Universidade de São Paulo
Instituto de Química

**Reatividade e Implicações em Processos Biológicos de
Complexos Imínicos de Cobre(II)**

Giselle Cerchiaro
TESE DE DOUTORADO

Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira
Orientadora

São Paulo, 8 de abril de 2005

ÍNDICE

Resumo

Abstract

Estruturas

Abreviaturas

1. Introdução

1.1. Introdução.....	01
1.1.1. A toxicidade do cobre.....	03
1.1.2. O envolvimento do cobre na glicoxidação de proteínas.....	08
1.1.3. O estudo da oxidação de carboidratos.....	14
1.1.4. O envolvimento do cobre na apoptose celular.....	17
1.1.5. Complexos de cobre do tipo Base de Schiff.....	27
1.2. Objetivos.....	30

2. Parte Experimental

Parte Experimental - Sínteses

I - 2.1. Métodos, Materiais e Instrumentação.....	31
I - 2.2. Sínteses.....	33
I - 2.2.1. [Cu(<i>isa-pn</i>)](ClO ₄) ₂ ; Composto 1.....	34
I - 2.2.2. [Cu(<i>isa-pn</i>)(Cl)]Cl; Composto 1a.....	35
I - 2.2.3. [Cu(<i>isa-en</i>)(H ₂ O)]ClO ₄ ·2H ₂ O; Composto 2.....	35
I - 2.2.4. [Cu(<i>isa-epy</i>) ₂](ClO ₄) ₂ ·2H ₂ O; Composto 3.....	36
I - 2.2.5. [Cu(<i>isa-hist</i>)(H ₂ O)](ClO ₄) ₂ ; Composto 4.....	37
I - 2.2.6. [Cu(<i>isa-amiquin</i>)(H ₂ O)](ClO ₄); Composto 5.....	38
I - 2.2.7. [Cu(<i>isa</i>) ₂](ClO ₄); composto 6.....	39
I - 2.2.8. [Cu(<i>quin-pn</i>)](ClO ₄) ₂ ; Composto 7.....	40
I - 2.2.9. [Cu(<i>apy</i> ₂ - <i>gla</i>)](ClO ₄) ₂ ; Composto 8.....	41
I - 2.2.10. [Cu(<i>pyal</i> ₂ - <i>gla</i>)](ClO ₄) ₂ ; Composto 9.....	42
I - 2.2.11. Na ₂ [Cu ₂ (<i>Glc</i>) ₃]·8H ₂ O; Composto 10.....	43
I - 2.2.12. Na ₂ [Cu ₃ (<i>Fru</i>) ₄]·8H ₂ O; Composto 11.....	44
I - 2.2.13. Na[Cu ₂ (<i>Gal</i>) ₃]·6H ₂ O; Composto 12.....	45

Parte Experimental – Reatividade e Cinética

II - 2.1. Métodos e Instrumentação – Cinética.....	46
II - 2.2. Experimentos Cinéticos.....	46
II - 2.3. Captação de spin por EPR, durante a reação catalítica.....	47

II - 2.4. Captação de intermediários por reações específicas.....	47
II - 2.5. Determinação dos produtos de reação.....	48
<i>Parte Experimental – Processos Biológicos</i>	
III - 2.1. Materiais, Métodos e Instrumentação – Processos Biológicos.....	49
III - 2.2. Culturas Celulares.....	49
III - 2.3. Tratamentos de células com os compostos.....	50
III - 2.4. Análise do crescimento e da morte celular.....	50
III - 2.5. Determinação de ROS e RNS intracelular.....	51
III - 2.6. Determinação de danos às proteínas citoplasmáticas	52
III - 2.7. Determinação das proteínas totais.....	52
III - 2.8. Imunoeletroforese (<i>Western Blotting</i>)	52
III - 2.9. Determinação das proteínas carboniladas.....	54
III - 2.10. Determinação das proteínas glicosiladas.....	54

3. Resultados e Discussão

<i>Discussão dos Resultados - Parte I- Síntese, Caracterização e Estudos de Equilíbrio.....</i>	<i>55</i>
I.3.1. Complexos imínicos e diimínicos de Cobre(II) da série da isatina.....	55
I.3.1.1. Sínteses.....	55
I.3.1.2. Estequiometria dos Compostos.....	57
I.3.1.3. Medidas de Condutividade Molar.....	57
I.3.1.4. Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR).....	59
I.3.1.5. Espectroscopia no Ultravioleta-visível (UV-Vis).....	68
I.3.1.6. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica.....	74
I.3.1.7. Espectrometria de Massa Electrospray (ESI-MS) e MS-MS.....	78
I.3.1.8. Eletroquímica.....	91
I.3.1.9. Estudos de equilíbrio ceto-enólico no sistema.....	92
I.3.2. Complexo diimínico de Cobre(II) derivado da quinolína.....	99
I.3.2.1. Síntese, Estequiometria e Medidas de condutividade molar.....	99
I.3.2.2. Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR).....	100
I.3.2.3. Espectroscopia no UV/Vis e EPR.....	100
I.3.2.4. Espectrometria de Massa Electrospray (ESI-MS) e MS-MS.....	102
I.3.3. Complexos imínicos de Cobre(II) derivados de aminocarboidratos.....	103
I.3.3.1. Síntese, Estequiometria e Medidas de condutividade molar.....	104
I.3.3.2. Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR).....	105
I.3.3.3. Espectroscopia no UV/Vis e EPR.....	107
I.3.3.4. Espectrometria de Massa Electrospray (ESI-MS)	108

I.3.3.5. Dicroísmo Circular (CD)	111
I.3.4. Complexos de Cobre(II) com carboidratos – Investigações sobre o sítio de ligação Cu(II)-carboidrato.....	113
I.3.4.1. Síntese, Estequiometria, Condutividade molar e Termogravimetria.....	117
I.3.4.2. Espectroscopia no Infravermelho e UV/vis.....	118
I.3.4.3. Espectroscopia EPR.....	120
I.3.4.4. Espectroscopia Raman.....	122
<i>Discussão dos Resultados - <u>Parte II Reatividade e Cinética</u>.....</i>	<i>126</i>
II.3.1.a. O uso do O ₂ como oxidante.....	126
II.3.1.b. A oxidação de carboidratos.....	127
II.3.2. Método de tratamento dos dados cinéticos.....	127
II.3.3. Dados e curvas cinéticas.....	129
II.3.4. Detecção de intermediários de reação.....	144
II.3.5. Detecção de produtos finais da degradação.....	153
II.3.6. Mecanismo de Reação e Lei de Velocidade.....	158
<i>Discussão dos Resultados - <u>Parte III Implicações em Processos Biológicos</u>.....</i>	<i>161</i>
III.3.1. Culturas celulares.....	162
III.3.2. Tratamentos e Morte Celular.....	162
III.3.2.a. Linha Celular U937.....	163
III.3.2.b. Linha Celular SH-SY5Y.....	172
III.3.3. Geração de ROS intracelular.....	174
III.3.3.a. Geração de ROS intracelular na linha U937.....	174
III.3.3.b. Geração de ROS intracelular na linha SH-SY5Y.....	179
III.3.4. <i>Imunoblotting</i> e danos protéicos.....	182
III.3.4.1. Danos Carbonílicos a proteínas citoplasmáticas.....	183
III.3.4.2. Formação de proteínas citoplasmáticas glicosiladas.....	187
III.3.5. Geração de radicais livres quimicamente – Comparação de Reatividades.....	189
III.3.6. Estudos avançados sobre o mecanismo celular.....	191
4. Conclusões.....	192
Apêndice1.....	196

Curriculum Vitae

RESUMO

Neste trabalho sintetizaram-se novos complexos imínicos e diimínicos de Cu(II) derivados da isatina, um indol endógeno, que foram então extensivamente caracterizados por análise elementar, medidas de condutividade molar, técnicas espectroscópicas: IV, UV/Vis e EPR, e por espectrometria de massa, ESI-MS. Estes compostos apresentaram equilíbrio ceto-enólico em solução, variando a geometria ao redor do íon Cu(II), ao se alterar o pH do meio, indo de tetraédrico em meio ácido à tetragonal em meio básico. Para a elucidação do papel do cobre no mecanismo de oxidação de carboidratos pelo oxigênio molecular, realizaram-se estudos cinéticos tendo como catalisadores estes complexos de cobre. Determinou-se a uma lei cinética global mais abrangente para estas reações, incluindo uma etapa dependente do cobre (a concentrações bem baixas), seguida de outra independente do metal. As etapas no mecanismo proposto, sob condições de pseudo-primeira ordem, combinam transferência eletrônica intramolecular, com provável redução do íon de cobre pelo substrato, levando a espécies muito reativas ($\text{OH}^\bullet$, $\text{O}_2^\bullet$, H_2O_2 , $\text{CO}_2^\bullet$), responsáveis pelo processo de iniciação e propagação, e a formação de produtos carbonílicos de cadeia curta (glicolato, glicerato e formiato).

Para o estudo da interação metal-carboidrato, importante para se entender melhor o papel do cobre frente a este ligante biológico, complexos de Cu(II) com monossacarídeos foram sintetizados e caracterizados por análise elementar e termogravimétrica, medidas de condutividade molar, espectroscopias UV/Vis, IV e EPR, além da espectroscopia Raman, através da qual investigou-se o modo de ligação do carboidrato ao metal em cada um destes complexos. Foram ainda preparados e caracterizados por análise elementar, medidas de condutividade molar, espectroscopias UV/Vis, IV, EPR, ESI-MS e CD dois novos complexos imínicos quirais de Cu(II), com ligantes do tipo aminocarboidrato, e que também foram utilizados para estudos biológicos.

Estudos de atividade biológica foram feitos *in vitro*, usando as linhagens celulares tumorais promonocítica sanguínea U937 e neuroblastoma SH-SY5Y, com os complexos imínicos de cobre, principalmente aqueles derivados da isatina. As células tratadas com os complexos mais ativos sofreram apoptose, verificada por ensaios citofluorimétricos, em que os complexos agiram em diferentes fases do ciclo celular de cada linhagem (fase G1, S ou G2/M). Através da técnica citofluorimétrica foi observada também a geração de radicais livres na célula e, através de ensaios imunológicos, determinou-se a quantidade de proteínas citoplasmáticas carboniladas e glicosiladas, geradas após os tratamentos com os compostos, em diferentes tempos de incubação. De uma maneira geral, estes estudos indicaram modulação da atividade biológica, com um comportamento antiproliferativo muito diferente, indo de baixa eficácia até alta eficiência. Dentre os compostos mais ativos, pode ser observada uma especificidade diferente, tanto com relação ao tipo de célula quanto ao seu modo de ação, evidenciando sua potencial aplicação como agentes antitumorais.

ABSTRACT

In this work, novel imine and diimine copper(II) complexes with ligands derived from isatin, an endogenous indol, were synthesized, and extensively characterized by elemental analysis, conductivity measurements, spectroscopic techniques (IR, UV/Vis, and EPR), and electrospray mass spectrometry (ESI-MS/MS). These compounds showed a keto-enolic equilibrium in solution, with variations in the geometry around the copper ion with increasing pH, varying from a more tetrahedral configuration in acidic medium to a tetragonal one in basic solution. In order to elucidate the role of copper in the carbohydrate oxidation by molecular oxygen, kinetic studies were performed using these complexes as catalysts. A more comprehensive global rate law was determined for this process, including a copper-dependent pathway (at very low concentrations), in addition to an independent one, both influenced by alkaline medium. The proposed mechanism, under pseudo-first order conditions, combine intramolecular electronic transfer with reduction of the copper ion by the substrate, leading to the formation of intermediary reactive species ($\text{OH}^\bullet$, $\text{O}_2^\bullet$, H_2O_2 , $\text{CO}_2^\bullet$), responsible for initiation and propagation steps, and of short chain carbonylic products (glycolate, glycerate and formiate ions).

To better understanding metal-carbohydrate interactions, copper(II) complexes with simple monosacharides were isolated, and characterized by elemental and thermogravimetric analyses, and spectroscopic techniques (IR, UV/Vis, and EPR), besides Raman spectroscopy, used to investigate the binding mode of the carbohydrate moiety to the copper ion, in each one of these complexes. Additionally, two novel chiral imine copper(II) complexes, derived from aminocarbohydrate ligands, were prepared and characterized by elemental analysis, conductivity measurements, and spectroscopic techniques (IR, UV/Vis, EPR, ESI-MS and CD), and one of them was also used in biological studies.

Biological activity studies were carried out with the imine and diimine copper(II) complexes derived from isatin, verifying antiproliferative effect toward some tumor cell lines (promonocyte U937 and neuroblastoma SH-SY5Y). Cells treated with the most active complexes were committed by the apoptotic program, as verified by citofluorimetric assays, with the complexes interfering the cell cycle in different ways (G1, G2/M or S phase. Formation of free radicals was detected, and cytoplasmatic carbonylated and glycosilated proteins inside the treated cells were determined by imunologic assays. In conclusion, these studies indicated modulation of the biological activity by the imine ligand in the copper(II) complexes, with very different antiproliferative behavior, going from undetectable activity to high efficacy. Among the most active compounds, a different specificity and action mode in both cell type could be observed, evidencing their potential application as antitumoral agents.

Estruturas dos precursores dos ligantes

3-indolin-2-ona
(isatina) isa

1,2-etilenodiamina
en

1,3-diaminopropano
pn

2-amino-1-etilpiridina
epy

hidrocloreto de histamina
hist

8-aminoquinolina
amiquin

2-quinolina carboxialdeído
quin

2-amino-2-deoxi-D-glicose
(D-glucosamina) gla

2-acetilpiridina
apy

2-piridinacarboxialdeído
pyal

D-(α)-glicose
Glc

D-(α)-galactose
Gal

D-(α)-frutose
Fru

Estruturas dos Complexos de cobre(II) preparados e estudados

Abreviaturas

Nomenclatura dos ligantes e complexos de cobre preparados e estudados:

isa-pn: N,N'[bis-(3,3'-indolin-2-ona)]-1,3-diiminopropano

[Cu(isa-pn)](ClO₄)₂: perclorato de [N,N'[bis-(3,3'-indolin-2-ona)]-1,3-diiminopropano]cobre(II)

isa-en: N-(3-indolin-2-ona)-1-imino-2-etilenoamina

[Cu(isa-en)(H₂O)](ClO₄)·2H₂O: perclorato de aqua[N-(3-indolin-2-ona)-1-imino-2-etilenoamina] cobre(II)

isa-epy: N-(3-indolin-2-ona)-2-iminoetil piridina

[Cu(isa-epy)](ClO₄)₂·2H₂O: perclorato de bis[N-(3-indolin-2-ona)-2-iminoetil piridina]cobre(II)

isa-hist: N-(3-indolin-2-ona)-4-iminazolil-etileno

[Cu(isa-hist)(H₂O)](ClO₄)₂: perclorato de aqua[N-(3-indolin-2-ona)-4-iminazolil-etileno]cobre(II)

isa-amiquin: N-(3-indolin-2-ona)-8-iminoquinolina

[Cu(isa-amiquin)(H₂O)](ClO₄): perclorato de aqua[N-(3-indolin-2-ona)-8-iminoquinolina]cobre(II)

isa: N-(3-indolin-2-ona) ou (1H-indol-2,3-diona)

[Cu(isa)₂](ClO₄): perclorato de bis-[N-(3-indolin-2-ona)]cobre(II)

quin-pn: N,N'-[bis-2-quinolina carboxialdeído]-1,3-diiminopropano

[Cu(quin-pn)](ClO₄)₂: perclorato de [N,N'-[bis-2-quinolina carboxialdeído]-1,3-diiminopropano] cobre(II)

apy-gla: 2-(2-imino-2-deoxi-D-glicose)-acetil-piridina

[Cu(apy₂-gla)](ClO₄)₂: perclorato de [2-acetilpiridina 2-(2-imino-2-deoxi-D-glicose)acetil-piridina] cobre(II)

pyal-gla: 2-(2-imino-2-deoxi-D-glicose)-caboxal-piridina

[Cu(pyal₂-gla)](ClO₄)₂: perclorato de [2-piridina carboxaldeído 2-(2-imino-2-deoxi-D-glicose)-caboxal-piridina]cobre(II)

Na₂[Cu₂(Glc)₃]·8H₂O: tris-(D-glicosato)cuprato(II) de sódio

Na₂[Cu₃(Fru)₄]·8H₂O: tetra-(D-frutosato)cuprato(II) de sódio

Na[Cu₂(Gal)₃]·6H₂O: tris-(D-galactosato)cuprato(II) de sódio

Técnicas e equipamentos:

CCD ou TLC = cromatografia em camada delgada

CID = Colisão induzida por dissociação (ou MS-MS)

DC ou CD = dicroísmo circular.

EC ou CE = Eletroforese capilar

EPR = espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (ou spin eletrônico)

ESI-MS = Espectrometria de massa electrospray

FACS = Citofluorímetro ou citômetro de fluxo ("Fluorescence-activated cell sorter")

IV ou FT-IR = espectroscopia de absorção na região do infravermelho

q-TOF = resolução de massas por quadrupolo ortogonal e tempo de voo dos íons ("Hybrid High Resolution Quadrupole Orthogonal Time of Flight Mass Spectrometer")

RMN = espectroscopia de ressonância magnética nuclear

TGA = análise termogravimétrica

UV/vis = espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível

VC ou CV = Voltametria cíclica

Reagentes e materiais:

AGEs = Produtos avançados de glicação (*Advanced Glycation End-Products*)

Annexin V-FITC = proteína de membrana (de ligação com cálcio) *Anexina V*, extraída de bactéria, complexada com o fluoróforo Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)

BSA = albumina bovina

CTAB = cloreto de cetiltrimetil amônio

Cu,Zn-SOD = Superóxido desmutase de cobre e zinco

DBNBS = 3,5-dibromo-4-nitrobenzeno sulfonila

DMF = dimetil formamida / DMSO = dimetil sulfóxido

DMPO = 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido

DNA = ácido desoxiribonucleico

3,5-DNB = ácido 3,5-dinitrobenzoico

DNP = 2,4-dinitrofenilhidrazina

DPPH = α,α' -difenil- β -picrilhidrazil

DTT = ditioneitol

FCS = soro fetal bovino

G1 = fase G1 do ciclo celular, fase tetraplóide.

G2/M = fase G2/M do ciclo celular onde ocorre a mitose, fase hipodiplóide

HEPES = ácido N-(2-hidroxil)piperazina-N'-(2-etanosulfônico)

IP = iodeto de propídeo

NK- κ B = Fator nuclear de transcrição ou transdução gênica sensível a radicais livres

PBS = tampão fosfato ("Phosphate Saline Buffer", fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, pH 7,4)

POBN = α -(4-piridil-1-óxido)-N-t-butilnitrona

PVDF = membrana de nitrocelulose ou fluoreto de polivinilideno

Tween 20 = tensoativo comercial

TEMED = N,N,N',N'-tetrametilenodiamina

TEMPOL = 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiloxi

TRIS = tris(hidroximetil)-aminometano (Triton X-100)

ROS e RNS = espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, respectivamente.

SDS = dodecil sulfato de sódio.

SDS-PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida em fase denaturante

SH-SY5Y = cultura celular humana neuroblastoma (European Collection of Cell Culture)

Sub G1 = indica núcleos apoptóticos (fase anterior à G1)

U937 = cultura celular humana promonocítica sanguínea (American Type Culture Collection)

Demais siglas que não estão aqui descritas são explicadas durante o texto, ao serem apresentadas.

1.1. Introdução

O cobre é o terceiro metal-traço mais abundante em humanos ¹, após ferro e zinco, e é o elemento biológico essencial cuja característica química principal são os dois estados de oxidação relevantes +1 e +2. Proteínas e enzimas que contêm cobre são responsáveis por funções primordiais em organismos vivos, como no transporte de elétrons (proteínas azuis, como a plastocianina e azurina)¹; metabolismo de oxigênio (hemocianina)² e sua redução até água (citocromo c oxidase) ^{2, 3}; ativação de oxigênio para oxidações de substratos como catecois e fenóis (tirosinase, catecol oxidase) ⁴ e oxidação de outros substratos importantes, com as enzimas galactose oxidase ⁵, amina oxidase, monoamina desidrogenase ^{6, 7, 8, 9}. Na Figura 1 são apresentadas resumidamente as principais enzimas e proteínas de cobre, e suas funções.

Embora o caráter bioessencial do cobre tenha sido estabelecido desde aproximadamente 1925 ¹⁰, a sua relevância biológica foi completamente reconhecida somente durante as últimas três décadas, quando houve um rápido desenvolvimento da química bioinorgânica deste elemento ¹¹. Este grande progresso somente foi possível devido ao desenvolvimento paralelo da química analítica ¹², da cristalografia de proteínas ¹³, de técnicas espectroscópicas ^{14, 15}, e da biologia molecular ¹⁶, e tendo sido um grande estímulo para a interação da química de complexos-modelo e da bioquímica de metaloproteínas ¹⁷.

¹ a) E. T. Adman, *Advances in Protein Chemistry*, v.42, CRC Press (1991) 145; b) R. Lontie, ed., *Copper Proteins and Copper Enzymes*, vol. 1-3, CRC Press (1984).

² E.I. Solomon, U.M. Sundaram, T.E. Machonkin, *Chem Rev.* 96 (1996) 2563.

³ J.P. Collman, R. Boulator, C.J. Sunderland, L. Fu, *Chem. Rev.* 104 (2004) 561.

⁴ I.A. Koval, D. Pursche, A.F. Stassen, P. Games, B. Krebs, J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.* 9 (2003) 1669.

⁵ J.W. Whittaker, *Chem. Rev.* 103 (2003) 2347.

⁶ J. P. Klinman, *Chem Rev.* 96 (1996) 2541.

⁷ J. Stubbe, W. A. van der Donk, *Chem Rev.* 98 (1998) 705.

⁸ B. A. Jazdzewski, W. B. Tolman, *Coord. Chem Rev.* 200-202 (2000) 633.

⁹ A. G. Sykes et al., *Coord. Chem. Rev.* 190-192 (1999) 771.

¹⁰ M.C. Linder, C.A. Goode, *Biochemistry of copper*, Plenum Press NY (1991).

¹¹ a) S.J. Lippard, J.M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley (1994); b) H.E. Toma, *Química Bioinorgânica*, Universidade de São Paulo Ed. (1984); c) J.J.R. Frausto da Silva, R.J.P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements*, Clarendon Press, Oxford (1994).

¹² G.C.M. Steffens, T. Soulimane, G. Wolff, G. Buse, *Eur. J. Biochem.* 213 (1993) 1149; e referencias citadas.

¹³ a) A.W. Smith, A. Câmara-Artigas, C. Olea Jr, W.A. Francisco, J.P. Allen, *Acta Cryst. D60* (2004) 1453; b) C.M. Wilmot, J. Haydu, M.J. McPerson, P.F. Knowles, S.E.V. Phillips, *Science* 286 (1999) 1724; c) A. Messerschmidt, H. Luecke, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 230 (1993) 997; d) R. Huber, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (1989) 848.

¹⁴ E.I. Solomon, A.B.P. Lever (Ed.), *Inorganic Electronic Structure and Spectroscopy*, Vol.II, Cap.1, John Wiley & Sons Inc., New York, (1999).

¹⁵ Alguns exemplos: a) E.A. Lewis, W.B. Tolman, *Chem. Rev.* 104 (2004) 1047; b) A. Donaire, B. Jimenez, J.M. Moratal, J.F. Hall, S.S. Hasnain, *Biochem.* 40 (2001) 837; c) J.A. Guekert, M.D. Lowery, E.I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 2817; d) M.D. Lowery, E.I. Solomon, *Science* 259 (1993) 1575; e) E.I. Solomon, M.J. Baldwin, M.D. Lowery, *Chem. Rev.* 92 (1992) 521.

¹⁶ Alguns exemplos: a) D.M. Arciero, B.S. Pierce, M.P. Hendrich, A.B. Hooper, *Biochem.* 41 (2002) 1703; b) L.P. Rowland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 (1995) 1251; c) C. Vulpe, B. Levinson, S. Whitney, S. Packman, J. Gitschier, *Nat. Genet.* 3 (1993) 7; d) K. Davies, *Nature* 361 (1993) 98; e) D.R. Rosen, et al. *Nature* 362 (1993) 59; f) H.X. Deng, et al. *Science* 261 (1993) 1047; g) J.O. McNamara, I. Fridovich,

Figura 1. Descrição das principais enzimas e proteínas de cobre ¹⁸.

Nature 362 (1993) 20; h) J.D. McManus, D.C. Brune, J. Han, J. Sandersloehr, T.E. Meyer, M.A. Cusanovich, G. Tollin, R.E. Blankenship, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 6531.

¹⁷ Alguns exemplos de complexos-modelo de sítio ativo de enzimas e proteínas de cobre, e revisões sobre o tema: a) E.I. Solomon, R.K. Szilagy, S.B. George, L. Basumallik, *Chem. Rev.* 104 (2004) 419; b) P. Games, I.A. Koval, J. Reedijk, *Dalton Trans.* 24 (2004) 4079; c) R. Cejudo-Marin, G. Alzuet, S. Ferrer, J. Borrás, A. Castineiras, E. Monzani, L. Casella, *Inorg. Chim. Acta* 331 (2002) 81; d) A. Neves, A. DosAnjos, A.J. Bortoluzzi, B. Szpoganicz, E.W. Schwingel, A.S. Mangrich, *Inorg. Chim. Acta* 356 (2003) 41; e) W.A. Alves, S.A. Almeida-Filho, M.V. Almeida, A. Paduan-Filho, C.C. Becerra, A.M.D.C. Ferreira, *J. Mol. Catal. A:Chemical* 198 (2003) 63; f) T. Kruse, T. Weyhermuller, K. Wieghardt, *Inorg. Chim. Acta* 331 (2002) 81; g) B.A. Jazdzewski, W.B. Tolman, *Coord. Chem. Rev.* 200-202 (2002) 633; h) W.A. Alves, I.A. Bagatin, A.M.D.C. Ferreira, *Inorg. Chim. Acta* 321 (2001) 11; i) S.M.M. Romanowski, A.S. Mangrich, A. Neves, *Quim. Nova* 24 (2001) 592; j) S. Itoh, M. Taki, S. Fukuzumi, *Coord. Chem. Rev.* 198 (2000) 3; k) A.M.D.C. Ferreira, M.L.P. DosSantos, E.M. Pereira, M.O. Damasceno, W.A. Alves, *Anais Acad. Bras. Ciências* 72 (2000) 51; l) Y. Wang, et al. *Science* 279 (1998) 537; m) J. Stubbe, W.A. VanderDonk, *Chem. Rev.* 98 (1998) 705; n) C.D. Borman, C.G. Saysell, A. Sokolowski, M.B. Twitchett, C. Wright, G. Sykes, *Coord. Chem. Rev.* 190-192 (1999) 771.

¹⁸ W. Kaim, J. Rall, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35 (1996) 43.

1.1.1. A toxicidade do cobre

Ainda que o cobre seja absolutamente necessário para a vida, participando de inúmeros processos de transferência eletrônica, atividade oxidase e oxigenase, e detoxificação de radicais livres¹⁹, paradoxalmente é altamente tóxico. A tolerância para um adulto humano é relativamente alta, tratando-se do sulfato de cobre, enquanto que a faixa terapêutica entre concentrações que causam sintomas de deficiência e aqueles responsáveis por envenenamento é muito estreita e variável²⁰, especialmente no período de crescimento ou em organismos inferiores. Em um adulto humano, há cerca de 80 mg de cobre, e apenas cerca de 10^{-18} M destes íons estão “livres” no organismo, ou seja, sem estar ligado a uma proteína carreadora ou aminoácidos. Isto significa menos de 1 cobre livre por célula²¹. Este importante dado nos revela que a reatividade do cobre é controlada pelas proteínas e enzimas que o contém. Estudos clínicos indicam que a maioria dos adultos humanos ingerem cerca de 1 mg de cobre diariamente na dieta, e uma faixa de 1-3 mg deste elemento é considerada adequada, segundo o conselho de nutrição dos EUA. A absorção de cobre é competitiva com a de ferro e zinco, e dependente dos níveis de metalotioneína, do teor de carboidratos na dieta, especialmente frutose²², e da ingestão de vitamina C (ácido ascórbico)²³. Altas concentrações de cobre podem ser deletérias, levando a danos oxidativos em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Assim, a concentração de cobre deve ser rigorosamente controlada pelo organismo, de modo que este íon essencial seja provido às enzimas e proteínas específicas, mas não acumulados em níveis tóxicos^{24,25}. O cobre, assim como outros metais com atividade redox, é seqüestrado da alimentação em formas não reativas, e absorvido na dieta como quelatos de aminoácidos, principalmente histidina. Apenas recentemente os mecanismos de transporte e distribuição de íons de metal de transição, como o cobre, começaram a serem desvendados²⁶.

O cobre absorvido entra no sangue carreado pela albumina, e é levado ao fígado, onde é incorporado principalmente à proteína ceruloplasmina (MM ~132 kDa), e em outras proteínas e peptídeos, como mostrado na Tabela 1²⁷. O plasma humano normal contém 200-400 mg/L de ceruloplasmina, onde cada unidade contém 6 íons de cobre fortemente ligados e freqüentemente 70 fracamente ligados, que além de ser uma proteína transportadora de cobre, ela catalisa a

¹⁹ R.H. Holm, P. Kennepohl, E.I. Solomon, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2239.

²⁰ R.A. Laven, C.T. Livesey, *Catt. Pract.* 12 (2004) 265.

²¹ J.S. Valentine, E.B. Gralla, *Science* 278 (1997) 817.

²² S. Reiser, J.C. Smith et.al. *Am. J. Clin. Nutr.* 42 (1985) 242.

²³ C.H. Smith, W.K. Bidlack, *J. Nutr.* 110 (1980) 1398.

²⁴ a) L. Rossi, M.F. Lombardo, M.R. Ciriolo, G. Rotilio, *Neurochem. Res.* 29 (2004) 493; b) A.L. Lamb, A.S. Torres, T.V. Halloran, A.C. Rosenzweig, *Nat. Struct. Biol.* 8 (2001) 751; c) D.M. Glerum, A. Shtanko, A. Tzagoloff, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 20531; d) L.W.J. Klomp, S.J. Lin, D.S. Yuan, R.D. HKlausner, V.C. Culotta, J.D. Gitlin, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 9221.

²⁵ K.G. Daniel, R.H. Harbach, W.C. Guida, Q.P. Dou, *Frontiers in Bioscience* 9 Suppl. S (2004) 2652.

²⁶ A.C. Rosenzweig, *Acc. Chem. Res.* 34 (2000) 119.

²⁷ M.C. Linder, *Mutat. Res.* 475 (2001) 141.

oxidação de poliaminas e polifenóis, e oxida Fe^{II} à Fe^{III} . Esta proteína utiliza e doa o cobre a sítios específicos localizados na superfície celular, e o excesso de cobre é excretado pela bilis.

Tabela 1. Diferentes formas de incorporação do cobre no plasma sanguíneo ²⁷.

Componentes do plasma	Contribuições aproximadas do cobre no plasma humano		
	Porcentagem	µg/L	µM
Ceruloplasmina	65	650	10,2
Albumina	18	180	3,0
Transcupreína (macroglobulinas)	9	90	1,4
Ferroxidase II	1	10	0,16
SOD extracelular e glicoproteínas ricas em Histidina	<1	<10	<0,16
Componentes de 15-60 KDa	4	40	0,63
Amino ácidos e peptídeos pequenos	4	35	0,55
Cobre livre	~0	0,0001	0,0000002

Uma proteína transportadora com alta afinidade por cobre (Ctr1) está presente na membrana celular, e transfere cobre ao citoplasma, onde pequenas proteínas específicas conduzem íons metálicos à enzimas de cobre citosólicas ou organelas. A chaperona (proteína construtora) Hah1 transfere o cobre à duas ATPases homólogas, a ATP7A e a APT7B localizadas no complexo de Golgi, que se encarrega de entregar o cobre à proteínas do caminho de secreção ou, movendo-se através da membrana citoplasmática, excretar o excesso de cobre da célula (Figura 2) ²⁴. Todas as chaperonas e bombas da célula contêm sítios de ligação com o metal e domínios estruturais análogos conservados. Interessantemente, uma forte similaridade estrutural destes sítios é também observada nas proteínas alvo da entrega do íons metálico. A CCS é uma chaperona citosólica que entrega cobre a enzima homodimérica SOD1 (yCCS em leveduras e hCCS, para humanos). Adicionalmente a leveduras e humanos, chaperonas de cobre foram identificadas em bactérias, plantas e outros animais ²⁶. A chaperona CCS apresenta dois domínios distintos: um é similar à outras chaperonas de cobre, e o outro assemelha-se à arquitetura do monômero SOD1. Isso mostra que a CCS forma heterodímeros estáveis com o monômero apo-SOD1 (SOD sem o cobre) e esta interação entre proteínas favorece o deslocamento do cobre ²⁴.

Figura 2^{24a}. A distribuição esquematizada do cobre em mamíferos. O transportador de alta afinidade **Ctr1** media a entrada de cobre pela célula. O metal é então distribuído entre três chaperonas diferentes: **Cox17**, **CCS** e **Hah1**. A **Cox17** entrega o cobre à citocromo C oxidase (**Cytox**) na mitocôndria, com a ajuda das proteínas **SCO1** e **SCO2**. A **CCS** transfere o cobre à superóxido dismutase de cobre e zinco (**SOD1**) no citosol e na mitocôndria. A **Hah1** entrega o cobre ao compartimento de eliminação. A saída do cobre é mediada pelas bombas dependentes de ATP, a **ATP7A** e a **ATP7B**.

Particularmente complexa é a distribuição do cobre na mitocôndria. O metal é entregue à esta organela pela chaperona chamada Cox17, localizada no citosol e no espaço intermembrana (IMS) da mitocôndria. A Cox17 parece ser fundamental na inserção do cobre na enzima mitocondrial citocromo C oxidase (Cytox), que na sua forma ativa contém três íons de cobre. Esta enzima é o complexo IV da cadeia de transporte de elétrons, e mutações da Cox17 resultam em disfunções na cadeia respiratória. Além disso, duas proteínas mitocondriais chamadas SCO1 e SCO2 participam na transferência do metal da Cox17 à Cytox (Figura 2); em particular, a SCO2 doa cobre ao sítio Cu_A na subunidade II da enzima. Assim, a entrega apropriada de cobre à mitocôndria é um fator crítico para a montagem das subunidades da Cytox no complexo funcional total. A complexa maquinaria da manobra da entrega do cobre à mitocôndria inclui ainda a bomba ATP7B (ou ATP7A). A função da ATP7B na mitocôndria não é claro, e parece estar envolvido na saída do cobre da mitocôndria, controlando então a concentração de cobre intramitocondrial²⁴.

Com a elucidação da rota de transporte dos íons metálicos, como o cobre, começou-se a entender o quanto e como alguns metais presentes naturalmente em enzimas e proteínas podem ser danosos aos organismos, levando a um grande número de doenças decorrentes a falhas nestes sistemas de transporte e armazenamento. Um tipo de doença relacionada ao cobre há

mais tempo conhecida, e causada por uma falha na dieta alimentar, é a doença originada em ruminantes devido à um tipo de nutrição específica, e aparece a partir da complexação do Cu^I com $\text{MoO}_n\text{S}_{4-n}^{2-}$ formado sob condições redutoras no estômago dos ruminantes. Deste modo, a “molibdenose”, como é assim conhecida, implica em uma deficiência secundária de cobre, caso agentes de competição (Fe, Zn) na complexação com o molibdênio não estejam presentes, ou elementos antagonistas (S, Se). Como os tiomolibdatos não são solúveis em água, eles são excelentes agentes quelantes para centros metálicos em baixos estados de oxidação, como Cu^I .

Tendo em vista as expectativas bastante realistas de se obter terapias eficientes das doenças causadas por desordens genéticas, duas doenças hereditárias relacionadas ao metabolismo do cobre têm atraído especial atenção dos pesquisadores: a doença de Wilson e a síndrome de Menkes²⁸. Ambas são causadas por mutações da proteína transportadora de cobre ATPase (ATP7A para a síndrome de Menkes, e ATP7B para a doença de Wilson)²⁴, que é seletivamente expressa em diferentes tecidos, envolvida no transporte intramembrana do cobre, e ocorrem em aproximadamente 1 nascimento a cada 100 mil. A doença de Wilson²⁹ envolve uma acumulação patológica de cobre no fígado e no cérebro, e é letal caso não tratada. A sua terapia consiste na administração de agentes quelantes específicos ao cobre, em particular a D-penicilamina³⁰, ou em caso de sua intolerância, a trietilenotetramina ou derivados. A D-penicilamina é também indicada no tratamento de dermoesclerose, que envolve uma superprodução de colágeno na pele. Esta doença demonstra a importância do cobre no controle da síntese de tecidos conjuntivos, mecanismo este ainda não totalmente decifrado.

Em contraste com a doença de Wilson, a síndrome de Menkes envolve o armazenamento insuficiente de cobre, e é causada também por uma disfunção hereditária no transporte intracelular de cobre, gerando uma falta sistêmica deste elemento no organismo. O gene responsável pela síndrome foi identificado e isolado, e está situado no cromossomo X^{16c}, e induz a um defeito no transporte do cobre pela ATP7A das células intestinais. A concentração de cobre no cérebro torna-se particularmente baixa³¹, pois este órgão contém também a proteína mutante ATP7A, expressa na barreira do cérebro com a corrente sanguínea. Caso a síndrome não seja tratada a tempo por suplementação do elemento essencial, por exemplo como “cobre-histidina”, uma degradação rápida e eventualmente letal ocorre no sistema nervoso central³². Um sintoma característico desta doença é a ocorrência de cabelo retorcido, ou extremamente enrolado,

²⁸ a) N.L. Brown, B.O.T. Lee, S. Silver, em *Metal Ions in Biological Systems*, v.30, H. Sigel, A. Sigel Eds., Dekker, NY (1995); b) J.H. Menkes, M. Alter, G. Stegleder, D.R. Weakley, J. Sung, *Pediatrics* 29 (1962) 764.

²⁹ P.C. Bull, G.R. Thomas, J.M. Rommens, J.R. Forbes, D.W. Cox, *Nature Genet.* 5 (1993) 327.

³⁰ a) L. Rossi, R. Squitti, P. Pasqualetti, E. Marchese, E. Cassetta, E. Forestiere, G. Rotilio, P.M. Rossini, *Neurosci. Lett.* 329 (2002) 137; b) R. Squitti, P.M. Rosini, E. Cassetta, F. Moffa, P. Pasqualetti, M. Cortesi, A. Colloca, L. Rossi, A. Finazzi-Agrò, *Eur. J. Clin. Invest.* 32 (2002) 51.

³¹ L. Rossi, A. DeMartino, E. Marchese, S. Piccirilli, G. Rotilio, M.R. Ciriolo, *Neuroscience* 103 (2001) 181.

³² B. Sarkar, K. Lingertat-Walsh, J.T.R. Clarke, *J. Pediatr.* 123 (1993) 828.

ilustrando novamente a necessidade da presença do cobre, na forma de proteínas de cobre, para a biossíntese de proteínas estruturais.

Outra doença originada em parte (cerca de 10%) por um defeito genético é a esclerose lateral amiotrófica (ou FALS) ^{16d}, causada por mudanças na seqüência de aminoácidos da enzima antioxidante Cu,Zn-SOD ³³. A SOD de eritrócitos de mamíferos é uma enzima homodimérica que contém um centro de zinco e um de cobre por subunidade (detalhes na Figura 3). Os dois metais são conectados de maneira única, por um ligante imidazolato em ponte, de uma histidina da cadeia lateral ³⁴. O cobre é o metal redox ativo que reduz o metaestável superóxido à peróxido, quando está no estado de oxidação 1+ (Cu^{I}), e oxida à O_2 quando está no estado de oxidação 2+ (Cu^{II}). Desde que a enzima não pode ser atacada por espécies agressivas de oxigênio, ela converte os reativos $\text{O}_2^{\bullet-}$ e $\text{HO}_2^{\bullet}$ muito eficazmente, por uma cinética controlada por difusão. Para a difusão das espécies radiculares de oxigênio ocorrer adequadamente, é crucial haver processos de transferência de elétron e próton extremamente rápidos no sítio ativo da enzima. Este processo é então acelerado por uma modificação do aminoácido Glu⁻ à Gln no canal que leva ao sítio metálico. Por outro lado, variações defeituosas da enzima SOD que afetam o modo de coordenação do cobre, causando um ganho de função a esta enzima, são tidas como responsável pela FALS, uma doença neurodegenerativa progressiva e irreversível do sistema motor. Esta doença tornou-se largamente conhecida por afetar pessoas proeminentes na sociedade, como o físico inglês Stephen Hawking.

Figura 3. Esquematisação do sítio ativo da Cu,Zn-SOD extraída de eritrócitos de mamíferos ¹⁸.

³³ a) M.T. Carri, A. Ferri, A. Battistoni, L. Famhy, R. Gabbianelli, F. Poccia, G. Rotilio, *FEBS Lett.* 414 (1997) 365; b) M.T. Carri, A. Battistoni, F. Polizio, A. Desideri, G. Rotilio, *idem* 356 (1994) 314.

³⁴ J.A. Tainer, E.D. Getzoff, J.S. Richardson, D.C. Richardson, *Nature* 306 (1983) 284.

Existem ainda outras doenças causadas por deficiência crônica de cobre na dieta, cujos sintomas incluem a fragilização das artérias e o aumento do tamanho do coração. A biosíntese do neurotransmissor L-epinefrina (adrenalina), por exemplo, requer uma hidroxilase dependente de fenilalanina ³⁵, que tem ferro ou cobre como componentes metálicos, assim como as enzimas dependentes de cobre dopamina β -monooxigenase e tirosinase ³⁵. Deste modo, certas anomalias relacionadas ao metabolismo e ao transporte do cobre ³⁶, levam o tão benéfico metal a se tornar um poderoso catalisador de danos mediados por espécies reativas de oxigênio (radicais livres, ROS), convertendo H_2O_2 à radicais hidroxil, e catalisando a oxidação de muitos substratos presentes no corpo, assim como danos ao DNA. Tão bem quanto cálcio e ferro, o estress oxidativo causa um aumento na disponibilidade de íons cobre. Por exemplo, a ceruloplasmina é rapidamente degradada por proteases ou por exposição a $ONOO^-$ para liberar cobre, embora seja mais resistente a danos por peróxidos. Íons de cobre são liberados em excesso no cérebro e nas paredes das artérias ³⁷. De um lado, ainda é necessário esclarecer alguns mecanismos desta injúria, como o que acontece na oxidação de carboidratos *in vivo*, com a controversa participação do cobre, para que se possa entender detalhadamente este processo. De outro, há a possibilidade desta capacidade quase única do cobre em provocar danos radiculares poder ser controlada, e aplicada na geração da morte programada de algumas células, como as tumorais, num processo chamado de apoptose celular. Este trabalho se propõe a estudar estes fatores relacionados à bioquímica e biologia do cobre.

1.1.2. O envolvimento do cobre na glicoxidação de proteínas

Carboidratos simples, como a glicose, têm sido reconhecidos como potenciais agentes oxidativos e causadores de diversos danos em decorrência do envelhecimento e do diabetes *mellitus*. A oxidação dos monossacarídeos catalisada por metais de transição (como cobre e ferro, presentes no organismo), gera cetoaldeídos (compostos dicarbonílicos) e radicais hidroxila e superóxido, além de peróxido de hidrogênio ³⁸. Este processo é tido pela área médica como o principal causador de envelhecimento das artérias e tecidos, e responsável pelas degenerações das proteínas como colágeno e elastina (proteínas de longa vida) observadas em maior extensão em pessoas diabéticas ³⁹. Sabe-se que na presença de íons cobre, os monossacarídeos agem como pró-oxidantes potentes, através da geração de espécies reativas de oxigênio. Pacientes

³⁵ K.D. Karlin, Z. Tyeklar, *Bioinorganic Chemistry of Copper*, Chapman & Hall, NY (1993).

³⁶ G. Rotilio, M.R. Ciriolo, M.T. Carri, L. Rossi, "Disturbances of copper homeostasis and brain function", em "*Handbook of Copper Pharmacology and Toxicology*", Humana Press, Totowa, NJ (2002).

³⁷ B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine* 3th ed., Oxford Science Publications (1998).

³⁸ S.P. Wolff, R.T. Dean, *Biochem. J.* 245 (1987) 243.

com diabetes mellitus sofrem uma incidência crescente de complicações, incluindo doenças cardiovasculares e catarata; os mecanismos responsáveis por isso não foram ainda totalmente elucidados, mas sabe-se que uma característica de tais complicações é a acumulação de produtos decorrentes da oxidação da glicose, ou produtos de sua condensação com proteínas, como aldeídos de baixa massa molecular ⁴⁰.

Reações entre grupamentos carbonílicos de monossacarídeos e grupamentos aminas de aminoácidos e proteínas levam inicialmente à formação de compostos do tipo imina (ou base de Schiff), que através de rearranjos formam os chamados compostos de Amadori (derivados de 1-amino-1-deoxi-2-cetose). Estes compostos de Amadori, através da enolização, geram radicais livres que danificam proteínas, estão envolvidos em reações ditas de Maillard ⁴¹, ou escurecimento de proteínas. A glicose (e outros monossacarídeos) pode lentamente ser condensada não enzimaticamente com grupamentos amina de proteínas, como indicado no Esquema 1, onde a aldose é um monossacarídeo e RNH₂ é a proteína ou aminoácido envolvido. Neste estágio, a reação é chamada de “glicosilação não-enzimática”, ou simplesmente, “glicação”. No primeiro passo deste processo, bases de Schiff bastante lábeis são formadas, rearranjando-se em produtos carbonílicos mais estáveis, os chamados produtos de Amadori ⁴². Estas reações são lentas e requerem um certo aquecimento durante o experimento laboratorial ⁴¹. Em um complexo mecanismo reacional, os compostos de Amadori são degradados à uma grande variedade de produtos, em geral polímeros e copolímeros nitrogenados, sumariamente chamados de AGE's (“Produtos finais avançados de glicação”) ⁴³. Esta transformação envolve intermediários reativos dicarbonílicos, como o glioxal, o metilglioxal e as 1- e 3-deoxiglucosonas, que são muito mais reativos do que o monossacarídeo original ⁴⁴. Os compostos dicarbonílicos podem ainda reagir novamente com proteínas e enzimas celulares, formando inter cruzamento entre elas, destruindo-as ou inativando-as ⁴⁵. Estas proteínas e enzimas glicadas têm ainda o seu modo de coordenação com íons metálicos alterados, causando reações paralelas de degradação

³⁹ a) M. Qian, M. Liu, J.W. Eaton, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 250 (1998) 385; b) B.J. Ortwerth, H.L. James, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 259 (1999) 706.

⁴⁰ H.M. Knott, B.E. Brown, M.J. Davies, R.T. Dean, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 3572.

⁴¹ A descoberta de Louise-Camille Maillard, em 1912, da reação amino-carbonilo, durante a tentativa de síntese de peptídeos em condições fisiológicas, abriu as portas ao que mais tarde viria ser o mercado da cor e do sabor nos alimentos. Tal tipo de reações, geralmente designadas por reações de Maillard, continua a ser objeto de grande interesse, relacionado quer com a química dos alimentos, quer com a sua inocuidade (formação de mutagênicos), quer com a nutrição (disponibilidade de aminoácidos), e quer ainda com a química das proteínas *in vivo* (envelhecimento e diabetes mellitus). *Ver mais sobre a química de Maillard*: a) S. Horvat, A. Jakas, *J. Peptide Science* 10 (2004) 119; b) F. Ledl, E. Schleicher, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (1990) 565; c) A. Cerami, In: *Maillard Reactions in Chemistry, Food and Health*, T.D. Labuza, G.A. Reineccius, V. Monnier, J. O'Brien, J. Baynes (Eds.), The Royal Soc. of Chem., London, pp.1-10.

⁴² O.Reihl, T.M. Rothenbacher, M.O. Lederer, W. Schwack, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 1609.

⁴³ R. Singh, A. Barden, T. Mori, L. Beilin, *Diabetologia* 44 (2001) 129.

⁴⁴ a) A. Okado-Matsumoto, I. Fridovich, *J. Biolog. Chem.* 275 (2000) 34853; b) P.J. Thornalley, A. Yurek-George, O.K. Argirov, *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 55; c) K. Arai, S. Maguchi, S. Fujii, H. Ishibashi, K. Oikawa, N. Taniguchi, *J. Biolog. Chem.* 262 (1987) 16969.

⁴⁵ P.E. Morgan, R.T. Dean, M.J. Davies, *Arch. Biochem. Biophys.* 403 (2002) 259.

da cadeia protéica ⁴⁶, formando “glicoquelatos” implicados em algumas complicações do diabetes^{39a}.

Esquema 1. Os estágios iniciais da reação de Maillard ⁴⁷ :

A glicose tem uma taxa lenta de glicação, de modo que açúcares intracelulares, como glicose-6-fosfato e frutose, formam AGE's em uma taxa maior. Se a oxidação acompanha a glicação, então os produtos formados são também conhecidos como produtos de glicoxidação ⁴³. O acúmulo de precursores dicarbonílicos e carbonílicos reativos, ou os produtos da glicoxidação, causam o chamado estresse carbonílico. Muitos receptores celulares de AGE foram identificados, como RAGE (receptores do tipo I e II em macrófagos), AGE-R1 (oligossacarídeo transferase-48), AGE-R2 (fosfoproteína 80K-H), e AGE-R3 (galectina-3) ⁴⁸. Eles são expressos em um grande número de células, incluindo musculares e epiteliais. O receptor RAGE pode também atuar como marcador e então mediar sinais celulares. Estudos *in vitro* mostraram que a ligação AGE-RAGE em macrófagos leva ao estresse oxidativo e à ativação do fator de transcrição NF-κB (*Nuclear Factor*, fator de transdução nuclear), em um processo da cascata de sinalização de morte celular envolvendo a ativação da proteína p21/MAP kinase, que então ativam a NK-κB, que é um fator de transcrição sensível a radicais livres ⁴⁹.

⁴⁶ S.T. Seifert, R. Krause, K. Gloe, T. Henle, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 2347.

⁴⁷ M. Namiki, *Advances in Food Res.* 32 (1988) 115.

⁴⁸ K.N. Lai, J.C.R. Leung, L.Y.Y. Chan, F.F.K. Li, S.C.W. Tang, M.F. Lam, K.C. Tse, T.P. Yip, T.M. Chan, A. Wieslander, H. Vlassara, *Clin. Experim. Immun.* 138 (2004) 466.

⁴⁹ R.A. Kowluru, *Life Sciences* 76 (2005) 1051.

O processo de glicação é endógeno e contribui para modificações pós-translacionais de proteínas, e é relativamente lento em condições fisiológicas. Ele é responsável pela presença especialmente de adutos de lisina e arginina glicosados em proteínas intra e extracelulares. Dentro das células, o impacto da glicação é fortemente atenuado pelo grande número de ciclos de regeneração e formação de muitas proteínas celulares. No entanto, proteínas extracelulares com longos ciclos de vida, como proteínas de sustentação (colágeno e elastina, incluindo também mielina e tubulina) acumulam adutos glicosados com a idade⁵⁰. Devido ao fato que muitas células e tecidos dos olhos, das artérias e da sustentação da pele são profundamente influenciadas pela diabetes e pelo envelhecimento, estudos envolvendo a glicação dessas proteínas tem recebido enorme atenção, pois acredita-se que o processo de degradação destes tecidos seja modulado pela glicação das proteínas presentes⁵¹.

A glicose, como outros α -hidroxialdeídos, pode se enolizar e assim reduzir o oxigênio molecular sob condições fisiológicas, catalisada por íons de metais de transição^{38,52,53}, gerando cetoaldeídos e intermediários oxidantes, como mostrado no Esquema 2.

Esquema 2. Oxidação do monossacarídeo (carboidrato) catalisada por metais de transição⁵³:

⁵⁰ P.J. Thornalley, A. Langborg, H.S. Minhas, *Biochem. J.* 344 (1999) 109.

⁵¹ a) G. Viteri, G. Carrard, I. Biorlouez-Aragon, E. Silva, B. Friguet, *Arch. Biochem. Biophys.* 427 (2004) 197; b) J.L. Wautier, A.M. Schmidt, *Circulation Res.* 95 (2004) 233; c) A.W. Stitt, *Br. J. Ophthalmol.* 85 (2001) 746.

⁵² L. Benov, I. Fridovich, *J. Biolog. Chem.* 273 (1998) 25741.

Esquema 3. Vias de ataque à cadeia protéica pela oxidação de monossacarídeos catalisada por metais de transição ⁵³:

⁵³ S.P. Wolff, Z.Y. Jiang, J.V. Hunt, *Free Rad. Biol. & Med.* 10 (1991) 339.

Há outras evidências bastante claras da participação de íons de cobre(II) neste processo de glicoxidação de proteínas *in vitro* ^{39,54,55}, como o fato do aumento da taxa de oxidação dos açúcares na presença do metal, e o conseqüente aumento da oxidação de proteínas, como a lipoproteína de baixa densidade (LDL) ⁵⁶. Observou-se que alguns compostos modelo de Amadori são capazes de gerar radicais superóxido ^{57,58}, com destacada participação de íons de cobre(II); mas, notou-se que a presença de metais de transição não era imprescindível na oxidação de compostos de Amadori. Entretanto, a oxidação de 1 elétron sem a catálise metálica somente ocorreria com a presença de um catalisador orgânico de transferência eletrônica apropriado, presente no próprio meio, como mostrado no Esquema 4 ⁵⁷. É incerto, no entanto, se a formação de superóxido observada nestes experimentos quando livre de íons metálicos é não-catalisada.

Esquema 4. Possíveis mecanismos da formação de superóxido na oxidação de compostos de Amadori ⁵⁷.

⁵⁴ a) D.L. Price, P.M. Rhett, S.R. Thorpe, J.W. Baynes, *J. Biol. Chem.* 52 (2001) 276; b) G.B. Sajithlal, P. Chithra, G. Chandrakasan, *Free Rad. Biol. Med.* 25 (1998) 265.

⁵⁵ a) G.A.A. Ferns, D.J. Lamb, A. Taylor, *Artherosclerosis* 133 (1997) 139; b) M.D. Ch, P.Y. Lin, C.T. Tsou, J.J. Wang, W.H. Lin, *Biol. Trace Elem. Res.* 50 (1995) 119; c) G.B. Sajithlal, P. Chithra, G. Chandrakasan, *Mol. Cell. Biochem.* 194 (1999) 257.

⁵⁶ H.O. Mowri, B. Frei, J.F. Keaney Jr., *Free Rad. Biol. Med.* 29 (2000) 814.

⁵⁷ V.V. Mossine, M. Linetsky, G.V. Glinisky, B.J. Ortwerth, M.S. Feather, *Chem. Res. Toxicol.* 12 (1999) 230.

⁵⁸ B.J. Ortwerth, H. James, G. Simpson, M. Linetsky, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 245 (1998) 161.

1.1.3. O estudo da oxidação de carboidratos

Um fator muito importante e necessário para se entender o processo de glicoxidação de proteínas é o estudo detalhado do mecanismo que inicia este processo, a oxidação de carboidratos simples, como a glicose e a frutose. A cinética da oxidação de açúcares redutores por Cu(II) foi primeiramente estudada por Urech⁵⁹ com o intuito de elucidar a estrutura do açúcar do leite, mas não trazendo nenhuma luz para o mecanismo do processo oxidativo. Outros estudos iniciais indicaram que a velocidade desta reação é de primeira ordem em relação ao carboidrato (hexose ou pentose) e independente da concentração de cobre(II), cuja etapa lenta corresponde à enolização do açúcar⁶⁰. Entretanto, nestes estudos foi utilizado como reagente tartarato ou citrato de cobre(II) em meio alcalino, ou seja, ligantes fracos, o que leva o metal a ser precipitado como óxido de cobre(I) durante a reação, agindo como reagente estequiométrico, e não participando das leis cinéticas como catalisador. Outras pesquisas confirmaram estes estudos com reagentes de cobre(II) com ligantes lábeis⁶¹, mas indicando que a formação do quelato de Cu(I) durante a reação é a etapa determinante. Em outro estudo⁶², relacionado à oxidação de carboidratos, foi detalhada a oxidação da hidroxiacetofenona por Cu(II) em solução básica tamponada, tendo sido determinada a seguinte lei de velocidade: $v = K_1[\text{acetona}] + K_2[\text{acetona}][\text{Cu(II)}]$, onde o primeiro termo corresponde à etapa independente de enolização e o segundo termo é o predominante quando a concentração do Cu(II) é maior do que 0,01 M. Este estudo suporta a explicação inicial de que a reação independe do catalisador, mas contesta que a formação do Cu(I) a partir da redução do Cu(II) no meio é a etapa determinante no processo. Estudos posteriores reforçaram o mecanismo até então aceito neste processo de *carboidratos em meio alcalino, novamente usando Cu(II) com ligantes fracos*⁶³. oxidação de

Foi postulado por estes estudos cinéticos que o cobre definitivamente não participa como catalisador do processo de oxidação de carboidratos, o que contraria toda a observação experimental da glicoxidação de proteínas in vivo e in vitro, sendo muito questionável o modelo usado nestes estudos, ou seja, complexos de cobre(II) que não são estáveis o suficiente e que não entram na lei cinética. Isso leva a erros de interpretação dos dados obtidos em relação ao processo de glicação e glicoxidação, onde comprovadamente há a participação de íons de cobre, sejam aqueles presentes nas células, ligados a peptídeos e proteínas específicas carregadoras, ou os presentes em enzimas que contêm cobre como cofator, participando de reações paralelas.

⁵⁹ F. Urech, *Ber.* 22 (1889) 318.

⁶⁰ a) M.P. Singh, B. Krishna, S. Ghosh, *Z. Phys. Chem.* 204 (1955) 1; b) idem, 205 (1956) 285; c) ibidem, 208 (1958) 273; d) S.V. Singh, M.P. Singh, *Z. Phys. Chem. (Frankfurt)* 50 (1966) 11.

⁶¹ B.A. Marshall, W.A. Waters, *J. Chem. Soc.* (1961) 1579.

⁶² K.B. Wiberg, W.G. Nigh, *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 3849.

⁶³ a) S.V. Singh, O.C. Saxena, M.P. Singh, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 537; b) M.P. Singh, A.K. Singh, V. Tripathy, *J. Chem. Phys.* 82 (1978) 1222; c) K. Gupta, A. Sharma, V. Misra, *Tetrahedron* 37 (1981) 2887.

Em anos recentes, estas cinéticas começaram a ser questionadas, e estudos envolvendo compostos de cobre(II) com ligante gluconato (complexo comercialmente disponível), comprovaram a participação do cobre da oxidação de uronatos (gluconato, o próprio ligante, e glucuronato) ⁶⁴. A enolização de carboidratos também foi bastante estudada e elucidada nestes últimos anos, comprovando sua importância na glicação e glicosidação de proteínas ⁶⁵. Isso torna a elucidação do mecanismo da oxidação de carboidratos um ponto chave para se entender e estudar este processo in vitro e in vivo, esclarecendo quando e como íons metálicos participam desta ação.

Um outro fator atraente que igualmente leva ao estudo da oxidação de carboidratos, além do esclarecimento do seu mecanismo, é que atualmente, muita atenção tem sido dada à catálise que utiliza materiais (catalisadores ⁶⁶ e sobretudo substratos) de baixo custo ⁶⁷. Açúcares são materiais de partida provenientes de fontes renováveis, baratas e abundantes, que geram como produtos de oxidação ácidos aldônicos e carboxílicos, com cadeia carbônica poli-hidroxilada assimétrica, que por sua vez servem de material de partida para inúmeras sínteses, onde se transformam em Synthons (moldes) quirais.

Uma das reações catalíticas que tem um papel central em síntese química, incluindo a produção de precursores fármacos, é a oxidação de álcoois e de carboidratos nos seus correspondentes compostos carbonílicos e carboxílicos ⁶⁸. A oxidação de álcoois catalisada por metais de transição em meio aquoso é uma reação que pode ser amplamente empregada na química fina e na conversão de carboidratos ^{69,70}. Métodos tradicionais de se conduzir transformações oxidativas em síntese química geralmente envolvem o uso de grandes quantidades de agentes oxidantes inorgânicos, notadamente reagentes de crômio, bastante tóxicos ⁷¹.

Desde 1967, os pesquisadores van der Baan e De Wilt começaram a explorar a conversão catalítica de carboidratos como uma fonte renovável de material de partida químico ⁷².

⁶⁴ R.T. Rodio, E.M. Pereira, M.M. Tavares, A.M.D.C. Ferreira, *Carbohydr. Res.* 315 (1999) 319.

⁶⁵ a) V.A. Yaylayan, A.A. Ismail, *Carbohydr. Res.* 276 (1995) 253; b) S.J. Anguila, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 49 (1992) 19; c) idem, 42 (1984) 15; d) V.A. Yaylayan, A.A. Ismail, *J. Carbohydr. Chem.* 267 (1993) 24933.

⁶⁶ a) S. Zolezzi, E. Spodine, A. Decinti, *Polyhedr.* 22 (2003) 1653; b) D.M. Boghaei, S. Mohebi, *J. Mol. Catal. A:Chemical* 179 (2002) 41; c) B.S. Lane, K. Burgess, *Chem. Rev.* 103 (2002) 2457.

⁶⁷ B.M. Choudary, M. Lakshmi Kantam, P. Lakshmi Santhi, *Catalysis Today* 57 (2000) 17.

⁶⁸ a) K. Ebitani, H.B. Ji, T. Mizugaki, K. Kaneda, *J. Mol. Catal. A:Chemical* 212 (2004) 161; b) V.B. Sharma, S.L. Jain, B. Sain, *J. Mol. Catal. A:Chemical* 212 (2004) 55; c) G.J. tenBrink, I.W.C.E. Arends, R.A. Sheldon, *Science* 287 (2000) 1636; d) I.E. Markó, P.R. Giles, M. Tsukazaki, S.M. Brown, C.J. Urch, *Science* 274 (1996) 2044.

⁶⁹ a) J.H.J. Kluytmans, A.P. Markusse, B.F.M. Kuster, G.B. Marin, J.C. Schouten, *Catalysis Today* 57 (2000) 143; b) M. Besson, P. Gallezot, *Catalysis Today* 57 (2000) 127.

⁷⁰ M. Besson, P. Gallezot, F. Lahmer, G. Flèche, P. Fuentes, "Oxidation of Glucose on Palladium Catalysts: Particle Size and Support Effects", on "Catalysis of Organic Reactions", ed. J.R. Kosak, T.A. Johnson, M. Dekker, Inc., 1994, p. 169.

⁷¹ a) R.A. Sheldon, I.W.C.E. Arends, A. Dijkstra, *Catalysis Today* 57 (2000) 157; b) D.H. Hollenberg, R.S. Klein, J.J. Fox, *Carbohydr. Res.* 67 (1978) 491.

⁷² H.G.J. de Wilt, H.S. van Der Baan, *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 11 (1972) 63.

A oxidação da glicose à gluconato em meio alcalino, catalisada por platina foi a primeira reação estudada, seguida da sua oxidação à glucarato ⁷³. Usando um sal de Pb(II) suportado em Pt/C, a seletividade da oxidação dos açúcares muda de ácidos aldáricos (glucônicos, glucurônicos) a ácidos 2-ceto carbonílicos ⁷⁴. Desenvolvendo novas rotas para a síntese da vitamina C e aplicações de derivados de carboidratos em detergentes, foi descrita a oxidação de glucosídeos (açúcares componentes da parede celular) catalisada por platina ⁷⁵. Ainda utilizando Pt/C, foi descrito a oxidação da frutose até os ácidos carboxílicos de cadeia curta, ácido glicólico e ácido 2-hidroxi-3-butanodióico ⁷⁶. Etanol foi utilizado como reagente modelo para estudos cinéticos com a caracterização in situ do catalisador heterogêneo de platina. Bismuto suportado Pd/C foi também usado para a oxidação de lactose ⁷⁷, e de glicose ⁷⁸. Oxidações deste tipo, com metais promotores como cádmio, telúrio, prata, tecnécio, selênio, cobalto, cério e estanho, suportados em carbono, têm sido muito utilizadas industrialmente na oxidação de álcoois e aldeídos, e ainda em testes para carboidratos. Um problema detectado nestes sistemas é a dissolução dos metais da superfície do catalisador na solução reacional, principalmente no caso do bismuto em Pd/C, na oxidação da glicose.

Um sistema de quatro componentes, o metiltrioxo-rênio(VII), o radical orgânico TEMPO, a água oxigenada e HBr foi testado na oxidação do amido da batata em meio aquoso, para fornecer biopolímeros que podem ser usados como agentes super-absorvedores ⁷⁹. A eficiência deste sistema ainda não foi criteriosamente verificada, mas marca o início de uma busca por sistemas catalíticos seletivos para carboidratos, abrindo amplas perspectivas de aplicações industriais. Muitos aspectos sobre a oxidação de carboidratos em meio homogêneo foram estudados, utilizando-se metais como agentes oxidantes, como complexos de vanádio(V), cério(IV) e telúrio(III), permanganato, cloro cromato de piridina (PCC), todos em quantidades equimolares ou em excesso ⁸⁰. Alguns sistemas utilizaram compostos em quantidades catalíticas, como o N-cloro-p-toluenosulfonamida ⁸¹, o periodato ⁸², e o radical TEMPO com peroxodissulfato em meio homogêneo, sistemas que apresentaram a desvantagem de ter que se empregar

⁷³ a) J.M.H. Dirks, H.S. van Der Baan, *J. Catal.* 67 (1981) 1; b) P.J.M. Dijkgraaf, M.J.M. Rijk, J. Meuldijk, K. Van Der Wiele, *J. Catal.* 112 (1988) 329; c) J.M.H. Dirks, H. van Der Baan, J.M.A.J.J. van Der Broek, *Carbohydr. Res.* 59 (1977) 63.

⁷⁴ P.C.C. Smits, B.F.M. Kuster, K. van Der Wiele, *Carbohydr. Res.* 153 (1986) 227.

⁷⁵ a) J.H. Vleeming, B.F.M. Kuster, G.B. Marin, F. Oudet, P. Courtine, *J. Catal.* 166 (1997) 148; b) J.H. Vleeming, B.F.M. Kuster, G.B. Marin, *Carbohydr. Res.* 303 (1997) 175.

⁷⁶ A.W. Heinen, J.A. Peters, H. van Bekkum, *Carbohydr. Res.* 304 (1997) 155.

⁷⁷ H.E.J. Hendriks, B.F.M. Kuster, G.B. Marin, *Carbohydr. Res.* 204 (1990) 121.

⁷⁸ M. Wenkin, P. Ruiz, B. Delmon, M. Devillers, *J. Mol. Catal. A: Chemical* 180 (2002) 141.

⁷⁹ W.A. Herrmann, J.P. Zoller, R.W. Fischer, *J. Organom. Chem.* 579 (1999) 404.

⁸⁰ A.G. Fadnis, *Carbohydr. Res.* 146 (1986) 97.

⁸¹ K.S. Rangappa, M.P. Raghavendra, D.S. Mahadevappa, D.C. Gowda, *Carbohydr. Res.* 306 (1998) 57.

⁸² a) F. Sussich, A. Cesàro, *Carbohydr. Res.* 329 (2000) 87; b) S.A. Barker, P.J. Somers, *Carbohydr. Res.* 3 (1966) 220.

grandes quantidades de agente oxidante ⁸³. Alguma atenção tem sido dada a sistemas que utilizem ouro suportado em carbono, onde se determinou a cinética de oxidação da glicose dependente da concentração do catalisador sólido ⁸⁴. Atualmente bastante atenção tem sido dada a sistemas eletrocatalíticos, com eletrodos de platina dopados com bismuto, na conversão de açúcares como substrato renovável ⁸⁵.

Estudos adicionais desta catálise de oxidação, além de levar ao desenvolvimento de catalisadores eficientes para carboidratos e também álcoois, podem levar ao entendimento de quais fatores influenciam a oxidação de carboidratos em organismos vivos e como estes substratos podem atuar como potentes pró-oxidantes.

1.1.4. O envolvimento do cobre na apoptose celular

Como foi comprovado, 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 injúria celular, que podem culminar em inúmeras doenças e na morte da célula, por necrose ou apoptose ⁸⁶. A morte celular programada, chamada apoptose, ⁸⁷ tem um importantíssimo papel no desenvolvimento celular normal e no controle de crescimento de tecidos. 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 (chamados “*Blebs*”) ligados à membrana citoplasmática, nos quais as organelas aparentemente estão intactas e muitos desses corpos apoptóticos apresentam um componente nuclear. A característica bioquímica mais bem definida da apoptose envolve o DNA nuclear. A clivagem da dupla hélice do DNA é observada entre as regiões de união entre os nucleossomas, e apresenta um padrão típico de fragmentos vistos através do gel de agarose na eletroforese, enquanto que na necrose a quebra do DNA é randômica e aparece como manchas na eletroforese. Atualmente acredita-se que esta quebra do DNA ocorra devido a processos

⁸³ a) N. Merbouh, J.F. Thaburet, M. Ibert, F. Marsais, J.M. Bobbitt, *Carbohydr. Res.* 336 (2001) 75; b) H. Kochkar, L. Lassalle, M. Morawietz, F. Holderich, *J. Catal.* 194 (2000) 343.

⁸⁴ a) Y. Onal, S. Schimpf, P. Claus, *J. Catal.* 223 (2004) 122; b) S. Biella, L. Prati, M. Rossi, *J. Catal.* 206 (2002) 242.

⁸⁵ a) S.T. Farrell, C.B. Breslin, *Elektroch. Acta* 49 (2004) 4497; b) I.G. Casella, M. Gatta, M. Contursi, *J. Electroanal. Chem.* 561 (2004) 103.

⁸⁶ a) M.F. Lombardo, M.R. Ciriolo, G. Rotilio, L. Rossi, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 1733; b) G. Rotilio, M.T. Carri, L. Rossi, M.R. Ciriolo, *IUBMB Life* 50 (2000) 309.

⁸⁷ a) L.E. Gerschenson, R.J. Rotello, *FASEB J.* 6 (1992) 2450; b) A. Glucksmann, *Biol. Rev.* 26 (1951) 59; c) J.W. Saunders, *Science* 154 (1966) 604.

enzimáticos, o que induz disfunções na cromatina ⁸⁸. A apoptose ocorre em células individuais, e difere da necrose em inúmeros fatores, como alguns apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Diferenças gerais entre apoptose e necrose ^{87a}.

Características	APOPTOSE	NECROSE
Estímulos	Fisiológico	Patológico (injúria)
Ocorrência	Células únicas	Grupos de células
Reversibilidade	Não (após mudanças morfológicas)	Sim (até certo ponto)
Organelas citoplasmáticas	Aumento em estágio avançado	Aumento em estágio primário
Escape das enzimas do lisosoma	Ausente	Presente
Cromatina nuclear	Compactação em massas densas e uniformes	Acumulação não definida
Quebra do DNA	Inter-nucleossomal	Randômica
Célula	Formação de corpos apoptóticos	Aumento e posterior desintegração
Fagocitose em outras células	Presente	Ausente
Inflamação	Ausente	Presente

A apoptose pode se dar por duas vias: o caminho extrínseco, onde receptores específicos à morte celular localizados na membrana celular são ativados, e o caminho intrínseco, onde a mitocôndria está primariamente envolvida, como esquematizado na Figura 3. Acredita-se que os principais fatores causadores da apoptose são: desequilíbrio no estado redox da célula, o que envolve disfunções na mitocôndria, e produção de ROS, com conseqüente geração de estresse oxidativo ⁸⁹.

Figura 3. Mecanismos de ativação intrínseco e extrínseco da cascata da apoptose.

⁸⁸ Y. Higuchi, *Biochem. Pharmacol.* 66 (2003) 1527.

⁸⁹ J.E. Klauning, L.M. Kamendulis, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44 (2004) 239.

Considerando que em um sistema celular o valor de pH é constante, o estado redox depende essencialmente do equilíbrio entre três pares redox: o sistema nicotinamida dinucleotídeo fosfato, $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, que tem o potencial mais negativo e, assim, constitui a fonte principal de elétrons para os outros sistemas; o sistema tioredoxina, $\text{Trx}_{\text{red}}/\text{Trx}_{\text{ox}}$, e o sistema glutatona, $\text{GSSG}/2\text{GSH}$, considerado o principal sistema tampão redox celular, por estar presente em maior quantidade com relação aos outros, apesar de seu potencial não ser o menor ⁹⁰. Alterando-se o equilíbrio redox deste último par ($\text{GSSG}/2\text{GSH}$), pode-se alterar todo o funcionamento celular, pois a glutatona representa um cofator de muitas reações indispensáveis à sobrevivência da célula. O equilíbrio redox em um sistema celular está envolvido na catálise enzimática durante as reações de oxidoredução, participa ativamente no metabolismo e no transporte celular, está envolvido na síntese do DNA, estabiliza as conformações ativas de muitas proteínas e garante a integridade de membranas biológicas ⁹¹. A morte celular é quase sempre associada a um ambiente oxidante, ao contrário do crescimento, que é associado a um ambiente redutor ⁹². Numerosas espécies pró-oxidantes, de fato, induzem a morte celular programada aumentando a concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e outras espécies oxidantes, que iniciam uma cascata de sinalizadores de morte bastante complicada, envolvendo proteínas como caspases (proteases de cisteína) ⁹³, **p38** e proteínas kinases (**JNK**) ⁹⁴, **p53** e **p21**, entre outras proteínas capazes de regular o ciclo celular, fatores nucleares de resposta imunitária e fatores de junção e ativação de membrana, como esquematizado no Apêndice 1. De fato, aproximadamente 50% dos tumores resultam de anomalias no gene necessário para expressar a proteína de supressão tumoral, a **p53**, envolvida em uma das cascatas da apoptose. Foi observado que a atividade da **p53** pode ser modulada através da complexação com cobre, pelo mecanismo do par redox $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$ ⁹⁵. O ambiente redox é então capaz de determinar o destino de uma célula: proliferação, diferenciação ou morte ⁹⁶.

Como observado nas cascatas de reações que participam da apoptose celular, definitivamente fica claro a participação da mitocôndria, como o evento pivô deste processo ⁹⁷. Extensivos estudos evidenciaram que durante a apoptose a membrana mitocondrial, em especial a interna (**IMM**, *inter mitochondrial membrane*) torna-se permeável às proteínas do espaço intermembrana, incluindo a citocromo c. Uma vez liberada, a citocromo c promove a ativação da pró-caspase-9 diretamente no complexo apoptosoma (ver Figura 3). A **pró-caspase-9** é a forma

⁹⁰ G. Filomeni, G. Rotilio, M.R. Ciriolo, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 1057.

⁹¹ Reed, D.J. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30 (1990) 603.

⁹² a) G. Hewlett, et al *Eur. J. Immunol.* 7 (1977) 781; b) J.D. Broome, M.W. Jeng, *J. Exp. Med.* 138 (1973) 574.

⁹³ J.B. Denault, G.S. Salvesen, *Chem. Rev.* 102 (2002) 4489.

⁹⁴ J.E. Hun, K.S. Kang, C. Chae, H.M. Kim, K.S. Ahn, S.H. Kim, *Biochem. Pharmacol.* 67 (2004) 1811.

⁹⁵ P. Hainaut, N. Rolley, M. Davies, J. Milner, *Oncogene* 10 (1995) 27.

⁹⁶ a) T. Finkel, *FEBS Lett.* 476 (2000) 52; b) W.G. Kirlin, et al *Free Rad. Biol. Med* 27 (1999) 1208; c) T.Y. Aw, *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (1999) 557; d) J. Cai, D.P. Jones, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 11401.

⁹⁷ D.R. Green, G. Kroemer, *Science* 305 (2004) 626.

latente (pró-) da **caspase-9**, ativada na cascata. A **caspase-9** ativa então a **caspase-3**, e o subsequente co-envolvimento de outras caspases na cascata de reações, que resulta nos fenótipos apoptóticos observados na célula. A permeabilização da **OMM** é modulada por membros da família de proteínas **Bcl-2** e **Bcl-X_L**, anti-apoptóticas, inibindo a perda de proteínas pela membrana, enquanto membros pró-apoptóticos como **Bax**, **Bak** e as **BH3** (**Bid** e **Bim**) estimulam essa perda. Entretanto, ainda não se conhece o mecanismo preciso pelo qual as proteínas mitocondriais atravessam a membrana (**IMM**) durante a apoptose, e como as proteínas **Bcl-2** regulam este processo ⁹⁸. Sabe-se apenas que o estresse oxidativo pode ser o responsável por essa permeabilidade da membrana mitocondrial interna (onde está a cadeia respiratória) através da queda de seu potencial redox.

Os danos provocados por ROS (referentes à $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$, H_2O_2 , oxigênio singlete, radical peróxido $LOO^{\bullet}$, entre outros) são causados principalmente pela alta reatividade destas espécies frente à oxidação de cadeias hidrocarbônicas dos ácidos graxos insaturados, dos resíduos de aminoácidos de proteínas, de carboidratos e de bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos. Os danos oxidativos causados por ROS levam, em casos extremos, a alterações e ao comprometimento da função de todas as estruturas e macromoléculas celulares com conseqüente morte celular ⁹⁹. Apenas em baixas concentrações, ROS são tidos como mensageiros no processo de tradução de sinal celular ^{96a}, por duas maneiras: fosforilação de proteínas ou mudança na quantidade de grupos tióis nas proteínas ¹⁰⁰. Em relação a membranas celulares, a reação devido à ação de radicais de oxigênio é a peroxidação dos fosfolipídios. O processo consiste em uma série de reações em cadeia nas quais os ácidos graxos insaturados dos fosfolipídios de membrana se transformam progressivamente em radicais lipídicos ($L^{\bullet}$), radicais peróxidos ($LOO^{\bullet}$) e peróxidos lipídicos ($LOOH$), que são rapidamente decompostos em outras espécies, como alcóxidos lipídicos ($LO^{\bullet}$), aldeídos (malonaldeído), alcanos, epóxidos lipídicos e álcoois ¹⁰¹. Em seqüência a tais processos degenerativos, as membranas da célula se tornam rígidas, perdendo completamente a fluidez e a permeabilidade seletiva ¹⁰². Com relação às proteínas, as reações oxidativas provocadas pelos radicais livres têm como conseqüência a proteólise, na qual as características físico-químicas de uma proteína exposta à ação de radicais de oxigênio são completamente alteradas, seja por diminuição da fluorescência nativa (devido a modificações em resíduos de triptofano e tirosina), ou por uma variação do ponto isoelétrico (causada pela oxidação de grupos $-R$ dos aminoácidos) ⁹⁹. Quando se trata de danos a ácidos

⁹⁸ a) D.R. Green, J.C. Reed, *Science* 281 (1998) 1309; b) S. Orrenius, *Toxicol. Lett.* 149 (2004) 19.

⁹⁹ a) H. Shi, L.G. Hudson, K.J. Liu, *Free Rad. Biol. Med.* 37 (2004) 582; b) T. Jabs, *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999) 231; c) R.T. Dean, S. Gieseg, M.J. Davies, *Trends Biochem. Sci.* 18 (1993) 437; d) D.C. Salo, et al *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 11919; e) K.J.A. Davies, S.W. Lin, R.E. Pacifici, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 9914.

¹⁰⁰ a) A.P. Arrigo, *Free Rad. Biol. Med.* 27 (1999) 936; b) Suzuki, Y.J.; Ono, Y.; Hirabayashi, Y. *FEBS Lett.* 425 (1998) 209.

¹⁰¹ A. Sevanian, P. Hochstein, *Ann. Rev. Nutr.* 5 (1985) 365.

¹⁰² J.F. Mead, em *Free Radicals in Biology* (1976), Pryor, W.A. ed., New York, Academic Press. p.51.

nucléicos, foi demonstrado que alterações oxidativas inibem irreversivelmente os processos de transcrição, tradução e replicação do DNA, levando a um envelhecimento precoce e à morte celular ¹⁰³. O dano oxidativo ao DNA se traduz em rompimento dos filamentos (duplos e únicos), formação de ligação cruzada DNA-DNA (ou DNA-proteína), troca de cromátides irmãos, modificações das bases nitrogenadas. Todos os nucleotídeos, de fato, podem sofrer modificações oxidativas, apesar das pirimidinas (citosina e timidina) parecerem ser mais susceptíveis aos processos de hidroxilação, saturação, abertura ou contração do anel imidazólico. Este tipo de alteração produz uma diminuição no grau de aromaticidade e uma perda da estrutura planar que se traduz em distorção local da dupla hélice ¹⁰⁴. Dada a proximidade imediata na cadeia de transporte, o DNA mitocondrial representa um ponto primordial de ataque e da toxicidade de ROS, defendendo-se com as enzimas que dismutam (desproporcionam) o radical superóxido, como a Mn-SOD na matriz mitocondrial, e a Cu,Zn-SOD no espaço intermembrana, armas potentes na defesa antioxidante contra o radical superóxido. Uma esquematização dos efeitos de espécies radicalares na ativação da morte celular é mostrada na Figura 4 ⁸⁸.

¹⁰³ a) D. Harman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78 (1981) 7124; b) Schraufstatter, et al. *J. Clin. Inves.* 82 (1988) 1040.

¹⁰⁴ G.W. Teebor, R.J. Boorstein, J. Cadet *Int. J. Radiat. Biol.* 54 (1988) 131-150.

Figura 4. Possível mecanismo na morte celular por necrose ou apoptose induzida por ROS e cuja defesa é mediada pelo sistema glutatona (exemplo oriundo de células gliomas) ⁸⁸.

Este desarranjo da geração de ROS, e suas conseqüências celulares, levando à apoptose, pode ser causado pela presença de metais em excesso na célula, como o cobre. Uma das conseqüências de altos níveis de cobre nas células é o aumento da taxa de formação de espécies reativas, como ROS, levando a danos oxidativos, com destruição da bicamada lipídica, alteração das funções protéicas e gênicas. Outra potencial conseqüência do cobre é a ativação da apoptose, embora ainda não se saiba em qual via mecanística ele atue ²⁷. Recentemente foi identificado uma proteína celular que se liga ao cobre, a Prion proteína (PrP^C), que regula o nível de peróxido de hidrogênio intracelular, prevenindo a apoptose induzida por cobre ¹⁰⁵. O cobre liga-se à PrP^C em um sítio majoritário de Cu(II) identificado no N-terminal, e esta proteína tem uma participação direta no metabolismo do cobre no cérebro. Embora a função fisiológica fundamental desta proteína permaneça não esclarecida, sabe-se que a deficiência da PrP^C resulta em fenótipos neuronais sensíveis ao estresse oxidativo induzido por O₂^{•-} e H₂O₂. Este fato mostra que o organismo tem mecanismos de intenso controle do cobre, especialmente em células neuronais, para evitar a apoptose indesejada em células saudáveis por ação deste elemento.

Numerosos estudos têm sido feitos no sentido de verificar a ação de compostos orgânicos na apoptose celular, como o produto natural ácido gambógico, capaz de causar apoptose em células T47D, mas é um composto isolado em pequenas quantidades (5%) da resina da árvore *Garcinia hanburyi*, no sudoeste da Ásia ¹⁰⁶. Outro caso é a C-ficocianina, um pigmento biliproteico extraído da *Spirulina platensis*, capaz de induzir apoptose em células humanas leucêmicas K562 ¹⁰⁷, dentre muitas outras drogas orgânicas e principalmente produtos naturais. Eles são largamente empregados no combate ao câncer através da indução da apoptose nas células tumorais, ou bloqueando o ciclo celular em determinada fase, como o caso do Taxol ¹⁰⁸, extraído da asca da árvore *Taxus-Brevifolia*, que o bloqueia na fase G2/M, interferindo eficientemente na síntese da tubulina. Entretanto, devido à complexidade de estruturas como essas, as suas sínteses para produção em larga escala na terapia anti-tumoral tornam-se quase inviáveis. Isso tornou a busca por terapias anti-tumorais mais baratas e simples um grande desafio, e tem impellido muitos pesquisadores a iniciar uma busca por drogas pró-apoptóticas baseadas em

¹⁰⁵ a) T. Nishimura, A. Sakudo, I. Nakamura, D. Lee, Y. Taniuchi, K. Saeki, Y. Matsumoto, M. Ogawa, S. Sakaguchi, S. Itohara, T. Onodera, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 323 (2004) 218; b) M.P. Hornshaw, J.R. McDermott, J.M. Candy, J.H. Lakey, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 214 (1995) 993.

¹⁰⁶ H.Z. Zhang, S. Kasibhatla, Y. Wang, J. Herich, J. Guastella, B. Tseng, J. Drewe, S.X. Cai, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 309.

¹⁰⁷ J. Subhashini, S.V.K. Mahipal, M.C. Reddy, M.M. Reddy, A. Rachamalla, P. Reddanna, *Biochem. Pharmacol.* 68 (2004) 453.

¹⁰⁸ a) P.B. Schiff, J. Fant, S.B. Horwitz, *Nature* 277 (1979) 665; b) M.C. Wani, H.L. Taylor, M.E. Wall, P. Coggon, A.T. McPhail, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 2325.

complexos metálicos, além da possibilidade de se elucidar a ação de muitos desses metais no organismo, através do estudo com complexos estáveis ¹⁰⁹.

Foi observado a atividade antimicrobial e mutagênica de complexos bis-tiocarbonohidrazonas de organoestanho(IV) com isatina e N-alkil-isatina (ver estrutura na Figura 5, Estrutura A) ¹¹⁰. Este tipo de complexo mostrou-se ativo ao controlar a população de bactérias Gram-positivas, embora a atividade mutagênica tenha sido observada apenas para o ligante bis-tiocarbonohidrazonas-N-metil isatina isolado.

Particularmente, compostos do tipo semicarbazonas, hidrazonas e derivados, e seus respectivos complexos metálicos estão sendo bastante estudados como indutores de apoptose em diversas células tumorais, embora com reduzida eficácia em muitos casos. Pressupõe-se que a atividade biológica destes complexos esteja associada à criação de interações fracas com o DNA, como ligações de hidrogênio e de van der Waals. Estudos iniciais com complexos de Cu(II) com ligantes tiosemicarbazonas derivados do salicilaldeído (estrutura B, Figura 5), somente o seu ligante (estrutura C, Figura 5) ^{111a}, e do tipo tiosemicarbazona metilpiruvato (estrutura D, Figura 5) complexado com Cu(II) e Zn(II) ^{111b} mostraram que estes compostos não foram capazes de causar apoptose celular.

Outros complexos do tipo semicarbazona foram testados, como complexos de Cu(II) e Fe(II) derivados de acil diazinas, e diminuíram a citotoxicidade do ligante (já usado em tratamentos contra o câncer), aumentando a especificidade para certas linhas tumorais, como os complexos de Cu(II) (estrutura E, Figura 5), que foram tidos como potentes indutores de apoptose em células de linfoma de Burkitt's ¹¹². Complexos de Cu(II) com tiosemicarbazonas derivadas do ácido α -cetoglucárico (estrutura F, Figura 5) mostraram inibir apenas a proliferação de células leucêmicas humanas U937, com efeito modesto (em 48h, redução de 28% da síntese de DNA, na fase S do ciclo) em causar apoptose nestas e em outras linhas celulares tumorais ¹¹³. Outros complexos de Cu(II) com ligantes do tipo tiosemicarbazonas heterocíclicas, como o 5-formiluracil (estrutura G, Figura 5) não foram capazes de inibição do crescimento celular nem tampouco de causar apoptose, e apresentaram uma interação muito leve com o DNA, em células leucêmicas humanas U937 ¹¹⁴. Demais complexos de Cu(II)-tiosemicarbazonas tiveram suas propriedades verificadas, como os derivados do piridoxal, onde foi observado que os complexos

¹⁰⁹ Exemplos primordiais desta abordagem: a) D.X. West, S.B. Padhye, P.B. Sonawane, *Struc. Bond.* **76** (1991) 1; b) J.R. White, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **77** (1977) 387.

¹¹⁰ A. Bacchi, M. Carcelli, P. Pelagatti, G. Pelizzi, M.C. Rodriguez-Arguelles, D. Rogolino, C. Solinas, F. Zani, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 397.

¹¹¹ a) M.B. Ferrari, S. Capacchi, G. Pelosi, G. Reffo, P. Tarasconi, R. Albertini, S. Pinelli, L. Lunghi, *Inorg. Chim. Acta* **286** (1999) 134; b) M.B. Ferrari, F. Bisceglie, G. Pelosi, P. Tarasconi, R. Albertini, S. Pinelli, *J. Inorg. Biochem.* **87** (2001) 137.

¹¹² J. Easmon, G. Purstinger, G. Heinisch, T. Roth, H.H. Fiebig, W. Holzer, W. Jager, M. Jenny, J. Hofmann, *J. Med. Chem.* **44** (2001) 2164.

¹¹³ a) M. Baldini, M.B. Ferrari, F. Bisceglie, P.P. Dall'Aglio, G. Pelosi, S. Pinelli, P. Tarasconi, *Inorg. Chem.* **43** (2004) 7170; b) M.B. Ferrari, F. Bisceglie, G.G. Fava, G. Pelosi, P. Tarasconi, R. Albertini, S. Pinelli, *J. Inorg. Biochem.* **89** (2002) 36.

sem a presença do grupamento NH_2 foram capazes de induzir apoptose em células leucêmicas humanas U937 ¹¹⁵. Complexos de Pd(II) com ligantes benzopiridinas derivados da tiosemicarbazona mostraram atividade citotóxica em células tumorais humanas MCF-7, TK-10 e UACC-62, mas sem especificidade alguma de fase do ciclo celular na inibição da proliferação ¹¹⁶. Complexos de Cu(II), Ni(II) e Zn(II) com hidrazonas derivadas da isatina (estrutura H, Figura 5) reduziram a proliferação celular na fase S do ciclo em cerca de 40%, nas células leucêmicas humanas TOM1, mas sem efeitos em outras linhas celulares leucêmicas, mostrando que são específicos a algumas células ¹¹⁷. De qualquer modo, nestes estudos, não há uma correlação clara entre estrutura do complexo e sua atividade apoptótica.

Figura 5. Estrutura de alguns complexos estudados na literatura com relação à apoptose.

Outros complexos metálicos, como vanádio (IV) tendo como ligante drogas antiinflamatórias não esteroidais (Ibuprofeno, Naproxeno e Tolmetina) apresentaram atividades

- ¹¹⁴ M. Baldini, M.B. Ferrari, F. Bisceglie, G. Pelosi, S. Pinelli, P. Tarasconi, *Inorg. Chem.* **42** (2003) 2049.
¹¹⁵ M.B. Ferrari, F. Bisceglie, G. Pelosi, P. Tarasconi, R. Albertini, P.P Dall'Aglio, S. Pinelli, A. Bergamo, G. Sava, *J. Inorg. Biochem.* **98** (2004) 301.
¹¹⁶ A.P. Rebolledo, M. Vieites, D. Gambino, O.E. Piro, E.E. Castellano, C.L. Zani, E.M. Souza-Fagundes, L.R. Teixeira, A.A. Batista, H. Beraldo, *J. Inorg. Biochem.* (2005) *in press*.
¹¹⁷ M.C. Rodrigues-Arguelles, M.B. Ferrari, F. Bisceglie, C. Pelizzi, G. Pelosi, S. Pinelli, M. Sassi, *J. Inorg. Biochem.* **98** (2004) 313.

fracas na inibição do crescimento de células osteoblásticas (UMR106 e MC3T3E1) ¹¹⁸. Estudos dos efeitos antitumorais de complexos de Cu(II), Ni(II), Co(II) e Zn(II) com ligantes do tipo tiohidrazinas sugerem que o complexo de Cu(II) apresenta um efeito dose-dependente na inibição da síntese do DNA em células fibroblásticas murina L-929 e mastocianoma murina P-815 ¹¹⁹. Complexos hexadentados derivados da tri-etilenodiamina de Cu(II), Ni(II) e Zn(II) com ligantes do tipo tripodal apresentaram atividade citotóxica, elevada com o aumento da lipofilicidade do ligante ¹²⁰.

O ligante 1,10-fenantrolina e seus complexos metálicos representam um novo grupo de agentes antifúngicos com aplicações potenciais no controle de infecções causadas por fungos ¹²¹. Observou-se que o ligante livre somente é ativo quando traços do metal estão presentes no meio fúngico, e concluiu-se que o complexo metálico é a espécie ativa nestes casos. Na comparação do tratamento das células tumorais com o ligante livre 1,10-fenantrolina e com o seu complexo metálico (de Cu^{II} e Mn^{II}) verificou-se um decréscimo na razão da glutatona reduzida:oxidada (GSH:GSSG) e um aumento do nível de peroxidação lipídica somente no caso do uso dos complexos, levando à apoptose, o que evidenciou a indução do estresse oxidativo pelos complexos. O complexo de cobre(II) com a 1,10-fenantrolina foi capaz de induzir a apoptose em células de carcinoma humano do fígado (Bel-7402) bloqueando a fase G1 do ciclo celular ^{121b}, e exibiu potentes efeitos citotóxicos na linha celular humana leucêmica HL-60 e na linha de câncer estomacal humano SGC-7901 com taxas de inibição de até 90% ¹²².

Os complexos de cobre(II) têm sido os mais estudados com o objetivo de se projetar novas drogas antitumorais, entendendo-se o papel dos complexos na indução da apoptose. Complexos de Cu(II) e Zn(II) com prodigiosina foram sintetizados com o objetivo de se avaliar a clivagem do DNA mediada por cobre ^{123,124}. Compostos naturais, presentes no chá verde, como o Galato de epigallocatequina, mostraram atividade de inibição da proliferação de células do adenoma de próstata humano (PCA) bastante aumentada na presença de íons de Cu(II) ¹²⁵. A amicacina, um antibiótico aminoglicosídeo teve sua atividade danosa ao DNA aumentada ao ser complexada a Cu(II), indicando que a ligação com o metal pode gerar espécies radicalares de

¹¹⁸ S.B. Etcheverry, D.A. Barrio, A.M. Cortizo, P.A.M. Williams, *J. Inorg. Biochem.* **88** (2002) 94.

¹¹⁹ N.K. Singh, S.B. Singh, N. Singh, A. Shrivastav, *BioMetals* **16** (2003) 471.

¹²⁰ N. Ye, G. Park, A.M. Przyborowska, P.E. Sloan, T. Clifford, C.B. Bauer, G.A. Broker, R.D. Rogers, R. Ma, S.V. Torti, M.W. Brechbiel, R.P. Planalp, *Dalton Trans.* **9** (2004) 1304.

¹²¹ a) B. Coyle, P. Kinsella, M. McCann, M. Devereux, R. O'Connor, M. Clynes, K. Kavanagh, *Toxicol. in Vitro* **18** (2004) 63; b) H. Zhou, C. Zheng, G. Zou, D. Tao, J. Gong, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34** (2002) 678.

¹²² S.C. Zhang, Y.G. Zhu, C. Tu, H.Y. Wei, Z. Yang, L.P. Lin, J. Ding, J.F. Zhang, Z.J. Guo, *J. Inorg. Biochem.* **98** (2004) 2099.

¹²³ G. Park, J.T. Tomlinson, M.S. Melvin, M.W. Wright, C.S. Day, R.A. Manderville, *Org. Lett.* **5** (2003) 113.

¹²⁴ a) M. Yoshiro, M. Haneda, M. Naruse, H.H. Htay, S. Iwata, R. Tsubouchi, K. Murakami, *Toxicol. in Vitro* **16** (2002) 705; b) F. Hayakawa, T. Kimura, T. Maeda, M. Fujita, H. Sohmiya, M. Fujii, T. Ando, *Biochim. Biophys. Acta* **1336** (1997) 123.

¹²⁵ H.N. Yu, J.J. Yin, S.R. Shen, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 462.

oxigênio, que seriam as responsáveis pelo aumento de atividade ¹²⁶. Estes e outros resultados semelhantes, ou seja, atividade biológica aumentada após a complexação do composto com o íon Cu(II), levaram a estudos cada vez mais intensos neste campo. Em células leucêmicas humanas, a inibição do proteasoma ocorre após 15 minutos de tratamento com o complexo de Cu(II)-bis-8-hidroxiquinolina, seguido de apoptose; fenômenos estes que não ocorrem em células humanas normais após o mesmo tratamento ¹²⁷. Além disso, a indução da apoptose ocorre com o ligante hidroxiquinolina sozinho apenas se as células forem pré-tratadas com cloreto de cobre(II). Nos casos em que os tratamentos são feitos com o cloreto de cobre(II) sozinho, com o ligante sozinho, ou com o ligante mais o pré-tratamento com cloreto de níquel(II), não se observam inibição do proteasoma, nem apoptose. Apesar do mecanismo de ação do cobre nas células tumorais ainda ser obscuro, alguns pesquisadores crêem que a apoptose causada por este fenômeno não seja devida a danos oxidativos mediados por cobre em proteínas. Concluem que certos tipos de ligantes orgânicos agem se coordenando ao cobre presente naturalmente em células tumorais, formando um potente inibidor do proteasoma e indutor de apoptose, nas concentrações de cobre encontradas nestes tecidos ¹²⁷.

Diversos complexos de Cu(II) tiveram deste modo suas atividades biológicas avaliadas, especialmente concernente a danos ao DNA e à apoptose ¹²⁸. Particularmente, alguns destes complexos podem gerar eficientemente espécies reativas de oxigênio (ROS), durante a catálise de substratos endógenos, que subseqüentemente atacam biomoléculas, disparando o estresse oxidativo ¹²⁹. Este estresse oxidativo conduzido por espécies parcialmente reduzidas de oxigênio pode ser amplificado pela reatividade do cobre ¹³⁰, levando à injúria de moléculas essenciais como proteínas, lipídeos e DNA, sendo um importante estímulo para a apoptose ⁹⁹. A partir destes estudos, é claro que alguns complexos de cobre podem interferir no ciclo celular em

¹²⁶ M. Jezowska-Bojczuk, W. Szczepanik, W. Lesniak, J. Ciesiolka, J. Wrzesinski, W. Bal, *Eur. J. Biochem.* **269** (2002) 5547.

¹²⁷ K.G. Daniel, P. Gupta, R.H. Harbach, W.C. Guida, Q.P. Dou, *Biochem. Pharmacol.* **67** (2004) 1139.

¹²⁸ a) S. Rubino, S. Petruso, R. Pierattelli, G. Bruno, G.C. Stocco, L. Steardo, M. Motta, M. Passerotto, E. Del Giudice, G. Guli, *J. Inorg. Biochem.* **98** (2004) 2071; b) T.B.S.A. Ravoof, K.A. Crouse, M.I.M. Tahir, A.R. Cowley, M.A. Ali, *Polyhedron* **23** (2004) 2491; c) N. Hoti, D. Zhu, Z.Y. Song, Z.S. Wu, S. Tabassum, M. Wu, *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **311** (2004) 22; d) R. Seth, S. Yang, S. Cho, M. Sabeen, E.A. Roberts, *Toxicol. In Vitro* **18** (2004) 501; e) S. Majumder, G.S. Panda, S.K. Choudhuri, *Eur. J. Med. Chem.* **38** (2003) 893; f) F. Liang, C. Wu, H. Lin, T. Li, D. Gao, Z. Li, J. Wei, C. Zheng, M. Sun, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13** (2003) 2469; g) I. Dovinová, H. Paulíková, P. Rauko, L. Hunáková, E. Hanusovská, E. Tibenská, *Toxicol. in Vitro* **16** (2002) 491; h) S.H. Chen, S.H. Liu, Y.C. Liang, J.K. Lin, S.Y. Lin-Shiau, *Eur. J. Pharmacol.* **414** (2001) 177; i) A. Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Muller, L. Ruiz-Ramirez, G.E.N. Kass, L.R. Kelland, R.M. Orr, M. Dobrota, *Toxicol. in Vitro* **14** (2000) 1; j) G. Nocentini, A. Barzi, *Biochem. Pharmacol.* **52** (1996) 65; k) J.T. Wolfe, D. Ross, G.M. Cohen, *FEBS Lett.* **352** (1994) 58.

¹²⁹ a) Y. Ma, T. Ogino, T. Kawabata, J. Li, K. Eguchi, S. Okada, *Free Rad. Biol. Med.* **27** (1999) 227; b) Y. Ma, L. Cao, T. Kawabata, T. Yoshino, B.B. Yang, S. Okada, *idem* **25** (1998) 568; c) T. Sawada, S. Hashimoto, H. Furukawa, S. Tohma, T. Inoue, K. Ito, *Immunopharmacol.* **35** (1997) 195.

¹³⁰ a) J.E. Klauning, L.M. Kamendulis, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44** (2004) 239; b) K.J.A. Davies, *IUBMB Life* **50** (2000) 279; c) G. Rotilio, L. Rossi, A. DeMartino, A.M.D.C. Ferreira, M.R. Ciriolo, *J. Braz. Chem. Soc.* **6** (1995) 221.

diferentes níveis, causando a apoptose (o que é muito interessante quando se trata de células tumorais), mas o mecanismo de seu modo de ação ainda permanece sem elucidação.

Todos estes fatores estimularam o estudo intenso do efeito biológico de alguns complexos de cobre(II) como causadores da apoptose celular realizado neste trabalho, vislumbrando-se uma possível e futura aplicação na terapia anti-tumoral, e conhecendo-se seu mecanismo de ação, o desenvolvimento de novos métodos e compostos mais eficazes neste sentido.

1.1.5. Complexos de cobre do tipo Base de Schiff

As bases de Schiff constituem uma classe de compostos orgânicos que possuem o grupo imina ($RR'C=N-R''$), formado pela condensação do grupo amina primária de uma molécula com grupo aldeído ou cetona de outra, e receberam este nome devido à Hugo Schiff, que primeiro sintetizou alguns derivados ¹³¹. A reação da síntese da imina é reversível, envolvendo um intermediário carbinolamina, e a eliminação de moléculas de água, como esquematizado na Figura 6 ¹³².

Figura 6. Exemplo da formação da Base de Schiff ou imina.

As iminas formam muito facilmente complexos de coordenação estáveis com a maioria dos metais de transição, reagindo rapidamente e sendo isoladas do meio reacional sem grandes dificuldades. A estabilidade térmica e a facilidade de formar complexos metálicos em diferentes estados de oxidação possibilitam a utilização destes compostos em diversos processos catalíticos ¹³², e também estudos bioinorgânicos ¹³³. Estes fatores nos levaram a utilizar esta classe de ligantes para a síntese dos complexos de cobre(II) que serviram de modelo ao estudo bioinorgânico do cobre.

¹³¹ Primeiras aparições das iminas na literatura química: H. Schiff, *Annalen* 150 (1869) 193 e 131 (1864) 118.

¹³² Algumas revisões sobre complexos metálicos com ligantes imínicos e aplicações: a) P.A. Vigato, S. Tamburini, *Coord. Chem. Rev.* 248 (2004) 1717; b) P.G. Cozzi, *Chem. Soc. Ver.* 33 (2004) 410; c) T. Katsuki, *idem* 33 (2004) 437; d) S. Brooker, *Coord. Chem. Rev.* 222 (2001) 33; e) R. Ziessel, *idem* 216-217 (2001) 195; f) D.A. Atwood, *ibidem* 165 (1997) 267.

¹³³ a) M.L.P. Santos, I.A. Bagatin, E.M. Pereira, A.M.D.C. Ferreira, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 6 (2001) 838; b) A.M.D.C. Ferreira, M.A.A. Azzellini, M.L.P. Santos, *J. Inorg. Biochem.* 86 (2001) 218.

Buscou-se a preparação de ligantes do tipo Base de Schiff funcionalizados, para posterior complexação com o cobre(II), feitos a partir do composto indólico isatina [N-(3-indolin-2-ona) ou (1H-indol-2,3-diona)] ¹³⁴, que possui um equilíbrio ceto-enólico intrínscico, como mostrado na Figura 7.

Figura 7. Tautômeros de equilíbrio da isatina.

A isatina foi obtida pela primeira vez através da oxidação do índigo pelos ácidos nítrico e crômico ¹³⁵, e posteriormente, Kekulé detectou a formação do ácido isatínico após tratamento da isatina com base seguido de acidificação, chegando-se a conclusão que a sua estrutura era a de uma lactama cíclica ¹³⁶ (ver Figura 7). Em 1882 foram propostas estruturas tautoméricas para a isatina: a lactama e a lactima, apresentando duas carbonilas quimicamente diferentes: a carbonila da lactama (α) e a carbonila cetônica (β) ¹³⁷. Esta descrição foi o primeiro exemplo para o estudo de substâncias tautoméricas conhecido.

Compostos naturais contendo o anel isatina são encontrados em algumas plantas ¹³⁸, além de ser um dos produtos do metabolismo da adrenalina em seres humanos ¹³⁹. É um versátil material de partida para síntese orgânica, na construção de compostos heterocíclicos e precursores fármacos. Além disso, a isatina possui muitas ações farmacológicas, dentre as quais destacam-se suas atividades anticonvulsantes, antiviral e antimicrobiana, e inibição da monoamina oxidase ¹⁴⁰, e também provoca efeitos comportamentais ¹⁴¹. Alguns compostos

¹³⁴ Review sobre o assunto: J.F.M Silva, S.J. Garden, A.C. Pinto, *J. Braz. Chem. Soc.* 12 (2001) 273.

¹³⁵ Ver citação em: W.C. Sumpter, *Chem. Rev.* 34 (1944) 303.

¹³⁶ Primeira vez citada transformações na isatina: A. Kekulé, *Ber.* 2 (1869) 93.

¹³⁷ Primeira vez observada as formas tautoméricas na isatina: A. Baeyer, *Ber.* 16 (1883) 2188 e 15 (1882) 2093.

¹³⁸ a) J. Bergman, J. Lindstrom, U. Tilstam, *Tetrahedr.* 41 (1985) 2879; b) G.J. Kapadia, Y.N. Shukla, S.P. Basak, *Tetrahedr.* 36 (1980) 2441.

¹³⁹ M. Ischia, A. Palumbo, G. Prota, *Tetrahedr.* 44 (1988) 6441.

¹⁴⁰ a) M. Verma, S.N. Pandeya, K.N. Singh, J.P. Stables, *Acta Pharm.* 54 (2004) 49; b) S.K. Sridhar, S.N. Pandeya, J.P. Stables, A. Ramesh, *Eur. J. Pharmacol. Sci.* 16 (2002) 129; c) A.E. Medvedev, A. Cow, M. Sandler, V. Glover, *Biochem. Pharmacol.* 52 (1996), 385; d) V. Glover, A. Medvedev, M. Sadler, *Life Sci.* 57 (1995) 2073.

¹⁴¹ a) Y. Tozawa, A. Ueki, S. Manabe, and K. Matsushima, *Biochem. Pharmacol.* 56 (1998) 1041; b) J.E. Morley, S.A. Farr, and J.F. Flood, *Eur. J. Pharmacol.* 305 (1996) 23.

sintéticos de isatina foram desenvolvidos como potentes inibidores de proliferação celular ¹⁴², e alguns derivados foram propostos como agentes anticâncer, ou antimicrobianos ¹⁴³. Além disso, os estudos da isatina e outros oxi-indóis endógenos como compostos com ações antiproliferativa e pró-apoptótica têm sido reportados ¹⁴⁴.

Alguns complexos de cobre(II) e outros metais de transição com isatina, ou seus derivados, foram descritos na literatura ¹⁴⁵. Compostos com ligantes do tipo quinolina-hidrazonas derivados da isatina foram sintetizados, e suas propriedades espectroscópicas e magnéticas foram investigadas ¹⁴⁶. Mais recentemente, complexos de cobre(II) com isatina-tiosemicarbazona (relacionados com a droga antiviral metilsazona) foram preparados por métodos de condensação usuais ou eletroquimicamente, sendo caracterizados por diferentes técnicas espectroscópicas ¹⁴⁷. Este tipo de complexo foi identificado como causador de inibição significativa na proliferação de células humanas leucêmicas ¹⁴⁸, apresentando o íon de cobre(II) em uma esfera de coordenação pirâmide de base quadrada, determinada por análises cristalográficas ¹⁴⁹. Quelatos de Ni(II), e outros complexos hetero binucleares com centros metálicos Cu(II), UO₂(II) ou La(III), com ligantes do tipo isatina-base de Schiff foram obtidos, incluindo o complexo precursor [N,N'-bis(indol-2-oxo-3-ilideno)-1,3-diimino-propano]cobre(II). Entretanto suas caracterizações estruturais descritas na literatura são bastante precárias e suas propriedades não foram devidamente investigadas ¹⁵⁰. A isatina exibe um interessante equilíbrio ceto-enólico que pode influenciar seus modos de coordenação, dando origem a complexos catiônicos ou neutros, com

¹⁴² 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.

¹⁴³ a) N. Karali, *Eur. J. Med. Chem.* **37** (2002) 909; b) S.N. Paneya, D. Sriram, G. Nath, E. DeClercq, *Eur. J. Pharm. Sci.* **9** (1999) 25; c) M. Mohammadi, G. McMahon, L. Sun, C. Tang, P. Hirth, B.K. Yeh, S.R. Hubbard, J. Schlessinger, *Science* **276** (1997) 955.

¹⁴⁴ A. Cane, M. C. Tournaire, D. Barritault, M. Crumeyrolle-Arias, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276** (2000) 379.

¹⁴⁵ a) G.A. Bain, D.X. West, J. Krejci, J. Valdés-Martínez, S. Hernández-Ortega, R.A. Toscano, *Polyhedron* **16** (1997) 855; b) C.V.R. Reddy, M.G.R. Reddy, *J. Chem. Eng. Data* **39** (1994) 723; c) V.I. Tsapkov, N.Al-Nabgali, V.V. Stan, N.M. Samus, *Russ. J. Gen. Chem.* **64** (1994) 1604; d) N.T. Akinchan, R. Akinchan, D.X. West, Y.H. Yang, *Transition Met. Chem.* **19** (1994) 135.

¹⁴⁶ a) R.C. Khulbe, R.P. Singh, Y.K. Bhoon, *Transition Met. Chem.* **8** (1983) 59; b) R.C. Khulbe, Y.K. Bhoon, R.P. Singh, *J. Indian Chem. Soc.* **58** (1981) 840.

¹⁴⁷ a) I. Kizilcikili, B. Akkurt, B. Ulkuseven, *Rev. Inorg. Chem.* **24** (2004) 31; b) E. Labisbal, A. Sousa, A. Castineiras, J.A. García-Vazquez, J. Romero, D.X. West, *Polyhedron* **19** (2000) 1255; c) D.X. West, A.K. El-Sawaf, G.A. Bain, *Transition Met. Chem.* **23** (1998) 1; d) S.P. Patel, A. Ray, R.P. Patel, *Synth. React. Inorg. Met. -Org. Chem.* **17** (1987) 419; e) W. Rohde, R. Shafer, J. Idriss, W. Levinson, *Talanta* **26** (1979) 373.

¹⁴⁸ M.C. Rodríguez-Argüelles, A. Sanchez, M.B. Ferrari, G.G. Fava, C. Pelizzi, G. Pelosi, R. Albertini, P. Lunghi, S. Pinelli, *J. Inorg. Biochem.* **73** (1999) 7.

¹⁴⁹ M.B. Ferrari, C. Pelizzi, G. Pelosi, M.C. Rodríguez-Argüelles, *Polyhedron* **21** (2002) 2593.

¹⁵⁰ a) A.M.A. Hassaan, *Transition Met. Chem.* **15** (1990) 283; b) A.M.A. Hassaan, A.K.A. Al-Nasr, M.A. Khalifa, *Russ. Coord. Chem.* **23** (1997) 356; c) A.M.A. Hassaan, A.K.A. Al-Nasr, M.A. Khalifa, *J. Indian Chem. Soc.* **74** (1997) 496.

variadas formas estruturais e diferentes reatividades ¹⁵¹. Por esta razão tornaram-se atrativos como compostos modelos desenvolvidos neste trabalho de Tese.

1.2. Objetivos

Este trabalho de Tese tem como objetivo estudar o papel do cobre na oxidação de carboidratos, um processo que ocorre *in vivo* e é responsável por uma série de danos oxidativos, e as implicações gerais de complexos de cobre em processos biológicos, através de estudos de viabilidade celular. Para ambos estes estudos serão sintetizados complexos imínicos e diimínicos de Cu(II) derivados da isatina, e amplamente caracterizados por análise elementar, medidas de condutividade molar, técnicas espectroscópicas IV, UV/Vis, EPR, e ESI-MS. Estes complexos serão utilizados no estudo cinético e mecanístico da oxidação de carboidratos simples, como a glicose, a frutose e a galactose, com a detecção de intermediários reativos pela técnica de captação de spin, e de produtos finais por EC, com o objetivo de se verificar a lei de velocidade experimental e teórica da reação. Estes complexos servirão também ao estudo biológico *in vitro*, com diferentes culturas celulares, com o objetivo de se avaliar seus efeitos citotóxicos e como eles atuam no ciclo celular, agindo como possíveis agentes apoptóticos numa terapia anti-tumoral.

Para o estudo da interação metal-carboidrato, importante para se entender a complexação do cobre *in vivo* com este ligante biológico, complexos de Cu(II) com açúcares simples serão preparados, caracterizados por análise elementar, medidas de condutividade molar, técnicas espectroscópicas IV, UV/Vis, EPR, e especialmente Raman para se verificar o sítio de ligação do metal no carboidrato. Serão preparados e caracterizados ainda alguns complexos imínicos quirais de Cu(II) com ligantes do tipo aminocarboidrato, para serem utilizados no estudo biológico como comparação com a classe de imínicos derivados da isatina.

¹⁵¹ A.M.A. Hassaan, *Synth. React. Inorg. Met. -Org. Chem.* 27 (1997) 835.

2. Parte Experimental – Parte I

Síntese, Caracterização e Estudos de Equilíbrio

I - 2.1. Métodos, Materiais e Instrumentação

As análises elementares CNH foram feitas na *Central Analítica* do Instituto de Química da USP (São Paulo – SP), usando um Analisador Elementar CNH Perkin-Elmer 2400, que permite a determinação de porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio com precisão de 0,01%. As análises de Cobre e Sódio foram realizadas no Espectrômetro de Plasma SPECTRO ICP-AES (Induced Coupled Plasma), da SpectroFlame. As amostras foram abertas por adição de ácido nítrico concentrado (PA), seguida de adição de H₂O₂ 30% (5 mL de cada), e aquecidas por 1 h (80-90 °C). A solução de cobre usada como padrão, nas análises de ICP-AES, foi obtida da TecLab (São José dos Campos, SP), certificadas pelo SRM 3114-NIST (USA).

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro BOMEM 3.0 com transformada de Fourier, na faixa de 400-4000 cm⁻¹, usando pastilhas de KBr (*Central Analítica, IQ-USP*) ou por Reflectância difusa (KBr), no espectrofotômetro ABB BOMEM MB series com transformada de Fourier. Os espectros de EPR foram feitos no espectrômetro Bruker (*IQ-USP*), 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. Em geral, ajustou-se a amplitude de modulação em 15 G para as amostras de cobre. As soluções contendo as amostras apresentavam concentrações de ~1-3 mM. DPPH (α, α' -difeníl- β -picrilhidrazil) foi usado como calibrador de frequência ($g = 2,0036$) para as amostras. Os espectros eletrônicos na região de Ultravioleta/Visível (UV/Vis) foram feitos no espectrofotômetro Olis – Aminco (modernizado) DW-2000, no espectrofotômetro Beckman DU-70 (*IQ-USP*) ou no UV-1650PC da Shimadzu, todos com compartimento de célula termostatizado. Foram empregadas celas usuais retangulares de quartzo, de caminho ótico igual a 1,000 cm. A absorvidade molar (ϵ) característica dos compostos foi obtida a partir dos coeficientes angulares dos gráficos de absorção *versus* concentração da espécie (em comprimentos de onda onde esta absorvia), e foram empregadas soluções estoque de concentração 1 mM, fazendo-se as devidas diluições, de modo a obter pontos onde a absorção variasse de 0,1 a ~ 1, para o máximo das bandas existentes.

Em alguns casos foi utilizado o espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H), equipamento Bruker, de 300 MHz (Central Analítica-IQ-USP).

Durante os experimentos onde os valores de pH foram ajustados, foram usadas quantidades apropriadas de soluções de HCl 0,1M ou NaOH 0,1M, com força iônica controlada com solução de KNO₃ 0,1M ou 0,05M, e o valor do pH foi monitorado pelo pHmetro Digimed DMPH-2, acoplado com eletrodo de vidro combinado, da Ingold ou Radiometer. 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 ± 0,05), (4,0 ± 0,05) e (10,0 ± 0,05). A temperatura da calibração e das medidas (no UV/Vis) foram (25 ± 1) °C. O valor do pH medido durante as reações foi monitorado usando-se fitas indicadoras da Merck.

As medidas de voltametria cíclica foram realizadas por meio de um potenciostato/galvanostato modelo 283 da EG&G Instruments – Princeton Applied Research (PAR). A célula eletroquímica utilizada é constituída de um recipiente de vidro em cuja tampa são fixados um capilar para a entrada de argônio, utilizou-se como eletrodo de referência Ag/AgCl em KCl 1,0 mol.dm⁻³ ($E^\circ = +0,222$ V vs EPH), o eletrodo de trabalho platina, e eletrodo auxiliar (fio espirado de platina). O polimento da superfície dos eletrodos de trabalho foi realizado com pasta de alumina (carbono vítreo) ou lixa fina de carbeto de silício (platina), ambos procedentes da Struers. Como eletrólito-suporte foi utilizado KNO₃ 0,10 M. Os voltamogramas cíclicos de soluções em DMF (dimetilformamida) foram obtidos a partir de amostras em concentrações de 1,00x10⁻² M do composto **1**. As soluções foram cuidadosamente deaeradas previamente aos experimentos, e o mesmo procedimento foi repetido antes de cada medida realizada, fazendo-se passar um fluxo de gás inerte (argônio) através das amostras. As análises termogravimétricas foram conduzidas no aparelho TGA-50 Shimadzu, com um fluxo de ar sintético de 50 mL/min.

As medidas de condutividade dos complexos preparados (soluções aquosas de 1 mM) foram realizadas no condutivímetro Digimed DM-31, usando solução padrão de KCl 10,0 mM (condutividade específica: 1412,0 μS cm⁻¹, a 25 °C). As soluções contendo as amostras apresentavam concentrações de 1 mM. As medidas de rotação ótica foram feitas em um aparelho DIP-370 Digital Polarimeter JASCO, e as medidas de dicroísmo circular foram feitas em um aparelho JASCO J-720 Spectropolarimeter, na faixa de 190 a 800 nm, com uma cela de quartzo circular, de 1,00 cm de caminho ótico, utilizando água deionizada como branco de referência.

Os espectros de Massa ESI – MS foram obtidos no IQ-UNICAMP (com o analisador de massas q-TOF) ou no Depto de Bioquímica do IQ USP (com o analisador de massas quadrupolar). Os espectros foram obtidos por Eletrospray de modo positivo, no aparelho Q-Tof da Micromass (Hybrid High Resolution Quadrupole Orthogonal Time of Flight Mass Spectrometer) ou no aparelho com detector quadrupolar da Micromass. O valor de energia do cone foi de 20, 40 e 70 V, e o capilar a 3000 V.

Os espectros de Raman foram registrados em um espectrômetro Renishaw Ramascope, modelo System 3000, com um microscópio Olympus BTH-2, usando lentes objetivas com aumento de 80 vezes (laser spot 10 μm) e Detector CCD (Charge Coupled Device), com resolução espectral de 2 cm⁻¹. A radiação excitante foi na linha de 632,8 nm do espectro do laser de He-Ne (Spectra Physic, modelo 127). A potencia do laser foi de 20 mW incidindo no sólido cristalino. Em alguns casos foram usados filtros, de 0 a 2, para diminuir a potencia do laser. No

filtro 0, o laser incidia 100% na amostra; no filtro 0,3, incidia 50%; no 0,6, incidia 25%; no 1, incidia 10% e no 2 incidia 1%.

Isatina (98 %, grau de pureza), D(+)-glucosamina (2-amino-2-deoxi-D-glicose sal hidrocloreto, $C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl$, 98%), 2-amino-1-etilpiridina (95%), 8-aminoquinolina (98%), hidrocloreto de histamina (98%), perclorato de cobre(II) hexahidratado (98%), salicilaldeído (98%), e demais reagentes foram obtidos da Aldrich Chemical Co.. As aminas etilenodiamina (99%), 1,3-diaminopropano (99%), e os solventes CH_2Cl_2 (99,5%), acetato de etila (99,5%), etanol absoluto (99,8%) e etanol (96%), e os ácidos nítrico e clorídrico foram obtidos da Merck Chemical Co. Éter etílico (98%) foi obtido da Synth. Os carboidratos usados como ligantes em alguns casos, D(+)-Glucose (99%) e D(-)-Frutose (99%), foram obtidos da Merck, e a D(+)-Galactose (99%), foi obtida da Sigma Chemical Co.

O controle do andamento das reações foi feito por Cromatografia em Camada Delgada (CCD ou TLC). Placas de cromatografia com vidro recoberto com sílica gel e indicador fluoresceína a 254 nm (diâmetro do poro: 60 Å, tamanho da partícula: 2-25 μm , camada 250 μm) foram obtidas da Sigma Chemical Co. Placas de alumínio recobertas com óxido de alumínio (alúmina) neutro 60 F₂₅₄ foram obtidas da Merck.

A água para preparo de todas as soluções foi deionizada, em aparelho Barnstead, modelo D 4700. O sistema deionizador é formado por um conjunto em circuito de 4 filtros cilíndricos, contendo resina para captura de íons e carvão ativado para captura de material orgânico.

I - 2.2. Sínteses

Os complexos de cobre(II) do tipo imina foram sintetizados por reação de condensação das aminas etilenodiamina (*en*), propilenodiamina, 1,3-diaminopropano (*pn*), 2-2-aminoetilpiridina (*epy*), hidrocloreto de histamina (*hist*) e 8-aminoquinolina (*amiquin*) com o indol isatina (*isa*), seguido de coordenação a íons de cobre(II), adicionados na forma de sal perclorato, de acordo com procedimentos gerais na literatura, com modificações adequadas¹⁵². Houve ainda um cuidado especial na utilização dos sais de perclorato, devido ao risco de explosões destes, quando em contato com substâncias orgânicas. Os compostos foram preparados em quantidades de laboratório (2-4 mmol, correspondentes a alguns miligramas), e todos os procedimentos de segurança foram rigorosamente seguidos. Os resíduos gerados foram entregues à central de solventes do IQ-USP para tratamento e reutilização.

Os demais complexos sintetizados seguiram o mesmo procedimento e, em alguns casos, vários testes sintéticos foram feitos a fim de se levar ao complexo desejado.

¹⁵² P. Gerriero, S. Tamburini, P. A. Vigato, *Coord. Chem. Rev.* 139 (1995) 17.

I - 2.2.1. [Cu(*isa-pn*)](ClO₄)₂; Composto 1

Dissolveu-se a isatina (3,3 mmol) em etanol (40 mL), e a solução teve o pH aparente ajustado para 5,5, com HCl concentrado (1-2 gotas). Adicionou-se lentamente 1,3-diaminopropano (propilenodiamina, 1,7 mmol) recém-destilado a esta solução de isatina, mantendo sob constante agitação por 6 h. A reação foi monitorada por CCD (usando a mistura EtOAc/ CH₂Cl₂ 20% como eluente). Após este período, um sólido amarelo foi formado, rapidamente filtrado e lavado com etanol gelado, e éter etílico. Secou-se o ligante (*isapn* = N,N'[bis-(3,3'-indolin-2-ona)]-1,3-diiminopropano) em um dessecador sob pressão reduzida, por 1 hora aproximadamente, protegendo-o da luz. Rendimento: 89% (487mg, 1,47 mmol,). Logo em sequência, dissolveu-se o ligante em etanol (20 mL), ajustando o pH para 7,5–8,0 com solução de acetato de sódio saturada. Adicionou-se lentamente perclorato de cobre(II) hexahidratado (1,47 mmol) dissolvido em água (2-3 mL), sob constante agitação. Formou-se imediatamente um fino sólido marrom, mantendo-se a solução sob agitação por mais 4 h. Resfriou-se a solução, e filtrou-se o precipitado, lavando-o com etanol e éter etílico gelados. Secou-se o composto final de cobre(II) em dessecador a baixa pressão, e recristalizando em solução de etanol/ éter etílico. Rendimento: 85% (743 mg, 1,25 mmol).

Dados de 1 {perclorato de [N,N'[bis-(3,3'-indolin-2-ona)]-1,3-diiminopropano]cobre(II)}: Experimental: Cu, 10,47; C, 38,53; H, 2,90; N, 9,50%. Calculados para C₁₉H₁₆N₄O₂Cu(ClO₄)₂: Cu, 10,68; C, 38,37; H, 2,75; N, 9,42%. $\Lambda_M = 81,5 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ em água, e $57,6 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ em metanol (ambos a 298 K). IV (cm⁻¹, KBr): 3447 (banda média, ν_{OH} água presente); 3447 e 3334 (banda larga, ν_{NH}); 3102- 2774 (fraca, $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^2}\text{H}}$ e $\nu_{\text{C}=\text{C}}$); 1734 (forte, ν_{CO} lactama 5 membros); 1616 (forte, $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ anel isatina); 1591 (forte, $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ base de Schiff); 1591 (forte, $\delta_{\text{N-H}}$); 1459 (média, $\nu_{\text{C-O}}$); 1102 e 625 (forte, ν_{ClO_4} não coordenado). UV/Vis: em solução aquosa (pH 5,5): 242 nm ($\epsilon = 5,12 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LT $n \rightarrow \pi$ ou $n \rightarrow \pi^*$), 303 nm ($\epsilon = 2,71 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LMCT $\pi \rightarrow d\pi$), 434 nm ($\epsilon = 1,55 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LMCT $\pi \rightarrow d\pi$); em acetonitrila: 688 nm ($\epsilon = 151,1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $d \rightarrow d$). MS (ES⁺): m/z : 395,02 (MM: 395,07, C₁₉H₁₆N₄O₂Cu), 397,03 [padrão isotópico do cobre (Cu^{63/65}) 395,07, monocarregado, C₁₉H₁₆N₄O₂Cu], em CH₃CN : H₂O, 1 : 1; 395,0011 e 397,0151, em MeOH:H₂O, 1:1. TOF MSMS 395,03 ES⁺: 367,89 (MM: 367,07, fragmento C₁₈H₁₆N₄OCu), 236,96 (MM: 235,73, fragmento C₁₀H₈N₂OCu), 223,72 (MM: 223,00, fragmento C₉H₈N₂OCu). EPR [9,32

GHz, Ganho: $2,00 \times 10^4$, Amplitude: 15 G, tempo: 20,48 ms, 77 K, MeOH/H₂O (4:1, V:V), 1 scan]: $g_{\perp} = 2,091$, $g_{\parallel} = 2,421$, $A_{\perp} = 14,2$ G, $A_{\parallel} = 132,8 \times 10^{-4}$ cm⁻¹, e a relação $g_{\parallel} / A_{\parallel} = 182,7$ cm.

I- 2.2.2. [Cu(*isa-pn*)(Cl)]Cl ; Composto 1a

Utilizando a mesma metodologia descrita cima, sintetizou-se o complexo **1** com o contra-íon cloreto, ao invés de perclorato.

Dados de 1a: Experimental: C, 40,87; H, 3,37; N, 10,46%. Calculados para C₁₁H₁₃N₃OCu(Cl)₂: C, 39,30; H, 3,89; N, 12,49%. A isatina condensou-se apenas com uma unidade de propilenodiamina.

I- 2.2.3. [Cu(*isa-en*)(H₂O)]ClO₄.2H₂O; Composto 2

Dissolveu-se a isatina (5 mmol) em etanol (50 mL) e ajustou-se o pH aparente da solução em torno de 5,5 com HCl concentrado (1-2 gotas). Adicionou-se lentamente etilenodiamina (5 mmol) recém destilada à solução de isatina, mantida sob constante agitação por 4 h. A reação foi monitorada por CCD (usando a mistura EtOAc/ CH₂Cl₂ 20% como eluente). Após este período, formou-se um sólido amarelo, que foi rapidamente filtrado e lavado com etanol e éter etílico gelados. Colocou-se o ligante isolado (*isaen* = N-(3-indolin-2-ona)-1-imino-2-etilenoamina), em dessecador sob pressão reduzida, protegendo-o da ação da luz. Rendimento: 78% (738 mg, 3,9 mmol). Em seguida, dissolveu-se o ligante em etanol (20 mL) e ajustou-se o pH a 7,5 – 8,0 com solução de acetato de sódio saturada (algumas gotas). Adicionou-se vagarosamente, em seguida, perclorato de cobre(II) hexahidratado (3,9 mmol) dissolvido em água (5 mL), sob constante agitação. Imediatamente um fino precipitado marrom começou a se formar, e manteve-se a agitação por mais 2 h. Resfriou-se a solução e o precipitado foi filtrado, e lavado com etanol e éter etílico gelados. Secou-se o composto final de cobre(II) em dessecador sob pressão reduzida, recristalizando-o em etanol/éter etílico. Rendimento: 90% (1,29 g, 3,5 mmol).

Dados de 2 {perclorato de [aqua-N-(3-indolin-2-ona)-1-imino-2-etilenoamina]cobre(II)}: Experimental: C, 30,40; H, 3,95; N, 10,89 %. Calculados para C₁₀H₁₀N₃OCu.(OH₂).(ClO₄)x2H₂O: C, 29,64; H, 3,97; N, 10,47 %. $\Lambda_M = 107,8$ S cm² mol⁻¹ em água, e 55,4 S cm² mol⁻¹ em metanol (ambos 298 K). IV (cm⁻¹, KBr): 3433 (média, νOH água presente); 3318 e 3272 (larga, νNH);

2954- 2894 (fraca, $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^2}\text{H}}$ e $\delta_{\text{C}_{\text{sp}^2}\text{C}}$); 1709 (forte, ν_{CO} lactama 5 membros); 1590 (forte, $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ base de Schiff); 1618 (forte, $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ anel isatina); 1574 (forte, $\delta_{\text{N-H}}$); 1449 (média, $\nu_{\text{C-O}}$); 1088 e 629 (fortes, ν_{ClO_4} não coordenado). UV/Vis: em solução aquosa (pH 6.5): 208 nm ($\epsilon = 9,11 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LT $n \rightarrow \pi$ ou $n \rightarrow \pi^*$), 242 nm ($\epsilon = 8,86 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LT $n \rightarrow \pi$ ou $n \rightarrow \pi^*$), 298 nm ($\epsilon = 2,21 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LT e/ou LMCT $\pi \rightarrow d\pi$), 456 nm ($\epsilon = 536,8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LMCT $\pi \rightarrow d\pi$), 675 nm ($\epsilon = 187,9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $d \rightarrow d$). MS (ES⁺): m/z : 293,03 (MM: 293,81, em CH_3CN : $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OCu}$), 295,03 [padrão isotópico do cobre ($\text{Cu}^{63/65}$) monocarregado], 269,03 (MM: 269,77, em CH_3OH : $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{OCu}$), 252,01 (MM: 252,03, em CH_3CN : fragmento $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{OCu}$), 236,96 (MM: 235,73, em CH_3CN : fragmento $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{OCu}$), 224,01 (MM: 224,75, em CH_3CN : fragmento $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{Cu}$). EPR [9,32 GHz, Ganho: $3,56 \times 10^4$, Amplitude: 15 G, tempo: 20,48 ms, 77 K, $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1, V:V), 1 scan, (pH 6.5)]: $g_{\perp} = 2,059$, $g_{\parallel} = 2,281$, $A_{\perp} = 28,45 \text{ G}$, $A_{\parallel} = 224,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, e a relação $g_{\parallel} / A_{\parallel} = 101,8 \text{ cm}$.

I- 2.2.4. **[Cu(*isa-epy*)₂](ClO₄)₂·2H₂O; Composto 3**

Dissolveu-se a isatina (5 mmol) em etanol (50 mL) e ajustou-se o valor o pH aparente em 5,5 com HCl concentrado (1-2 gotas). Adicionou-se lentamente 2-aminoetilpiridina (5 mmol) a solução de isatina, mantendo sob constante agitação por 24 h. Após isso, houve a formação de um sólido amarelo claro, rapidamente filtrado e lavado com etanol e éter etílico gelado. Secou-se este ligante (*isaepy* = N-(3-indolin-2-ona)- 2-iminoetil piridina) em dessecador sob pressão reduzida por aproximadamente 1 h, protegendo-o da luz. Rendimento: 74% (930 mg, 3,7 mmol). Dissolveu-se o ligante formado em etanol (20 mL) e ajustou-se o pH para 7,5–8,0 com solução de acetato de sódio saturada (gotas). Adicionou-se lentamente perclorato de cobre(II) hexahidratado (3,7 mmol) dissolvido em água (5 mL), mantendo a agitação constante por 12 h. Após este período, formou-se um fino precipitado marrom, que foi filtrado e lavado com etanol e éter etílico gelado. Secou-se o composto de cobre(II) em dessecador sob pressão reduzida, por aproximadamente 6 h. Rendimento: 86% (2,44 g, 3,2 mmol).

Dados de 3 {perclorato de bis-[N-(3-indolin-2-ona)-2-iminoetil piridina]cobre(II)}: Experimental: C, 45,69; H, 3,52; N, 10,08%. Calculados para $(C_{15}H_{13}N_3O)_2Cu(ClO_4)_2 \cdot 2H_2O$: C, 44,98; H, 3,76; N, 10,45%. $\Lambda_M = 110,0 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ em solução aquosa e $56,0 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ em metanol (298 K). IV (cm^{-1} , KBr): 3438 (banda média, νOH água presente); 3354 (fraca, νNH); 3081-2995 (fraca, $\nu\text{C}_{\text{sp}^2}\text{H}$ e $\delta\text{C}_{\text{sp}^2}\text{C}$); 1725 (forte, νCO lactama 5 membros); 1614 (forte, $\nu\text{C}=\text{N}$ anel benzênico); 1597 (forte, $\nu\text{C}=\text{N}$ da base de Schiff e $\delta\text{N-H}$ sobrepostas); 1444 (média, $\nu\text{C-O}$); 1094 e 624 (fortes, νClO_4 não coordenado). UV/Vis: em solução aquosa (pH 6,0): 206 nm ($\epsilon = 1,28 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LT $n \rightarrow \pi$ ou $n \rightarrow \pi^*$), 247 nm ($\epsilon = 5,57 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LT $n \rightarrow \pi$ ou $n \rightarrow \pi^*$), 406 nm ($\epsilon = 1,15 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LMCT $\pi \rightarrow d\pi$). MS (ES+): m/z : 565,12 (MM: 565,15, em CH_3CN : $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_2\text{Cu}$), 563,12 [padrão isotópico do cobre ($\text{Cu}^{63/65}$) monocarregado], 563,12 (MM: 563,12, em CH_3CN : $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2\text{Cu}$), 312,02 (MM: 312,81, em CH_3CN : $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{OCu}$). EPR [9,32 GHz, Ganho: $2,00 \times 10^4$, Amplitude: 15 G, 20,48 ms, 77 K, solução MeOH/água (4:1, V:V), 1 scan]: $g_{\perp} = 2,082$, $g_{\parallel} = 2,503$, $A_{\perp} = 15,8 \text{ G}$, $A_{\parallel} = 135,4 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, e a relação $g_{\parallel} / A_{\parallel} = 188,2 \text{ cm}$.

I- 2.2.5. **[Cu(*isa-hist*)(H₂O)](ClO₄)₂; Composto 4**

A uma solução aquosa (2 mL) de hidrocloreto de histamina (3 mmol), cujo pH medido foi 3,75, adicionou-se uma solução de isatina (3 mmol) em etanol 96% (20 mL), mantendo-se sob constante agitação à temperatura ambiente, por 1 h, onde não se observaram mudanças (*isahist* = N-[(3-indolin-2-ona)]-4-iminazolil etileno). Adicionou-se $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6(\text{ClO}_4)_2$ (3 mmol) diretamente a mistura reacional, e manteve-se sob agitação vigorosa por algumas horas à t.a. Após este período, como não ocorreu mudanças reacionais (visíveis no meio e por CCD), adicionou-se base (NaOH 6M, 1-2 gotas) ao meio, elevando o valor do pH da mistura a 8-9. Imediatamente formou-se um fino precipitado marrom escuro. Esta mistura reacional foi então deixada sob agitação por 12 h à t.a.. Filtrou-se o precipitado em funil de placa porosa, lavando-o sucessivas vezes com etanol e éter etílico. Secou-se o precipitado em dessecador à pressão reduzida por aproximadamente 6 h. Rendimento: 25 % (397 mg, 0,70 mmol).

Dados de 4 {perclorato de [aqua-N-(3-indolin-2-ona)-4-iminazolil-etileno]cobre(II)}: Experimental: C, 27,02; H, 3,49; N, 10,05 %. Calculados para $C_{13}H_{12}N_4OCu(ClO_4)_2 \cdot 4H_2O$: C, 27,21; H, 3,51; N, 9,77 %. Teste de solubilidade: solúvel em DMSO, 2,2-DMP, e acetona; parcialmente solúvel em MeOH, EtOH e AcOH; insolúvel em CH_2Cl_2 , $CHCl_3$, DMF, CH_3CN e água. $\Lambda_M = 116 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ em água, e $56 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ em metanol (ambos 298 K). IV (cm^{-1} , KBr): 3417 (forte, ν_{OH} água); 2974 (fraca, $\nu_{C_{sp^2}H}$ e $\delta_{C_{sp^2}C}$); 1616 (forte, $\nu_{C=N}$ do anel da isatina e do anel imidazólico, banda muito alargada); 1587 (forte, $\nu_{C=N}$ da base de Schiff); 1555 (forte e alargada, δ_{N-H}); 1115 e 661 (fortes, ν_{ClO_4} não coordenado). UV/Vis: em DMSO: 264 nm ($\epsilon = 9,50 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LT $n \rightarrow \pi$ ou $n \rightarrow \pi^*$), 383 nm ($\epsilon = 5,66 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LT e/ou LMCT $\pi \rightarrow d\pi$), 452 nm ($\epsilon = 4,01 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LMCT $\pi \rightarrow d\pi$). MS (ES+): m/z : 344 (MM: 344, em CH_3CN : $C_{15}H_{15}N_5OCu$), 346 [padrão isotópico do cobre ($Cu^{63/65}$) monocarregado], 248 (MM: 249, em CH_3CN : $C_{11}H_{10}N_2OCu$). EPR [9,32 GHz, Ganho: $2,52 \times 10^4$, Amplitude: 15 G, 10.48 ms, 77 K, solução CH_3CN :acetona (1:1, V:V), 28 scans]: $g_{\perp} = 2,0339$, $g_{\parallel} = 2,380$, $A_{\perp} = 42,799 \text{ G}$, $A_{\parallel} = 149,0 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, e a relação $g_{\parallel} / A_{\parallel} = 159,7 \text{ cm}$.

I- 2.2.6. [Cu(*isa-amiquin*)(H_2O)](ClO_4); Composto 5

A um balão reacional foram adicionados uma solução de isatina (4 mmol) em de 30 mL de etanol, sendo o pH aparente ajustado a 5 com HCl concentrado (1-2 gotas). Adicionou-se em seguida uma solução de 8-aminoquinolina (4 mmol) em etanol (10 mL), quando o meio reacional tornou-se imediatamente vermelho, mantendo-se uma agitação constante à t.a.. A reação foi acompanhada por CCD (sílica gel; eluente: CH_2Cl_2 / EtOAc 50%). Após 20 h de reação, para a completa formação da imina (*isaamiquin* = N-[(3-indolin-2-ona)]-8-iminoquinolina), adicionou-se $Cu(H_2O)_6.(ClO_4)_2$ (4 mmol) e imediatamente formou-se um fino precipitado marrom. Manteve-se a agitação por 4 h e o balão reacional foi colocado na geladeira por 24 h. Filtrou-se o precipitado em funil de placa porosa, lavando o precipitado com etanol absoluto e éter etílico, e secou-se o precipitado marrom em dessecador à pressão reduzida por aproximadamente 6 h. Rendimento: 13 % (237 mg, 0,50 mmol).

Dados de 5 {perclorato de [aqua-N-(3-indolin-2-ona)-8-iminoquinolina]cobre(II)}: Experimental: C, 44,07; H, 3,27; N, 8,81 %. Calculados para $C_{17}H_{11}N_3OCu(OH)(ClO_4) \cdot H_2O$: C, 43,32; H, 3,00; N,

8,92 %. $\Lambda_M = 130 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ em água, e $40 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ em metanol (ambos 298 K). IV (cm^{-1} , KBr): 3409 e 3196 (forte, νOH água e νNH de amida secundária); 1706 (forte, $\nu\text{C=O}$ lactama 5 membros coordenada); 1616 (forte, $\nu\text{C=N}$ anel isatina); 1590 (média, $\nu\text{C=N}$ base de Schiff); 1511 (forte, $\nu\text{C-N}$); 1084 e 628 (fortes, νClO_4 não coordenado). UV/Vis: em CH_3CN : 205 e 252 nm ($\epsilon = 6,68 \times 10^4$ e $3,31 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LT $n \rightarrow \pi$ ou $n \rightarrow \pi^*$), 320 nm ($\epsilon = 9,12 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LT e/ou LMCT $\pi \rightarrow d\pi$), 458 nm ($\epsilon = 1,02 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LMCT $\pi \rightarrow d\pi$), 547 nm ($\epsilon = 527 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $d \rightarrow d$). MS (ES+): m/z : 754 (MM: 754, em CH_3CN : 2 unidades de $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OCu}$), 758 [padrão isotópico do cobre ($\text{Cu}^{63/65}$) monocarregado], 377 (MM: 377, em CH_3CN : $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OCu}$), 379 [padrão isotópico do cobre ($\text{Cu}^{63/65}$) monocarregado], 274 (MM: 273, em CH_3CN : $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OCu}$), 275 [padrão isotópico do cobre ($\text{Cu}^{63/65}$) monocarregado]. EPR [9,32 GHz, Ganho: $2,52 \times 10^4$, Amplitude: 15 G, 10,48 ms, 77 K, solução $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (4:1, V:V), 1 scan]: $g_{\perp} = 2,06513$, $g_{\parallel} = 2,30048$, $A_{\perp} = 24,456 \text{ G}$, $A_{\parallel} = 172,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, e a relação $g_{\parallel} / A_{\parallel} = 133,0 \text{ cm}$.

I- 2.2.7. $[\text{Cu}(\text{isa})_2](\text{ClO}_4)$; composto 6

A uma solução etanólica (20 mL) de isatina (5 mmol) (*isa* = N-[(3-indolin-2-ona)]), cujo pH aparente do meio foi ajustado a 9 com solução de NaOH concentrada (1-2 gotas), adicionou-se $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6(\text{ClO}_4)_2$ (2,5 mmol) diretamente a mistura reacional, e manteve-se sob agitação vigorosa à t.a. Formou-se um fino precipitado marrom claro e a mistura reacional foi então deixada sob agitação por 12 h à t.a.. Filtrou-se o precipitado em funil de placa porosa, lavando-o sucessivas vezes com etanol e éter etílico. Secou-se o precipitado em dessecador à pressão reduzida por aproximadamente 6 h. Rendimento: 60 % (683 mg, 1,5 mmol).

Dados de 6 {perclorato de bis-[N-(3-indolin-2-ona)]cobre(II)}: Experimental: C, 42,55; H, 2,15; N, 6,54 %. Calculados para $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4 \text{ Cu}(\text{ClO}_4)$: C, 42,19; H, 1,98; N, 6,15 %. $\Lambda_M = 41,38 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ em água (298 K). IV (cm^{-1} , KBr): 3508 e 3423 (medias e finas, νNH de amida secundária); 3191-2855 (fracas, $\nu\text{C}_{\text{sp}^2}\text{H}$ e $\delta\text{C}_{\text{sp}^2}\text{C}$); 1730 (forte, $\nu\text{C=O}$ lactama 5 membros); 1617 (forte, $\nu\text{C=N}$ isatina); 1560 (média encoberta, $\delta\text{N-H}$); 1093 e 661 (medias, νClO_4 não coordenado). UV/Vis: em água: 208 e 242 nm ($\epsilon = 6,35 \times 10^4$ e $1,34 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LT $n \rightarrow \pi$ ou $n \rightarrow \pi^*$), 302 nm ($\epsilon = 6,39 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LT e/ou LMCT $\pi \rightarrow d\pi$), 415 nm ($\epsilon = 1,66 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LMCT $\pi \rightarrow d\pi$). MS (ES+): m/z : 393 [MM: 393, em $\text{CH}_3\text{CN}/ \text{H}_2\text{O}$ (1:1, v:v): $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2$], 395 [padrão isotópico do cobre ($\text{Cu}^{63/65}$) monocarregado], 357 (MM: 357, em $\text{CH}_3\text{CN}/ \text{H}_2\text{O}$: $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4\text{Cu}$), 359 [padrão isotópico

do cobre ($\text{Cu}^{63/65}$) monocarregado], 240 (MM: 240, em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$: $\text{C}_8\text{H}_5\text{NO}_2\text{CuNO}$), 242 [padrão isotópico do cobre ($\text{Cu}^{63/65}$) monocarregado]; 210 (MM: 210, em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$: $\text{C}_8\text{H}_5\text{NO}_2\text{Cu}$), 212 [padrão isotópico do cobre ($\text{Cu}^{63/65}$) monocarregado]. EPR [9,32 GHz, Ganho: $6,32 \times 10^3$, Amplitude: 14 G, 10.48 ms, 77 K, solução $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (4:1, V:V), 8 scans]: $g_{\perp} = 2,0873$, $g_{\parallel} = 2,27254$, $A_{\perp} = 17,323$ G, $A_{\parallel} = 168,65 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, e a relação $g_{\parallel} / A_{\parallel} = 134,7 \text{ cm}$.

I- 2.2.8. $[\text{Cu}(\text{quin-pn})](\text{ClO}_4)_2$; Composto 7

A uma solução de quinolinaldeído (2-quinolina carboxaldeído, 10 mmol) em etanol (20 mL) levemente aquecido, aproximadamente 40°C , com o pH aparente ajustado a 5,5 - 6 com HCl concentrado (1 gota), adicionou-se propilenodiamina recém destilada (5 mmol) vagarosamente. A mistura foi mantida sob constante agitação por 5 h a temperatura ambiente (*quinpn* = N,N'-[bis-2-quinolina carboxialdeído]-1,3-diiminopropano). Após este período, adicionou-se lentamente perclorato de cobre(II) hexahidratado (5 mmol) em água (5 mL), e deixou-se a mistura reacional sob constante agitação por 24 h. Formou-se um precipitado verde oliva claro, que foi filtrado e lavado com etanol e éter etílico gelado. Rendimento: 47% (1,45 g, 2,4 mmol).

Dados de 7 {perclorato de [N,N'-[bis-2-quinolina carboxialdeído]-1,3-diiminopropano]cobre(II)}: Experimental: C, 44,77; H, 3,35; N, 9,10 %. Calculados para $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$: C, 44,93; H, 3,28; N, 9,11 %. $\Lambda_M = 208 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ em água e $130 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ em metanol (298 K). IV (cm^{-1} , KBr): 3436 (νOH , água presente); 3069-2945 (fraca, $\nu\text{C}_{\text{sp}^2}\text{H}$ e $\delta\text{C}_{\text{sp}^2}\text{C}$); 1650 (media, $\nu\text{C}=\text{N}$); 1589 (media, $\nu\text{C}=\text{N}$, outro); 1097 e 624 (fortes, νClO_4 não coordenado). UV/Vis: em solução aquosa: 206 nm ($\epsilon = 4,95 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LT $n \rightarrow \pi$ ou $n \rightarrow \pi^*$), 252 nm ($\epsilon = 4,90 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LT $n \rightarrow \pi$ ou $n \rightarrow \pi^*$), 336 nm ($\epsilon = 1,12 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, LMCT $\pi \rightarrow d\pi$), 665 nm ($\epsilon = 135,1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $d \rightarrow d$). MS (ES+): m/z : 415,09 (MM: 415,98, em MeOH: $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{Cu}$), 417,02 [padrão isotópico do cobre ($\text{Cu}^{63/65}$) monocarregado em MeOH/água], 385,97 (MM: 386,94, em MeOH: $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{Cu}$), 246,99 (MM: 246,77, em MeOH: $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{Cu}$), 232,97 (MM: 232,75, em MeOH: $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_2\text{Cu}$), 217,97 (MM: 218,72, em MeOH: $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{Cu}$). EPR [9,32 GHz, Ganho: $1,00 \times 10^4$, Amplitude: 15 G, 20,48 ms, 77 K, solução $\text{MeOH}/\text{água}$ (4:1, V:V), 1 scan]: $g_{\perp} = 2,060$, $g_{\parallel} = 2,409$, $A_{\perp} = 27,2$ G, $A_{\parallel} = 192,4 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, e a relação $g_{\parallel} / A_{\parallel} = 125,5 \text{ cm}$.

I- 2.2.9. [Cu(*apy*₂-*gla*)](ClO₄)₂ ; Composto 8

A uma solução de D-(+)-glucosamina (2 mmol) em metanol (10 mL), com o pH aparente da solução ajustado a 7,5 com solução de acetato de sódio saturada, adicionou-se 2-acetilpiridina (160 µL, 2 mmol) lentamente, e manteve-se agitação constante a t.a.. Não houve formação do ligante (controle por CCD) até 24 h depois de misturados os reagentes. Adicionou-se então perclorato de cobre(II) hexahidratado (1 mmol), e após alguns segundos, a solução tornou-se verde intensa. Após 12 h sob agitação, resfriou-se a solução (que se tornou púrpura) e um precipitado de cor púrpura escura se formou. Filtrou-se em funil de placa porosa, lavando o com água deionizada gelada (2-5 mL) e éter etílico gelado. Secou-se o produto formado em dessecador a pressão reduzida por aproximadamente 6 h. Recristalizou-se em água/etanol. Rendimento: 55% (0,6 mmol). Ao se passar este composto na coluna de troca iônica DOWEX fortemente alcalina, trocadora de ânions (cloretos por outros), isolou-se o composto com o contra-íon cloreto, ao invés de perclorato.

Dados de 8 {perclorato de [2-acetilpiridina-2-(2-imino-2-deoxi-D-glicose)acetil-piridina]cobre(II)}: Experimental: C, 36,33; H, 3,93; N, 6,07 %. Calculados para C₂₀H₂₅N₃O₆Cu.(ClO₄)₂: C, 36,07; H, 3,78; N, 6,31 %. [α]_D -156° (c 0,75 mmol, H₂O). Λ_M = 163 S cm² mol⁻¹ em água e 72 S cm² mol⁻¹ em metanol (298 K). IV (cm⁻¹, KBr): 3418 (banda larga, νOH); 3068-2923 (fraca, νC_{sp2}H, νC_{sp3}H e νC_{sp2}C); 1645 (média, νC=O); 1605 (media, νC=N); 1574 (média, νC-N); 1473 e 1443 (médiás, νC-O); 1086 e 629 (fortes, νClO₄ não coordenado). UV/vis: em solução aquosa: 262 nm (ε = 2,04x10⁴ M⁻¹cm⁻¹, LT n→π ou n→π*), 373 nm (ε = 2,20x10³ M⁻¹cm⁻¹, LT n→π ou n→π*), 519 nm (ε = 4,99x10³ M⁻¹cm⁻¹, LMCT π→dπ), 550 nm (ε = 5,74x10³ M⁻¹cm⁻¹, LMCT π→dπ), 670 nm (ε = 255 M⁻¹cm⁻¹, d→d T_{2g} ← E_g). MS (ESI+,70V): m/z = 525,9 [MM: 526, em CH₃CN/H₂O, fragmento C₂₀H₂₅N₃O₆ (H₂O)(CH₃CN)Cu⁺]; 346,1 [MM: 345,8, em CH₃CN/H₂O, fragmento C₁₃H₁₈N₂O₆Cu⁺]; 328,0 [MM: 327,8, em CH₃CN/H₂O, fragmento C₁₃H₁₆N₂O₅Cu⁺]; 409,0 [MM: 409,6, em CH₃CN/H₂O, fragmento C₁₃H₁₈N₂O₅Cu₂⁺]; 186,0 [MM: 186,7, em CH₃CN/H₂O, fragmento

(CH₃CN)₃Cu⁺]; 145,0 [MM: 145,6, em CH₃CN/H₂O, fragmento (CH₃CN)₂Cu⁺]. EPR [9,32 GHz, Ganho: 1,42x10⁴, Amplitude: 15 G, 20,48 ms, 77 K, solução MeOH/água (4:1, V:V), 1 scan]: g_⊥ = 2,06122, g_∥ = 2,493, A_⊥ = 36,41 G, A_∥ = 207,5x10⁻⁴ cm⁻¹, e g_∥ / A_∥ = 120,2 cm.

I- 2.2.10. [Cu(*pyal*₂-*gla*)](ClO₄)₂ ; Composto 9

A uma solução de D-(+)-glucosamina (2 mmol) em metanol (20 mL) adicionou-se 2-piridina carboxaldeído (2 mmol) recém destilado (sob pressão reduzida em micro-destillador, Pe: 181 °C), e a mistura foi mantida sob agitação constante a temperatura ambiente por 24 h (controle da reação por CCD). Adicionou-se então perclorato de cobre(II) hexahidratado (1 mmol), e a solução que estava amarelo claro, tornou-se verde intenso. A agitação foi mantida por mais 6 h, quando se observou a formação de um precipitado verde intenso. Filtrou-se em funil de placa porosa, lavando o com água deionizada gelada (2-5 mL) e éter etílico gelado. Recristalizou-se em água/etanol, obtendo-se um sólido marrom-esverdeado. Rendimento: 78% (0,8mmol).

Dados de 9 {perclorato de [2-piridina-carboxaldeído-2-(2-imino-2-deoxi-D-glicose)-caboxal-piridina]cobre(II)}: Experimental: C, 33,65; H, 2,98; N, 6,90 %. Calc. para C₁₈H₂₁N₃O₆Cu.(ClO₄)₂: C, 33,89; H, 3,31; N, 6,60 %. [α]_D +209,5° (c 1,09 mmol, H₂O). Λ_M = 180 S cm² mol⁻¹ em solução aquosa e 84 S cm² mol⁻¹ em metanol (ambos 298 K). IV (cm⁻¹, KBr): 3421 (forte, νOH); ~2935 (médias, νC_{sp2}H e νC=C); 1640 (forte, νC=O); 1607 (forte, νC=N); 1570 (média, νC-N); 1477 e 1446 (médias, νC-O); 1085 e 634 (forte, νCl-O não coordenado). UV/vis: em solução aquosa: 293 nm (ε = 1,23x10⁴ M⁻¹cm⁻¹, LT n→π ou n→π*), 373 nm (ε = 3,96x10³ M⁻¹cm⁻¹, LT n→π ou n→π*), 471 nm (ε = 1,18x10³ M⁻¹cm⁻¹, LMCT π→dπ), 690 nm (ε = 168 M⁻¹cm⁻¹, d→d T_{2g} ← E_g). MS (ESI+,70V): m/z = 220,1 [MM: 219,5, em CH₃CN/H₂O, fragmento C₁₈H₂₁N₃O₆Cu²⁺]; 221,1 [MM: 221 em CH₃CN/H₂O, padrão isotópico C₁₈H₂₁N₃O₆⁶⁵Cu²⁺]; 331,0 [MM: 331,8, em CH₃CN/H₂O, fragmento C₁₂H₁₆N₂O₅Cu⁺]; 445,0 [MM: 445,9, em CH₃CN/H₂O, fragmento C₁₈H₂₁N₃O₆Cu⁺(H₂O), e padrão isotópico 457,0 ⁶⁵Cu⁺]; 145,0 [MM: 145,6, em CH₃CN/H₂O, fragmento (CH₃CN)₂Cu⁺]. EPR [9,32 GHz, Ganho: 1,52x10⁴, Amplitude: 15 G, 20,48

ms, 77 K, solução MeOH/água (4:1, V:V), 1 scan]: $g_{\perp} = 2,06435$, $g_{\parallel} = 2,4247$, $A_{\perp} = 38,587$ G, $A_{\parallel} = 127,9 \times 10^{-4}$ cm⁻¹, e $g_{\parallel} / A_{\parallel} = 189,5$ cm.

I- 2.2.11. Na₂[Cu₂(Glc)₃]· 8H₂O ; Composto 10

Um procedimento geral foi usado para se preparar os complexos de cobre(II) com D-(+)-glicose (Glc), D-(+)-fructose (Fru) e D-(+)-galactose (Gal) , similar ao descrito na literatura, onde sais de sódio dos ligantes carboidratos foram preparados *in situ* ¹⁵³ .

A uma solução de D-Glicose (4 mmol) em 10 mL de metanol à 0°C, adicionou-se sódio metálico recentemente cortado (8 mmol), e a mistura reacional foi mantida sob intensa agitação a t.a. por 30 minutos. A este sal de sódio da D-glicose gerado *in situ* foi vagarosamente adicionado Cu(H₂O)₆(ClO₄)₂ (2 mmol) em 10 mL de metanol. Imediatamente, um precipitado azul claro formou-se, e a mistura reacional foi mantida sob agitação por 12 h à t.a.. O precipitado azul claro foi isolado por filtração, e purificado por dissolução em metanol a quente, seguido de uma Segunda filtração (repedido 2 vezes). O complexo obtido foi seco à pressão reduzida por 9 h, resultando em um precipitado azul claro esverdeado em 40 % de rendimento (0,678 g).

Dados de 10 {tris-(D-glicosato)cuprato de sódio}: Experimental: C, 25,09; H, 5,77; Cu 15,07; Na 5,11 %. Calc. para Na₂[Cu₂(Glc)₃]•8H₂O: C, 25,30; H, 5,66; Cu 14,88; Na 5,38 %. TGA (ar sintético): - 16,59 % à 137,8 °C; calc. Para perda de 8 H₂O: -16,86 %. $\Lambda_M = 219$ S cm² mol⁻¹ em solução aquosa, e 59 S cm² mol⁻¹ em MeOH (ambas 298 K). IV (cm⁻¹, KBr): 3316 (forte, νOH); 2920 - 2878 (forte, νC_{sp3}H); 1030 (média, νC-O e νC-C). UV/Vis: em solução aquosa: 239 nm ($\epsilon = 3,62 \times 10^3$ M⁻¹cm⁻¹, LT n→σ ou n→σ*), 664 nm ($\epsilon = 56,3$ M⁻¹cm⁻¹, d→d). Raman: 3265 (δOH), 2897-2882 (νCH's), 1460-1256 (δCCH, δOCH e δCOH), 1120-1022 (δCOC, δCCO, δCCC, δCCH), 930 e 838 (νCC e δC1H1, região anomérica), 288-234 (torção do anel, deformação de baixa frequência). EPR [9,32 GHz, Ganho: 2,0x10⁴, Amplitude: 15 G, 20,48 ms, 77 K, sólido, 1-8 scan]: $g_{zz} = 2,2521$, $g_{xx} = 2,0698$, $g_{yy} = 2,0218$, $A_{zz} = 189,9$ G, $A_{xx} = 26,1$ G, $A_{yy} = 23,7$ G.

I- 2.2.12. Na₂[Cu₃(Fru)₄]· 8H₂O ; Composto 11

O complexo 11 foi preparado adotando o mesmo procedimento experimental para a preparação de 10. O composto 11, um sólido azul, foi isolado em 57 % de rendimento (0,665 g).

Dados de 11 {tetra-(D-frutosato)cuprato de sódio}: Experimental: C, 26,06; H, 5,53; Cu 18,07; Na 3,96 %. Calc. para Na₂[Cu₃(Fru)₄]•8H₂O: C, 26,31; H, 5,34; Cu 17,41; Na 4,18 %. TGA (ar sintético): - 13,37 % à 137,8 °C; calc. para a perda de 8 H₂O: -13,16 %. $\Lambda_M = 200,8$ S cm² mol⁻¹ em solução aquosa, e 49,8 S cm² mol⁻¹ em MeOH (ambas 298 K). IV (cm⁻¹, KBr): 3364 (forte,

¹⁵³ a) S.B. Etcheverry, P.A.M. Williams, E.J. Baran, *Carbohydr. Res.* 302 (1997) 131-138; b) P.A.M. Williams, S.B. Etcheverry, E.J. Baran, *Carbohydr. Res.* 329 (2000) 41-47; c) A. Sreedhara, C.P. Rao, B.J. Rao, *Carbohydr. Res.* 289 (1996) 39-53.

6νOH); 2922 - 2883 (forte, νC_{sp3}H); 1067 (média, νC-O e νC-C). UV/Vis: em solução aquosa: 245 nm (ε = 3,64x10³ M⁻¹cm⁻¹, LT n→σ ou n→σ*), 672 nm (ε = 61,2 M⁻¹cm⁻¹, d→d). Raman: 3221 e 3483 (δOH), 2938-2895 (νCH's), 1450-1255 (δCCH, δOCH e δCOH, algumas bandas encobertas), 1071-964 (δCOC, δCCO, δCCC, δCCH), 930, 867, 828 e 835 (νCC e δC1H1, região anomérica, anel furanose predominante), 259 (torção do anel, deformação de baixa frequência). EPR [9,32 GHz, Ganho: 2,0x10⁴, Amplitude: 15 G, 20,48 ms, 77 K, sólido, 1-8 scan]: g_{zz} = 2,2613 e 2,2594^ξ, g_{xx} = 2,0617, g_{yy} = 2,0245, A_{zz} = 189,5 e 194,0^ξ G, A_{xx} = 26,1 G, A_{yy} = 21,7G. (^ξ sinal fraco).

I- 2.2.13. Na[Cu₂(Gal)₃]· 6H₂O ; Composto 12

O complexo **12** foi preparado adotando o mesmo procedimento experimental para a preparação de **10**. O composto **12**, um sólido verde claro, foi isolado em 35 % de rendimento (0,370 g).

Dados de **12** {tris-(D-galactosato)cuprato de sódio}: C, 26,90; H, 5,48; Cu 16,83; Na 2,97 %. Calc. para Na[Cu₂(Gal)₃]•6H₂O: C, 27,16; H, 5,68; Cu 17,05; Na 2,89 %. TGA (ar sintético): - 13,41 % à 137,8 °C; calc. Para a perda de 6 H₂O: -13,59 %. Λ_M = 108 S cm² mol⁻¹ em solução aquosa, e 28 S cm² mol⁻¹ em MeOH (ambas 298 K). IV (cm⁻¹, KBr): 3388 (forte, νOH); 2938 - 2878 (forte, νC_{sp3}H); 1065 (média, νC-O and νC-C). UV/Vis: em solução aquosa: 240 nm (ε = 3,05x10³ M⁻¹cm⁻¹, LT n→σ ou n→σ*), 664 nm (ε = 78,6 M⁻¹cm⁻¹, d→d). Raman: 3131 (δOH), 2982-2861 (νCH's), 1455-1246 (δCCH, δOCH e δCOH), 1100-998 (δCOC, δCCO, δCCC, δCCH), 925, 881 e 823 (νCC e δC1H1, região anomérica), 292-249 (torção do anel, deformação de baixa frequência). EPR [9,32 GHz, Ganho: 2,0x10⁴, Amplitude: 15 G, 20,48 ms, 77 K, sólido, 1-8 scan]: g_{zz} = 2,2521 e 2,2933^ξ, g_{xx} = 2,0648, g_{yy} = 2,02179, A_{zz} = 189,1 e 160,9^ξ G, A_{xx} = 23,5 G, A_{yy} = 19,6 G. (^ξ sinal fraco).

2. Parte Experimental – Parte II *Reatividade e Cinética*

II - 2.1. Métodos e Instrumentação – Cinética

Os carboidratos usados nos estudos cinéticos, D(+)Glucose (99%) e D(-)Frutose (99%), foram obtidos da Merck, e a D(+)Galactose (99%), foi obtida da Sigma Chemical Co.

As medidas cinéticas foram realizadas no Oxígrafo GILSON (Medical Electronics Inc. USA), equipamento que permite a verificação de oxigênio consumido. Foram usados o Eletrodo de Clark (Pt, com referência interna de Ag/AgCl) e membrana para sonda de O₂ da YSI (Yellow Spring Instruments Co.), com solução saturada de KCl entre o eletrodo e a membrana (1 gota). O volume da célula é de 1,8 mL, fechada com uma pequena tampa contendo um orifício capilar que não permite a troca gasosa com a atmosfera, acoplada a um banho termostatizado e com agitador magnético. A voltagem aplicada no eletrodo foi de 0.8 V em todas as medidas. Ditionito de sódio (agente redutor) foi usado para calibrar o oxígrafo (0% e 100% de oxigênio dissolvido na célula). De acordo com Handbooks de química, a 25°C (298 K) há 244 µM de O₂ dissolvidos em água pura. Este valor foi usado em todas as medidas com esta temperatura para calibração. Em outras temperaturas foram usados valores intermediários entre 244 e 198 µM O₂ (37°C). Os estudos que foram conduzidos em meio básico, utilizaram tampões carbonato (Na₂CO₃/ NaOH 1 mol/L), 250-25 mM, pH = (12,0 ± 0,2); e nos estudos com outros valores de pH foram usados tampões carbonato e fosfato. Todos os tampões e soluções utilizadas nos estudos cinéticos (com exceção da solução do catalisador de cobre) foram passados por resina de troca iônica Chelex 100, para eliminar qualquer traço de íons metálicos. A temperatura foi mantida por banho termostatizado em todos os estudos. Foram feitas soluções estoques dos complexos de cobre e dos substratos (carboidratos), e adicionados volumes adequados na cela do oxígrafo, a fim de obter-se a concentração final desejada, tanto do catalisador quanto do substrato, usando-se a relação $C_1V_1 = C_2V_2$, onde 1 é a cela e 2 é a solução estoque. Para simular uma cinética de primeira ordem, e facilitar o tratamento dos dados por Michaelis-Menten, foi utilizada uma concentração do catalisador no mínimo 10 vezes menor que do substrato. Todas as medidas foram feitas em duplicatas, ou triplicatas quando necessário, e o erro experimental variou de 3 a 5%.

II - 2.2. Experimentos Cinéticos

Foram testadas as oxidações dos 3 carboidratos (glicose, galactose e frutose), catalisadas pelos complexos de cobre(II) preparados (compostos **1**, **2** e **3**). Foi monitorada a variação de oxigênio na cela (µM O₂ dissolvido) em relação a um dos elementos da reação (catalisador, substrato, tampão ou OH⁻), que variou. Em todos os estudos cinéticos fez-se o

controle com as seguintes curvas: catalisador (complexo utilizado no estudo em questão) sem o substrato (carboidrato), substrato sem o catalisador, e utilizando o $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6(\text{ClO}_4)_2$ no lugar do catalisador usado como comparação.

II - 2.3. Captação de spin por EPR, durante a reação catalítica

Os captadores de spin (Spin Trapping) utilizados nos experimentos de EPR para a captação de possíveis radicais da reação dos complexos de cobre(II) com os carboidratos foram DNBBS (3,5-dibromo-4-nitrobenzeno sulfonila) e DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido). Para a quantificação dos radicais captados foi utilizado como padrão o TEMPOL (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiloxi), solução 38,2 μM , ou solução 36,0 μM .

Fizeram-se experimentos no EPR, com as oxidações de três carboidratos (glicose, galactose e frutose) catalisadas pelos complexos de cobre(II) preparados (compostos **1**, **2** e **3**), para a captação de radicais livres gerados intermediariamente. Usaram-se tampões fosfatos [pH 7,4 (50 mM), 8,5 (100 mM) e 12,0 (25 mM)] e tampão carbonato (pH 12,0, 250 mM), todos passados por resina de troca iônica Chelex 100, para a eliminação de possíveis íons metálicos. Ajustaram-se os volumes adicionados à cela, de 200 μM . Os captadores utilizados foram: POBN e DNBBS, para a captação de radicais de carbono e DMPO para radicais de oxigênio. Para a quantificação dos radicais captados foi utilizado como padrão o TEMPOL, em solução 38,2 μM . Usaram-se ponteiras e pipetas de plástico para adicionar os captadores à cela, e estes foram mantidos em banho de gelo enquanto foram utilizados. As concentrações utilizadas foram: Complexo de cobre (CuL): $1,00 \times 10^{-4}$ M, Substrato (carboidratos): $1,00 \times 10^{-3}$ M e captadores: 50 mM.

Utilizou-se no EPR a faixa de campo de 3450 G (± 100 G), e a amplitude de 1 G. A frequência foi de 9,69 MHz e a potência de 20,00 mW.

II - 2.4. Captação de intermediários por reações específicas

Catalase (extraída de fígado bovino, n. 39049-6, contendo 75,2 mg de proteína/ mL e 10000 unidade/ mg, em suspensão líquida com 1.0 % de timol), e demais reagentes foram obtidos da Aldrich Chemical Co.. Cu,Zn-SOD (n. S2515, contendo 3000 unidade/ mg), extraída de eritrócitos bovinos, foi obtida da Sigma Chemical Co.. Os métodos cinéticos e condições utilizados para a verificação da formação de intermediário reativos, ao se utilizar a Cu,Zn-SOD para a verificação da presença de radical superóxido e a Catalase para a presença de água oxigenada, foram utilizando-se o instrumento Oxígrafo. Foi monitorada a variação de oxigênio na cela (mM O_2 dissolvido) em uma condição onde a concentração do substrato (Frutose) foi de $1,1 \times 10^{-3}$ M e do catalisador $1,1 \times 10^{-4}$ M, em tampão fosfato pH 12,0. Em diferentes curvas foram

adicionados 18000 unidades de Catalase, e 15000 unidades de Cu, Zn-SOD à reação monitorada cineticamente.

II - 2.5. Determinação dos produtos de reação

Equipamentos: Todos os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (modelo P/ACE 5510, Beckman Coulter Instruments, Fullerton, CA, USA) equipado com um detector de arrazo de diodos, ajustado a 254 nm e a uma temperatura de controle a 25 °C. A aquisição dos dados e o tratamento no software foi completada pelo Beckman P/ACE System Gold® Software). Foram usados capilares de sílica fundida com dimensões de 57 cm de comprimento total (50 cm de comprimento efetivo), 75 µm de diâmetro interno e 365 diâmetro externo. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente, a pressão de 0.5 psi durante 3 s. O sistema foi operado sob voltagem constante e polaridade reversa (-25 kV).

Reagentes e Soluções: Todos os reagentes utilizados possuíam grau de pureza analítico, os solventes possuíam pureza cromatográfica e a água foi purificada por deionização (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA). Os padrões ácido xilônico, ácido fórmico, ácido glicérico ácido glicônico e cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAB) foram adquiridos da Aldrich (Milwaukee, WI, U.S.A.). O reagente ácido 3,5-dinitrobenzoico (3,5-DNB) foi adquirido da Merck (Darmstadt, Germany). Soluções estoques padrões foram preparadas a 1000 mg/L e estocadas em freezer até o momento da análise. Foram preparadas soluções estoques dos eletrólitos 3,5-DNB a concentração de 20 mmol L⁻¹ e CTAB a concentração 10 mmol L⁻¹. O eletrólito de trabalho foi compreendido de 10 mmol L⁻¹ 3,5-DNB e 0,2 mmol L⁻¹ CTAB, ajustado a pH 3,7 com uma solução 0,1 mol L⁻¹ de HCl.

Condições Analíticas: As soluções dos eletrólitos foram preparadas antes do uso, e filtradas por membrana antes do uso. Ao início do dia, o capilar era condicionado por pressões de fluxo de 1 mol L⁻¹ de solução de NaOH (5 min), água deionizada (5 min) e solução de eletrólito (10 min) seguido por um fluxo eletrocínético da solução de eletrólito (-25 kV durante 10 min). Entre as corridas, o capilar era novamente preenchido com solução se eletrólito (2 min fluxo).

2. Parte Experimental – Parte III *Implicações em Processos Biológicos*

III - 2.1. Materiais, Métodos e Instrumentação – Processos Biológicos

Todos os equipamentos, materiais e reagentes (com exceção dos compostos de cobre utilizados como tratamento) foram utilizados do Departamento de Bioquímica, da Universidade Tor Vergata de Roma. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (Micropore). Dimetil sulfóxido (DMSO), ditioneíto (DTT), N-(2-hidroxil)piperazina-N'-(2-acido etanosulfônico) (HEPES), sal dissódico, iodeto de propídeo, cocktail inibitor de protease, terc-butil hidroperóxido, foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). O kit para a determinação de proteínas glicosilatas (Pro-Q Emerald 300 Glycoprotein Gel Stain Kit) provém da Molecular Probes Inc. (Eugene, OR). O kit para dosagem no citofluorímetro, composto de Annexin V-FITC foi adquirido da Bander MedSystems (Viena, Áustria). O kit para a determinação de proteínas oxidadas (Oxyblot) provém da Intergen (Purchase, NY). Todos os demais reagentes, soluções e solventes provém da Merck (Darmstadt, Alemanha).

O equipamento de fluorimetria que mede a fluorescência celular, o citofluorímetro (FACS) Backington and Dickson, e todos os demais equipamentos (espectrofotômetro Beckman) pertencem ao Departamento de Biologia da Universidade Tor Vergata de Roma. Todos os materiais de laboratório utilizados, como as garrafas de cultura, pipetas e tubos de centrífuga (Eppendorf, Falcon) são estéreis, utilizados em capela de cultura celular esterilizada com luz UV e fluxo lamelar de ar.

III - 2.2. Culturas Celulares

As células humanas promonocíticas (sanguíneas tumorais) estabilizadas em cultura U937, derivadas da *American Type Culture Collection*, foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640, onde foram adicionados: soro bovino (FCS) a 10% livre de enzimas sanguíneas (56°C por 30 min), glutamina 2 mM, tampão HEPES 25 mM, piruvato 1 mM, aminoácidos não essenciais e 100 U/mL de uma solução antibiótica constituída de penicilina ou streptomomicina. As garrafas celulares, que possuem uma abertura de respiração na tampa com um filtro bacteriológico, continham células em suspensão e eram mantidas a uma temperatura de 37°C em atmosfera controlada, de 5% de CO₂. As células U937 possuem um tempo de duplicação de cerca de 24h e mantêm um crescimento exponencial em um intervalo de concentração que vai de 1,0 x 10⁵/mL a 1,2 x 10⁶/mL. A suspensão celular era mantida em linha disseminada de rotina em meio fresco de cultura.

A cultura de células humanas neuroblastomas (neurais tumorais) SH-SY5Y, derivadas da *European Collection of Cell Culture*, foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's F12, suplementado com soro bovino (FCS) a 15% livre de enzimas sanguíneas (56°C por

30 min), glutamina 2 mM e 100 U/mL de uma solução antibiótica constituída de penicilina ou streptomomicina. As garrafas celulares, que possuem uma abertura de respiração na tampa com um filtro bacteriológico, continham células em aderência e eram mantidas a uma temperatura de 37°C em atmosfera controlada, a 5% de CO₂. Quando as células chegavam à confluência, eram destacadas com uma solução de tripsina 0,25% e a suspensão celular era centrifugada (1200 rpm, 7 min), e disseminada em meio fresco de cultura. O uso da tripsina era substituído com um estaco mecânico, usando-se uma espátula (scrapper) estéril, somente nos casos em que as células destacadas serviriam a experimentos para a dosagem de ROS, no Citofluorímetro.

Para ambos os tipos celulares, a conta era efetuada utilizando-se um emocitômetro de Thoma, enquanto a viabilidade celular era determinada mediante exclusão com o colorante *Trypan Blue* ou Azul de Tripano (0,16%). Este composto é, de fato, capaz de atravessar a membrana plasmática, somente no caso em que existem alterações celulares, evidenciando a presença de células mortas e o percentual de necrose (ou apoptose) na população celular.

III - 2.3. Tratamentos de células com os compostos

Foram preparadas soluções estoques dos complexos **1 a 6**, em DMSO, e do composto **8** em água deionizada e passada por um filtro bacteriológico, a $5,0 \times 10^{-3}$ M, mantidas a -20°C. As garrafas celulares (de 2 a 15 mL) eram preparadas cada uma com uma concentração inicial de células $2,0 \times 10^5$ células/mL para a linha U937 ou $2,0 \times 10^5$ células/ 5cm² (1 mL) para a linha SH-SY5Y (contadas inicialmente com a câmara de contagem de Thoma, utilizando o colorante Trypan Blue), e os compostos adicionados nas quantidades adequadas ou que se desejavam (de 5 a 50 µM) no meio de cultura. Para cada caso, foram feitas garrafas celulares com a mesma quantidade de células, como controles com o solvente utilizado na dissolução do composto em questão (água ou DMSO). Estas garrafas celulares já preparadas para o tratamento eram mantidas em estufa a uma temperatura de 37°C, em atmosfera controlada, a 5% de CO₂, e eram retiradas para avaliação após 1, 3, 6, 12, 24, 36 ou 48 h de tratamento, dependendo do tipo de estudo que seria feito.

III - 2.4. Análise do crescimento e da morte celular

As curvas de crescimento celular foram traçadas utilizando a metodologia de contagem no microscópio ótico em câmara de contagem de Thoma, baseada na capacidade de exclusão do colorante Trypan Blue. De cada experimento foram extraídos 4 amostras, e estas contadas duas vezes cada, de modo a dar um valor o mais próximo possível do real. Em geral foram feitos de 1 a 4 experimentos, para cada tratamento utilizado.

O grau de apoptose foi verificado apenas nos tratamentos feitos com as células U937, na técnica de citofluorimetria em fluxo (sigla FACS), que permitiu estabelecer não somente o grau

de morte celular, mas também uma estimativa do percentual de células nas várias fases do ciclo celular. As células eram tratadas com uma solução de Triton X-100 a 0,1% e iodeto de propídeo (5µg/mL); o detergente Triton solubilizava a membrana plasmática, deixando intacta a membrana nuclear, enquanto o fluorocromo se intercalou ao DNA evidenciando, segundo a intensidade de fluorescência emitida, os núcleos apoptóticos (fase G1 do ciclo celular), tetraplóide (fase G2/M do ciclo) e hipodiplóide ¹⁵⁴. Estes últimos representam os núcleos apoptóticos tardios, caracterizados pelo fato de possuírem o DNA cortado em fragmentos de 200 ppm, ou múltiplos deste. Assim, o citofluorímetro foi utilizado para se determinar as fases iniciais do programa apoptótico. As fragmentações do DNA, realizadas com iodeto de propídeo, são de fato eventos tardios do programa de morte. Ao contrário, um dos parâmetros que pode ser utilizado para distinguir células em apoptose precoce é a translocação da fosfatidilserina, fosfolípido da esfera interna da membrana plasmática, presente na superfície celular. O fenômeno de translocação foi revelado mediante o tratamento com annexina V-FITC, proteína bacteriana (que fluoresce mediante uma ligação com o fluorocromo) capaz de reconhecer e marcar a fosfatidilserina externa. As células necróticas, que poderiam representar falsos eventos positivos por causa dos danos presentes na membrana celular, foram evidenciadas após a marcação dupla da população com annexina V-FITC e iodeto de propídeo. Após lavagem com PBS ("Phosphate Saline Buffer", tampão fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, pH 7,4), 2 x 10⁵ células (1 mL) foram re-suspensas em 195 µL de tampão HEPES/NaOH 10 mM pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM, com a adição de 5 µL de annexina V-FITC, mantida em uma solução contendo TRIS (tris(hidroximetil)-aminometano) 50 mM, NaCl 100 mM, albumina bovina (BSA) a 1% e azida de sódio 0,02%, a pH 7,4. Após 30 minutos de incubação no escuro, foram adicionados outros 190 µL de tampão HEPES/NaOH. As populações celulares foram marcadas com annexina V-FITC; e sucessivamente foram adicionados 10 µL de uma solução 20 µg/mL de iodeto de propídeo. O diagrama, com a população *versus* a fluorescência (vermelho para iodeto de propídeo, contra verde para a annexina V-FITC), representa o espaço no qual as células se distribuem, com base na emissão que apresentam.

III - 2.5. Determinação de ROS e RNS intracelular

Para o ensaio do conteúdo intracelular de ROS (espécies reativas de oxigênio), foram utilizados métodos fluorimétricos diretamente nas células tratadas, marcadas com Rodamina, um fluorocromo capaz de atravessar a membrana plasmática e emitir fluorescência somente se sofre reação química com os intermediários reativos de oxigênio (H₂O₂, O₂⁻, OH⁻) e também com os radicais de nitrogênio (RNS). A intensidade da fluorescência medida no FACS foi comparada a

¹⁵⁴ Nicoletti, I; Migliorati, G.; Pagliacci, M.C.; Grignani, F.; Riccardi, C. *J. Immunol. Methods* **139** (1991) 271.

um controle positivo, constituído das células não-marcadas com rodamina. Em sequência à incubação com rodamina (dissolvida em DMSO) por 20 minutos a 37°C, as células foram centrifugadas, lavadas com cuidado e re-suspendidas em PBS. A produção de radicais, equivalente à medida feita em 10.000 células por amostra, vinha então quantificada com base no deslocamento da intensidade da fluorescência da população celular marcada com rodamina, analisando no citofluorímetro a fluorescência verde (FL1).

III - 2.6. Determinação de danos às proteínas citoplasmáticas

Os danos às proteínas celulares foram determinados por meio de Eletroforese em Gel, por meio de separação das proteínas. Primeiramente as células, após feito o tratamento desejado, eram centrifugadas (destacadas das garrafas se SH-SY5Y), lavadas e re-suspendidas em PBS, centrifugadas novamente, e o precipitado celular era imediatamente usado ou as amostras eram congeladas a -80°C. Após, as amostras eram então re-suspendidas em tampão de lise celular (10 mM de tris(hidroximetil) aminoetano, 150 mM de NaCl e 1% do surfactante Triton, com 1:10 de cocktail inibitor de protease), cerca de 0,1 mL por amostra, deixado por 10-15 minutos em gelo, centrifugadas a 17000 rpm, a 4°C, por 15 minutos, onde o sobrenadante contém as proteínas celulares citosólicas.

Estas proteínas devem ser contadas, a fim de se carregar o gel de eletroforese com as mesmas quantidades de proteínas em todas as amostras, para comparações.

III - 2.7. Determinação das proteínas totais

A concentração protéica total dos lisados celulares foi calculada utilizando o método de Lowry ¹⁵⁵. O método constitui-se na redução de uma solução alcalina de íons Cu(II) por alguns resíduos de aminoácidos mais reativos, como a tirosina, a cisteína, o triptofano e a histidina. Os íons de Cu(II) são quelados pelos grupos aromáticos (o triptofano e a tirosina por meio dos seus grupos fenólicos, a cisteína através do grupo -SH, e a histidina através do anel imidazólico), que depois são reduzidos pelo reagente de *Folin-Ciocalteau*. O produto da reação de redução é evidenciado pela formação de compostos coloridos, de um azul intenso, cujo máximo de absorção é a 695 nm. A concentração protéica foi calculada baseada em uma curva de calibração obtida com várias concentrações de albumina (BSA) como padrão.

¹⁵⁵ Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. *J Biol. Chem.* **193** (1951) **265-275**.

III - 2.8. Imunoeletroforese (*Western Blotting*)

Para todos os fatores moleculares compreendidos nestes estudos, a quantidade de proteínas imuno-reativas foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida em fase denaturante (SDS-PAGE), seguida de transferência em membrana de nitrocelulose ou fluoreto de polivinilideno (PVDF) no caso da análise de danos carbonílicos, e diretamente em gel, no caso de danos glicosílicos. A eletroforese em dodecil-sódio sulfato (SDS) é um método analítico que permite separar, pela ação de um campo elétrico constante e da malha de acrilamida, as moléculas diversas com base em seu peso molecular. O SDS é um denaturante protéico, e por ser dotado de uma cabeça polar de carga negativa, neutraliza as cargas positivas das proteínas, que podem então ser separadas com base em seu peso molecular. A sua utilização durante o tratamento da amostra, no tampão de corrida e no gel de acrilamida, assegura desta forma uma separação das proteínas somente baseada em seu peso molecular. Para a preparação de um gel a 12 % usa-se: solução de acrilamida 4,0 mL (solução feita com 29,1% de acrilamida e 0,9% de N,N-metileno-bis-acrilamida em água), água 3,35 mL, tampão *resolving* 2,50 mL (solução feita com 54,45 g de TRIS em 250 mL de água, levando a pH 8,8 com HCl e o volume a 300 mL com água), SDS 10% 100 µL, solução de persulfato de amônio (0,1-0,3% peso:volume) 50 µL como catalisador, e TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamina) 10 µL para iniciar a polimerização. Ao se polimerizar, faz-se um outro gel com uma baixa concentração de acrilamida, onde as proteínas chegam em linha para começarem a se separar: acrilamida 0,65 mL, água 3,05 mL, *stacking buffer* (solução feita com 6 g de TRIS em 70 mL de água, levando a pH 6,8 com HCl e o volume a 300 mL com água), SDS 10% 25 µL, solução de persulfato de amônio 0,1-0,3% 25 µL, e TEMED 10 µL para iniciar a polimerização. Os géis são feitos em posição vertical, em um aparelho CASTER que une dois vidros, com um espaçador entre eles de cerca de 1,5 mm, que é a espessura do gel que é feito neste espaço. Transfere-se o gel a um aparelho de eletroforese (em vertical) e aplica-se uma corrente de cerca de 20 a 25 mA para cada gel, deixando-se a voltagem livre. Utiliza-se o tampão de corrida feito de TRIS 45g, Glicina 216g e SDS 5g, dissolvidos em 1 L de água bidestilada. À eletroforese, segue-se a transferência das proteínas, contidas no gel, sobre uma membrana, suporte mais ou menos poroso, capaz de manter adsorvidas as moléculas separadas previamente. A transferência é otimizada com a aplicação de um campo elétrico com uma intensidade de corrente de 100 mA, para uma transferência *overnight*, em um tampão de corrida composto por TRIS (tris(hidroximetil)aminoetano) 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3 e metanol a 20%. Em alternativa a este procedimento clássico, pode-se aplicar uma corrente muito mais elevada (até 500 mA) por um período limitado de tempo (1-2 h), mantendo o aparelho em baixa temperatura (4°C) para se evitar o aquecimento do gel e da membrana. A eficiência do transferência é verificada colorando-se o gel com o colorante Blue de Coomassie (em metanol 25% e ácido acético 10%) ou a membrana com vermelho de Ponceao (colorante reversível que pode ser lavado com água e PBS).

A revelação imunoenzimática das proteínas adsorvidas é conduzida mediante incubação da membrana com anticorpos específicos (anticorpo primário). Para manter íntegra a imunoglobulina utilizada para a dosagem, pode-se escolher entre um tempo de incubação longo a baixa temperatura (toda a noite, a 4°C) ou mais breve (2-3 h) à temperatura ambiente. Após lavagens oportunas com solução de PBS e o surfactante Tween 20 (1%), coloca-se o segundo anticorpo (anticorpo secundário) conjugado à enzima peroxidase. Valendo-se do uso do luminol, substrato da peroxidase, a reação luminosa emitida durante a revelação vem impressa em uma chapa fotográfica, subseqüentemente revelada com soluções apropriadas.

III - 2.9. Determinação das proteínas carboniladas

As proteínas carboniladas foram detectadas usando o kit Oxyblot. Resumidamente, 20 µg de proteínas reagiram com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP), por 15 minutos a 25 °C, onde os grupos carbonílicos foram complexados com a hidrazina, formando hidrazonas, de cor vermelha. As amostras celulares lisadas e tratadas com DNP (também com a adição de β-mercaptoetanol) foram resolvidas e separadas em gel de poliacrilamida 12% ou 10% em SDS, e identificadas por *imunoblotting* usando um anticorpo anti-DNP, um segundo anticorpo anti-rabbit, e após reveladas utilizando-se o luminol, impressas na chapa fotográfica. Amostras não derivatizadas ou amostras de controle, sem presumivelmente proteínas carboniladas, foram usadas como controles negativos. Em geral se fez três vezes cada *imunoblotting* para validar os resultados. A quantidade de proteínas carboniladas foram analisadas através do programa BioRad para Windows, que fornece o percentual revelado em cada chapa, após varredura ótica.

III - 2.10. Determinação das proteínas glicosiladas

As proteínas glicosiladas (com a ação dos açúcares presentes no meio de cultura, em concentrações úteis à célula) foram detectadas utilizando-se o kit Pro-Q Emerald 300 Glycoprotein. Tratam-se as amostras celulares (com cerca de 10 a 100 µg/mL de proteína total) com o chamado "Sample Buffer", que utiliza uma solução de TRIS (tris(hidroximetil)aminoetano) e HCl 0,15M, ajustado a um pH de 6,8 (1 mL), glicerol (0,8 mL), SDS 10% (1,6 mL), água (3,8 mL), β-mercaptoetanol (0,4 mL) e o colorante azul de bromofenol (0,4 mL). No caso de se analisar as proteínas glicosiladas, não é necessário aquecer as amostras. As amostras celulares lisadas e tratadas com o "Sample Buffer" foram resolvidas e separadas em gel de poliacrilamida 12% ou 10% em SDS, ou em gel de acrilamida a gradiente, indo de 6 a 15%, e identificadas por um posterior tratamento no próprio gel, sem a necessidade de se fazer *imunoblotting*. O controle foi feito por meio da amostra sem o tratamento, e a comparação por meio de um padrão molecular de proteínas glicosiladas. Resumindo-se o tratamento proposto pelo kit, primeiramente

retirou-se todo o SDS do gel por meio de lavagens de 45-50 minutos com solução de 50% metanol e 5% ácido acético glacial em água bidestilada (cerca de 100 mL de solução por gel), em constante agitação à temperatura ambiente. Após rápidas lavagens com solução de ácido acético glacial 3% em água, incuba-se o gel em uma solução que oxida os carboidratos presentes (ácido periódico). Lavando-se novamente o gel (duas ou três vezes), incuba-se o gel com a solução fluorescente presente no kit por 2 h, no escuro. A revelação se dá por meio de fotografia do gel a um comprimento de onda de 300 nm. Pode-se visualizar a $\lambda = 256$ nm, o mais comum encontrado nos aparelhos deste tipo. A quantidade de proteínas glicosiladas fotografadas do gel foram analisadas através do *Softwear Quantity One*, da *BioRad* para Windows, que fornece o percentual revelado em cada foto, após varredura ótica (scanner).

3. Resultados e Discussão – Parte I

Síntese, Caracterização e Estudos de Equilíbrio

Os resultados obtidos neste trabalho de Tese estão divididos em três partes:

- Parte I – “Síntese e Caracterização de Complexos Imínicos e Diimínicos de Cobre(II) Derivados de Indol, de Aminocarboidratos e de Carboidratos”
- ***Parte II - “Reatividade dos Complexos Diimínicos de Cobre(II) na Oxidação de Carboidratos – Cinética, Lei de Velocidade e Mecanismo de Reação”***
- ***Parte III - “Atividades Bioinorgânica e Biológica - Efeitos de Complexos Imínicos e Diimínicos de Cobre na Viabilidade Celular”***

Esta discussão da Primeira Parte está dividida segundo as séries dos complexos preparados, onde são apresentados suas sínteses, caracterizações e demais estudos, a fim de facilitar a compreensão do trabalho.

As sínteses dos complexos imínicos e diimínicos foram desenvolvidas a partir de metodologias já conhecidas, baseadas em reações de condensação para a formação de iminas¹⁵². Em todos os casos foram efetuadas modificações adequadas, visando obter melhores rendimentos e principalmente uma única espécie. As estruturas propostas nos esquemas para cada composto foram sugeridas com base em dados espectroscópicos e outras análises, como condutividade molar e em alguns casos, termogravimetria.

1.3.1. Complexos imínicos e diimínicos de Cobre(II) da série da isatina

1.3.1.1. Sínteses

A isatina (ou isatin) é um indol endógeno que possui um grupo carbonila vizinho a um grupo amida, como mostrado na Figura 7 (tautômeros, Introdução). Isso torna esta carbonila pouco reativa à condensação com aminas, para formação de iminas (ou bases de Schiff). Em procedimentos gerais para reações deste tipo sugeridos na literatura, faz-se o uso de catálise ácida, como modo de protonar a carbonila, tornando-a mais reativa. Isso se dá pela diminuição de energia dos níveis de orbitais moleculares da ligação C=O, devido à menor eletronegatividade do oxigênio que está positivado (os níveis energéticos do C e do O ficam mais próximos). Assim, esta diminuição de energia do LUMO (orbital molecular não-ocupado de menor energia) da ligação C=O, facilita o ataque de um nucleófilo ao átomo de carbono¹⁵⁶.

¹⁵⁶ A. Rauk, “*Orbital Interaction Theory of Organic Chemistry*”, John Wiley & Sons (1994).

Em alguns casos a catálise ácida funcionou muito bem, e diversos testes reacionais foram feitos a fim de se encontrar a melhor condição reacional para cada reação, ou grupo de reações. Foram testados diferentes solventes, temperaturas, tempos reacionais e valores de pH tanto para a síntese do ligante, quanto para a síntese do complexo.

Após vários testes, desenvolveu-se uma metodologia que passou a ser usada em todos os casos de preparação de ligantes imínicos derivados da isatina. Utilizou-se reação sem aquecimento, com valor de pH bastante controlado (5,5 para a preparação do ligante, e após a adição do metal, elevou-se o valor à cerca de 7,5-8,0), em meio etanólico, e em geral sem o isolamento prévio do ligante formado. Assim, foram preparados 5 complexos imínicos ou diimínicos derivados da isatina, sendo que em um deles, o ligante é a própria isatina, obtido para fins de comparação espectroscópica e de reatividade. As aminas usadas na condensação foram: etilenodiamina (*en*), 1,3-propileno diamina (*pn*), 2-(2-aminoetil)piridina (*epy*), hidrocloreto de histamina (*hist*) e 8-aminoquinolina (*amiquin*). Os compostos preparados, todos sólidos cristalinos variando da coloração marrom escuro à marrom claro, estão descritos no Esquema I.1.

Esquema I.1. Estruturas propostas para os compostos de cobre(II) da classe das isatinas preparados.

1.3.1.2. Estequiometria dos Compostos

As estruturas no Esquema I.1., para os complexos de cobre(II) preparados com os ligantes da classe das isatinas, foram inicialmente propostas de acordo com os resultados de análises elementares indicando os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN), expressos na Parte Experimental. Posteriormente estas estruturas foram corroboradas por resultados obtidos através de outras técnicas.

A análise do teor de cobre nas amostras desses compostos foi feita por espectrometria de plasma, mas não se obteve um resultado reprodutivo na chama e a análise vinda deles não foi, desta forma, confiável. A metodologia utilizada para a abertura da amostra, utilizando-se ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio não geraram resultados reprodutíveis, talvez por uma possível precipitação dos íons de cobre presente, não chegando estes ao aparelho para a medição. Entretanto, em geral a análise CNH dos compostos indicou valores dentro de uma faixa razoável de erro.

No caso do composto **2**, $[\text{Cu}(\text{isa-en})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$, o esperado seria a formação de uma unidade de etilenodiamina (*en*), para duas de isatina, formando um composto diimínico. Mas ocorreu a formação de um composto ainda mais interessante, visto que um composto do tipo quelante diimínico já fora obtido com o composto **1**. Ocorreu a formação da base de Schiff apenas de um lado da etilenodiamina, com uma unidade de isatina, gerando um composto imínico com um grupo NH_2 livre e uma posição mais lábil na coordenação do íon cobre(II).

1.3.1.3. Medidas de Condutividade Molar

Como técnica complementar para a elucidação da estequiometria dos complexos obtidos, foram realizadas medidas de Condutividade Molar. A condutância de uma solução resulta da soma das contribuições de todos os íons presentes nesta. Embora todos os íons presentes contribuam para a condução da corrente, a fração da corrente transportada por uma dada espécie iônica depende de sua concentração relativa e da facilidade com que se movimenta no meio, sua mobilidade. Desta maneira, a condutância específica de um dado eletrólito varia com sua concentração. No caso de um eletrólito forte, a condutância específica aumenta fortemente com a concentração. Em contrapartida, as condutâncias específicas de eletrólitos fracos aumentam muito gradualmente. Em ambos os casos, o aumento da condutância é

devido ao incremento do número de íons por unidade de volume da solução. Portanto, a medida de condutividade é utilizada na determinação da quantidade e/ou proporção de espécies iônicas presentes em solução ¹⁵⁷. Prepararam-se soluções aquosas e metanólicas dos complexos estudados, com concentrações de 1.00×10^{-3} M, usando solução de KCl 1.00×10^{-3} M e constante de célula 1.1 cm^{-1} (25°C) como padrão de calibração, e utilizando eletrodos adequados tanto à soluções aquosas quanto à soluções orgânicas (a separação entre eles varia de uma solução para outra). As medidas foram expressas como $\Lambda_M = 1000 \times \Lambda_{(\text{medida no condutivímetro})} / [\text{Concentração}]$. Os resultados obtidos são mostrados na Parte Experimental e foram comparados com os valores aceitáveis de condutividade molar para alguns eletrólitos, em diferentes solventes, conforme descrito na Tabela I.1. ¹⁵⁷:

Tabela I.1. Valores aceitáveis de condutividade molar (Λ_M) para alguns eletrólitos em diferentes solventes orgânicos, em solução 1.00×10^{-3} M, a 25°C ¹⁵⁷.

Solvente	Tipo do eletrólito*			
	1:1	2:1	3:1	4:1
Nitrometano	75-95	150-180	220-260	290-330
Nitrobenzeno	20-30	50-60	70-82	90-100
Acetona	100-140	160-200	~270	~360
Acetonitrila	120-160	220-300	340-420	~500
Dimetilformamida (DMF)	65-90	130-170	200-240	~300
Metanol	80-115	160-220	290-350	~450
Etanol	35-45	70-90	120?	~160

* “carga” da solução. Ex: 2:1, proporção entre cátions e ânions.

Em solução aquosa, os valores aceitáveis de Λ_M são proporcionais ao tipo de eletrólito: 1:1 ~100, 2:1 ~200, 3:1 ~300 e 4:1 ~400 $\text{S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$. A diferença de condutividade de um íon verificada nos diversos solventes explica-se pelo fato de alguns solventes serem mais coordenantes que outros e de sua mobilidade variar com a natureza do solvente.

Os valores de condutividade molar obtidos estão dentro da faixa proposta para os complexos no estado sólido, cujas fórmulas estruturais foram previstas com base na análise elementar CHN dos mesmos. Para **1**, obtiveram-se os valores de 81,5 (em água) e 57,6 $\text{Scm}^2.\text{mol}^{-1}$ (em metanol); para **2**: 107,8 (em água) e 55,4 $\text{Scm}^2.\text{mol}^{-1}$ (em metanol); para **3**: 110,0 (em água) e 56,0 $\text{Scm}^2.\text{mol}^{-1}$ (em metanol); para **4**: 116 (em água) e 56,0 $\text{Scm}^2.\text{mol}^{-1}$ (em metanol); para **5**: 130,0 (em água) e 40,0 $\text{Scm}^2.\text{mol}^{-1}$ (em metanol); e para **6**: 41,4 $\text{Scm}^2.\text{mol}^{-1}$ (em água). Observou-se um fato curioso acerca destes complexos da série das isatinas, que somente após extensa análise destas estruturas pode-se compreender: pelas medidas de condutividade, todos

¹⁵⁷ W.J. Geary, *Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 81.

os seis complexos apresentaram estrutura monocarregada em solução, e não dicarregada (carga 2+) como foi observado na estequiometria de alguns deles, através dos resultados de análise CHN. Isso se explica pelo fato de que em solução tem-se o equilíbrio ácido-base, ou equilíbrio ceto-enólico inerente destas estruturas. Estes equilíbrios estão representados no Esquema 1.2, para o composto **1**, seguindo igual padrão para os demais.

Esquema 1.2. Equilíbrios envolvendo a estrutura do composto **1**:

No estado sólido, a fórmula molecular sugerida é aquela dada para a estrutura **1A**, com a carga 2+ e dois contra-íons perclorato. Em geral, estes complexos de cobre(II) precipitaram na forma de maior carga iônica (2+), e os que precipitaram na forma da carga mais baixa (1+), possuíam uma posição lábil, por onde se coordenou a água (ou outro solvente), e facilitou a formação de pontes entre as estruturas, estabilizando esta estrutura. Em solução, o equilíbrio ceto-enólico da estrutura ocorre, e ao passar à forma enol (**1B**), a estrutura perde o próton mais facilmente que na forma ceto, onde a carga negativa restante ficaria no átomo menos eletronegativo, o nitrogênio. O enolato remanescente anula então uma carga positiva do íon de Cu(II), e a carga total do complexo observada é 1+. Notou-se este comportamento nos três compostos da série das isatinas, com o favorecimento da forma intermediária em solução. A partir destes fatos, chega-se à conclusão que ao se variar

o valor do pH da solução, interfere-se no equilíbrio ceto-enólico intrínseco da estrutura destes compostos, e conseqüentemente varia-se drasticamente a geometria ao redor do íon metálico. Estas curiosas estruturas teriam, desta forma, a reatividade alterada apenas variando-se o valor do pH da solução que as contém. Estes compostos vieram ao encontro de nossos propósitos – sintetizar estruturas que apresentassem um tipo de equilíbrio interno semelhante ao equilíbrio ceto-enólico observado nos carboidratos, e assim avaliar estas novas estruturas como possíveis catalisadores adaptáveis, capazes de propiciar novos estudos neste campo, com modificações de geometria ao redor do íon metálico e conseqüentes mudanças de reatividade.

I.3.1.4. Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR)

Para caracterização espectroscópica destes complexos, fez-se a espectroscopia na região do infravermelho, UV-Vis e ressonância paramagnética eletrônica (EPR). A chamada radiação infravermelha (IR) corresponde à parte do espectro situada entre as regiões do visível e das microondas, entre 12800 e 10 cm⁻¹. A radiação infravermelha na faixa aproximada de 10000 a 100 cm⁻¹ quando absorvida, converte-se em energia de vibração molecular, em um processo que é quantizado. A frequência ou o comprimento de onda de uma absorção depende da massa dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria molecular ¹⁵⁸.

Os espectros vibracionais dos compostos imínicos e diimínicos da classe das isatinas foram registrados num intervalo do espectro eletromagnético de 400 a 4000 cm⁻¹, em um espectrômetro com transformada de Fourier, a partir de pastilhas preparadas por homogeneização e prensagem de 1-2mg da amostra, e 200mg de KBr anidro. As frequências das vibrações, características das ligações presentes nos complexos estudados, foram identificadas por comparação com frequências vibracionais características de cada grupo presente. A caracterização desses grupos funcionais presentes em cada composto através desta técnica foi muito útil na determinação estrutural do composto sintetizado, complementada com as demais técnicas. As bandas características de absorção no IV para cada composto e suas respectivas atribuições estão na Tabela I.2, de forma que se podem comparar os complexos sintetizados. Os espectros obtidos podem ser observados na Figura I.1 de A a F, respectivamente para os compostos de **1** a **6**.

A)

B)

C)

D)

E)

F)

Figura I.6. Espectros na região do infravermelho. A) $[\text{Cu}(\text{isa-pn})](\text{ClO}_4)_2$ (Composto 1); B) $[\text{Cu}(\text{isa-en})(\text{OH}_2)]\text{ClO}_4$ (Composto 2); C) $[\text{Cu}(\text{isa-epy})_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Composto 3); D) $[\text{Cu}(\text{isa-hist})(\text{OH}_2)](\text{ClO}_4)_2$ (Composto 4). E) $[\text{Cu}(\text{isa-amiquin})(\text{OH}_2)](\text{ClO}_4)$ (Composto 5); F) $[\text{Cu}(\text{isa})_2](\text{ClO}_4)$ (Composto 6). Todas as amostras foram feitas em pastilha de KBr, com resolução 4 cm^{-1} .

Tabela I.2. Bandas (em cm^{-1}) características observadas no espectro de IV dos compostos e suas atribuições.

Composto	νOH	νNH ou/e δNH	$\nu\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$	$\nu\text{C}_{\text{sp}^2-\text{H}}$ e $\delta\text{C}_{\text{sp}^2-\text{H}}$	$\nu\text{C}=\text{O}$	$\nu\text{C}=\text{N}$ base Schiff $^{\zeta}$	$\nu\text{C}=\text{N}$ anel isatina $^{\zeta}$	νClO_4 e δClO_4
(1)	3440	3447 - 3334	3102	2774 (faixa)	1734	1591	1616	1102 e 625
(2)	3433	3318-3272	2954	2954-2894	1709	1590	1618	1088 e 629
(3)	3438	3354	3081 (faixa)	3081-2995	1725	1597	1614	1094 e 624
(4)	3417 (OH e água)	1555	~ 3080	2974	/	1587	1616 (junto com imidazol)	1115 e 661
(5)	3409	3196 e 1511	/	/	1706	1590	1616	1084 e 628
(6)	/	3508 e 3423 (NH sec) e 1460	/	3191-2855	1730	/	1617	1093 e 661

ν = deformação axial (estiramento) simétrico ou assimétrico; δ = deformação angular. $^{\zeta}$ Estas duas atribuições podem estar trocadas.

A análise dos espectros de IV destes complexos mostra que os compostos apresentam bandas de estiramentos característicos de C=O, C=N, N-H e O-H, distintamente. Em todos estes complexos de cobre analisados, observam-se bandas de intensidade forte em torno de 3400 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos do grupo -OH da água presente na pastilha de KBr ou na esfera de coordenação, com exceção do complexo 6, onde este problema não ocorreu e pode-se verificar os estiramentos distintos do grupo N-H. Em todos os complexos, bandas referentes aos estiramentos C-H de grupos CH, CH₂ e CH₃ alifáticos e CH aromáticos encontram-se na região de 3070 a 2850 cm^{-1} , característica de cada carbono (sp, sp₂ ou sp₃). Entre 1200 e 740 cm^{-1} são encontradas várias bandas que podem ser atribuídas às deformações angulares (δ) de ligações C-H em cadeias alifáticas e deformações angulares fora do plano de C-H aromáticos, na região de identificação, onde aparecem muitas outras bandas. As bandas referentes às ligações entre cobre(II) e N alifático aparecem na região de 460 a 440 cm^{-1} ¹⁵⁹, Segundo dados da literatura¹⁶⁰, o estiramento da ligação Cu-imina(N) ocorre na faixa de frequência 390 a 300 cm^{-1} , o que não foi possível monitorar pelos espectros obtidos (até 400 cm^{-1}).

Na região entre 1240 e 1465 cm^{-1} , foram observadas bandas referentes às vibrações de estiramento C=C em anéis aromáticos (nos compostos que a possuíam), que podem aparecer nos complexos deslocadas para frequências maiores ou menores, com relação ao ligante livre, devido à coordenação ao íon metálico¹⁶¹. Mas devido a estas ligações C=C absorverem numa faixa de frequência onde também se observam outras bandas, como C-O, e outras da região de identificação (1500 - 400 cm^{-1}), elas muitas vezes estão encobertas ou sobrepostas. Na faixa de 1585 a 1665 cm^{-1} , aparecem bandas associadas aos estiramentos C=N. Estas bandas de absorção do C=N em geral situam-se em frequências maiores, e a observação delas numa frequência menor indica que o grupamento está coordenando ao metal (e a ligação C=N fica mais longa, com caráter C-N). Por esta razão, atribuiu-se a banda relativo ao C=N de menor valor à aquela da Base de Schiff, que está diretamente coordenada ao metal. Já a que ocorreu em região maior, foi atribuída à imina presente no anel da isatina, ou em anel piridínico (no caso de 3), ou juntamente com anel imidazol (no caso de 4), cujos estiramentos mantêm-se em uma faixa maior pois a ligação não participa da coordenação com o metal. Este estiramento imínico do anel da isatina foi identificado em 1614 - 1618 cm^{-1} , pois no espectro do composto 6, que tem somente esta imina e não é uma Base de Schiff foi possível atribuir com mais clareza este estiramento.

Este argumento, porém, pode não se aplicar para todo os casos devido a efeitos de ressonância e demais pontos de coordenação ao metal, e os valores atribuídos ao C=N da base de Schiff e ao C=N da piridina ou imidazol podem estar trocados. Para se obter informação mais exata sobre estes estiramentos, seria necessário marcar a molécula com deutério (sintetizá-la

¹⁵⁹ R. G. Xiong, B. L. Zuo, X. Z. You, *Polyhedron* 15 (1996) 903.

¹⁶⁰ D. W. Johnson, H. K. Mayer, J. P. Minard, J. Banaticla, C. Miller, *Inorg. Chim. Acta* 144 (1988) 167.

com ligantes deuterados em posições específicas), e por Raman ressonante, verificar os desdobramentos (aumento de linhas da região de cada uma das ligações C=N) em energias anteriores à que estas absorveriam, para se obter o efeito ressonante e verificar os efeitos nas respectivas bandas de absorção. Mesmo porque, a ligação N-H de amidas absorve na região de 1640-1550 cm^{-1} , em sua deformação, e a atribuição das bandas de absorção na região de 1680 a 1550 no espectro de IV fica muito difícil.

Apenas no caso do estiramento da ligação C=O da amida da isatina pode-se tirar alguma informação sem tantas dúvidas. Comparando-se todos estes complexos da série das isatinas 1 e 3, eles apresentam a estrutura no estado sólido predominantemente na forma CETO do ligante isatina-base de Schiff. Apenas o composto 4 foi observado possuir uma estrutura bastante predominante na forma ENOL, ao ser isolado no estado sólido. Pode-se afirmar isto, pois não foi observado nenhum estiramento relacionado a C=O no espectro deste composto. O estiramento de amida observado nos demais está num comprimento de onda maior que a comumente observada para cetonas comuns (1800-1750 cm^{-1}), mais especificamente para lactamas cíclicas de 5 membros (1730 cm^{-1}). Ou em número de onda menor, $\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$, no caso dos compostos 2 e 5, onde a carbonila está na forma de um intermediário entre C=O e C-O. No composto 6, observa-se o estiramento de carbonila, de lactama cíclica de 5 membros (1730 cm^{-1}), não se observa o estiramento de OH, e se observa o estiramento da ligação C=N do anel da isatina, levando-se a afirmar que este composto, na forma sólida, está como enolato. Conclui-se, desta maneira, que quando sólido, os compostos 2, 5 e 6 estão predominantemente na forma ENOL, o composto 4 está totalmente na forma ENOL, e os compostos demais (1 e 3) estão predominantemente na forma CETO. Apesar de se verificar que no estado sólido esta classe de complexo pode se apresentar em ambas as formas, há nitidamente a predominância de uma das formas, para cada composto. O equilíbrio ceto-enólico que apresentam ocorre muito rapidamente em solução (velocidade difusional do meio), mas, no estado sólido, verifica-se a predominância da forma mais estável para cada caso, isto é, nas condições em que o composto foi isolado. Como anteriormente verificado, precipitaram as estruturas de maior carga iônica, com exceção dos complexos com uma posição lábil, onde talvez a presença de pontes entre as estruturas estabilize o composto formado na carga mais baixa.

As bandas referentes ao estiramento e à deformação do ânion ClO_4^- , a 1095 e 625 cm^{-1} , confirmam a sua posição de contra-íon, não coordenado à esfera interna do cobre(II), estando na simetria T_d ¹⁶². No caso dos compostos 1 e 4, estas bandas estão mais deslocadas para frequências maiores, podendo indicar a formação de ligações de hidrogênio neste caso. Caso houvesse um abaixamento de simetria do perclorato com a sua coordenação ao centro de cobre(II) isso se verificaria por mudanças destas bandas.

¹⁶¹ F. A. Botino, P. Finochiero, E. Libertini, *J. Coord. Chem.* 16 (1988) 341.

Analisando as estruturas destes complexos cujos ligantes são derivados de indois, que apresentam um equilíbrio ceto-enólico (ou ceto-aminólico) intrínseco, o espectro de IV poderia causar dúvidas e não corroborar com os resultados de análise elementar e de medida de condutividade. Este equilíbrio ocorre muito rapidamente em solução (velocidade difusional do meio), onde a estrutura está ora em uma forma, ora noutra. No Esquema I.3 podem-se observar estas estruturas, e suas predominâncias no estado sólido, para cada composto, de acordo com as conclusões extraídas da análise de IV.

Esquema I.3. Estruturas dos compostos 1 - 6 no estado sólido (espécie predominante) e seus equilíbrios em solução.

¹⁶² a) A. M. Ramadan, M. M. E. Nagggar, *J. Inorg. Biochem.* 63 (1996) 143; b) K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectroscopy of Inorganic and Coordination Compounds*, 5^a ed. (1997) J. Wiley, Nova York.

I.3.1.5. Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Desde o século XX, métodos espectroscópicos proporcionaram estudos rigorosos através da elaboração de teorias em relação à estrutura eletrônica de complexos de metais de transição. A Teoria do Campo Ligante forneceu a base para o entendimento dos termos espectroscópicos observados nas estruturas eletrônicas dos metais de transição, e o advento da Mecânica Quântica forneceu as bases teóricas para o surgimento da Teoria de Orbitais Moleculares, e praticamente toda estrutura pôde ser explicada minuciosamente. Deste modo, a espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV/Vis) tornou-se uma técnica eficaz de nos fornecer informações importantes acerca da estrutura eletrônica de complexos metálicos, e também outros compostos puramente orgânicos. A absorção molecular na região do UV/Vis do espectro depende da estrutura eletrônica da molécula. Esta absorção de energia quantizada conduz os elétrons de orbitais no estado fundamental para orbitais de maior energia em um estado excitado.

Os complexos de cobre(II), com configuração d^9 , apresentam invariavelmente uma geometria octaédrica, com distorção tetragonal. Esse fato é consequência do princípio de Jahn-Teller, que prevê a perda de degenerescência para sistemas não lineares, sempre que ocorrer ganho de energia. Um complexo d^9 octaédrico é degenerado, pois o elétron desemparelhado pode ocupar tanto o orbital $d_{x^2-y^2}$ como o orbital d_{z^2} . As distorções tetragonais abaixam a energia da configuração d_{z^2} . A distorção com relação à geometria quadrado planar, onde o elétron fica no orbital d_{z^2} , estabiliza a molécula, e é responsável pela resposta extrema ao teorema de Jahn-Teller. É importante notar que este teorema refere-se à degenerescência das configurações quando os orbitais estão ocupados ¹⁶³.

Em virtude do efeito Jahn-Teller, os complexos de cobre(II) apresentam uma geometria D_{4h} alongada, com os ligantes axiais bastante afastados, favorecendo a coordenação no plano xy e convertendo-se com facilidade em estruturas quadrado planares, de acordo com o diagrama de níveis de energia apresentado na Figura I.2. Por outro lado, no estado reduzido, complexos de

¹⁶³ D.F. Shriver, P.W. Atkins, C.H. Langford, "Inorganic Chemistry", Oxford Univ. Press (1992).

Cu(I) d^{10} com camada totalmente preenchida têm preferência por geometrias tetraédricas, que garantem maior estabilização pela EECL (Energia de estabilização do campo ligante), que para complexos d^5 e d^{10} é zero. O estado de energia fundamental do Cu(II) é dado por $M_L = L = 2$; $M_S = S = 1/2$; $2S + 1 = 2 \therefore {}^2D$. As transições eletrônicas devido ao desdobramento do campo ligante são entre os termos: ${}^2B_{2g} \leftarrow {}^2B_{1g}$ e ${}^2E_g \leftarrow {}^2B_{1g}$. Elas aparecem largas e sobrepostas em solução, e conforme o esperado, observa-se então somente uma banda na região do visível para os desdobramentos do cobre(II).

Alguns ligantes, como os compostos imínicos e diimínicos aqui estudados conseguem estabilizar ambos os estados de oxidação, sendo assim bons catalisadores e/ou miméticos de enzimas que contêm cobre no sítio ativo e que atuam em ciclos catalíticos envolvendo etapas redox. Frequentemente os compostos com estes ligantes apresentam estruturas intermediárias entre geometria piramidal e tetraédrica, minimizando mudanças conformacionais durante os ciclos catalíticos.

Figura I.2. – Diagrama de níveis de energia para o íon Cu(II) d^9 em vários campos ligantes ¹⁴.

Nos espectros UV/vis de complexos metálicos, as principais bandas de absorção registradas são atribuídas basicamente a três tipos de transições eletrônicas ¹⁶³. As absorções na região do ultravioleta, de alta energia, estão relacionadas com as transições internas dos ligantes, LT ($n \rightarrow \pi$ e $\pi \rightarrow \pi^*$), onde n é o orbital não ligante, π é 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 do ligante para o metal, LMCT ($\pi \rightarrow d\pi$)¹⁶⁴, e as de menor intensidade, na região do visível, são atribuídas às transições d-d. Para os ligantes orgânicos do tipo bases de Schiff, as transições LT $\pi \rightarrow \pi^*$, referentes aos grupos cromóforos C=N, C=C, são registradas na literatura¹⁶⁵ na região entre 196-313 nm, com coeficiente de absorvidade molar (ϵ), característico de cada complexo, maior que $10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, indicando transições totalmente permitidas pelas regras de seleção (Laporte e spin). Nos complexos, estas bandas podem sofrer deslocamentos devido à presença do íon metálico.

As bandas referentes às transições LMCT ($\pi \rightarrow d\pi$) aparecem na região de 320-450 nm, com ϵ característicos em torno de $10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e são comumente encontradas na maioria dos metais com alto estado de oxidação. Estas bandas também são totalmente permitidas pelas regras de seleção (Laporte e spin), e se caracterizam por intensas absorções na região espectral do visível e UV próximo¹⁶³. Os espectros eletrônicos dos compostos sintetizados foram registrados em soluções aquosas, com posterior determinação dos respectivos valores de absorvidade molar (ϵ). Esses espectros são apresentados na Figura I.3 (itens A a G) e os dados de λ e ϵ estão na Tabela I.3.

¹⁶⁴ G. Tabbi, W.L. Driessen, J. Reedijk, R.P. Bonomo, N. Ueldman, A.L. Spek, *Inorg. Chem.* 36 (1997) 1168.

¹⁶⁵ (a) M. Tumer, H. Koksall, S. Serin, *Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem.* 27(5) (1997) 775; (b) R.J. Hill, E.F. Rickard, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 40 (1978) 793; (c) T.G. Fawcett, E.E. Bernarducci, K.K. Jespersen, H.J. Schugar, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 2598.

C)

D)

E)

F)

G)

Figura II.3. Espectros eletrônicos no UV/Vis dos complexos da série da isatina. A) [Cu(*isa-pn*)](ClO₄)₂ (**1**): em solução aquosa; B) em solução de dimetilformamida (DMF), ampliação da região visível; C) [Cu(*isa-en*)(OH₂)]ClO₄ (**2**), em solução aquosa; D) [Cu(*isa-epy*)₂](ClO₄)₂·2H₂O (**3**), em solução aquosa; E) [Cu(*isa-hist*)(OH₂)](ClO₄)₂ (**4**), em DMSO; F) [Cu(*isa-amiquin*)(OH₂)](ClO₄) (**5**), em acetonitrila; G) [Cu(*isa*)₂](ClO₄) (**6**), em solução aquosa.

Tabela I.3. Caracterização das bandas observadas (nm) e valores de absorvidade molar (ε) dos complexos.

Composto	LT - λ _{max} / nm (ε/ M ⁻¹ cm ⁻¹)	LMCT - λ _{max} / nm (ε/ M ⁻¹ cm ⁻¹)	d-d - λ _{max} / nm (ε/ M ⁻¹ cm ⁻¹)
[Cu(<i>isa-pn</i>)](ClO ₄) ₂ (1) em água e CH ₃ CN para d-d	242 (5.12x10 ³)	303 (2.71x10 ³) 434 (1.55x10 ³)	687 (151)*
[Cu(<i>isa-en</i>)(OH ₂)]ClO ₄ ·(H ₂ O) ₂ (2) em água	207 (9.11x10 ³) 242 (8.86x10 ³)	298 (2.21x10 ³) 456 (536)	675 (188)
[Cu(<i>isa-epy</i>) ₂](ClO ₄) ₂ ·(H ₂ O) ₂ (3) em água	206 (1.28x10 ³) 247 (5.57x10 ³)	406 (1.15x10 ³)	NO
[Cu(<i>isa-hist</i>)(H ₂ O)](ClO ₄) ₂ (4) em DMSO	264 (9.50x10 ³)	383 (5.66x10 ³) 452 (4.01x10 ³)	NO
[Cu(<i>isa-amiquin</i>)(H ₂ O)](ClO ₄) (5) em CH ₃ CN	205 (6.68x10 ⁴) 252 (3.31x10 ⁴)	320 (9.12x10 ³) 458 (1.02x10 ³)	547 (527)
[Cu(<i>isa</i>) ₂](ClO ₄) (6) em água	208 (6.35x10 ⁴) 242 (1.34x10 ⁴)	302 (6.39x10 ³) 415 (1.66x10 ³)	NO

NO = não observada ou encoberta

Como esperado, para todos os complexos as bandas de LT apareceram na região do UV distante, de 200 a ~300 nm. As transições LMCT para os compostos cujos ligantes contêm grupos aromáticos e imínicos foram bem evidentes, e caracterizadas por intensas absorções ($\epsilon > 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). É interessante notar as semelhanças nos valores de λ_{max} para as transições LT e LMCT entre os compostos desta classe das isatinas.

As bandas concernentes às transições d-d destes complexos de cobre(II) coordenados a ligantes contendo nitrogênio e oxigênio como átomos doadores, apresentam absortividade molar (ϵ) menor que $100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ¹⁶⁶, para os complexos 1 e 2. As absorções d-d deslocadas no sentido da região de menor energia (maiores comprimentos de onda, λ), indicam distorções tetraédricas na geometria quadrado planar ao redor do íon de cobre(II)¹⁶⁷, e os valores de ϵ superiores a $100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ indicam a ausência de centrossimetria (i)¹⁶⁸. Observou-se este fato mais especificamente no complexo 5, dentre os que tinham a banda d-d observável, a 550 nm, com uma estrutura próxima à de uma pirâmide de base quadrada, pois apresentou um valor de absortividade molar alto, bem acima de $100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Nos demais complexos a banda d-d não foi observada claramente, devido a encobrimentos.

I.3.1.6. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) é uma técnica de exploração extremamente poderosa para estruturas eletrônicas de materiais que contenham elétron desemparelhado. Há várias técnicas de EPR, cada uma com vantagens distintas. A mais popular, devida à sua viabilidade, é a espectroscopia EPR de onda contínua, onde a radiação de microondas (GHz) é aplicada à amostra continuamente¹⁶⁹. A espectroscopia EPR é então aplicada a vários metais de transição e a espécies radicalares. O EPR é um complemento muito útil à espectroscopia RMN, que não pode ser usada em amostras paramagnéticas (a constante de acoplamento spin-órbita do elétron é muito maior do que a constante de acoplamento spin-órbita do núcleo, e se sobrepõe a este). Mas ambas dependem do momento magnético associado com o spin da partícula, ou o elétron ou o núcleo. Para um spin de $\frac{1}{2}$, os dois estados produzidos pela interação com um campo magnético, B, diferem em energia por:

$$\Delta E = g \mu B \quad (1)$$

onde o valor de g depende da identidade da partícula, e μ é o momento magnético. Para o elétron livre, g é 2.0023, enquanto para o próton é 5.5856. Os momentos magnéticos para o elétron e para o núcleo diferem bastante devido à dependência com a massa, que é:

¹⁶⁶ F.A. Cotton, G. Wilkinson, "Advanced Inorganic Chemistry", 5th ed. John Wiley & Sons (1988) 765.

¹⁶⁷ a) S.J. Gruber, C.M. Harris, E. Sinn, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 30 (1968) 1805; b) R. L. Belford, T.S. Piper, *Mol. Phys.* 5 (1962) 251.

¹⁶⁸ U. Mukhopadhyay, L. Govindasamy, K. Ravikumar, D. Velmurugan, D. Ray, *Inorg. Chem. Commun.* 1 (1998) 152.

¹⁶⁹ F.E. Mabbs, *Chem. Soc. Rev.* (1993) 313.

$$\mu = e h / 4 \pi m \quad (2)$$

e assim o μ_B para o elétron (magneton de Bohr) é $9,274 \times 10^{-24} \text{ JT}^{-1}$, e para o núcleo μ_N é $5,051 \times 10^{-27} \text{ JT}^{-1}$. Este fator é responsável pela diferença nas frequências características ($\Delta E = h\nu$) e na sensibilidade dos dois métodos. O espectro de EPR depende dos valores de g da amostra, que diferem do elétron livre pelo ambiente químico próximo ao átomo paramagnético. Isto é normalmente feito fixando-se uma frequência, geralmente de 9 GHz (banda X do radar marinho), e variando o campo aplicado. É importante notar que no RMN é o oposto que acontece ¹⁷⁰. As linhas observadas num espectro 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), aparecendo na região de $B = 3000 \text{ G}$ ($g \sim 2$). A unidade comumente usada para expressar o campo magnético em espectroscopia EPR é Gauss (G) ou Tesla (T) onde $10^{-4} \text{ T} = 1 \text{ G}$. A interação análoga com átomos dos ligantes, geralmente muito pequena, gera a chamada estrutura super-hiperfina. O espectro apresenta-se usualmente com muitas linhas, porque ambos os valores de g e das 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, e a equação (1) ganha mais o fator da constante hiperfina $A \rightarrow$

$$h\nu = g \mu H \pm 1/2 A m_I \quad (3)$$

onde: h é a constante universal de Planck, ν a frequência da radiação, A a constante de desdobramento hiperfino e m_I são vários valores de momento orbital I (+1, 0, -1). Na Tabela I.4 estão apresentados alguns núcleos mais comuns em bioinorgânica e seus respectivos momentos magnéticos ¹⁷¹.

Tabela I.4. Principais núcleos com seus momentos magnéticos:

Núcleo	Spin	Nº de linhas	Desdobramento (Gauss)
¹ H	1/2	2	0 - 6
¹⁴ N	1	3	0 - 20
¹⁹ F	1/2	2	0 - 30
⁶³ Cu	3/2	4	20 - 200
⁶⁵ Cu	3/2	4	20 - 200
⁹⁵ Mo	5/2	6	40
⁹⁷ Mo	5/2	6	40
⁵⁵ Mn	5/2	6	95
⁵¹ V	7/2	8	20 - 200

¹⁷⁰ R.V. Parish, "NMR, NQR, EPR and Mössbauer Spectroscopy in Inorganic Chemistry", Ellis Horwood Lim. (1990), 223p.

¹⁷¹ P.F. Knowles, D. Marsh, H.W.E. Rattle, "Magnetic Resonance of Biomolecules", John Wiley & Sons (1976), 343p.

Em muitos casos, as posições e os desdobramentos das linhas (especificados pelos valores de g e das constantes hiperfinas (A) dependem da direção do campo magnético com relação aos eixos moleculares, isto é, da simetria molecular. 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 $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$. Para orientações intermediárias, os valores de g e de A dependem do ângulo que o campo magnético faz com os principais eixos. Se amostras monocristalinas são disponíveis, estudos de orientação angular podem dar informações valiosas. Porém o mais usual é obter-se o espectro de pó policristalino. Neste caso o espectro apresenta todas as diferentes direções superpostas e um espectro complicado é observado, com linhas mais largas e distorcidas ¹⁷⁰. Compostos dimetálicos (com ambos os metais paramagnéticos) com acoplamento antiferromagnético apresentam desdobramento hiperfino na região ~ 1500 G ($g \sim 4$), correspondentes às transições com $(\Delta M_s = \pm 2)$ ¹⁷². Estas transições são de baixa probabilidade, por serem proibidas por spin.

Deste modo, a interpretação dos valores do parâmetro g , das constantes de interação hiperfina (A), das constantes hiperfinas isotrópicas e a anisotropia espectral permitem obter informações valiosas sobre a configuração eletrônica de íons metálicos paramagnéticos, seu estado de oxidação e suas características estruturais, como por exemplo, distorções ao redor do íon ¹⁷¹. Com este intuito, espectros de EPR dos complexos de Cu(II) preparados foram obtidos na banda X, $\sim 9,3$ GHz (Figura I.4, espectros de A a F) e os parâmetros g e as constantes hiperfinas A estão especificados na Tabela I.5 para os complexos da classe das isatinas, assim como a relação entre eles. A absorção de energia gera um espectro que normalmente é registrado na forma de 1ª derivada.

Figura I.4. Espectros de EPR, todos a 77K. A) $[\text{Cu}(\text{isa-pn})](\text{ClO}_4)_2$ (**1**) 1mM, em solução MeOH:H₂O (4:1, v:v, pH~5), a ganho: 2.00×10^4 , amplitude de modulação: 15G, constante de tempo: 20.48s, 1 scan; B) $[\text{Cu}(\text{isa-en})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ (**2**) 1mM, MeOH:H₂O (4:1, v:v), ganho: 3.64×10^4 , amplitude de modulação: 15G, constante de tempo: 20.48s, 1 scan; C) $[\text{Cu}(\text{isa-epy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (**3**) 1mM, MeOH:H₂O (4:1, v:v), ganho: 2.00×10^4 , amplitude de modulação: 15G, constante de tempo: 20.48 s, 1 scan; D) $[\text{Cu}(\text{isa-hist})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ (**4**) 0.5mM, CH₃CN:acetona (1:1, v:v), ganho: 2.52×10^4 , amplitude de modulação: 15G, constante de tempo:

10.24s, 8 scans; E) $[\text{Cu}(\text{isa-amiquin})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$ (**5**) 1mM, MeOH:H₂O (4:1, v:v), ganho: 2.52×10^4 , amplitude de modulação: 15G, constante de tempo: 10.24s, 1 scan; F) $[\text{Cu}(\text{isa})_2](\text{ClO}_4)$ (**6**) 1mM, MeOH:H₂O (4:1, v:v), ganho: 6.32×10^3 , amplitude de modulação: 14G, constante de tempo: 10.24s, 1 scan.

Tabela I.5. Valores dos parâmetros tensor g e das constantes hiperfinas (A) dos compostos preparados, em solução Metanol : Água (4:1, v:v) para os compostos **1**, **2**, **3**, **5** e **6**, ou CH₃CN:acetona (1:1, v:v) para o composto **4**, a 77K (Dewar com N₂ líquido). DPPH (difênil picril hidrazil) foi usado como padrão de referência.

Composto	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$A_{\perp}$ (G)	$A_{\parallel}$ ($\times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$)	$g_{\parallel} / A_{\parallel}$ (cm)
$[\text{Cu}(\text{isa-pn})](\text{ClO}_4)_2$ (1)	2.091	2.421	14.2	132.8	183
$[\text{Cu}(\text{isa-en})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2)	2.059	2.281	28.5	224.9	102
$[\text{Cu}(\text{isa-epy})_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3)	2.082	2.503	15.8	135.4	188
$[\text{Cu}(\text{isa-hist})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ (4)	2.034	2.380	42.8	149.0	159
$[\text{Cu}(\text{isa-amiquin})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$ (5)	2.065	2.300	24.5	172.9	133
$[\text{Cu}(\text{isa})_2](\text{ClO}_4)$ (6)	2.087	2.270	17.3	168.7	135

Os complexos de cobre estudados apresentaram simetria axial (em solução), ou seja, o ambiente ao redor do íon cobre no eixo z é diferente do ambiente nos eixos xy , que são iguais, e o parâmetro $g_{\parallel}$ tem maior valor do que o $g_{\perp}$. Deste modo, determinaram-se os parâmetros $g_{\parallel}$ e $g_{\perp}$, e as constantes $A_{\parallel}$ e $A_{\perp}$, comparando-os com valores conhecidos para íons de cobre(II) em complexos semelhantes e proteínas afins, sendo possível obter-se a geometria ao redor do íon metálico para estes compostos de um modo bem preciso. A relação empírica $g_{\parallel} / A_{\parallel}$ (cm) tem sido usada para caracterizar complexos miméticos da proteína SOD (superóxido dismutase), e fornece um indicativo da distorção ao redor do metal. Se esta razão for de 105-135 cm, a geometria observada ao redor do íon é mais corretamente descrita como quadrado planar, e se for >250 cm, a geometria é mais tetraédrica¹⁷³. Para orientações intermediárias, os valores de g e de A dependem do ângulo que o campo magnético faz com os principais eixos da molécula.

Estes complexos de cobre(II) preparados apresentaram comportamento típico destes íons, com bandas em ~3100G. Fazendo-se uma correlação entre a geometria e a relação $g_{\parallel} / A_{\parallel}$ (cm), observa-se que os complexos **2**, **5** e **6** apresentam esta relação como 102, 133 e 135 cm, sugerindo que a geometria ao redor do íon cobre é quase quadrado planar, principalmente no caso do composto **2** $[\text{Cu}(\text{isa-en})]^+$, ou bem próxima disso. Este resultado corrobora dados anteriores obtidos através de espectroscopia UV/vis, onde os compostos **2** e **5** apresentaram valores de ϵ foram bem acima de $100 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (especialmente o **5**), e menores valores de λ_{max} d-d, indicando uma perda de centrosimetria, com uma estrutura próxima à pirâmide de base

¹⁷³ J. Muller, K. Felix, C. Maichle, E. Lengfelder, J. Strachle, F.U. Weser, *Inorg. Chim. Acta* 233 (1995) 11.

quadrada. Os demais complexos de cobre apresentaram a relação $g_{||} / A_{||}$ entre 159 e 188 cm, indicando geometrias de distorções significativas ao redor do íon cobre, possibilitando geometrias mais aproximadamente tetraédricas nos valores maiores (188 cm, composto 3 e 183, composto 1) e geometria com distorções intermediárias no caso de valores menores (159 cm, composto 4). No caso do composto 4, apesar de não ser observada a banda d-d, analisou-se sua geometria pelo EPR, indicando uma espécie com configuração intermediária entre pirâmide de base quadrada e tetraédrica ao redor do Cu(II).

I.3.1.7. Espectrometria de Massa Electrospray (ESI-MS) e MS-MS

Na técnica de impacto de elétrons, mais comumente usada, um espectrômetro de massa bombardeia moléculas na fase vapor com um feixe de elétrons de alta energia e registra o resultado do impacto dos elétrons como um espectro de íons separados baseados na razão massa/carga (m/z). Os espectrômetros de massa podem ser classificados segundo o método de separação dos íons: a) deflexão em campo magnético, onde os íons formados na fonte são defletidos em curva por um campo magnético e focalizados no detector; b) filtro de massas com quadrupolo, que utiliza quatro barras sujeitas a uma diferença de potencial; c) tempo de voo (ToF), onde as partículas de carga unitária submetidas a uma diferença de potencial V atingem a mesma energia translacional em elétrons-Volt (eV), e deste modo, as partículas mais leves têm um tempo de voo menor que partículas maiores para uma dada distância.

Até o início da década de 80, a Espectrometria de Massa (EM ou MS) era aplicada somente a compostos orgânicos voláteis e termoestáveis. A volatilidade limitada e a 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 trazidos para a fase gasosa e ionizados. No entanto, o desenvolvimento de técnicas como MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), introduzida por Hillenkamp e Karas¹⁷⁴ e ESI (Electron Spray Ionization), por Fenn¹⁷⁵, permitiu um grande avanço em EM. Classes de compostos que não eram compatíveis com os métodos de ionização utilizados como, proteínas, peptídeos, compostos organometálicos e de coordenação¹⁷⁶, além de sistemas mais complexos como bactérias e vírus, podem ser facilmente ionizadas e terem suas massas analisadas¹⁷⁷.

O interesse científico na técnica de Eletrospray (ESI) ocorreu quando John Fenn demonstrou a sua capacidade de analisar proteínas de alto peso molecular. A técnica de

¹⁷⁴ M. Karas, F. Hillekamp, *Anal. Chem.* 60 (1988) 2299.

¹⁷⁵ a) M. Yamashita, J.B. Fenn, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 4451; b) J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, *Science* 264 (1989) 64.

¹⁷⁶ a) R. Colton, A. D'Agostinho, J.C. Traeger, *Mass Spectrom. Rev.* 14 (1995) 79; b) D.A. Plattner, *Int. J. Mass Spectrom.* 207 (2001) 125.

eletrospray possibilita a análise de compostos polares e/ou de alto peso molecular através da ionização destes compostos em solução, e de sua posterior transferência para a fase gasosa. Desta forma, moléculas multiprotonadas $(M+nH)^{n+}$ são formadas e as suas relações m/z medidas. Uma representação do espectrômetro de massas q-TOF é apresentada na Figura I.5.

Figura I.5. Espectrômetro de massas ESI-MS q-TOF (Waters).

O instrumento é composto de uma fonte de ionização por eletrospray, um quadrupolo, que é usado como filtro de íons, um hexapolo e um analisador de massas por tempo de voo (TOF – Time of flight). Esta configuração permite obter espectros de MS e MS/MS com alta resolução. Para um experimento de MS/MS, o íon de interesse é selecionado com resolução unitária no quadrupolo, colidido com um gás no hexapolo e os fragmentos iônicos têm suas massas determinadas com alta resolução pelo tempo de voo. Para experimentos de MS, os quadrupolos funcionam no modo “rf-only”, e os íons são analisados com alta resolução no ToF. O detector de massas é um MCP (Microchannel Plate), ou seja, uma série de multiplicadores de elétrons onde um simples elétron pode gerar um pulso de 10^7 ou mais elétrons na saída.

Estes avanços foram motivadores a utilizar a espectrometria de massa com a técnica ESI como ferramenta de análise e caracterização de muitos dos compostos preparados, já que uma técnica de resolução molecular não pode ser usada neles, como cristalografia de raios-X, pois não formaram monocristais apropriados, e RMN, pois compostos com átomos paramagnéticos como Cu(II) distorcem o campo magnético aplicado, gerando espectros com sinais sobrepostos e com as constantes de acoplamento ($^3J_{H-H}$ e $^2J_{H-H}$, por exemplo) não resolvidas.

Utilizou-se então a técnica de ionização eletrospray (ESI), operando em modo positivo, em um espectrômetro de massa quadrupolo de alta resolução, com analisador de tempo de voo

¹⁷⁷ *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, R. B. Cole (Ed.), Wiley, New York (1997).

ortogonal. A temperatura do nebulizador foi de 200°C e a voltagem do cone em torno de 40V. Os espectros MS-MS (espectroscopia tandem) foram adquiridos usando o íon selecionado no quadrupolo Q1, fazendo a sua dissociação (CID, Collision Induced Dissociation) com N₂ a energias de 15 eV em Q2, e seus fragmentos analisados no q-TOF. Os compostos assim estudados foram 1, [Cu(isa-pn)]²⁺, 2, [Cu(isa-en)]⁺, e 3, [Cu(isa-epy)]²⁺, com o analisador por tempo de voo q-TOF. Para os compostos 4, [Cu(isa-hist)]²⁺, 5 [Cu(isa-amiquin)]⁺ e 6, [Cu(isa)₂]⁺, utilizou-se como analisador um quadrupolo simples (ao invés de um q-TOF), que apesar de não ter alta resolução como o q-TOF, proporcionou o padrão de fragmentação adequado destes compostos, que puderam então serem comparados. Os padrões de fragmentação foram estudados com base nos seus respectivos espectros de massa e CIDs.

A Figura I.6 mostra o espectro de massa ESI de íon positivo de 1, adquirido em uma solução de acetonitrila:água (1:1, v:v). Como o cobre apresenta dois isótopos abundantes [⁶³Cu (69.2%) e ⁶⁵Cu (30.8%)], em uma razão de abundância de 1:0.44, o complexo catiônico intacto foi detectado como um “cluster” isotopomérico de íons unicamente carregados, centrados em m/z 395 (para ⁶³Cu) com o segundo íon mais abundante a m/z 397 (devido ao ⁶⁵Cu), e com um padrão isotópico que concorda com o calculado para C₁₉H₁₆CuN₄O₂⁺ (Figura I.6.b). Notou-se que no curso da ionização, o complexo duplamente carregado C₁₉H₁₆Cu(II)N₄O₂²⁺ reduziu-se ao unicamente carregado Cu(I), formando C₁₉H₁₆Cu(I)N₄O₂⁺, um processo de redução de carga comum para cátions metálicos gasosos altamente carregados sob as condições do ESI¹⁷⁸. A seleção do cluster unicamente carregado dos íons C₁₉H₁₆Cu(I)N₄O₂⁺ e sua dissociação induzida por colisão (CID) com nitrogênio a energia de 15 eV no experimento espectrométrico de massa Tandem (MS/MS), revelou um diagnóstico estrutural e revelou um comportamento de dissociação muito interessante, como descrito no Esquema I.4. A dissociação ocorre principalmente na “ponte” propileno N-(CH₂)₃N : um deslocamento de [1,3-H] é acompanhado por uma quebra na ligação N-C1, que forma ambos os derivados N-metil e N-vinil da isatina. Conseqüentemente, ambos os fragmentos neutros da isatina competem pelo Cu⁺ para formar os dois principais e abundantes fragmentos de ⁶³Cu/⁶⁵Cu contendo os íons com m/z 223 (225) e 235 (237), com seus característicos padrões isotópicos de cobre.

¹⁷⁸ a) J. Griep-Raming, S. Meyer, T. Bruhn, J.O. Metzger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **41** (2002) 2738. b) R. Arakawa, S. Tachiyashiki, T. Matsuo, *Anal. Chem.* **67** (1995) 4133.

(a)

Cuisapn (CH₃CN : H₂O) 1:1

cobre5 120 (3.534) Cm (120:155)

(b)

Cuisapn (MEOH : H₂O) 1:1

cobre (0.028) Is (1.00,1.00) C₁₉H₁₆CuN₄O₂

TOF MS ES+ 5.48e12

(c)

Cuisapn (CH₃CN : H₂O) 1:1

cobre6 45 (1.255) Cm (45:104)

TOF MSMS 395.00ES+ 2.98e4

Figura I.6. (a) Espectro de MS ESI em modo positivo do composto 1; (b) Comparação entre o espectro teórico (superior) e experimental (inferior); (c) Espectro de MS/ MS do íon de m/z 395.

Esquema I.4. Padrão de fragmentação proposto ao composto **1**.

Sob as mesmas condições de ionização de **1**, os compostos **2** e **3** foram estudados, e mostraram comportamento análogo ao **1**, indicando que os compostos desta série possuem mesmo um tipo interessante de fragmentação padrão. Na análise do complexo **2**, o fato que se mostrou bastante interessante é que a quarta posição da coordenação do cobre é lábil, ou seja, coordena-se com acetonitrila ou metanol, dependendo do solvente usado na ionização. A Figura I.7.a (e sua expansão I.7.b), com o espectro adquirido em uma solução de acetonitrila:água (1:1, v:v) mostra o complexo catiônico intacto com CH_3CN na quarta posição do cobre, de m/z : 293.03, com o cobre apresentando o padrão isotópico que concorda com o calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{CuN}_4\text{O}^+$ (Figura I.7). A Figura I.7.d e I.7.e mostram os espectros MS/MS para o íon m/z 293 e m/z 252, em $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$ e $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$, respectivamente.

(a)

(b)

Cuisaen (CH₃CN : H₂O) 6:4

cobre7 174 (4.926) Cm (162:218)

TOF MS ES+
1.39e4

(c)

Cuisaen (CH₃CN : H₂O) 6:4

cobre7 (0.028) Is (1.00,1.00) C₁₂H₁₄CuN₄O

TOF MS ES+
5.94e12

(d)

Cuisaen (CH₃CN : H₂O) 6:4 CID 293

cobre8 54 (1.505) Cm (30:95)

TOF MSMS 293.00ES+
1.21e4

(e)

Figura I.7. (a) espectro de MS ESI em modo positivo de **2**; (b) expansão da região de m/z 200 a 340; (c) comparação entre os espectros teórico (superior) e experimental (inferior); (d) espectro de MS/ MS do íon de m/z 293; (e) espectro de MS/ MS do íon de m/z 252.

O padrão de fragmentação do composto **2** está sugerido no Esquema I.5, e foi proposto com base nos espectros de fragmentação MS/MS (CID) dos íons m/z 293 e 252. Diferentemente da fragmentação do composto **1**, a dissociação neste caso ocorre na estrutura da isatina, não só na “ponte” etileno N-(CH₂)₂N. A formação de uma estrutura tensionada, com anéis de 4 membros é também sugerida.

Esquema I.5. Padrão de fragmentação proposto para o composto **2**.

Na análise do complexo **3**, observou-se que o seu padrão de fragmentação é igualmente interessante, sem a formação de uma estrutura tensionada, mas com a formação de uma estrutura muito estabilizada por ressonância, com a formação preferencial do complexo de cobre nesta estrutura. Os espectros de MS-ESI em $CH_3CN:H_2O$, a comparação entre o espectro obtido e o esperado, e o espectro MS/MS do íon m/z 563 estão apresentados na figura I.8, e o padrão de fragmentação está proposto no esquema I.6. No complexo **3**, um composto de Cu^{2+} , que é um íon de camada aberta, perde hidrogênio radicalar para se tornar um composto de íon de camada completa, Cu^+ . A perda de H^+ posteriormente reduz o estado de carga do complexo, formando um fragmento muito estável.

(a)

Cuisaepy (CH₃CN : H₂O) 6:4

cobre11 242 (6.949) Cm (157:275)

TOF MS ES+
1.09e4

(b)

Cuisaepy (CH₃CN : H₂O) 6:4

cobre11 (0.028) Is (1.00,1.00) C₃₀H₂₄N₆O₂Cu

TOF MS ES+
4.82e12

(c)

Cuisaepy (CH₃CN : H₂O) 6:4 CID 563

cobre12 66 (1.838) Cm (21:94)

TOF MSMS 563.00ES+
1.48e3

Figura I.8. (a) espectro de MS ESI em modo positivo de **3**; (b) comparação entre os espectros teórico (superior) e experimental (inferior); (c) espectro de MS/ MS do íon de m/z 563.

Esquema I.6. Padrão de fragmentação proposto ao composto **3**.

Na análise da fragmentação dos demais três compostos da série, utilizou-se o ionizador electrospray (ESI), mas com o detector Quadrupolo apenas, não mais o q-TOF. Neste caso, não há a precisão necessária para complexos de coordenação, onde cargas estão envolvidas, e é pela diferença de m/z entre os picos de um mesmo cluster que se determina qual a carga daquele referido fragmento. Mas, como os padrões de fragmentação já eram conhecidos para estes compostos, obteve-se um espectro razoavelmente de fácil análise, onde os fragmentos principais puderam ser sugeridos.

Os espectros dos compostos **4**, **5** e **6** são mostrados na Figura I.9, enquanto que suas fragmentações propostas estão no Esquemas I.7, I.8 e I.9 respectivamente.

(a)

(b)

(c)

Figura I.9. (a) espectro de ESI-MS com detector Quadrupolo, em modo positivo de **4**; (b) espectro de MS ESI com detector Quadrupolo, em modo positivo de **5**; (c) espectro de MS ESI com detector Quadrupolo, em modo positivo de **6**. Em todos os casos, usou-se como solvente uma mistura de CH₃CN:H₂O, 4:1, v:v.

Esquema I.7. Padrão de fragmentação proposto para o composto **4**.

Esquema I.8. Padrão de fragmentação proposto para o composto **5**.

Esquema I.9. Padrão de fragmentação proposto para o composto **6**.

No caso da análise de massa electrospray dos compostos 4, 5 e 6, apenas foi possível afirmar que a carga dos fragmentos era 1+ ou 2+, pois se tratava de um único íon de cobre em cada cluster. Isso devido ao fato do analisador de massa, o setor quadrupolar, não ser de alta resolução. Foi importante também identificar que os íons formados correspondem à espécie proposta e, mesmo sendo de baixa resolução os espectros de massa, é possível afirmar que se trata dos compostos em questão, com as estruturas propostas.

I.3.1.8. Eletroquímica

Com o objetivo de caracterizar melhor os sistemas estudados, principalmente obter maiores informações sobre o equilíbrio ceto-enólico, dos compostos da classe da isatina, foram feitos alguns estudos usando técnica eletroquímica. Foram feitos estudos preliminares de voltametria cíclica (VC) do composto **1**, $[\text{Cu}(\text{isa-pn})]^{2+}$, em solução de DMF, por ser mais solúvel em uma concentração maior. Este composto foi escolhido como modelo para o estudo eletroquímico. Utilizou-se uma célula eletroquímica constituída de um recipiente de vidro em cuja tampa são fixados um capilar para a entrada de argônio, e um eletrodo de referência Ag/AgCl em KCl 1,0 mol.L⁻¹ ($E^\circ = +0,222$ V vs EPH), um eletrodo de trabalho platina, e um eletrodo auxiliar (fio espiralado de platina). O voltamograma obtido está na figura I.10 a seguir.

Figura I.10. VC do composto **1** $[\text{Cu}(\text{isa-pn})]^{2+}$ com eletrodo de Pt em DMF (eletrólito KNO_3), 0,01 M.

Não foi possível determinar especificamente um potencial de meia onda de **1** (E°), por haver a presença de duas ondas de redução e duas de oxidação muito próximas. Porém, observa-se no voltamograma que aparentemente ele comporta-se como se houvessem duas espécies em solução, com a onda de redução e oxidação do cobre ($\text{Cu}^{1+/2+}$). A onda de oxidação

do ligante ocorre em potenciais menores, não observados no voltamograma. Estes estudos iniciais de VC nos deram mais uma possível caracterização do equilíbrio ceto-enólico neste sistema, sugerindo que os tautômeros de equilíbrio possuem potenciais de oxi-redução diferentes, mas próximos.

1.3.1.9. Estudos do equilíbrio ceto-enólico do sistema

Foram feitos estudos de equilíbrio para os compostos da série das isatinas, utilizando como modelo os três primeiros compostos **1**, **2** e **3**, através de espectroscopia no UV/vis e EPR. Primeiramente foram feitos estudos para o composto **1**, $[\text{Cu}(\text{isa-pn})]^{2+}$, que se mostrou o mais representativo desta série.

Durante as caracterizações destes compostos por UV/vis e EPR, notou-se que o comportamento deles variava com mudanças de pH, e em algumas faixas de valores, estas mudanças eram bastante pronunciadas, chegando a nos impressionar a complexidade destes sistemas. Um estudo de equilíbrio desta classe de compostos mostrou-se então um vasto campo a ser explorado neste trabalho, relacionando estes sistemas com a área de catálise, pois se trata de compostos cuja reatividade pode ser manipulada através de uma mudança estrutural induzida pela variação de pH do meio, e com a área de bioinorgânica, onde se poderia agora estudar o que ocorre na oxidação de carboidratos *in vivo*, com o papel do cobre nesta catálise. Isto porque para se estudar este processo é preciso um complexo de cobre que suporte os altos valores de pH que o meio reacional do estudo requer.

Estudos do Equilíbrio através de Espectroscopia UV/Vis

As mudanças no espectro eletrônico destes compostos a diferentes valores de pHs foram monitoradas espectrofotometricamente, com adição de HCl 0,1 mol.L⁻¹, ou NaOH 0,1 mol.L⁻¹, e com a força iônica controlada com KNO₃. Primeiramente foi estudado o composto **1**, $[\text{Cu}(\text{isa-pn})]^{2+}$, e o estudo deste serviu como modelo para os demais. Uma nova banda foi detectada em 354 nm, com o deslocamento concomitante em 434 nm (ombro em 402 nm), em meio alcalino, como mostra a Figura I.11.

Figura I.11. Espectros eletrônicos no UV/vis do complexo $[\text{Cu}(\text{isa-pn})]^{2+}$ 0.5 mmol dm^{-3} , à diferentes pHs (A a O): A) pH 2,7; B) pH 3,1; C) pH 3,4; D) pH 3,6; E) pH 3,8; F) pH 4,1; G) pH 5,8; H) pH 6,6; I) pH 7,6; J) pH 9,5; K) pH 9,7; L) pH 10,3; M) pH 10,4; N) pH 10,7; O) pH 11,3; força iônica controlada pela adição de KNO_3 0,1M.

Este estudo também foi feito para o complexo **2** $[\text{Cu}(\text{isa-en})(\text{H}_2\text{O})]^+$, e este demonstrou comportamento análogo, com o deslocamento de uma banda em 429 nm para 368 nm, ao se passar do meio ácido para o meio alcalino (Figura I.12).

Figura I.12. Espectros eletrônicos no UV/Vis do $[\text{Cu}(\text{isa-en})(\text{OH}_2)]\text{ClO}_4$ 1mM (**2**), em solução aquosa, com variação de pH após adição de base ou ácido, em força iônica controlada pela adição de KNO_3 0,1M.

Os dados sugerem que em ambos os casos (e muito provavelmente para todos estes sistemas com equilíbrio ceto-enólico) há o deslocamento de uma banda de absorção na região

de mais baixa energia para uma região de mais alta energia no espectro de UV/vis. Estes dados mostram que a forma enólica é favorecida a altos pHs, e é esperada a apresentar bandas de transferência de carga (LMCT) mais intensas, a mais alta energia.

A determinação do pKa da espécie $[\text{Cu}(\text{isa-pn})]^{2+}$ foi realizada através da equação:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log [\text{X}^-]/[\text{HX}]$$

onde $[\text{X}^-]$ é a concentração da espécie não protonada e $[\text{HX}]$ é a concentração da espécie protonada. Reescrevendo a equação acima em termos de absorbância, temos:

$$\text{pH} = \text{pKa} + z \cdot \log [(A - A_{\min})/(A_{\max} - A)], \text{ onde:}$$

$A_{\min}$ é a menor absorbância da amostra e $A_{\max}$ é a maior absorbância da amostra

$z = +1$ se $A(\text{X}^-) > A(\text{HX})$, e assim $A_{\min} = A(\text{HX})$ e $A_{\max} = A(\text{X}^-)$

$z = -1$ se $A(\text{X}^-) < A(\text{HX})$, e assim $A_{\min} = A(\text{X}^-)$ e $A_{\max} = A(\text{HX})$

Assim, traçou-se a curva pH versus $\log [(A - A_{\min})/(A_{\max} - A)]$, onde A = absorbância da nova banda em $\lambda = 354 \text{ nm}$ dos espectros de **1**, Fig. I.11 ($A_{\min}$ = abs. mínima da banda, $A_{\max}$ = abs. máxima da banda e A = abs. da banda em cada pH), mostrada na Figura I.13.

Figura I.13. Curva do pH versus $\log [(A - A_{\min})/(A_{\max} - A)]$, em $\lambda = 354 \text{ nm}$, para o complexo **1**.

Estes resultados permitiram calcular o pKa de 9.5 para **1**, a partir do coeficiente linear, no equilíbrio consistente com a formação da espécie com o ligante na forma enólica em ambos os lados da molécula.

Estudos do Equilíbrio através de Espectroscopia EPR

Os espectros de EPR do complexo **1** obtidos em soluções de metanol:água (4:1, v:v) mostraram um perfil característico de simetria axial ao redor do centro de cobre(II), com $g_{\parallel} > g_{\perp}$, como especificado na discussão destes dados. Variações significativas destes parâmetros

foram observadas ao aumentar o valor do pH da solução, na faixa de 2.5 a 11.0, como mostrado na Figura I.14.

Figura I.14. – Espectros de EPR do complexo **1**, à diferentes pHs: **A)** pH 3.0 (Ganho: 2.24×10^3 , Amplitude; 12G, t: 20.48ms); **B)** pH 5.6 (Ganho: 5.02×10^3 , Amplitude; 15G, t: 20.48ms); **C)** pH 11.0 (Ganho: 5.02×10^3 , Amplitude; 12G, t: 20.48ms).

Para os compostos **2** e **3**, também foram feitos estes estudos de EPR variando-se o valor do pH do meio (Figuras I.15 e I.16 respectivamente). Os resultados foram muito similares aos observados no caso do composto **1**. Também foi observada para estes demais compostos a presença do equilíbrio proposto, bastante claramente.

Figura I.15. – Espectros de EPR do complexo **2**, à diferentes pHs: **A)** pH 3.0 (Ganho: 2.24×10^3 , Amplitude; 12G, t: 20.48ms); **B)** pH 5.6 (Ganho: 5.02×10^3 , Amplitude; 12G, t: 20.48ms); **C)** pH 11.0 (Ganho: 5.02×10^3 , Amplitude; 12G, t: 20.48ms).

Figura I.16. – Espectros de EPR do complexo **3** à diferentes pHs: **A)** pH 3.0 (Ganho: 2.84×10^3 , Amplitude; 12G, t: 20.48ms); **B)** pH 5.6 (Ganho: 7.10×10^4 , Amplitude; 12G, t: 20.48ms); **C)** pH 11.0 (Ganho: 1.00×10^4 , Amplitude; 12G, t: 20.48ms).

Na Tabela I.6 estão mostrados os parâmetros do EPR determinados a partir dos respectivos espectros, a diferentes valores de pH.

Tabela I.6. Parâmetros do EPR a diferentes valores de pH para **1**, **2** e **3**, em solução congelada de metanol / água (4:1, v/v), à 77 K.

Parâmetros EPR					
Composto	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$A_{\perp}$ (G)	$A_{\parallel}$ (10^{-4} cm^{-1})	$g_{\parallel} / A_{\parallel}$ (cm)
[Cu(<i>isa-pn</i>)](ClO₄)₂ 1					
pH $\approx$ 5	2.091	2.301	14.2	126	183
pH = 11	2.065	2.240		189	118
pH < 3	2.086	2.420		130	186
[Cu(<i>isa-en</i>)(H₂O)]ClO₄ 2					
pH $\approx$ 5	2.059	2.278	28.5	225	102
pH = 11	2.057	2.234		192	116
pH < 3	2.083	2.421		131	185
[Cu(<i>isa-epy</i>)₂](ClO₄)₂ 3					
pH $\approx$ 5	2.082	2.503	15.8	132	188
pH = 11	2.054	2.236		186	120
pH < 3	2.082	2.425		130	187

Observa-se um comportamento muito semelhante para todos os compostos estudados, **1**, **2** e **3**, sendo que todos convergem para uma espécie semelhante em meio ácido ou básico, provando que esta classe de ligantes segue um comportamento parecido.

A razão $g_{\parallel} / A_{\parallel}$ mudou de ~ 185 cm em pH baixos (meio ácido) para ~ 118 cm em pH altos (meio alcalino), para todos os compostos. Isto indica uma mudança na geometria da estrutura dos ligantes ao redor do centro de cobre(II) da configuração tetraédrica distorcida para uma geometria mais quadrado planar ou tetragonal¹⁷³, da espécie ceto à enólica, corroborando os resultados observados ao se estudar o equilíbrio através da espectroscopia UV/vis. Apenas o composto **2**, em meios mais neutros, apresenta valores dos parâmetros de EPR diferentes dos demais, indicando que já em meio neutro apresenta uma geometria mais próxima ao quadrado planar do que os demais. Além disso, ele apresenta uma mistura das duas espécies de equilíbrio mais pronunciada do que os outros compostos.

Concluindo-se esta parte de síntese e caracterização, foram sintetizados novos complexos de cobre(II), de uma classe inédita, ou seja, imínicos e diimínicos derivados de um indol, e foram completamente caracterizados por diferentes técnicas. Eles apresentam um equilíbrio ceto-enólico em solução característico do ligante, mas que muda drasticamente a geometria ao redor do centro de cobre, e mesmo em meio altamente alcalino, são compostos estáveis e bastante adequados ao estudo inicialmente proposto: a elucidação do papel do cobre

na oxidação de carboidratos, um ponto ainda controverso, na glicação de proteínas e em danos biológicos.

1.3.2. Complexo diimínico de cobre(II) derivado da quinolína

1.3.2.1. Síntese, Estequiometria e Medidas de condutividade molar

O quinolinaldeído ou 2-quinolina carboxialdeído (*quin*), é um composto da classe das quinolinas bastante utilizado em sínteses. O objetivo aqui foi sintetizar a imina correspondente à condensação do grupo carbonila do *quin* com o grupo amina da 1,3-propilenodiamina (*pn*). Esta classe de ligante formado não apresentaria o equilíbrio ceto-enólico, contrariamente a classe das isatinas, mas seria interessante por formar uma estrutura com alta ressonância características das quinolinas. Vale ressaltar que as quinolinas, aminoquinolinas e derivados (fenantrolinas) são compostos bastante utilizados no tratamento da malária e Leshmaniose, e complexos metálicos deste tipo podem propiciar estudos interessantes no campo da inibição do crescimento celular.

O composto *quin+pn* foi preparado similarmente ao composto *isa+pn*. A imina formada (ligante *quin-pn*) não foi isolada pois se tratava de um composto muito sensível ao ar. Foi feito um teste isolando-o, mas ele se degradou rapidamente, passando de uma coloração amarelo claro à marrom escuro. O próprio reagente quinolinaldeído é muito sensível ao ar e degrada-se facilmente quando aberto. O composto formado na complexação do ligante *quin-pn* ao íon de cobre, adicionado como perclorato de cobre(II), foi um sólido verde claro, composto **7**, mostrado no Esquema I.10.

Esquema I.10. Composto da classe das quinolinas preparado.

Foram feitas medidas do teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio deste complexo (Parte Experimental), e concluiu-se, juntamente com outras medidas, como a de condutividade molar, que indicou como sendo um eletrólito 2:1 ($\Lambda_M = 208 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ em água e $130 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ em metanol, 298 K), que a estrutura acima proposta é a correta.

1.3.2.2. Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR)

No espectro de IV do complexo **7** (na Figura I.17), foram observadas bandas referentes ao estiramento da ligação O-H de água presente na preparação da pastilha de KBr (3436 cm^{-1}), de ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ (3069 cm^{-1}), de $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$ ($3069\text{-}2945\text{ cm}^{-1}$), e de C=N na região de 1650 e de 1589 cm^{-1} , demonstrando a presença de duas iminas distintas, sendo uma da base de Schiff e outra do anel aromático da quinolina, mas que, neste caso, foram impossíveis de serem distinguidas. Nota-se também a presença de duas bandas intensas nas regiões de 1097 e 624 cm^{-1} , características do contra-íon perclorato não coordenado.

Figura I.17. Espectro na região do IV do $[\text{Cu}(\text{quin-pn})](\text{ClO}_4)_2$ (**7**), em pastilha de KBr, resolução 4 cm^{-1} .

1.3.2.3. Espectroscopia no UV/vis e EPR

O espectro de UV/vis do composto **7** foi feito em solução aquosa (na Figura I.18), e apresentou bandas de transição interna do ligante características, em 206 e 251 nm , com absorvidade molar de 4.95×10^4 e $4.90 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente. Foram também observadas bandas LMCT e d-d, em 336 nm ($\epsilon = 1.12 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e 665 nm ($\epsilon = 135\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), respectivamente. A transição LMCT neste caso foi bastante intensa ($\epsilon > 10^3\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), já que o ligante contém grupos aromáticos e imínicos.

Os complexo de cobre(II) **7** apresentou comportamento típico deste íon no espectro de EPR (na Figura I.19), com bandas em $\sim 3100\text{ G}$. Foram observados para os parâmetros espectroscópicos, a partir do espectro de EPR deste composto: os tensores $g_{\perp} = 2.060$ e $g_{\parallel} = 2.409$, e as constantes hiperfinas $A_{\perp} = 27.2\text{ G}$ e $A_{\parallel} = 192 \times 10^{-4}\text{ cm}^{-1}$. Nos complexos de cobre,

fazendo-se uma correlação entre a geometria e a relação $g_{\parallel} / A_{\parallel}$ (cm), observa-se que este complexo **7** apresenta esta relação como 125 cm, sugerindo que a geometria ao redor do íon cobre é quase quadrado planar. Os complexos de cobre derivados da isatina [Cu(*isa-en*)(H₂O)]ClO₄·(H₂O)₂ (**2**), [Cu(*isa-amiquin*)(H₂O)](ClO₄) (**5**) e [Cu(*isa*)₂](ClO₄) (**6**) apresentaram a relação $g_{\parallel} / A_{\parallel}$ similares, como 102, 133 e 135 cm, respectivamente.

Figura I.18. Espectros no UV/vis do [Cu(*quin-pn*)](ClO₄)₂ (**7**), em solução aquosa.

Figura I.19. Espectro de EPR do [Cu(*quin-pn*)](ClO₄)₂ (**7**) ~1mM, em solução MeOH:H₂O (4:1, v:v), 77K. Ganho: 1,00x10⁴, amplitude de modulação: 15G, constante de tempo: 20,48 s, 1 scan.

1.3.2.4. Espectrometria de Massa Electrospray (ESI-MS) e MS-MS

Os espectros de MS ESI do complexo **7** em MeOH:H₂O, estão descritos na Figura I.20, e apresentaram um comportamento similar aos compostos da série da isatina, com a permanência do cobre nos fragmentos analisados, de m/z 246, 232 e 217, equivalentes aos íons m/z: C₁₂H₁₁N₂Cu, C₁₁H₉N₂Cu e C₁₀H₈N₂Cu. O íon molecular corresponde ao fragmento m/z 415 (com o padrão isotópico do ⁶⁵Cu em 417, monocarregado), correspondente à C₂₃H₂₀N₄Cu. O cluster do fragmento m/z = 513 corresponde a muito provavelmente o íon molecular acrescido de moléculas de metanol (3).

(a)

(b)

(c)

Figura I.20. (a) espectro de ESI-MS em modo positivo de **7**; (b) comparação entre os espectros teórico (superior) e experimental (inferior); (c) espectro de MS/ MS do íon de m/z 514.

Sintetizou-se e caracterizou-se um complexo de Cu(II) do tipo base de Schiff, para servir de comparação nos estudos de reatividade e elucidação do mecanismo do cobre na oxidação de carboidratos, mas sem apresentar o equilíbrio ceto-enólico da série anterior. Deste modo, poderá ser avaliado até que ponto este equilíbrio é importante na estabilidade e reatividade dos exemplos propostos de compostos modelo (série isa) para este tipo de estudo.

I.3.3. Complexos imínicos de Cobre(II) derivados de aminocarboidratos

Um método efetivo de se alcançar a catálise assimétrica é o uso de complexos metálicos quirais como catalisadores^{179, 180}. Dos vários métodos usados para se produzir compostos enantiopuros, a catálise homogênea quiral é uma estratégia tentadora, como refletido pelo

¹⁷⁹ H. Brunner, M. Schönherr, M. Zabel, *Tetrahedron: Asymmetry* **12** (2001) 2671.

¹⁸⁰ a) A.S.C. Chan, S.A. Laneman, R.E. Miller, J.H. Wagenknecht, J.P. Coleman, "Homogeneous Asymmetric Catalysis as an Important Tool for the Production of Fine Chemicals and Pharmaceutical Products", in "Catalysis of Organic Reactions" ed. J.R. Kosak, T.A. Johnson, **1994**, 581p; b) T. Katsuki, *Chem. Soc. Rev.* **33** (2004) 437; c) D.A. Evans, D. Seidel, M. Rueping, H.W. Lam, J.T. Shaw, A.W. Downey, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 12692; d) D.M. Du, B. Fu, W.T. Hua, *Tetrahedron* **59** (2003) 1933; e) S. Bunce, R.J. Cross, L.J. Farrugia, S. Kunchandy, L.L. Meason, K.W. Muir, M. O'Donnell, R.D. Peacock, D. Stirling, S.J. Teat, *Polyhedron* **17** (1998) 4179.

numeroso número de publicações neste campo ¹⁸¹. Entretanto, o design de eficientes catalisadores quirais para serem usados em síntese assimétrica em meio aquoso é um dos maiores desafios das pesquisas em catálise ¹⁸².

Reações enantiosseletivas catalisadas por ácidos de Lewis usualmente devem ser feitas sob atmosfera inerte e condições estritamente anidras, pois a maioria dos catalisadores ácidos de Lewis são lábeis à água, sendo facilmente decompostos neste meio. Assim, são muitas as estratégias usadas para solubilizar um complexo metálico ou um organometálico em água, especialmente para sua utilização em catálise. Neste sentido, o uso de ligantes carboidratos oferece não somente a quiralidade desejada ao sistema catalítico, mas também a solubilidade aquosa, além de serem disponíveis e baratos ¹⁸³.

Com base nestas informações, e com o objetivo majoritário de se sintetizar e estudar complexos de cobre(II) com ligantes não usuais, do tipo imínicos e diimínicos, foram sintetizados e estruturalmente caracterizados dois novos complexos imínicos de cobre(II) com ligantes derivados da D-(+)-glucosamina, um aminocarboidrato disponível e barato. Estes complexos foram facilmente preparados, sem a prévia proteção de grupos funcionais, e poderão servir como catalisadores quirais, em reações no meio aquoso, aplicação esta sugerida em vários exemplos na literatura ¹⁸⁴.

1.3.3.1. Síntese, Estequiometria e Medidas de condutividade molar

Os complexos de cobre(II) com ligantes imínicos derivados da D-Glucosamina foram preparados pela condensação do hidrocloreto de D-(+)-Glucosamina (2-amino-2-deoxi-D-glicose), gla, e 2-acetilpiridina (apy), para originar o complexo 8, ou 2-piridina carboxaldeído (pyal), para originar o complexo 9, e no mesmo meio reacional, realizou-se a metalação com íons de cobre(II), na forma de sais perclorato, de acordo com procedimentos gerais descritos na literatura para a preparação de bases de Schiff ¹⁵². As estruturas propostas para os complexos 8, [Cu(apy₂-gla)](ClO₄)₂, um sólido cristalino de coloração púrpura, e 9 [Cu(pyal₂-gla)](ClO₄)₂, um sólido cristalino de coloração verde escuro-amarronzado, estão no Esquema I.11.

¹⁸¹ a) M. Dieguez, O. Pàmies, C. Claver, *Chem. Rev.* **104** (2004) 3189; b) G. Desimoni, G. Dusi, G. Fatia, P. Quadrelli, P.P. Righetti, *Tetrahedron* **51** (1995) 4131; c) M. Dieguez, O. Pamies, A. Ruiz, Y. Diaz, S. Castillon, C. Claver, *Coord. Chem. Rev.* **242** (2004) 159.

¹⁸² a) B.Y. Yang, X.M. Chen, G.J. Deng, Y.L. Zhang, Q.H. Fan, *Tetrahedron Lett.* **44** (2003) 3535; b) P. Müller, C. Fruit, *Chem. Rev.* **103** (2003) 2905.

¹⁸³ a) Y.Y. Yan, T.V. RajanBabu, *J. Org. Chem.* **66** (2001) 3277; b) R. Kadyrov, D. Heller, R. Selke, *Tetrahedron: Asymmetry* **9** (1998) 329; c) R. Lai, S. Martin, *Tetrahedron: Asymmetry* **7** (1996) 2783.

¹⁸⁴ a) Y.N. Belokon, M. North, T.D. Churkina, N.S. Ikonnikov, V.I. Maleev, *Tetrahedron* **57** (2001) 2491; b) C.M.R. Ribeiro, E.S. Santos, A.H.O. Jardim, M.P. Maia, F.C. da Silva, A.P.D. Moreira, V.F. Ferreira, *Tetrahedron: Asymmetry* **13** (2002) 1703.

Esquema I.11. Compostos da classe dos aminocarboidratos preparados.

A condensação do grupo nitrogenado da glucosamina com o grupo carbonila do reagente derivado da piridina (*apy* ou *pyal*), para originar a base de Schiff correspondente, foi feito sem etapas prévias de proteção de grupos funcionais da glucosamina, geralmente etapas estas necessárias quando se trata de reações com carboidratos ou seus derivados.

Medidas de condutividade molar de ambos os complexos mostraram um resultado de eletrólito 2:1, consistentes com os resultados das análises elementares de CHN. O que é interessante notar é que foi formada somente uma unidade da base de Schiff em ambos os compostos, provavelmente devido à interferência estérea no sítio de coordenação do cobre com uma imina. Devido à característica instável do ligante base de Schiff, foi impossível isolá-lo, e os complexos de cobre(II) foram preparados *in situ*. Estes complexos apresentaram alta solubilidade e estabilidade em solução aquosa, onde mesmo após vários meses em água, apresentaram os mesmos parâmetros espectroscópicos (UV/Vis, EPR).

I.3.3.2. Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR)

Os espectros de IV destes dois complexos (na Figura I.21) mostraram bandas características do grupamento imínico, observadas a 1608 cm^{-1} para **8**, e 1607 cm^{-1} para **9**. A banda atribuída ao grupo carbonila, do outro ligante bidentado 2-acetilpiridina, no caso de **8**, ou 2-piridinacarboxaldeído, no caso de **9**, que não formaram a unidade imínica, foram observadas em 1645 e 1640 cm^{-1} , respectivamente. Bandas relativas ao estiramento hidroxila foram encontradas em ambos os casos. Bandas adicionais observadas ao redor de 1085 e 630 cm^{-1} são características de íons perclorato não coordenados.

A)

B)

Figura I.21. Espectros na região do IV, em pastilha de KBr, resolução 4 cm⁻¹. A) [Cu(*apy*₂-*gla*)](ClO₄)₂ (**8**); B) [Cu(*pya*₁₂-*gla*)](ClO₄)₂ (**9**).

1.3.3.3. Espectroscopia no UV/vis e EPR

Os espectros eletrônicos de **8** e **9** (na Figura I.22) foram conduzidos em solução aquosa, e mostraram bandas características esperadas para complexos do tipo base de Schiff, sistemas altamente conjugados ². Os máximos de comprimento de onda correspondentes foram observados em 262 e 373 nm ($\epsilon = 2.0$ e $0.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para **8**, e em 293 e 373 nm ($\epsilon = 1.2$ e $0.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para **9**, correspondendo a transições internas do ligante ($n \rightarrow \pi$, ou $n \rightarrow \pi^*$), e aquelas detectadas em 519 e 550 nm ($\epsilon = 2.2$ e $4.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), para **8**, e em 471 nm, ($\epsilon = 1.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), para **9**, que foram atribuídas a transições de carga do ligante ao metal (LMCT, $\pi \rightarrow d\pi$). As bandas de transição d-d apareceram em 670 nm ($\epsilon = 255 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para **8**, indicando em parte uma perda de sua centrosimetria, principalmente pelo alto valor de absortividade molar, e em 690 nm ($\epsilon = 168 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para **9**.

Figura II.22. Espectros na região do UV/Vis, ambos em solução aquosa. A) $[\text{Cu}(\text{apy}_2\text{-gla})](\text{ClO}_4)_2$ (**8**); B) $[\text{Cu}(\text{pyal}_2\text{-gla})](\text{ClO}_4)_2$ (**9**).

Os espectros de EPR dos complexos **8** e **9** (na Figura I.23) foram feitos em solução de metanol:água (4:1, v:v), e mostraram um característico perfil de um ambiente axial ao redor do

centro metálico, com o tensor $g_{//} > g_{\perp}$. Os valores dos parâmetros retirados dos espectros de EPR dos complexos **8** e **9** estão na Tabela I.7.

Figura I.23. Espectros de EPR (banda X). **A**) $[\text{Cu}(\text{apy}_2\text{-gla})](\text{ClO}_4)_2$ (**8**); **B**) $[\text{Cu}(\text{pyal}_2\text{-gla})](\text{ClO}_4)_2$ (**9**); ambos em MeOH:H₂O (4:1,v:v), ~1mM, 77K. Ganho: 1.52×10^4 , amplitude de modulação: 15G, constante de tempo: 20.48 s, 1 scan.

Tabela I.7. Parâmetros retirados dos espectros de EPR para **8** e **9**.

Composto	$g_{\perp}$	$g_{//}$	$A_{\perp}$ (G)	$A_{//}$ (10^{-4} cm^{-1})	$g_{//} / A_{//}$ (cm)
$[\text{Cu}(\text{apy}_2\text{-gla})](\text{ClO}_4)_2$ 8	2.0612	2.493	36.4	207.5	120
$[\text{Cu}(\text{pyal}_2\text{-gla})](\text{ClO}_4)_2$ 9	2.0643	2.425	38.6	127.9	190

Baseando-se na razão empírica $g_{//}/A_{//}$, o complexo **8** exibe uma geometria ao redor do íon metálico mais quadrado planar, com o elétron desemparelhado no orbital dx^2-y^2 enquanto que o complexo **9** mostra uma geometria muito próxima a um tetraedro distorcido.

I.3.3.4. Espectrometria de Massa Electrospray (ESI-MS)

Os espectros de massa ESI dos complexos **8** e **9** em $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ foram realizados em modo positivo com separação por tempo de voo (q-TOF), e estão descritos na Figura I.24, e apresentaram um comportamento similar entre si, com a formação final de um complexo de cobre ligado à acetonitrila.

(a)

(b)

Figura I.24. Espectros de ESI-MS. **a)** do complexo **8**; **b)** do complexo **9**. Ambos em modo positivo, 70eV, modo positivo, analisador q-TOF, feitos em $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$.

O padrão de fragmentação dos dois complexos **8** e **9** é mostrado nos Esquemas I.12 e I.13, respectivamente.

Esquema I.12. Padrão de fragmentação proposto para o composto **8**.

Esquema I.13. Padrão de fragmentação proposto para o composto **9**.

Observam-se em ambos os espectros de ESI-MS destes dois compostos alguns picos decorrentes da fragmentação intensa da molécula, com rearranjos não característicos. Estes rearranjos, ocorridos somente em fase gasosa, foram favorecidos pelo alto potencial de ionização provocado no ionizador electrospray, onde normalmente ocorrem fenômenos não observados por outras técnicas de ionização. Mas mesmo assim, foi possível a observação dos principais fragmentos que caracterizaram a molécula.

1.3.3.5. Dicroísmo Circular (CD)

Devido ao fato destes complexos serem derivados de aminocarboidratos, e após a análise detalhada das suas estruturas, percebeu-se que eram quirais, e foram então realizadas medidas de rotação ótica para os complexos 8 e 9, visando a confirmação deste fato. No caso do complexo 8, com o ligante glucosamina formando a unidade imínica com a acetilpiridina, o $[\alpha]_D$ medido foi igual a -156° (c 0.75 mmol, H₂O), e para o complexo 9, cuja unidade imínica da glucosamina era formada com a piridinacarboxaldeído, o $[\alpha]_D$ foi de $+209.5^\circ$ (c 1.09 mmol, H₂O), ambas medidas repetidas 10 vezes, para comprovar o desvio ótico deles.

Como as medidas de rotação ótica são realizadas em comprimento de onda fixos, fez-se então medidas de dicroísmo circular (CD ou DC) para ambos os complexos ($5,0 \times 10^{-4} M$), em temperatura controlada de $25^\circ C$, no intervalo de 190 a 800 nm. O CD pode ser definido como a interação entre a diferença de absorção entre a luz polarizada à esquerda com a luz polarizada à direita com uma molécula opticamente ativa conferindo assim um espectro CD característico. Esta técnica espectroscópica depende portanto, da assimetria estrutural da molécula. É uma técnica bastante empregada no estudo de mudanças conformacionais, vizinhanças locais, interações de ligantes com proteínas e também como uma estimativa qualitativa da estrutura secundária¹⁸⁵.

Os espectros de CD obtidos para ambos os complexos estão na Figura I.25.

Figura I.25. Espectros de CD dos complexos 8 e 9, em solução aquosa.

Observa-se uma complementaridade entre os dois complexos que, embora não sendo enantiômeros, comportam-se quase como tais, conforme visto pelos espectros de CD. Lembrando-se que a geometria deles diferem significativamente, a origem desta diferença no espectro de CD pode ser devido às diferenças de geometria ao redor do íon metálico, causando assimetrias complementares nas duas moléculas, fazendo o complexo 8 desviar o plano da luz polarizada para a um lado, e o complexo 9, para o outro. Os comprimentos de ondas e respectivas absorbâncias estão detalhados na Tabela I.8, com destaque para os dados mais significativos na diferença entre os espectros.

Tabela I.8. Valores de absorbância no espectro CD dos complexos 8 e 9. Os valores em destaques são os mais importantes.

Complexo 8		Complexo 9	
λ/ nm	Absorbância	λ/ nm	Absorbância
224	+ 1.2	217	- 0.73
254	+ 0.42	255	- 0.29
288	+ 0.22	288	+ 0.15
319	- 0.09	315	+ 0.18
393	- 0.09	354	+ 0.15
423	+ 0.03	/	/
460	+ 0.06	463	+ 0.16
498	- 0.07	/	/
523	- 0.01	517	+ 0.15
570	+ 0.11	581	- 0.11
606	+ 0.13	606	+ 0.04
667	- 0.41	636	- 0.26

Nota-se que a maior diferença está na região de transição interna do ligante, onde a espécie 8 desvia a luz para o positivo e a espécie 9 desvia para o negativo. Na região de transições LMCT também se nota diferença acentuada, onde agora é a espécie 8 que desvia a luz para o negativo e a espécie 9 para o positivo. Na região de transição d-d ambas as espécies desviam para o negativo, indicando que é realmente no ligante e na ligação metal-ligante que reside a assimetria destas moléculas. Este fato não é obvio, já que um ligante quiral, como derivado de um aminocarboidrato, não indicaria obrigatoriamente a formação de um complexo quiral, ao se ligar com o metal, pois é a simetria da molécula como um todo que deve ser avaliada. Neste caso, provou-se pela técnica de CD a assimetria destas duas espécies, e mais

¹⁸⁵ A. Rodger, B. Nordén, “Circular Dichroism and Linear Dichroism”, Oxford University Press, Oxford, **1997**.

além, a complementaridade quiral delas, que não são imagem enantioméricas, e sim espécies diferentes em apenas uma posição do ligante afastada do centro quiral carboidrato. Esta pequena diferença, onde é um grupo metila no complexo 8, foi substituído por um hidrogênio no 9, levou a um posicionamento ou arranjo diferente do ligante, gerando desvios diferentes na luz polarizada.

Estes resultados indicam um interessante e importante ponto a ser mais bem explorado, notadamente na área de catálise, que devido ao pouco tempo restante, deixamos para uma outra ocasião.

1.3.4. Complexos de Cobre(II) com carboidratos – Investigações sobre o sítio de ligação Cu(II)-carboidrato

Os carboidratos são uma classe de moléculas bioativas com inúmeras funções ¹⁸⁶. Interações gerais de metal-carboidrato têm grande importância em fluidos biológicos e moléculas, como glicoproteínas e lipopolissacarídeos. Embora todas as funções e mecanismos de ação dos carboidratos não estejam completamente elucidados, seus vários papéis serão gradualmente desvendados à medida que se atinge um alto grau de conhecimento acerca das informações moleculares, nos mecanismos de resposta imunológica e ação glicoproteica.

Já os íons de metais de transição são encontrados em organismos vivos apropriadamente coordenados a diferentes biomoléculas, participando de várias reações bioquímicas onde eles têm um papel crucial. Embora os carboidratos exibam propriedades de coordenação relativamente pobres, em comparação a outros ligantes biológicos, e usualmente formem complexos fracos, as interações entre íons metálicos e poliálcoois, nucleotídeos, e outros ligantes do tipo açúcar, estão supostamente envolvidas em muitos processos bioquímicos

¹⁸⁶ Os carboidratos são os compostos orgânicos de ocorrência natural mais largamente distribuídos na Terra. Os carboidratos são produzidos durante o processo da fotossíntese, no qual a energia luminosa é convertida em energia química, pela combinação de dióxido de carbono com água, formando também oxigênio molecular. A energia estocada nos carboidratos é usada por organismos não-fotossintéticos, nos processos conhecidos como glicólise e respiração. Ao final do século XVIII (1792), a química dos carboidratos começou a se desenvolver e muitos açúcares naturais foram isolados. Mas o grande salto desta ciência foi dado por Emil Fischer, que elucidou a estrutura de muitos açúcares, e é considerado o pai da química e da bioquímica de carboidratos e da bioquímica. Ver mais sobre a química dos carboidratos: a) J.F. Robyt, “*Essentials of Carbohydrate Chemistry*”, Springer-Verlag New York, Inc. (1998), 399p. b) P. Finch, “*Carbohydrates: Structures, Syntheses and Dynamics*”, Kluwer Academic Publ. Dordrecht (1999), 335p; c) S. David, “*The Molecular and Supramolecular Chemistry of Carbohydrates: Chemical Introduction to the Glycosciences*”, Oxford Univ. Press, New York (1997), 321p; d) G.J. Boons, “*Carbohydrate Chemistry*”, Blackie Academic Professional Press, London (1998), 509p.

importantes, incluindo processos de reconhecimento, eventos imunológicos, e condições patológicas¹⁸⁷.

A abundância de grupos funcionais eletronegativos e uma estereoquímica bem definida fazem dos sacarídeos potenciais ligantes de interesse para a coordenação de íons metálicos em sistemas naturais, e a compreensão destas interações permanece um dos desafios da química dos carboidratos¹⁸⁸. A mímica do reconhecimento de um carboidrato por um receptor sintético tem atraído muito a atenção de pesquisadores, especialmente na química supramolecular e bioinorgânica. A avaliação das interações entre um molde (como um carboidrato) e um monômero funcional (como um complexo metálico) é um dos passos para o desenvolvimento de polímeros molecularmente “impressos”. Além disso, o interesse em complexos do tipo metal-carboidrato é por não serem restritos à área biológica. Os carboidratos são práticos reagentes não somente em análises de separação de compostos quirais, mas também em conversores adequados em sínteses estereoseletivas, em quantidades estequiométricas ou catalíticas¹⁸⁸. Carboidratos de baixa massa molecular, tão bem quanto os dióis, trióis e polissacarídeos, são considerados blocos de construção versáteis para a síntese sistemática de estruturas mais complexas, como géis, fibras, membranas, mono- e multi- camadas, e polímeros contendo metais, onde usualmente os polissacarídeos agem como ligantes pela desprotonação de um ou mais grupos hidroxila¹⁸⁹.

A ligação de íons metálicos à carboidratos e compostos correlatos tem sido estudada desde o início do século, principalmente com o intuito de esclarecer o modo de coordenação ao centro metálico dos grupos hidroxila de cada unidade do carboidrato^{190,191,192}. Uma razão particular para estes estudos é que a caracterização quantitativa dos equilíbrios de coordenação entre íons metálicos e poliálcoois e outros ligantes do tipo carboidrato, contendo somente átomos de oxigênio doadores de densidade eletrônica, é muito difícil, devido à baixa estabilidade dos complexos formados em meio aquoso neutro ou ácido¹⁸⁷. A baixa densidade eletrônica destes grupos doadores oxigenados faz com que eles não substituam integralmente as moléculas de água ligadas na esfera de coordenação interna do íon metálico, a despeito do seu grande número de pontos de coordenação em um mesmo ligante¹⁵³. Com o aumento do valor do pH, entretanto, a hidrólise de alguns íons metálicos previne a coordenação de ligantes orgânicos, e então a formação do complexo pode ser esperada somente em soluções fortemente alcalinas, após desprotonação dos grupos hidroxila.

¹⁸⁷ B. Gyurcsik, L. Nagy, *Coord. Chem. Rev.* 203 (2000) 81.

¹⁸⁸ J.F. Verchère, S. Chapelle, F. Xin, D.C. Crans, *Progress in Inorg. Chem.* 47 (1998) 837, John Willey and Sons, Inc.

¹⁸⁹ (a) P. Klüfers, J. Schuhmacher, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33 (1994) 1742; (b) M. Gottschaldt, R. Wegner, H. Görls, P. Klüfers, E.-G. Jäger, D. Klemm, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 1941.

¹⁹⁰ R.P. Bandwar, C.P. Rao, M. Giralt, J. Hidalgo, G.U. Kulkarni, *J. Inorg. Biochem.* (1997) 38.

¹⁹¹ M. Saladini, M. Candini, D. Iacopino, L. Menabue, *Inorg. Chim. Acta* 292 (1999) 189.

¹⁹² a) M. Kato, T. Tanase, *Inorg. Chem.* 44 (2005) 8; b) M. Jezowska-Bojczuk, W. Lesniak, *J. Inorg. Biochem.* 85 (2001) 99.

O fato de os carboidratos em solução existirem em equilíbrios conformacionais e anoméricos (Esquema I.14), e que os isômeros interagem de modos diferentes com os íons metálicos, torna os estudos da natureza destas interações ainda mais complicados ¹⁹³. Além disso, as constantes de estabilidade destes complexos, determinadas por técnicas usuais são, de fato, valores gerais ou médios, com respeito as diversas conformações possíveis dos ligantes. Conseqüentemente, é considerado uma difícil missão de se determinar os reais modos de ligação de grupos hidroxilas à íons de metais de transição, e a estratégia freqüentemente utilizada é a de se determinar uma característica física do íon metálico, monitorando a sua mudança sob a influência do ligante. Com um metal paramagnético, como complexos de cobre(II) ou vanádio(IV), informações muito úteis podem ser obtidas a partir de seus espectros de EPR ^{190, 153c,194}. Outros métodos estruturais, como CD ^{190,192,194}, RMN ^{192,195}, espectrometria de massa ¹⁹⁶, absorção de raio-X estendido da estrutura fina (EXAFS) ¹⁹⁷ e espectroscopia no infravermelho (FTIR) também têm sido utilizados ^{194,198}. Por outro lado, estudos de complexos metal-carboidrato baseados na espectroscopia Raman são raros. Esta técnica foi empregada com sucesso para elucidar os efeitos dos cátions Ca^{2+} , Sr^{2+} , La^{3+} , Zn^{2+} , Na^+ , Cd^{2+} , Mg^{2+} e K^+ no equilíbrio anomérico de açúcares simples, como a D-glicose ¹⁹⁹. Mais recentemente, espectros de FT-Raman (Raman com transformada de Fourier) ajudaram na elucidação e sistematização de interações intermoleculares fracas em carboidratos e proteínas ²⁰⁰. Entretanto, há pouca informação sobre o modo de ligação entre cobre(II) e carboidratos simples, usando esta técnica.

¹⁹³ B. Gyurcsik, L. Nagy, *Coord. Chem. Rev.* **203** (2000) 81.

¹⁹⁴ S. Striegler, M. Dittel, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 11518.

¹⁹⁵ a) S.J. Angyal, *Aust. J. Chem.* **25** (1972) 1957; b) S.J. Angyal, D. Greeves, J.A. Mills, *Aust. J. Chem.* **27** (1974) 1447.

¹⁹⁶ a) G. Smith, A. Kaffashan, J.A. Leary, *Int. J. Mass Spectr.* **182/183** (1999) 299; b) G.A. Lawrance, M.J. Robertson, Sutrisno, E.E. von Nagy-Felsobuki, *Inorg. Chim. Acta* **328** (2002) 159.

¹⁹⁷ L. Nagy, A. Szorcsik, *J. Inorg. Biochem.* **89** (2002) 1.

¹⁹⁸ L. Yang, Y. Su, Y. Xu, Z. Wang, Z. Guo, S. Weng, C. Yan, S. Zhang, J. Wu, *Inorg. Chem.* **42**(19) (2003) 5844.

¹⁹⁹ F. Franks, J.R. Hall, D.E. Irish, K. Norris, *Carbohydr. Res.* **157** (1986) 53.

Esquema I.14. Formas anoméricas dos carboidratos como α - e β -piranose (na forma da cadeia conformacional 4C_1) para a D-glicose e D-galactose, e α - e β -piranose e furanose, para D-frutose.

Por esta razão, nos interessamos por estes compostos, particularmente visando a aplicação da técnica de Raman na elucidação da ligação cobre(II)-carboidrato, cuja importância reside ainda no fato de que a oxidação de pentoses e hexoses comuns está implicada na glicação de proteínas ²⁰¹. Em especial, íons de cobre(II) foram verificados aumentar significativamente este processo oxidativo ²⁰². Para se elucidar completamente este processo, além dos estudos catalíticos, os sítios de ligação Cu(II)-carboidrato devem ser entendidos e, entretanto, eles ainda não são bem compreendidos.

A proposta deste estudo é usar a técnica de EPR e em especial Raman como principais ferramentas para se verificar a conformação de ligantes carboidratos simples ao redor do íon de cobre(II), elucidando assim qual o tipo de estrutura do ligante (anômero α ou β) está preferencialmente ligada ao centro metálico, coletando evidências espectroscópicas de que o sítio de coordenação do carboidrato ao cobre(II) é, por exemplo, o carbono anomérico.

²⁰⁰ R.G. Zhabankov, S.P. Firsov, T.E. Kolosova, L.K. Prihodchenko, D.D. Grinshpan, J. Baran, M.K. Marchewka, H. Ratajczak, *J. Mol. Struct.* 656 (2003) 275.

²⁰¹ M.B. Yim, H.S. Yim, C. Lee, S.-O. Kang, P.B. Chock, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 928 (2001) 48.

1.3.4.1. Síntese, Estequiometria, Medidas de condutividade molar e Termogravimétricas

Para a realização desta investigação, alguns complexos de cobre(II) foram preparados a partir de sais de sódio dos carboidratos mais comuns, D-glicose, D-frutose e D-galactose, gerados com sódio metálico, em meio metanólico e usando proporções estequiométricas de $2\text{Na}^0:1\text{carboidrato}$, e em seguida complexados com íons cobre(II), adicionados ao meio na forma de sal perclorato. Os complexos formados foram precipitados no meio reacional, e investigados no estado sólido (em solução há o problema da estabilidade destes complexos, e poderiam ser gerados dados não confiáveis). Suas estequiometrias foram obtidas através de análise elementar, ICP-AES (análise do teor de cobre e sódio) e termogravimetria (TGA), além de medidas de condutividade molar.

A estequiometria determinada para estes complexos correspondem a três unidades de ligantes carboidratos coordenados a dois centros de cobre(II), no caso das hexoses D-Glicose e D-Galactose, ou quatro moléculas de carboidrato ligadas a três centros de cobre(II) para a pentose D-frutose, com varias moléculas adicionais de água. Os resultados da análise termogravimétrica complementaram estes dados, indicando a perda de 8 moléculas de água à 138°C para os complexos com a glicose e com a frutose, e a perda de 6 moléculas de água à mesma temperatura para o complexo com a galactose.

Deste modo, a formula mínima foram determinadas para estes complexos de Cu(II) com carboidrato como: $\text{Na}_2[\text{Cu}_2(\text{Glc})_3]\cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**10**), $\text{Na}_2[\text{Cu}_3(\text{Fru})_4]\cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**11**) and $\text{Na}[\text{Cu}_2(\text{Gal})_3]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (**12**), respectivamente. Eles se mostraram bastante solúveis em água, mas insolúveis em solventes orgânicos comuns.

Complexos similares descritos na literatura incluem complexos monoméricos, misturados com ligantes nitrogenados ²⁰³, estruturas diméricas ²⁰⁴, e poliméricas ²⁰⁵, sempre como uma mistura de diferentes modos de ligação ao redor do centro metálico, quando somente ligantes carboidratos são usados como ligantes. O único exemplo descrito na literatura ¹⁹⁰ bastante similar aos aqui obtidos, descreve os complexos de cobre(II)-sacarídeos, após purificação para eliminação de subprodutos de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ e sais de sódio, como complexos mono-nucleares ($\text{Na}_2[\text{Cu}(\text{Mal})\text{Cl}_2]$), di-nucleares ($\text{Na}[\text{Cu}_2(\text{Glc})_2\text{Cl}_3]$) ou tri-nucleares ($\text{Na}[\text{Cu}_3(\text{Fru})_2(\text{OH})\text{Cl}_4]\cdot \text{CH}_3\text{OH}$ ou $\text{Na}[\text{Cu}_3(\text{Gal})_2\text{Cl}_3]\cdot \text{CH}_3\text{OH}$). Estes autores também obtiveram espécies oligoméricas, como $\text{Na}[\text{Cu}_8(\text{Glc})_4\text{Cl}_7\text{Br}_2]\cdot 5\text{CH}_3\text{OH}$, onde apenas as fórmulas estequiométricas são propostas, mas não as estruturas. Este trabalho sugere que há uma formação inicial de altos oligômeros na reação;

²⁰² a) T. Nakayama, K. Terazawa, S. Kawakishi, *J. Agric. Food Chem.* **40** (1992) 830; b) G.B. Sajithlal, P. Chithra, G. Chandrakasan, *Mol. Cell. Biochem.* **194** (1999) 257; c) R. Cheng, S. Kawakishi, *J. Agric. Food Chem.* **42** (1994) 700.

²⁰³ S. Striegler, E. Tewes, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2002) 487.

²⁰⁴ R.P. Bandwar, M. Giraldo, J. Hidalgo, C.P. Rao, *Carbohydr. Res.* **284** (1996) 73.

²⁰⁵ P. Klüfers, J. Schuhmacher, *Angew. Chem. Inter. Ed. Engl.* **33** (17) (1994) 1742.

entretanto, quando $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi usado, foram isolados apenas complexos mono-, di- ou tri-nucleares.

Em todos estes complexos, os carboidratos estão coordenados ao Cu(II) usualmente através de grupos hidroxilas livres e deprotonados, em uma estrutura polimérica, onde não somente uma unidade do íon de cobre liga-se a cada unidade do ligante carboidrato.

As medidas de condutividade molar destes complexos **10**, **11** e **12**, foram feitas em água deionizada ou metanol, à 298 K, como mostrados na parte experimental, e são consistentes com um eletrólito 1:2, para ambos os complexos **10** e **12**, e eletrólito 1:1 para o complexo **13**. Estes dados corroboram os resultados previamente observados nas análises elementares, em relação aos grupos hidroxila carregados ou ionizados nos complexos, preparados como sais de sódio dos carboidratos.

Entretanto, estes complexos também se mostraram muito instáveis em solução, e a formação de cristais adequados para estudos cristalográficos não foi conseguida. A suas soluções aquosas exibiram modificações espectrais com o tempo, após alguns dias. Também foi demonstrado na literatura a instabilidade em solução aquosa, para complexos semelhantes¹⁹⁰, especialmente em uma faixa de valor de pH entre 5,0 e 6,0.

1.3.4.2. Espectroscopia no Infravermelho e UV/Vis

Os espectros na região de IV dos complexos $\text{Na}_2[\text{Cu}_2(\text{Glc})_3] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**10**), $\text{Na}_2[\text{Cu}_3(\text{Fru})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**11**) e $\text{Na}[\text{Cu}_2(\text{Gal})_3] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (**12**), mostraram bandas características de compostos hidroxilados (na Figura I.26), como a banda larga característica de $\nu(\text{OH})$, indicando a presença de moléculas de água na estrutura. As bandas ao redor de $2940\text{-}2880\text{ cm}^{-1}$, para todas as espécies estudadas, foram atribuídas à $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H})$, enquanto que sua correspondente deformação foi verificada ao redor de 1370 cm^{-1} , indicando um deslocamento da faixa original do carboidrato livre, ao redor de $1460\text{-}1340\text{ cm}^{-1}$. Os estiramentos C-C e C-O que nos carboidratos livres estão na região de $1140\text{-}990\text{ cm}^{-1}$, nos complexos apresentaram uma banda bastante alargada em 1050 cm^{-1} . Os espectros dos sais de sódio dos complexos mostraram um grande rearranjo de suas ligações de hidrogênio, devido à ionização dos monosacarídeos, sendo caracterizado pela presença de bandas alargadas e deslocadas em todos os casos. Devido a este fato, não foi possível retirar do espectro de IV informações relevantes com respeito aos complexos, como o modo de ligação do carboidrato ao íon metálico.

Figura I.26. Espectros no IV, pastilha de KBr. A) Na₂[Cu₂(Glc)₃].8H₂O (**10**); B) Na₂[Cu₃(Fru)₄].8H₂O (**11**); C) Na[Cu₂(Gal)₃].6H₂O (**12**).

Os espectros eletrônicos dos compostos **11**, **12** e **13** foram registrados em solução aquosa (na Figura I.27), e mostraram os máximos de absorção em 239 nm ($\epsilon = 3.62 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para **10**, 245 nm ($\epsilon = 3.64 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para **11**, e 240 nm ($\epsilon = 3.05 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para **12**, atribuídos a transições internas do ligante ($n \rightarrow \sigma$ ou $n \rightarrow \sigma^*$), muito similar em todos os casos. Não foram observadas transições LMCT, devido à ausência de átomos ligantes doadores, como N. As bandas de transição d-d foram observadas em 664 nm ($\epsilon = 56 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para **10**, em 672 nm ($\epsilon = 61 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para **11**, e em 664 nm ($\epsilon = 79 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para **12**.

Figura I.27. Espectros no UV/Vis em solução aquosa. A) $\text{Na}_2[(\text{Glc})_3\text{Cu}_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**10**); B) $\text{Na}_2[(\text{Fru})_4\text{Cu}_3] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**11**); C) $\text{Na}[(\text{Gal})_3\text{Cu}_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (**12**).

I.3.4.3. EPR

Os espectros de EPR para os complexos $\text{Na}_2[\text{Cu}_2(\text{Glc})_3] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**10**), $\text{Na}_2[\text{Cu}_3(\text{Fru})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**11**) e $\text{Na}[\text{Cu}_2(\text{Gal})_3] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (**12**) (na Figura I.28) foram realizados no estado sólido, a 77K, e mostraram um característico perfil de um ambiente rômico ao redor do centro de cobre(II), com a presença de diferentes parâmetros, g_{xx} , g_{yy} e g_{zz} , e das correspondentes constantes hiperfinas A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} , como esperado para um ambiente paramagnético rômico, com $S = \frac{1}{2}$ e $I = \frac{3}{2}$, usando

instrumento de banda X, a $\nu = 9.250 \text{ GHz}$ ²⁰⁶. Os parâmetros obtidos a partir destes espectros estão na Tabela I.9.

Figura I.28. Espectros de EPR no estado sólido, 77K; **A)** $\text{Na}_2[\text{Cu}_2(\text{Glc})_3] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**10**); **B)** $\text{Na}_2[\text{Cu}_3(\text{Fru})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**11**); **C)** $\text{Na}[\text{Cu}_2(\text{Gal})_3] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (**12**); com as respectivas ampliações **D)**, **E)**, e **F)**. Ganho: 1.00×10^4 , amplitude de modulação: 12G, constante de tempo: 20.48 s, 1 scan.

Tabela I.9. Parâmetros de EPR para os complexos de Cu-carboidrato preparados, em estado sólido, a 77K.

Complexo	g_{zz}	$A_{zz} \text{ (G)}$	g_{xx}	$A_{xx} \text{ (G)}$	g_{yy}	$A_{yy} \text{ (G)}$
$\text{Na}_2[\text{Cu}_2(\text{Glc})_3] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (10)	2.252	190	2.070	26.1	2.022	23.7
$\text{Na}_2[\text{Cu}_3(\text{Fru})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (11)	2.261 2.259 ξ	189 194 ξ	2.062	26.1	2.025	21.7
$\text{Na}[\text{Cu}_2(\text{Gal})_3] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (12)	2.252 2.293 ξ	189 161 ξ	2.065	23.5	2.018	19.6

ξ Em baixas concentrações. (Ver detalhe ampliado na Figura I.28)

²⁰⁶ F.E. Mabbs, D. Collison, "Electron Paramagnetic Resonance of d Transition Metal Compounds", Elsevier Ed. (1992) Cap. 4, p. 113.

No caso do complexo **12**, a evidência da presença de dois isômeros foi observada, como indicado pelo desdobramento das constantes g_{zz} e A_{zz} , devido aos dois anômeros do açúcar (neste caso a Galactose) presentes em quase proporções quase iguais. O desdobramento nas regiões de g_{xx} e g_{yy} não foi verificado. Ao contrário, no caso do composto **11**, há claramente um isômero majoritário. Entretanto, para o composto **10**, o espectro é mais consistente com a presença de somente uma espécie. O ambiente rômico ao redor do íon de cobre(II) não é usual, mas consistente no caso destes complexos. Se existem três moléculas de carboidratos ao redor do íon metálico, condizente com este tipo de ambiente, e os espectros são completamente diferentes dos demais complexos de cobre(II) que exibem um ambiente axial. A posição relativa do sinal é sugestiva de um estado fundamental no orbital d_{zz} , com ligações Cu-L curtas no plano xy , e duas delas mais longas, no eixo z . A pequena diferença observada entre os valores de g_{xx} e g_{yy} indica somente uma alteração marginal observada ao longo das direções x e y . Todavia, para todos estes complexos, não foram observadas transições $\Delta M_S=2$ características de associações diméricas intermoleculares entre os centros de cobre, pois o desdobramento do estado triplete não foi observado (ao redor de 1500 G).

Resultados análogos foram verificados para complexos similares de Cu(II)-carboidrato na literatura ¹⁹⁰, também com um ambiente rômico ao redor do íon de cobre. Neste caso, complexos ternários foram obtidos, exibindo também íons cloretos coordenados. Os parâmetros de EPR observados para as espécies $\text{Na}[\text{Cu}_2(\text{Glc})_3\text{Cl}_3]$, $\text{Na}[\text{Cu}_3(\text{Fru})_2(\text{OH})\text{Cl}_4]$, $\text{Na}[\text{Cu}_3(\text{Fru})_2\text{Cl}_3]$, e $\text{Na}[\text{Cu}_3(\text{Gal})_2\text{Cl}_3] \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ foram muito similares aos valores observados para os nossos complexos $\text{Na}_2[\text{Cu}_2(\text{Glc})_3] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**10**), $\text{Na}_2[\text{Cu}_3(\text{Fru})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**11**) e $\text{Na}[\text{Cu}_2(\text{Gal})_3] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (**12**), com g_1 na faixa de 2.26-2.29, g_2 ao redor de 2.07 e g_3 entre 2.00 e 2.03.

1.3.4.4. Espectroscopia Raman

Com regras de seleção diferentes do IV ²⁰⁷, o Raman fornece informações adicionais valiosas a respeito do comportamento vibracional da molécula. Muita atenção tem sido dada recentemente à aplicação da espectroscopia Raman em amostras biológicas, utilizando lasers no visível.

Deste modo, fez-se o estudo por espectroscopia Raman dos complexos obtidos como modelo para a ligação Metal-Carboidrato, isto é, os complexos **10**, **11** e **12**. A Figura I.29 mostra os espectros de Raman do ligante livre D-Glicose comparados ao de seu correspondente complexo com cobre(II) **10**, sem correções e ampliados na faixa significativa do espectro, já que na faixa de 1600 à 4000 cm^{-1} não forneceu informações importantes neste caso. A presença de bandas características do anômero α da glicose em 402, 538, 769, 839, 913, 1340 e 1365 cm^{-1} e

²⁰⁷ Para se ler mais a respeito de Espectroscopia Raman e algumas aplicações: P. Hendra, C. Jones, G. Warnes, "Fourier Transform Raman Spectroscopy: Instrumentation and Chemical Applications", Ellis Horwood Limited, England, **1991**, 311p.

aqueles referentes ao anômero β em 420, 1070 e 1120 cm^{-1} ^{208, 209} indicam que o ligante no estado sólido como uma mistura de anômeros com predominância do confôrmero α . Entretanto, no espectro do complexo **10** há um aumento nas intensidades relativas das bandas do anômero β em 423, 448, 519, 900, 931, 1072, 1125, 1325 e 1375 cm^{-1} , indicando que este anômero é a conformação preferencial do ligante coordenado. Embora um padrão interno não tenha sido utilizado nestes casos, a relação sina/ruído foi utilizada como um indicativo para a constatação da diminuição ou aumento das bandas.

Figura I.29. Espectros Raman da D-glicose (a) e do seu correspondente complexo de Cu(II) (**10**) (b), ambos no estado sólido. Radiação usada: linha do laser He-Ne 632.8 nm, com potência de 5 mW.

O espectro Raman da D-frutose e do seu complexo de Cu(II) correspondente **11** estão mostrados na Figura I.30. No espectro do ligante D-frutose livre, as bandas em 464, 871, 922 e 1173 cm^{-1} foram atribuídas ao isômero furanose (anel de 5 membros da D-Frutose, ver Esquema I.14), e as bandas em 421, 523, 815, 976 e 1140 cm^{-1} foram atribuídas ao isômero piranose (anel de 6 membros, Esquema I.14), indicando que ambos os isômeros estão presentes no ligante sólido ²¹⁰. Já no espectro Raman do respectivo complexo de Cu(II) **11**, observa-se o aumento das intensidades relativas das bandas em 458, 712, 872 e 931 cm^{-1} devido à presença majoritária do isômero furanose ao se complexar, com o decréscimo concomitante nas intensidades relativas das bandas em 421, 523, 832 e 968 cm^{-1} , que são aquelas características do carboidrato na

²⁰⁸ F. Franks, J.R. Hall, D.E. Irish, K. Norris, *Carbohydr. Res.* 157 (1986) 53.

²⁰⁹ R.G. Zhabankov, V.M. Andrianov, M.K. Marchewka, *J. Mol. Struct.* 436-437 (1997) 637.

²¹⁰ M. Mathlouthi, D.V. Luu, *Carbohydr. Res.* 78 (1980) 225.

forma piranose, sugerindo portanto que o ligante preferencialmente adquire a estrutura furanose no complexo. É importante notar que Etcheverry et al. observaram um comportamento similar no complexo de oxovanádio(IV) com D-Frutose ²¹¹.

Figura I.30. Espectros Raman da D-frutose (a) e do seu correspondente complexo de Cu(II) (**11**), ambos no estado sólido. Radiação usada: linha do laser He-Ne 632.8 nm, com potência de 5 mW.

Estes resultados estão em concordância com os dados de EPR, onde se notou a presença de uma estrutura bastante predominante ao redor do íon de cobre(II), no caso dos complexos com a D-glicose $\text{Na}_2[\text{Cu}_2(\text{Glc})_3] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ **10** e com a D-frutose $\text{Na}_2[\text{Cu}_3(\text{Fru})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ **11**.

O espectro Raman da D-Galactose e seu complexo de cobre(II) análogo **12** estão mostrados na Figura I.31. Neste caso, os dois espectros são muito similares e pode-se concluir que os dois anômeros da D-Glactose (α e β) estão aproximadamente na mesma proporção no ligante livre e no complexo, sem apresentar nenhuma coordenação preferencial de um conformero com o íon metálico.

Estes resultados também estão de acordo com os dados do EPR para este complexo, onde foi observado uma mistura de dois tipos de ambiente ao redor dos íons de cobre(II).

²¹¹ S.B. Etcheverry, P.A.M. Williams, E.J. Baran, *Carbohydr. Res.* 302 (1997) 131.

Figura I.31. Espectros Raman da D-galactose (a) e do seu correspondente complexo de Cu(II) (**12**) (b), ambos no estado sólido. Radiação usada: linha do laser He-Ne 632.8 nm, com potência de 5 mW.

As atribuições completas das bandas dos espectros Raman aqui apresentados para os complexos 10, 11 e 12 foram apresentadas em Parte Experimental (Capítulo 2.I.).

É sabido que em compostos de coordenação de íons metálicos há uma transferência de carga entre o íon metálico e o sítio atômico do ligante que pode resultar em aumento na intensidade relativa das bandas do Raman relacionadas aos grupos coordenados do ligante ²¹². Levando-se em conta este argumento, no espectro Raman do complexo com a D-frutose (complexo 11, Figura I.30 b), o aumento nas intensidades relativas das bandas designadas ao anel do açúcar em 630 e 1072 cm⁻¹ (designadas como deformação CCO e como estiramento CO, respectivamente), e em 1261, 1360 e 1458 cm⁻¹, designados como torção, balanço e deformação CH₂, respectivamente) ²¹⁰, sugerem que o oxigênio 1 é um dos preferidos para o sítio de coordenação com o cobre(II). Usando o mesmo argumento, no espectro Raman da D-glicose, as intensidades relativamente altas das bandas em 1072, 1125, 1357 e 1375 cm⁻¹, cujos modos normais tem a predominante contribuição das ligações C(1)O(5) e C(1)O(1) ²⁰⁹, sugerem que este sítio ligante é o ancoramento para o cobre(II) no complexo.

Apesar destes estudos terem sido feito no estado sólido, devido à instabilidade do complexo de cobre(II)-carboidrato em solução, deram um indicativo de como o cobre se coordena ao carboidrato, preferindo uma determinada estrutura do ligante do que outra. Estudos sobre este tipo de complexo já haviam sido feitos na literatura, mas sem o devido aprofundamento estrutural.

²¹² P.S. Santos, O. Sala, L.K. Noda, N.S. Gonçalves, *Spectrosc. Acta*, 56-A (2000) 1553.

3. Resultados e Discussão – Parte II *Reatividade e Cinética*

A grande versatilidade dos compostos de cobre (II) preparados com ligantes imínicos e diimínicos derivados da isatina, apresentando um interessante equilíbrio ceto-enólico, deu origem a um intenso estudo quanto às atividades catalíticas e biológicas destes compostos. Uma característica importante é a capacidade de se modular sua reatividade através da mudança no valor do pH do meio. São compostos que mostraram uma grande variação no arranjo dos ligantes ao redor do metal ao se passar de meio ácido a meio alcalino, estabilizando espécies de cobre(II) também em altos valores de pH, e assim adequando-se a processos que ocorrem em meio básico, como a oxidação de carboidratos. Esta reação-modelo constituiu o objetivo principal destes estudos, devido, em primeira instância, ao grande interesse biológico implicado. *Como apresentado na Introdução desta Tese, há controvérsias sobre o papel desempenhado por íons metálicos de transição, em especial o cobre(II), nestas reações de oxidação de carboidratos. Buscou-se, com estes estudos cuidadosamente elaborados a partir de complexos modelos, a elucidação desta controvérsia.*

II.3.1.a. O uso do O₂ como oxidante

Um ponto estratégico a ser destacado é o uso de oxigênio molecular como agente oxidante, a partir do ar, devido à sua relação custo/benefício geralmente vantajosa, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental. O estudo das várias maneiras com que o oxigênio molecular pode ser ativado é de grande importância tanto na área biológica, como industrial, para aplicação em catálise. Inúmeras oxidações são realizadas por organismos vivos utilizando o oxigênio molecular e enzimas especializadas. Do lado industrial, o oxigênio é um oxidante barato, limpo e, desde que se utilize o catalisador adequado, bons rendimentos e altas seletividades podem ser alcançados ²¹³.

O conhecimento do modo de ação do oxigênio molecular como agente oxidante é um ponto crucial para o desenvolvimento de mecanismos reacionais, ainda não conhecidos, e o modo de ação de novos catalisadores. A reatividade do oxigênio molecular é regida pela sua maior tendência de atuar como oxidante de dois elétrons do que com um elétron apenas. Observando a configuração eletrônica do oxigênio, $\sigma^2\pi^4\pi^{*2}$, nota-se que ao agir como oxidante de um elétron, indo de O₂ para O₂[•], ou formando HO₂[•] em uma reação de protonação, este elétron é adicionado ao orbital π^* , duplamente degenerado. A energia de troca do orbital semipreenchido é perdida na oxidação monoelétrica, resultando em um balanço energético desfavorável para reações deste tipo.

²¹³ a) R.A. Sheldon, I.W.C.E. Arends, H.E.B. Lempers, *Catal. Today* 41 (1998) 387; b) R. A. Sheldon, *Top. Curr. Chem.* 164 (1993) 21.

Deste modo, o oxigênio molecular é um fraco iniciador de reações com substratos diamagnéticos que podem apenas fornecer um elétron por molécula. No caso de substratos paramagnéticos, ou seja, espécies radicalares, a molécula de dióxigênio se torna muito reativa, pois ocorre um rápido emparelhamento de spins dos elétrons. O papel dos complexos metálicos na ativação do oxigênio molecular é o de ultrapassar este obstáculo cinético de restrição de spin, o que pode ser feito de várias maneiras. Do ponto de vista do tipo de reação, estas podem ser do tipo no qual o oxigênio se combina diretamente com o substrato, as chamadas reações de inserção parcial ou total, ou do tipo no qual o oxigênio age apenas como agente oxidante, se reduzindo a peróxido de hidrogênio ou água, dependendo das condições e do substrato; são as chamadas reações de não-inserção. Reações de não-inserção são importantes pelo grande interesse que existe em reações do oxigênio molecular catalisadas por enzimas do tipo oxidase, nas quais o oxigênio é reduzido a peróxido de hidrogênio. Estas reações estão normalmente acopladas a sistemas de enzimas que rapidamente decompõem o peróxido formado, como as peroxidases e as catalases. A maior parte das reações de inserção parcial de oxigênio envolve a iniciação e a propagação de reações de radicais livres com íons metálicos.

II.3.1.b. A oxidação de carboidratos

Buscou-se nesta parte do trabalho, de Reatividade e Cinética, unir informações sobre a catálise da oxidação de carboidratos por complexos de Cu(II) e a natureza desta transformação, e assim foi possível chegar a conclusões importantes da ação deste metal nesta oxidação num meio reacional, já que ainda há grande controvérsia sobre o papel de íons de cobre(II) na oxidação de carboidratos, tanto in vitro, quanto in vivo, como foi discutido na introdução. Além disso, o desenvolvimento de complexos especialmente adaptáveis a meios reacionais drásticos, como meios alcalinos, é muito atraente tanto do ponto de vista estrutural, quanto do ponto de vista catalítico.

II.3.2. Método de tratamento dos dados cinéticos

O método utilizado para o tratamento dos dados cinéticos foi o de Michaelis-Menten, numa analogia com a catálise enzimática.

Este método considera que para muitas enzimas, a velocidade de reação (v) varia com a concentração do substrato, obedecendo a uma curva de saturação hiperbólica e sendo definida como o número de moles de produto formados por litro e por segundo. Para uma concentração fixa de enzima, v é quase independente da variação da concentração de substrato, quando esta é suficientemente alta como é representado na figura ao lado, da curva da velocidade inicial em função da concentração do substrato. A inclinação da curva no seu início fornece-nos a constante de reação observada (k_{obs}).

A comparação dos valores de k_{obs} obtidos quando se avalia a influência da concentração do catalisador ou do substrato, dá uma boa idéia sobre a reatividade deles. Além disso, é um método quase imediato de se avaliar a eficiência de um catalisador (ou substrato) em relação a outro, sem a necessidade de muitos cálculos.

Considerando-se que o processo catalítico ocorre através das etapas:

uma enzima, E , combina-se com um substrato S formando um complexo ES , com constante de velocidade k_1 . O complexo ES formado pode dissociar-se em $E + S$, com constante de velocidade k_2 , ou formar o produto P , com constante de velocidade k_3 . A constante de Michaelis K_m , a velocidade máxima $V_{m\acute{a}x}$ e a constante de eficiência do catalisador k_{cat} podem então ser prontamente deduzidas a partir da curva do inverso das velocidades iniciais de reação *versus* o inverso das concentrações de substrato ($1/v_i$ *versus* $1/[substrato]$), onde $k_{cat} = v_{m\acute{a}x} / [cat]$, o coeficiente linear da reta é dado por $1/v_{m\acute{a}x}$, e o coeficiente angular é $K_m / v_{m\acute{a}x}$ ²¹⁴.

Os dados sobre a variação da concentração do catalisador foram tratados aplicando-se regressão linear nos pontos iniciais das curvas cinéticas obtidas e extraindo-se as respectivas velocidades iniciais de reação através da tangente do ângulo formado, e a partir daí obtendo-se os valores de k_{obs} . Para simular uma cinética de primeira ordem, e facilitar o tratamento dos dados por Michaelis-Menten, foram utilizadas concentrações do catalisador entre 10 e 30 vezes menores que do substrato.

Mediu-se o consumo de oxigênio durante as reações de oxidação estudadas em um Oxígrafo ²¹⁵, com controle de temperatura e concentração. O Oxígrafo é um equipamento que permite a verificação de oxigênio presente no meio, monitorando seu consumo ou sua liberação. Ele possui um eletrodo sensível a oxigênio, o Eletrodo de Clark (Pt, com referência interna de

²¹⁴ L. Striter, *Bioquímica*, Ed. Guanabara Koogan, RJ, (1992).

²¹⁵ J. Robinson, J.M. Cooper, *Anal. Biochem.* 33 (1970) 390.

Ag/AgCl), com voltagem aplicada de 0,8 V, envolto em uma membrana de polietileno para sonda de O₂, com solução saturada de KCl entre o eletrodo e a membrana. Com o Oxígrafo foi possível a obtenção de curvas cinéticas do consumo de O₂ do meio reacional em relação ao tempo. O volume da célula reacional usada foi de 1,8 mL, fechada com uma pequena tampa contendo um orifício capilar, que dificulta a troca gasosa com a atmosfera, acoplada a um banho termostaticado e com agitador magnético. Usou-se ditionito de sódio (agente redutor) para calibrar o oxígrafo (0% e 100% de oxigênio dissolvido na célula), que é aproximadamente de 244 μM²¹⁶, a 25°C (298 K), em água pura. Usou-se este valor em todas as medidas com esta temperatura para calibração. Em outras temperaturas foram usados valores intermediários entre 244 e 198 mM O₂ (37°C). Nos estudos que foram conduzidos em meio básico, utilizaram-se tampões carbonato (Na₂CO₃/ NaOH 1 mol/L), 25-250 mM, pH (12,0 ± 0,2). Todos os tampões e soluções utilizadas nestes estudos cinéticos (com exceção da solução do catalisador de cobre) foram eluídos em resina de troca iônica Chelex 100, para eliminar qualquer traço de íons metálicos. Todas as medidas foram feitas em duplicatas, e triplicatas quando necessário, e o desvio experimental variou de 3 a 5%. Em todos os estudos cinéticos fez-se o controle com as seguintes curvas: catalisador (complexo utilizado no estudo em questão) sem o substrato (carboidrato); substrato sem o catalisador; e finalmente utilizando o [Cu(H₂O)₆](ClO₄)₂ no lugar do catalisador preparado para comparação.

II.3.3. Dados e curvas cinéticas

As curvas cinéticas de consumo de oxigênio na oxidação da glicose, frutose e galactose (todas 1,00x10⁻³ M, onde M = mol.dm⁻³) para o catalisador [Cu(*isa-pn*)]²⁺ estão nas Figuras II.1, II.2 e II.3, respectivamente, onde variou-se a concentração do catalisador, numa escala de pelo menos 10 vezes menor que a concentração do carboidrato, para simular uma cinética de primeira ordem e aplicar o tratamento de Michaelis-Menten. A curva de variação da concentração do carboidrato, a frutose, que se mostrou mais ativa, mantendo-se constante o catalisador em 1,00x10⁻⁴ M é mostrada na Figura II.4.

²¹⁶ D.R. Lide, "CRC HANDBOOK of Chemistry and Physics" – 75ed., ed.; CRC Press (1994), p.6-4.

Figura II.1. Monitoramento da variação de oxigênio na célula ($\mu\text{M O}_2$ dissolvido) em relação à concentração do catalisador (1), na oxidação da glicose. *Cuisapn* = catalisador, complexo 1; *Glu* = glicose.

Figura II.2. Monitoramento da variação de oxigênio na célula ($\mu\text{M O}_2$ dissolvido) em relação à concentração do catalisador (1), na oxidação da frutose. *Cuisapn* = catalisador, complexo 1; *FR* = frutose.

Figura II.3. Monitoramento da variação de oxigênio na célula ($\mu\text{M O}_2$ dissolvido) em relação à concentração do catalisador (1), na oxidação da galactose. *Cuisapn* = catalisador, complexo 1; *GA* = galactose.

Figura II.4. Monitoramento da variação de oxigênio na cela ($\mu\text{M O}_2$ dissolvido) em relação à concentração da frutose, mantendo-se constante a concentração do catalisador. *Cuisapn* = complexo **1**; *FRU* = frutose.

É interessante notar que as curvas de controle, onde há apenas o catalisador ou apenas o substrato, o consumo de O_2 é bem menor (ou desprezível), indicando que não há nenhuma outra reação de oxidação ocorrendo. A exceção a isso é a frutose, que mesmo sem o catalisador, apresenta uma pequena taxa de consumo de O_2 . Outro controle usado foi o complexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, ou mais conhecido como complexo cobre-aqua, como catalisador, que se mostrou muito menos reativo do que o catalisador em questão estudado. Observam-se dois processos cinéticos, principalmente nas curvas de oxidação da frutose. Aparentemente, há um processo de iniciação mais rápido e outro que continua a reação. Para os cálculos cinéticos, foram utilizados os primeiros processos de cada curva, onde a velocidade é maior.

Assim como feito para o composto **1**, os estudos cinéticos na oxidação de carboidratos foram também desenvolvidos para o composto **2**, mas em um estudo mais completo, onde todos os parâmetros da reação foram variados independentemente (concentração do catalisador, do substrato, do carbonato, pH e temperatura). Não é necessário fazer todas estas variações em todos os substratos e catalisadores, de modo que se escolheu o composto **2** e a frutose para este estudo mais completo, pois ambos mostraram-se os mais reativos.

As curvas cinéticas de consumo de oxigênio na oxidação da glicose, frutose e galactose (todas em solução $1,00 \times 10^{-3}$ M) para o complexo $[\text{Cu}(\text{isa-en})]^+$ estão nas Figuras II.5, II.6 e II.7, respectivamente, onde variou-se a concentração do catalisador. A curva de variação da concentração de um carboidrato, a frutose, que se mostrou mais ativa, mantendo-se constante o catalisador em $1,00 \times 10^{-4}$ M está na Figura II.8. As curvas da variação de outros parâmetros, como a temperatura, o valor do pH e a concentração de carbonato no tampão, estão nas Figuras II.9, II.10 e II.11, respectivamente.

Figura II.5. Monitoramento da variação de oxigênio na célula ($\mu\text{M O}_2$ dissolvido) em relação a concentração do catalisador (2), na oxidação da glicose. *Cuisaen* = catalisador, composto 2; *Glu* = glicose.

Figura II.6. Monitoramento da variação de oxigênio na célula ($\mu\text{M O}_2$ dissolvido) em relação a concentração do catalisador (2), na oxidação da frutose. *Cuisaen* = catalisador, composto 2; *FR* = frutose.

Figura II.7. Monitoramento da variação de oxigênio na célula ($\mu\text{M O}_2$ dissolvido) em relação a concentração do catalisador (2), na oxidação da galactose. *Cuisaen* = catalisador, composto 2; *GA* = galactose.

Figura II.8 Monitoramento da variação de oxigênio na cela ($\mu\text{M O}_2$ dissolvido) em relação a concentração da frutose, mantendo-se constante a concentração do catalisador. *Cuisaen* = composto 2; *FRU* = frutose.

Figura II.9 Monitoramento da variação de oxigênio na cela ($\mu\text{M O}_2$ dissolvido) em relação à variação da temperatura, mantendo-se constante a concentração do catalisador ($1,11 \times 10^{-4} \text{ M}$) e da frutose ($1,11 \times 10^{-3} \text{ M}$). *Cuisaen* = catalisador, composto 2; *FRU* = frutose. As diferenças nas concentrações iniciais de O_2 dissolvido é devido à diferença de temperatura, que altera a solubilidade do O_2 na água.

Figura II.10 Monitoramento da variação de oxigênio na cela ($\mu\text{M O}_2$ dissolvido) em relação à variação do pH (ajuste com solução de NaOH), com a variação da $[\text{OH}^-]$ do meio, mantendo-se constante a concentração do catalisador ($1,11 \times 10^{-4} \text{ M}$) e da frutose ($1,11 \times 10^{-3} \text{ M}$). *Cuisaen* = catalisador, composto 2; *FRU* = frutose.

Figura II.11. Monitoramento da variação de oxigênio na cela ($\mu\text{M O}_2$ dissolvido) em relação à concentração de carbonato no meio, mantendo-se constante a concentração do catalisador ($1.11 \times 10^{-4} \text{ M}$) e da frutose ($1.11 \times 10^{-3} \text{ M}$). *Cuisaen* = catalisador, composto 2; *FRU* = frutose.

As curvas cinéticas apresentam um comportamento similar ao estudo com o catalisador 1. Nas curvas de controle, onde há apenas o catalisador ou apenas o substrato, o consumo de O_2 é quase nulo, indicando que não há nenhuma reação de oxidação ocorrendo, tendo apenas a frutose uma pequena taxa de oxidação. Nota-se claramente que o catalisador $[\text{Cu}(\text{isa-en})]^+$ é mais reativo frente aos carboidratos estudados do que o $[\text{Cu}(\text{isa-pn})]^{2+}$, e isso pode ser devido ao fato de ele ter em sua estrutura um grupo NH_2 mais lábil, podendo ser um ponto de interação do substrato a ser oxidado, através de reação de condensação, e facilitar assim sua interação com o centro ativo de cobre.

Na Figura II.10 observa-se o efeito do aumento do valor do pH na velocidade da reação. A partir do pH 11 a velocidade sobe exponencialmente, indicando que provavelmente é preciso retirar o próton da hidroxila do carboidrato para começar a sua oxidação, somente iniciada com a forma enólica do carboidrato. Ou seja, a etapa mais lenta é a enolização do carboidrato. Neste pH alto, também o ligante no catalisador assume um equilíbrio quase todo deslocado à forma enol, na qual estamos propondo que estes catalisadores sejam mais ativos.

A partir da curva cinética da variação da temperatura, com concentrações fixas de catalisador **2** e substrato (frutose), obtiveram-se os respectivos coeficientes angulares a cada T no seu início (v_i). Nota-se um comportamento típico de reações que seguem a equação de Arrhenius, onde o aumento da temperatura implica em uma maior velocidade de reação. A partir desta curva de $\ln v_i$ versus $1/T$ (Figura II.12), foi possível obter a energia de ativação para este processo, de 1.1 kJmol^{-1} , a partir da equação de Arrhenius. Esta baixa energia de ativação está de acordo com a energia necessária à enolização do carboidrato. Valores muito similares foram obtidos em estudos prévios da enolização do uronato, catalisado por um complexo de cobre(II)-gluconato ⁶⁴.

Figura II.12. Curva de v_i versus T. Catalisador = $[\text{Cu}(\text{isa-en})]^+ 1.11 \times 10^{-4} \text{ M}$; Substrato = Frutose $1.11 \times 10^{-3} \text{ M}$; 25°C ; Tampão carbonato 250 mM, pH12.

Assim como feito para o composto **1** e **2**, os estudos cinéticos na oxidação de carboidratos foram ainda desenvolvidos para o composto **3**, onde foram obtidas curvas cinéticas de consumo de oxigênio na oxidação da glicose, frutose e galactose (todas em solução $1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$) para o catalisador $[\text{Cu}(\text{isa-epy})]^{2+}$. As curvas cinéticas obtidas estão nas Figuras II.13, II.14 e II.15, relativas respectivamente à oxidação da glicose, frutose e galactose.

Figura II.13. Monitoramento da variação de oxigênio na célula ($\mu\text{M O}_2$ dissolvido) em relação à concentração do catalisador (3), na oxidação da glicose. *Cuisaepy* = catalisador, composto 3; *Glu* = glicose.

Figura II.14. Monitoramento da variação de oxigênio na célula ($\mu\text{M O}_2$ dissolvido) em relação à concentração do catalisador (3), na oxidação da frutose. *Cuisaepy* = catalisador, composto 3; *FR* = frutose.

Figura II.15. Monitoramento da variação de oxigênio na célula ($\mu\text{M O}_2$ dissolvido) em relação à concentração do catalisador (3), na oxidação da galactose. *Cuisaepy* = catalisador, composto 3; *GA* = galactose.

As curvas cinéticas para o composto 3 apresentaram um comportamento similar a dos estudos com o catalisador 1 e 2. Nas curvas de controle, onde há apenas o catalisador ou apenas o substrato, o consumo de O_2 é quase nulo, indicando que não há nenhuma reação de oxidação ocorrendo, tendo apenas a frutose uma taxa significativa de oxidação.

Foram feitos também estudos cinéticos a título de comparação entre íons ferro(II) e cobre(II), na forma dos complexos sulfato de ferro(II) amoniacal e perclorato de cobre(II) hexahidratado, o mesmo utilizado nas curvas cinéticas de controle (dos estudos anteriores). Observou-se uma maior atividade de íons cobre(II) em comparação com íons de ferro(II), como mostrado na Figura II.16, provando que íons $Cu(II)$ são bem mais ativos na oxidação de todos os carboidratos estudados do que íons $Fe(II)$, considerando que em altos valores de pH estes íons não apresentem grandes diferenças de K_{ps} caso precipitem na forma de hidróxido.

Figura II.16. Estudo cinético comparativo entre $[Fe(H_2O)_6]^{2+}$ e $[Cu(H_2O)_4]^{2+}$ na oxidação da frutose, glicose e galactose, medindo-se o consumo de oxigênio, pH 12, tampão carbonato 250 mM, $T = (25.0 \pm 0.1)^\circ C$.

A partir das curvas cinéticas obtidas em todos os estudos catalíticos realizados foi possível se obter as curvas de velocidade inicial (coeficiente angular da curva no início da reação) *versus* a concentração do elemento que estava variando (catalisador, substrato, base), e assim foi possível chegar a um valor de k_{obs} para cada substrato, na reação catalisada com cada um dos três complexos estudados. As constantes catalíticas observadas foram calculadas, para enfim se chegar a uma lei cinética experimental e a um mecanismo de reação, proposto a partir de todas as evidências experimentais.

As constantes das reações catalíticas da oxidação dos carboidratos estão descritas na Tabela II.1, onde as constantes observadas foram calculados a partir das curvas de consumo de O_2 , variando-se as concentrações de catalisador.

Tabela II.1 – Constantes de velocidade observadas para os complexos estudados, na oxidação da glicose, frutose e galactose pelo oxigênio molecular. Condições de reação: [Substrato] = $1,11 \times 10^{-3}$ M, e $[\text{OH}] = (2,2 \pm 0,8) \times 10^{-2}$ M, correspondendo a um pH $(12,0 \pm 0,2)$, à $(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$.

Composto	$k_{\text{obs}} / 10^{-2} \text{ s}^{-1}$		
	Glicose	Frutose	Galactose
$[\text{Cu}(\text{isa-pn})](\text{ClO}_4)_2$ 1	$1,66 \pm 0,08$	$12,4 \pm 0,6$	$0,52 \pm 0,02$
$[\text{Cu}(\text{isa-en})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$ 2	$1,91 \pm 0,09$	$13,7 \pm 0,7$	$1,81 \pm 0,09$
$[\text{Cu}(\text{isa-epy})_2](\text{ClO}_4)_2$ 3	$2,7 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,1$	$1,41 \pm 0,07$

Uma dependência de primeira ordem em relação à concentração do catalisador é observada no início da reação, seguido de um efeito de saturação a concentrações $> 1,0 \times 10^{-4}$ M, para todos os catalisadores, e $2,0 \times 10^{-5}$ M apenas no caso de **2**, para a frutose e a glicose, pois ele é mais reativo que os demais. Lembrando-se que a concentração de O_2 no meio é $2,00 \times 10^{-4}$ M, este efeito de saturação está relacionado com a concentração dos reagentes presentes. As curvas de velocidade inicial *versus* concentração dos complexos (de onde foram retirados as constantes) são visualizadas na Figura II.17.

Figura II.17. Curvas de influência do catalisador na velocidade inicial. [Carboidrato] = 1.00 mM nos gráficos: **A)** glicose, **B)** frutose e **C)** galactose. Reações a $T = (25.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$, e pH 12.0, em tampão carbonato ($\text{CO}_3^{2-}/\text{OH}^-$, 250 mM). Com os complexos **1** $[\text{Cu}(\text{isa-pn})]^{2+}$, **2** $[\text{Cu}(\text{isa-en})]^+$ e **3** $[\text{Cu}(\text{isa-epy})]^{2+}$, nas curvas com os símbolos ■, ● e ▲, respectivamente.

Como comparação, foi também analisado o composto diimínico **7**, $[\text{Cu}(\text{quin-pn})](\text{ClO}_4)_2$, com estrutura bastante parecida com os complexos derivados da isatina aqui estudados (Figura II.18 A). Como seus parâmetros de EPR se equiparam aos parâmetros observados na forma enol dos complexos de cobre derivados da isatina, isto indica ter ele a mesma estrutura próxima ao quadrado planar ao redor do íon de cobre (II), porém sem apresentar o equilíbrio tautomérico em solução. O composto **7** apresentou atividade catalítica insignificante, quando comparado nas mesmas condições dos compostos derivados da isatina analisados. Em relação a oxidação da frutose (concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{M}$), em tampão carbonato 250 mM e pH 12,0, o composto **7** apresentou um k_{obs} de $(1,52 \pm 0,09) \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$, ou seja, cerca de duas ordens de grandeza abaixo da atividade catalítica dos complexos **1**, **2** e **3**.

Em uma outra comparação, outros dois complexos de cobre(II) feitos por outros integrantes do grupo foram estudados e comparados. Eles possuíam, assim como o composto **7**, estrutura geométrica bastante semelhante aos complexos com ligantes derivados da isatina, mas sem o equilíbrio ceto-enólico, e sem a estabilidade necessária para a realização destes estudos de oxidação de carboidratos em pHs muito altos (Figura II.18 B, com os complexos de cobre usados para comparação: $\text{Cu}(\text{apy-hist})^+$ e $\text{Cu}(\text{apy-epy})^+$, onde *apy*: acetilpiridina, *hist*: histamina, *epy*: 2-aminoetil piridina). Este estudo provou que os ligantes escolhidos para este estudo apresentam alta estabilidade a valores elevados de pH, auxiliado pela presença de um equilíbrio interno, dependente do pH.

A)

B)

Figura II.18. Curvas ($v_i \times [\text{Cat}]$), na oxidação catalisada da frutose 1.00 mM. Reações a $T = (25.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$, e pH 12.0, em tampão carbonato ($\text{CO}_3^{2-}/\text{OH}^-$, 250 mM). **A)** Complexo 7.; **B)** Influência do tipo do catalisador de cobre(II) com diferentes ligantes Base de Schiff na velocidade inicial.

Analisando a dependência da velocidade inicial de reação com a variação na concentração do substrato (frutose), da concentração de base ($[\text{OH}^-]$ e da concentração do tampão carbonato (Figura II.19), juntamente com a variação do catalisador, chegou-se a uma lei de velocidade, exemplificada para o caso do catalisador 2.

Figura II.19. (A) Dependência da velocidade inicial com a concentração de frutose, na presença do complexo **2**, $[\text{Cu}(\text{isa-en})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$, 0,110 mM. Reação a $T = (25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$, e pH 12,0, em tampão carbonato ($\text{CO}_3^{2-}/\text{OH}^-$, 250 mM). (B) Dependência com a concentração de $[\text{OH}]$. Reação a $T = (25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$, **2** $[\text{Cu}(\text{isa-en})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$, 0,110 mM, e $[\text{Frutose}] = 1,00$ mM. (C) Influência da concentração de carbonato (do tampão) na velocidade inicial da oxidação da frutose. Reação a $T = (25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$, pH = 12,0, **2** $[\text{Cu}(\text{isa-en})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$, 0,110 mM, e $[\text{Frutose}] = 1,00$ mM.

A Lei de velocidade experimental foi determinada a partir dos dados cinéticos apresentados, considerando-se somente a dependência de primeira ordem, ou seja, a parte inicial da curva cinética presentes nas Figuras II.17 e II.19, das curvas de velocidade inicial *versus* $[\text{CuL}]$, para os complexos **1** e **2**, e de velocidade inicial *versus* $[\text{Fru}]$ e de velocidade inicial *versus* $[\text{OH}]$:

- Condições experimentais de concentrações:

[frutose] = $1,11 \times 10^{-3}$ M, [CuL, 2] = $1,11 \times 10^{-4}$ M, pH = $(12,0 \pm 0,2)$ e $[\text{OH}^-] = 2,16 \times 10^{-2}$ M.

- Variação da concentração do catalisador (dados da curva V_i x [CuL, 2], Fig. II.17.A):

$$V_i = V_0 + k_{\text{obs}} [\text{CuL}]$$

$$V_0 = (0,73 \pm 0,02) \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad \text{e} \quad k_{\text{obs}} = (12,4 \pm 0,4) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$$

- Variação da concentração do substrato (dados da curva V_i x [Substrato, Frutose], Fig. II.19.A): $V_i = k_2 [\text{fru}]$, k_0 é zero. Sem substrato, não se tem reação.

$$k_2 = (1,33 \pm 0,04) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$$

- Variação da concentração de base (dados da curva V_i x $[\text{OH}^-]$, Fig. II.19.B):

$$V_i = k_0' + k_1' [\text{OH}^-]$$

$$k_0' = 1,29 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad \text{e} \quad k_1' = (4,6 \pm 0,1) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$$

* Este valor é consistente com dados da literatura para a etapa de enolização do açúcar, não dependente do metal. Este valor foi relatado como $5,65 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1} = 0,94 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^{63a}.

- Teoricamente:

$$V_i = k_2 [\text{fru}] = V_0 + k_{\text{obs}} [\text{CuL}] = k_0' + k_1' [\text{OH}^-]$$

Considerando que a velocidade inicial depende de uma equação somente dependente de uma constante e do açúcar ($k_2 [\text{fru}]$), outra de uma constante e o catalisador ($k_{\text{obs}} [\text{CuL}]$), e outra de uma constante e a base ($k_1' [\text{OH}^-]$).

$V_0 = k [\text{fru}][\text{OH}^-]$, pois é a velocidade dependente somente da concentração do açúcar e da base, sem ação do CuL.

$k_{\text{obs}} = k'[\text{fru}][\text{OH}^-]$, pois esta constante observada da reação para um dado CuL é dependente das demais constantes envolvidas na reação.

$$\text{Assim: } V_i = V_0 + k_{\text{obs}} [\text{CuL}] \rightarrow V_i = k [\text{fru}][\text{OH}^-] + k_{\text{obs}} [\text{CuL}] \rightarrow$$

$$V_i = k [\text{fru}][\text{OH}^-] + k'[\text{fru}][\text{OH}^-][\text{CuL}] \rightarrow V_i = (k + k' [\text{CuL}]) [\text{fru}] [\text{OH}^-]$$

Considerando-se também a soma de uma etapa dependente somente da concentração do açúcar, sem ação nem da base, nem do CuL, com uma constante que foi denominada k_0 , tem-se a lei cinética experimental gerada:

$$V_i = k_0 [\text{fru}] + (k + k' [\text{CuL}]) [\text{OH}^-] [\text{fru}],$$

Verificando-se a validade desta lei:

Dependência com $[\text{OH}^-]$:

$$V_i = \{k_0 + (k + k' [\text{CuL}]) [\text{OH}^-]\} [\text{fru}] \quad \text{e} \quad V_i = k_0' + k_1' [\text{OH}^-]$$

k_0 depende apenas da [fru] e é a única constante que não depende de $[\text{OH}^-]$

$$k_0 = k_2 [\text{fru}] = 1,33 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} \times 1,11 \times 10^{-3} \text{ M} \rightarrow k_0 = 1,48 \times 10^{-5} \text{ M s}^{-1}$$

Dependência com [CuL]:

$$V_i = \{k_o + (k + k' [\text{CuL}]) [\text{OH}^-]\} [\text{fru}] \text{ e } V_i = V_o + k_{\text{obs}} [\text{CuL}]$$

$$\{k_o + (k + k' [\text{CuL}]) [\text{OH}^-]\} [\text{fru}] = V_o + k_{\text{obs}} [\text{CuL}]$$

$$\text{rearranjando: } \{k_o + k [\text{OH}^-]\} [\text{fru}] + k' [\text{CuL}] [\text{OH}^-] [\text{fru}] = V_o + k_{\text{obs}} [\text{CuL}]$$

$$\text{como } V_o = k_o + k [\text{OH}^-] [\text{fru}] ,$$

$$k' [\text{CuL}] [\text{OH}^-] [\text{fru}] = k_{\text{obs}} [\text{CuL}] \rightarrow k' [\text{OH}^-] [\text{fru}] = k_{\text{obs}}$$

$$k' = k_{\text{obs}} / [\text{OH}^-] [\text{fru}] = 12,4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} / 2,16 \times 10^{-2} \text{ M} \times 1,11 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$k' = 5,91 \times 10^3 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

$$\text{como } V_o = 0,73 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ e } V_o = \{k_o + k [\text{OH}^-]\} [\text{fru}] = k_o [\text{fru}] + k [\text{OH}^-] [\text{fru}],$$

$$\text{e } k = V_o / k_o [\text{OH}^-] = 2,9 \times 10^{-2} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

Dependência com a [fru] (para confirmar o valor de k') :

$$V_i = \{k_o + (k + k' [\text{CuL}]) [\text{OH}^-]\} [\text{fru}] \text{ e } V_i = k_2 [\text{fru}]$$

$$\{k_o + (k + k' [\text{CuL}]) [\text{OH}^-]\} [\text{fru}] = k_2 [\text{fru}]$$

$$\{k_o + (k + k' [\text{CuL}]) [\text{OH}^-]\} = k_2$$

$$k_2 = k_o + k [\text{OH}^-] + k' [\text{CuL}] [\text{OH}^-],$$

$$\text{onde } k_o = 1,17 \times 10^{-5} \text{ M s}^{-1}, k = 2,9 \times 10^{-2} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}, \text{ e } k_2 = 1,33 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$$

$$k_2 - k_o = k [\text{OH}^-] + k' [\text{OH}^-] [\text{CuL}], \text{ então } k' = \{(k_2 - k_o) - k [\text{OH}^-]\} / [\text{OH}^-] [\text{CuL}]$$

$$k' = \mathbf{5,26 \times 10^3 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}}$$

o que é muito similar (considerando os desvios nas medidas) com o valor observado para k' na dependência com o catalisador CuL: $k' = \mathbf{5,91 \times 10^3 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}}$ (12% de diferença).

Assim, a lei de velocidade experimental alcançada, que satisfaz todas as constantes determinadas, é a seguinte:

$$\mathbf{V_i = \{k_o + (k + k' [\text{CuL}]) [\text{OH}^-]\} [\text{fru}]}$$

Onde $k_o = 1,3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (negligenciável), $k = 2,6 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$, e $k' = 6,0 \times 10^3 \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6 \text{ s}^{-1}$. Como análogo, para comparação e verificação se a Lei cinética proposta valeria para todo o sistema, a lei foi testada para o composto **1**, o complexo $[\text{Cu}(\text{isa-pn})]^{2+}$. Particularmente, os valores determinados para as constantes k_o e k são muito próximos, como mostrados na Tabela II.2, sendo independentes do catalisador.

Tabela II.2 – Parâmetros cinéticos para a oxidação da frutose ($1,11 \times 10^{-3}$ M), catalisada pelos complexos **1** e **2**. Condições de reação: $[\text{OH}^-] = (2,2 \pm 0,8) \times 10^{-2}$ M, correspondendo ao pH ($12,0 \pm 0,2$), a ($25,0 \pm 0,2$)°C.

Composto	Parâmetros Cinéticos		
	k_o (s^{-1})	k ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k' ($\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$)
$[\text{Cu}(\text{isa-en})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ 2	$1,31 \times 10^{-5}$	$2,65 \times 10^{-2}$	$6,01 \times 10^3$
$[\text{Cu}(\text{isa-pn})](\text{ClO}_4)_2$ 1	$1,17 \times 10^{-5}$	$2,99 \times 10^{-2}$	$5,17 \times 10^3$

Em contraste, a constante k' calculadas para o complexo **2** é ligeiramente maior que a calculada para o complexo **1**, sugerindo que **2** é levemente mais ativo do que **1** na oxidação da frutose. De qualquer modo, ambos os processos: o catalisado apenas por base (enolização do substrato), e o catalisado por metal, são etapas determinantes da reação, na faixa de concentrações usadas. Estes resultados estão consistentes com o equilíbrio previamente estabelecido para estes complexos, de que a forma enol é a espécie cataliticamente mais ativa. Estes resultados foram corroborados pela atividade desprezível de complexos de cobre similares, mas que não apresentam estabilidade à altos valores de pH.

A velocidade inicial também mostrou ser dependente das variações de concentração de tampão $[\text{CO}_3^{2-}]$, indicando uma significativa dependência com a força iônica. Entretanto, estes resultados podem também indicar uma participação de íons carbonato no processo de oxidação, desde que o ânion carbonato radicalar $\text{CO}_3^{\bullet-}$ é um forte oxidante, com $E^\circ = 1,78$ V a pH = 7,0 ²¹⁷, e tem sido relatado como um produto de oxidação de ânions carbonatos por peróxido de hidrogênio, catalisado por espécies que têm atividade da enzima Cu,Zn-SOD ²¹⁸, isto é, catalisam a dismutação ou desproporcionamento de radicais superóxido a oxigênio e peróxido de hidrogênio. No caso da enzima as etapas abaixo foram propostas:

A espécie reativa, responsável pela atividade peroxidase da enzima SOD, observada em pH fisiológico apenas em presença de bicarbonato ou carbonato, corresponderia na verdade a um complexo em que o oxidante estaria coordenado ao centro metálico, $[\text{SOD-Cu}^{2+}(\bullet\text{OH})]$, em vez de se ter radicais hidroxil livres em solução ²¹⁹. O radical carbonato é capaz de oxidar outros

²¹⁷ O. Augusto, M.G. Bonini, A.M. Amanso, E. Linares, C.X.C. Santos, and S.L. De Menezes, *Free Radic. Biol. Med.* 32 (2002) 841.

²¹⁸ H. Zhang, J. Joseph, M. Gurney, D. Becker and B. Kalyanaraman, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 1013.

²¹⁹ S. Sankarapandi, J.L. Zweier, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 1226.

substratos, incluindo o captador DMPO e a própria enzima SOD. No caso de complexos de cobre com ligantes mais simples, como no estudo aqui desenvolvido, poderia-se ter também a formação de uma espécie análoga, $[\text{LCu}^{2+}(\cdot\text{OH})]$, como a principal responsável pela reatividade oxidante observada.

II.3.4. Detecção de intermediários de reação

A detecção de intermediários reativos em uma reação pode ser feita por EPR, utilizando captadores de spin, o chamado método *spin trapping*. Para compreender esta técnica em toda a sua potencialidade, é preciso entender um pouco sobre a química radicalar. Radicais podem ser gerados em sistemas químicos e biológicos através de múltiplos caminhos diferentes. Em geral, esses processos podem ser divididos em duas categorias. A primeira são reações que envolvem clivagem de ligações (a) e a segunda envolve a transferência eletrônica, e incluem a oxidação de íons metálicos ou a redução de peróxidos (b), sendo que existem processos que pertencem a ambas as categorias ²²⁰.

Reações de transferência eletrônica direta constituem processos de oxidação ou redução e nestes casos os radicais gerados podem ser espécies neutras ou carregadas, obtendo-se assim, radicais cátions e radicais ânions. Exemplos incluem a oxidação de ânions através de peroxidases e redução de alguns produtos químicos biologicamente importantes e drogas tais como quinonas ²²¹. Uma vez gerados tais radicais podem conduzir a uma enorme variedade de diferentes tipos de reações, num processo em cascata, e novamente podem ser subdivididas em diferentes categorias, especificadas abaixo:

²²⁰ M.J. Davies, R.T. Dean, *Radical-Mediated Protein Oxidation: from Chemistry to Medicine*, Oxford Univ. Press, Oxford, (1997).

²²¹ R.P. Mason, *Free. Rad. Biol.* (1982), 161.

Verifica-se que reações de um radical com uma outra molécula podem gerar uma espécie radicalar, ou espécies oxidadas ou reduzidas. Bons exemplos deste tipo de fenômeno são reações de radicais com certos íons metálicos ²²², como:

Muitos radicais são extremamente reativos, mas podem mostrar uma alta seletividade em suas reações. Um exemplo deste fenômeno é o radical hidroxil ($\text{OH}^{\bullet}$), que é oxidante e uma espécie eletrofílica, mostrando assim alguma seletividade em relação ao tipo de ligação que ele ataca. Assim, a reação deste radical com um álcool simples como o etanol, 97,5% de $\text{OH}^{\bullet}$ reage com ligações C–H, ao invés de O–H ²²³. Isto é uma consequência direta da força de ligação maior para a ligação O–H em relação a ligação C–H (cerca de 495 kJmol^{-1} contra $385\text{--}410 \text{ kJmol}^{-1}$)^{223b}, indicando a preferência de ataque deste radical em sítios mais ricos em elétrons.

O estudo de quais radicais estão sendo formados nas reações de oxidação, acompanhadas cineticamente, pode se mostrar muito útil no esclarecimento deste processo de oxidação de carboidratos. Quando um radical é capturado (*spin trapped*) utilizando-se a técnica de EPR, o que se observa não é um radical mas sim, um aduto deste radical. O ponto mais importante da técnica de *spin trapping* é a determinação química da estrutura do spin aduto. Esta técnica consiste, deste modo, em usar um composto que forma um radical livre estável por reagir covalentemente com um radical livre instável. Assim, a espécie radicalar é “captada” em uma forma de longa vida que pode ser observada a temperatura ambiente usando equipamento convencional de EPR. As separações hiperfinas do aduto provem informações que podem ajudar na identificação do radical original. Desde que o radical aduto estável acumula, a técnica de captação de spin é um método integrativo de se medir quantitativamente radicais livres.

Os captadores de spin mais utilizados possuem em geral o grupamento nitrona ou nitroso, sendo que somente as nitronas detecta radicais centrados no oxigênio, como superóxido e radicais hidroxil à temperatura ambiente ²²⁴. Ambos compostos, nitronas e nitrosos, reagem covalentemente com um grande número de radicais livres para produzirem o aduto nitróxido (N•O). O espectro do nitróxido gera um triplete característico que pode exibir outros desdobramentos hiperfinos de núcleos vizinhos que possuem momento magnético. A magnitude e a natureza desta interação é dependente então do spin nuclear, tão bem quanto efeitos de ressonância, indutivos e estéricos. Com captadores do tipo nitrona, o radical captado é ligado ao carbono α , e o núcleo presente neste radical captado está longe do nitrogênio do grupo nitróxido

²²² G.V. Buxton, C.L. Greenstock, W. P. Hellman, A B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **17** (1988) 513-886.

²²³ a) K.D. Asmus, H. Mockel, A. Henglein, *J. Phys. Chem.* **77** (1973) 1218-1221; b) J. Fossey, D. Lefort, J. Sobra, *Free Radical in Organic Chemistry*, Wiley, Chichester (1995).

²²⁴ G.M. Rosen, E.J. Rauckman, *Methods in Enzymology* **105** (1984) 198.

formado, dificultando um pouco a resolução das hiperfinas formadas deste radical. Captadores de spin que possuem um hidrogênio α , como o DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido), gera adutos com separação de hiperfinas devido a ambos H- α e nitrogênio do grupo nitróxido. Nestes adutos, as magnitudes de A_N e A_H são muito sensíveis a natureza do radical captado, e pode servir como identificadores ²²⁴. No Esquema II.1 são mostrados alguns captadores, além do DMPO, o DBNBS (3,5-dibromo-4-nitrobenzeno sulfonila) e o 4-POBN [α -(4-piridil-1-óxido)-N-t-butilnitrona], com seus respectivos adutos radicalares.

Esquema II.1. Estruturas e adutos de alguns captadores de spin utilizados.

As nitronas são compostos altamente reativos, podendo participar de uma grande variedade de reações, além da captação de espécies radicalares. Nitronas podem ser reduzidas e oxidadas em uma grande variedade de produtos, e o estudo desta química é essencial para o entendimento de como radicais artefatos são gerados a partir destes compostos. Íons metálicos, podem servir como catalisadores destas reações sofridas por este captador, como por exemplo, o cloreto férrico é conhecido por reagir com o DMPO em seu ácido hidroxâmico correspondente, cuja oxidação posterior poderia produzir o nitróxido correspondente 5,5-dimetilpirrolidona-2-oxil (DMPOX) ²²⁴. Deste modo, deve-se ter cautela na afirmação da presença de radicais livres quando se trata de sistemas oxidantes.

Foram feitos estudos para os três catalisadores (**1**, **2** e **3**), em concentração de 0,1 mM, e para os três açúcares (glicose, frutose e galactose), em concentração de 1,0 mM. Foram feitos brancos também, para se eliminar ao máximo a possibilidade de radicais gerados por artefatos neste sistema. Os valores de pH estudados foram de 12,0, 8,5 e 7,4, variando também o tipo de tampão (fosfato e carbonato), para se observar a possível influência destes fatores em uma possível geração de intermediários radicalares. Os captadores de spin utilizados foram DMPO e DBNBS, na quantidade de 50 mM em cada reação.

Purificou-se previamente o captador DMPO como recomendado ²²⁵, destilando-o a pressão reduzida, e sintetizou-se o DBNBS a partir do ácido 3,5-dibromosulfanílico e ácido acético glacial, segundo procedimento descrito na literatura ²²⁶. O DMPO também pode ser sintetizado a partir de 2-(3-metil-3-nitrobutil)-1,3-dioxano, este preparado a partir de 2-(3-metil-3-nitrobutil)-1,3-dioxolano ^{224,227}. As medidas no EPR foram feitas após aproximadamente 5 minutos de iniciada cada reação, realizada em frasco de polietileno do tipo ependorf, sendo a solução homogenizada imediatamente transferida para uma cela de quartzo chata, apropriada para as medidas de EPR. Foram acumulados 8 scans em cada medida, com amplitude de modulação de 1 Gauss e ganho do aparelho de $2,00 \times 10^5$, na faixa de 3450 ± 100 G (vide Figura II.20).

Embora a formação de radicais “livres” de oxigênio por processos catalisados por íons cobre seja um assunto controverso ^{53,57}, na presença de DMPO a formação de um aduto DMPO-OH foi observada, com $A_H = A_N = 14,9$, a pH 12 (tampão fosfato e carbonato), 8,5 (tampão fosfato) e 7,4 (tampão fosfato), para todos os substratos estudados, frutose, glicose e galactose (Figura II.20).

Figura II.20. Experimentos com o captador de spin DMPO 50.0 mM, amplitude 1 Gauss, 8 scans cada (espectros obtidos após 5 minutos de reação). **A)** Frutose 1.00 mM, composto **2**: 0.10 mM, pH 7.4, tampão fosfato 50 mM; **B)** Frutose 1.00 mM, composto **2**: 0.10 mM, pH 8.5, tampão fosfato; **C)** Frutose 1.00 mM, composto **2**: 0.10 mM, pH 12.0, tampão fosfato; **D)** Frutose 1.00 mM, sem catalisador, pH 12.0, tampão fosfato; **E)** Frutose 1.00 mM, composto **2**: 0.10 mM, pH 12.0, tampão carbonato 250 mM; **F)** Frutose 1.00

²²⁵ G.R. Buettner, L.W. Oberley, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **8** (1978) 69-74.

²²⁶ H. Kaur, *Free Rad. Res.* **24** (1996) 409.

mM, composto **3**: 0.10 mM, pH 12.0, tampão fosfato; **G**) Galactose 1.00 mM, composto **2**: 0.10 mM, pH 12.0, tampão fosfato; **H**) Glicose 1.00 mM, composto **2**: 0.10 mM, pH 12.0, tampão fosfato; **I**) Frutose 1.00 mM, composto **1**: 0.10 mM, pH 12.0, tampão fosfato (25 mM, para todos o uso do tampão fosfato).

Com a frutose, não se detectou a evidência de outros adutos, se não o DMPO-OH[•]. No caso da glicose e galactose, observou-se um aduto adicional, provavelmente devido a radicais centrados no carbono, com $A_N = 15,7$ e $A_H = 18,8$ G. este aduto pode ser descrito como a formação do radical ânion $\text{CO}_2^{\bullet-}$, reportado na literatura com as constantes hiperfinas de $A_N = 15,8$ e $A_H = 18,8$ G²²⁸. Estes resultados são esperados, desde que a glicose e a galactose formam aldonatos (gluconatos e glucuronatos), em adição ao formiato⁸¹. Intermediários similares foram previamente detectados na autooxidação do complexo gluconato de cobre. No caso da frutose, a formação de produtos dicetonicos é preferivelmente favorecida, sem a geração de formiato e radical ânion $\text{CO}_2^{\bullet-}$.

Para a quantificação dos radicais OH[•], visualizados no aduto formado com o DMPO (DMPO-OH[•]), usou-se o padrão TEMPOL (radical estável 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil piperideno N-oxil) em concentração conhecida de 38,2 μM , utilizando integração dupla dos sinais (programa WinEPR), e obtiveram-se os seguintes resultados:

- Para a oxidação da FRUTOSE, em pH 12.0 (tampão fosfato), a geração de OH[•] ficou na seguinte ordem: 2.43 μM com composto **2** > 1.32 μM com composto **3** > 0.77 μM sem catalisador > 0.55 μM com composto **1**.
- Comparando-se apenas o mais ativo dos catalisadores, **2**, com a FRUTOSE, em relação ao pH (comparando-se tampão fosfato), a geração de OH[•] ficou na seguinte ordem: 2.43 μM em pH 12 > 1.42 μM em pH 8.5 > 0.90 μM em pH 7.4.
- Comparando-se o substrato, em relação ao composto **2**, em pH 12.0 (tampão fosfato 25 mM), a geração de OH[•] ficou na seguinte ordem: 2.43 μM para a FRUTOSE > 1.31 μM para a GLICOSE = 1.31 μM para a GALACTOSE.

Estes resultados corroboram os dados obtidos nos estudos cinéticos, monitorando o consumo de O₂, mostrando que o catalisador **2**, a frutose, e o pH maior são as situações que mais produzem radicais OH[•], levando a velocidades maiores de reação.

Ao contrário do esperado, em presença de tampão carbonato não se observou formação de aduto DMPO-OH (espectro **E**, na Figura II.20). No caso da enzima Cu,Zn SOD, foi constatado

²²⁷ a) R. Bonnett, R.F.C. Brown, V.M. Clarck, I.O. Sutherland, A. Todd, *J. Chem. Soc.* (1959) 2094; b) R. Bonnett, V.M. Clarck, A. Giddy, A. Todd, *J. Chem. Soc.* (1959) 2087; c) H. Schechter, D.E. Ley, L. Zeldin, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1951) 3664.

que os radicais carbonato formados oxidam o DMPO a um cátion radical ou se adicionam à dupla ligação e posteriormente, numa reação com água, formam o aduto DMPO-OH, conforme Esquema II.2 ²²⁹.

Esquema II.2. Formação do aduto DMPO-OH a partir de radicais carbonato.

Neste caso, o aduto DMPO-OH se originaria da oxidação do DMPO ou da formação intermediária de um aduto DMPO-CO₃, sendo somente observado em presença de ânions bicarbonato ou carbonato. No caso dos complexos estudados, ao contrário, parece que o aduto DMPO-OH origina-se mesmo de radicais livres [•]OH ou a partir de radicais superóxido também formados na reação de oxidação dos carboidratos. Sabe-se que o aduto DMPO-O₂⁻ pode-se decompor, em presença de complexos de cobre, dando o aduto DMPO-OH ^{224,230}.

Outra possibilidade seria ter-se na verdade preferencialmente a formação de uma espécie altamente oxidante, análoga àquela formada com a enzima SOD, [LCu²⁺([•]OH)], com formação apenas em pequena extensão de radicais livres hidroxil. De qualquer modo, os complexos cobre estudados, com bases de Schiff derivadas de isatin, mostraram ser bastante oxidantes.

No intuito de se verificar a presença de radicais centrados no carbono, utilizou-se o DNBBS, mais adequado a estes radicais, onde poderíamos identificar que tipo de cadeia carbônica estaria ligada ao radical. Os experimentos feitos foram similares aos

²²⁸ W.H. Koch, M.R. Cheedkel, *Biochim. Biophys. Acta* 924 (1987) 458.

²²⁹ H. Zhang, J. Joseph, C. Felix, B. Kalyanaraman, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 14038.

²³⁰ a) E. Finkelstein, G.M. Rosen, E.J. Rauckman, *Molecular Pharmacol.* 21 (1982) 262; b) E. Finkelstein, G.M. Rosen, E.J. Rauckman, J. Paxton, *Molecular Pharmacol.* 16 (1979) 676.

feitos ao se utilizar o captador DMPO, variando-se os parâmetros: catalisador, substrato, pH e tampão.

Entretanto, a formação de adutos com radicais de carbono derivados da degradação dos carboidratos com DBNDS (Figura II.21) não foi verificada em nenhum dos sistemas estudados. O DBNBS mostrou ser oxidado nos altos valores de pH das reações, possivelmente a um radical nitrosil, apresentando um espectro característico de 3 linhas com $A_N = 9 \text{ G}$ ²³¹. A explicação para esta geração de radicais nitrosil no sistema é que a espécie OH^- presente no sistema (tampão) e a espécie radicalar $\text{OH}^\bullet$ atacariam a posição 4 do anel benzênico do DBNDB, onde está o grupo nitro, liberando-o como radical nitrosil. Isso ocorre pois grupos retiradores de carga no anel benzênico, como Br^- , ativam o anel para a substituição aromática eletrofílica, e como o NO^- é um melhor grupo de saída que o OH^- , é ele quem saiu, em uma cisão homolítica (também pode ter ocorrido cisão heterolítica), gerando $\text{NO}^\bullet$ no sistema (Esquema II.3). A valores de pH mais baixos (8-10), a reação observada é bastante lenta, e a formação de radicais de carbono não foi detectada em nenhum sistema usando DBNBS.

Figura II.21. Experimentos com o captador de spin DBNBS 50.0 mM, amplitude 1 Gauss, 8 scans cada (espectros obtidos após 5 minutos de reação). **A)** Frutose 1.00 mM, sem catalisador, pH 12.0, tampão fosfato; **B)** Frutose 1.00 mM, composto **2**: 0.10 mM, pH 12.0, tampão fosfato; **C)** Frutose 1.00 mM, composto **2**: 0.10 mM, pH 7.4, tampão fosfato; **D)** Frutose 1.00 mM, composto **2**: 0.10 mM, pH 8.5, tampão fosfato; **E)** Frutose 1.00 mM, composto **2**: 0.10 mM, pH 12.0, tampão carbonato 250 mM; **F)** Galactose 1.00 mM, composto **2**: 0.10 mM, pH 12.0, tampão fosfato; **G)** Glicose 1.00 mM, composto **2**: 0.10 mM, pH 12.0, tampão fosfato 25 mM.

²³¹ C.A. Davies, B.R. Nielsen, G. Timmins, L. Hamilton, A. Brooker, R. Guo, M.C.R. Symons, P.G. Winyard, *Nitric Oxide: Biol. and Chem.* 5 (2001) 116.

Esquema II.3. Provável mecanismo de degradação do captador DBNBS nos sistemas estudados, com a geração do radical nitrosil, e a formação do aduto DBNBS-NO, bis(2,6-bromo-4-sulfofenil) nitroxil, $A_N=9$ G.

Outro método para a detecção de intermediários reativos como radicais superóxido e água oxigenada, é o emprego do uso de reações enzimáticas específicas. Para isso foram realizados experimentos no próprio aparato do Oxígrafo, pelo consumo ou liberação de oxigênio nas reações específicas, para a detecção destes outros intermediários, que não foram possíveis de se identificar por EPR. Radicais superóxido foram qualitativamente identificados pela adição de Cu,Zn-SOD ao meio reacional, causando uma supressão temporária da oxidação da frutose, seguida de uma mudança na velocidade de reação, como mostrado na Figura II.22, para os catalisadores **1**, **2** e **3**. Experimentos análogos permitiram indicar a presença de peróxido de hidrogênio, pela adição da Catalase durante a reação (Figura II.23).

Figura II.22. (a) Adição da $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$ (15000 u.) as curvas cinéticas de consumo de oxigênio versus tempo de reação, durante a oxidação da Frutose, catalisada por **1**, $[\text{Cu}(\text{isa-pn})]^{2+}$, a $T = (25.0 \pm 0.1)^\circ \text{C}$, e pH 12.0, em solução de NaOH. $[\text{Frutose}] = 1.00 \text{ mM}$. $[\text{Cu}(\text{isa-pn})]^{2+} = 1.00 \times 10^{-4} \text{ M}$. A) Adição de $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$ (15000 u.) após 300 s de reação; e B) após 900 s; (b) Condições idênticas ao (a): adição de $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$ com I = $[\text{Cu}(\text{isa-en})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)$ (**2**) (0.11 mM), e II = $[\text{Cu}(\text{isa-epy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (**3**) (0.11 mM).

Figura II.23. (a) Adição da Catalase (18800 u.) as curvas cinéticas de consumo de oxigênio versus tempo de reação, durante a oxidação da Frutose, catalisada por **1**, $[\text{Cu}(\text{isa-pn})]^{2+}$, a $T = (25.0 \pm 0.1)^\circ \text{C}$, e pH 12.0, em solução de NaOH. $[\text{Frutose}] = 1.00 \text{ mM}$. $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+} = 1.00 \times 10^{-4} \text{ M}$. A) Adição de Catalase (18800 u.) após 290 s de reação; B) após 425 s; C) após 650 s. (b) Condições idênticas ao (a): adição de Catalase com I = $[\text{Cu}(\text{isa-en})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)$ (**2**) (0.11 mM), e II = $[\text{Cu}(\text{isa-epy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (**3**) (0.11 mM).

Estes intermediários, superóxido e H₂O₂, não devem permanecer inativos no meio reacional, provavelmente reagem pela ação catalítica do cobre, sendo dismutados ou decompostos, respectivamente, através das etapas:

II.3.5. Detecção de produtos finais da degradação

Esperava-se que os produtos finais da oxidação de carboidratos catalisados pelos complexos de cobre preparados sejam ácidos carboxílicos, e deste modo utilizou-se a eletroforese capilar para a determinação destes compostos uma vez que esta técnica vem sendo utilizada a alguns anos com sucesso na determinação dessa classe de compostos ²³². Métodos químicos para a verificação de grupos carbonilas gerados da degradação dos carboidratos (produtos dicarbonílicos), por exemplo, através de reação com a nitrofenilhidrazina, dando a nitrofenilhidrazona correspondente (com $\lambda_{\text{max}}=360\text{-}390 \text{ nm}$, $\epsilon = 2.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), que pode ser quantificada espectrofotometricamente ²³³, não seriam uma boa solução para a detecção dos produtos finais da reação de oxidação, pois os substratos carboidratos já possuem estes grupos (equilíbrio tautomérico dos açúcares, forma aberta da cadeia), e mascarariam este teste.

A Eletroforese Capilar é um método rápido e barato para se detectar ânions formados, e tem muitas vantagens em relação à CG (Cromatografia Gasosa), e HPLC (Cromatografia Líquida de alta Eficiência), que é muito limitada pela escolha da coluna. Neste caso, devido às condições de altos valores de pH e da presença do catalisador de cobre no meio, não foi encontrada uma coluna ideal para possíveis análises.

Nos estudos realizados nesse trabalho optou-se por fazer uma varredura, ou seja, foram utilizados uma série de ácidos mono-, di- e tri-carboxílicos com e sem hidroxilas na cadeia carbônica. Desse modo pode-se fazer a identificação de alguns produtos formados bem como é possível sugerir a estrutura de outros produtos dessas reações a partir da mobilidade eletroforética apresentada por estes compostos. O primeiro passo no sentido de se buscar a separação de compostos que apresentam equilíbrio ácido-base é a determinação do pH de trabalho. A determinação desse valor de pH pode ser feita utilizando-se uma curva de

²³² a) K.D. Altria, D. Elder, *J. Chromatogr. A* 1023 (2004) 1-14; b) T. Soga, G.A. Ross *J. Chromatogr. A* 837 (1999), 231; c) Z. El Rassi, Y.S. Mechref, "Analysis of Carbohydrates" in "Capillary Electrophoresis – theory and practice", 2nd. Ed., Ed. P. Camilleri, CRC Press, 1998, 552 p.

mobilidade *versus* pH. A partir dos dados de pKa e mobilidade apresentados na Tabela II.3. pode-se construir essa curva, com as mobilidades dos ácidos conhecidos.

Tabela II.3. Dados de pKa e mobilidade para alguns ácidos possíveis de serem formados.

Ácido	pKa ₁	μ ₁	pKa ₂	μ ₂	pKa ₃	μ ₃
Acético	4,76	-42,4				
Cítrico	3,128	-28,7	4,761	-54,7	6,396	-74,4
Fórmico	3,752	-56,6				
Glucônico	3,662	-27,2				
Glucurônico	3,677	-26,7				
Glicólico	3,886	-42,4				
Maleico	1,921	-41,3	6,225	-62,4		
Málico	3,460	-32,6	5,050	-59,0		
Malônico	2,847	-40,7	5,696	-67,0		
Oxálico	1,271	-42,4	4,266	-77,0		
Succínico	4,207	-33,0	5,638	-60,9		
Tartárico	3,036	-32,6	4,366	-60,7		

A partir da construção da curva de mobilidade de pKa relativa a estes ácidos, escolheu-se o pH 3,7 como o pH de trabalho, tendo em vista que neste pH tem-se a separação de todos os compostos utilizados. O ácido xilônico (cujos valores de pKa não foram conhecidos) foi analisado nesta mesma condição.

A análise de ácidos carboxílicos por eletroforese capilar pode ser feita no modo direto ou indireto. Como estes compostos apresentam uma baixa absorvidade molar na região do UV/vis optou-se por se realizar a análise no modo indireto, de modo a se obter uma maior sensibilidade. Usou-se também um inverter de fluxo eletro-osmótico durante as corridas, devido a grande diferença de mobilidade eletroforética entre os compostos analisados. Este inverter foi o CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio).

Uma vez determinado o pH de trabalho, determinou-se qual a composição do eletrólito a ser usado nessa separação. O eletrólito de corrida deve apresentar algumas características: a mobilidade desse composto deve ser próxima à mobilidade dos analitos e ele deve apresentar capacidade tamponante. Como a detecção é feita no modo indireto, o eletrólito deve apresentar absorção na região UV/vis, onde, preferencialmente, os analitos não apresentem absorção. A fim de se satisfazer todas estas condições, o ácido 3,5-dinitrobenzóico foi escolhido como eletrólito de corrida. As propriedades deste composto estão descritas na Tabela II.4.

Tabela II.4. Características eletroforéticas do ácido 3,5-dinitrobenzóico.

Ácido	pKa ₁	μ ₁	Mobilidade em pH 3,7
3,5-dinitrobenzóico	4,76	-42,4	-24,3

Como se pode observar na tabela II.4, a mobilidade do ácido 3,5-dinitrobenzóico está próxima à mobilidade média dos compostos analisados e este composto apresenta uma capacidade tamponante em pH 3,7. Ele também apresenta alta absortividade molar em 254 nm, comprimento de onda escolhido para as análises.

Determinadas as condições de análise, foram feitas as análises dos produtos das reações, para os substratos glicose, frutose e galactose, catalisados pelos compostos **1**, **2** e **3**, conforme mostrado na Na Figura II.24.

A) para o composto 1, [Cu(*isa-pn*)]²⁺

B) para o composto 2, [Cu(*isa-en*)(H₂O)]⁺

C) Curva Padrão

Figura II.24. Produtos detectados por EC na oxidação dos carboidratos catalisada pelos complexos de cobre: A) $[\text{Cu}(\text{isa-pn})](\text{ClO}_4)_2$ **1**; B) $[\text{Cu}(\text{isa-en})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)$ **2**. C) Mistura padrão. Legenda dos picos: **1**. ácido fórmico; **2**. ácido glicérico; **3**. ácido glicólico; **4**. ácido xilônico; *. não identificado.

Os estudos foram realizados para as reações catalisadas pelos três complexos (**1**, **2** e **3**) na oxidação da Glicose, Frutose e Galactose, como mostrado na Tabela II.5.

De acordo com os eletroferogramas apresentados na Figura II.23 e demais não apresentados (inclusive ao longo do tempo), foi possível identificá-los por comparação com os padrões de ácidos carboxílicos, e também puderam ser feitas algumas inferências quanto à estrutura destes compostos. De acordo com a estrutura de todos os padrões apresentados pode-se verificar que na condição eletroforética utilizada somente puderam ser analisados compostos com as seguintes características estruturais:

- Ácidos monocarboxílicos sem hidroxila na posição α de até dois átomos de carbono, no caso somente o ácido acético e o fórmico.
- Ácidos monocarboxílicos com hidroxila ou carbonila na posição α
- Ácidos dicarboxílicos. Os ácidos dicarboxílicos simples tais como o oxálico, malônico e succínico foram testados como possíveis produtos de reação enquanto que os ácidos glutárico e adípico não foram testados porque suas mobilidades eletroforéticas são menores que a mobilidade do ácido succínico, e assim estes dois compostos saem depois destes ácidos, o que os descarta.

Tendo em vista que as reações de oxidação de carboidratos não geram produtos com aumento de cadeia, podemos afirmar que os produtos formados possuem no máximo 6 átomos de carbono na cadeia. Apenas no caso dos complexos **1** e **3** foi observada a presença de

xilonato, provindo da oxidação da galactose. Quanto ao pico marcado (*) não se encontrou em bancos de dados nenhum composto que apresente mobilidade e pKa semelhantes, de modo que se possa fazer alguma inferência quanto a identificação do mesmo.

Tabela II.5. Produtos de oxidação de carboidratos, verificados na catálise pelos complexos **1**, **2** e **3**, por EC, detecção direta, utilizando o eletrólito de corrida 3,5-DNB (20 mM) e CTAB (10 mM). O eletrólito de trabalho foi 10 mM de 3,5-DNB e 0.2 mM de CTAB, ajustado a pH 3.7 com HCl (0.1M).

	Fórmico	Glicérico	Glicólico	Xilônico
Frutose	+	+	+	-
Glicose	+	+	+	-
Galactose	+	+	+	+
Frutose	+	+	+	-
Glicose	+	+	+	-
Galactose	+	+	+	-
Frutose	+	+	+	-
Glicose	+	+	+	-
Galactose	+	+	+	+

Mostrou-se, claramente, que os açúcares foram oxidados a ácidos carboxílicos de cadeia curta neste meio (Figura II.25). Por acelerar a velocidade da reação (deslocando o equilíbrio de enolização), em meio básico, não se formam produtos dicarbonílicos e carbonílicos de cadeia curta nesta catálise com os complexos de Cu(II), como esperado, mas a reação foi mais além (devido a grande reatividade dos compostos de cobre utilizados como catalisadores), chegando aos ácidos carboxílicos, que foram detectados pela EC.

Figura II.25. Estrutura dos ácidos carboxílicos formados.

Com a detecção dos produtos destas reações, juntamente com as dependências observadas nos estudos cinéticos e a detecção de intermediários radiculares, ambos já feitos, foi

possível a elaboração de um mecanismo de reação para estas oxidações, envolvendo os três compostos de cobre(II) estudados como modelo (1, 2 e 3), e obviamente, estendendo-se o raciocínio para os demais compostos de cobre(II), e compostos de cobre(II) em geral, inclusive para cobre(II) complexado em enzimas no organismo. Observou-se que a atividade catalítica dos compostos estudados como modelo é muito superior que a do complexo cobre-aqua, usado para comparações. Isso sugere uma ativa participação dos ligantes, tanto no que diz respeito ao potencial (E^0) do complexo, quanto na catálise propriamente dita, onde possivelmente ocorre uma interação com o substrato a ser oxidado.

II.3.6. Lei de Velocidade e Mecanismo de Reação

A lei de velocidade experimental determinada indicou que a enolização do substrato é a etapa determinante deste sistema reacional. De acordo com os dados experimentais, um mecanismo baseado nos seguintes passos foi proposto:

Regeneração do Catalisador:

Propagação da reação:

Terminação da Reação:

* $\text{Cu}^{\text{II}}\text{L}_{\text{enol}}$ é a enol forma do complexo, considerada estável e predominante no meio.

$$k_1 = [\text{Fru-enediol}] / [\text{Frutose}] [\text{OH}^-]$$

$$k_2 = [(Fru-enediol)Cu^{II}L_{enol}] / [Fru-enediol] [Cu^{II}L_{enol}]$$

Assumindo que a equação (2) se refere a um equilíbrio rápido envolvendo o catalisador, com a prevalência da forma enol a valores altos de pH, como verificado por medidas espectroscópicas, e que as equações (1) e (3) são as etapas determinantes, a velocidade de reação é dada por:

$$-d[O_2]/dt = k [I] [O_2]$$

onde **I** é a espécie intermediária envolvendo interações entre o substrato e o catalisador [(Fru-enediol)Cu^{II}L_{enol}], que é rapidamente decomposta nas espécies correspondentes reduzidas Cu^IL e o radical Fru-enediol•, por transferência eletrônica interna. Nas condições de estado estacionário, d[I]/dt = 0, e então:

$$k_2 [Fru-enediol] [Cu^{II}L_{enol}] = k [I] [O_2]$$

Portanto,

$$-d[O_2]/dt = k_2 [Fru-enediol] [Cu^{II}L_{enol}]$$

Também, a partir das etapas (1) e (3):

$$d[Fru-enediol]/dt = k_1 [Fructose] [OH^-] - k_{-1} [Fru-enediol] + k_2 [Fru-enediol] [Cu^{II}L_{enol}] = 0$$

Entretanto,

$$[Fru-enediol] = k_1 [Fructose] [OH^-] / (k_{-1} + k_2 [Cu^{II}L_{enol}])$$

Substituindo esta equação na expressão de velocidade, tem-se:

$$-d[O_2]/dt = k_2 [Cu^{II}L_{enol}] k_1 [Fructose] [OH^-] / (k_{-1} + k_2 [Cu^{II}L_{enol}])$$

Se $[Cu^{II}L_{enol}] \gg k_{-1} / k_2$ (ou seja, quando a concentração de cobre é MAIOR do que a concentração do substrato enolisado), esta expressão torna-se: **$V_i = k_1 [Fructose] [OH^-]$** , indicando que o processo é independente da concentração de cobre.

Todavia, quando $[Cu^{II}L_{enol}] \ll k_{-1} / k_2$ (ou seja, quando a concentração de cobre é MENOR do que a concentração do substrato enolisado) a equação assume a forma:

$-d[O_2]/dt = (k_1 / k_{-1}) k_2 [Cu^{II}L_{enol}] [Fructose] [OH^-]$, indicando que o processo é DEPENDENTE do cobre, quando este está em baixas concentrações (menor que a concentração do substrato).

De acordo com este esquema catalítico, e considerando uma ampla faixa de concentração do catalisador, a expressão global para a velocidade de reação inicial é:

$$V_i = -d[O_2]/dt = (k_1 + k [Cu^{II}L_{enol}]) [Fructose] [OH^-], \text{ onde } k = K_1.k_2$$

Esta expressão é consistente com a lei de velocidade experimental determinada previamente, $V_i = \{(k + k' [CuL]) [OH^-]\} [fru]$ considerando que nas condições utilizadas (tampão carbonato, pH = 12.3) $[Cu^{II}L_{enol}] \approx [CuL]_T$, isto é, a concentração total do catalisador está na forma enólica.

Estudos existentes na literatura sobre a oxidação de carboidratos, em solução alcalina, catalisados por íons de cobre(II) foram usualmente conduzidos a altas concentrações do íon metálico, em condições onde ocorre a precipitação simultânea de óxido de cobre(I), isto é, na forma de complexo aqua $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$ ou na forma de complexos fracos⁶³. Desta forma, os resultados eram consistentes a uma cinética independente do cobre. Mostrou-se com este trabalho, usando-se os compostos de cobre(II) adequados a esta catálise e a este estudo, o papel de do cobre em processos de oxidação de carboidratos, onde este metal é importante apenas no início da reação e em quantidade catalítica. Uma vez iniciado o processo radicalar, com etapas em cadeia, a iniciação através do íon metálico torna-se dispensável. Esta constatação é de grande valia para se entender processos degenerativos que ocorrem na oxidação de carboidratos *in vivo*, onde os metais, como o cobre, estão presentes em quantidades ínfimas e sempre complexados em proteínas e enzimas.

3. Resultados e Discussão – Parte III

Implicações em Processos Biológicos

Embora existam muitas pesquisas a respeito de danos biológicos causados por compostos metálicos, em geral elas se referem a estudos conduzidos com proteínas isoladas, e os danos vistos nestes casos podem ou não ser depois reportados a sistemas biológicos reais. Optou-se, desta maneira, em fazer um estudo de danos biológicos através da oxidação de biomoléculas, geração de radicais e modos de ação causados diretamente em culturas celulares (estudos *in vitro*), um primeiro passo para um estudo posterior de danos *in vivo* diretamente.

Muito se tem feito na investigação da ação de radicais livres, especialmente aqueles de oxigênio (ROS), em sistemas biológicos, sistema esse bastante variado e estudado, complementado com pesquisas farmacológicas, químicas e físicas. Sabendo-se que complexos de cobre(II) são potenciais geradores de ROS em sistemas químicos e biológicos, pesquisas que estudam este fenômeno se multiplicaram e a cada dia encontram-se correlações mais estreitas entre: íons metálicos - produção de ROS - danos oxidativos – envelhecimento – doenças degenerativas. Seguindo esta linha de pesquisa, estudou-se os danos biológicos a sistemas experimentais celulares humanos causados ou induzidos por complexos de cobre(II) com ligantes imínicos e diimínicos derivados da isatina (**Esquema I.1, compostos 1-6**), sintetizados e estudados durante este trabalho do doutorado. Também foi estudado o complexo de cobre(II) **8** (**Esquema I.11, complexo 8**), um derivado glicosilado, que difere dos demais da classe da isatina, e que serviria como um padrão de comparação para relações do tipo estrutura-atividade no meio biológico. Estes complexos mostraram possuir propriedades químicas características, como a presença de um equilíbrio ceto-enólico, e atividade catalítica relevante na oxidação de substratos naturais, como os monossacarídeos. Esta reatividade em relação à oxidação de monossacarídeos (açúcares comuns, como glicose, frutose e galactose), os tornam importantes sistemas experimentais no estudo de problemas biológicos relacionados a esta oxidação *in vivo*, como o estudo da glicosilação de proteínas intracelulares e de membrana, geração de espécies radicalares em meio biológico e, por fim, o envelhecimento e a morte celular programada, denominada apoptose.

Com esta finalidade, de explorar melhor as possíveis atividades biológicas dos complexos de cobre preparados, procurou-se um centro de pesquisa com experiência e competência na área de estudos de apoptose e de estresse oxidativo, e que também tivesse familiaridade com a química biológica do cobre. Estes estudos foram realizados durante um estágio de Doutorado (doutorado Sanduíche) no laboratório dos Profs. Drs. Maria Rosa Ciriolo e Giuseppe Rotilio, conhecidos pesquisadores da Cu,Zn-SOD e do metabolismo do cobre, no Departamento de Biologia da Universidade de Roma Tor Vergata.

III.3.1. Culturas celulares

Com o objetivo de se estudar os efeitos em culturas celulares dos complexos de cobre preparados, decidiu-se utilizar como sistemas experimentais duas linhas de células humanas em cultura: a linha de promonocítica U937 e a de neuroblastoma neonatal SH-SY5Y. São ambas linhas celulares tumorais e constituem um bom sistema experimental para ensaios biológicos, já que não é possível se trabalhar com linhas celulares normais, pois a cultura não se mantém.

As células U937 são uma linha leucocitária e, como tal, exprimem proteínas de membrana correlatas com a resposta imunitária ligada à fagocitose e à destruição dos agentes patogênicos. A sua membrana constitui, deste modo, mais do que em outras células, uma fonte de estímulos múltiplos aos quais respondem de maneira diversa. De fato, é da mesma membrana plasmática que, em idade pré ou neonatal, a sobrevivência das células depende. Esta membrana possui receptores de morte (Fas, TNF-R), que vêm ativados, originando uma complexa cascata de ativadores de morte celular programada. Por outro lado, as células SH-SY5Y derivam de uma linha de neurônios motores cuja função vital é baseada em uma solicitação contínua da membrana plasmática. Os impulsos que recebem são mediados pela ação química dos neurotransmissores e sofrem mudanças contínuas e súbitas do potencial elétrico transmembrana, para a propagação do sinal através do corpo celular.

As linhas U937 e SH-SY5Y constituem exemplos celulares distantes do ponto de vista morfológico e funcional, mas reconhecíveis quando se observa o que a membrana plasmática representa para ambas, na verdade o lugar de qual depende a vida e a função celular.

III.3.2. Tratamentos e Morte Celular

Os compostos de **1** a **6**: $[\text{Cu}(\textit{isa-pn})]^{2+}$ (**1**), $[\text{Cu}(\textit{isa-en})(\text{H}_2\text{O})]^+$ (**2**), $[\text{Cu}(\textit{isa-epy})_2]^{2+}$ (**3**), $[\text{Cu}(\textit{isa-hist})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (**4**), $[\text{Cu}(\textit{isa-amiquin})(\text{H}_2\text{O})]^+$ (**5**) e $[\text{Cu}(\textit{isa})_2]^+$ (**6**) e o composto **8**, $[\text{Cu}(\textit{apy}_2\text{-gla})]^{2+}$, todos com contra-íon perclorato (estruturas na parte I), foram utilizados nestes estudos com linhas celulares U937 e SH-SY5Y. Foram usadas soluções-estoque $5,0 \times 10^{-3}$ M em DMSO para os complexos de **1** a **6** e em água deionizada para o composto **8**. Todas foram preparadas em maneira estéril e mantidas a -20°C . Inicialmente foi realizado um experimento global (*screening*) visando estabelecer as melhores condições de se tratar a linha celular U937 com os compostos de cobre: em garrafas celulares de 2, 5 ou 15 mL, com concentrações dos compostos no meio celular variando de 5 a 50 μM . Observou-se que os resultados mais reprodutíveis eram aqueles feitos em garrafas de 5 ou 15 mL, pois em 2 mL o volume final variava muito, devido à evaporação em estufa celular do meio de cultura, com conseqüente alteração da concentração. As contagens celulares foram feitas em microscópio ótico na câmara de contagem de Thoma, com o uso do colorante Trypan Blue ou Azul de Tripiano – através da exclusão de membrana, deixando este uma coloração azul em uma célula morta. Com relação ao tempo em que foram

feitas estas contagens celulares, decidiu-se por um tempo padrão de comparação de 24 ou 48 horas, para acompanhamento de todo o ciclo celular. Assim, para cada sistema experimental celular, fez-se um monitoramento detalhado com todos os compostos, fazendo as repetições necessárias para validar cada tratamento e as respectivas contagens.

III.3.2.a. Linha Celular U937

Neste sistema experimental celular foram feitos primeiramente, com todos os compostos, tratamentos com concentrações **1, 5, 10, 25, 50 e 100 μM** , a **24 e a 48 h**. Decidiu-se considerar os que tinham mais significado: **10, 25 e 50 μM** , em especial 50 μM , que foi repetido várias vezes para garantir validação. Foram feitos uma média de dois experimentos distintos, para comparação com o Controle (tratamento com o solvente utilizado, ou seja, DMSO, nos casos de **1 a 6**, e água, no caso de **8**).

Obteve-se uma alta taxa de morte celular no caso dos compostos **8, 3 e 5**, na seguinte ordem de atividade: **8 > 3 > 5**, visível principalmente na concentração de 50 μM , e já a 24h. As diferenças que foram levadas em consideração são aquelas percentuais entre células vivas e mortas, iniciais, e depois de 24 e 48 h, pois entre os vários tratamentos ocorre uma variação natural entre a quantidade inicial de células. Os ensaios de mortalidade foram repetidos, então, apenas para a concentração de **50 μM** , mas com todos os tratamentos realizados no mesmo dia, com a concentração inicial de células igual em todos os casos. Os resultados, mostrados em forma gráfica na Figura III.1, são os seguintes:

Figura III.1. Representação da média de dois experimentos cada, para todos os compostos, com concentração 50 μ M e todos com a mesma concentração inicial de células, a 24 e a 48 h.

Observa-se que a correlação de morte celular para os compostos **8** > **3** > **5**, se mantém. Os compostos inócuos, ou que pelo menos, não causam danos acarretando a morte celular, são: **1**, **2**, **4** e **6**, além do controle, em que se usou DMSO a 50 μ M. O DMSO é reconhecidamente um antioxidante em pequenas quantidades (em alta concentração é tóxico à célula), e se vê que não causa efeitos quando comparado ao controle sem DMSO (no caso do controle usado no tratamento com o composto **8**).

Para se verificar efetivamente se a morte celular foi causada por apoptose ou necrose, usou-se uma poderosa técnica em bioquímica e biologia celular: a citofluorimetria. Esta técnica permite verificar a fluorescência celular, de toda uma população celular, num aparelho chamado citofluorímetro (FACS), no qual passa uma célula por vez, e sua fluorescência é registrada, e acumulada para cerca de 10000 células, para se fazer uma população. Deste modo, aproveita-se este recurso para “marcar” com agentes fluorescentes algumas características celulares típicas de apoptose, marcação do núcleo e produção de radicais.

Uma das características principais de uma célula apoptótica é a inversão de um fosfolípido na membrana citoplasmática externa. Nas células normais a membrana celular de fosfolípido possui uma proteína chamada fosfatidilserina, na composição de 90% no interior da parede celular, e 10% no exterior. Na célula apoptótica ocorre um fenômeno de inversão desta população, talvez um modo pelo qual a célula se faz reconhecer pelo sistema imunológico para ser completamente “digerida”. Ao se marcar a fosfatidilserina com uma substância fluorescente, é

possível medir no FACS a quantidade de células que sofreram apoptose no tratamento, pela quantidade de fluorescência medida da população. Usa-se para isso a Annexina, uma proteína bacteriana, que se liga a fosfatidilserina, complexada com um composto fluorescente verde, o FITC. Neste caso, uma célula normal terá uma baixa fluorescência, enquanto uma célula apoptótica terá uma fluorescência elevada (pois quase toda fosfatidilserina estará no exterior da membrana e será marcada).

Um outro método consiste na marcação do núcleo, para saber em que fase do ciclo celular a célula se encontra, ou melhor, em que fase do ciclo celular o tratamento causou danos e o bloqueou. Se a célula está para se dividir, o núcleo se divide antes e, se for marcado, a fluorescência vista desta célula será dobrada. Numa célula apoptótica, o núcleo se fragmenta em diversos pedaços, agindo como núcleos pequenos e a fluorescência total da célula será mais baixa que de uma célula normal. Ao se usar uma solução com água deionizada, iodeto de propídeo e Triton 1% (um tensoativo), faz-se buracos na parede celular, e o iodeto de propídeo entra, se intercalando ao DNA, e fluoresce no vermelho. Se a célula é apoptótica, com o núcleo fragmentado, estes pequenos pedaços de núcleo saem da célula e esta apresentará uma fluorescência geral baixa (menor que uma célula normal). Assim, é possível verificar em que fase do ciclo celular encontra-se a população celular. Porém, somente com este método isolado não é possível determinar se a célula é apoptótica ou necrótica, pois na necrose, o DNA sai do núcleo, e ao se fazer buracos na parede celular com o Triton, este DNA sai da célula e a fluorescência desta célula aparece como se ele fosse uma célula viva ou apoptótica. Portanto, o melhor procedimento é se fazer antes a marcação da membrana, com a Annexina V-FITC, para ver se há morte celular por apoptose ou necrose e depois verificar, com o método do iodeto de propídeo, em que fase do ciclo celular encontra-se a célula. Este ensaio foi feito de acordo com metodologia universalmente utilizada, com algumas modificações ²³⁴. Pode-se fazer um gráfico confrontando estas duas informações, usando na mesma amostra que foi feita a marcação com Annexina V-FITC, o iodeto de propídeo; deve-se apenas tomar o cuidado de não sobrepor as fluorescências observadas (ombros das ondas de emissão no vermelho e no verde se sobrepõem).

Desta maneira, foram feitos os experimentos no FACS com todos os tratamentos preliminares, após 48 h, usando-se em cada caso concentração 50 μ M de composto de cobre, cujos gráficos obtidos estão representados nas Figuras III.2 e III.3.

Para experimentos com Annexina V-FITC e iodeto de propídeo, respectivamente:

²³⁴ I. Vermes, C. Haanen, H.N. Steffens, C. Reutelingsperger, *J. Immunol. Methods* **184** (1995) 39.

Figura III.2. Gráficos FACS dos experimentos com Annexina V-FITC, seguido da adição de iodeto de propídeo, após 48 h de tratamento. **C** é o controle normal, isto é, sem o uso de DMSO; **Cdmso** corresponde ao controle com o uso de DMSO, em concentração 50 μ M.

Figura III.3. Gráficos FACS dos experimentos com iodeto de propídeo, para verificação da fase do ciclo celular (apoptose, G1, S e G2/M), após 48 h de tratamento. C é o controle normal, isto é, sem o uso de DMSO; Cdmso corresponde ao controle com o uso de DMSO, em concentração 50 μ M.

Com estes dados, após tratamento no programa *WinMDA* (Microsoft/Mactosh), determinou-se a quantidade percentual de células em cada fase do ciclo celular e o percentual de morte celular determinado pelo experimento da Annexina, mostrados na Tabela III.1.

Tabela III.1. Resultados preliminares dos tratamentos feitos no FACS, onde controle refere-se a células sem nenhum tipo de adição de tratamento ou solvente e controle DMSO refere-se à adição de DMSO, em igual concentração dos tratamentos (50 μ M), após 48 h de tratamento.

CELULAS 48h	I.P.			Annexina
	% apoptose	% G1	% G2/M	% Cel Morte
Controle	6,30	56,10	23,35	3,56
Controle DMSO	6,82	54,21	27,32	4,31
Composto 1	7,19	50,13	30,46	3,39
Composto 2	7,12	52,06	29,77	3,80
Composto 3	17,54	42,47	22,60	24,81
Composto 4	6,90	52,64	29,20	4,02
Composto 5	7,44	40,24	40,62	8,36
Composto 6	7,88	52,78	28,35	4,00
Composto 8	10,22	33,87	19,29	24,32

A partir dos resultados preliminares acima descritos, observa-se que o composto **3** é **predominantemente apoptótico** (maior bloqueio do ciclo celular na fase Sub-G1, ou seja, anterior a G1), enquanto o composto **5** **causa morte celular bloqueando o ciclo em fase G1 e G2**, além de ser também apoptótico. Ao contrário, composto **8** causa a morte celular por necrose basicamente, pois não se vêem sinais do fenômeno apoptótico neste caso. De modo a aprofundar o estudo, fizeram-se os mesmo experimentos no FACS, de uma forma mais detalhada, com os compostos que mais causavam morte celular: **8, 3 e 5**, com controle normal e controle DMSO, a 12, 24 e 36 h de tratamento, a 50 μ M. Apesar do composto **1** **não causar uma acentuada morte celular, observou-se que ele aumenta as células na fase G1 do ciclo**. Para se eliminar a fluorescência natural de cada sistema, eliminando a fluorescência nativa de cada complexo (Cu^{2+} não é fluorescente, mas os ligantes podem o ser, além de Cu^+ gerado eventualmente), fez-se um controle negativo para cada caso. Foram feitos dois experimentos idênticos (ao invés de um), para cada tratamento ou controle, no qual em um deles não foi adicionado a substância fluorescente. A fluorescência natural celular medida nestes casos foi descontada da fluorescência medida com o agente fluorescente. Observou-se que os compostos **3 e 5** possuíam uma fluorescência natural já bastante alta, e isso foi descontado no resultado final da fluorescência observada nos experimentos, conseguindo, deste modo, um “branco” de fluorescência. Estes resultados estão mostrados nas Figuras III.4 e III.5, respectivamente referentes aos experimentos com IP (iodeto de propídeo) e Annexina, comparados na Tabela III.2.

Figura III.4. Gráficos FACS dos experimentos com *Annexina V-FITC*, seguido da adição de iodeto de propídeo, para: controle normal, controle DMSO, tratamentos **3**, **5** e **8**, cada um com seu respectivo “branco”, a **A)** 12, **B)** 36 e **C)** 24 h. **bk** = branco, todo o experimento, menos a adição de Annexina V-FITC.

Figura III.5. Gráficos FACS dos experimentos com I.P., para: controle normal, controle DMSO, tratamentos **3**, **5** e **8**, cada um com seu respectivo “branco”, a **A)** 12, **B)** 24 e **C)** 36 h. **bk** = branco, todo o experimento, menos o iodeto de propídeo. Os controles bk não foram feitos a tempos de 24 e 36 h devido a semelhança demonstrada dos sistemas (bk e experimento normal) a 12 h.

Tabela III. 2. Resultados dos tratamentos feitos no FACS, com concentração 50 μ M, a 12, 24 e 36 h, e controles normal e com DMSO, em igual concentração dos tratamentos; em todos os casos foram feitos brancos (BK), sem a adição do fluoroforo. **A)** I.P. (alguns experimentos não foram feitos em 24 e 36 h, pois se mostraram desnecessários a 12 h, com valores próximos entre a amostra branco e a amostra com o fluoroforo); **B)** Annexina V-FITC.

A)

	<i>I.P.</i>								
	12 h			24 h			36 h		
<i>CÉLULAS</i>	%ap	/ %G1	/ %G2/M	%ap	/ %G1	/ %G2/M	%ap	/ %G1	/ %G2/M
Controle bk	2,40	51,71	37,64						
Controle	2,95	63,71	23,74				3,07	41,13	46,00
<i>Controle dmso bk</i>	1,89	62,66	29,87						
Controle dmso	2,31	69,96	20,07	3,13	53,09	39,72	1,91	44,08	46,80
Composto 3 bk	3,87	51,51	32,70						
Composto 3	4,64	61,60	19,51	5,32	56,26	29,28	6,85	45,46	32,74
Composto 5 bk	2,77	44,17	44,38						
Composto 5	3,25	44,70	37,38	4,34	44,56	43,81	3,18	29,65	58,08
Composto 8 bk	4,11	46,55	37,38						
Composto 8	4,72	47,54	32,70	6,15	62,07	21,37	5,98	44,07	34,86

B)

	<i>Annexina V-FITC</i>		
	12 h	24 h	36 h
<i>CÉLULAS</i>	% Morte celular / real observado	% Morte celular	% Morte celular
Controle bk	1,39	0,00	0,01
Controle	0,34	1,12	1,46
<i>Controle dmso bk</i>	0,17	0,02	0,00
<i>Controle dmso</i>	2,66	0,83	0,82
Composto 3 bk	42,18	41,32	58,76
Composto 3	41,48 = 0%	56,29 = 14,97%	77,41 = 18,65 %
Composto 5 bk	94,39	93,53	94,46
Composto 5	93,64 = 0%	93,43 = 0%	95,24 = 0,78%
Composto 8 bk	1,07	6,79	3,09
Composto 8	7,86 = 6,79 %	41,50 = 34,71 %	64,84 = 61,75%

Observou-se, desta forma, com um estudo mais detalhado, que o composto **5** tem uma fluorescência natural muito alta e, quando descontada, verifica-se que a fluorescência observada não é devido à marcação de morte celular, a diferentes tempos de tratamento 12, 24 e 36 h. Foi determinado anteriormente (nos experimentos preliminares) que este composto causa um aumento da morte celular, bloqueando as células na fase G2/M do ciclo, que é a fase na qual elas dividem o núcleo, verificada após o ciclo completo (48 h). Talvez seja por isso que não se verificou morte celular com o método da Annexina em tempos breves ao se tratar as células U937 com este composto. Já o composto **3**, apesar de ter uma alta fluorescência natural, quando

esta é descontada do branco, vê-se que tem uma taxa alta de morte celular, que aumenta com o tempo até 24 h e depois tende a se estabilizar, já em 36 h. O composto **8** não tem uma fluorescência natural tão alta e vê-se, claramente, o aumento exponencial da taxa de morte com o tempo, sugerindo uma mortalidade necrótica superior à apoptótica, devido principalmente à sua alta toxicidade para a célula.

III.3.2.b. Linha Celular SH-SY5Y

Neste sistema experimental foram feitos diretamente, com todos os compostos, tratamentos a 50 μ M, a 24 e a 48 h. Decidiu-se considerar que o tipo de tratamento mais adequado seria igual para os dois sistemas celulares estudados, e por comparação com a linha celular U937, decidiu-se fazer apenas os experimentos mais significativos. Os resultados estão mostrados em forma gráfica na Figura III.6, para melhor visualização, para cada composto, feitos todos com uma mesma concentração inicial de células, numa média de dois experimentos distintos, para comparação entre Controle (tratamento com o solvente utilizado, ou seja, DMSO, nos casos de **1** a **6**, e água, no caso de **8**:

Figura III.6. Representação da média de dois experimentos cada, para todos os compostos, com 50 μ M e todos com a mesma concentração inicial de células, a 12 e a 24 h.

Como observado com a linha celular U937, os compostos que afetam a viabilidade celular na linha de neuroblastoma SH-SY5Y são: **8, 3, 5, 6 e 1**, sendo que **1 e 6** não afetavam a linha U937. Deve ser levada em consideração a viabilidade em 12 e 24 h, visto que a 48 h estes tratamentos são demasiadamente tóxicos para as células. Na realidade, após 24 h observou-se que a maioria (exceto o **8**) não causa exatamente morte celular, mas apenas diminui a taxa de crescimento da célula. O composto que aparentemente mostra-se mais danoso frente à linha SH-SY5Y é o composto **8**, causando a maior taxa de morte celular, desde o início visivelmente necrótica. Isso ocorre em ambas as linhas celulares, provavelmente devido à grande hidrosolubilidade deste composto. A linha celular SH-SY5Y é uma linha muito mais sensível do que a U937 com respeito à toxicidade de membrana.

Determinou-se, desta maneira, que os compostos estudados nos tratamentos celulares causam efeitos distintos em diferentes tipos de células. Em relação à viabilidade celular, para a linha U937 são os compostos **8, 3 e 5** que causam as maiores taxas de morte celular, sendo o composto **3** o mais apoptótico. Para a linha SH-SY5Y, são os compostos **1, 6, 3, 5 e 8**, visto que esta linha celular é mais sensível.

Utilizou-se a técnica de citofluorimetria para a observação de em qual fase do ciclo celular agem os compostos, aqueles que apresentaram resultados mais significativos nos estudos anteriores. Os dados observados, estão apresentados na Figura III.7.

Figura III.7. Efeitos dos complexos 1, 3 e 5 no ciclo celular da linha celular SH-SY5Y, tratadas por 24 e 48h com iodeto de propilideno.

III.3.3. Geração de ROS intracelular

Para a determinação quantitativa dos radicais livres produzidos no meio intracelular podem-se usar as vantagens da técnica do FACS (citofluorímetro de fluxo), com alto grau de precisão. Usou-se uma molécula sonda, a Rodamina, que fluoresce ao reagir com radicais livres (ROS e RNS) presentes no meio intracelular, passando da forma reduzida (dicloreto de diidrorodamina), não fluorescente, para a forma oxidada (rodamina), que é fluorescente. Devido ao fato da rodamina apresentar carga, ela também é um importante agente indicativo de potencial de membrana, e deste modo, as análises de radicais livres feitas devem ser apenas qualitativas e ilustrativas, levando-se este fato importante em consideração. A estrutura da rodamina reduzida e oxidada estão descritas no esquema abaixo:

Diidrocloreto de diidrorodamina

Rodamina

Há um grande interesse dos pesquisadores na elaboração de sondas cada vez mais específicas e eficazes, e recentemente foi desenvolvido uma molécula sonda fluorescente para radicais superóxido especificamente, mas que não utiliza o mecanismo redox, como a rodamina, apresentando uma grande vantagem na detecção de superóxido em sistemas biológicos complexos ²³⁵.

III.3.3.a. Geração de ROS intracelular na linha U937

Inicialmente, foi feita uma varredura geral da geração de ROS intracelular na linha celular U937, com todos os compostos em concentração 50 μ M, após 48 h de tratamento. Os resultados obtidos estão mostrados na forma de gráficos da quantidade de radicais produzidos, comparada com os controles normais e com DMSO (Figura III.8).

Figura III.8. Gráficos no FACS dos experimentos com rodamina, para verificação da produção intracelular de ROS, após 48 h de tratamento.

A partir destes dados, ao se fixar um marcador igual em todos os gráficos, aproximadamente na altura da metade do pico mais deslocado, obteve-se um percentual de comparação na fluorescência, descrito na Tabela III.3. Deve ser levado em consideração que estas medidas iniciais de fluorescência foram feitas somente após 48 h de tratamento, quando as células já apresentavam alguma alteração, mesmo com aqueles compostos que aparentemente não causavam danos.

²³⁵ H. Maeda et al. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 68.

Tabela III.3. Resultados preliminares dos tratamentos feitos no FACS, para verificação da fluorescência, onde controle refere-se a células sem nenhum tipo de tratamento ou adição de solvente, e controle DMSO refere-se à adição de DMSO, em igual concentração dos tratamentos (50 μ M), após 48 h de tratamento.

	% de Fluorescência
CELULAS 48h	
<i>Controle</i>	34,36
<i>Controle dms</i>	36,84
Composto 1	93,23
Composto 2	78,25
Composto 3	96,87
Composto 4	57,58
Composto 5	98,90
Composto 6	61,88
Composto 8	77,90

Verificou-se geração de grande quantidade de fluorescência no caso de todos os compostos, em especial **1, 8, 3 e 5**. A maioria deles são exatamente aqueles que causaram a maior taxa de mortalidade celular, como os compostos **8, 3 e 5**. A partir destes dados, resolveu-se fazer experimentos mais detalhados com estes três compostos (igualmente feitos para verificação de morte celular, com *Annexina V-FITC* e Iodeto de propídeo, IP), com o controle do branco (usando-se o sistema igual para o experimento no FACS, mas sem o agente fluorescente) e em tempos breves, a 1, 3, 6 e 12 h. Estes dados estão representados na Figura III.9 e os respectivos percentuais estão na Tabela III.4.

Tabela III.4. Resultados dos tratamentos feitos no FACS, para a medida de fluorescência, a partir de uma marcação nos gráficos, onde controle refere-se a células sem nenhum tipo de tratamento ou adição de solvente, e controle DMSO refere-se à adição de DMSO, em igual concentração dos tratamentos (50 μ M), após 1, 3, 6 e 12 h de tratamento.

Figura III.9. Gráficos FACS dos experimentos com Rodamina, para: *controle normal*, *controle DMSO*, tratamentos **3**, **5** e **8** ($50 \mu\text{M}$ todos), cada um com seu respectivo branco (bk), a **A**) 1 h, **B**) 3 h, **C**) 6 h e **D**) 12 h.

	% Fluorescência			
	1 h	3h	6 h	12 h
Controle bk	0,05	1,78	0,00	0,07
Controle	96,77	96,96	99,98	89,09
Controle DMSO bk	0,16	0,05	0,58	0,08
Controle DMSO	91,96	95,58	93,40	93,25
Composto 3 bk	0,13	1,05	0,42	3,52
Composto 3	96,50	97,37 = 96,32	93,00 = 92,58	97,33 = 93,81
Composto 5 bk	2,14	8,00	2,57	X 58,91 X
Composto 5	98,73 = 96,59	99,20 = 91,20	98,71 = 96,14	X 97,72 X
Composto 8 bk	0,01	0,02	0,00	0,18
Composto 8	97,21	98,04	95,61	96,75

Visto que não ocorrem variações significativas em relação aos brancos e aos experimentos utilizando a Rodamina como sonda (branco sempre próximo a zero e altos deslocamentos quando adicionada a rodamina), decidiu-se utilizar o valor diretamente obtido nos experimentos quando esta variação era menor do que 0,40 %. Apenas no caso do tratamento com o Composto 5, a 12 h, branco e com rodamina, este valor se diferencia de uma maneira incomum, devido, muito provavelmente, a um erro experimental de medida no branco deste experimento, que foi desconsiderado. Observam-se também nos controles valores altos de fluorescência, embora o único controle que deve ser considerado é o com DMSO, pois reflete bem o ambiente em que os tratamentos foram conduzidos. Com base neste controle, foi feita uma tabela da evolução da fluorescência em relação ao tempo (Tabela III.5).

Tabela III.5. Tabela da evolução de fluorescência medida em relação ao tempo, para os tratamentos efetuados com os compostos 3, 5 e 8 (50 µM), na linha U937, *descontando-se o valor do controle com DMSO.*

	% fluorescência efetiva			
	1 h	3h	6 h	12 h
Composto 3	4,54	0,74	0,10	0,56
Composto 5	4,63	0,01	2,73	X 4,47X
Composto 8	5,25	2,46	2,21	3,50

Apesar da variação experimental existente, observa-se a tendência da maior fluorescência na primeira hora de tratamento com todos os compostos, com valores maiores para o composto 8. Este aumento de fluorescência segue a ordem de taxa de morte celular, observada a 24 e 48 h: **8 > 3 ≅ 5**. Esta inter-relação pode ser feita da seguinte forma: os compostos primeiramente geram um alto estresse oxidativo na célula, logo que iniciado o tratamento, quando entram no citoplasma, ou mesmo na membrana. Com esta grande

quantidade de ROS gerado inicialmente, a célula inicia um processo de morte, no qual, para cada composto em particular, é afetada uma via diferente de morte celular, dado que pode ser visto pela fase do ciclo celular no qual a célula interrompe sua atividade (visto anteriormente nos experimentos de FACS com *Annexina-V FITC* e Iodeto de propídeo).

III.3.3.b. Geração de ROS intracelular na linha SH-SY5Y

A fim de se verificar correlações entre a geração de ROS intracelular entre as duas linhas celulares estudadas, utilizou-se a mesma metodologia dos experimentos feitos para a linha U937. Fizeram-se tratamentos a concentrações menores (visto que esta linha celular é mais sensível que a outra), a 25 μ M, e a tempos de 3 e 6 h. Utilizou-se também, já na varredura inicial, o branco, ou seja, todo o tratamento (ou controle), mas sem a Rodamina. Os resultados estão demonstrados na Figura III.10 e na Tabela III.6.

A)

B)

Figura III.10. Gráficos FACS dos experimentos com Rodamina, para: controle normal, controle DMSO, tratamentos **1** a **6**, e **8** (25 μ M todos), cada um com seu respectivo branco (BK), a **A)** 3 e **B)** 6 h.

Selecionou-se somente a primeira população de células (células reais). A cauda que aparece, como uma segunda população, pode ser devido a fragmentos das células SH-SY5Y feitos pela ação da tripsina ou do raspador mecânico. Como no FACS passa uma célula por vez, ele reconhece a fluorescência de apenas uma célula como se fosse de duas populações (corpo celular + prolongamento neural).

Tabela III.5. Resultados dos tratamentos feitos no FACS, para a medida de fluorescência, onde *Controle* refere-se a células se nenhum tipo de adição de tratamento ou solvente, e controle DMSO refere-se a adição de DMSO, em igual concentração dos tratamentos (25 µM), após 3 e 6 h de tratamento.

	% de fluorescência	
	3h	6 h
Controle bk	0,24	1,32
Controle	5,90 = 5,66	7,76 = 6,44
Controle DMSO bk	0,44	1,25
<i>Controle DMSO</i>	3,00 = 2,56 *	8,15 = 6,90*
Tratamento Comp. 1 bk	0,47	1,55
Tratamento Comp. 1	5,24 = 4,77*	6,80 = 5,25*
Tratamento Comp. 2 bk	0,33	0,99
Tratamento Comp. 2	5,15 = 4,82*	X 87,93 = 86,94 X
Tratamento Comp. 3 bk	0,62	1,33
Tratamento Comp. 3	7,35 = 6,73*	11,33 = 10,00*
Tratamento Comp. 4 bk	0,14	1,07
Tratamento Comp. 4	7,50 = 7,36*	10,88 = 9,81*
Tratamento Comp. 5 bk	4,94	5,95
Tratamento Comp. 5	16,73 = 11,79*	9,65 = 3,70*
Tratamento Comp. 6 bk	0,31	0,84
Tratamento Comp. 6	6,82 = 6,51*	10,36 = 9,52*
Tratamento Comp. 8 bk	0,88	1,31
Tratamento Comp. 8	5,24 = 4,36*	11,09 = 9,78*

* resultados após descontados o branco medido (bk)

Nota-se uma grande variação nos valores de fluorescência medida com os diferentes compostos, em geral com pequenas variações após 3 h de tratamento, e com variações maiores após 6 h. Nota-se um grande percentual de fluorescência medido principalmente pelo composto **2** que está fora da linha dos demais valores, possivelmente causado por um erro experimental, ou algum fator externo à medida (as células podem ter sido estressadas anteriormente), e este valor foi descartado. No caso das medidas de fluorescência na linha celular SH-SY5Y não se nota uma correlação estreita com a viabilidade celular entre os compostos. Após 6 h, observa-se uma maior produção de ROS para os tratamentos com os compostos **3, 4, 6, 8 e 5** (o **2** foi descartado por haver dúvidas em relação à medida). Verifica-se um certo padrão na geração de radicais, apesar de aumentar com o tempo quando comparado ao controle, e uma maior produção inicialmente, ou pelo menos estabilizado, como na linha U937.

Isso pode indicar que estes compostos possuem um padrão de geração de radicais intracelulares: a maioria dos radicais é gerada no início do tratamento, logo após os compostos serem adicionados. Os danos subseqüentes causados, como danos oxidativos a proteínas (discutidos mais adiante), podem ser devido a esta produção inicial de radicais.

III.3.4. *Imunobloting* e danos protéicos

Muitas moléculas de interesse biológico como aminoácidos, peptídeos, proteínas, nucleotídeos e ácidos nucléicos, possuem grupos ionizáveis e podem existir em solução como espécies eletricamente carregadas, seja como cátions ou ânions. Assim, moléculas com cargas parecidas, mas pesos moleculares diferentes, terão uma relação massa/carga diferente e apresentarão uma migração diferenciada se colocadas em presença de um campo elétrico. Os cátions migram em direção ao campo elétrico negativo (catodo) e os ânions ao pólo positivo (anodo) a uma velocidade que depende do equilíbrio entre a força eletromotriz do campo elétrico, e a força de atrito existente entre íons e o meio circunstancial. Quando a eletroforese é conduzida em um suporte inerte e homogêneo, os componentes da amostra migram como bandas distintas que ao final da corrida podem ser reveladas com a utilização de técnicas analíticas apropriadas. Este método tem o nome de eletroforese de zona. Existem diversos tipos de eletroforese de zona: carta de filtro, acetato de nitrocelulose, sílica, alumina, gel de amido, gel de agar, gel de poliacrilamida. Para que a eletroforese se realize, as amostras são dissolvidas em tampão adequado, adicionado também ao suporte para consentir a condução da corrente. O tampão deve também manter constante o estado de ionização da molécula a separar, cuja carga muda com o valor de pH, sobretudo no caso de íons bipolares. As macromoléculas, como as proteínas, devem ser previamente tratadas, de modo a terem uma relação constante massa/carga: deste modo, a separação eletroforética dependerá somente do peso molecular. Este tratamento é feito com dodecilsulfato de sódio (SDS), a 10%, um detergente aniônico usado para dividir as subunidades, facilitar a solubilização e inserir um grupo iônico a intervalos regulares da cadeia peptídica, ou também com β -mercaptoetanol, agente redutor capaz de quebrar as pontes dissulfetos.

No caso de eletroforese feita em suporte gel de acrilamida, utilizado para os experimentos neste trabalho, este gel é preparado imediatamente antes do uso, fazendo-se copolimerizar acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$) com um agente capaz de estabelecer ligações cruzadas, como a N,N'-metilenobisacrilamida ($\text{CH}_2(\text{NHCOCH}=\text{CH}_2)_2$), em presença de um catalisador (persulfato de amônio, 0,1-0,3 % peso/volume) e um iniciador (N,N,N',N'-tetrametilenodiamina, TEMED), em ausência de oxigênio, preferivelmente, pois o oxigênio molecular inibe a polimerização química.

Após a eletroforese, as proteínas separadas são em seguida transferidas em membrana de nitrocelulose ou fluoreto de polivinilideno (PVDF), com o auxílio de campo elétrico. Nesta membrana de nitrocelulose, faz-se um tratamento de reconhecimento das proteínas que interessam ao estudo chamado *imunobloting*, ou *western bloting*, que se baseia no reconhecimento das proteínas através da adição de anticorpos específicos.

Este método foi utilizado para se determinar a formação de proteínas carboniladas e glicosiladas (esta diretamente no gel de acrilamida).

III.3.4.1. Danos Carbonílicos a proteínas citoplasmáticas

O tratamento prévio das amostras baseia-se em uma reação dos grupos carbonílicos presentes nas proteínas alteradas com a dinitrofenilhidrazina (DNPH, solução amarela), formando dinitrofenilhidrazona (vermelha) ao se condensar às carbonilas presentes. Após se fazer o *blotting* à nitrocelulose, usa-se um anticorpo específico para esta substância, reconhecendo a hidrazona formada nas proteínas de todas as faixas de peso molecular. Deste modo, analisando o percentual marcado em cada lastra (chapa) fotográfica revelada, pode-se estimar a quantidade de proteínas carboniladas que foram geradas no sistema.

Na Figura III.11 estão os *western blottings* feitos para a linha celular U937 a 48 h, e também a outros tempos, com a indicação do percentual de proteína carbonilada gerada em cada caso.

A)

C	1	2	3	4	5	6	8
3.4	3.8	6.8	14.7	6.6	9.4	9.9	22.8

B)

C	dms	dms	dms	3	3	3	5	5	5	8	8	8
36h	12h	24h	36h	12h	24h	36h	12h	24h	36h	12h	24h	36h
13.0	9.0	10.9	9.3	10.8	12.4	14.3	16.7	14.4	11.2	11.1	13.6	48*

Figura III.11. *Western Blotting* das proteínas carboniladas geradas nas células U937, **A)** após 48 h, usando-se 50 μ M de composto em cada caso, e carregando-se com 17 μ g de proteína em cada linha; e **B)** após 12, 24 e 36 h de tratamento (50 μ M), onde C é o controle normal é DMSO é o controle com DMSO

(50 μ M), carregando-se com 12 μ g de proteínas em cada linha, dos compostos que mais causam danos oxidativos: **3**, **5** e **8** (observados primeiramente ao se fazer com 48h, em A). (Géis de acrilamida a 12%)

Observa-se, deste modo, que as quantidades de proteínas carboniladas geradas aumentam ligeiramente com o tempo (para cada composto), e são proporcionais à taxa de morte comparativa entre os tratamentos com os compostos efetuados, ou seja, **8** > **3** > **5**, com uma quantidade menor gerada no controle com DMSO (a mesma concentração usada nos tratamentos). O controle normal, ou seja, sem a adição de DMSO, apresenta uma concentração maior de proteínas carboniladas do que aquele com a adição de DMSO. Isso ocorre porque o DMSO, em baixa concentração, é um agente protetor da célula, evitando em parte os danos oxidativos. Deste modo, como a adição dos compostos nos tratamentos foi feita em DMSO, é este o controle que deve ser levado em consideração para comparações, para se descontar o efeito deste solvente. Observa-se um fato curioso, para o tratamento com o composto **8**: após um determinado período, apenas uma banda protéica apareceu no *blotting*. Foram repetidos os experimentos, com diferentes amostras, para se eliminar um possível erro experimental, mas em todos os casos o resultado foi idêntico, com o aparecimento de apenas uma linha, equivalente a proteínas de peso molecular de aproximadamente 60-70 kDa. Visto que este tratamento é predominantemente necrótico às células, e após 36 h a maioria esta morta, as proteínas citoplasmáticas que estavam nas células mortas por necrose (que conseqüentemente “explodem” no meio de cultura) não foram precipitadas juntamente com as células vivas e apoptóticas ao se fazer o precipitado celular para o estudo, centrifugando-se o meio a 1200 rpm. A esta velocidade de centrifugação apenas as proteínas mais pesadas conseguem ser precipitadas, como o que se consegue observar no *blotting* a 36h. As demais proteínas, também danificadas pela necrose, que estavam no meio de cultura, não foram precipitadas, e conseqüentemente, não foram observadas. Outro fato que se nota, é que no tratamento com o composto **5** a quantidade de proteína carbonilada diminuiu ligeiramente com o tempo. De alguma forma, estas células conseguem se defender dos danos causados por este composto, predominantemente apoptóticos, e que bloqueia o ciclo celular na fase G2/M (visto pelos experimentos no FACS), ou seja, o DNA já foi duplicado, na fase S (entre a fase G1 e G2/M), o novo núcleo (para a nova célula) já foi feito, mas a célula bloqueia a mitose, por algum mecanismo de defesa ativado, possivelmente por uma condensação prematura da cromatina. Isso geralmente ocorre quando a proteína kinase ATR, que sinaliza se a duplicação do DNA foi correta, é ativada (por causa dos danos radiculares gerados no DNA), fosforilando outra proteína sinalizadora (Chk-1), que sinaliza por sua vez, a não realizar a mitose. Este tratamento, deste modo, faz a célula morrer por um mecanismo de defesa próprio no final de seu ciclo de divisão apenas, e os danos carbonílicos às proteínas citoplasmáticas são mais evidentes no início do tratamento, quando a célula “sente”

mais os efeitos do composto. Depois, consegue anular estes efeitos, chegando a ponto de duplicar o núcleo, mas é bloqueada a divisão celular completa.

O tratamento com o composto **3**, ao contrário, bloqueia o ciclo celular na fase G1 (verificado nos experimentos no FACS), ou seja, na fase em que a célula inicia a se dividir, pela ação de proteínas sinalizadoras, como MDM2, p53 e p21. Deste modo, conclui-se que, se um tratamento bloqueia o ciclo celular nesta fase, atua de certa forma na ação destas proteínas sinalizadoras, que fazem parte da cascata que controla a reparação e replicação correta do DNA, e em caso de grave dano ao DNA, sinalizam a morte apoptótica da célula. Deste modo, este tratamento muito provavelmente causa um dano severo ao DNA logo no início da cascata sinalizadora de reparação do DNA, envolvida consequentemente na cascata de morte celular programada (se o DNA não é reparado) que é imediatamente ativada, e a célula é bloqueada nesta fase do ciclo, em G1. Com o passar do tempo, verifica-se também um aumento no nível de proteínas citoplasmáticas carboniladas, indicando que os danos severos se acumulam, o que no final causa a morte programada da célula, a apoptose.

Os dados apresentados mostraram que cada um dos compostos (**3**, **5** e **8**) causa um dano diverso à linha celular U937, e como verificado também pela geração de espécies radicalares (ROS e RNS) nestes casos, resultam em altos níveis de proteínas carboniladas que são consideradas marcadores de danos oxidativos a proteínas, enquanto outros alvos como lipídeos poli-insaturados não são afetados. Estes danos são causados muito provavelmente (principalmente no caso dos tratamentos apoptóticos, **3** e **5**) pela ação conjunta da geração de radicais livres nas primeiras horas de tratamento, danificando o DNA, grave ou levemente, no caso de **3** e **5**, respectivamente, causando a parada do ciclo celular em fases diversas. Não é acreditado que estes compostos atuem em uma ação direta na cascata sinalizadora de morte celular na célula, na ativação/desativação de algumas proteínas importantes, pela ligação em sítios ativos destas proteínas. Compostos metálicos, principalmente reativos como no caso de compostos de cobre(II), atuam geralmente gerando radicais livres no citoplasma, que por sua vez danificam o DNA e geram também danos oxidativos a proteínas, ativando assim, a cascata de morte celular programada. Comprova-se assim que um excesso de íons cobre(II) na célula (em forma complexada ou coordenados em proteínas) sempre causa danos protéicos e, em presença de açúcares simples, que estão presentes no meio de cultura, isso pode significar um dano ainda maior. Alguns dos compostos de cobre estudados são extremamente tóxicos, causando a necrose da célula, como verificado no caso do composto **8**, que possui uma estrutura glicosilada, entrando, possivelmente, mais facilmente e em maior quantidade na célula onde causa danos imediatos e intensos. E este tipo de ação não é muito desejado em uma terapia para o câncer.

A análise das proteínas carboniladas nos tratamentos efetuados na linha celular SH-SY5Y mostraram uma pequena diferença, em relação aos tratamentos e ao controle efetuado. Na

Figura III.12 estão os *western blottings* feitos para esta linha celular a 24 h, e também em outros tempos (6 e 12 h), com a indicação do percentual de proteína carbonilada gerados em cada caso.

A)

B)

Figura III.12. *Western Blotting* das proteínas carboniladas geradas nas células SH-SY5Y, **A)** após 24 h, usando-se 50 μ M de composto em cada caso e carregando-se com 9 μ g de proteína em cada linha; **B)**

após 6 e 12 h de tratamento (25 μ M), onde C é o controle com DMSO (25 μ M), carregando-se com 5 μ g de proteínas em cada linha. (Géis de acrilamida a 12 %. *Std*: standard, padrão de proteínas fornecido pelo kit).

Observa-se no caso **B**) que a quantidade de proteínas carboniladas aumenta ligeiramente com o tempo (a 12 h produz mais do que a 6 h), como era esperado, e em correlação com os compostos que mais causam morte celular (**1, 3, 5, 6 e 8**).

De qualquer modo, nota-se uma ação não tendenciosa entre morte celular e geração de danos carbonílicos.

III.3.4.2. Formação de proteínas citoplasmáticas glicosiladas

No caso da verificação da geração de proteínas glicosiladas, faz-se todo o tratamento diretamente no gel, sem a necessidade de se fazer imunoblotting. O tratamento prévio das amostras baseia-se em uma oxidação dos carboidratos presentes nas proteínas que foram glicosiladas com ácido periódico, após a separação das proteínas no gel de acrilamida com SDS 10%. Posteriormente, faz-se uma reação com uma substância luminescente que emite no comprimento de onda de 300 nm. Pode-se visualizar a $\lambda = 256$ nm, o comprimento mais comum encontrado nos aparelhos de visualização fotográfica. As fotografias dos géis foram tiradas logo após sua exposição à luz UV, e estão mostradas na Figura III.13 para as células U937 e na Figura III.14 para as células SH-SY5Y, com a quantidade percentual de proteínas geradas em cada linha analisadas com o auxílio do programa computacional BioRad (Microsoft).

A)

B)

C	1	2	3	4	5	6	8	Std
11.9	16.6	14.2	11.9	15.1	14.1	17.8	9.6	
% de proteínas glicosiladas								

Figura III.13. **A)** Fotografia a 300 nm do gel de poliacrilamida a 12 % (com SDS 10 %), e **B)** gel de poliacrilamida a gradiente (6 a 15 %), das proteínas glicosiladas de U937. Tratamento: após 48 h, com 50 μ M cada, e controle com DMSO a 50 μ M, carregado com 10 μ g em cada linha. (Std: standard).

No caso das células U937 não se observa grande variação entre as amostras após tratamentos efetuados com os diferentes compostos. Apenas no caso do tratamento com o composto **8** observa-se a presença de apenas uma linha em evidência no gel, correspondente à proteína glicosilada, de massa molecular 42000 Da, uma glicoproteína definida como α -ácido-glicoproteína, pelo padrão oferecido pelo kit de análise (última linha do gel, standard). Deste modo, apesar de não ter outras proteínas marcadas, este tratamento apresenta somente esta proteína que foi glicada. Um estudo mais aprofundado seria necessário para se explicar o que pode ter acontecido. Mas a explicação é a mesma daquela da proteína carbonilada para este composto, após um período de tempo maior, pois são casos semelhantes. Após grande taxa de morte por necrose, onde a célula literalmente explode no meio de cultura, as proteínas mais leves não foram precipitadas para serem analisadas, e por isso aparece somente esta proteína de peso molecular maior. Este procedimento foi repetido com diversas amostras, especialmente após o tratamento com o composto **8**, e feitas em dias diferentes, levando sempre ao mesmo resultado.

C	1	2	3	4	5	6	8	Std
14.1	16.4	17.1	17.8	15.8	18.7	17.9	18.6	
% de proteínas glicosiladas								

6H

Figura III.14. Fotografia a 300 nm do gel de poliacrilamida a 12 % (com SDS 10 %), a 12 e a 6 h das proteínas glicosiladas de SH-SY5Y. Tratamento: após 6 e 12 h, com 25 μ M cada, e controle com DMSO a 25 μ M, carregados com 10 μ g em cada linha.

Na linha celular SH-SY5Y já se observam ligeiras diferenças entre as intensidades das linhas marcadas, equivalendo a taxa de morte das células. Observa-se que nas células controle ocorre um menor número de proteínas glicosiladas e, em geral, 12 h mais que 6 h (menos no controle com DMSO). Em todos os casos, principalmente após 12 h de tratamento, observa-se uma incidência maior da linha da α -ácido glicoproteína, comparada com as outras glicoproteínas de outros pesos moleculares. Após 12 h, pode-se inclusive verificar um percentual ligeiramente maior de glicoproteínas formadas nos tratamentos **1, 3, 4 e 6**, em relação ao **2, 5 e 8**. Isso está relativamente de acordo com a taxa de morte nesta linha (mais alta para os compostos **1, 3, 5, 6 e 8**), dados estes equiparáveis aos de proteínas carboniladas.

III.3.5. Geração de radicais livres quimicamente – Comparação de Reatividades

Na tentativa de se explicar a reatividade biológica dos complexos estudados, para sua comparação neste estudo, utilizou-se mais uma vez, a técnica de captação de spin pelo EPR., buscando-se alguma diferença nas características intrínsecas do complexo na geração de radicais, num meio químico. Neste caso, utilizou-se o DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido), para captação de radicais de oxigênio, e foram comparados os compostos da série da isatina, na sua capacidade de geração de espécies radicalares quando submetidos a um meio com peróxido. Utilizou-se o radical estável TEMPOL (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidilóxi) para se avaliar quantitativamente a produção de radicais (no programa WinEPR). Na Figura III.15 estão os espectros e suas respectivas concentrações de radicais adutos gerados. Em todos os casos o sinal observado é típico do aduto DMPO-OH, com $A_N = A_H = 14,9$ G.

Figura III.15. Espectros de captação de spin por EPR, mostrando o aduto DMPO-OH formado na presença dos complexos de **1** a **6**, com peróxido de hidrogênio. Condições em todos os espectros, após 15 minutos de reação: ganho: $2,00 \times 10^4$, amplitude: 1G, tempo constante: 40,96 ms, 1 scan, temperatura ambiente. [DMPO] = 100 mM, [H₂O₂] = 2,5 mM, [CuL] = 100 μM, tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 (bk = branco, sem a adição de nenhum complexo de cobre).

Através destes experimentos, observa-se quantidade apreciável de radicais hidroxila gerados na presença de peróxido de hidrogênio, para os complexos **5**, **3** e **1**, justamente aqueles que mais causaram danos biológicos, afetando a viabilidade celular (cada um de uma maneira específica, e de modo diverso para diferentes culturas). A produção estimulada (pelo peróxido de hidrogênio) de radicais nestes complexos indica uma tendência de reatividade frente a um metabólito celular (peróxido), através da qual pode-se compará-los entre si. Verificou-se, deste modo, a mesma tendência observada nos estudos *in vitro* celulares na geração de espécies reativas radicalares.

A detecção de adutos DMPO-OH na presença de íons de cobre não constitui uma evidência inequívoca da captação de radicais livres hidroxil²³⁶, embora o estresse oxidativo pela geração de ROS gerada por estes íons e também por reagentes de Fenton é tido como causa importante na indução da morte celular²³⁷. Este aduto também pode ser verificado proveniente da decomposição do aduto correspondente DMPO-OOH, ou via reações nucleofílicas catalisadas pelo metal (explicação detalhada na Parte 2, na Discussão dos resultados de Reatividade e Cinética), na qual uma oxidação inicial do DMPO é seguida de uma adição de água, como já descrito para o cobre na presença de o-fenantrolina²³⁸. Entretanto, o comportamento diferente observado com os ligantes estudados é um indicativo de diferentes propriedades pró-oxidantes destes complexos.

²³⁶ T.M. Buttke, P.A. Sandstrom, *Immunol. Today* 15 (1994) 7.

²³⁷ C. Manzl, J. Enrich, H. Ebner, R. Dallinger, G. Krumschnabel, *Toxicol.* 196 (2004) 57.

²³⁸ M.B. Yim, P.B. Chock, E.R. Stadtman, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 4099.

Os complexos **5** e **3** apresentam como semelhança estrutural o fato de serem os mais volumosos, de possuírem grupos aromáticos (além do pertencente à isatina), e o complexo **1** se assemelha a eles neste caso, pois também é um complexo volumoso e bastante tetraédrico no pH biológico de 7 – 7.4 (dados vistos no EPR, em 3.I.). Talvez este seja o motivo pelo qual estes complexos afetaram a viabilidade celular de modo intenso, pelo fato de entrarem mais facilmente na célula, ou pelo fato de serem mais estáveis (uma vez dentro delas), e assim agirem de uma maneira mais eficaz, ou ainda pelo fato de danificarem mais a membrana celular, por gerarem mais radicais livres em presença de metabólitos celulares.

Outros fatores, além do estresse oxidativo, parecem ter influência no processo de apoptose, como foi discutido na Introdução desta Tese. Entretanto, a partir destes resultados pode-se concluir que no caso dos complexos de cobre estudados a geração de espécies reativas é um fator importante a ser considerado.

III.3.6. Estudos avançados sobre o mecanismo celular

Foram feitos estudos avançados sobre a atuação destes compostos no mecanismo celular, na cultura de neuroblastoma SH-SY5Y. Estão sendo avaliados, mais detalhadamente os complexos **1** e **3** sobre a indução de processos apoptóticos, alteração do estado redox na célula e da relação GSH/GSSG (glutathiona, glutathiona oxidada), e ativação das proteínas MAP kinase, JNK e p38, todas envolvidas no processo de morte apoptótica e mecanismos de proteção celular. Os estudos foram feitos através de imunoblotting, com reação a anticorpos específicos a estas proteínas.

Sobre a cultura de neuroblastoma o composto **1** induz oxidação, mas não a morte celular, enquanto o composto **3** induz a morte celular apoptótica, mas não a oxidação, tudo entre 24 h de tratamento. Com isso tem-se no composto **1** uma ação pró-oxidante, enquanto que no composto **3**, uma ação pró-apoptótica. Eles possuem uma atividade seletiva sobre as células tumorais, agindo de diferentes maneiras, e agindo seletivamente no alvo tumoral. Sobre as células U937 o composto **3** também possui forte ação pró-apoptótica.

Com este estudo, aqui iniciado, focaliza-se o conhecimento de possíveis “drogas” antitumorais derivadas do cobre(II), com diferentes ligantes imínicos que modulam sua atividade no alvo tumoral. Conhecendo-se seu mecanismo de ação, seria possível o desenvolvimento de novos complexos de cobre(II) modulados de acordo com a função que se deseja no alvo tumoral.

De uma maneira geral, a partir dos resultados até agora obtidos, estes estudos indicam que os compostos de cobre(II) com ligantes imínicos derivados da isatina possuem um comportamento muito diferente ao afetar a viabilidade celular, indo da total ineficácia a uma alta toxicidade; e entre estes últimos (causadores de alta taxa de morte

celular) pode ser observada uma diferente especificidade tanto no tipo de célula quanto no seu modo de ação, e isso representa o aspecto mais interessante para seu possível emprego futuro na terapia do câncer.

4. CONCLUSÕES

Atualmente é bastante difundida a idéia de que conhecimentos químicos são essenciais para o êxito em atuações que visem uma melhoria da qualidade de vida, especialmente no que se refere à saúde, ao meio ambiente e ao conforto humano. Baseando-se nesta premissa, teve-se como objetivo principal deste trabalho a elucidação do papel do cobre(II) no processo de oxidação de carboidratos, uma reação importante que ocorre in vivo, implicada em diversos processos fundamentais, e na apoptose celular, como modo de se desenvolver uma nova estratégia para tratamentos anti-tumorais.

Foram desenvolvidos ligantes mais elaborados, capazes de se coordenar fortemente a íons de cobre(II), influenciando suas propriedades estruturais, espectroscópicas e catalíticas frente a agentes oxidantes usuais no meio biológico. Assim, foram sintetizados complexos imínicos e diimínicos de Cu(II) derivados da isatina, um indol endógeno: $[\text{Cu}(\text{isa-pn})](\text{ClO}_4)_2$ (**1**), $[\text{Cu}(\text{isa-en})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**), $[\text{Cu}(\text{isa-epy})_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**), $[\text{Cu}(\text{isa-hist})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ (**4**), $[\text{Cu}(\text{isa-amiquin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ (**5**) e $[\text{Cu}(\text{isa})_2]\text{ClO}_4$ (**6**). Estes compostos foram então amplamente caracterizados por análise elementar, medidas de condutividade molar e técnicas espectroscópicas: IV, UV/Vis, EPR e ESI-MS. Apresentaram um interessante equilíbrio ceto-enólico em solução, variando a geometria ao redor do íon Cu(II) de quase tetraédrica, em meio ácido, a quadrado planar em meio alcalino, conforme verificado através de EPR e UV/Vis²³⁹.

Os complexos **1**, **2** e **3** foram utilizados no estudo completo da cinética e do mecanismo de oxidação de carboidratos simples, como a glicose, a frutose e a galactose, através do acompanhamento da reação pelo consumo de oxigênio molecular, em tampão carbonato pH 12,0, a $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. As constantes cinéticas de primeira ordem (k_{obs}) determinadas para a oxidação da glicose foram: $1,66 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ para **1**, $1,91 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ para **2** e $2,72 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ para **3**. Analogamente, para a oxidação da frutose foram: $12,4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ para **1**, $13,7 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ para **2** e $2,75 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ para **3**; e para a oxidação da galactose foram: $0,52 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ para **1**, $1,81 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ para **2** e $1,41 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ para **3**.

A partir de dados cinéticos complementares chegou-se a uma lei cinética experimental: $V_i = \{k_o + (k + k' [\text{CuL}]) [\text{OH}']\} [\text{carboidrato}]$, indicando que a velocidade de reação era de primeira ordem em relação ao catalisador, seguido de um efeito de saturação. Baseado nestes resultados, propôs-se um mecanismo de reação com uma etapa dependente do cobre e outra dependente só da base. Compostos de cobre(II) com ligantes do tipo base de Schiff similares foram testados, mas sem apresentar o equilíbrio ceto-enólico das isatinas, e praticamente não catalisaram a reação. Estes estudos cinéticos mostraram também que a reação ocorre significativamente apenas em pHs alcalinos, onde tanto o substrato quanto o catalisador (ligante coordenado)

sofrem enolização. Os parâmetros cinéticos observados para **1** foram: $k_0=1,17 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $k=2,99 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, e $k'=5,17 \times 10^3 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$; e para **2** foram: $k_0=1,31 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $k=2,65 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, e $k'=6,01 \times 10^3 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$, sugerindo que **2** é levemente mais ativo do que **1** na oxidação da frutose (k' maior). Demonstrou-se ainda que ambos os processos: o catalisado apenas por base (enolização do substrato), e o catalisado por metal, são etapas determinantes da reação, na faixa de concentrações usadas. Uma etapa não-catalítica, com constante k_0 , independente de $[\text{OH}^-]$ e de $[\text{CuL}]$, mostrou ser desprezível. Estes resultados são consistentes com o equilíbrio previamente verificado para estes complexos, de que a forma enol é a espécie cataliticamente mais ativa. Estes resultados foram ainda corroborados pela atividade desprezível de complexos de cobre similares, mas que não apresentam equilíbrio ceto-enólico.

Foram detectadas as presenças dos radicais hidroxil e $\text{CO}_2^\bullet$ como intermediários de reação, através da técnica de captação de spin por EPR e, adicionalmente, a formação de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, através de reações com enzimas específicas. Como produtos principais gerados nestas oxidações foram determinados, por eletroforese capilar, ácidos carboxílicos de cadeia curta, como glicolato, glicerato, e formiato. Apenas no caso do complexo não tão reativo **3**, ocorreu a formação do ácido xilônico, de cadeia maior. Chegou-se também a uma lei cinética teórica, a partir do mecanismo de reação proposto: $V_i = -d[\text{O}_2]/dt = (k_1 + k[\text{Cu}^{\text{II}}\text{L}_{\text{enol}}]) [\text{Fructose}] [\text{OH}^-]$, onde $k = K_1.k_2$ (sendo $K_1 = k_1/k_{-1}$ a constante para o equilíbrio ceto-enólico do açúcar), consistente com a lei experimental determinada, apresentando uma etapa dependente do metal e outra independente. Os passos no mecanismo proposto, sob condições de primeira ordem, combinam transferência eletrônica intramolecular, com provável redução do íon de cobre pelo substrato coordenado, levando a espécies radicalares substrato-enediol, responsáveis pelo processo de iniciação ²⁴⁰.

Estudos anteriores reportados na literatura sobre a oxidação de carboidratos, em solução aquosa alcalina, em presença de íons cobre indicaram sempre ordem zero no metal ⁶³. Entretanto, estes estudos eram usualmente conduzidos a altas concentrações de cobre, usando ligantes fracos (como solvente, citrato, tartarato), ocorrendo simultaneamente a precipitação do catalisador como óxido de cobre(I).

Para o estudo da interação metal-carboidrato, importante para se entender a complexação do cobre *in vivo* com este ligante biológico, complexos de Cu(II) com açúcares simples $\text{Na}_2[\text{Cu}_2(\text{Glc})_3] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**10**), $\text{Na}_2[\text{Cu}_3(\text{Fru})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**11**) e $\text{Na}[\text{Cu}_2(\text{Gal})_3] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (**12**), foram sintetizados e caracterizados por análise elementar, medidas de condutividade molar, técnicas espectroscópicas IV, UV/Vis, EPR, e Raman, especialmente para se verificar o sítio de ligação do metal no carboidrato. Estes complexos, apesar de analisados em sólido, foram sintetizados em solução, precipitando na forma mais estável ao se complexarem. Pôde-se inferir que o cobre(II)

²³⁹ G. Cerchiaro, P.L. Saboya, A.M.D.C. Ferreira, D.M. Tomazela, M.N. Eberlin, *Transition Met. Chem.* 29 (2004) 495-504.

prefere uma estrutura do carboidrato para se ligar em relação a outra (anômero predominante), devido à diferentes estabilidades, efeitos estéricos e outros fatores eletrônicos. No caso da glicose, o Cu(II) liga-se preferencialmente na sua forma anômero β , enquanto na frutose liga-se à estrutura furanose e na galactose a uma mistura dos anômeros α e β ²⁴¹. Estas formas nem sempre coincidiram com aquelas predominantes no ligante livre.

Foram ainda preparados e caracterizados dois novos complexos imínicos quirais de Cu(II) com ligantes do tipo aminocarboidrato, [Cu(apy₂-gla)](ClO₄)₂ (**8**) e [Cu(pyal₂-gla)](ClO₄)₂ (**9**), que tiveram sua quiralidade estudada pela técnica de CD e que também mereceriam ser utilizados para estudos biológicos similares e comparativos com a classe de complexos imínicos derivados da isatina. Verificou-se a assimetria destas duas espécies e, além disso, uma certa complementaridade quiral delas, que não são imagens especulares ou enantioméricas, e sim espécies diferentes em apenas um substituinte do ligante, em posição afastada do centro quiral. Esta pequena diferença, um grupo metila no complexo **8** que substituiu um hidrogênio no **9**, levou a um posicionamento ou arranjo diferente do ligante ao redor do metal, gerando desvios diferentes na luz polarizada ²⁴².

Possíveis atividades biológicas dos compostos de cobre preparados também foram exploradas. Observaram-se os efeitos dos compostos **1-6** e **8**, nas linhas celulares tumorais promonocítica sanguínea U937 e neuroblastoma SH-SY5Y, onde apresentaram comportamentos distintos. O complexo **8** mostrou-se necrótico a ambas culturas, enquanto o composto **2, 4** e **6** não apresentaram citotoxicidade significativa nas concentrações utilizadas nos estudos. Já os compostos **1, 3** e **5** foram bastante citotóxicos, sendo o **3** o mais efetivo. As células tratadas com estes complexos sofreram apoptose, ou morte celular programada, verificada por ensaios citofluorimétricos. Os compostos ativos (**1, 3** e **5**) agiram em diferentes fases do ciclo celular de cada linha. O composto **1** bloqueou a fase G1 do ciclo celular na linha SH-SY5Y já em 24h de tratamento, enquanto o composto **3** foi bastante apoptótico em ambas as linhas, com predominância da U937, sendo que na linha SH-SY5Y bloqueou o ciclo celular especialmente na fase G2/M, e o composto **5** causou apoptose em ambas as linhas. Através da técnica citofluorimétrica foi observada também a geração de radicais livres (ROS e RNS), sendo que os compostos que mais geraram radicais em ambas as linhas nas primeiras horas de tratamento foram os mais ativos na apoptose, compostos **1, 3** e **5**, além do composto **8**, bastante necrótico. Adicionalmente, através da técnica de *immunoblotting*, determinou-se a quantidade de proteínas citoplasmáticas carboniladas e glicosiladas por meio de reações com anticorpos específicos, geradas após os tratamentos com os compostos, em diferentes tempos de incubação. Novamente observou-se que o composto necrótico **8** gerou a maior quantidade destas proteínas alteradas, em ambas as linhas celulares. Entretanto, observou-se alteração protéica nos

²⁴⁰ G. Cerchiaro, G.A. Micke, M.F.M. Tavares, A.M.D.C. Ferreira, *J. Mol. Catal. A:Chem.* **221** (2004) 29-39.

²⁴¹ G. Cerchiaro, A.C. Sant'ana, M.L.A. Temperini, A.M.D.C. Ferreira, *Vibrat. Spectr.* (2004) submetido.

tratamentos com os compostos **3** e **5**, principalmente ²⁴³. De uma maneira geral, a partir dos resultados até agora obtidos, estes estudos indicam que estes compostos de cobre(II) com ligantes imínicos derivados da isatina apresentam atividade biológica, com um comportamento muito diferente ao afetar a viabilidade celular, indo da total ineficácia a altas toxicidades; e entre estes últimos (causadores de alta taxa de morte celular) pode ser observada uma diferente especificidade, tanto com relação ao tipo de célula quanto ao seu modo de ação, e isso representa o aspecto mais intrigante para um potencial emprego futuro destes compostos na terapia do câncer.

Com estes estudos bioinorgânicos realizados, foi possível um entendimento mais aprofundado de processos catalíticos envolvendo complexos de cobre, necessário para melhor elucidação das diferentes funcionalidades do cobre em organismos vivos, onde desempenha papel crucial na manutenção de processos vitais, mas pode também desencadear reações adversas, invariavelmente com a participação do oxigênio molecular e seus derivados reduzidos.

²⁴² G. Cerchiaro, A.M.D.C. Ferreira, *manuscrito em preparação*.

²⁴³ G. Cerchiaro, K. Aquilano, G. Filomeni, G. Rotilio, M.R. Ciriolo, A.M.D.C. Ferreira, *J. Inorg. Biochem.* (2005) aceito, abril/2005.

244