UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

INTERAÇÕES DE COMPLEXOS DE RÓDIO(II) COM
ALBUMINA HUMANA

BRENO PANNIA ESPÓSITO

TESE DE DOUTORADO
Área: Química Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Renato Najjar

São Paulo

2000

*They gather close to give support
To form a lasting bond
Which carries them from day to day
And into time beyond*

— Richard Buckingham, *Voice of the wolf*

*À minha mãe, Maria de Lourdes,
ao meu pai, Anielo (in memoriam)
e aos irmãos Marco e Marísia.*

SUMÁRIO	4
Agradecimentos	7
Resumo	8
Abstract	9
Abreviaturas	10

INTRODUÇÃO

<i>Uma breve introdução: Metais em Medicina</i>	11
I – COMPLEXOS DE RÓDIO(II)	14
I.1 – DESCRIÇÃO DE ALGUNS COMPLEXOS DE RÓDIO(II)	15
I.1.1 – Carboxilatos de Ródio	
I.1.2 – Amidatos de Ródio	
I.2 – ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPLEXOS DE RÓDIO(II)	26
I.2.1 – Retrospecto	
I.2.2 – Fatores que afetam a atividade biológica dos carboxilatos de ródio	
a) <i>Inibição enzimática da síntese de DNA</i>	
b) <i>Lipofilicidade</i>	
I.2.3 – Biodistribuição e estudos anatomopatológicos	
I.2.4 – Novos complexos de ródio(II)	
a) <i>Novos carboxilatos de ródio e adutos com medicamentos “clássicos”</i>	
b) <i>Inclusão em ciclodextrina</i>	
c) <i>Complexos mistos do tipo $[Rh_2(\mu\text{-OOCR})_2(N\text{-}N)_2Y_2](\text{OOCR})_2$</i>	
d) <i>Formamidinato de ródio(II)</i>	
e) <i>Trifluoroacetamido de ródio</i>	
II – Albumina de Soro Humana (HSA) como Transportadora de Metais	41
II.1 – FUNÇÕES E ESTRUTURA DA ALBUMINA DE SORO HUMANA	42
II.1.1 – Introdução	
II.1.2 – Estrutura primária da Albumina de Soro Humana	
II.1.3 – Estrutura espacial da Albumina de Soro Humana	
a) <i>Estrutura secundária</i>	
b) <i>Estrutura terciária</i>	
II.2 – LIGAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS À HSA	48
II.2.1 – Princípios da ligação de centros metálicos a proteínas	
II.2.2 – Ligação entre íons metálicos e a HSA	
a) <i>Cys34</i>	
b) <i>Seqüência N-terminal</i>	
c) <i>Outros sítios de coordenação</i>	

II.3 – LIGAÇÃO DE METALOFÁRMACOS DO GRUPO DA PLATINA À HSA.....	55
II.3.1 – Complexos antitumorais de platina e a albumina	
II.3.2 – Complexos antitumorais de ouro e a albumina	
II.3.3 – Complexos antitumorais de rutênio e a albumina	
II.3.4 – Complexos antitumorais de ródio e a albumina	

III – OBJETIVOS.....	65

E X P E R I M E N T A L

IV – MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
IV.1 – REAGENTES.....	68
IV.2 – LIGAÇÃO DO $Rh_2(ac)_4$ COM O PLASMA TOTAL.....	70
IV.2.1 – Extração com sal	
IV.2.2 – Eletroforese em gel	
IV.2.3 – Condições experimentais	
IV.3 – ESPECTROFOTOMETRIA.....	73
IV.3.1 – Titulação espectrofotométrica	
IV.3.2 – Cálculo das constantes de afinidade	
IV.3.3 – Condições experimentais	
IV.4 – DICROÍSMO CIRCULAR.....	75
IV.4.1 – Base molecular do poder rotatório	
IV.4.2 – Estimativa da conformação de proteínas a partir de DC	
IV.4.3 – Condições experimentais	
IV.5 – FLUORIMETRIA.....	78
IV.5.1 – Fluorescência de materiais biológicos	
IV.5.2 – Supressão de fluorescência	
IV.5.3 – Condições experimentais	
IV.6 – PARTIÇÃO.....	81
IV.6.1 – Solubilidade dos complexos em <i>n</i> -octanol	
IV.6.2 – Partição com células	
IV.7 – ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DO COMPLEXO $Rh_2(tfc)_4$	83
IV.8 – ESTUDO DE SOBREVIDA.....	84
IV.8.1 – Avaliação do composto HSA— $Rh_2(tfc)_4$	
IV.8.2 – Avaliação do composto $Rh_2(tfc)_4$	
IV.8.3 – Tratamento dos dados	

RESULTADOS E DISCUSSÃO

V – RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
V.1 – LIGAÇÃO DO $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ COM O PLASMA TOTAL	87
V.2 – ESPECTROFOTOMETRIA	90
V.3 – DICROÍSMO CIRCULAR	102
V.4 – FLUORIMETRIA	107
V.5 – PARTIÇÃO	118
V.6 – ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DO COMPLEXO $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$	121
V.7 – ESTUDO DE SOBREVIVÊNCIA	134
VI – CONCLUSÕES	139

APÊNDICES

ESTRUTURAS DOS AMINOÁCIDOS	141
GLOSSÁRIO	142
 BIBLIOGRAFIA	 143
CURRICULUM VITÆ	157

AGRADECIMENTOS

Muitos amigos, colegas que depois viraram amigos, e outros simplesmente conhecidos, contribuíram diretamente para que eu pudesse concluir esta tese. Gostaria de agradecer especialmente às seguintes pessoas, pelo seu auxílio, companheirismo e incentivo:

Os docentes do IQUSP, Adelaide Faljoni-Alário, Ana Maria da Costa Ferreira, Denise de Oliveira Silva, Elisabeth de Oliveira, Iolanda Midea Cuccovia, Maria Terêsa Machini de Miranda, Wladia Viviani, Angelo Gambarini, Frank Herbert Quina, Koiti Araki, Luís Henrique Catalani, Henrique Eisi Toma, Hermi Felinto de Brito, Walter Ribeiro Terra.

Os funcionários do IQUSP, Izaura Nobuko Toma, Margarida Tavityan (Margô), Jorge Luiz Araújo Amaro (B1), Valério de Oliveira, e a turma da Central Analítica.

Os eficientes colegas da efficientíssima Biblioteca do Conjunto das Químicas, Adriana de Almeida Barreiros, Marina Yamashita e Angelo Alves da Cruz.

Os grandes amigos que já estão batalhando mundo afora, Prof. Dr. Aparecido Ribeiro de Souza (UFG), Eric de Souza Gil e Dr. Jorge Fernando Silva de Menezes.

Os companheiros do laboratório, Prof^a. Dr^a. Anna Maria Passos Felicíssimo, Adriana Fernandes Sotelo, Ana Cecília Valderrama Negrón, Marisa Tsao, Neyde Hiroko Takata.

Os generosos amigos do ICB-USP, Dr. Szulim Ber Zyngier e Ana Rita Araújo Gonçalves.

Os colegas da Santa Casa, Dra. Suely Mitoi Ykko Ueda, Dr. Luís Marcelo Osorio Bravo e Dr. Roberto Pinto Paes.

O pessoal do Laboratório de Cromatografia da Fundação Pró-Sangue, Dr. Antonio Carlos Magnanelli e Teresa Maria S. P. Victorio.

O Prof. Dr. Hae Yong Kim (EPUSP) e Leonardo Soriano de Alencar, por me livrarem de inúmeros pequenos apertos durante a redação da tese e o tratamento dos dados.

As agências CNPq e FAPESP, pela bolsa de doutorado e auxílios às nossas linhas de pesquisa.

Meu assessor de doutorado, que não conheci, mas que muito me ajudou com seus conselhos.

E, finalmente, por sempre ter me ajudado, ensinado e animado, gostaria de agradecer especialmente ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Renato Najjar.

RESUMO

Vários complexos de ródio $Rh_2(L)_4$ (L = acetato, propionato, butirato, trifluoroacetato e trifluoroacetamidato) ligam-se à albumina de soro humana (HSA) em relações molares de aproximadamente 8:1. Medidas de dicroísmo circular mostraram que os carboxilatos mais lipossolúveis (butirato e trifluoroacetato) provocaram as maiores alterações na estrutura secundária da HSA. As constantes de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência da HSA por esses complexos também foram maiores para os compostos mais lipofílicos. O amidato lipossolúvel, $Rh_2(tfc)_4$, apresentou supressão intermediária e não provocou alterações estruturais. Isto mostra que é possível projetar metalofármacos antitumorais que se ligam a proteínas de transporte em grande quantidade, sem provocar alterações estruturais importantes. Esses complexos tiveram também suas afinidades em relação à HSA determinadas por espectrofotometria, observando-se no caso dos alquilcarboxilatos uma correlação inversa com suas lipossolubilidades, o que sugere uma competição entre coordenação axial ao metal e interação hidrofóbica do ligante. A difusão dos complexos livres ou ligados à proteína para células de Ehrlich *in vitro* parece primordialmente governada pelo caráter hidrofóbico do complexo. O complexo $Rh_2(tfc)_4$ apresentou afinidade pela proteína ($K = 214,1$), além de partição celular tanto em ausência (32,1%) como na presença (48,6%) de HSA. Desta forma, o composto HSA: $Rh_2(tfc)_4$ teve sua ação antitumoral investigada em camundongos Balb-c portadores de ascite de Ehrlich, mostrando que a HSA pode ser um reservatório para o complexo de ródio.

ABSTRACT

Various divalent rhodium complexes $\text{Rh}_2(\text{L})_4$ (L = acetate, propionate, butyrate, trifluoroacetate and trifluoroacetamidate) have been found to bind to non-defatted human serum albumin (HSA) at molar ratios about 8:1. The circular dichroism measurements showed that the more liposoluble carboxylates butyrate and trifluoroacetate caused the major alterations of the secondary structure of HSA. Stern-Volmer constants for the fluorescence quenching by these complexes were also higher for the lipophilic metal compounds. In the case of the rhodium carboxylates it was observed that their denaturing and quenching properties could be explained in terms of their liposolubilities: the higher their lipophilic characters, the higher their abilities to penetrate inside the protein framework leading to structural alterations, and the closer they could get to the Trp214 residue causing fluorescence quenching. The liposoluble amidate complex $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$, presented an intermediate quenching and did not cause structural alterations in the protein, presumably not penetrating inside the peptidic backbone. This shows that it is possible to design new antitumor metal complexes which bind to a large extent to a transporter protein causing little structural damage. The affinities for human albumin of these five rhodium(II) complexes were determined by spectrophotometry. In the case of the alkylcarboxylates, an inverse correlation of affinity with their liposolubilities was observed. Diffusion of the free or protein-bound complexes into Ehrlich cells *in vitro* seems to be primarily governed by the hydrophobic character of the complex. The complex $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ exhibited considerable affinity towards the protein ($K = 214.1$) as well as cell partition both in the absence (32.1%) and presence (48.6%) of HSA. The compound $\text{HSA}:\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ has had its antitumoral action in tumor-bearing Balb-c mice investigated, showing that HSA can be a drug reservoir for the rhodium complex.

ABREVIATURAS

2-ME	2-mercaptoetanol (ou β -mercaptoetanol), HO—CH ₂ CH ₂ —SH
Bis	<i>N,N'</i> -metilenobisacrilamida
BSA	<i>bovine serum albumin</i> ; albumina de soro bovina
DC	dicroísmo circular
FAD/FADH ₂	flavina adenina dinucleotídeo (oxidada/reduzida)
HSA	<i>human serum albumin</i> ; albumina de soro humana
MeCN	acetonitrila, CH ₃ CN
Me ₂ SO	dimetil-sulfóxido, (CH ₃) ₂ SO
NAD ⁺ /NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada/reduzida)
py	piridina, C ₆ H ₅ N
Rh ₂ (ac) ₄	<i>tetrakis</i> (μ -O,O-acetato) de dirródio(II), Rh ₂ (CH ₃ COO) ₄ ¹
Rh ₂ (but) ₄	<i>tetrakis</i> (μ -O,O-butirato) de dirródio(II), Rh ₂ (CH ₃ CH ₂ CH ₂ COO) ₄
Rh ₂ (pr) ₄	<i>tetrakis</i> (μ -O,O-propionato) de dirródio(II), Rh ₂ (CH ₃ CH ₂ COO) ₄
Rh ₂ (tfa) ₄	<i>tetrakis</i> (μ -O,O-trifluoroacetato) de dirródio(II), Rh ₂ (CF ₃ COO) ₄
Rh ₂ (tfc) ₄	<i>tetrakis</i> (μ -O,N-trifluoroacetamidato) de dirródio(II), Rh ₂ (CF ₃ CONH) ₄
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis</i> , eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilenodiamina

---

¹ Em princípio, todos os complexos de ródio apresentados, quando em solução, devem estar com as posições axiais L ocupadas por moléculas do solvente bastante lábeis (v. Figura 1.1); mais rigorosamente, esses complexos deveriam ser representados pela fórmula geral Rh₂(ponte)₄(L)₂. Omitimos, porém, as moléculas do solvente para simplificar as notações.

Uma breve introdução: Metais em Medicina

A investigação das aplicações médicas de complexos metálicos é uma das áreas que mais tem crescido dentro da química inorgânica contemporânea, conduzindo o pesquisador ao “melhor de dois mundos”: o da química polivalente, rica e colorida dos metais de transição, e o dos intrincados e fascinantes mecanismos bioquímicos de controle e manutenção da vida. É o que está contido na definição da moderna química bioinorgânica.

A figura abaixo mostra onde os complexos metálicos são usados e/ou estudados para as aplicações médicas. Há numerosas revisões na literatura, abrangendo as conquistas mais recentes [Yang e Guo, 1999; Sadler *et al.*, 1999; Schwietert e McCue, 1999; Kratz e Schutte, 1998], algumas delas em língua portuguesa [Fontes *et al.*, 1997; Najjar, 1992], apenas para citar alguns exemplos.

Algumas das áreas-chave da química inorgânica médica [Guo e Sadler, 1999].

As aplicações atuais mais importantes dos metalofármacos, conforme compilação de Guo e Sadler (1999), seriam:

- ◇ **Agentes de contraste para ressonância magnética:** Complexos de Gd^{+3} , Mn^{+2} ou Fe^{+2} .
- ◇ **Radiofármacos:** Especialmente, derivados de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, forte emissor de radiação γ , que é tipicamente empregado para diagnose clínica. Outros radionuclídeos são pes-

quisados, especialmente ^{111}In , ^{67}Ga , ^{51}Co , ^{51}Cr e ^{169}Yb para diagnose, e ^{89}Sr , ^{153}Sm e ^{186}Re para terapia.

- ◇ **Antiinfectivos:** Ag e seus compostos, embora não se compreenda exatamente o mecanismo das suas citotoxicidades. Complexos de Sb são empregados no tratamento de leishmaniose.
- ◇ **Miméticos da superóxido dismutase (SOD):** Essa enzima é uma das responsáveis pela desativação do radical livre O_2^- , o qual, segundo se acredita, está envolvido na gênese de diversas doenças degenerativas (Mal de Parkinson ou de Alzheimer). A SOD, entretanto, não é adequada para uso terapêutico. Alguns complexos porfirínicos e outros macrocíclicos de Mn e Fe têm sido postulados para a eliminação do excesso de superóxido e de outros radicais livres do organismo.
- ◇ **Miméticos da insulina:** Complexos de V (vanadatos ou vanadilas) podem mimetizar a ação da insulina (estimular a absorção e oxidação da glicose, bem como a síntese de glicogênio), podendo ser ferramentas úteis no tratamento de diabetes.
- ◇ **Vasodilatadores:** Por ora, apenas o complexo de Fe^{+2} *nitroprussiato de sódio*, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ tem uso clínico. Complexos de Ru têm sido propostos.
- ◇ **Terapia fotodinâmica:** Envolve o uso de um fotossensibilizador (complexo metálico) e irradiação com luz visível, para promover um efeito tóxico sobre determinadas células ou tecidos. Há um complexo de Lu que apresenta alta fotossensibilização, atualmente em triagens clínicas.
- ◇ **Antiulcígenos:** Complexos de Bi têm sido empregados habitualmente no tratamento de úlceras e gastrites.
- ◇ **Antiartrícos:** Empregados clinicamente em casos difíceis de artrite reumatóide. Comumente são compostos de ouro(I), como a *auranofina*.
- ◇ **Antidepressivos:** Sais de Li são reconhecidamente de valor no tratamento de psicoses maníaco-depressivas, embora seu mecanismo de ação não seja totalmente compreendido.
- ◇ **Antitumorais:** Principalmente derivados da Pt^{+2} e Pt^{+4} , são dos quimioterápicos de câncer mais empregados no mundo atualmente. Derivados de Au, Ru, Ti, Ge e Rh também têm sido propostos. Vamos voltar a este tópico várias vezes no decorrer desta Introdução.

Caberia lembrar ainda os estudos que se fazem a respeito de:

- Desintoxicação por metais pesados, como o caso do Hg utilizado ns garimpos;

- Complementação alimentar: como suprir o organismo de deficiências de metais que sejam essenciais;
- *Design* de ligantes com alta afinidade por metais que, em alguns casos, poderiam inibir o sítio ativo de metaloenzimas super-expressadas em situações de doença.

E, afora as considerações acima, cabe lembrar que os sistemas metálicos com aplicações médicas têm se transformado em um lucrativo segmento do mercado [Sadler, 1997].

I – COMPLEXOS DE RÓDIO (II)

*“A metal is not just a metal: it is a metal plus its ligands.
The metal ion and its ligands determine the biological activity”
— Sadler, 1997*

I.1 – DESCRIÇÃO DE ALGUNS COMPLEXOS DE RÓDIO(II)

I.1.1 – Carboxilatos de Ródio

Desde que Rosenberg *et al.* (1965) descobriram a ação de espécies de platina sobre o crescimento de bactérias, com a subsequente aprovação da *cisplatina* como quimioterápico para tumores na cabeça, pescoço e testículos, vários outros compostos metálicos foram sintetizados, perseguindo-se efeitos semelhantes. Esses mesmos autores relataram que dois compostos de ródio, o RhCl_3 e o $(\text{NH}_4)_3\text{RhCl}_6$, também eram tão eficientes quanto os compostos platínicos para induzir o crescimento filamentoso (indicativo da inibição da divisão celular) em *Escherichia coli* em concentração de 8 ppm por 2 horas. Nessas condições, o complexo $[\text{Rh}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$ provocava morte das bactérias, e os isômeros *cis* e *trans* do $[\text{Rh}(\text{en})_2\text{Cl}_2]\text{NO}_3$ não produziam alterações significativas. Gillard (1971) descreveu os efeitos inibitórios do complexo *trans*-diclorotetrakispiridina-ródio(III). Outros complexos de Rh(III) do tipo *trans*- $[\text{RhL}_4\text{X}_2]\text{Y}$ (onde L = piridina ou piridina substituída; X = Cl^- ou Br^- ; Y = Cl^- , Br^- , NO_3^- ou ClO_4^-) apresentavam atividade antibacteriana bastante relacionada com seus potenciais redox.

Na esteira dos complexos platínicos, vários sistemas foram propostos, sendo um deles os *carboxilatos de ródio(II)*. Sua ação biológica será descrita com mais detalhes no item I.2.

A Figura 1.1 apresenta a estrutura em “gaiola” dos carboxilatos de ródio. Esses complexos possuem dois átomos de ródio no estado de oxidação formal +2, unidos por quatro ligantes-ponte carboxilatos nas posições equatoriais e por uma ligação simples Rh-Rh. Nas posições axiais, vários ligantes L podem se coordenar, bem como moléculas do solvente, normalmente através de átomos de oxigênio ou nitrogênio, formando adutos de maneira reversível.

A síntese e caracterização dos carboxilatos de ródio com um grande número de ligantes L foi alvo de revisões clássicas [Felthouse, 1982; Boyar e Robinson, 1983]. Esses complexos foram estudados principalmente por espectroscopia eletrônica (UV-visível), vibracional (infravermelho e Raman), ressonância magnética nuclear, ressonância paramagnética de elétron, difração de raios-X, susceptibilidade magnética, potenciometria e análise térmica. Essas revisões incluem também o estudo das reações de formação de adutos, de troca dos ligantes equatoriais e da destruição da “gaiola”.

Figura 1.1: Estrutura genérica em “gaiola” de um carboxilato de ródio(II). A posição axial *L* normalmente está ocupada por uma molécula de solvente ou outra qualquer que possua átomos coordenantes disponíveis, quando em solução, ou por átomos de oxigênio do ligante carboxilato de uma molécula de complexo vizinha, quando em estado sólido, formando arranjos cristalinos.

Além dos carboxilatos de ródio, muitos outros complexos diméricos de Rh com ligantes-ponte tipo O,O, N,N ou S,O foram sintetizados e descritos, dado que são sistemas interessantes do ponto de vista da química das ligações metal-metal e, em alguns casos, apresentam atividade catalítica [Hannon, 1997; Housecroft, 1992 a 1996].

Vamos detalhar, a seguir, as propriedades físicoquímicas de uma dessas classes de novos diméricos, pelas quais nos interessamos anteriormente [Espósito, 1997], os *amidatos de ródio*.

I.1.2 – Amidatos de Ródio

Complexos diméricos de Rh(II), nos quais seja possível modular a força e a simetria do campo ligante equatorial, têm sido sintetizados na tentativa tanto de se elucidar aspectos da química da ligação metal-metal, como de conferir novas propriedades ao sistema, visando aplicações catalíticas e/ou farmacológicas. A escolha do tipo e do número de ligantes equatoriais permite o controle do primeiro potencial de oxidação e das propriedades da ligação axial do complexo [Bear, 1986].

O grupo de J. L. Bear foi o introdutor de complexos mistos de carboxilatos e amidatos de ródio, de fórmula geral

onde $n = 0$ a 4 , $R' = \text{H}$ ou C_6H_5 , $R = \text{CH}_3$, CF_3 ou H . As posições axiais L podem estar ocupadas por vários ligantes (Figura 1.2) [Bear, 1986]. Nesses complexos, o ligante-ponte é um amidato, ou seja, um dos átomos de oxigênio que fazem a ponte com um átomo de ródio é trocado por um grupo NH , o que altera tanto a simetria da molécula como suas propriedades químicas e espectrais. Os amidatos acima citados são obtidos através da reação entre $\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4$ e a respectiva amida em excesso, fundida a temperaturas tipicamente ao redor de $120 - 160^\circ\text{C}$. Quatro tetra-amidatos de ródio foram descritos na literatura, a saber: *N-fenilacetamidato*, $\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{CONC}_6\text{H}_5)_4$ [Duncan *et al.*, 1982]; *trifluoroacetamidato*, $\text{Rh}_2(\text{CF}_3\text{CONH})_4$ [Dennis *et al.*, 1982b]; *acetamidato*, $\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{CONH})_4$ [Zhu *et al.*, 1984] (e paralelamente por Baranovskii e Sevast'yanova, 1984 e Shchelokov *et al.*, 1984), e *benzamidato*, $[\text{Rh}_2(\text{C}_6\text{H}_5\text{CONH})_4](\text{py})_2$ [Chakravarty *et al.*, 1985]. A substituição passo-a-passo dos ânions CH_3COO^- pelos RNCOR'^- pode conduzir aos produtos de reação mono-, di-, tri- e tetra-substituídos, com seus isômeros geométricos (Figura 1.2), que podem ser separados por HPLC (Figura 1.3).

Figura 1.2: Estruturas dos 12 isômeros geométricos possíveis para os quatro produtos de substituição dos amidatos de ródio (II). IId e IIIa também têm isômeros óticos [Duncan *et al.*, 1982].
R, R' = CH₃, C₆H₅ (N-fenilacetamidato); CF₃, H (trifluoroacetamidato) ou CH₃, H (acetamidato).

Figura 1.3: Cromatogramas exibindo os vários isômeros e produtos da reação de $\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4$ com acetamida (a), trifluoroacetamida (b) e N-fenilacetamida (c).
a: **0** $\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4$, e os produtos de mono- (I), di- (II), tri- (III) e tetra- (IV) substituição. No destaque, separação da banda II com razão de fluxo menor, exibindo a formação de 3 isômeros di-substituídos [Ahsan *et al.*, 1986];
b: **1 - 4** são os diferentes isômeros tetra-substituídos. **2** é o isômero (2,2-*cis*) [Dennis *et al.*, 1983];
c: **1** $\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4$, e os produtos de mono- (**2**), di- (**3** e **4**), tri- (**5** e **6**) e tetra- (**7** e **8**) substituição [Lifsey *et al.*, 1987].

Na prática, observa-se que nem todos os isômeros possíveis são obtidos. Ahsan *et al.* (1986) determinaram a estrutura cristalina do complexo $[\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{CONH})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, verificando que apenas o isômero que apresenta dois átomos de nitrogênio em *cis* ligados em cada átomo de ródio é formado (corresponde a IVa na Figura 1.2). Apenas um isômero tri-substituído foi obtido, o IIIa (de três possíveis), e três dos quatro possíveis isômeros di-substituídos (IIa, IIc e IId). Para o trifluoroacetamido, o isômero IVa forma-se preferencialmente (94%), embora os outros isômeros também estejam presentes [Dennis *et al.*, 1983].

Postula-se que a seletividade observada na formação dos isômeros seja função do efeito diretivo/labilizante da primeira amida que se liga equatorialmente. Para a ordem de entrada dos ligantes equatoriais no acetamido de ródio, vale a regra empírica de que o nitrogênio do íon amidato que entra não pode se ligar *trans* a nenhum outro nitrogênio, sobre o mesmo átomo de ródio [Ahsan *et al.*, 1986].

Os amidatos de ródio(II) têm os seus primeiros potenciais de oxidação em valores tais que, na melhor das hipóteses, alcançam o nível mínimo dos potenciais de oxidação dos carboxilatos de ródio (Figura 1.4), o que pode ser resultado tanto da maior sensibilidade do HOMO à simetria e força do campo ligante do amidato, como de um aumento da energia dos orbitais de caráter metálico, devido à menor eletronegatividade do íon amidato. Isso tem interesse para o eletroquímico, que pode modular os valores de $E_{1/2}$ na faixa aproximadamente entre 0,0 V — 1,0 V pela troca seletiva de ligantes equatoriais do tipo carboxilato para amidato, bem como potenciais entre 1,0 — 1,5 V pela substituição dos grupos R dos carboxilatos [Bear *et al.*, 1984]. A Tabela I.1 resume algumas propriedades dos complexos de ródio(II).

Figura 1.4: Esquema dos potenciais de primeira oxidação dos carboxilatos e amidatos de ródio(II) (adaptado de Bear *et al.*, 1984).

Tabela I.1: Algumas propriedades dos amidatos de ródio(II) e carboxilatos de ródio(II) selecionados.

Complexo	L (átomo coord.)	Isômero ^a	Rh-Rh (Å)	Ângulo de mordedura (graus) ^b	Rh-L (Å)	E _{1/2} (V) ^c	λ máx (nm) (trans, Rh-Rh)	Referência
<u>Amidatos de ródio</u>								
Rh ₂ (CF ₃ CONH) ₄	py (N)	IVa ^d	2,472	128,5 ^h	2,29	1,09 (MeCN)	538 (MeOH) 488 (MeCN)	Kadish <i>et al.</i> , 1982 Dennis <i>et al.</i> , 1983 Zoroddu e Dallochio, 1989 Best <i>et al.</i> , 1989
	trim ^e (N)	IVc					ca. 510 (MeOH)	
	pyt ^f (N)	IVc					ca. 540 (MeOH)	
	PPh ₃					0,34 ⁱ	440 (CH ₂ Cl ₂)	
	AsPh ₃ (As)					n.d.	444 (CH ₂ Cl ₂)	
Rh ₂ (CH ₃ CONC ₆ H ₅) ₄	SbPh ₃ (Sb)					n.d.	444 (CH ₂ Cl ₂)	
		IVa				0,55 (CH ₂ Cl ₂) 0,40 (Me ₂ SO)	668 (CH ₂ Cl ₂) 530 (Me ₂ SO)	Bear <i>et al.</i> , 1984 Lifsey <i>et al.</i> , 1987
	Me ₂ SO (S)	IVc				0,34 (MeCN)	700 (CH ₂ Cl ₂)	
	Me ₂ SO (S)	IVa	2,448	122,2	2,395	0,60 (CH ₂ Cl ₂) 0,41 (Me ₂ SO)	585 (Me ₂ SO)	
	Me ₂ SO (S)	IVc ^g	2,397	123,7	2,586			
Rh ₂ (CH ₃ CONH) ₄						0,15 (MeCN)	500 (MeCN)	Zhu <i>et al.</i> , 1984 et al., 1986 Best <i>et al.</i> , 1989
	H ₂ O (O)	IVa	2,415	122,2 ^h	2,073 ^h			
	PPh ₃					-0,20 ⁱ	467 (CH ₂ Cl ₂)	
	AsPh ₃ (As)	IVa	2,471	124,5 ^h	2,540	-0,09 ⁱ	435 (CH ₂ Cl ₂)	
	SbPh ₃ (Sb)					-0,05 ⁱ	510 (CH ₂ Cl ₂)	

Tabela I.1 (cont.)

$\text{Rh}_2(\text{C}_6\text{H}_5\text{CONH})_4$	SbPh_3 (Sb) py (N) $\text{C}_6\text{H}_5\text{CONH}_2$ (?) PPh_3	IVa IVa IVa	2,463 2,437 2,463 2,437	123,8 ^b 124,6 ^b	2,681 2,227	508 (CH_2Cl_2) 460 (o) (CH_2Cl_2) 488 (Me_2CN) 440 (Me_2SO) 563 (THF) 445 (o) (CH_2Cl_2)	Chakravarty et al., 1985
Carboxilatos de ródio							
$\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4$	H_2O (O) Me_2SO (S) py (N) EtOH (O)	 n.d.	2,385 2,406 2,3994 2,3855	124,8	2,310 2,451 2,227	1,02 (H_2O) 1,17 (Me_2CN) 584 - 600 (H_2O) 497 (Me_2SO)	Das et al., 1978 Bovar e Robinson, 1983 Zhu et al., 1984
$\text{Rh}_2(\text{CF}_3\text{COO})_4$	Me_2SO (O) EtOH (O)	 n.d.	2,419 2,396	128,7	2,236 2,28		Kadish et al., 1982 Bovar e Robinson, 1983
$\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO})_4$	Me_2SO (S) py (N)	 n.d.	2,407 2,3963		2,449 2,227	0,99 (H_2O)	Bovar e Robinson, 1983 Chakravarty et al., 1985

a v. Figura 1.2

b ângulo O-C-N (amídiatos) ou O-C-O (carboxilatos)

c para a oxidação $\text{Rh}^{\text{III}}/\text{Rh}^{\text{IV}} \rightarrow \text{Rh}^{\text{IV}}/\text{Rh}^{\text{V}}$ do complexo sem ligantes axiais, versus Eletrodo de Calomelano Saturado

d produto maioritário (~ 94%), outros isômeros também são obtidos

e $\text{t}_{\text{lin}} = 2,4$ -diamino-5-(3',4',5'-trimetoxibenzil)pirrimidinaf $\text{pyr} = 2,4$ -diamino-5-(4-clorofenil)-6-etilpirrimidinag apenas 1 Me_2SO

h média

i versus eletrodo ferroceno/ferrocênio

O espectro eletrônico na região visível do $\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{CONC}_6\text{H}_5)_4$ apresenta quatro bandas, sendo a de $\lambda_{\text{máx}}$ sensível à natureza do ligante axial. No $\text{Rh}_2(\text{CF}_3\text{CONH})_4$ e no $\text{Rh}_2(\text{C}_6\text{H}_5\text{CONH})_4$, em contraste, observam-se apenas duas bandas nessa região, sendo igualmente as de $\lambda_{\text{máx}}$ sensíveis ao grupo L (Tabela I.1). Bear *et al.* (1984) sugerem que essa banda corresponderia a uma transição envolvendo um orbital $\sigma_{\text{Rh-Rh}}$, que interagiria fortemente com o ligante axial. Para os carboxilatos de ródio, assume-se a configuração $\sigma^2 \pi^4 \delta^2 \delta^*{}^2 \pi^*{}^4$ (onde vemos que a molécula pode estabelecer ligações tanto σ como π — aceitando elétrons no orbital vazio $\sigma^*_{\text{Rh-Rh}}$ e/ou doando elétrons do orbital preenchido $\pi^*_{\text{Rh-Rh}}$), e as suas duas bandas eletrônicas na região do visível, *ca.* 400 nm e *ca.* 600 nm, são atribuídas às transições $\pi_{\text{Rh-O}} \rightarrow \sigma^*_{\text{Rh-O}}$ e $\pi^*_{\text{Rh-Rh}} \rightarrow \sigma^*_{\text{Rh-Rh}}$, respectivamente² [Cotton *et al.*, 1988]. Embora superficialmente semelhantes aos espectros observados nos amidas, Chakravarty *et al.* (1985) notam que não seria justificável uma atribuição análoga das transições, uma vez que metade das ligações Rh-O são substituídas por Rh-N nos amidas, e a simetria destes complexos é diminuída de D_{4h} para C_{2h} . Mesmo assim, tanto Kaldish *et al.* (1982) como Zoroddu e Dallochio (1989) irão sugerir que, no caso do trifluoroacetamido, a banda de menor energia seja devida à transição $\pi^* \rightarrow \sigma^*$ e a banda *ca.* 400 nm a algum tipo de transição $\pi^* \rightarrow \sigma^*_{\text{Rh-O}}$ ou $\sigma^*_{\text{Rh-N}}$.

Baranovskii e Sevast'yanova (1984) apresentaram as seguintes bandas (cm^{-1}) do espectro infra-vermelho do complexo $\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{CONH})_4$ (e suas atribuições): 3360 (ν_{NH}), 1587 (ν_{CO} ou ν_{CN}), 1214 e 1192 ($\nu_{\text{acetamida}}$), 929 (ν_{CC}), 696 (δ_{NH}), 606 e 587 (δ_{NCO}), 383 e 367 (provavelmente $\nu_{\text{Rh-O}}$ ou $\nu_{\text{Rh-N}}$). Chakravarty *et al.* (1985) relataram analogamente bandas de infra-vermelho para o complexo $[\text{Rh}_2(\text{C}_6\text{H}_5\text{CONH})_4](\text{C}_6\text{H}_5\text{CONH}_2)_2$ em 3360 (ν_{NH} do benzamido equatorial), e 1635 e 1650 cm^{-1} , atribuíveis às benzamidas axiais (se bem que não tenha sido possível determinar por qual átomo da benzamida estaria ocorrendo a ligação axial).

Foram feitos estudos da influência relativa da habilidade σ -doadora e π -receptora do ligante-ponte e dos coordenantes axiais sobre os potenciais de oxidação, estrutura e estiramento Rh-Rh (por espectroscopia Raman) para os complexos $\text{Rh}_2(\text{ponte})_4(\text{L})_2$, onde ponte = acetato, acetamido ou trifluoroacetamido e L = AsPh_3 , SbPh_3 ou PPh_3 [Best *et al.*, 1989; Best *et al.*, 1990]. Quanto mais forte o caráter σ -doador destas fosfinas, mais fraca torna-se a ligação Rh-Rh, pelo acréscimo de densidade eletrônica em orbitais σ^* da unidade Rh-Rh. ($\nu_{\text{Rh-Rh}}$; L = PPh_3 < $\nu_{\text{Rh-Rh}}$; L = SbPh_3). Talvez por motivos semelhantes, o au-

² A atribuição da transição *ca.* 600 nm já foi alvo de alguma controvérsia. Miskowski *et al.* (1984) consideravam-na $\pi^*_{\text{Rh-Rh}} \rightarrow \sigma^*_{\text{Rh-O}}$.

mento da basicidade do ligante equatorial igualmente enfraquece a ligação metal-metal ($V_{Rh-Rh} ; \text{ponte} = \text{amidato} < V_{Rh-Rh} ; \text{ponte} = \text{carboxilato}$).

Em conformidade com os dados de eletroquímica, que mostram essa maior facilidade de oxidação dos amidatos de ródio, e das considerações a respeito do estiramento Rh-Rh acima mencionadas, estudos de espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (ESCA) mostraram que a adição de cada acetamidato diminui a força da ligação Rh-Rh em $\sim 0,25$ eV, que passa de 308,8 eV no acetato para 308,0 eV no acetamidato (erro experimental: $\pm 0,1$ eV). Essas observações sugerem que o tetra-acetamidato de ródio deva ser um complexo com melhores características π -doadoras (e pior σ -receptoras) que o tetra-acetato, com respeito à ligação axial. De fato, por exemplo, a ligação Rh-S no complexo misto tri-substituído $[Rh_2(CH_3COO)(CH_3CONH)_3(Me_2SO)_2] \cdot 2H_2O$ é 0,038 Å menor do que aquela no correspondente tetra-acetato, mesmo não sendo o Me_2SO o melhor ligante π -receptor disponível [Ahsan *et al.*, 1986]. Entretanto, Best *et al.* (1989) combateram essa proposta ao sugerirem que, pelas semelhanças em V_{Rh-Rh} observadas para diversos L, a ligação Rh-L seria insensível às propriedades σ e π do ligante-ponte.

Além do aumento da densidade eletrônica no centro metálico, existem outros fatores que devem ser considerados na avaliação das estruturas dos amidatos de ródio, como o *ângulo de mordedura* do ligante equatorial (O-C-Y, onde Y = O ou NH para os carboxilatos ou amidatos de ródio, respectivamente), e os *efeitos estéricos* introduzidos pela presença de substituintes no átomo de nitrogênio. Os amidatos até hoje descritos ainda não permitem, por exemplo, determinar até que ponto a distância na ligação Rh-Rh é função apenas de efeitos eletrônicos, ou é imposta pela geometria do ligante-ponte. A substituição do CH_3 por CF_3 no acetamidato e no acetato de ródio provoca um aumento nesse ângulo de aproximadamente 5° e um aumento na distância Rh-Rh (Tabela I.1). Além disso, comparando-se alguns dados estruturais dos complexos $[Rh_2(C_6H_5CONH)_4(py)_2]$ e $[Rh_2(CF_3CONH)_4(py)_2]$, observa-se que a distância Rh-Rh é 0,035 Å maior para o último, o que poderia ser atribuído à maior basicidade do benzamidato. Contudo, isso também implicaria em que a ligação Rh- N_{py} fosse maior para o $[Rh_2(C_6H_5CONH)_4(py)_2]$, posto que o complexo dimérico seria menos eletrofílico, e o que se observa é justamente o oposto (Tabela I.1). Portanto, parece claro que temos um complexo jogo de efeitos eletrônicos e estéricos determinando as características estruturais dos amidatos, efeitos estes ainda não completamente elucidados [Chakravarty *et al.*, 1985].

A reação em meio fundido entre a N-fenilacetamida e o acetato de ródio conduz a dois isômeros tetra-substituídos, em porcentagens semelhantes (Figura 1.3) [Lifsey *et al.*, 1987]. O mecanismo postulado para a formação dos tetra-amidatos de ródio envolve uma

ligação axial entre a amida que entra e o acetato de ródio, prévia à substituição equatorial, e direcionada por eventuais amidas já estabelecendo a ponte entre os dois centros metálicos. Em uma primeira análise, portanto, se esperaria que essa ligação axial inicial fosse sensível a quaisquer efeitos estéricos. A introdução de um grupo C_6H_5 volumoso no nitrogênio da amida conduziu de fato à formação de duas espécies tetra-substituídas, o que nos mostra que a regra empírica de previsão de isômeros, formulada para o acetamidato, não é completa. O isômero IVc do N-fenilacetamidato (Figura 1.2) pode ligar apenas uma molécula de Me_2SO na posição axial (ao contrário do isômero IVa, que liga duas), justamente no átomo de ródio estericamente mais acessível.

I.2 – ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPLEXOS DE RÓDIO(II)

I.2.1 – Retrospecto

Hughes *et al.* (1972) observaram que o acetato de ródio (Figura 1.1, R = CH₃) apresentava um efeito sinérgico sobre as taxas de sobrevivência de camundongos implantados com células L1210 quando administrado em combinação com arabinosilcitosina (embora isoladamente não fosse ativo contra esse tumor, como ocorria na ascite de Ehrlich [Erck *et al.*, 1974]). Esse composto provocava também aumento de sobrevivência em camundongos portadores de ascite de Ehrlich, leucemia P388 e, em alguns casos, completa remissão do tumor [Boyar e Robinson, 1983]. Desde então, inúmeros estudos da atividade biológica e do comportamento químico dessa classe de complexos foram realizados, em busca de uma melhor compreensão dos fatores que afetariam sua ação antitumoral. Na década de 80, surgiram três importantes revisões na literatura, cobrindo exaustivamente os trabalhos realizados [Felthouse, 1982; Boyar e Robinson, 1983; Bear, 1986]. Esta última revisão merece destaque, por ter sido escrita pelo introdutor dos estudos de atividade biológica dos carboxilatos de ródio(II), onde resume os principais resultados do seu grupo e sugere novas diretrizes para a síntese de complexos análogos. Curiosamente, é a última referência desse autor sobre tal assunto.

Vários carboxilatos de ródio foram empregados em testes de sobrevivência (acetato, propionato, butirato, pentanoato, hexanoato, decanoato, metoxiacetato, etoxiacetato, trimetoxibenzoato, etoxipropionato, cetopentanoato, ciclopropionato, *para*-etoxibenzoato, 4-metil-2-oxopentanoato e 2-furanoato). Destes, apenas o propionato, o butirato, o pentanoato e o cetopentanoato provocam grande porcentagem do aumento de sobrevivência (%ILS, *increased life span*³) contra ascite de Ehrlich, sarcoma 180 e ascite P388. Todos os outros são ou muito insolúveis em salina, ou altamente tóxicos, ou menos ativos contra P388 e Ehrlich do que o acetato de ródio [Bear, 1986]. A Tabela I.2 mostra os resultados de atividade biológica, bem como as doses letais para 10% da população de animais (DL₁₀) para alguns desses complexos. Vemos que o butirato de ródio apresenta os maiores valores de aumento de sobrevivência, embora seja também o mais tóxico da série, o que se reflete no índice terapêutico praticamente idêntico ao do propionato de ródio.

---

³ Para a definição dos parâmetros farmacológicos, vide “Glossário”.

Tabela I.2: Estudos de sobrevivência com camundongos suíços albinos portando tumor ascítico de Ehrlich (adaptado de Bear *et al.*, 1975).

Complexo	DL ₁₀ (μmol.kg ⁻¹)	Dose administrada (μmol.kg ⁻¹ .dia ⁻¹ ; 6 dias)	% Aumento de sobrevida	Índice terapêutico
Acetato de ródio	43	67,8	78	1,8
		33,9	88	
		22,6	44	
Propionato de ródio	5,4	8,04	—	4,2
		5,02	143	
		2,01	149	
		1,00	17	
Butirato de ródio	1,25	3,61	—	4,7
		1,80	132	
		1,08	197	
		0,54	173	
		0,18	3	

Os carboxilatos de ródio reagem estavel mas reversivelmente pela posição axial da ligação Rh-Rh com substratos biológicos contendo grupos amino desprotonados em pH fisiológico: adenina, nucleotídeos, polinucleotídeos, DNA fita simples, RNase A, BSA e alguns aminoácidos (especialmente His e Met; v. Seção IV.3.1). Compostos sulfidrílicos como a glutationa e a cisteína, provocam a quebra da estrutura em “gaiola” e ligam-se irreversivelmente ao Rh [Felthouse, 1982; Boyar e Robinson, 1983].

No seu estudo de inibição de enzimas contendo grupos SH essenciais, Howard *et al.* (1976) observaram que a cisteína causa a quebra da estrutura dos carboxilatos de ródio. Pneumatikakis e Psaroulis (1980) estudaram os produtos de reação do acetato de ródio com aminoácidos contendo sulfidrilas livres (L-cisteína, L-cisteína-metiléster e L-penicilamina) ou aciladas (os tioéteres S-metilcisteína, S-etilcisteína e metionina). No primeiro caso, observaram a formação de quelatos (S,N) de Rh(II) mononucleares, caracterizados por microanálise elementar, susceptibilidade magnética e espectroscopias infravermelha, eletrônica e de ressonância de spin (ESR). No segundo caso, através das mesmas técnicas, esses autores observaram a formação de adutos do tipo Rh₂(CH₃COO)₄(tioéter)₂, sem a quebra da ligação Rh-Rh.

Variando-se o comprimento da cadeia do ligante equatorial em Rh₂(O₂CR)₄ (R = CH₃, CH₃OCH₃ e CH₂CH₃), Das e Bear (1976) já haviam mostrado que a ordem de estabilidade dos complexos 1:1 e 1:2 (carboxilato de ródio : imidazol) era propionato > acetato > metoxiacetato (ΔH_1 = -8,65; -7,43 e -7,3 kcal.mol⁻¹, respectivamente, e ΔH_2 = -5,3; -3,0 e -3,0 kcal.mol⁻¹, respectivamente). Essas diferenças, porém, são pequenas para justificar a diferença de atividades biológicas dos carboxilatos de ródio(II) [Das *et al.*, 1977]. A magni-

tude das variações das velocidades de formação de adutos entre propionato, acetato e metoxiacetato de ródio (II) com His⁴ e imidazol também são relativamente pouco pronunciadas (Tabela I.3), indicando que a mudança do ligante equatorial tem pouco efeito sobre a perda de moléculas de solvente na posição axial.

Tabela I.3: Constantes cinéticas de formação de adutos entre alguns carboxilatos de ródio(II) com histidina ou imidazol (adaptado de Das *et al.*, 1977)

	His (<i>k</i> , M ⁻¹ s ⁻¹)	Imidazol (<i>k</i> , M ⁻¹ s ⁻¹)
Acetato de Rh	3,6 x 10 ⁵	7,1 x 10 ⁶
Propionato de Rh	5,6 x 10 ⁵	7,4 x 10 ⁶
Metoxiacetato de Rh	4,0 x 10 ⁵	6,2 x 10 ⁶

Postulou-se também que as atividades biológicas diferenciadas dos carboxilatos de ródio(II) poderiam resultar de diferentes taxas de troca dos ligantes equatoriais (RCOO⁻) por grupos ligantes do substrato biológico. Bear *et al.* (1975) testaram essa hipótese, dissolvendo Rh₂(ac)₄, Rh₂(pr)₄ e Rh₂(but)₄ em ácido trifluoroacético, acompanhando por RMN o surgimento do ácido carboxílico correspondente (acético, propanóico e butírico). Determinaram as constantes cinéticas de pseudo-primeira ordem a 20°C com os valores 1,4, 1,5 e 1,3 x 10⁻⁴ s⁻¹ para Rh₂(acetato)₄, Rh₂(propionato)₄ e Rh₂(butirato)₄, respectivamente. A virtual identidade desses resultados indica que a velocidade de troca do ligante equatorial não deve ser considerada para explicar a atividade biológica dos carboxilatos de ródio (II). Além disso, observa-se que essa reação de troca é relativamente rápida, podendo eventualmente ocorrer em sítios biológicos com carboxilatos acessíveis (p. ex., resíduos de aspartato ou glutamato).

Kadish *et al.* (1978) sintetizaram dez complexos do tipo Rh₂(O₂CR)₄, onde R possuía caráter ora eletrodoador, ora eletro-receptor. Para cada complexo, obtiveram os potenciais de oxidação monoeletrônica, e compararam a atividade biológica do Rh₂(propionato)₄ com a do seu análogo [Rh₂(pr)₄]⁺. Não foi observada correlação entre tais potenciais redox e a atividade biológica dos complexos, e o composto [Rh₂(propionato)₄]⁺ mostrou-se apenas ligeiramente superior à espécie neutra em estudos de sobrevivência em camundongos portadores de tumor P388.

⁴ Para os códigos de 1 e 3 letras de aminoácidos, v. apêndices.

1.2.2 – Fatores que afetam a atividade biológica dos carboxilatos de ródio

a) Inibição enzimática da síntese de DNA

Howard *et al.* (1976) estudaram o efeito da ação de alguns carboxilatos de ródio sobre a atividade de 17 enzimas, observando que todas as que possuíam grupos tióis no ou perto do sítio ativo (fosfoglicerato mutase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, piruvato quinase, lactato desidrogenase (LDH), enolase, glucose-6-fosfato desidrogenase, glicerolfosfato desidrogenase, desidrogenase málica e aldolase) eram irreversivelmente inibidas por esses complexos. Ainda, observou-se um paralelismo quase numérico entre a inibição da LDH *in vitro* e a atividade antitumoral *in vivo*. Se esse fenômeno é importante *in vivo*, permanece por ser elucidado.

Observou-se que os carboxilatos de ródio *in vivo* inibem a síntese do DNA (diminuição de 90% da incorporação de ^3H -timidina no DNA em ascite de Ehrlich após 24 horas de incubação [Bear, 1986]) e de proteínas, mas têm pouco efeito sobre a síntese de RNA. Essa inibição, possivelmente, seria indireta, dando-se pelo bloqueio de enzimas envolvidas com a síntese do DNA. De fato, a DNA polimerase α é fortemente inibida por reagentes que bloqueiem sulfidrilas, e a DNA polimerase γ depende de substratos com grupos SH para máxima atividade [Boyar e Robinson, 1983]. Estudos de inibição em culturas sincronizadas mostraram que as células na fase S (isto é, durante a síntese de DNA) são as mais afetadas pelo butirato de ródio [Bear, 1986].

Uma evidência, de certa forma indireta, que reforça a importância do papel da inibição enzimática, veio de estudos de aumento de sobrevida de camundongos implantados com ascite de Ehrlich, depois de tratados com uma mistura de propionato de ródio e ácido poliadenílico, *poli(A)*, em diferentes proporções. O *poli(A)* liga-se nas posições axiais do $\text{Rh}_2(\text{pr})_4$ mais fortemente que o grupo -SH, e ainda estabiliza o complexo pelo efeito quelato (ou seja, protege o carboxilato de ródio da reação com -SH no meio extracelular e, portanto, permite que a droga esteja disponível por mais tempo para atacar o tumor). Quando a relação *poli(A)*: $\text{Rh}_2(\text{pr})_4$ aumenta de 0 para 20, observa-se %ILS de 190 para 280, e o número de camundongos que sobrevivem após 50 dias passa de dois para cinco [Bear e Robinson, 1983].

b) Lipofilicidade

As observações acima expostas de Das e Bear (1976) mostraram que as entalpias de formação dos adutos entre carboxilatos de ródio e imidazol não devem ser o motivo da diferenciação na atividade biológica desses complexos. Além disso, a coordenação dos complexos com aminoácidos livres no organismo não deve ser um fator determinante nas suas ações biológicas, posto que estas espécies estão presentes em baixas concentrações [Bear, 1986]. Howard *et al.* (1977) mostraram que a *lipofilicidade* dos complexos correlaciona-se bem com suas ações antitumorais (Tabela I.4).

Tabela I.4: Atividade farmacológica dos complexos tipo $Rh_2(O_2CR)_4$ correlacionadas com suas lipofilicidades [Howard *et al.* 1977].

Composto	Salina			Miristato de isopropila ^a			% Rh ligado às células de tumor	Coef. Partição	
	DL ₁₀	%ILS ^b	IT	DL ₁₀	% ILS	IT		CHCl ₃	Octanol
	(mol/kg x 6 dias)			(mol/kg x 6 dias)					
RhCl ₃	4,2x10 ⁻³			insolúvel			12,0	<0,0005	1,32x10 ⁻⁴
R = CH ₂ OCH ₃	5,9x10 ⁻⁴	50	1,1	insolúvel			2,5	<0,005	5,21x10 ⁻⁴
R = CH ₃	2,6x10 ⁻⁴	88	1,8	insolúvel			25,0	0,071	6,54x10 ⁻⁴
R = CH ₂ CH ₃	1,9x10 ⁻⁵	149	4,2	1,2x10 ⁻⁵	175	2,0	68,0	0,540	8,17
R = (CH ₂) ₂ CH ₃	6,0x10 ⁻⁶	197	4,7	1,4x10 ⁻⁶	179	2,4	insol.	15,6	898
R = (CH ₂) ₃ CH ₃	insolúvel			1,7x10 ⁻⁶	236	3,1	insol.	>300	>3000
R = (CH ₂) ₄ CH ₃	insolúvel			2,2x10 ⁻⁶	136	2,0	insol.	>300	>3000

^a meio hidrofóbico para testes dos carboxilatos insolúveis em salina. ^b %ILS e IT (índice terapêutico) baseados na dose DL₁₀.

De acordo com Bear (1986), a absorção dos carboxilatos de ródio pelas células seria governada primariamente pelo caráter hidrofóbico dos complexos. Além disso, compostos mais hidrofóbicos teriam maior possibilidade de interagirem com as proteínas (enzimas, por exemplo) e exercer sua atividade biológica. Porém, cadeias mais longas do que a do pentanoato já não apresentam vantagens. Parece que ou problemas estéricos começam a impedir a ação dos complexos, ou que é realmente necessária alguma hidrofili-licidade para os compostos poderem desempenhar sua ação antitumoral.

Incorporação dirigida por lipofilicidade e inibição de enzimas que sintetizam DNA parecem se constituir nas duas principais vias da ação antitumoral dos carboxilatos de ródio.

I.2.3 – Biodistribuição e estudos histopatológicos

Erck *et al.* (1976) conduziram experimentos de biodistribuição de $\text{Rh}_2(\text{CH}_3^{14}\text{COO})_4$ em animais portadores de ascite de Ehrlich. Após 15 minutos de injeção, o monitoramento tanto de Rh como de ^{14}C mostrou que o complexo permanecia intacto, e praticamente restrito ao plasma. Após 1 hora, observou-se rápida remoção do fluido ascítico, com decomposição do complexo ($[\text{Rh}] > [^{14}\text{C}]$). O órgão-alvo inicial foi o fígado, embora depois de 2 h os níveis de Rh aumentaram no intestino e rins. A liberação de $^{14}\text{CO}_2$ foi detectada em grande quantidade, devendo ser o principal metabólito do $\text{Rh}_2(\text{CH}_3^{14}\text{COO})_4$. Assumiu-se que a diferença de *tempo* para observar o surgimento de $^{14}\text{CO}_2$ após a administração de $\text{Rh}_2(\text{CH}_3^{14}\text{COO})_4$ ou $\text{CH}_3^{14}\text{COONa}$ possa ser considerada como o tempo que o acetato de ródio leva para gerar íons acetato (portanto, o tempo que o complexo leva para se decompor). Obteve-se uma constante de velocidade para esse processo metabólico de $0,70 \text{ h}^{-1}$, que forneceu um $t_{1/2}$ máximo de aproximadamente 60 minutos.

Craciunescu *et al.* (1991) realizaram as primeiras experiências de observação de alterações de tecidos induzidas por complexos de ródio (II). Investigaram o tecido renal de ratos que receberam o aduto entre $\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4$ e o antimalárico “Mepacrina”. Espósito *et al.* (1999a) observaram os efeitos do complexo $\text{Rh}_2(\text{CF}_3\text{CONH})_4$ sobre o tecido do coração, pulmões, fígado, rins, testículos, ovário, cérebro e medula óssea de camundongos Balb-c. Esses resultados serão discutidos mais adiante, nesta tese.

Souza *et al.* (1997) estudaram a distribuição do aduto entre propionato de ródio e isonicotinato de sódio, injetado intraperitonealmente em camundongos Balb-c saudáveis, monitorando-se a concentração de Rh por emissão atômica. Foi observado que o composto é rapidamente absorvido e atinge concentração plasmática máxima em 8 horas. Entre 24-48 horas, todos os tecidos apresentam $[\text{Rh}]$ máxima, mormente o baço. Após seis dias, o metal pôde ser detectado apenas nos rins e no fígado, e após 20 dias, apenas no fígado. O $t_{1/2}$ para a eliminação do Rh no sangue (33,6 h) foi ligeiramente superior ao da Pt na cisplatina ou carboplatina, porém o $t_{1/2}$ para eliminação de Rh do rim (62,0 h) foi menor do que para a Pt em ambas as drogas.

I.2.4 – Novos complexos de ródio(II)

Hall *et al.* (1980) sintetizaram e testaram alguns carboxilatos de ródio(II) e estudaram sua ação em camundongos portadores de tumores, como a leucemia L1210 e o melanoma B16. Nos ensaios farmacológicos, assume-se que tais linhagens respondem à quimioterapia de modo análogo ao que o fazem em seres humanos, tendo portanto caráter preditivo. Dos compostos obtidos por esses autores, apenas o butirato, o ciclobutano-carboxilato e o isobutirato apresentaram alguma ação contra esses tumores, não porém com a mesma eficiência de certos compostos de Pt(II), o que levou os autores a acreditar que futuras investigações da ação antitumoral dos carboxilatos de ródio(II) não seria produtiva. Realmente, Bear (1986) ressalta que, para o butirato de ródio exercer ação terapêutica, necessita estar em contato com as células L1210 por pelo menos 6 horas na concentração de 0,8 μM . Entretanto, conforme mencionado anteriormente, a meia-vida desses complexos é de apenas 1 hora, e injeções posteriores para manter o nível da droga resultam em efeitos tóxicos.

Em vista disso, Bear (1986) concordará que novos complexos de ródio(II) seriam necessários, nos quais os ligantes equatoriais alterassem a reatividade do núcleo Rh_2^{4+} de forma que:

- i* - o complexo seja mais estável por maior tempo no animal hospedeiro;
- ii* - a toxicidade ao hospedeiro seja moderada, e
- iii* - o complexo retenha a reatividade a grupos -SH, mas com maior especificidade à enzima-alvo.

Poderíamos recordar ainda que, assim como o $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ apresenta efeito sinérgico com a arabinosilcitosina sobre L1210 [Hughes *et al.*, 1972], outros adutos entre carboxilatos de ródio e drogas antitumorais “clássicas” poderiam exercer a mesma ação. Além disso, existe um imenso campo a ser explorado, no que tange ao transporte dos complexos (carboxilatos ou não) por macromoléculas e/ou biopolímeros.

Dentro da filosofia de troca de ligantes equatoriais é que foram concebidos e sintetizados os *amidatos de ródio (II)* descritos no item I.1.2 Porém, até recentemente, nenhum desses complexos com amidas como ligantes equatoriais havia sido testado em tumores *in vitro* ou *in vivo* [Clarke e Stubbs, 1996], o que nos levou a sintetizar e avaliar a atividade biológica do complexo $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ [Espósito *et al.*, 1997].

Complexos diméricos de ródio(II) com outros ligantes equatoriais têm sido testados, bem como novas estratégias de carregamento do composto bioativo, e a busca de

efeitos sinérgicos com medicamentos clássicos. Resumiremos a seguir os trabalhos mais recentes publicados nesse sentido.

a) Novos carboxilatos de ródio e adutos com medicamentos “clássicos”

O Quadro I.1 resume alguns dos novos carboxilatos de ródio e seus adutos com ligantes transportadores ou medicamentos clássicos (Figura 1.5).

Do ponto de vista dos complexos metálicos, o objetivo procurado na substituição dos carboxilatos “típicos” (acetato, propionato e butirato) por outros ácidos policarboxílicos, ou hidrocarbonetos, é conferir ao composto final maior solubilidade em água, ou menor toxicidade (v. Figura 1.6). Alguns dos novos complexos parecem ter atingido esses objetivos. O citrato de ródio é muito hidrossolúvel, e sua toxicidade aguda não pôde ser determinada sequer com doses elevadas de 260mg/kg. Esse complexo aumentou a probabilidade de sobrevivência de camundongos suíços portadores de ascite de Ehrlich para 75%, contra 21% do grupo controle [Zyngier *et al.*, 1989]. Derivados de hidrocarbonetos, como o ceto-glucuronato e o gluconato de ródio apresentam perfil de solubilidade adequado, baixas toxicidades e efeito sinérgico (os adutos com ciclofosfamida são mais ativos que os complexos ou a droga isoladamente, *in vitro*) [Gil *et al.*, 1999]. Adutos com ácido isonicotínico conferem maior solubilidade ao complexo metálico, com toxicidades semelhantes às dos complexos livres [Souza *et al.*, 1996], ou sensivelmente menores [Souza, 1995].

Os adutos entre carboxilatos de ródio e drogas antichagásicas (Berenil, Mepacrina), radiosensibilizadores (derivados do nitroimidazol: benznidazol, metronidazol), anti-tumorais (ciclofosfamida, azatioprina), ou com ligantes com afinidade ao tumor (sulfadiazina) foram sintetizados com vistas a um eventual efeito sinérgico, ou seja, o da potencialização do efeito de uma droga pela outra. Esse fenômeno foi observado para o aduto entre propionato de ródio e metronidazol (índice terapêutico = 2,2; ligeiramente superior ao do propionato livre) [Nothenberg *et al.*, 1994], acetato de ródio com Berenil [Farrell *et al.*, 1984] e para alguns dos compostos obtidos por Craciunescu *et al.* (1991). Curiosamente, porém, adutos dos carboxilatos de ródio com ciclofosfamida, ou de acetato de ródio com sulfisoxazol, mostraram-se inativos (v. Quadro I.1).

Figura 1.5: Alguns ligantes axiais empregados nos novos adutos com carboxilatos de ródio(II).

Figura 1.6: Alguns dos novos carboxilatos de ródio(II).

Quadro I.1: Carboxilatos de ródio recentemente sintetizados e alguns dos seus adutos, de fórmula geral $Rh_2(O_2CR)_4L_2$, com ações biológicas avaliadas (para explicações, vide texto).

R	L	Ação biológica estudada	Ref.
CH ₃	Ác. isonicotínico	Toxicidade	Souza <i>et al.</i> , 1996
	Benznidazol	Antichagásico	Nothenberg <i>et al.</i> , 1991
	Metronidazol	Antichagásico	Nothenberg <i>et al.</i> , 1991
	Plasmoquina	Antichagásico, antitumoral	Craciunescu <i>et al.</i> , 1991
	Primoquina	Antichagásico, antitumoral	Craciunescu <i>et al.</i> , 1991
	Pentaquina	Antichagásico, antitumoral	Craciunescu <i>et al.</i> , 1991
	Amodiaquina	Antichagásico, antitumoral	Craciunescu <i>et al.</i> , 1991
	Isopentaquina	Antichagásico, antitumoral	Craciunescu <i>et al.</i> , 1991
	Mepacrina	Antichagásico, antitumoral	Craciunescu <i>et al.</i> , 1991
	Cloroquina	Antichagásico, antitumoral	Craciunescu <i>et al.</i> , 1991
	Azatioprina	Toxicidade (prévio)	Chifotides <i>et al.</i> , 1992
	Berenil	Antichagásico, antitumoral	Farrell <i>et al.</i> , 1984
	Ciclofosfamida	Antitumoral*	Joesten <i>et al.</i> , 1982
	Sulfisoxazol	Toxicidade, sobrevida*	Reibschied <i>et al.</i> , 1994
	Sulfadiazina	Bactericida	Sinisterra, 1992
CH ₂ CH ₃	Ác. isonicotínico	Toxicidade	Souza <i>et al.</i> , 1996
	Metronidazol	Antichagásico	Nothenberg <i>et al.</i> , 1991
		IT, bactericida, inibição sínt. DNA	Nothenberg <i>et al.</i> , 1994
	Benznidazol	Antichagásico, toxicidade	Nothenberg <i>et al.</i> , 1991
	Metronidazol	Antichagásico, toxicidade	Nothenberg <i>et al.</i> , 1991
	Ciclofosfamida	Antitumoral*	Joesten <i>et al.</i> , 1982
CH ₂ CH ₂ CH ₃	Sulfadiazina	Bactericida	Sinisterra, 1992
	Ác. isonicotínico	Toxicidade	Souza <i>et al.</i> , 1996
	Benznidazol	Antichagásico	Nothenberg <i>et al.</i> , 1991
	Metronidazol	Antichagásico	Nothenberg <i>et al.</i> , 1991
	Ciclofosfamida	Antitumoral*	Joesten <i>et al.</i> , 1982
	Sulfadiazina	Bactericida	Sinisterra, 1992
CF ₃	Sulfadiazina	Toxicidade, sobrevida	Reibschied <i>et al.</i> , 1994
	Benznidazol	Antichagásico	Nothenberg <i>et al.</i> , 1991
C ₆ H ₅	Benznidazol	Antichagásico	Nothenberg <i>et al.</i> , 1991
	Metronidazol	Antichagásico	Nothenberg <i>et al.</i> , 1991
C ₆ H ₅ CH ₂	Benznidazol	Antichagásico	Nothenberg <i>et al.</i> , 1991
	Metronidazol	Antichagásico	Nothenberg <i>et al.</i> , 1991
Hidrocínato ^a	Benznidazol	Antichagásico	Nothenberg <i>et al.</i> , 1991
	Metronidazol	Antichagásico	Nothenberg <i>et al.</i> , 1991
Cínato ^a	—	Toxicidade	Najjar <i>et al.</i> , 1984
Ciclopropano-carboxilato ^a	Ác. isonicotínico	Toxicidade, sobrevida	Souza, 1995
Cetoglucuronato ^a	Ciclofosfamida	Toxicidade	Gil <i>et al.</i> , 1999
Gluconato ^a	Ciclofosfamida	Toxicidade	Gil <i>et al.</i> , 1999
Citrato ^a	—	Toxicidade, sobrevida, inibição sínt. DNA	Zyngier <i>et al.</i> , 1989

* composto inativo

^a v. Figura 1.6

A ação bactericida frente a *Staphilococcus aureus* (Gram-positiva) dos carboxilatos de ródio com sulfadiazinas mostrou-se correlacionada à lipofilicidade dos complexos, porém foram inativos contra *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* [Sinisterra, 1992]. O propionato de ródio com metronidazol é ativo frente a *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativa), porém inativo contra *K. pneumoniae* e *E. coli* [Nothenberg *et al.*, 1994].

b) Inclusão em ciclodextrina

A inclusão de complexos de ródio(II) em ciclodextrinas foi efetuada visando aumentar as possibilidades de transferência da droga para a fase aquosa, e controlar a cinética da sua liberação no organismo. Dentre os complexos incluídos, encontram-se o citrato de ródio [Sinisterra *et al.*, 1999], o 3-fluorobenzoato [Sinisterra *et al.*, 1998] e o α -metilcinamato [Sinisterra *et al.*, 1995].

c) Complexos mistos do tipo $[Rh_2(\mu-OOCR)_2(N-N)_2Y_2](OOCR)_2$

O grupo de F. Pruchnik, na Polônia, tem se dedicado à síntese, caracterização e avaliação da atividade biológica de complexos do tipo $[Rh_2(\mu-OOCR)_2(N-N)_2Y_2](OOCR)_2$ (Figura 1.8), tendo obtido resultados promissores. O Quadro I.2 relaciona alguns dos complexos estudados por esses autores.

Figura 1.8: Estrutura do $[Rh_2(\mu-OOCR)_2(N-N)_2(H_2O)_2]$. Os íons axiais $RCOO^-$ estão substituídos por moléculas de água.

Quadro I.2: Atividade biológica dos complexos tipo $[\text{Rh}_2(\mu\text{-OOCR})_2(\text{N-N})_2\text{Y}_2](\text{OOCR})_2$

	R	N-N	Y	RCOO	Ação biológica estudada	Ref.
1	Ph	phen	H ₂ O	Ph	Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Bien <i>et al.</i> , 1999
2	Ph	bpy	H ₂ O	Ph	Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Bien <i>et al.</i> , 1999
3	But	bpy	H ₂ O	But	Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Bien <i>et al.</i> , 1999
4	Pr	phen	H ₂ O	Pr	Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Bien <i>et al.</i> , 1999
5	H	phen	Cl	—	Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Bien <i>et al.</i> , 1997
6	Me	phen	H ₂ O	Me	Antitumor (carcinoma humano KB)	Pruchnik e Dus, 1996
					Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Bien <i>et al.</i> , 1997
					Inibição algas (<i>C. vulgaris</i>)	Pruchnik <i>et al.</i> , 1997
					Antitumor (carcinoma humano KB)	Pruchnik e Dus, 1996
7	Me	phen	Cl	—	Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Bien <i>et al.</i> , 1997
8	Me	bpy	H ₂ O	Me	Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Bien <i>et al.</i> , 1997
9	Me	bpy	Cl	—	Antitumor (carcinoma humano KB)	Pruchnik e Dus, 1996
					Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Bien <i>et al.</i> , 1997
10	Me	dmpq	H ₂ O	Me	Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Bien <i>et al.</i> , 1997
11	Et	phen	H ₂ O	Et	Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Bien <i>et al.</i> , 1997
12	Et	bpy	H ₂ O	Et	Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Bien <i>et al.</i> , 1997
13	Pr	bpy	H ₂ O	Pr	Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Bien <i>et al.</i> , 1997
14	But	phen	H ₂ O	But	Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Bien <i>et al.</i> , 1997
15	Me	dpp	H ₂ O	Me	Inibição algas (<i>C. vulgaris</i>)	Pruchnik <i>et al.</i> , 1997
16	Lact	phen	H ₂ O	Lact	Inibição algas (<i>C. vulgaris</i>)	Pruchnik <i>et al.</i> , 1997
17	Mand	phen	H ₂ O	Mand	Antitumor (carcinoma humano KB)	Pruchnik e Dus, 1996
					Inibição algas (<i>C. vulgaris</i>)	Pruchnik <i>et al.</i> , 1997
					Antitumor (carcinoma humano KB)	Pruchnik e Dus, 1996
18	Mand	dpp	H ₂ O	Mand	Inibição algas (<i>C. vulgaris</i>)	Pruchnik <i>et al.</i> , 1997
19	H	bpy	Cl	—	Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Pruchnik <i>et al.</i> , 1996
20	Me	terpy	Cl	—	Antitumor (carcinoma humano KB)	Pruchnik e Dus, 1996
					Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Pruchnik <i>et al.</i> , 1996
21	Mand	dmp	H ₂ O	Mand	Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Pruchnik <i>et al.</i> , 1996
22	Mand	bpy	H ₂ O	Mand	Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Pruchnik <i>et al.</i> , 1996
23	Mand	phen	Cl	—	Antitumor (carcinoma humano KB)	Pruchnik e Dus, 1996
					Bactericida (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)	Pruchnik <i>et al.</i> , 1996
24	Lact	bpy	H ₂ O	Lact	Antitumor (carcinoma humano KB)	Pruchnik e Dus, 1996

Ph = C₆H₅; Me = CH₃; Et = C₂H₅; Pr = C₃H₇; But = C₄H₉; Lact = CH₃CHOH; Mand = C₆H₅CHOH; bpy = 2,2'-bipiridina; dmpq = 6,7-dimetil-2,3-bis(2-piridil)quinoxalina; dpp = 4,7-difenil-1,10-fenantrolina; phen = 1,10-fenantrolina; terpy = 2,2':6,2"-terpiridina.

A ordem observada da ação dos complexos **1-4** sobre *S. aureus* foi **1 ~ 2 ~ 3 > 4**, ou seja, decresce com o decréscimo do volume do substituinte R. A atividade do complexo **1** foi testada subsequenteemente contra várias linhagens de *S. aureus* resistentes a antibióticos, sendo ativo em concentrações de 5×10^{-5} M, embora sem correlação aparente com a resistência. Os complexos **1-4** mostraram-se pouco ativos contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* [Bien *et al.*, 1999]. Os compostos **6-10** são consideravelmente mais ativos do que os ligantes livres, e foram os antibacterianos mais ativos contra *E. coli*, tendo pouco efeito sobre *S. aureus*. De fato, a resposta daquela bactéria ao aumento do volume de R é exatamente oposta à observada para *S. aureus*, decrescendo na série R = H ~ CH₃ > C₂H₅ > C₃H₇ ~ C₄H₉ [Bien *et al.*, 1997]. A ordem observada da atividade citostática contra

células sincronizadas da alga *Chlorella vulgaris* foi **15** > **16** > **17** > **6** [Pruchnik *et al.*, 1997]. Compostos com grupos carboxilatos volumosos como o **14** e o **17** (além de outros, como por exemplo o butanoato, pentanoato e benzoato) também são ativos contra bactérias Gram-positivas, enquanto que o formato e o acetato mostram atividade seletiva contra bactérias Gram-negativas [Pruchnik *et al.*, 1996; Bien *et al.*, 1999]. Pruchnik e Dus (1996) observaram que a atividade dos tetra- α -hidroxicarboxilatos lactato e mandelato de ródio era maior do que a dos complexos de outros hidroxiácidos contendo duas ou três carboxilas. A substituição de duas carboxilas por dois grupos phen (**16** e **17**) aumenta a atividade dos complexos, sendo inclusive maior do que a do $\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, o que não ocorre quando se substitui pela bpy. Complexos contendo X_2 ($\text{X} = \text{Cl}^-$, Br^- ou I^- , como por exemplo **5** e **19**) têm pouca ação carcinostática, uma vez que os grupos X^- não são completamente removidos.

d) Formamidinato de ródio(II)

O grupo de P. Piraino, na Itália, relatou a atividade biológica do complexo $\text{Rh}_2(\text{Form})_2(\text{O}_2\text{CCF}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2$, onde Form = N,N'-di-*p*-tolilformamidinato (Figura 1.9), comparando-a com aquelas do acetato de ródio e da cisplatina, frente ao sarcoma ascítico de Yoshida e/ou sarcoma T8 de Guérin, inoculado em ratos Sprague-Dawley (Tabela I.5) [Fimiani *et al.*, 1990].

Figura 1.9: Formamidinato de ródio

Tabela I.5: Efeitos comparativos de alguns metalofármacos sobre sarcoma ascítico de Yoshida, injetados intraperitonealmente (adaptado de Fimiani *et al.*, 1990).

Complexo	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	ILS%	SLT (> 60 dias)
Acetato de ródio	6,78	60,7	4
Formamidinato de ródio	3,27	62,3	5
Cisplatina	16,6	74,8	16
Formamidinato de ródio	5,46	66,7	16

SLT = sobreviventes de longo termo

A toxicidade do formamidinato mostrou-se tão baixa que não pôde ser determinada, uma vez que o complexo tinha que ser dissolvido em uma quantidade de DMSO que por si só já era tóxica aos animais. Esse complexo é menos tóxico que a cisplatina e acetato ou propionato de ródio, e antitumoral equivalente a essas drogas, quando administrado nas mesmas concentrações.

Esses resultados conduziram os autores ao estudo das interações desse complexo com nucleobases e nucleosídeos. O formamidinato de ródio reage com adenina e N^6, N^6 -dimetiladenina na razão molar de 1:1 e 1:2, gerando adutos mono e bi-axiais coordenados pelo N(3) da adenina. A reação com citosina, 1-metilcitosina e citidina, por outro lado, ocorre através de uma oxidação monoeletrônica, originando complexos paramagnéticos de fórmula geral $Rh_2(Form)_2(O_2CCF_3)(\mu-L)_n$ (L = citosina, 1-metilcitosina, citidina), nos quais os grupos L estão *equatorialmente* ligados pelo N(3) e o átomo de N da amina desprotonado [Piraino *et al.*, 1993]. A reação com fenantrolina ou bipyridina leva à dissociação do grupo $CF_3CO_2^-$ [Lo Schiavo *et al.*, 1994], e estudos cristalográficos dos produtos da reação com 9-etilguanina ou 9-etiladenina foram realizados [Catalan *et al.*, 1999].

e) Trifluoroacetamidata de ródio

O complexo $Rh_2(tfc)_4$ teve sua atividade antitumoral avaliada recentemente, como parte do nosso programa de mestrado. Foram realizados testes *in vitro* frente a células de leucemia humana (linhagens U937 e K562) e de ascite de Ehrlich (murínica) (Tabela I.6). Foram obtidos também os valores de DL_{10} e DL_{50} para camundongos Balb-c portadores de ascite de Ehrlich.

Tabela I.6: Valores médios (10^{-5} M) de IC_{50} para o $Rh_2(tfc)_4$ a cisplatina [Espósito *et al.*, 1997].

Linhagem	$Rh_2(tfc)_4$	Cisplatina
U937	4,8	13,0
K562	7,8	7,9
Ehrlich	5,0	6,4

Comparações desses resultados com dados da literatura devem ser feitas com cautela, posto que não é raro que se usem animais de outras linhagens ou diferentes formas de administração da droga. E, enfim, o ambiente varia de biotério para biotério, e

nem sempre se consegue garantir que os animais serão submetidos às mesmas condições de manipulação.

Isso ressaltado, podemos examinar a Tabela I.7:

Tabela I.7: Toxicidades de alguns complexos metálicos (10^{-5} mol/kg).

Complexo	DL ₁₀	DL ₅₀	Animal	Ref.
Cisplatina		4,33	Camundongo suíço	Hydes e Russell, 1988
Acetato Rh	4,3		Camundongo suíço	Bear <i>et al.</i> , 1975
Propionato Rh	0,54		Camundongo suíço	Bear <i>et al.</i> , 1975
Butirato Rh	0,125		Camundongo suíço	Bear <i>et al.</i> , 1975
Rh ₂ (CF ₃ CONH) ₄	2,4	4,8	Camundongo Balb-c	Espósito <i>et al.</i> , 1997

Nota-se que o complexo Rh₂(CF₃CONH)₄ tem toxicidade semelhante à da cisplatina e da mesma ordem de grandeza que a do acetato de ródio, com a vantagem de ser mais lipofílico, conforme discutiremos mais adiante.

Determinou-se também a dose desse complexo que promovia a sobrevida de longo termo de 90% de uma população de camundongos inoculados com Ehrlich. O valor obtido, $3,8 \times 10^{-5}$ mol/kg, é curiosamente muito próximo da DL₅₀ [Espósito *et al.*, 1998].

Daniels *et al.* (1991) obtiveram dois derivados di-substituídos da reação entre Rh₂(CF₃CONH)₄ e fenantrolina, e cremos que seria interessante avaliar se as suas atividades antitumorais seriam aumentadas em relação às do complexo tetra-substituído, conforme observado por Pruchnik (v. item I.2.4c).

II – ALBUMINA DE SORO HUMANA (HSA) COMO TRANSPORTADORA DE METAIS

*“Albumin may be unique among proteins in that
so many scientists have spent the largest portion of their
professional careers studying very specific aspects of this protein.
New appreciation for the complexity and potential applications
presented by the structure of albumin promises to consume
the careers of many more scientists.”*

— Carter e Ho, 1994

II.1 – FUNÇÕES E ESTRUTURA DA ALBUMINA DE SORO HUMANA

II.1.1 – Introdução

A albumina (Figura 2.1) é a proteína mais abundante do plasma sangüíneo, totalizando 52% da sua composição protéica, contra 20% das γ -globulinas (imunoproteínas IgG, IgA, IgM, IgD e IgE), 11% de β -globulinas (lipoproteínas, transferrina), 11% de α -globulinas (lipo e glicoproteínas, e macro e haptoglobulinas), 5% de fibrinogênio e 1% de outras proteínas como as metaloenzimas [Kratz, 1993].

Figura 2.1: Representação cilíndrica da HSA cujas coordenadas cristalográficas estão depositadas no *Protein Data Bank* (Brookhaven National Laboratory; <http://www.pdb.bnl.gov>), sob o código 1A06.

Em indivíduos normais, está presente em concentrações tipicamente ao redor de 40 mg/ml ($\sim 0,6$ mM) [Curry *et al.*, 1998]. Sua função fisiológica ainda é controversa, quicá precisamente pela enorme variedade de papéis que ela desempenha, e que incluem o controle da pressão osmótica do sangue e o transporte, metabolismo e distribuição de várias substâncias endógenas ou exógenas, como hormônios, aminoácidos, ácidos graxos, íons metálicos e drogas [He e Carter, 1992]. Outras funções têm-lhe sido sugeridas, como sua ação antioxidante e/ou protetora contra radicais livres no meio extracelular (v. a excelente revisão de Carter e Ho, 1994). A degradação da albumina pode provavelmente se constituir numa fonte de aminoácidos para alguns tecidos [Kragh-Hansen, 1990].

Grande parte da importância fisiológica dessa proteína é consequência precisamente da possibilidade de dissolução no meio biológico que ela oferece a substâncias que, originalmente, são hidrofóbicas, como os ácidos graxos. Curry e colaboradores [Curry *et al.*, 1998; Curry *et al.*, 1999] determinaram cristalograficamente cinco sítios de ligação de miristato distribuídos assimetricamente pela molécula de HSA, e Sugio *et al.* (1999) designaram três sítios de coordenação de ácidos graxos de cadeia longa na superfície da HSA. Para uma revisão sobre mecanismos de reação de equilíbrio apresentadas pela HSA, veja-se Vorum (1999).

II.1.2 – Estrutura primária da Albumina de Soro Humana

Do ponto de vista químico, a molécula de albumina humana consiste em uma única cadeia polipeptídica de 585 resíduos de aminoácidos (massa molecular aproximada de 66 kd), cuja seqüência foi determinada pela combinação de métodos de seqüenciamento direto e de seqüenciamento de nucleotídeos de clones de DNA recombinante (veja-se a Tabela II.1). As estruturas moleculares e os códigos de 1 e 3 caracteres dos aminoácidos são apresentados nos apêndices.

Algumas características da albumina humana [Kragh-Hansen, 1990; Carter e Ho, 1994], são:

- a* - presença de um único resíduo de triptofano (na posição 214);
- b* - conteúdo de metionina baixo em relação ao de cisteína (respectivamente, 6 e 35 resíduos). Como veremos a seguir, o número ímpar de resíduos de cisteína é de importância fundamental para a estabilização da estrutura e das características de ligação de alguns íons metálicos com a HSA;
- c* - conteúdo elevado de aminoácidos com carga, como ácido aspártico (36), ácido glutâmico (61), lisina (59) e arginina (23), que conferem à proteína uma carga total elevada (-17, em pH fisiológico) e portanto uma boa hidrossolubilidade. De fato, é possível preparar-se soluções fisiológicas de HSA com finalidade medicinal até 30% (massa:volume de solução).
- d* - ausência de sítios de glicosilação, ao contrário de outras proteínas da família das albuminas, como a α -fetoproteína.

Tabela II.1: Sequência de uma letra dos aminoácidos da HSA^a

1	D	56	D	111	N	166	T	221	Q	276	K	331	L	386	N	441	P	496	T	551	F
2	A	57	E	112	L	167	E	222	R	277	E	332	Y	387	L	442	E	497	Y	552	A
3	H	58	S	113	P	168	C	223	F	278	C	333	E	388	I	443	A	498	V	553	A
4	K	59	A	114	R	169	C	224	P	279	C	334	Y	389	K	444	K	499	P	554	F
5	S	60	E	115	L	170	Q	225	K	280	E	335	A	390	Q	445	R	500	K	555	V
6	E	61	N	116	V	171	A	226	A	281	K	336	R	391	N	446	M	501	E	556	E
7	V	62	C	117	R	172	A	227	E	282	P	337	R	392	C	447	P	502	F	557	K
8	A	63	D	118	P	173	D	228	F	283	L	338	H	393	E	448	C	503	N	558	C
9	H	64	K	119	E	174	K	229	A	284	L	339	P	394	L	449	A	504	A	559	C
10	R	65	S	120	V	175	A	230	E	285	E	340	D	395	F	450	E	505	E	560	K
11	F	66	L	121	D	176	A	231	V	286	K	341	Y	396	E	451	D	506	T	561	A
12	K	67	H	122	V	177	C	232	S	287	S	342	S	397	Q	452	Y	507	F	562	D
13	D	68	T	123	M	178	L	233	K	288	H	343	V	398	L	453	L	508	T	563	D
14	L	69	L	124	C	179	L	234	L	289	C	344	V	399	G	454	S	509	F	564	K
15	G	70	F	125	T	180	P	235	V	290	I	345	L	400	E	455	V	510	H	565	E
16	E	71	G	126	A	181	K	236	T	291	A	346	L	401	Y	456	V	511	A	566	T
17	E	72	D	127	F	182	L	237	D	292	E	347	L	402	K	457	L	512	D	567	C
18	N	73	K	128	H	183	D	238	L	293	V	348	R	403	F	458	N	513	I	568	F
19	F	74	L	129	D	184	E	239	T	294	E	349	L	404	Q	459	Q	514	C	569	A
20	K	75	C	130	N	185	L	240	K	295	N	350	A	405	N	460	L	515	T	570	E
21	A	76	T	131	E	186	R	241	V	296	D	351	K	406	A	461	C	516	L	571	E
22	L	77	V	132	E	187	D	242	H	297	E	352	T	407	L	462	V	517	S	572	G
23	V	78	A	133	T	188	E	243	T	298	M	353	Y	408	L	463	L	518	E	573	K
24	L	79	T	134	F	189	G	244	E	299	P	354	E	409	V	464	H	519	K	574	K
25	I	80	L	135	L	190	K	245	C	300	A	355	T	410	R	465	E	520	E	575	L
26	A	81	R	136	K	191	A	246	C	301	D	356	T	411	Y	466	K	521	R	576	V
27	F	82	E	137	K	192	S	247	H	302	L	357	L	412	T	467	T	522	Q	577	A
28	A	83	T	138	Y	193	S	248	G	303	P	358	E	413	K	468	P	523	I	578	A
29	Q	84	Y	139	L	194	A	249	D	304	S	359	K	414	K	469	V	524	K	579	S
30	Y	85	G	140	Y	195	K	250	L	305	L	360	C	415	V	470	S	525	K	580	Q
31	L	86	E	141	E	196	Q	251	L	306	A	361	C	416	P	471	D	526	Q	581	A
32	Q	87	M	142	I	197	R	252	E	307	A	362	A	417	Q	472	R	527	T	582	A
33	Q	88	A	143	A	198	L	253	C	308	D	363	A	418	V	473	V	528	A	583	L
34	C	89	D	144	R	199	K	254	A	309	F	364	A	419	S	474	T	529	L	584	G
35	P	90	C	145	R	200	C	255	D	310	V	365	D	420	T	475	K	530	V	585	L
36	F	91	C	146	H	201	A	256	D	311	E	366	P	421	P	476	C	531	E		
37	E	92	A	147	P	202	S	257	R	312	S	367	H	422	T	477	C	532	L		
38	D	93	K	148	Y	203	L	258	A	313	K	368	E	423	L	478	T	533	V		
39	H	94	Q	149	F	204	Q	259	D	314	D	369	C	424	V	479	E	534	K		
40	V	95	E	150	Y	205	K	260	L	315	V	370	Y	425	E	480	S	535	H		
41	K	96	P	151	A	206	F	261	A	316	C	371	A	426	V	481	L	536	K		
42	L	97	E	152	P	207	G	262	K	317	K	372	K	427	S	482	V	537	P		
43	V	98	R	153	E	208	E	263	Y	318	N	373	V	428	R	483	N	538	K		
44	N	99	N	154	L	209	R	264	I	319	Y	374	F	429	N	484	R	539	A		
45	E	100	E	155	L	210	A	265	C	320	A	375	D	430	L	485	R	540	T		
46	V	101	C	156	F	211	F	266	E	321	E	376	E	431	G	486	P	541	K		
47	T	102	F	157	F	212	K	267	N	322	A	377	F	432	K	487	C	542	E		
48	E	103	L	158	A	213	A	268	Q	323	K	378	K	433	V	488	F	543	Q		
49	F	104	Q	159	K	214	W	269	D	324	D	379	P	434	G	489	S	544	L		
50	A	105	H	160	R	215	A	270	S	325	V	380	L	435	S	490	A	545	K		
51	K	106	K	161	Y	216	V	271	I	326	F	381	V	436	K	491	L	546	A		
52	T	107	D	162	K	217	A	272	S	327	L	382	E	437	C	492	E	547	V		
53	C	108	D	163	A	218	R	273	S	328	G	383	E	438	C	493	V	548	M		
54	V	109	N	164	A	219	L	274	K	329	M	384	P	439	K	494	D	549	D		
55	A	110	P	165	F	220	S	275	L	330	F	385	Q	440	H	495	E	550	D		

^a: conforme depositado no *Protein Data Bank* (Brookhaven National Laboratory)
 endereço Internet: <http://www.pdb.bnl.gov>

A sequência de aminoácidos é bastante conservada entre as albuminas de mamíferos, o que sugere uma diferenciação evolutiva antiga. Na Tabela II.2 podemos verificar essa identidade para algumas albuminas conhecidas.

Tabela II.2: Matriz de identidade entre as seqüências de algumas albuminas (os valores indicam o número de resíduos conservados) (Reproduzido de Carter e Ho, 1994).

Origem	Humana	Bovina	Eqüina	Ovina	Rato	Sapo
Bovina	441					
Eqüina	442	430				
Ovina	435	539	438			
Rato	426	409	422	404		
Sapo	221	218	222	216	225	
Salmão	161	170	153	165	159	154

Assim, a albumina humana apresenta, por exemplo, aproximadamente 75% de homologia com as seqüências das albuminas bovina e eqüina [Carter e Ho, 1994].

II.1.3 – Estrutura espacial da Albumina de Soro Humana

a) Estrutura secundária

Diversos modos de avaliação do conteúdo de sub-estruturas organizadas da HSA, como α -hélices e folhas β , (Figura 2.2) foram empregados antes que resultados conclusivos fossem obtidos via difração de raios-X. Esses métodos baseiam-se em medidas espectroscópicas de dicroísmo circular (v. capítulo IV.4) e previsões por regras de probabilidade, nas quais se determina empiricamente a freqüência de um dado aminoácido numa dessas sub-estruturas.

Coerentemente com as evidências oriundas daqueles métodos, dados cristalográficos mostram que a HSA é constituída principalmente por α -hélices (~ 67%), e quase nenhuma contribuição de folhas β [Carter e Ho, 1994].

Figura 2.2: Estrutura geral da α -hélice direita, estrutura comumente encontrada nas proteínas⁵. Os pontilhados são ligações de hidrogênio entre o grupo NH (azul) e átomos de oxigênio (vermelho).

A HSA pode se ligar rapidamente e com grande afinidade a vários ligantes diferentes, tendo as reações de equilíbrio HSA—ligante constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem típicas de 10^{-5} s^{-1} , ou seja, que a reação atinge o equilíbrio na ordem de 1 microssegundo [Vorum, 1999]. Isso sugere a capacidade da proteína de alterar sua conformação interna de modo rápido. “Bolsões” hidrofóbicos, por um lado, e grupos substituintes carregados, por outro, devem auxiliar esses ligantes a se fixarem na proteína. Contudo, essa capacidade de alteração conformacional não é ilimitada; o próprio ligante tem que preencher certos requisitos estéricos para ligações de alta afinidade.

Além disso, a presença de um ligante pode impedir a ligação de um outro (competição pelos sítios de ligação) e proteger a proteína contra desnaturação pelo calor ou pela ação da uréia; contra hidrólise enzimática, etc. Uma decorrência importante desse fato é que, apesar das alterações conformacionais na proteína induzidas pelos ligantes, a *quantidade* de hélices alfa *não se altera significativamente* [Kragh-Hansen, 1990].

⁵ fonte: Protein Crystallography on the Web, <http://px.cryst.bbk.ac.uk/99/sample/helix.htm>;

b) Estrutura terciária

A albumina foi reconhecida pela primeira vez como um importante componente do plasma sanguíneo em 1839, e seus cristais têm sido obtidos desde o final do século XIX. Numerosos estudos espectroscópicos foram empregados na tentativa de elucidar sua estrutura terciária (para uma revisão, veja-se Kragh-Hansen, 1990), porém, foi só muito recentemente que resultados conclusivos de difração de raios-X foram apresentados, em resoluções de 2,8 Å [He e Carter, 1992] e 2,5 Å [Sugio *et al.*, 1999] (Figura 2.1), quer por limitações na resolução dos aparelhos até então disponíveis, quer pela obtenção de cristais com perfil de difração insatisfatório, quer ainda pela falta de reprodutibilidade dos experimentos. Na faixa de pH entre 4,5 — 8,0, a molécula de HSA tem a forma de coração, aproximadamente igual a um triângulo equilátero de lados ~ 80 Å e com ~ 30 Å de profundidade.

Uma outra característica da HSA consiste na posição das 17 pontes de dissulfeto (ligações S-S entre resíduos de cisteína adjacentes), que se dão quase exclusivamente entre segmentos helicoidais protegidos do solvente. A albumina é a única proteína conhecida cujo arranjo tridimensional depende inteiramente desse motivo estrutural. Isso talvez explique a notória estabilidade dessa proteína frente às condições desnaturantes mais adversas [Carter e Ho, 1994]. Interações hidrofóbicas entre as hélices conferem maior estabilidade à estrutura da proteína. (Figura 2.3).

Figura 2.3: Estrutura espacial de um dos três domínios da HSA, exibindo os motivos helicoidais [Carter e Ho, 1994].

II.2 – LIGAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS À HSA

II.2.1 – Princípios da ligação de centros metálicos às proteínas

O conceito HSAB (*hard and soft acids and bases*) [Pearson, 1969] é útil para a previsão de reações de compostos de coordenação. Os íons metálicos, tipicamente ácidos de Lewis, podem ser mais “duros” ou “moles” de acordo com, respectivamente, seu menor ou maior tamanho, sua carga e facilidade de polarização. Essa característica do íon metálico vai ditar as espécies do substrato biológico com as quais poderá se ligar com maior afinidade. Dois exemplos: o complexo K_2PtCl_4 apresenta um átomo de Pt(II), ácido mole, e portanto poderíamos esperar coordenação com bases igualmente moles como a sulfidri-la da Cys ou o tioéter da Met, e dificilmente com os grupos COO^- do Asp ou Glu. As metalotioneínas são proteínas com teor elevado (~ 30 - 35%) de Cys, portanto são sítios de coordenação preferencial para íons como Cd^{+2} , Hg^{+2} , Pb^{+2} e Tl^+ (e, realmente, uma das funções das metalotioneínas pode ser justamente a destoxificação do organismo desses metais) [Lippard e Berg, 1994].

As proteínas, em geral, oferecem vários tipos de sítios de coordenação para íons metálicos, duros ou moles. As cadeias laterais ligantes mais importantes são o grupo SH da Cys, o imidazol da His, o carboxilato do Asp e Glu, e o fenolato da Tyr (Figura 2.4). Ligantes menos freqüentes são a hidroxila da Ser/Thr, o tioéter da Met, a carboxamida da Gln/Asn, e a guanidina da Arg [Lippard e Berg, 1994]. Os grupos $\alpha-NH_2$ apresentam alta basicidade e permitem a estabilização de complexos por forte efeito de campo ligante. Existem sítios de ligação que envolvem o nitrogênio desprotonado do próprio esqueleto peptídico, embora os átomos de oxigênio desse esqueleto não pareçam ser sítios importantes. Além disso, as pontes S—S da cistina, abundantes na molécula de HSA, podem oferecer um sítio específico para ligação com metais [Sarkar, 1987].

Há situações em que os íons metálicos são os responsáveis pela sustentação estrutural de proteínas. É o caso, por exemplo, da glutamina sintetase, enzima que contém um número significativo de equivalentes de Mn^{+2} . Se os íons manganês (II) são removidos, observa-se uma perda de atividade catalítica, além de alterações em propriedades físicas como coeficiente de sedimentação e viscosidade intrínseca. Cátions metálicos podem, também, estabilizar conformações biologicamente importantes da proteína, como no caso da ativação da α -amilase por Ca^{+2} , e de numerosas outras proteínas como a conalbumina,

Figura 2.4: Alguns modos de ligação possíveis entre íons metálicos e aminoácidos.

transferrina, quimotripsina, ceruloplasmina e ferritina [Sarkar, 1987].

Complexos metálicos podem promover a dimerização de moléculas de proteínas. No seu estudo da interação do K_2PtCl_4 com a HSA, Trynda e Kuduk-Jaworska (1994) observaram a agregação da HSA. A massa molecular estimada sugeria a formação do dímero da HSA, unido por intermédio do metal (HSA-Pt-HSA) ou diretamente (HSA-HSA).

Além dos efeitos eletrônicos discutidos, recentemente demonstrou-se pela primeira vez que aminoácidos não-ligantes (isto é, não participantes do ambiente de coordenação do metal) também podem estabilizar um complexo metal-peptídeo através de efeitos *conformacionais* (Bal *et al.*, 1998b). Estes autores citam o caso da arginina vasopressina, um peptídeo que forma complexos 4N com Cu(II) cuja estabilidade é atribuída à flexibilidade da extremidade N-terminal, e sintetizaram um pentapeptídeo modelo para complexação com cobre (Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-NH₂), sendo cada um dos resíduos sistematicamente substituído por uma alanina, e os efeitos sobre a estabilidade do complexo foram observados. Caberia a questão de se a flexibilidade da extremidade N-terminal das albuminas não poderia ser usada da mesma forma para explicar, por exemplo, a estabilidade da ligação Cu(II)—DSA, a despeito da falta do crucial resíduo His na terceira posição desta proteína.

Finalmente, temos a dizer que uma terceira categoria de efeitos também é relevante para a explicação da estabilidade de sistemas metálicos (íons ou complexos) que interagem com a albumina e outras proteínas. Yamashita *et al.* (1990) mostraram que, a despeito da espécie metálica e do seu sítio exato de coordenação, um padrão qualitativo que se observou nas 23 metaloproteínas estudadas foi a ligação do metal em zonas de grande *contraste hidrofóbico*: o metal liga-se em uma região hidrofílica que, por sua vez, está encravada em uma região maior hidrofóbica. Os autores descreveram analiticamente esse fenômeno através de uma “função de contraste de hidrofobicidade”, *C*, avaliada a partir da estrutura da proteína. As regiões que apresentaram os valores máximos de *C* concordevam bastante bem com os sítios reais de coordenação dos cátions metálicos.

*Há mais coisas entre um metal e uma proteína
do que pode sonhar a nossa vã filosofia.*

II.2.2 – Ligação entre íons metálicos e a HSA

No que se refere ao transporte de metais, a albumina difere da grande maioria das outras proteínas, justamente por transportar várias espécies diferentes, com grande afinidade. Além de transportar grandes quantidades de Ca^{+2} e Mg^{+2} de uma maneira relativamente pouco específica, a HSA contém sítios de alta afinidade para Cu(II) , Zn(II) e Ni(II) [Sarkar, 1983]. A HSA liga-se fracamente com Al^{+3} [Harris, 1996] e em maior extensão ao Fe^{+3} , tendo neste caso provavelmente uma atividade antioxidante importante, por exemplo, em bebês prematuros, nos quais as concentrações de outras proteínas ligantes de metais (transferrina ou ceruloplasmina) são baixas [Loban *et al.*, 1997].

A molécula de HSA já teve sua estrutura subdividida em função da preferência dos tipos de ligantes por algum sítio específico. Carter e Ho (1994), depois de sistematizarem os resultados obtidos por vários autores, com seus dados de difração de raio-X, forneceram evidências praticamente “visuais” desses sítios de ligação. O consenso é que ligantes heterocíclicos pequenos, ácidos carboxílicos, compostos aromáticos e a bilirrubina têm afinidade por dois sítios entre os subdomínios IIA e IIIA (sítios de ligação I e II); ácidos graxos de cadeia longa teriam outros dois sítios de alta afinidade (ditos III e IV); e os íons metálicos teriam dois sítios *específicos* (embora muitos outros de menor especificidade distribuídos ao longo da molécula): o resíduo Cys34 (sítio V) e a sequência dos três primeiros resíduos da cadeia N-terminal (sítio VI).

a) Cys34

O grupo Cys34 liga-se preferencialmente com ácidos moles, como o Au(I) , Ag(I) , Hg(II) e Cd(II) e, em menor extensão, com o Cu(II) . No que se refere à distribuição de metalofármacos, é um sítio provável para coordenação da droga *auranofina* (v. seção II.3).

Esse resíduo apresenta o grupo SH mais reativo do organismo; na albumina nativa, ocorre com frequência bloqueado por cisteína ou glutatona, o que poderia ser uma forma natural de proteção contra dimerização da proteína. O resíduo Cys34 não está totalmente exposto; antes, encontra-se protegido por outros resíduos vicinais (Figura 2.5). A His39, um resíduo virtualmente conservado em todas as albuminas de mamíferos, possivelmente pode contribuir para a estabilização da forma ionizada Cys-S^- através de ponte de hidrogênio. O pK_{SH} da Cys34 é relativamente baixo (5, comparado com 8,5 e 8,9, respectivamente da cisteína e glutatona), o que permitiria uma maior capacidade seqüestrante de metais. Isso talvez explicasse a grande sensibilidade dos peixes à exposição a metais

como o Hg e Ag (na albumina de salmão, verificou-se que a Cys34 é substituída por um resíduo de serina) [Carter e Ho, 1994].

Figura 2.5: Localização do resíduo Cys34 da HSA, em uma fenda próxima à superfície da molécula. Nesse arranjo, o resíduo Cys34 está relativamente protegido por outros aminoácidos, como o Glu82 e a His49. Esse motivo estrutural é bastante conservado nas albuminas de mamíferos [Carter e Ho, 1994].

b) Seqüência N-terminal

A HSA contém um sítio de alta afinidade por Cu(II) e Ni(II), que compreende os três primeiros resíduos da seqüência N-terminal, onde os elementos fundamentais são:

- um grupo NH₂-terminal livre;
- um resíduo de histidina na terceira posição; e
- dois átomos de nitrogênio peptídicos intermediários (v. Figura 2.6).

Proteínas que apresentam esse motivo estrutural (batizado de *ATCUN* — *amino terminal Cu(II) and Ni(II) — binding motif*) ligam-se especificamente a Cu(II) e Ni(II), mas podem liberar esses íons facilmente pelo intermédio de ligantes apropriados, manifestando seu papel principal de transporte na HSA [Harford e Sarkar, 1997].

Nas albuminas em que o resíduo de His3 é trocado (como por exemplo na albumina canina), a afinidade por Cu(II) é menor, como foi observado por Dixon e Sarkar (1974) trabalhando com o peptídeo 1-24 da DSA (*dog serum albumin*), o que inclusive poderia ter implicações para a susceptibilidade que determinadas raças de cães apresentam à intoxicação por cobre. Entretanto, Masuoka e Saltman (1994) pela primeira vez relataram os

valores das constantes de ligação entre Cu(II) e a albumina canina inteira, apresentando o metal sob a forma de um quelato bem definido. Estes autores obtiveram $\log K = 10,17$; 11,03 e 11,18 para a ligação de Cu(II) com, respectivamente, albuminas canina, bovina e humana. Embora dez vezes menor, a constante de ligação para a albumina canina ainda sugere uma alta especificidade, e que outros grupos poderiam estar envolvidos na ligação com o metal, compensando a ausência da His3. As *proalbuminas*, variantes genéticas raras da HSA caracterizadas pela presença de um pró-peptídeo (usualmente ArgArg) não removido da sequência N-terminal, também podem apresentar baixo poder de ligação aos metais. A proalbumina tipo Nagasaki-3 apresenta a mutação His3 $\rightarrow$ Gln, com o conseqüente decréscimo de afinidade por metais [Takahashi *et al.*, 1987]. Porém, outras variantes dessas proalbuminas, como a Varese (onde o resíduo Arg² é mutado por uma histidina), podem exibir características excepcionais de ligação a íons metálicos [Kragh-Hansen *et al.*, 1994].

Figura 2.6: Estrutura do peptídeo GlyGlyHis-N-metilamida, modelo proposto do sítio de coordenação do Cu(II) em albuminas (motivo ATCUN), mostrando a conformação do peptídeo após a coordenação quadrado-planar do íon metálico [Carter e Ho, 1994]. Note-se a coordenação ao anel imidazólico através do N piridínico (N_δ), preferencialmente ao N pirrólico (N_ε; v. Figura 2.4), em condições fisiológicas. Quando não metalados, ambos os átomos são tautômeros [Sigel e Martin, 1982].

Os íons Cu(II) e Ni(II) na região de ligação ATCUN apresentam coordenação quadrado planar, o que pode ser avaliado tanto em solução como no plasma total através de RMN de próton para os resíduos Asp1-Ala2-His3-Leu4 [Berners-Price e Sadler, 1996].

É interessante notar que essa sequência N-terminal, na HSA, não tem uma estrutura cristalográfica definida, sendo bastante flexível [Carter e Ho, 1994; Sugio *et al.*, 1999].

Isso pode ser importante para ressaltar o papel de outros sítios de coordenação distribuídos ao longo da molécula, como veremos a seguir.

c) Outros sítios de coordenação

Goumakos *et al.* (1991) estudaram os modos e as constantes de ligação do Zn(II) e Cd(II) com HSA e DSA através das técnicas de ressonância magnética de ^{113}Cd e diálise de equilíbrio, mostrando que a albumina humana liga-se com aproximadamente 2 equivalentes de Cd(II) ($\log K = 5,3$) e 1 equivalente de Zn(II) ($\log K = 6,4$). Além disso, estudos de competição mostraram que há um sítio de alta afinidade para Cd(II) na HSA que não é afetado pela presença de Zn(II) ou Cu(II), e de um sítio de alta afinidade para Zn(II) que não é afetado por Cd(II) ou Cu(II). Tais sítios para esses metais, que apresentariam principalmente resíduos de histidila e carboxilatos, não seriam o mesmo sítio amino-terminal de alta afinidade para Cu(II), mas estariam mais internalizados, envolvendo principalmente ligantes com nitrogênio e oxigênio. Observações análogas foram feitas por Huai *et al.* (1996), determinando por espectroscopia FTIR com reflexão total atenuada o efeito da ligação de Zn(II) e Cd(II) sobre a conformação da HSA e da BSA, e concluindo que os sítios primários de ligação com esses cátions envolveria grupos C=O e C-N. Contudo, Yongqia *et al.* (1992), por espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (ESCA), acharam evidências do envolvimento de grupos cistinilas na ligação de íons Zn(II).

Yongqia *et al.* (1994), através de diálise de equilíbrio, determinaram que a HSA e a BSA são saturadas por 12 e 14 equivalentes de Zn(II), respectivamente. Calcularam todas as constantes de estabilidade sucessivas e, coincidindo com o trabalho de Goumakos *et al.* (1991), apresentaram os valores $\log K_1 = 5,3$ e $\log K_2 = 5,0$ (Zn(II)-HSA); e $\log K_1 = \log K_2 = 5,3$ (Zn(II)-BSA) (BSA = albumina bovina) para os sítios de alta especificidade.

Recentemente, Bal *et al.* (1998a) descreveram, por técnicas espectroscópicas, a estrutura do sítio de ligação *secundário* de Cu(II) de três albuminas: humana, bovina e suína. Esse sítio secundário não apresenta o motivo estrutural ATCUN, e parece ser tetragonal {2N, 4O}, provavelmente envolvendo os resíduos His105, His146 e His247. Regiões próximas aos dois primeiros resíduos histidílicos são ricas em Asp e Glu, fornecendo os grupos carboxilatos necessários para a ligação eficiente de Zn(II) e Cd(II), o que corrobora os dados de Goumakos *et al.* (1991).

Além disso, esse sítio secundário para Cu(II) é um sítio de ligação multi-metálico para Cu(II), Ni(II), Zn(II) e Cd(II). No caso da HSA, íons de Ni(II) competem com o Cu(II) pela ocupação desse sítio, formando um complexo aproximadamente 14 vezes mais es-

tável do que com o cobre. Competições contra Cu(II) análogas foram feitas com Zn(II) e Cd(II), obtendo-se estabilidades aproximadamente 8 e 21 vezes maiores para os íons de zinco e cádmio, respectivamente. Portanto, postula-se que esse sítio pode ser um alvo biológico importante de metais tóxicos como Ni(II), Cd(II) e outros semelhantes.

Nas três albuminas mencionadas, os dois primeiros átomos de cobre ligam-se especificamente, quer por quelação (motivo de ligação ATCUN), quer pela existência de um sítio pré-organizado. Os demais íons Cu(II) ligam-se muito mais fracamente a átomos de nitrogênio e oxigênio individuais na superfície da molécula. Portanto, mesmo albuminas sem um sítio de alta afinidade por Cu(II) podem ter um papel metabólico importante na distribuição e armazenamento desse metal.

II.3 – LIGAÇÃO DE METALOFÁRMACOS DO GRUPO DA PLATINA À HSA

De acordo com Kratz (1993), os complexos metálicos, quando interagem com proteínas, podem ser divididos, geralmente, nos seguintes tipos:

- a) complexos metálicos com um número definido de ligantes firmemente ligados ao metal (p.ex., N-heterocíclicos, β -dicetonas), e com alguns outros hidrolizáveis, cambiáveis com nucleotídeos biológicos, como haletos, sulfatos, nitratos, carboxilatos, etc;
- b) complexos metálicos nos quais ligantes mono, bi ou polidentados (por exemplo, aminas, fenantrolina, NTA, EDTA) preenchem completamente a esfera de coordenação do metal, estando também firmemente ligados:
  - b.1) se o metal é inerte e não há afinidade entre o metal e a proteína, a interação envolverá ligações fracas (van der Waals), e o complexo se comportará como uma molécula orgânica;
  - b.2) se houver afinidade metal—proteína, o complexo penetrará na região de ligação da proteína e os ligantes serão trocados.

Essa classificação estrutural, embora não contemple todos os fenômenos, é digna de nota, uma vez que praticamente *todos* os complexos metálicos *antitumorais* são do primeiro tipo: alguns ligantes lábeis são perdidos após a coordenação com a proteína, mas outros permanecem no complexo, podendo promover outras ligações, como por exemplo estabelecendo pontes com o DNA, e gerando uma subsequente atividade antitumoral (Kratz, 1993). Outras possibilidades seriam a promoção de alterações conformacio-

nais na proteína e a respectiva indução de uma resposta imunológica, ou ainda a desativação de sítios ativos por mudanças estruturais, etc.

Deve-se ressaltar que o estudo da interação de quaisquer drogas, também os metalofármacos, com a HSA, é fundamental para a compreensão das suas propriedades farmacológicas. As razões para isso foram citadas nos itens anteriores: a albumina é uma proteína abundante e multi-ligante; em princípio se esperaria que fosse dos primeiros alvos biológicos da molécula medicamentosa. A exceção notável seria apresentada pela droga que, depois de injetada, *não* apresentasse reações com essa proteína. Testes preliminares de comportamento químico dos fármacos no soro sangüíneo, portanto, são básicos para se prever eventuais efeitos colaterais, como por exemplo nefro ou hepatotoxicidade, indução de respostas alérgicas, partição pela barreira hematoencefálica, etc. Isso porque os medicamentos, e criticamente os complexos metálicos, devem preservar sua estrutura a fim de que se possa prever com razoável certeza o mecanismo de ação. O plasma sangüíneo é uma mistura de sais a 37°C, que contém uma gama enorme de proteínas, hormônios, aminoácidos, enzimas e ácidos graxos. Requer-se dos complexos metálicos, por exemplo, que não sejam hidrolizáveis nesse meio, nem formem precipitados, quelatos ou outras espécies estáveis que dificultem sua entrega às células-alvo. Além disso, complexos que induzam danos às estruturas protéicas (desnaturação ou polimerização) podem desencadear resposta imune. E finalmente, os metais do grupo da platina são ácidos moles, e apresentam toxicidade característica dos metais pesados (portanto, o requisito da estabilidade cinética e/ou termodinâmica no meio fisiológico é crucial para a eficácia terapêutica).

Sendo assim, e tendo-se em mente a importância do estudo das reações entre metalofármacos e proteínas do soro, conforme apresentado acima, depara-se com alguma surpresa com a quantidade de artigos da literatura que focalizam a atenção na ação dessas drogas sobre o DNA. Tal fenômeno, notório para o caso da cisplatina, deve-se ao fato de que, desde que se descobriu sua ação antitumoral no final da década de 60, tem-se acumulado uma quantidade razoável de evidências que sugerem a inibição da síntese do DNA como fator preponderante da sua atividade biológica (para revisões recentes, veja-se por exemplo Farrel, 1996; Bloemink e Reedijk, 1996; Whitehead e Lippard, 1996; Reedijk, 1996; Fontes *et al.*, 1997). E tal “tendência de estudo” é flagrante se observamos o enfoque dos trabalhos pioneiros que descrevem a ação de outros metalofármacos contemporâneos à cisplatina, como por exemplo os carboxilatos de ródio. Um dos primeiros estudos químicos realizados com esta família de complexos foi o da sua ligação com o DNA, ou com enzimas que interferem na sua síntese [Bear *et al.*, 1975, e Howard *et al.*,

1976], mas posteriormente percebeu-se que qualquer proteína com grupos amino não-protonados pode se constituir em sítios de coordenação para esses complexos [Dennis *et al.*, 1982a, e Bear, 1986] (veja-se o Capítulo I desta tese). Estudos recentes da interação de complexos de ródio com nucleobases foram publicados [Waysbort *et al.* (1993), Dunbar *et al.* (1994), Catalan *et al.* (1995), Kotsodimou e Katsaros (1996)].

Essa tendência de estudo é natural, porém Wang *et al.* (1996) chamam a atenção para a existência de outros sítios de ação biológica que, embora não excluam de fato a interação direta ou indireta com o DNA, também devem ser considerados para a adequada compreensão do efeito terapêutico, que seria a manifestação final de uma série de eventos quimicamente complexos. No caso da cisplatina, esses autores relacionam as seguintes evidências biomédicas para a existência de alvos não-DNA: indução de hemólise e reações alérgicas, ligação com proteínas do plasma, mediação de *stress* oxidativo e dano celular, ativação de macrófagos, e nefrotoxicidade típica de metais pesados (que inclui a inibição de enzimas críticas, ligação a grupos tióis, danos à membrana celular, etc). A cisplatina, como todos os ácidos moles, forma ligações rápidas e/ou estáveis com resíduos sulfurados (metionina e cisteína), algumas vezes irreversíveis. Daí que proteínas e peptídeos constituam-se em alvos bastante sensíveis. Uma experiência elegante de Beltrán *et al.* (1999) consistiu em apresentar a cisplatina a um composto híbrido histidina-deoxiguanosina (isto é, a uma molécula que oferecesse ao complexo metálico, ao mesmo tempo, as opções de coordenação com os nitrogênios imidazólicos da histidina e com o N7 da guanina — o sítio de coordenação por excelência da cisplatina no DNA). O resultado obtido foi interessante: dois quelatos isômeros nos quais a platina estava coordenada ao N7 e a um dos N imidazólicos da histidina. Nenhuma preferência do metal por qualquer desses N-doadores foi observada.

Inicialmente, os metalofármacos não-platínicos foram sintetizados com o objetivo de mimetizar a ação da cisplatina (ligação com guaninas e indução de dobra no DNA), embora relativamente poucos tenham conseguido. Metais pesados podem interferir com uma grande variedade de vias metabólicas, e recentemente tem sido dada ênfase cada vez maior à ação de tais compostos sobre outros alvos biológicos. Temos por exemplo, que alguns complexos de rutênio (v. abaixo) podem ocupar os sítios de Fe(III) em proteínas como a transferrina, e possuem ação antimetastática independente da ligação com DNA; metalocenos de titânio podem inibir proteinases; complexos de gálio podem inibir a ribonucleotídeo redutase; a ação antitumoral de complexos de estanho correlaciona-se com sua lipofilicidade [Clarke *et al.*, 1999]; e complexos de Pt(II) e Pd(II) possuem elevada afinidade por átomos de nitrogênio heterocíclicos, como a histidina [Tsiveriotis e Hadjilia-

dis, 1999], embora relativamente poucos estudos dessas interações cruciais tenham sido realizados.

Nesta seção, pretendemos apresentar uma breve revisão do estudo das interações da albumina com alguns complexos antitumorais de platina, ouro, rutênio e ródio.

II.3.1 – Complexos antitumorais de platina e a albumina

Numerosos estudos têm sido realizados sobre as interações entre complexos platínicos e a albumina humana, na busca por drogas análogas à cisplatina que tenham menores efeitos tóxicos (Figura 2.7). Se é verdade que ainda são relativamente poucos os metalofármacos na prática médica, por outro lado raras vezes se viu uma aplicação prática de um complexo estimular tanto o estudo da química de coordenação do metal como ocorreu com a cisplatina (Lippert, 1999).

Pizzo *et al.* (1988) estudaram as diferentes estereoespecificidades e seletividades da reação da *trans*-diclorodiaminoplatina(II) (transplatina) e da *cis*-diaminodicloroplatina(II) (cisplatina) sobre proteínas do plasma, dentre elas a albumina. Relataram que a carboxamidometilação da HSA (isto é, bloqueio do resíduo Cys34) não perturbava a coordenação da transplatina, impedindo, por outro lado, a reação da cisplatina. Isso foi a primeira evidência de que o resíduo Cys34 poderia se constituir em um sítio de ligação importante para a cisplatina na HSA, mas certamente não o único, uma vez que ainda não se sabia exatamente aonde a transplatina estava se ligando, embora houvessem evidências anteriores do envolvimento de resíduos de metionina (veja-se Pizzo *et al.* (1998) e referências).

A despeito do grande número de estudos, algumas incongruências persistiam na literatura, que esperavam uma explicação. Por exemplo, sempre se acreditou que a cisplatina ligar-se-ia irreversivelmente à HSA e o conjugado formado (cisplatina-HSA) não teria nenhum efeito terapêutico, ou ainda que não poderia se constituir num “depósito” dessa droga (veja-se, por exemplo, Cole e Wolf, 1980). Não obstante, há evidências clínicas de que a albumina desempenha um papel ativo na farmacocinética desse medicamento. Nanji *et al.* (1986) e Holding *et al.* (1992a) observaram que pacientes hipoalbuminêmicos não respondem adequadamente ao tratamento com cisplatina, apresentando nefrotoxicidade importante devido à exposição dos rins à cisplatina não-conjugada. Vreeburg *et al.* (1992) relatam o caso de um paciente que tinha os rins severamente comprometidos após quimioterapia convencional com cisplatina, mas que respondeu à injeção dessa droga pré-incubada com HSA. Holding *et al.* (1992b) iniciaram estudos clínicos fase 1 (em paci-

entes) do efeito do conjugado cisplatina-HSA para o tratamento de câncer na cabeça e no pescoço. Além disso, Hoshino *et al.* (1995) determinaram a citotoxicidade do conjugado cisplatina-HSA contra o carcinoma epidermóide humano A431. Finalmente, Kratz (1998) apresentou um registro de patente para o uso de conjugados antineoplásicos de transferrina e/ou albumina com cisplatina e outras drogas, e Sinn *et al.* (1996) solicitaram a patente do uso de conjugado de drogas com agentes quelantes e proteínas de transporte, como a albumina, para entrega sítio-específica de medicamentos.

Figura 2.7: Alguns complexos platínicos testados clinicamente.

Muito recentemente, Ivanov *et al.* (1998) realizaram um estudo exaustivo dos modos de coordenação da cisplatina sobre a HSA, através das técnicas de ressonância magnética bidimensional de ¹H e ¹⁵N (usando cisplatina marcada com ¹⁵N), cromatografia por filtração em gel, e comparação com a HSA recombinante (com maior conteúdo de tióis livres), entre outras. Concluíram que o resíduo Cys34 não é o único nem o mais importante sítio de ligação da cisplatina à HSA. Este seria um macroquelato envolvendo um resíduo de metionina (ligando-se à platina por átomos de S e N), e existiriam outros sítios monofuncionais envolvendo o enxofre de outras metioninas, e o próprio Cys34. Essas reações seriam complexas, e isso talvez fosse uma explicação para os resultados aparentemente contraditórios dos efeitos clínicos e das observações químicas anteriores, uma vez que diferentes modos de preparação do conjugado cisplatina-HSA poderiam conduzir a produtos diferentes.

Nesse mesmo ano, Neault e Tajmir-Riahi (1998) chegaram a conclusões semelhantes às de Ivanov *et al.*, estudando a interação da cisplatina com a HSA por FTIR. Os grupos polipeptídicos C-N, C=O e grupos de enxofre doadores estariam envolvidos na ligação.

A reação da cisplatina com proteínas é relativamente lenta ($t_{1/2} \sim 2 \text{ h}$)⁶, e é consistente com dois processos de primeira ordem: a substituição de um dos grupos cloreto por uma molécula de água, e o ataque dessa espécie carregada à proteína. A *tetraplatina* (tetracloro-1,2-diaminociclohexanoplatina(IV)) apresenta velocidade de reação ligeiramente maior ($t_{1/2} \sim 1,8 \text{ h}$) e a mesma ordem de ligação da reação da cisplatina, sugerindo que este complexo reage através de um ataque nucleofílico direto, sendo o ligante cloreto deslocado pela proteína (LeRoy e Thompson, 1989). A tetraplatina, além disso, é menos nefrotóxica que a cisplatina. Pelas diferentes velocidades de ligação com a proteína, menos tetraplatina estaria livre no plasma ou seria excretada pela urina, o que também poderia em parte explicar as observações de Daley-Yates e McBrien (1985) a respeito da baixa nefrotoxicidade da transplatina em relação à cisplatina, carboplatina ou iproplatina (após nove horas de diálise, praticamente toda a transplatina estava conjugada à proteína, contra $\sim 60\%$ para a cisplatina, 20% para a carboplatina e $\sim 10\%$ para a iproplatina).

II.3.2 – Complexos antitumorais de ouro e a albumina

Os complexos de ouro são comumente empregados no tratamento de artrites (*crisoterapia*), embora também apresentem alguma atividade antitumoral. Os exemplos melhor estudados são os complexos difosfínicos tetraédricos de ouro(I) e a *auranofina*, (trietilfosfina)(2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-beta-D-glucopiranosato-S-ouro(I)) (Figura 2.8) [Dhubhghaill e Sadler, 1993].

A HSA é responsável pela ligação de 80 a 95% do ouro no soro, funcionando como a proteína transportadora de fato (embora a hemoglobina e principalmente as metalotio-neínas também possam incorporar esse metal). A distância Au—S_{Cys34} (seu principal sítio de ligação) é de cerca de 2,28 - 2,30 Å. Além da auranofina, outros complexos biologicamente ativos de ouro com grupos cloreto de partida podem ligar-se também aos resíduos de His da HSA [Shaw, 1999]. Quando o ouro se liga à HSA, observa-se a abertura da cavidade onde se encontra a Cys34, que se moveria para uma região mais exposta ao solvente [Berners-Price e Sadler, 1996].

---

⁶ Para reações de primeira ordem, $t_{1/2} = \ln 2/k$ e a lei da velocidade é expressa por $-kt = \ln ([A]/[A_0])$ [Atkins, 1994, pp. 870-871].

Figura 2.8: Auranofina (*Ridaura*®), (trietilfosfina)(2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-beta-D-glucopiranosato-S-ouro(I)).

Roberts *et al.* (1996) determinaram as constantes de velocidade para a reação auranofina – HSA: o primeiro passo, de primeira ordem em relação à proteína, apresenta $k_1 = 3,4 \pm 0,3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, enquanto o segundo passo, mais lento, apresenta $k_2 = 2,3 \pm 0,3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e também é de primeira ordem em relação à HSA e de ordem zero em relação à auranofina. Como ocorre com vários complexos de ouro, a ligação da auranofina à HSA é rápida e termodinamicamente estável. Porém, um dos seus metabólitos importantes, o dicianoaurato(I), $\text{Au}(\text{CN})_2^-$, tem baixa afinidade por essa proteína, podendo ser uma fonte de ouro para o meio intracelular [Canumalla *et al.*, 1998].

II.3.3 – Complexos antitumorais de rutênio e a albumina

Vários complexos de rutênio com atividade antitumoral também têm sido investigados como possíveis alternativas aos compostos platínicos. Keppler *et al.* (1993) apresentaram uma revisão dos compostos testados.

Um dos compostos que tiveram suas interações com proteínas do plasma estudadas é o *trans*-indazolio-[tetraclorobisindazolrutenato(III)], ou Ru-Ind (Figura 2.9) [Keppler *et al.*, 1993; Kratz, 1993]. Tal complexo reage em poucos minutos com o soro total, sendo que a reação pode ser acompanhada espectrofotometricamente pelo surgimento de uma banda *d-d* em 585 nm.

Estudos de LPLC (*low pressure liquid chromatography*) mostram que a maior fração, 80 a 90% do complexo, apresenta-se coordenada à HSA, e o restante às globulinas, entre elas a transferrina (Tf). Como o rutênio no Ru-Ind apresenta-se no mesmo estado de oxidação que o Fe(III) (que possui alta afinidade pela transferrina na proporção 2:1 Fe(III):apoTf), supõe-se que o complexo antitumoral pudesse se ligar nesses sítios específicos. Essa hipótese foi confirmada inicialmente através de espectros de dicroísmo circular do Ru-Ind, que demonstraram que a apoTf liga-se especificamente a dois equivalentes de Ru-Ind. A albumina liga-se a 5 equivalentes do complexo. Moléculas adicionais do

complexo não produzem alterações nas bandas de dicroísmo circular, embora ambas as proteínas possam se ligar até a 10 equivalentes do complexo.

Figura 2.9: Ru-Ind, *trans*-indazolio-[tetraclorobisindazolrutenato(III)]

Smith *et al.* (1996) apresentaram estudos cristalográficos da interação de três complexos de rutênio com a apo-lactoferrina (proteína semelhante à apoTf), observando a existência de dois tipos de sítio de ligação: um de alta afinidade, no lobo N-terminal de alta especificidade para Fe(III), e outro de baixa afinidade, que parece envolver resíduos de His expostos da superfície da molécula.

O fato de o Ru-Ind ter alta afinidade pela apoTf sugeriu a possibilidade de se usar essa proteína como carregadora da droga para as células tumorais (pré-incubando o complexo com apoTf, e apresentando o conjugado ao tumor), baseado na observação de que as células tumorais expressam maior quantidade de receptores de Tf. Isso deu origem a uma série de estudos da atividade biológica dos conjugados entre drogas de rutênio e apoTf (veja-se por exemplo Kratz *et al.*, 1994; Kratz *et al.*, 1996, e Messori *et al.*, 1996). A ação antitumoral do conjugado correlaciona-se com a adequação espacial do complexo de Ru ao sítio de alta especificidade da proteína: conjugados onde o complexo não permite o “fechamento” do lobo N-terminal são menos ativos do que os que o permitem [Smith *et al.*, 1996].

Um complexo antitumoral análogo ao Ru-Ind, o imidazolio [*trans*-tetraclorobis(imidazol)rutenato(III)] teve suas interação com a HSA estudadas por métodos espectroscópicos e imunológicos [Trynda-Lemiesz *et al.*, 1999]. A ligação desse complexo na HSA induz perda de helicidade da proteína e dificulta a ligação de outros ligantes

como a warfarina (uma prova molecular específica para o subdomínio IIA da HSA) ou o heme. Observou-se supressão da fluorescência do Trp214 da HSA.

O complexo antitumoral dicloro-1,2-propilenodiaminotetraacetato de rutênio (III) (RAP) liga-se firmemente à albumina, apoTf ou Tf diférrica, embora ao que parece sem a mesma afinidade que o Ru-Ind, o que sugere o envolvimento de resíduos imidazólicos das superfícies das proteínas, como no caso das ligações de baixa afinidade do Ru-Ind com HSA ou apoTf [Vilchez *et al.*, 1998].

Recentemente, as interações do complexo Na[*trans*-RuCl₄(DMSO)(imidazol)] (Figura 2.9; um dos grupos imidazólicos é substituído por DMSO) com BSA foram estudadas por métodos espectroscópicos, indicando que a albumina reage rápida e estavelmente com esse composto, na proporção de 5:1, provavelmente através de resíduos de His (como os outros complexos de rutênio mencionados). Em vista disso, a albumina deve desempenhar um papel importante na biodisponibilidade dos complexos de rutênio, quer por desativação da droga, quer pelo transporte facilitado para sítios tumorais [Messori *et al.*, 2000].

II.3.4 – Complexos antitumorais de ródio e a albumina

Há relatos na literatura de estudos da interação entre complexos de ródio radioativos (¹⁰⁵Rh) e anticorpos monoclonais, com o objetivo de se obterem novas ferramentas para a radioimunodiagnose de câncer. Esse radionuclídeo possui características interessantes para uso clínico, como meia-vida de 35,5 horas (compatível com o tempo de residência dos anticorpos no tumor), inércia cinética e emissões β e γ adequadas para o monitoramento [Pillai *et al.*, 1990]. Normalmente, o radionuclídeo é incorporado em um quelato, que por sua vez possui grupos funcionais que permitem a ligação com o anticorpo. Como estas proteínas são relativamente caras e difíceis de serem obtidas, muitas vezes se escolhe a albumina (humana ou bovina) como modelo para se estudar a eficiência dessa conjugação. Realizaram-se trabalhos nesse sentido com os compostos ¹⁰⁵Rh-Cys [Lo *et al.*, 1990] e [¹⁰⁵Rh]Rh-4-(*p*-aminobenzil)-dietilenotriamina [Pillai *et al.*, 1990].

No que se refere à ligação de complexos diméricos à albumina, Bear *et al.* (1975) investigaram quais proteínas poderiam se constituir em alvos biológicos para o Rh₂(ac)₄ através de diálise de equilíbrio. Observaram que ocorria ligação entre esse complexo e a BSA, além de nucleotídeos, polinucleotídeos, ribonuclease A e RNA desnaturado (Capítulo I).

Trynda e Pruchnik (1995) realizaram os primeiros estudos exaustivos das interações entre $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ e a HSA. A proteína, neste estudo, foi tratada de forma a remover os ácidos graxos que permanecem ligados após todo o processo de separação da albumina do plasma sanguíneo e das purificações subseqüentes. A titulação espectrofotométrica do complexo sobre a HSA mostrou que aproximadamente 8 equivalentes de $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ ligam-se por equivalente de HSA. Os autores sugerem que os resíduos de His sejam os sítios de coordenação para o complexo (baseado no λ_{max} da transição Rh-Rh em 545 nm), seguindo as conclusões de Dennis *et al.* (1982a), embora não se tenha discutido (a) a possibilidade de interação com resíduos de metionina, que têm alta afinidade por metais pesados; e (b) a possibilidade de labilização dos ligantes equatoriais, na proteína, por resíduos com ácidos carboxílicos na cadeia lateral, como glutamato e aspartato. De acordo com os resultados de dicroísmo circular (DC), o complexo $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ provoca perda de 8 a 18% da helicidade da HSA, conforme a razão molar complexo:proteína aumenta de 1:1 até 10:1. O produto final dessa reação mostrou-se mais resistente à desnaturação por ureia e menos sensível ao teste de imunoprecipitação, o que sugere desnaturação da região antigênica e conseqüente perda de complementaridade antígeno-anticorpo.

Posteriormente, esses mesmos autores estudaram com detalhe a interação do complexo $[\text{Rh}_2(\text{ac})_2(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ac})_4$ com a HSA tratada [Trynda-Lemiesz e Pruchnik, 1997]. Tanto a reação do complexo com His quanto com HSA apresentou perfis espectroscópicos semelhantes, com a banda 1 (transição Rh-Rh) deslocada para 470 nm. Além disso, o espectro de DC na região do ultra-violeta para o sistema $[\text{Rh}_2(\text{ac})_2(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ac})_4\text{:HSA}$ (10:1) indicou aproximadamente 25% de perda de α -hélice da proteína. Esse complexo também suprimiu a fluorescência do resíduo de Trp na posição 214 da HSA, levando os autores a sugerirem que a ligação do complexo próximo desse sítio exporia o Trp a um ambiente mais hidrofílico. Evidências adicionais da ligação do complexo nas proximidades desse resíduo foram dadas pela redução da ligação da warfarina no sistema $[\text{Rh}_2(\text{ac})_2(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ac})_4\text{—HSA}$. Outros ligantes endógenos, como o heme e a bilirrubina, também tiveram suas ligações perturbadas no sistema $[\text{Rh}_2(\text{ac})_2(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ac})_4\text{—HSA}$. A incubação de $[\text{Rh}_2(\text{ac})_2(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ac})_4$ com HSA (10:1) seguida de cromatografia em gel de Sephadex G25 mostrou que 6-7 moléculas do complexo de ródio ligam-se à proteína.

III – OBJETIVOS

“Detailed knowledge of the reactions of the new platinum compounds on their complicated route from injection to the DNA of the tumour cell will be crucial for this development, and will supply a number of major challenges for coordination chemists and many other scientists in the coming years.”

— Reedijk, 1996

A tese defendida neste trabalho é a de que a albumina pode se constituir em um dos principais alvos biológicos para os complexos de ródio(II), às custas de relativamente poucas alterações estruturais no biopolímero, estando envolvida no transporte e/ou remoção dessas drogas pelo organismo.

Para a comprovação dessa tese, foram realizados os seguintes experimentos⁷:

- i* - avaliação da ligação de um complexo de ródio pelo plasma total humano;
- ii* - acompanhamento espectroscópico (UV-visível, dicroísmo circular e fluorescência) da reação entre uma série de complexos de ródio(II) e a albumina;
- iii* - estudo da partição dos complexos de ródio com células tumorais *in vitro*, na presença ou ausência de albumina; e
- iv* - estudo da atividade biológica de um complexo de ródio ($\text{Rh}_2(\text{CF}_3\text{CONH})_4$) pré-conjugado à albumina, sobre camundongos portadores de ascite de Ehrlich.

São sugeridas interpretações para as correlações observadas entre a estrutura dos complexos metálicos e seus perfis de reação com a proteína.

Paralelamente, realizamos um breve estudo histopatológico em camundongos tratados com $\text{Rh}_2(\text{CF}_3\text{CONH})_4$, onde descrevemos os danos teciduais promovidos por esse complexo, que deverão ser considerados para eventuais aplicações clínicas. O interesse por este composto específico advém dos trabalhos anteriores [Espósito, 1997] de busca de novos complexos de ródio(II) que apresentassem perfis de solubilidade mais adequados em meio fisiológico, bem como ligantes que facilitassem a incorporação do metalofármaco à célula tumoral.

A motivação última deste trabalho de apresentação de vários complexos metálicos a uma proteína tem duas faces. Em primeiro lugar, a busca da compreensão do(s) fator(es) envolvido(s) na entrega de metalofármacos aos seus alvos biológicos, e as reações do organismo ao complexo metálico xenobiótico. E, em segundo lugar, a tentativa de alcançar competência no estudo de sistemas metálicos interagindo com biopolímeros, o que nos abriria horizontes para o estudo de outros sistemas como por exemplo as metaloenzimas, as proteínas de estoque de metais, a regulação nutricional de metais, a toxicidade induzida por íons metálicos, etc.

---

⁷ Resultados publicados por Espósito *et al.* (1999b) e Espósito *et al.* (2000).

IV – MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1 – REAGENTES

A albumina humana fração V (96 - 99%), A1653, foi comprada da Sigma e utilizada sem maiores purificações. Uma amostra de albumina humana estéril a 20% de uso clínico (Instituto Grifols S.A., Barcelona, Espanha)⁸ foi empregada nos testes *in vivo*. As concentrações de todas as soluções protéicas em tampão fosfato (pH = 7,4) foram determinadas espectrofotometricamente através da relação

$$[\text{HSA}] / \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} = 1,55 A_{280} [\text{Dunn, 1994a}],$$

salvo onde explicitamente notado o contrário. Em todos os cálculos, assumiu-se para a HSA uma $M_r = 66439$ [Kragh-Hansen, 1990].

$\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, CF_3CONH_2 (97%) e $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ foram comprados da Aldrich e utilizados como recebidos, exceto a trifluoroacetamida, que foi sempre seca à vácuo (35°C) por meia hora antes do uso. Os demais carboxilatos de ródio, $\text{Rh}_2(\text{pr})_4$, $\text{Rh}_2(\text{but})_4$ e $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$ foram preparados por métodos descritos [Nothenberg *et al.*, 1991] e usados do estoque do laboratório.

O complexo $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ foi preparado através da reação de fusão entre o acetato de ródio e a amida correspondente, de acordo com o método de Dennis *et al.* (1982b), com pequenas alterações descritas por Espósito *et al.* (1997). O composto azulado foi analisado por microanálise elementar (Fórmula $\text{Rh}_2(\text{CF}_3\text{CONH})_4(\text{H}_2\text{O})(\text{CH}_3\text{OH})$: % calculado: C=15,36; H=1,43; N=7,96; % experimental: C=15,13; H=1,06; N=8,25), e ^1H -RMN em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, observando-se um singleto em $\delta = 6,72$ ppm vs. TMS, característico dos prótons N-H [Dennis *et al.*, 1982b]. Ambas as análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP (RMN: aparelho DRX 500).

Soluções estoque 10^{-3} M desses complexos foram preparadas pela diluição em água deionizada das massas adequadas de cada composto. Devido à sua insolubilidade, a solução de $\text{Rh}_2(\text{but})_4$ recebeu 3% v/v de etanol, o que não interferiu nas suas interações com a HSA. Evitou-se nos tampões a presença de íons Cl^- , que formam precipitados com o complexo $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ [Dennis *et al.*, 1982b]. Tris ou hepes, tampões comuns de soluções biológicas, são potenciais coordenantes de complexos metálicos [Prenzler e McFadyen, 1997]. A fim de simplificar os procedimentos experimentais, essas substâncias não foram utilizadas. Soluções de $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$ foram preparadas sempre que necessário, dada a insta-

⁸ Gentilmente cedida pelo Dr. Antonio C. Magnanelli, da Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo.

bilidade do complexo em meio aquoso. As concentrações dos complexos foram confirmadas por fotometria ou por espectroscopia de emissão atômica com plasma de argônio (ICP-AES, Spectroflame Modula), utilizando-se a linha de emissão de Rh em 343,489 nm com padrão de emissão atômica de ródio da Aldrich.

Tampão fosfato pH = 7,4 foi preparado através de diluições de soluções-estoque de Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 (Synth do Brasil), com água deionizada. Tampão PBS (*phosphate buffered saline*) consiste em NaCl 0,85% em tampão fosfato 150 mM, pH 7,2.

O *n*-octanol 99,5% foi comprado da Synth do Brasil e o Tween®-80 foi da J.T. Baker, Inc.

IV.2 – LIGAÇÃO DO $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ COM O PLASMA TOTAL

IV.2.1 – Extração com sal

As proteínas do plasma podem ser fracionadas em função da sua solubilidade, através do aumento gradual da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e posterior diálise dos precipitados. No caso da albumina, através dessa técnica bastante simples é possível obter um produto de pureza ao redor de 95%.

Em tubos de ensaio, as amostras do soro foram saturadas a 50% com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, adicionando-se um volume de solução 100% saturada de sulfato de amônio dado pela equação:

$$V = \frac{V_i(C_f - C_i)}{100 - C_f} \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

V = volume da solução 100% saturada a acrescentar

V_i = volume inicial da solução problema

C_i = porcentagem de saturação inicial de sulfato de amônio na solução problema

C_f = porcentagem de saturação final desejada na solução problema.

Os tubos foram mantidos em geladeira por uma noite, e centrifugados a 2500 rpm por 20 minutos em seguida. Os sobrenadantes foram transferidos com pipetas de Pasteur para provetas, e saturados a 75% com sulfato de amônio com volumes da solução saturada, como descrito acima, sendo repetido o mesmo processo de precipitação e centrifugação. A fração protéica obtida consiste principalmente em albumina.

Os sobrenadantes foram removidos com pipetas, e os precipitados foram dissolvidos em 2,0 ml de solução de NaCl 2%. Essas soluções salinas foram dialisadas por 24 horas a temperatura ambiente contra 2 litros de água destilada.

IV.2.2 – Eletroforese em gel

Em pH's diferentes do seu ponto isoelétrico (pI), as proteínas são moléculas carregadas eletricamente, e portanto passíveis de migração em um campo elétrico. Essa propriedade é útil para as separações eletroforéticas.

O sistema eletroforético mais comum nos laboratórios bioquímicos consiste na migração por um gel de poliacrilamida (PAGE, do inglês para *polyacrilamide gel electrophoresis*) na presença do detergente aniônico dodecilsulfato de sódio (SDS). A estratégia é submeter a proteína a condições desnaturantes, de modo que a sua migração pelo gel seja função apenas do seu tamanho [Dunn, 1994b].

Os géis de poliacrilamida são formados pela copolimerização do monômero com um agente de *cross-linking*, normalmente a *N,N'*-metilenobisacrilamida (Bis), sendo possível regular o tamanho do poro pela concentração do monômero (%T) e do agente de *cross-linking* (%C). Géis a 10%T separam proteínas na faixa de 15 a 200 kD. A polimerização do gel é iniciada com persulfato de amônio e *N,N,N',N''*-tetrametiletilenodiamina (TEMED). Antes da corrida no gel, a amostra é desnaturada pela reação a quente com SDS e 2-mercaptoetanol (2-ME), este último para clivar as pontes de dissulfeto.

Neste ensaio, a concentração das proteínas foi determinada pelo método de Lowry [Lowry *et al.*, 1951], que consiste basicamente na reação com cobre(II), seguida pela redução do ácido fosfomolibdicofosfotúngstico ao azul de heteropolimolibdênio, o que equivale ao método de Biureto acoplado ao uso do reagente de Folin-Ciocalteu [para detalhes, v. Dunn, 1994a].

IV.2.3 – Condições experimentais

a) Incubação e diálise do plasma

20 ml de sangue foram coletados de um voluntário humano saudável, sendo centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos após a coagulação em tubos de ensaio. O plasma foi removido com pipetas Pasteur e separado em alíquotas (4 x 2,0 ml e 1 x 1,0 ml), sendo mantido em refrigerador enquanto não estivesse em uso. Todo o material que teve contato com sangue e/ou plasma (tubos de ensaio, pipetas, tubos de centrifuga, ponteiros) foi tratado com água sanitária por 24 horas, enxaguado e lavado com HCl 1:1 por 2 minutos.

Em seguida, três alíquotas de plasma (1,85 ml) foram incubadas com 0,5 ml de solução de $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ $1,0 \times 10^{-3}\text{M}$ por 0, 2 e 24 horas em banho-maria a 37°C, sendo armazenados na geladeira até o momento do fracionamento. Seguiu-se então o método do *salting-out* com sulfato de amônio, descrito acima, permitindo a sedimentação da fração de albumina por 24 h a 4°C.

As frações de albumina com 0, 2 e 24h de incubação (chamadas daqui por diante de A_0 , A_2 e A_{24}) foram ressuspensas em NaCl 2% e dialisadas contra 2 litros de água des-

tilada por 24 horas a temperatura ambiente. No final, o conteúdo dos sacos de diálise foi removido com pipetas Pasteur e encaminhados para a eletroforese.

b) Eletroforese em gel (SDS-PAGE)

Os experimentos de eletroforese mini-gel SDS-PAGE foram realizados em sistema Bio-Rad, com amperagem constante (25 mA), sendo aplicados no gel 2 µg de proteínas em cada poço do gel de contenção. A dosagem de proteínas foi feita pelo método de Lowry, utilizando-se espectrofotômetro Beckman DU-70 para a leitura das absorções em 620 nm.

A composição do gel, do sistema desnaturante e do tampão⁹ foram:

<i>Gel de separação a 10%T (30 ml):</i>	<i>Gel de contenção (stacking gel) a 5%T (10 ml):</i>
11,9 ml H ₂ O 10,0 ml mix acrilamida 30% ^a 7,5 ml Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) 0,3 ml SDS 10% 0,3 ml persulfato de amônia 10% 0,012 ml TEMED	6,8 ml H ₂ O 1,7 ml mix acrilamida 30% ^a 1,25 ml Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) 0,1 ml SDS 10% 0,1 ml persulfato de amônia 10% 0,01 ml TEMED
<i>Sistema desnaturante (10 ml):</i>	<i>Tampão de corrida (pH 8,3)</i>
1 g SDS 2 ml glicerol 2 ml azul de bromofenol 0,1% ^b 1,25 ml Tris-HCl 1 M (pH 6,8) 2 ml 2-ME H ₂ O qsp 10 ml	188 g glicina 30,2 g Tris 10 g SDS

^a 29% acrilamida + 1% Bis

Tanto os testes prévios como as corridas finais de eletroforese foram realizados nas instalações do Laboratório de Cromatografia, Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo.

c) Dosagem de Rh

Alíquotas das frações de albumina empregadas na eletroforese foram diluídas para um volume final de 3,0 ml com NaCl 2%, com vistas à detecção do ródio pela técnica de emissão atômica.

⁹ De acordo com o procedimento adotado pelo Laboratório de Cromatografia, FPS, HSP.

IV.3 – ESPECTROFOTOMETRIA

IV.3.1 – Titulação espectrofotométrica

Nos experimentos de titulação espectrofotométrica, o material de referência para todas as curvas foi uma solução de HSA, varrendo-se apenas a região visível (posto que os complexos de ródio estudados apresentam elevada absorção no UV, na mesma região da HSA). Os espectros foram registrados após um tempo de reação de 2 minutos, a 60 nm/min. Após cada adição de alíquotas do complexo, a relação molar entre o complexo metálico e a proteína foi determinada pela Equação 2:

$$\bar{n} = \frac{n_{\text{Rhclx}}}{n_{\text{HSA}}} \quad (\text{Equação 2})$$

onde n = número de mols. A intensidade da banda 1 ($\lambda_{\text{máx}}$), que corresponde à transição $\pi^* \rightarrow \sigma^*$, foi monitorada para se construírem as curvas de titulação. Fixamos o valor de $\lambda_{\text{máx}}$ para a situação em que $\bar{n} = 1,0$.

IV.3.2 – Cálculo das constantes de ligação

Assumindo-se que existe apenas um tipo de interação entre os complexos de ródio e a HSA, as constantes de ligação podem ser calculadas a partir do método descrito por Stephanos (1996). Nessa situação, podem-se estabelecer as equações

e

$$K = \frac{[\text{HSA}:\text{Rh}_2(\text{L})_4]}{[\text{HSA}][\text{Rh}_2(\text{L})_4]} \quad (\text{Equação 4})$$

O gráfico de $1/(A-A_0)$ versus $1/L_0$ é linear, sendo A_0 a absorbância inicial da proteína no comprimento de onda da transição Rh-Rh (banda 1, ~500 nm) (e portanto igual a zero) e A a absorção registrada a cada incremento na concentração do complexo de ródio (L_0). A constante de ligação K pode ser estimada pela relação entre o coeficiente linear e o coeficiente angular.

Esse método foi usado para o cálculo de K de diversas interações droga — proteína, e concretamente para a determinação de K para a associação entre cisplatina e HSA [Neault e Tajmir-Niahi, 1998].

IV.3.3 – Condições experimentais

Os espectros eletrônicos foram registrados em um espectrofotômetro Hitachi U3000, operando na região visível (350 - 750 nm) com cubetas de vidro e na região do ultra-violeta (200 - 350 nm) com cubetas de quartzo. Caminho óptico: 1 cm. Sempre que as cubetas foram utilizadas com soluções contendo proteínas, foram tratadas com solução sulfocrômica por 30 segundos, seguindo-se abundante lavagem com água destilada.

IV.4 – DICROÍSMO CIRCULAR

IV.4.1 – Base molecular do poder rotatório

Num estado de polarização circular, o fóton pode ter duas *helicidades* diferentes, à direita e à esquerda (Figura 4.1) [Shriver *et al.*, 1994, pp.604-605].

Figura 4.1: O fóton pode ser circularmente polarizado, em dois componentes definidos de momento angular ao longo do seu eixo de propagação [Shriver *et al.*, 1994, p.604].

Moléculas quirais, como os polipeptídeos helicoidais ou alguns complexos metálicos pequenos (cuja estrutura pode ser considerada como o fragmento de uma hélice, Figura 4.2) apresentam o fenômeno do *dicroísmo circular*. Ou seja, essas moléculas possuem diferentes coeficientes de absorção ϵ para luz polarizada à esquerda (ϵ_L) ou à direita (ϵ_R). Um espectro de dicroísmo circular (DC) é uma representação gráfica de $\Delta\epsilon$ ($\epsilon_L - \epsilon_R$) *versus* o comprimento de onda [Shriver *et al.*, 1994, pp. 604-605; Atkins, 1994, pp.702-703; Hay, 1984, pp. 48-51].

Figura 4.2: Configuração absoluta Λ e Δ de dois isômeros octaédricos *tris*-bidentados [Hay, 1984, p. 49].

Espectros de DC são comumente empregados em química de coordenação para a caracterização de enantiômeros, posto que a espectroscopia de absorção eletrônica convencional não permite essa diferenciação. Além disso, no estudo de metaloenzimas, também os espectros de DC são muito mais sensíveis a pequenas dissimetrias ao redor do sítio de coordenação do íon metálico.

As α -hélices da HSA são intrinsecamente assimétricas, e a diminuição das intensidades das bandas de DC dessas estruturas, após a coordenação com os complexos de ródio, será usada como medida da desnaturação protéica induzida por estes compostos.

O espectro de DC de proteínas e peptídeos, embora seja uma técnica restrita no sentido de não permitir atribuições de estruturas inequívocas às moléculas, é em todo caso um guia preliminar de conformações e mudanças conformacionais dessas substâncias dentro de uma ampla faixa de condições. No caso de proteínas e peptídeos, há pelo menos três tipos de assimetria que podem conduzir à atividade ótica [Van Holde, 1975; Nakanishi *et al.*, 1994]:

a) A estrutura primária (esqueleto polipeptídico) é normalmente assimétrica (isto é, os $C\alpha$ normalmente têm quatro substituintes diferentes). As transições observadas ocorrem principalmente em duas regiões: 180 - 200 nm (transição π - π^* permitida, ϵ elevado) e 210 - 230 nm ($\epsilon_{\max} < 100$).

b) As estruturas secundárias em muitos casos são helicoidais (α -hélices), como vimos. Há uma dependência direta entre o comprimento da hélice e a amplitude do sinal de DC, pois há maiores chances de acoplamento entre as transições π - π^* entre os diferentes resíduos. Avalia-se a porcentagem de α -hélices em um peptídeo ou proteína pelo valor padronizado de $[\theta]_{222}^{10}$.

c) A estrutura terciária pode ser tal que induza a distorções em ambientes que de per si não apresentariam atividade ótica. É o caso típico do incremento do sinal de DC do anel aromático da tirosina, quando este resíduo encontra-se “enterrado” em ambientes assimétricos que distorçam a nuvem eletrônica, como ocorre em algumas imunoglobulinas.

---

¹⁰ $[\theta]$ é a *elipticidade molar*, dada em graus.cm²/dmol. Pode ser assumida como uma medida do dicroísmo circular da substância, pois $[\theta] = 3300 \Delta\epsilon$ ($\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$).

IV.4.2 – Estimativa da conformação de proteínas a partir de DC

Existem vários métodos descritos para extrair informações sobre a conformação da proteína em solução dos dados de DC. Basicamente, todos esses métodos assumem que o espectro da proteína pode ser representado por uma somatória dos espectros dos elementos de estrutura secundária (α -hélice, β -turno e folhas β), mais a contribuição de um “termo de ruído” que inclui a contribuição dos cromóforos aromáticos [Greenfield, 1996].

Tais métodos computacionais baseiam-se em diferentes algoritmos e são mais ou menos especializados para um determinado motivo estrutural (para uma revisão dos métodos computacionais, v. Greenfield, 1996).

O método auto-consistente (SELCON), descrito originalmente por Sreerama e Woody (1993), foi escolhido neste trabalho para o cálculo das porcentagens de elementos secundários, posto que é recomendado para o estudo de proteínas globulares em solução, fornecendo correlações bastante boas entre as porcentagens previstas e encontradas desses motivos estruturais [Greenfield, 1996].

O método SELCON compara 17 proteínas de sua base de dados (conhecidas espectral e cristalograficamente) com o espectro a ser analisado, excluindo sistematicamente as menos semelhantes. Uma estimativa inicial da estrutura da proteína-problema é feita, e esse espectro é incorporado na base de dados para posterior deconvolução, que por sua vez é incorporada na base de dados no lugar da estimativa inicial, e assim sucessivamente até que a auto-consistência seja atingida. O programa utilizado para a análise dos dados foi o SELCON2 [Sreerama e Woody, 1994].

IV.4.3 – Condições experimentais

Os espectros de DC da HSA nativa ou incubada com os complexos de ródio foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco J720, com fonte de Xe, na região de 195 – 260 nm, com velocidade de varredura de 50 nm/min. Foram empregadas cubetas de quartzo de 0,5 mm de caminho óptico, lavadas com solução sulfocrômica (para eliminar os traços da proteína) por 30 segundos e água em abundância.

IV.5.1 – Fluorescência de materiais biológicos

A espectroscopia de fluorescência é uma das ferramentas mais interessantes para o estudo de sistemas biológicos, uma vez que proteínas, peptídeos e outras biomoléculas freqüentemente apresentam sondas fluorescentes intrínsecas, ou podem estar associadas a espécies (p. ex. NADH, FADH₂) que funcionam como sondas fluorescentes extrínsecas. Essas sondas permitem conhecer características estruturais da proteína como a distância entre sítios internos, existência de conformeros e grau de exposição ao solvente [Eftink, 1991].

Das sondas intrínsecas de fluorescência, as mais importantes são os resíduos de triptofano (Trp), tirosina e fenilalanina (Figura 4.3). Proteínas que contêm esses três resíduos são chamadas de *tipo B*; e as que contêm apenas tirosina e fenilalanina são ditas do *tipo A*. O resíduo de Trp pode ser seletivamente excitado (posto que possui uma forte absorção entre 280 - 300 nm, e os demais fluoróforos são excitáveis em comprimentos de onda menores), com o maior rendimento quântico (que permite medidas acuradas mesmo com nanomols do analito), e tem sua luminescência fortemente dependente da vizinhança química [Ito, 1994]. Portanto, o estudo da fluorescência do Trp em especial é muito útil para a HSA, que possui apenas um resíduo desse aminoácido, na posição 214.

Figura 4.3: Fluoróforos naturais das proteínas e peptídeos.

Moléculas semelhantes ao Trp apresentam máximo de emissão ($\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}}$) ao redor de 350 nm em meio aquoso, embora grupos substituintes no indol possam alterar drasticamente essa posição. Em proteínas que possuem Trp, a posição de $\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}}$ varia com o grau de exposição ao solvente: em meio apolar (hidrofóbico), os níveis eletrônicos a partir dos quais ocorre a transição são menos estabilizados, portanto a diferença de energia entre o estado excitado e o fundamental é maior, e conseqüentemente $\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}}$ será deslocado para regiões de maior energia, ou menor comprimento de onda. Em se passando de

um meio polar (aquoso) para um apolar, observa-se um característico “deslocamento para o azul” [Ito, 1994].

No caso da HSA, a excitação com luz de λ entre 295 e 305 nm produz um espectro puro de emissão do Trp, de $\lambda_{\text{máx}}$ dependendo apenas das propriedades do ambiente ao redor desse resíduo [Steinhardt *et al.*, 1971], que é uma “fissura” hidrofóbica [v. Moriyama *et al.*, 1996 e referências internas].

IV.5.2 – Supressão de fluorescência

No presente estudo, nosso interesse consistiu em acompanhar as interações dos complexos de ródio com a HSA através da *supressão da fluorescência* do resíduo Trp214 promovida pelas espécies metálicas. Uma vez que a localização do Trp no arcabouço protéico é já conhecida, as alterações efetivadas pelos complexos sobre a sua fluorescência poderão dar-nos informações a respeito dos seus possíveis sítios de ligação.

Um fluoróforo pode ser desativado através dos seguintes caminhos [Eftink e Ghiron, 1981; Somogyi e Lakos, 1993]:

- decaimento por emissão de fóton:

- decaimento por processos independentes, como supressão interna:

- decaimento pela presença de um supressor colisional Q:

Com iluminação contínua de baixa intensidade, apenas uma pequena fração do fluoróforo estará no estado excitado e portanto a intensidade de fluorescência será proporcional à concentração do fluoróforo. Tal sistema estacionário pode ser descrito pela equação de Stern-Volmer dada por:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] \quad (\text{Equação 8})$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência ou presença do supressor Q (neste caso, um dos complexos de ródio), e K_{sv} é a constante Stern-Volmer (que indicará as diferentes eficiências supressoras dos complexos de ródio). Portanto, o gráfico (F_0/F) versus $[Q]$ é uma reta cujo coeficiente angular é K_{sv} .

Existe uma outra relação útil:

$$k_q = \frac{K_{SV}}{\tau_0} \quad (\text{Equação 9})$$

onde τ_0 é o tempo de vida do estado excitado e k_q é a constante cinética bimolecular da supressão. Para a HSA, $\tau_0 = 6,0$ nanossegundos [Lakowicz e Weber, 1973].

Supressores comumente empregados no estudo de proteínas desconhecidas são o O_2 (molécula pequena e neutra, penetrando através da proteína e atuando como um inibidor indiscriminado), a acrilamida (molécula neutra embora de dimensões maiores) e o iodoeto (polar e de raio grande, suprimindo apenas resíduos expostos ao solvente). O uso concertado dos três permite determinar a situação química do fluoróforo.

Íons de metais de transição ou lantanídeos algumas vezes são usados como supressores de fluorescência (para uma revisão, v. Chen, 1976), podendo atuar pela formação de ligações com grupos SH, ou por transferência eletrônica após a ligação a certos sítios [Eftink e Ghiron, 1981].

IV.5.3 – Condições experimentais

Os espectros de emissão do Trp214 da HSA foram registrados em cubetas de quartzo (1 cm) em um espectrofluorímetro SPEX-Fluorolog 2 com monocromadores SPEX 1680 de 0,22 m (fendas: excitação: 4 mm; emissão: 0,5 mm), filtro de 370 nm e lâmpada de Xe de 450 W como fonte de excitação, sendo todo o aparelho controlado pelo computador espectroscópico DM3000F. A amostra foi excitada em 300 nm e a leitura da emissão de fluorescência foi feita na faixa entre 350 e 500 nm após 2 minutos.

IV.6 – PARTIÇÃO

IV.6.1 – Solubilidade dos complexos em *n*-octanol

2,0 ml de solução de cada um dos complexos de ródio(II) foram diluídos com água destilada a 3,0 ml e tiveram seus espectros de absorção no visível registrados. Cada solução recebeu em seguida 100 μ l de *n*-octanol, e foram agitadas manualmente por 30 segundos. As fases aquosas foram removidas com pipetas Pasteur e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, esperando-se 24 horas a 4°C que eventuais emulsões formadas (caracterizadas pela turbidez após a agitação) fossem quebradas. As fases aquosas extraídas foram removidas com pipetas Pasteur e tiveram suas absorções no visível registradas. Quando necessário, procedeu-se à diluição das fases aquosas extraídas para que os espectros pudessem ser registrados (volume mínimo da cubeta = 3,0 ml).

IV.6.2 – Partição com células

As partições dos complexos de ródio com células tumorais foram determinadas na presença e ausência de HSA. Nos experimentos sem proteína (“branco”), substituímos a HSA por água destilada, seguindo exatamente o mesmo procedimento.

Tomamos 5 alíquotas de 0,5 ml de solução de HSA 3,7 mg/ml, incubando cada uma delas com 0,1 ml de solução do complexo de ródio (II) 10^{-3} M (concentrações determinadas por emissão atômica) por 5 minutos a 37°C. 0,1 ml de cada uma das misturas foi transferido para tubos Eppendorf, em triplicata (ou seja, tivemos um total de 15 tubos).

Paralelamente, preparamos uma suspensão de células de ascite de Ehrlich. Um camundongo portador do tumor foi sacrificado no momento do experimento, sendo coletado 1 ml do líquido ascítico, que foi lavado duas vezes com 10 ml de tampão PBS. Essas células foram ressuspensas em 25 ml de PBS e o número de células vivas e mortas foi contado ($1,4 \times 10^6$ células intactas/ml no experimento com HSA e $2,7 \times 10^6$ células intactas/ml no experimento “branco”). 0,9 ml dessa suspensão de células foi transferido para os tubos Eppendorf, seguindo-se agitação em vórtex por 30 segundos.

Em seguida, os Eppendorfs foram centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm, separando-se depois os sobrenadantes, que foram diluídos com 2 ml de água destilada. Os sobrenadantes foram levados ao plasma de emissão atômica, para a determinação da concentração de ródio.

Os testes de partição com células foram realizados nas dependências do Laboratório de Quimioterapia, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas I, USP.

IV.7 – ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DO COMPLEXO $Rh_2(tfc)_4$

Catorze camundongos Balb-c saudáveis foram divididos em três grupos. Dois animais receberam intraperitonealmente 500 µl de solução salina (grupo controle). Sete animais receberam 500 µl de solução aquosa de Tween®-80 5% m/m, e cinco animais receberam 500 µl de uma solução $2,0 \times 10^{-3}M$ de $Rh_2(tfc)_4$, de forma a suportarem aproximadamente a dose *Surv₉₀* ($3,8 \times 10^{-5}$ mol/kg; v. Espósito *et al.*, 1999b). Nenhum dos animais morreu por efeitos tóxicos da droga durante esse período.

Após 25 dias, os camundongos foram sacrificados para a coleta de tecidos do miocárdio, pulmões, fígado, rins, testículos, ovário, baço, cérebro e medula óssea. Essas partes foram mantidas em uma solução de formol 10% e posteriormente em blocos de parafina. Desses blocos foram preparadas lâminas, coradas com hematoxilina-eosina, que posteriormente foram fotografadas em microscópio ótico.

A inoculação e coleta dos tecidos foram realizadas no Laboratório de Quimioterapia, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas I, USP. A preparação das lâminas e as fotografias foram realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica, Departamento de Patologia da Santa Casa de São Paulo.

IV.8 – ESTUDO DE SOBREVIVÊNCIA

Sessenta camundongos Balb-c de aproximadamente 20 g foram inoculados com 5×10^5 células de ascite de Ehrlich e divididos em três grupos (Dia 0). Paralelamente, preparamos as soluções de:

- HSA: 1,75 ml de solução de HSA 20% foram diluídos a 25 ml com água destilada; $[HSA] = 5,3 \mu M$.
- HSA-Rh₂(tfc)₄: 0,0167 g de Rh₂(tfc)₄ foram dissolvidos com 20 ml de água quente. A solução final foi filtrada e transferida para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com água. Essa solução foi gotejada com agitação sobre 1,75 ml de solução de HSA 20%. Observou-se a característica mudança de coloração da solução, de azulado para vermelho, indicativa da ligação do complexo de ródio com a proteína. Após 10 minutos, essa solução foi filtrada e transferida para um balão volumétrico de 25 ml. O volume final foi completado com água destilada, e a concentração de Rh₂(tfc)₄ foi determinada por emissão atômica. $[Rh_2(tfc)_4] = 1,12 \times 10^{-4} M$. Nessas condições, $n_{Rh}/n_{HSA} = 0,5$. Isso garantiu-nos que todas as moléculas do complexo estariam ligadas à proteína.
- Rh₂(tfc)₄: 0,0165 g de Rh₂(tfc)₄ foram dissolvidos com 20 ml de água quente. A solução final foi filtrada e transferida para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com água. A concentração de ródio foi determinada por emissão atômica. $[Rh_2(tfc)_4] = 1,05 \times 10^{-4} M$.

IV.8.1 – Avaliação do composto HSA—Rh₂(tfc)₄

Após 24 horas (Dia 1), 15 animais receberam 0,5 ml de solução de HSA (grupo controle) e outros 15 foram tratados com 0,5 ml da solução de HSA-Rh₂(tfc)₄, de modo a receberem 2,8 $\mu mol/kg$ da droga Rh₂(tfc)₄. A inocuidade da HSA frente aos camundongos fora previamente testada em três animais, que não manifestaram sinais de resposta alérgica. Transcorridas mais 24 horas (Dia 2), todos os camundongos foram submetidos aos mesmos tratamentos novamente (ou seja, os camundongos tratados receberam duas doses da droga com intervalos de 24 horas).

As doses foram escolhidas tendo em vista que 5,6 $\mu mol/kg$ da droga poderiam conduzir, de acordo com Espósito *et al.* (1999a), a uma porcentagem razoável de sobrevivência,

diminuindo os efeitos tóxicos observados quando doses próximas à $Surv_{90}$ são administradas.

IV.8.2 – Avaliação do composto $Rh_2(tfc)_4$

Após 24 horas (Dia 1), 15 animais receberam 0,5 ml de água (grupo controle) e outros 15 foram tratados com 0,5 ml da solução de $Rh_2(tfc)_4$, de modo a receberem 2,1 $\mu\text{mol/kg}$ da droga $Rh_2(tfc)_4$. Transcorridas mais 24 horas (Dia 2), todos os camundongos foram submetidos aos mesmos tratamentos novamente (ou seja, os camundongos tratados receberam duas doses da droga com intervalos de 24 horas).

IV.8.3 – Tratamento dos dados

As curvas de sobrevida são apresentadas como gráficos de Kaplan-Meier, e a significância das diferenças de sobrevida nos dois grupos de animais foi testada pelo método de Mantel-Haenszel [Matthews e Farewell, 1988]:

$$T = \frac{(O_1 - E_1)^2}{E_1} + \frac{(O_2 - E_2)^2}{E_2} \quad (\text{Equação 10}),$$

onde: T = teste

O_n = somatória dos valores observados

E_n = somatória dos valores esperados.

Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Quimioterapia, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas I, USP.

V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 – LIGAÇÃO DO $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ COM O PLASMA TOTAL

Antes de realizarmos os estudos da interação entre os complexos de ródio e a HSA propriamente ditos, foi feito um exame da ligação entre o $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ com o plasma total humano. Nosso objetivo aqui era uma confirmação da hipótese inicial de que a HSA estaria preferencialmente envolvida na distribuição dos complexos de ródio, tanto pela sua elevada concentração como pela diversidade dos seus sítios de ligação. A albumina foi isolada pelo método de extração com sal (*salting-out*) e a pureza dessa fração foi checada por eletroforese. O método do *salting-out* empregado no fracionamento do plasma é um dos mais simples e rápidos de se obter albumina com pureza ao redor de >95%, o que pode ser comprovado pelos perfis de eletroforese em gel (Figuras 5.1 e 5.2). Assumimos que o acetato de ródio se comportaria frente ao plasma total de modo análogo ao dos outros complexos estudados.

Figura 5.1: SDS-PAGE da albumina humana purificada do plasma pelo método do *salting-out*. Teste preliminar da pureza da proteína obtida da diálise. A concentração de HSA de trabalho, para os testes de incubação, foi fixada em 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Figura 5.2: SDS-PAGE da albumina humana após incubação com $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ por 0 (A_0), 2 (A_2) e 24 (A_{24}) horas.

Os resultados apresentados na Tabela V.1 mostram que aproximadamente 50% do complexo já se encontra ligado à albumina mesmo na ausência de incubação, e essa incorporação sobe a 70% com 2 horas de reação. A ligação covalente da cisplatina com a HSA requer períodos de incubação tipicamente ao redor de 2 h [LeRoy e Thompson, 1989].

Tabela V.1: Resultados do teste de ligação de $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ com o plasma total.

$t_{\text{incub}} / \text{h}$	[HSA] mg mL^{-1}	V_P mL	V_{sal} mL	[Rh] mg mL^{-1}	[Rh]/[HSA]
0 (A_0)	5,293	1,4	1,6	$1,71 \times 10^{-3}$	$3,23 \times 10^{-4}$
2 (A_2)	3,742	1,8	1,2	$1,82 \times 10^{-3}$	$4,87 \times 10^{-4}$
24 (A_{24})	4,644	2,0	1,0	$3,16 \times 10^{-3}$	$6,80 \times 10^{-4}$

[HSA] = Concentração de albumina, determinada pelo método de Lowry. P é HSA > 95%.

V_P = Volume da solução proteica após a diálise.

V_{sal} = Volume de NaCl 2%.

[Rh] = Concentração de $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$, determinada por emissão atômica.

Para quaisquer metalofármacos, espera-se idealmente que a cinética da ligação com a albumina não seja excessivamente rápida, o que imobilizaria uma quantidade elevada da droga, mas sim que o complexo fosse lentamente liberado para se associar aos alvos biológicos, o que evitaria a necessidade de doses múltiplas. Naturalmente, também

a estabilidade dessa ligação deveria ser intermediária: nem tão elevada que impedisse a liberação para a célula, nem tão baixa que permitisse aos complexos reagir com espécies não-alvo. Em outras palavras, o complexo deve ter ligantes *lábeis*, que possam ser trocados pelos do alvo biológico, e outros *inertes*, que sustentem o complexo na sua forma farmacologicamente ativa. Os complexos de ródio(II), de fórmula geral $Rh_2(\text{ponte})_4(L)_2$ (Figura 1.1) possuem ligantes equatoriais que satisfazem estas últimas condições, enquanto que as moléculas L coordenadas axialmente são facilmente cambiáveis com outros grupos doadores.

Deste teste de ligação com o plasma sanguíneo, obteve-se portanto uma informação útil para projetar o restante dos experimentos, que foi o tempo de incubação estabelecido em 2 - 5 minutos. Essa estratégia seria justificada posteriormente, durante o ajuste das condições dos experimentos fotométricos: a posição e intensidade relativamente inalteradas da banda 1 ($\lambda_{\text{máx}}; \pi^*_{Rh-Rh} \rightarrow \sigma^*_{Rh-Rh}$) após 24 horas de reação entre os complexos de ródio e a HSA mostraram-nos que a reação de formação dos adutos complexo-proteína é rápida.

Outras frações protéicas, especialmente a das globulinas, são muito contaminadas por traços de albumina, o que impediu-nos uma atribuição segura da porcentagem de $Rh_2(ac)_4$ nessa fração. De qualquer forma, parece claro que o principal alvo dos complexos de ródio no plasma sanguíneo é a albumina.

V.2 – ESPECTROFOTOMETRIA

A reação do acetato de ródio com di- e tripeptídeos, piridinas substituídas e imidazóis foi estudada espectroscopicamente por Dennis *et al.* (1982a), que buscaram determinar o sítio de ligação mais provável desse complexo em um biopolímero. Observaram que os adutos mais estáveis são os que se formam com ligantes que contêm átomos de nitrogênio em anéis conjugados (ordem de estabilidade: $-\text{NH}_2 \ll \text{py} < \text{imidazol}$). As constantes de formação são praticamente idênticas para os dipeptídeos HisHis, AlaHis e HisGly¹¹. Em HisGly, a coordenação pode ocorrer pelo $-\text{NH}_2$ livre ou pelo nitrogênio imidazólico da histidina. O espectro eletrônico altera-se drasticamente quando o pH é ajustado próximo ao valor do pK_a da histidina (histidina protonada), mas não quando $\text{pH} \sim \text{pK}_a$ da glicina, o que sugere que a coordenação está ocorrendo através do grupo imidazol. Além disso, esses autores determinaram que substituições no anel imidazólico diminuem a estabilidade (na ordem $\text{His} < \text{imidazol} < \text{N-metilimidazol}$). Entretanto, substituições nas piridinas não se correlacionam com a estabilidade dos adutos, o que sugere que a interação entre $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ e os ligantes estudados não é uma reação ácido-base simples, e deve envolver tanto contribuições σ como contribuições π originadas da capacidade π -retrodoadora do centro metálico.

Em sua revisão de estudos similares para complexos de Pt(II) e Pd(II), Tsiveriotis e Hadjiliadis (1999) mostraram que os nitrogênios imidazólicos (especialmente o N3) são os sítios mais favoráveis de coordenação nos peptídeos ensaiados. Isso foi explicado pelo fato de o N1 ser mais fortemente protonado, e que a coordenação com o N3 e um nitrogênio amínico pode estabilizar o complexo metal:peptídeo através da formação de um anel quelato de seis membros (v. Figura 2.6).

Acredita-se que a histidina seja o principal sítio de coordenação dos complexos de ródio(II) na HSA [Trynda e Pruchnik, 1995], e, de modo análogo, para o de algumas drogas de rutênio que estabelecem ligações coordenadas com a proteína [Vilchez, 1998; Messori, 2000]. No caso dos complexos de ródio(II), essa hipótese justifica-se pelo deslocamento da banda de absorção eletrônica correspondente à transição Rh-Rh de 580 para 540 nm após a coordenação do complexo com a proteína, com o subsequente desenvolvimento de uma coloração avermelhada (vejam-se os espectros de titulação espectrofotométrica, Figuras 5.3 a 5.7). Uma demonstração mais precisa do comprometimento de

---

¹¹ Para os códigos de 1 e 3 letras dos aminoácidos, vejam-se os apêndices.

resíduos de His com a coordenação de complexos de ródio(II) poderia ser feita com o bloqueio desses aminoácidos com dietilpirocarbonato [Messori *et al.*, 2000].

Conforme ressalvamos anteriormente, resta saber se outros aminoácidos com elevada afinidade por metais pesados, como a metionina, consistiram-se ou não em sítios de ligação para os complexos de ródio(II). A reação entre $Rh_2(pr)_4$ e metionina em solução provoca um deslocamento da transição Rh-Rh de 580 para 562 nm, com o desenvolvimento de uma coloração alaranjada, característica da coordenação axial de carboxilatos de ródio por enxofre [Pneumatikakis e Psaroulis, 1980]. Talvez isso fosse um sinal de que, por algum motivo, esses resíduos sulfurados não estariam sendo sítios de ligação favorecidos para estes complexos de ródio na HSA. Daí que compartilhemos, ao longo das discussões a seguir, a hipótese de ser a histidina o sítio de ligação preferencial, se bem que, naturalmente, nossos resultados não permitem que se descartem outros resíduos candidatos a coordenantes.

Além disso, também seria necessária uma verificação inequívoca da permanência ou não dos quatro ligantes-pontes dos complexos diméricos de ródio, ou se eles eventualmente poderiam ser labilizados por resíduos carboxilados da proteína, como o glutamato e o aspartato.

Figura 5.3: Espectros eletrônicos obtidos durante a titulação de HSA com $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$. A seta indica o deslocamento da banda $\lambda_{\text{máx}}$ de acordo com o incremento na concentração dos complexos. Condições: $T_{\text{amb}} = 28^\circ\text{C}$; referência: HSA. $[\text{Rh}_2(\text{ac})_4] = 1,1 \times 10^{-3} \text{M}$; incrementos: 50 (1º. espectro, de baixo para cima), 100 (2º. e 3º. espectros) e 200 (demais espectros) μl da solução do complexo sobre 2,0 ml de solução de HSA $5,6 \times 10^{-5} \text{M}$.

Figura 5.4: Espectros eletrônicos obtidos durante a titulação de HSA com $\text{Rh}_2(\text{pr})_4$. A seta indica o deslocamento da banda $\lambda_{\text{máx}}$ de acordo com o incremento na concentração dos complexos. Condições: $T_{\text{amb}} = 28^\circ\text{C}$; referência: HSA. $[\text{Rh}_2(\text{pr})_4] = 1,1 \times 10^{-3}\text{M}$; incrementos: 50 (1º. espectro, de baixo para cima), 100 (2º. e 3º. espectros) e 200 (demais espectros) μl da solução do complexo sobre 2,0 ml de solução de HSA $5,6 \times 10^{-5}\text{M}$.

Figura 5.5: Espectros eletrônicos obtidos durante a titulação de HSA com $\text{Rh}_2(\text{but})_4$. A seta indica o deslocamento da banda $\lambda_{\text{máx}}$ de acordo com o incremento na concentração dos complexos. Condições: $T_{\text{amb}} = 28^\circ\text{C}$; referência: HSA. $[\text{Rh}_2(\text{but})_4] = 0,75 \times 10^{-3} \text{M}$; incrementos: 50 (1º. espectro, de baixo para cima), 100 (2º. e 3º. espectros) e 200 (demais espectros) μl da solução do complexo sobre 2,0 ml de solução de HSA $5,6 \times 10^{-5} \text{M}$.

Figura 5.6: Espectros eletr\^onicos obtidos durante a titula\c{c}\~ao de HSA com $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$. A seta indica o deslocamento da banda $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ de acordo com o incremento na concentra\c{c}\~ao dos complexos. Condi\c{c}\~oes: $T_{\text{amb}} = 28^\circ\text{C}$; refer\^encia: HSA. $[\text{Rh}_2(\text{tfa})_4] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$; incrementos: 50 (1.º espectro, de baixo para cima), 100 (2.º e 3.º espectros) e 200 (demais espectros) μl da solu\c{c}\~ao do complexo sobre 2,0 ml de solu\c{c}\~ao de HSA $5,6 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Figura 5.7: Espectros eletrônicos obtidos durante a titulação de HSA com $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$. A seta indica o deslocamento da banda $\lambda_{\text{máx}}$ de acordo com o incremento na concentração dos complexos. Condições: $T_{\text{amb}} = 28^\circ\text{C}$; referência: HSA. $[\text{Rh}_2(\text{tfc})_4] = 1,0 \times 10^{-3}\text{M}$; incrementos: 50 (1º. espectro, de baixo para cima), 100 (2º. e 3º. espectros) e 200 (demais espectros) μl da solução do complexo sobre 2,0 ml de solução de HSA $5,6 \times 10^{-5}\text{M}$.

O número de moléculas de complexo ligadas à HSA foi determinado pela extrapolação dos segmentos lineares das curvas de titulação (Figura 5.8). A relação aproximada obtida de 8:1 (complexo:proteína) é consistente com os valores obtidos por Trynda e Pruchnik ($\text{Rh}_2(\text{ac})_4$: 8:1 [Trynda e Pruchnik, 1995]; $[\text{Rh}_2(\text{ac})_2(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OAc})_2$: 7:1 [Trynda-Lemiesz e Pruchnik, 1997]) e de fato correlaciona-se também com o número total de resíduos de His na HSA, entre 13 e 15 [Kragh-Hansen, 1990]. Naturalmente, a possibilidade de interação com esses resíduos imidazólicos dependerá da posição que eles ocupem dentro do esqueleto polipeptídico.

Figura 5.8: Curvas de titulação não corrigidas da HSA com os complexos de Rh. Condições iniciais: $[\text{HSA}] = 6.8 \times 10^{-5} \text{M}$ ($M_r = 66439$), tampão PO_4^{3-} , pH 7.4; $[\text{Rh}_{\text{complexos}}]$ (mM) = 1.1, 1.1, 0.75, 1.1 e 1.0 para $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$, $\text{Rh}_2(\text{pr})_4$, $\text{Rh}_2(\text{but})_4$, $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$ e $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$, respectivamente, em água deionizada (T_{amb}). Referência: solução de HSA. Tempo de reação: 2'. Absorção: monitorou-se o $\lambda_{\text{máx}}$ (transição $\pi^*_{(\text{Rh}2)} \rightarrow \sigma^*_{(\text{Rh}2)}$) na situação em que $[\text{Rh}]:[\text{HSA}] = 1$

Com esses valores ponto-a-ponto de absorbância em função da concentração do complexo de ródio, foram construídas as curvas $1/(A-A_0)$ versus $1/L_0$ (Figura 5.9) para os cálculos das constantes de afinidade K (Tabela V.2), de acordo com o procedimento descrito no item IV.3.2.

Figura 5.9: Gráfico de $1/(A-A_0)$ versus $1/L_0$ para a formação de adutos entre os complexos de ródio estudados e a HSA. A é a absorvância registrada para diferentes concentrações L_0 dos complexos, nos comprimentos de onda relatados na Figura 5.8. A_0 é a absorvância inicial da HSA nesses comprimentos de onda; neste experimento, sempre foi nula.

Tabela V.2: Cálculo de K para a ligação entre complexos de ródio e a HSA, de acordo com o método de Stephanos (1996). $P < 0,00001$, e sua correlação com as lipofilicidades de cada complexo.

Aduto	Coefficiente linear a	Coefficiente angular b	R	% extraído (n -octanol) ^a	K^b
$Rh_2(ac)_4$ -HSA	7,203	0,00428	0,99035	15,2	1683
$Rh_2(pr)_4$ -HSA	5,012	0,00474	0,99935	31,9	1057
$Rh_2(but)_4$ -HSA	1,972	0,00394	0,99927	95,6	500,5
$Rh_2(tfa)_4$ -HSA	4,039	0,00567	0,99986	88,2	712,3
$Rh_2(tfc)_4$ -HSA	1,700	0,00794	0,99522	80,2	214,1

^a: vide Tabela V.5, onde tais valores são obtidos. ^b: $K = a/b$.

No estudo das constantes de formação dos adutos entre carboxilatos de ródio e bases nitrogenadas (em aminas livres ou polipeptídeos, por exemplo), de acordo com o raciocínio apresentado acima, sugeriu-se que a histidina se constitua no principal sítio de ligação dos complexos de ródio(II) na HSA. Além disso, observou-se que a estabilidade desses adutos com histidina está correlacionada com suas *lipofilicidades*. Das *et al.*

(1977) relataram $\log K_1$ para a formação de adutos entre $\text{Rh}_2(\text{ponte})_4(\text{His})$ (ponte = ac, pr) como 4,05 e 4,14, respectivamente, sendo a diferença atribuída à menor solvatação do propionato e, portanto, maior facilidade de se ligar à histidina.

Entretanto, observamos neste trabalho uma correlação *inversa* entre a lipofilicidade dos alquilcarboxilatos de ródio e o valor das constantes de afinidade K (Tabela V.2).

A interação com resíduos (provavelmente histidina) na molécula de albumina parece ser favorecida para os alquilcarboxilatos *mais solvatados*, o que sugere um efeito adicional de estabilização na proteína inexistente para a reação com o aminoácido livre, possibilidade esta já prevista pelos mesmos autores do trabalho com histidina [Das *et al.*, 1977]. De fato, podemos imaginar que a estabilidade da ligação de complexos de ródio(II) com a HSA seja uma resultante de pelo menos dois efeitos distintos: (a) coordenação axial com resíduos de His, e (b) interações hidrofóbicas entre o complexo e o esqueleto peptídico da proteína.

Os valores das constantes de afinidade obtidos por espectrofotometria refletiriam especificamente o caso (a) acima. Sugerimos que a coordenação axial dos complexos seja mais fraca para os complexos mais lipossolúveis justamente pela maior contribuição das interações hidrofóbicas (caso b). Isso pode ser melhor visualizado no esquema hipotético abaixo (Figura 5.10), nos quais os tamanhos relativos das setas dão uma idéia da importância de cada um dos tipos de ligação para cada complexo. Isso não significa que ambos os efeitos não possam ser independentes.

Figura 5.10: Esquema hipotético de correlação entre lipofilicidade dos alquilcarboxilatos de ródio(II) e suas ligações com a HSA. a: interação axial com resíduo de His. b: interação lipofílica. O tamanho relativo das setas (fora de escala) indicaria a importância de cada tipo de interação em cada complexo estudado. Até o presente momento, não há evidências conclusivas da relação causal entre os dois fenômenos apresentados, necessárias à plena validação (ou refutação) deste modelo.

No caso do $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$, que apresenta elevada hidro e lipossolubilidade, se esperaria uma contribuição significativa da interação axial, dada a maior dureza dos centros metálicos. Esse efeito aparentemente é perdido quando se trocam os ligantes equatoriais CF_3COO por CF_3CONH . Comparando-se com o valor de K observado para o complexo $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$, o mais baixo de todos, julgamos que os grupos NH poderiam estar envolvidos em ligações de hidrogênio que iriam contra o sentido das interações hidrofóbicas. Isso será novamente discutido ao comentarmos os resultados de dicroísmo circular.

Consideremos os sítios típicos de coordenação metálica da HSA:

- *resíduo Cys34*: observou-se que os aminoácidos contendo sulfidrilas livres podem levar à quebra da ligação Rh-Rh no $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$, levando à formação de quelatos monoméricos [Pneumatikakis e Psaroulis, 1980]. A permanência da banda 1 ($\lambda_{\text{máx}}$, característica da ligação Rh-Rh) durante o curso das reações indica que a decomposição dos complexos, caso a coordenação com o resíduo Cys34 tenha se realizado, não foi um fenômeno importante.

- *seqüência N-terminal (motivo ATCUN)*: de alta especificidade para íons Cu(II) e Ni(II) , apresenta simetria quadrado-planar, onde o resíduo His3 tem um papel chave [Harford e Sarkar, 1997]. Não cremos que os complexos de ródio(II) estudados neste trabalho apresentem as propriedades estéricas adequadas para coordenação nesse sítio.

Os valores de K obtidos (Tabela V.2), da ordem de 10^2 — 10^3 , são menores do que as constantes de afinidade reportadas para outras drogas que interagem com a HSA [Neault e Tajmir-Riahi, 1998]. De fato, seria desejável que a afinidade entre a HSA e os complexos do tipo $\text{Rh}_2(\text{ponte})_4$ fosse elevada o suficiente para retê-los e transportá-los dentro do sistema circulatório, mas baixa o suficiente para permitir que fossem transferidos para as células-alvo. Os testes de partição, mais adiante, vão mostrar que essa transferência realmente pode ocorrer. Outras constantes de ligação para $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ e $\text{Rh}_2(\text{pr})_4$ foram revisadas por Boyar e Robinson (1983). De modo geral, observa-se que os valores de K para a formação de monoadutos com ligantes simples ou dipeptídeos contendo histidina podem ser até uma ordem de magnitude maiores do que os valores encontrados para a interação com a HSA. O valor da constante de ligação para a primeira piridina que ocupa uma posição axial do $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ foi de 242 [Kadish *et al.*, 1982].

Assumimos, com isto, que os complexos permanecem intactos quando confrontados com a proteína, isto é, que seus ligantes equatoriais não são perdidos. Essa segunda hipótese poderia ser testada de duas formas:

1 - Ao se fazer reagir a albumina com um complexo de ródio dotado de ligantes axiais de alta afinidade pela unidade Rh-Rh, espectroscopicamente bem diferenciados dos adutos com imidazóis, que não permitiriam a coordenação com a proteína nessas posições. Caso houvesse sinais de que há ródio ligado à albumina, mesmo nessas condições, poderíamos supor que a tal ligação estaria dando-se através da labilização de um ou mais ligantes equatoriais.

2 - Reagir por exemplo o $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ com os ligantes-ponte marcados com ^{14}C , e acompanhar a eliminação de $^{14}\text{CO}_2$ ou outros substratos radioativos.

V.3 – DICROÍSMO CIRCULAR

No que tange às perturbações estruturais da HSA causadas pelos complexos de ródio(II) nas condições deste trabalho, vemos pelas Figuras 5.11 a 5.15 que são pouco pronunciadas. Os resultados de porcentagem de elementos de estrutura secundária obtidos pelo programa SELCON2 estão listados na Tabela V.3. Tais valores, baixos, contrastam com as alterações significativas provocadas pelo $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$, conforme relatam Trynda e Pruchnik (1995): perda de 8 a 18% de α -hélices à medida que a razão molar complexo:proteína varia entre 1 e 10. Não observamos mudanças significativas no conteúdo de hélices mesmo para a razão molar do $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ de 14:1, com incubação a 37°C por 24 horas.

Figura 5.11: Espectros de CD da HSA livre e em presença de $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$. $[\text{HSA}]_{\text{inicial}}: 3,39\mu\text{M}$. $\bar{n} = 14,7$.

— HSA sem incubação   - - - - HSA- $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ sem incubação
- - - - HSA- $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ após 24 h de incubação a 37°C .

Figura 5.12: Espectros de CD da HSA livre e em presença de $\text{Rh}_2(\text{pr})_4$. $[\text{HSA}]_{\text{inicial}}: 3,39 \mu\text{M}$. $\bar{n} = 15,9$.

— HSA sem incubação   - - - - HSA- $\text{Rh}_2(\text{pr})_4$ sem incubação
 - - - - HSA- $\text{Rh}_2(\text{pr})_4$ após 24 h de incubação a 37°C .

Figura 5.13: Espectros de CD da HSA livre e em presença de $\text{Rh}_2(\text{but})_4$. $[\text{HSA}]_{\text{inicial}}: 3,39 \mu\text{M}$. $\bar{n} = 11,1$.

— HSA sem incubação   - - - - HSA- $\text{Rh}_2(\text{but})_4$ sem incubação
 - - - - HSA- $\text{Rh}_2(\text{but})_4$ após 24 h de incubação a 37°C .

Figura 5.14: Espectros de CD da HSA livre e em presença de $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$. $[\text{HSA}]_{\text{inicial}}: 3,39\mu\text{M}$. $\bar{n} = 15,6$.
 — HSA sem incubação   - - - - HSA- $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$ sem incubação
 - . - . HSA- $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$ após 24 h de incubação a 37°C .

Figura 5.15: Espectros de CD da HSA livre e em presença de $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$. $[\text{HSA}]_{\text{inicial}}: 3,39\mu\text{M}$. $\bar{n} = 15,0$.
 — HSA sem incubação   - - - - HSA- $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ sem incubação
 - . - . HSA- $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ após 24 h de incubação a 37°C .

Tabela V.3: Alterações nas proporções de elementos de estrutura secundária da HSA após coordenação com os complexos de Rh, calculadas pelo algoritmo SELCON-2. Condições iniciais: [HSA] = 3,39 μ M; incubação: 24 h a 37°C; $\bar{n}$ = 14,7, 15,9, 11,1, 15,6 e 15,0 para Rh₂(ac)₄, Rh₂(pr)₄, Rh₂(but)₄, Rh₂(tfa)₄ e Rh₂(tfc)₄, respectivamente.

	α -hélice (%)	β anti-par. (%)	β paral. (%)	β -turno (%)	Aleatório (%)	F-soma
<i>s/ incubação</i>						
HSA livre	64,98	3,30	4,46	15,41	14,25	1,0241
Rh ₂ (ac) ₄	65,85	3,15	4,18	14,45	13,16	1,0079
Rh ₂ (pr) ₄	60,27	4,29	3,63	14,84	13,59	0,9663
Rh ₂ (but) ₄	58,85	5,44	4,61	16,88	16,08	1,0185
Rh ₂ (tfa) ₄	55,24	5,71	5,42	17,51	15,37	0,9925
Rh ₂ (tfc) ₄	64,84	3,20	4,26	14,49	13,13	0,9993
<i>c/ incubação</i>						
HSA livre	67,28	2,99	3,64	14,51	13,69	1,0211
Rh ₂ (ac) ₄	68,07	2,64	2,96	13,75	13,09	1,0051
Rh ₂ (pr) ₄	66,55	3,16	4,36	14,98	13,80	1,0286
Rh ₂ (but) ₄	60,39	5,41	4,51	16,66	15,96	1,0294
Rh ₂ (tfa) ₄	57,53	4,30	5,14	18,15	15,51	1,0063
Rh ₂ (tfc) ₄	67,32	3,22	5,54	15,22	11,34	1,0263

Explicamos essa aparente anomalia considerando que optou-se desde o início por trabalhar com a HSA *nativa*, isto é, que não teve suas moléculas de ácidos graxos removidas durante o processo de purificação, uma vez que assim a proteína estaria em uma situação mais próxima daquela que ocorre *in vivo*. Sob condições fisiológicas normais, há entre 0,1 a 2 moléculas de ácidos graxos ligadas à albumina [Curry *et al.*, 1998], possivelmente competindo com outros ligantes pelos sítios de ligação e conferindo à molécula uma estabilidade adicional frente a agentes desnaturantes. Este raciocínio é reforçado também pela evidência de que, mesmo com um grande número de ligantes, a albumina não perde seu arranjo conformacional facilmente [Kragh-Hansen, 1990]. Estudando a interação de uma porfirina de ferro com HSA obtida por DNA recombinante na razão molar 8:1, Tsuchida *et al.* (1999) também não determinaram alterações significativas nos níveis de α -hélice, o que está de acordo com nossas observações.

Quando consideramos o tempo de reação, a única diferença observada foi um aumento na porcentagem de estruturas desordenadas (*random coil*) após incubação por 24 horas a 37°C. Isto novamente confirma as evidências anteriores de que o tempo de rea-

ção da albumina com os complexos é rápido. O principal alvo estrutural foi a α -hélice, e o seu decréscimo foi consistentemente acompanhado por um aumento nas porcentagens de folhas β .

V.4 – FLUORIMETRIA

A análise da eficiência supressora de fluorescência dos complexos de ródio(II), supressão essa que pode dar informações valiosas sobre a vizinhança do fluoróforo da proteína (e, portanto, da posição de ligação do complexo metálico), parece corroborar os resultados de DC em que as lipossolubilidades dos complexos provocariam as únicas alterações importantes. Já se observou que alguns desses complexos metálicos coordenam-se ao redor do resíduo Trp214 da albumina humana [Trynda-Lemiesz e Pruchnik, 1997], que por sua vez está localizado em um bolsão hidrofóbico [Moriyama *et al.*, 1996]. A Figura 5.16 destaca essa região da HSA, e os resultados são apresentados e discutidos imediatamente após.

Figura 5.16: Representação do resíduo de Trp214 (amarelo) dentro de um ambiente hidrofóbico na HSA (representado pelos cilindros azuis). Figura gerada pelo programa WebLab ViewerLite 3.20 utilizando as coordenadas cristalográficas da HSA depositadas no *Protein Data Bank* (Brookhaven National Laboratory; <http://www.pdb.bnl.gov>) sob o código *1uor*.

Uma perfil padrão de diluição com tampão fosfato (Figura 5.17) foi obtido antes dos espectros de emissão de fluorescência da HSA tratada com cada um dos cinco comple-

xos de ródio (Figuras 5.18 a 5.22). Com estes dados, foi possível construir as respectivas curvas de Stern-Volmer (Figura 5.23) e obter a K_{SV} de cada complexo (Tabela V.4).

Figura 5.17: Espectros de emissão do Trp-214 da HSA (diluição com água deionizada). Cada curva corresponde a uma adição de 0,1 mL. Condições iniciais: [HSA] = 3,5 μ M (assume-se para a HSA M_r = 66439). Tempo de homogeneização: 15'. λ_{exc} = 300nm.

Figura 5.18: Espectros de emissão do Trp-214 da HSA após reação com $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ em solução aquosa. Os valores no destaque referem-se à concentração (em μM) do complexo de ródio. Condições iniciais: $[\text{HSA}] = 3,5 \mu\text{M}$. Tempo de homogeneização: 15'. $\lambda_{\text{exc}} = 300\text{nm}$.

Figura 5.19: Espectros de emissão do Trp-214 da HSA após reação com $\text{Rh}_2(\text{pr})_4$ em solução aquosa. Os valores no destaque referem-se à concentração (em μM) do complexo de ródio. Condições iniciais: $[\text{HSA}] = 3,5 \mu\text{M}$. Tempo de homogeneização: 15'. $\lambda_{\text{exc}} = 300\text{nm}$.

Figura 5.20: Espectros de emissão do Trp-214 da HSA após reação com $\text{Rh}_2(\text{but})_4$ em solução aquosa. Os valores no destaque referem-se à concentração (em μM) do complexo de ródio. Condições iniciais: $[\text{HSA}] = 3,5 \mu\text{M}$. Tempo de homogeneização: 15'. $\lambda_{\text{exc}} = 300\text{nm}$.

Figura 5.21: Espectros de emissão do Trp-214 da HSA após reação com $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$ em solução aquosa. Os valores no destaque referem-se à concentração (em μM) do complexo de ródio. Condições iniciais: $[\text{HSA}] = 3,5 \mu\text{M}$. Tempo de homogeneização: 15'. $\lambda_{\text{exc}} = 300\text{nm}$.

Figura 5.22: Espectros de emissão do Trp-214 da HSA após reação com $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ em solução aquosa. Os valores no destaque referem-se à concentração (em μM) do complexo de ródio. Condições iniciais: $[\text{HSA}] = 3,5 \mu\text{M}$. Tempo de homogeneização: 15'. $\lambda_{\text{exc}} = 300\text{nm}$.

Figura 5.23: Curvas Stern-Volmer da interação dos complexos de Rh com HSA. Condições: [HSA] = 2.8 μM (M_r = 66439). F_0 = fluorescência na ausência do supressor; F = fluorescência na presença do supressor. Tempo de reação: 2'.

Tabela V.4: K_{SV} e k_q dos complexos estudados. $P < 0,00001$.

Complexo	Coef. linear	R	$K_{SV} (\text{M}^{-1})$	$k_q \times 10^{-6}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
$\text{Rh}_2(\text{ac})_4$	0,890	0,9490	0,0197	3,28
$\text{Rh}_2(\text{pr})_4$	0,944	0,9962	0,0305	5,08
$\text{Rh}_2(\text{but})_4$	0,970	0,9896	0,0850	14,2
$\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$	0,878	0,9980	0,120	20,0
$\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$	0,854	0,9816	0,0553	9,22

A inspeção combinada dos resultados obtidos com a espectroscopia DC (ainda que praticamente no limiar do erro experimental) e de fluorescência mostra que os alquilcarboxilatos $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$, $\text{Rh}_2(\text{pr})_4$ e $\text{Rh}_2(\text{but})_4$ parecem apresentar ação desnaturante (Tabela V.3) e eficiência supressora (Tabela V.4) correlacionadas às suas lipofilicidades. O butirato de ródio, pouco solúvel em água, apresenta a maior capacidade de interferência com a estrutura secundária da proteína (perda de α -hélice de $\sim 6 - 7\%$), muito maior que a produzida pelo acetato. Sua eficiência supressora é também mais pronunciada, o que é indicado pelo maior valor de $K_{\text{SV, butirato}} = 0,0850 \text{ M}^{-1}$, comparado com $K_{\text{SV, acetato}} = 0,0197 \text{ M}^{-1}$.

Todos os alquilcarboxilatos de ródio apresentam padrões de absorção similares, com alguma sobreposição com a região de emissão da HSA (Figura 5.24). Portanto, as diferenças detectadas pelas técnicas de DC e fluorescência poderiam ser atribuídas às diferentes lipossolubilidades desses complexos. O butirato de ródio parece possuir a maior afinidade pelo arcabouço polipeptídico dentre os alquilcarboxilatos de ródio, e portanto poderíamos esperar uma preferência especial para se alojar no (ou nas proximidades do) bolsão hidrofóbico onde está o resíduo de Trp.

Por outro lado, o complexo $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$ possui quatro grupos CF_3 altamente eletronegativos, que removem densidade eletrônica da ligação metal-metal, fazendo portanto com que os centros metálicos se tornem ácidos mais duros. O espectro de absorção eletrônica do $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$ apresenta um padrão de sobreposição com a emissão da HSA muito semelhante àquele observado para os alquilcarboxilatos (Figura 5.24). Porém, suas capacidades tanto desnaturantes como supressoras foram as mais pronunciadas dentre todos os complexos estudados ($K_{\text{SV, trifluoroacetato}} = 0,120 \text{ M}^{-1}$ e perda de 10% de α -hélice).

Apesar da alta solubilidade do $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$ em água, este complexo apresenta também uma significativa afinidade por solventes orgânicos. Tanto assim que uma das etapas de purificação desse complexo envolve uma extração com diclorometano. No experimento de extração dos complexos metálicos com *n*-octanol, confirmou-se que o $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$ apresenta propriedades lipofílicas (Tabela V.5, adiante). Se podemos considerar que o esqueleto peptídico é um pouco menos hidrofóbico do que o *n*-octanol, seria possível então atribuir os mais elevados graus de desnaturação e supressão do complexo $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$ como devidos à sua maior propensão a penetrar na proteína. Além disso, o caráter ácido mais forte do centro de dirródio, e a presença dos grupos CF_3 equatoriais, permitiriam interações mais fortes com bases duras (átomos de O ou N) do arcabouço peptídico. Isso possivelmente seria um fator de grande perturbação estrutural para a proteína.

Figura 5.24: Superposição das regiões de absorção eletrônica dos complexos (em solução aquosa) com a região de emissão do Trp214 da HSA (tampão fosfato, pH 7,4).

Considerando agora o complexo amidato, $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$, notam-se duas importantes diferenças com os carboxilatos de ródio. A primeira é a presença dos grupos NH nos ligantes-ponte equatoriais (Figura 1.3). A segunda, seu espectro de absorção eletrônica está deslocado para maiores energias (Figura 5.24). A presença de uma banda ao redor de 380 nm permite a máxima sobreposição espectral com a emissão da HSA. Entretanto, o complexo $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ não apresentou a maior capacidade supressora e, além disso, praticamente não causou alterações importantes na estrutura da proteína (Tabela V.3), mesmo com uma solubilidade considerável no meio hidrofóbico (Tabela V.5, adiante).

Acreditamos que as diferentes capacidades supressoras dos carboxilatos de ródio sobre a HSA sejam função principalmente da *proximidade* que esses complexos têm em relação ao resíduo internalizado de Trp. No caso do trifluoroacetamidato, a presença dos grupos NH poderia impedir sua penetração na proteína, e daí observarmos a pouca perturbação sobre a estrutura secundária da mesma. Sua ação supressora, portanto, deveria

ser resultado de uma maior contribuição da sobreposição espectral em relação aos carboxilatos. A magnitude dos valores das constantes cinéticas de supressão (k_q) observadas (Tabela V.4) não sustenta a hipótese de supressão controlada por difusão, o que significa que o fluoróforo não é prontamente acessível ao supressor.

Ao tentar construir curvas Stern-Volmer com soluções de Trp *livre*, não conseguimos observar uma correlação linear entre (F_0/F) e $[Q]$. Quando os complexos de ródio estão em contato com o triptofano, os espectros de fluorescência são perturbados de maneira irregular, sem a linearidade observada quando o aminoácido está internalizado na HSA. Isto nos sugere que a presença dos complexos metálicos perturba o decaimento fluorescente do triptofano livre, talvez através da formação de adutos com padrões de emissão diferentes daqueles do aminoácido livre. Alguns dias após a adição de solução de Trp tamponada (pH 7,4) sobre soluções de carboxilatos de ródio, observou-se mudança de coloração de azul para amarelado. Dentro da proteína, portanto, não haveria contato direto entre os supressores (complexos de ródio) e o resíduo de Trp. Entretanto, pelos espectros da Figura 5.20 para a interação de butirato de ródio sobre a HSA, verifica-se uma modificação no padrão de emissão na região entre 400 e 460 nm para altas concentrações do complexo, o que evidenciaria um outro fenômeno além da supressão, uma possível interação de curta distância com o fluoróforo.

V.5 – PARTIÇÃO

O transporte de metais de transição através da membrana celular foi elucidado apenas recentemente, o que pode ter contribuído para as relativamente poucas pesquisas exaustivas de novos metalofármacos. Normalmente se assumia um transporte passivo dessas espécies através da membrana, se bem que já se tenha relatado o transporte *ativo* de íons metálicos promovido por uma proteína trans-membrana conhecida como DCT1 (*Divalent Cation Transporter*, presente principalmente na porção inicial do duodeno, podendo incorporar uma grande variedade de cátions como Fe^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Mn^{+2} , Pb^{+2} e Zn^{+2} [Gunshin *et al.*, 1997; Andrews *et al.*, 1999]). Entretanto, não se conhece ainda o papel dos ligantes do complexo metálico nesse transporte [Schwietert e McCue, 1999].

Por ora, estaremos assumindo um transporte passivo dos carboxilatos de ródio para a célula tumoral.

Foram determinadas as porcentagens de extração dos complexos de ródio por fase orgânica (*n*-octanol) e por células de ascite de Ehrlich, para se desenhar um possível esquema da transferência das drogas metálicas da albumina para a célula tumoral. Posto que a membrana celular é lipoprotéica, o objetivo foi verificar se há correlações entre a lipossolubilidade (inferida pela facilidade de extração com *n*-octanol) (Tabela V.5) e a difusão dos complexos de ródio(II) para a fração celular (Tabela V.6).

Tabela V.5: Lipossolubilidade dos complexos em *n*-octanol.

Complexo	A sem extração	A com extração	% extraída
$\text{Rh}_2(\text{ac})_4$	0,0401	0,0340	15,2
$\text{Rh}_2(\text{pr})_4$	0,0317	0,0216	31,9
$\text{Rh}_2(\text{but})_4$	0,0316	0,0014	95,6
$\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$	0,0195	0,0023	88,2
$\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$	0,0242	0,0048	80,2

Analisando os resultados de partição (Tabela V.6), pode-se notar novamente que as diferentes absorções dos alquilcarboxilatos pela fase celular são consistentemente governadas por suas lipofilicidades, tanto em estado livre como ligado à HSA. Em princípio, apenas o complexo livre (não associado à proteínas plasmáticas) estaria maximamente disponível para difusão através da membrana e penetração celular [Benet *et al.*, 1990], embora, como vimos, o próprio sistema droga—albumina possa ser internalizado [Stehle

et al., 1999], inclusive com alguma preferência pelo fluido intercelular tumoral [Gerlowski e Jain, 1986]. De acordo com Kodaka *et al.* (1998), o acúmulo de complexos de platina nas células está de fato correlacionado às suas lipofilicidades. Esses autores, contudo, sugerem que compostos muito hidrofóbicos poderiam interagir mais irreversivelmente com a membrana celular, diminuindo a quantidade de droga disponível para o núcleo. Acreditamos que esse fenômeno seria um obstáculo à ação antitumoral daqueles complexos cujo mecanismo envolvesse *basicamente* uma interação com DNA, o que ainda está por se demonstrar para o caso dos complexos de ródio(II) estudados. Danos à membrana citoplasmática podem ser nocivos para a célula.

Tabela V.6: Partição com células:

a) Complexos livres¹

$2,68 \times 10^6$ células mL⁻¹ ($1,68 \times 10^6$ células vivas mL⁻¹ + $1,00 \times 10^6$ células mortas mL⁻¹)

Complexo	[Rh] _{células}	[Rh] _{S1}	[Rh] _{S2}	[Rh] _{S3}	Média	[Rh] _{orig.}	%[Rh] _{Sobren.}	%[Rh] _{Extraída}
Rh ₂ (ac) ₄	2,855	0,563	0,490	0,538	0,531	1,592	55,8	44,2
Rh ₂ (pr) ₄	2,288	0,144	0,140	0,156	0,147	0,440	19,2	80,8
Rh ₂ (but) ₄	1,146	0	0	0	0,000	0,000	0,00	100,0
Rh ₂ (tfa) ₄	1,006	0,218	0,165	0,171	0,185	0,554	55,1	44,9
Rh ₂ (tfc) ₄	1,366	0,322	0,315	0,291	0,309	0,928	67,9	32,1

b) Complexos conjugados à HSA¹

$1,36 \times 10^6$ células mL⁻¹ (9×10^5 células vivas mL⁻¹ + $4,6 \times 10^5$ células mortas mL⁻¹)

Complexo	[Rh] _{células}	[Rh] _{S1}	[Rh] _{S2}	[Rh] _{S3}	Média	[Rh] _{orig.}	%[Rh] _{Sobren.}	%[Rh] _{Extraída}
Rh ₂ (ac) ₄	2,472	0,606	0,592	0,600	0,599	1,798	72,8	27,2
Rh ₂ (pr) ₄	1,986	0,352	0,364	0,465	0,394	1,181	59,5	40,5
Rh ₂ (but) ₄	1,201	0,091	0,048	0,072	0,070	0,210	17,5	82,5
Rh ₂ (tfa) ₄	2,040	0,498	0,515	0,529	0,514	1,541	75,6	24,4
Rh ₂ (tfc) ₄	1,766	0,273	0,314	0,321	0,303	0,908	51,4	48,6

¹ Todas as concentrações em ppm Rh.

[Rh]_{células}: concentração de Rh após a diluição a dez vezes com a suspensão de células;

[Rh]_{S1}, [Rh]_{S2}, [Rh]_{S3}: concentração de Rh nos sobrenadantes (1 mL) extraídos após a vortexação, *diluídos* com 2,0 mL de água, para permitir a detecção;

[Rh]_{orig}: concentração original de Rh no sobrenadante [= Média x 3];

%[Rh]_{Sobren.}: porcentagem de Rh que permaneceu no sobrenadante [= (100. [Rh]_{orig}) / [Rh]_{células}];

%[Rh]_{Extraída}: porcentagem do que permaneceu no *pellet* celular [= 100 - %S].

Com relação à partição com células, o complexo Rh₂(tfa)₄ comporta-se de modo semelhante ao Rh₂(ac)₄, embora seja mais lipofílico. Tendo em conta sua já descrita afinidade pela HSA, especialmente a de natureza hidrofóbica, não seria surpreendente verifi-

car que ele seja transferido em menor escala do que os demais (Tabela V.6b). Entretanto, a explicação para a relativamente diminuída partição do complexo *livre* para as células (Tabela V.6a) parece envolver um outro tipo de fenômeno ao nível da membrana, que necessitaria de maiores elucidações. Analogamente, o trifluoroacetamidata livre também apresenta diminuída difusão pela fase celular.

O complexo $Rh_2(tfc)_4$ apresenta maior difusão celular (aproximadamente 21%) quando ligado à proteína, comparando-se com o $Rh_2(ac)_4$ (Tabela V.6b), mas essa tendência é revertida para os complexos livres (Tabela V.6a). Isto poderia indicar que os ligantes trifluoroacetamidatos podem favorecer a liberação do complexo da proteína.

V.6 – ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DO COMPLEXO $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$

Voltamo-nos agora aos resultados de atividade biológica do complexo $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$. O estudo histopatológico desse complexo em camundongos (Figuras 5.25 a 5.32) mostrou que os principais alvos são o pulmão, rins e fígado. Observaram-se focos de hemorragia e colapso alveolar no tecido pulmonar (Figura 5.25b,c), e vacuolização do tecido renal (Figura 5.26b-d) e hepático (Figura 5.27b-d), que pode ser visualizada pelo aparecimento de “buracos” permeando as células. Tal vacuolização poderia ser explicada como sendo uma resposta da célula à contaminação pelo complexo, tentando compartimentalizá-lo e/ou neutralizá-lo. O rompimento de tais vacúolos, quando estão muito grandes, libera no citossol enzimas digestivas que também contribuem para a morte celular.

Metais pesados como o Cd, Hg e Pb apresentam perfis de nefrotoxicidade semelhantes [Haschkek e Rousseaux, 1998]. Não foram observadas alterações importantes no córtex cerebral, testículos, miocárdio e medula. Quanto ao baço, a intumescência observada em relação ao tecido normal (Figuras 5.28b,c) tanto após a administração da droga como do veículo (Tween® 80) poderia ser explicada por uma resposta inflamatória.

Figura 5.25: Fotografia em microscópio ótico de corte de tecido de pulmão de camundongo Balb-c (aumento: 6,3x). *a*: tecido normal. *b*: após tratamento com 5×10^{-5} mol/kg de $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$.

Figura 5.25 (*continuação*): Fotografia em microscópio ótico de corte de tecido de pulmão de camundongo Balb-c. c: após tratamento com 5×10^{-5} mol/kg de $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$; aumento de 16x.

Figura 5.26: Fotografia em microscópio ótico de corte de tecido de rim de camundongo Balb-c (aumento: 6,3x). *a*: tecido normal. *b*: após tratamento com 5×10^{-5} mol/kg de $Rh_2(tfc)_4$.

Figura 5.26 (*continuação*): Fotografia em microscópio ótico de corte de tecido de rim de camundongo Balb-c após tratamento com 5×10^{-5} mol/kg de $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$. c: aumento de 40x. d: aumento de 100x.

Figura 5.27: Fotografia em microscópio ótico de corte de tecido de fígado de camundongo Balb-c (aumento: 6,3x). a: tecido normal. b: após tratamento com 5×10^{-5} mol/kg de $Rh_2(tfc)_4$.

Figura 5.27 (*continuação*): Fotografia em microscópio ótico de corte de tecido de fígado de camundongo Balb-c após tratamento com 5×10^{-5} mol/kg de $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$. c: aumento de 16. d: aumento de 40x.

Figura 5.28: Fotografia em microscópio ótico de corte de tecido de baço de camundongo Balb-c (aumento: 6,3x). *a*: tecido normal. *b*: após tratamento com Tween® 80.

Figura 5.28 (*continuação*): Fotografia em microscópio ótico de corte de tecido de baço de camundongo Balb-c. c: após tratamento com 5×10^{-5} mol/kg de $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$; aumento de 6,3x.

Figura 5.29: Fotografia em microscópio ótico de corte de tecido do córtex cerebral de camundongo Balb-c (aumento: 6,3x). a: tecido normal. b: após tratamento com 5×10^{-5} mol/kg de $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$.

Figura 5.30: Fotografia em microscópio ótico de corte de tecido de testículo de camundongo Balb-c (aumento: 6,3x). *a*: tecido normal. *b*: após tratamento com 5×10^{-5} mol/kg de $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$.

Figura 5.31: Fotografia em microscópio ótico de corte de tecido de miocárdio de camundongo Balb-c (aumento: 6,3x). a: tecido normal. b: após tratamento com 5×10^{-5} mol/kg de $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$.

Figura 5.32: Fotografia em microscópio ótico da medula de camundongo Balb-c (aumento: 16x). *a*: tecido normal. *b*: após tratamento com 5×10^{-5} mol/kg de $Rh_2(tfc)_4$.

V.7 – ESTUDO DE SOBREVIDA

A estratégia de utilizar albuminas (bovina, de rato ou humana) como carregadoras de drogas para células tumorais é já bastante conhecida. Embora as células não disponham de receptores de membrana para essa proteína, elas podem endocitar macromoléculas, que são metabolizadas e utilizadas para síntese de novas proteínas. Há evidências de que macromoléculas como a albumina podem penetrar mais facilmente no fluido intersticial de tumores do que naqueles de tecidos normais [Gerlowski e Jain, 1986]. Drogas ligadas à albumina (normalmente por ligações covalentes) são então lisossomadas e liberadas dentro do citossol, onde exercem sua ação biológica. Como a demanda por aminoácidos para síntese protéica é maior para a célula tumoral, percebe-se então que a albumina pode funcionar como um típico transportador de drogas (v. o caso das drogas de rutênio com apoTf, II.3.3) [Stehle *et al.*, 1999].

Foram testadas as ações antitumorais do aduto HSA—Rh₂(tfc)₄ e do complexo livre Rh₂(tfc)₄ (Figuras 5.33 e 5.34, respectivamente). Todos os camundongos do primeiro experimento que sobreviveram após o período de investigação (39 dias) apresentavam tumor sólido, uma resposta fisiológica ao foco tumoral causada ou pela pouca quantidade de células ascíticas injetadas, ou por um efeito terapêutico da droga. Esses camundongos, mesmo portadores de tumor, podem levar meses antes de morrer, e portanto interrompemos o experimento depois que todos os camundongos sem tumor sólido haviam morrido.

Figura 5.33: Curva de Kaplan-Meier da sobrevivência dos camundongos Balb-c tratados com o composto HSA-Rh₂(tfc)₄ (dose final: 5,6 µmol/kg). Ao final do experimento, alguns camundongos desenvolveram tumor sólido.

Figura 5.34: Curva de Kaplan-Meier da sobrevivência dos camundongos Balb-c tratados com o complexo Rh₂(tfc)₄ (dose final: 5,3 µmol/kg).

A significância da sobrevida dos grupos tratados foi verificada através do teste de Mantel-Haenszel (Quadros 5.1 e 5.2) [Matthews e Farewell, 1988].

Quadro 5.1: Teste de Mantel-Haenszel para o experimento de sobrevida com camundongos Balb-c tratados com HSA-Rh₂(tfc)₄ (Controle: solução de albumina).

t	n	n ₁	n ₂	r	c	o ₁	o ₂	e ₁	e ₂
1	30	15	15	3	-	3	0	1,50	1,50
2	27	12	15	2	-	2	0	0,89	1,11
3	25	10	15	5	-	5	0	2,00	3,00
4	20	5	15	2	-	1	1	0,50	1,50
5	18	4	14	1	-	1	0	0,22	0,78
6	17	3	14	1	-	1	0	0,18	0,82
7	16	2	14	1	-	0	1	0,13	0,88
8	15	2	13	1	-	0	1	0,13	0,87
9	14	2	12	2	-	0	2	0,29	1,71
10	12	2	10	1	-	0	1	0,17	0,83
11	11	2	9	1	-	0	1	0,18	0,82
12	10	2	8	1	-	0	1	0,20	0,80
13	9	2	7	1	-	0	1	0,22	0,78
14	8	2	6	1	-	0	1	0,25	0,75
15	7	2	5	1	-	0	1	0,29	0,71

Quadro 5.2: Teste de Mantel-Haenszel para o experimento de sobrevida com camundongos Balb-c tratados com Rh₂(tfc)₄ (Controle: tampão fosfato).

t	n	n ₁	n ₂	r	c	o ₁	o ₂	e ₁	e ₂
1	30	15	15	4	-	4	0	2,00	2,00
2	26	11	15	7	-	7	0	2,96	4,04
3	19	4	15	2	-	2	0	0,42	1,58
4	17	2	15	2	-	1	1	0,24	1,76
5	15	1	14	1	-	0	1	0,07	0,93
6	14	1	13	1	-	0	1	0,07	0,93
7	13	1	12	3	-	1	2	0,23	2,77

t = período
n = número total de animais
n₁ = n° animais do grupo controle
n₂ = n° animais tratados
r = número de mortos

c = número de censurados
o₁ = mortes observadas no período, controle
o₂ = mortes observadas no período, tratados
e₁* = mortes esperadas no período, controle
e₂* = mortes esperadas no período, tratados

$$* e_i = (r \cdot n_i) / n$$

Para calcularmos T (Equação 10, capítulo IV), foram obtidos antes

$$O_i = \sum_i o \quad e \quad E_i = \sum_i e$$

Portanto, **T = 6,83** (Quadro 5.1) e **19,39** (Quadro 5.2).

Ou seja, as diferenças observadas nos padrões de sobrevivência, em ambos os testes, são estatisticamente significantes ($p < 0,01$).

Os controles nestes experimentos não foram exatamente idênticos (solução de HSA e solução tampão; v. item IV.8), portanto uma comparação direta entre os perfis de sobrevivência dos camundongos tratados com $Rh_2(tfc)_4$ e HSA— $Rh_2(tfc)_4$ não seria rigorosamente válida do ponto de vista da análise estatística empregada. Fazendo-se essa ressalva, aplicamos o teste de Mantel-Haenszel nesses dois perfis, considerando o grupo $Rh_2(tfc)_4$ como um “controle” do grupo HSA— $Rh_2(tfc)_4$ (Quadro 5.3), a fim de ganhar evidências a respeito da albumina estar afetando, e em que medida, a biodistribuição do complexo.

Quadro 5.3: Teste de Mantel-Haenszel para o experimento de sobrevivência com camundongos Balb-c tratados com HSA— $Rh_2(tfc)_4$ (Controle: $Rh_2(tfc)_4$).

t	n	n ₁	n ₂	r	c	o ₁	o ₂	e ₁	e ₂
1	30	15	15	1	-	1	0	1,50	1,50
2	29	14	15	1	-	0	1	0,48	0,52
3	28	14	14	2	-	1	1	1,00	1,00
4	26	13	13	1	-	1	0	0,50	0,50
5	25	12	13	1	-	0	1	0,48	0,52
6	24	12	12	4	-	2	2	2,00	2,00
7	20	10	10	2	-	1	1	1,00	1,00
8	18	9	9	3	-	2	1	1,50	1,50
9	15	7	8	1	-	1	0	0,47	0,53
10	14	6	8	1	-	1	0	0,43	0,57
11	13	5	8	1	5	0	1	0,38	0,62

A diferença nos padrões de sobrevivência, contudo, não foi estatisticamente significativa neste último caso ($T = 0,51$). Ou seja, admitindo-se que os dois diferentes controles possam ser diretamente comparados, não se percebe uma discrepância entre a sobrevivência dos camundongos tratados com o complexo de ródio livre e a daqueles que receberam tal substância pré-incubada à albumina. Como já vimos que o acetato de ródio liga-se rapidamente à albumina em meio plasmático, e pressupondo que o $Rh_2(tfc)_4$ apresentaria comportamento análogo, esta semelhança nos indicaria que a albumina é de fato um transportador (ou um “reservatório”) para os complexos de ródio pela corrente sanguínea.

Juntamente com as considerações sobre as afinidades dos complexos de ródio(II) pela HSA e/ou células, poderíamos imaginar que os complexos incorporados à albumina sejam posteriormente transferidos para a célula tumoral por difusão passiva e/ou endocitose. As interações entre os complexos de ródio(II) e a HSA nativa parecem governadas por um misto de efeitos lipofílicos e de coordenação, causando relativamente poucas alterações estruturais sobre essa proteína.

VI – CONCLUSÕES

*“The dirhodium class of compounds may be too toxic for clinical use,
but a better understanding of their mechanism
may lead to improvements elsewhere.”
— Clarke et al., 1999*

- 1) A ligação entre $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ com o plasma total e posterior fracionamento indicam que a HSA é um alvo sorológico importante para este complexo, e possivelmente para os demais dímeros de ródio(II). A reação é rápida.
- 2) A HSA liga-se com aproximadamente 8 equivalentes dos complexos $\text{Rh}_2(\text{ponte})_4$ (ponte = acetato, propionato, butirato, trifluoroacetato ou trifluoroacetamidato), provavelmente através de resíduos de histidina.
- 3) Os alquilcarboxilatos de ródio(II) apresentam eficácia supressora, ação desnaturante (limitada) e perfil de partição pelas células *in vitro* correlacionados com suas lipofilicidades.
- 4) A afinidade medida por espectrofotometria dos alquilcarboxilatos de ródio(II) pelos resíduos de aminoácidos na HSA correlaciona-se *inversamente* com suas lipofilicidades.
- 5) O complexo $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$ apresenta eficácia supressora e ação desnaturante correlacionadas com sua lipofilicidade, sendo esses efeitos mais intensos do que os observados nos alquilcarboxilatos. Sugere-se que a maior dureza dos centros metálicos cause maiores distúrbios à estrutura protéica e seja a responsável pela relativamente elevada afinidade pela ligação axial com aminoácidos (provavelmente histidina) na HSA. Tanto o complexo livre como o ligado à proteína são relativamente pouco difusíveis por células *in vitro*.
- 6) O complexo $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ não perturba a estrutura da HSA, embora seja lipofílico e apresente lipossolubilidade intermediária. A presença do ligante-ponte trifluoroacetamidato pode interagir de forma diferente com o arcabouço peptídico do que a dos ligantes carboxilatos.
- 7) Em doses próximas à DL_{50} , o complexo $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ provoca danos hepáticos, renais e pulmonares. Sua toxicidade é tipicamente a de um metal pesado.
- 8) O composto $\text{HSA—Rh}_2(\text{tfc})_4$ apresenta ação antitumoral, indicando que a HSA pode se constituir em um reservatório para o complexo $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ (e provavelmente para os demais complexos de ródio) para a lenta liberação à célula tumoral.

Apêndices

Estruturas moleculares e códigos de três e um caracteres dos α -aminoácidos

$\begin{array}{c} \text{HCHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Glicina (Gly;G)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Alanina (Ala;A)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{CHCHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Valina (Val;V)
$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CHCH}_2\text{CHCOOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$ Leucina (Leu;L)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHCHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Isoleucina (Ile;I)	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Fenilalanina (Phe;F)
$\begin{array}{c} \text{HOCH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Serina (Ser;S)	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3\text{CHCHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Treonina (Thr;T)	$\begin{array}{c} \text{HO-C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Tirosina (Tyr;Y)
$\begin{array}{c} \text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Triptofano (Trp;W)	$\text{CH}_3\text{—S—CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH}$ NH₂ Metionina (Met;M)	$\text{HS—CH}_2\text{CHCOOH}$ NH₂ Cisteína (Cys;C)
$\begin{array}{c} \text{C}_4\text{H}_7\text{NCH}_2\text{COOH} \end{array}$ Prolina (Pro;P)	$\begin{array}{c} \text{HOOCCH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Ácido aspártico (Asp;D)	$\begin{array}{c} \text{HO—CCH}_2\text{CHCOOH} \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ Asparagina (Asn;N)
$\begin{array}{c} \text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Ácido glutâmico (Glu;E)	$\begin{array}{c} \text{HO—CCH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ Glutamina (Gln;Q)	$\begin{array}{c} \text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Histidina (His;H)
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N—C—NH—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \quad \\ \text{NH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ Arginina (Arg;R)		$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Lisina (Lys;K)

Glossário

- Definição dos parâmetros farmacológicos

CI₅₀	Concentração inibitória para 50% das células
DE₅₀	Dose eficaz 50% (é a dose que provoca o efeito em estudo — exceto morte — em 50% da população)
DL₁₀	Dose letal para 10% da população
DL₅₀	Dose letal para 50% da população
ILS₄₀	<i>Increased life span 40%</i> ; Aumento de sobrevida 40% (dose que aumenta em 40% a sobrevida do grupo tratado em relação ao grupo controle)
IT	Índice terapêutico, $IT = DL_{50}/DE_{50}$

- Outros termos

kd	kilodalton (o <i>dalton</i> é uma unidade de massa exatamente igual a 1,0000 na escala de massas atômicas; 1 kd = 1000 daltons)
pl	Ponto isoelétrico (pH no qual a carga líquida da proteína é zero)
Plasma	(ou Soro) Parte não-celular do sangue, aproximadamente 55% do seu volume. É composto de 90% de água e 10% de solutos; destes, 3/4 em massa são proteínas.

BIBLIOGRAFIA

1. AHSAN, M.Q.; Bernal, I. e Bear, J.L. (1986). Reaction of $\text{Rh}_2(\text{OOCCH}_3)_4$ with acetamide: crystal and molecular structure of $[\text{Rh}_2(\text{HNOCCCH}_3)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ *Inorg. Chem.* **25**, 260-265.
2. ANDREWS, N.C.; Fleming, M.D. e Gunshin, H. (1999). Iron transport across biologic membranes. *Nutrit. Rev.* **57(4)**, 114-123.
3. ATKINS, P.W. (1994). Physical chemistry. 5ª edição. Oxford University Press, Oxford.
4. BAL, W.; Christodoulou, J.; Sadler, P.J. e Tucker, A. (1998a). Multi-metal binding site of serum albumin. *J. Inorg. Biochem.* **70**, 33-39.
5. BAL, W.; Dyba, M.; Kasprzykowski, F.; Kozłowski, H.; Latajka, R.; Lankiewicz, L. Mackiewicz, Z. e Pettit, L.D. (1998b). How non-bonding amino acid side-chains may enormously increase the stability of a Cu(II)-peptide complex. *Inorg. Chim. Acta* **283**, 1-11.
6. BARANOVSKII, I.B. e Sevast'yanova, R.E. (1984). Acetamidate complexes of rhodium(II). *Russ. J. Inorg. Chem.* **29(7)**, 1025-1027.
7. BEAR, J.L.; Gray Jr, H.B.; Rainen, L.; Chang, I.M.; Howard, R.; Serio, G. e Kimball, A.P. (1975). Interaction of rhodium(II) carboxylates with molecules of biologic importance. *Cancer Chemother. Rep.* **59**, 611-620.
8. BEAR, J.L.; Zhu, T.P.; Malinski, T.; Dennis, A.M. e Kadish, K.M. (1984). Electrochemical characterization of a rhodium(II) dimer with *N*-phenylacetamido bridging ligands. *Inorg. Chem.* **23**, 674-678.
9. BEAR, J.L. (1986). Rhodium compounds for antitumor use. *Precious Met. Proc. Int. Precious Met. Inst. Conf. 9th* **9**, 337-344.
10. BELTRÁN, M.; Onoa, G.B.; Pedroso, E.; Moreno, V. e Grandas, A. (1999). Study of the interaction between a histidine-deoxyguanosine hybrid and cisplatin. *J. Biol. Inorg. Chem.* **4**, 701-707.
11. BENET, L.Z.; Mitchell, J.R. e Sheiner, L.B. (1990). Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution and elimination *in* Goodman and Gilman's pharmacological basis of therapeutics, 8ª ed, Gilman, A.G.; Rall, T.W.; Nies, A.S.; Taylor, P., eds, Pergamon, New York, página 12.
12. BEST, S.P.; Chandley, P.; Clark, R.J.H.; McCarthy, S.; Hursthouse, M.B. e Bates, P.A. (1989). Syntheses, electrochemistry, and spectroscopy of dirhodium(II) tetraacetamidate and tetrakis(trifluoroacetamidate) complexes with axial group 15 substi-

- tuent. The X-ray crystal structure of $[\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{CONH})_4(\text{AsPh}_3)_2]$ and $[\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{CONH})_{4-n}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_n(\text{MPh}_3)_2]$, M = As or Sb, $n \sim 1$. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 581-588.
13. BEST, S.P.; Clark, R.J.H. e Nightingale, A.J. (1990). Resonance Raman spectroscopy of the one-electron-oxidized analogues of dirhodium complexes $\text{Rh}_2(\text{bridge})_4.2\text{L}$: bridge = acetate, acetamidate, or trifluoroacetamidate; L = triphenylphosphine or triphenylarsine. Relationship between the rhodium-rhodium stretching frequency and bond order. *Inorg. Chem.* **29**, 1383-1387.
  14. BIEN, M.; Lachowicz, T.M.; Rybka, A.; Pruchnik, F.P. e Trynda, L. (1997). Binuclear rhodium(II) complexes with selective antibacterial activity. *Metal-Based Drugs* **4**, 81-88.
  15. BIEN, M.; Pruchnik, F.P.; Seniuk, A.; Lachowicz, T.M. e Jakimowicz, P. (1999). Studies of antibacterial activity of binuclear rhodium(II) complexes with heterocyclic nitrogen ligands. *J. Inorg. Biochem.* **73**, 49-55.
  16. BLOEMINK, M.J. e Reedijk, J. (1996). Cisplatin and derived anticancer drugs: mechanism and current status of DNA binding. *Met. Ions Biol. Systems* **32**, 641-685.
  17. BOYAR, E.B. e Robinson, S.D. (1983). Rhodium(II) carboxylates. *Coord. Chem. Rev.* **50**, 109-208.
  18. CARTER, D.C. e Ho, J.X. (1994). Structure of serum albumin. *Adv. Prot. Chem.* **45**, 153-203.
  19. CATALAN, K.V.; Chifotides, H.T.; Dunbar, K.R. e Mindiola, A.J. (1995). Synthesis and single crystal X-ray studies of dirhodium complexes with DNA purines. *Proc. NOBC-ChE* **22**, 177-184 [CA: 124:192361s].
  20. CATALAN, K.V.; Hess, J.S.; Maloney, M.M.; Mindiola, D.J.; Ward, D.L. e Dunbar, K.R. (1999). Reactions of DNA purines with dirhodium formamidinate compounds that display antitumor behavior. *Inorg. Chem.* **38**(17), 3904-3913.
  21. CHAKRAVARTY, A.R.; Cotton, F.A.; Tocher, D.A. e Tocher, J.H. (1985). Syntheses, structures and redox properties of tetrakis-(μ -benzamidato)-dirhodium(II) complexes. *Inorg. Chim. Acta* **101**, 185-196.
  22. CHEN, R.F. (1976). The effect of metal cations on intrinsic protein fluorescence. in *Bi-ochemical fluorescence: Concepts*, v. 2, R.F. Chen e H. Edelhoch, eds., Marcel Dekker, Inc., New York e Basel, capítulo 13, 573-606.
  23. CHIFOTIDES, H.T.; Dunbar, K.R.; Matonic, J.H. e Katsaros, N. (1992). Unusual structural features of tetrakis-(μ -carboxylato) dirhodium(II), an antitumor agent, bound to a-

- zathioprine, a biologically active mercaptopurine derivative. *Inorg. Chem.* **31(22)**, 4628-4634.
24. CLARKE, M.J. e Stubbs, M. (1996). Interactions of metallopharmaceuticals with DNA. *Met. Ions Biol. Syst.* **32**, 727-780.
  25. CLARKE, M.J.; Zhu, F. e Frasca, D.R. (1999). Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. *Chem. Rev.* **99**, 2511-2533.
  26. COLE, W.C. e Wolf, W. (1980). Preparation and metabolism of a cisplatin/serum protein complex. *Chem.-Biol. Interactions* **30**, 223-235.
  27. Cotton, F.A.; Drexler Jr., J.W. e Schreiner, A.F. (1988). Electronic excitation MO assignment of $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CR})_4(\text{L}_{\text{ax}})_2$ using MCT experiment and theory. *Inorg. Chem.* **27(19)**, 3265-3267.
  28. CRACIUNESCU, D.G.; Molina, C.; Parrondo-Iglesias, E.; Alonso, M.P.; Lorenzo Molina, C.; Doadrio-Villarejo, J.C.; Gutierrez-Rios, M.T.; de Frutos, M.I.; Gaston de Iriarte, E.; Certad Fombona, G. e Ercoli, N. (1991). Estudio de las actividades farmacológicas duales (antitumorales y antitripanosómicas) "in vivo" desplegadas por los nuevos complejos dímeros y neutros del Ir(II) y del Rh(II) con los medicamentos antimaláricos clásicos. *An. Real Acad. Farm.* **57**, 15-36.
  29. CURRY, S.; Mandelkow, H.; Brick, P. e Franks, N. (1998). Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nature Struct. Biol.* **5(9)**, 827-835.
  30. CURRY, S.; Brick, P. e Franks, N. (1999). Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim. Biophys. Acta* **1441**, 131-140.
  31. DALEY-YATES, P.T. e McBrien, D.C.H. (1985). The renal fractional clearance of platinum antitumour compounds in relation to nephrotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* **34(9)**, 1423-1428.
  32. DANIELS, M.A.M.; Mehmet, N. e Tocher, D.A. (1991). Synthesis, characterisation and crystal structure of a dirhodium(II) compound with two bridging trifluoroacetamidate ligands. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2601-2606.
  33. DAS, K. e Bear, J.L. (1976). Complexation of tetra- μ -carboxylato-dirhodium(II) with imidazole. *Inorg. Chem.* **15(9)**, 2093-2095.
  34. DAS, K.; Simmons, E.L. e Bear, J.L. (1977). Thermodynamics and kinetics of some tetra- μ -carboxylato-dirhodium(II) adduct formation reactions. *Inorg. Chem.* **16(6)**, 1268-1271.

35. DAS, K.; Kadish, K.M. e Bear, J.L. (1978). Substituent and solvent effects on the electrochemical properties of tetra- μ -carboxylato-dirhodium(II). *Inorg. Chem.* **17**(4), 930-934.
36. DENNIS, A.M.; Howard, R.A. e Bear, J.L. (1982a). The reactivity of tetra- μ -acetatodirhodium(II) with selected di- and tripeptides, substituted pyridines and imidazole ligands. *Inorg. Chim. Acta* **66**, L31-L34.
37. DENNIS, A.M.; Howard, R.A.; Lançon, D.; Kadish, K.M. e Bear, J.L. (1982b). A dirhodium(II) complex with trifluoroacetamidato ligands. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 399-401.
38. DENNIS, A.M.; Korp, J.D.; Bernal, I.; Howard, R.A. e Bear, J.L. (1983). Crystal and molecular structure of a dinuclear rhodium(II) complex with trifluoroacetamidato bridging ligands. *Inorg. Chem.* **22**, 1522-1529.
39. DHUBHGHAILL, O.M.N. e Sadler, P.J. (1993). Gold complexes in cancer chemotherapy. *In Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, B.K. Keppler, ed., VCH, 221-248.
40. DIXON, J.W. e Sarkar, B. (1974). Isolation, amino acid sequence and copper(II)-binding properties of peptide (1-24) of dog serum albumin. *J. Biol. Chem.* **249**(18), 5872-5877.
41. DUNBAR, K.R.; Matonic, J.H.; Saharan, V.P.; Crawford, C.A. e Christou, G. (1994). Structural evidence for a new metal-binding mode for guanine bases: implications for the binding of dinuclear antitumor agents to DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **116**(5), 2201-2202.
42. DUNCAN, J.; Malinksi, T.; Zhu, T.P.; Hu, Z.S.; Kadish, K.M. e Bear, J.L. (1982). Characterization of novel rhodium(II) dimers with *N*-phenylacetamido bridging ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 5507-5509.
43. DUNN, M.J. (1994a). Determination of total protein concentration. *In Protein purification methods — a practical approach*. Harris, E.L.V. e Angal, S. (eds). IRL Press, Oxford, 10-18.
44. DUNN, M.J. (1994b). Electrophoretic analysis methods. *In Protein purification methods — a practical approach*. Harris, E.L.V. e Angal, S. (eds). IRL Press, Oxford, 18-40.
45. EFTINK, M.R. (1991). Fluorescence techniques for studying protein structure. *Meth. Biochemical Anal.* **35**, 127-205.
46. EFTINK, M.R. e Ghiron, C.A. (1981). Fluorescence quenching studies with proteins. *Anal. Biochem.* **114**, 199-227.

47. ERCK, A.; Rainen, L.; Whileyman, J.; Chang, I.M.; Kimball, A.P. e Bear, J.L. (1974). Studies of rhodium(II) carboxylates as potential antitumor agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **145**, 1278-1283.
48. ERCK, A.; Sherwood, E.; Bear, J.L. e Kimball, A.P. (1976). The metabolism of rhodium(II) acetate in tumor-bearing mice. *Cancer Res.* **36**, 2204-2209.
49. ESPÓSITO, B.P. (1997). Estudo das interações entre carboxilatos de ródio(II) e amidas. Dissertação de mestrado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
50. ESPÓSITO, B.P.; Souza, A.R.; Zyngier, S.B. e Najjar, R. (1997). $Rh_2(CF_3CONH)_4$: the first biologic assays of a rhodium (II) amidate. *Metal-Based Drugs* **4(6)**, 333-338.
51. ESPÓSITO, B.P.; Zyngier, S.B.; Najjar, R.; Paes, R.P.; Ueda, S.M.Y. e Barros, J.C.A. (1999a). Survival and histopathological study of animals bearing Ehrlich tumor treated with a rhodium(II) amidate. *Metal-Based Drugs* **6(1)**, 17-18.
52. ESPÓSITO, B.P.; Faljoni-Alário, A.; Menezes, J.F.S.; Brito, H.F. e Najjar, R. (1999b). A circular dichroism and fluorescence quenching study of the interactions between rhodium (II) complexes and human serum albumin. *J. Inorg. Biochem.* **75(1)**, 55-61.
53. ESPÓSITO, B.P.; Oliveira, E., Zyngier, S.B. e Najjar, R. (2000). Effects of human serum albumin in some biological properties of rhodium(II) complexes. *J. Braz. Chem. Soc.* (no prelo).
54. FARRELL, N.; Williamson, J. e McLaren, D.J.M. (1984). Trypanocidal and antitumour activity of platinum-metal and platinum-metal-drug dual-function complexes. *Biochem. Pharmacol.* **33(7)**, 961-971.
55. FARRELL, N. (1996). Current status of structure-activity relationships of platinum anticancer drugs: activation of the trans geometry. *Met. Ions Biol. Systems* **32**, 603-639.
56. FELTHOUSE, T.R. (1982). The chemistry, structure, and metal-metal bonding in compounds of rhodium(II). *Progress Inorg. Chem.* **29**, 73-155.
57. FIMIANI, V.; Ainis, T.; Cavallaro, A. e Piraino, P. (1990). Antitumor effect of the new rhodium(II) complex: $Rh_2(For)_2(O_2CCF_3)_2(H_2O)_2$ (Form=N,N'-di-*p*-tolylformamidinate). *J. Chemother.* **2(5)**, 319-326.
58. FONTES, A.P.S.; Almeida, S.G. e Nader, L.A. (1997). Compostos de platina em quimioterapia do câncer. *Quím. Nova* **20(4)**, 398-406.
59. GERLOWSKI, L. e Jain, R.K. (1986). Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvascular Res.* **31**, 288-305.
60. GIL, E.S.; Gonçalves, M.I.A.; Ferreira, E.I.; Zyngier, S.B. e Najjar, R. (1999). Water soluble cyclophosphamide adducts of rhodium(II) keto-gluconate and glucuronate.

- Synthesis, characterization and *in vitro* cytostatic assays. *Metal-Based Drugs* **6**(1), 19-24.
61. GILLARD, R.D. (1971). Some advances in rhodium chemistry. *Rec. Chem. Prog.* **32**, 17.
  62. GOUMAKOS, W.; Laussac, J.-P. e Sarkar, B. (1991). Binding of cadmium(II) and zinc(II) to human and dog serum albumins. An equilibrium dialysis and ^{113}Cd -NMR study. *Biochem. Cell. Biol.* **69**, 809-820.
  63. GREENFIELD, N.J. (1996). Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.* **235**, 1-10.
  64. GUO, Z. e Sadler, P.J. (1999). Metals in medicine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 1512-1531.
  65. GUNSHIN, H.; Mackenzie, B.; Berger, U.V.; Gunshin, Y.; Romero, M.F.; Boron, W.F.; Nussberger, S.; Gollan, J.L. e Hediger, M.A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**, 482-488.
  66. HALL, L.M.; Speer, R.J. e Ridgway, H.J. (1980). Synthesis and antitumor activity of certain rhodium(II) carboxylates. *J. Clin. Hematol. Oncol.* **10**(1), 25-27.
  67. HANNON, M.J. (1997). Rhodium 1994. *Coord. Chem. Rev.* **162**, 477-494.
  68. HARFORD, C. e Sarkar, B. (1997). Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding (ATCUN) motif of proteins and peptides: Metal binding, DNA cleavage, and other properties. *Acc. Chem. Res.* **30**, 123-130.
  69. HASCHEK, W.M. e Rousseaux, C.G. (1998). Fundamentals of toxicologic pathology. Academic Press, San Diego, p. 168.
  70. HAY, R.W. (1984). Bio-inorganic chemistry. Ellis Horwood, West Sussex.
  71. HE, X.M. e Carter, D.C. (1992). Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **358**, 209-215.
  72. HOLDING, J.D.; Lindup, W.E.; Bowdler, D.A.; Siodlak, M.Z. e Stell, P.M. (1992a). Disposition and tumour concentrations of platinum in hypoalbuminemic patients after treatment with cisplatin for cancer of the head and neck. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **32**, 173-179.
  73. HOLDING, J.D.; Lindup, W.E.; Van Laer, C.; Vreeburg, G.C.M.; Schilling, V.; Wilson, J.A. e Stell, P.M. (1992b). Phase I trial of a cisplatin-albumin complex for the treatment of cancer of the head and neck. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **33**, 75-81.
  74. HOSHINO, T.; Misaki, M.; Yamamoto, M.; Shimizu, H.; Ogawa, Y. e Toguchi, H. (1995). *In vitro* cytotoxicities and *in vivo* distribution of transferrin-platinum(II) complex. *J. Pharm. Sci.* **84**(2), 216-221.

75. HOUSECROFT, C.E. (1996). Rhodium 1993. *Coord. Chem. Rev.* **152**, 107-139.
76. HOUSECROFT, C.E. (1995). Rhodium 1992. *Coord. Chem. Rev.* **146**, 235-267.
77. HOUSECROFT, C.E. (1994). Rhodium 1991. *Coord. Chem. Rev.* **134**, A307-A341.
78. HOUSECROFT, C.E. (1992). Rhodium. *Coord. Chem. Rev.* **115**, 191-230.
79. HOWARD, R.A.; Spring, T.G. e Bear, J. L. (1976). The interaction of rhodium(II) carboxylates with enzymes. *Cancer Res.* **36**, 4402-4405.
80. HOWARD, R.A.; Sherwood, E.; Erck, A.; Kimball, A.P. e Bear, J.L. (1977). Hydrophobicity of several rhodium(II) carboxylates correlated with their biologic activity. *J. Med. Chem.* **20(7)**, 943-946.
81. HUGHES, R.G.; Bear, J.L. e Kimball, A.P. (1972). Synergistic effect of rhodium acetate and arabinosylcytosine on L1210. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 120.
82. HYDES, P.C. e Russell, M.J.H. (1988). Advances in platinum cancer chemotherapy. *Cancer Metast. Rev.* **7**, 67-89.
83. ITO, A.S. (1994). Espectroscopia de fluorescência no estudo de sistemas de interesse biológico. Tese de livre-docência, Instituto de Física, Universidade de São Paulo.
84. IVANOV, A.I.; Christodoulou, J.; Parkinson, J.A.; Barnham, K.J.; Tucker, A.; Woodrow, J. e Sadler, P. (1998). Cisplatin binding sites on human albumin. *J. Biol. Chem.* **273(24)**, 14721-14730.
85. JOESTEN, M.D.; Najjar, R. e Hebrank, G. (1982). Metal complexes of alkylating agents - III. *Polyhedron* **1(7-8)**, 637-639.
86. KADISH, K.M.; Das, K.; Howard, R.; Dennis, A. e Bear, J.L. (1978). Redox reactions and antitumor activity of tetracarboxylatodirrhodium(II). *Bioelectrochem. Bioenerg.* **5(4)**, 741-753.
87. KADISH, K.M.; Lançon, D.; Dennis, A.M. e Bear, J.L. (1982). Electrochemical characterization of a novel rhodium(II) dimer, $\text{Rh}_2(\text{ONHCCF}_3)_4$. *Inorg. Chem.* **21**, 2987-2992.
88. KEPPLER, B.K.; Lipponer, K.-G.; Stenzel, B. e Kratz, F. (1993). New tumor-inhibiting ruthenium complexes. In *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, B.K. Keppler, ed., VCH, 187-220.
89. KODAKA, M.; Dohta, Y.; Rekonen, P.; Okada, T. e Okuno, H. (1998). Physicochemical factors for cytotoxic activity in platinum dinuclear complexes with pyrimidine and imide ligands. *Biophys. Chem.* **75**, 259-270.
90. KOUTSODIMOU, A. e Katsaros, N. (1996). Reactions of the rhodium trifluoroacetate dimer with nucleosides and nucleotides. *J. Coord. Chem.* **39**, 169-197.
91. KRAGH-HANSEN, U. (1990). Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan. Med. Bull.* **37(1)**, 57-84.

92. KRAGH-HANSEN, U.; Brennan, S.O.; Minchiotti, L. e Galliano, M. (1994). Modified high-affinity binding of Ni^{+2} , Ca^{+2} and Zn^{+2} to natural mutants of human serum albumin and proalbumin. *Biochem. J.* **301**(1), 217-223.
93. KRATZ, F. (1993). Interactions of antitumor metal complexes with serum proteins. Perspectives for anticancer drug development. *In Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, B.K. Keppler, ed., VCH, 391-429.
94. KRATZ, F. (1998). Antineoplastic transferrin and albumin conjugates of cytostatic antimetabolites, and cisplatin analogs. Patente (Chemical Abstracts 128:213389).
95. KRATZ, F. e Schutte, M.T. (1998). Anticancer metal complexes and tumour targeting strategies. *Cancer J.* **11**(4), 176-182.
96. LAKOWICZ, J.R. e Weber, G. (1973). Quenching of protein fluorescence by oxygen. Detection of structural fluctuations in proteins on the nanosecond time scale. *Biochemistry* **12**(21), 4171-4179.
97. LEROY, A.F. e Thompson, W.C. (1989). Binding kinetics of tetrachloro-1,2-diaminocyclohexaneplatinum(IV) and *cis*-diamminedichloroplatinum(II) at 37 °C with human plasma proteins and with bovine serum albumin. Does aquation precede protein binding? *J. Natl. Cancer Inst.* **81**(6), 427-436.
98. LIFSEY, R.S.; Lin, X.Q.; Chavan, M.Y.; Ahsan, M.Q.; Kadish, K.M. e Bear, J.L. (1987). Reaction of $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4$ with *N*-phenylacetamide: substitution products and geometric isomers. *Inorg. Chem.* **26**, 830-836.
99. LIPPARD, S.J. e Berg, J.M. (1994). Principles of bioinorganic chemistry. University Science Books, Mill Valley, p. 21 e 45.
100. LIPPERT, B. (1999). Impact of cisplatin on the recent development of Pt coordination chemistry: a case study. *Coord. Chem. Rev.* **182**, 263-295.
101. LO, J.M.; Pillai, M.R.A.; John, C.S. e Troutner, D.E. (1990). Labeling of human serum albumin with ^{105}Rh -Cysteine complexes. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part A* **41**(1), 63-67.
102. LO SCHIAVO, S.; Sinicopri, M.S.; Tresoldi, G.; Arena, C.G. e Piraino, P. (1994). Dirhodium(II) complexes with bi- and tri-dentate nitrogen-containing ligands. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1517-1522.
103. LOWRY, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. e Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
104. MASUOKA, J. e Saltman, P. (1994). Zinc(II) and copper(II) binding to serum albumin. A comparative study of dog, bovine and human albumin. *J. Biol. Chem.* **269**(41), 25557-25561.

105. MATTHEWS, D.E. e Farewell, V.T. (1988). Using and understanding medical statistics, 2ª edição, Karger, Basel, pp. 79-87.
106. MESSORI, L.; Orioli, P.; Vullo, D.; Alessio, E. e Iengo, E. (2000). A spectroscopic study of the reaction of NAMI, a novel ruthenium(III) anti-neoplastic complex, with bovine serum albumin. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1206-1213.
107. MISKOWSKI, V.M.; Schaeffer, W.P.; Sadegui, B.; Santarsiero, B.D. e Gray, H.B. (1984). Polarized electronic spectra of dirhodium(II) tetraacetate. *Inorg. Chem.* **23**, 1154-1162.
108. MORIYAMA, Y., Ohta, D.; Hachiya, K., Mitsui, Y. e Takeda, K. (1996). Fluorescence behavior of tryptophan residues of bovine and human serum albumins in ionic surfactant solutions: a comparative study of the two and one tryptophan(s) of bovine and human albumins. *J. Prot. Chem.* **15(3)**, 265-272.
109. NAJJAR, R.; Kimura, E.; Seidel, W.; Osiro, T.T. e Cursino, J.R. (1984). Cinamato de ródio: testes biológicos e síntese de compostos de adição. Anais do II Simpósio Nacional de Química Inorgânica (05 a 07 de julho de 1984). Instituto de Química, Universidade de São Paulo. pp 49-51.
110. NAJJAR, R. (1992). Complexos metálicos com atividade anticancerígena. *Quím. Nova* **15(4)**, 323-327.
111. NAKANISHI, K.; Berova, N. e Woody, R.W. (1994). Circular Dichroism - principles and applications, VCH, cap. 1 e 17.
112. NANJI, A.A.; Stewart, D.J. e Mikhael, N.Z. (1986). Hyperuricemia and hypoalbuminemia predispose to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **17(3)**, 274-276.
113. NEAULT, J.F. e Tajmir-Riahi, H.A. (1998). Interaction of cisplatin with human serum albumin. Drug binding mode and protein secondary structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1384**, 153-159.
114. NEUSE, E.W. (1998). Carrier-bound platinum and iron compounds with carcinostatic properties. *Polym. Adv. Technol.* **9**, 786-793.
115. NOTHENBERG, M.S.; Takeda, G.K.F. e Najjar, R. (1991). Adducts of nitroimidazole derivatives with rhodium(II) carboxylates: syntheses, characterization, and evaluation of antichagasic activities. *J. Inorg. Biochem.* **42**, 217-229.
116. NOTHENBERG, M.S.; Zyngier, S.B.; Giesbrecht, A.M.; Gambardella, M.T.P.; Santos, R.H.A.; Kimura, E. e Najjar, R. (1994). Biological activity and crystallographic study of a rhodium propionate - metronidazole adduct. *J. Brazilian Chem. Soc* **5(1)**, 23-29.

117. PEARSON, R.G. (1969). *In* Survey of Progresses in Chemistry, vol. 1, A. Scott, ed., Academic Press, Capítulo 1.
118. PILLAI, M.R.A.; Lo, J.M.; John, C.S. e Troutner, D.E. (1990). Labeling of proteins using [^{105}Rh]Rh-4-(*p*-aminobenzyl)-diethylenetriamine. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part B* **17(4)**, 419-426.
119. PIRAINO, P.; Tresoldi, G. e Lo Schiavo, S. (1993). Interactions of the Rh_2^{4+} formamidinate complex $\text{Rh}_2(\mu\text{-form})_2(\mu\text{-O}_2\text{CCF}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (form=N,N'-di-*p*-tolylformamidinate anion) with nucleobases and nucleotides. *Inorg. Chim. Acta* **203**, 101-105.
120. PIZZO, S.V.; Swaim, M.W.; Roche, P.A. e Gonias, S.L. (1988). Selectivity and stereospecificity of the reactions of dichlorodiammineplatinum(II) with three purified plasma proteins. *J. Inorg. Biochem.* **33**, 67-76.
121. PNEUMATIKAKIS, G. e Psaroulis, P. (1980). Interactions of tetra- μ -acetato dirhodium(II) with sulfur-containing aminoacids. *Inorg. Chim. Acta* **46**, 97-100.
122. PRENZLER, P.D. e McFayden, W.D. (1997). Reactions of cisplatin and the *cis*-diamminediaqua platinum(II) cation with Tris and Hepes. *J. Inorg. Biochem.* **68**, 279-282.
123. PRUCHNIK, F.P. e Dus, D. (1996). Properties of rhodium(II) complexes having cytostatic activity. *J. Inorg. Biochem.* **61**, 55-61.
124. PRUCHNIK, F.P.; Bien, M. e Lachowicz, T. (1996). Properties of binuclear rhodium(II) complexes and their antibacterial activity. *Metal-Based Drugs* **3**, 185-195.
125. PRUCHNIK, F.P.; Kluczevska, G.; Wiczok, A.; Mazurek, U. e Wilczok, T. (1997). Rhodium(II) complexes with phenantrolines and their metabolic action on synchronized cell culture. *J. Inorg. Biochem.* **65**, 25-34.
126. REEDIJK, J. (1996). Improved understanding in platinum antitumor chemistry. *Chem. Commun.* 801-806.
127. REIBSCHEID, E.M.; Zyngier, S.B.; Maria, D.A.; Mistrone, R.J.; Sinisterra, R.D.; Couto, L.G. e Najjar, R. (1994). Antitumor effects of rhodium(II) complexes on mice bearing Ehrlich tumors. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **27**, 91-94.
128. ROSENBERG, B.; Van Camp, L. e Krigas, T. (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from platinum electrode. *Nature* **205**, 698-699.
129. SADLER, P.J. (1997). COST Action D8 (1996-2001) Workshop: Chemistry of Metals in Medicine - The industrial perspective. *Metal-Based Drugs* 119-123.
130. SADLER, P.J.; Li, H. e Sun, H. (1999). Coordination chemistry of metals in medicine: target sites for bismuth. *Coord. Chem. Rev.* **185-186**, 689-709.

131. SARKAR, B. (1983). Albumin as the major plasma protein transporting metals. *Life Chem. Rep.* **1**, 165-207.
132. SARKAR, B. (1987). Metal protein interactions. *Progr. Food Nutr. Sci.* **11**, 363-400.
133. SCHECHTER, B.; Arnon, R. e Wilchek, M. (1995). Polymers in drug delivery: immunotargeting of carrier-supported *cis*-platinum complexes. *Reactive Polym.* **25**, 167-175.
134. SCHWIETERT, C.W. e McCue, J.P. (1999). Coordination compounds in medicinal chemistry. *Coord. Chem. Rev.* **184**, 67-89.
135. SHAW, C.F. (1999). Gold-based therapeutic agents. *Chem. Rev.* **99(9)**, 2589-2600.
136. SHCHELOKOV, R.M.; Maiorova, A.G.; Kuznetsova, G.N.; Golovaneva, I.F. e Evstaf'eva, O.N. (1984). The reaction of rhodium complexes with acetamide. *Russ. J. Inorg. Chem.* **29(5)**, 766-767.
137. SHRIVER, D.F.; Atkins, P.W. e Langford, C.H. (1994). Inorganic chemistry. 2^a edição. Oxford University Press, Oxford.
138. SIGEL, H. e Martin, R.B. (1982). Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands. *Chem. Rev.* **82**, 385-426.
139. SINISTERRA MILLÁN, R.D. (1992). Carboxilatos de ródio(II) com sulfadiazina. Síntese, estudos espectroscópicos, termoanalíticos e biológicos visando atividade antitumoral. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
140. SINISTERRA, R.D.; Najjar, R.; Alves, O.L.; Santos, P.S.; Alves de Carvalho, C.A. e Conde da Silva, A.L. (1995). The inclusion of rhodium(II) α -methyl-cinnamate in β -cyclodextrin. *J. Inclusion Phen. Mol. Recogn. Chem.* **22**, 91-98.
141. SINISTERRA, R.D.; Najjar, R.; Santos, P.S.; Carvalho, O.L.A.; Munson, E. e Thakur, K. (1998). ¹³C CP/MAS studies of rhodium(II) 3-fluorobenzoate and their inclusion compound in β -cyclodextrin. *J. Inclusion Phen. Mol. Recogn. Chem.* 511-514.
142. SINISTERRA, R.D.; Shastri, V.P.; Najjar, R. e Langer, R. (1999). Encapsulation and release of rhodium(II) citrate and its association complex with hydroxypropyl- β -cyclodextrin from biodegradable polymer microspheres. *J. Pharm. Sci.* **88(5)**, 574-576.
143. SINN, H.; Schrenk, H.-H.; Maier-Borst, W.; Stehle, G. (1996). Drug conjugates with metal-binding compounds for individual dosing. Patente (Chemical Abstracts 125:257187).
144. SOMOGYI, B. e Lakos, Z. (1993). Protein dynamics and fluorescence quenching. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **18**, 3-16.

145. SOUZA, A.R. (1995). Cicloalcanocarboxilatos de ródio(II). Síntese, estudos espectroscópicos, termoanalíticos e avaliação do potencial antitumor. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
146. SOUZA, A.R.; Najjar, R.; Glikmanas, S. e Zyngier, S.B. (1996). Water-soluble rhodium(II) carboxylate adducts: cytotoxicity of the new compounds. *J. Inorg. Biochem.* **64**, 1-5.
147. SOUZA, A.R.; Najjar, R.; Oliveira, E. e Zyngier, S.B. (1997). Distribution of rhodium in mice submitted to treatment with the adduct of rhodium propionate and sodium isonicotinate. *Metal-Based Drugs* **4(1)**, 39-41.
148. SREERAMA, N. e Woody, R.W. (1993). A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* **209**, 32-44.
149. SREERAMA, N. e Woody, R.W. (1994). Poly(Pro)II helices in globular proteins: identification and circular dichroic analysis. *Biochemistry* **33**, 10022-10025.
150. STEHLE, G.; Wunder, A.; Schrenk, H.H.; Hartung, G.; Heene, D.L. e Sinn, H. (1999). Albumin-based drug carriers: comparison between serum albumins of different species on pharmacokinetics and tumor uptake of the conjugate. *Anti-Cancer Drugs* **10**, 785-790.
151. STEINHARDT, J.; Krijn, J. e Leidy, J.G. (1971). Differences between bovine and human serum albumins: binding isotherms, optical rotatory dispersion, viscosity, hydrogen ion titration, and fluorescence effects. *Biochemistry* **10(22)**, 4005-4014.
152. STEPHANOS, J.J. (1996). Drug-protein interactions: two-site binding of heterocyclic ligands to a monomeric hemoglobin. *J. Inorg. Biochem.* **62**, 155-169.
153. SUGIO, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M. e Kobayashi, K. (1999). Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.* **12(6)**, 439-446.
154. TAKAHASHI, N.; Takahashi, Y. e Putnam, F.W. (1987). Structural changes and metal binding by proalbumins and other amino-terminal genetic variants of human serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84(21)**, 7403-7407.
155. TRYNDA, L. e Kuduk-Jaworska, J. (1994). Impact of K₂PtCl₄ on the structure of human serum albumin and its binding ability of heme and bilirubin. *J. Inorg. Biochem.* **53**, 249-261.
156. TRYNDA, L. e Pruchnik, F.P. (1995). Interaction of tetra-μ-acetatodirhodium(II) with human serum albumin. *J. Inorg. Biochem.* **58**, 69-77.
157. TRYNDA-LEMIESZ, L. e Pruchnik, F.P. (1997). Studies on the interaction between human serum albumin and [Rh₂(OAc)₂(bpy)₂(H₂O)₂](OAc)₂. *J. Inorg. Biochem.* **66**, 187-192.

158. TRYNDA-LEMIESZ, L.; Keppler, B.K. e Kozlowski, H. (1999). Studies on the interactions between human serum albumin and imidazolium [trans-tetrachlorobis (imidazol)ruthenate(III)]. *J. Inorg. Biochem.* **73(3)**, 123-128.
159. TSIVERIOTIS, P. e Hadjiliadis, N. (1999). Studies on the interaction of histidyl containing peptides with palladium(II) and platinum(II) complex ions. *Coord. Chem. Rev.* **190-192**, 171-184.
160. TSUCHIDA, E.; Komatsu, T.; Matsukawa, Y.; Hamamatsu, K. e Wu, J. (1999). Human serum albumin incorporating tetrakis(o-pivalamido)phenylporphyrinatoiron(II) derivative as a totally synthetic O₂-carrying hemoprotein. *Bioconjugate Chem.* **10(5)**, 797-802.
161. VAN HOLDE, K.E. (1975). Dicroísmo Circular e Dispersão Ótica Rotatória in *Bioquímica Física*, Edgard Blücher LTDA, 1975, cap. 10.
162. VORUM, H. (1999). Reversible ligand binding to human serum albumin. Theoretical and clinical aspects. *Dan. Med. Bull.* **46(5)**, 379-399.
163. VREEBURG, G.C.M.; Stell, P.M.; Holding, J.D.; e Lindup, W.E. (1992). Cisplatin-albumin complex for the treatment of cancer of the head and neck. *J. Laryngol. Otol.* **106**, 832-833.
164. WANG, K.; Lu, J. e Li, R. (1996). The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coord. Chem. Rev.* **151**, 53-88.
165. WAYSBORT, D.; Tarien, E.; Eicchorn, G.L. (1993). Nature of the specific interactions of rhodium acetate dimer with adenosine. *Inorg. Chem.* **32(22)**, 4774-4779.
166. WHITEHEAD, J.P. e Lippard, S.J. (1996). Proteins that bind to and mediate the biological activity of platinum anticancer drug—DNA adducts. *Met. Ions Biol. Systems* **32**, 687-726.
167. YAMASHITA, M.M.; Wesson, L.; Eisenman, G. e Eisenberg, D. (1990). Where metal ions bind in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5648-5652.
168. YANG, P. e Guo, M. (1999). Interactions of organometallic anticancer agents with nucleotides and DNA. *Coord. Chem. Rev.* **185-186**, 189-211.
169. ZHOU, Y.; Yuwen, W.; Xuying, H.; Jiesheng, H.; Yunqin, H.; Hong, L. e Panwen, S. (1994). Equilibrium dialysis of metal-serum albumin. I. Successive stability constants of Zn(II)-serum albumin and the Zn²⁺-induced cross-linking self-association. *Biophys. Chem.* **51**, 81-87.
170. ZHU, T.P.; Ahsan, M.Q.; Malinski, T.; Kadish, K.M. e Bear, J.L. (1984). Electrochemical characterization of a series of dirhodium(II) complexes with acetate and acetamidate bridging ligands. *Inorg. Chem.* **23**, 2-3.

171. ZORODDU, M.A. e Dallochio, R. (1989). Interactions of tetrakis-(μ -trifluoroacetamido)-dirhodium(I) with 2,4-diaminopyrimidines. *Trans. Met. Chem.* **14**, 267-268.
172. ZYNGIER, S.B.; Kimura, E. e Najjar, R. (1989). Antitumor effects of rhodium(II) citrate in mice bearing Ehrlich tumors. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **22**, 397-401.
173. ZYNGIER, S.B.; Espósito, B.P.; Souza, A.R. e Najjar, R. (1998). Increase in life span of mice bearing Ehrlich tumor treated with a rhodium (II) amidate. *N-S Arch. Pharmacol.* **358(1)**, R530, Suppl. 2 (apresentado no *XIIIth International Congress of Pharmacology*, München, Alemanha, 26-31/07/1998).

CURRICULUM VITÆ

Nome: Breno Pannia Espósito

Local de nascimento: São Paulo, Brasil

Data de nascimento: 21/10/1971

Formação acadêmica:

Graduação: 1990 a 1994: Bacharel em Química pela Universidade de São Paulo.

Pós-graduação: 1995 a 1997: Mestrado em Química Inorgânica pela Universidade de São Paulo. Orientador: Prof. Dr. Renato Najjar. Título da dissertação: “Estudo dos produtos de reação entre carboxilatos de ródio(II) e amidas” (defendida em 04/03/1997).

1997 ao presente: Doutorado em Química Inorgânica pela Universidade de São Paulo. Orientador: Prof. Dr. Renato Najjar.

Atividades industriais:

Auxiliar de laboratório na Givaudan do Brasil (atual Givaudan-Roure do Brasil). Manipulação e desenvolvimento de aromatizantes (Dez 1987 a Fev 1990).

Estágios acadêmicos:

1. Tecnologia de Produtos Marinhos (1991 a 1993)
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Araújo Antunes

2. Química Teórica (2º semestre de 1993)
Instituto de Química da Universidade de São Paulo
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Motta Alves Peixoto

3. Fotoquímica Orgânica (1994)

Instituto de Química da Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Catalani

Produção acadêmica:

- Comunicações em congressos:

1. "Peixe-espada (*Trichiurus lepturus*) no Litoral Sudeste do Brasil: custo, disponibilidade, e avaliação do potencial nutritivo". Breno Pannia Espósito e Sérgio Araújo Antunes. X Encontro Brasileiro de Ictiologia (IOUSP, Fev de 1993).
2. "Estudo dos produtos de reação entre carboxilatos de ródio(II) e amidas". Breno Pannia Espósito e Renato Najjar. XIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (Poços de Caldas, Maio de 1996).
3. "Estudo da atividade biológica de um complexo de ródio derivado da trifluoroacetamida". Breno Pannia Espósito e Renato Najjar. XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (Poços de Caldas, Maio de 1997).
4. "Interação do $\text{Rh}_2(\text{CF}_3\text{CONH})_4$ com albumina de soro humana". Breno Pannia Espósito e Renato Najjar. XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (Poços de Caldas, Maio de 1998).
5. "Estudo da interação entre complexos de ródio (II) e albumina humana por dicroísmo circular e supressão de fluorescência". Breno Pannia Espósito, Adelaide Faljoni-Alário, Jorge Fernando Silva de Menezes, Hermi Felinto de Brito e Renato Najjar. XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (Poços de Caldas, Maio de 1999).
6. "Efeitos da albumina humana sobre algumas propriedades biológicas de complexos de ródio (II)". Breno Pannia Espósito, Elisabeth de Oliveira, Szulim Ber Zyngier e Renato Najjar. XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (Poços de Caldas, Maio de 2000).

- Artigos:

1. Espósito, B.P.; Souza, A.R.; Zyngier, S.B.; Najjar, R. "Rh₂(CF₃CONH)₄: the first biologic assays of a rhodium (II) amidate" *Metal-Based Drugs* **1997**, 4(6), 333-338.
2. Zyngier, S.B.; Espósito, B.P.; Souza, A.R.; Najjar, R. "Increase in life span of mice bearing Ehrlich tumor treated with a rhodium (II) amidate" *N-S Arch. Pharmacol.* **1998**, 358(1), R530-R530, Suppl. 2 (apresentado no XIIIth International Congress of Pharmacology, München, Germany, 26-31 Julho, 1998).
3. Espósito, B.P.; Zyngier, S.B.; Najjar, R.; Paes, R.P.; Ueda, S.M.Y.; Barros, J.C.A. "Survival and histopathological study of animals bearing Ehrlich tumor treated with a rhodium(II) amidate" *Metal-Based Drugs* **1999**, 6(1), 17-18.
4. Espósito, B.P.; Faljoni-Alário, A.; Menezes, J.F.S.; Brito, H.F.; Najjar, R. "A circular dichroism and fluorescence quenching study of the interactions between rhodium (II) complexes and human serum albumin" *J. Inorg. Biochem.* **1999**, 75, 55-61.
5. Espósito, B.P.; Oliveira, E., Zyngier, S.B.; Najjar, R. "Effects of human serum albumin in some biological properties of rhodium(II) complexes" *J. Braz. Chem. Soc.* (no prelo).
6. Espósito, B.P.; Najjar, R. "Antitumoral Platinum-Group Metallodrugs Interacting with Albumin" *Coord. Chem. Rev.* (submetido).