

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

VIVIAN CHAGAS DA SILVEIRA

Investigação da Atividade Biológica de
Complexos de Cobre(II) com Ligantes
Inspirados em Biomoléculas

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
28/11/2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

VIVIAN CHAGAS DA SILVEIRA

Investigação da Atividade Biológica de Complexos de
Cobre(II) com Ligantes Inspirados em Biomoléculas

Tese de Doutorado

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

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

São Paulo
2008

Vivian Chagas da Silveira

Investigação da Atividade Biológica de Complexos de Cobre(II)
com Ligantes Inspirados em Biomoléculas

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Ao meu marido Andrei
e à minha filha Lauren,
por todo amor, apoio e compreensão

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Ana Maria da Costa Ferreira agradeço pela valiosa orientação, apoio e idealização do projeto de pesquisa.

Às Prof^a Dra. Denise Oliveira Silva e Dra. Vera Regina Constantino e aos seus alunos pelas discussões nos seminários de grupo.

À Prof^a Dra. Carla Columbano de Oliveira e a sua aluna Dra. Juliana Silva da Luz pela colaboração nos experimentos com DNA e pelas discussões, que muito ajudaram na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Hermi Felinto de Brito que propiciou a realização dos experimentos de fluorescência.

Aos amigos que fazem ou fizeram parte do grupo, Mariana, Joelson, Saulo, Paulo, Giovanni, Henri e Maurício, pela companhia e pelas discussões científicas.

Aos colegas da salinha, Otávio, Leonardo, Sérgio, André, pela agradável convivência.

Às amigas Ana Valéria, Karina, Juliana, Renata e Cida pelo apoio e amizade demonstrados.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial à Maria Aparecida Paiva Lopes, à Sônia Ribeiro e ao Ricardo Couto.

À minha família, minha irmã Luciana, avó, tias, sogro e sogra que sempre me apóiam e torcem pelas minhas vitórias. Especialmente aos meus pais, Roberto e Nivia, pelo amor e dedicação.

Ao meu marido Andrei pelo amor, carinho, amizade, apoio e paciência demonstrados ao longo dessa jornada. À minha filha Lauren pelos momentos de alegria e também por ter colaborado para que eu pudesse escrever essa Tese.

À FAPESP, pela bolsa de doutorado e pelo auxílio financeiro.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, e, na impossibilidade de citá-las uma a uma, contribuíram com seu apoio para a realização deste trabalho.

À banca examinadora, por ter aceito julgar este trabalho.

RESUMO

Silveira, V. C. - **Investigação da Atividade Biológica de Complexos de Cobre(II) com Ligantes Inspirados em Biomoléculas**. 2008. (167p). Tese - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho, alguns novos complexos imínicos de cobre(II) com ligantes inspirados em biomoléculas como oxindóis, contendo grupos indólicos, imidazólicos ou pirrólicos com diferentes características estruturais, foram sintetizados e caracterizados por análise elementar, espectrometria ESI-MS e espectroscopias IV, UV/Vis e EPR. As possíveis interações desses complexos de cobre com a albumina humana (HSA) e com o plasma sanguíneo foram estudadas através das técnicas EPR, CD e SDS-PAGE, indicando que estas ocorrem principalmente no sítio N-terminal da proteína. Suas reatividades frente a compostos biológicos relevantes, tais como glutationa, ascorbato e peróxido de hidrogênio, também foram verificadas. Alguns dos complexos estudados podem ser ativados por glutationa, ascorbato ou peróxido de hidrogênio, sendo capazes de gerar espécies reativas de oxigênio em concentrações significativas, na presença desses redutores ou oxidantes biológicos. Adicionalmente, as propriedades pró-oxidantes de tais complexos foram investigadas, visando elucidar estudos prévios de suas atividades pró-apoptótica e antitumoral. Alguns destes complexos foram mais eficientes em causar danos oxidativos à 2-deoxi-D-ribose, enquanto outros foram mais eficientes em causar oxidações na proteína HSA, com formação de grupos carbonílicos, principalmente em presença de H₂O₂. Experimentos de CD complementaram estes resultados, indicando que somente alguns complexos causaram modificações na α -hélice da proteína. Experimentos de EPR com captador de spin, na presença de HSA e H₂O₂, mostraram a formação de quantidades apreciáveis de radicais hidroxil e radicais de carbono, em presença de peróxido de hidrogênio. Além disso, os complexos apresentaram notável habilidade de ligação ao DNA e conseqüente atividade nuclease, promovendo clivagens nas duas fitas. Experimentos de fluorescência, EPR, gel de eletroforese marcado com α -³²P-UTP e CD foram ainda realizados, visando elucidar o mecanismo de ação destes complexos no meio biológico. Estes experimentos indicaram que eles podem se associar ao DNA, através de suas bases ou pela interação com a deoxi-ribose, já que promoveram danos oxidativos nestes substratos. Entretanto, não catalisam a hidrólise dos grupos fosfato, atuando, portanto, predominantemente por um mecanismo oxidativo. Através de CD, poucas perturbações na elipsicidade do DNA foram observadas, o que indica que estes complexos provavelmente estão localizadas nas cavidades ou alças do ácido nucléico.

Palavras-chaves: complexos de cobre(II); oxindóis; bases de Schiff; danos oxidativos; DNA; HSA; espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

Silveira, V. C. - **Investigação da Atividade Biológica de Complexos de Cobre(II) com Ligantes Inspirados em Biomoléculas**. 2008. (167p). PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Some novel imine–copper(II) complexes with ligands inspired in biomolecules such as oxindoles, containing indole, pyrrole or imidazole moieties with different structural features were synthesized, and characterized by elemental analysis, IR, UV/Vis and EPR spectroscopies, and ESI-MS spectrometry. Interactions of these complexes with human serum albumin (HSA) and human plasma were verified by EPR, CD and SDS-PAGE techniques, showing that they occur mainly at the N-terminal site of the protein. Their reactivity towards biological relevant compounds, such as glutathione, ascorbate and hydrogen peroxide were also verified; some of them are capable of generating ROS in significant concentrations, in the presence of these reducing or oxidant agents. Additionally, the activity of such copper(II) complexes in promoting oxidative damage to different substrates was investigated, in order to elucidate previous studies on their pro-apoptotic and antitumoral activity. Some of these complexes were much more efficient to cause oxidative damage to 2-deoxy-D-ribose, especially in the presence of hydrogen peroxide. On the contrary, others were more active in causing damage to HSA protein, with the formation of carbonyl groups. Experiments by CD corroborated these results, since only some of the complexes caused modifications in the protein α -helix. EPR spin trapping experiments, in the presence of HSA and H₂O₂, showed significant generation of hydroxyl as well as carbon centered radicals. Moreover, all the complexes showed remarkable ability to bind to DNA, promoting double-strand cleavage, upon H₂O₂ activation. In order to investigate their mechanism of action, fluorescence, EPR, gel-electrophoresis with labeled α -³²P–UTP and CD experiments were carried out. The results indicated that these complexes can bind to DNA through its bases or can interact with the deoxy-ribose rings, promoting oxidative damage to those substrates. On the contrary, they do not catalyze the hydrolysis of phosphate groups. By CD spectroscopy, little perturbations on the helicity conformation of the DNA were observed, indicating that these complexes are probably located in the grooves.

Keywords: copper complexes; oxindolimines; oxidative damage; DNA; HSA; reactive oxygen species.

LISTA DE ABREVIATURAS

ϵ	absortividade molar (em $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
$\lambda_{\text{máx}}$	comprimento de onda de absorção máxima
CD	dicroísmo circular
CT	Calf-thymus
Cu,Zn-SOD	superóxido dismutase de cobre e zinco
DNA	ácido deoxi-ribonucléico
DMPO	5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido
DMSO	dimetil sulfóxido
DNPH	2,4 – dinitrofenilhidrazina
DPPH	α, α' -difenil- β -picrilhidrazil
EB	brometo de etídeo
en	etilenodiamina
EPR	ressonância paramagnética eletrônica
epy	2-(2-aminoetilpiridina)
EROS	espécies reativas de oxigênio
ESI-MS	Espectrometria de massa <i>electrospray</i>
GSH	glutathiona redutase
HSA	albumina humana
IL	banda interna do ligante
im	imidazol
isa	isatina
IV	infravermelho
MM	massa molar
pn	1,3 -diaminopropano
pyr	pirrol
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida em fase denaturante
TBA	ácido 2-tiobarbitúrico
UV/Vis	ultravioleta-visível
phen	fenantrolina
TLC	cromatografia de camada fina
RNA	ácido ribonucléico
TCLM	transferência de carga ligante-metal
TCML	transferência de carga metal-ligante
TEMPOL	N,N,N',N'-tetrametilenodiamina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da circulação geral do cobre no corpo humano.....	19
Figura 2. Inibidor de CDK - <i>SU9516</i>	22
Figura 3. Ciclo de Divisão Celular.....	23
Figura 4. Mecanismo de Controle do Ciclo Celular.....	24
Figura 5. Fatores de Estímulo e Bloqueio do Ciclo Celular.....	25
Figura 6. Formas tautoméricas da isatina.....	27
Figura 7. Representação da estrutura da albumina humana (HSA).....	29
Figura 8. Estrutura da dupla-hélice do DNA.....	31
Figura 9. Diferentes formas de DNA.	33
Figura 10. Espectros eletrônicos no UV/Vis dos complexos.	54
Figura 11. Espectros eletrônicos no UV/Vis dos reagentes, comparando-se os valores de ϵ ($\text{mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$) dos compostos obtidos com os dos reagentes utilizados na síntese.....	56
Figura 12. Espectros eletrônicos no UV/Vis dos reagentes, comparando-se os valores de ϵ ($\text{mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$) dos compostos obtidos com os dos reagentes utilizados na síntese.....	57
Figura 13. Espectros na região do infravermelho.....	59
Figura 14. Espectros de EPR dos complexos no estado sólido, a 77K	63
Figura 15. Espectros de EPR dos complexos em solução, a 77K.	65
Figura 16. Espectro de massas do composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$ (1).....	69
Figura 17. Equilíbrio ceto-enólico do composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$	70
Figura 18. Equilíbrio da forma enólica do composto (1) e da forma ceto do composto (2) presentes em solução aquosa.	70
Figura 19. Espectro de massas do composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ (3).....	71
Figura 20. Espectro de massas do composto $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$ (4).....	72
Figura 21. Espectro de massas do composto $[\text{Cu}(\text{pyrpn})]$ (5).....	72
Figura 22. Equilíbrio ceto-enólico do composto $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$ (4).....	74
Figura 23. Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$ 0,15 mM, em solução aquosa, com variação de pH após adição de ácido.....	75
Figura 24. Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$ 0,15 mM, em solução aquosa, com variação de pH após adição de base.	76
Figura 25. Curva do pH <i>versus</i> $\log ((A - A_f)/(A_0 - A))$, em $\lambda = 386 \text{ nm}$, do pH 1,59 até 11,34, para o complexo (4).....	76

Figura 26. Gráfico do pH <i>versus</i> $\log ((A - A_f)/(A_0 - A))$, em $\lambda = 347$ nm, para a determinação do pK _a 1 do complexo (4).....	77
Figura 27. Gráfico do pH <i>versus</i> $\log ((A - A_f)/(A_0 - A))$, em $\lambda = 386$ nm, para a determinação do pK _a 2 do complexo (4).....	78
Figura 28. Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo [Cu(isaenim)] ²⁺ 0,15 mM, em solução aquosa, com variação de pH após adição de base.	79
Figura 29. Gráfico do pH <i>versus</i> $\log ((A - A_f)/(A_0 - A))$, em $\lambda = 386$ nm, para a determinação do pK _a 3 do complexo (4).....	79
Figura 30. Equilíbrios ácido/base envolvidos no composto (4).	80
Figura 31. A) Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo [Cu(isaepy)H ₂ O]ClO ₄ 0,15 mM, em solução aquosa, com variação de pH após adição de base. B) Gráfico do pH <i>versus</i> $\log ((A - A_f)/(A_0 - A))$, em $\lambda = 360$ nm, para a determinação do pK _a do complexo (1).....	81
Figura 32. A) Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo [Cu(isaepy) ₂](ClO ₄) ₂ 0,15 mM, em solução aquosa, com variação de pH após adição de base. B) Gráfico do pH <i>versus</i> $\log ((A - A_f)/(A_0 - A))$, em $\lambda = 301$ nm, para a determinação do pK _a do complexo (2).	81
Figura 33. Espectros de EPR da interação entre os complexos e proteínas no plasma, a 77K	83
Figura 34. SDS-PAGE, com gel separador de poliacrilamida de 12%, dos compostos de cobre e plasma	86
Figura 35. Espectros de EPR da interação dos complexos.....	87
Figura 36. Espectros de EPR da interação entre os complexos e proteínas no plasma.....	90
Figura 37. Espectro de CD da titulação de HSA (0,6 mM) com os compostos	95
Figura 38. Curva analítica da amplitude dicróica, em 564 nm, <i>versus</i> concentração para o composto [Cu(H ₂ O) ₄] ²⁺	96
Figura 39. Espectro de CD para monitoramento da estrutura secundária da HSA.	100
Figura 40. Espectros de emissão dos complexos de cobre (0,5 mM), a 25 °C, na presença ou ausência de GSH (10 mM)	103
Figura 41. Espectros de emissão dos compostos de cobre (0,5 mM) a 25 °C, após adição de GSH (10 mM).....	103
Figura 42. Espectros EPR, mostrando o radical ascorbil formado na presença dos complexos	105
Figura 43. Espectros EPR, pelo método de captação de spin, mostrando o aduto DMPO-OH formado na presença do complexo [Cu(isaepy)H ₂ O] ⁺ , com peróxido de hidrogênio, em função do tempo	107

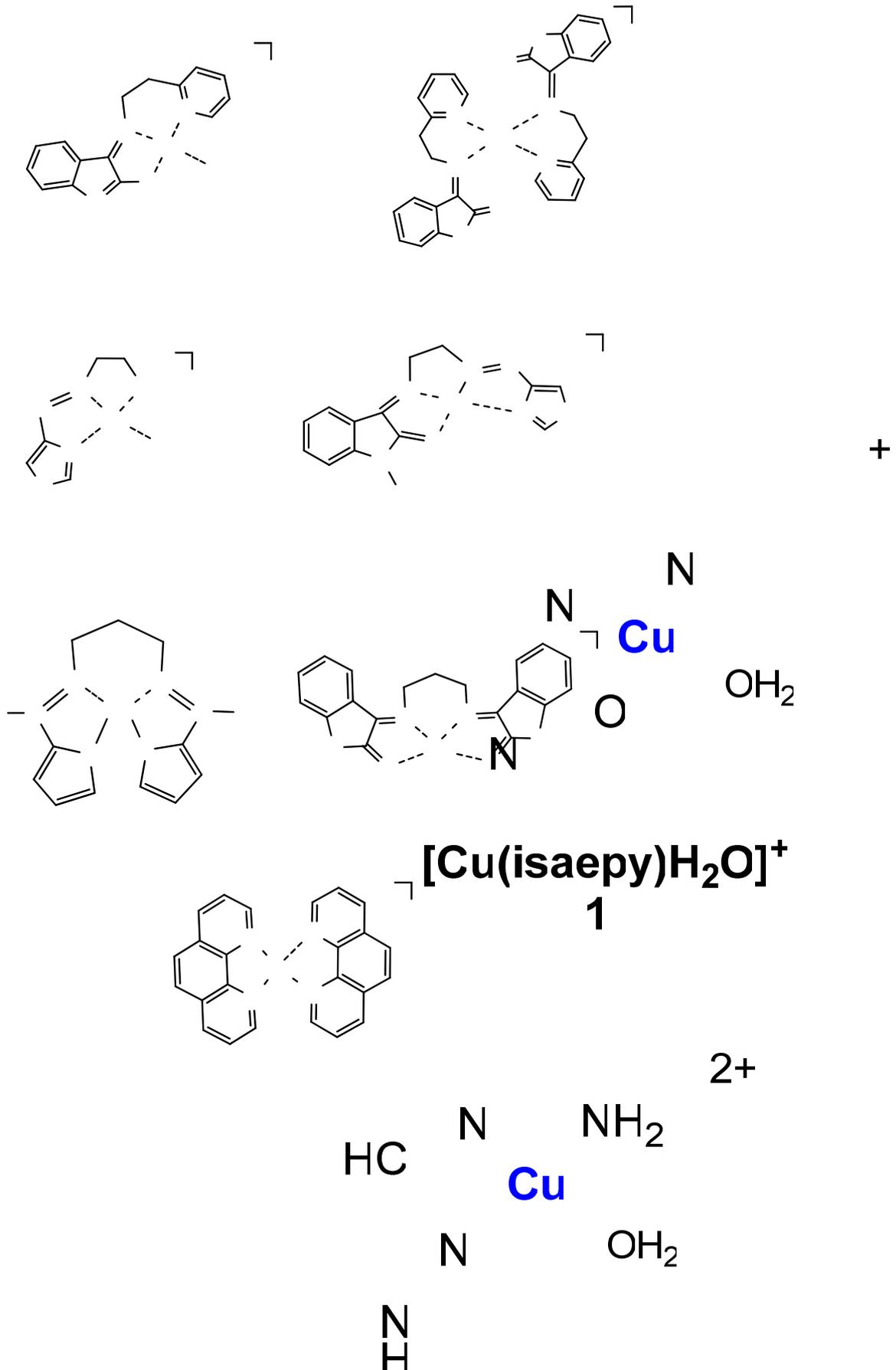
Figura 44. Espectros de captação de spin por EPR, pelo método de captação de spin, mostrando o aduto DMPO-OH formado na presença dos complexos.....	108
Figura 45. Espectros EPR, pelo método do captador de spin, dos adutos DMPO-OH formados na presença dos complexos de cobre e peróxido de hidrogênio.....	109
Figura 46. Espectros EPR dos adutos DMPO-OH e DMPO-C formados na presença dos complexos de cobre, peróxido de hidrogênio e HSA	111
Figura 47. Danos oxidativos à albumina humana induzidos por complexos de cobre(II) na presença ou na ausência de peróxido de hidrogênio.....	113
Figura 48. SDS-PAGE, com gel separador de poliácridamida de 12%, dos compostos de cobre e albumina, (Cu/HSA 1:1)	114
Figura 49. Dano oxidativo à 2-deoxi-D-ribose (2,50 mM) promovido pelos complexos de cobre(II) (100 µM)	116
Figura 50. Dependência do dano oxidativo à 2-deoxi-D-ribose (2,50 mM) com a concentração dos complexos de cobre(II)	117
Figura 51. (A) Gel de agarose do plasmídeo de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo [Cu(isaepy) ₂](ClO ₄) ₂ (2)	120
Figura 52. (A) Gel de agarose do plasmídeo de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo [Cu(isaepy)H ₂ O]ClO ₄ (1).....	121
Figura 53. (A) Gel de agarose do plasmídeo de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo [Cu(enim)H ₂ O](ClO ₄) ₂ (3)	122
Figura 54. (A) Gel de agarose do plasmídeo de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo [Cu(isaenim)](ClO ₄) ₂ (4)	123
Figura 55. Dados referentes à quantificação das bandas dos géis de eletroforese dos diferentes complexos	124
Figura 56. Gel de agarose do plasmídeo de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo [Cu(pyrpn)] por 15, 30, 60 ou 120 min, com peróxido de hidrogênio	125
Figura 57. Espectro de absorção dos complexos na ausência e em presença de DNA.	126
Figura 58. Espectro de absorção da titulação dos complexos	128
Figura 59. Curva de saturação da intensidade de fluorescência obtida com a adição de EB ao DNA 1 µM, variando-se a concentração na faixa de 2 a 22 µM.	129
Figura 60. Curva de saturação da intensidade de fluorescência obtida com a adição de EB ao DNA 1 µM, variando-se sua concentração na faixa de 0,4 a 4 µM.	130
Figura 61. Espectros de emissão do EB ligado ao DNA na ausência e na presença dos compostos	132

Figura 62. Efeito da adição dos compostos de cobre na intensidade da fluorescência do brometo de etídeo ligado ao DNA.....	132
Figura 63. Gráfico da curva de saturação e gráfico de Scatchard, respectivamente, para os complexos.....	135
Figura 64. Curva de saturação da intensidade de fluorescência obtida com a adição de EB ao DNA-CT 3,2 μM , variando-se a concentração na faixa de 10 a 127 μM	137
Figura 65. Espectros de emissão do EB ligado ao DNA-CT na ausência e na presença do composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$	138
Figura 66. Efeito da adição do composto (3) na intensidade do brometo de etídeo ligado ao DNA.. ..	138
Figura 67. Gráfico da curva de saturação e gráfico de Scatchard para o complexo $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (3)	139
Figura 68. Espectro de CD do DNA-CT (800 μM) em tampão fosfato 50 mM/NaCl-0,1M na ausência e na presença dos compostos $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$	141
Figura 69. Cromatograma TLC dos compostos de cobre (50 μM) e UTP.....	143
Figura 70. Gel de poliacrilamida 8% nativo, com oligômeros de RNA marcado no fósforo 5', incubados com complexos de cobre(II).....	144
Figura 71. Gel de poliacrilamida 8% desnaturante, com oligômero de DNA marcado no fósforo 5'.....	145
Figura 72. Gel de poliacrilamida 8% desnaturante, com oligômero de RNA marcado no fósforo 5' na presença do composto $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$	146
Figura 73. Espectros de EPR da interação entre os complexos e os nucleotídeos do DNA .	149
Figura 74. Espectros de EPR visando monitorar a interação entre os complexos de cobre com o DNA Calf-thymus	153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização das bandas observadas ($\lambda_{\text{máx}}$) e respectivos valores de absorvidade molar (ϵ) dos complexos.....	54
Tabela 2. Caracterização das bandas observadas ($\lambda_{\text{máx}}$) e valores de absorvidade molar (ϵ) dos reagentes.	56
Tabela 3. Valores dos parâmetros de g_{\perp} e g_{\parallel} dos compostos sintetizados,.....	63
Tabela 4. Valores do parâmetro g e das constantes hiperfinas (A) dos compostos sintetizados	66
Tabela 5. Parâmetros observados após adição de HCl 0,1 mol/L a uma solução de $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$	73
Tabela 6. Parâmetros observados após adição de NaOH 0,1 mol/L a uma solução de $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$	74
Tabela 7. Valores de pK_a determinados para o composto (4).....	80
Tabela 8. Parâmetros medidos nos espectros de EPR da interação entre os complexos e proteínas, a 77K.....	84
Tabela 9. Parâmetros medidos nos espectros EPR dos complexos $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ em presença da albumina.....	88
Tabela 10. Parâmetros medidos dos espectros de EPR da interação entre os complexos e a proteína HSA	91
Tabela 11. Bandas de interação do cobre no sítio I da albumina observadas por CD e por EPR	96
Tabela 12. Valores de constantes de estabilidade relativas, determinadas para os compostos de cobre em experimentos competitivos com a HSA.....	97
Tabela 13. Porcentagens estimadas para α - hélice da HSA usando o programa K2D, através das curvas de Dicroísmo Circular.....	101
Tabela 14. Concentração dos adutos radicalares gerados nas soluções de CuL.....	110
Tabela 15. Valores de K e n para a série de complexos de cobre (II) obtidos pelo ajuste não-linear da curva de saturação.....	136
Tabela 16. Parâmetros medidos nos espectros de EPR da interação entre os complexos e bases do DNA.....	149

**ESTRUTURAS DOS COMPLEXOS DE COBRE(II)
PREPARADOS E ESTUDADOS**



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. O metabolismo do cobre	19
1.2. O processo de apoptose celular e as enzimas quinases	21
1.3. Complexos de cobre como potenciais metalofármacos	25
1.4. Interações de complexos de cobre com proteínas	28
1.5. Interações de complexos de cobre com DNA	30
2. OBJETIVOS	36
3. PARTE EXPERIMENTAL	37
PARTE I - Síntese, Caracterização e Estudos de Equilíbrio	37
I - 3.1. Reagentes e Soluções	37
I - 3.2. Sínteses	37
I - 3.2.1. Composto $[Cu(isaepy)H_2O]ClO_4$; Composto 1	37
I - 3.2.2. Composto $[Cu(enim)H_2O](ClO_4)_2$; Composto 3	38
I - 3.2.3. Composto $[Cu(isaenim)](ClO_4)_2$; Composto 4	38
I - 3.2.4. Composto $[Cu(pyrpn)]$; Composto 5	38
I - 3.3. Instrumentação e Métodos de Caracterização	39
I - 3.3.1. Análise Elementar	39
I - 3.3.2. Espectroscopia na Região do Ultravioleta/Visível (UV/Vis)	39
I - 3.3.3. Espectroscopia na região do Infravermelho	39
I - 3.3.4. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	40
I - 3.3.5. Espectrometria de Massa	40
I - 3.4. Estudos de Equilíbrio	40
I - 3.4.1. Estudos de Equilíbrio através de Espectroscopia EPR	40
I - 3.4.2. Estudos de Equilíbrio através de Espectroscopia UV/Vis	41
3. PARTE EXPERIMENTAL	42
PARTE II - Implicações em Processos Biológicos	42
II - 3.1. Espectros EPR dos Complexos de Cobre em presença de Albumina Humana ou Plasma Humano	42
II - 3.2. Interação dos Complexos de Cobre(II) com Proteína através de SDS-PAGE	42

II – 3.3. Estabilidade Termodinâmica dos complexos de cobre: Medidas de Dicroísmo Circular	43
II – 3.4. Modificação na Estrutura Secundária da HSA monitorada por medidas de Dicroísmo Circular	43
II – 3.5. Fluorescência dos Complexos de Cobre(II) na Presença de Glutathione (GSH)	44
II – 3.6. Geração de Radicais Livres e Detecção por EPR.....	44
II – 3.7. Geração de Radicais Livres e Detecção por EPR em Presença de HSA.....	45
II – 3.8. Danos Carbonílicos à Albumina na Presença de Complexos de Cobre(II)...	45
II – 3.9. Experimentos de clivagem com a proteína HSA.....	46
II – 3.10. Danos oxidativos à 2-deoxi-D-ribose em presença de complexos de cobre	46
II – 3.11. Clivagem do DNA em presença de complexos de cobre	46
II – 3.12. Monitoramento de interações dos complexos com DNA, através de espectroscopia UV/Vis	47
II – 3.13. Monitoramento de interações dos complexos com DNA, através de medidas de Fluorescência	47
II – 3.14. Monitoramento de interações dos complexos com o DNA, através de Dicroísmo Circular	48
II – 3.15. Cromatografia de camada fina (TLC) com nucleotídeo marcado com ^{32}P	48
II – 3.16. Gel de Poliacrilamida com oligômeros de RNA ou DNA	49
II – 3.17. Espectros EPR de soluções de complexos de cobre com DNA e suas Bases	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
PARTE I - Síntese, Caracterização e Estudos de Equilíbrio	51
I - 4.1. Síntese e Caracterização	51
I - 4.2. Estudo do Equilíbrio ceto-enólico do Composto $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$	73
I - 4.2.1. Estudos de Equilíbrio através de Espectroscopia EPR.....	73
I - 4.2.2. Estudos de Equilíbrio através de Espectroscopia UV/Vis	74
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
PARTE II - Implicações em Processos Biológicos	82
II – 4.1. Espectros EPR com Albumina Humana e Plasma Humano.....	82
II – 4.2. Interação dos Complexos de Cobre(II) com Proteína através de SDS-PAGE	85
II – 4.3. Interação dos Complexos de cobre (II) com HSA em Função do Tempo.....	86

II – 4.4. Estabilidade Termodinâmica: Medidas de Dicroísmo Circular	92
II – 4.5. Modificação na Estrutura Secundária da HSA: Medidas de Dicroísmo Circular.....	97
II – 4.6. Fluorescência dos Complexos de Cobre(II) na Presença de Glutathiona (GSH)	101
II – 4.7. Geração de Radicais Livres e Detecção por EPR.....	104
II – 4.8. Geração de Radicais Livres e Detecção por EPR na Presença de HSA.....	109
II – 4.9. Danos Carbonílicos à Albumina em Presença de Complexos de Cobre(II)	111
II – 4.10. Experimentos de clivagem da proteína HSA em presença de complexos de cobre	114
II – 4.11. Danos oxidativos à 2-deoxi-D-ribose causados por complexos de cobre .	115
II – 4.12. Clivagens nas fitas do DNA	118
II – 4.13. Interações dos complexos de cobre com DNA: monitoramento por espectroscopia eletrônica.....	126
II – 4.14. Estudos de Fluorescência da Intercalação de complexos de cobre no DNA	128
II – 4.15. Estudo de Interação dos Complexos de Cobre ao DNA através de Dicroísmo Circular	139
II – 4.16. Experimentos de Cromatografia de Camada Fina (TLC) com DNA marcado com * P ³²	142
II – 4.17. Verificação de clivagem da ligação fosfato através de Gel de Poliacrilamida com Oligômeros de RNA ou DNA	144
II – 4.18. Espectros EPR de complexos de cobre em presença de DNA ou de suas Bases.....	147
5. CONCLUSÕES.....	154
6. REFERÊNCIAS	158
7. ANEXO – SÚMULA CURRICULAR.....	168

1. INTRODUÇÃO

O comportamento bioinorgânico do cobre vem despertando grande interesse da comunidade científica nas últimas décadas, quando foram esclarecidos os detalhes estruturais e as principais funções de proteínas e enzimas dependentes deste metal. Paralelamente, no mesmo período, vários compostos de coordenação contendo cobre coordenado a ligantes mais simples se mostraram bons miméticos dos sítios ativos destas biomoléculas e auxiliaram a elucidar detalhes estruturais desses sítios. Embora, nas disciplinas de bioquímica ou química bioinorgânica, sejam amplamente discutidas as funções de proteínas que requerem cobre para as suas atividades, como as tirosinases, as redutases ou as oxidases, é muito menos difundido o fato de íons de cobre desempenharem um papel importantíssimo no metabolismo humano do oxigênio molecular como um todo e o conhecimento de que variações em sua concentração podem provocar graves transtornos e enfermidades [1,2].

O cobre é um metal essencial no meio biológico, encontrado em uma grande variedade de plantas, organismos e microorganismos. É o terceiro metal de transição ou metal-traço mais abundante nos seres humanos, após o ferro e o zinco, e desempenha funções importantes no sistema biológico [3]. Encontra-se distribuído praticamente em todo o organismo, mas em diferentes concentrações, o que indica seus vários papéis funcionais [1]. A importância biológica, funcional e/ou estrutural do cobre em animais e humanos está relacionada com as enzimas cobre-dependentes - as tradicionalmente denominadas cuproenzimas, como, por exemplo, no transporte de elétrons pelas proteínas azuis, como a plastocianina e a azurina [4]. Está também presente no sítio ativo de inúmeras proteínas e enzimas participantes do metabolismo do oxigênio, como na proteína carregadora de oxigênio, hemocianina [5]; na proteína envolvida na sua redução até água, citocromo c oxidase [5,6]; nas proteínas responsáveis pela ativação de oxigênio para oxidações de substratos como aminas, carboidratos, fenóis e catecóis levando à formação de produtos carbonílicos (aldeídos, quinonas, etc.) e de peróxido de hidrogênio, como amina oxidase, galactose oxidase, tirosinase ou catecol oxidase [7].

Com tantas funções diferentes, não é de se admirar que centros de cobre em biomoléculas apresentem as mais variadas estruturas: há centros mononucleares, dinucleares e até clusters polinucleares, permitindo a coordenação de diferentes substratos e envolvendo mecanismos com etapas monoelétrônicas e dieletrônicas.

Algumas metaloproteínas protegem os sistemas biológicos de danos causados por espécies reativas de oxigênio, como o ânion radical superóxido ou o peróxido de hidrogênio,

sendo muito estudadas devido à sua implicação com a saúde humana. Nestas incluem-se enzimas de cobre, ferro ou manganês como as superóxido dismutases, e de ferro e manganês como as catalases e pseudo-catalases, respectivamente [8]. Particularmente, na enzima Cu,Zn-SOD, o cobre tem papel antioxidante, catalisando a dismutação de radicais superóxido a oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, enquanto o zinco exerce um papel estrutural, mantendo a proteína numa conformação adequada. Entretanto, mutações nesta proteína levam a mudanças drásticas em suas propriedades redox agregando, a esta proteína predominantemente antioxidante, uma atividade oxidante [9].

Em todas essas enzimas citadas, o íon cobre participa de ciclos catalíticos envolvendo os estados de oxidação Cu(I) e Cu(II), em que o arcabouço protéico ao redor do íon metálico tem forte influência em suas propriedades (redox, espectroscópicas, magnéticas, etc.) e determina sua reatividade. Deste modo, têm grande interesse o planejamento e o estudo de sistemas-modelos, que apresentem uma modulação nas propriedades estruturais e funcionais do cobre, através de variações nos ligantes.

Em particular, tem-se grande interesse em compostos que apresentem alta reatividade frente a espécies paramagnéticas radicalares, como íons superóxido $O_2^{\bullet-}$, $\bullet NO$, radical fenoxil, semiquinonas, etc. [10], isto é, reatividade em transferências monoelétrônicas. As proteínas azuis estão envolvidas em processos de transferência de elétrons, exemplo, azurina e plastocianina. Elas receberam esse nome devido a sua intensa coloração, atribuída a uma banda de transferência de carga, TCLM, entre o ligante sulfurado e o íon metálico. Estas proteínas impõem uma geometria peculiar ao metal no sítio de ligação, que é mais próxima de Cu(I), mais tetraédrica, do que de Cu(II), quadrado planar, de tal modo que o cobre não tem a possibilidade de se rearranjar na sua geometria preferida, dependendo do estado de oxidação [11]. Entretanto, esta geometria é adequada para ambos os estados redox do metal, impedindo sua perda ou mobilização, durante o ciclo catalítico.

As galactoses oxidases são encontradas em vários animais e também no homem, cuja função é a de catalisar a oxidação de alcoóis a aldeídos, através da redução de oxigênio a peróxido de hidrogênio. Suas massas molares são de aproximadamente 68 kDa e seu centro ativo possui apenas um átomo de cobre. Há controvérsias quanto ao papel do cobre no mecanismo de ação dessa enzima. Alguns autores acreditam na redução do metal pelo substrato e posterior oxidação pelo oxigênio, outros sugerem que a função do cobre é apenas a de estruturar adequadamente o substrato que reage diretamente com o oxigênio [2].

As aminas oxidases são também encontradas no organismo humano e catalisam a desaminação oxidativa de aminas e di-aminas biológicas a aldeídos. Possuem massa molar de

aproximadamente 100 kDa e geralmente são compostas de duas sub-unidades, cada uma contendo um átomo de cobre. Alguns estudos mostram que somente um sítio de cobre(II) é imprescindível para a catálise. Isso evidencia que o mecanismo de ação da enzima envolve a coordenação da amina de uma forma muito similar àquela que ocorre nos complexos inorgânicos de cobre(II) binucleares com aminas bidentadas [12].

As enzimas superóxido dismutases (SOD) controlam a concentração do ânion superóxido *in vivo*, catalisando a transformação de dois íons superóxidos em oxigênio e H_2O_2 . A CuZnSOD é distribuída tanto no citosol quanto no espaço da intermembrana mitocondrial em células eucarióticas. A reação ocorre em um processo de duas etapas, na qual a molécula de superóxido reduz a forma oxidada Cu(II) da enzima formando O_2 e a enzima reduzida. A enzima reduzida subsequentemente reduz a segunda molécula de superóxido, formando H_2O_2 e restaurando a forma oxidada da enzima [13].

1.1. O metabolismo do cobre

O cobre é encontrado em carnes, frutos-do-mar, em muitos vegetais, cereais e nozes. Estima-se que, numa dieta balanceada e adequada ao ser humano, são necessários de 2 a 5 mg de cobre por dia [14]. A Figura 1 mostra um esquema simplificado da circulação geral desse metal no corpo humano.

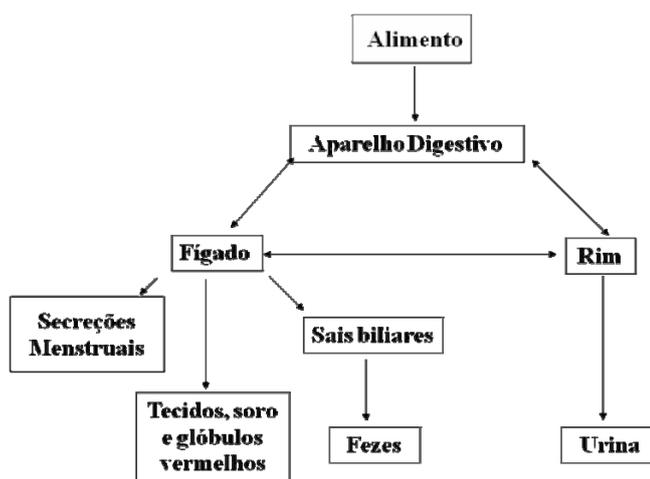


Figura 1. Esquema da circulação geral do cobre no corpo humano. (V. Sargentelli, A. E. Mauro, A. C. Massabni, Química Nova 19 (1996) 290).

O alimento que contém cobre é digerido no aparelho digestivo do indivíduo e o cobre assimilado é, então, distribuído para os tecidos, soro, glóbulos e fígado. Esse processo é

chamado de fluxo normal de cobre. A absorção do cobre inicia-se no intestino delgado, entrando através das membranas das células por difusão facilitada. No interior das células intestinais, capazes de absorver o cobre, os íons Cu(II) estão ligados à proteína metalotioneína.

Aproximadamente 90% do cobre absorvido são incorporados à ceruloplasmina plasmática, uma proteína que contém 6 (seis) átomos de cobre, cada qual com uma vizinhança diferente, capaz de desempenhar diferentes funções, incluindo transportar o metal até outras proteínas. O restante do cobre absorvido se liga à albumina, transcuroína e outras proteínas plasmáticas. O cobre é então transportado até o fígado, através da veia porta. Nos hepatócitos, o cobre é captado pelas metalotioneínas para seu armazenamento ou se incorpora a várias cuproenzimas. As metalotioneínas carregadas de cobre são armazenadas nos lisossomas dos hepatócitos, evitando desta maneira a toxicidade causada pelo metal ionizado “livre”. Quando necessário, o cobre é novamente incorporado à ceruloplasmina e excretado ao plasma. A ceruloplasmina é sintetizada no fígado e secretada no soro. O transporte do cobre em todos esses processos se realiza através de proteínas especializadas denominadas chaperonas cúpricas e por várias ATP-ases cuprodependentes ou proteínas de Menkes. O cobre em excesso é posteriormente eliminado por via biliar e excretado nas fezes.

Pequenas mudanças no metabolismo podem ser desprezíveis e não levar a maiores complicações. Todavia, grandes alterações podem provocar graves distúrbios e até doenças. Apesar da grande importância do cobre no corpo humano, certas anomalias relacionadas ao metabolismo e ao transporte do cobre podem levar esse metal essencial a se tornar nocivo ao organismo, pela interferência nas atividades catalíticas normais de algumas enzimas [15]. O cobre possui grande afinidade por grupos S-H e muitas enzimas contêm esse grupo que é essencial para suas atividades catalíticas normais. O cobre pode então provocar a inativação destas enzimas [2].

Além disso, sua atividade redox pode causar vários danos mediados por espécies reativas de oxigênio (EROS), através da conversão de H₂O₂ em radicais hidroxil e da consequente oxidação catalisada de muitos substratos presentes nas células, como a oxidação de proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos [16]. Íons de cobre, coordenados a diferentes ligantes, podem apresentar reações, denominadas etapas tipo-Fenton, similarmente ao verificado com íons de ferro [17]:



Portanto, o cobre é um metal de transição que, em virtude de sua capacidade redox, atua como cofator em inúmeras enzimas e proteínas, tendo um papel fundamental no metabolismo celular. Por outro lado, é também responsável por muitos processos de dano celular, que podem culminar em inúmeras doenças e até na morte da célula, por necrose ou apoptose [18]. Neste contexto, o cobre pode gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o processo de oxidação de substratos endógenos e, subseqüentemente, pode causar danos a outras biomoléculas, iniciando o chamado estresse oxidativo. Este processo, que depende da reatividade do íon cobre e é modulada pelos ligantes, pode gerar danos oxidativos em diversas biomoléculas como açúcares, lipídeos, proteínas e DNA [16], mas que se bem controlado pode constituir um processo útil na cura de doenças degenerativas.

1.2. O processo de apoptose celular e as enzimas quinases

A morte celular apoptótica é um tipo de morte celular altamente regulada, que tem como função principal eliminar células desnecessárias ou danificadas. Ao contrário do que ocorre na necrose, não há reação inflamatória e aumento de tamanho das organelas na célula apoptótica. A compactação precoce do núcleo celular é observada, seguida de quebra do núcleo em fragmentos discretos. As células se rompem através de corpos ou vesículas apoptóticos ligados à membrana citoplasmática, nos quais as organelas aparentemente estão intactas e muitos desses corpos apoptóticos apresentam um componente nuclear [19]. A falha em mecanismos que levem à morte celular apoptótica pode promover o câncer. As mitocôndrias, presentes no citosol da célula, têm papel fundamental em etapas essenciais da vida e da morte celulares. Estas organelas geram por fosforilação oxidativa 80 a 90% do ATP necessário para a respiração e sobrevivência da célula, regulam o fluxo de cálcio e têm a habilidade de desencadear a apoptose, liberando proteínas pró-apoptóticas, como citocromo c oxidase e o fator indutor de apoptose (IAF), para o citoplasma. Elas são responsáveis pela produção de grande parte dos compostos fosfatados de alta energia (ATP, GTP, creatina fosfato) e também participam da regulação da morte celular, geração e detoxificação de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio [20]. Assim, a função adequada das mitocôndrias é essencial para a maioria das células de mamíferos. Mutações no DNA mitocondrial têm sido associadas a inúmeras desordens no meio biológico, desde doenças neurodegenerativas até o câncer. Deste modo, há grande interesse em desenvolver drogas terapêuticas que desencadeiem a morte das células cancerígenas explorando as funções das mitocôndrias. Como conseqüência, as mitocôndrias aparecem como alvos potenciais para a

terapia anti-câncer baseada em moléculas pequenas, que vão atuar direta ou indiretamente sobre elas [21]. Adicionalmente, as mitocôndrias também constituem alvos para agentes terapêuticos desenvolvidos para o tratamento de outras disfunções, como doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, diabetes e certas infecções virais.

Numerosos estudos têm sido feitos no sentido de verificar a ação de certos compostos orgânicos na apoptose celular [22,23,24]. A idéia é desenvolver inibidores de enzimas envolvidas na divisão celular com o objetivo de influenciar esse processo, visando o desenvolvimento de compostos anti-câncer. Um exemplo é o composto *SU9516*, 3-[1-(3H-imidazol-4-íl)-met-(Z)-ilideno]-5-metoxi-1,3-dihidro-indol-2-(ona), que se mostrou capaz de induzir apoptose em células de carcinoma de colon [25].

Esse composto *SU9516* é um inibidor de CDK1/ciclinaB, CDK2/ciclinaA ou CDK2/ciclinaE, que são enzimas quinases dependentes de ciclinas e que governam o ciclo normal de divisão celular. O inibidor *SU9516* é preparado a partir de 5-metoxi-oxindol e imidazol-4-carboxaldeído, apresentando em sua estrutura um grupo imidazol e um esqueleto de isatina [25], conforme mostrado na Figura 2. Isatina é um oxindol derivado de metabólitos de aminoácidos, como o triptofano, obtida pela oxidação do grupo indol e excretada na urina humana.

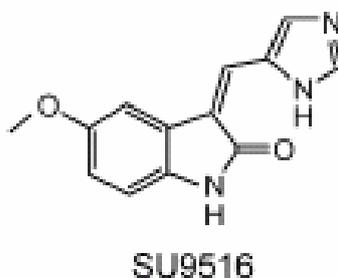


Figura 2. Inibidor de CDK - *SU9516*.

Dentre as várias abordagens no estudo das moléculas-alvo para agentes quimioterapêuticos contra o câncer, destaca-se o desenvolvimento de inibidores de quinases dependentes de ciclina, as chamadas CDK (cyclin-dependent kinases) [26]. Estas quinases são enzimas da família serina/treonina, que governam o ciclo normal de divisão celular. A progressão deste ciclo é determinada por eventos de fosforilação sequencial através de uma cascata de holoenzimas, específicas para cada fase do ciclo celular, envolvendo ciclinas e suas parceiras catalíticas, as quinases CDKs [27, 28]. O ciclo celular é composto de uma seqüência ordenada de fases. A célula diferenciada se encontra em G_0 , onde ela atingiu sua

diferenciação terminal e está quiescente. Nos adultos, a maioria das células não se divide constantemente e a maior parte permanece nesta fase, fora do ciclo. Se a célula recebe fatores de estímulo, por exemplo, uma lesão na pele, ela entra em G_1 , período em que aumenta de tamanho e prepara as proteínas de que necessita para a síntese de DNA. Durante esta fase, a célula é sensível às condições ambientais. Se elas não forem favoráveis, a divisão celular pára em G_1 . No entanto, se ultrapassar o ponto R (ponto de restrição), a divisão celular ocorrerá independente de condições ambientais. Na fase S sintetiza-se o DNA que será replicado durante a fase G_2 . No início de G_2 existe outro ponto de controle importante, onde se verificará a qualidade do DNA replicado. Finalmente, na fase mitótica (M), o DNA duplicado será dividido entre as duas células filhas. A mitose será impedida se, na checagem da mitose, forem constatadas anormalidades na divisão dos cromossomos [29]. A Figura 3 mostra o ciclo normal de divisão celular.

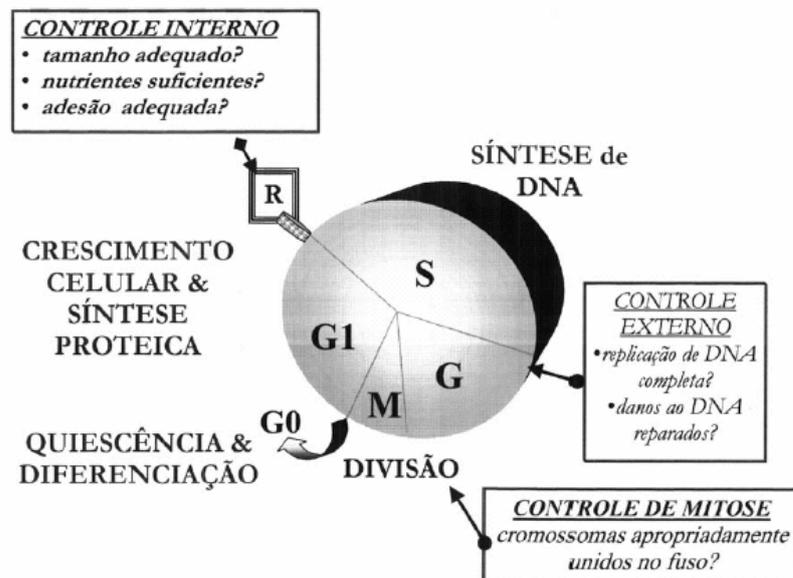


Figura 3. Ciclo de Divisão Celular. (L.S. Ward, *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, vol 46, nº 4 Agosto 2002).

Todas as etapas ao longo do ciclo de divisão celular, como quiescência (G_0), comprometimento da síntese do DNA (fase S) e a transição de G_2 para mitose, são dependentes de complexos específicos CDK/ciclina. Vários grupos de proteínas atuam na ativação do ciclo, por exemplo, as ciclina que determinam quais proteínas devem ser fosforiladas. Por outro lado, um grupo de inibidores do ciclo atua impedindo ou regulando a

progressão do ciclo de divisão celular, e um deles é a proteína **p53**. O gene **p53** foi denominado o guardião do genoma e codifica um fator de transcrição protéico, a proteína **p53**. Nas células saudáveis, a concentração da proteína **p53** é baixa, entretanto quando ocorre lesão no DNA, a proteína acumula-se e ativa vários genes, um dos quais codifica a proteína **p21**. A proteína **p21**, por outro lado, inativa complexos de ciclinas/CDK impedindo a fosforilação da **Rb**, interrompendo o ciclo no ponto de controle 1. Isto permite o reparo do DNA. Se o reparo for bem sucedido, o ciclo prossegue passando para a fase **S**. Se o reparo não for bem sucedido, o gene **p53** desencadeia o processo de apoptose, ou suicídio da célula. A desregulação deste processo pode resultar em um crescimento celular desordenado e incontrolável, que caracteriza o estado neoplástico ou cancerígeno [29]. A Figura 4 mostra o mecanismo de controle do avanço celular e a Figura 5 mostra os fatores de estímulo e bloqueio do ciclo celular.

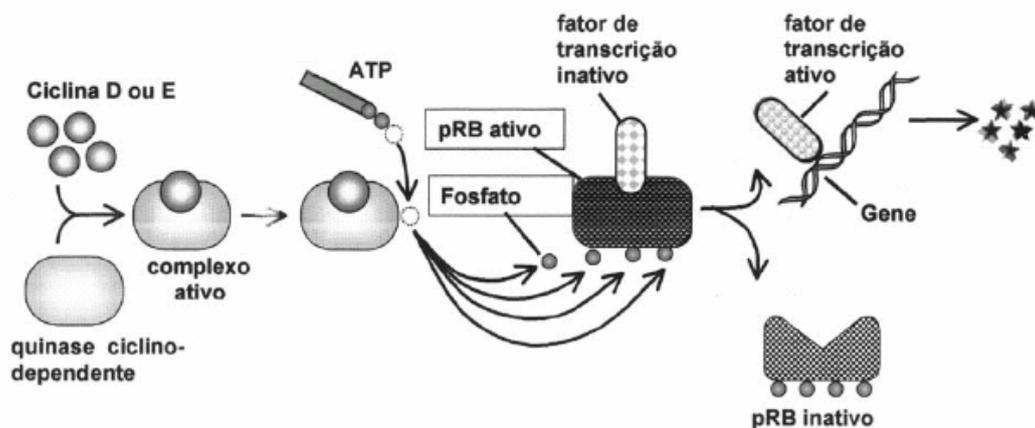


Figura 4. Mecanismo de Controle do Ciclo Celular. (L.S. Ward, *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, vol 46, nº 4 Agosto 2002)

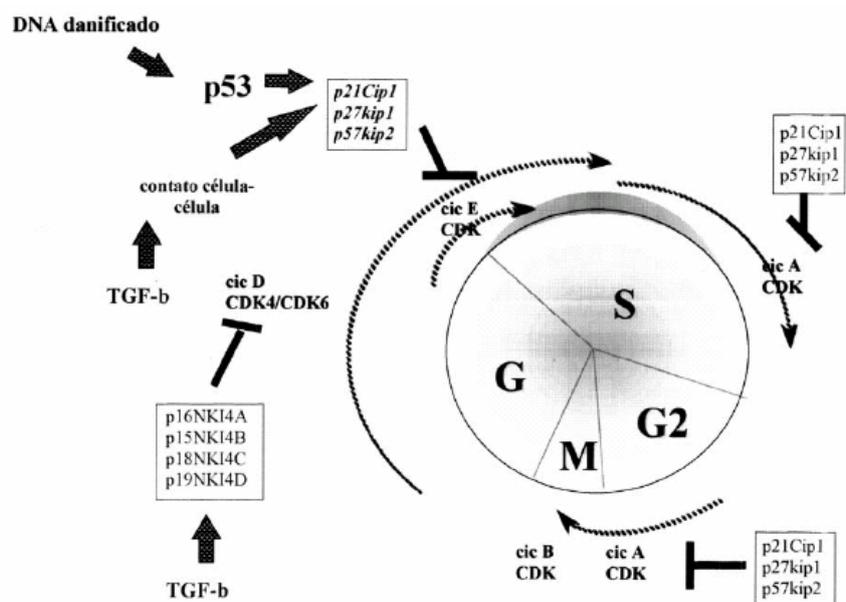


Figura 5. Fatores de Estímulo e Bloqueio do Ciclo Celular. (L.S. Ward, *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, vol 46, nº 4 Agosto 2002).

Não é surpreendente que a atividade destas quinases seja o motivo principal para a desregulação observada no câncer. O conhecimento desta atividade da CDK no processo cancerígeno levou ao desenvolvimento de pequenas moléculas inibidoras das CDKs, visando o tratamento desta doença. Esta estratégia terapêutica é, no entanto, bastante complicada, uma vez que há quinases que não desempenham diretamente um papel no ciclo celular [24]. No entanto, o complexo *SU9516* é um potente inibidor de CDK1/ciclinaB, CDK2/ciclinaA ou CDK2/ciclinaE [25], o que pode ser explicado pelas suas fortes interações através de ligações de hidrogênio [30] com grupos presentes na enzima. Além disso, o *SU9516* diminui a fosforilação da proteína **pRb** [31] e induz o processo de apoptose em células de carcinoma de colon [25].

1.3 Complexos de cobre como potenciais metalofármacos

Nos últimos anos, as interações de íons metálicos com vários ligantes que apresentam alguma atividade biológica têm sido bastante estudadas, já que geralmente ocorre um aumento da atividade fisiológica de muitos compostos orgânicos [32,33] quando coordenados a um centro metálico, particularmente aqueles que apresentam atividade redox. As atividades farmacológicas dos complexos metálicos dependem do íon metálico, do seu ligante e da

estrutura desses compostos. Estes fatores são responsáveis por interações específicas em sítios alvos do organismo, como proteínas, DNA, lipídeos, carboidratos, membranas, etc. [34].

Vários complexos metálicos têm sido estudados como drogas e agentes de diagnósticos para o tratamento de várias doenças [35,36]. Este interesse farmacológico tem sido responsável por um grande avanço na área. Entretanto, geralmente o mecanismo de ação ou mesmo o principal alvo biológico destes compostos ainda não foram bem elucidados. Os compostos de platina, como a cisplatina ($\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl}_2]$), a carboplatina e a oxaliplatina são os mais usados até agora como agentes terapêuticos contra o câncer [37]. Por outro lado, estudos mais recentes têm sido desenvolvidos com metais essenciais, como o cobre, já que se espera que o nível de toxicidade dos compostos derivados desses metais seja menor que o de metais não-essenciais [38,39], como a platina ou o ródio, já utilizados com sucesso, mas que ainda apresentam problemas. Devido à habilidade deste íon metálico de gerar espécies de radicais livres, muitos complexos de cobre com diferentes tipos de ligantes têm sido testados como potentes drogas apoptóticas [39,40]. São vários os exemplos de complexos metálicos, com ligantes naturais, sintéticos ou semi-sintéticos, que têm sido estudados com o objetivo de melhorar a atividade biológica desses ligantes, incluindo atividade antiácida, anti-inflamatória, antifúngica, antimicrobiana, antiviral e antitumoral [35,41]. Interessantemente, alguns complexos de cobre têm apresentado atividade tóxica seletiva frente a células malignas.

Alguns compostos de cobre com diversos ligantes foram sintetizados em nosso laboratório e têm sido estudados com a finalidade de desenvolver potenciais agentes terapêuticos. Alguns desses compostos derivados de isatina, um indol endógeno, mostraram atividade apoptótica significativa em células humanas tumorais [39], além de apresentarem atividade catalítica apreciável na oxidação de carboidratos e capacidade de gerar quantidade significativa de espécies reativas de oxigênio (ROS) [42]. A isatina (1H-indol-2,3-diona; 2,3-dioxindolina; ou indolina-2,3-diona) está presente no cérebro e em outros tecidos nos humanos, porém seu metabolismo não foi ainda bem elucidado. A isatina e seus derivados vêm demonstrando uma grande variedade de efeitos no meio biológico, incluindo a inibição de monoamina oxidase, atividade bactericida, fungicida, antiviral e antiproliferativa [43]. As bases de Schiff derivadas da isatina também possuem várias atividades farmacológicas, dentre as quais destacam-se suas atividades anticonvulsivantes, antidepressivas, analgésica e anti-inflamatória [44]. Alguns compostos sintéticos de isatina foram desenvolvidos como potentes inibidores de proliferação celular [45], e alguns derivados foram propostos como agentes anticâncer ou antimicrobianos [46].

Compostos derivados de oxindóis, como *SU5416* e *SU6668*, também têm sido descritos como antitumorais e gerando interesse clínico, pela sua atuação como inibidores de angiogênese, isto é, dificultando a vascularização de tumores, através da inibição de etapas de sinalização envolvendo receptores do fator de crescimento VEGF [47].

A isatina apresenta formas tautoméricas, em um equilíbrio ceto-enólico, como é mostrado na Figura 6.



Figura 6. Formas tautoméricas da isatina.

Baseado então nestes estudos anteriores, preparou-se e investigou-se alguns novos complexos de cobre com ligantes nitrogenados do tipo imina como possíveis agentes farmacológicos, seja promovendo processos oxidativos ou desempenhando papel antioxidante, em condições fisiológicas. Foram estudados compostos derivados do imidazol, por apresentar atividades biológicas interessantes, como propriedades farmacêuticas, biocidas e fungicidas [48], além de estar presente como grupo coordenante de íons de cobre no sítio ativo de muitas enzimas em resíduos de histidinas; derivados com estrutura semelhante ao deste composto e, finalmente, derivados da própria isatina.

Compostos de cobre com ligantes do tipo base de Schiff, obtidos a partir da condensação de compostos carbonílicos com aminocompostos, têm sido estudados extensivamente nos últimos anos, com relação à sua reatividade frente ao oxigênio molecular e seus derivados reduzidos [49]. Alguns destes compostos são conhecidos por causar toxicidade às células, através da geração de espécies reativas de oxigênio, capazes de promover danos a diferentes biomoléculas [50,51]. Outros têm sido utilizados como eficientes catalisadores para a oxidação de diferentes substratos [52,53]. Alguns destes compostos têm sido investigados também quanto à sua atividade antioxidante, isto é, como eficientes catalisadores da dismutação (ou desproporcionamento) de radicais superóxidos [54,55].

Estes compostos de cobre com ligantes do tipo base de Schiff são também modelos potenciais do sítio ativo de diversas proteínas e enzimas de cobre, que desempenham um

papel fundamental, especialmente em reações envolvendo o oxigênio e suas espécies reativas [53].

1.4 Interações de complexos de cobre com proteínas

Estudos de possíveis interações entre complexos metálicos e proteínas são extremamente úteis, visando o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas, baseado nas propriedades desses sistemas. Estes complexos, com íons com atividade redox, podem gerar danos oxidativos provocados por agentes oxidantes devido à ação catalítica dos metais, especialmente no sítio em que se coordenam. A oxidação de proteínas pode resultar em modificações em aminoácidos específicos, ligações cruzadas e clivagem das ligações polipeptídicas [56].

Os metais de transição promovem modificação oxidativa tanto em aminoácidos livres como em resíduos de aminoácidos em proteínas [57]. De maneira geral, os resíduos de Cys, His, Arg, Lys e Pro são os alvos principais. As sulfidrilas são comumente oxidadas a dissulfetos, que podem se transformar em sulfenos ou sulfonas. O imidazol da histidina pode ser oxidado a ácido aspártico, asparagina ou 2'-OH-His. A Arg é convertida em γ -semialdeído glutâmico; Lys em semialdeído-2-amino-adípico e Pro em ácido glutâmico, piroglutâmico ou γ -aminobutírico e γ -semialdeído glutâmico [58]. De acordo com Requena e colaboradores, os semialdeídos glutâmico e aminoadípico são os principais produtos carbonílicos da oxidação das proteínas glutamina sintase, BSA, RNase e lisozima, catalisada por metais [59].

A formação e os rearranjos de radicais intermediários decorrentes do processo de oxidação de moléculas de proteínas também resultam em fragmentação das ligações polipeptídicas e formação de ligações cruzadas intra- e inter-proteínas. Por causa disso, a proteína pode formar ligações cruzadas com o DNA [60].

A albumina é uma das proteínas mais estudadas, devido à sua utilidade, baixo custo, estabilidade e propriedades de ligação peculiares. A albumina humana (HSA) é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, com concentração entre 0,5-0,8 mM, e é responsável por inúmeros papéis importantes no sistema biológico, incluindo a ligação e o transporte de metais essenciais, terapêuticos e tóxicos [61, 62]. A albumina possui uma alta afinidade por vários ligantes, como ácidos graxos, aminoácidos, esteróides, xenobióticos, etc. A ligação do cobre na albumina tem sido bastante estudada devido ao seu papel no transporte de cobre e à característica da coordenação quadrado planar ou tetragonal do Cu(II) ao sítio N-terminal da proteína [62].

As albuminas são caracterizadas por conterem um número pequeno de resíduos de triptofano e metionina e um alto número de resíduos de cistina e de aminoácidos carregados, ácidos aspártico e glutâmico, lisina e arginina. O conteúdo de glicina e isoleucina é menor que a média encontrada em proteínas. Tanto a albumina bovina (BSA) quanto a humana (HSA) possuem apenas um resíduo de cisteína livre, a Cys34. Os outros formam 17 pontes dissulfeto ajudando a manter a estrutura terciária da proteína. A albumina bovina (BSA) possui 2 resíduos de triptofano, Trp134 e Trp212 e a humana (HSA) apenas um, Trp212 [63]. 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 a HSA. Comparativamente existe entre as albuminas bovina e humana uma seqüência homóloga de 76% da estrutura [63].

A Figura 7 mostra uma representação da estrutura da proteína HSA.

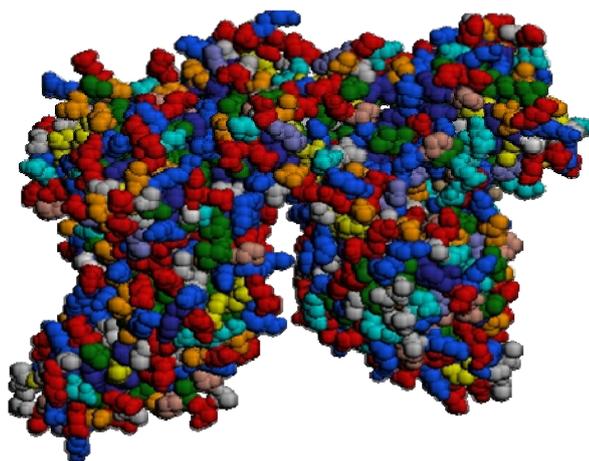


Figura 7. Representação da estrutura da albumina humana (HSA).

Ao incorporar íons metálicos, como o cobre, em sua estrutura, a proteína pode ser alvo importante de reações redox que podem levar à sua oxidação e/ou degradação, através de espécies reativas de oxigênio, com formação de grupos carbonílicos ou outros produtos provenientes da modificação oxidativa de resíduos de aminoácidos, clivagem de ligações específicas, ou ainda com formação de ligações cruzadas [64].

No caso de complexos de cobre estáveis, como as imina-cobre(II), seria interessante verificar como o ligante influi ou interfere nas interações do metal com a proteína. Quer-se saber se o ligante compete eficientemente pelo metal frente à proteína; se há sítios preferenciais na proteína para essa interação com o metal; se o ligante auxilia a degradação oxidativa da proteína ou, ao contrário, inibe a atividade redox do metal, protegendo a proteína.

Estudos anteriores na literatura mostram que tanto a albumina bovina quanto a humana apresentam uma seqüência N-terminal X-Y-His que constitui um forte sítio fisiológico de coordenação, específico para íons cobre(II). Esse sítio é estável, pois os 4 nitrogênios do tri-peptídeo amino-terminal formam uma forte coordenação quadrado planar com o metal [51,65].

Além do sítio N-terminal, estudos indicam que existe um segundo sítio não específico de coordenação para íons cobre(II) [66]. Esse segundo sítio foi descrito como sendo multi-metal, já que Zn(II), Ni(II) e Cd(II), também são capazes de se coordenarem a ele. Outros estudos mostraram que em pH alto (~9,0) um segundo íon de cobre(II) se liga à proteína numa conformação tetragonal, através de uma ligação tiolato, provavelmente pela desprotonação da Cys-34 [67].

1.5 Interações de complexos de cobre com DNA

A interação de complexos de metais de transição com DNA tornou-se muito importante, pois serve como modelo para o estudo de enzimas de restrição, para elucidar o papel de íons metálicos em nucleases naturais e para o desenvolvimento de agentes de diagnóstico ou terapêuticos em sistemas biológicos. Estes estudos estão relacionados com a replicação do DNA *in vivo*, mutação dos genes e mecanismos de ação de drogas cujo alvo seja o DNA [68, 69].

O DNA apresenta estrutura de dupla-hélice e as duas fitas do DNA se enrolam em torno do eixo das hélices. As deoxi-riboses ficam na parte externa em relação às bases nitrogenadas, e expostas ao meio aquoso. As bases estão pareadas entre as duas fitas, sendo responsáveis por manter a sua estrutura de dupla fita. As ligações glicosídicas no DNA, entre as deoxi-riboses e as bases nitrogenadas, não estão diretamente opostas na dupla-hélice, gerando duas cavidades desiguais em seu contorno. As duas cavidades (“grooves”) são denominadas cavidade maior e cavidade menor. Nessas cavidades, especialmente na maior, as bases estão expostas ao meio ou ao solvente e são quimicamente distinguíveis [70]. A Figura 8 mostra a estrutura da dupla-hélice do DNA, identificando as cavidades.

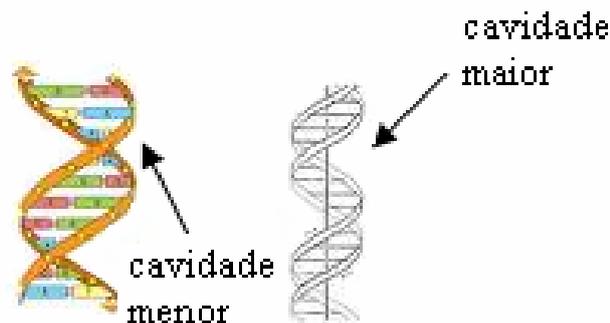


Figura 8. Estrutura da dupla-hélice do DNA.

A molécula de DNA, como possui grande quantidade de ânions fosfato e grupos doadores contendo oxigênio e nitrogênio, apresenta-se como uma molécula ideal para a ligação de cátions metálicos.

Os complexos de metais de transição caracterizados pela sua alta estabilidade, versatilidade estrutural e com propriedades espectroscópicas e redox únicas, têm sido amplamente explorados em estudos de ligação ao DNA, com o objetivo de desenvolver novas drogas com propriedades farmacológicas significativas, ou atuar como novos agentes de diagnóstico. Na maioria dos complexos estudados, os íons metálicos servem usualmente como um centro redox e os ligantes são responsáveis pelo reconhecimento do DNA. Os modos de reconhecimento são baseados nas interações eletrostáticas, por intercalação, por ligação às cavidades do DNA e/ou por ligações de hidrogênio [71].

Os complexos testados são geralmente compostos contendo grupos aromáticos condensados e com a presença de um resíduo hidrofóbico planar, que é um requisito essencial para a intercalação. Além disso, a capacidade dos complexos metálicos de formar ligações não-covalentes com polinucleotídeos também é considerada. A intercalação ocorre quando existe ligação dos compostos ao DNA através da inserção entre os pares de bases do polinucleotídeo, tornando-se estáveis por interações não-covalentes. O processo de intercalação pode produzir alterações profundas na estrutura secundária na cadeia dos nucleotídeos, com maiores conseqüências para a replicação e a transcrição do DNA. Em alguns casos de intercalação pode ocorrer um caminho seletivo, isto é, a intercalação ocorrer preferencialmente numa seqüência particular de bases [72]. Identificar esses sítios preferenciais tem sido um desafio para os químicos bioinorgânicos.

Os maiores efeitos oxidativos gerados por metais de transição no DNA são quebra das fitas, depurinização, ligações cruzadas e mutação nas bases [58]. A depurinização ocorre quando há liberação das bases. Neste mecanismo, estão envolvidas espécies reativas de oxigênio. Por exemplo, íons Cr(VI) e Cu(II) são capazes de liberar guanina e adenina,

respectivamente, da molécula de DNA. Na verdade, a depurinização ocorre simultaneamente com a quebra da fita do DNA e ambos os efeitos podem resultar do ataque do radical hidroxil ao açúcar do DNA [73]. As ligações cruzadas entre proteína e DNA são comuns de acontecer. Geralmente, os metais podem causar estas ligações por duas maneiras: através de interações de seus ligantes com as biomoléculas ou induzindo a formação de fortes ligações covalentes entre o DNA e a proteína.

A presença de H_2O_2 e de íons metálicos próximos ao DNA gera uma variedade de produtos devido ao ataque às quatro bases do DNA pelo radical hidroxil formado. Normalmente, a base mais atacada é a guanina, embora também sejam observados produtos de mutação resultantes de outras bases [74].

Existe um grande interesse no desenvolvimento de complexos que tenham alta afinidade pelo DNA e que sejam capazes de clivar sua dupla fita, servindo como potenciais agentes terapêuticos contra o câncer, doenças virais e ferramentas para a biologia molecular [75]. As clivagens causadas na dupla fita do DNA são mais letais para as células, pois são mais difíceis de serem refeitas pelos processos de reparação enzimática [76].

Muitos complexos metálicos com diferentes tipos de ligantes têm sido testados como potentes “nucleases químicas”, isto é, compostos capazes de clivar eficientemente o DNA [77, 78]. O cobre é um dos metais mais usados para este objetivo. Embora o ferro seja conhecido por catalisar danos oxidativos ao DNA, o cobre apresenta maior potencial já que sua reatividade frente a oxidantes como o peróxido de hidrogênio parece ser sítio-específica. Em geral os danos observados ocorrem exatamente no sítio de coordenação do cobre à biomolécula [74,79]. Em casos específicos de compostos de cobre, existem dois processos principais associados à clivagem do DNA: (i) processo oxidativo e (ii) processo hidrolítico. No mecanismo oxidativo, o íon cobre cicla entre as espécies Cu(II) e Cu(I) promovendo a formação de espécies radiculares, particularmente o radical hidroxil gerado pela interação com peróxido de hidrogênio, que causam a quebra das fitas do DNA [80]. No mecanismo hidrolítico, o átomo de cobre apresenta habilidade em gerar espécies nucleofílicas em pH neutro, que são capazes de atacar os grupos fosfatos das fitas do DNA, promovendo sua hidrólise ou clivagem [81].

A clivagem do DNA plasmidial superenrolado (

Figura 9a) pode ocorrer apenas em uma única fita do DNA. Como consequência, o DNA superenrolado (Forma I) abre formando um círculo aberto (Forma II), como mostra a

Figura 9b. A forma linear (Forma III) será observada apenas se houver a clivagem adicional da segunda fita de DNA (

Figura 9c).

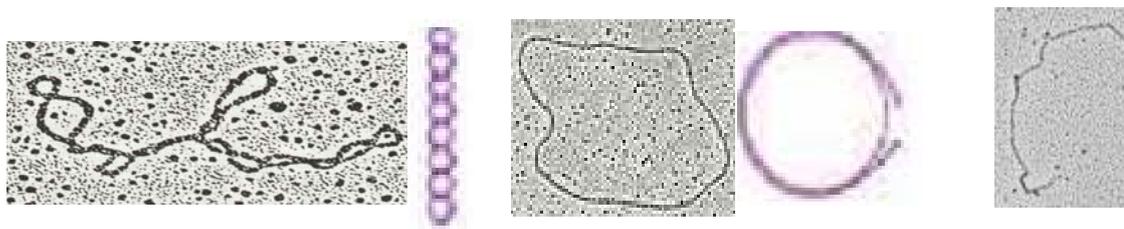


Figura 9. Diferentes formas de DNA: A) Forma I, superenrolado; B) Forma II, circular aberto; C) Forma III, linear.

Muitos complexos metálicos que clivam o DNA empregam o mecanismo oxidativo. Um composto comumente usado é o $[\text{Fe}(\text{edta})]$ [82,83]. Na presença de H_2O_2 ou O_2 e um agente redutor, o $[\text{Fe}(\text{edta})]$ cliva eficientemente tanto fita simples quanto fita dupla do DNA. Neste processo, os radicais hidroxil são produzidos através da reação de Fenton, onde a abstração de um átomo de hidrogênio do anel da deoxi-ribose e um rearranjo do anel do açúcar resultam na quebra da fita e na conseqüente liberação de uma base.

A bleomicina (blm), um antibiótico antitumoral, é um segundo agente de clivagem que requer Fe^{2+} e H_2O_2 ou O_2 na presença de um agente redutor para essa atividade nuclease, embora a bleomicina não produza radicais livres hidroxil [84,85].

Diversos complexos de cobre têm mostrado ser capazes de clivar o DNA. O primeiro a ser estudado e que mostrou eficiente atividade de clivagem do DNA foi o complexo $[\text{Cu}(\text{o-phen})_2]^{2+}$, sendo *o-phen* a 1,10-fenantrolina [86], através de um mecanismo muito similar aos dos compostos anteriormente citados. Como os compostos $[\text{Fe}(\text{edta})]$ e $\text{Fe}(\text{blm})$, o $[\text{Cu}(\text{o-phen})_2]^{2+}$ inicia a clivagem do DNA pela abstração do átomo de hidrogênio e requer H_2O_2 ou O_2 na presença de um agente redutor. Posteriormente, a química dos complexos metálicos com a 1,10-fenantrolina ou com ligantes derivados da fenantrolina tornou-se um atrativo para o desenvolvimento de novos agentes de diagnóstico ou terapêuticos, que pudessem reconhecer e clivar o DNA [87,88,89].

Numerosos outros ligantes têm sido complexados com íons cobre para promover a degradação oxidativa do DNA. Estes ligantes incluem 2,2'-bipiridina (bpy) [90] e vários ácidos hidroxâmicos [91]. Existem ainda outros tipos de ligantes, como por exemplo, ligantes do tipo imínicos [92,93]. Os quimioterápicos bases de Schiff continuam sendo de grande interesse para bioquímicos e farmacólogos [94]. As atividades antimicrobiana e antiproliferativa de complexos com cobre(II) com ligantes bases de Schiff não são atribuídas

somente ao centro metálico ou somente ao ligante coordenado [95], mas também às propriedades físico-químicas, estruturais e eletrônicas devido à coordenação.

As tiosemicarbazonas constituem também outro tipo de ligantes bastante estudados, formando complexos de cobre que interagem eficientemente com o DNA [96, 97, 98, 99]. Compostos deste tipo apresentam uma variedade de propriedades biológicas, dependendo do grupo aldeído ou cetona envolvidos. Nas últimas décadas, complexos de Cu(II) com piridina-2-carboxaldeído tiosemicarbazona têm atraído bastante atenção devido à suas propriedades biológicas relevantes, relacionadas aos efeitos citotóxicos contra células tumorais [100] e também devido à sua habilidade de se adsorver em eletrodos de ouro, que aumentam as reações redox do citocromo c [101].

As quinolonas são um grupo de agentes sintéticos antibacterianos, que contêm o esqueleto de 4-oxo-1,4-dihidroquinolina. Em geral, as quinolonas podem atuar como drogas antibacterinas que inibem efetivamente a replicação do DNA e são comumente usadas para o tratamento de muitas infecções [102]. Na literatura, complexos de cobre(II) de ciprofloxacina [103], cinoxacina [104] e ofloxacina [105] também têm sido estudados. Psomas e colaboradores [106] sintetizaram complexos de cobre mononucleares com ácido oxolínico (quinolona antibacteriana), na presença ou na ausência de ligantes heterocíclicos, como a 1,10-fenantrolina, 2,2'-bipiridina ou 2,2'-dipiridilamina. Entretanto, a atividade microbiana dos complexos foi menor em comparação com a atividade do ácido oxolínico livre.

Exemplos mais recentes incluem ligantes macrocíclicos simples [107], resíduos de aminoácidos [108,109] e até mesmo compostos dinucleares [110]. Vários compostos com dipeptídeos têm se mostrado potentes nucleases, apresentando ainda atividade antitumoral [108].

A habilidade de forte coordenação dos ligantes macrocíclicos e sua alta seletividade pelos metais de transição sempre gerou grande interesse nos químicos, devido à sua variedade de aplicações, tanto na área de catálise [111,112], em reações redox [113], como drogas antitumorais [114], como compostos modelos que mimetizam metaloproteínas [115] e metaloenzimas usadas como fotossensibilizadoras em terapia fotodinâmica [116]. Recentemente, a investigação da interação entre DNA e complexos macrocíclicos teve uma grande importância para a compreensão do mecanismo de ação de algumas drogas antitumorais e antivirais, e também para o desenvolvimento de novas drogas cujo alvo seja o DNA [117]. O complexo macrocíclico do tipo $[MLX_2]$, onde (M = Co(II) (**1**), Cu(II) (**2**), L = diquinolineno [1,3,7,9] tetraazaciclododecino-7, 15 (14H, 16H)-dibenzeno X = (Cl), apresentaram atividades antibacteriana e antifúngica apreciáveis [107].

Os compostos di e multinucleares também têm sido bastante utilizados como nucleases artificiais, já que os centros multinucleares de metais são frequentemente encontrados em nucleases naturais e os centros metálicos podem demonstrar efeito na ativação do O_2 e no reconhecimento do DNA [118,119,120,121,122]. Muitas enzimas que hidrolisam ligações fosfato e clivam seqüências de ácidos nucléicos possuem centros multinucleares de íons metálicos. Rossi e colaboradores sintetizaram um complexo dinuclear de Cu(II) que foi capaz de clivar DNA genômico e plasmidial através da hidrólise da ligação fosfato [123]. Esse composto apresentou ainda efeito citotóxico em células de carcinoma de pulmão da linhagem GLC4. Li e colaboradores prepararam complexos de cobre mono e dinucleares e verificaram que seus compostos dinucleares são mais seletivos na reação de oxidação da guanina do DNA [124]. Os complexos multinucleares com platina também interagem com o DNA, mas diferentemente dos compostos mononucleares de platina. Eles interagem predominantemente através dos átomos de oxigênio dos grupos fosfato do DNA [125].

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi estudar a atividade biológica de compostos de cobre, modulada por ligantes nitrogenados, especialmente sua possível interação com biomoléculas como proteínas e DNA, e suas implicações em processos oxidativos ou degradativos. Para isso, complexos de cobre(II) com ligantes que apresentem similaridade estrutural à de compostos naturais com atividade biológica relevante, particularmente derivados imínicos de indóis e oxindóis, foram sintetizados.

Os estudos também visaram a caracterização dos complexos isolados, através de diferentes técnicas: análise elementar, espectrometria ESI-MS e, especialmente, técnicas espectroscópicas (UV/Vis, IV, EPR), e a investigação de suas propriedades redox, verificando-se sua possível atividade catalítica em reações com peróxido de hidrogênio, glutatona e ascorbato, agentes oxidantes ou redutores presentes no meio biológico. Além disso, foram feitos estudos da interação desses compostos com a proteína HSA (albumina humana), a 2-deoxi-D-ribose, o DNA e o RNA, visando detectar possíveis sítios de ligação e possíveis danos e/ou modificações causados nestas biomoléculas por este tipo de composto, importantes para compreender melhor sua reatividade pró-apoptótica e antitumoral, já verificadas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

PARTE I - Síntese, Caracterização e Estudos de Equilíbrio

I - 3.1. Reagentes e Soluções

Os reagentes: isatina (98%, grau de pureza), 2-(2-aminoetil)piridina (95%), perclorato de cobre(II) hexahidratado (98%), 4(5)imidazolcarboxialdeído foram de procedência da Aldrich Chemical Co. O reagente 2-pirrolcarboxialdeído foi obtido da Alfa Aesar, enquanto a amina etilenodiamina (99%) e os solventes etanol (96 %), etanol absoluto (99%), metanol absoluto (99%), diclorometano (99%) e o ácido clorídrico foram obtidos da Merck Chemical Co. O DNA “Calf thymus” (CT-DNA) na forma de sal de sódio e a albumina humana (HSA) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Os nucleotídeos utilizados foram de procedência da Across.

A água para preparo de todas as soluções foi deionizada, purificada em aparelho Barnstead, modelo D470. O sistema deionizador é formado por um conjunto em circuito de 4 filtros cilíndricos, contendo resina de troca iônica para captura de íons e carvão ativado para captura de material orgânico.

I – 3.2. Sínteses

As sínteses dos complexos imínicos foram desenvolvidas a partir de metodologias já conhecidas, baseadas em reações de condensação para a formação de iminas descritas na literatura [126]. Em todos os casos foram feitas modificações adequadas, de acordo com as sínteses realizadas anteriormente em nosso laboratório [42,127].

I – 3.2.1. Composto [Cu(isaepy)H₂O]ClO₄; Composto 1

Dissolveu-se isatina (736 mg, 5 mmol) em etanol e diclorometano (25 mL de cada). Adicionou-se lentamente 2-(2-aminoetil)piridina (598 µL, 5 mmol) dissolvida em etanol à solução de isatina. Em seguida, ajustou-se o pH em 5,5 com gotas de HCl concentrado, mantendo-se sob agitação constante por 24 horas. Após isso, adicionou-se lentamente perclorato de cobre(II) (1,85 g, 5 mmol) dissolvido em 5 mL de etanol, ajustando o pH para 7,5 – 8,0 com solução de NaOH concentrado. Um fino precipitado marrom foi obtido e a reação foi então mantida por 12 horas. A seguir a solução foi concentrada no rotoevaporador.

O precipitado foi filtrado e lavado com etanol e éter etílico gelados. Secou-se o composto de cobre(II) obtido em dessecador, sob pressão reduzida.

I – 3.2.2. Composto [Cu(enim)H₂O](ClO₄)₂; Composto 3

Adicionou-se 4(5)-imidazolcarboxialdeído (192 mg, 2 mmol) dissolvido em 15 mL de metanol e etilenodiamina (134 µL, 2 mmol) destilada, também dissolvida em 15 mL de metanol. A reação foi mantida sob agitação constante, à temperatura de 55°C e o pH aparente medido foi de 10. Após 4 horas, adicionou-se 2 mmol (741 mg) de perclorato de cobre (II). A solução ficou azul intensa e a reação foi mantida por mais 2 horas à temperatura ambiente. Resfriou-se o sistema em banho de gelo, filtrou-se e lavou-se o precipitado formado com metanol e éter etílico gelados.

I – 3.2.3. Composto [Cu(isaenim)](ClO₄)₂; Composto 4

Primeiramente o composto (3) [Cu(enim)H₂O](ClO₄)₂ foi sintetizado, em metanol sob aquecimento, como descrito anteriormente. Após 4 horas de reação, adicionou-se 2 mmol (294 mg) de isatina dissolvida em 15 mL de metanol. O pH medido após adição da isatina foi de 5,5, sendo que a solução ficou verde e a reação foi mantida por 24 horas, à temperatura ambiente. Resfriou-se o sistema em banho de gelo, filtrou-se e lavou-se o precipitado marrom esverdeado formado com metanol e éter etílico gelados. Em outras tentativas de síntese, a adição da isatina também foi feita em etanol, obtendo-se o mesmo valor de pH durante a reação e a mesma coloração da solução; no entanto, neste caso o produto obtido foi marrom alaranjado.

I – 3.2.4. Composto [Cu(pyrpn)]; Composto 5

Adicionou-se 2-pirrolcarboxialdeído (190 mg, 2 mmol) dissolvido em 15 mL de metanol e 1,3 diaminopropano (83 µL, 1 mmol) destilado, também dissolvido em 15 mL de metanol. A reação foi mantida sob agitação constante à temperatura de 55°C, durante 2 horas. Após 1 hora de reação, a solução tornou-se amarela escura e o pH aparente era 8,5. Após a adição de 1 mmol (370 mg) de perclorato de cobre(II), também em metanol, obteve-se um precipitado marrom avermelhado. Resfriou-se o sistema em banho de gelo, filtrou-se e lavou-se o precipitado com metanol e éter etílico gelados.

O **composto 2** $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ e o **composto 6** $[\text{Cu}(\text{isapn})]$ já haviam sido sintetizados anteriormente em nosso laboratório e agora apenas repetimos suas sínteses, constatando tratar-se dos mesmos compostos [42]. Esses compostos foram utilizados, pois causaram mais danos biológicos, afetando a viabilidade celular [39]. O **composto 7** $[\text{Cu}(o\text{-phen})_2](\text{ClO}_4)_2$ já havia sido sintetizado em nosso laboratório, segundo método da literatura [128].

I – 3.3. Instrumentação e Métodos de Caracterização

I – 3.3.1. Análise Elementar

As análises elementares CNH foram feitas na Central Analítica do Instituto de Química, usando um Analisador Elementar CNH Perkin-Elmer 2400, que permite a determinação de porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio com precisão de 0,01%. Resultados com reprodutibilidade dentro de 0,5 a 1% são aceitáveis.

I – 3.3.2. Espectroscopia na Região do Ultravioleta/Visível (UV/Vis)

Os espectros eletrônicos na região de Ultravioleta/Visível (UV/Vis) foram registrados em espectrofotômetro UV-1650PC da Shimadzu, a partir de soluções em água ou DMSO: água (1:9) dos compostos, em concentração de 10^{-5} a 10^{-3} mol.L⁻¹, utilizando cubetas de quartzo de caminho ótico de 1,00 cm.

A absorvidade molar (ϵ , mol⁻¹ L cm⁻¹) característica dos compostos, a cada comprimento de onda máximo, foi obtida a partir dos coeficientes angulares dos gráficos de absorção *versus* concentração da espécie (em faixas de comprimentos de onda onde havia absorção dos complexos). Foram empregadas soluções com concentração inicial de 1,5 mM, fazendo-se as devidas diluições, de modo a obter pontos onde a absorção variasse de 0,1 a ~1, para o valor máximo das bandas existentes. Este mesmo procedimento também foi realizado com os espectros obtidos para alguns reagentes utilizados nas sínteses.

I – 3.3.3. Espectroscopia na região do Infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro ABB BOMEM, modelo MB com transformada de Fourier, por reflectância

difusa, na faixa de 400 – 4000 cm^{-1} . As amostras foram maceradas em KBr, previamente seco a 120°C.

I – 3.3.4. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

Os espectros de EPR foram registrados no espectrômetro da BRUKER, modelo EMX, operando na banda X ($\nu = 9,33$ GHz) com potência de 20 mW, equipado com uma cavidade Dewar para baixas temperaturas (77 K), usando tubos de quartzo, da marca Wilmad, de 4 mm de diâmetro interno. As medidas dos compostos de cobre foram feitas a baixas temperaturas (77 K) no estado sólido e em soluções, com concentrações de 1 –3 mM em etanol, metanol ou em solução metanol:H₂O (1:1). DPPH (α , α' -difenil- β -picrilhidrazil) foi usado como calibrador de frequência para todas as amostras.

I – 3.3.5. Espectrometria de Massa

Os espectros de espectrometria de massa com ionização por *electrospray*, ESI-MS, foram obtidos na Central Analítica do IQ-USP, em equipamento Squire 3000 Plus da Bruker Daltonics. Todos os espectros foram obtidos por *electrospray* de modo positivo.

I – 3.4. Estudos de Equilíbrio

Foram feitos estudos de equilíbrio para o composto [Cu(isaenim)](ClO₄)₂ (**4**) através de espectroscopia EPR e UV/Vis. Durante estes experimentos, onde os valores de pH foram ajustados, foram usadas quantidades apropriadas de soluções de HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M, e o valor de pH foi monitorado com pHmetro Digimed, acoplado a eletrodo de vidro. O pH foi calibrado em valores baixos (soluções ácidas) e em valores altos (soluções básicas), de acordo com o uso, utilizando soluções tampões da Synth, pH (7,0 \pm 0,05), (4,0 \pm 0,05) e (10,0 \pm 0,05).

I – 3.4.1. Estudos de Equilíbrio através de Espectroscopia EPR

Os espectros de EPR do complexo (**4**) em solução de metanol:água (1:1, v:v), com concentração de 1,70 mM, foram registrados após cada adição de 1 μL de HCl 0,1 M ou 1 M,

ou 1 μL de NaOH 0,1 M ou 1 M. Os espectros foram obtidos a baixa temperatura (77K), com soluções congeladas.

I – 3.4.2. Estudos de Equilíbrio através de Espectroscopia UV/Vis

As mudanças no espectro eletrônico a diferentes valores de pHs foram também monitoradas espectroscopicamente, a 25°C, baseado no método de Patterson [129]. Preparou-se uma solução 0,15 mM (3 mL) do composto **(4)** em água e na cubeta da amostra foram adicionados 1 μL de HCl 0,1 M ou 1 M, ou 1 μL de NaOH 0,1 M ou 1 M. Após cada adição de ácido ou base, um espectro UV/Vis foi registrado na região de 190 – 1100 nm. Os valores de pK_a foram determinados através do gráfico do $\log ((A - A_f)/(A_0 - A))$ versus pH, como descrito anteriormente [129].

3. PARTE EXPERIMENTAL

PARTE II - *Implicações em Processos Biológicos*

II – 3.1. Espectros EPR dos Complexos de Cobre em presença de Albumina Humana ou Plasma Humano

Medidas de EPR foram feitas para verificar a interação dos complexos de cobre(II) com albumina e com plasma sanguíneo. As condições experimentais utilizadas foram: [HSA] = 0,60 mM; [CuL] = 600 μ M; tampão fosfato 50 mM pH = 7,4; plasma sanguíneo isolado de sangue coletado após 12 horas de jejum; T = 77K. O plasma sanguíneo usado foi doado pela própria orientadora.

Todas as medidas foram feitas seguindo o mesmo procedimento, a mistura reacional foi agitada e uma alíquota foi retirada e imediatamente 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 15 minutos até completar 2 horas, tanto para o plasma sanguíneo como para albumina (HSA). Porém, após 30 min não foram mais observadas modificações.

Além dessa proporção (1:1), também foram feitas medidas de EPR na presença de maior concentração de compostos de cobre, com proporção [HSA]:[CuL] de 1:3. As condições experimentais utilizadas foram: [HSA] = 300 μ M; [CuL] = 900 μ M; tampão fosfato 50 mM pH = 7,4. Neste caso, a mistura reacional foi incubado a 37,0°C por 30 minutos.

II – 3.2. Interação dos Complexos de Cobre(II) com Proteína através de SDS-PAGE

Estes experimentos foram realizados para verificar a possível interação dos complexos de cobre(II) com outras proteínas do plasma, além da albumina. As concentrações iniciais foram: [CuL] = 1,5 mM; [HSA] no plasma = 0,60-0,70 mM. Utilizou-se ($V_{\text{final}} = 10\mu\text{L}$) no eppendorff : plasma = 1,0 μL ; CuL = 7,0 μL ; azul de bromofenol = 1,0 μL ; SDS = 1,0 μL . O marcador de peso molecular utilizado foi o SDS-PAGE standards – Broad Range da Bio-Rad, com faixa de 7 a 201 KDa. Este experimento SDS-PAGE foi realizado de acordo com o método de Laemmli [130].

No eppendorff adicionou-se plasma + solução de 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 e aplicaram-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 Brilliant Blue R-250, por 30 minutos. O gel foi então descorado com solução de metanol:ácido acético (30%:10%) e seco para determinação das bandas.

II – 3.3. Estabilidade Termodinâmica dos complexos de cobre: Medidas de Dicroísmo Circular

As medidas foram efetuadas em um espectropolarímetro JASCO J-720, no intervalo de 300 a 650 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo esférica de 1,00 cm de caminho óptico. Todas as medidas foram feitas a 25°C, com velocidade de leitura de 200 nm/min e tempo de resposta de 1s. Foram adicionadas alíquotas sucessivas de solução de cada um dos complexos de cobre(II) (0 a 1,2 mM) a uma solução de albumina 0,70 mM, em tampão fosfato 50 mM e pH =7,4. Após cada adição do complexo de cobre(II) o respectivo espectro de CD foi registrado. Utilizou-se como controle uma solução do aqua-complexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$.

II – 3.4. Modificação na Estrutura Secundária da HSA monitorada por medidas de Dicroísmo Circular

Neste estudo, utilizou-se novamente a espectroscopia de dicroísmo circular. Entretanto, neste caso utilizou-se uma cubeta de quartzo esférica de 0,10 cm e o espectro foi registrado no intervalo de 190 a 300 nm, à temperatura ambiente. Os espectros foram coletados com velocidade de leitura de 200 nm/min e tempo de resposta de 1s. Cada espectro foi feito com acúmulo de 3 varreduras. As reações foram feitas em eppendorff, utilizando concentrações de $8,0 \times 10^{-7}$ a $4,5 \times 10^{-5}$ M dos complexos de cobre(II) em solução de albumina $1,5 \times 10^{-5}$ M, em tampão fosfato: NaCl (50 mM:0,1M) e pH = 7,4. Os resultados são expressos em elipsicidade residual (θ), em $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ que é definido como:

$$\theta = \frac{\text{CD (mdeg)}}{10 \times n \times l \times C_p}$$

onde CD é o valor obtido em miligraus, n é o número de resíduos de aminoácidos que no caso da albumina humana é 585, l é caminho ótico da cubeta e C_p é a concentração da proteína [131].

II – 3.5. Fluorescência dos Complexos de Cobre(II) na Presença de Glutathione (GSH)

As medidas de fluorescência foram realizadas utilizando-se um espectrofluorímetro (SPEX-fluorolog 2), com cubetas de caminho óptico igual a 1,000 cm, com todas as faces de quartzo transparentes.

As medidas de fluorescência foram feitas para verificar a estabilidade dos complexos de cobre frente a um agente redutor como a glutathione, presente em grandes concentrações nas células (~3 mM).

As soluções dos complexos de cobre(II) $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ foram preparadas em água e o composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$ foi preparado em solução de DMSO:água (1:9, v/v). As condições experimentais foram: $[\text{CuL}] = 0,50$ mM; $[\text{GSH}] = 10$ mM, em tampão fosfato 50 mM e pH = 7,4.

As amostras contendo os complexos de cobre(II) na presença e na ausência de glutathione (GSH) foram excitadas utilizando-se o comprimento de onda 336 nm. As amostras foram excitadas após 5 minutos da adição da glutathione. Os espectros foram registrados na faixa de 500 a 750 nm, monitorando-se a emissão característica de complexos de cobre(I)-tiolato, em torno de 650 nm [132].

II – 3.6. Geração de Radicais Livres e Detecção por EPR

Neste estudo, utilizou-se novamente a técnica de EPR, com captação de spin, buscando-se alguma diferença nas características intrínsecas dos complexos que influísse na geração dos radicais hidroxil e radicais de carbono, em presença de peróxido de hidrogênio, e de radical ascorbil, em presença de íons ascorbato.

Utilizou-se o radical estável TEMPOL (ou 4-hidroxi-2, 2, 6, 6-tetrametil-1-piperidiloxi) como padrão para se avaliar quantitativamente a produção de radicais, à temperatura ambiente. Para este cálculo utilizou-se o programa WinEPR, da Bruker, usando integração dupla.

Para captação de radicais de oxigênio e de carbono, utilizou-se o DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido), e os compostos foram comparados na sua capacidade de geração de espécies radicalares, quando submetidos a um meio com peróxido de hidrogênio. O experimento foi realizado em duas condições experimentais diferentes: [DMPO] = 100 mM, [H₂O₂] = 5 mM, [CuL] = 375 μM e [DMPO] = 100 mM, [H₂O₂] = 2,5 mM, [CuL] = 100 μM, todas em tampão fosfato 50 mM e pH = 7,4.

O experimento com ascorbato foi realizado na proporção 1:1 de [CuL]:[ascorbato], sendo: [CuL] = [ascorbato] = 1,50 mM, em tampão fosfato 50 mM e pH = 7,4.

II – 3.7. Geração de Radicais Livres e Detecção por EPR em Presença de HSA

O experimento anterior foi novamente realizado, no entanto, agora na presença de HSA para avaliar danos radicalares que provavelmente ocorram com a proteína. As condições experimentais utilizadas foram:

- 1) [DMPO] = 100 mM, [H₂O₂] = 5 mM, [CuL] = 0,375 mM, [HSA] = 0,625 mM;
- 2) [DMPO] = 100 mM, [H₂O₂] = 5 mM, [CuL] = 0,375 mM, [HSA] = 0,25 mM e
- 3) [DMPO] = 100 mM, [H₂O₂] = 5 mM, [CuL] = 0,375 mM, [HSA] = 0,125 mM.

Também utilizou-se o radical estável TEMPOL de concentração 36 μM (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiloxi) como padrão, para quantificar a produção de radicais, à temperatura ambiente. Também neste caso utilizou-se integração dupla, no programa WinEPR da Bruker.

II – 3.8. Danos Carbonílicos à Albumina na Presença de Complexos de Cobre(II)

O procedimento experimental foi baseado em protocolo descrito na literatura e utilizado em diversos artigos [133,134]. As condições experimentais utilizadas para este estudo foram: [H₂O₂] = 750 μM; [HSA] = 75 μM; [CuL] = 75 μM (concentração estequiométrica de cobre); [H₂O₂] = 30 μM; [HSA] = 75 μM; [CuL] = 10 μM (concentração catalítica de cobre). Ambas as condições foram realizadas em tampão fosfato 50 mM e pH = 7,4. As amostras foram incubadas a 37°C, por 30 minutos. Adicionou-se então a todas as amostras 1 mL de solução DNPH (dinitrofenil-hidrazina) (0,1 M em HCl 1 M) e incubou-se por mais 30 minutos, à mesma temperatura. As amostras foram retiradas do banho e, depois de resfriadas, foram adicionados 1,5 mL de NaOH 1 M. Após 5 minutos mediu-se a absorvância em 370 nm, correspondente ao máximo de absorção de uma possível dinitrofenil-hidrazona formada.

II – 3.9. Experimentos de clivagem com a proteína HSA

Estes experimentos foram realizados para verificar possíveis clivagens na proteína causadas pelos diferentes complexos de cobre(II), tanto em presença como na ausência de peróxido de hidrogênio. As concentrações finais utilizadas foram: $[CuL] = 45 \mu M$; $[HSA] = 45 \mu M$ ou $[CuL] = 75 \mu M$; $[HSA] = 75 \mu M$; $[H_2O_2] = 750 \mu M$. Ambas as condições foram realizadas em tampão fosfato 50 mM e $pH = 7,4$. As amostras foram incubadas por 30 min, a $37^\circ C$, em cada caso. Após a incubação, adicionou-se 1,0 μL SDS (10%) e 1,0 μL de azul de bromofenol. O marcador de peso molecular utilizado foi o SDS-PAGE standards – Broad Range da Bio-Rad com padrões na faixa de 7 a 201 KDa. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE, de acordo com o método de Laemmli [130].

II – 3.10. Danos oxidativos à 2-deoxi-D-ribose em presença de complexos de cobre

Os danos oxidativos à 2-deoxi-D-ribose foram avaliados através do método TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico), monitorando-se a formação de um cromóforo vermelho resultante, análogo ao formado com malonaldeído [135]. As reações foram realizadas em tampão fosfato 50 mM e $pH 7,4$, contendo 2,50 mM de 2-deoxi-D-ribose, 1 ou 2 mM de H_2O_2 e complexos de cobre(II) na faixa de 25 a 100 μM , em um volume final de 1 mL. As reações utilizadas como controle foram realizadas: A) sem a presença dos compostos de cobre ou B) sem adição do peróxido de hidrogênio. A seguir, as soluções finais foram incubadas por 1 hora, a $37^\circ C$. Após a incubação, procedeu-se à segunda etapa que é a análise do processo, onde se adicionou 1 mL de ácido tiobarbitúrico 1% (w/v) à solução de reação, seguida de aquecimento a $100^\circ C$, por 15 min. Após o resfriamento à temperatura ambiente, mediu-se a absorvância a 532 nm ($\epsilon = 1,36 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$). Todos os experimentos foram realizados pelo menos em duplicata [136].

II – 3.11. Clivagem do DNA em presença de complexos de cobre

Primeiramente realizou-se a transformação das bactérias com o plasmídeo pBluescript II de 2961 pares de bases (Stratagene). Após esta etapa, o DNA plasmidial foi extraído e purificado usando um “kit” de purificação da Qiagen. A concentração de DNA plasmidial obtida foi de 76 ng/ μL , que foi determinada pela intensidade de absorção em 260 nm, com valor de coeficiente de absorvância molar conhecida de $6600 M^{-1} cm^{-1}$ [137]. As amostras reacionais (20 μL volume total) contendo 240 ng de DNA superenrolado (Forma I), 50 mM

tampão fosfato (pH 7.4), em presença ou ausência de 120 μM de H_2O_2 e com diferentes concentrações de complexos de cobre(II), na faixa de 1 a 50 μM , foram incubadas a 37 $^\circ\text{C}$, variando-se o tempo de incubação. Após a incubação, adicionaram-se 4 μL de tampão de amostra para DNA e as amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%), em tampão TAE 1X à 100 V, por 2 h.

II – 3.12. Monitoramento de interações dos complexos com DNA, através de espectroscopia UV/Vis

As soluções dos complexos de cobre(II) (20 μM) foram tituladas com quantidades crescentes de DNA (0 a 0.15 μM) na ausência e na presença de H_2O_2 (80 μM), em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4). Os correspondentes espectros UV/Vis foram registrados, na faixa de 200 a 600 nm, com o objetivo de verificar possíveis interações com o DNA, especialmente intercalação entre as fitas.

II – 3.13. Monitoramento de interações dos complexos com DNA, através de medidas de Fluorescência

As medidas de fluorescência foram realizadas utilizando-se um espectrofluorímetro (SPEX-Fluorolog 2), com cubetas de caminho óptico igual a 1,000 cm, com todas as faces de quartzo transparentes. O comprimento de onda de excitação utilizado foi $\lambda_{\text{ex}} = 492$ nm e a fluorescência emitida foi medida em aproximadamente 620 nm. Todos os experimentos foram realizados em tampão fosfato 50 mM contendo 0,1 M de cloreto de sódio, em pH = 7,4. O NaCl é utilizado para evitar uma segunda fixação do brometo de etídeo (EB) aos sítios do DNA [138].

O DNA plasmidial foi extraído e purificado usando um “kit” de purificação da Qiagen, após a transformação das bactérias com o plasmídeo pBluescript II de 2961 pares de bases (Stratagene). A concentração de DNA plasmidial obtida foi de 100 ng/ μL , que foi determinada pela intensidade de absorção em 260 nm.

A concentração de DNA no experimento foi de 0,001 mg/mL. O espectro de emissão do brometo de etídeo (EB), na ausência e na presença de DNA, foi registrado variando-se a concentração na faixa de 0,4 a 22 μM . Esta variação de concentração do EB foi realizada para verificar o ponto de saturação de moléculas de brometo de etídeo nos sítios do DNA. A concentração de saturação utilizada foi de 2 μM ou 0,79 $\mu\text{g/mL}$. Após as concentrações de

DNA e EB terem sido estabelecidas, o estudo de fluorescência foi realizado com o aumento das concentrações dos compostos de (1) a (4), variando de 0,6 a 60 μM . Os espectros foram registrados à temperatura ambiente, após 10 minutos da adição dos compostos.

Nestes experimentos foi utilizado como controle o composto de cobre $[\text{Cu}(\text{phen}_2)^{2+}]$ que é muito usado na literatura, pois foi o primeiro composto de cobre a ser estudado que mostrou eficiente atividade nuclease, isto é, de clivagem do DNA [86].

A pureza do DNA “Calf thymus” (CT-DNA) foi verificada através da razão da absorbância em 260 e 280 nm, onde foi encontrado um valor de 1,86, em tampão fosfato 50 mM e pH = 7,4. Como o valor encontrado foi maior que 1,8; isto indica que o DNA está suficientemente livre de proteína [137].

Experimentos com o CT-DNA foram também realizados com o composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ para comparar com os dados obtidos com o DNA plasmidial. A concentração de DNA nestes experimentos foi de 3,2 μM . O espectro de emissão do EB, na ausência e na presença de DNA, foi registrado variando-se a concentração na faixa de 10 a 127 μM . Esta variação de concentração do EB foi realizada para verificar o ponto de saturação de moléculas de brometo de etídeo nos sítios do DNA. A concentração de saturação utilizada foi de 51 μM . Após as concentrações de DNA e EB terem sido estabelecidas, o estudo de fluorescência foi realizado com o aumento das concentrações do composto (3), variando de 2 a 120 μM . Os espectros foram registrados à temperatura ambiente, após 10 minutos da adição dos compostos.

II – 3.14. Monitoramento de interações dos complexos com o DNA, através de Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos à temperatura ambiente com uma cubeta de 0,1 cm. A concentração de DNA Calf-Thymus utilizada foi de 800 μM e os espectros foram registrados na ausência e na presença de 10 a 120 μM dos complexos $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ na região entre 220 e 300 nm.

II – 3.15. Cromatografia de camada fina (TLC) com nucleotídeo marcado com $^*P^{32}$

A placa de cromatografia de camada fina ou delgada (TLC) utilizada neste experimento foi a de polietilenoimina e o eluente utilizado foi uma solução contendo 0,8 M de cloreto de lítio e 0,8 M de ácido acético. As imagens foram obtidas em instrumento “phosphoimager”,

no laboratório da Profa. Carla Columbano de Oliveira, em colaboração com a Dra. Juliana da Silva Luz.

As amostras reacionais (10 μL volume total) contendo 50 μM de CuL, 120 μM de H_2O_2 , 50 mM tampão fostato (pH 7.4), em presença fósforo marcado (radioativo), $\alpha - ^{32}\text{P} - \text{UTP}$ (1 μCi), foram incubadas a 37 $^\circ\text{C}$, por 30 min. As concentrações utilizadas e o tempo de incubação foram os mesmos utilizados no experimento de clivagem do DNA.

II – 3.16. Gel de Poliacrilamida com oligômeros de RNA ou DNA

O gel utilizado nestes experimentos foi o de poliacrilamida 8%, desnaturante ou nativo, com oligômeros de RNA contendo 21 nucleotídeos ou de DNA, ambos marcados no fósforo 5' com $\gamma - ^{32}\text{P} - \text{dATP}$ através da enzima kinase. Todas as imagens foram obtidas em instrumento “phosphoimager”.

As amostras reacionais (20 μL volume total), nestes experimentos com oligômeros de RNA, em gel nativo, contendo 25 ou 50 μM de CuL, 120 μM de H_2O_2 , 50 mM tampão fosfato (pH 7,4) e em presença de oligo de RNA marcado, foram incubadas a 37 $^\circ\text{C}$, por 30 min.

As amostras reacionais (20 μL volume total), nos experimentos com oligômeros de DNA em gel desnaturante, continham 25 ou 50 μM de CuL, 120 μM de H_2O_2 , 50 mM tampão fosfato (pH 7,4), em presença de oligômeros de DNA marcado, e também foram incubadas a 37 $^\circ\text{C}$, por 30 min.

No experimento com oligômeros de RNA em gel desnaturante, as amostras reacionais (20 μL volume total) contendo 25, 50, 100 ou 200 μM de $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, 120 μM de H_2O_2 , 50 mM tampão fosfato (pH 7,4), em presença de oligo de RNA marcado, também foram incubadas a 37 $^\circ\text{C}$, por 30 min.

II – 3.17. Espectros EPR de soluções de complexos de cobre com DNA e suas Bases

Medidas de EPR foram feitas para verificar se ocorre a interação dos complexos de cobre(II) com DNA. Nestes experimentos utilizou-se o DNA Calf-Thymus e os nucleotídeos (base+ açúcar + monofosfato): guanosina 5'-monofosfato, citidina 5'-monofosfato, adenosina 5'-monofosfato e uridina 5'-monofosfato.

As proporções DNA e CuL utilizadas nos experimentos foram de 1:1 e 3:1. As condições experimentais utilizadas no experimento foram: $[\text{DNA}] = 300 \mu\text{M}$; $[\text{CuL}] = 300$

μM ; tampão fosfato 50 mM e $\text{pH} = 7,4$. Para a proporção de 3:1, foram utilizadas as seguintes concentrações: $[\text{DNA}] = 1,20 \text{ mM}$; $[\text{CuL}] = 300 \mu\text{M}$; tampão fosfato 50 mM e $\text{pH} = 7,4$.

As proporções de nucleotídeo e CuL utilizadas no experimento também foram de 1:1 e 1:3. Na proporção de 1:1, foram utilizadas as seguintes concentrações: $[\text{Base}] = 600 \mu\text{M}$; $[\text{CuL}] = 600 \mu\text{M}$; tampão fosfato 50 mM e $\text{pH} = 7,4$. Para a proporção de 1:3, foram utilizadas as seguintes concentrações: $[\text{Base}] = 600 \mu\text{M}$; $[\text{CuL}] = 3 \text{ mM}$; tampão fosfato 50 mM e $\text{pH} = 7,4$.

Em todos esses experimentos adicionou-se etilenoglicol (na proporção 1:1 v/v), que é usado para melhorar o sinal do EPR em amostras aquosas. As misturas reacionais foram incubadas por 12 horas, à temperatura ambiente, antes das medidas espectroscópicas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE I - Síntese, Caracterização e Estudos de Equilíbrio

I - 4.1. Síntese e Caracterização

Todos os complexos de cobre em estudo foram preparados com pureza adequada, conforme os dados analíticos e espectroscópicos obtidos.

A análise elementar para o composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$ (**1**) mostrou o percentual experimental de 40,82 %C; 3,25 %H e 8,82 %N, enquanto que o percentual calculado para carbono, hidrogênio e nitrogênio foi de 41,78 %C; 3,25 %H e 9,70 %N. Este resultado está dentro do intervalo de precisão aceitável ($\leq 1\%$).

A síntese do composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ (**3**) foi acompanhada por cromatografia em camada delgada CCD (ou TLC = thin layer chromatography), com placas de vidro recoberto com sílica gel, usando etanol como eluente; e além disso, um espectro eletrônico foi obtido antes da adição do cobre para comprovar a condensação dos precursores, formando o ligante. O percentual calculado para carbono, hidrogênio e nitrogênio foi de 17,20 %C; 2,87 %H e 13,38 %N, enquanto os valores experimentais foram de 18,11 %C; 2,32 %H e 13,38 %N.

A síntese do composto $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$ (**4**) foi efetuada a partir da preparação do composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$, seguida da condensação com o oxindol. Após a adição da isatina, o pH baixou para 5,5, sendo portanto uma boa indicação que a imina estava se formando devido à liberação de íons H^+ durante a formação da ligação $\text{C}=\text{N}$ entre o grupo carbonílico do oxindol e o grupo amina ainda livre do ligante já coordenado ao cobre. O percentual calculado para carbono, hidrogênio e nitrogênio foi de 31,70 %C; 2,45 %H e 13,20 %N. E o percentual experimental foi de 31,73 %C; 2,54 %H e 12,75 %N. Os resultados obtidos para o produto marrom alaranjado obtido com a mesma síntese, porém utilizando o etanol como solvente, também foram coerentes com os valores esperados.

A análise elementar para o composto $[\text{Cu}(\text{pyrpn})]$ (**5**) mostrou os percentuais experimentais de 53,83 %C; 5,02 %H e 18,21 %N, enquanto que os respectivos valores calculados para carbono, hidrogênio e nitrogênio foram de 53,89 %C; 4,87 %H e 19,34 %N, considerando a fórmula mínima $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{Cu}$.

A análise elementar para o composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (**2**) mostrou os percentuais experimentais de 45,73 %C; 3,48 %H e 10,21 %N, enquanto que os respectivos valores calculados para carbono, hidrogênio e nitrogênio foram de 44,98 %C; 3,76 %H e 10,45 %N,

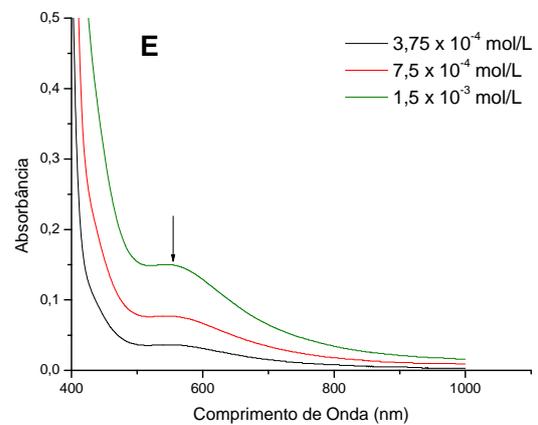
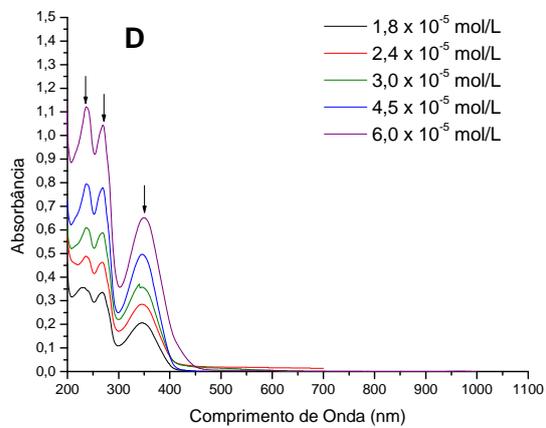
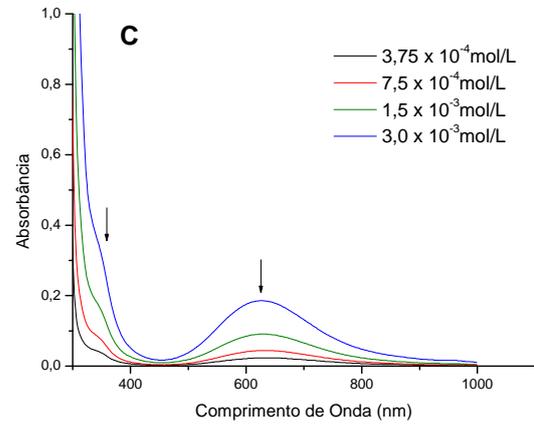
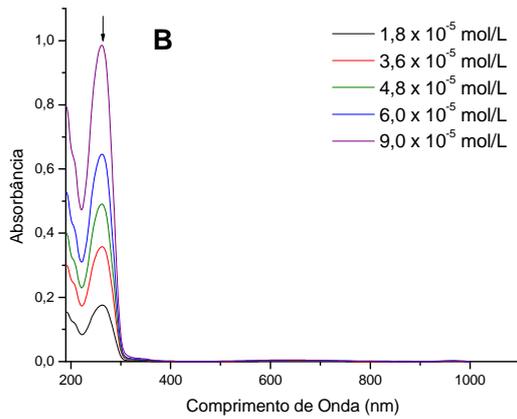
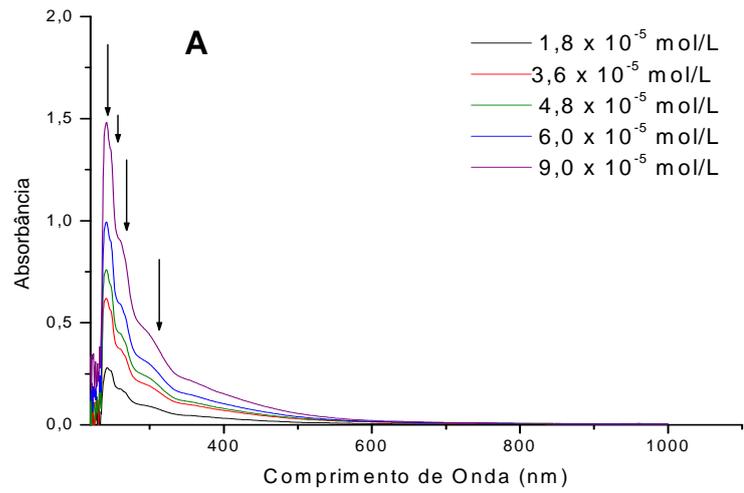
considerando a fórmula mínima $C_{30}H_{26}N_6O_2Cu(ClO_4)_2$. O percentual calculado para carbono, hidrogênio e nitrogênio do composto $[Cu(isapn)](ClO_4)_2$ foi de 38,55 %C; 2,63 %H e 9,52 %N. E o percentual experimental foi de 38,37 %C; 2,75 %H e 9,42 %N, considerando a fórmula mínima $C_{19}H_{16}N_4O_2Cu(ClO_4)_2$.

Nos espectros UV/Vis de complexos metálicos, as principais bandas de absorção registradas são atribuídas basicamente a três tipos de transições eletrônicas [139]. As absorções na região do ultravioleta, de alta energia, estão relacionadas com as transições internas dos ligantes, IL ($n \rightarrow \pi$ 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/visível estão relacionadas às transições de transferência de carga, TC. Em uma transição, um elétron é movido entre orbitais que são predominantemente dos ligantes e orbitais que são predominantemente do metal. A transição é classificada como transição de transferência de carga do ligante para o metal, TCLM ($\pi \rightarrow d\pi$) ou como transferência de carga do metal para o ligante, TCML ($d\pi \rightarrow \pi^*$). Este tipo de transição é normalmente mais comumente observado em complexos com ligantes que possuem orbitais π^* semipreenchidos, especialmente ligantes aromáticos. O outro tipo de transição observada na região do visível é a transições d-d, de menor intensidade ($\epsilon \approx 10$ a $10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$), característica de metais com camada d não totalmente preenchida.

Para os ligantes orgânicos do tipo bases de Schiff, as transições IL $\pi \rightarrow \pi^*$, referentes aos grupos cromóforos C=N, C=C, são registradas na literatura [140] na região entre 196 – 313 nm, com coeficiente de absorvidade molar (ϵ) maior 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, indicando o grupo coordenante.

As bandas referentes às transições TCLM ($\pi \rightarrow d\pi$) aparecem na região de 320 – 450 nm, com ϵ característicos em torno de $10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Estas bandas também são permitidas pelas regras de seleção e se caracterizam por intensas absorções na região do visível e UV próximo [139]. A

Figura 10 refere-se aos espectros eletrônicos obtidos para os compostos de cobre sintetizados e os dados respectivos de λ_{max} e ϵ estão na Tabela 1.



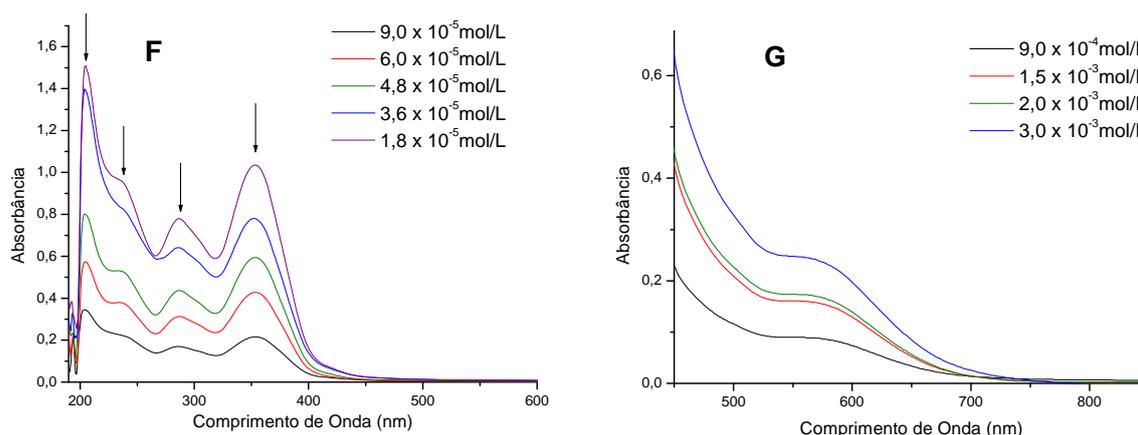


Figura 10. Espectros eletrônicos no UV/Vis dos complexos. A) $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$ (**1**), em DMSO: H_2O (1:9); B) $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ (**3**) em solução aquosa; C) região do visível para o composto (**3**); D) $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$ (**4**) em solução aquosa; E) região do visível para o composto (**4**); F) $[\text{Cu}(\text{pyrpn})_2]$ (**5**) em etanol; G) região do visível para o composto.

Como esperado, para todos os complexos as bandas de IL (internas do ligante) apareceram na região do UV distante, de 200 a ~ 300 nm e as transições TCLM apareceram a partir de 300 nm.

Tabela 1. Caracterização das bandas observadas ($\lambda_{\text{máx}}$) e respectivos valores de absorvidade molar (ϵ) dos complexos.

	λ máx (nm)	ϵ ($\text{mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$)	Transição
$[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$ (1)	242	$1,64 \times 10^4$	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	247 (om)	$1,47 \times 10^4$	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	260 (om)	$9,67 \times 10^3$	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	301	$4,83 \times 10^3$	TCLM ($\pi \rightarrow d\pi$)

om = ombro

	λ máx (nm)	ϵ ($\text{mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$)	Transição
$[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ (3)	264	$1,07 \times 10^4$	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	344 (om)	$1,15 \times 10^2$	TCLM ($\pi \rightarrow d\pi$)
	639	61,1	d - d

om = ombro

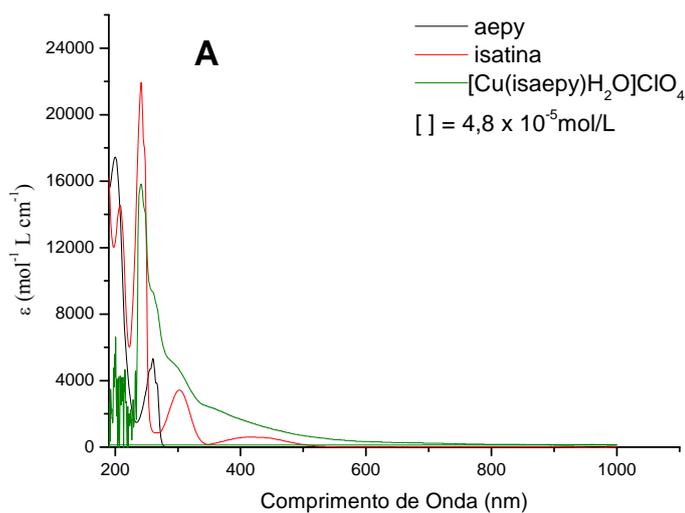
	λ máx (nm)	ϵ ($\text{mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$)	Transição
[Cu(isaenim)](ClO₄)₂ (4)	238	$2,01 \times 10^4$	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	268	$1,93 \times 10^4$	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	347	$1,11 \times 10^4$	TCLM ($\pi \rightarrow d\pi$)
	545 (om)	101	d - d

om = ombro

	λ máx (nm)	ϵ ($\text{mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$)	Transição
[Cu(pyrpn)]₂ (5)	203	$1,63 \times 10^4$	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	237	$1,07 \times 10^4$	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	286	$8,76 \times 10^3$	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	354	$1,20 \times 10^4$	IL ($\pi \rightarrow d\pi$)
	568 (om)	86,7	d - d

om = ombro

Também foram obtidos os espectros dos reagentes utilizados na preparação dos compostos. Os espectros eletrônicos destes reagentes foram obtidos em água. A Figura 11 mostra os espectros comparando os valores de ϵ ($\text{mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$) dos compostos obtidos com os dos reagentes utilizados na síntese.



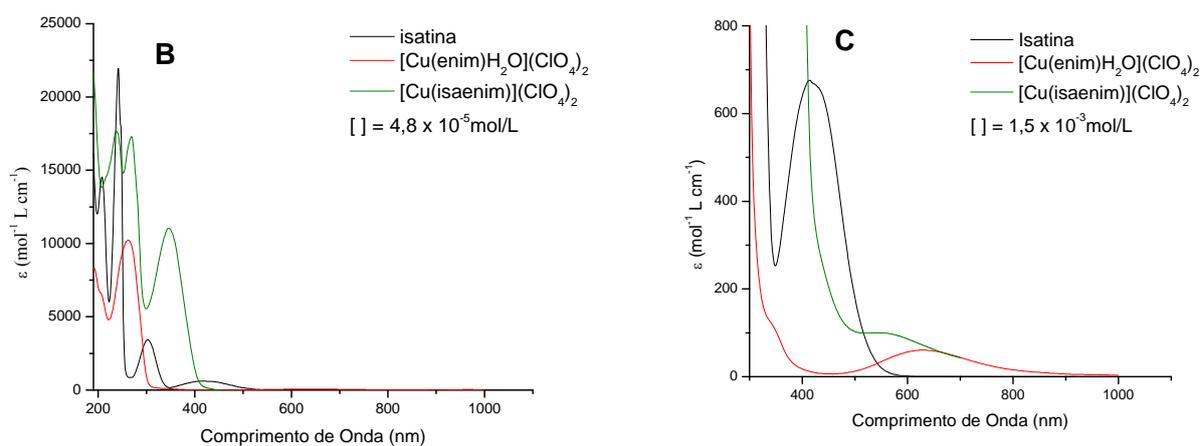


Figura 11. Espectros eletrônicos no UV/Vis dos reagentes, comparando-se os valores de ϵ ($\text{mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$) dos compostos obtidos com os dos reagentes utilizados na síntese. A) (2-aminoetil) piridina, isatina, composto (1); B) isatina, composto (3), composto (4); C) isatina, composto (3), composto (4) na região do visível.

A Tabela 2 mostra os valores obtidos para a isatina e para o 2-(2-aminoetil)piridina.

Tabela 2. Caracterização das bandas observadas (λ_{max}) e valores de absorvidade molar (ϵ) dos reagentes.

	λ_{max} (nm)	ϵ ($\text{mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$)	Transição
Isatina	208	$1,45 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	242	$2,19 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	302	$3,44 \times 10^3$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	421	604,2	$n \rightarrow \pi^*$
2-(2-aminoetil)piridina	λ_{max} (nm)	ϵ ($\text{mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$)	Transição
	200	$1,74 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	260	$5,33 \times 10^3$	$\pi \rightarrow \pi^*$

O espectro UV/Vis do composto (1) apresentou bandas em 242 e 301 nm e ombros em 247 e 260 nm, e a banda d-d não foi observada. O complexo (1) apresentou as mesmas bandas dos reagentes, que praticamente não sofreram nenhum deslocamento; portanto, estas são bandas intraligantes. O ϵ calculado para o composto, correspondente à banda em 242 nm, foi menor quando comparado com o da isatina. Os valores de ϵ referentes a outras bandas foram maiores no complexo, quando comparados a aqueles com os reagentes.

O espectro eletrônico do ligante *enim*, obtido antes da adição do cobre durante a síntese do composto **(3)**, apresentou uma única banda em $\lambda_{\text{max}} = 262$ nm (Figura 12). Esta banda também foi observada para o composto de cobre do respectivo ligante composto **(3)**.

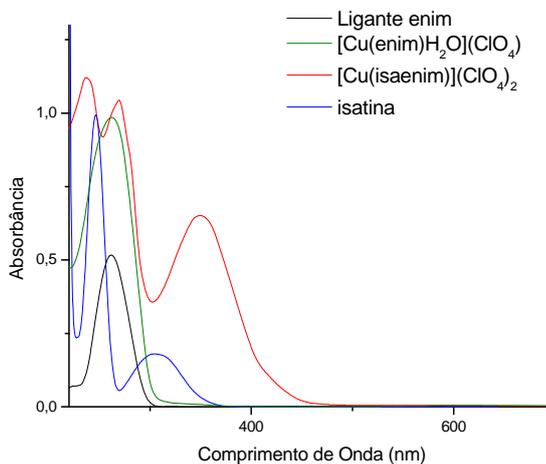
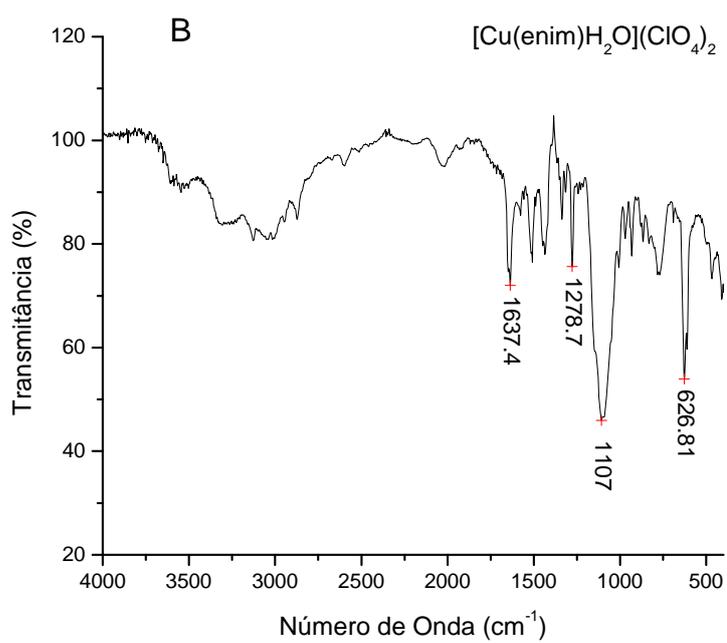
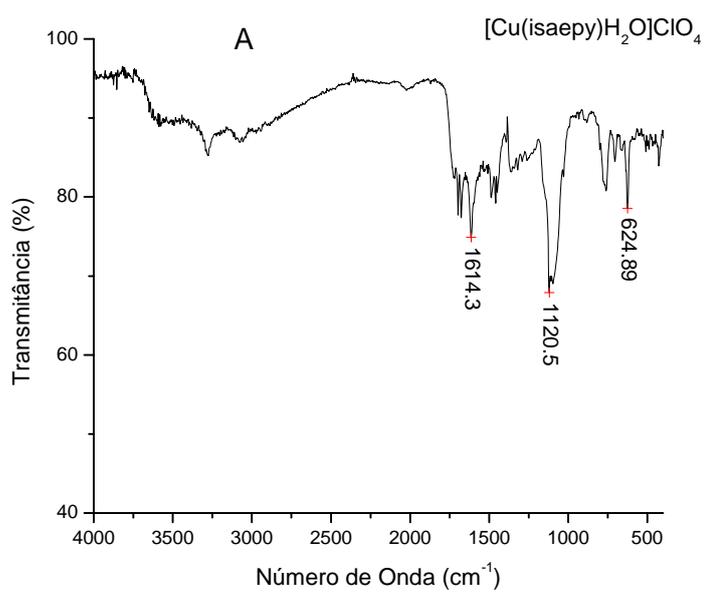


Figura 12. Espectros eletrônicos no UV/Vis dos reagentes, comparando-se os valores de ϵ ($\text{mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$) dos compostos obtidos com os dos reagentes utilizados na síntese.

As bandas e os valores de ϵ encontrados para o complexo **(3)** foram comparados com aos valores dos reagentes utilizados e com o ligante *enim*. A banda em 262 nm, encontrada para o ligante *enim*, também foi observada no composto **(3)**, porém foi deslocada para 268 nm. Houve deslocamento da banda em 264 nm do composto **(3)** para um comprimento de onda maior, 268 nm. O composto **(4)** apresentou uma banda em 238 nm, referente à banda da isatina em 242 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$), que foi deslocada para um comprimento de onda menor, indicando coordenação ao metal, e também uma banda em 268 nm, referente à banda do composto **(3)**. Isto indica que o composto apresenta tanto a isatina como o ligante *enim*.

Além disso, os espectros eletrônicos dos complexos **(3)** e **(4)** apresentaram novas bandas em 344 e 347 nm, respectivamente, que indicam a presença de metais coordenados no composto. As bandas 545 e 639 nm, de elevado comprimento de onda e de baixa absorvidade molar, correspondem a transições d – d.

As frequências das vibrações obtidas através de espectros no infravermelho permitiram caracterizar os grupos presentes nos compostos estudados [141]. Os espectros obtidos podem ser observados na Figura 13, de A a D, respectivamente para os compostos **(1)**, **(3)**, **(4)** e **(5)**.



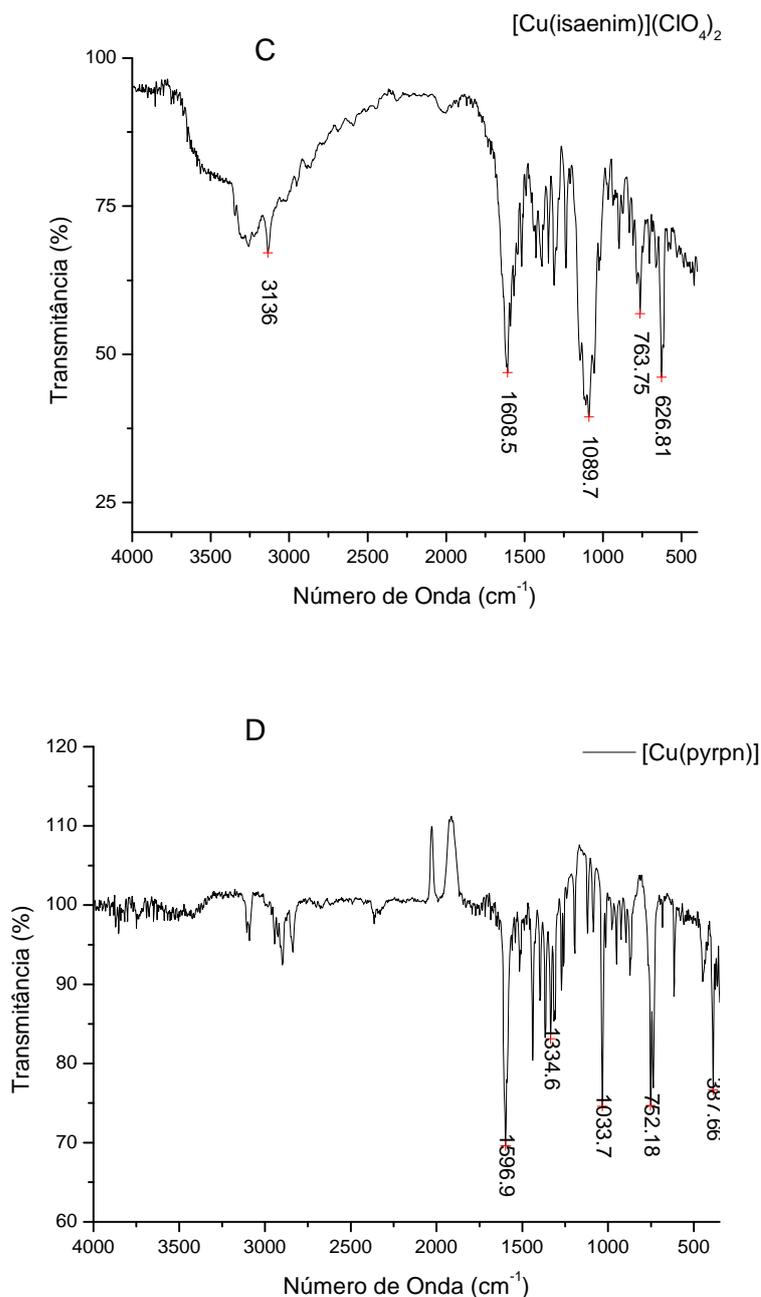


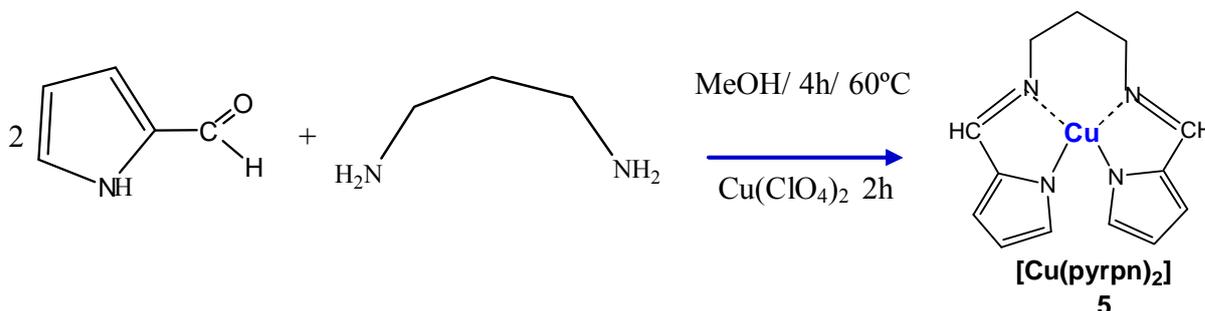
Figura 13. Espectros na região do infravermelho. A) [Cu(isaepy)H₂O]ClO₄; B) [Cu(enim)H₂O](ClO₄)₂; C) [Cu(isaenim)](ClO₄)₂; D) [Cu(pyrpn)].

Através do espectro de infravermelho do composto [Cu(isaepy)H₂O]ClO₄ (**1**), podem-se observar bandas em 1694 cm⁻¹ do grupo enol coordenado ao cobre, em 1460 cm⁻¹ indicando a presença de grupamentos C=N e C=C do anel da piridina e, em 1120 cm⁻¹, relacionada ao estiramento do ânion perclorato não coordenado (Figura 13a). A banda em 1614 cm⁻¹ refere-se ao estiramento C=N, indicando a coordenação da Base de Schiff ao metal [142].

O espectro de infravermelho do composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ (**3**) apresentou a banda em 1440 cm^{-1} indicando a presença de $\text{C}=\text{N}$ e $\text{C}=\text{C}$ do anel do imidazol, e as bandas em 1637 e 1570 cm^{-1} correspondem ao estiramento $\text{C}=\text{N}$ da base de Schiff e ao estiramento $\text{N}-\text{H}$ da etilenodiamina, respectivamente (Figura 13b).

O espectro de infravermelho obtido para o composto $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$ (**4**) corresponde ao espectro do composto (**3**) com mais algumas bandas da isatina (Figura 13c). A banda em 1608 cm^{-1} está mais intensa, pois provavelmente está superposta com as bandas do estiramento $\text{C}=\text{N}$ da base de Schiff e $\text{C}=\text{O}$ da amida que aparecem na mesma região ($\cong 1640\text{ cm}^{-1}$). Algumas das bandas do ligante estão deslocadas, pois os máximos de absorção diminuem de 4 a 15 cm^{-1} quando coordenado ao cobre [142].

No espectro infravermelho do composto (**5**), pode-se observar uma banda intensa em 1596 cm^{-1} que é referente à formação da imina (estiramento $\text{C}=\text{N}$). A banda em $1140 - 1060\text{ cm}^{-1}$ relacionada ao estiramento do ânion perclorato não foi observada, indicando que este complexo não possui contra-íon. A carga positiva do íon cobre(II) está sendo compensada pela saída dos hidrogênios ligados ao nitrogênio do anel pirrólico, conforme reação abaixo:



A 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 [143]. 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:

$$\Delta E = g \mu \beta$$

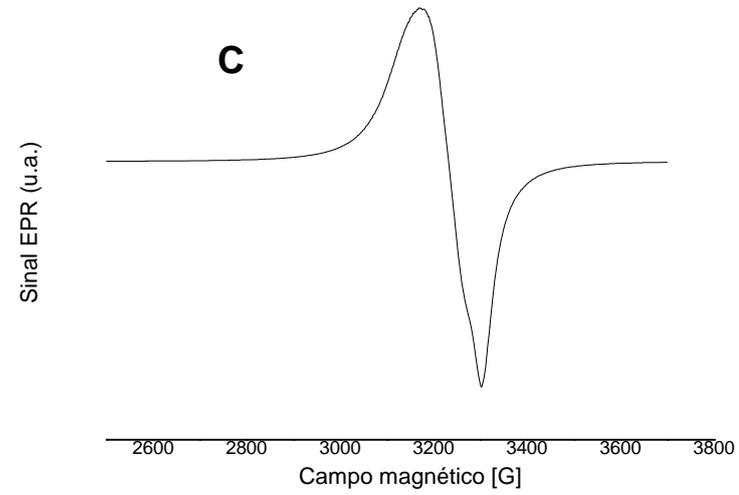
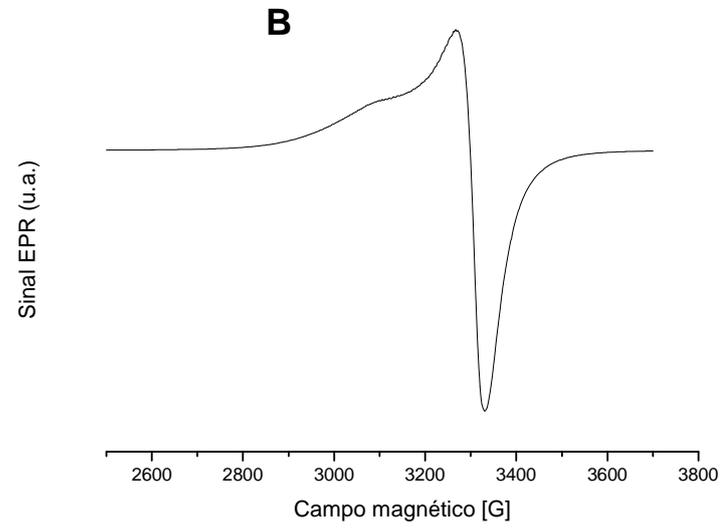
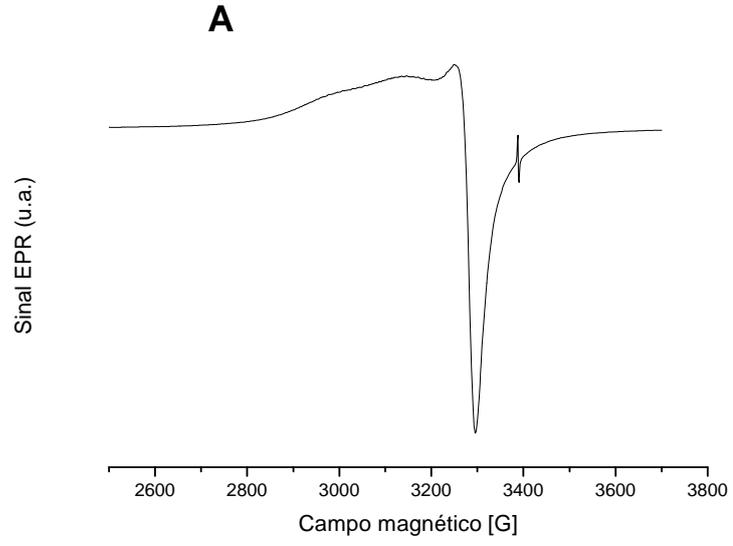
onde o valor de g , chamada constante giromagnética, depende da identidade da partícula e μ é o momento magnético [139]. Para o elétron livre, g_e é 2,0023. O fator g em um

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 e conseqüentemente produzir um campo magnético local. O valor de g indica a simetria do ambiente ligante e dá uma indicação da disponibilidade quanto aos 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 (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 absorção de energia gera um espectro que normalmente é registrado na forma de 1ª derivada.

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 [144].

Primeiramente foram obtidos espectros de EPR dos complexos preparados no estado sólido (Figura 14).



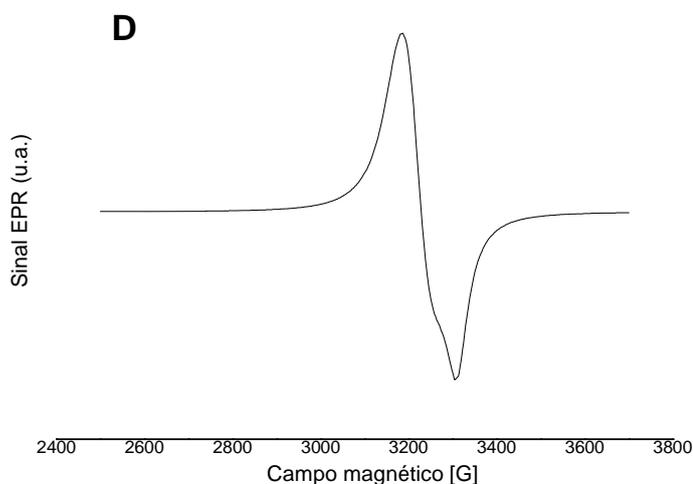


Figura 14. Espectros de EPR dos complexos no estado sólido, a 77K. A) [Cu(isaepy)H₂O]ClO₄; B) [Cu(enim)H₂O](ClO₄)₂; C) [Cu(isaenim)](ClO₄)₂; D) [Cu(pyrpn)]. Todos os espectros foram registrados com ganho de $3,56 \times 10^3$, amplitude de modulação de 15G, constante de tempo de 20,48 s e 1 varredura.

Os valores correspondentes dos parâmetros g_{\perp} e g_{\parallel} de cada um dos complexos são apresentados na Tabela 3.

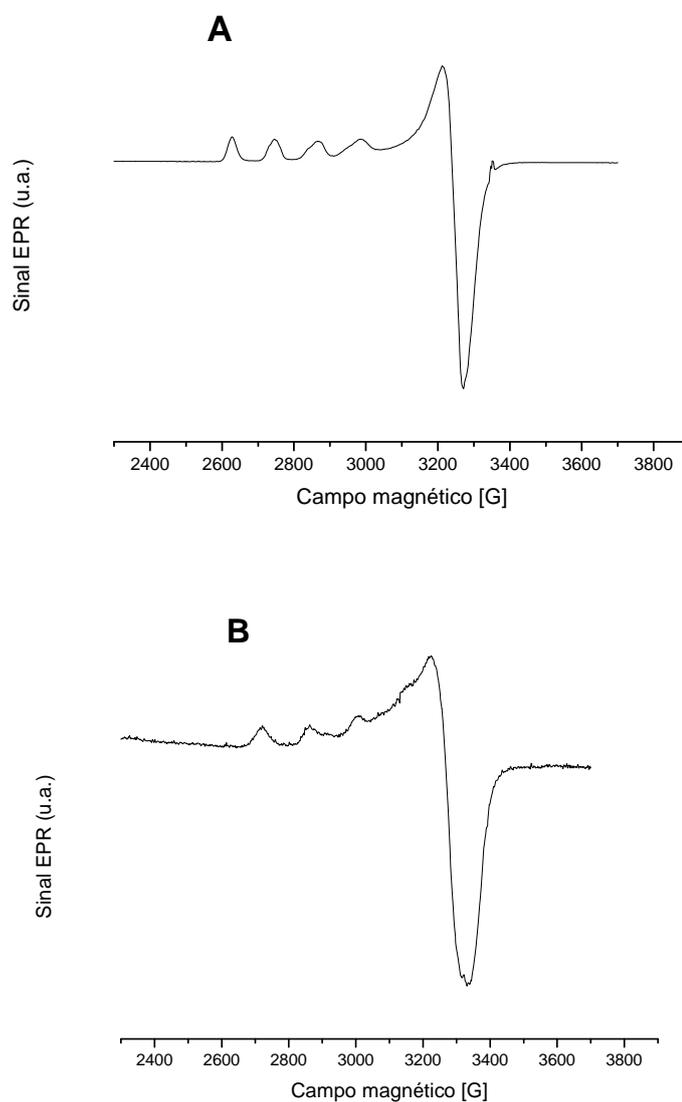
Tabela 3. Valores dos parâmetros de g_{\perp} e g_{\parallel} dos compostos sintetizados, no estado sólido, a 77K.

Composto	g_{\perp}	g_{\parallel}
1	2,072	2,155
3	2,055	2,186
4	2,097 (g_{iso})	-
5	2,103 (g_{iso})	-

Como os espectros foram obtidos com amostras de um pó cristalino e não de um monocristal, o espectro apresenta todas as direções superpostas e com linhas mais largas e distorcidas, mas observou-se que os compostos (1) e (3) apresentaram simetria axial, ou seja,

o ambiente ao redor do íon cobre no eixo z é diferente do ambiente no eixo xy, que são iguais, e o parâmetro $g_{//}$ tem maior valor do que o g_{\perp} . Já os compostos (4) e (5) apresentaram um único valor de g no estado sólido, um g isotrópico, que é o mesmo em todas as direções, não permitindo a visualização da estrutura hiperfina.

Os espectros de EPR dos compostos estudados também foram obtidos em soluções congeladas. Esses espectros são apresentados na Figura 15.



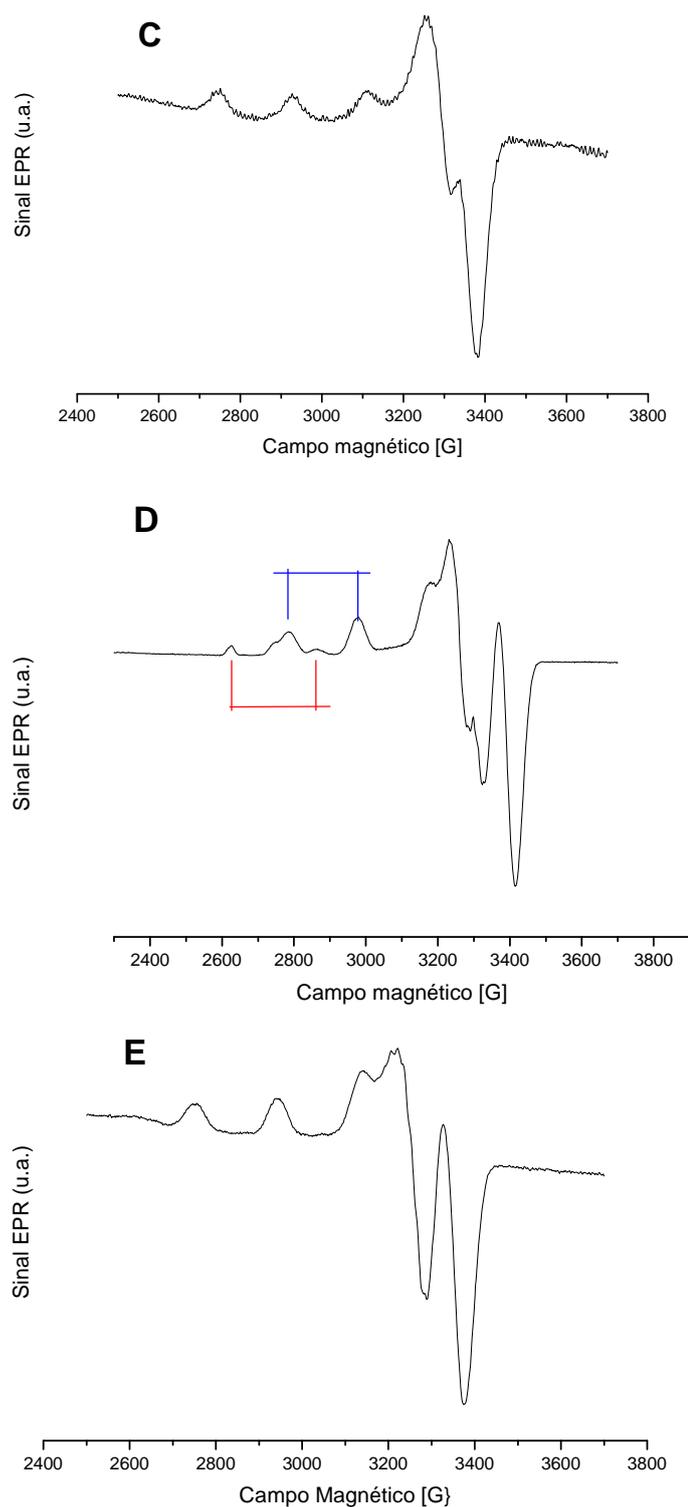


Figura 15. Espectros de EPR dos complexos em solução, a 77K. A) $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ em etanol; B) $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$ em etanol; C) $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ em metanol ; D) $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$ em $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1); E) $[\text{Cu}(\text{pyrpn})]$ em etanol. Todos os espectros foram registrados com ganho de $3,56 \times 10^2$, amplitude de modulação de 15G, constante de tempo de 20,48 s e 2 varreduras.

A Tabela 4 apresenta os parâmetros correspondentes, medidos nos espectros de EPR obtidos de soluções dos compostos sintetizados e do perclorato de cobre(II), usado como controle.

Tabela 4. Valores do parâmetro g e das constantes hiperfinas (A) dos compostos sintetizados, em solução congelada a 77K.

Composto	g_{\perp}	g_{\parallel}	$A_{\parallel} (\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1})$	$g_{\parallel} / A_{\parallel} (\text{cm})$
1	2,075	2,309	154	150
3	2,069	2,243	188	119
4	2,075	2,415	139	174
		2,202	202	109
5	2,058	2,215	201	110
[Cu(H₂O)₄]²⁺	2,090	2,422	133	182

O spin nuclear do cobre é 3/2, e então se observa um espectro EPR característico de íons cobre, com 4 linhas na região de g_{\parallel} , além da linha mais larga correspondente a g_{\perp} . Todos os compostos de cobre apresentaram simetria axial em solução, ou seja, o ambiente ao redor do íon cobre no eixo z é diferente do ambiente nos eixos x e y, que são iguais, e o parâmetro g_{\parallel} tem maior valor do que o g_{\perp} .

A relação empírica $g_{\parallel} / A_{\parallel} (\text{cm})$ tem sido usada para caracterizar complexos miméticos de diversas proteínas de cobre, entre elas a proteína SOD (superóxido dismutase), e fornece um indicativo da extensão da distorção tetraédrica num ambiente tetragonal ao redor do metal. Se esta razão estiver na faixa de 105 – 135 cm, a geometria observada ao redor do íon será provavelmente mais corretamente descrita como quadrado planar, e se esta relação for > 250 cm, a geometria será mais tetraédrica [145]. Portanto, quanto maior o valor desta relação, maior a extensão da distorção tetraédrica na esfera de coordenação do metal.

De acordo com os dados obtidos, observa-se que o composto **(1)** apresentou um valor intermediário (150 cm), indicando uma espécie com configuração intermediária entre quadrado planar e tetraédrica ao redor do cobre(II).

O composto **(3)** apresenta as relações $g_{\parallel} / A_{\parallel}$ como 119 cm, sugerindo que a geometria ao redor do íon metálico é quadrado planar.

O composto [Cu(isaenim)](ClO₄)₂ **(4)** apresentou dois valores de A_{\parallel} referentes a dois conjuntos de quatro linhas de diferentes intensidades. Isto indica que o cobre está ligado a

dois sítios diferentes, e provavelmente correspondem a uma mistura de duas espécies. Uma das estruturas do composto (4) apresentou valor $g_{//} / A_{//}$ de 109 cm (quadrado planar), entretanto a outra estrutura apresentou um valor maior (174 cm), indicando geometria com distorções significativas ao redor do íon cobre, possibilitando geometria mais tetraédrica, como no perclorato de cobre(II). O composto (4) pode apresentar as formas ceto e enólica, já que o grupo isatina coordenado também apresenta o equilíbrio ceto \leftrightarrow enólico.

O composto (5) parece também possuir uma estrutura mais tetragonal ou quadrado planar, pois o valor $g_{//} / A_{//}$ encontrado foi de 110 cm.

A **Espectrometria de Massa (EM ou MS)** utiliza o movimento de íons em campos elétricos e magnéticos para classificá-los de acordo com sua relação massa-carga (m/z). Desta forma, esta técnica é aplicada principalmente à identificação e quantificação dos compostos, elucidação estrutural e obtenção de informações relativas às propriedades químicas das moléculas.

Até o início da década de 80, a Espectrometria de Massa era aplicada somente a compostos orgânicos voláteis e termoestáveis. A volatilidade limitada e a alta termoestabilidade de compostos de origem biológica, complexos de coordenação e organometálicos eram propriedades incompatíveis com os métodos de ionização até então disponíveis. O desenvolvimento de técnicas de ionização como FAB (*Fast Atom Bombardment*) e PD (*Plasma Desorption*) permitiram que compostos metálicos, por exemplo, pudessem ser vaporizados e ionizados. No entanto, o desenvolvimento de técnicas como MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), introduzida por Karas e Hillenkamp [146] e ESI (*Electron Spray Ionization*) permitiram um grande avanço em EM e sua aplicação a uma gama maior de amostras.

Uma das técnicas de ionização, em maior expansão, é por *electrospray* (ou eletronebulização) que passou por duas fases distintas de investigação e desenvolvimento. A primeira ocorreu antes de 1970 e centrou-se mais nos aspectos fundamentais do processo de produção de carga, devendo-se salientar o trabalho realizado por Dole et al. [147]. A segunda fase deu-se a partir de 1970, com destaque para o trabalho desenvolvido em 1984 por Yamashita e Fenn [148], considerado pioneiro da espectrometria de massa de ionização por *electrospray*. A partir deste trabalho, a técnica sofreu um incremento notório com o desenvolvimento e construção de fontes iônicas comercializáveis, baseadas no princípio de carregar gotas eletricamente.

Há essencialmente três características que fazem com que esta seja considerada uma técnica distinta das outras técnicas de ionização. A primeira destas características é a capacidade para produzir íons multiplamente carregados, com número de cargas elevado, reduzindo assim a razão m/z , de tal modo que seja possível analisar compostos de elevada massa molecular, até centenas de kDa, em praticamente todo o tipo de analisadores. Uma segunda característica é que as amostras a analisar devem ser introduzidas em solução, o que faz com que seja possível seu acoplamento com muitas técnicas de separação. Por último e não menos importante, é o fato de ser o *electrospray* uma técnica de ionização suave, permitindo que as interações não covalentes entre moléculas que existem em solução sejam preservadas na fase gasosa.

O desenvolvimento da espectrometria de massa de ionização por *electrospray* permitiu assim novas possibilidades para análise de compostos de elevada massa molecular de todos os tipos, incluindo proteínas, nucleotídeos, polímeros sintéticos, compostos organometálicos e de coordenação [149], sendo por isso uma técnica muito usada em investigação biológica, bioquímica, farmacêutica, médica e química.

A produção de íons por ionização *electrospray* requer essencialmente dois passos: dispersão de gotas altamente carregadas quase à pressão atmosférica, seguida de condições que permitam a evaporação da gota.

As soluções são primeiramente pulverizadas eletrostaticamente, com formação de gotas pequenas e altamente carregadas. A nebulização da solução é em alguns casos facilitada pela ajuda de um gás nebulizador. Posteriormente, as moléculas de analito devem de alguma forma ser separadas do solvente, na forma de íons. Este passo de formação de íons, como em muitas das técnicas de ionização consideradas suaves, é provavelmente o menos compreendido no processo global do *electrospray*. Alguns mecanismos têm sido propostos para a dessorção de íons a partir de gotas carregadas sendo que o modelo de *resíduo de carga* de Dole [147], aplicado a macromoléculas, foi talvez o primeiro a servir de base para a atual técnica de *electrospray*. Neste modelo é considerado que à medida que o solvente se evapora, a densidade de carga à superfície aumentará até que as forças repulsivas de Coulomb entre as cargas superficiais excedam a tensão superficial, levando à divisão da gota inicial. Se este processo de divisão continuar e se a solução original for suficientemente diluída será alcançado um estado no qual cada gota conterá uma única molécula que reterá parte da carga inicial, ou seja, serão formados macro-íons.

Portanto, utilizou-se a técnica de ionização *electrospray* (ESI), operando em modo positivo, como ferramenta de análise e caracterização dos compostos preparados, já que

algumas técnicas não puderam ser usadas, como a cristalografia de raios-X, pois não obtivemos monocristais apropriados, e a RMN, pois compostos com átomos paramagnéticos como Cu(II) distorcem o campo magnético aplicado, gerando espectros com sinais largos ou sobrepostos e com as constantes de acoplamento não resolvidas.

O espectro de massa do complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (**2**) já tinha sido obtido anteriormente [42]. Os valores de m/z encontrados foram: 563,1 [MM = 566,11 em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, correspondente ao fragmento monocatión $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2\text{Cu}$]; 565,1 [modelo isotópico ($\text{Cu}^{63/65}$) monocatión]; 312,0 [forma enólica, fragmento $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{OCu}$ (composto (**2**))]; 314,1 [modelo isotópico ($\text{Cu}^{63/65}$) monocatión].

A Figura 16 mostra o espectro de massa do composto (**1**), registrado em uma solução de metanol:água (1:1, v:v).

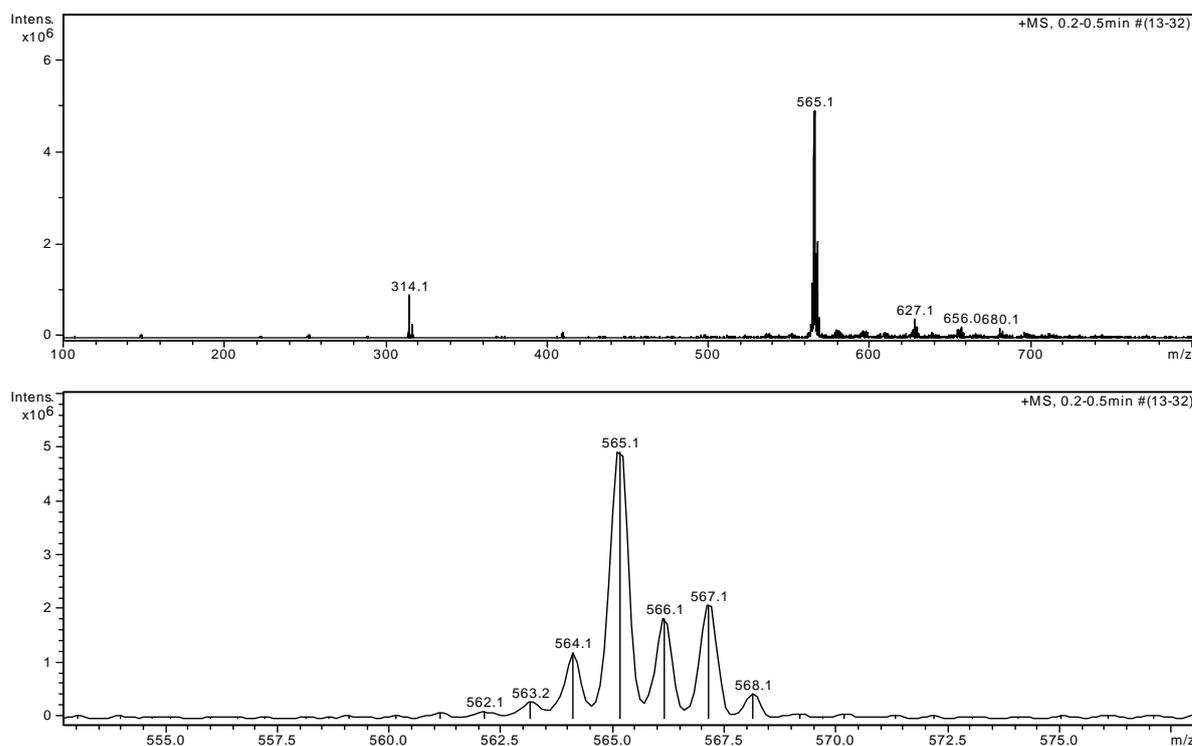


Figura 16. Espectro de massas do composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$ (**1**) em solução de metanol:água (1:1, v:v).

Os valores de m/z encontrados foram: 314,1 [MM = 431,29 em $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, correspondente ao fragmento $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{OCu}$]; 564,1 [forma ceto, fragmento $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2\text{Cu}$ (composto (**1**), MM = 566,11)]; 566,2 [modelo isotópico ($\text{Cu}^{63/65}$) monocation].

Portanto, as espécies correspondentes à forma ceto do composto (2) e à forma enólica do composto (1) estão presentes em solução aquosa, embora em diferentes proporções, como observado pelos dados de ESI-MS (Figura 17).

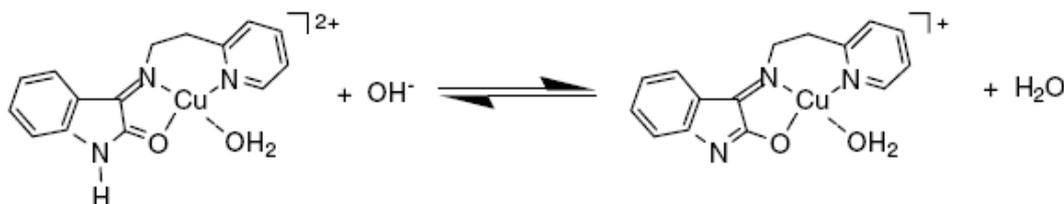


Figura 17. Equilíbrio ceto-enólico do composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$.

Além disso, os dados de MS(ESI+) mostram que os compostos (1) e (2) podem coexistir em solução aquosa, de acordo com o equilíbrio ceto-enólico da Figura 18, apesar de terem sido isolados na forma ceto (complexo (1)) ou na forma enólica (complexo (2)), dependendo do pH durante suas sínteses. Ambos complexos apresentaram os mesmos fragmentos monocátion, correspondendo à forma enólica do CuL ($m/z = 314,1$) e à forma ceto do CuL_2 ($m/z = 564,1$), formado nas condições usadas nas medidas do MS(ESI+).

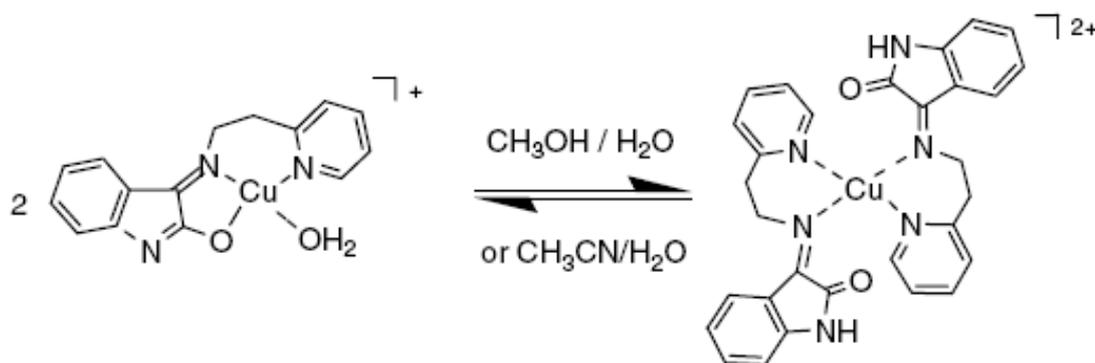


Figura 18. Equilíbrio da forma enólica do composto (1) e da forma ceto do composto (2) presentes em solução aquosa.

Os valores de m/z encontrados para o composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ (3) foram: 338,05 [MM = 418,63 em $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, correspondente ao fragmento $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_4)_2\text{Cu}$]; 340,02 [modelo isotópico ($\text{Cu}^{63/65}$)]; 260,03 [fragmento monocátion $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_4\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2)$]; 262,03 [modelo isotópico ($\text{Cu}^{63/65}$)]; 278,03 [fragmento monocátion $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OCu}(\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2)$]; 280,03 [modelo isotópico ($\text{Cu}^{63/65}$)] (Figura 19).

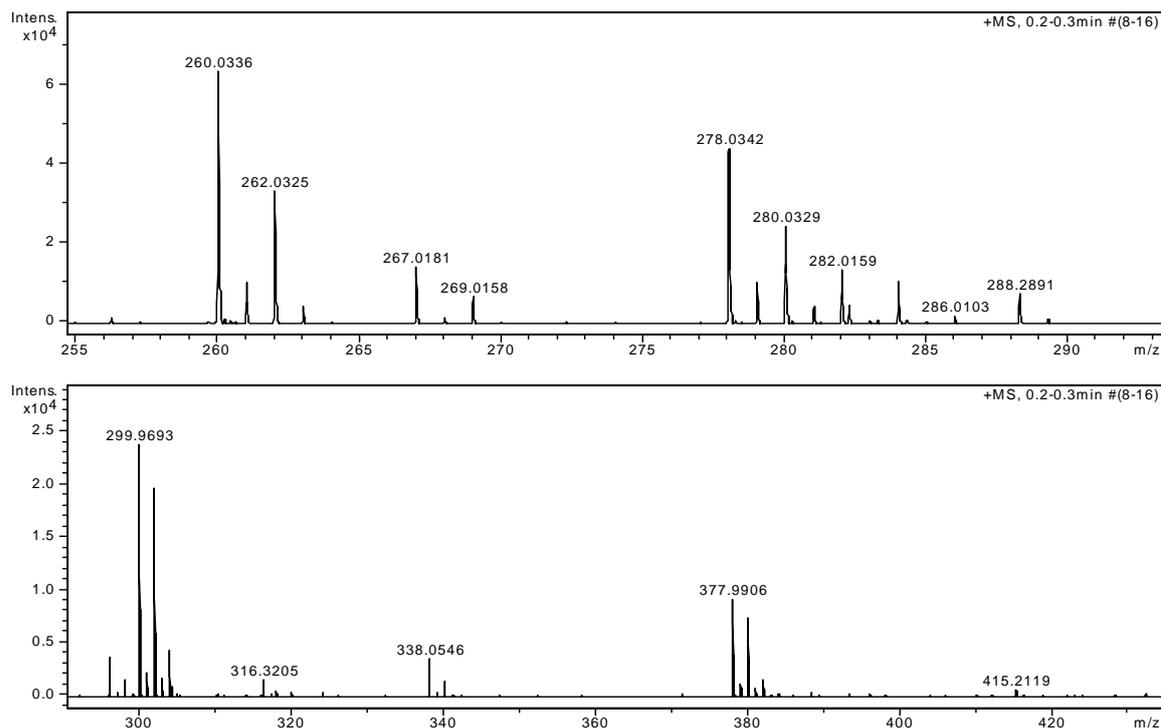
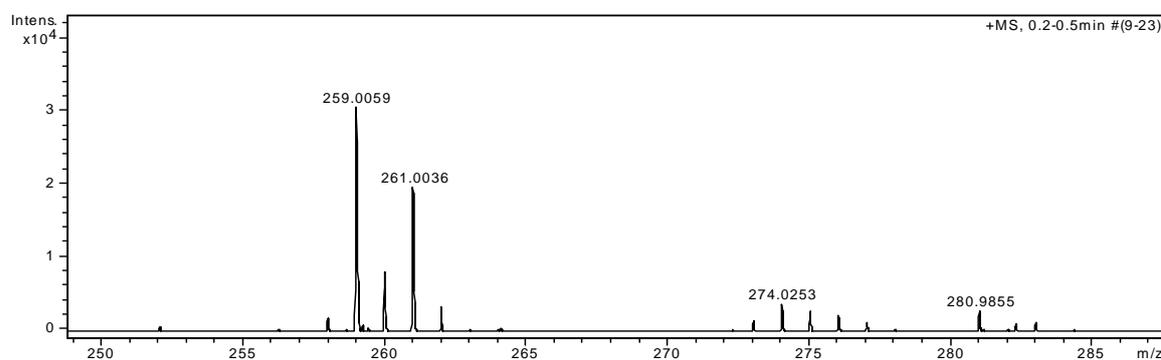


Figura 19. Espectro de massas do composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ (**3**) em solução de metanol:água (1:9, v:v).

Os valores de m/z encontrados para o composto $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$ (**4**) foram: 347,75 [MM = 529,74 em $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, correspondente ao fragmento $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2\text{Cu}$]; 349,04 [modelo isotópico ($\text{Cu}^{63/65}$)]; 259,01 [fragmento monocation $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_4\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2)$]; 261,0 [modelo isotópico ($\text{Cu}^{63/65}$)] (Figura 20). Alguns fragmentos observados foram os mesmos para o composto (**3**).



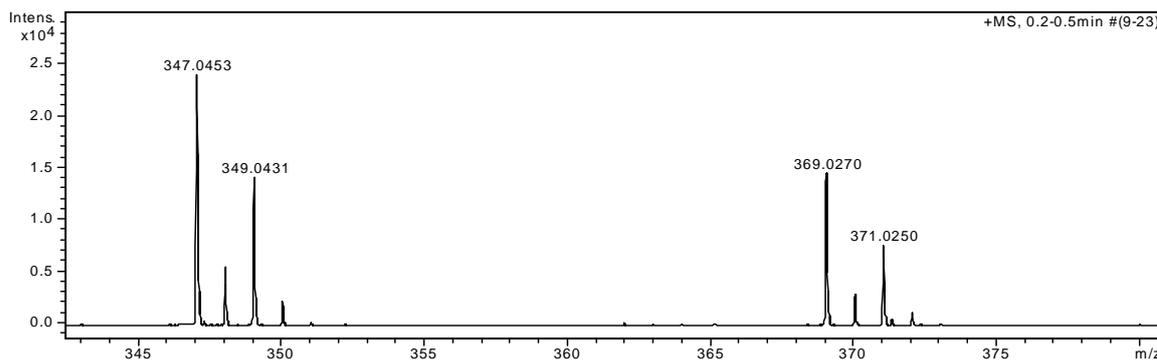


Figura 20. Espectro de massas do composto [Cu(isaenim)](ClO₄)₂ (**4**) em solução de metanol:água (1:9, v:v).

Os principais valores de m/z encontrados para o composto [Cu(pyrpn)] (**5**) foram: 290,1 [MM = 289,82 em CH₃OH/H₂O, correspondente ao fragmento C₁₃H₁₄N₄Cu]; 292,1 [modelo isotópico (Cu^{63/65})] (Figura 21). Os dados de MS(ESI+) são consistentes com a fórmula proposta para o composto.

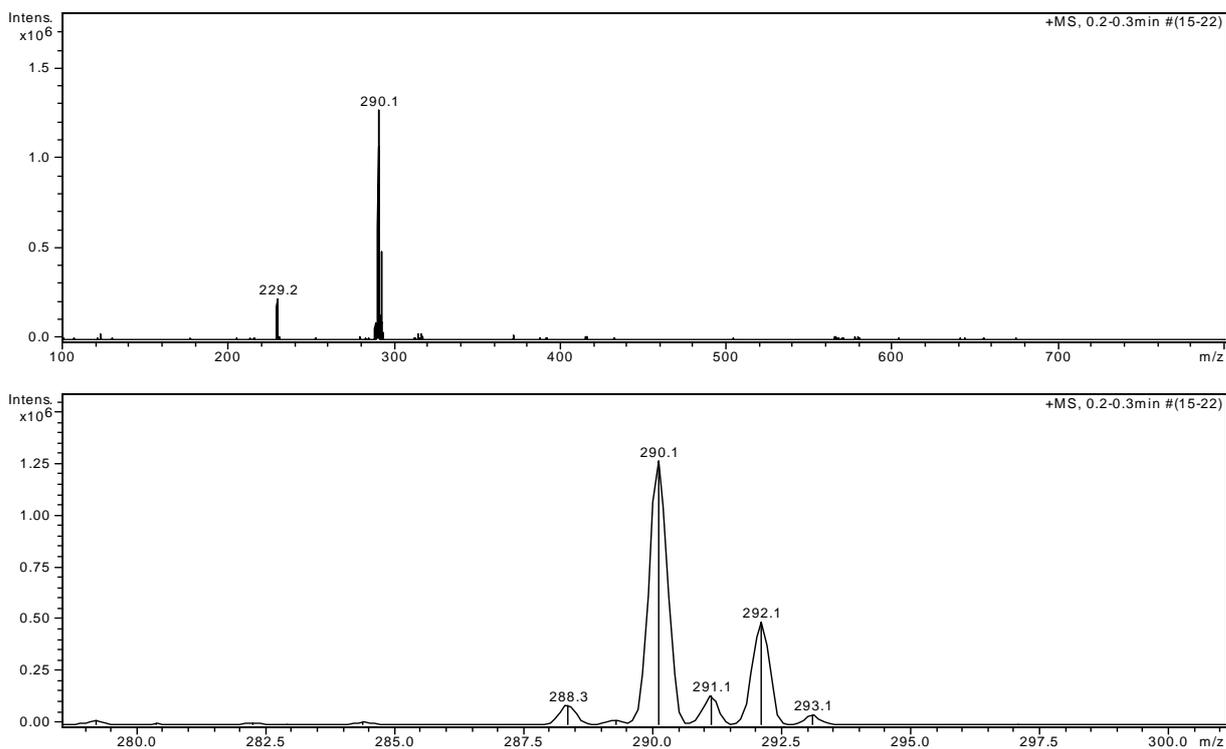


Figura 21. Espectro de massas do composto [Cu(pyrpn)] (**5**) em solução de metanol:água (1:1, v:v).

I - 4.2. Estudo do Equilíbrio ceto-enólico do Composto [Cu(isaenim)](ClO₄)₂

Durante o estudo de equilíbrio do composto (4), [Cu(isaenim)](ClO₄)₂, por EPR e UV/Vis, notou-se que os espectros dele variavam com mudanças de pH, e que em algumas faixas de valores, estas mudanças eram bastante pronunciadas. Deste modo, procedeu-se a um estudo detalhado desses equilíbrios através das duas técnicas espectroscópicas.

I - 4.2.1. Estudos de Equilíbrio através de Espectroscopia EPR

O equilíbrio ceto-enólico foi inicialmente estudado por EPR. O pH da solução inicial medido foi de 4,20. Como as soluções analisadas por EPR precisam ser mais concentradas, foi possível observar que em pH ácido a solução é amarela e em meio alcalino, a cor da solução torna-se um verde escuro. Além disso, observou-se que em pH muito alto, a partir de 9,7, a solução começou a ficar turva e no pH 11,0 houve formação de precipitado. A Tabela 5 e a Tabela 6 mostram os respectivos parâmetros obtidos após adição de HCl ou NaOH, à uma solução do complexo (4).

Tabela 5. Parâmetros observados após adição de HCl 0,1 mol/L a uma solução de [Cu(isaenim)](ClO₄)₂.

pH	G _⊥	g _∥	A _∥ (x10 ⁻⁴ cm ⁻¹)	g _∥ / A _∥ (cm)
4,20	2,084	2,437	139	174
		2,203	202	109
3,80	2,084	2,436	139	174
		2,205	202	109
3,40	2,084	2,437	139	174
		2,205	202	109
2,50	2,086	2,436	139	174
		2,205	202	109

Portanto, não houve mudanças significativas nos parâmetros observados com adição de ácido.

Tabela 6. Parâmetros observados após adição de NaOH 0,1 mol/L a uma solução de $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$

pH	g_{\perp}	g_{\parallel}	$A_{\parallel} (10^{-4} \text{ cm}^{-1})$	$g_{\parallel} / A_{\parallel} (\text{cm})$
5,60	2,081	2,437	139	174
		2,204	202	109
6,20	2,068	2,437	139	174
		2,202	202	109
7,20	2,097	2,202	202	109
8,10	2,099	2,202	202	109
9,70	2,102	2,202	202	109
11,0	2,101	2,202	202	109

Através do EPR foi possível observar que em meio ácido os dois compostos estavam presentes na solução. Mas a partir do pH 7,20 somente um dos compostos permaneceu, indicando que o equilíbrio foi praticamente todo deslocado para esta espécie. Como já foi descrito anteriormente, o composto na forma enólica apresenta uma geometria quadrada planar. A Figura 22 mostra o equilíbrio ceto-enólico do composto (4). Assim, os parâmetros g_{\parallel} e A_{\parallel} com valores 2,437 e 139, respectivamente, correspondem à espécie ceto, enquanto os parâmetros com valores 2,202 e 202 são relativos à espécie enólica.

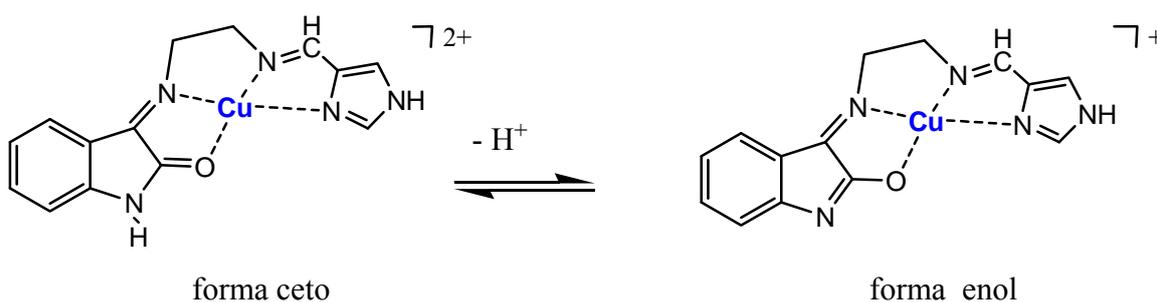


Figura 22. Equilíbrio ceto-enólico do composto $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$ (4).

I - 4.2.2. Estudos de Equilíbrio através de Espectroscopia UV/Vis

A existência das formas ceto e enólica em solução foi também verificada através do espectro eletrônico, através da variação dos valores de pH da solução. A partir dos resultados deste estudo, também foi possível determinar o pK_a do composto (4).

A determinação do pK_a foi realizada através da equação:

$$pH = pK_a + \log [X^-]/[HX] \quad (1)$$

onde $[X^-]$ é a concentração da espécie não protonada e $[HX]$ é a concentração da espécie protonada.

Reescrevendo a equação 1 em termos de absorbância, temos:

$$pH = pK_a + \log ((A - A_f)/(A_0 - A)) \quad (2)$$

onde A é a absorbância da solução contendo uma certa concentração total de espécies protonada e não protonada, A_f é a absorbância da espécie protonada na mesma concentração e A_0 é a absorbância da espécie não protonada na mesma concentração.

O pK_a pode ser então determinado graficamente, que é o valor onde a reta intercepta no eixo x do gráfico pH versus $\log ((A - A_f)/(A_0 - A))$. A reta deve apresentar coeficiente linear próximo de 1 [129].

O pH inicial da solução foi de 6,28. Adicionando-se HCl 0,1 M, o espectro apresentou as mesmas bandas até o pH de 3,14. No entanto, a partir deste valor a absorbância das bandas em 268 e 238 nm aumentou e a banda em 347 nm começou a diminuir e praticamente desapareceu no pH = 1,59 (Figura 23).

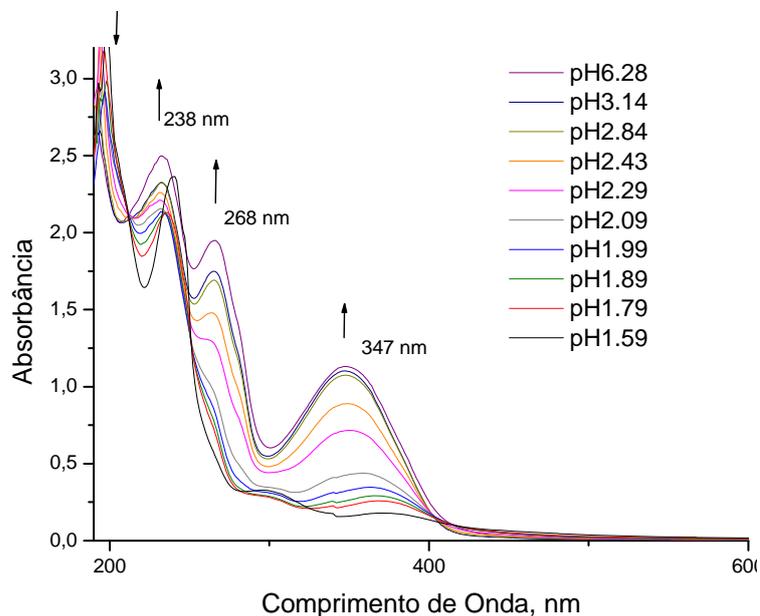


Figura 23. Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo $[Cu(isaenim)]^{2+}$ 0,15 mM, em solução aquosa, com variação de pH após adição de ácido.

Com a adição de base, a banda em 238 nm ficou inalterada até o pH de 9,31. No entanto, a intensidade da banda em 268 nm diminuiu e a banda em 347 nm deslocou-se para 386 nm e tornou-se mais intensa até pH de 11,34. Portanto, houve um deslocamento das bandas para uma região de menor energia (Figura 24).

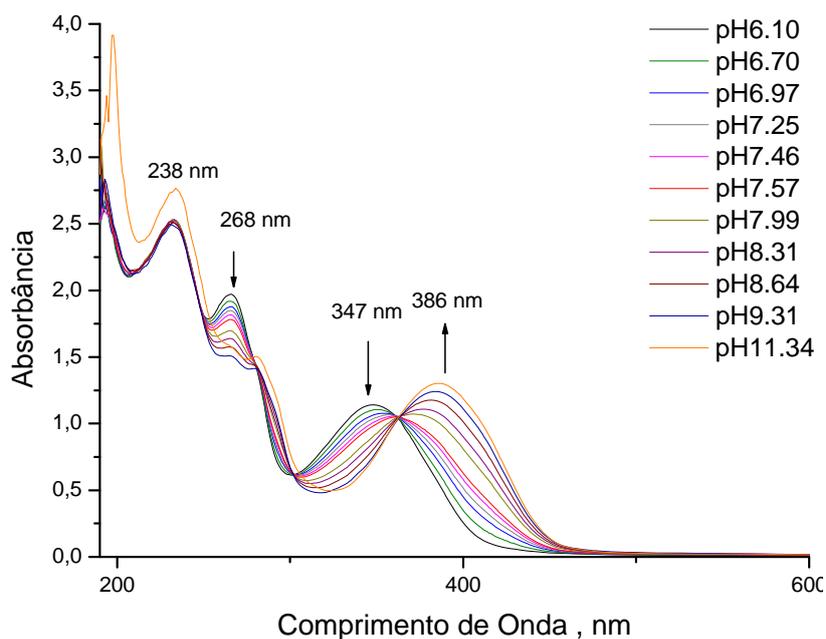


Figura 24. Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$ 0,15 mM, em solução aquosa, com variação de pH após adição de base.

Traçando-se a curva de pH *versus* $\log((A - A_f)/(A_0 - A))$, em $\lambda = 386$ nm, do pH 1,59 até 11,34, foi obtido um gráfico mostrado na Figura 25.

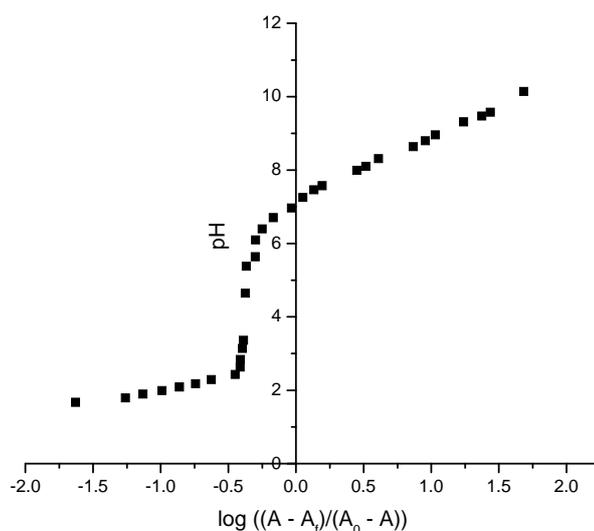


Figura 25. Curva do pH *versus* $\log((A - A_f)/(A_0 - A))$, em $\lambda = 386$ nm, do pH 1,59 até 11,34, para o complexo (4).

No entanto, percebeu-se que o gráfico obtido não foi uma reta com coeficiente linear igual ou próximo a 1 e que durante a adição de ácido e base ocorreram dois eventos diferentes, com modificações em bandas de comprimento de onda diferentes, e que portanto o composto estudado poderia apresentar dois valores de pK_a distintos. Assim, traçou-se a curva primeiramente no meio ácido a partir das absorbâncias em 347 nm (Figura 26) e posteriormente, do pH 6,10 até 11,34 em 386 nm (Figura 27). Os gráficos foram ajustados através do programa Origin 6.0 usando a equação 2. Neste ajuste, os parâmetros A_f e o coeficiente linear = 1 foram mantidos constantes e o parâmetro A_0 foi ajustado sucessivamente a partir do valor experimental inicial até que a equação 2 satisfizesse os pontos experimentais.

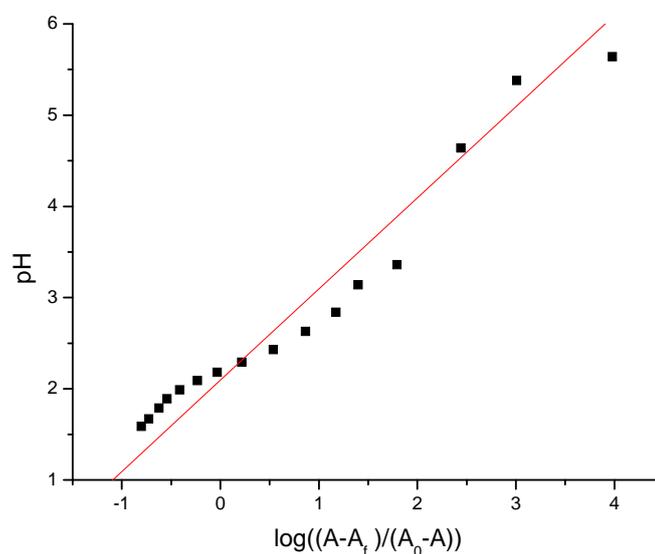


Figura 26. Gráfico do pH *versus* $\log((A - A_f)/(A_0 - A))$, em $\lambda = 347$ nm, para a determinação do pK_a1 do complexo (4).

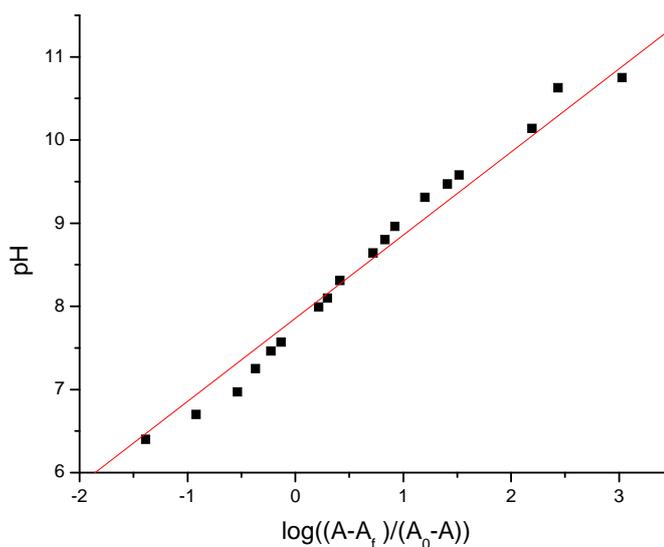


Figura 27. Gráfico do pH *versus* $\log((A - A_f)/(A_0 - A))$, em $\lambda = 386$ nm, para a determinação do pK_{a2} do complexo (4).

Os dados a 386 nm, que corresponde a uma banda presente no espectro da forma enólica, foram mais confiáveis.

Continuando com a adição de base, a partir do pH de 11,56, a absorvância da banda em 238 nm começou a aumentar. A banda em 268 nm foi deslocada para 277 nm e tornou-se mais intensa. A banda em 386 nm começou a diminuir até pH de 13,82 (Figura 28). O gráfico obtido do pH *versus* $\log((A - A_f)/(A_0 - A))$ com os valores de absorvância medidos em 386 nm é mostrado na Figura 29. Não foi necessário fazer o ajuste iterativo deste gráfico, isto é, a reta proposta de ajustou adequadamente aos pontos experimentais.

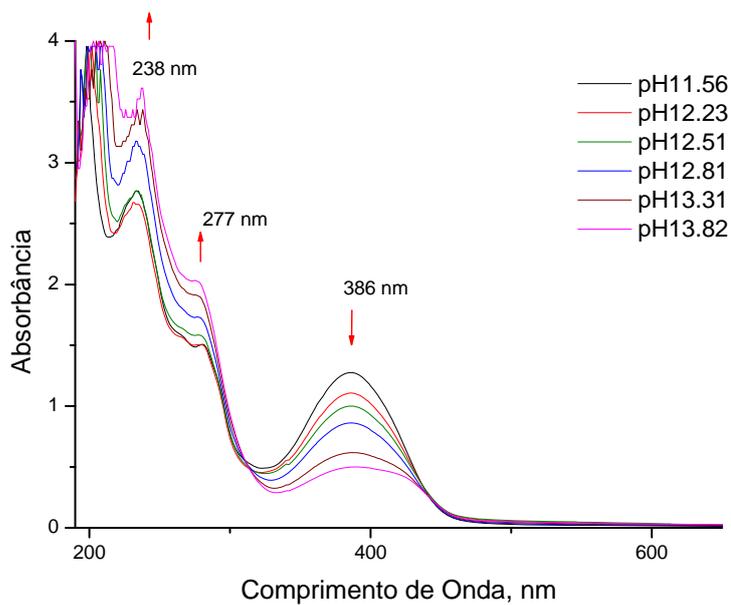


Figura 28. Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$ 0,15 mM, em solução aquosa, com variação de pH após adição de base.

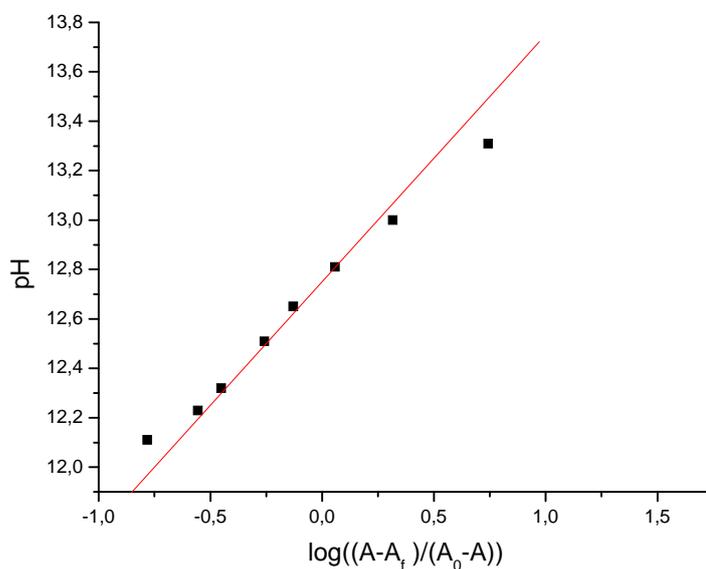


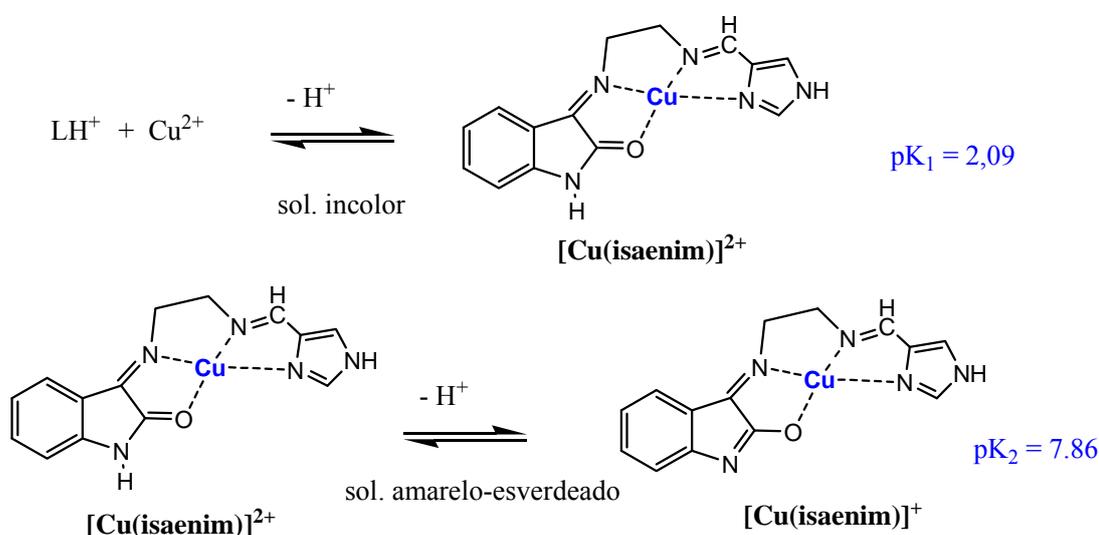
Figura 29. Gráfico do pH *versus* $\log((A - A_f)/(A_0 - A))$, em $\lambda = 386$ nm, para a determinação do pK_{a3} do complexo (4).

A Tabela 7 mostra os valores de pK_a determinados para o composto.

Tabela 7. Valores de pK_a determinados para o composto (4).

Composto $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$	
pK_{a1}	2,09
pK_{a2}	7,86
pK_{a3}	12,75

Esses valores de pK_a foram calculados a partir da proposição dos seguintes equilíbrios (Figura 30):

**Figura 30.** Equilíbrios ácido/base envolvidos no composto (4).

O primeiro equilíbrio refere-se à formação do complexo na forma ceto, a partir do ligante protonado e do íon metálico, o segundo é explicado pelo equilíbrio ceto-enólico do ligante coordenado, que também foi observado por EPR. A partir do $\text{pH} = 10$ inicia-se a formação de um precipitado branco, que se verificou tratar-se de carbonato de sódio, Na_2CO_3 . Isso é um indicativo de que está ocorrendo degradação do composto e do anel de isatina.

Analogamente, os valores de pK_a também foram determinados para os complexos $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, que foram de 8,94 e 7,90, respectivamente (Figura 31 e Figura 32).

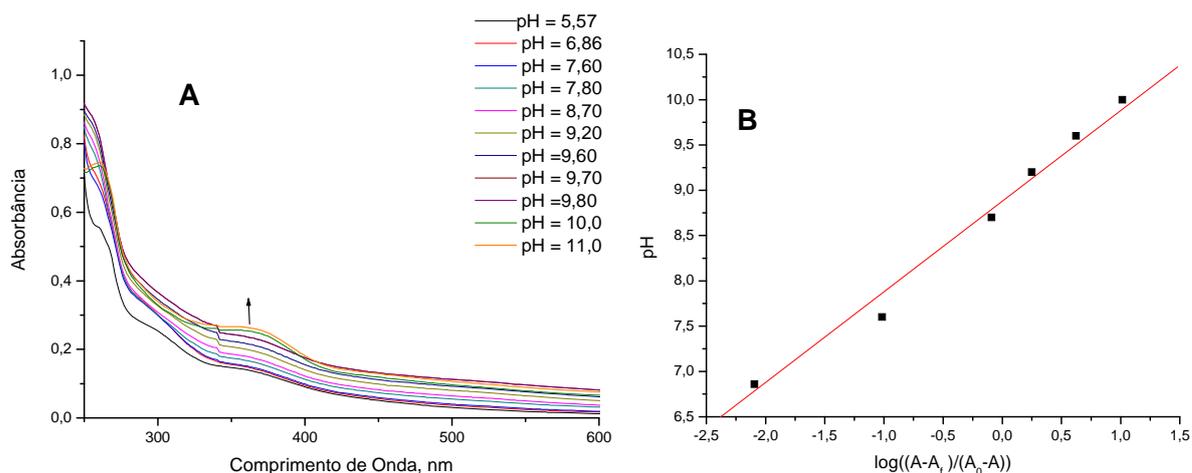


Figura 31. A) Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$ 0,15 mM, em solução aquosa, com variação de pH após adição de base. B) Gráfico do pH *versus* $\log((A - A_f)/(A_0 - A))$, em $\lambda = 360$ nm, para a determinação do pK_a do complexo (1).

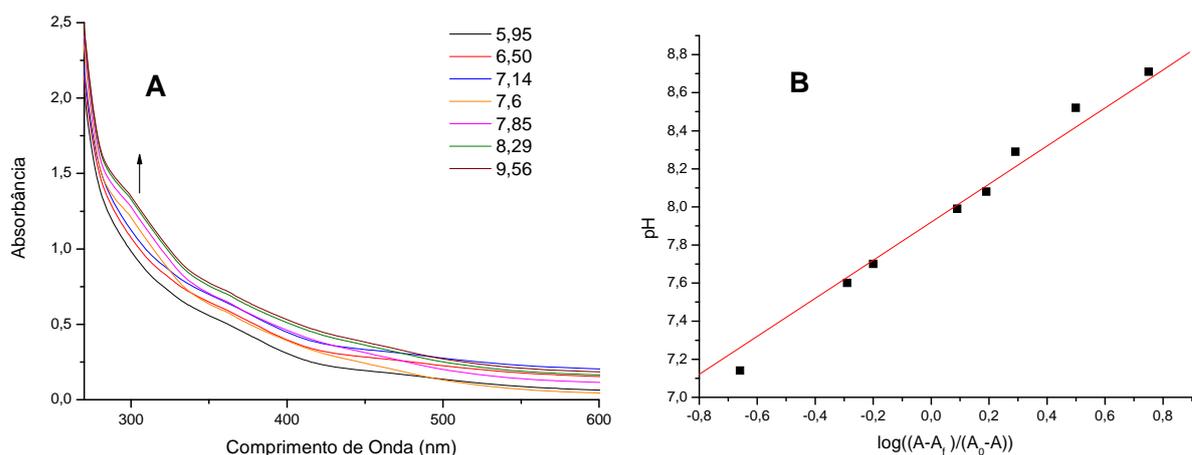


Figura 32. A) Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ 0,15 mM, em solução aquosa, com variação de pH após adição de base. B) Gráfico do pH *versus* $\log((A - A_f)/(A_0 - A))$, em $\lambda = 301$ nm, para a determinação do pK_a do complexo (2).

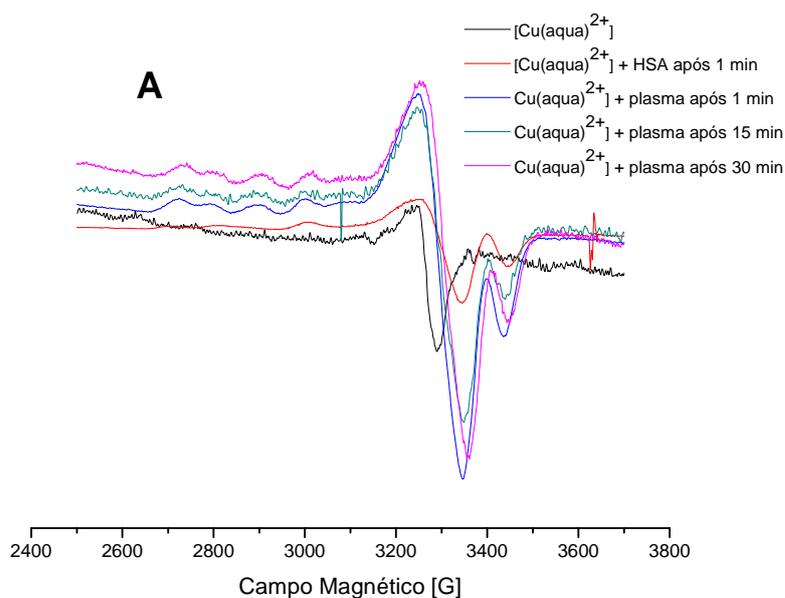
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE II - *Implicações em Processos Biológicos*

II – 4.1. Espectros EPR com Albumina Humana e Plasma Humano

Como a albumina é a proteína mais abundante do plasma sanguíneo e os íons de cobre(II) interagem facilmente com ela, foi feito um estudo de interação entre os compostos sintetizados e a proteína ou plasma. Pretendia-se também comparar se os parâmetros observados no plasma correspondiam aos parâmetros obtidos com a albumina humana isolada, isto é, se a albumina era a principal proteína, presente no plasma, para interação com os complexos de cobre estudados. Além disso, este experimento permitiu verificar se a presença dos ligantes ao redor do cobre(II) causava uma modificação na interação do cobre com a proteína, pois como comparação foi usado o sal $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$.

A concentração da albumina usada foi de 0,6 mM, ou seja, aproximadamente a mesma concentração em que é encontrada no plasma sanguíneo. As condições experimentais utilizadas foram: $[\text{HSA}] = 0,60 \text{ mM}$ e $[\text{CuL}] = 600 \text{ }\mu\text{M}$, portanto na proporção 1:1 metal/proteína. A Figura 33 mostra os espectros de EPR obtidos e a Tabela 8 os parâmetros correspondentes medidos.



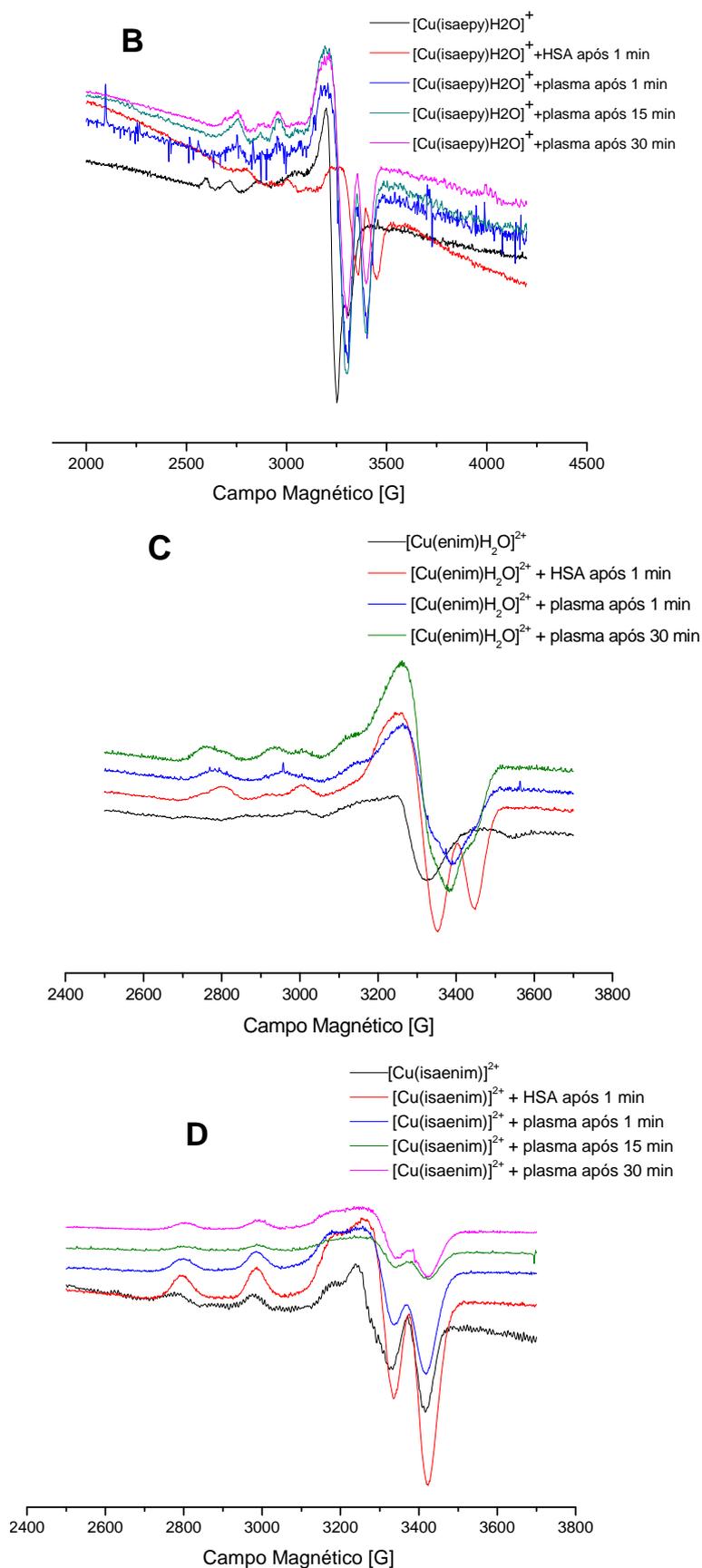


Figura 33. Espectros de EPR da interação entre os complexos e proteínas no plasma, a 77K. A) $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$; B) $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$; C) $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$; D) $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$.

Tabela 8. Parâmetros medidos nos espectros de EPR da interação entre os complexos e proteínas, a 77K. (NO = não observado)

$[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$							
	$^1A_{//}$ (G)	$g_{//}$	$^2A_{//}$ (G)	$g_{//}$	$^3A_{//}$ (G)	$g_{//}$	g_{\perp}
CuL	125	2,421	NO		NO		2,082
HSA após 1min	NO		205	2,170	NO		2,065
Plasma após 1 min	NO		205	2,187	171	2,255	2,065
Plasma após 15 min	NO		205	2,165	171	2,264	2,060
Plasma após 30 min	NO		205	2,173	171	2,249	2,060

$[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$					
	$^1A_{//}$ (G)	$^1g_{//}$	$^2A_{//}$ (G)	$^2g_{//}$	g_{\perp}
CuL	180	2,268	NO		2,061
HSA após 1min	182	2,258	205	2,175	2,055
Plasma após 1 min	182	2,255	203	2,176	2,055
Plasma após 15 min	182	2,255	203	2,175	2,055
Plasma após 30 min	182	2,258	203	2,171	2,055

$[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$							
	$^1A_{//}$ (G)	$^1g_{//}$	$^2A_{//}$ (G)	$^2g_{//}$	$^3A_{//}$ (G)	$^3g_{//}$	g_{\perp}
CuL	182	2,257	NO		NO		2,075
HSA após 1min	182	2,257	203	2,166	NO		2,055
Plasma após 1 min	NO		203	2,166	174	2,219	2,055
Plasma após 15 min	NO		203	2,167	174	2,219	2,055
Plasma após 30 min	NO		203	2,166	174	2,219	2,055

$[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$			
	$^1A_{//}$ (G)	$^1g_{//}$	g_{\perp}
CuL	196	2,201	2,097
HSA após 1min	192	2,203	2,054
Plasma após 1 min	192	2,205	2,054
Plasma após 15 min	192	2,204	2,055
Plasma após 30 min	192	2,204	2,055

O primeiro sinal detectado com parâmetro $^1A_{//}$ refere-se à interação do cobre com seus respectivos ligantes na presença de tampão fosfato pH = 7,4. De acordo com os dados obtidos nesses espectros de EPR, pode-se observar que para alguns compostos dos surge um novo sinal com parâmetro $^2A_{//}$ de aproximadamente 206 G quando se adiciona HSA, com simultânea modificação do parâmetro $g_{//}$. Este segundo sinal pode ser atribuído à interação do cobre com os sítios da albumina, já que os mesmos parâmetros também foram observados no

experimento com $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ e HSA. Os valores encontrados estão próximos aos valores da literatura de $A_{//} = 200 \text{ G}$ e $g_{//} = 2,18$ [150]. Estes parâmetros são típicos de Cu(II)-HSA, onde o Cu(II) está ligado aos quatro nitrogênios de resíduos de aminoácidos na região amino terminal da proteína em uma geometria aproximadamente quadrado planar [151, 152].

Além disso, quando o experimento foi realizado em presença do plasma, surgiu um novo sinal com ${}^3A_{//}$ de aproximadamente 171 G e $g_{//} = 2,22 - 2,26$. Este novo sinal surgiu logo após a adição do plasma somente no caso de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ e do composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$. Este terceiro sinal pode indicar que o cobre esteja se ligando em outra proteína do plasma, como a ceruloplasmina, ou até mesmo em outro sítio da albumina.

O composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$ apresentou somente o sinal com parâmetro A de 206 G e g de 2,055, após adição da HSA ou do plasma, indicando provavelmente interação do cobre apenas com a HSA no sítio I.

No caso do $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$, praticamente não houve modificação na região de $g_{//}$ do espectro EPR, o que indica que não houve mudança drástica na vizinhança do metal, ao se adicionar a proteína ou o plasma. Pode ter acontecido de o ligante não ter sido substituído neste caso, ou de ter-se formado um complexo misto, com o ligante e um grupo da proteína coordenados.

II – 4.2. Interação dos Complexos de Cobre(II) com Proteína através de SDS-PAGE

Para verificar se o sinal observado de aproximadamente 174 G e $g = 2,22 - 2,26$ no EPR refere-se à interação dos compostos com outras proteínas do plasma, realizou-se gel de proteína unidimensional (Figura 34). Se houver alguma mudança de peso molecular, de outra espécie que não a albumina, a interação com uma segunda proteína do plasma pode ser confirmada.

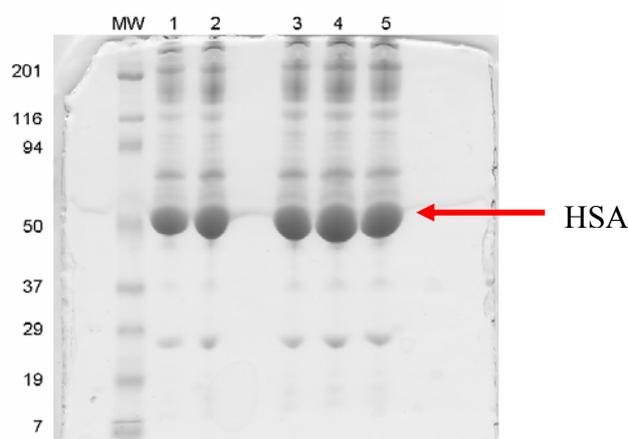


Figura 34. SDS-PAGE, com gel separador de poliacrilamida de 12%, dos compostos de cobre e plasma, $[\text{CuL}] = 600 \mu\text{M}$, (Cu/HSA 1:1), incubados em banho-maria por 30 minutos, a $37,0^\circ\text{C}$.

MW: Marcador de massa molecular, Broad Range BioRad.

Canaleta 1: plasma sanguíneo.

Canaleta 2: plasma + $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$.

Canaleta 3: plasma + $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$.

Canaleta 4: plasma + $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$.

Canaleta 5: plasma + $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$.

Através do gel de proteínas obtido não foi possível observar nenhuma modificação em outras proteínas do plasma, isto é, com diferentes massas molares. Somente foi observada uma leve modificação na banda correspondente ao peso molecular da albumina, conforme a seta indica no gel acima. Portanto, parece que os complexos de cobre interagem preferencialmente com a HSA. Também se percebe na análise deste gel que os compostos parecem interagir mais com a proteína (manchas maiores), indicando talvez a presença dos respectivos ligantes.

II – 4.3. Interação dos Complexos de cobre (II) com HSA em Função do Tempo

Como o resultado do SDS-PAGE foi negativo, isto é, indicou que fundamentalmente os complexos de cobre estudados interagem preferencialmente com a albumina, resolveu-se investigar se o sinal observado no EPR estava relacionado com algum outro sítio da albumina e se dependia do tempo de interação dos compostos. As condições experimentais utilizadas foram: $[\text{HSA}] = 600 \mu\text{M}$; $[\text{CuL}] = 600 \mu\text{M}$; portanto na proporção 1:1 de metal/proteína. Utilizou-se a mesma proporção e temperatura que foi usada anteriormente, porém os espectros foram registrados após 20 minutos de incubação.

A Figura 35 mostra os espectros de EPR obtidos e a Tabela 9 os respectivos parâmetros medidos.

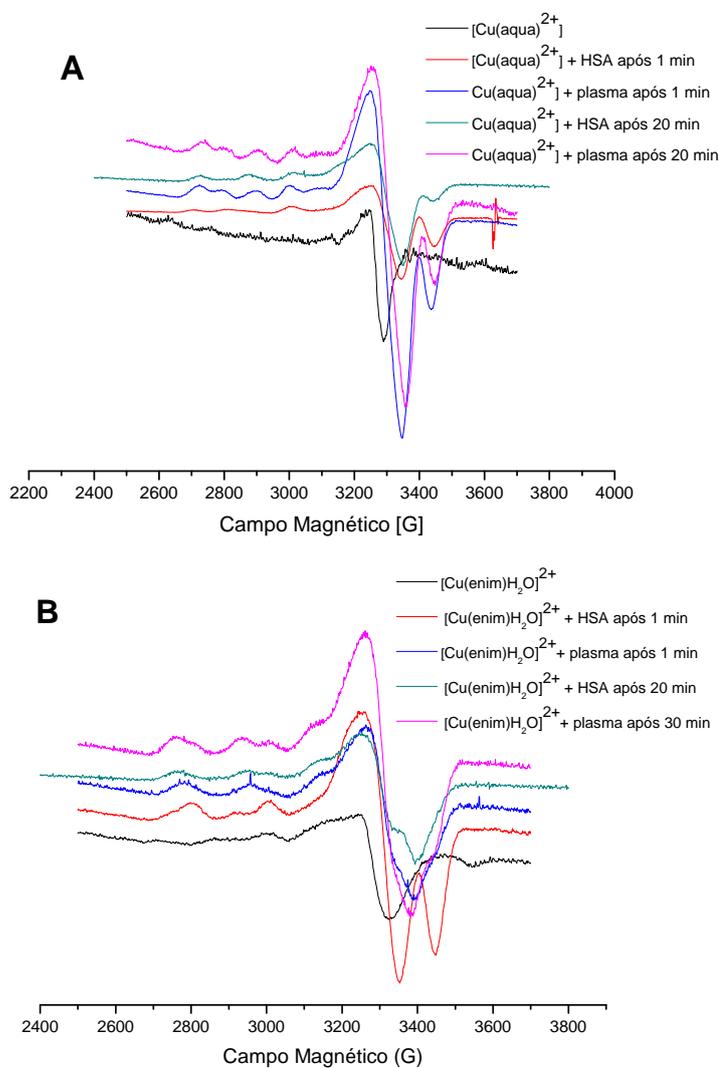


Figura 35. Espectros de EPR da interação dos complexos: A) $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ e B) $[\text{Cu}(\text{enin})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ com a albumina, após 20 min de incubação a 37°C , registrados a 77K.

Tabela 9. Parâmetros medidos nos espectros EPR dos complexos $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ em presença da albumina após 20 min de incubação, registrados a 77K.

$[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$							
	$^1A_{//}$ (G)	$^1g_{//}$	$^2A_{//}$ (G)	$^2g_{//}$	$^3A_{//}$ (G)	$^3g_{//}$	g_{\perp}
CuL	125	2,421	NO		NO		2,082
HSA após 1 min	NO		205	2,170	NO		2,065
HSA após 20 min	NO		205	2,187	174	2,255	2,060
Plasma após 1 min	NO		205	2,165	171	2,264	2,060
Plasma após 20 min	NO		205	2,173	171	2,249	2,060

$[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$							
	$^1A_{//}$ (G)	$^1g_{//}$	$^2A_{//}$ (G)	$^2g_{//}$	$^3A_{//}$ (G)	$^3g_{//}$	g_{\perp}
CuL	182	2,257	NO		NO		2,075
HSA após 1 min	182	2,257	203	2,166	NO		2,055
HSA após 20 min	NO		203	2,258	174	2,219	2,055
Plasma após 1 min	NO		203	2,167	174	2,219	2,055
Plasma após 20 min	NO		203	2,166	174	2,219	2,055

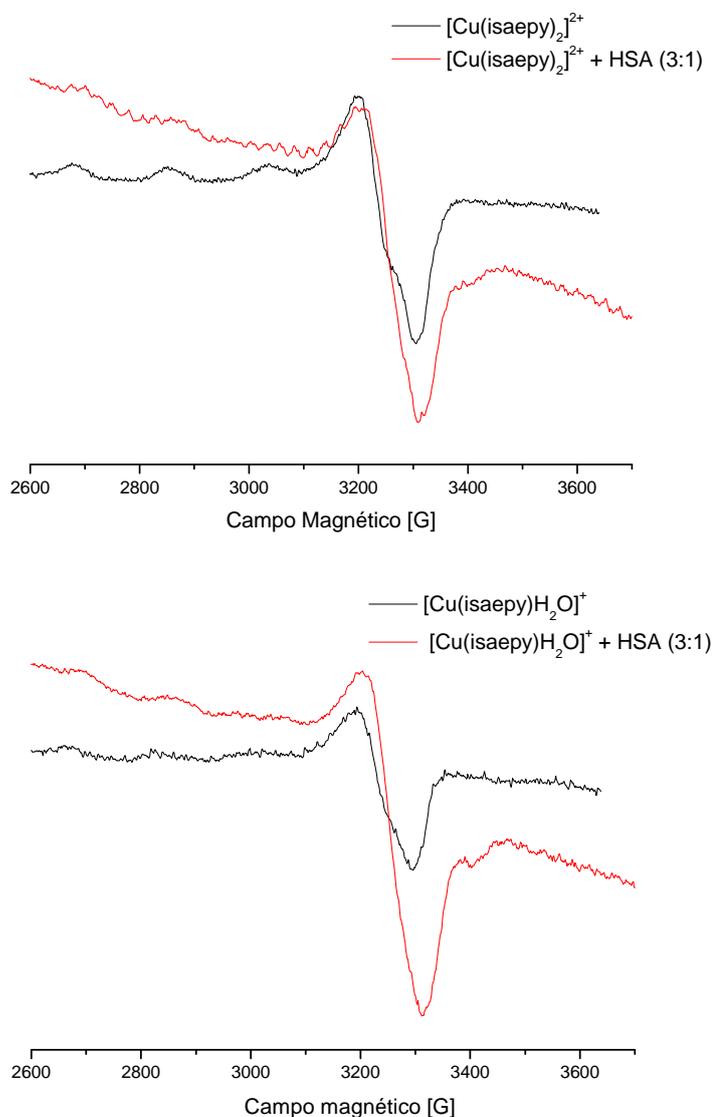
O sinal com parâmetro de 174 G, observado em interações com o plasma, também foi observado com a HSA no caso dos dois compostos, após 20 minutos de incubação. Isto indica que este parâmetro refere-se à interação ou inserção do cobre em outro sítio da albumina e que esta interação é dependente do tempo, e que não se refere provavelmente à interação com outra proteína do plasma. Este parâmetro também foi observado por Greenaway e colaboradores [61] e foi associado a espécies adicionais de Cu(II)-HSA em sítios não específicos da proteína. Entretanto, estes autores observaram este parâmetro quando foi adicionado mais de um equivalente molar de cobre(II) à HSA. Em nosso trabalho este sinal foi detectado em proporções estequiométricas 1:1, após 20 minutos de incubação com a proteína.

Os parâmetros de EPR com valores aproximados de $A_{//} = 205$ G e $g_{//} = 2,17$ são consistentes com a coordenação de quatro átomos de nitrogênio ligantes ao cobre, no sítio N-terminal da proteína, específico para esse íons. Os parâmetros adicionais apresentaram um valor de $g_{//}$ maior e um valor de $A_{//}$ menor que o parâmetro anterior, indicando que o cobre está coordenado através da combinação de átomos de nitrogênio e oxigênio da proteína [153]. Bal e colaboradores [154] obtiveram os parâmetros de EPR com valores aproximados de $A_{//} = 166$ G e $g_{//} = 2,29$ para o cobre ligado ao segundo sítio da albumina, e sugeriram uma coordenação do metal por dois átomos de nitrogênio e quatro de oxigênio, numa geometria

tetragonal. Além disso, afirmaram que neste sítio não está envolvido o resíduo de Cys – 34, já que os parâmetros continuaram sendo observados após a utilização do complexo de ouro Et_3PAuCl , sendo que este complexo de ouro é conhecido por bloquear a Cys – 34.

O estudo de EPR com o composto $[\text{Cu}(\text{pyrpn})]$ foi feito somente com a albumina. A proporção utilizada também foi $[\text{CuL}]:[\text{HSA}]$ 1:1. Posteriormente, além da proporção 1:1 o estudo também foi feito na proporção $[\text{CuL}]:[\text{HSA}]$ 3:1 para verificar se ocorreria interação em outro sítio da albumina com excesso de complexo. Com esta proporção, todos os complexos foram analisados.

A Figura 36 mostra os espectros de EPR obtidos com cada um dos complexos e na Tabela 10 são listados os respectivos parâmetros medidos.



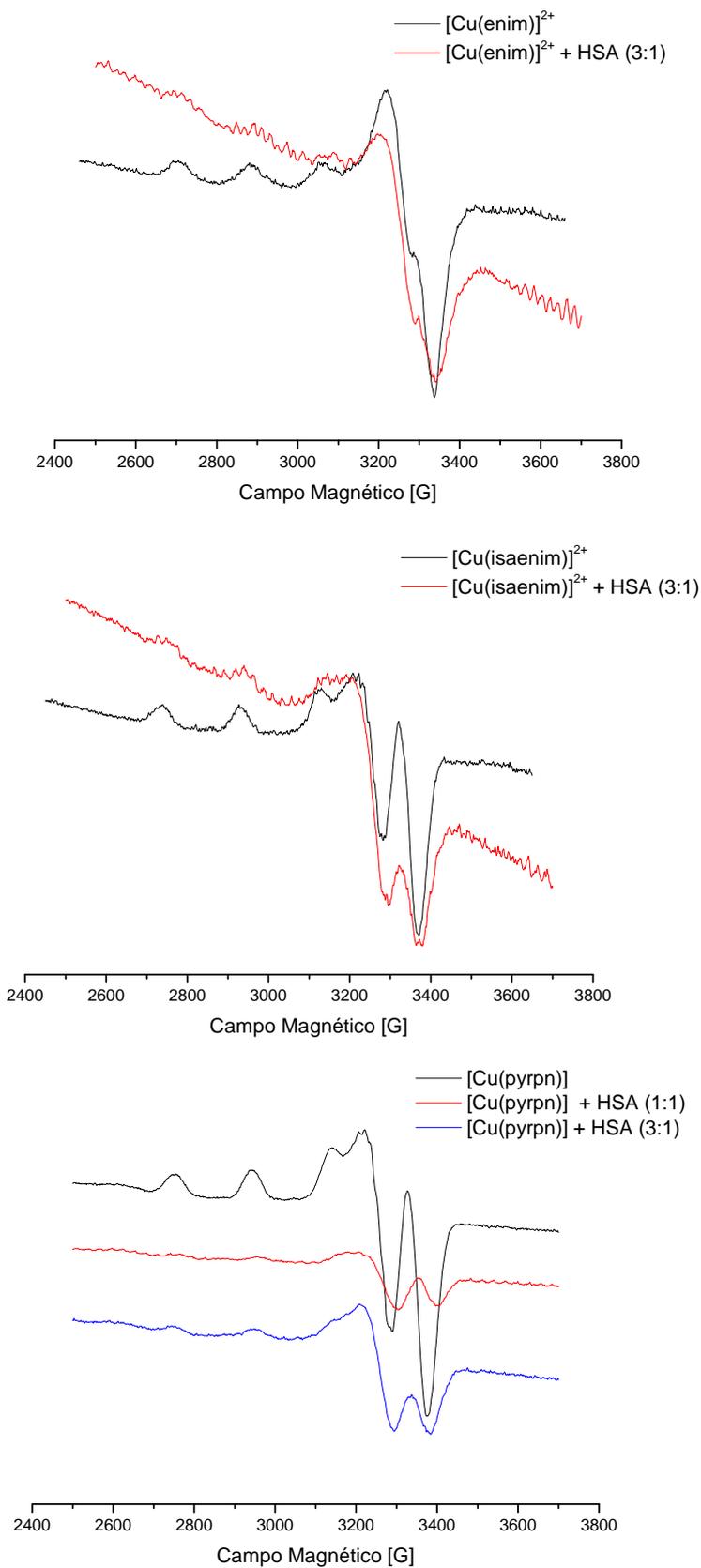


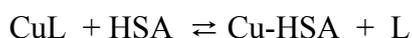
Figura 36. Espectros de EPR da interação entre os complexos e proteínas no plasma, a 77K, após 30 minutos de incubação.

Tabela 10. Parâmetros medidos dos espectros de EPR da interação entre os complexos e a proteína HSA, a 77K, após 30 minutos de incubação. # Valores obtidos da Tese de Doutorado de M. P. Abbott [155]

	CuL			CuL:HSA 1:1			CuL:HSA 3:1		
	A//(G)	g//	g _⊥	A//(G)	g//	g _⊥	A//(G)	g//	g _⊥
[Cu(H ₂ O) ₄] ²⁺	125	2,421	2,082	205	2,187	2,060	190	2,321	2,060
				174	2,255				
[Cu(isaepy) ₂] ²⁺ #	178	2,257	2,059	206	2,248	2,054	180	2,281	2,060
				171	2,209				
[Cu(isaepy)H ₂ O] ⁺	180	2,268	2,061	203	2,166	2,055	176	2,264	2,056
[Cu(enim)] ²⁺	182	2,257	2,055	203	2,258	2,055	205	2,262	2,055
				174	2,219				
[Cu(isaenim)] ²⁺	196	2,201	2,097	192	2,204	2,055	196	2,221	2,055
[Cu(pyrpn)]	194	2,215	2,058	205	2,198	2,052	205	2,202	2,053

De acordo com os dados obtidos nesses espectros de EPR, pode-se observar que para o composto [Cu(pyrpn)] também surge um novo sinal com parâmetro A// de aproximadamente 205 G quando se adiciona HSA, com simultânea modificação do parâmetro g. Este sinal pode ser atribuído à interação do cobre provavelmente com o sítio N-terminal da albumina HSA, já que os mesmos parâmetros também foram observados no experimento com [Cu(H₂O)₄]²⁺ e também para outros compostos da mesma série, na proporção 1:1 [metal]/[albumina].

O espectro dos compostos [Cu(pyrpn)] e [Cu(enim)]²⁺ continuam com os mesmos parâmetros quando a proporção é de [CuL]:[HSA] 3:1, o que indica que provavelmente a interação do cobre é no mesmo sítio I, região N-terminal. No caso de outros compostos da série, [Cu(isaepy)H₂O] e [Cu(isaepy)₂], o sinal com A// de aproximadamente 205 desaparece, ao utilizar excesso dos compostos (3:1), predominando um novo sinal, com A// = 180 G e g// = 2,281, aproximadamente, que parece ser comum aos compostos estudados. Isto pode ser explicado pela formação de uma terceira espécie, correspondente à inserção do cobre em um segundo sítio da proteína, além das espécies [CuL] e [Cu-HSA], no equilíbrio:



No caso do [Cu(isaenim)]²⁺, os resultados não apresentaram nenhuma modificação no espectro EPR com qualquer proporção [CuL]:[HSA], o que indica que não houve mudança na

vizinhança do metal, ao se adicionar a proteína. Pode ter acontecido de o ligante não ser substituído, neste caso.

II – 4.4. Estabilidade Termodinâmica: Medidas de Dicroísmo Circular

A estabilidade termodinâmica dos complexos de cobre(II) pode ser estudada através da 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 por uma molécula opticamente ativa, produzindo então um espectro característico. Esta técnica é muito empregada no estudo de mudanças conformacionais, vizinhanças locais, interações de ligantes com proteínas e também como uma estimativa qualitativa da estrutura secundária da proteína [156].

Neste experimento, utilizou-se a albumina humana (HSA), um quelante fisiológico eficiente para cobre. A ligação do cobre(II) à albumina proporciona uma mudança das transições eletrônicas observadas próximas à região de 564 nm. A amplitude dessa banda característica negativa de Cotton corresponde à formação de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{HSA})]$ e é diretamente proporcional à sua concentração [145].

A HSA foi titulada com quantidades crescentes dos compostos de cobre e a estabilidade termodinâmica foi deduzida, através das respectivas constantes de estabilidade, a partir da regressão linear da amplitude do CD a 564 nm em função da concentração de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{HSA})]$.

A capacidade de competição entre as bases de Schiff e a albumina humana na coordenação de íons cobre(II) foi comparada, para determinar a correspondente constante de estabilidade levando-se em conta os seguintes equilíbrios [145]:



A partir destes equilíbrios foi possível calcular a constante de estabilidade relativa (β) para cada complexo de cobre(II), como se segue:

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

onde:

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

$$[\text{Cu(II)L}] = [\text{Cu(II)}]_o - [\text{Cu(II)HSA}]$$

$$[\text{HSA}] = [\text{HSA}]_o - [\text{Cu(II)HSA}]$$

Utilizando os espectros CD obtidos com o composto $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ como referência, foi possível construir um gráfico de equação linear da amplitude dicróica, medida após cada adição, em função da concentração do complexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ em 564 nm, supondo que todo o cobre tenha se ligado à proteína. Através da equação da reta foi possível calcular o valor de $[\text{Cu(II)HSA}]$ após cada adição do composto de cobre, pois:

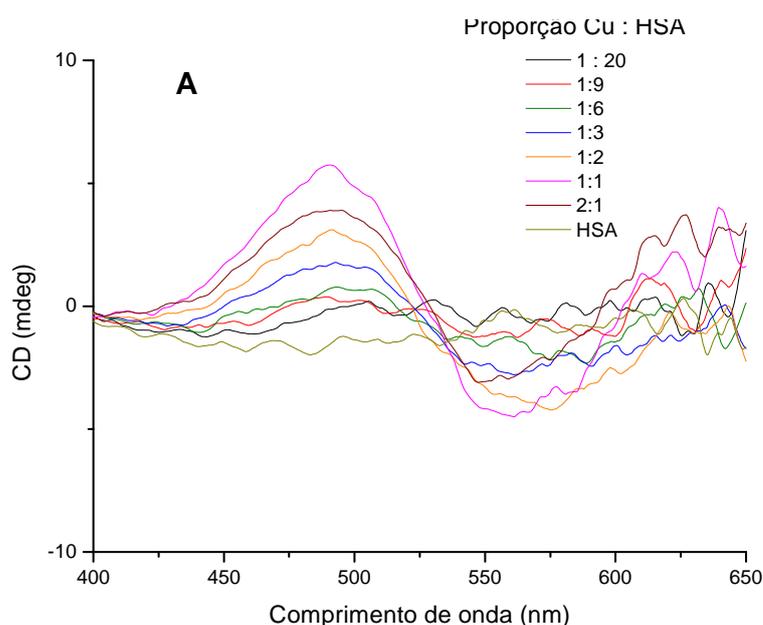
$$y = ax + b$$

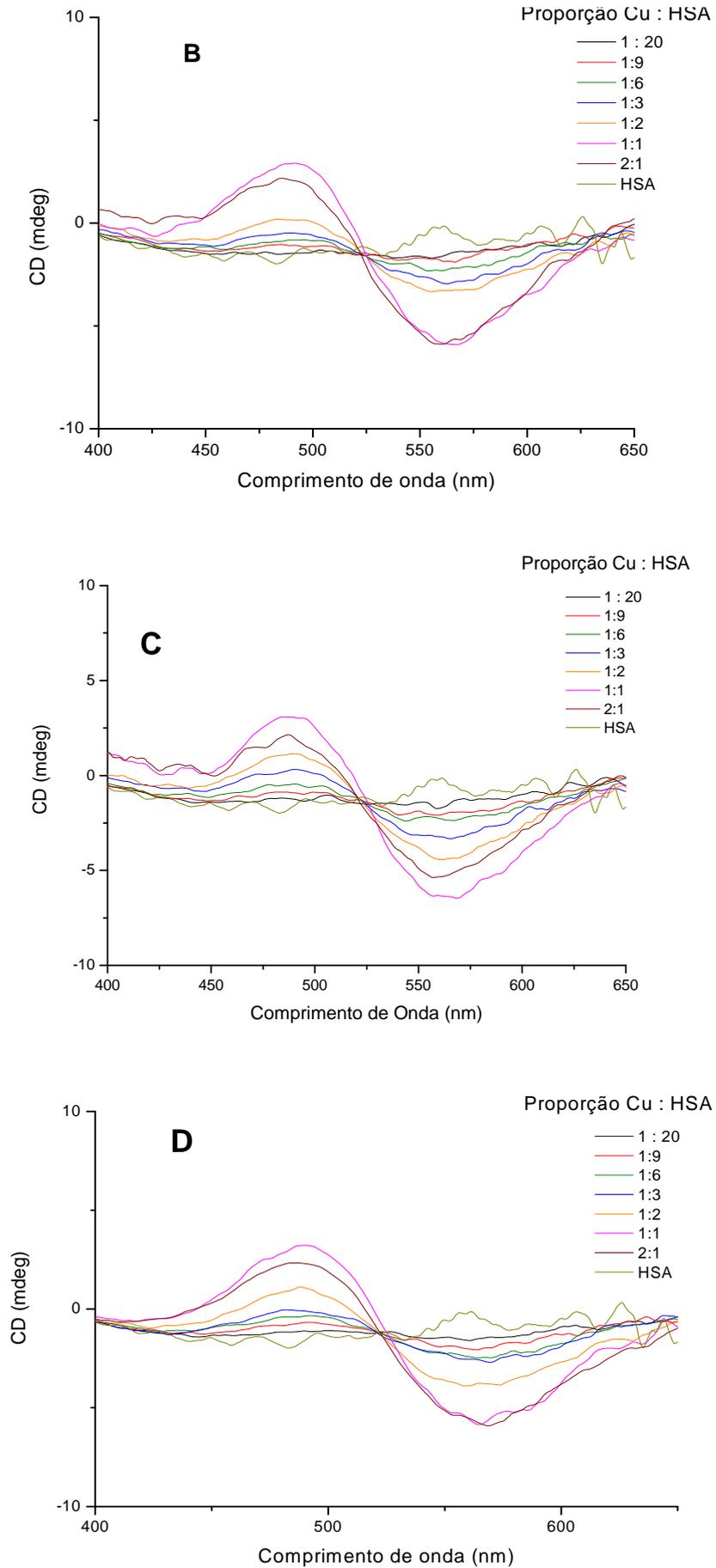
onde: $y = [\text{Cu(II)HSA}] \cong L$ e $x =$ amplitude dicróica

Para cada ponto teremos um valor de y que fornecerá um valor de β_{rel} , e assumindo que $\log K = 16,2$ para $[\text{Cu(II)HSA}]$ [145] obteremos um valor médio de $\log K$ para cada composto de cobre(II).

Para todos os compostos, observou-se uma amplitude dicróica negativa em 564 nm da banda de Cotton característica. Esse conjunto de bandas positivas e negativas na região do visível é associada à ligação de íons cobre(II) no sítio N-terminal da albumina (sítio I), referente à transição d-d do Cu(II) coordenado ao sítio I da proteína.

A Figura 37, de A a F mostra os espectros de CD obtidos para os complexos de cobre(II) estudados.





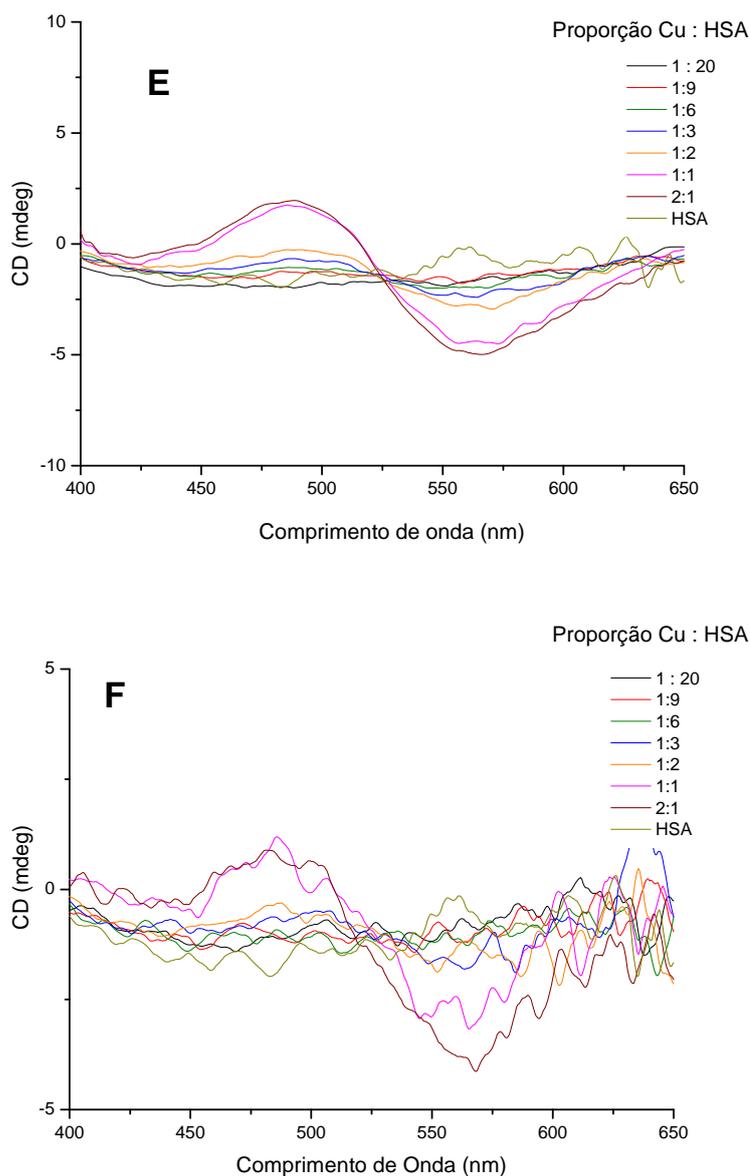


Figura 37. Espectro de CD da titulação de HSA (0,6 mM) com os compostos A) $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$; B) $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$; C) $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{+2}$; D) $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$; E) $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$; F) $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ em tampão fosfato/NaCl de pH = 7,4; a temperatura ambiente; na região do visível

As bandas atribuídas ao cobre no sítio I da proteína nos experimentos de CD podem ser relacionadas às bandas observadas nos espectros EPR quando se estudou a interação do cobre com a albumina através desta técnica [154] (Tabela 11).

Tabela 11. Bandas de interação do cobre no sítio I da albumina observadas por CD e por EPR, na literatura [154].

HSA	SÍTIO I			
	CD		EPR	
	λ	ΔE	$g_{//}$	$A_{//}$
	562	- 0,53	2,18	211
	480	+ 0,40		
	306	+ 0,72		

Todos os compostos apresentaram um sinal com parâmetros análogos a estes no espectro EPR.

A curva analítica para $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ encontra-se na Figura 38 e a Tabela 12 mostra as constantes relativas de estabilidade, calculadas para os demais compostos.

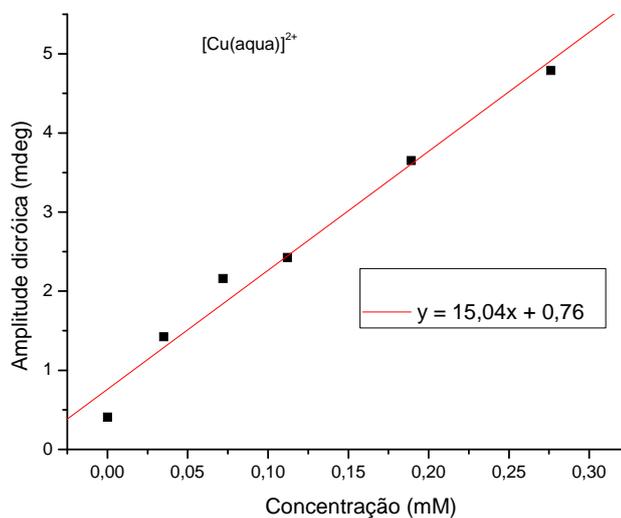


Figura 38. Curva analítica da amplitude dicróica, em 564 nm, *versus* concentração para o composto $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$.

Tabela 12. Valores de constantes de estabilidade relativas, determinadas para os compostos de cobre em experimentos competitivos com a HSA.

Composto	log K
$[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$	16,2
$[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{+2}$	15,7
$[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$	16,2
$[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$	16,7
$[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$	18,1

Os compostos apresentaram constantes da mesma ordem de grandeza que a constante de formação da espécie $[\text{Cu}(\text{HSA})]$ indicando que o cobre coordenado aos ligantes imínicos possui estabilidade semelhante à da espécie cobre-albumina. Assim, em meio biológico podem ser transportados no plasma, coordenados em parte a seu ligante inicial, apesar de se distribuírem parcialmente entre este ligante e a albumina.

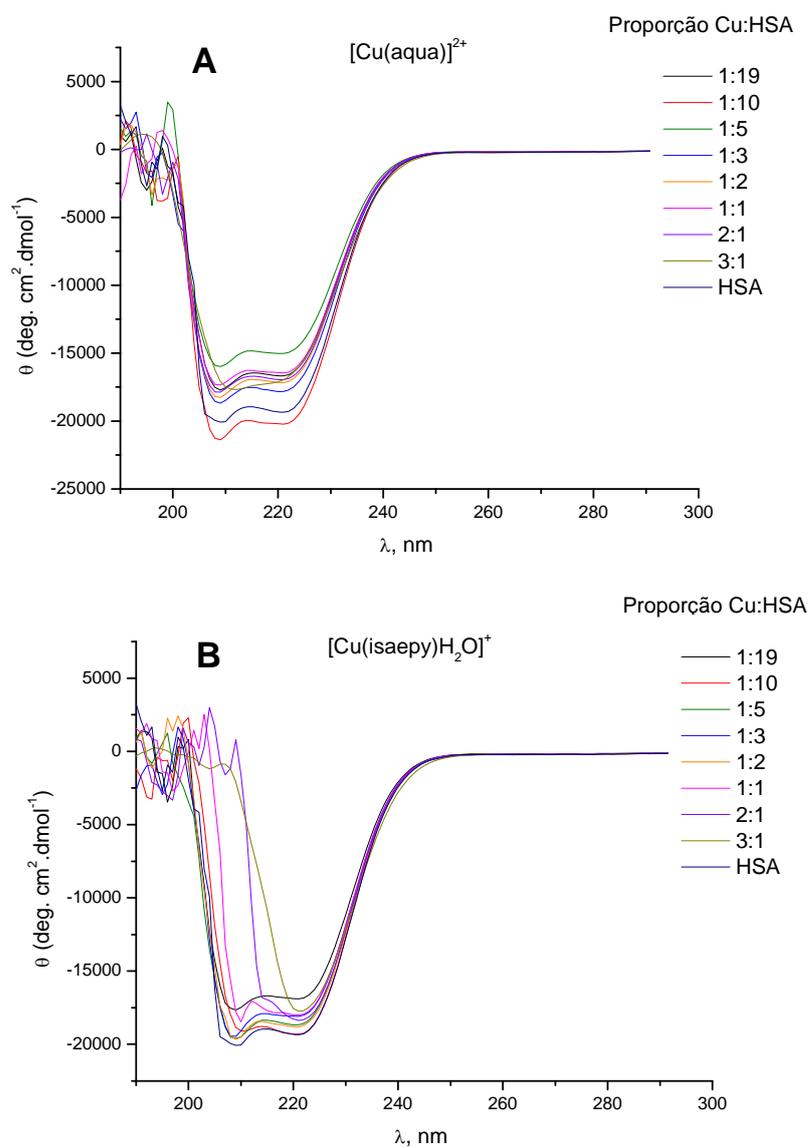
II – 4.5. Modificação na Estrutura Secundária da HSA: Medidas de Dicroísmo Circular

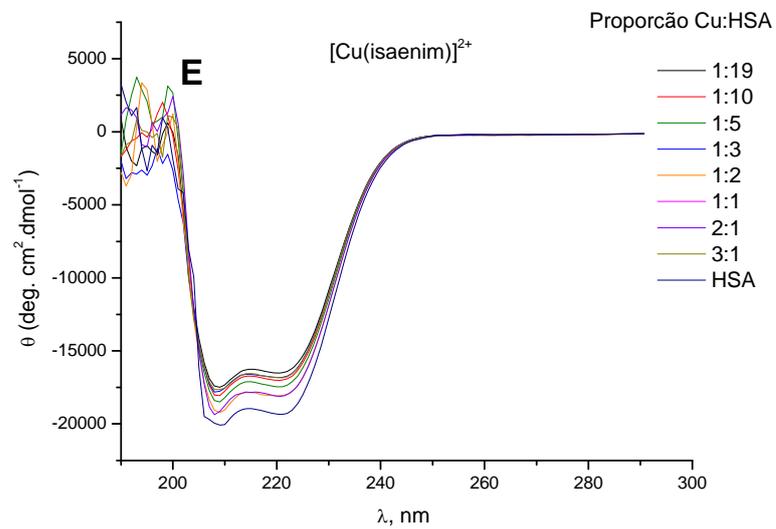
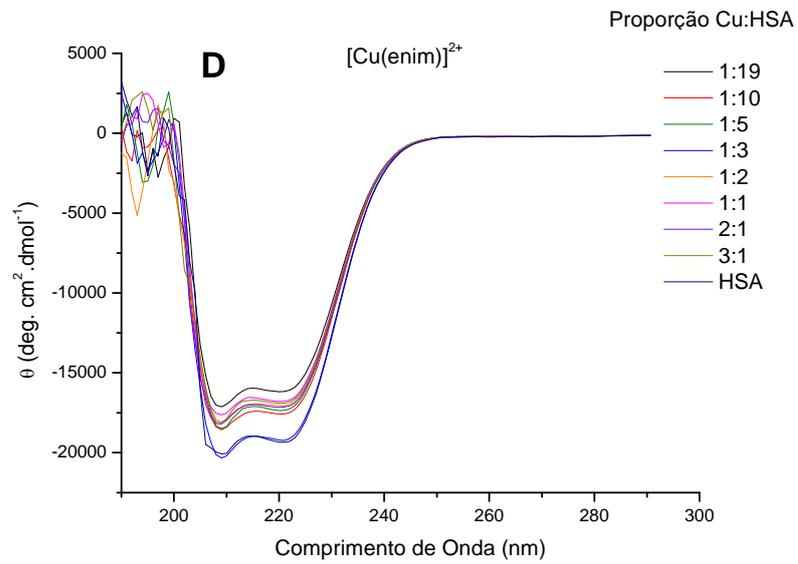
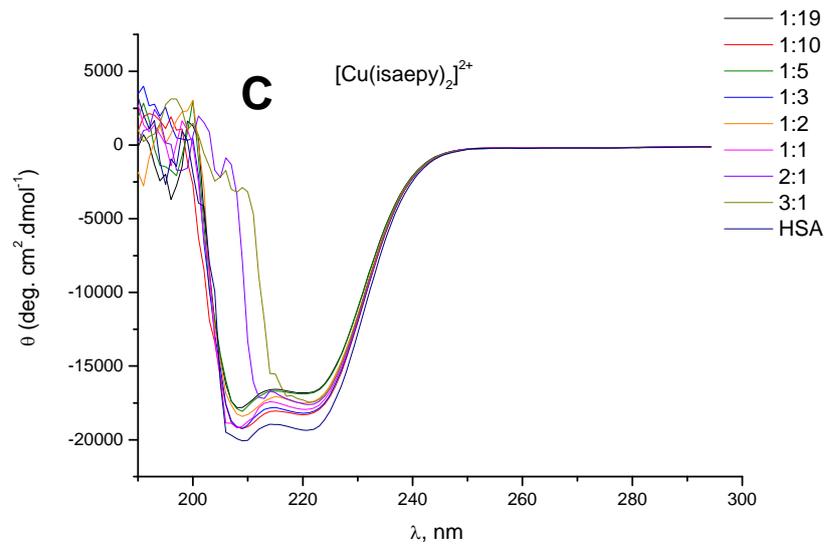
Na região de 190 a 250 nm, observa-se a variação conformacional da estrutura secundária de proteínas, que pode incluir arranjos de α -hélice, β -folha e conformação randômica. Em uma proteína que apresente alta porcentagem da forma α -hélice, a forma β -folha e a randômica possuem baixa elipsicidade, de aproximadamente - 4000 deg.cm²/dmol, em 208 nm. A α -hélice possui máximo em aproximadamente - 33000 deg.cm²/dmol. O conteúdo de α -hélice poderia então ser calculado a partir da elipsicidade molecular, em 208 nm, usando a equação:

$$\% \alpha\text{-hélice} = \frac{[\theta]_{208} - 4000}{33000 - 4000} \times 100$$

onde 33000 é a elipsidade molecular para 100% de conteúdo α -hélice e 4000 é a elipsicidade molecular para 0% de estrutura α -hélice na proteína [157]. No entanto, esta equação é muito aproximada e, portanto, para melhor análise dos resultados utilizou-se um

algoritmo chamado K2D desenvolvido por Andrade e colaboradores [158]. O experimento foi realizado utilizando concentrações mais baixas de albumina e cubeta de 0,10 cm [131]. De acordo com alguns autores, é necessário que o tampão possua NaCl para manter a força iônica, permitindo que a proteína fique enrolada, isto é, que mantenha sua estrutura secundária usual. Portanto, realizou-se o experimento na presença do tampão fosfato 50 mM contendo NaCl 0,1M uma vez que este tampão já havia sido utilizado, conforme mostrado na Figura 39.





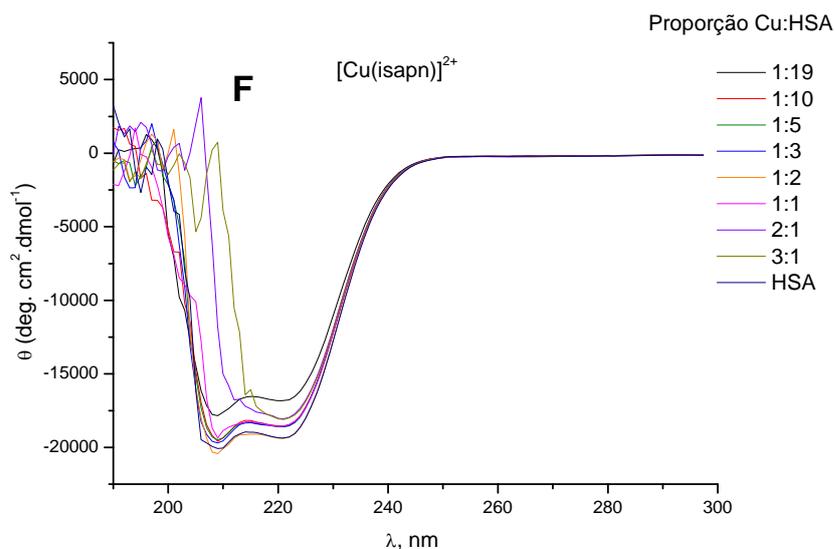


Figura 39. Espectro de CD para monitoramento da estrutura secundária da HSA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) em tampão fosfato 50 mM contendo NaCl 0,1M, com várias concentrações dos compostos: A) $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$; B) $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$; C) $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$; D) $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$; E) $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$; F) $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$.

Em geral, os compostos não causaram uma mudança muito significativa na conformação da proteína. Os compostos **(1)**, **(2)** e **(6)** foram os que mais danificaram ou modificaram a conformação da albumina. À medida que se aumenta a concentração do complexo observa-se uma diminuição acentuada do conteúdo α -hélice e uma diminuição mais branda do conteúdo de β -folha. Para os outros complexos o comportamento foi semelhante ao do complexo cobre-aqua, isto é, uma variação discreta do conteúdo de ambas as estruturas α -hélice e β -folha.

Através dos espectros, pode-se verificar que não houve mudanças na estrutura terciária da albumina humana, já que não houve variações na região de 260 a 280 nm.

A Tabela 13 mostra os percentuais da α -hélice calculados para os compostos, a partir do programa K2D. A porcentagem de estrutura α -hélice calculada para a HSA inicial, antes da adição dos complexos, foi de 63%.

Tabela 13. Porcentagens estimadas para α - hélice da HSA usando o programa K2D, através das curvas de Dicroísmo Circular.

Proporção Cu:HSA	α -HÉLICE					
	$[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$	Composto 1	Composto 2	Composto 3	Composto 4	Composto 6
1:19	56	56	58	57	56	57
1:10	68	62	59	57	56	57
1:5	56	60	58	58	59	60
1:3	56	60	60	62	54	60
1:2	57	60	59	55	59	60
1:1	57	58	59	57	60	56
2:1	56	42	46	57	60	47
3:1	55	39	42	55	57	43

Portanto, através da técnica de dicroísmo circular na região do ultravioleta, foi possível ainda verificar as modificações causadas na estrutura secundária da proteína, moduladas pelo ligante imínico. Apenas um dos compostos, $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$ (**1**) em equilíbrio com o composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ (**2**) no pH fisiológico, foi capaz de perturbar a conformação da proteína.

II – 4.6. Fluorescência dos Complexos de Cobre(II) na Presença de Glutathione (GSH)

A glutathione (GSH, γ -glutamylcysteinylglycine), um tripeptídeo presente em altas concentrações nas células, pode reduzir íons de cobre(II), formando complexos cobre-GSH, que facilitam o transporte e a inserção deste metal in vivo [159]. Por outro lado, em determinadas condições a GSH pode também induzir estresse oxidativo ao reduzir o cobre, iniciando um ciclo redox onde o cobre é re-oxidado pelo oxigênio molecular [136,160].

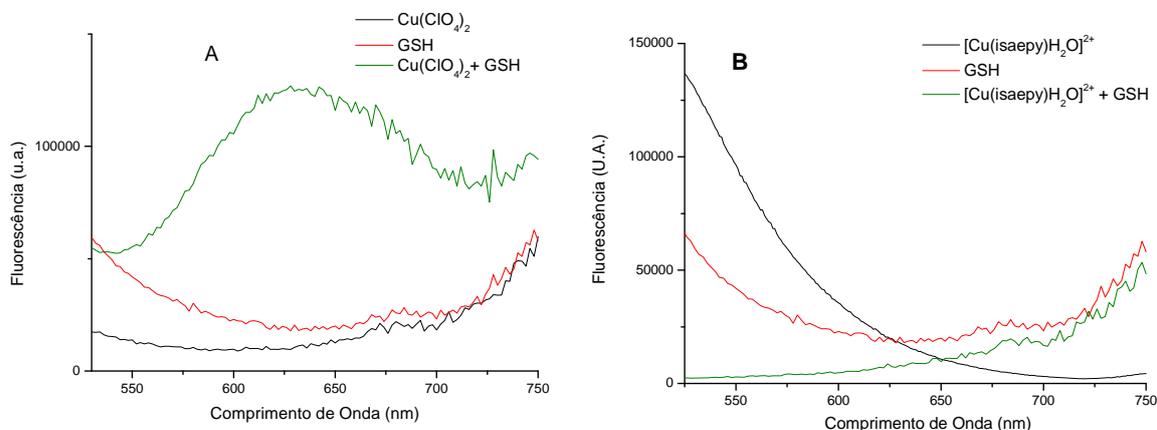
Portanto, em estudos sobre a estabilidade de complexos de cobre no meio biológico, é interessante verificar se estes podem ser reduzidos por redutores biológicos, como a glutathione ou o ácido ascórbico, avaliando-se sua potencialidade em participar de etapas oxidativas posteriores. Se o complexo é reduzido e sofre substituição do ligante pela GSH, o efeito final é de ação antioxidante, já que espécies como $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{GSH})_2]$ são muito estáveis. Porém, se a

redução do metal ocorre, mesmo parcialmente, e o ligante não é substituído, formam-se espécies que em presença de oxigênio têm provavelmente uma ação pró-oxidante, isto é, são capazes de induzir danos oxidativos.

Complexos de cobre(I) com GSH apresentam luminescência característica, com emissão em 640 nm, ao sofrerem excitação em 336 nm devido à ligação cobre(I)-tiolato [136]. Estudos através de medidas de fluorescência dos complexos de cobre(II) estudados, em presença de GSH, permitiram avaliar a extensão da redução do cobre nesses complexos e a subsequente substituição dos ligantes pela glutatona.

Não se observa emissão na faixa de 400 a 750 nm nas soluções dos compostos em tampão fosfato; porém, quando se adiciona glutatona à solução de alguns dos complexos observa-se uma banda característica, com máximo em torno de 630 – 650 nm, num espectro de luminescência típico de cobre(I)-tiolato, indicando uma redução do cobre pela glutatona e subsequentemente uma substituição do ligante imínico [136].

Os respectivos espectros de emissão dos vários compostos estudados são apresentados na Figura 40. Observa-se que os complexos de cobre não emitem em 630 – 650 nm.



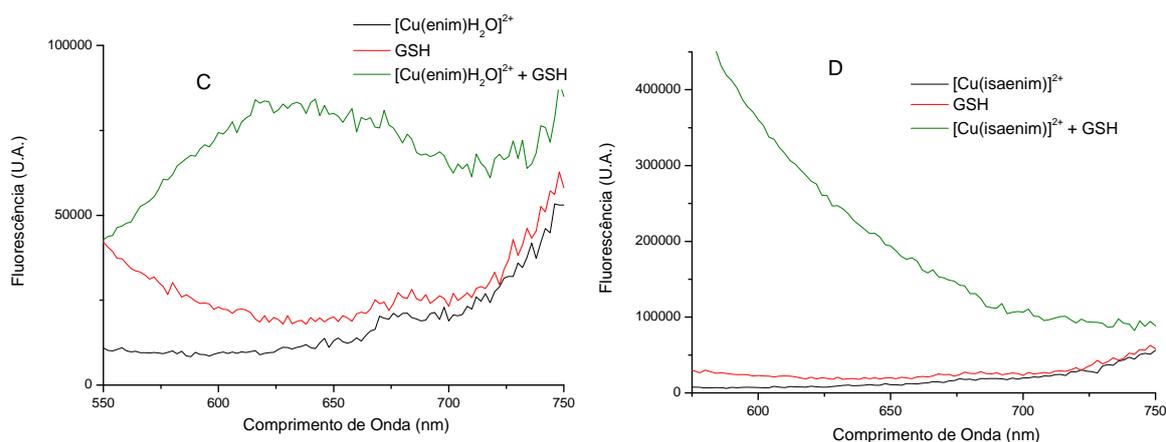


Figura 40. Espectros de emissão dos complexos de cobre (0,5 mM), a 25 °C, na presença ou ausência de GSH (10 mM). A) $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$; B) $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$ (**1**); C) $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (**3**); D) $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$ (**4**).

Quando a glutatona é adicionada ao perclorato de cobre(II), isto é, à espécie cobre-aqua $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, ocorre emissão em 628 nm, característica de cobre(I)-tiolato (Figura 40a). O cobre do composto (**3**) também foi reduzido pela glutatona gerando emissão nesta região (Figura 40c).

De acordo com o gráfico comparativo, observa-se que a banda em 625 nm do perclorato de cobre(II) é mais intensa que a banda do composto (**3**). Isto indica que esse composto não foi totalmente reduzido pela glutatona (Figura 41).

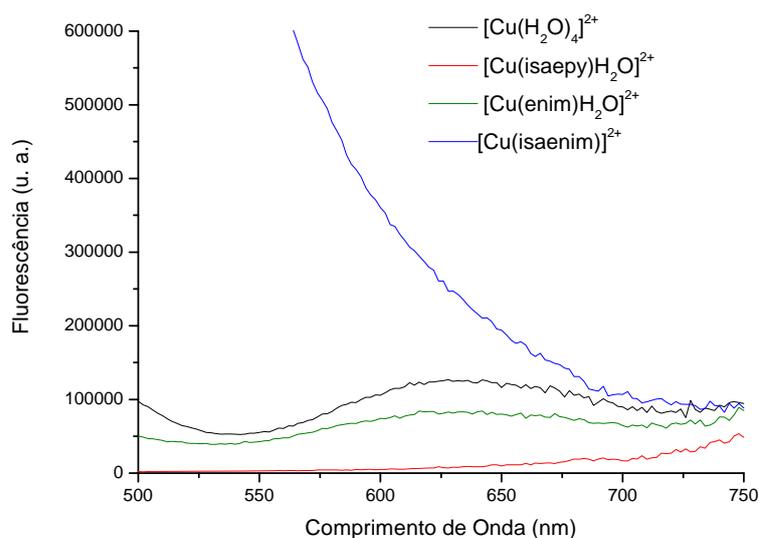
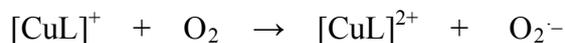


Figura 41. Espectros de emissão dos compostos de cobre (0,5 mM) a 25 °C, após adição de GSH (10 mM).

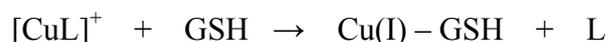
A glutationa possui um potencial de oxidação relativamente alto de 0,24 V em pH = 7,4 e é capaz de causar redução do composto.



O composto pode então ser re-oxidado pelo oxigênio molecular:



Por outro lado, ela pode reagir com o composto reduzido $[\text{CuL}]^+$ substituindo o ligante e gerando o complexo relativamente estável de Cu(I)–GSH, cuja formação pode ser observada pela banda característica no espectro de fluorescência [160].



Dessa maneira podemos concluir que o composto (3), que apresentou a banda em 630 – 650 nm, foi parcialmente reduzido e teve subsequentemente o ligante imínico substituído pela GSH. No caso dos compostos (1) e (4), eles podem ter sido reduzidos pela GSH, mas sem a posterior substituição do ligante, já que a banda do cobre(I)-tiolato em 630 nm não foi observada.

Se os compostos (1) e (4) foram somente reduzidos e não substituídos pela GSH, sugere-se que estes compostos possivelmente serão ativos na produção de radicais livres ao serem re-oxidados pelo oxigênio molecular ou por outro agente oxidante. No entanto, os que foram substituídos pela glutaciona, possivelmente gerarão menos danos oxidativos, pois a glutaciona inibe a formação de radicais livres pelos íons cobre, ao formar complexo estável com o metal no estado reduzido. O efeito protetor da GSH é assim atribuído à estabilidade da espécie formada ao ligar-se ao cobre(I), dificultando a re-oxidação deste íon e a consequente geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) [161].

No composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ (2) também não apareceu a banda em 630 nm referente ao cobre(I)-tiolato, podendo ter sofrido redução, mas não substituição do ligante [155].

Conclui-se destes experimentos que o complexo $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (3) pode ser parcialmente reduzido e ter seu ligante substituído pela glutaciona reduzida (GSH).

II – 4.7. Geração de Radicais Livres e Detecção por EPR

O ácido ascórbico (vitamina C) pode ser oxidado formando radicais ascorbil (A^\cdot ou AH^\cdot) [162]. Os radicais livres ascorbil podem ser gerados a partir de ácido ascórbico quer

pela reação com radicais livres, tais como ânion superóxido e hidroxil [162,163], quer por oxidação na presença de metais de transição, como ferro e muito mais eficientemente, o cobre [164].

A primeira observação da geração de radicais ascorbil no sangue foi realizada por Dodd e Giron-Conland [165]. A hipótese de Lohmann é que no sangue há enzimas que possuem atividade de oxidação do ascorbato [166] e Sasaki e colaboradores mostraram que tanto a albumina quanto a ceruloplasmina estão envolvidas neste fenômeno [167]. O mecanismo de oxidação do ascorbato por íons metálicos coordenados a proteínas (ceruloplasmina, albumina e transferrina) foi investigado *in vitro* e no plasma isolado, através da detecção de radicais livres ascorbil através de EPR. Foi demonstrado também que íons ascorbato podem ser oxidados pela albumina do soro humano ou pela ceruloplasmina e que o cobre e o ferro catalisam essa oxidação [168].

O efeito da oxidação do ascorbato pelos complexos de cobre aqui focalizados foi estudado através da detecção do radical ascorbil, utilizando a técnica de EPR. Os espectros correspondentes são mostrados na Figura 42.

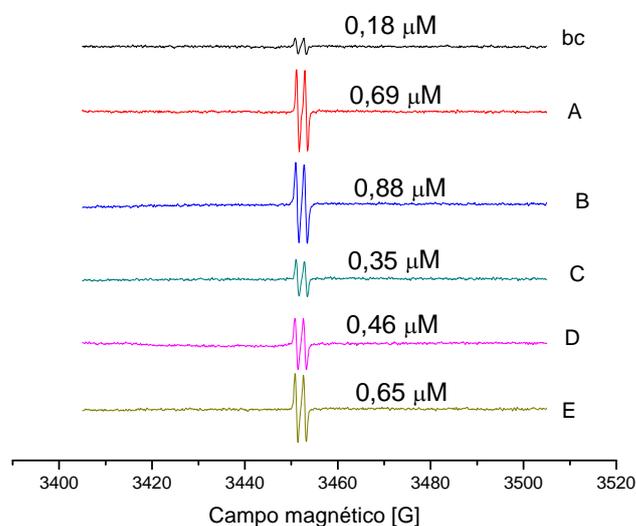


Figura 42. Espectros EPR, mostrando o radical ascorbil formado na presença dos complexos: A) $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$; B) $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$; C) $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$; D) $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$; E) $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$; bc = controle, sem adição de complexos de cobre. Os espectros foram registrados após 1 min, com ganho de 7.00×10^4 , amplitude de modulação de 1 G, constante de tempo de 40.96 ms, 1 varredura. $[\text{ascorbato}] = 1,5 \text{ mM}$, $[\text{CuL}] = 1,5 \text{ mM}$, tampão fosfato 50 mM, pH = 7,4.

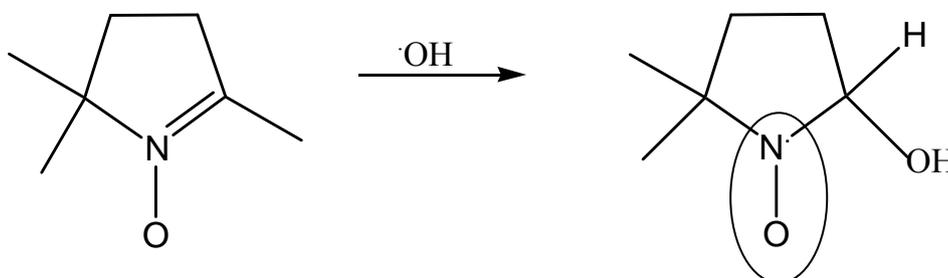
A partir da integração dupla (no programa WinEPR da Bruker) da área do espectro para o sinal de tempol ($1,60 \times 10^{-1}$) e do sinal do ascorbil obtido respectivamente para cada composto, foi possível calcular a concentração de radical ascorbil gerada. Para todos os composto de cobre(II) a concentração de ascorbil foi obtida de acordo com a relação: $[\text{ascorbil}] = 51 \mu\text{M} \times \text{área do sinal em presença de CuL} / \text{área do sinal de Tempol}$.

O composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (**3**) foi mais facilmente reduzido pelo ascorbato, produzindo maior quantidade de radical. No entanto, o composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$ (**1**) gerou radical ascorbil na mesma extensão que o $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ e os outros ($[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$) geraram menor quantidade de radicais. Neste caso, o ligante imínico parece ter inibido esta redução do cobre pelo ascorbato. O composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (**3**) foi o único que também foi reduzido e parcialmente substituído pela glutaciona.

Alguns estudos mostram que a oxidação de biomoléculas, tais como o DNA, é mais favorecida no sistema cobre(II)-ascorbato, em presença de H_2O_2 [80,169]. Ou pode-se também observar danos oxidativos a biomoléculas em presença de peróxido de hidrogênio, catalisados por íons de cobre. Assim, a reatividade dos complexos frente ao peróxido de hidrogênio também foi estudada, pois o cobre na presença deste composto pode ser reduzido e, analogamente, participar de um ciclo redox, gerando espécies reativas de oxigênio (EROS), que podem causar danos a biomoléculas.

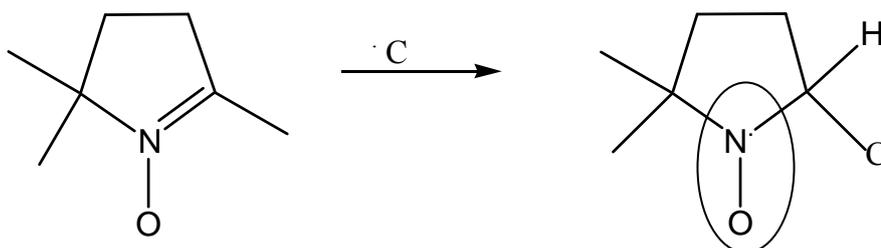
Para verificar a possível geração de EROS na reação dos complexos estudados com o peróxido de hidrogênio, realizaram-se experimentos de EPR usando DMPO como captador de radicais. Este captador DMPO pode detectar a presença de radicais tanto de oxigênio, como de carbono, através das reações:

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



Para este tipo de aduto radicalar formado o espectro característico esperado apresenta 4 linhas, com parâmetros $a_{\text{H}} = a_{\text{N}} = 14,9 \text{ G}$ [170].

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



Para este tipo de radical formado o espectro característico esperado apresenta 6 linhas, com parâmetros $a_{\text{H}} = a_{\text{N}}$ que dependem do grupo R.[171].

Este experimento foi realizado em duas condições experimentais diferentes:

- 1) $[\text{DMPO}] = 100 \text{ mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5 \text{ mM}$, $[\text{CuL}] = 0,375 \text{ mM}$ e
- 2) $[\text{DMPO}] = 100 \text{ mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2,5 \text{ mM}$, $[\text{CuL}] = 100 \text{ }\mu\text{M}$,

ambas em tampão fosfato 50 mM, $\text{pH} = 7,4$. O composto tempol (solução 36 μM) foi usado como padrão para estimar calibrador para a extensão de formação de radicais.

Na Figura 43 estão os espectros e suas respectivas concentrações de radicais adutos gerados para o composto (1), após 1, 5, 10 e 15 min da adição de H_2O_2 , na primeira condição experimental.

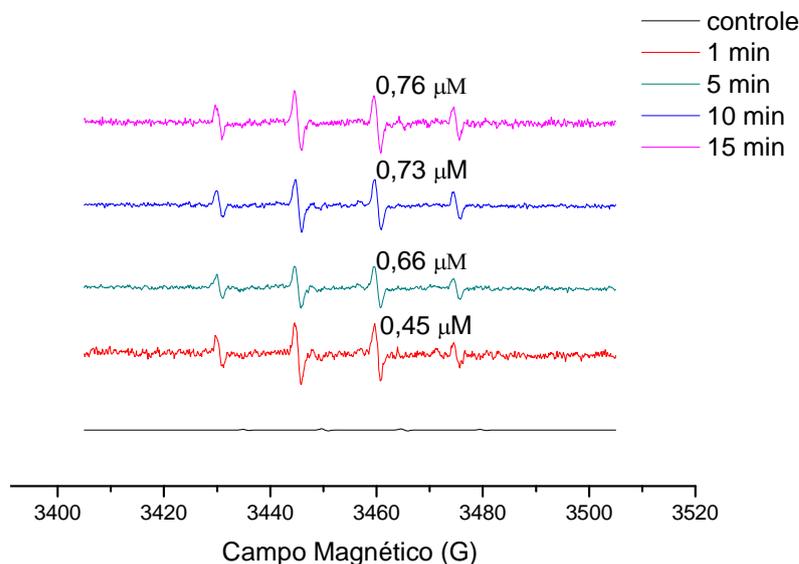


Figura 43. Espectros EPR, pelo método de captura de spin, mostrando o aduto DMPO-OH formado na presença do complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$, com peróxido de hidrogênio, em função do tempo. Condições em todos os espectros: ganho: $2,00 \times 10^4$, amplitude: 1G, constante de tempo 40,96 ms, 1 varredura, temperatura ambiente. $[\text{DMPO}] = 100 \text{ mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5 \text{ mM}$, $[\text{CuL}] = 0,375 \text{ mM}$, tampão fosfato 50 mM, $\text{pH} = 7,4$. Controle = sem a adição de complexo de cobre.

E a Figura 44 mostra a comparação dos espectros e suas respectivas concentrações de radicais adutos gerados, para todos os compostos, 15 min após a adição de H_2O_2 , também na primeira condição experimental.

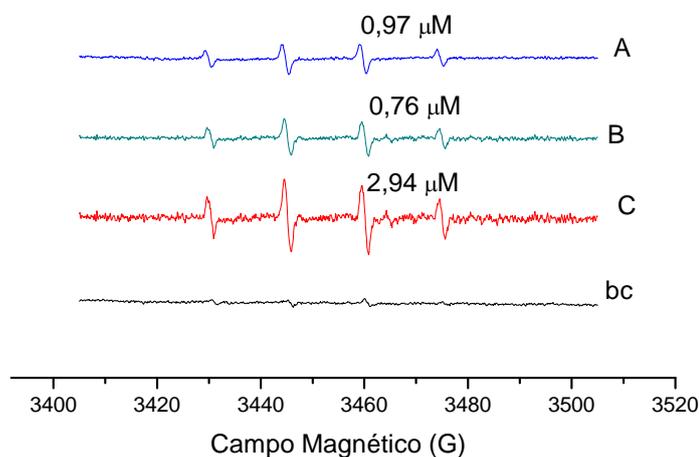


Figura 44. Espectros de captação de spin por EPR, pelo método de captação de spin, mostrando o aduto DMPO-OH formado na presença dos complexos: A) $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$ (**4**); B) $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$ (**1**); C) $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (**3**) com peróxido de hidrogênio, bc = controle, sem adição de complexos de cobre. Os espectros foram registrados após 15 min, com ganho de 2.00×10^4 , amplitude de modulação de 1 G, constante de tempo de 40.96 ms, 1 varredura. $[\text{DMPO}] = 100 \text{ mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5 \text{ mM}$, $[\text{CuL}] = 0,375 \text{ mM}$, tampão fosfato 50 mM, pH = 7,4.

A partir da integração dupla (no programa WinEPR da Bruker) da área do espectro referente ao sinal para o tempol ($36 \mu\text{M}$, $1,04 \times 10^{-1}$) e do sinal do aduto obtido para cada composto, foi possível calcular a concentração de radical gerada para todos os composto de cobre(II), de acordo com a relação: $[\text{aduto}] = 36 \mu\text{M} \times \text{área do sinal em presença de CuL} / \text{área do sinal de Tempol}$.

Comparando-se os dados obtidos, observa-se que o complexo $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ foi o composto que mais gerou radicais nesta condição.

A Figura 45 mostra a comparação dos espectros e suas respectivas concentrações de radicais adutos gerados para todos os compostos, após 15 min da adição de H_2O_2 , na segunda condição experimental. Nesta nova condição também foram registrados os espectros referentes a diversos tempos de reação.

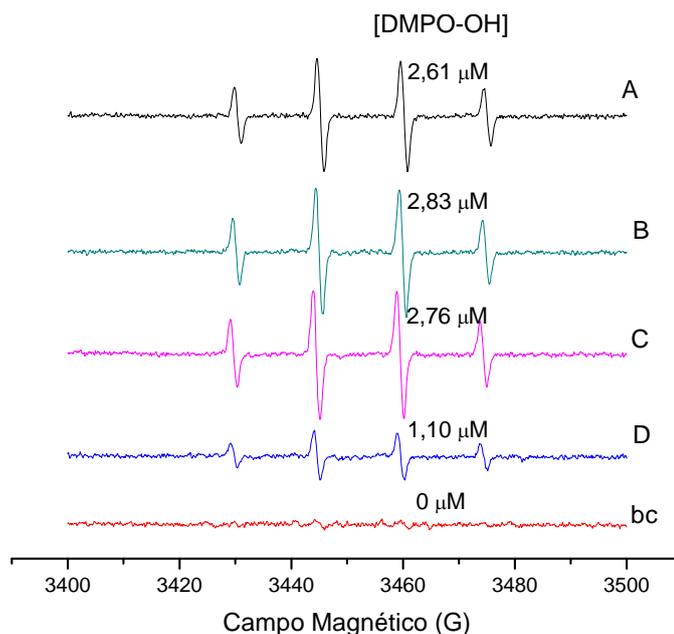


Figura 45. Espectros EPR, pelo método do captador de spin, dos adutos DMPO-OH formados na presença dos complexos de cobre e peróxido de hidrogênio, (A) $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$; (B) $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (**3**); (C) $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$ (**4**); D) $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$ (**1**); bc = controle, sem adição de complexos de cobre. Os espectros foram registrados após 15 min, com ganho de 2.00×10^4 , amplitude de modulação de 1 G, constante de tempo de 40.96 ms, 1 varredura. $[\text{DMPO}] = 100 \text{ mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2,5 \text{ mM}$, $[\text{CuL}] = 100 \text{ } \mu\text{M}$, tampão fosfato 50 mM, pH = 7,4.

Da mesma forma, a partir da integração dupla da área do espectro referente ao sinal para o tempol ($36 \text{ } \mu\text{M}$, $1,27 \times 10^{-1}$) e ao sinal do aduto para cada complexo, foi possível calcular a concentração de radical gerada para todos os composto de cobre(II) de acordo com a relação : $[\text{aduto}] = 36 \text{ } \mu\text{M} \times \text{área do sinal em presença de CuL} / \text{área do sinal de Tempol}$

Nesta nova condição, o composto (**3**) continuou gerando bastante radical, mas o composto $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$ (**4**) também se mostrou bastante eficiente.

II – 4.8. Geração de Radicais Livres e Detecção por EPR na Presença de HSA

O experimento anterior foi novamente realizado, no entanto, agora na presença de HSA para avaliar danos radicalares que provavelmente ocorram com a proteína. Nas três condições experimentais utilizadas, as concentrações foram: $[\text{DMPO}] = 100 \text{ mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5,00 \text{ mM}$, $[\text{CuL}] = 0,375 \text{ mM}$; o que variou foi a concentração $[\text{HSA}]$: 0,625 mM; 0,25 mM e 0,125 mM.

A partir da integração dupla da área do espectro correspondente ao sinal para o tempol ($36 \mu\text{M}$, $1,04 \times 10^{-1}$) e ao sinal dos adutos para cada complexo, foi possível calcular a concentração de radical gerada para todos os composto de cobre(II) de acordo com a relação: $[\text{aduto}] = 36 \mu\text{M} \times \text{área do sinal em presença de CuL} / \text{área do sinal de Tempol}$.

Nestes experimentos observou-se a presença de um aduto de carbono, além do aduto de radicais hidroxil, nos espectros referentes a cada um dos complexos. Nas duas primeiras condições, com concentrações de HSA de 0,625 e 0,25 mM, a relação sinal/ruído estava muito baixa porque as concentrações de albumina estavam muito alta e não foi possível detectar os sinais de radicais formados e, portanto, estas condições foram desconsideradas. A Tabela 14 mostra a concentração de adutos radicalares gerados para os compostos, em presença de $[\text{HSA}] = 0,125 \text{ mM}$ e a Figura 46 mostra os respectivos espectros, considerando-se separadamente os sinais para radicais hidroxil (4 linhas) e os sinais para radicais centrados no C (6 linhas).

Os radicais de carbono devem ser formados pela ação dos radicais hidroxil, primariamente formados, sobre grupos da proteína. Verificou-se, aproximadamente, a geração de uma quantidade de radicais de carbono equivalente à metade dos radicais hidroxil observados.

Tabela 14. Concentração dos adutos radicalares gerados nas soluções de CuL (0,375mM), H_2O_2 (5,00 mM), HSA (0,125 mM), em tampão fosfato 50 mM pH = 7,4, usando DMPO (100 mM) como captador de spin, após 15 minutos de reação.

CuL	[DMPO-OH] (μM)	[DMPO-C] (μM)
$[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$	0,36	0,15
$[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$	0,16	0,06
$[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$	0,11	0,03

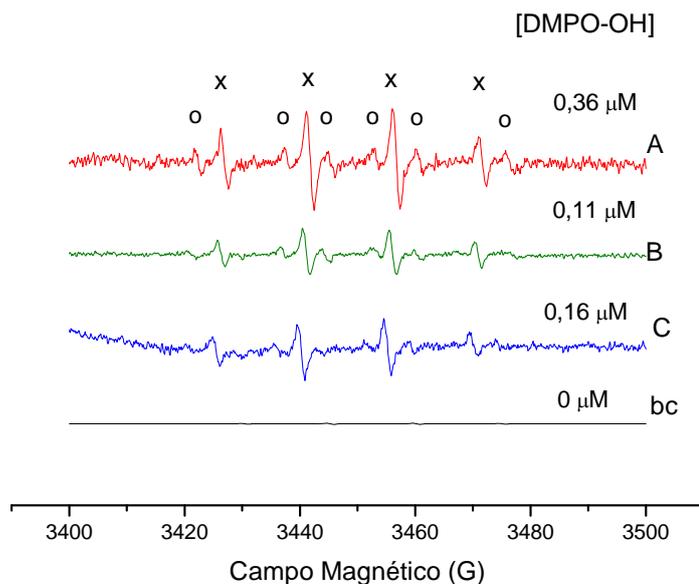


Figura 46. Espectros EPR dos adutos DMPO-OH e DMPO-C formados na presença dos complexos de cobre, peróxido de hidrogênio e HSA na condição $[DMPO] = 100$ mM, $[H_2O_2] = 5$ mM, $[CuL] = 0,375$ mM, $[HSA] = 0,125$ mM, (A) $[Cu(isaepy)H_2O]^+$; (B) $[Cu(isaenim)]^{2+}$; (C) $[Cu(enim)H_2O]^{2+}$; bc = controle, sem adição de complexos de cobre. Os espectros foram registrados após 15 min, com ganho de 2.00×10^4 , amplitude de modulação de 1 G, constante de tempo de 40.96 ms, 1 varredura.

As concentrações de radicais formados foram menores do que nos experimentos sem a albumina, mesmo que neste experimento tenham sido gerados também radicais de carbono. A proteína muito provavelmente exerce um papel de ligante extra para o cobre, isto é, compete com os ligantes imínicos pelos íons de cobre e formando uma espécie $Cu(II)HSA$ muito estável, reage menos com o peróxido, gerando assim menos radicais hidroxil e consequentemente menos radicais de carbono.

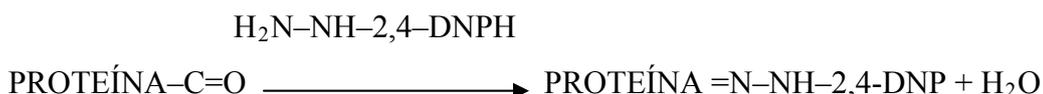
O composto $[Cu(isaepy)H_2O]^+$ (**1**) foi o que mais gerou radicais, em comparação com os outros compostos, no entanto, este composto foi o que menos gerou radicais no experimento na ausência de proteína.

II – 4.9. Danos Carbonílicos à Albumina em Presença de Complexos de Cobre(II)

Danos oxidativos à albumina humana foram estimados pela formação de grupos carbonílicos, após incubação com os complexos de cobre em presença ou não de peróxido de hidrogênio, monitorados através da obtenção das correspondentes dinitrofenil-hidrazonas, pela reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH). Estes derivados hidrazonas são estáveis,

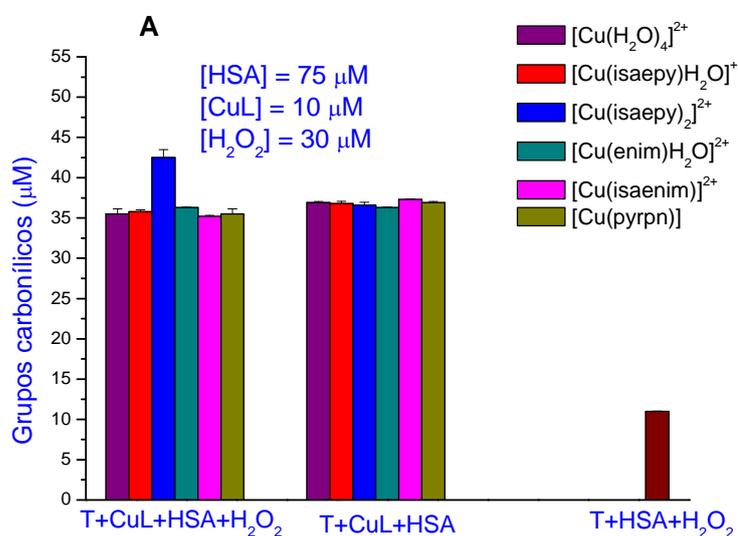
apresentando forte coloração amarela ou alaranjada, podendo ser estimados espectrofotometricamente em $\lambda = 360\text{-}390\text{ nm}$. O valor de absorvidade molar, $\epsilon = 2,2 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, foi utilizado para determinar a concentração desses grupos carbonílicos formados [133, 134]. Para estes experimentos, em geral sugere-se que a concentração de proteína deva ser $\leq 5\text{ mg/mL}$, para se ter dados reprodutíveis e mais confiáveis [172].

Reação:



Estes experimentos foram realizados com concentrações catalíticas dos compostos e também com concentrações estequiométricas.

As Figura 47a e b referem-se a grupos carbonílicos formados nos experimentos com concentrações catalíticas e estequiométricas, respectivamente, com cada um dos complexos, em presença e na ausência de peróxido de hidrogênio.



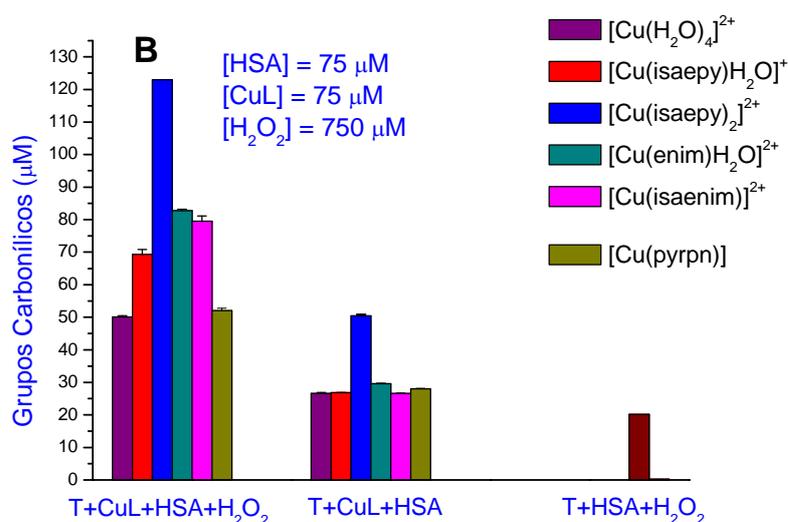


Figura 47. Danos oxidativos à albumina humana induzidos por complexos de cobre(II) na presença ou na ausência de peróxido de hidrogênio, verificados após a reação com DNPH, através da determinação da absorbância em 370 nm. Incubação por 30 min, a 37°C e pH = 7,4. A) Concentrações catalíticas de CuL; B) Concentrações estequiométricas de CuL.

Através destes experimentos, pode-se verificar que em quantidades catalíticas nenhuma diferença significativa foi observada na reatividade dos diferentes complexos frente à proteína HSA (Figura 47a). Entretanto, em condições estequiométricas, pode-se observar que os danos carbonílicos causados pelo cobre na proteína foram dependentes da presença de peróxido de hidrogênio e mostraram ainda ser modulados pelo ligante, pois os compostos estudados provocaram moderadamente mais danos do que o controle $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ (Figura 47b).

Na ausência do peróxido, todos os complexos tiveram comportamento semelhante, com extensão de danos oxidativos pouco maior que o apresentado pelo controle, isto é, em presença da mesma concentração de peróxido, mas na ausência de compostos de cobre. A exceção foi o composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$, que mesmo na ausência de peróxido, foi capaz de gerar danos carbonílicos na proteína.

Em presença do peróxido, nas condições estequiométricas, os compostos $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$, $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$ apresentaram praticamente a mesma eficiência na formação de grupos carbonílicos na proteína. O composto $[\text{Cu}(\text{pyrpn})]$ apresentou comportamento semelhante ao $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$. No entanto, o composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$, bastante estudado em nosso grupo e que apresentou propriedades citotóxicas acentuadas [155], gerou quase o dobro da concentração de grupos carbonílicos na proteína, nas mesmas condições experimentais, em relação a todos os complexos aqui apresentados.

II – 4.10. Experimentos de clivagem da proteína HSA em presença de complexos de cobre

Estes experimentos foram realizados com o objetivo de verificar se a clivagem da proteína é induzida pelos compostos de cobre em meio aeróbico, na ausência ou em presença de peróxido de hidrogênio. Para estes experimentos, utilizou-se a mesma condição estequiométrica utilizada no experimento de danos carbonílicos na HSA. O mecanismo oxidativo de clivagem de proteínas, na ausência de peróxido de hidrogênio, é causado pelo envolvimento do oxigênio molecular [173]. A fragmentação de proteínas ocorre especialmente através da formação de EROS, em especial radicais hidroxil [174], que produzem modificações oxidativas nas proteínas, tornando-as mais susceptíveis a degradações.

Tanto na ausência quanto na presença de peróxido de hidrogênio, não foi observado nenhum perfil de clivagem na proteína, causado pelos complexos de cobre, muito diferente daquele observado no controle (Figura 48).

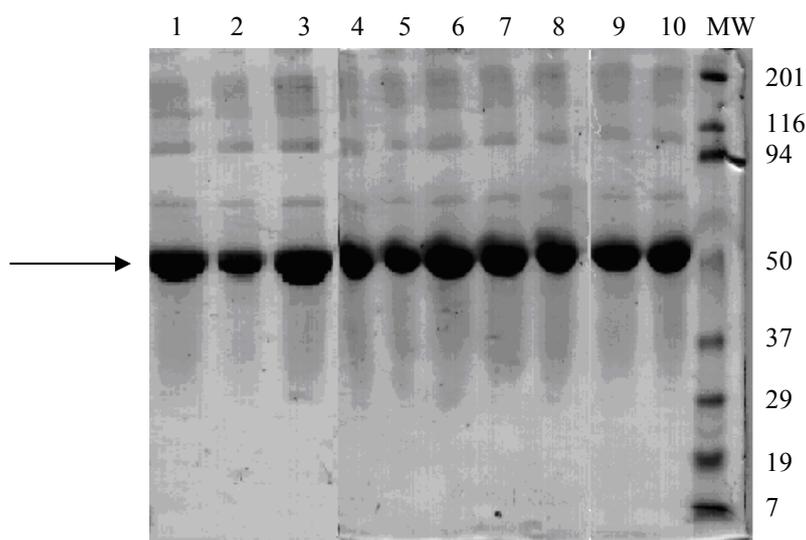


Figura 48. SDS-PAGE, com gel separador de poliácridamida de 12%, dos compostos de cobre e albumina, (Cu/HSA 1:1), incubados em banho-maria por 30 minutos, a 37,0°C na ausência ou na presença de peróxido de hidrogênio. A seta indica a proteína albumina.

MW: Marcador de massa molecular, Broad Range BioRad.

Canaleta 1: HSA.

Canaleta 2: HSA + $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$.

Canaleta 3: HSA + $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$.

Canaleta 4: HSA + $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$.

Canaleta 5: HSA + $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$.

Canaleta 6: HSA + H_2O_2 .

Canaleta 7: HSA + H_2O_2 + $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$.

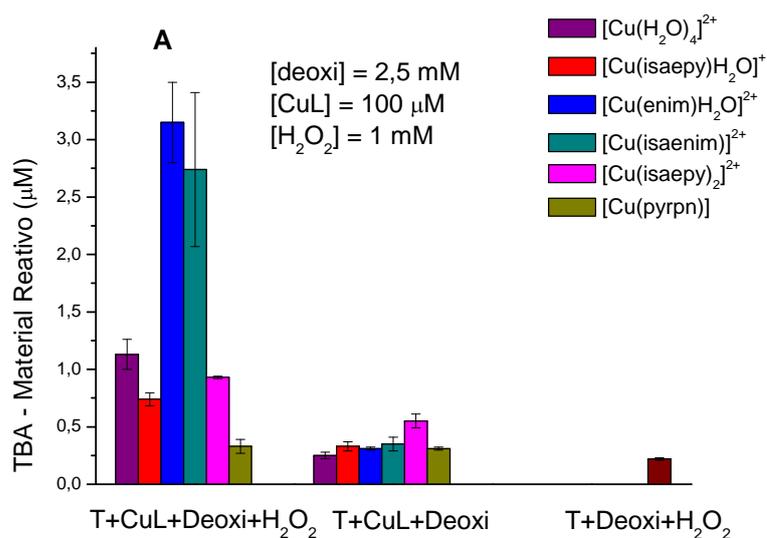
Canaleta 8: HSA + H_2O_2 + $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$.

Canaleta 9: HSA + H₂O₂ + [Cu(enim)H₂O]²⁺.
 Canaleta 10: HSA + H₂O₂ + [Cu(isaenim)]²⁺.

No entanto, o composto citado anteriormente [Cu(isaepy)₂]²⁺ (**2**) foi capaz de gerar diversos fragmentos na proteína, em presença de peróxido de hidrogênio, nas mesmas condições experimentais [155]. Assim, com estes experimentos demonstrou-se que os complexos aqui estudados são bem menos reativos que este complexo (**2**), que já havia demonstrado atividade antitumoral frente a diferentes células, sendo capaz de induzir o processo de apoptose [175].

II – 4.11. Danos oxidativos à 2-deoxi-D-ribose causados por complexos de cobre

O estudo da oxidação do açúcar 2-deoxi-D-ribose catalisada pelos compostos de cobre foi realizado na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio, através do método de TBARS, conforme descrito anteriormente na seção experimental. Nestes experimentos, o complexo [Cu(isaepy)₂]²⁺ foi também usado, para comparação. Somente os complexos [Cu(enim)H₂O](ClO₄)₂ e [Cu(isaenim)](ClO₄)₂ foram significativamente mais reativos que o aqua-complexo (Figura 49a).



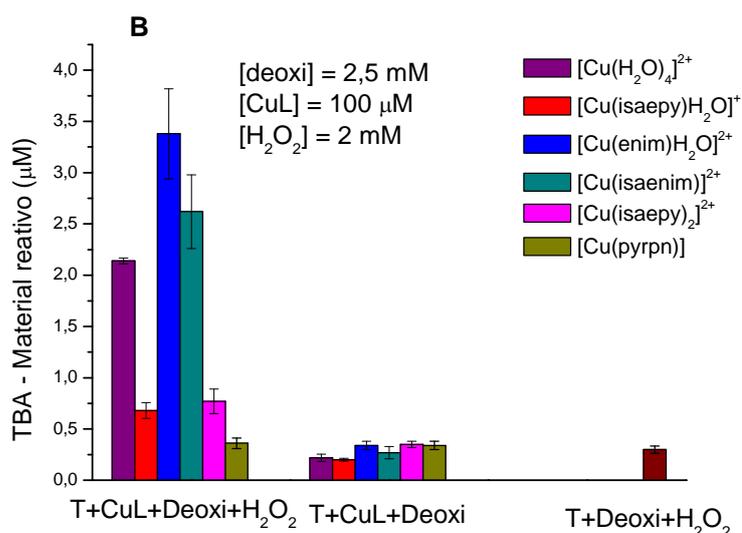


Figura 49. Dano oxidativo à 2-deoxi-D-ribose (2,50 mM) promovido pelos complexos de cobre(II) (100 μM), após 1 h de incubação à 37 °C, pH = 7,4 em tampão fosfato (50 mM), na presença de H₂O₂: (A) 1 mM; (B) 2 mM. A degradação do açúcar formando produtos como malonaldeído foi monitorada através da absorbância a 532 nm, após reação com ácido 2-tiobarbitúrico.

A adição de mais peróxido de hidrogênio não gerou aumento considerável dos danos causados pelos compostos estudados, somente aumentaram os danos causados pelo aqua-complexo (Figura 49b).

A influência da concentração do catalisador no processo também foi verificada na faixa de 25-100 μM (Figura 50). A variação das concentrações dos complexos [Cu(isaepy)H₂O]ClO₄ e [Cu(isaepy)₂](ClO₄)₂ praticamente não tiveram influência no dano oxidativo ao açúcar.

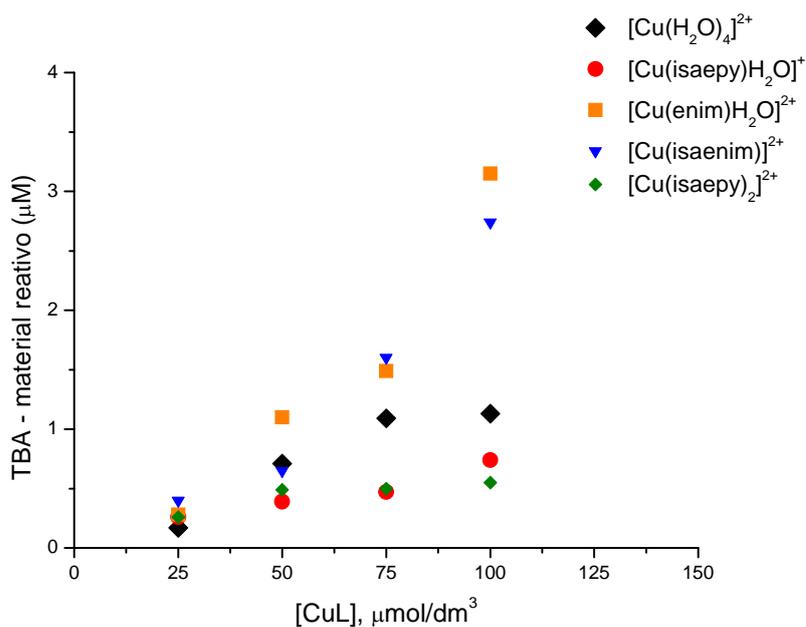


Figura 50. Dependência do dano oxidativo à 2-deoxi-D-ribose (2,50 mM) com a concentração dos complexos de cobre(II), em comparação com o aqua-complexo. Incubação por 1 h a 37 °C e pH = 7,4, na presença de H₂O₂ (1mM).

Por outro lado, os complexos que contêm o grupo imidazol foram os mais reativos frente à deoxi-ribose e parecem que são capazes de formar interações adicionais através da formação de ligações de hidrogênio entre o NH do anel heterocíclico e os grupos hidroxilas do anel da ribose, exibindo assim uma melhor atividade.

O composto [Cu(pyrpn)], que apresenta somente anéis pirrólicos, não promoveu danos ao açúcar do DNA. A extensão da formação de material oxidado foi a mesma, tanto em presença quanto na ausência de peróxido de hidrogênio. De acordo com a estrutura do complexo, não existe a possibilidade de formação de interações entre grupos do composto com os grupos hidroxilas do anel ribose, indicando que talvez este seja um fator determinante da reatividade neste caso.

II – 4.12. Clivagens nas fitas do DNA

A atividade “nuclease” dos complexos de cobre frente ao DNA foi verificada através da eletroforese em gel de agarose, utilizando um DNA plasmidial superenrolado. Os cinco complexos de cobre(II) foram incubados com DNA, na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio como agente oxidante [176].

O peróxido de hidrogênio na ausência de complexos de cobre induziu pouca clivagem em uma única fita do DNA, observando-se uma pequena diminuição na concentração da espécie superenrolada (Forma I) e um pequeno aumento na concentração da forma relaxada (Forma II), como é mostrado na série de figuras a seguir, Figura 51 a Figura 54, nas canaletas controle. Após a incubação do DNA com H₂O₂ em presença dos complexos de cobre(II) estudados, os danos causados na biomolécula foram muito maiores quando comparados aos danos causados somente pelo H₂O₂. Tanto a Forma II como o DNA linear (Forma III) foram detectadas, dependendo da concentração dos complexos e também do tempo de incubação (Figura 51 a Figura 54). Em todos os experimentos, a atividade de cada complexo foi comparada com a do aqua-complexo na concentração de 50 µM, após 60 min de incubação com o DNA (Figura 53a, canaletas I e II).

Os experimentos com o complexo [Cu(isaepy)₂]²⁺ (**2**) apresentaram alta atividade no DNA, já que após 15 min de incubação e com 50 µM de concentração, a Forma I desapareceu completamente, como observado na canaleta 6 da Figura 51a. Além disso, este complexo foi capaz de gerar a Forma II do DNA até mesmo na ausência de peróxido de hidrogênio (Figura 51a, canaleta sem H₂O₂). Também, nas concentrações de 25 e 50 µM, uma quantidade considerável da forma linear de DNA (Forma III) foi observada em presença de peróxido de hidrogênio. Este composto foi o complexo mais ativo na indução de apoptose em células tumorais de uma série de complexos de cobre testados, todos com ligantes imínicos [175].

Resultados similares foram obtidos para o complexo [Cu(isaepy)H₂O]⁺ (**1**), como mostrado na Figura 52. Comparando-se a Figura 51 e a Figura 52, onde os compostos apresentam os mesmos ligantes, observa-se praticamente a mesma reatividade, diferenciando-se apenas em aspectos cinéticos. Isto era de se esperar, já que estes complexos se apresentam interrelacionados num equilíbrio em solução aquosa (vide página 70). Entretanto, o complexo (**2**) não causou dano ao DNA na ausência de peróxido de hidrogênio como foi observado para o composto (**1**).

Na Figura 53a podemos observar que a intensidade da banda da Forma I superenrolada do DNA diminui com o tempo, tornando-se não visível após 60 min de incubação com o

complexo $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ (**3**), em concentrações maiores. A Forma II foi observada após tempos maiores de incubação ou com elevada concentração do complexo, enquanto que a forma linear (Forma III) apareceu somente após 60 min de incubação, na presença de no mínimo 25 μM do complexo (**3**). O perfil do gel de eletroforese observado para o composto $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$ (**4**) foi muito similar ao do composto (**3**), como mostra a Figura 54. Neste caso, a Forma III também foi detectada após tempos maiores de incubação e com alta concentração do complexo. Ambos os complexos, não apresentaram clivagem do DNA na ausência de peróxido de hidrogênio.

Estes resultados mostraram que todos os complexos foram capazes de causar clivagens no DNA de uma maneira eficiente, com atividade “nuclease” comparável à de outros compostos de cobre(II), com ligantes assemelhados, já descritos na literatura [71,177, 178]. Macías e colaboradores verificaram que a coordenação de íons cobre com sulfonamida e com 1,10-fenantrolina geraram clivagens significativas ao DNA ao longo do tempo, apresentando maior atividade “nuclease” do que o complexo cobre-fenantrolina [177]. Liu e colaboradores verificaram a atividade “nuclease” de complexos imínicos macrocíclicos de cobre(II), no entanto estes compostos foram capazes de gerar apenas a Forma II do DNA em 1,5 h de incubação e com 50 μM do composto [179].

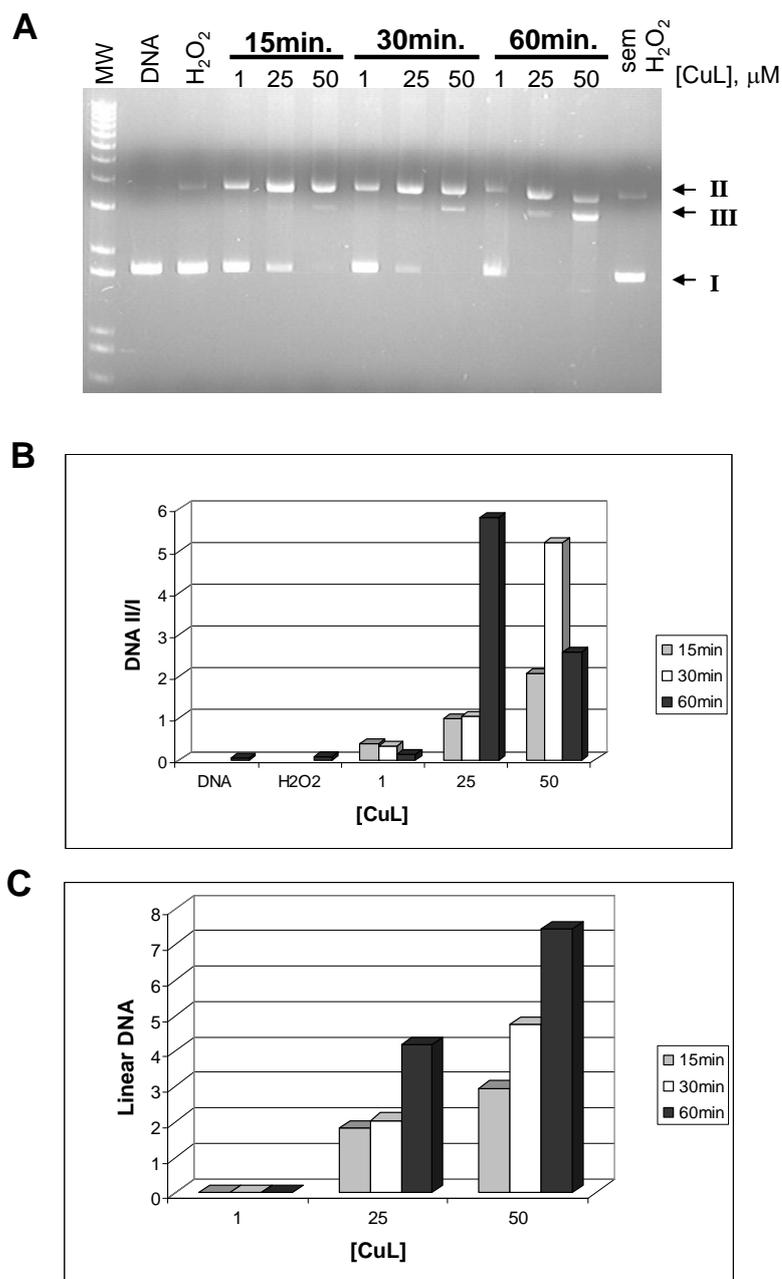


Figura 51. (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (**2**) por 15, 30 ou 60 min, com e sem peróxido de hidrogênio. Canaletas: MW, marcador; DNA, DNA plasmidial; H₂O₂, DNA + H₂O₂; sem H₂O₂, DNA + CuL (50 μM) (*T*_{inc} = 60 min), sem adição de H₂O₂. As concentrações de CuL estão indicadas no gel. (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A). (C) Quantificação da Forma III das bandas do gel de eletroforese na parte (A).

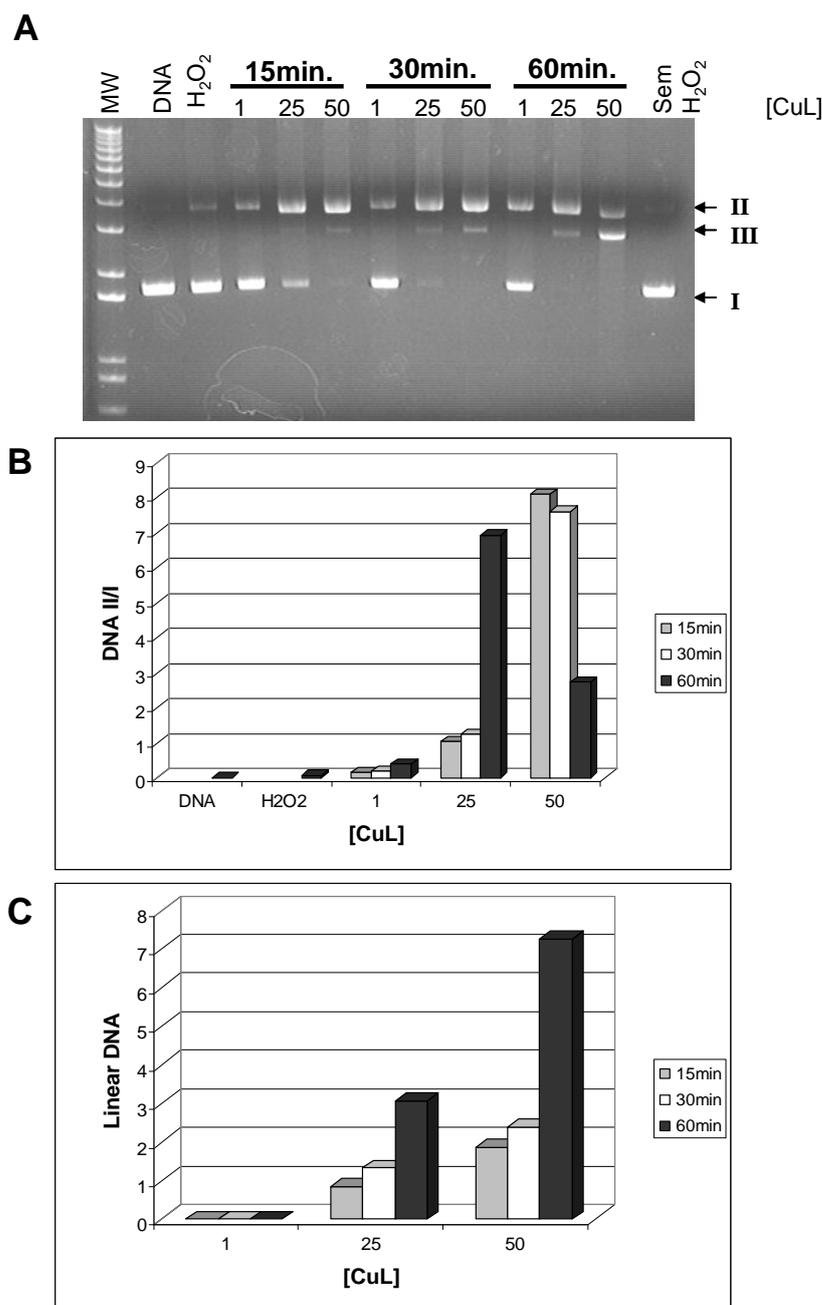


Figura 52. (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$ (**1**) por 15, 30 ou 60 min, com e sem peróxido de hidrogênio. Canaletas: MW, marcador; DNA, DNA plasmidial; H_2O_2 , DNA + H_2O_2 ; sem H_2O_2 , DNA + CuL (50 μM) ($T_{\text{inc}} = 60$ min), sem adição de H_2O_2 . As concentrações de CuL estão indicadas no gel. (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A). (C) Quantificação da Forma III das bandas do gel de eletroforese na parte (A).

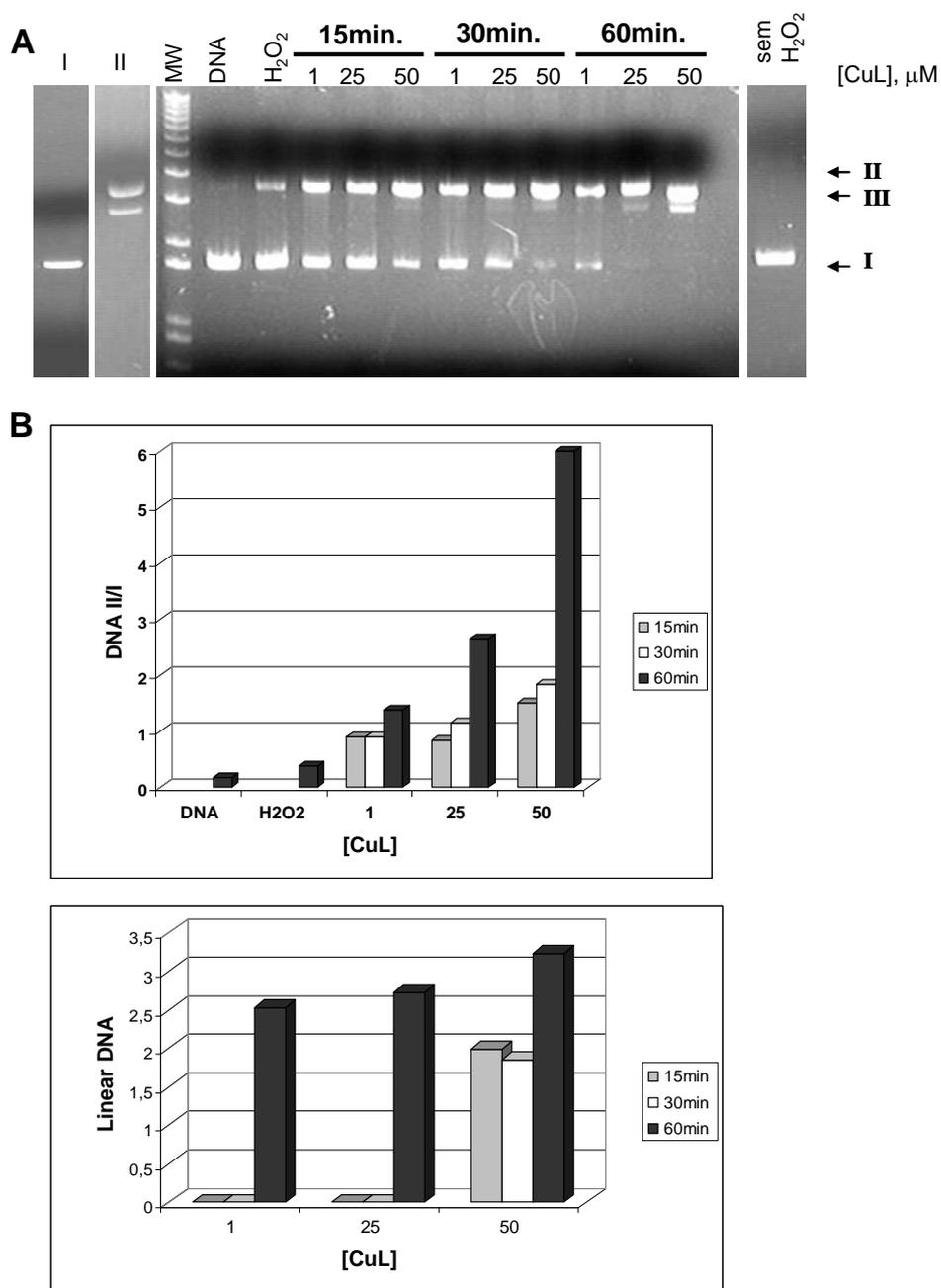


Figura 53. (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ (**3**) por 15, 30 ou 60 min, com e sem peróxido de hidrogênio. Canaletas: I, DNA + $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ (50 μM) ($T_{\text{inc}} = 60$ min); II, DNA + $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ (50 μM) + H_2O_2 ($T_{\text{inc}} = 60$ min); MW, marcador; DNA, DNA plasmidial; H_2O_2 , DNA + H_2O_2 ; sem H_2O_2 , DNA + CuL (50 μM) ($T_{\text{inc}} = 60$ min), sem adição de H_2O_2 . As concentrações de CuL estão indicadas no gel. (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A). (C) Quantificação da Forma III das bandas do gel de eletroforese na parte (A).

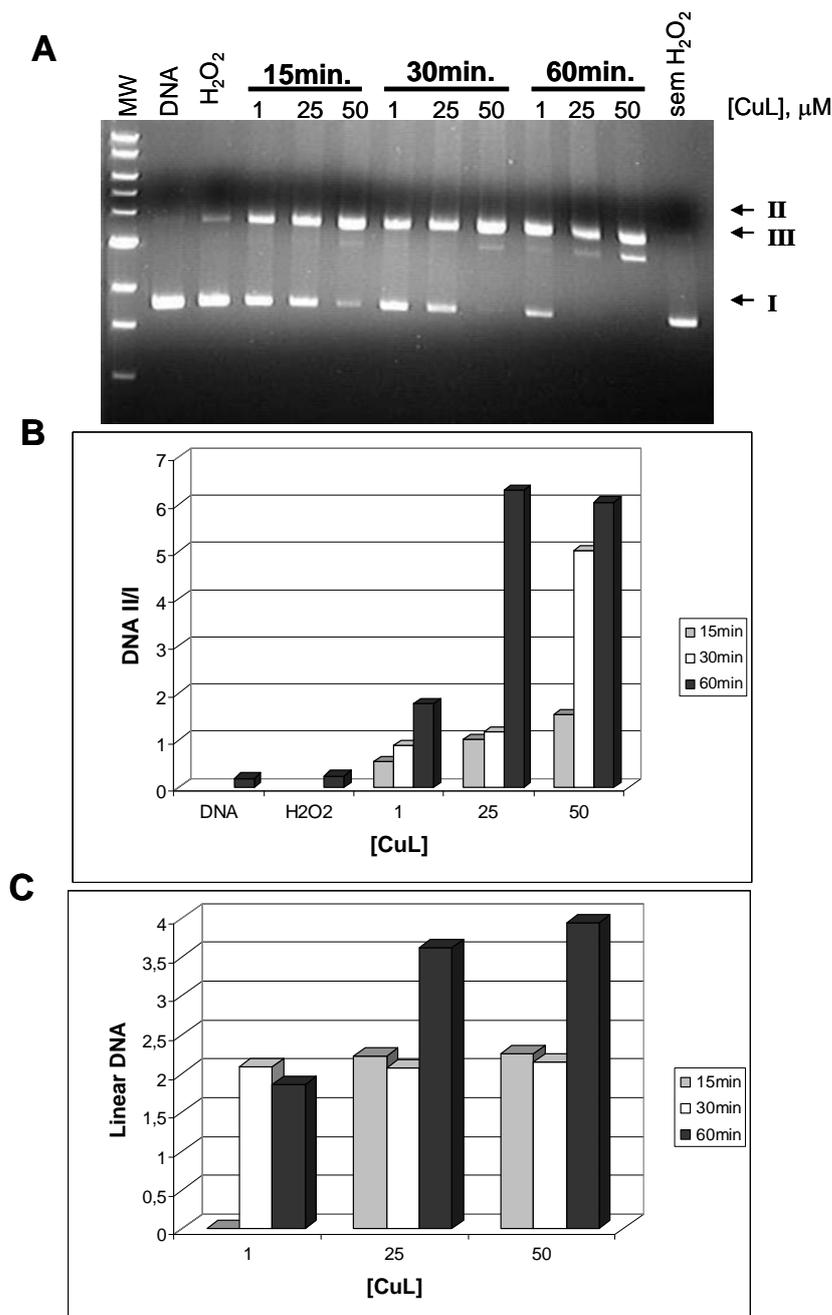


Figura 54. (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$ (**4**) por 15, 30 ou 60 min, com e sem peróxido de hidrogênio. Canaletas: MW, marcador; DNA, DNA plasmidial; H_2O_2 , DNA + H_2O_2 ; sem H_2O_2 , DNA + CuL (50 μM) ($T_{\text{inc}} = 60$ min), sem adição de H_2O_2 . As concentrações de CuL estão indicadas no gel. (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A). (C) Quantificação da Forma III das bandas do gel de eletroforese na parte (A).

A quantidade relativa das formas II e III do DNA foi determinada por medidas de densitometria, complementando os resultados obtidos nos experimentos de eletroforese. Através destes valores é fácil observar que a ordem decrescente de reatividade dos complexos, tendo o DNA como alvo, é $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ (**2**) > $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$ (**1**) > $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$ (**4**) ~ $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (**3**), como mostram as Figura 55a e Figura 55b. Em todos os casos, existe uma progressiva transformação do plasmídio Forma I em Forma II, e posteriormente à Forma III. O complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ transforma o plasmídio superenrolado na Forma II mais lentamente que o complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$, apesar de ser formada praticamente a mesma quantidade de DNA linear após 60 min de incubação, para ambos os complexos. Entretanto, o composto (**1**) é mais eficiente, já que pode causar dano ao DNA até mesmo na ausência de peróxido de hidrogênio. Por outro lado, os complexos $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (**3**) e $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$ (**4**) apresentaram atividade “nuclease” mais baixa que os anteriormente citados e muito similar entre si, embora o composto (**4**) seja um pouco mais rápido na clivagem do DNA que o composto (**3**).

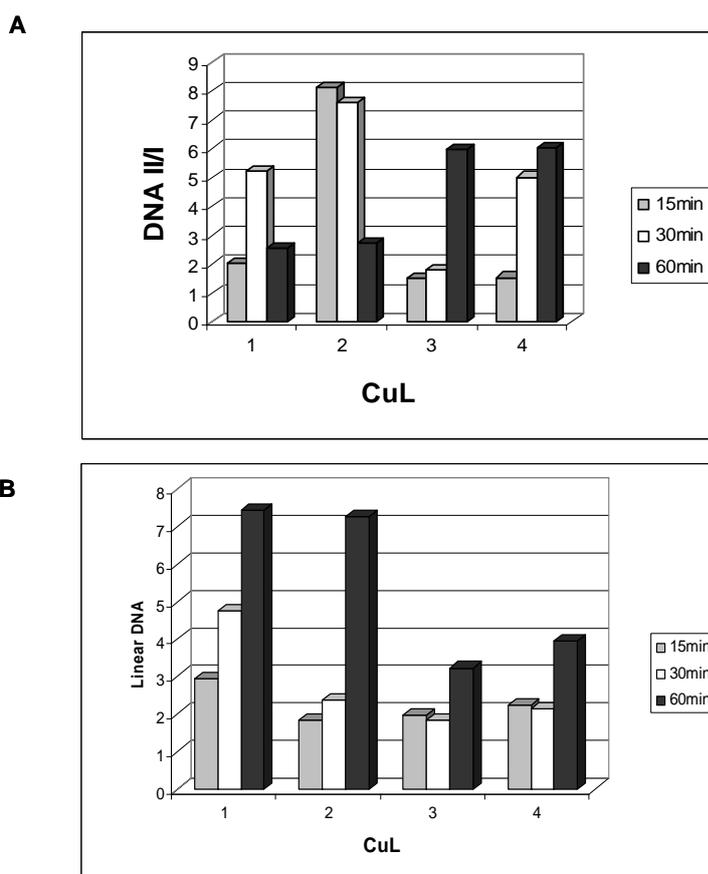


Figura 55. Dados referentes à quantificação das bandas dos géis de eletroforese dos diferentes complexos. (A) Proporção DNA Form II/Form I; (B) DNA Linear (Forma III). Complexos (50 μM): $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (**1**); $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$ (**2**); $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ (**3**); $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$ (**4**).

A Figura 56 mostra atividade “nuclease” do complexo [Cu(pyrpn)] (**5**), cujo ligante é derivado de pirrol e não de indol, frente ao DNA através da eletroforese em gel de agarose, utilizando um DNA plasmidial superenrolado.

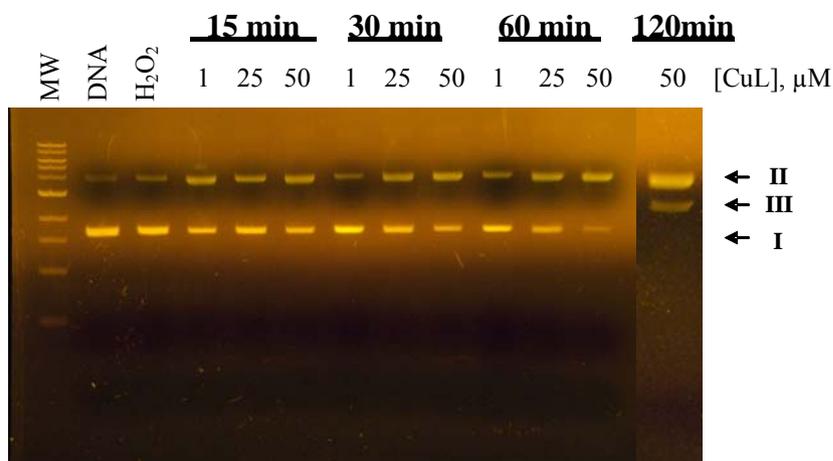


Figura 56. Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo [Cu(pyrpn)] por 15, 30, 60 ou 120 min, com peróxido de hidrogênio. Canaletas: MW, marcador; DNA, DNA plasmidial; H₂O₂, DNA + H₂O₂. As concentrações de CuL estão indicadas no gel.

Esse composto [Cu(pyrpn)] foi o composto estudado menos ativo, tendo o DNA como alvo. O complexo de cobre induziu pouca clivagem em uma única fita do DNA, observando-se uma pequena diminuição na concentração do superenrolado (Forma I) e um pequeno aumento na concentração da forma relaxada (Forma II) somente após 60 min de incubação, na presença de no mínimo 25 µM do composto. A forma linear (Forma III) foi observada somente após 120 min de incubação na concentração mais elevada (50 µM). Apesar desse complexo apresentar uma estrutura aproximadamente planar, conforme os parâmetros do EPR, ele não apresenta grupos que possam formar ligações de hidrogênio com o açúcar do DNA. Por esta razão, não deve atuar sobre os sítios da deoxi-ribose ou das bases no DNA, já que foi menos reativo e só causou danos oxidativos ao DNA após tempo maior de incubação (2 horas). Portanto, não deve favorecer o ataque dos radicais hidroxil em sítios específicos na biomolécula.

II – 4.13. Interações dos complexos de cobre com DNA: monitoramento por espectroscopia eletrônica

Com o objetivo de elucidar possíveis interações dos complexos de cobre(II) estudados com o DNA, os correspondentes espectros de absorção foram registrados após a adição de DNA a soluções dos compostos **(1)** a **(4)**. Os espectros de UV/Vis para a proporção complexo:DNA (20 μM : 0.03 μM), na presença de peróxido de hidrogênio, são mostrados na Figura 57.

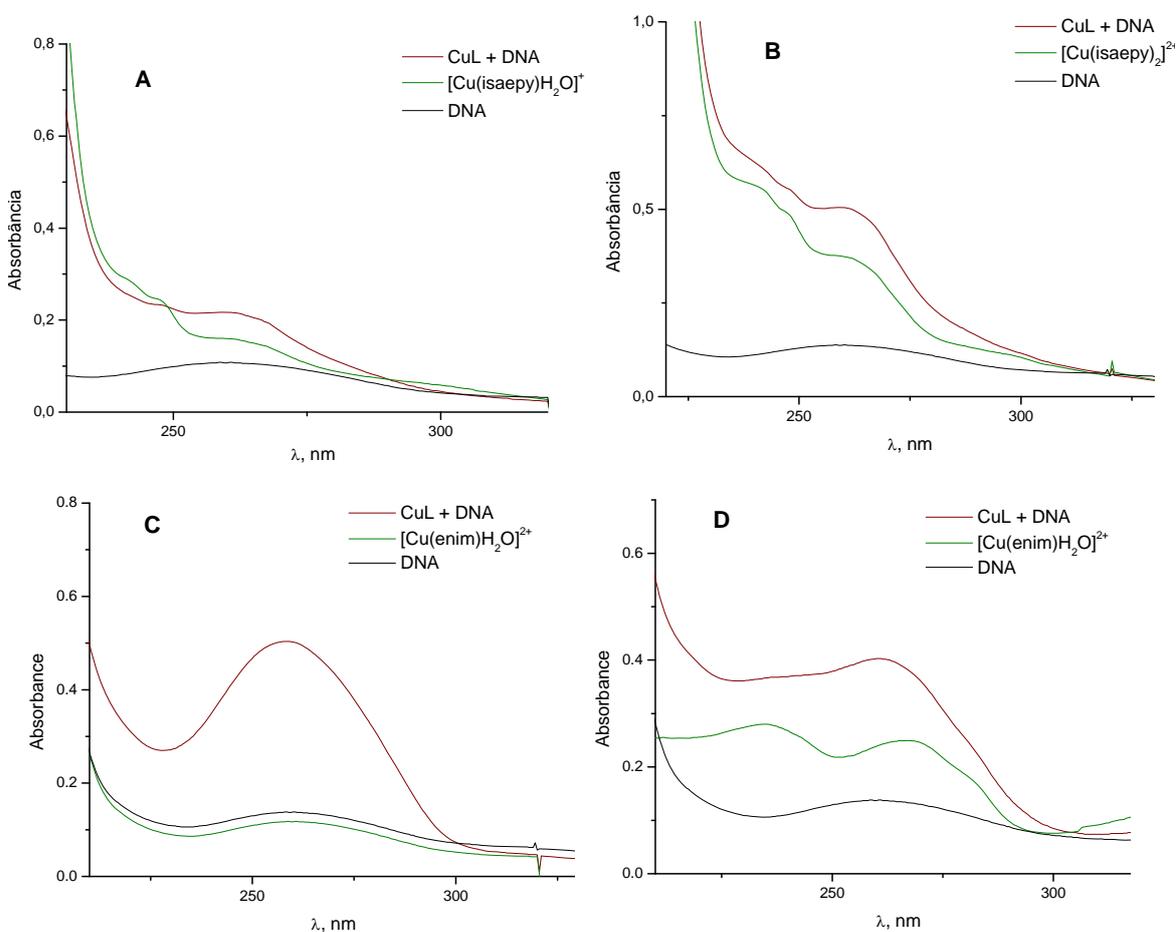
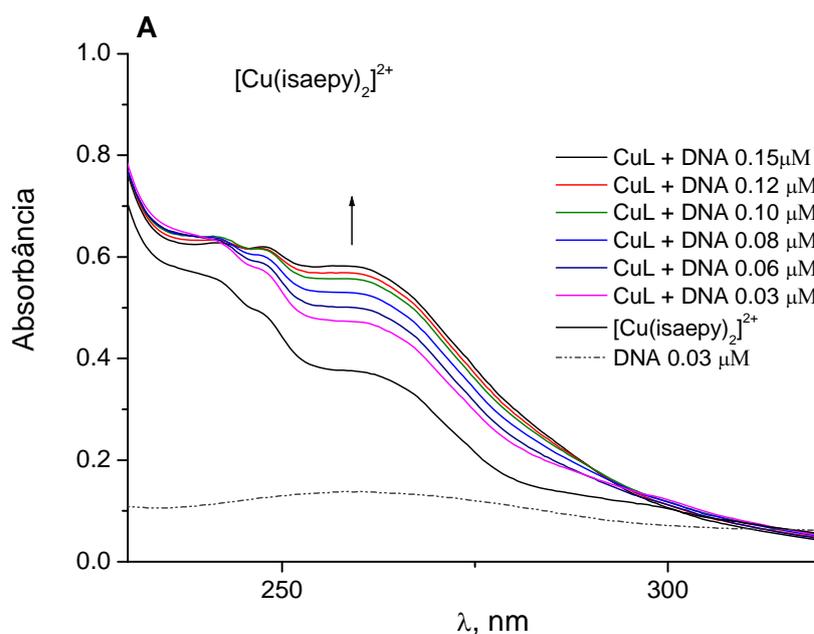


Figura 57. Espectro de absorção dos complexos na ausência e em presença de DNA. (A) $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$ **(1)**; (B) $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ **(2)**; (C) $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ **(3)**; (D) $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$ **(4)**. A relação de concentração $[\text{CuL}]:[\text{DNA}]$ é de 20 μM : 0.03 μM . Os espectros foram registrados a 25°C, logo após a adição de H_2O_2 (80 μM).

Estes experimentos foram realizados para relacionar mudanças espectrais com as possíveis interações entre os complexos de cobre e a biomolécula DNA. Os resultados podem auxiliar na interpretação dos experimentos de clivagem do DNA, uma vez que íons de cobre,

ao contrário de íons de ferro, costumam causar danos oxidativos no próprio sítio em se coordenam, os chamados danos em sítios específicos [74,79].

Na titulação de soluções dos complexos **(1)** e **(4)** com DNA, na ausência de peróxido de hidrogênio, utilizou-se os compostos na concentração de 20 μM e adicionou-se o DNA com concentrações entre 0,03 e 0,15 μM (Figura 58). Os espectros obtidos foram idênticos aos obtidos em presença de H_2O_2 . Um hipercromismo, caracterizado por um aumento na intensidade de absorção do DNA em 260 nm foi observado, já que os complexos apresentam bandas intraligantes nesta região (247 e 260 nm, respectivamente). Experimentos análogos com os compostos **(2)** e **(3)** apresentaram as mudanças espectrais análogas. Resultados similares já foram descritos na literatura para complexos de cobre com geometrias quadrado planar ou piramidal [180, 181].



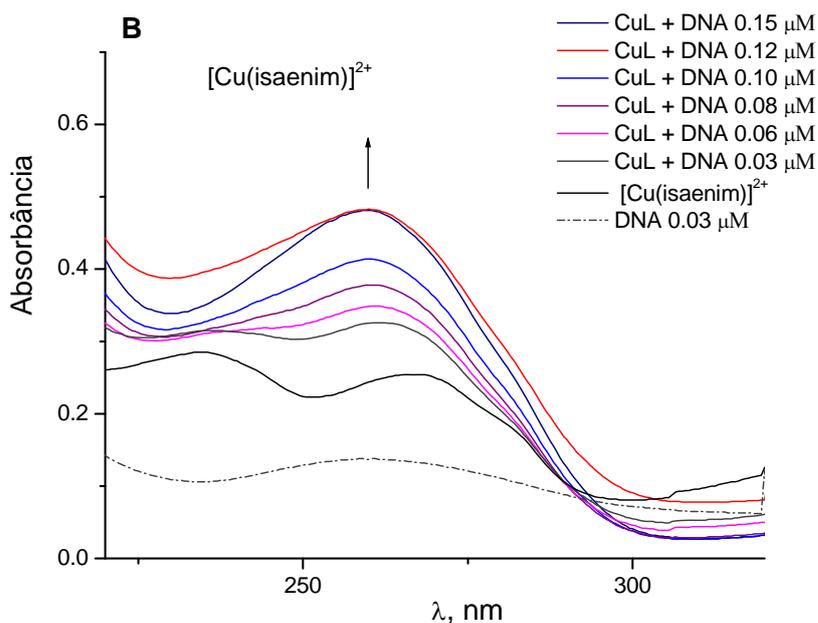


Figura 58. Espectro de absorção da titulação dos complexos (A) $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (**2**) e (B) $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$ (**4**) com DNA (adição de alíquotas de 10 μL). O espectro de cada complexo (concentração de 20 μM , volume inicial de 100 μL) foi monitorado em função do aumento da concentração de DNA (0,03-0,15 μM), como indicada na legenda.

Em todos os casos, houve um aumento considerável na absorbância em torno de 260 nm. Isto pode ser um indicativo de uma intercalação clássica dos complexos de cobre entre as fitas do DNA. Usualmente, após a adição de DNA, observa-se na banda de absorção da biomolécula, em 260 nm, um hipercromismo (aumento da absorbância) ou um hipocromismo (diminuição da absorbância) devido a distorções na dupla-hélice do DNA, causado por uma forte ligação ou intercalação dos complexos metálicos [71,182].

II – 4.14. Estudos de Fluorescência da Intercalação de complexos de cobre no DNA

A interação dos complexos de cobre com o DNA foi também estudada através de espectros de fluorescência. O brometo de etídeo (EB) é uma das mais sensíveis sondas de fluorescência que pode se ligar ao DNA [183]. Não existe emissão do DNA sozinho e a fluorescência do brometo de etídeo aumenta após sua intercalação no DNA, quando comparado ao EB sozinho [184]. Se o complexo metálico se intercalar entre as fitas do DNA, isto causará uma diminuição dos sítios de ligação do DNA disponíveis para o brometo de etídeo e haverá uma diminuição da intensidade de fluorescência do sistema EB–DNA [185]. Por isso, quando os compostos são adicionados, é possível verificar se estes são capazes de

remover o EB do DNA, ou seja, se eles interagem com a biomolécula ou se intercalam entre as fitas do DNA.

A Figura 59 mostra a curva saturação da intensidade de fluorescência obtida com a adição de EB ao DNA 1 μM , variando-se sua concentração na faixa de 2 a 22 μM , isto é, com excesso de EB.

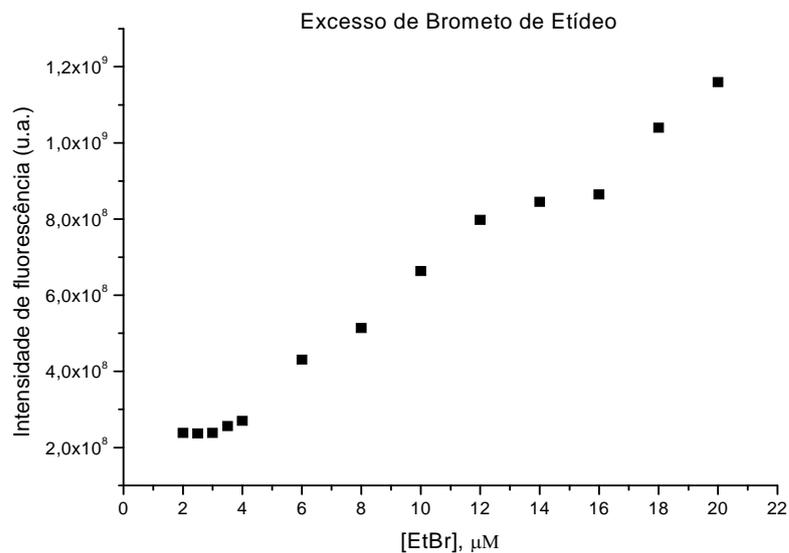


Figura 59. Curva de saturação da intensidade de fluorescência obtida com a adição de EB ao DNA 1 μM , variando-se a concentração na faixa de 2 a 22 μM .

Com estas concentrações utilizadas, verificamos que a intensidade de fluorescência não variou nos primeiros pontos, isto é, só após o quarto ponto (4 μM) é que a intensidade começou a aumentar. No entanto, estes valores já correspondem aos valores da intensidade do EB sozinho, indicando que o brometo já estava em excesso com relação ao DNA.

O experimento foi então repetido com concentrações menores de EB, (Figura 60).

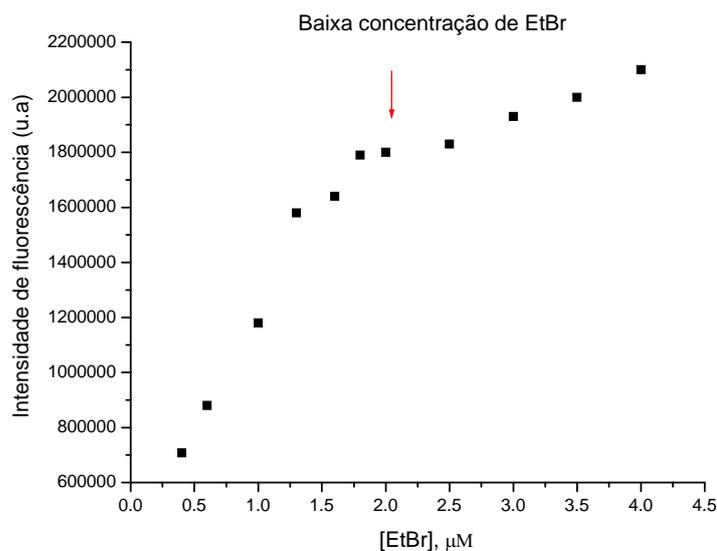
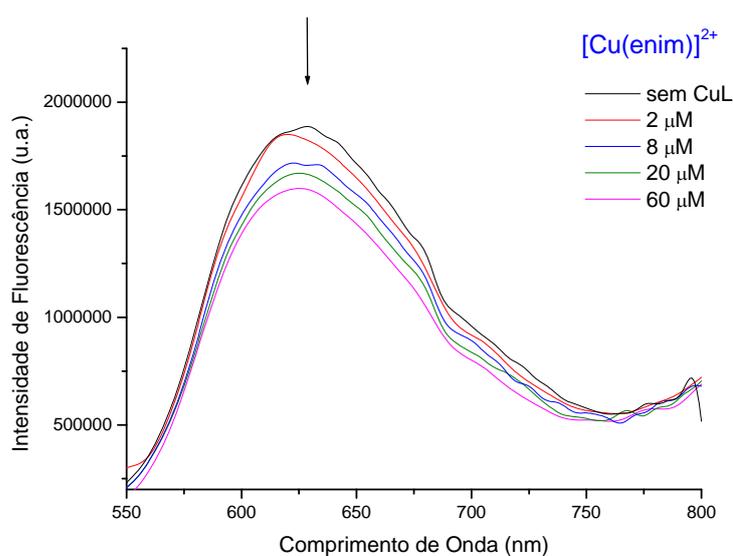
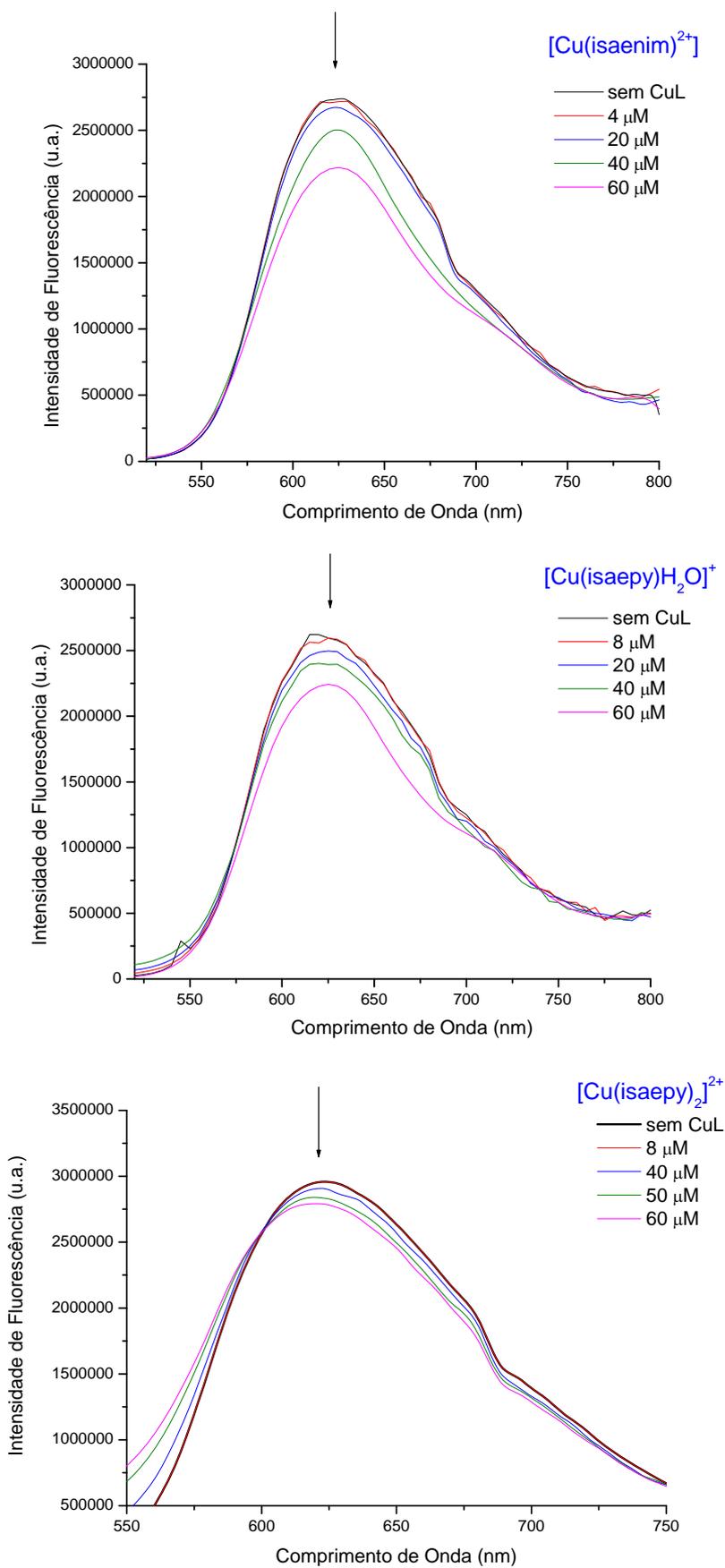


Figura 60. Curva de saturação da intensidade de fluorescência obtida com a adição de EB ao DNA 1 µM, variando-se sua concentração na faixa de 0,4 a 4 µM.

Esta variação de concentração do EB foi realizada para verificar o ponto de saturação de moléculas de brometo de etídeo nos sítios do DNA. A concentração de EB utilizada para os próximos experimentos foi então de 2 µM, que corresponde ao ponto de saturação do brometo de etídeo, sem grande excesso do mesmo.

Os espectros de emissão do EB ligado ao DNA na ausência e na presença dos complexos de cobre estão mostrados na Figura 61.





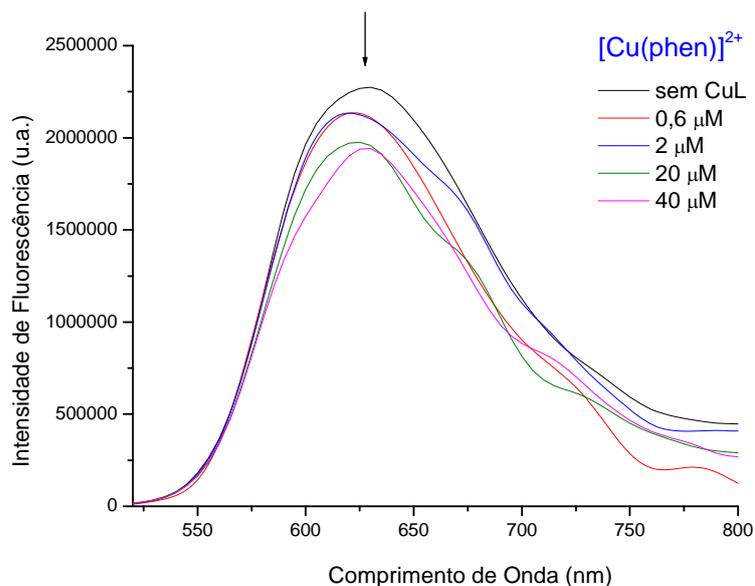


Figura 61. Espectros de emissão do EB ligado ao DNA na ausência e na presença dos compostos $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{isaenin})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$, respectivamente. $[\text{EB}] = 2 \mu\text{M}$, $[\text{DNA}] = 1 \mu\text{M}$, $[\text{CuL}] = 0,6$ a $60 \mu\text{M}$. A seta indica que a intensidade diminui com o aumento da concentração dos compostos de cobre.

Verificou-se nos espectros dos compostos $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ a presença de um ponto isobéptico, em ~ 570 e 600 nm , respectivamente. Nos outros casos, este ponto não é tão evidente.

A Figura 62 mostra o decaimento da intensidade de emissão do brometo de etídeo, ligado ao DNA, após a adição de cada um dos complexos na solução de DNA.

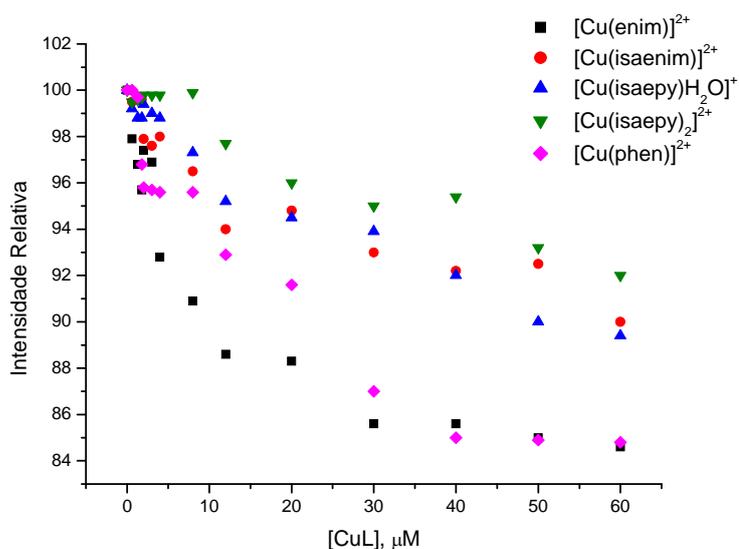


Figura 62. Efeito da adição dos compostos de cobre na intensidade da fluorescência do brometo de etídeo ligado ao DNA. $[\text{EB}] = 2 \mu\text{M}$, $[\text{DNA}] = 1 \mu\text{M}$, $[\text{CuL}] = 0,6$ a $60 \mu\text{M}$.

Os dados sugerem que todos os compostos se intercalam no DNA, provavelmente substituindo o EB. Além disso, mostram que a habilidade de intercalação do composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ compara-se com a do composto $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$, com constante de equilíbrio de saturação mais alta que a dos outros complexos.



A partir dos dados de intensidade obtidos para os compostos e para o brometo de etídeo, calculou-se essa constante de saturação de ligação e o número de sítios de ligação para cada um dos complexos. Os cálculos foram realizados segundo Rupesh e colaboradores [186].

Primeiramente, calculou-se a concentração dos complexos metálicos ligados ao DNA usando a fórmula:

$$C_1 = \frac{I_{\text{DNA/EB}} - I_{\text{DNA/EB/CuL}}}{(V-1)K}$$

onde C_1 é a concentração do complexo metálico ligado ao DNA, $I_{\text{DNA/EB}}$ é a intensidade de fluorescência do DNA e EB na ausência do complexo metálico; $I_{\text{DNA/EB/CuL}}$ é a intensidade de fluorescência do DNA, EB e complexo metálico em uma dada concentração do complexo (0,6 a 60 μM); V é a razão entre a intensidade de fluorescência do brometo de etídeo ligado ao DNA e a intensidade de fluorescência do brometo de etídeo livre; e K é o coeficiente angular do gráfico intensidade de fluorescência em função da concentração de brometo de etídeo sem DNA.

A concentração do complexo não ligado (C_{nl}) ao DNA é escrito como:

$$C_{nl} = C_T - C_1$$

onde C_T é a concentração total dos complexos metálicos em solução.

Para calcular a constante de afinidade de um ligante com uma biomolécula é usada a equação de Scatchard [187]:

$$r/C_{nl} = K(n - r)$$

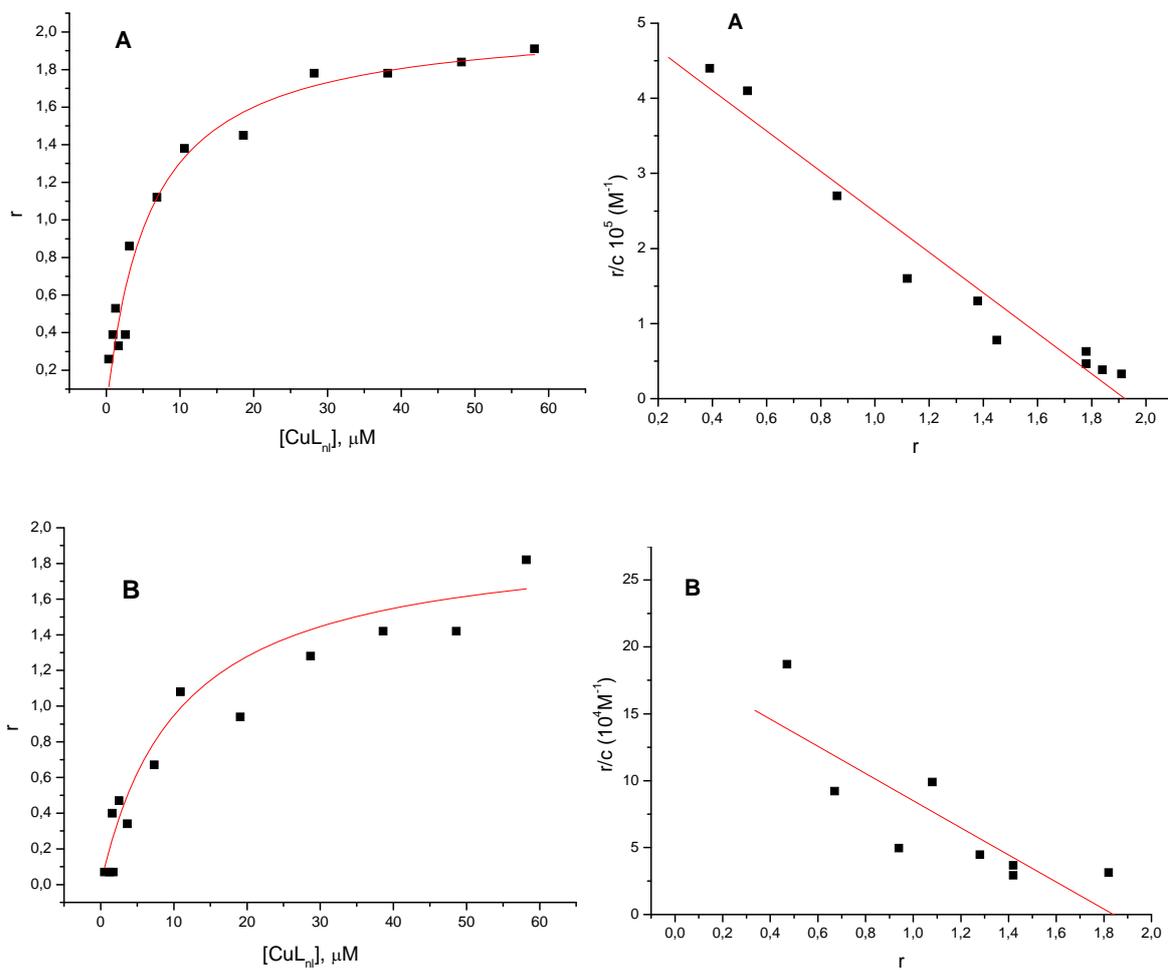
onde r é a razão entre a concentração do complexo ligado e o número dos sítios totais disponíveis para a ligação, n é o número de sítios de ligação por mol de DNA e K é a constante de ligação intrínseca ao sítio. Neste caso,

$$r = C_1 / [\text{DNA}]_{\text{total}}$$

A constante de ligação foi calculada através do gráfico de r em função da concentração do metal não ligado (C_{nl}). A curva no gráfico é uma hipérbole (curva de saturação), onde os

valores de K e n são determinados usando um ajuste de regressão não-linear. Para linearizar esta curva, pode-se construir um gráfico de r/C_{nl} em função de r . O valor de n será dado pelo ponto onde a reta intercepta o eixo x , e o valor de K é o coeficiente angular. No entanto, esta transformação causa um erro maior do que usar a curva de saturação, isto é, o ajuste não-linear.

A curva de saturação e o gráfico de Scatchard para os complexos são mostrados na Figura 63. Os valores de K e n dos respectivos complexos são mostrados na Tabela 15.



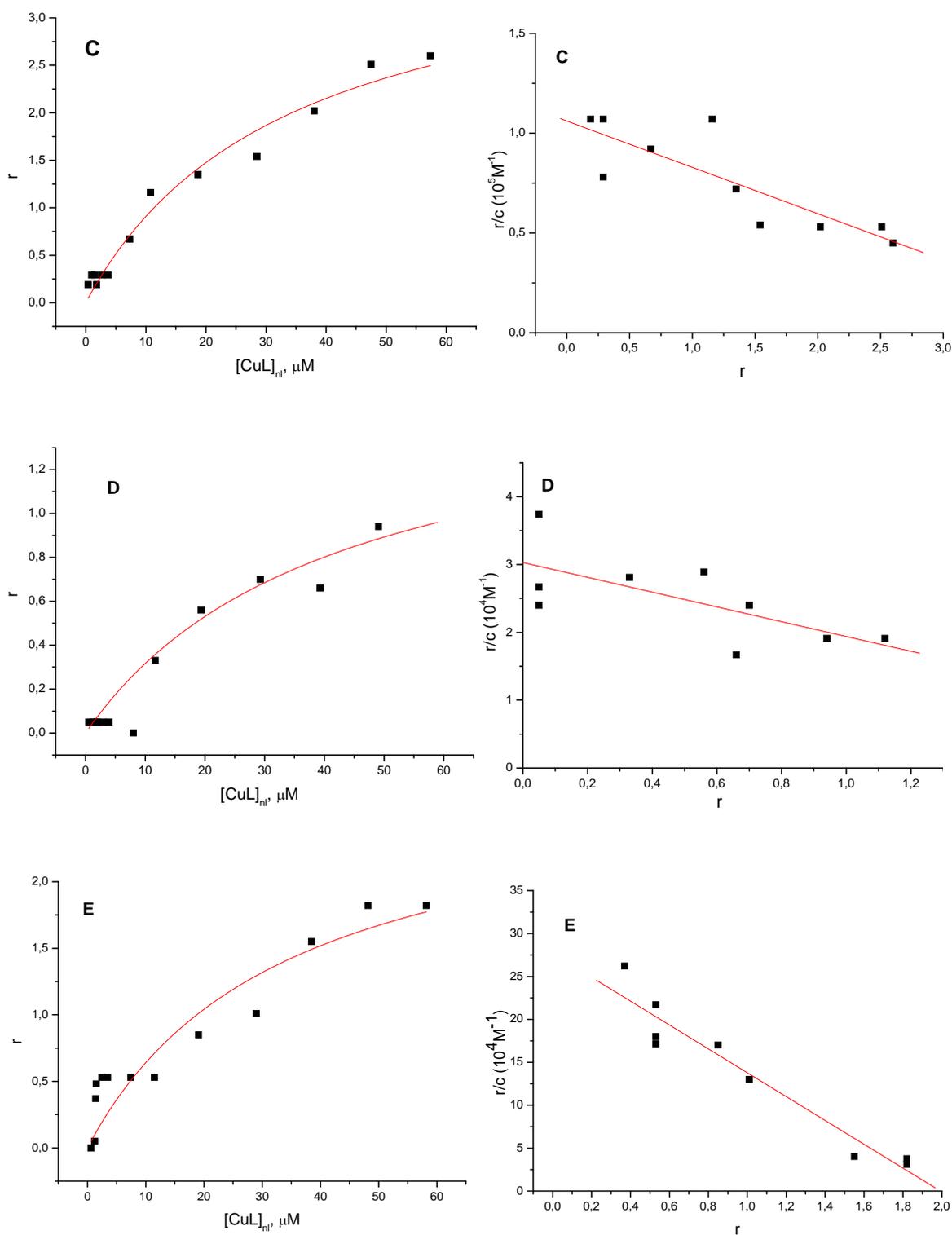


Figura 63. Gráfico da curva de saturação e gráfico de Scatchard, respectivamente, para os complexos. (A) $Cu(enim)H_2O]^{2+}$, (B) $[Cu(isaenim)]^{2+}$, (C) $[Cu(isaepy)H_2O]^+$, (D) $[Cu(isaepy)_2]^{2+}$, (E) $[Cu(phen)_2]^{2+}$. $[EB] = 2 \mu M$, $[DNA] = 1 \mu M$, $[CuL] = 0,6$ a $60 \mu M$.

Tabela 15. Valores de K e n para a série de complexos de cobre (II) obtidos pelo ajuste não-linear da curva de saturação.

Compostos	Nº de sítios de ligação (n)	K ($10^4 M^{-1}$)
$[Cu(enim)H_2O]^{2+}$	0,78	17,1
$[Cu(isaenim)]^{2+}$	0,75	9,33
$[Cu(isaepy)H_2O]^+$	1,64	2,97
$[Cu(isaepy)_2]^{2+}$	0,75	1,42
$[Cu(phen)_2]^{2+}$	1,07	2,95

Pelos valores obtidos, verificou-se que todos os compostos apresentam $n \sim 1$, isto é, há intercalação de uma molécula para cada mol de DNA, similarmente ao verificado para o $[Cu(phen)_2]^{2+}$. O composto $[Cu(isaepy)H_2O]^+$ apresentou um valor de K mais elevado ($1,6 \times 10^4 M^{-1}$) e se compararmos seu análogo $[Cu(isaepy)_2]^{2+}$ ($0,7510^4 M^{-1}$), parece que a presença do segundo ligante isaepy dificulta a intercalação do cobre no DNA ou que a presença da água, um ligante lábil, facilita essa intercalação. Em estudos análogos de compostos de Pt, é admitido que a presença de um sítio lábil é necessário para a intercalação [188]. Nestes estudos os valores determinados de n para $cis\text{-}\{Pt(NH_3)_2Cl_2\}$, $cis\text{-}[Pt(en)Cl_2]$ e $Pt(dien)Cl]Cl$ são bem mais baixos $\sim 0,20$.

As diferenças nas constantes de ligação dos complexos de cobre com o DNA podem ser explicadas pelos fatores que estabilizam as ligações. A coordenação covalente é uma forte interação entre o íon metálico e átomos do ligante. Ao contrário, as ligações por pontes de hidrogênio e interações de van der Waals são bem mais fracas.

O composto $[Cu(enim)]^{2+}$ apresenta, de acordo com o EPR, uma geometria quase quadrado planar, sendo por isso maior sua constante de afinidade entre as fitas do DNA. Os experimentos de interação com o DNA através dos espectros de absorção na região do UV/Vis também mostraram que este composto é o que mais se intercala ao DNA, já que apresentou maior modificação na banda em 260 nm (hipercromismo). Esse hipercromismo indica perda das interações de elétrons π entre as bases do DNA, possivelmente entre as bases G e C, que é a via usual de intercalação de complexos metálicos ao DNA. Os compostos $[Cu(isaenim)]^{2+}$ e $[Cu(enim)]^{2+}$ ligam-se ao DNA fortemente e geram bastante radicais hidroxil, conforme observado nos experimentos de EPR, e causam também bastante danos ao açúcar do DNA. No entanto, geram menos danos ao DNA conforme observado nos experimentos de clivagem.

O composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ é o que possui um volume maior e uma geometria mais tetraédrica ao redor do cobre, por isso apresenta menor constante de afinidade, cerca de dezessete vezes menor que o composto $[\text{Cu}(\text{enim})]^{2+}$ (**3**). No entanto, este composto foi o que mais causou danos ao DNA, até mesmo na ausência de peróxido. Este composto pode estar associado ao DNA através das “grooves” (cavidades ou fendas), mantendo interações por ligações de hidrogênio com as bases. A explicação para o fato de este composto ligar-se ao DNA mais fracamente, e mesmo assim causar danos mais eficientemente ao DNA do que os outros compostos, pode ser atribuída à sua proximidade às bases do DNA, fazendo com que o íon cúprico esteja mais próximo do sítio alvo no DNA do que nos outros compostos.

Para o composto que apresentou maior intercalação, $[\text{Cu}(\text{enim})]^{2+}$ (**3**), experimentos análogos foram feitos com o DNA de Calf-thymus. A Figura 64 mostra a curva de saturação da intensidade de fluorescência obtida com a adição de EB ao DNA Calf-thymus 3,2 μM , variando-se sua concentração na faixa de 10 a 127 μM .

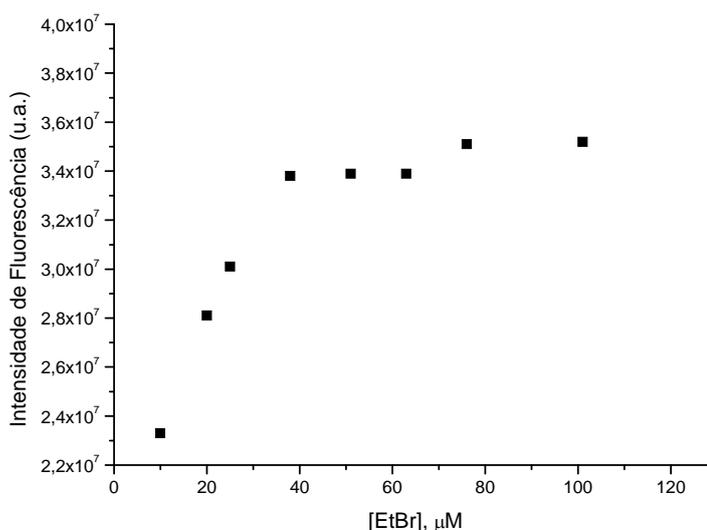


Figura 64. Curva de saturação da intensidade de fluorescência obtida com a adição de EB ao DNA-CT 3,2 μM , variando-se a concentração na faixa de 10 a 127 μM .

Essa variação de concentração do EB foi realizada para verificar o ponto de saturação da fluorescência de moléculas de brometo de etídeo aos sítios do DNA. A concentração de EB utilizada para os próximos experimentos foi de 51 μM , que corresponde ao ponto de saturação do brometo de etídeo, sem excesso do mesmo.

Os espectros de emissão do EB ligado ao DNA-CT na ausência e na presença do complexo $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ está mostrado na Figura 65.

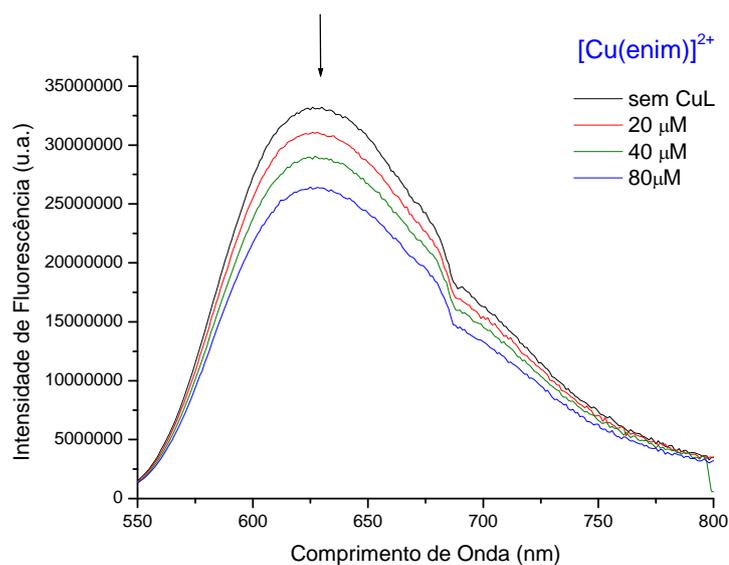


Figura 65. Espectros de emissão do EB ligado ao DNA-CT na ausência e na presença do composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$. $[\text{EB}] = 51 \mu\text{M}$, $[\text{DNA}] = 3,2 \mu\text{M}$, $[\text{CuL}] = 2$ a $120 \mu\text{M}$. A seta indica que a intensidade diminui com o aumento da concentração dos compostos de cobre.

A Figura 66 mostra o decaimento da intensidade de emissão do brometo de etídeo após a adição do complexo **(3)** na solução de DNA.

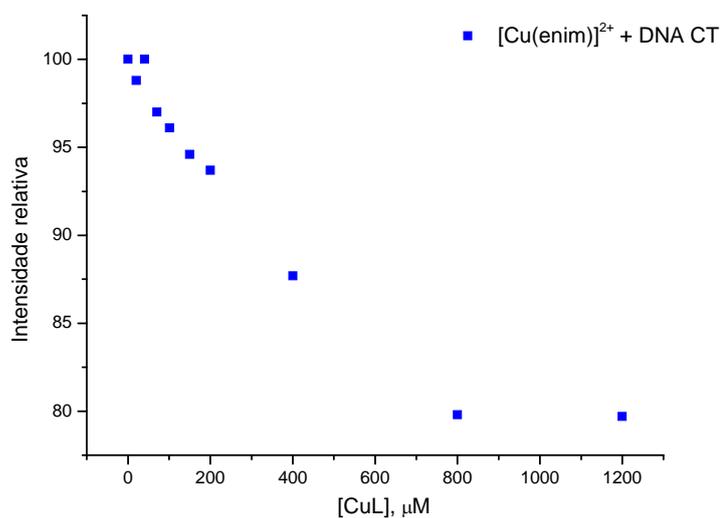


Figura 66. Efeito da adição do composto **(3)** na intensidade do brometo de etídeo ligado ao DNA. $[\text{EB}] = 51 \mu\text{M}$, $[\text{DNA}] = 3,2 \mu\text{M}$, $[\text{CuL}] = 2$ a $120 \mu\text{M}$.

A partir dos dados de intensidade obtidos para o composto e para o brometo de etídeo, calculou-se a constante de saturação de ligação e o número de sítios de ligação para todos os complexos da mesma maneira citada anteriormente.

A curva de saturação e o correspondente gráfico de Scatchard para os complexos são mostrados na Figura 67.

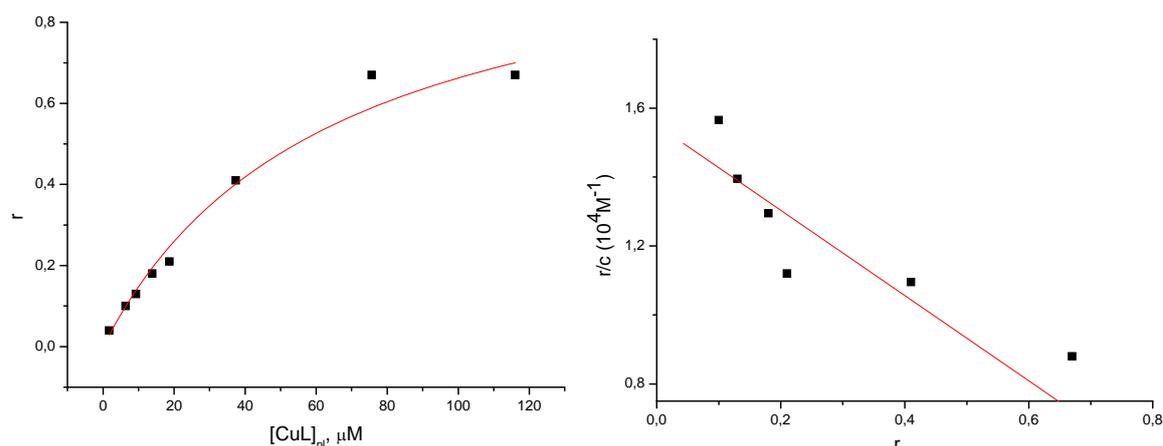


Figura 67. Gráfico da curva de saturação e gráfico de Scatchard para o complexo $[Cu(enim)H_2O]^{2+}$ (**3**). $[EB] = 51 \mu M$, $[DNA] = 3,2 \mu M$, $[CuL] = 2$ a $120 \mu M$.

O valor de n encontrado para o composto $[Cu(enim)H_2O]^{2+}$ na presença de DNA-CT foi de 1,08 e o valor de K de $1,49 \times 10^4 M^{-1}$. O valor de n é maior que o encontrado para este composto na presença de DNA plasmidial; no entanto, o valor de K está muito abaixo do encontrado para o DNA plasmidial ($17 \times 10^4 M^{-1}$).

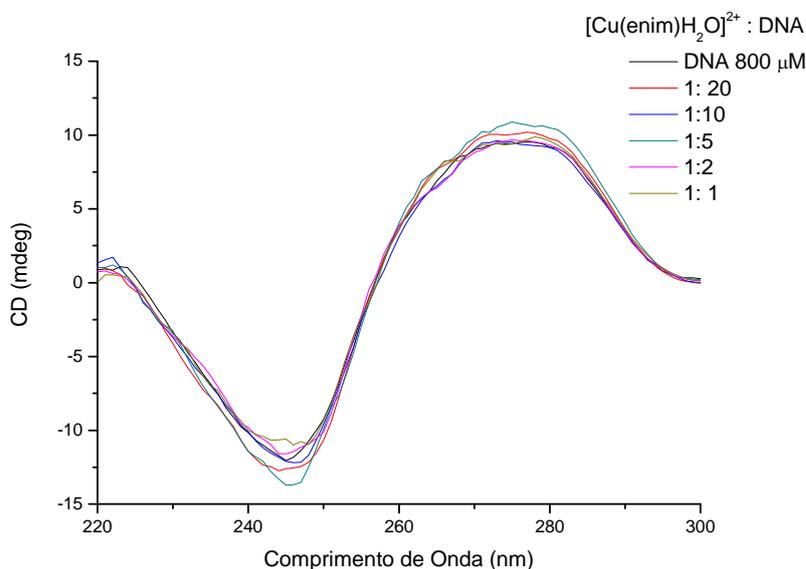
De acordo com dados da literatura, o valor de K para o complexo $[Cu(o\text{-phen})_2]^{2+}$ na presença de DNA-CT é de aproximadamente $1,85 \times 10^4 M^{-1}$ [189], pois o valor para a espécie oxidada é cerca de 2,7 vezes menor que para a espécie reduzida $[Cu(o\text{-phen})_2]^+$ ($5 \times 10^4 M^{-1}$) [80]. Portanto, o composto $[Cu(enim)H_2O]^{2+}$ parece intercalar-se ao DNA tão bem quanto o $[Cu(o\text{-phen})_2]^{2+}$.

II – 4.15. Estudo de Interação dos Complexos de Cobre ao DNA através de Dicroísmo Circular

A técnica de dicroísmo circular é muito importante para se detectar mudanças de conformação que ocorrem na cadeia de DNA em decorrência de interações DNA-droga, pois os sinais de CD são muito sensíveis ao modo de interação do DNA com pequenas moléculas [190].

O espectro de CD do DNA-CT consiste de uma banda positiva em 275 nm, que é relacionada à interação do tipo π existente entre os intercalantes e as bases, e uma banda negativa em 245 nm, devido à elipsicidade da forma B do DNA [161,177]. As mudanças observadas nos sinais dos espectros de CD correspondem assim a mudanças na estrutura do DNA. Portanto, uma interação nas fendas do DNA ou uma interação eletrostática de pequenas moléculas com o DNA apresentam pouca ou nenhuma perturbação nas bandas de interações π e na elipsicidade, enquanto que uma intercalação aumenta as intensidades de ambas as bandas, estabilizando a conformação da forma B do DNA-CT, como observado para os intercaladores clássicos [191].

Os espectros de CD foram realizados com os complexos $[\text{Cu}(\text{enim})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$, pois foram os compostos que apresentaram as constantes de afinidade pelo DNA extremas (Figura 68). Após a adição destes compostos em várias proporções ao DNA-CT, verificou-se que ambos causaram mudanças não significativas nas intensidades das bandas positiva e negativa do espectro de CD. Chen e colaboradores observaram um aumento dessas bandas quando adicionaram seus complexos ao DNA, indicando uma intercalação típica envolvendo interações π - π^* e uma estabilização da elipsicidade do DNA na forma B [192].



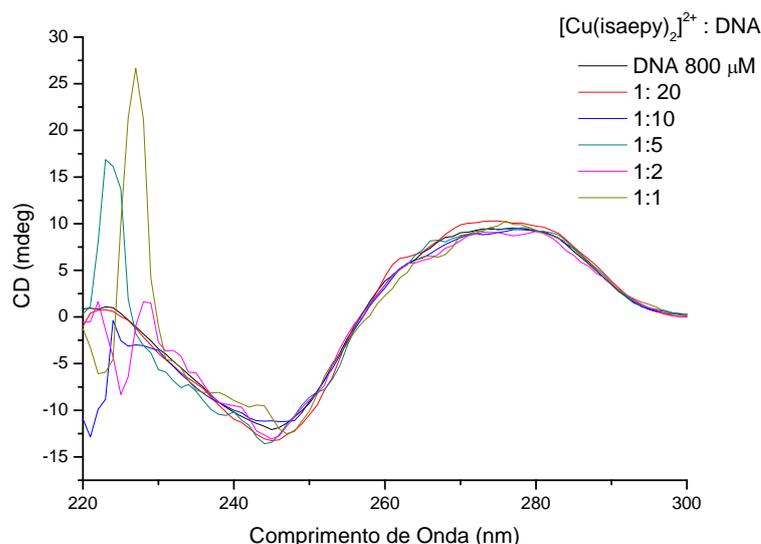


Figura 68. Espectro de CD do DNA-CT (800 μM) em tampão fosfato 50 mM/NaCl-0,1M na ausência e na presença dos compostos $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$, com várias concentrações dos compostos.

Portanto, para os nossos complexos estudados, a interação nas fendas é o principal modo de interação, ao invés da intercalação clássica.

Pequenas moléculas, tais como fármacos, corantes orgânicos, etc., geralmente ligam-se ao DNA através da fenda ou cavidade menor (*minor groove*), enquanto que macromoléculas, tais como moléculas de muitas proteínas, ligam-se ao DNA através da fenda ou cavidade maior (*major groove*) [193].

Alguns agentes antineoplásicos interagem com os pares de bases nitrogenadas reversivelmente (por meio de contatos de van der Waals, interações eletrostáticas e, sobretudo, ligação de hidrogênio), geralmente através de conformações tipo iso-hélicas e são classificadas como moléculas ligantes na fenda menor do B-DNA. A característica iso-hélica pode ser definida pela alteração conformacional destas moléculas, para que haja a interação com os pares de bases nitrogenadas que compõem a hélice do B-DNA. As moléculas mais representativas dessa classe são as amidinas aromáticas e as lexitropsinas [194].

De fato, foi observado que em tal conformação iso-hélica, deve ocorrer uma possível interação com os pares de bases nitrogenadas do DNA, descrita também nas estruturas cristalográficas. Os ligantes na fenda menor interagem preferencialmente com os pares de bases AT (adenina e timina), pois a guanina possui um substituinte, que é uma amina aromática, voltada para o interior da fenda menor, causando impedimento estereoquímico.

Diversas modificações nas estruturas das amidinas aromáticas, distamicina e netropsina foram elaboradas, visando alterar a seletividade com relação aos pares de base AT para GC (guanina e citosina), aumentar o número de bases que irão interagir, além de se tentar aumentar a afinidade das moléculas às seqüências AT do DNA [194].

Sabe-se que o composto tetraédrico $[\text{Cu}(o\text{-phen})_2]^{2+}$ é primeiramente reduzido em solução, onde grupos tióis ou superóxido são os doadores de elétrons, e o complexo reduzido liga-se reversivelmente à fenda menor do DNA e sofre oxidação pelo peróxido de hidrogênio gerando espécies oxo-cobre que são diretamente as responsáveis pela clivagem do DNA. A coordenação do complexo pode ocorrer diretamente ou mais acessivelmente ao hidrogênio do C-1 da deoxi-ribose. No B-DNA, o hidrogênio do C-1 está localizado na parte inferior da fenda menor [195,196].

Já complexos metálicos contendo ligantes heterocíclicos aromáticos com cadeias longas têm mostrado que se ligam ao DNA não covalentemente, através de intercalação na fenda maior, onde o ligante heterocíclico é inserido parcialmente entre os pares de bases maximizando interações do tipo π [197].

Os compostos $[\text{Cu}(\text{enim})]^{2+}$ (**3**) e $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$ (**4**) provavelmente apresentam um mecanismo de intercalação semelhante ao $[\text{Cu}(o\text{-phen})_2]^{2+}$, onde o ataque oxidativo é iniciado no hidrogênio do C-1 da deoxi-ribose, localizado na parte inferior da fenda menor. Os complexos de coordenação devem-se ligar e provocar danos ao DNA provavelmente através deste domínio estrutural.

Ao contrário, os compostos $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ (**2**) e $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$ (**1**) podem estar interagindo com o DNA através da fenda maior, provavelmente entre pares de bases, já que são complexos com ligantes grandes e possuem estrutura com distorção tetraédrica maior.

II – 4.16. Experimentos de Cromatografia de Camada Fina (TLC) com DNA marcado com ^{32}P

Uma das possibilidades de danos ao DNA, causados ou induzidos por complexos de cobre, é a oxidação das bases purínicas ou pirimidínicas desta biomolécula [86,196,198] e outra é a hidrólise de ligações fosfato [81,199,200].

Com o objetivo de verificar se os compostos de cobre estavam clivando a ligação do fosfato ao nucleosídeo, realizou-se um experimento de incubação do DNA, contendo fosfato radioativo, marcado isotopicamente, $\alpha - ^{32}\text{P} - \text{UTP}$, com os complexos de cobre estudados, analisando-se os produtos através de cromatografia de camada fina ou camada delgada (TLC).

A Figura 69 refere-se ao experimento de clivagem da ligação fosfato do nucleotídeo.

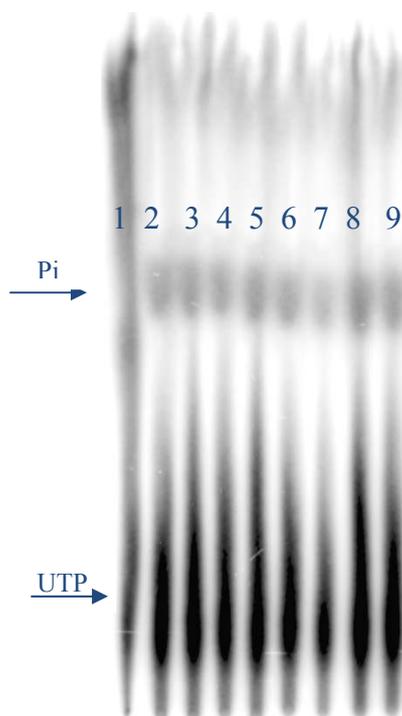


Figura 69. Cromatograma TLC dos compostos de cobre ($50 \mu\text{M}$) e UTP, incubados por 30 minutos, a $37,0^\circ\text{C}$ na presença de peróxido de hidrogênio ($120 \mu\text{M}$).

Canaleta 1: UTP (uracil trifosfato) com fósforo marcado;

Canaleta 2: $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$;

Canaleta 3: $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$;

Canaleta 4: $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+ + \text{H}_2\text{O}_2$;

Canaleta 5: $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$;

Canaleta 6: $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$;

Canaleta 7: $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$;

Canaleta 8: $[\text{Cu}(\text{pyrpn})] + \text{H}_2\text{O}_2$;

Canaleta 9: sem CuL + H_2O_2 (controle).

O fragmento observado em todas as canaletas corresponde ao fósforo inorgânico marcado (Pi) ainda ligado, já que também está presente na canaleta do UTP. Além disso, observou-se que não houve diminuição da intensidade da banda referente ao UTP em nenhuma canaleta. Isto indica que os compostos não clivaram a ligação do fosfato no nucleotídeo em nenhuma posição.

II – 4.17. Verificação de clivagem da ligação fosfato através de Gel de Poliacrilamida com Oligômeros de RNA ou DNA

Este experimento foi realizado para comprovar se realmente não ocorreu clivagem da ligação no fosfato. Pensou-se que seria necessário um fragmento maior para que os compostos pudessem interagir, para depois causar a clivagem. Em um nucleotídeo, como o utilizado no experimento anterior, são poucos os sítios de ligação já que existe apenas uma base.

Primeiramente, utilizou-se um oligômero de RNA marcado no fósforo 5' e a Figura 70 refere-se a um gel de poliacrilamida com o fragmento de RNA.

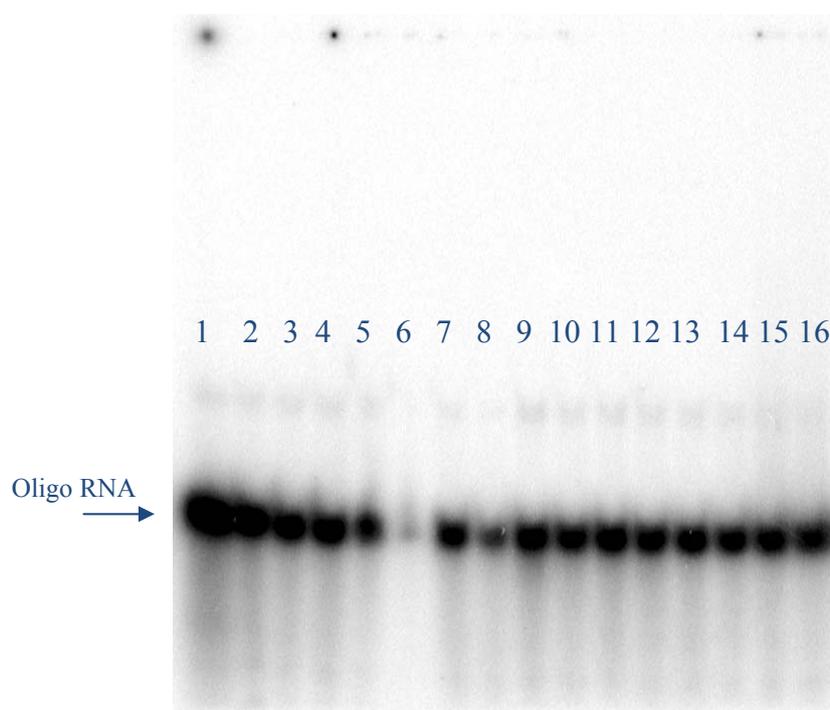


Figura 70. Gel de poliacrilamida 8% nativo, com oligômeros de RNA marcado no fósforo 5', incubados com complexos de cobre(II).

Canaleta 1: oligômero de RNA marcado;

Canaleta 2: sem CuL + H₂O₂ (controle);

Canaletas 3 e 4: [Cu(H₂O)₄]²⁺ + H₂O₂; 25 e 50 μM.

Canaletas 5 e 6: [Cu(pyrpn)] + H₂O₂; 25 e 50 μM.

Canaletas 7 e 8: [Cu(isapn)]²⁺ + H₂O₂; 25 e 50 μM.

Canaletas 9 e 10: [Cu(isaenin)]²⁺ + H₂O₂; 25 e 50 μM.

Canaletas 11 e 12: [Cu(enim)H₂O]²⁺ + H₂O₂; 25 e 50 μM.

Canaletas 13 e 14: [Cu(isaepy)H₂O]⁺ + H₂O₂; 25 e 50 μM.

Canaletas 15 e 16: [Cu(isaepy)₂]²⁺ + H₂O₂; 25 e 50 μM.

Existem duas mudanças que podem ser observadas no gel em caso de clivagem da ligação fosfato. A primeira seria a fragmentação abaixo do oligômero de RNA e, neste caso,

como o gel é nativo, só serão observados fragmentos grandes. A segunda seria a diminuição da intensidade do sinal radioativo do oligômero, indicando perda de fosfato marcado que estivesse mais exposto.

Em nenhuma canaleta foi observada fragmentação do oligômero. No entanto, observou-se a diminuição da intensidade do sinal radioativo para os compostos [Cu(pyrpn)] (7) e [Cu(isapn)]²⁺ (6). Para o composto [Cu(pyrpn)] pode ter ocorrido uma falha ao entrar no gel, pois o mesmo foi dissolvido em etanol e este solvente não passa através do gel.

Para completar o experimento anterior, também foi feito um gel de poliacrilamida com oligômero de DNA. Como o RNA é fita simples e o DNA é fita dupla, é possível que os compostos precisem se intercalar para causar quebra da ligação fosfato. Além disso, o gel de poliacrilamida utilizado foi desnaturante, o que permite a visualização de fragmentos pequenos, ou seja, uma maior definição (Figura 71).

Neste caso, o composto [Cu(pyrpn)] foi dissolvido em água contendo 10 % de DMSO para garantir sua entrada no gel.

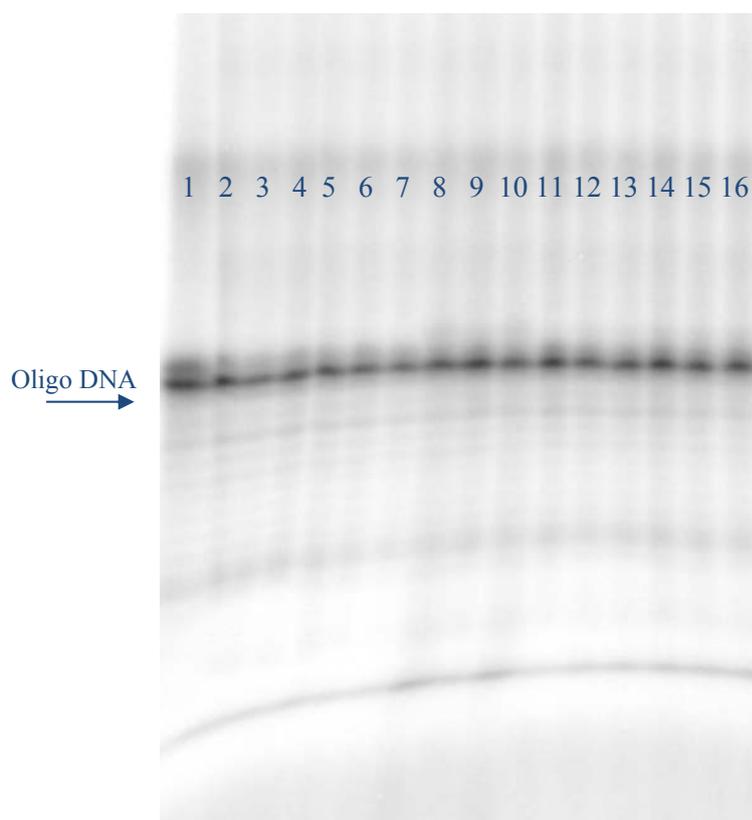


Figura 71. Gel de poliacrilamida 8% desnaturante, com oligômero de DNA marcado no fósforo 5'.

Canaleta 1: oligômero de DNA marcado;
Canaleta 2: sem CuL + H₂O₂ (controle);

Canaletas 3 e 4: $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$; 25 e 50 μM .
 Canaletas 5 e 6: $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$; 25 e 50 μM .
 Canaletas 7 e 8: $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$; 25 e 50 μM .
 Canaletas 9 e 10: $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$; 25 e 50 μM .
 Canaletas 11 e 12: $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$; 25 e 50 μM .
 Canaletas 13 e 14: $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$; 25 e 50 μM .
 Canaletas 15 e 16: $[\text{Cu}(\text{pyrpn})] + \text{H}_2\text{O}_2$; 25 e 50 μM .

Em nenhuma canaleta observou-se a formação de fragmentos abaixo do sinal do DNA, indicando que realmente o composto $[\text{Cu}(\text{pyrpn})]$ não tinha entrado no gel anterior por causa do etanol e que o composto $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ não clivou a ligação fosfato, como também já havia sido observado, podendo ter ocorrido alguma falha no momento de aplicação no gel.

E, finalmente, o experimento com o oligômero de RNA marcado foi novamente refeito para o composto $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ (**6**), em quatro concentrações diferentes, para confirmar o resultado negativo obtido anteriormente (Figura 72). Porém, desta vez foi utilizado o gel de poliacrilamida 8% desnaturante, que permite maior definição.

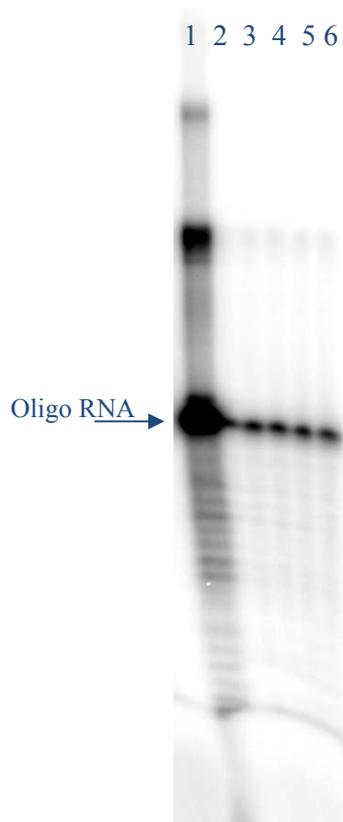


Figura 72. Gel de poliacrilamida 8% desnaturante, com oligômero de RNA marcado no fósforo 5' na presença do composto $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$.

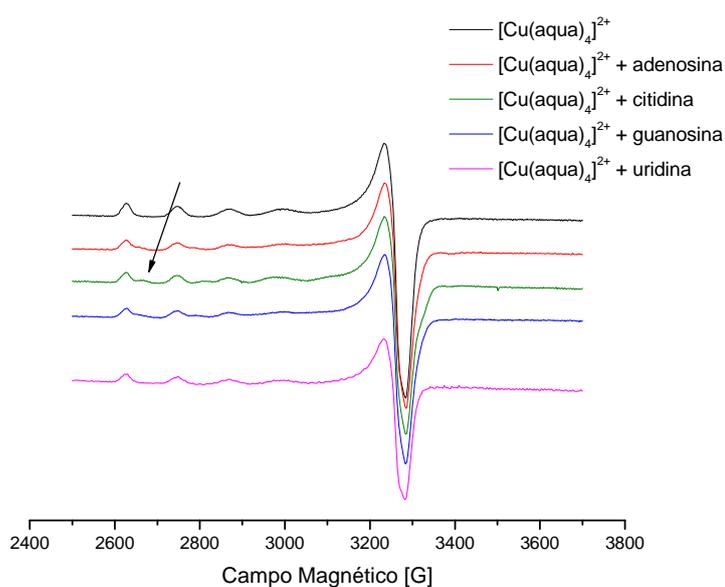
Canaleta 1: oligômero de RNA marcado;
 Canaleta 2: sem CuL + H_2O_2 (controle);
 Canaleta 3: 25 μM ;

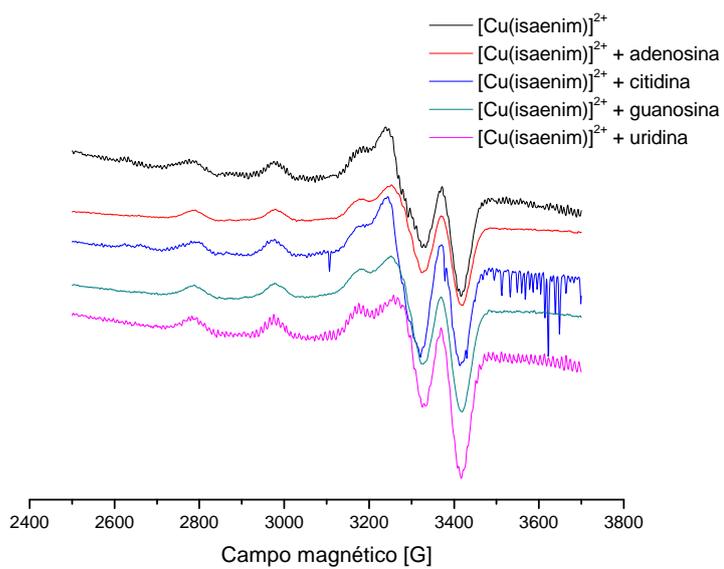
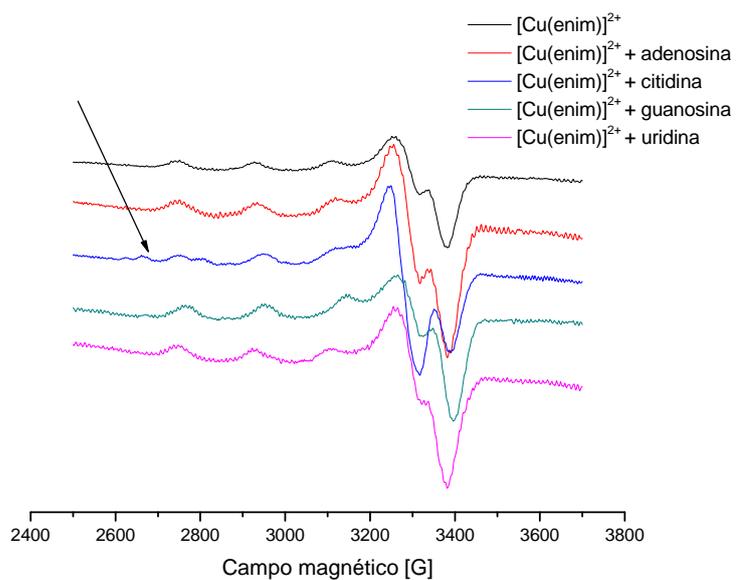
Canaleta 4: 50 μM ;
 Canaleta 5: 100 μM ;
 Canaleta 6: 200 μM .

Apesar das altas concentrações do composto $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, não foram detectados fragmentos de RNA abaixo do sinal do oligômero, indicando que este composto também não cliva a ligação fosfato.

II – 4.18. Espectros EPR de complexos de cobre em presença de DNA ou de suas Bases

Os dois sítios mais importantes e disponíveis para interação covalente entre um íon metálico e o DNA correspondem aos grupos doadores de elétrons das bases, preferencialmente a guanina, e aos grupos fosfatos do nucleotídeo. Para verificar se ocorre interação dos compostos com as bases foi feito um estudo de interação entre os compostos sintetizados e o próprio DNA ou suas bases, para comparação através da espectroscopia de EPR. Neste estudo foram utilizados os nucleotídeos, pois as bases são pouco solúveis em tampão fosfato pH = 7,4. A Figura 73 mostra os espectros de EPR obtidos e a Tabela 16 os correspondentes parâmetros medidos. Os parâmetros mostrados nesta tabela referem-se aos experimentos com excesso de nucleotídeos, mas que foram os mesmos obtidos para experimentos análogos com os nucleotídeos na proporção (1:1).





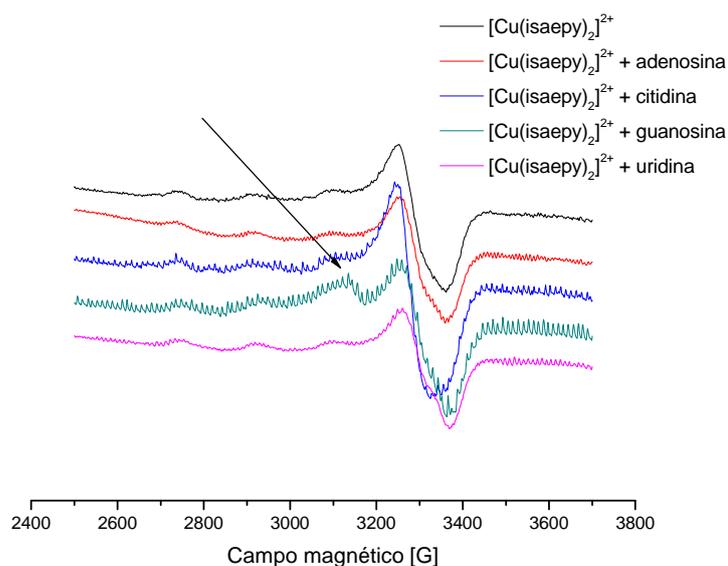


Figura 73. Espectros de EPR da interação entre os complexos e os nucleotídeos do DNA, a 77K. Todos os espectros foram registrados com: ganho no detector de $7,96 \times 10^3$, amplitude de modulação de 15G, constante de tempo de 40,96 ms e 2 varreduras.

Os parâmetros obtidos a partir dos espectros das Figuras anteriores são mostrados na Tabela 16, a seguir.

Tabela 16. Parâmetros medidos nos espectros de EPR da interação entre os complexos e bases do DNA, a 77K.

	$[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$				
	$^1A_{//}(\text{G})$	$^1g_{//}$	$^2A_{//}(\text{G})$	$^2g_{//}$	g
CuL	121	2,416			2,085
Adenosina	121	2,414			2,085
Citidina	121	2,414	147	2,333	2,085
Guanosina	121	2,416	145	2,360	2,048
Uridina	121	2,414			2,085

	$[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$				
	$^1A_{//}(\text{G})$	$^1g_{//}$	$^2A_{//}(\text{G})$	$^2g_{//}$	g
CuL	180	2,243			2,063
Adenosina	180	2,243			2,063
Citidina	180	2,243	145	2,363	2,063
Guanosina	180	2,243			2,063
Uridina	180	2,243			2,063

	$[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$				
	$^1A_{//}(\text{G})$	$^1g_{//}$	$^2A_{//}(\text{G})$	$^2g_{//}$	g
CuL	198	2,202			2,075
Adenosina	198	2,202			2,075
Citidina	198	2,202			2,075
Guanosina	198	2,202			2,075
Uridina	198	2,202			2,075

	$[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$		
	$^1A_{//}(\text{G})$	$^1g_{//}$	g
CuL	180	2,249	2,067
Adenosina	180	2,249	2,067
Citidina	180	2,249	2,067
Guanosina	180	2,249	2,067
Uridina	180	2,249	2,067

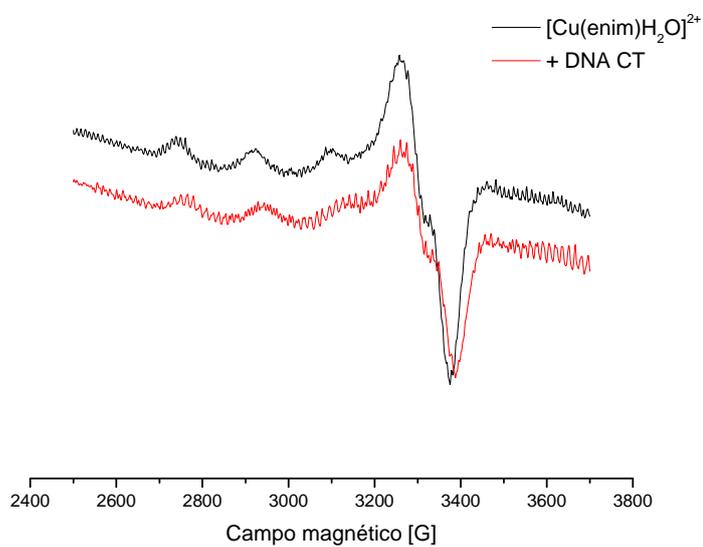
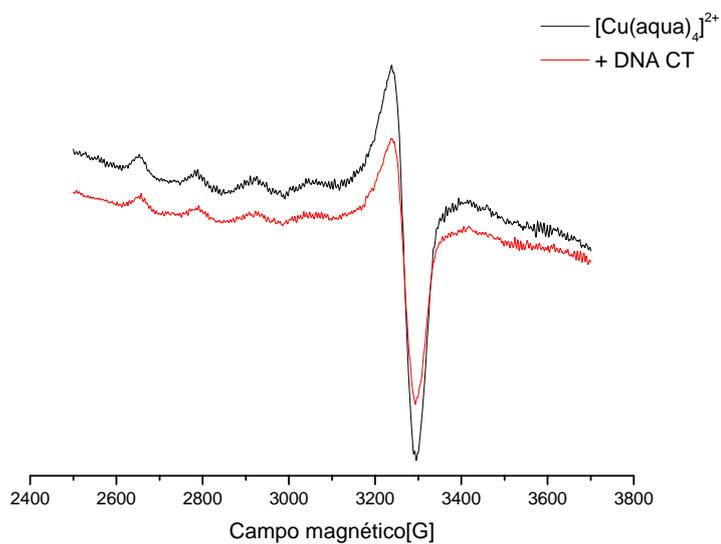
O composto $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ usado como controle, apresentou um novo sinal com parâmetro $A_{//}$ de $147 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ e $g_{//}$ de 2,333, aproximadamente, após adição da citidina e da guanosina, indicando provavelmente uma interação do cobre com estas bases. Estudos mostram que as quebras das fitas do DNA na presença de íons Cu(II) ocorrem usualmente próximos de resíduos de guanina, sugerindo que esses íons ligam-se ao DNA preferencialmente nesses sítios [201,202]. Nosso estudo de EPR com os nucleotídeos confirmaram que o $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ interage com os pares de base guanina e citosina.

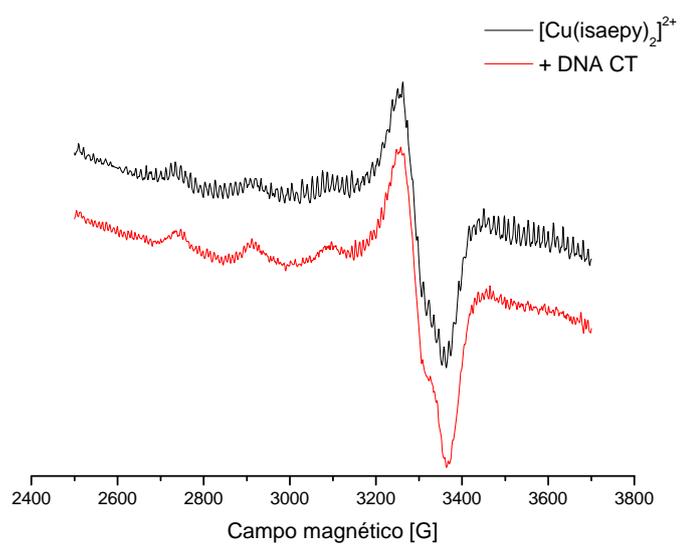
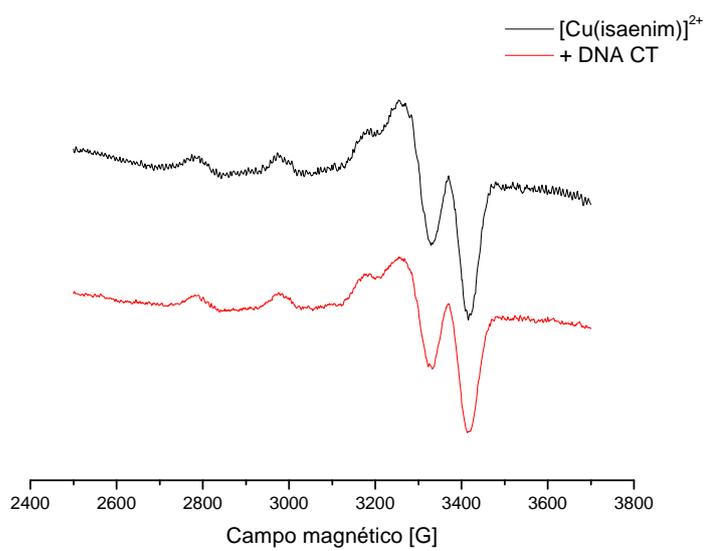
O composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (**3**) parece ter interação com a citidina, apresentando o mesmo parâmetro que o $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ em presença dessa base.

Os compostos $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ (**2**) e $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$ (**4**) provavelmente interagiram somente com a guanina, pois apesar dos parâmetros de EPR obtidos com esses compostos e com esta base serem os mesmos, quando comparados com os compostos sozinhos, a adição da

guanosina causou modificação no espectro. Provavelmente a guanina ocupa a quarta ou quinta posição de coordenação ao redor do cobre.

A Figura 74 mostra os espectros de EPR obtidos após 12 horas de incubação dos complexos com o DNA Calf-Thymus (CT) na proporção 3:1 [DNA]:[CuL].





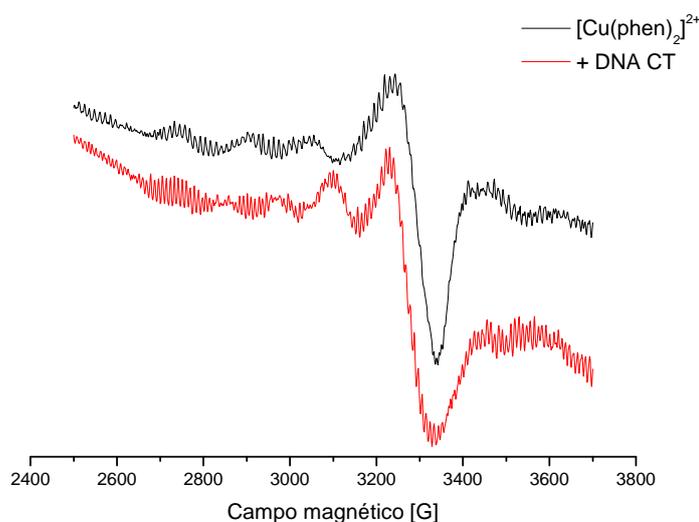


Figura 74. Espectros de EPR visando monitorar a interação entre os complexos de cobre com o DNA Calf-thymus, após 12 horas de incubação, a 77K. $[\text{DNA}]_{\text{CT}} = 1,20 \text{ mM}$; $[\text{CuL}] = 300 \mu\text{M}$; tampão fosfato 50 mM pH = 7,4. Todos os espectros registrados com: ganho no detector de $3,56 \times 10^4$, amplitude de modulação de 15G, constante de tempo de 40,96 ms e 4 varreduras.

Os parâmetros obtidos em presença de DNA CT foram os mesmos observados para os complexos na ausência da biomolécula, em pH = 7,4. O espectro do complexo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ na presença do DNA foi o único que apresentou parâmetros diferentes do complexo. O complexo apresenta um sinal com parâmetro de $A_{//}$ de $145 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ e $g_{//}$ de 2,273, enquanto que o composto na presença do DNA apresentou um novo sinal com parâmetro de $A_{//}$ de $178 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ e $g_{//}$ de 2,233. No entanto, isso não significa obrigatoriamente que os outros compostos não estejam interagindo com o DNA, mas sim que não está ocorrendo nenhuma variação acentuada na vizinhança do cobre decorrente da interação com o ácido nucléico. Estes resultados reforçam a idéia de que essa interação entre os complexos e o DNA ocorre nas alças, cavidades ou fendas (*major* ou *minor grooves*).

5. CONCLUSÕES

Os experimentos realizados permitiram estudos sistemáticos da atividade biológica de compostos imínicos de cobre(II), modulada pelo ligante, e forneceram resultados importantes para a compreensão de seus mecanismos de interação com as biomoléculas HSA e DNA, induzindo processos oxidativos ou degradativos na biomolécula.

Para esses estudos, quatro novos complexos imínicos de cobre com ligantes que apresentassem similaridade estrutural à de compostos naturais com atividade biológica relevante, particularmente derivados imínicos de indóis, oxindóis e pirróis, foram sintetizados: $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$ (**1**), $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ (**3**), $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$ (**4**) e $[\text{Cu}(\text{pyrpn})]$ (**5**). Estes complexos foram então caracterizados por análise elementar, técnicas espectroscópicas (UV/Vis, IV, EPR) e espectrometria ESI-MS. Os complexos $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (**2**), $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ (**6**) e $[\text{Cu}(\text{phen})_2](\text{ClO}_4)_2$ (**7**) já haviam sido sintetizados anteriormente em nosso laboratório e foram utilizados para comparação nos experimentos.

Os compostos (**1**), (**2**), (**4**) e (**6**), derivados de isatina, apresentaram um interessante equilíbrio em solução, de acordo com o pH do meio, conforme verificado por espectroscopia UV/Vis, sendo possível a determinação dos respectivos valores de pK_a . O equilíbrio ceto-enólico do composto (**4**) também foi verificado por EPR. De maneira análoga, os valores de pK_a foram determinados para os complexos $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$, $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ e $[\text{Cu}(\text{isaenim})](\text{ClO}_4)_2$, que foram de 8,94; 7,90 e 7,90, respectivamente. O valor de pK_a 9,5 para o composto $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ já havia sido previamente determinado [42].

Interações dos complexos com a albumina humana (HSA) e com o plasma sanguíneo foram estudadas através das técnicas EPR, SDS-PAGE e CD. Os estudos de EPR e SDS-PAGE mostraram que os compostos interagem no plasma sanguíneo principalmente com a albumina. Por EPR, verificou-se que essa interação ocorre preferencialmente no sítio I, isto é, no sítio N-terminal. No entanto, os compostos (**2**) e (**3**) provavelmente interagem com outro sítio da albumina, após certo período de indução. Os experimentos de CD confirmaram a interação dos compostos no sítio N-terminal e também permitiram calcular as constantes de estabilidade dos compostos, com $\log K = 15-18$, verificando-se que são da mesma ordem de grandeza que a da espécie $[\text{Cu-HSA}]$, com $\log K = 16,2$, e que, portanto, são estáveis no meio biológico, podendo competir com a proteína pelos íons de cobre.

Além disso, estudou-se o comportamento destes complexos frente a agentes redutores ou oxidantes usuais no meio biológico, como a glutatona (GSH), o ascorbato (asc) e o peróxido de hidrogênio. Através dos experimentos com estes compostos, observou-se que o

complexo **(3)** foi o mais reativo, sendo facilmente reduzido pela glutatona e pelo ascorbato e também foi bastante ativo na formação de radicais livres em presença de H_2O_2 , nas duas condições experimentais utilizadas.

Adicionalmente, investigou-se a atividade pró-oxidante de tais complexos, através de danos causados em diferentes substratos, visando elucidar estudos prévios de sua atividade pró-apoptótica e antitumoral. Experimentos de EPR com captador de spin, na presença de HSA e H_2O_2 , mostraram a formação de quantidades significativas de radicais hidroxil e radicais de carbono. No experimento de danos carbonílicos à albumina, o composto $[Cu(isaepy)_2]^{2+}$ **(2)** foi capaz de gerar danos carbonílicos na proteína em concentrações estequiométricas de composto, mesmo na ausência do oxidante peróxido de hidrogênio. Em presença de peróxido de hidrogênio, os danos observados com este composto **(2)** foram os maiores, enquanto para os outros compostos foram apenas um pouco maiores que os observados com a aqua-complexo de cobre(II). Experimentos de CD complementaram estes resultados, mostrando que somente os complexos **(1)**, **(2)** e **(6)** causaram modificações na α -hélice da proteína. No entanto somente o composto $[Cu(isaepy)_2]^{2+}$ **(2)** foi capaz de gerar diversos fragmentos na proteína, em presença de peróxido de hidrogênio, através do experimento de SDS-PAGE [155].

Por outro lado, os compostos $Cu(enim)H_2O]^{2+}$ **(3)** e $[Cu(isaenim)]^{2+}$ **(4)** foram os mais ativos nos experimentos realizados para degradação do açúcar do DNA, a 2-deoxi-D-ribose, monitorados através do método TBARS. De acordo com os dados mostrados nos experimentos de danos ao DNA, a maioria dos complexos estudados exibiram uma atividade “nuclease” melhor que a apresentada pelo aqua-complexo, que foi usado como controle. A exceção foi o composto $[Cu(pyrpn)]$, pouco reativo. Eles também mostraram que esta propriedade é modulada pela natureza do ligante imínico, e não só pela presença do íon cobre. Além disso, os experimentos demonstraram que a presença de peróxido de hidrogênio é necessária para clivar o DNA plasmidial, sugerindo um mecanismo redox [203], provavelmente envolvendo EROs. Entretanto, o complexo $[Cu(isaepy)_2](ClO_4)_2$ **(2)** foi o único capaz de clivar a fita do DNA, mesmo na ausência de H_2O_2 , sugerindo um mecanismo adicional. Na presença de H_2O_2 , sua atividade é muito similar à do complexo **(1)**, com o mesmo ligante. Os complexos **(3)** e **(4)** exibiram uma atividade “nuclease” menor. No entanto, todos eles apresentaram elevada eficiência na clivagem do DNA, comparável à de outros compostos já descritos na literatura [177].

Experimentos de fluorescência, EPR, gel de eletroforese marcado com α - ^{32}P -UTP e CD foram ainda realizados, visando elucidar o mecanismo de ação destes complexos no meio biológico.

A intercalação dos complexos nas fitas do DNA foi demonstrada através de experimentos de fluorescência, monitorando-se a substituição do brometo de etídeo (EB) no DNA. As constantes de equilíbrio correspondentes mostraram valores semelhantes ao do complexo $[\text{Cu}(o\text{-phen})_2]^{2+}$ (**7**) ($\sim 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), um dos mais estudados na literatura, porém em alguns casos, obtiveram-se valores bem superiores ($1\text{-}2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). A relação n determinada de intercalação foi similar à de outros casos descritos na literatura e igual a ~ 1 espécie CuL/mol de DNA. Apenas um dos complexos, $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$ (**1**), indicou um valor superior (1,6). O composto $[\text{Cu}(\text{enim})]^{2+}$ (**3**) apresenta, de acordo com o EPR, uma geometria mais quadrado planar, sendo por isso maior sua constante de afinidade entre as fitas do DNA. Os experimentos de interação com o DNA através dos espectros de absorção na região do UV/Vis também mostraram que este composto é o que mais se intercala ao DNA, já que apresentou maior modificação na banda em 260 nm (hipercromismo). Os compostos $[\text{Cu}(\text{enim})]^{2+}$ (**3**) e $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$ (**4**) ligam-se ao DNA fortemente e geram bastante radicais hidroxil, conforme observado nos experimentos de EPR, e causam também bastante danos ao açúcar do DNA. No entanto, geram menos clivagens no DNA, conforme observado nos experimentos correspondentes.

Estudos de interações dos complexos com o DNA, através de espectroscopia EPR, indicaram pequena ou nenhuma variação geométrica na vizinhança do cobre. Em presença dos nucleotídeos das correspondentes bases (guanina, citosina, adenina e timina ou uracil), apenas com alguns dos complexos verificou-se variações mais pronunciadas em presença de guanina ou citosina. Estas são as bases que usualmente se apresentam como alvos preferenciais em estudos similares na literatura.

Experimentos com fosfato marcado demonstraram que o mecanismo não é hidrolítico, isto é, não envolve hidrólise das ligações fosfato. Ao contrário, a alta capacidade dos complexos de gerarem EROs em presença de peróxido de hidrogênio, verificada através de espectroscopia EPR, indica que o mecanismo é provavelmente oxidativo, isto é, através de danos às bases ou à deoxi-ribose.

Através de CD, poucas perturbações na elipsicidade do DNA foram observadas, o que indica que estes complexos provavelmente estão localizadas nas cavidades ou fendas do ácido nucléico. Assim, para os nossos complexos estudados, a interação nas fendas, maior ou menor, é o principal modo de interação, ao invés da intercalação clássica, interna. Os

compostos $[\text{Cu}(\text{enim})]^{2+}$ (**3**) e $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{2+}$ (**4**) provavelmente apresentam um mecanismo de intercalação semelhante ao $[\text{Cu}(\text{o-phen})_2]^{2+}$, onde eles se ligam ao DNA próximo ao anel da ribose, localizado na fenda menor, formando EROs via reações tipo Fenton, que então atacam o açúcar. Ao contrário, os compostos $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]^+$ (**1**) e $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ (**2**) podem estar interagindo com o DNA através da fenda maior, provavelmente entre pares de bases, já que são complexos com ligantes grandes, volumosos, e possuem estrutura com distorção tetraédrica maior.

6. REFERÊNCIAS

- [1] W. Kaim, J. Rall, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35 (1996) 43.
- [2] V. Sargentelli, A. E. Mauro, A. C. Massabni, *Química Nova* 19 (1996) 290.
- [3] E. T. Adman, *Advances in Protein Chemistry*, v. 42, CRC Press (1991) 145.
- [4] R. Lontie, ed., *Copper Proteins and Copper Enzymes*, vol. 1-3, CRC Press (1984).
- [5] E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2563.
- [6] J. P. Collman, R. Boulator, C. J. Sunderland, L. Fu, *Chem. Rev.* 104 (2004) 561.
- [7] I. A. Koval, D. Pursche, A. F. Stassen, P. Games, B. Krebs, J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.* 9 (2003) 1669.
- [8] W. Kaim, J. Rall, *Angew. Chem., Int. Ed.* 35 (1996) 43; E. I. Solomon, P. Chen, M. Metz, S. K. Lee, A. E. Palmer, *Angew. Chem., Int. Ed.* 40 (2001) 4570; E. Kim, E. E. Chufan, K. Kamaraj, K. D. Karlin, *Chem. Rev.* 104 (2004) 1077.
- [9] J.S. Valentine, P. A. Doucette, S. Z. Potter, *Annual Rev. Biochem.* 74 (2005) 563.
- [10] T. Theophanides, J. Anastassopoulou, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42 (2002) 57.
- [11] R. R. Crichton, *Biological Inorganic Chemistry. An Introduction*, Ed. Elsevier, 1a Ed., 2008.
- [12] Y. Nako, M. Oonish, U. Tamoko, H. kashihara, S. Suzuki, M. Sakai, Y. Fukuda, *Bull. Chem. Soc.* 67 (1994) 2586.
- [13] W. Kaim, B. Schwederski, *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, John Wiley & Sons LTDA.
- [14] A. L. Lehninger, *Princípios de Bioquímica*, Ed. Sarvier, São Paulo, 1986.
- [15] B. Sarkar, *J. Inorg. Biochem.* 79 (2000) 187.
- [16] G. Rotilio, M. T. Carrí, L. Rossi, M. R. Ciriolo, *IUBMB Life* 50 (2000) 309; M. E. Letelier, A. M. Lepe, M. Fáandez, J. Salazar, R. Marín, P. Aracena, H. Speisky, *Chem.-Biol. Interact.* 151 (2005) 71.
- [17] M. Valko, C. Rhodes, J. Moncola, M. Izakovic, M. Mazur, *Chemico-Biol. Interactions*, 160 (2006) 1.
- [18] M. F. Lombardo, M. R. Ciriolo, G. Rotilio, L. Rossi, *Cel. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 1733.
- [19] J. W. Saunders, *Science* 154 (1966) 604.
- [20] D. R. Green, G. Kroemer, *Science* 305(2004) 626.
- [21] N. Dias, C. Bailly, *Biochem Pharmacol.* 70 (2005) 1.

- [22] H. Z. Zhang, S. Kasibhatla, Y. Wang, J. Herich, J. Guastella, B. Tseng, J. Drewe, S. X. Cai, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 309.
- [23] S. R. Rajski, R. M. Williams, *Chem. Rev.* 98 (1998) 2723.
- [24] P. B. Schiff, J. Fant, S. B. Horwitz, *Nature* 277 (1979) 665.
- [25] M. E. Lane, B. Yu, A. Rice, K. E. Lipson, C. Liang, L. Sun, C. Tang, G. McMahon, R. G. Pestell, S. Wadler, *Cancer Res.* 61 (2001) 6170.
- [26] R. Golsteyn, *Cancer Let.* 217 (2005) 129.
- [27] D. W. Litchfield, *Biochem. J.* 369 (2003) 1.
- [28] I. Collins, M. D. Garrett, *Curr. Op. Pharmacol.* 5 (2005) 366.
- [29] L. S. Ward, *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 46 (2002) 351.
- [30] D. J. Moshinsky, C. R. Bellamacina, D. C. Boisvert, P. Huang, T. Hui, J. Jancarik, S. Kim, A. G. Rice, *Bioch and Research Comm.* 310 (2003) 1026.
- [31] K. C. Luk, M. E. Simcox, A. Schutt, K. Rowan, T. Thompson, Y. Chen, U. Kammlott, W. DePinto, P. Dunten, A. Desmatakis, *Bioorganic & Medicinal Chem. Let.* 14 (2004) 913.
- [32] K. H. Thompson, C. Orvig, *Science* 300 (2003) 936.
- [33] N. Farrell, *Coord. Chem. Rev.* 232 (2002) 1.
- [34] a) P. J. Sadler, Z. Guo, *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 863. b) S. J. Berners-Price, P. J. Sadler, *Coord. Chem. Rev.* 151 (1996) 1.
- [35] L. J. Ming, *Med. Res. Rev.* 23 (2003) 697.
- [36] F. Kratz, M. T. Schutte, *Cancer J.* 11 (1998) 176.
- [37] S. Ahmad, A. A. Isab, S. Ali, A. R. Al-Arfaj, *Polyhedron* 25 (2006) 1633.
- [38] G. Mendoza-Díaz, R. Perez-Alonso, R. Moreno-Esparza, *J. Inorg. Biochem.* 64 (1996) 207.
- [39] G. Cerchiaro, K. Aquilano, G. Filomeni, G. Rotilio, M.R. Ciriolo, A.M.D.C. Ferreira, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 1433.
- [40] K. G. Daniel, P. Gupta, R. H. Harbach, W. C. Guida, Q. P. Dou, *Biochem. Pharm.* 67 (2004) 1139.
- [41] J. F. M. Silva, S. J. Garden, A. C. Pinto, *J. Braz. Chem. Soc.* 12 (2001) 273.
- [42] a) G. Cerchiaro, G. Micke, M. M. Tavares, A. M. D. C. Ferreira, *J. Mol. Catalysis A: Chem* 221 (2004) 29; b) G. Cerchiaro, P. Saboya, D. M. Tomazela, M. N. Eberlin, A. M. D. C. Ferreira, *Transit. Met. Chem.* 29 (2004) 495.

- [43] G. Cerchiaro, A. M. D. C. Ferreira, *J. Braz. Chem. Soc.* 17(2006) 1473.
- [44] S. K. Sridhar, A. Ramesh, *Biol. Pharm. Bull.* 24 (2001) 1149.
- [45] S.E. Webber, J. Tikhe, S. T. Worland, S. A. Fuhrman, T. F. Hendrickson, D. A. Matthews, R. A. Love, A. K. Patick, J. W. Meador, R. A. Ferre, E. L. Brown, D. M. DeLisle, C. E. Ford, S. L. Binford, *J. Med. Chem.* 39 (1996) 5072.
- [46] N. Karali, *Eur. J. Méd. Chem.* 37 (2002) 909.
- [47] A. R. Quesada, R. M.-Chápuli, M. A. Medina, *Med. Res. Rev.* 26 (2006) 483.
- [48] J. M.-Ayala, C. E.-Guzmán, S. E. C.-Blum, E. O. R.-Hernández, S. Bernes, M. J. R.-Hoz, N. B.-Behrens, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 1676.
- [49] N. Kitajima, Y. Morooka, *Chem. Rev.* 94 (1994) 737.
- [50] C. Steinkuller, J. Z. Pedersen, U. Weser, G. Rotilio, *Biochem. Pharmacol.* 42 (1991) 1821.
- [51] A. Nagele, K. Felix, E. Lengfelder, *Biochem. Pharmacol.* 47 (1994) 555.
- [52] D. A. Rockfile, A. E. Martell, *J. Mol. Catal. A: Chemical* 99 (1995) 87.
- [53] E. Spodine e J. Manzur, *Coord. Chem. Rev.* 119 (1992) 171.
- [54] T. Yaping, F. Yunzhong, L. Qinhui, S. Qin, S. Wenmei, *Free Rad. Biol. Med.* 12 (1992) 533.
- [55] C. M. Lui, R. G. Xiong, X. Z. You, *Polyedron* 116 (1997) 119.
- [56] J. Choi, C. A. Malakowsky, J. M. Talent, C. C. Conrad, R. W. Gracy, *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 293 (2002) 1566.
- [57] E.R. Stadtman, *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) 797.
- [58] K. S. Kasprzak, *Free Radical Biology & Medicine*, 32 (2002) 958.
- [59] J. R. Requena, C.-C. Chao, L. R. Levine, E. R. Stadtman, *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 98 (2001) 69.
- [60] J. Choi, C. A. Malakowsky, J. M. Talent, C. C. Conrad, R. W. Gracy, *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 293 (2002) 1566.
- [61] F. T. Greenaway, J. J. Hahn, N. Xi, J. R. J. Sorenson, *Biometals* 11 (1998) 21.
- [62] Y. Zhang, D. E. Wilcox, *J. Biol. Inor. Chem* 7 (2002) 327.
- [63] I. D. Kuntz, W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem* 28 (1974) 239.
- [64] D.C. Ramirez, S. E. G. Mejiba, R. P. Mason, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 27402.
- [65] D. C. Carter, J. X. Ho, *Adv. Protein Chem.*, 45 (1994) 153.
- [66] W. Bal, J. Christodoulou, P. J. Sadler, A. Tucker, *J. Inorg. Biochem.* 70 (1998) 33.

- [67] A. I. Ivanov, J. A. Parkinson, E. Cossins, J. P. Sadler, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 5 (2000) 102.
- [68] X. H. Zou, B.H. Ye, H. Li, Q. L. Zhang, H. Chao, J. G. Liu, L. N. Ji, X. Y. Li, *J. Biol. Inorg. Chem.* 6 (2001) 143.
- [69] S. J. Berners-Price, P. J. Sadler, *Coord. Chem. Rev.* 151 (1996) 1–40.
- [70] A. Zaha, “*Biología Molecular Básica*”, 2000, Ed. Mercado Aberto, 336p.
- [71] V. Uma, M. Elango, B.U. Nair, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2007) 3484.
- [72] T. Biver, F. Secco, M. Venturini. *Coord. Chem. Rev.* 252 (2008)1163.
- [73] K. S. Kasprzak, G. S. Buzard, *Molecular biology and toxicology of metals*. London: Taylor and Francis; 2000, 477–527.
- [74] O. I. Aruoma, B. Halliwell, E. Gajewski, M. Dizdaroglu, *Biochem. J.* 273 (1991) 601.
- [75] K. R. Rupesh, S. Deepalatha, M. Krishnaveni, R. Venkatesan, S. Jayachandran, *Eur. J. Med. Chem.* 41 (2006) 1494.
- [76] C. Liu, J. Zhou, Q. Li, L. Wang, Z. Liao, H. Xu, *J. Inorg. Biochem.* 75 (1999) 233.
- [77] B. Macías, M.V. Villa, F. Sanz, J. Borrás, M. González-Álvarez, G. Alzuet, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 1441.
- [78] H. Li, X.Y. Le, D. W. Pang, H. Deng, Z. H. Xu, Z.H. Lin, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 2240.
- [79] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, (1989) 2^a ed., Clarendon Press, Oxford.
- [80] B. K. Santra, P. A. N. Reddy, G. Neelakanta, S. Mahadevan, M. Nethaji, A. R. Chakravarty, *J. Inorg. Biochem.* 89 (2002) 191.
- [81] C. Fernandes, G. L. Parrilha, J. A. Lessa, L. J.M. Santiago, M. M. Kanashiro, F. S. Boniolo, A. J. Bortoluzzi, N. V. Vugman, M. H. Herbst, A. Horn Jr., *Inorg. Chim. Acta* 359 (2006) 3167.
- [82] (a) W. J. Dixon,; J. J. Hayes, J. R. Levin, M. F. Weidner, B. A. Dombroski, T. D. Tullius, *Methods Enzymol.* 208 (1991) 380 (b) W. K. Pogozelski, T. J. McNeese, T. D. Tullius, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 6428.
- [83] (a) R. P. Hertzberg, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 313. (b) R. P. Hertzberg, P. B. Dervan, *Biochemistry* 23 (1984) 3934. (c) P. B. Dervan, *Methods Enzymol.* 208 (1991) 497.
- [84] (a) J. Stubbe, J. W. Kozarich, *Chem. Rev.* 87 (1987) 1107.

- [85] (a) S. M. Hecht, *Acc. Chem. Res.* 19 (1986) 383.
- [86] D.S. Sigman, D.R. Graham, V.D. Aurora, A.M. Stern, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 12269.
- [87] Z. M. Wang, H. K. Lin, Z. F. Zhou, M. Xu, T. F. Liu, S. R. Zhu, Y. T. Chen, *Bioorg Med Chem.* 9 (2001) 2849.
- [88] T. Hirohama, Y. Kuranuki, E. Ebina, T. Sugizaki, H. Arai, M. Chikira, S. P. Tamil, M. Palaniandavar, *J Inorg Biol Chem* 99 (2005) 1205.
- [89] S. C. Zhang, J. L. Zhou, *J. Coord. Chem.* 61 (2008) 2488.
- [90] M. A. De Rosch, W. C. Trogler, *Inorg. Chem.* 29 (1990) 2409.
- [91] (a) Hashimoto, S.; Yamashita, R.; Nakamura, Y. *Chem. Lett.* (1992) 1639 (b) Hashimoto, S.; Nakamura, Y. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1995) 1413.
- [92] Y. An, M.-L. Tong, L.-N. Ji, Z.-W. Mao, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2006) 2066.
- [93] A. T. Chaviara, E. E. Kioseoglou, A. A. Pantazaki, A. C. Tsipis, P. A. Karipidis, D. A. Kyriakidis, C. A. Bolos, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1749.
- [94] E. M. Hodnett, P. D. Mooney, *J. Med. Chem.* 13 (1970) 786.
- [95] A. T. Chaviara, P. J. Cox, K. H. Repana, A. A. Pantazaki, K. T. Papazisis, A. H. Kortsaris, D. A. Kyriakidis, G. St. Nikolov, C. A. Bolos, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 467.
- [96] M. Baldini, M. Belicchi-Ferrari, F. Bisceglie, G. Pelosi, S. Pinelli, P. Tarasconi, *Inorg. Chem.* 42 (2003) 2049.
- [97] R. K. Hussain, R. P. Sambasiva, B. P. Ravindra, *Trans. Met. Chem.* 25 (2000) 154.
- [98] A. M. Thomas, A. D. Naik, M. Nethaji, A. R. Chakravarty, *Inorg. Chim. Acta* 357 (2004) 2315.
- [99] P. M. Krishna, K. H. Reddy, J. P. Pandey, D. Siddavattam, *Trans. Met. Chem.* 33 (2008) 661.
- [100] B. García, J. Garcia-Tojal, R. Ruiz, R. Gil-García, S. Ibeas, B. Donnadieu, J. M. Leal, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1892.
- [101] (a) H. A. O. Hill, D. J. Page, N. J. Walton, *J. Electroanal. Chem.* 208 (1986) 395; (b) H. A. O. Hill, D. J. Page, N.J. Walton, *J. Electroanal. Chem.* 217 (1987) 129.
- [102] H. C. Neu, *Am. J. Med.* 82 (1987) 395.
- [103] I. Turel, L. Golic, O. L. Ruiz Ramirez, *Acta Chim. Slov.* 46 (1999) 273.
- [104] M. Ruiz, R. Ortiz, L. Perello, J. Latorre, J. Server-Carrio, *J. Inorg. Biochem.* 65 (1997) 87.

- [105] B. Macias, M. V. Villa, I. Rubio, A. Castineiras, J. Borrás, *J. Inorg. Biochem.* 84 (2001) 163.
- [106] G. Psomas, A. Tarushi, E. K. Efthimiadou, Y. Sanakis, C. P. Raptopoulou, N. Katsaros, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1764.
- [107] D. S. Lamani, K. R. V. Reddy, H. S. B. Naik, H. R. P. Naik, A. M. Sridhar *J. Macromol. Sci., Part A*, 45 (2008) 857.
- [108] P. R. Reddy, N. Raju, K. V. G. Reddy, *Metal Ions in Biology and Medicine* 10 (2008) 389.
- [109] G. Facchin, E. Kremer, O. R. Nascimento, A. J. Costa, J. Ellena, M. H. Torre, *Metal Ions in Biology and Medicine* 10 (2008) 140.
- [110] Y. L. Song, Y. T. Li, Z. Y. Wu, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1691.
- [111] L. L. Chappell, A. D. Voss, J. R. Morrow, *Inorg. Chem.* 37 (1998) 3989.
- [112] S. K. Gupta, D. D. Agarwal, D. Raina, *Ind. J. Chem. Sec, Inog. Bioinorg. Phys. Theor. Anal. Chem.* 35 (1996) 995.
- [113] S. Chandrashekhar, W. L. Waltz, J. W. Prasad, *Quail, Con. J. Chem.* 75 (1997) 1363.
- [114] J. H. Jeong, M. W. Chun, W. K. Chung, *J. Med. Chem* 6 (1996) 47; *Chem. Abstr.* 125 (1996) 75.
- [115] V. D. Campbell, E. J. Parsons, W. T. Pennington, *Inorg. Chem.* 32 (1993) 1773.
- [116] J. L. Sessler, H. G. Mody, D. M. Tarak, B. N. A. Tashioki, S. W. Young, *Acc. Chem. Res.* 27 (1994) 43.
- [117] S. G. Kang, S. J. Kim, J. H. Jeong, *Inorg. Chem. Acta* 340 (2002) 187.
- [118] N. H. Williams, W. Cheng, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 8079.
- [119] P. Molenveld, J. F. J. Engbersen, D. N. Reinhoudt, *Chem. Soc. Rev.* 29 (2000) 75.
- [120] a) S. T. Frey, H. H. J. Sun, N. N. Murphy, K. D. Karlin, *Inorg. Chim. Acta* 242 (1996) 329; b) K. J. Humphreys, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 5588; c) K. J. Humphreys, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 6009; d) K. J. Humphreys, A. E. Johnson, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Biol. Inorg. Chem.* 7 (2002) 835.
- [121] M. J. Belousoff, B. Graham, L. Spiccia, *Eur. J. Inorg. Chem* (2008) 4133.
- [122] J. L. G.-Giménez, G. Alzuet, M. G.-Álvarez, A. Castineiras, M. L.-González, J. Borrás, *Inorg. Chem.* 46 (2007) 7178.

- [123] L. M. Rossi, A. Neves, A. J. Bortoluzzi, R. Hörnera, B. Szpoganicz, H. Terenzi, A. S. Mangrichc, E. Pereira-Maia, E. E. Castellano, W. Haase, *Inorg. Chim. Acta* 358 (2005) 1807.
- [124] L. Li, N. N. Murthy, J. Telser, L. N. Zakharov, G. P. A. Yap, A. L. Rheingold, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *Inorg. Chem.* 45 (2006) 7144.
- [125] S. Komeda, T. Moulaei, K. K. Woods, M. Chikuma, N. P. Farrell, L. D. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 16092.
- [126] P. Guerriero, S. Tamburini, P.A. Vigato, *Coord. Chem. Rev.* 139 (1995) 17.
- [127] W.A. Alves, G. Cerchiaro, A. Paduan, D.M. Tomazela, M.N. Eberlin, A.M.D.C. Ferreira, *Inorg. Chim. Acta* 358 (2005) 3581.
- [128] C.M. Harris, T.N. Lockyer, H. Waterman, *Nature* 192 (1961) 424.
- [129] G. S. Patterson, *J. Chem. Edu.* 76 (1999) 395.
- [130] U. K. Laemmler, *Nature* 227 (1970) 680.
- [131] Y. Kumar, S. Tayyab, S. Muzammil, *Arch. Biochem. Biophys.* 426 (2004) 3.
- [132] A. Richter, U. Weser, *Inorg. Chim. Acta* 151 (1988) 145.
- [133] C.L. Hawkins, M.J. Davies, *Biochem. Biophys. Acta* 1360 (1997) 84.
- [134] L.R. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shaltiel, E.R. Stadtman, *Meth. Enzimol.* 186 (1990) 464.
- [135] H. Rapoport, K. Holden, *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962) 635.
- [136] M. A. Azzellini, I. A. Bagatin, A.M.D.C. Ferreira, *Redox Report* 11 (2006) 25.
- [137] M. E. Reichmann, S. A. Rice, C. A. Thomas, P. Doty. *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 3047.
- [138] J.-L. Butour, J.-P. Macquet, *Eur. J. Biochem.* 78 (1977) 455-463.
- [139] D. F. Shriver, P.W. Atkins, *Química Inorgânica*, (2003), Bookman, 816p.
- [140] M. Tumer, H. Koksall, S. Serin, *Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem.* 27 (1997) 775.
- [141] R. M. Silverstein, G. C. Bassler, T. C. Morrill, *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 5ª Ed. Guanabara Koogan (1994) 387p.
- [142] a) B. S. Radovanovic, S. Andelkovic, *Spectr. Let.* 31 (1998) 63; b) A. Th. Chaviara, P. C. Christidis, A. Papageorgiou, E. Chrysogelou, D. J. Hadjipavlou-Litina, C. A. Bolos, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 2102.
- [143] F.E. Mabbs, *Chem. Soc Rev.* 22 (1993) 313.

- [144] P.F. Knowles, D. Marsh, H. W. E. Rattle, *Magnetic Resonance of Biomolecules*, John Wiley & Sons (1976) 343p.
- [145] J.Muller, K. Felix, C. Maichle, E. Langfelder, J. Strachle, F. U. Weser, *Inorg. Chim. Acta* 233 (1995) 11.
- [146] M. Karas, F. Hillekamp, *Anal. Chem.* 60 (1988) 2299.
- [147] M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C.Mobley, L.D.Ferguson e M.B.Alice, *J. Chem. Phys.* 49 (1968) 2240.
- [148] M.Yamashita e J.B.Fenn, *J.Phys. Chem.* 88 (1984) 4451.
- [149] R. Colton, A. D'Agostimho, J. C. Traeger, *Mass Spectrom. Ver* 14 (1995) 79.
- [150] G. Rakhit, W. E. Antholine, W. Froncisz, J. S. Hyde, J. R. Pilbrow, G. R. Sinclair, B. Sarkar, *J. Inorg. Biochem.* 25 (1985) 217.
- [151] B. Sarkar, Y. Wigfield. *Can J. Biochem.*46 (1968) 601.
- [152] C. Harford, B. Sarkar, *Acc. Chem. Res.* 30 (1997) 123.
- [153] J. Peisach, W. E. Blumberg, *Arch. Biochem Biophys.* 165 (1974) 691.
- [154] W. Bal, J. Christodoulou, P. J. Sadler, A. Tucker, *J. Inorg. Biochem.* 70 (1998) 33.
- [155] M. P. Abbott, *Modificações oxidativas em proteínas em presença de complexos de cobre(II)*, Tese de Doutorado, setembro/2007, Instituto de Química, USP, SP, Brasil.
- [156] A.Rodger, B. Nórden, *Circular Dichroism and Liner Dichroism*, Oxford University Press, Oxford, (1997).
- [157] N. Greenfield, G. D. Fasman, *Biochemistry* 8 (1969) 4108.
- [158] M. A. Andrade, P. Chacón, J.J. Merelo, F. Morán. 6 (1993) *Prot. Eng.* 383.
- [159] A. M. D. C. Ferreira, M. R. Ciriolo, L. Marcocci, G. Rotilio, *Biochem. J.* 292 (1993) 673.
- [160] C. Steinkühler, J. Z. Pedersen, U. E. Weser, G. Rotilio, *Biochem. Pharmac.* 42 (1991) 1821.
- [161] L. Milne, P. Nicotera, S. Orrenius, M. J. Burkitt, *Arch. Biochem Biophys.* 304 (1993) 102.
- [162] B. H. J. Bielski, A. O. Allen, H. A. Schwarz, *J. Amer. Chem. Soc.* 103 (1981) 3516.
- [163] B. H. J. Bielski, D. A. Comstock, R. A. Bowen, *J. Amer. Chem. Soc.* 93 (1971) 5624.
- [164] A. E. Martell, em: P. A. Seib, B. M. Tolbert, *Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism and Uses*. Washington: American Chemical Society; 153–178, 1982.
- [165] N. J. Dodd, J. M. Giron-Conland, *Br. J. Cancer* 32 (1975) 451.

- [166] W. Lohmann, *Z. Naturforsch C* 36 (1981) 804.
- [167] R. Sasaki, T. Kurokawa, D. Shibua, *Biochem. Int.* 10 (1985) 155.
- [168] A. Mouithys-Mickalad, C. Deby, G. Deby-Dupont, M. Lamy, *BioMetals* 11 (1998) 81.
- [169] L. Milne, P. Nicotera, S. Orrenius, M. J. Burkitt, *Arch. Biochem, Biophys.* 304 (1993) 102.
- [170] G. R. Buettner, R. P. Mason, *Meth. Enzimol.* 186 (1990) 127.
- [171] P. Tordo, *Electron Paramagnetic Resonance*, 16 (1998) 116.
- [172] I. Dalle-Donnea, R. Rossib, D. Giustarinib, A. Milzania, R. Colombo, *Clinica Chim. Acta* 329 (2003) 23.
- [173] H. Y. Shrivastava, M. Kanthimathi, B. U. Nair, *Biochem. et Bioph. Acta* 1573 (2002) 149.
- [174] D. C. Ramirez, S. E. G. Mejiba, R. P. Mason, *The J. of Biol. Chem.* 280 (2005) 27402.
- [175] G. Filomeni, G. Cerchiaro, A.M.D.C. Ferreira J.Z. Pedersen, A. De Martino, G. Rotilio, M.R. Ciriolo, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 12010.
- [176] V. C. Silveira, J. S. Luz, C. C. Oliveira, I. Graziani, M. R. Ciriolo, A. M. D. C. Ferreira, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1090.
- [177] B. Macías, M.V. Villa, B. Gómez, J. Borrás, G. Alzuet, M. González-Álvarez, A. Castiñeiras, *J. Inorg. Biochem.* 101 (2006) 444.
- [178] Y. Zhao, J. Zhu, W. He, Z. Yang, Y. Zhu, Y. Li, J. Zhang, Z. Guo, *Chem. Eur. J.* 12 (2006) 6621-6629.
- [179] J. Liu, T.-B. Lu, H. Deng, L.-N. Ji, L.-H. Qu, H. Zhou, *Transition Met. Chem.* 28 (2003) 116.
- [180] C. Liu, J. Zhou, Q. Li, L. Wang, Z. Liao, H. Xu, *J. Inorg. Biochem.* 75 (1999) 233.
- [181] M. Baldini, M. Belichi-Ferrari, F. Bisceglie, P.P. Dall'Aglio, G. Pelosi, S. Pinelli, P. Tarasconi, *Inorg. Chem.* 43 (2004) 7170-7179.
- [182] M. Navarro, E.J. Cisneros-Fajardo, M. Fernandez-Mestre, D. Arrieche, E. Marchan, *J. Inorg. Biochem.* 97 (2003) 364-369.
- [183] C. V. Kumar, H. Emma, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1992) 470.
- [184] M. J. Waring, *J. Mol. Biol.* 13 (1965) 269.
- [185] E. Nyarko, N. Hanada, A. Habib, M. Tabata, *Inorg. Chim. Acta* 357 (2004) 739.
- [186] K. R. Rupesh, S. deepalatha, M. Krishnaveni, R. Venkatesan, S. Jayachandran, *Eur. J. Med. Chem.* 41 (2006) 1494.

- [187] J.-B. Lepecq, C. Paoletti, *J. Mol. Biol.* 27 (1967) 87.
- [188] J.-L. Butour, J.-P. Macquet, *Eur. J. Biochem.* 78 (1977) 455.
- [189] S. Mahadevan, M. Palaniandavar, *Inorg. Chem.* 37 (1998) 3927.
- [190] V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, A. K. Schyolkina, A. I. Poletayer, *Biopolymers* 12 (1973) 89.
- [191] J. G. Collins, T. P. Shields, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 9840.
- [192] L.-M. Chen, J.-C. Chen, S. Shi, C.-P. Tan, K.-C. Zheng, L.-N. Ji, *J. Mol. Struct.* 881 (2008) 156.
- [193] S. Bi, H. Zhang, C. Qiao, Y. Sun, C. Liu, *Spectrochim. Acta Part A* 69 (2008) 123.
- [194] V. L. de Almeida, A. Leitão, L. C. B. Reina, C. A. Montanari, M. T. P. Lopes, C. L. Donnici, *Quim. Nova* 28 (2005) 118.
- [195] T. B. Thederahn, M. D. Kuwabara, T. A. Larsen, D. S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 4941.
- [196] D. S. Sigman, T. W. Bruice, A. Mazumder, C. L. Sutton, *Acc. Chem. Res.* 26 (1993) 98.
- [197] J. G. Collins, T. P. Shields, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 9840.
- [198] W. K. Pogozelski, T. D. Tullius, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1089.
- [199] F. Mancin, P. Scrimin, P. Tecilla, U. Tonellato, *Chem. Commun.* (2005) 2540.
- [200] Y. An, S.-D. Liu, S.-Y. Deng, L.-N. Ji, Z.-W. Mao, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1586.
- [201] J. L. Sagripanti, K. H. Kraemer, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 1729.
- [202] W.-J. Ma, E.-H. Cao, J.-F. Qin, *Redox Report*, 4 (1999) 271.
- [203] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncola, M. Izakovic, M. Mazura, *Chem.-Biol. Interact.* 160 (2006) 1–40.

ANEXO**SÚMULA CURRICULAR****DADOS PESSOAIS**

Nome: Vivian Chagas da Silveira

Local e data de nascimento: Porto Alegre, 01 de fevereiro de 1976.

EDUCAÇÃO

Escola Estadual Dom João Becker, Porto Alegre-RS, 1993

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2000.
Graduação (Química Bacharelado)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2003.
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Técnico em Química, Porto Alegre, 1995

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, FAPESP, 04/2006 a 01/2009

Projeto: Investigação da Atividade Biológica de Complexos Metálicos com Ligantes Inspirados em Biomoléculas e de sua Potencial Aplicação como Agentes Farmacológicos

Bolsista de Doutorado, CAPES, 08/2005 a 03/2006

Projeto: Investigação da Atividade Biológica de Complexos Metálicos com Ligantes Inspirados em Biomoléculas e de sua Potencial Aplicação como Agentes Farmacológicos

Professora Substituta de Nível Superior do Departamento de Química Inorgânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003 a 2005.

Bolsista de Mestrado, CNPq, 03/2001 a 02/2003.

Projeto: Investigação dos Mecanismos de Resistência ao Excesso de Ferro em Arroz.

Bolsista de Iniciação Científica, CNPq, 10/1996 a 07/2000.

Projeto: Síntese, Caracterização e Reatividade de Catalisadores de Paládio-Tungstênio e Paládio-Molibdênio em Química Ambiental.

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

Artigos Completos

1) Silveira, V. C.; Luz, J. S.; Oliveira, C. C.; Graziani, I.; Ciriolo, M. R.; Ferreira, A. M. D.C. Double-strand DNA Cleavage Induced by Oxindole-Schiff Base Copper(II) Complexes with Potential Antitumor Activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 102, p. 1090-1103, 2008.

2) Silveira, V. C. ; Oliveira, A.P. ; Sperotto, Raul Antonio ; Espíndola, L. S. ; Amaral, L. ; Dias, J. F. ; Cunha, J. B. ; Fett, J. P.. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 19, p. 127-139, 2007.

3) Patente de Invenção - Ferreira, A. M. D. C.; Cerchiaro, G. ; Abbott, M. P. ; Silveira, V. C. ; Ciriolo M. R.. Complexos metálicos com compostos indólicos, oxindólicos e seus derivados imínicos, processos para sua obtenção, suas atividades farmacológicas como agentes antitumorais, uso desses complexos e derivados na formulação de medicamentos para o tratamento de tumores e medicamentos para o tratamento de tumores (Usp-Università Di Roma), Pi 0.600.985-9 (I.N.P.I., Br).. 2006

4) Gregianini, T. S., Silveira, V. C., Porto, D. D., Kerber, V. A., Henriques, A. T., Fett Neto, A. G. The alkaloid brachycerine is induced by ultraviolet radiation and is an effective singlet oxygen quencher. *Photochemistry and Photobiology*, v. 78, Nº 5, p. 470 – 474, 2003.

5) BAIBICH, Ione Maluf ; SANTOS, J. H. Z ; SILVEIRA, V. C.; GIGOLA, C.; SICA, A. M. Photogenerated Metalcarbonyl Species On Alumina and Pd-Alumina Surfaces. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*, v. 43, Nº 1, p.26 – 31, 1998.

Trabalhos científicos apresentados em congresso (mais relevantes)

1) Silveira, V.C., Luz, J.S., Oliveira, C.C., Benezra, H., Ferreira, A.M.D.C., Binding and Mechanistic Studies of Interactions Between Imine-Copper(II) Complexes and DNA. In: XIV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, Foz do Iguaçu, 2008. Book of Abstracts.. Foz do Iguaçu, 2008. v. 1. p. 448.

- 2) Silveira, V. C.; Ferreira, A. M. D. C.. Oxidative Damage to Biomolecules by Reactive Oxygen Species Mediated by Copper(II)-Schiff Base Complexes. In: V Meeting of the Society for Free Radical in Biology and Medicine, South American Group, 2007, Montevideo. Book of Abstracts.. Montevideo, 2007. v. 1. p. 31-31.
- 3) Ferreira, A. M. D. C. ; Cerchiaro, G. ; Abbott, M. P. ; Silveira, V. C. ; Filomeni, G. ; Rotilio, G. ; Ciriolo, M. R. . Novel Oxindole-Schiff Base Copper(II) Complexes as Potential Metallopharmaceuticals. In: 13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-13), 2007, Vienna. Journal of Biological Inorganic Chemistry. Berlin : Springer, 2007. v. 12. p. S10-S10.
- 4) Silveira, V. C., Ferreira, A. M. D. Interações e Modificações Observadas na Proteína HSA em Presença de complexos Imínicos de Cobre(II) através de Dicroísmo Circular In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia. 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2007. p.142. (Apresentação em painel e oral)
- 5) Silveira, V. C. ; Abbott, M. P. ; Ferreira, A. M. D. C. . Redox Behaviour of Some Imine-Copper(II) Complexes towards Glutathione and Hydrogen Peroxide.. In: XIII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2006, Fortaleza. XIII BMIC Program and Abstracts. Fortaleza, 2006. v. 1. p. 156-156.
- 6) Abbott, M. P. ; Silveira, V. C. ; Ferreira, A. M. D. . Interactions of Some Imine-Copper(II) Complexes with Plasma Proteins Investigated by EPR Spectroscopy and SDS-PAGE.. In: XIII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2006, Fortaleza. XIII BMIC Program and Abstracts. Fortaleza, 2006. v. 1. p. 33-33.
- 7) Fadanelli, C. ; Silveira, V. C. ; Fett, J. P. . Produção de anticorpos específicos contra ferritina de arroz (*Oryza sativa*). In: XV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2003, Porto Alegre. Resumos do XV Salão de Iniciação Científica. Porto Alegre: Pró-Reitoria de Pesquisa - UFRGS, 2003. p. 527-527.

8) Silveira, V. C., Fett, J. P., Magalhães, M. L. B., Basso, L. A. Construção de vetores para clonagem e expressão de ferritina de *Oryza sativa* em *Escherichia coli* In: 53º Congresso Nacional de Botânica, 2002, Recife. Resumos do 53º Congresso Nacional de Botânica. , 2002, v. 1, p.30.

9) Fett, J. P., Silveira, V. C., Gross, J., Oliveira, A. P., Delai, R. M., Mandaji, M., Camatti Júnior U., Fettneto, A. G. Mechanisms of resistance to excess iron in rice plants In: XI Reunion Latinoamericana de Fisiologia Vegetal, 2002, Punta del Este. Actas de la XI Reunion Latinoamericana de Fisiologia Vegetal. , 2002. v.1. Referências adicionais : Uruguai/Inglês. Meio de divulgação: Meio magnéticoCD

10) Silveira, V. C.; Biabich, I. M. ; Santos, J. H. Z. Reações Fotoquímicas de Metalcarbonilas do Grupo 6 em Superfícies de Alumina e Paládio-Alumina. In: 21ª Reunião Anual da SBQ, Resumos da 21ª Reunião Anual da SBQ. Poços de Caldas, MG. 1998.

11) Baibich, I. M.; Silveira, V. C.; Santos, J. H. Z ; Gigola, C.; Sica, A. M. Photogenerated Metalcarbonyl Species On Alumina and Pd-Alumina Surfaces. In: 43rd International Conference on Analytical Sciences and Spectroscopy, 43rd International Conference on Analytical Sciences and Spectroscopy, Montreal, CANADA. 1997.

Prêmios e títulos

2008 - Top 25 Hottest Papers in Journal of Inorganic Biochemistry, Science Direct - Elsevier.

2007 - Travel Award, SFRBM South American Group.

Outras Atividades

Estágio docente no Programa PAE (USP, São Paulo) nas seguintes disciplinas:

Fundamentos de Química-Transformações, 1º semestre de 2006.

Química dos Elementos, 2º semestre de 2006.

Fundamentos de Química-Estrutura, 1º semestre de 2007.

Química de Coordenação, 2º semestre de 2007.

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](#)