^{-1})	$^2A_{//}$ (10^{-4} cm^{-1})	$^3A_{//}$ (10^{-4} cm^{-1})	g_{\perp}
CuL	NO	NO	NO	2,077
HSA após 1min	NO	205	NO	2,065
HSA após 20 min	NO	205	174	2,065
Plasma após 1 min	NO	205	174	2,060
Plasma após 20 min	NO	205	174	2,060

De acordo com os resultados mostrados nas Figuras 51 a 56 e nas Tabelas acima verifica-se que os complexos $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{isami})]^+$, $[\text{Cu}(\text{isaen})]^+$, $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ apresentam o mesmo sinal com $A_{//} = 206 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, tanto em presença de HSA, como em presença de plasma sanguíneo. Este sinal é característico da interação de íons de cobre(II) com a albumina no sítio N-terminal [30] e, portanto, estes complexos interagem com a albumina presente no plasma sanguíneo imediatamente após a incubação. Além disso, para os complexos $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{isami})]^+$ e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ observa-se o aparecimento de um novo sinal com $A_{//} = 171 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ apenas após 20 minutos de reação. Este sinal corresponde a uma interação tempo-dependente entre os complexos de cobre(II) e a albumina, provavelmente em um sítio secundário da própria proteína ou é devido a interações com outra biomolécula. O $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ não apresentou estes sinais adicionais de interação com a albumina, conforme esperado, de acordo com resultados experimentais de dicroísmo circular já discutidos anteriormente.

4.3.5. SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida é um método analítico que permite separar, pela ação de um campo elétrico constante e da malha de acrilamida, moléculas diversas com base no seu peso molecular. O SDS é um denaturante protéico e, por ser dotado de uma cabeça polar de carga negativa, neutraliza as cargas positivas das proteínas, que podem então ser separadas com base apenas no seu peso molecular.

Muitas moléculas de interesse biológico como aminoácidos, peptídeos e proteínas possuem grupos ionizáveis e podem existir em solução como espécies eletricamente carregadas, seja como cátions ou como ânions. Assim, moléculas com cargas parecidas, mas com pesos moleculares diferentes, terão uma relação massa carga diferente e apresentarão uma migração diferenciada quando colocadas em presença de um campo elétrico. Os cátions migram em direção ao campo elétrico negativo e os ânions migram em direção ao campo elétrico positivo, a uma velocidade que depende do equilíbrio entre a força eletromotriz do campo elétrico e a força de atrito existente entre os íons e o meio circunstancial. Quando a eletroforese é conduzida em um suporte inerte e homogêneo, os componentes da amostra migram como bandas distintas que ao final da corrida podem ser reveladas com a utilização de técnicas analíticas apropriadas.

Os estudos utilizando SDS-PAGE foram feitos para verificar as possíveis interações dos complexos de cobre(II) com as proteínas do plasma sanguíneo e também para observar se as interações eram diferentes para cada complexo utilizado. O gel obtido está mostrado na Figura 57.

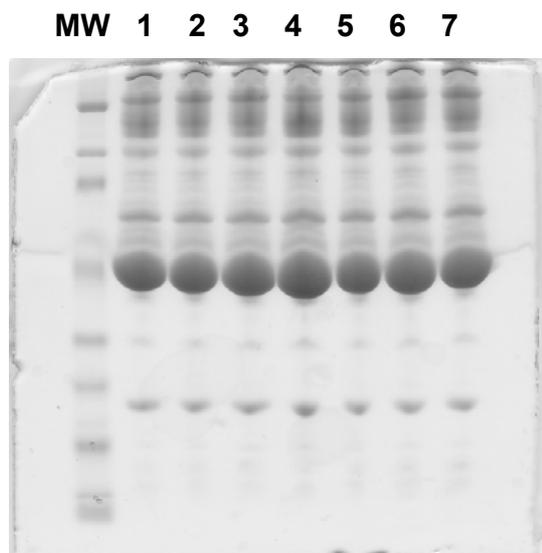


Figura 57. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%. MW: marcador de peso molecular; canaleta 1: plasma; canaleta 2: plasma + $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$; canaleta 3: plasma + $[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]^+$; canaleta 4: plasma + $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$; canaleta 5: plasma + $[\text{Cu}(\text{isami})]^+$; canaleta 6: plasma + $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$; canaleta 7: plasma + $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$.

Analisando-se a Figura 57, percebe-se que todos complexos apresentaram o mesmo perfil de distribuição observado para o plasma sozinho. Isto demonstra que nestas condições experimentais não foi possível distinguir diferenças nas interações dos diferentes complexos de cobre(II) com a albumina humana, presente no plasma. Todos os compostos se comportaram da mesma maneira.

4.3.6. Estudos de Fluorescência

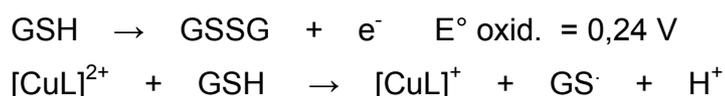
A Fluorescência é uma técnica em que uma molécula com elétrons em estados excitados tende a voltar para o estado fundamental cedendo energia para o meio e um dos processos de volta ao estado fundamental, chamado fluorescência, envolve a emissão de fótons. Ocorre, porém, que a energia do fóton emitido não é igual à do fóton absorvido, apesar do fato de que tanto a absorção de radiação como a emissão da fluorescência resultarem de transições entre um estado eletrônico excitado e o estado fundamental. Ao absorver um fóton, a molécula parte de um arranjo de equilíbrio adequado ao estado eletrônico fundamental. Quando passa a um estado eletrônico excitado, a molécula vai se rearranjar, ou sofrer uma relaxação, para uma outra geometria mais adequada a esse estado excitado. Um pouco de

energia é perdida nessa relaxação, de modo que no momento da emissão a diferença de energia entre o estado excitado e o fundamental é menor que aquela existente no momento da absorção. Como resultado, a energia do fóton emitido é menor que a do fóton absorvido.

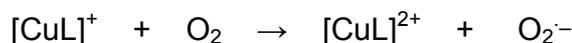
Na espectroscopia de fluorescência, uma amostra é irradiada com luz UV/Visível e detecta-se a radiação emitida pela amostra submetida à iluminação. Experimentalmente procura-se determinar a energia da radiação emitida, a intensidade com que ocorre a emissão, o desvio na direção de polarização quando a luz incidente é polarizada e o intervalo de tempo no qual a molécula permanece no estado excitado (da ordem de 10^{-9} segundos). Todos esses “parâmetros fluorescentes” dependem da interação da molécula fluorescente com o meio circundante, compreendido como as moléculas vizinhas, sejam essas moléculas do solvente ou outras presentes no meio.

A glutathione (GSH, γ -glutamylcysteinylglycine), um tripeptídeo presente em altas concentrações (da ordem mM) nas células, pode reduzir ativamente complexos de cobre, iniciando um ciclo redox, onde o cobre é reoxidado pelo oxigênio molecular.

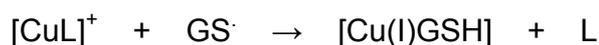
A glutathione possui um potencial de oxidação relativamente alto de 0,24 V em pH = 7,4 e é capaz de causar ativa redução do composto de cobre.



O composto pode então ser reoxidado pelo oxigênio molecular:



Por outro lado, como a glutathione é facilmente oxidável, ela pode reagir com o composto reduzido $[\text{CuL}]^+$ substituindo o ligante e gerando o complexo relativamente estável de Cu(I)–GSH que pode ser observado por seu característico espectro de fluorescência.



A glutathione reduzida que não substituiu o ligante pode gerar a glutathione oxidada [178].



O estudo da fluorescência dos complexos de cobre(II) na presença de glutatona (GSH) permitiu avaliar a extensão da redução seguida de substituição dos ligantes pela glutatona.

Para todos os complexos de cobre(II) estudados, não houve emissão na faixa de 500 a 750 nm em ausência de GSH, como mostra a Figura 11. Quando glutatona foi adicionada, alguns dos complexos exibiram uma banda característica de formação de espécie Cu(I)-tiolato, com máximo em torno de 630-650 nm, indicando uma redução e subsequente substituição do ligante. Estes espectros são mostrados na Figura 58.

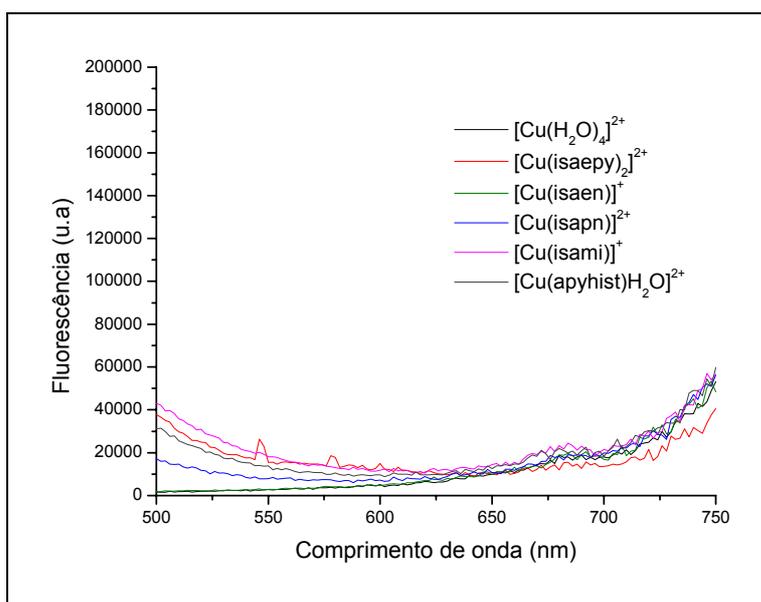


Figura 58. Espectro de emissão de fluorescência dos complexos de cobre(II) em presença de glutatona.

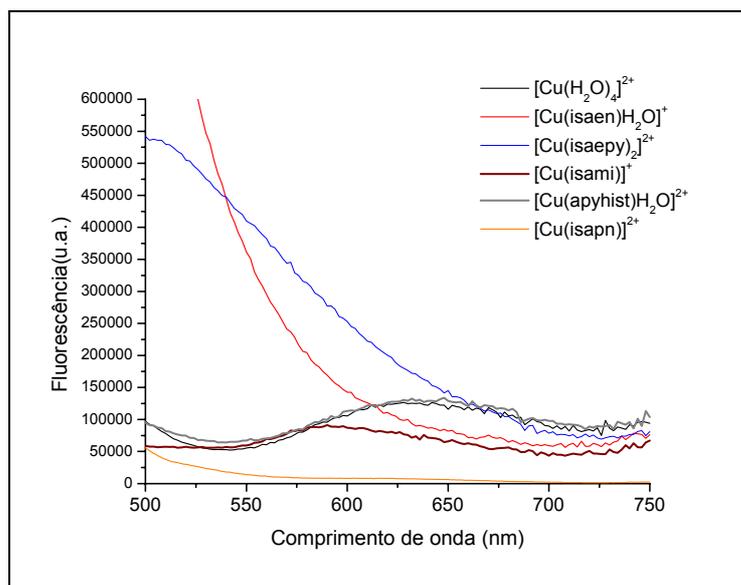


Figura 59. Espectro de emissão de fluorescência dos complexos de cobre(II) em presença de glutatona.

Pelos espectros apresentados nas Figuras 58 e 59 pode-se perceber que a redução do cobre no complexo e a subsequente substituição do ligante pela glutatona são moduladas pelo ligante, já que os complexos mostraram comportamentos diferentes frente a glutatona.

O $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ foi totalmente substituído pela glutatona como já era de se esperar. Além do aqua-complexo, o $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ mostrou resultado semelhante, sendo o único complexo imínico de cobre(II) totalmente substituído. Já o $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ foi o único complexo que resistiu à substituição do ligante, provavelmente por ser tetradentado, uma vez que não apresentou a banda característica de formação de Cu(I)-tiolato. O $[\text{Cu}(\text{isami})]^+$ apresentou a banda característica de formação de Cu(I)-tiolato um pouco deslocada e menos intensa do que o aqua-complexo, indicando que o ligante foi apenas parcialmente substituído. Para os complexos $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]^+$ ainda não foi possível explicar o comportamento apresentado. Parece não haver ocorrido a redução apreciável do metal, uma vez que a banda da GSH continuou muito intensa.

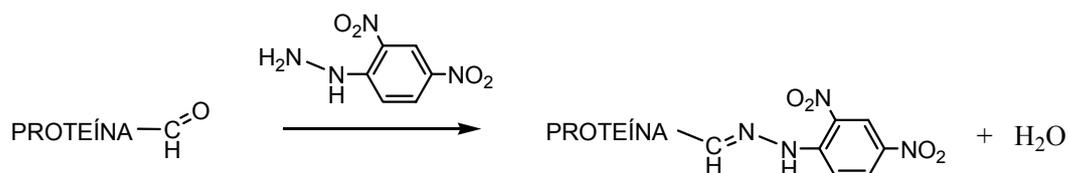
Estes resultados mostraram que os complexos de cobre(II) diferem na sua reatividade frente a glutathiona, demonstrando mais uma vez que a reatividade dos complexos está diretamente relacionada com seus ligantes, sendo modulada por eles.

4.4. Danos a biomoléculas em presença de complexos de cobre(II)

4.4.1. Danos oxidativos à albumina na presença de complexos de cobre(II)

Danos oxidativos à albumina bovina foram estimados pela formação de grupos carbonil, monitorados através da obtenção das correspondentes dinitrofenilhidrazonas, pela reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH). Estes derivados hidrazonas são estáveis, apresentando forte coloração amarela, podendo ser estimados espectrofotometricamente em $\lambda = 360-390$ nm (Figura 60). O valor de absorvidade molar ($\epsilon = 2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) foi utilizado para quantizar a formação de grupos carbonil [156].

Reação:



Nas Figuras 60, 61 e 62 estão os gráficos que representam os grupos carbonil formados nos três experimentos.

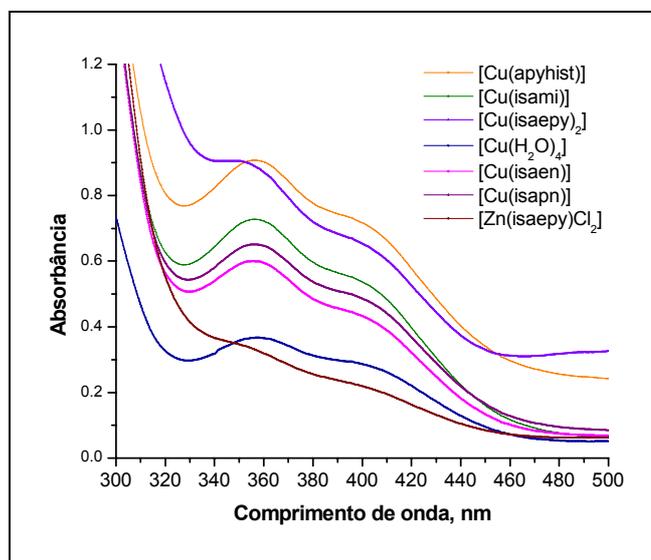


Figura 60. Espectro de absorvância para monitoramento da formação de grupos carbonílicos na proteína.

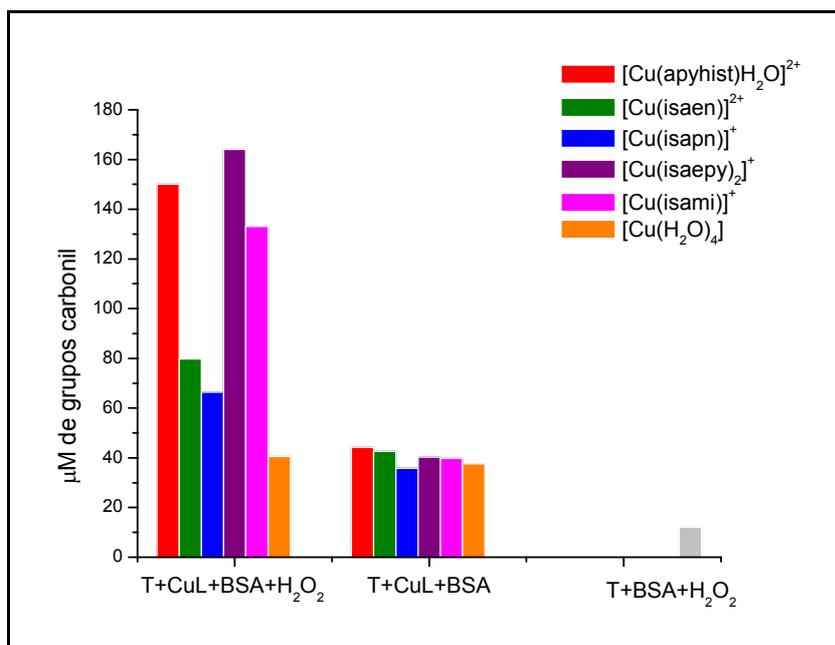


Figura 61. Dano oxidativo à albumina bovina induzido por complexos de cobre(II)

[H₂O₂] = 1,0 mM, [BSA]=5,0 mM, [CuL] = 300 μM, tampão fosfato 50 mM, pH = 7,3, T = 37,0°C

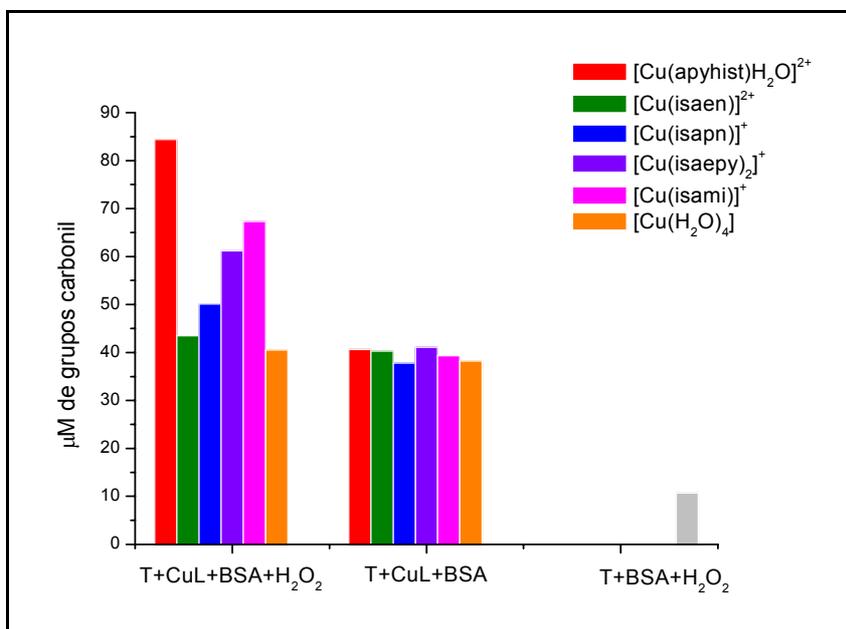


Figura 62. Dano oxidativo à albumina bovina induzido por complexos de cobre(II)

[H₂O₂] = 2,5 mM, [BSA]=5,0 mM, [CuL] = 300 μM, tampão fosfato 50 mM, pH = 7,3, T = 37,0°C

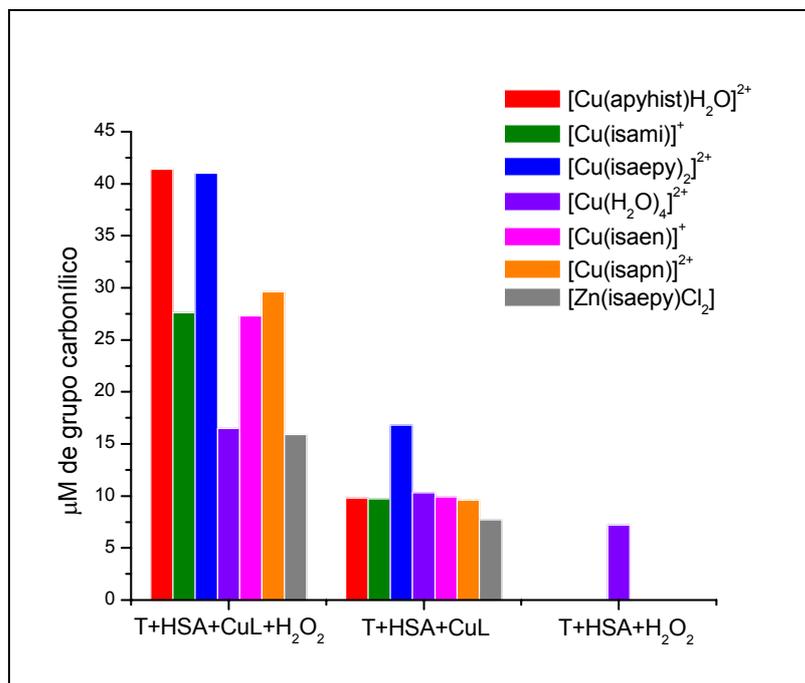


Figura 63. Dano oxidativo à albumina humana induzido por complexos de cobre(II) [H₂O₂] = 0,75 mM, [BSA] = 75 μM, [CuL] = 75 μM, tampão fosfato 50 mM, pH = 7,3, T = 37,0°C

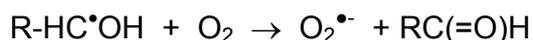
Pelos gráficos de danos oxidativos à albumina bovina na presença de complexos de cobre(II), Figuras 64 e 65, observa-se um decréscimo na quantidade de grupos carbonil formados em concentrações maiores de peróxido de hidrogênio. Por exemplo, para os compostos mais reativos o nível de grupos carbonil é de ~160 μmol/L em presença de H₂O₂ 1 mM e ~90 μmol/L em presença de H₂O₂ 2,5 mM. Normalmente espera-se que ocorra justamente o contrário, aumento dos danos com o aumento da concentração de H₂O₂. Quando o peróxido de hidrogênio está presente podem ocorrer as seguintes reações:



Em concentrações maiores de H₂O₂ pode ocorrer maior formação deste radical (•OH), que é bastante reativo, provocando outros danos à proteína, que não

geram grupos carbonílicos. Com isso pode ocorrer uma diminuição dos danos oxidativos geradores de grupos carbonílicos, pois a proteína já foi danificada por uma via alternativa, envolvendo radicais hidroxil (ou superóxido).

Os grupos carbonil podem ser formados através das etapas:



A Figura 66 mostra os resultados obtidos para HSA. Nesse caso os compostos $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ foram os que mais causaram dano à proteína em presença de peróxido de hidrogênio. Em contra partida o complexo de zinco, $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ teve o mesmo comportamento do aqua-complexo, causando menos à HSA.

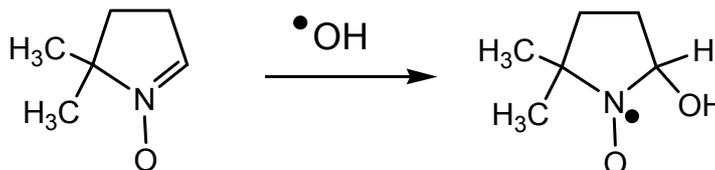
Em todos os experimentos observa-se que os complexos $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ foram os mais capazes de causar dano oxidativo tanto na albumina bovina quanto na humana.

4.4.2. Estudos de EPR

Para observar se houve a formação de radicais na interação da albumina bovina com complexos de cobre(II), na presença de água oxigenada peróxido de hidrogênio, experimentos de EPR com em presença de um captador de spin foram realizados, utilizando-se tempol em concentração conhecida ($38\mu\text{M}$) como calibrador para formação desses radicais.

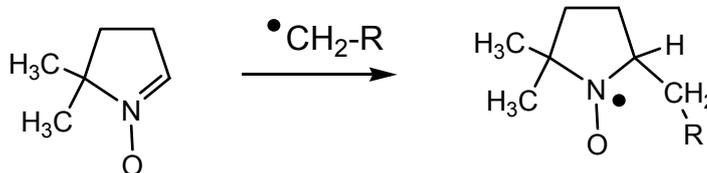
A reação do captador utilizado (DMPO) com mais de um radical pode ocorrer:

a) Radical $\cdot\text{OH}$:



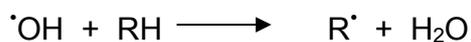
Para este tipo de aduto radicalar, o espectro esperado apresenta 4 linhas.

b) Radical $\cdot\text{C}$:



Para este tipo de radical, o espectro esperado apresenta 6 linhas.

Radicais centrados no carbono podem ser formados pela ação de radicais hidroxil em compostos ou grupos orgânicos, numa etapa de propagação da cadeia radicalar:



A Figura 64 apresenta os espectros de EPR para os complexos de cobre(II) com albumina bovina na presença de peróxido de hidrogênio e o captador DMPO.

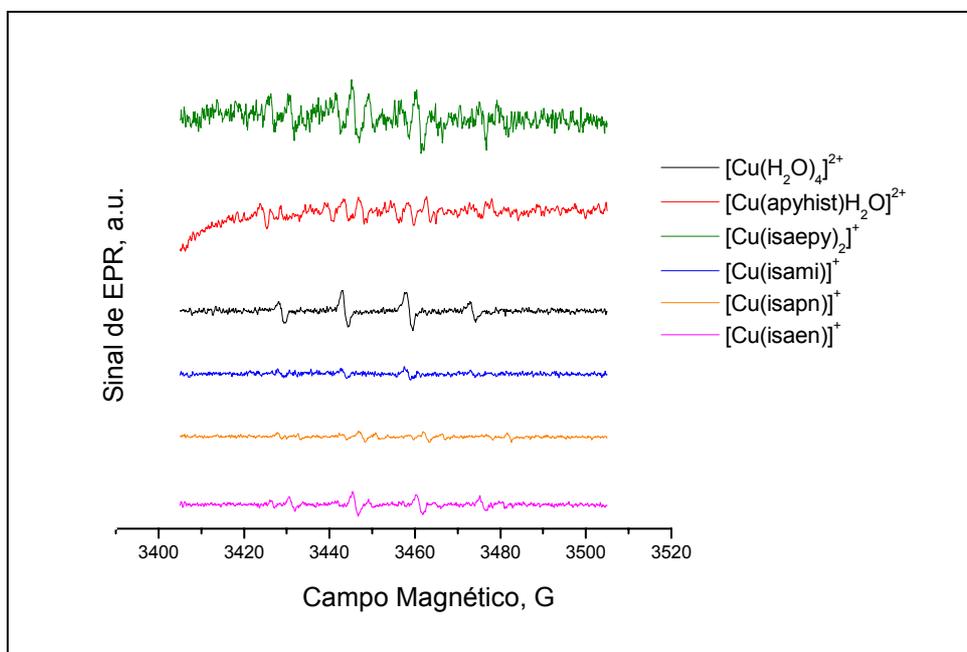


Figura 64. Espectros de EPR de soluções contendo BSA, CuL, H_2O_2 , usando DMPO como captador de spin, após 5 minutos de reação.

Pelos espectros de EPR obtidos pode-se perceber que há formação de diferentes radicais, não só radical hidroxila como também radical de carbono, durante a reação entre albumina bovina e os complexos de cobre, em presença de peróxido de hidrogênio. A presença destes radicais pode explicar porque ocorre a diminuição de grupos carbonílicos formados em concentrações maiores de peróxido de hidrogênio, nos experimentos de danos oxidativos à albumina bovina.

A partir da integração dupla da área do espectro (Di/N) para o tempol e do respectivo sinal observado em cada caso, foi possível calcular a concentração de radical gerada para cada composto de cobre(II) de acordo com a relação:

$$\text{área sinal (Di/N, para cada CuL)} \times (38 \mu\text{M}) / \text{Área Tempol} = 1,04 \times 10^{-1} \text{ radicais}$$

Tabela 15. Concentração dos adutos radicalares gerados nas soluções contendo BSA, [CuL] e H₂O₂, usando DMPO como captador de spin, após 5 minutos de reação.

CuL	[DMPO-OH] (μM)	[DMPO-C] (μM)
[Cu(H ₂ O) ₄] ²⁺	0,38	-----
[Cu(apyhist)H ₂ O] ²⁺	0,36	0,12
[Cu(isaen)] ⁺	0,12	0,05
[Cu(isaepy) ₂] ²⁺	0,52	0,27
[Cu(isapn)]	0,11	0,06
[Cu(isami)] ¹⁺	0,24	-----

Comparando-se os dados da Tabela 15 com os dados obtidos no experimento de danos oxidativos à albumina, observa-se que os complexos [Cu(apyhist)H₂O]²⁺ e [Cu(isaepy)₂]²⁺ foram os que apresentaram maior concentração de radicais formados e maior concentração de grupos carbonil na proteína. Portanto, dentre os compostos estudados estes dois parecem ser os mais reativos. O complexo [Cu(isami)]¹⁺ foi um dos complexos que apresentou maior formação de grupos carbonil na proteína, porém como gerador de radicais foi um dos piores. Em contra partida, o complexo [Cu(isapn)] foi um dos complexos que menos causou danos à proteína e foi um dos melhores geradores de radical. Já o [Cu(isaen)H₂O]⁺ mostrou ser o menos reativo

dos compostos estudados, foi o que menos gerou radicais e o que menos causou danos à albumina.

Também neste caso, de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), o ligante parece modular a reatividade dos íons de cobre.

4.4.3. SDS-PAGE em presença de H₂O₂:

Para observar a ocorrência de dano oxidativo na albumina causado pelos complexos de cobre(II) foi feito também SDS-PAGE em presença de peróxido de hidrogênio.

Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 65 abaixo.

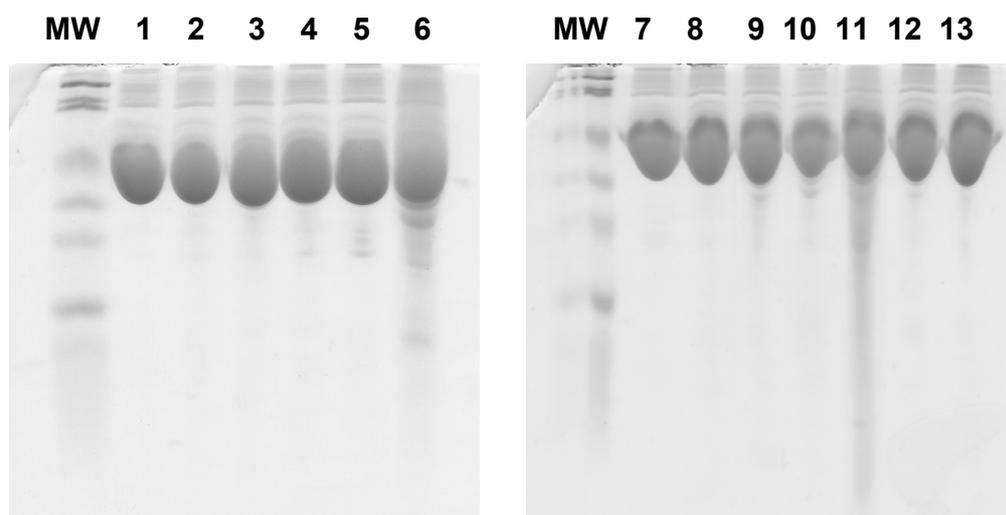


Figura 65. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12%, usando $[CuL]=0,75(M$ (Cu/HSA 1:1) e $[H_2O_2]=7,5(M$. A HSA foi desnaturada utilizando-se SDS 10%. MW: Marcador de peso molecular BioRad. Canaletas: 1: HSA, 2: HSA + H₂O₂, 3: HSA + [Cu(H₂O)₄]²⁺, 4: HSA + [Zn(isaepy)Cl₂] 5: HSA + [Cu(isaen)]⁺, 6: HSA + [Cu(apyhist)H₂O]²⁺, 7: HSA, 8: HSA + H₂O₂, 9: HSA + [Cu(H₂O)₄]²⁺, 10: HSA + [Zn(isaepy)Cl₂], 11: HSA + [Cu(isaepy)₂]²⁺, 12: HSA + [Cu(isapn)], 13: HSA + [Cu(isami)]⁺.

Neste estudo verificou-se que, em presença de peróxido de hidrogênio, os compostos [Cu(isaen)]⁺, [Cu(apyhist)H₂O]²⁺ e principalmente [Cu(isaepy)₂]²⁺, foram capazes de clivar a proteína, já que o padrão de fragmentação apresentado no gel está diferente dos outros compostos estudados e do controle realizado. Este último composto mostrou também ser o mais reativo na indução de apoptose, em estudos

anteriores no nosso laboratório [52], atuando especialmente sobre mitocôndrias e o núcleo das células tumorais. Estes estudos mostraram a geração de espécies reativas (EROs) e a ocorrência de peroxidação lipídica, glicosilação de proteínas e danos ao DNA, após a permeação dos complexos de cobre para dentro da célula.

4.4.4. Influência dos complexos de cobre(II) na respiração mitocondrial:

Por esta razão, complementando os estudos relatados, procedeu-se a uma investigação, ainda que preliminar, sobre a influência dos vários compostos de cobre(II) estudados na respiração mitocondrial, visando elucidar melhor seu mecanismo de atuação no meio biológico.

Para comparar os resultados obtidos foi necessário calcular o ICR (índice de controle respiratório) das mitocôndrias extraídas na ausência de metal, a partir dos dados de respiração mitocondrial obtidos.

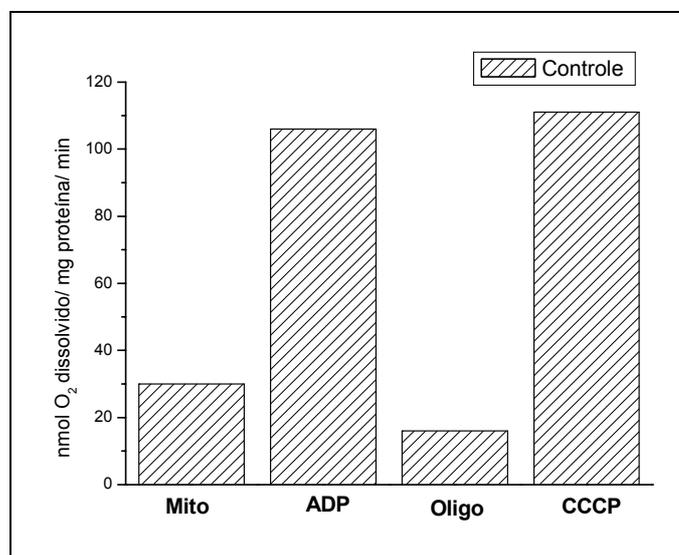


Figura 66. Controle da respiração mitocondrial

Para se calcular o ICR neste experimento, dividiu-se o valor do consumo de oxigênio, após a adição de ADP, pelo valor do consumo de oxigênio antes da adição de ADP. O valor de ICR para este experimento controle foi de 6,6, indicando que a

extração das mitocôndrias e a sua preparação para realização do experimento foram boas. A seguir, adicionou-se oligomicina que é um inibidor da ATP sintase e deste modo é observado uma inibição na respiração mitocôndria, conforme visto na Figura 66. Finalmente, adicionou-se CCCP, um composto capaz de capturar o próton ao redor da membrana externa e inserí-lo novamente dentro da mitocôndria. Com isto, reativa-se a respiração.

Experimento 1:

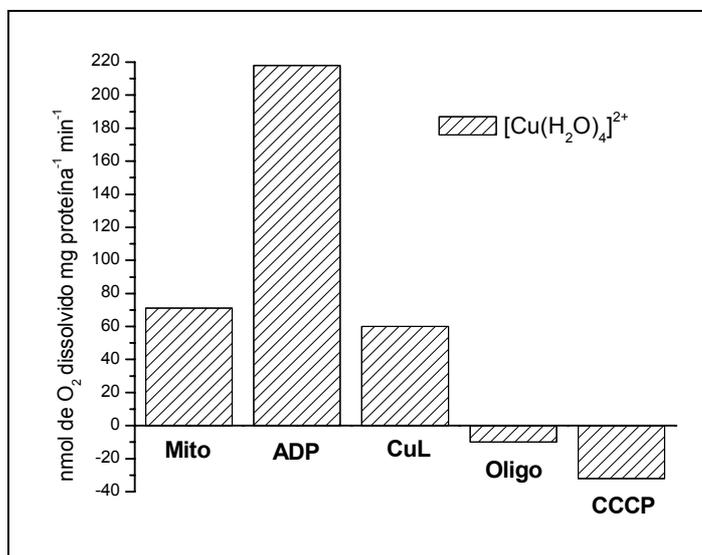


Figura 67. Respiração mitocondrial sob influência do composto $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$

Ao se adicionar o aqua-complexo de cobre(II), após a adição de ADP, verificou-se uma inibição no consumo de oxigênio, que foi mais acentuada ao adicionar a oligomicina e ainda maior ao juntar o CCCP. Portanto, o íon de cobre foi capaz de inibir a fosforilação e a transferência de prótons para dentro da mitocôndria.

O mesmo comportamento foi observado para todos os complexos imínicos de cobre estudados, conforme pode ser visto nas Figuras 68 a 73 a seguir. Em presença de cada um deles verificou-se inibição da fosforilação e da respiração. Provavelmente, sendo cátions lipofílicos essas espécies de cobre interagem com a

membrana, interrompendo a fosforilação. Além disso, por apresentar atividade redox, podem eles mesmos consumirem oxigênio.

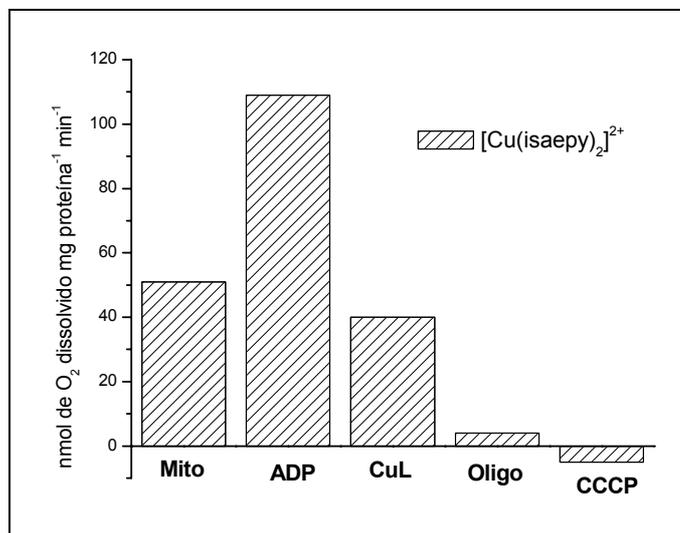


Figura 68. Respiração mitocondrial sob influência do composto [Cu(isaepy)₂]²⁺

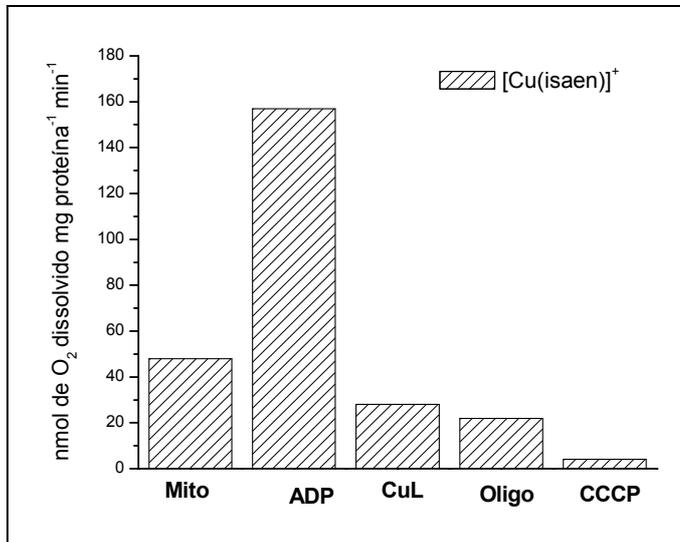


Figura 69. Respiração mitocondrial sob influência do composto [Cu(isaen)]⁺

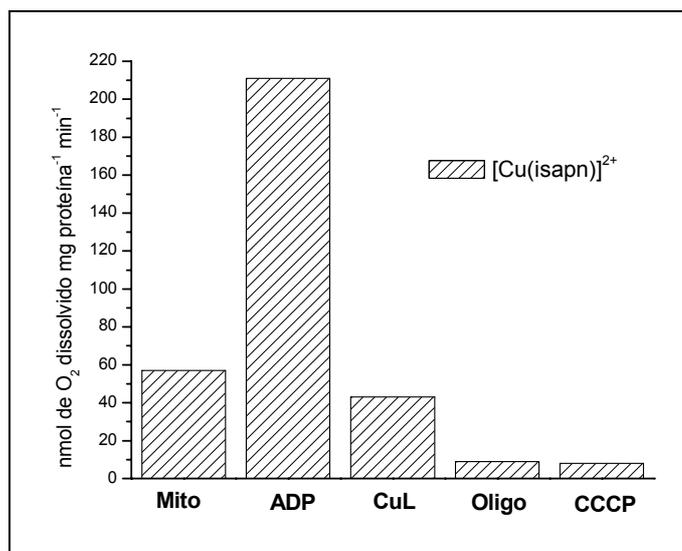


Figura 70. Respiração mitocondrial sob influência do composto $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$

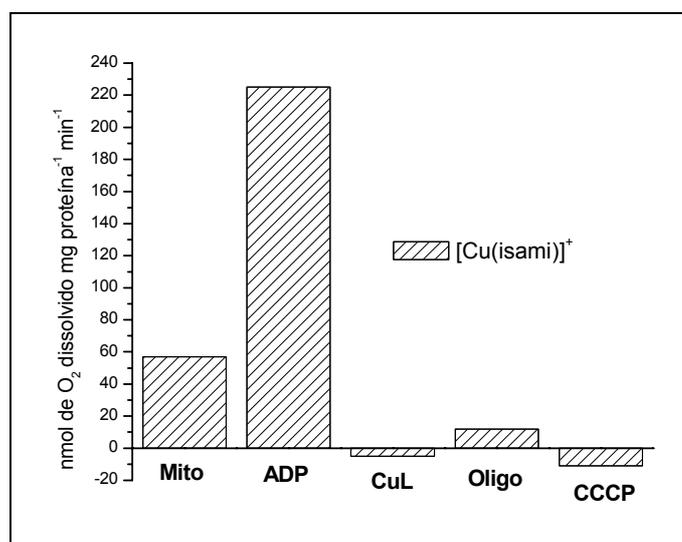


Figura 71. Respiração mitocondrial sob influência do composto $[\text{Cu}(\text{isami})]^+$

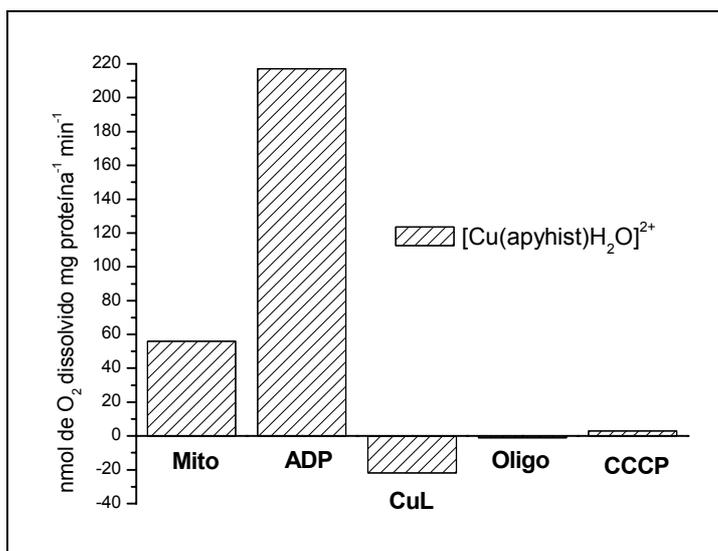


Figura 72. Respiração mitocondrial sob influência de $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$

Entretanto, em presença do composto de zinco, $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$, não se observou a inibição do consumo de oxigênio, logo após sua adição. Por outro lado, não se observou tampouco o retorno da respiração mitocondrial ao se adicionar o CCCP.

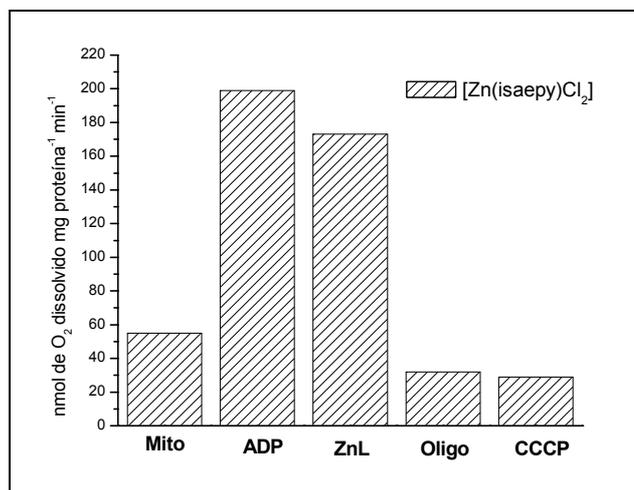


Figura 73 – Respiração mitocondrial sob influência de $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$

Experimento 2:

Neste caso, adicionando-se o complexo de cobre(II) antes da adição de ADP, foram verificadas diferenças de comportamento entre os vários compostos. A adição do aqua-complexo inibiu o consumo de oxigênio, que depois não foi restabelecido com a adição de ADP, nem a de CCCP. Pode-se interpretar essa inibição pelo íon cobre como decorrente do bloqueio de transferência de prótons.

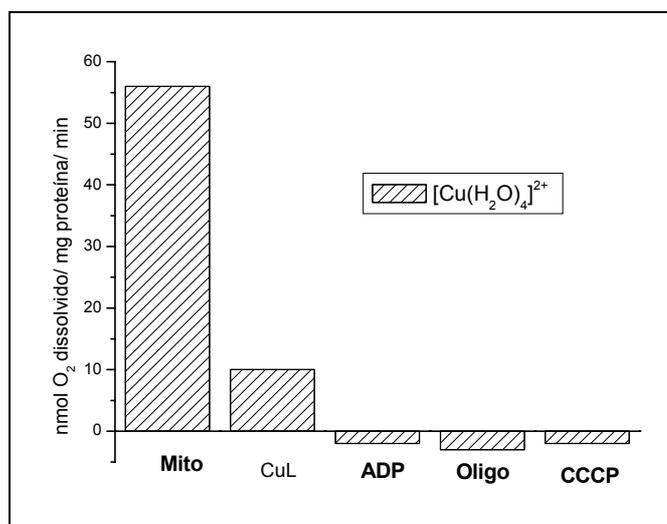


Figura 74. Respiração mitocondrial sob influência do composto [Cu(H₂O)₄]²⁺

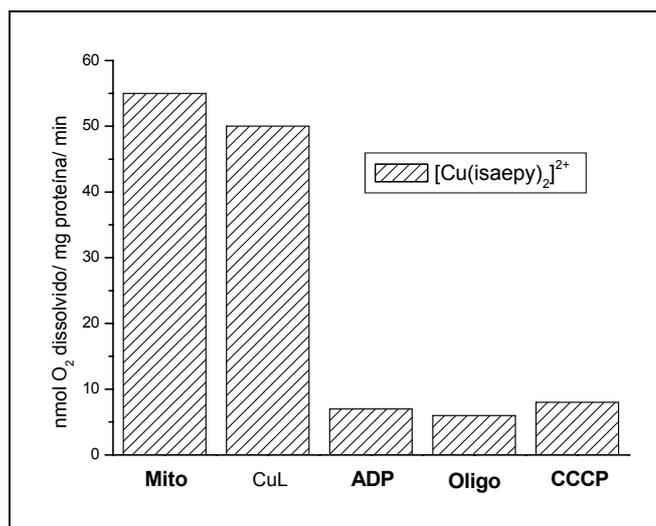


Figura 75. Respiração mitocondrial sob influência do composto [Cu(isaepy)₂]²⁺

A adição do complexo **[Cu(isaepy)₂]²⁺**, por outro lado, praticamente não modificou a velocidade de consumo de oxigênio. A subsequente adição de ADP, contrariamente ao esperado, não aumentou a velocidade de respiração. Também, a adição de CCP não restabeleceu o consumo de oxigênio.

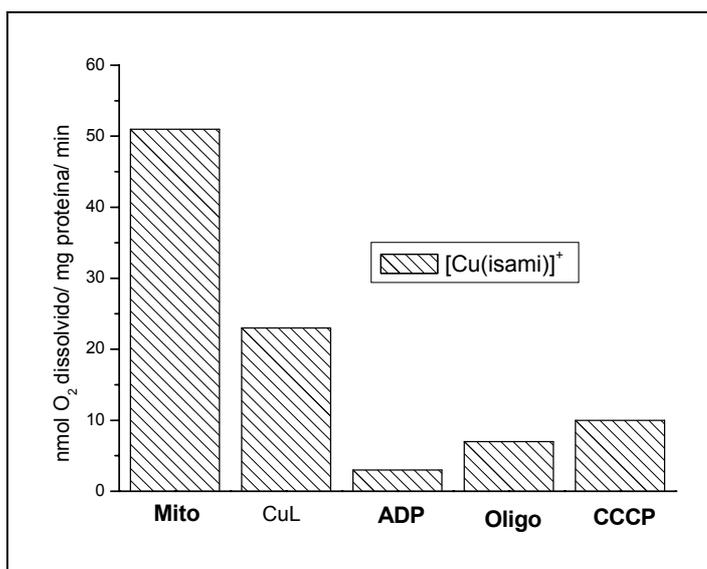


Figura 76. Respiração mitocondrial sob influência do composto [Cu(isami)]²⁺

Em presença do composto **[Cu(isami)]²⁺**, observou-se uma inibição da respiração (aproximadamente 50%), que foi ainda maior ao se adicionar ADP, mostrando que o processo de fosforilação também foi inibido, mas não totalmente, uma vez que a adição de CCCP restabeleceu em parte a respiração.

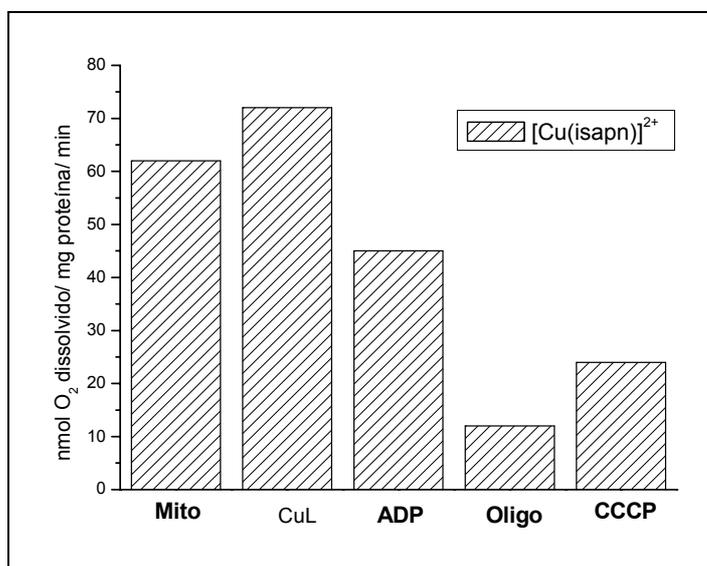


Figura 77. Respiração mitocondrial sob influência do composto [Cu(isapn)]²⁺

O comportamento do complexo [Cu(isapn)]²⁺ foi diferente. Adicionado antes do ADP, não inibiu a respiração mitocondrial, ao contrário, aumentou o consumo de oxigênio, que entretanto diminuiu um pouco, ao se adicionar o ADP. Neste caso o CCCP também foi capaz de restabelecer em parte o consumo de oxigênio, após inibição pela oligomicina.

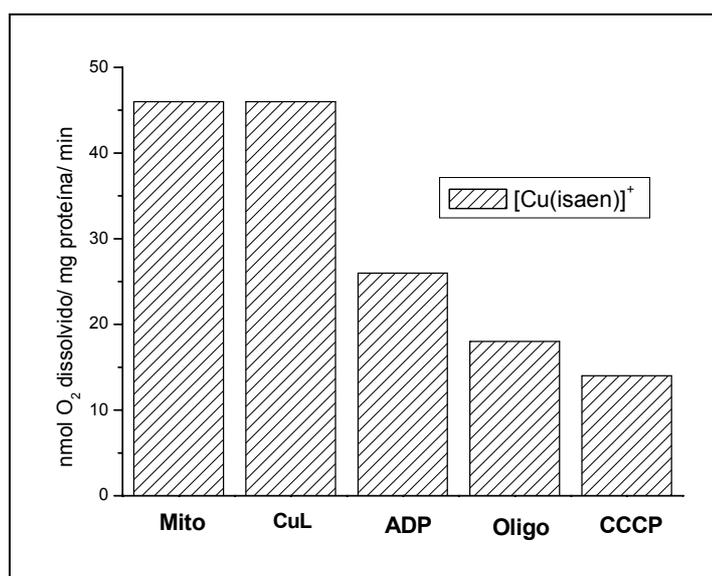


Figura 78. Respiração mitocondrial sob influência do composto [Cu(isaen)H₂O]⁺

A adição do composto **[Cu(isaen)H₂O]⁺** não alterou a respiração mitocondrial, entretanto, em presença de ADP ocorreu uma diminuição no consumo de oxigênio. Este decréscimo continuou sendo observado tanto em presença de oligomicina quanto em presença de CCCP. Nesse caso, a respiração mitocondrial não foi restabelecida.

O composto **[Cu(apyhist)H₂O]²⁺** inibiu parcialmente o consumo de oxigênio, mas permitiu o restabelecimento da respiração pela adição de ADP. Neste caso, a inibição pela oligomicina foi seguida de restabelecimento parcial ao adicionar-se o CCCP, conforme mostrado na Figura 81.

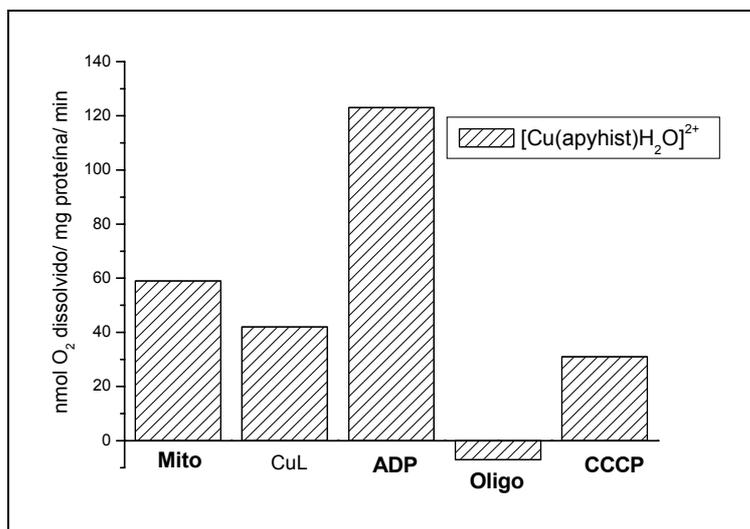


Figura 79. Respiração mitocondrial sob influência do composto **[Cu(apyhist)H₂O]²⁺**

Finalmente, em presença do composto de zinco, **[Zn(isaepy)Cl₂]**, observou-se inibição total da respiração, que não foi restabelecida, nem parcialmente, pela adição de ADP ou CCCP.

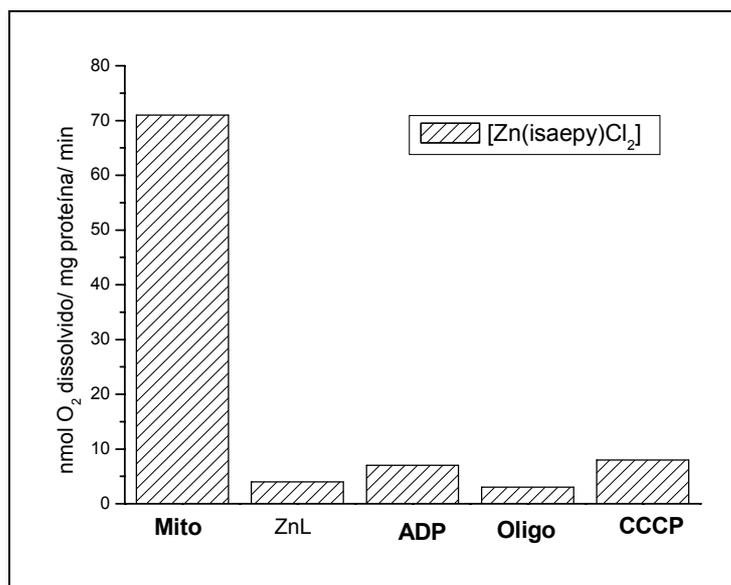


Figura 80. Respiração mitocondrial sob influência do composto $[Zn(isaepy)Cl_2]$

A partir dos resultados observados pode-se inferir que com adição prévia de ADP, todos os complexos de cobre inibiram fortemente a respiração mitocondrial. O composto de zinco, ao contrário, não inibiu o processo.

Entretanto, se a adição do complexo for feita antes da de ADP, verificam-se diferenças na influência de cada complexo na respiração mitocondrial.

Para elucidar melhor o mecanismo de atuação destes compostos necessita-se de mais experimentos, com o uso de diversos inibidores (rotenona, inibidor do complexo I da cadeia; antimicina A, ou mesmo KCN para inibir o citocromo c oxidase) ou de ativadores da cadeia respiratória, como NADH. Portanto, outros estudos deverão ser feitos.

5. Conclusões

Estes estudos sobre alguns complexos selecionados de cobre(II) com ligantes dimínicos, contendo grupos piridina, imidazol ou indol, permitiram investigar sua reatividade frente a processos oxidativos envolvendo carboidratos e proteínas. A oxidação de carboidratos simples, D-glicose, D-frutose e D-galactose, catalisada por estes complexos mostrou ser dependente da concentração do metal, da concentração do substrato, obedecendo a um mecanismo do tipo Michaelis-Menten, do pH do meio e da concentração do tampão carbonato utilizado. A atividade catalítica do cobre foi modulada pelos ligantes, com participação de espécies reativas de oxigênio, sendo o complexo mais ativo frente à oxidação da D-frutose foi o $[\text{Cu}(\text{isaen})\text{H}_2\text{O}]^+$, já na oxidação da D-Glicose e D-galactose, os resultados indicam que todos os compostos estudados se mostraram bons catalisadores na oxidação de carboidratos, apresentando valores de k_{obs} da mesma ordem de grandeza.

Interações dos vários complexos estudados com a albumina (BSA) foram monitoradas por dicroísmo circular (CD), verificando-se que estes compostos apresentam constantes de estabilidade da mesmo ordem que a da espécie $[\text{Cu-BSA}]$, com $\log K = 15-17$ e que, portanto, são estáveis no meio biológico, podendo competir com a proteína pelos íons de cobre. O sítio preferencial de inserção do cobre na proteína foi o sítio N-terminal, à exceção de um dos compostos, $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, que predominantemente apresentou o cobre num sítio secundário, provavelmente no sítio da cisteína 34.

Danos oxidativos à proteína albumina (BSA ou HSA) também foram observados, principalmente em presença de peróxido de hidrogênio, com geração de radicais hidroxil e formação de grupos carbonil na proteína. Os resultados indicaram que em todos os experimentos os complexos $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ foram ao mais capazes de causar dano oxidativo tanto na albumina bovina quanto na humana.

Experimentos através de espectroscopia EPR e SDS-PAGE corroboraram estes dados, mostrando a especiação do cobre entre o ligante imínico e a proteína albumina, além de uma migração do cobre a outro sítio na própria proteína, ou a outra biomolécula, num processo tempo-dependente.

Alguns dos complexos puderam ser reduzidos e ter o ligante imínico substituído em presença de glutathiona (GSH), um agente redutor presente em alta concentração no citosol. Outros, entretanto, parecem não ser afetados pela GSH, conforme verificado em experimentos de fluorescência. Esta diferença de reatividade pode ter influência substancial no ciclo catalítico destes complexos, em meio biológico.

Portanto, os complexos estudados apresentaram reatividade catalítica significativa nos processos oxidativos envolvendo tanto carboidratos como proteínas, dependente do ligante diimínico. Assim, através de modificações estruturais no ligante, pode-se modular a reatividade do metal, visando substratos específicos.

Em estudos anteriores, esses compostos mostraram-se capazes de induzir o processo apoptótico em diferentes tipos de células tumorais [52]. Os alvos preferenciais, uma vez introduzidos na célula, foram o núcleo e as mitocôndrias, o que levou a estes estudos sobre sua influência na respiração mitocondrial. Os resultados obtidos indicaram diferenças significativas nessa influência dos diversos compostos sobre o consumo de oxigênio. Por exemplo, com adição prévia de ADP, todos os complexos de cobre inibiram fortemente a respiração mitocondrial, enquanto o composto de zinco, ao contrário, não inibiu o processo. Se a adição do complexo for feita antes da de ADP, verificaram-se diferenças significativas. Com o composto de zinco, $[Zn(isaepy)Cl_2]$, observou-se inibição total da respiração, que não foi restabelecida, nem parcialmente, pela adição de ADP ou CCCP. Já o composto $[Cu(apyhist)H_2O]^{2+}$ inibiu parcialmente o consumo de oxigênio, mas permitiu o restabelecimento da respiração pela adição de ADP. Neste caso, a inibição pela oligomicina foi seguida de restabelecimento parcial da respiração ao adicionar-se o CCCP. Os dados parecem indicar que além do transporte de elétrons na cadeia respiratória, também o processo de fosforilação é afetado pela presença dos complexos de cobre ou zinco.

Estes estudos forneceram informações importantes para melhor elucidação do mecanismo de atuação destes compostos como promotores de processos oxidativos e como potenciais agentes antitumorais, embora estudos mais aprofundados sejam ainda necessários.

6. Referências Bibliográficas

1. P.B. Hamond e R.P. Beliles, Casarett and Doull's Toxicology, *The Basic Science of Poisons*, R. Doull et al (Eds.), Macmillan, N.Y., 1980, 406-467;
2. F.E Guthrie e J.J. Perry, *Introduction to Environmental Toxicology*, Elsevier, N.Y., 1980, 484;
3. D.E Carter e Q. Fernando, *J. Chem. Ed.*, 1979, **56**, 491;
4. W. Kaim e B. Schwederski, *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, John Wiley & Sons Ltd, cap.10, 187-214;
5. W. Kaim. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2003, 761-768. The chemistry and biochemistry of the copper-radical interaction;
6. J.S. Valentine e E.B. Gralla, *Science*, 1997, **278**, 817;
7. B. Halliwell e J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2^a ed., Clarendon Press, Oxford, 1989;
8. V. Sargentelli, A.E. Mauro e A.C. Massabni, *Química Nova*, 1996, **19**, 290;
9. B. Sarkar, *J. Inorg. Biochem.*, 2000, **79**, 187;
10. B. Sarkar e Y. Wigfield, *Can. J. Biochem.*, 1968, **46**, 601;
11. S.J. Lau e B. Sarkar, *J. Biol. Chem.*, 1971, **246**, 5938;
12. J.P. Lussac e B. Sarkar, *Biochem.*, 1984, **23**, 2832;
13. C.T. Dameron, E.D. Harris, *J. Biochem.*, 1987, **248**, 669;
14. A. Mas e B. Sarkar, *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, **123**, 1135;
15. B. Zhou e J. Gitshier, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1977, **94**, 7481;
16. A.L. Lamb, A.S. Torres, T.V. Halloran e A.C. Rosenzweig, *Nat. Struct. Biol.*, 2001, **8**, 751; L.W.J. Klomp, S.J. Lin, D.S. Yuan, R.D. Klausner, V.C. Culotta e J.D. Gitlin, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 9221;
17. A.C. Rosenzweig, *Acc. Chem. Res.*, 2000, **34**, 119;
18. L. Rossi, M.F. Lombardo, M.R. Ciriolo, G. Rotilio, *Neurochem. Res.*, 2004, **29**, 493;
19. D.M. Glerum, A. Shtanko e A. Tzagoloff, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 9221;
20. V.C. Culotta, L.W.J. Klomp, J. Strain, R.L.B. Casareno, B. Krens e J.D. Gitkin, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 23469;

21. M.C. Linder, *Biochemistry of Copper*, Plenum, N.Y., 1991, 163;
22. J.D. Crapo, T. Oury, C. Rabouille, J.W. Slot e L.Y. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992, **89**, 10405;
23. H. Kuivaniemi, L. Ala-Kokko e K.J. Kivirikko, *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, **883**, 326;
24. P.C. Bull, G.R. Thomas, J.M. Rommens, J.R. Forbes e D.W. Cox, *Nature Genet.*, 1993, **5**, 327;
25. L. Rossi, R. Squitti, P. Pasqualetti, E. Marchese, E. Cassetta, E. Forestieri, G. Rotilio e P.M. Rossini, *Neurosc. Lett.*, 2002, **329**, 137;
26. B. Sarkar, K. Lingrat-Walsh e J.T.R. Clarke, *J. Pediatr.*, 1993, **123**, 1828;
27. M. Didonato e B. Sakar, *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, **1360**, 3;
28. (a) P. Ulrich e A. Cerami, *Recent Prog. Horm. Res.* 2001, **56**, 1; (b) M.B. Yim, H.-S. Yim, C. Lee, S.-O. Kang e P.B. Chock, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001, **928**, 48.
29. R.T. Dean, S. Fu, R. Stocker e M.J. Davies, *Biochem. J.*, 1997, **324**, 1-18.
30. C.L. Hawkins e M.J. Davies, *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, **1504**, 196.
31. P.E. Morgan, R.T. Dean e M.J. Davies, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2002, **403**, 259.
32. (a) S.Y. Choi, H.Y. Kwon e J.H. Kang, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1472**, 651.
(b) T. Kocha, M. Yamaguchi, H. Ohtaki, T. Fukuda e T. Aoyagi, *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, **1337**, 319.
33. D.I. Pattison e M.J. Davies, *Chem. Res. Toxicol.* 2001, **14**, 1453.
34. A. Wright, W.A. Bubb, C.L. Hawkins e M.J. Davies, *Photochem. Photobiol.*, 2002, **76**, 35.
35. A. Buranaprapuk, S.P. Leach, C.V. Kumar e J.R. Bocarsly, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1387**, 309.
36. E.R. Stadtman, *Free Rad. Biol. Med.*, 1990, **9**, 315-325.
37. M.-X. Fu, J.R. Requena, A.J. Jenkins, T.J. Luons, J.W. Baynes e S.R. Thorpe, *J. Biol. Chem.* 1996, **271**, 9982-9986.
38. F.K. Yeboah, I. Alli e V.A. Yaylayan, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 3164-3172.
39. J.M. Onorato, S.R. Thorpe e J.W. Baynes, *Ann. N. Y. Acad. Sciences*, 1998, **854**, 277-290.
40. A.W. Stitt, *Br. J. Ophthalmol.* 2001, **85**, 746-753.

41. M. Namiki, *Adv. Food Res.* 1988, **32**, 115-184.
42. G.P. Rizzi, The Maillard Reaction in Foods, In: *Maillard Reactions in Chemistry, Food and Health*, T.D. Labuza et al., eds., The Royal Chem. Soc., 1995.
43. (a) K. Krapfenbauer, R. Birnbacher, H. Vierhapper, K. Herkner, D. Kampel e G. Lubec, *Clinical Science* 1998, **95**, 331-337. (b) M. Kalousova, J. Skrha e T. Zima, *Physiol. Res.* 2002, **51**, 597-604.
44. (a) B.J. Ortwerth e H.L. James, *Biochem. Biophys. Res Commun.* 1999, **259**, 706-710. (b) R. Nagai, Y. Unno, M.C. Hayashi, S. Masuda, F. Hayase, N. Kinoshita e S. Horiuchi, *Diabetes*, 2002, **51**, 2833-2839.
45. R.L. Levine, *Free Radical Biol. Med.* 2002, **32**, 790-796.
46. J.L. Wautier e P.J. Guillausseau, *Diabetes Metab (Paris)* 2001, **27**, 535-542.
47. J.W. Baynes e S.R. Thorpe, *Diabetes*, 1999, **48**, 1-9.
48. H.O. Mowri, B. Frei e J.F. Keaney Jr., *Free Radical Biol. Med.* 2000, **29**, 814-824.
49. W. Kaim e J. Rall, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996, **35**, 43-60. Copper, a modern element.
50. R.H. Holm, P. Kennepohl e E.I. Solomon, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2239-2314.
51. a) H.C. Sutton e C.C. Winterbourn, *Free Rad. Biol. Med.* 1989, **6**, 53-60. b) L.M. Gaetke, C.K. Chow, *Toxicology*, 2003, **189**, 147-163.
52. S.M. Lynch e B. Frei, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 5158-5163
53. S.M. Lynch e B. Frei, *J. Lipid Res.*, 1993, **34**, 1745-1753.
54. M. Kuzuya, K. Yamada, T. Hayashi, C. Funaki, M. Naito, K. Asai e F. Kuzuya, *Biochim. Biophys. Acta* 1992, **1123**, 334-341.
55. R. Cheng e S. Kawakishi, *J. Agric. Food Chem.* 1993, **41**, 361-365.
56. R. Cheng e S. Kawakishi, *J. Agric. Food Chem.* 1994, **42**, 700-703.
57. J.T. Saari e G.M. Dahlen, *J. Nutr. Biochem.* 1999, **10**, 210-214.
58. (a) S. Goldstein e D. Meyertein, *Acc. Chem. Res.* 1999, **32**, 547-550. (b) M.B. Yim, P.B. Chock e E.R. Stadtman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**, 5006-5010.
59. P.E. Morgan, R.T. Dean e M.J. Davies, *Arch. Biochem. Biophys.* 2002, **403**, 259-269.
60. S.P. Wolff, Z.Y. Jiang e J.V. Hunt, *Free Radical Biol. Med.* 1991, **10**, 339-352.

61. R. Nagai, K. Ikeda, T. Higashi, H. Sano, Y. Jinnouchi, T. Araki e S. Horiuchi, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 1997, **234**, 167-172.
62. C. Loske, A. Gerdemann, W. Schepl, M. Wycislo, R. Schinzel, D. Palm, P. Riederer e G. Münch, *Eur. J. Biochem.* 2000, **267**, 4171-4178.
63. (a) G. Multhaup, T. Ruppert, A. Schlicksupp, L. Hesse, E. Bill, R. Pipkorn, C.L. Masters e K. Beyreuther, *Biochemistry* 1998, **37**, 7224-7230. (b) S.I. Liochev e I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* 2002, **277**, 34674-34678.
64. (a) M.B. Kadiiska, R. Mason, *Spectrochimica Acta Part A* 2002, **58**, 1227-1239. (b) C. Steinkühler, I. Mavelli, L. Rossi, J.Z. Pedersen, G. Melino, U. Weser, G. Rotilio, *Biochem. Pharmacol.* 1990, **39**, 1473-1479.
65. S.J. Jewett, A.M. Rocklin, M. Ghanevati, J.M. Abel, J.A. Marach, *Free Rad. Biol. Med.* 1999, **26**, 905-918.
66. J.W. Eaton e M. Qian, *Mol. Cell. Biochem.*, 2002, **234-235**, 135-142.
67. J.A. Dunn, DE.R. McCance, S.R. Thorpe, T.J. Lyons e J.W. Baynes, *Biochemistry*, 1991, **30**, 1205-1210.
68. K.J. Wella-Knecht et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1995, **34**, 3702-3709.
69. (a) P.J. Thornalley, A. Langborg e H.S. Minhas, *Biochem. J.* 1999, **344**, 109-116. (b) E.A. Abordo, H.S. Minhas e P.J. Thornalley, *Biochem. Pharmacol.* 1999, **58**, 641-648.
70. F. Dutra, F.S. Knudsen, D. Curi e E. J.H. Bechara. *Chem. Res. Toxicol.* 2001, **14**, 1323-1329.
71. P.J. Thornalley, *Chem.-Biol. Interact.* 1998, **111-112**, 137-151.
72. J. Figge, T. Rossing e V. Fencel, *J. Lab. Clin. Med.*, 1991, **117**, 53;
73. R. Werner, *Essential Biochemistry and Molecular Biology*, 1992, Aplenton & Lange, USA, 304;
74. J.T. Peters, *Adv. Protein Chem.*, 1985, **37**, 161;
75. I.D. Kuntz e W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.*, 1974, **28**, 239;
76. D.C. Carter e J.X. Ho, *Adv. Protein Chem.*, 1994, **45**, 153;
77. W. Bal, J. Christodolou e P.J. Sadler, *J. Inorg. Biochem.*, 1998, **70**, 33;
78. A.I. Ivanov, J.A. Parkinson, E. Cossins e J.P. Sadler, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2000, **5**, 102

79. P.A. Vigato e S. Tamburini, *Coord. Chem. Rev.*, 2004, **248**, 1717;
80. P.G. Cozzi, *Chem. Soc. Ver.*, 2004, **33**, 410;
81. T. Katsuki, *Chem. Soc. Ver.*, 2004, **33**, 437;
82. S. Brooker, *Coord. Chem. Rev.* 2001, **222**, 33;
83. R. Zessel, *Coord. Chem. Rev.*, 2001, **216**, 195;
84. D.A. Atwood, *Coord. Chem. Rev.*, **1997**, 165, 267;
85. M. A. Azellini, A. M. D. C. Ferreira, *J. Chem. Soc. Dalton Trans*, **2001**, 6, 838;
86. A.M.D.C. Ferreira M.A.A. Azzellini, M.L.P. Santos, *J. Inorg. Biochem.*, 2001, **86**, 218;
87. K.D. Karlin e Y. Gultneh, *J. Chem. Educ.*, 1985, **62**, 983;
88. K.D. Karlin e Y. Gultneh, *Progress. Inorg. Chem.*, 1987, **35**, 219;
89. G. Cerchiaro, G.A. Micke, M.F.M. Tavares e A.M.D.C. Ferreira, *J. Mol. Catal.*, 2004, **221**, 29;
90. G. Cerchiaro, K. Aquilano, G. Filomeni, G. Rotilio, M.R. Ciriolo e A.M.D.C. Ferreira, *J. Inorg. Biochem.* 2005, **99**, 1433-1440.
91. M.A.A. Azzellini, M.P. Abbott, A. Machado, A. Faljoni-Alario, M.T.M. Miranda, and A.M.D.C. Ferreira. *Chem. Res. Toxicol.*, 2007, submetido – MS-tx-2007-00160h.
92. A. Cane, M.C. Touraire, D. Barritault e M. Crumeyrolle-Arias, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, **276**, 379;
93. A. Medvedev, N. Igosheva, M. Crumeyrolle-Arias, V. Glover, *Stress*, 2005, **8**, 175-183.
94. A.M.A. Hassaan, *Synth. React. Inorg. Met. – Org. Chem.*, 1997, **27**, 835;
95. G.A. Bain, D.X. West, J. Krejci, J. Valdés-Martínez, S. Hernandez-Ortega e R.A. Tosacano, *Polyhedron*, 1997, **16**, 855;
96. C.V.R. Reddy e M.G.R. Reedy, *J. Chem. Eng. Data*, 1994, **39**, 723;
97. V.I. Tsapkov, N. Al-Nabgali, V.V. Stan e N.M. Samus, *Russ. J. Gen. Chem.*, 1994, **64**, 1604;
98. N.T. Akinchan, R. Akinchan, D.X. West e Y.H. Yang, *Transition Met. Chem.*, 2004, **19**, 135;
99. R.C. Kulbe, R.P. Singh e Y.K. Bhoon, *Transition Met. Chem.*, 1983, **8**, 59;
100. R.C. Kulbe, Y.K. Bhoon e R.P. Singh, *J. Indian Chem. Soc.* 1981, **58**, 840;

101. I. Kizilicli, B. Akkurt e B. Ukulseven, *Rev. Inorg. Chem.* 2004, **24**, 31;
102. E. Labisbal, A. Souza, A.Castineiras, J.A. Garcia-Vazquez, J. Romero e D.X. West, *Polyhedron*, 2000, **19**, 1255;
103. D.X. West, A.K. El-Sawaf e G.A. Bain, *Transition Met. Chem.*, 1998, **23**, 1;
104. S.P. Patel, A. Ray e R.P. Patel, . *React. Inorg. Met. – Org. Chem.*, 1987, **17**, 419;
105. W. Rohde, R. Shafer, Idriss e W. Levinson, *Talanta*, 1979, **26**, 373;
106. M.C. Rodríguez-Argüelles, A. Sanchez, M.B. Ferrari, G.G. Fava, C. Pelizzi, G. Pelosi, R. Albertini, P. Lunghi e S. Pinelli, *J. Inorg. Biochem*, 1999, **73**, 7;
107. M.F. Lombardo, M.R. Ciriolo, G. Rotilio e L. Rossi, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2003, **60**, 1733;
108. G. Rotilio, M.T. Carrí, L. Rossi e M.R. Ciriolo, *IUBMB Life*, 2000, **50**, 309;
109. L.E. Gerschenson e R.J. Rotello, *FASEB J.* 1992, **6**, 2450;
110. A. Glucksmann, *Biol. Rev.*, 1951, **26**, 56;
111. J.W. Saunders, *Science*, 1966, **154**, 604;
112. Y. Higuchi, *Biochem. Pharmacol.*, 2003, **66**, 1527;
113. a) C. Poten e J. Wilson, *Apoptosis – The Life and Death of Cells*; Cambridge, 2005. b) X. Yin e Z. Dong, *Essentials of Apoptosis – A Guide for Basic and Clinical Research*, Humana Press, 2003.
114. J.E. Klauning e L.M. Kamendulis, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2004, **44**, 239;
115. G. Filomeni, G. Rotilio e M.R. Ciriolo, *Biochem. Pharmacol.* 2002, **64**, 1057;
116. G. Hewllet, et al, *Eur. J. Immunol.*, 1977, **7**, 781.
117. J.D. Broome e M.W. Jeng, *J. Exp. Med.*, 1973, **138**, 574;
118. J.B. Denault e G.S. Salvesen, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 4489;
119. J.E. Hun, K.S. Kang, C. Chae, H.M. Kim, K.S. Ahn e S.H. Kim, *Biochem. Pharmacol.*, 2004, **67**, 1811;
120. D.R. Green e G. Kroemer, *Science*, 2004, **305**, 626;
121. D.R. Green e J.C. Reed, *Science*, 1998, **281**, 1309;
122. S. Orrenius, *Toxicol. Lett.*, 2004, **149**, 19;
123. H. Shi, L.G. Hudson e K.J. Liu, *Free Rad. Biol. Med.*, 2004, **37**, 582;
124. T. Jabs, *Biochem. Pharmacol.*, 1999, **57**, 231;

125. R.T. Dean, S. Gieseg e M.J. Davies, *Trends Biochem. Sci.*, 1993, **18**, 437;
126. D.C. Salo, et al, *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 11919;
127. K.J.A. Davies, S.W. Lin e R. E. Pacifici, *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 9914;
128. A.P. Arrigo, *Free Rad. Biol. Med.*, 1999, **27**, 936;
129. Y.J. Suzuki, Y. Ono e Y. Hirabayashi, *FEBS Lett.*, 1998, **425**, 209;
130. T. Nishimura, et al, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2004, **323**, 218;
131. M.P. Hornshaw, J.R. McDermott, J.M. Candy e J.H. Lakey, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1995, **214**, 993;
132. D.X. West, S.B. Padhye e P.B. Sonawane, *Struc. Bond.*, 1991, **76**, 1;
133. J.R. White, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1977, **77**, 387;
134. G. Park, J.T. Tomlinson, M.S. Melvin, M.W. Wright, C.S. Day e R.A. Manderville, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 113;
135. M. Yoshiro, M. Haneda, M. Naruse, H.H. Htay, S. Iwata, R. Tsubouchi e K. Murakami, *Toxicol. In Vitro*, 2002, **16**, 705;
136. T. Kimura, T. Maeda, M. Fujita, H. Sohmiya, M. Fujii e T. Ando, *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, **1336**, 123;
137. H.N. Yu, J.J. Yin e S.R. Shen, *J. Agric. Food. Chem.*, 2004, **52**, 462;
138. M. Jezowska-Bojczuk, W. Szczepanik, W. Lesniakm, J. Wrzesinski e W. Bal, *Eur. J. Biochem.*, 2002, **269**, 5547;
139. K.G. Daniel, P. Gupta, R.H. Harbach, W.C. Guida e Q.P. Dou, *Biochem. Pharmacol.*, 2004, **67**, 1139;
140. S. Rubino, et al, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 2071;
141. N. Hoti, et al, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 2004, **311**, 22;
142. R. Seth, et al, *Toxicol. In Vitro*, 2004, **18**, 501;
143. S.H. Shen, et al, *Eur. J. Pharmacol.*, 2001, **414**, 177;
144. Y. Ma, T. Kawabata e S. Okada, *Free Rad. Biol. Med.*, 1999, **27**, 227;
145. Y. Ma, L. Cao, T. Kawabata, T. Yoshino, B.B. Yang e S. Okada, *Free Rad. Biol. Med.*, 1998, **25**, 568;
146. T. Sawada, S. Hashimoto, H. Furukawa, S. Tohma, T. Inoue e K. Ito, *Immunopharmacol.*, 1997, **35**, 195;

147. J.E. Klauning e L.M. Kamendulis, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2004, **44**, 239;
148. K.J.A. Davies, *IUBMB Life*, 2000, **50**, 279;
149. G. Rotilio, L. Rossi, A. DeMartino, A.M.D.C. Ferreira e M.R. Ciriolo, *J. Braz. Chem. Soc.*, 1995, **6**, 221;
150. a) G. Cerchiaro e A.M.D.C. Ferreira, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2006, **17**, 1473-1485.
b) A.M.D.C. Ferreira, G. Cerchiaro, M.R. Ciriolo, M.P. Abbott, V.C. Silveira, INPI/SP nº. 0.600.985-9 de 20.03.2006.
151. P.A. Vigato, S. Tamburini e L. Bertolo, *Coord. Chem Rev.* 2007, **251**, 1311-1492; P. Guerriero, S. Tamburini, P.A. Vigato, *Coord. Chem. Rev.* 1995, **134**, 17;
152. G. Cerchiaro, P.L. Saboya, D.M. Tomasela, M.N. Eberlin e A.M.D.C. Ferreira, *Trans. Met. Chem.*, 2004, **29**, 494;
153. B.O. Spalek, J. Balej e I. Paseka, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1982, **78**, 2349;
154. A. Richter e U. Wesser, *Inorg. Chim. Acta*, 1998, **151**, 145;
155. C.L. Hawkins e M.J. Davies, *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, **1360**, 84;
156. R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent e E. R. Stadtman, *Method. Enzymol.*, 1990, **186**, 464;
157. O.H. Lowry, N.J. Rosenbough, A.L. Farr e R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265;
158. G. Cerchiaro, Tese de Doutorado, IQ-USP, 2005;
159. R.M. Silverstein e F.X. Webster, Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 6ed, LTC, 1998;
160. R.G. Xiong, B.L. Zuo e X.Z. Tou, *Polyhedron*, 1996, **15**, 903;
161. D.W. Johnson, H.K. Mayer, J.P. Minard, J. Banaticla e C. Miller, *Inorg. Chim. Acta*, 1988, **144**, 167;
162. F.A. Botino, P. Finochiero e E. Libertini, *J. Coord. Chem.*, 1988, **16**, 341;
163. A.M. Ramadan e M.M. Naggat, *J. Inorg. Biochem.*, 1996, **63**, 143;
164. K. Nakamoto, Infrared and Raman Spectroscopy of Inorgânica and Coordination Compounds, 5ed., J. Wiley, 1997;

165. K. Nakanishi e P.H. Solomon, *Infrared Absorption Spectroscopy-Practical*, 2 ed., Holden-Day, 1977;
166. P.R. Griffiths e J.A. DeHaseth, *FTIR*, Wiley, 1986;
167. D.F. Shriver e P.W. Atkins, *Química Inorgânica*, Bookman, 2003;
168. M. Turner, H. Koksai e S. Serin, *Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem.*, 1997, **27**, 775;
169. M. Qian e M. Liu, *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, 1998, **250**, 358;
170. D.R. Ride, "CRC Handbook of Chemistry and Physics", 75 ed. CRC Press, 1994, 6-4.
171. D. Voet e J.G. Voet, *Bioquímica*, Artmed, 2006, 478;
172. C.R. Cantor e P.R., Schimell, *Biophys. Chem. Part II*, W.H Freeman e Company, 1980;
173. G.W. Ewing, *Métodos Instrumentais de Análise Química*, Edgard Blucher, 1972;
174. I.D. Kuntz e W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.*, 1985, **37**, 161;
175. J. Muller, C. Maicchle e U. Wesser, *Inorg. Chim. Acta*, 1995, **233**, 11;
176. F.E. Mabbs, *Chem. Soc. Rev.*, 1993, 313;
177. P.F. Knowles, D. Marsh e H.W.E. Rattle, *Magnética Ressonance of Biomolecules*, John Wiley and Sons, 1976, 343;
178. C. Steinkühler, J.Z. Pedersen, U. Weser e G. Rotilio, *Biochem. Pharmacol.*, 1991, **42**, 1821.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. O cobre no meio biológico.....	13
1.2. Oxidação e glicação de proteínas.....	16
1.3. O papel do cobre em processos oxidativos no meio biológico.....	19
1.4. A Albumina	23
1.5. Complexos de cobre com ligantes imínicos	27
1.6. O cobre e o processo apoptótico	29
2. Objetivos	34
3. Parte Experimental	35
3.1. Reagentes:.....	35
3.2. Métodos e Instrumentação:	35
3.3. Sínteses.....	38
3.4. Reatividade dos complexos de cobre(II) frente à oxidação de carboidratos por oxigênio molecular	40
3.5. Interação dos complexos de cobre(II) com biomoléculas.....	42
3.5.1. Estabilidade termodinâmica: medidas de Dicroísmo Circular	42
3.5.2. Estudo espectrofotométrico dos complexos de cobre(II) na presença de BSA.....	44
3.5.3. Interação dos complexos de cobre(II) com plasma sanguíneo e albumina humana: Medidas de EPR.....	44
3.5.4. Experimentos de SDS-PAGE.....	45
3.5.5. Fluorescência dos complexos de cobre(II) na presença de glutatona (GSH)	46
3.6. Danos a biomoléculas em presença de complexos de cobre(II)	47
3.6.1. Danos oxidativos à albumina na presença de complexos de cobre(II).....	47
3.6.2. Estudos de EPR.....	48
a) Determinação da presença de radicais livres.....	48
3.6.3. SDS-PAGE em presença de H ₂ O ₂	50
3.6.4. Influência de complexos de cobre(II) na respiração mitocondrial.....	51
4. Resultados e Discussão:	52
4.1 Sínteses:	53
4.1.1 Análise Elementar:	53
4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho:	54
4.1.3 Espectroscopia Eletrônica:	60

4.2. Reatividade dos complexos de cobre(II) frente à oxidação de carboidratos:.....	69
4.3. Interação dos complexos de cobre(II) com biomoléculas.....	84
4.3.1. Estabilidade Termodinâmica: Medidas de Dicroísmo Circular:	84
4.3.2. Estudo espectrofotométrico dos complexos de cobre(II) na presença de BSA.....	91
4.3.4. Estudos de EPR.....	95
4.3.5. SDS-PAGE	103
4.3.6. Estudos de Fluorescência	104
4.4. Danos a biomoléculas em presença de complexos de cobre(II)	109
4.4.1. Danos oxidativos à albumina na presença de complexos de cobre(II).....	109
4.4.2. Estudos de EPR.....	112
4.4.3. SDS-PAGE em presença de H ₂ O ₂ :	115
4.4.4. Influência dos complexos de cobre(II) na respiração mitocondrial:.....	116
5. <i>Conclusões</i>	126
6. <i>Referências Bibliográficas</i>	128

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)