**PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E PRÓ-OXIDANTES DE
COMPOSTOS DE COBRE COM LIGANTES DIIMÍNICOS:
ESTUDOS CINÉTICOS E INTERMEDIÁRIOS DE REAÇÃO**

MARIA LUCIA PIRES DOS SANTOS

Tese de Doutorado

Química Inorgânica

Profa. Dra. ANA MARIA DA COSTA FERREIRA

Orientadora

SÃO PAULO

2002

"Propriedades Antioxidantes e Pró-Oxidantes de Compostos de Cobre com Ligantes Diimínicos: Estudos Cinéticos e Intermediários de Reação"

MARIA LÚCIA PIRES DOS SANTOS

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Química Inorgânica.

Aprovada por:

Profa. Dra. ANA MARIA DA COSTA FERREIRA
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. HENRIQUE EISI TOMA
IQ – USP

Profa. Dra. MARISA HELENA GENNARI DE MEDEIROS
IQ – USP

Prof. Dr. ELIA TFOUNI
FFCL-RP – USP

Profa. Dra. REGINA CÉLIA GALVÃO FREM DI NARDO
IQ – UNESP – Araraquara

SÃO PAULO
27 DE FEVEREIRO 2002.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Dedico este trabalho

*Ao meu companheiro
"Zezinho" e minha querida filha
"Ariettinha" por iluminarem a minha
vida com amor, carinho, ensinamentos,
ajuda, compreensão, infindável apoio e
por caminharem comigo na execução
deste trabalho, me estimulando a
prosseguir sempre e entenderem a
minha ausência para que este trabalho
fosse concluído.*

*A Deus por estar presente em todos os momentos e ter me dado a chance de
conhecer o maior mistério: a vida*

A meus pais, Darcy e Rubens, que me ajudaram a construir o que sou hoje, por todo o carinho, incentivo e amor e às minhas irmãs Cris e Lena pela amizade.

Ao Fábio pela amizade e apoio à doce "Ariettinha"

À professora Ana Maria pela oportunidade de trabalhar sob competente orientação e empenho

AGRADECIMENTOS

Aos amigos do Bloco 2 Inferior pela companhia, amizade e apoio e em especial a Cida, Adriana, Melina, Christian, Wendel, M. Amélia, Marcos, Kelly e Saulo pela generosidade, constante ajuda e momentos de descontração, o meu muito obrigado.

Aos colegas, funcionários e professores do Instituto de Química da USP que, de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.

À Dra. Izilda Aparecida Bagatin, pela realização e interpretação dos experimentos eletroquímicos - voltametria cíclica.

Ao professor Pio Colepicolo Neto pela possibilidade de utilizar o Sonicador para obtenção dos lipossomos.

À professora Adelaide Faljoni-Alário pela obtenção dos espectros CD.

Ao Célio e a Edlaine pelo apoio técnico no uso de equipamentos imprescindíveis para o desenvolvimento de alguns experimentos.

Ao José Soares pela realização das análises no Espectrofotômetro de Emissão Atômica e a professora Elizabeth de Oliveira pela estrutura cedida.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, especialmente ao professor Ubirajara Cairo por me substituir nas atividades didáticas neste período e aos colegas do Departamento de Ciências Naturais.

A CAPES/PIDCT pela concessão da bolsa de estudos.

Sou grata a tudo e a todos que de alguma forma me ajudaram nesta caminhada.

ÍNDICE

Lista de Tabelas.....	i
Lista de Figuras.....	iii
Estrutura dos Compostos de Cobre Sintetizados.....	vii
Estrutura dos principais compostos utilizados.....	ix
Simbologia	xi
Resumo	xiii
Abstract	xv
Objetivos	xvii

I. INTRODUÇÃO

I.1. Cobre – Um bioelemento moderno	3
I.2. Produção Celular de Ânion Superóxido e do Óxido Nítrico	6
I.3. Peroxinitrito em Condições Fisiológicas	8
I.4. Reatividade do Peroxinitrito	9
I.5. Reatividade do Peroxinitrito na presença de Dióxido de Carbono.....	11
I.6. Peroxidação Lipídica	12
I.6.1. Alvos de ataque	13

II. PARTE EXPERIMENTAL

II.1. Reagentes e Soluções	14
II.1.1. Síntese do Peroxinitrito	14
II.2. Métodos e Técnicas Experimentais.....	15
II.2.1. Medidas Espectroscópicas	
II.2.1.1. Análise do Cobre	15
II.2.1.2. Medidas na região UV/Vis e do Infravermelho	15
II.2.1.3. Medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)....	15
II.2.1.4. Medidas de Cinética Rápida	16
II.2.1.5. Estabilidade Termodinâmica - Medidas de Dicroísmo Circular (CD)	16

II.2.2. Medidas Potenciométricas	17
II.2.3. Medidas de Susceptibilidade Magnética	17
II.2.4. Análise Elementar	17
II.2.5. Análise do Peróxido de Hidrogênio	17
II.2.6. Medidas da Atividade SOD	18
II.2.7. Preparo dos lipossomos	18
II.2.8. Dosagem dos Produtos de Lipoperoxidação - Teste do ácido tiobarbitúrico (TBA)	19
II.2.9 Medidas eletroquímicas – Voltametria cíclica	20
II.3. Síntese dos Compostos Diimínicos de Cobre(II)	20
II.3.1. [Cu(dpbi)](ClO ₄) ₂ ·H ₂ O	21
II.3.2. [Cu(dmbi)](ClO ₄) ₂	21
II.3.3. [Cu(depy)](ClO ₄) ₂	22

III. RESULTADOS E DISCUSSÕES

III.1. Caracterização por Análise Elementar.....	23
III.2. Caracterização Espectroscópica e Magnética	
III.2.1. Espectros Eletrônicos	24
III.2.2. Espectros no Infravermelho	30
III.2.3. Medidas de Susceptibilidade Magnética	32
III.2.4. Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	33

IV. REATIVIDADE DOS COMPOSTOS DIIMÍNICOS DE COBRE(II)

IV.1. Estudo da Atividade Mimética de Cu ₂ Zn ₂ SOD	38
IV.2. Lipofilicidade	40
IV.3. Geração de Radicais Hidroxil	42
IV.4. Atividade Catalítica na Decomposição do Peroxinitrito	48
IV.4.1. Efeito do CO ₂ na decomposição do ONOO ⁻	56

IV.5. Atividade Catalítica na Nitração de Compostos Aromáticos, dependente do Peroxinitrito	60
IV.5.1. Efeito do Dióxido de Carbono na Nitração de Compostos Aromáticos, catalisada por Complexos Diimínicos de Cobre(II) dependente do Peroxinitrito	64
IV.5.2. Produto da Nitração do HPA na presença do Complexo Diimínico de Cobre(II), $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$	66
IV.6. Atividade Catalítica na Peroxidação Lipídica	72
IV.6.1. Efeito de Bicarbonato e de Nitrito na Atividade Peroxidásica de Complexos Diimínicos de Cobre(II)	79
IV.7. Investigação da Geometria ao redor do Cu(II) na reação do $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ na presença de Peroxinitrito e Bicarbonato.....	81
IV.8. Efeito do ânion HCO_3^- na geração de radicais hidroxil no sistema $\text{CuL}/\text{H}_2\text{O}_2$	84
IV.9. Medidas Eletroquímicas – Voltametria Cíclica.....	85
IV.10. Estabilidade Termodinâmica – Medidas de Dicroísmo Circular (CD)	90
V. CONCLUSÕES.....	97
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

LISTA DE TABELAS

Tabela	página
1. Resultados das análises elementar para os complexos diimínicos de cobre(II)	23
2. Dados dos espectros UV/Vis para os compostos diimínicos de cobre(II)	30
3. Principais Bandas no IV (cm^{-1}) dos Complexos Diimínicos de Cobre(II)	31
4. Momento magnético para os complexos diimínicos de Cobre(II) a temperatura ambiente	32
5. Parâmetros EPR para os Complexos Diimínicos de Cobre(II)	36
6. Atividade SOD dos complexos de cobre(II) em estudo. Xantina $3,33 \times 10^{-4}$ M, xantina oxidase, $200\mu\text{L}$ diluídos em 10 mL de tampão fosfato pH 7,4, NBT^{2+} $3,82 \times 10^{-4}$ M, variando-se a concentração de cobre na faixa de 10^{-6} M a 10^{-9} M.	39
7. Coeficiente de partição (K_p) para os complexos diimínicos de cobre em sistemas octanol/água usando como fase aquosa, tampão fosfato 50 mM e temperatura 24°C	41
8. Formação do aduto DMPO-OH para os compostos diimínicos de cobre(II) na presença de $\text{H}_2\text{O}_2 = 1,52 \times 10^{-3}\text{M}$, em tampão fosfato 50 mM pH 7,4, $T = 25^\circ\text{C}$ após 10 minutos de reação, $G = 2,52 \times 10^6$	45
9. Valores de k_{obs} (s^{-1}) obtidos para os compostos diimínicos de Cu(II) a $(25 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, $[\text{ONOO}^-] = 600 \mu\text{M}$, a diferentes pHs.	53
10. Valores da k de segunda ordem ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) obtidos para os compostos, $[\text{Cu}(\text{pyal-en})](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Cu}(\text{apz-pn})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}(\text{depy})](\text{ClO}_4)_2$ e na ausência dos compostos a $(25 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, $[\text{ONOO}^-] = 600 \mu\text{M}$ e diferentes pHs.....	54
11. Valores de k_{obs} (s^{-1}) obtidos para a nitração do 4-HPA, catalisada pelo $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ a $(25 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, $[\text{ONOO}^-] = 600 \mu\text{M}$, a diferentes pHs.....	63
12. Valores da k de segunda ordem ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) obtidos para a nitração do 4-HPA, catalisada por $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ a $(25 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, $[\text{ONOO}^-] = 600 \mu\text{M}$, a diferentes pHs.....	64
13. Valores de k_{obs} (s^{-1}) para a nitração do 4-HPA, catalisada por $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$, na presença de NaHCO_3 4,43mM, a $(25 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, $[\text{ONOO}^-] 600\mu\text{M}$	66

14. Formação do composto 4-HPA-NO ₂ , obtido a partir da reação do 4-HPA, 5 mM, como peroxinitrito 600 μM, catalisada por [Cu(pyal-en)] ²⁺ a várias concentrações.....	67
15. Variação das concentrações dos complexos de cobre na peroxidação lipídica estimulada por ONOO ⁻ (1,0 mM)	74
16. Variação das concentrações dos complexos de cobre na peroxidação lipídica estimulada por H ₂ O ₂ - 3,0 mM.....	76
17. Parâmetros EPR obtidos para [Cu(pyal-en)] ²⁺ = 2,97 x 10 ⁻⁴ M, [ONOO ⁻] = 9,26 x 10 ⁻⁴ M, [HCO ₃ ⁻] = 4,5 x 10 ⁻² M em tampão fosfato 100 mM, pH = 6,92.....	82
18. Efeito do HCO ₃ ⁻ na geração de radicais hidroxil no sistema CuL/H ₂ O ₂ após 5 minutos de reação.....	85
19. Valores da amplitude obtida através dos Espectros de CD e as concentrações das espécies envolvidas no sistema.....	95
20. Valores da Constante de Estabilidade (log K) e Constante Relativa (β_{rel}) para os compostos CuL a 30°C.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura	página
1. Função metabólica essencial das proteínas de cobre. Não estão incluídas as proteínas responsáveis pelo transporte, armazenamento e reguladora de cobre.	4
2. Curvas cinéticas da decomposição do Peroxinitrito 600 μ M a diferentes pHs e (25 $\pm$ 0,2) $^{\circ}$ C	16
3. Espectro EPR para o composto [Cu(dpbi)] ²⁺ em solução metanol/água (4:1, v/v) 70 $^{\circ}$ K. Potência 20,17 mW, frequência 9,438 GHz, frequência de modulação 100 KHz, amplitude de modulação 15 G e ganho 1,42 – 3,317 x 10 ⁴	33
4. Espectro EPR para o composto [Cu(depy)] ²⁺ em solução metanol/água (4:1, v/v) 70 $^{\circ}$ K. Potência 20,17 mW, frequência 9,438 GHz, frequência de modulação 100 KHz, amplitude de modulação 15 G e ganho 1,42 – 3,317 x 10 ⁴	34
5. Espectro EPR para o composto [Cu(dmbi)] ²⁺ em solução metanol/água (4:1, v/v), a T = 70 $^{\circ}$ K. Potência 20,17 mW, frequência 9,438 GHz, frequência de modulação 100 KHz, amplitude de modulação 15 G e ganho 1,42 – 3,317 x 10 ⁴ , a pH 6,0	34
6. Espectro EPR para o composto [Cu(dmbi)] ²⁺ em solução metanol/água (4:1, v/v) T = 70 $^{\circ}$ K. Potência 20,17 mW, frequência 9,438 GHz, frequência de modulação 100 KHz, amplitude de modulação 15 G e ganho 1,42 – 3,317 x 10 ⁴ , a pH 7,2	35
7. Espectros EPR dos compostos [Cu(pyal-en)] ²⁺ e [Cu(apz-pn)] ²⁺ em solução congelada de acetonitrila, a 77 $^{\circ}$ K	36
8. Espectro de solução saturada metanol/água 4:1, v/v a 77 $^{\circ}$ K para o [Cu(dmbi)] ²⁺ , a diferentes pHs. Potência 20,17 mW, frequência 9,438 GHz, frequência de modulação 100 KHz, amplitude de modulação 15 G e ganho 1,42 – 3,317 x 10 ⁴	37
9. Espectro EPR do aduto DMPO-OH obtido das soluções dos complexos de cobre(II), 40 μ M, [H ₂ O ₂] = 1,52 mM e [DMPO-OH] = 0,10 M em tampão fosfato 50 mM, pH = 7,4.	44

10. Espectro EPR dos adutos DMPO-OH (asterístico) e do DMPO-metil para [Cu(apz-pn)] ²⁺ 47 μM, [H ₂ O ₂] = 1,50 μM, [DMPO] = 0,10 M e [DMSO] = 0,028 M.	46
11. Dependência do pH na decomposição do peroxinitrito 600μM, catalisada por complexos diimínicos de cobre(II) 50 μM e temperatura (25,0 ± 0,2) °C.	49
12. Efeito da concentração do [Cu(pyal-en)] ²⁺ , na decomposição do peroxinitrito 600 μM, a (25,0 ± 0,2) °C, a diferentes pHs.	50
13. Efeito da concentração do [Cu(apz-pn)] ²⁺ , na decomposição do peroxinitrito 600, a (25,0 ± 0,2) °C, a diferentes pHs.	50
14. Efeito da concentração do [Cu(depy)] ²⁺ , na decomposição do peroxinitrito 600 μM a (25,0 ± 0,2) °C, a diferentes pHs.	51
15. Efeito da concentração do [Cu(dmbi)] ²⁺ , na decomposição do peroxinitrito 600 μM, a (25,0 ± 0,2) °C, a diferentes pHs.	51
16. Efeito da concentração do [Cu(dpbi)] ²⁺ , na decomposição do peroxinitrito 600 μM, a (25,0 ± 0,2) °C, a diferentes pHs.	52
17. Dependência do pH no estudo do efeito do CO ₂ na decomposição do peroxinitrito 600 μM, [HCO ₃ ⁻] 4,43 mM, T = (25,0 ± 0,2) °C.	57
18. Decomposição do peroxinitrito na presença de diferentes concentrações de CO ₂ em equilíbrio, para alguns complexos de cobre a pH 6,25 ± 0,15, [ONOO ⁻] = 600 μM, [CuL] = 50 μM, T = (25, 0 ± 0,2) °C.	58
19. Decomposição do peroxinitrito na presença de diferentes concentrações de CO ₂ em equilíbrio, para alguns complexos de cobre a pH 6,75 ± 0,06, [ONOO ⁻] = 600 μM, [CuL] = 50 μM, T = (25,0 ± 0,2) °C.	58
20. Decomposição do peroxinitrito na presença de diferentes concentrações de CO ₂ em equilíbrio, para alguns complexos de cobre a pH 7,65 ± 0,20, [ONOO ⁻] = 600μM, [CuL] = 50μM, T = (25,0 ± 0,2) °C.	59
21. Dependência de pH para a nitração do 4-HPA, 5 mM, mediada por ONOO ⁻ , 600μM catalisada por [Cu(pyal-en)] ²⁺ e [Cu(depy)] ²⁺ 100μM, em tampão fosfato 250 mM, T = (25,0 ± 0,2) °C.	62
22. Efeito da concentração do [Cu(pyal-en)] ²⁺ 100 μM, na nitração do 4-HPA, 5 mM, mediada pelo peroxinitrito, 600 μM, a (25 ± 0,2) °C a diferentes pHs.	62

23. Efeito do Dióxido de Carbono, na nitração do 4-HPA, 5,0 mM, catalisada por $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ 100 μM , mediada por $[\text{ONOO}^-]$ 600 μM , em tampão fosfato 250 mM, a $(25 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ a várias concentrações de bicarbonato/dióxido de carbono.....65
24. Nitração do 4-HPA, 5,0 mM, catalisada por $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ 100 μM , mediada por $[\text{ONOO}^-]$ 600 μM , $[\text{NaHCO}_3]$ 4,43 mM, em tampão fosfato 250 mM, a $(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ a vários pHs.....65
25. Espectro UV para a nitração do 4-HPA, 5 mM, monitorada a 430 nm, catalisada por $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ a várias concentrações e ONOO^- 600 μM a $(25 \pm 0,2)^\circ\text{C}$67
26. Espectro eletrônico UV/Vis para a reação do 4-HPA $3,0 \times 10^{-2}$ M com peroxinitrito 600 μM , na presença de $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ $6,0 \times 10^{-4}$ M.....68
27. Espectro eletrônico UV/Vis para a reação do 4-HPA $3,0 \times 10^{-2}$ M com peroxinitrito 600 μM , na presença de $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ $6,0 \times 10^{-4}$ M.....69
28. Espectro eletrônico UV/Vis para a reação do 4-HPA $3,0 \times 10^{-2}$ M com peroxinitrito 600 μM , na presença de $[\text{Cu}(\text{phen})]^{2+}$ $6,0 \times 10^{-4}$ M.....69
29. Peroxidação lipídica: medida da produção de espécies reativas com o TBA (TBARS) em fosfatidilcolina incubada por 5 minutos, variando-se as concentrações dos complexos de cobre; [peroxinitrito] = 1,0 mM.....75
30. Peroxidação lipídica de lipossomas em presença do composto $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ a variadas concentrações; [peroxinitrito] = 1,0 mM.....75
31. Peroxidação lipídica: medida da produção de espécies reativas com o TBA (TBARS) em fosfatidilcolina, estimulada por H_2O_2 3,0 mM, incubada por 40 minutos, variando-se as concentrações dos complexos de cobre.....77
32. Peroxidação lipídica: medida da produção de espécies reativas com o TBA (TBARS) em fosfatidilcolina, estimulada por H_2O_2 6,0 mM, incubada por 40 minutos, variando-se as concentrações dos complexos diimínicos de cobre(II).....77
33. Efeito do HCO_3^- (25,0 mM) e/ou NO_2^- (1,00 mM) na peroxidação lipídica mediada por $[\text{CuL}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 3,00$ mM, Tampão fosfato pH 7,4 e Lipossomos = 2,50 mg/mL.....80
34. Espectro EPR do $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+} = 2,97 \times 10^{-4}$ M na presença de $[\text{ONOO}^-] = 9,26 \times 10^{-4}$ M e $[\text{HCO}_3^-] = 4,00 \times 10^{-2}$ M e pH 6,92, a 77°K82

35. Espectro EPR do $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+} = 1,02 \times 10^{-4} \text{ M}$ na presença de $[\text{ONOO}^-] = 1,59 \times 10^{-3} \text{ M}$ e $[\text{HCO}_3^-] = 4,00 \times 10^{-2} \text{ M}$ e pH 7,26.....83
36. Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ 5,0 mM em DMF, contendo TEAP, 0,10 M, **a)** sob atmosfera de argônio, **b)** em presença de dioxigênio, **c)** com adição de peróxido de hidrogênio.....87
37. Espectro eletroquímico UV-Vis do complexo $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ 3,0 mM em acetonitrila, contendo TEAP 0,10 M, no intervalo de -0,25 a +0,50 V vs. EPH.....88
38. Voltamograma cíclico dos complexos $[\text{Cu}(\text{dpbi})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$ 5,0 mM em DMF, contendo TEAP, 0,10 M, sob atmosfera de argônio.....89
39. Espectro de CD da [BSA] 0,7 mM em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 com; **A)** $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ com concentrações (1) 0,0mM, (2) 0,047 mM, (3) 0,091 mM, (4) 0,13mM, (5) 0,21mM (6) 0,33mM. **B)** $[\text{Cu}(\text{dpbi})]^{2+}$ com concentrações) (1) 0,0mM, (2) 0,044mM, (3) 0,084mM, (4) 0,122mM, (5) 0,16mM, (6) 0,19mM, (7) 0,25mM. **C)** $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$ com concentrações (1) 0,0mM, (2) 0,053mM, (3) 0,102mM, (4) 0,15mM, (5) 0,19mM, (6) 0,23mM, (7) 0,302mM. T = 30,0 ($\pm 0,1$)°C92
40. Espectro CD, [BSA] = 0,7mM em tampão borato 100mM (pH 7,2) com $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{SO}_4)$ (1) 0 mM, (2) 0,14 mM, (3) 0,18 mM, (4) 0,22 mM, (5) 0,28 mM. T = (30,0 $\pm$ 0,1)°C. Figura interna – amplitude, cm, versus [CuL], mM.....93
41. Espectro CD, [BSA] = 0,7mM em tampão borato 100mM (pH 7,2) com $[\text{Cu}(\text{apz-pn})]^{2+}$ (6) 0mM, (7) 0,05mM, (8) 0,09mM, (9) 0,14mM, (10) 0,18mM, (11) 0,22mM, (12) 0,28mM, T = (30,0 $\pm$ 0,1)°C.....93
42. Espectro CD, [BSA] = 0,7mM em tampão borato 100mM (pH 7,2) com $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ (13) 0mM, (14) 0,05mM, (15) 0,09mM, (16) 0,14mM, (17) 0,18mM, (18) 0,22mM, (19) 0,28mM, T = (30,0 $\pm$ 0,1)°C.....94

Estrutura dos compostos de cobre sintetizados

#Perclorato de N,N'-bis(2-piridil)metileno-1,2-diaminoetano-(N,N',N'',N''') de cobre(II): $[\text{Cu}(\text{pyal-en})](\text{ClO}_4)_2$ - MM = 500,73

#Perclorato de N,N'-bis(2-pirazil-metil)metileno-1,3-diaminopropano-(N,N',N'',N''') de cobre(II): $[\text{Cu}(\text{apz-pn})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - MM = 562,78

#Compostos sintetizados durante o Mestrado [119]

Perclorato de N,N'-bis(2-(2-fenil)benzimidazol-2,3-diaminobutano-(N,N',N'',N''')) de cobre(II): $[\text{Cu}(\text{dpbi})](\text{ClO}_4)_2$ - MM = 730,9

Perclorato de N, N'-bis(2-metil)benzimidazol-2,3-diaminobutano-(N,N',N'',N''') de cobre(II): $[\text{Cu}(\text{dmbi})](\text{ClO}_4)_2$ - MM = 606,86

Perclorato de N, N'-bis(2-etil)piridil-2,3-diaminobutano-(N,N',N'',N''') de cobre (II): $[\text{Cu}(\text{depy})](\text{ClO}_4)_2$ - MM = 556,84

Estruturas dos principais compostos utilizados

Nome	Abreviação	Estrutura
1,2-diaminoetano	en
1,3-diaminopropano	pn
2-piridinacarboxaldeído	pyal
2-acetilpirazina	apz
2-(2-aminofenil)benzilimidazol	pbi
2,3 butanodiona (diacetilo)	d

2-aminometilbenzilimidazol
dihidrocloreto

mbi

2-(2-aminoetilpiridina)

epy

Radical aduto 5, 5'-dimetil-1-pirrolina
-N-óxido

DMPO-OH

ácido 4-hidroxifenilacético

4-HPA

Simbologia

ABTS = 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolina]-6-ácido sulfônico

APP = proteína precursora amilóide

BSA = albumina bovina

$\beta_{rel.}$ = constante de estabilidade relativa

CD = dicroísmo circular

$[Cu(PuPy)] \cdot 0,5H_2O(ClO_4)_2$ onde PuPy = *N,N'*-bis(2-piridil)metileno-1,4-butanodiamina

$[Cu(PuPhePy)](ClO_4)_2$ onde PuPhePy = *N,N'*-bis(2-piridil-fenil)metileno-1,4-butanodiamina

$[Cu(Pu-6-MePy)] \cdot H_2O(ClO_4)_2$ onde Pu-6-MePy = *N,N'*-bis(2-(6-metil)piridil)metileno-1,4-butanodiamina

EPR = ressonância paramagnética eletrônica

Fe(III)TMPyP = 5,10,15,20-tetrakis(*N*-metil-4'-piridil)porfinatoferro(III)

Fe(III)TMPS=5,10,15,20-tetrakis(2,4,6-trimetil-3,5-sulfonatofenil)porfinato de ferro(III)

GSH = Glutathiona reduzida

GSSG = Glutathiona oxidada

LDL = lipoproteína de baixa densidade

MDA = malonaldeído

Mn(III)TMPyP=5,10,15,20-tetrakis-(*N*-metil-4'-piridil) porfinatomanganês(III)

MF⁺ = formazan

NBT²⁺ = nitro blue tetrazólio

ONOOCO_2^- = aduto nitrosoperoxocarboxilato

$\text{ONOOH} / \text{ONOO}^-$ = O termo peroxinitrito é usado para referir a soma do ânion peroxinitrito (ONOO^-) e ácido peroxinitroso (ONOOH). Os nomes recomendados pela IUPAC para o ânion peroxinitrito, ácido peroxinitroso e óxido nítrico são oxoperoxonitrato (1).

SOD = superóxido dismutase

SIN-1 = 5-amino-3-(4-morfolinil)-1,2,3-oxadiazolio

XO = Xantina oxidase

RESUMO

Complexos diimínicos de cobre(II) têm despertado grande interesse como modelos estruturais e funcionais do sítio ativo de diversas proteínas e enzimas dependentes deste metal, particularmente aquelas relacionadas ao oxigênio molecular e seus derivados reduzidos. Embora sejam bons miméticos da SOD, uma enzima antioxidante, estes compostos também podem apresentar atividade peroxidásica considerável, causando danos oxidativos a diversos substratos.

Neste trabalho, 3 novos complexos diimínicos de cobre(II), derivados de 2,3-butanodiona e 2-(2-aminofenil)benzimidazol, 2-(aminometil)benzimidazol ou 2-(2-aminoetil)piridina, foram sintetizados e posteriormente caracterizados através de análise elementar, medidas magnéticas e espectroscopia UV/Vis, IR e EPR, com a finalidade de verificar como modificações no ligante podem modular suas propriedades, especialmente frente a oxidantes biológicos, como peróxido de hidrogênio e peroxinitrito. Estes novos complexos preparados tiveram ainda suas propriedades comparadas às de espécies semelhantes, derivadas de piridinaldeído e etilenodiamina ou acetilpirazina e propilenodiamina, estudadas anteriormente.

As propriedades antioxidantes dos complexos foram estimadas através da atividade catalítica acentuada na dismutação de radicais superóxidos, em comparação a complexos similares descritos na literatura, indicando que estas espécies são bons miméticos da SOD. Evidências da distorção tetraédrica ao redor do íon cobre, similar à observada na enzima nativa, foram obtidas através de parâmetros espectroscópicos característicos.

Os novos complexos também mostraram atividade pró-oxidante, gerando radicais hidroxil em quantidades apreciáveis, em presença de peróxido de hidrogênio, detectados e identificados por EPR com a adição de captador de spin. Danos oxidativos promovidos por estas espécies complexas foram observados através da peroxidação lipídica de lipossomos de fosfatidilcolina de lecitina. Estes danos foram expressivamente aumentados em presença de íons nitrito e/ou bicarbonato. Sua atividade catalítica na decomposição do peroxinitrito, em presença e ausência de dióxido de carbono, bem como na nitração do 4-hidroxifenilacetato, mediada por

peroxinitrito, foi também estudada através de medidas de cinética rápida (stopped-flow). Evidências de intermediários de reação foram obtidas através de mudanças significativas no espectro EPR.

As propriedades eletroquímicas e a estabilidade termodinâmica relativa dessas espécies, estimada pela técnica de dicroísmo circular, usando a albumina bovina como quelante fisiológico, foram também verificadas.

Todos os estudos relatados foram desenvolvidos para melhor correlacionar a reatividade observada com determinadas características estruturais dos complexos de cobre preparados.

ABSTRACT

Many investigations on diimine copper(II) complexes have been carried out in order to mimic functional and structural properties of the active sites in proteins and enzymes dependent on this metal. Special interest has been focused on their reactivity toward molecular oxygen and its reduced derivatives, and more recently toward peroxynitrite. These diimine copper(II) complexes exhibited SOD-like activities, but have also shown considerable peroxidase activity, causing oxidative damage to different targets.

In this work, some new diimine copper(II) complexes were prepared, derived from 2,3-butanedione and 2-(2-aminophenyl)benzimidazole, 2-(aminomethyl)benzimidazole or 2-(2-aminoethyl)pyridine, and characterized using UV/Vis, IR and EPR spectroscopy, elemental analysis and determination of the effective magnetic moment. Those complexes have also been compared to similar species, derived from pyridinaldehyde and ethylenediamine, or acetylpyrazine and propylenediamine, previously prepared.

The studied complexes showed significant SOD activity, indicative of antioxidant properties, and a pronounced tetrahedral distortion around the copper ion, estimated by characteristic spectroscopic parameters.

On the other hand, the new compounds also exhibited pro-oxidant activities, by generating hydroxyl radicals in the presence of hydrogen peroxide, detected by the spin-trapping EPR method. The extension of lipid peroxidation promoted by these diimine copper(II) complexes was also investigated, using liposomes of lecithin L- α -phosphatidylcholine as membrane mimics. An enhancement of their peroxidase activity in the presence of bicarbonate and/or nitrite anion was also observed. Further, the decomposition of peroxynitrite, in the presence and absence of carbon dioxide, and the peroxynitrite-mediated nitration of 4-hydroxyphenylacetate, catalyzed by these copper compounds, was measured by stopped-flow kinetic runs. Evidence of intermediary species was provided by significant changes in the EPR spectra.

Finally, their electrochemical properties were estimated by cyclic voltammetry and their relative thermodynamic stability was verified through the technique of circular dichroism, using a competitive reaction with albumin, a physiological Cu(II) chelator.

All those studies were performed at the aim of correlating some structural characteristics to the observed reactivity of the diimine copper(II) complexes.

I. INTRODUÇÃO

Complexos de cobre têm sido extensivamente estudados como miméticos de centros ativos em diversas proteínas e enzimas dependentes deste metal, especialmente com ligantes imínicos e aminas macroacíclicas. Devido à sua flexibilidade, facilidade de obtenção e capacidade de estabilizar os estados de oxidação usuais do cobre, ligantes deste tipo permitem a manutenção de geometrias peculiares ao redor do íon cobre, levando a propriedades espectroscópicas interessantes e a uma reatividade bastante variada [1-3]. Diferentes complexos contendo este tipo de ligante têm sido descritos como modelos funcionais e/ou estruturais de proteínas de cobre, com uma grande variedade de centros ativos, incluindo superóxido dismutase Cu_2Zn_2 -SOD [4, 5], tirosinase [6], hemocianina [7] e citocromo c oxidase [8, 9].

Como miméticos da SOD, mostram propriedades antioxidantes ao catalisar a dismutação de radicais superóxido a espécies menos reativas, oxigênio e peróxido de hidrogênio:

O peróxido de hidrogênio formado neste processo, *in vivo*, pode se desproporcionar para produzir O_2 e H_2O , numa reação catalisada pela catalase, ou pode participar da formação de um potente oxidante, o radical hidroxil, extremamente reativo, com uma meia vida extremamente curta, reagindo rápida e inespecificamente com alvos celulares mais próximos, podendo lesar DNA, proteínas, açúcares e lipídios [9b].

Por outro lado, estes mesmos compostos podem também gerar espécies reativas de oxigênio na presença de oxidantes biológicos, como o peróxido de hidrogênio ou o peroxinitrito.

O peróxido de hidrogênio é gerado e liberado por uma grande variedade de células normais ou malignas, em resposta a fatores de estímulos específicos ou por células tumorais. O H_2O_2 em concentrações entre 10 a 100 μM atua como um mensageiro intra e intercelular capaz de promover respostas de crescimento em

culturas [10]. O mecanismo pode envolver interação direta com receptores específicos, a oxidação das proteínas fosfatases, quinases, fatores de transcrição ou fatores inibidores de transcrição.

Muitas enzimas, in vivo, incluindo a xantina oxidase, a urato oxidase e as D-aminoácido oxidase, podem gerar o peróxido de hidrogênio. Os sistemas biológicos que geram $O_2^{\bullet-}$, também são fonte de H_2O_2 pela dismutação deste radical (atividade SOD).

O peróxido de hidrogênio é considerado um agente oxidante e redutor fraco, entretanto parece inativar diretamente algumas enzimas, pela oxidação do grupo tiol (-SH), no sítio ativo [11].

Danos às proteínas, lipídios e DNA são mediados pelo peróxido de hidrogênio, catalisados por íons de cobre que podem atuar como reagentes do tipo Fenton ou do tipo Haber-Weiss, similarmente a íons de ferro, através de reações em cadeia, gerando espécies reativas de oxigênio:

Estas espécies, especialmente os radicais hidroxil, têm sido descritas como responsáveis por danos oxidativos a diferentes alvos biológicos (proteínas, lipídios, membranas, DNA), podendo causar inúmeras doenças ou processos degenerativos (catarata, aterosclerose, câncer, envelhecimento, etc). Por esta razão, o controle da homeostase do cobre in vivo é bastante rigoroso. Estimativas recentes indicaram uma concentração de íons cobre livre nas células normais < de 10^{-18} mol/L. Para efeito de comparação, considerando um íon de cobre livre por célula, com volume estimado de 10^{-14} L, a concentração seria de 10^{-10} mol/L [12].

O peroxinitrito é um poderoso oxidante que reage com todas as classes de biomoléculas, incluindo proteínas, via oxidação da tirosina [13], resíduos de selenocisteína [14], metaloenzimas [15], DNA [16], lipídios [17] e antioxidantes, como ascorbato e tióis [18]. Seu comportamento cinético é interessante e complexo, em reações de oxidação e nitração, causando muitos efeitos deletérios, usualmente ligados à geração de radicais livres. Dados mais recentes na literatura indicam que cerca de 30

a 35% da decomposição do peroxinitrito ocorre por via radicalar. O restante corresponde ao decaimento a nitrato, conforme mostrado no Esquema abaixo.

Esquema 1

Embora a decomposição do peroxinitrito seja muito rápida, in vivo, alguns complexos metálicos conseguem catalisar esta reação.

Complexos de cobre constituídos pela 1,10-fenantrolina e aminoácidos como ligantes [19], bem como a enzima Cu₂Zn₂ SOD [20], também mostraram atividade catalítica na decomposição do peroxinitrito e na nitração do 4-hidroxifenilacetato [19]. Recentemente, Stern e colab. [21] verificaram que porfirinas de ferro, solúveis em água, Fe(III)TMPyP e Fe(III)TMPS, catalisam a rápida isomerização do peroxinitrito a nitrato. Groves e colab. observaram ainda que porfirinas de manganês, na presença de antioxidantes biológicos como o ascorbato, a glutathione e o Trolox [22], catalisam a redução do peroxinitrito a nitrito e dióxido de nitrogênio.

Alguns complexos de cobre com ligantes imínicos são também descritos como bons geradores de espécies reativas na presença de redutores biológicos largamente disseminados, como o ascorbato ou glutathione [23, 24], causando efeitos citotóxicos in vivo, dependendo do complexo de cobre(I) correspondente ser reoxidado pelo oxigênio molecular. Neste ciclo redox, radicais livres de oxigênio são gerados.

1.1. Cobre – Um bioelemento moderno

O cobre é um elemento essencial aos seres vivos com características químicas únicas, em seus dois estados relevantes de oxidação, +1 e +2, cuja importância pode ser avaliada pelo grande número de proteínas e enzimas dependentes deste metal,

participantes de inúmeros processos biológicos onde desempenham funções variadas [25]. O fato mais notável referente aos sítios de cobre encontrados em proteínas é o número particularmente elevado de funções envolvendo o metabolismo do O_2 ou de compostos N/O e sua freqüente associação com oxidantes e radicais orgânicos e inorgânicos, tais como o tirosil, semiquinonas, superóxido ou nitrosil [26].

As funções desempenhadas por proteínas de cobre incluem: transporte de oxigênio molecular, transporte de elétrons, absorção, armazenamento e transporte do cobre, oxidação de substratos, como aminas, fenóis e carboidratos, ação antioxidante contra radicais livres e ainda participação no ciclo do nitrogênio (denitrificação) [27, 28] (vide **Figura 1**).

Figura 1 – Função metabólica essencial das proteínas de cobre. Não estão incluídas as proteínas responsáveis pelo transporte, armazenamento e reguladora de cobre. Adaptação da figura da ref. [26]

O cobre biológico é preferencialmente extracelular, mas está também distribuído na célula, incluindo o núcleo, as mitocôndrias, os lisossomos, o retículo endoplasmático e o citosol [29]. No metabolismo do cobre, o transporte intracelular é de vital importância para a sua incorporação nas proteínas que dependem deste metal para sua atividade [30].

Os íons de cobre são absorvidos no sistema gastro-intestinal, ficando disponíveis coordenados à albumina e a ligantes que contêm resíduos de histidina. Metalotioneínas ricas em cisteínas são responsáveis pela homeostase e pela transferência de cobre para a ceruloplasmina, uma proteína que contém seis átomos de cobre e que pode também atuar como ferroxidase na catálise de oxidação de Fe^{II} a Fe^{III} [26]. Mais recentemente, novas proteínas de cobre, denominadas chaperonas, têm sido descritas como principais responsáveis pelo tráfego de cobre entre proteínas, tanto em leveduras como em ratos e humanos [31].

Em metaloproteínas e metaloenzimas, o cobre se coordena com características bem distintas, quanto à geometria conformacional e coordenação espacial, com átomos de O, N ou S nos ligantes. Características espectrais peculiares são impostas ao íon cobre num centro ativo de proteína, se comparadas às de complexos simples de alta simetria, com ligantes menores. Essas estruturas específicas observadas nos sítios ativos são determinantes para a reatividade destes centros em reações catalíticas.

O caráter da ligação metal-ligante em complexos de cobre(II) é freqüentemente iônico e favorece a estabilização desse estado de oxidação através da distorção Jahn-Teller. Entretanto, diferentes extensões do alongamento axial numa geometria octaédrica ou tetraédrica podem produzir diversas geometrias (**Diagrama** abaixo) e desvios dessas estruturas de energia mínima são necessários para possibilitar mudanças rápidas no estado de oxidação, em reações de transferência eletrônica eficazes.

Diagramas de energia

A alta estabilidade das ligações $Cu^{II}N$, torna desnecessário o uso de ligantes macrocíclicos tetrapirrólicos, comuns em sistemas biológicos contendo ferro ou cobalto, mas raro para cobre. Ligações de íons cobre com ligantes contendo O, S ou P como átomos ligantes são mais fracas e lábeis. A geometria e o número de coordenação do cobre(I) é mais flexível, devido à sua configuração d^{10} e ausência de estabilização de campo ligante.

O cobre é também diferenciado pelo potencial redox do par Cu^{II}/Cu^I , mais alto em comparação a outros sistemas biologicamente relevantes, particularmente o par Fe^{III}/Fe^{II} [32].

1.2. Produção Celular de Ânion Superóxido e do Óxido Nítrico

A formação do ânion superóxido, $O_2^{\bullet-}$, é um processo contínuo em células aeróbicas. Cerca de 1% do oxigênio consumido é convertido em superóxido através da perda de elétrons pelas cadeias de transporte de elétrons, como as da mitocôndria e do retículo endoplasmático. As taxas de produção do ânion superóxido podem ser aumentadas várias vezes, seja por uma ruptura do fluxo normal de elétrons, pelo

aumento na tensão do oxigênio ou pelo aumento da atividade de enzimas como a NADPH oxidase, de membranas de macrófagos ativados e de neutrófilos [33, 11, 34].

O óxido nítrico, $^{\bullet}\text{NO}$, um radical livre relativamente estável, paramagnético, resultante da presença de um elétron desemparelhado, é sintetizado endogenamente a partir da oxidação da L-arginina a L-citrulina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), na presença de oxigênio molecular e NADPH [35]. O óxido nítrico é produzido por uma grande variedade de células tais como neurônios, células musculares, macrófagos, neutrófilos e plaquetas entre outras [36]. É capaz de se difundir livremente em todas as direções do seu sítio de origem, fazendo do controle de sua síntese a chave para sua atividade de regulação.

A molécula de monóxido de nitrogênio, $^{\bullet}\text{NO}$, pode sofrer inúmeras reações podendo atuar como um composto oxidante ou como um agente redutor, formando NO^+ (cátion nitrosônio) ou NO^- (ânion nitrosil), respectivamente [37]. Alguns estudos mostram que $^{\bullet}\text{NO}$ tem propriedades citotóxicas e é a origem de numerosas doenças e estados degenerativos. Entretanto, outros relatos sugerem que o $^{\bullet}\text{NO}$ previne danos aos tecidos.

A química desta molécula em sistemas biológicos é extensa, complexa e está dividida em duas categorias: direta e indireta. Os efeitos diretos são as reações que ocorrem entre o $^{\bullet}\text{NO}$ e as moléculas biológicas específicas. Os efeitos indiretos não envolvem o $^{\bullet}\text{NO}$, mas são mediados pelas espécies reativas de nitrogênio (RNOS) [38].

Dentre as inúmeras funções, a molécula de $^{\bullet}\text{NO}$ tem sido reconhecida como um mediador chave de diversas funções fisiológicas através de suas interações diretas com biomoléculas críticas. Além disso, o óxido nítrico pode regular oxidações biológicas e consequentemente modular danos mediados por radicais livres [39]. O óxido nítrico pode também inibir reações radicalares, ao nível molecular, através de diferentes mecanismos, podendo ainda se coordenar a íons metálicos de transição, tais como cobre, manganês ou o ferro dos grupos heme do citocromo c oxidase [40, 41] e da hemoglobina [42].

Este gás inorgânico exerce uma variedade de funções reguladoras da alteração do sistema cardiovascular e de modulação neurológica. Participa também do sistema imune anti-tumor e anti-patogênico. Entretanto, esta molécula também está envolvida

em diferentes doenças e processos inflamatórios e provavelmente em doenças neurológicas degenerativas, como aterosclerose, diabetes, câncer e artrite [38].

O $\cdot\text{NO}$ reage com alguns radicais, tais como o superóxido e os derivados dos lipídios para formar o ONOO^- e o LOONO , respectivamente, que podem reagir com outros alvos biológicos, influenciando diferentes funções celulares e fisiológicas.

1.3. Peroxinitrito em Condições Fisiológicas

O ânion superóxido reage, *in vivo*, com o óxido nítrico para formar o ânion peroxinitrito estável, a uma velocidade de $4,3\text{--}6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [43, 44] próximo à velocidade de reação controlada por difusão. A constante de velocidade desta reação é maior do que a constante de reação do superóxido com a enzima superóxido dismutase ($k = 1,3\text{--}2,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [45] e também maior do que a constante de reação entre o óxido nítrico com grupos heme ($k = 10^5\text{--}10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [46, 47], favorecendo assim a formação do ânion peroxinitrito.

A formação de peroxinitrito por células em condições metabólicas favorece o aumento da produção de superóxido e óxido nítrico, recentemente demonstrada em macrófagos [48], células de Kupffer [49], células endoteliais [50] e neutrófilos [51]. Por outro lado, a formação de peroxinitrito em tecidos está associada à formação de resíduos de nitrotirosina, detectados em várias lesões, como as ateroscleróticas de humanos [52], as inflamatórias em miocárdio de humanos [53], as cutâneas em leishmaniose murina [54] e em plasma de fumantes [55]. O peroxinitrito é capaz de promover a nitração da tirosina, de resíduos de triptofano em proteínas, de resíduos da guanina no DNA e de grupos alifáticos em ácidos graxos e açúcares. As nitrações biológicas são catalisadas por metais de transição, metaloproteínas e por dióxido de carbono [56]. Os resíduos de nitrotirosina são usualmente utilizados como um marcador da formação de peroxinitrito, uma vez que o óxido nítrico e o dióxido de nitrogênio são agentes nitrantes fracos, nas mesmas condições [57].

O ânion peroxinitrito (ONOO^-) é relativamente estável, provavelmente porque sua redução gera O_2^{2-} como um grupo reativo [58], com velocidade de decomposição relativamente lenta em soluções alcalinas. Entretanto, é muito instável a pH 7,4, tendo

uma meia vida menor que 1 segundo [59]. O pK_a do peroxinitrito é 6,6 [60] e apesar de apenas 20% encontrar-se na forma ácida, ácido peroxinitroso em pH 7,4, sua rápida decomposição desloca o equilíbrio, levando a um completo desaparecimento do ânion. A sua decomposição, catalisada pela protonação, pode ser acompanhada espectrofotometricamente por medidas de cinética rápida ("stopped flow") na região de UV a 302 nm, uma vez que o ânion peroxinitrito apresenta uma banda de absorção nessa região ($\epsilon_{302} = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e sua constante de decomposição de pseudo-primeira ordem, k_{obs} , em pH 7,4 e a 25°C, é de aproximadamente $0,27 \text{ s}^{-1}$ [61].

I.4. Reatividade do Peroxinitrito

O peroxinitrito é um poderoso oxidante e reage por um mecanismo relativamente complexo, cuja natureza tem sido extensivamente debatida [62].

O ânion peroxinitrito é relativamente estável, mas protonado [56] ou na presença de um ácido de Lewis [21, 58, 63-65], incluindo CO_2 e certos complexos de íons metálicos como o cobre da superóxido dismutase, oxida moléculas por processos de 1 ou 2 elétrons [66]. Na ausência de outros substratos, ele se decompõe rapidamente para formar NO_3^- , um produto estável em meio ácido [67, 68, 69].

A reatividade do ONOOH inicialmente foi interpretada em termos da formação de intermediários, como o radical $^{\bullet}\text{OH}$ [70, 71] ou espécies do tipo hidroxil, $[\text{ML}(^{\bullet}\text{OH})]$ [72]. Posteriormente esta proposta foi substituída, usando argumentos termodinâmicos, por modelos que atribuíam diferentes reatividades aos isômeros geométricos, formados pela orientação *cis* versus *trans* ao redor da ligação ON-OOH [73] ou eram baseados na isomerização como uma etapa da ativação unimolecular [74]. Neste último caso, acreditava-se que a forma reativa seria um transiente ("transoid") instável cujas propriedades se assemelhavam ao estado de transição para a isomerização *cis-trans*. Este é um modelo recomendado para processos redox por 1 elétron, de esfera externa, cuja reatividade pode ser entendida no contexto do formalismo de Marcus [74].

Cálculos Ab-initio mais recentes indicaram, entretanto, que os isômeros *cis* e *trans* do ONOOH são praticamente isoenergéticos [75] e que não há base termodinâmica para uma das formas ser substancialmente mais reativa. Assim, o

mecanismo radicalar foi reavaliado, assumindo-se que haveria uma etapa de iniciação com a homólise da ligação O-O. O estado de transição seria então um par [$\cdot\text{NO}_2\cdots\cdot\text{OH}$] ou [$\cdot\text{NO}_2\cdots\text{CO}_3\cdot$], em presença de dióxido de carbono. As energias estimadas para a ligação O-O no ONO-OH e no aduto ONO-OCO₂ são excepcionalmente baixas, 22 kcal/mol e 9 kcal/mol, respectivamente. Para comparação, esta energia no caso do HO-OH é de 51 kcal/mol [58, 75].

Estudos cinéticos têm mostrado que muitas oxidações por 1 elétron ocorrem por caminho “indireto”, sendo de primeira ordem com relação ao peroxinitrito e de ordem zero em relação às espécies oxidáveis, indicando que uma ativação unimolecular precede a etapa de óxido-redução [73, 76, 68, 72, 77-79]. Entretanto, as oxidações por 2 elétrons parecem ocorrer por um caminho “direto”, sendo de primeira ordem em relação ao peroxinitrito e ao redutor [66, 73, 80-82] (vide **Esquema 2**).

Esquema 2 - Mecanismo proposto para a decomposição do peroxinitrito, onde R_o reagiria com ordem zero em relação ao substrato e R₁ reagiria com ordem 1 em relação ao substrato [83]

I.5. Reatividade do Peroxinitrito na presença de Dióxido de Carbono

O dióxido de carbono modula a reatividade do peroxinitrito pela alteração da velocidade e dos produtos formados, sendo uma reação de fundamental importância no meio biológico, uma vez que o bicarbonato é o principal sistema tampão em tecidos e a forma de vida aeróbica depende da troca dos gases CO_2/O_2 [84]. O peroxinitrito reage rapidamente com o dióxido de carbono, com $k = 3 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [85], formando o aduto nitrosoperoxocarbonato, ONOOCO_2^- , cuja decomposição produz como um dos intermediários reativos o radical carbonato, $\text{CO}_3^{\bullet-}$. A formação deste radical em soluções aquosas de peroxinitrito foi recentemente comprovada, através de medidas de EPR em fluxo, por Augusto e colab. [85]. A participação deste radical na oxidação de substratos foi inicialmente inferida da reatividade do peroxinitrito com íons inorgânicos, na presença de dióxido de carbono [68, 86].

Inicialmente foi sugerido por Lyman e Hurst [63] que a etapa limitante desta reação é a formação do aduto ONOOCO_2^- . Esta sugestão foi confirmada por outros autores [64, 68, 77, 84, 86, 87] e na ausência de substratos o aduto se decompõe a nitrato e dióxido de carbono. Entretanto, em presença de substratos uma fração de aproximadamente 35% do aduto pode participar de oxidações por 1 elétron e/ou da nitração de aromáticos, provavelmente pela homólise do aduto a dióxido de nitrogênio e o radical carbonato. A formação do radical hidroxil também é possível [71, 88]. Tanto o radical hidroxil como o radical carbonato pode oxidar substratos, pela abstração de um átomo de hidrogênio, mas no caso do radical hidroxil, as reações de adição poderiam predominar em algumas condições [89]; (vide **Esquema 3**).

Desta maneira, em presença de CO_2 a reatividade do peroxinitrito é consideravelmente modificada. Augusto e colab. confirmaram ainda que o radical carbonato não é protonado em pHs fisiológicos. Como discutido por Bisby e colab. [90] estes resultados indicam que o radical carbonato é ligeiramente mais oxidante em soluções neutras ($E_{m,i} \sim 1,80 \text{ V}$) [85] do que previamente assumido, considerando um pK_a de 9,6 ($E_{m,i} \sim 1,64 \text{ V}$) [90].

Esquema 3 - Mecanismo proposto para a decomposição do peroxinitrito na presença de dióxido de carbono [91].

1.6. Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica é uma deterioração oxidativa de lipídios insaturados que envolve a formação e a propagação de radicais lipídicos e o rearranjo de ligações duplas. Tem sido associada a diversos mecanismos celulares deletérios que podem acarretar câncer, inflamação, envelhecimento, etc. “Placas de gordura” detectadas no interior das paredes das artérias são um sinal visível do envolvimento desse processo na aterosclerose [92]. Estas “placas de gordura” contêm partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e estão envolvidas na iniciação e desenvolvimento da aterosclerose [93- 96]. Apesar dos mecanismos de envelhecimento e a formação de tumores ainda serem obscuros, a literatura indica a participação de produtos secundários de lipoperoxidação na lesão cromossômica associada a estes processos [97].

I.6.1. Alvos de ataque

As membranas que circundam as células e organelas celulares, contêm uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). Os maiores constituintes das membranas biológicas são as proteínas e lipídios. O lipídio mais comum em membranas de células animais é a lecitina (fosfatidilcolina) que é um glicerofosfolípido tendo a colina como grupo cabeça. As membranas lipídicas são moléculas anfifáticas que expostas à água tendem a se agregar, com suas regiões hidrofóbicas reunidas e a região hidrofílica em contato com a água. Os fosfolípidios quando sonicados em soluções aquosas formam os lipossomos, onde as folhas em bicamadas dobram-se sobre si mesmas e perdem suas regiões limitantes hidrofóbicas, para gerar uma esfera oca que engloba uma cavidade aquosa.

Embora o mecanismo de iniciação da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade permaneça indefinido, várias linhas de investigação sugerem que íons metálicos de transição, tais como o cobre e o ferro, exercem importantes funções neste processo [98]. Os íons cobre são poderosos promotores da decomposição de peróxidos [99], atuando como um excelente catalisador da peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade, principalmente pela decomposição de peróxidos pré-formados, como mostram as equações abaixo:

Diferentes ligantes coordenados aos íons de cobre podem então mediar e/ou modular esta sua atividade. A lipofilicidade destes complexos ou a presença de substituintes nos ligantes, mais adequados à interação com os grupos lipídicos, seriam então fatores a ser considerados nas diferenças de reatividade observadas entre diferentes complexos de cobre.

II. PARTE EXPERIMENTAL

II.1. Reagentes e Soluções

Os reagentes usados foram de grau analítico de diferentes fontes: 2,3-butanodiona (diacetilo, 97%), 2-(2-aminoetil)piridina (95%), o perclorato cúprico hexahidratado (98%), o tetra(tiocianato)cobaltato(II) de mercúrio, xantina (98%) e o ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPA) foram de procedência da Aldrich Chemical Co. Os reagentes (2-aminofenil)benzimidazol (98%) e (2-aminometil)benzimidazol dihidroclorato foram de procedência da Lancaster. A xantina oxidase, L- α -fosfatidilcolina de lecitina, o ácido tiobarbitúrico (TBA) e a resina Chelex 100 foram de procedência da Sigma Chemical Co.

Os sais inorgânicos para preparação das soluções-tampão e os solventes foram de procedência da Merck.

II.1.1. Síntese do Peroxinitrito

O peroxinitrito foi sintetizado segundo procedimento descrito na literatura, em reator de fluxo, a partir do nitrito de sódio 0,6M e peróxido de hidrogênio 0,65M [70]; um excesso de peróxido de hidrogênio foi utilizado para minimizar a contaminação por nitrito [107]. Para eliminar o excesso de peróxido de hidrogênio, a solução de peroxinitrito obtida, em NaOH 4M, foi tratada com dióxido de manganês e depois centrifugada, antes de ser armazenada, em frascos plásticos a -80 °C, em freezer. Os baixos níveis de contaminação de peróxido de hidrogênio (<1%) e de nitrito (10-30%), foram determinados, pelo método titanil [100] e por medidas espectrofotométricas a 354 nm ($\epsilon = 24,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [101], respectivamente. O peroxinitrito sintetizado foi mantido em uma solução fortemente básica (pH ≥ 12), a -80°C. A concentração da solução estoque, preparada a cada dia por diluição adequada em água, foi determinada espectrofotometricamente a 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [102].

II.2. Métodos e Técnicas Experimentais

II.2.1. Medidas Espectroscópicas

II.2.1.1. Análise do cobre

A análise dos complexos de cobre foi realizada por espectrometria de emissão atômica, num instrumento ICP-AES-Spectroflame - Spectro, com fonte de plasma de argônio induzido. A solução de cobre foi introduzida a uma vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ e monitorado através da linha de emissão a 327,396 nm, com um limite de detecção de $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$, no Laboratório de Espectrometria de Emissão e Absorção Atômica, da Profa. Elizabeth de Oliveira, no IQ-USP-SP.

II.2.1.2. Medidas na região UV/Vis e do Infravermelho

As medidas espectrofotométricas dos complexos na região UV/Visível foram efetuadas em espectrofotômetro Beckman, modelo DU-70, ou em um instrumento Hitachi, modelo U-2000, utilizando celas de quartzo, com caminho óptico de 1,00 cm e volumes de 3 mL ou 1 mL (nas medidas de peroxidação lipídica).

As medidas na região do infravermelho foram realizadas em um instrumento Perkin Elmer, modelo 783, ou em um BOMEM 3,0, de refletância difusa, no intervalo de 4000 a 200 cm^{-1} , utilizando pastilhas de brometo de potássio anidro.

II.2.1.3. Medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

Um instrumento Bruker EMX, operando na banda X (frequência = 9,5 GHz, potência 20 mW e frequência de modulação = 100 KHz) foi usado para registrar os espectros EPR. O campo magnético foi calibrado com 2,2-bis(4-*tert*-octilfenil)-1-picrilhidrazil como padrão externo, para as medidas sólidas, e com soluções de $[\text{Cu}(\text{edta})]^{2+}$ (1,0 mM) para soluções congeladas metanol-água (4:1). Na detecção dos radicais hidroxil utilizou-se o método do captador de spin (*spin-trapping*) [111, 112].

Como captador foi usado o 5,5'-dimetil-3,4-dihidropirrol-*N*-óxido (DMPO), após purificação pelos métodos recomendados, de destilação a pressão reduzida ou filtração em carvão ativo [104,105].

II.2.1.4. Medidas de Cinética Rápida

As medidas de cinética rápida (*stopped-flow*) foram executadas em um espectrofotômetro, da Applied Photophysics, modelo SX.18 MV, a $(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, monitorando-se o decaimento do peroxinitrito a 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ou o produto de nitração 4-NO₂-HPA, a 430 nm ($\epsilon = 4400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A medida do pH foi feita após cada corrida cinética, na solução de descarte.

Exemplos de curvas cinéticas obtidas são mostrados na **Figura 2**

Figura 2- Curvas cinéticas da decomposição do Peroxinitrito 600 μM a diferentes pHs e $(25\pm0,2)^\circ\text{C}$

II.2.1.5. Estabilidade Termodinâmica - Medidas de Dicroísmo Circular (CD)

As medidas de estabilidade relativa das espécies cobre-diimina foram realizadas usando albumina como ligante competitivo, em um espectrofotômetro JASCO-J-720, no intervalo de 300 a 650 nm, utilizando-se uma cela de quartzo esférica de 1,00 cm de caminho óptico.

II.2.2. Medidas Potenciométricas

As medidas de pH foram efetuadas em pHmetro Digimed, modelo DMPH-2, acoplado a um eletrodo de vidro combinado, da Analion ou da Ingold. Antes de qualquer medida de pH, o aparelho foi calibrado com soluções - tampão apropriadas.

II.2.3. Medidas de Susceptibilidade Magnética

As medidas de susceptibilidade magnética das amostras sólidas foram realizadas com uma balança Faraday Cahn, modelo DTL 7500, à temperatura ambiente e para calibração utilizou-se como padrão o composto $\text{Hg}[\text{Co}(\text{SCN})_4]$ ($\chi = 16,44 \times 10^{-6}$ unidades $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$, a 20°C) [106].

II.2.4. Análise Elementar

A análise elementar de C, N e H dos complexos preparados foi realizada pelo Central Analítica do IQ-USP, usando um aparelho da Perkin – Elmer, Elemental Analyser 2400 CHN.

II.2.5. Análise do Peróxido de Hidrogênio

As soluções de peróxido de hidrogênio foram analisadas pela obtenção de um peroxo-complexo estável de vanádio(V) [108], de coloração avermelhada, monitorada espectrofotometricamente, a 450 nm ($\varepsilon = 360 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), resultante da adição de soluções de peróxido de hidrogênio em análise a uma solução de metavanadato de amônio 0,04M, em meio fortemente ácido (H_2SO_4 0,5M).

II.2.6. Medidas da Atividade SOD

O método utilizado para a medida dessa atividade biológica foi o da inibição da redução do reagente Nitro Blue Tetrazólio (NBT^{2+}) por radicais superóxidos, gerados no sistema xantina/xantina oxidase. A formação da espécie formazan foi monitorada a 530 nm e a pH 7,4, estimando-se sua velocidade inicial na ausência e na presença de diferentes concentrações dos complexos em estudo. Uma unidade de atividade SOD é definida como a quantidade de enzima que acarreta 50% de inibição (IC_{50}) da redução do NBT^{2+} [115-116].

II.2.7. Preparo dos lipossomos

Os lipossomos de L- α -fosfatidilcolina de lecitina foram preparados a partir de uma solução estoque (20mg/mL) em tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,4), tratado com resina Chelex 100. A suspensão obtida foi sonicada por três ciclos de 30 s, a 65 W, em banho de gelo, com sonicador Branson 250. Os lipossomos foram mantidos a 4°C, protegidos da luz e utilizados no máximo em uma semana.

Fosfatidilcolina

R = ácido graxo saturado (ácido palmítico)
R' = ácido graxo insaturado (ácido oleico)

II.2.8. Dosagem dos Produtos de Lipoperoxidação - Teste do ácido tiobarbitúrico (TBA)

A peroxidação lipídica foi medida através da dosagem de espécies reativas frente ao ácido tiobarbitúrico (thiobarbituric reactive species, **TBARS**) [109], após incubação dos lipossomos com os sistemas em estudo: peróxido de hidrogênio ou peroxinitrito com os complexos de cobre preparados. Vários produtos do tipo malonaldeído (MDA), formados na peroxidação lipídica de fosfatidilcolina, ou de membranas, são detectados pela reação com TBA, formando um cromóforo vermelho, em solução ácida, com banda de absorção característica a 532 nm ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [110]. Nestes ensaios a quantidade de MDA formado foi medida tomando-se 500 μL de amostra, após incubação dos lipossomos, e misturando-se a 500 μL de reagente contendo TBA (0,37% m/v), HCl 0,25 M, Butilato Hidroxitolueno (BHT) 4mM e o detergente Triton X-100 1% v/v. A mistura foi então incubada a 100°C, durante 40 minutos. Após esse tempo, as amostras foram resfriadas e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, filtradas e a absorbância do sobrenadante foi lida a 532 nm.

II.2.9. Medidas Eletroquímicas – Voltametria cíclica

As medidas de voltametria cíclica foram executadas usando um sistema PARC da EG&G, consistindo de um potenciostato modelo 283, uma cela constituída por três eletrodos e um software ECHM, versão 4.30, foram utilizados. Soluções dos complexos de cobre 5mM foram preparadas em dimetilformamida, contendo 0,1 mM de perclorato de tetraetilamônio. Um eletrodo de trabalho, constituído de um disco de platina, e uma haste de platina, como eletrodo auxiliar, foram utilizados para as medidas, versus um eletrodo de referência Ag/AgNO₃ ($E^{\circ} = 0,503 \text{ V}$ versus EPH) [182]. As medidas espectroeletroquímicas foram executadas usando um potenciostato PARC, modelo 173 e, em paralelo, um espectrofotômetro modelo 8453 e uma cubeta de quartzo com comprimento óptico 0,025 cm. Nestas medidas, utilizou-se um eletrodo de trabalho de ouro e um minieletrodo auxiliar de platina, versus um microeletrodo de referência Ag/AgNO₃. O complexo investigado foi dissolvido em dimetilformamida, em concentração 5 mM, contendo perclorato de tetraetilamônio (TEAP) 0,10 M.

II.3. Síntese dos Compostos Diimínicos de Cobre(II)

Os complexos de cobre(II) com ligantes diimínicos tetradentados, derivados de 2,3-butanodiona e 2-(2-aminofenil)benzimidazol, 2-(aminometil)benzimidazol, ou 2(2-aminoetil)piridina, foram obtidos na forma de percloratos, a partir da condensação do composto carbonílico e as aminas correspondentes, baseado em procedimentos descritos na literatura, por vários pesquisadores [111-114, 118]. Os complexos [Cu(apz-pn)](ClO₄)₂ e o [Cu(pyal-en)](ClO₄)₂ tinham sido previamente sintetizados e caracterizados durante o Mestrado [119], embora novas sínteses tenham sido agora efetuadas para complementação dos estudos.

Cuidado: Apesar das espécies preparadas serem bastante estáveis, sais de perclorato de cobre com ligantes orgânicos podem ser explosivos. Devem ser manuseados com muito cuidado, sempre em pequenas quantidades.

II.3.1. $[\text{Cu}(\text{dpbi})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Na preparação desse complexo utilizou-se 4 mmols (0,837g) de 2-(2-aminofenil)benzimidazol dissolvidos em 8 mL de etanol e 2 mL de água deionizada. A esta solução foram adicionados, sob agitação constante, 2 mmols (0,180 mL) de 2,3-butanodiona, dissolvidos em 2 mL de etanol. A mistura foi mantida a 55°C por aproximadamente 150 minutos, obtendo-se uma solução ocre. Resfriou-se esta solução a 30°C e adicionou-se, gota a gota, sob constante agitação, 2 mmols (0,741 g) de perclorato de cobre hexa-hidratado dissolvidos em 4 mL de água deionizada, mantendo-se essas condições por aproximadamente 60 minutos. Posteriormente, deixou-se a solução em banho de gelo, por 30 minutos, e filtrou-se o precipitado formado, lavando-se com etanol gelado. Finalmente, processou-se à sua secagem em dessecador a vácuo, obtendo-se cristais ocre, com rendimento de 75% (2,162 g).

II.3.2. $[\text{Cu}(\text{dmbi})](\text{ClO}_4)_2$

Na preparação desse complexo utilizou-se 4 mmols (0,880 g) de (2-aminoetil)benzimidazol di-hidrocloreto dissolvidos em 3 mL de água deionizada. Inicialmente elevou-se o pH da solução a ~8, com NaOH 0,1 M. A esta solução adicionou-se, sob constante agitação, 2 mmols (0,180 mL) de 2,3-butanodiona dissolvidos em 15 mL de metanol. A mistura foi mantida a 63°C por aproximadamente 30 minutos, obtendo-se uma solução de cor laranja. Resfriou-se esta solução a 33°C e adicionou-se, gota a gota, sob constante agitação, 2 mmols (0,741 g) de perclorato de cobre, dissolvidos em 3 mL de água deionizada. A mistura foi mantida nessas condições por 150 minutos, obtendo-se uma solução verde. Em seguida manteve-se a solução a 4°C, por 17 horas, e depois em banho de gelo por 120 minutos. Filtrou-se o precipitado ocre formado, lavando-se com água deionizada e metanol gelado e finalmente procedeu-se à sua secagem em dessecador a vácuo. O rendimento obtido foi de 27% (0,330 g).

II.3.3. [Cu(depy)](ClO₄)₂

Na preparação deste complexo adicionou-se 4 mmols (0,489 g) de 2-(2-aminoetil)piridina dissolvidos em 7,5 mL de etanol, sob constante agitação, a 2 mmols (0,180 mL) de 2,3 -butanodiona dissolvidos em 7,5 mL de etanol. A solução foi mantida sob refluxo (a 78°C) por aproximadamente 75 minutos, obtendo-se uma solução marrom escura. Resfriou-se então a 30°C e adicionou-se lentamente, sob constante agitação, 2 mmols (0,741 g) de perclorato de cobre dissolvidos em 5 mL de água deionizada, mantendo-se essas condições por 150 minutos. Posteriormente, deixou-se a solução em banho de gelo por 75 minutos. Filtrou-se o precipitado cinza formado, lavando-se com etanol gelado e secando em dessecador a vácuo. O rendimento obtido neste caso foi de 71% (0,788 g).

Em seguida, procedeu-se à caracterização química e estrutural das espécies complexas preparadas, utilizando diferentes técnicas, como: análise elementar, espectroscopia eletrônica UV/Vis, EPR e infravermelha, e medidas de susceptibilidade magnética. Parâmetros espectroscópicos adequados foram obtidos, em cada caso.

III. RESULTADOS E DISCUSSÕES

III.1. Caracterização por Análise Elementar

Os complexos sintetizados inicialmente foram caracterizados através da análise elementar de C, N, H e Cu²⁺. Os resultados estão listados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Resultados das análises elementar para os complexos diimínicos de cobre(II).

<i>Compostos</i>	<i>%C</i>	<i>%N</i>	<i>%H</i>	<i>%Cu²⁺</i>	<i>Rendimento da Síntese</i>
[Cu(dmbi)](ClO ₄) ₂ (castanho esverdeado) (C ₂₀ H ₂₀ N ₆)Cu(ClO ₄) ₂ MM = 606,86	39,58* 40,59	14,34* 15,17	3,32* 3,38	10,47* 10,11	27%
[Cu(dpbi)](ClO ₄) ₂ ·H ₂ O (ocre) (C ₃₀ H ₂₄ N ₆)Cu(ClO ₄) ₂ ·H ₂ O MM = 730,9	48,11* 46,13	11,22* 11,96	3,49* 3,20	8,48* 7,20	75%
[Cu(depy)](ClO ₄) ₂ (cinza) (C ₁₈ H ₂₂ N ₄)Cu(ClO ₄) ₂ MM = 556,84	38,83* 38,49	10,28* 9,74	4,08* 3,93	11,41* 10,76	71%
[Cu(apz-pn)](ClO ₄) ₂ ·H ₂ O (ocre) (C ₁₅ H ₁₈ N ₆)Cu(ClO ₄) ₂ ·H ₂ O MM = 562,78	32,01 31,89	14,93 12,94	3,58 3,47	11,29 9,88	22%
[Cu(pyal-en)](ClO ₄) (azul) (C ₁₄ H ₁₄ N ₄)Cu(ClO ₄) ₂ MM = 500,73	33,58 33,72	11,19 11,76	2,82 3,02	12,68 12,65	70%

* Valores esperados

Analisando-se os resultados da **Tabela 1**, observou-se que os valores experimentais são bem próximos dos valores calculados, considerando as estruturas sugeridas, indicando que as sínteses foram bem sucedidas. Note-se que os compostos $[\text{Cu}(\text{apz-pn})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e o $[\text{Cu}(\text{dpbi})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ apresentam uma molécula de água de hidratação.

III.2. Caracterização Espectroscópica e Magnética

III.2.1. Espectros Eletrônicos

Estudos dos espectros na região do UV/Visível foram realizados para os compostos sintetizados, a concentrações variadas, utilizando-se álcool etílico e/ou dimetilformamida para os complexos $[\text{Cu}(\text{dpbi})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$, e acetonitrila para o $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$. Os espectros mostraram bandas de intensidade elevada na região do UV, atribuídas a transições dos ligantes $n \rightarrow \pi$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ e bandas largas menos intensas a 600 – 700 nm, devidas às transições d-d. Adicionalmente, estes complexos mostraram bandas entre 300 – 400 nm atribuídas às transições de transferência de carga Ligante - Metal, $(\pi)\text{imina} \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}$, presentes também em compostos similares contendo o grupo benzimidazol [120, 121]. Compostos em campo tetragonal fraco apresentam uma transição d-d em 710 nm, observada para o composto $[\text{Cu}(\text{dmbi})](\text{ClO}_4)_2$. Os espectros dos compostos diimínicos de cobre(II) são mostrados a seguir e os dados correspondentes estão na **Tabela 2**.

Espectros A

Espectros no intervalo 200-450 nm do composto $[\text{Cu}(\text{dpbi})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, em solução alcoólica a várias concentrações

A - $9,14 \times 10^{-6} \text{ M}$
B - $1,83 \times 10^{-5} \text{ M}$
C - $2,74 \times 10^{-5} \text{ M}$
D - $3,66 \times 10^{-5} \text{ M}$

Espectros no intervalo 450-850 nm do composto $[\text{Cu}(\text{dpbi})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, em solução alcoólica a várias concentrações

A - $4,55 \times 10^{-4} \text{ M}$
B - $6,61 \times 10^{-4} \text{ M}$
C - $7,58 \times 10^{-4} \text{ M}$
D - $1,06 \times 10^{-3} \text{ M}$
E - $1,52 \times 10^{-3} \text{ M}$

Espectros B

Espectros no intervalo 200-850 nm do composto $[\text{Cu}(\text{dmbi})](\text{ClO}_4)_2$, em solução alcoólica a várias concentrações

A - $2,79 \times 10^{-5} \text{ M}$
 B - $4,21 \times 10^{-5} \text{ M}$
 C - $5,59 \times 10^{-5} \text{ M}$
 D - $6,99 \times 10^{-5} \text{ M}$

Espectros no intervalo 650-800 nm do composto $[\text{Cu}(\text{dmbi})](\text{ClO}_4)_2$, em dimetilformamida a várias concentrações

A - $0,35 \times 10^{-4} \text{ M}$
 B - $0,71 \times 10^{-3} \text{ M}$
 C - $1,06 \times 10^{-3} \text{ M}$
 D - $1,41 \times 10^{-3} \text{ M}$
 E - $1,77 \times 10^{-3} \text{ M}$

Espectros C

Espectros no intervalo 200-500 nm do composto $[\text{Cu}(\text{depy})](\text{ClO}_4)_2$, em acetonitrila a várias concentrações

- A - $1,22 \times 10^{-5} \text{ M}$
- B - $2,44 \times 10^{-5} \text{ M}$
- C - $3,66 \times 10^{-5} \text{ M}$
- D - $6,11 \times 10^{-5} \text{ M}$
- E - $8,54 \times 10^{-5} \text{ M}$
- F - $1,22 \times 10^{-4} \text{ M}$

Espectros no intervalo 500-750 nm do $[\text{Cu}(\text{depy})](\text{ClO}_4)_2$, em acetonitrila a concentrações variadas

- A - $4,88 \times 10^{-4} \text{ M}$
- B - $6,11 \times 10^{-4} \text{ M}$
- C - $8,54 \times 10^{-4} \text{ M}$
- D - $9,76 \times 10^{-4} \text{ M}$
- E - $1,22 \times 10^{-3} \text{ M}$

Espectros D

Espectro no intervalo 200 – 450 nm do complexo $[\text{Cu}(\text{apz-pn})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em meio aquoso, a concentrações variadas

A - $1,45 \times 10^{-4} \text{ M}$

B - $1,16 \times 10^{-4} \text{ M}$

C - $0,87 \times 10^{-4} \text{ M}$

D - $0,58 \times 10^{-4} \text{ M}$

E - $0,29 \times 10^{-4} \text{ M}$

Espectro na região 500 -850 nm do complexo $[\text{Cu}(\text{apz-pn})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em meio aquoso, a concentrações variadas

A - $1,45 \times 10^{-3} \text{ M}$

B - $1,16 \times 10^{-3} \text{ M}$

C - $0,87 \times 10^{-3} \text{ M}$

D - $0,58 \times 10^{-3} \text{ M}$

E - $0,29 \times 10^{-3} \text{ M}$

Espectro E

Espectro no intervalo 200 – 350 nm do composto $[\text{Cu}(\text{pyal-en})](\text{ClO}_4)_2$ em meio aquoso, a concentrações variadas.

- A - $1,80 \times 10^{-4} \text{ M}$
- B - $1,44 \times 10^{-4} \text{ M}$
- C - $1,30 \times 10^{-4} \text{ M}$
- D - $1,08 \times 10^{-4} \text{ M}$
- E - $0,72 \times 10^{-4} \text{ M}$
- F - $0,36 \times 10^{-4} \text{ M}$

Espectro no intervalo 500-800 nm do composto $[\text{Cu}(\text{pyal-en})](\text{ClO}_4)_2$ em meio aquoso, a concentrações variadas.

- A - $1,44 \times 10^{-3} \text{ M}$
- B - $1,27 \times 10^{-3} \text{ M}$
- C - $1,08 \times 10^{-3} \text{ M}$
- D - $0,90 \times 10^{-3} \text{ M}$
- E - $0,72 \times 10^{-3} \text{ M}$
- F - $0,36 \times 10^{-3} \text{ M}$

Tabela 2 - Dados dos espectros UV/Vis para os compostos diimínicos de cobre(II).

<i>Composto</i>	$\lambda_{\text{máx}}, \text{nm}$	$\varepsilon, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
[Cu(dpbi)](ClO ₄) ₂ ·H ₂ O (Espectros A)	208	21,3x10 ³
	292	39,0x10 ³
	358	10,02x10 ³
	640	221
[Cu(dmbi)](ClO ₄) ₂ (Espectros B)	240	14,5x10 ³
	270	12,6x10 ³
	304	5,7x10 ³
	356	4,27x10 ³
	710	101
[Cu(depy)](ClO ₄) ₂ (Espectros C)	260	11,4x10 ³
	400	1,2x10 ³
	620	214
[Cu(apz-pn)](ClO ₄) ₂ ·H ₂ O # (Espectros D)	213	1,42x10 ⁴
	267	1,58x10 ⁴
	646	60
[Cu(pyal-en)](ClO ₄) # (Espectros E)	230	1,9x10 ⁴
	275	7,88x10 ³
	630	106

Dados obtidos durante o Mestrado

III.2.2. Espectros no Infravermelho

Os espectros de transmitância foram registrados no intervalo de 200 a 4000 cm⁻¹, identificando-se, por comparação com compostos similares, as frequências de vibração características das ligações presentes nos complexos sintetizados, listados na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Principais Bandas no IV (cm^{-1}) dos Complexos Diimínicos de Cobre(II).

	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}=\text{C})$	$\delta(\text{CH}_2)$	$\nu(\text{C}-\text{N})$	$\nu(\text{ClO}_4^-)$	$\nu(\text{Cu}-\text{N})$
$[\text{Cu}(\text{dpbi})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1620 (média)	1575 (forte)	1445 (forte)	1130 (média)	1090 (forte) 620 (fraca)	240 (fraca)
$[\text{Cu}(\text{dmbi})](\text{ClO}_4)_2$	1620 (fraca)	1590 (fraca)	1458 (média)	1130 (forte)	1115 (forte) 620 (forte)	240 (fraca)
$[\text{Cu}(\text{depy})](\text{ClO}_4)_2$	1620 (média)	1605 (fraca)	1445 (forte)	1100 (média)	1075 (forte) 620 (forte)	240 (fraca)
$[\text{Cu}(\text{apz-pn})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}^\#$	1650 (fraca)	1525 (fraca)	1480 (média)	1150 (forte)	1085 (forte) 625 (fraca)	240 (fraca)
$[\text{Cu}(\text{pyal-en})](\text{ClO}_4)^\#$	1656 (média)	1603 (fraca)	1446 (média)	1095 (forte)	1100 (forte) 631(fraca)	240 (fraca)

[#] Dados obtidos durante o Mestrado

Os complexos exibiram uma banda de intensidade média a fraca na região de 1620 cm^{-1} , correspondente ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{N}$ [113, 114, 122], além de bandas características a 1520 -1600, a ~ 1450 e a ~ 1100 , atribuídas a estiramento $\text{C}=\text{C}$, deformação CH_2 e estiramento $\text{C}-\text{N}$, respectivamente. As bandas em aproximadamente 1100 cm^{-1} e 620 cm^{-1} , de intensidade média a forte, revelam que o ânion ClO_4^- não está coordenado ao $\text{Cu}(\text{II})$, indicando um caráter iônico do perclorato nestes compostos [118, 123]. Observou-se uma banda a 240 cm^{-1} atribuída à vibração $\text{Cu}-\text{N}$, comum para os derivados piridínicos, entre $330 - 240 \text{ cm}^{-1}$ [123].

III.2.3. Medidas de Susceptibilidade Magnética

As medidas de susceptibilidade magnética foram efetuadas em uma balança Faraday Cahn, à temperatura ambiente e para calibração utilizou-se o composto tetra(tiocianato)cobaltato(II) de mercúrio, $\text{Hg}[\text{Co}(\text{CNS})_4]$, ($\chi = 16,44 \times 10^{-6}$ unidades cm^3/g a 20°C). Calculou-se o momento magnético efetivo (μ_{eff}) e determinou-se o n° de elétrons desemparelhados (n) considerando apenas a contribuição de spin [124].

Todos os complexos exibiram um comportamento paramagnético com um momento magnético efetivo próximo de $2,0\mu_B$, esperado para complexos mono nucleares de $\text{Cu}(\text{II})$ [125-126]. Entretanto, o complexo $[\text{Cu}(\text{dmbi})](\text{ClO}_4)_2$ exibiu um momento magnético efetivo muito mais baixo ($\mu_{\text{eff}} = 0,692\mu_B$), indicando alguma interação antiferromagnética no estado sólido. Este comportamento foi depois esclarecido através de medidas de EPR, mostrando tratar-se de duas espécies de cobre diferentes.

Tabela 4 - Momento magnético para os complexos diimínicos de Cobre(II) a temperatura ambiente.

<i>Composto</i>	μ_{eff} , B.M.
$[\text{Cu}(\text{dpbi})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,12
$[\text{Cu}(\text{dmbi})](\text{ClO}_4)_2$	0,692
$[\text{Cu}(\text{depy})](\text{ClO}_4)_2$	2,02
$[\text{Cu}(\text{apz-pn})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}^\#$	2,14
$[\text{Cu}(\text{pyal-en})](\text{ClO}_4)_2^\#$	2,01

[#] Dados obtidos durante o Mestrado

III.2.4. Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

Medidas de EPR foram também realizadas com o objetivo de avaliar a geometria de coordenação ao redor do íon cobre, que é também um importante fator na caracterização de complexos miméticos. O ciclo catalítico da enzima Cu_2Zn_2 SOD envolve um processo redox, alternando a forma reduzida Cu(I) e a forma oxidada Cu(II) . Isto requereria uma mudança conformacional reversível do sítio ativo de um arranjo quadrado planar, preferido por Cu(II) , para uma forma tetraédrica, mais adequada a Cu(I) [127]. Para evitar esta mudança e o correspondente dispêndio de energia, a configuração ao redor do metal no sítio ativo da enzima é melhor descrita como tetragonal com distorção tetraédrica, que nos modelos pode ser maior ou menor.

Essas medidas foram efetuadas com o composto no estado sólido e em solução metanol/água (4:1, v/v) a 70°K e a 300°K , utilizando-se tubo de quartzo Wilmad de 4 mm de diâmetro e amplitude de modulação 15 G. As constantes de interação hiperfina (A) e a absorção espectral (g) foram calculadas a partir dos espectros EPR, mostrados nas Figuras 3, 4 e 5, a fim de avaliar a distorção ao redor do íon cobre.

Figura 3 -Espectro EPR para o composto $[\text{Cu}(\text{dpbi})]^{2+}$ em solução metanol/água (4:1, v/v) 70°K . Potência 20,17 mW, frequência 9,438 GHz, frequência de modulação 100 KHz, amplitude de modulação 15 G e ganho $1,42 - 3,317 \times 10^4$.

Figura 4 -Espectro EPR para o composto $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ em solução metanol/água (4:1, v/v) 70°K. Potência 20,17 mW, frequência 9,438 GHz, frequência de modulação 100 KHz, amplitude de modulação 15 G e ganho $1,42 - 3,317 \times 10^4$.

Figura 5 - Espectro EPR para o composto $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$ em solução metanol/água (4:1, v/v), a $T = 70^\circ\text{K}$. Potência 20,17 mW, frequência 9,438 GHz, frequência de modulação 100 KHz, amplitude de modulação 15 G e ganho $1,42 - 3,317 \times 10^4$, a **pH 6,0**.

Figura 6 - Espectro EPR para o composto $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$ em solução metanol/água (4:1, v/v) $T = 70^\circ\text{K}$. Potência 20,17 mW, frequência 9,438 GHz, frequência de modulação 100 KHz, amplitude de modulação 15 G e ganho $1,42 - 3,317 \times 10^4$, a **pH 7,0**.

Observou-se uma simetria axial, com valores distintos para $g_{\parallel}$ e $g_{\perp}$, como mostram os dados da **Tabela 5**. Os valores de $g_{\parallel}/A_{\parallel}$ podem ser usados para estimar a extensão da distorção tetraédrica na geometria tetragonal ao redor do íon cobre(II), já que os valores de $g_{\parallel}$ são mais afetados por mudanças na geometria. Em geral complexos com valores entre 105 -145 apresentam uma configuração mais quadrado planar e aqueles com valores entre 135 -250, uma configuração mais tetraédrica [4].

Tabela 5 - Parâmetros EPR para os Complexos Diimínicos de Cobre(II) em metanol/água (4:1, v/v) 70°K.

Composto	Parâmetros EPR			
	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ (10^{-4}cm^{-1})	$g_{\parallel}/A_{\parallel}$ (cm)
[Cu(dpbi)](ClO ₄) ₂ ·H ₂ O	2.056	2.248	182	118
[Cu(dmbi)](ClO ₄) ₂	2.070	2.241	188	115
	(a pH=7,02)			
	2.070	2.235	193	111
		2.247	161	133
	(a pH = 6,00)			
[Cu(depy)](ClO ₄) ₂	2.060	2.218	188	114
[Cu(apz-pn)](ClO ₄) ₂ ·H ₂ O [#]	2,063	2,229	198	113
[Cu(pyal-en)](ClO ₄) [#]	2,058	2,218	190	117
Cu ₂ Zn ₂ SOD*	2,083	2,271	142	162

[#] em solução de acetonitrila, a 77°K

*Dados da referência [117]

Para comparação, os espectros dos compostos anteriormente estudados, [Cu(pyal-en)]²⁺ e [Cu(apz-pn)]²⁺, são mostrados na **Figura 7**.

Figura 7 – Espectros EPR dos compostos [Cu(pyal-en)]²⁺ e [Cu(apz-pn)]²⁺ em solução congelada de acetonitrila, a 77°K.

O complexo $[\text{Cu}(\text{dmbi})](\text{ClO}_4)_2$ mostrou um comportamento diferenciado, com dois centros diferentes de cobre ($g_{\parallel} = 2,235$ e $2,247$) no espectro EPR em soluções metanol-água, a $\text{pH} = 6,00$ e 77°K . Experimentos a diferentes pHs indicaram que ambas as espécies são observadas a $\text{pH} \leq 6,0$. Entretanto, a $\text{pH} \geq 6,3$ somente um sinal foi observado, atribuído à espécie caracterizada com $g_{\perp} = 2,070$; $g_{\parallel} = 2,241$ e $A_{\parallel} = 188,1$ G, como mostra a **Figura 8**.

Figura 8 - Espectro de solução saturada metanol/água 4:1, v/v a 77°K para o $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$, a diferentes pHs. Potência 20,17 mW, frequência 9,438 GHz, frequência de modulação 100 KHz, amplitude de modulação 15 G e ganho $1,42 - 3,317 \times 10^4$.

Estes dois diferentes sinais de cobre observados a pH mais baixo podem ser explicados devido a duas espécies presentes. Na síntese, dois complexos de cobre parecem ter sido obtidos: uma forma protonada e outra deprotonada envolvendo o anel imidazol, facilitando a interação entre elas em uma “cadeia polimérica”, similar a estruturas descritas na literatura com este tipo de ligante [128, 129]. Os outros compostos, ao contrário, exibiram espectros EPR e valores de μ_{eff} consistentes com um único centro de cobre isolado.

IV. Reatividade dos compostos diimínicos de cobre(II)

IV.1 Estudo da Atividade Mimética de Cu₂Zn₂ SOD

A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do ânion superóxido a oxigênio molecular (O₂) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) [117]. A reação pode ser representada pela **Equação 15**:

O peróxido de hidrogênio formado neste processo, in vivo, pode se desproporcionar para produzir O₂ e H₂O, numa reação catalisada pela catalase, ou pode ser utilizado na oxidação de diversos substratos, via enzimas peroxidases.

Entretanto, a reação de dismutação do radical superóxido é também catalisada por muitas espécies de metais de transição, num processo não enzimático. Complexos de cobre, ferro e manganês têm sido descritos como miméticos da SOD [115].

Os complexos de cobre parecem atuar na reação de dismutação do radical superóxido por sofrer oxidação e redução alternadas, facilmente mudando seu estado de oxidação de uma unidade (**Equações 16 e 17**). A enzima nativa apresenta um sítio ativo com estrutura distorcida, acomodando o cobre em ambos os estados de oxidação.

Estudos de compostos miméticos da superóxido dismutase são importantes para investigar a relação entre funções e estruturas da enzima, verificando como variações estruturais na vizinhança do metal podem influir na atividade biológica observada. A principal vantagem do uso de modelos é permitir facilmente mudanças de estrutura que na enzima nativa seriam muito mais difíceis de obter.

Além disso, estudos com compostos-modelos são interessantes do ponto de vista farmacológico, uma vez que estes compostos podem ter utilidades terapêuticas, atuando

como agentes antioxidantes ao desproporcionar radicais livres em reagentes menos reativos.

Devido à instabilidade do radical $O_2^{\cdot-}$, todos os ensaios da atividade SOD são indiretos, através de reações acopladas a captadores adequados, como no ensaio químico (método de redução do NBT).

A reação foi monitorada espectrofotometricamente e a partir das curvas de absorbância versus tempo de reação, calculou-se a porcentagem de redução do NBT^{2+} , comparando-se as velocidades iniciais para as diferentes concentrações dos complexos com aquela na sua ausência (branco).

A atividade SOD dos complexos tetracoordenados foi então comparada com aquelas de compostos miméticos, investigados durante o Mestrado, outros da literatura e a da própria enzima nativa, Cu_2,Zn_2 SOD. Os correspondentes valores de IC_{50} são mostrados na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Atividade SOD dos complexos de cobre(II) em estudo. Xantina $3,33 \times 10^{-4}$ M, xantina oxidase, $200\mu L$ diluídos em 10 mL de tampão fosfato pH 7,4, NBT^{2+} $3,82 \times 10^{-4}$ M, variando-se a concentração de cobre na faixa de 10^{-6} M a 10^{-9} M.

<i>Composto</i>	<i>$IC_{50}, \mu mol L^{-1}$</i>
Cu_2,Zn_2 SOD	0,00589/0,0143
$[Cu(apz-pn)](ClO_4)_2 \cdot H_2O$ [#]	0,0902
$[Cu(depy)](ClO_4)_2$	0,216
$[Cu(PuPhePy)](ClO_4)_2$ [*]	0,270 [*]
$[Cu(dpbi)](ClO_4)_2 \cdot H_2O$	0,431
$[Cu(pyal-en)](ClO_4)_2$ [#]	0,446
$[Cu(PuPy)] \cdot 0,5H_2O(ClO_4)_2$ [*]	0,603 [*]
$[Cu(dmbi)](ClO_4)_2$	1,44
$[Cu(Pu-6-MePy) \cdot H_2O](ClO_4)_2$ [*]	2,25

[#] Compostos já estudados durante o Mestrado [119]

^{*}Dados da referência [4]

Analisando os dados obtidos, podemos verificar que os novos complexos tetradentados, têm uma atividade SOD similar a dos compostos estudados anteriormente e a compostos descritos na literatura: $[\text{Cu}(\text{PuPy})] \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}(\text{ClO}_4)\text{N,N}'\text{-bis}(2\text{-piridil})\text{metileno-1,4-butanodiamina}$ e $[\text{Cu}(\text{PuPhePy})](\text{ClO}_4)_2 \text{N,N}'\text{-bis}(2\text{-piridil-fenil})\text{metileno-1,4-butanodiamina}$, sendo este último, considerado um dos melhores complexos miméticos da atividade SOD. Para comparação, o íon aqua apresenta um valor de IC_{50} de $\sim 30 \mu\text{M}$, enquanto o íon $[\text{Cu}(\text{o-phen})]^{2+}$ de $\sim 2 \mu\text{M}$.

Dentre os novos complexos, o $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ foi o mais ativo, embora com atividade menor que o do composto $[\text{Cu}(\text{apz-pn})]^{2+}$. Entretanto, no caso dos compostos $[\text{Cu}(\text{dpbi})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$, o íon $\text{Cu}(\text{II})$ está ligado a 2 átomos de nitrogênio da “Imina alifática” e a outros dois nitrogênios de grupos benzimidazol. O grupo substituinte fenil, no primeiro caso, ligado ao átomo de Nitrogênio na “imina” por uma ligação simples, apresenta efeito indutivo que aumenta sua densidade eletrônica, possibilitando que o ligante seja convertido em um ligante mais macio, quando comparado ao $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$, que possui os outros dois átomos de nitrogênio ligados ao grupos metil. A alta afinidade do íon $\text{Cu}(\text{II})$ macio por ligantes também macios [115b] aumenta a estabilidade deste complexo, quando comparado ao composto similar $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$, com uma atividade mimética SOD mais baixa.

IV.2. Lipofilicidade

Uma das possíveis razões para o melhor ou pior desempenho dos complexos de cobre estudados na atividade SOD poderia ser devida à sua maior ou menor lipofilicidade. Para avaliar esta hipótese, a interação dos complexos diimínicos de cobre(II) com membranas lipídicas foi então verificada. Determinou-se o valor do coeficiente de partição para cada complexo estudado pela diferença de sua solubilidade entre os solventes octanol e água, comparando-se os valores de K_p obtidos com dados similares da literatura [130]. O coeficiente de partição é uma medida apropriada para estimar tanto a lipofilicidade quanto a permeabilidade destas espécies na membrana, uma vez que as substâncias mais hidrofílicas migram pela membrana e não se acumulam nas membranas ou nos compartimentos lipofílicos [120]. Entretanto,

alguns autores como Schubert [131] enfatizam diferenças significativas entre interfaces octanol/água e membrana/água. Em contraste com a interface octanol/água, a interface membrana/água é muito maior, facilitando o acesso de um grande número de moléculas na fase aquosa. A interface octanol/água é permeável somente a substâncias neutras e as membranas, sendo carregadas, podem se ligar também a moléculas carregadas. Além disso, outro fator a ser considerado é que a assimetria da membrana não pode ser simulada pelo sistema octanol/água. Apesar destas ressalvas, o sistema octanol/água tem sido bastante utilizado para medidas relativas do tipo proposto [130].

A lipofilicidade dos complexos diimínicos de cobre, miméticos da Cu_2Zn_2 SOD, foi quantificada pela determinação do coeficiente de partição (K_p) na mistura octanol/água [130], empregando tampão fosfato 50mM a pH 7,4 como a fase aquosa. Esses coeficientes de partição octanol/água foram determinados por vigorosa mistura de soluções dos complexos de cobre, aproximadamente 2 a 4 μM em tampão fosfato, com o mesmo volume de octanol, mantendo-se a mistura a 24°C por mais de 5 horas, para assegurar que o equilíbrio de partição fosse alcançado. Os dados obtidos estão na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Coeficiente de partição (K_p) para os complexos diimínicos de cobre em sistemas octanol/água usando como fase aquosa, tampão fosfato 50 mM e temperatura 24°C.

<i>Complexos de Cobre</i>	<i>Coeficiente de partição, K_p</i>
$[\text{CuPuPhePy}](\text{ClO}_4)_2^*$	0,14
$[\text{Cu}(\text{pyal-en})](\text{ClO}_4)_2$	0,22
$[\text{Cu}(\text{depy})](\text{ClO}_4)_2$	0,24
$[\text{Cu}(\text{apz-pn})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,28
$[\text{CuPuPy}](\text{ClO}_4)_2 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}^*$	0,70
$[\text{Cu}(\text{dpbi})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,36
$[\text{Cu}(\text{dmbi})](\text{ClO}_4)_2$	3,47

*Dados da referência [130]

A concentração do cobre da fase aquosa e não aquosa foi medida por Espectrometria de Emissão Atômica, num instrumento ICP-AES, Spectroflame – Spectro, onde:

$$[\text{Cu}]_{\text{fase não aquosa}} = [\text{Cu}]_{\text{fase aquosa antes da mistura}} - [\text{Cu}]_{\text{fase aquosa depois da mistura}} \quad (18)$$

$$K_p = \frac{[\text{Cu}]_{\text{fase não aquosa}}}{[\text{Cu}]_{\text{fase aquosa}}} \quad (19)$$

Os coeficientes de partição dos complexos sintetizados foram comparados com aqueles compostos da literatura também miméticos da SOD. O composto $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ apresentou um coeficiente de partição baixo, próximo ao valor obtido para o $[\text{CuPuPhePy}]^{2+}$ [130], sendo provavelmente, dentre os estudados, o menos solúvel em membranas. Ambas estas espécies são bons miméticos da SOD. O composto $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$, com um valor bem mais alto, possivelmente é o mais solúvel em membranas e apresentou atividade SOD mais baixa. Entretanto o composto $[\text{Cu}(\text{apz-pn})]^{2+}$, o melhor mimético dentre eles, não apresentou um coeficiente de partição muito baixo, isto é, parece ser mais lipofílico que $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ ou $[\text{Cu}(\text{PuPhePy})]^{2+}$. Apesar dessas incoerências, a menor lipofilicidade parece favorecer a atividade SOD, isto é, os complexos mais ativos são os menos lipofílicos (ou mais hidrofílicos), ou seja, os que apresentam os coeficientes de partição mais baixos.

IV.3. Geração de Radicais Hidroxil

Apesar de bons miméticos da SOD, apresentando portanto propriedades antioxidantes, os compostos diimínicos de cobre estudados também mostraram boa capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio, relacionadas a propriedades pró-oxidantes. Verificamos então essas suas propriedades pró-oxidantes, uma vez que

compostos-modelos em contraste às proteínas, usualmente exibem ambos os tipos de atividade em magnitudes comparáveis.

A presença de radicais hidroxil na reação de decomposição do peróxido de hidrogênio catalisada por estes complexos diimínicos de cobre(II) foi investigada por EPR através do método de captador de spin [103]. DMPO (5,5'-dimetil-pirrolina-N-óxido) foi usado como captador, depois de purificado por métodos recomendados [104, 105a].

Para todos os compostos estudados, os espectros EPR dos adutos DMPO-OH, gerados durante a reação com peróxido de hidrogênio, foram registrados utilizando-se $[\text{CuL}] = 40\mu\text{M}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,52\text{ mM}$ e $[\text{DMPO}] = 0,10\text{ M}$, em tampão fosfato 50 mM, a pH = 7,4. As respectivas concentrações de adutos formados foram obtidas dos espectros correspondentes, por integração dupla, usando soluções de tempol 38,2 μM para calibração.

Observou-se que em todos os sistemas $\text{CuL}/\text{H}_2\text{O}_2$ ocorreu a formação de aduto DMPO-OH, com valores característicos das constantes hiperfinas $a_N = a_H = 1,49\text{ mT}$ [105b]. Para este tipo de reatividade, o composto $[\text{Cu}(\text{apz-pn})]^{2+}$ foi o mais ativo, gerando maior concentração do aduto DMPO-OH. A **Figura 9** e **Tabela 8** mostram estes resultados.

Figura 9 - Espectro EPR do aduto DMPO-OH obtido das soluções dos complexos de cobre(II), 40 μ M, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,52 \text{ mM}$ e $[\text{DMPO-OH}] = 0,10 \text{ M}$ em tampão fosfato 50 mM, pH = 7,4.

A – $[\text{Cu}(\text{apz-pn})]^{2+}$, Ganho = $1,12 \times 10^6$

B – $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$, Ganho = $2,52 \times 10^6$

C – $[\text{Cu}(\text{dpbi})]^{2+}$, Ganho = $2,52 \times 10^6$

D – $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$, Ganho = $2,52 \times 10^6$

E – $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$, Ganho = $3,99 \times 10^6$

As concentrações de adutos DMPO-OH obtidas a partir da integração dupla dos sinais, estão na **Tabela 8**, comparadas ao obtido com o composto aqua, $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$.

Tabela 8 - Formação do aduto DMPO-OH para os compostos dimínicos de cobre(II) na presença de $\text{H}_2\text{O}_2 = 1,52 \times 10^{-3}\text{M}$, em tampão fosfato 50 mM pH 7,4, $T = 25^\circ\text{C}$ após 10 minutos de reação, $G = 2,52 \times 10^6$.

<i>Compostos de Cobre</i>	<i>[CuL], μM</i>	<i>[DMPO-OH], μM</i>
[Cu(apz-pn)](ClO_4) ₂ ·H ₂ O	42,7	2,48
[Cu(H ₂ O) ₄](SO ₄) ₂	51,0	1,01
[Cu(depy)](ClO_4) ₂	40,8	0,758
[Cu(dpbi)](ClO_4) ₂ ·H ₂ O	38,8	0,610
[Cu(dmbi)](ClO_4) ₂	40,0	0,255
[Cu(pyal-en)](ClO_4) ₂	47,9	0,206

Para comprovar que os radicais hidroxil são formados por etapas redox entre os complexos de cobre(II) e o peróxido de hidrogênio, em uma reatividade do tipo Fenton, adicionou-se dimetilsulfóxido ao meio reacional, proporcionando reações competitivas de captadores de spin pelo radical hidroxil:

Se as etapas (21) e (24), envolvendo radicais $\cdot\text{OH}$ "livres", ocorrerem no sistema, a relação do sinal do aduto DMPO-OH em presença e na ausência do DMSO deverá ser igual à relação entre as constantes cinéticas das etapas (22) e (24). Outra possibilidade,

dependente de superóxido, envolveria a etapa (23) e a subsequente hidrólise do aduto DMPO-O₂^{•-} gerando o aduto DMPO-OH.

Observou-se ainda a formação do radical DMPO-metil, com $a_H = 22,9G$ e $a_N = 15,5G$ após a adição de dimetilsulfóxido, como mostra a **Figura 10**, confirmando a formação dos radicais hidroxil livres gerados pela etapa redox entre os complexos de cobre(II) e o peróxido de hidrogênio.

Figura 10 - Espectro EPR dos adutos DMPO-OH (asterístico) e do DMPO-metil para $[Cu(apz-pn)]^{2+}$ 47 μM , $[H_2O_2] = 1,50 \mu M$, $[DMPO] = 0,10 M$ e $[DMSO] = 0,028 M$.

Em reações deste tipo é esperado para a razão: K_{DMSO}/K_{DMPO} aproximadamente 1,6 :1, obtendo-se para o composto em estudo mais reativo, $[Cu(apz-pn)]^{2+}$, o valor de 1,2-1,3 : 1, calculado pela **Equação 25**:

$$k_{DMSO}/k_{DMPO} = \frac{[DMPO] ([DMPO-OH]_0 - [DMPO-OH])}{[DMSO][DMPO-OH]} \quad (25)$$

onde: k_{DMSO} e k_{DMPO} são as constantes de velocidade para a reação do radical hidroxil com DMSO e com DMPO, respectivamente e $[DMPO-OH]_0$ é a quantidade de aduto formado na ausência de DMSO e $[DMPO-OH]$, na presença de DMSO [133].

Portanto, no caso do composto $[\text{Cu}(\text{apz-pn})]^{2+}$, parece que a reação ocorre via mecanismo de radicais livres.

No caso da própria enzima Cu_2Zn_2 SOD, uma espécie $[\text{LCu}(\cdot\text{OH})]^{2+}$ foi proposto anteriormente por Hodgson e Fridovich [134] como responsável pela sua atividade peroxidásica, observada inicialmente apenas a pH alcalino, e que levaria à sua inativação, com oxidação de um resíduo de histidina (His-118) no sítio ativo [135]. Posteriormente, estudos desta atividade a pH fisiológico, através de experimentos de EPR pelo método do captador de spin, mostraram a obtenção de grandes quantidades do aduto DMPO-OH , interpretado como resultante da formação de radicais livres $\cdot\text{OH}$ [136, 137]. Porém, estudos ainda mais recentes verificaram que este efeito só era observado em presença de íons bicarbonato, já que todos os estudos por EPR usavam tampão bicarbonato [138].

Kalyanaraman e colab. mostraram que este efeito do bicarbonato, aumentando a atividade peroxidásica da enzima, era observado com outros substratos, como ABTS, nitrito, lipídios insaturados ou γ -tocoferol, e que era devido à formação de radicais livres carbonato, $\text{CO}_3^{\cdot-}$ [139]. A espécie $[\text{LCu}(\cdot\text{OH})]^{2+}$ oxidaria íons bicarbonato a radicais carbonato e estes, por sua vez, oxidariam outros substratos.

Entretanto, posteriormente, usando água isotopicamente marcada, H_2^{17}O , foi mostrado que radicais carbonato eram capazes de oxidar o captador DMPO ao correspondente cátion radical, que por adição de água originavam o aduto $\text{DMPO-}^{17}\text{OH}$, na mesma proporção isotópica (43%) que a água usada como reagente (45%) [140]. A formação de radicais carbonato, a partir da oxidação de bicarbonato pela espécie $[\text{LCu}(\cdot\text{OH})]^{2+}$, explicaria além da hidroxilação do DMPO, a nitração da tirosina, em presença de nitrito, e a oxidação do ABTS a $\text{ABTS}^{\cdot+}$:

IV.4. Atividade Catalítica na Decomposição do Peroxinitrito

O peroxinitrito, poderoso oxidante, formado pela rápida reação entre o óxido nítrico e o ânion superóxido ($k_2 = 6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [141], em tecidos ou células que simultaneamente geram estes radicais, pode ser tanto o maior agente patogênico em doenças associadas com o stress oxidativo [132], como um agente microbicida natural [142, 143, 144, 70], que reage por um mecanismo relativamente complexo, cuja natureza está sendo intensivamente debatida [145].

O ânion peroxinitrito é relativamente estável, mas protonado ou na presença de um ácido de Lewis [146, 147, 148], incluindo CO_2 e alguns complexos metálicos de transição, oxida moléculas susceptíveis por processos de um e/ou dois elétrons e, na ausência de reagentes oxidáveis, decompõe-se rapidamente para formar nitrato como um produto estável em meio ácido [60, 69].

Os experimentos cinéticos foram executados em um espectrofotômetro *stopped-flow* (Applied Photophysics, SX. 18 MV) a $(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$. As reações dos complexos diimínicos de cobre(II), na faixa de 50 a 150 μM , com o peroxinitrito em excesso (600 μM), foram realizadas em condições de pseudo-primeira ordem. Em todos os experimentos o peroxinitrito, diluído em água deionizada, foi adicionado aos complexos diimínicos de cobre(II), dissolvidos em tampão fosfato 100 mM. A decomposição do peroxinitrito foi monitorada a 302 nm, como descrito previamente, pela mistura de volumes iguais de peroxinitrito e soluções de cobre. As curvas cinéticas foram obtidas pela média de 10 determinações independentes. O pH da reação foi medido antes e depois de cada reação.

A decomposição do ONOO^- , altamente dependente do pH ($p_K = 6,6$) [60], foi monitorada entre 5,8 a 8,2 como mostra a **Figura 11**.

Figura 11 – Dependência do pH na decomposição do peroxinitrito 600 μ M, catalisada por complexos diimínicos de cobre(II) 50 μ M e temperatura (25,0 $\pm$ 0,2) $^{\circ}$ C.

Verificou-se, ainda, o efeito da variação da concentração dos complexos diimínicos de cobre(II) em estudo, na decomposição do peroxinitrito 600 μ M, a diferentes pHs. Estes resultados estão nas **Figuras 12, 13, 14, 15 e 16**.

Figura 12 - Efeito da concentração do $[\text{Cu(pyal-en)}]^{2+}$, na decomposição do peroxinitrito $600 \mu\text{M}$, a $(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, a diferentes pHs.

Figura 13 - Efeito da concentração do $[\text{Cu(apz-pn)}]^{2+}$, na decomposição do peroxinitrito $600 \mu\text{M}$, a $(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, a diferentes pHs.

Figura 14 - Efeito da concentração do $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$, na decomposição do peroxinitrito $600 \mu\text{M}$ a $(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, a diferentes pHs.

Figura 15 - Efeito da concentração do $[\text{Cu}(\text{dmibi})]^{2+}$, na decomposição do peroxinitrito $600 \mu\text{M}$, a $(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, a diferentes pHs.

Figura 16 - Efeito da concentração do $[\text{Cu}(\text{dpbi})]^{2+}$, na decomposição do peroxinitrito $600 \mu\text{M}$, a $(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, a diferentes pHs.

As curvas cinéticas obtidas, indicam uma atividade catalítica moderada apenas para alguns dos complexos diimínicos de cobre(II) em estudo, no intervalo de pH estudado. O composto $[\text{Cu}(\text{pyal-en})](\text{ClO}_4)_2$ exibiu uma atividade catalítica em toda a faixa de pH estudada, com um valor máximo de $k_{\text{obs}} = 1,68 \text{ s}^{-1}$ a $\text{pH} = 6,3$, e valores de $k_{\text{obs}} = 0,64$ e $0,59 \text{ s}^{-1}$, a $\text{pH} 7,0$ e $7,4$, respectivamente. A atividade do composto $[\text{Cu}(\text{apz-pn})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ foi menor, com $k_{\text{obs}} = 1,27 \text{ s}^{-1}$ a $\text{pH} = 6,0$ e $0,48 \text{ s}^{-1}$ a $\text{pH} = 7,0$. Para os compostos $[\text{Cu}(\text{depy})](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Cu}(\text{dmbl})](\text{ClO}_4)_2$ e $[\text{Cu}(\text{dpbi})](\text{ClO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$, nenhum efeito significativo foi verificado. O perfil de pH para as diferentes espécies $[\text{CuL}]$ está nas **Figura 11, 12, 13, 14, 15 e 16 e Tabela 9**. A **Tabela 10**, mostra as constantes de velocidade de segunda ordem para os complexos $[\text{Cu}(\text{pyal-en})](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Cu}(\text{apz-pn})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}(\text{depy})](\text{ClO}_4)_2$ e na ausência dos compostos.

Tabela 9 – Valores de k_{obs} (s^{-1}) obtidos para os compostos diimínicos de Cu(II) a ($25 \pm 0,2$)°C, $[ONOO^-] = 600 \mu M$, a diferentes pHs.

Compostos								
pH	k_{obs}, s^{-1}						Ligante dmbi	Comp. X [#]
	Ausência CuL	[CuL], L = pyal-en	[CuL], L = apz-pn	[CuL], L = depy	[CuL], L = dpbi	[CuL], L = dmbi		
6,0	1,00 ± 0,14	1,61 ± 0,13	1,27 ± 0,20	0,90 ± 0,12	0,89 ± 0,16			0,87
6,28	0,88 ± 0,22		1,03 ± 0,19				0,88 ± 0,11	
6,31	0,98 ± 0,13	1,68 ± 0,18	1,12 ± 0,11	0,96 ± 0,16	0,71 ± 0,21			
6,5	1,36 ± 0,30	1,61 ± 0,21				0,99 ± 0,17		
7,06	0,53 ± 0,16	0,64 ± 0,12	0,48 ± 0,12					
7,22	0,43 ± 0,23				0,47 ± 0,20			
7,28	0,42 ± 0,13		0,58 ± 0,19				0,35 ± 0,10	0,44
7,39		0,59 ± 0,11		0,39 ± 0,15		0,36 ± 0,21		
7,5								0,33
7,74	0,30 ± 0,12		0,13 ± 0,09	0,34 ± 0,16				

[#] X = $[Cu^{II}(o\text{-phen})(\text{serina})]^+$, ref. [19]

Tabela 10 - Valores da k de segunda ordem ($M^{-1}s^{-1}$) obtidos para os compostos, $[Cu(pyal-en)](ClO_4)_2$, $[Cu(apz-pn)](ClO_4)_2 \cdot H_2O$ e $[Cu(depy)](ClO_4)_2$ e na ausência dos compostos a $(25^\circ \pm 0,2)^\circ C$, $[ONOO^-] = 600 \mu M$ e diferentes pHs.

Compostos				
$k, M^{-1}s^{-1}$				
pH	Ausência de cobre	$[Cu(pyal-en)]^{2+}$	$[Cu(apz-pn)]^{2+}$	$[Cu(depy)]^{2+}$
6,0	$1,67 \times 10^3 \pm 0,14$	$2,68 \times 10^3 \pm 0,13$	$2,12 \times 10^3 \pm 0,13$	$1,50 \times 10^3 \pm 0,12$
6,31	$1,36 \times 10^3 \pm 0,13$	$2,80 \times 10^3 \pm 0,18$	$1,87 \times 10^3 \pm 0,13$	
7,22	$0,72 \times 10^3 \pm 0,23$			$1,60 \times 10^3 \pm 0,16$
7,28	$0,70 \times 10^3 \pm 0,13$		$0,97 \times 10^3 \pm 0,13$	
7,39		$0,98 \times 10^3 \pm 0,11$		$0,65 \times 10^3 \pm 0,15$

Já a decomposição do peroxinitrito frente ao ligante diimínico, diacetilaminometilbenzimidazol, uma inibição bem mais acentuada do que para os compostos metalados foi verificada, mostrando que só o ligante não justifica o processo catalítico (vide Fig.11). Este ligante foi isolado e caracterizado com boa pureza (95-97%), antes da etapa de metalação.

Quanto à dependência com o catalisador, observou-se uma variação hiperbólica da velocidade de reação com o aumento da concentração dos complexos, seguida por uma dependência linear, no caso dos compostos mais reativos, $[Cu(pyal-en)]^{2+}$ e $[Cu(apz-pn)]^{2+}$ (vide Fig12 e 13). Nos demais casos, a constante de velocidade é praticamente independente da concentração do complexo, em toda a faixa de pH estudada.

Os resultados obtidos podem ser explicados pelo mecanismo envolvendo a coordenação do peroxinitrito ao centro metálico como quinto ligante, em uma etapa competitiva com íons H^+ , facilitando as transferências redox. Etapas análogas têm sido propostas para a catálise de reações do peroxinitrito com porfirinas de ferro e manganês, porém formando nestes casos espécies de alto estado de oxidação [149-151]. O catalisador poderia ativar o peroxinitrito similarmente ao H^+ , embora em uma menor extensão:

As etapas (36) e (37) explicariam o efeito catalítico, através da estabilização da espécie ativa $[\text{LCu}(\cdot\text{OH})]^{2+}$, competindo com a etapa (33b). Este efeito é moderado, uma vez que nessa etapa o mecanismo radicalar representa apenas 30-35% da decomposição do peroxinitrito.

IV.4.1. Efeito do CO₂ na decomposição do ONOO⁻

Os efeitos biológicos do peroxinitrito têm sido recentemente considerados bastante dependentes da sua reação com o dióxido de carbono, uma vez que em compartimentos intra e extracelulares a concentração do CO₂ é de aproximadamente 1,0 mM e a constante de velocidade para esta reação é $k = 5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [152]. É tão rápida que os seqüestradores biológicos precisariam estar presentes a níveis muito altos, próximos a níveis tóxicos, para competir com o ONOO⁻ e o CO₂. Entretanto, a níveis fisiológicos de bicarbonato, somente um número limitado de biomoléculas reage diretamente com o ONOO⁻, são eles: proteínas contendo o grupo heme, peroxidases (mieloperoxidase), seleno-proteínas (glutathione peroxidase).

O ânion ONOO⁻ reage rapidamente com o CO₂, formando um aduto, nitrosoperoxocarbonato, (ONOOOCO₂⁻), onde grande parte da reatividade biológica do peroxinitrito é atribuída à formação desta espécie. Na ausência de substratos, o aduto ONOOOCO₂⁻ se decompõe a nitrato e dióxido de carbono, mas na sua presença, uma fração do aduto (~35%) pode participar de oxidações e nitrações de aromáticos, provavelmente por homólise a dióxido de nitrogênio e ao radical carbonato, CO₃^{•-} [84]. A participação do radical carbonato na oxidação de substratos foi inferida da reatividade do peroxinitrito com íons inorgânicos na presença de dióxido de carbono. [60,86]. A decomposição do peroxinitrito na presença de dióxido de carbono/bicarbonato e [Cu(pyal-en)]²⁺ foi estudada por “stopped-flow”, monitorada a 302 nm, com um tempo de mistura menor que 2 ms. A cinética da reação foi estudada variando-se o pH de 6,0 a 8,25, em tampão fosfato 100 mM e (25,0 ± 0,2)°C, variando a concentração do bicarbonato total de 0 a 22,2 mM, em presença de peroxinitrito 600 μM. As constantes de velocidade para as reações de pseudo-primeira ordem foram obtidas a partir de uma média de 7 experimentos independentes. A decomposição do peroxinitrito na presença de NaHCO₃ parece ser máxima a pH ~ 6,2, como mostra a **Figura 17**. Este valor é similar a aqueles obtidos por outros autores no intervalo de pH 6,2 - 6,5 [153, 87]. Estes valores são consistentes com a velocidade limitante da reação entre o ânion peroxinitrito (pK_a = 6,6) e o dióxido de carbono (pK_a aparente = 6,4) [154] para produzir o aduto nitrosoperoxocarbonato, cuja homólise poderia gerar o radical carbonato.

Figura 17 - Dependência do pH no estudo do efeito do CO_2 na decomposição do peroxinitrito $600 \mu M$, $[HCO_3^-]$ $4,43 \text{ mM}$, $T = (25,0 \pm 0,2)^\circ C$.

Estudou-se o efeito da decomposição do peroxinitrito em diferentes pHs e diferentes concentrações de CO_2 em equilíbrio, como mostram as **Figuras 18, 19 e 20**, a seguir.

Figura 18 - Decomposição do peroxinitrito na presença de diferentes concentrações de CO₂ em equilíbrio, para alguns complexos de cobre a pH 6,25 ± 0,15, [ONOO⁻] = 600 μM, [CuL] = 50 μM, T = (25,0 ± 0,2)°C.

Figura 19 - Decomposição do peroxinitrito na presença de diferentes concentrações de CO₂ em equilíbrio, para alguns complexos de cobre a pH 6,75 ± 0,06, [ONOO⁻] = 600 μM, [CuL] = 50 μM, T = (25,0 ± 0,2)°C.

Figura 20 - Decomposição do peroxinitrito na presença de diferentes concentrações de CO₂ em equilíbrio, para alguns complexos de cobre a pH 7,65 ± 0,20, [ONOO⁻] = 600 μM, [CuL] = 50 μM, T = (25,0 ± 0,2)° C.

No estudo cinético da decomposição do peroxinitrito, na presença de bicarbonato, observou-se um efeito adicional a pH 6,25 para o composto [Cu(pyal-en)]²⁺, usado como catalisador. Entretanto a pH mais alto (7,67), isto é, concentrações de CO₂ mais baixas, o composto [Cu(depy)]²⁺ foi quem exibiu uma maior atividade catalítica, resultado este observado na decomposição do peroxinitrito por este composto na ausência de bicarbonato/carbonato.

A função para o radical carbonato em processos mediados pelo peroxinitrito foi inicialmente sugerida por Radi e coautores [149], demonstrando que o bicarbonato aumenta significativamente a quimioluminescência iniciada pelo peroxinitrito. Utilizando espectroscopia EPR, Augusto e colab. mediram a formação do radical CO₃^{•-} com um rendimento próximo ao quantitativo, do aduto ONOOCO₂⁻ [85, 150], baseado nos produtos de oxidação das suas reações indiretas. Goldstein e Czapski [86] estabeleceram que a forma reativa do aduto, ONOOCO₂⁻, tem propriedades e reatividade química consistente com as dos radicais [•]NO₂/CO₃^{•-}. Verificaram também que o rendimento do produto das oxidações indiretas por um elétron pelo aduto diminui significativamente com o aumento da viscosidade do meio, consistente com um mecanismo radicalar [151]. Mais recentemente, os radicais [•]NO₂ e CO₃^{•-} foram admitidos como únicos intermediários observáveis na reação de ONOO⁻ com CO₂ [155]. O aduto ONOO-CO₂ teria uma meia-vida < 0,5 ms, não se acumulando no sistema.

IV.5. Atividade Catalítica na Nitração de Compostos Aromáticos, dependente do Peroxinitrito

O peroxinitrito é um oxidante versátil que provavelmente media os efeitos tóxicos do óxido nítrico (NO) [152]. O óxido nítrico sozinho não oxida biomoléculas ou causa a nitração de anéis aromáticos, mas provavelmente está envolvido em intermediários do peroxinitrito, que reage com todas as classes de biomoléculas, incluindo lipídios, proteínas, DNA, tióis e antioxidantes de baixo peso molecular, como ascorbato. Seu comportamento cinético é interessante e complexo.

A nitração de resíduos de tirosina pode alterar a fosforilação/defosforilação das proteínas um importante aspecto regulador da transdução de sinal [156]. Em muitos casos, a contribuição do peroxinitrito em doenças, tem sido inferida por detecção dos nitrocompostos em tecidos lesados [157]. Inicialmente a nitração de resíduos de tirosina a pHs neutros era considerada dependente da formação do peroxinitrito. Mais recentemente tem sido demonstrado que outros mecanismos são possíveis tais como a oxidação do nitrito pelo ácido hipocloroso e por enzimas peroxidases [158, 159] e a união do óxido nítrico com radicais tirosil da proteína, seguida por oxidações a 3-nitrotirosina [160]. Ainda, baixos rendimentos do 3-nitrotirosina obtidos pelo fluxo de peroxinitrito, produzido a partir dos doadores de óxido nítrico e geradores de radicais superóxido, indicam que o peroxinitrito é um agente nitrante fisiológico importante [161]. Entretanto, sistemas enzimáticos geradores de radicais superóxidos, são dependentes de substratos que reagem com o peroxinitrito, tais como o ácido úrico [162] e o acetaldeído [163]. Diversos microambientes também podem afetar a nitração mediada por peroxinitrito, evidenciado por nitrações preferenciais de alguns resíduos de tirosina em proteínas [164, 165, 166] e pela nitração de moléculas de γ -tocoferol presentes em partículas de LDL por SIN-1, 5-amino-3-(4-morfolinil)-1,2,3-oxadiazolio, [166] que se auto-oxidam produzindo fluxos de óxido nítrico e ânion superóxido [167].

As nitrações mediadas por peroxinitrito podem ser catalisadas por ácidos de Lewis, incluindo, CO_2 , [168], $[\text{Fe}(\text{edta})]^+$, [153], Cu_2Zn_2 SOD [154], complexos porfirínicos de manganês [169] e complexos de cobre(II) [170]. Entretanto, na ausência

de catalisadores, a nitração ocorre via formação do ácido peroxinitroso, ONOOH , e não ocorre em concentrações de íons H^+ baixas ($\text{pH} > 9$) [149].

Neste estudo, verificamos se os compostos diimínicos de cobre(II) catalisam também reações de nitração do 4-hidroxifenilacetato (4-HPA), pelo peroxinitrito, monitorando-se as eventuais reações através da técnica de cinética rápida, com acompanhamento espectrofotométrico da formação do composto nitrado. Os experimentos cinéticos foram executados em um espectrofotômetro stopped-flow (Applied Photophysics SX. 18 MV) a $(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$. Investigamos reações de nitração catalisada por $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$, que apresentou uma maior atividade catalítica na decomposição do peroxinitrito, e para o $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$, que mostrou uma inibição para pHs mais baixos e uma atividade catalítica moderada, a pH mais alto. As concentrações usadas foram na faixa de 50 a 150 μM para os complexos, com o peroxinitrito em excesso (600 μM), em condições de pseudo-primeira ordem. O peroxinitrito diluído em água deionizada foi adicionado aos complexos diimínicos de cobre(II), dissolvidos em tampão fosfato 250 mM. A nitração foi monitorada a 430 nm [152], após mistura de volumes iguais de peroxinitrito e soluções de cobre com o substrato 4-HPA. As curvas cinéticas foram obtidas pela média de 10 determinações independentes e o pH da reação foi medido antes e depois de cada reação. A nitração do 4-HPA foi monitorada entre pH 5,8-7,5, como mostra a **Figura 21**.

Figura 21 - Dependência de pH para a nitração do 4-HPA, 5 mM, mediada por ONOO⁻, 600 μM catalisada por [Cu(pyal-en)]²⁺ e [Cu(depy)]²⁺ 100 μM, em tampão fosfato 250 mM, T = (25,0 ± 0,2)° C.

Verificamos também o efeito da variação da concentração do complexo diimínico de cobre(II) em estudo, [Cu(pyal-en)]²⁺, na nitração do 4-HPA, mediada por peroxinitrito, 600 μM, a diferentes pHs. Veja **Figura 22**.

Figura 22 - Efeito da concentração do [Cu(pyal-en)]²⁺ 100 μM, na nitração do 4-HPA, 5 mM, mediada pelo peroxinitrito, 600 μM, a (25 ± 0,2)° C a diferentes pHs.

Os dados obtidos para a constante de velocidade da reação de nitração dependente do pH, apresenta um k_{obs} máximo em pH ~ 6,0, similar a valores obtidos por outros autores, com outros complexos, e um ponto de inflexão em pH acima de 6,5 [149]. Os valores das constantes de velocidade observados para essas reações são similares a aqueles observados para o decaimento do peroxinitrito, em toda faixa de pH estudado. Uma atividade catalítica moderada foi observada para o $[Cu(pyal-en)]^{2+}$ e o $[Cu(depy)]^{2+}$, mostrando um efeito mais acentuado entre pH 6,0 – 6,5 para o primeiro composto, como mostram os dados da **Tabela 11**. A **Tabela 12** mostra as constantes de velocidade de segunda ordem para a reação de nitração do 4-HPA, na ausência e na presença dos compostos $[Cu(pyal-en)]^{2+}$ e $[Cu(depy)]^{2+}$.

Em ambos os casos, observou-se uma dependência hiperbólica seguida por uma dependência linear da velocidade de reação com o aumento da concentração dos complexos.

Tabela 11 – Valores de k_{obs} (s^{-1}) obtidos para a nitração do 4-HPA, catalisada pelo $[Cu(pyal-en)]^{2+}$ e $[Cu(depy)]^{2+}$ a $(25 \pm 0,2)^{\circ}C$, $[ONOO^{-}] = 600 \mu M$, a diferentes pHs.

<i>Sistema Reacional</i>				
k_{obs}, s^{-1}				
PH	T/ $ONOO^{-}$ decomposição	T/ $ONOO^{-}$ /4-HPA nitração	T/ $ONOO^{-}$ /4-HPA/ $[Cu(pyal-en)]^{2+}$	T/ $ONOO^{-}$ /4-HPA/ $[Cu(depy)]^{2+}$
6,0	$1,00 \pm 0,14$	$0,70 \pm 0,18$	$1,00 \pm 0,21$	$0,71 \pm 0,11$
6,15		$0,68 \pm 0,21$		
6,19			$0,99 \pm 0,10$	
6,28	$0,88 \pm 0,22$	$0,90 \pm 0,10$		
6,31	$0,98 \pm 0,13$		$0,97 \pm 0,21$	
6,5	$1,36 \pm 0,30$			$0,72 \pm 0,09$
6,80		$0,54 \pm 0,18$		
7,06	$0,53 \pm 0,16$		$0,58 \pm 0,10$	$0,55 \pm 0,12$
7,22		$0,39 \pm 0,11$	$0,64 \pm 0,11$	
7,28	$0,42 \pm 0,13$			
7,44	$0,34 \pm 0,30$	$0,16 \pm 0,16$	$0,54 \pm 0,12$	$0,44 \pm 0,10$

Tabela 12 - Valores da k de segunda ordem ($M^{-1}s^{-1}$) obtidos para a nitração do 4-HPA, catalisada pelo $[Cu(pyal-en)]^{2+}$ e $[Cu(depy)]^{2+}$ a $(25 \pm 0,2)^{\circ}C$, $[ONOO^{-}] = 600 \mu M$, a diferentes pHs.

<i>Sistema Reacional</i>			
$k, M^{-1}s^{-1}$			
pH	T/ $ONOO^{-}$ /4-HPA	T/ $ONOO^{-}$ /4-HPA/ $[Cu(pyal-en)]^{2+}$	T/ $ONOO^{-}$ /4-HPA/ $[Cu(depy)]^{2+}$
6,0	$1,17 \times 10^3 \pm 0,18$	$1,67 \times 10^3 \pm 0,21$	$1,18 \times 10^3 \pm 0,11$
6,28	$1,50 \times 10^3 \pm 0,10$		
6,31		$1,62 \times 10^3 \pm 0,21$	
6,5			$1,20 \times 10^3 \pm 0,09$
6,80	$0,90 \times 10^3 \pm 0,18$		
7,06		$0,97 \times 10^3 \pm 0,10$	$0,92 \times 10^3 \pm 0,12$

IV.5.1. Efeito do Dióxido de Carbono na Nitração de Compostos Aromáticos, catalisada por Complexos Diimínicos de Cobre(II) dependente do Peroxinitrito

A reação do peroxinitrito com o dióxido de carbono representa uma das maiores rotas da atividade do peroxinitrito in vivo, devido à alta concentração intra e extracelular de CO_2 e à formação do aduto $ONOCO_2^{-}$, que na presença de moléculas alvo, promove reações de oxidação e de nitração. Em geral, o rendimento das reações de nitração é mais alto na presença de dióxido de carbono por um fator de aproximadamente 2 [171]. Assim, muitas das reações do $ONOO^{-}$ in vivo são provavelmente mediadas pelos intermediários reativos derivados da reação do $ONOO^{-}$ com o CO_2 do que pelo próprio peroxinitrito.

Esses experimentos foram executados, também por cinética rápida, stopped-flow com o $[Cu(pyal-en)]^{2+}$ 100 μM , na presença de peroxinitrito 600 μM e 4-HPA 5 mM, em tampão fosfato 250 mM, a $(25,0 \pm 0,2)^{\circ}C$ em presença de várias concentrações de bicarbonato/dióxido de carbono, como mostra a **Figura 23**.

Figura 23 – Efeito do Dióxido de Carbono, na nitração do 4-HPA, 5,0 mM, catalisada por $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ 100 μM , mediada por $[\text{ONOO}^-]$ 600 μM , em tampão fosfato 250 mM, a $(25 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ a várias concentrações de bicarbonato/dióxido de carbono.

A **Figura 24** mostra o efeito do dióxido de carbono na nitração do 4-HPA catalisada por $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ 100 μM , na presença de peroxinitrito 600 μM , a vários pHs

Figura 24 - Nitração do 4-HPA, 5,0 mM, catalisada por $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ 100 μM mediada por $[\text{ONOO}^-]$ 600 μM , $[\text{NaHCO}_3]$ 4,43 mM, a $(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ e vários pHs.

A partir dos resultados obtidos, observa-se que na presença de NaHCO_3 , 4,43 mM, a constante de velocidade de nitração do composto 4-HPA, é maior, principalmente entre pH 6,0 – 7,0, na presença de $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$, quando comparada à constante de velocidade na ausência do composto diimínico (vide **Tabela 13**). À medida que o pH aumenta, o valor da k_{obs} diminui, devido a um menor efeito do bicarbonato em função de uma menor quantidade de CO_2 no meio reacional.

Tabela 13 – Valores de k_{obs} (s^{-1}) para a nitração do 4-HPA, catalisada por $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$, na presença de NaHCO_3 4,43 mM, a $(25 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, $[\text{ONOO}^-]$ 600 μM .

<i>Sistema Reacional</i>		
$k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$		
pH	T/ONOO ⁻ /4-HPA/ CO_2 4,43 mM	T/ONOO ⁻ /4-HPA/ CO_2 4,43 mM/ $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$
6,21	$12,8 \pm 0,3$	
6,25		$18,7 \pm 0,2$
6,89		$7,3 \pm 0,1$
6,92	$5,5 \pm 0,2$	
7,46		$3,4 \pm 0,2$
7,58	$2,8 \pm 0,1$	

IV.5.2. Produto da Nitração do HPA na presença do Complexo Diimínico de Cobre(II), $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$

O produto estável da reação de nitração entre o $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ e o 4-HPA, 3-nitro-4-HPA, mediada por peroxinitrito, 600 μM , foi monitorado por espectrofotometria UV/Vis. A nitração do 4-HPA na presença do catalisador foi executada em um experimento em que uma solução de 4-HPA 5 mM, em tampão fosfato 50 mM pH 7,23, e o complexo testado entre 0 – 150 μM também em tampão fosfato 50 mM pH 7,23 foi

rapidamente misturada com o peroxinitrito, sob agitação constante. Depois de 5 minutos de reação, o pH da solução foi ajustado entre 10 - 11 com NaOH 1,0 M e a absorbância lida a 430 nm ($\varepsilon = 4400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [138] A **Figura 25**, mostra este resultado.

Figura 25 – Espectro UV para a nitração do 4-HPA, 5 mM, monitorada a 430 nm, catalisada por $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ em tampão fosfato 50 mM pH 7,23, a várias concentrações e ONOO^- 600 μM a $(25 \pm 0,2)^\circ\text{C}$.

Calculamos a partir dos espectros UV a concentração do produto formado, 4-HPA- NO_2 . Os dados estão na **Tabela 14**.

Tabela 14 – Formação do composto 4-HPA- NO_2 , obtido a partir da reação do 4-HPA, 5 mM, com o peroxinitrito 600 μM , catalisada por $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$, em tampão fosfato 50 mM pH 7,23 a várias concentrações.

$[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$, μM	4-HPA- NO_2 , μM
0	$28,0 \pm 0,015$
25	$29,9 \pm 0,012$
50	$31,3 \pm 0,018$
150	$32,9 \pm 0,009$

Analisando a concentração final do produto obtido da reação de nitração do 4-HPA, observa-se uma pequena dependência com o aumento da concentração do $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$, indicando uma atividade catalítica moderada para o composto em estudo.

Com o objetivo de verificar uma possível coordenação do composto 4-HPA aos complexos em estudo, no sistema $\text{CuL}/4\text{-HPA}$, investigamos a transição d-d por espectroscopia UV/Vis, após 5 minutos de reação com o peroxinitrito, a $(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$. As Figuras 26, 27 e 28 mostram estes resultados.

Figura 26 – Espectro eletrônico UV/Vis para a reação do 4-HPA $3,0 \times 10^{-2} \text{ M}$ com peroxinitrito $600 \mu\text{M}$, na presença de $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ $6,0 \times 10^{-4} \text{ M}$, em tampão fosfato 50 mM $\text{pH} 7,23$.

Figura 27 – Espectro eletrônico UV/Vis para a reação do 4-HPA $3,0 \times 10^{-2}$ M com peroxinitrito $600 \mu\text{M}$, na presença de $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ $6,0 \times 10^{-4}$ M, em tampão fosfato 50 mM pH 7,23.

Figura 28 – Espectro eletrônico UV/Vis para a reação do 4-HPA $3,0 \times 10^{-2}$ M com peroxinitrito $600 \mu\text{M}$, na presença de $[\text{Cu}(\text{o-phen})]^{2+}$ $6,0 \times 10^{-4}$ M, em tampão fosfato 50 mM pH 7,23.

Através das **Figuras 26, 27 e 28** observa-se um aumento muito discreto da absorbância na região da banda d-d para os compostos $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ um pequeno decaimento da banda na região de 600 nm para o $[\text{Cu}(\text{phen})]^{2+}$, usado como controle, porém esta pequena alteração não comprova uma provável interação entre os compostos em estudo e o reagente 4-HPA. Este reagente só poderia interagir

com o cobre através de grupos com oxigênio, que usualmente não são bons ligantes para esse metal.

Entretanto, o derivado da tirosina poderia coordenar-se na quinta posição de coordenação do cobre, podendo ainda ocorrer a redução do cobre, similarmente ao verificado com a tirosina, que forma o correspondente radical tirosil [172].

A partir dos resultados obtidos verificamos que o perfil de pH para a nitração do 4-HPA pelo peroxinitrito, catalisada pelos complexos de cobre(II) em estudo é em forma de sino (vide Fig. 17 pag.49) tanto na presença como na ausência de bicarbonato/carbonato. Este perfil também é típico em muitas outras reações do ONOO^- , formando produtos de nitração estáveis [153, 172, 173, 174].

Os compostos $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ aumentam moderadamente a velocidade de nitração em toda faixa de pH estudado, entretanto o primeiro apresentou uma atividade catalítica ligeiramente maior. Este comportamento é similar às características cinéticas obtidas para a nitração do 4-HPA catalisada pela enzima Cu_2Zn_2 SOD [153], porém é muito menor que as exibidas por outros complexos, tais como as porfirinas de manganês [149].

Embora não totalmente esclarecido na literatura, em nitrações mediadas pelo peroxinitrito, provavelmente os complexos de cobre(II) atuam como ativador do ONOO^- , da mesma forma que os íons H^+ , porém em menor extensão, sendo responsável pelo aumento observado da velocidade da nitração do 4-HPA. A reatividade do peroxinitrito usualmente é considerada fortemente dependente da protonação, entretanto este não é o caso quando metais de transição, dióxido de carbono ou outros ácidos de Lewis estão presentes em solução.

Uma explicação plausível da atividade catalítica do complexo de cobre, envolve a formação do aduto peroxinitrito-complexo, com uma reatividade similar à do ácido peroxinitroso. Este aduto favoreceria a homólise do peroxinitrito, em $^*\text{NO}_2$ e uma espécie $[\text{LCu}^*\text{OH}]^{2+}$ com reatividade semelhante à de radicais livres OH, ou poderia se rearranjar para produzir nitrato, que provavelmente se dissocia do cobre. Veja as equações abaixo:

Além da nitração de compostos fenólicos, poderia ser observada a hidroxilação de substratos adequados, como o próprio DMPO, usado como captador de radicais, ou a oxidação de substratos, como o ABTS, que formaria o cátion radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ [139,140].

Baseado neste esquema, verificou-se que a contribuição do cobre ocorre tanto em reações de nitração como de decomposição do peroxinitrito. O composto mais ativo aumentou a constante cinética de nitração em cerca de 1,5 vezes e a de decomposição em ~1,7 vezes.

Também na nitração foi observada a influência do dióxido de carbono. A reação do peroxinitrito na presença de dióxido de carbono forma o aduto ONOCO_2^- . Lymar e colaboradores [77] sugeriram um mecanismo no qual o intermediário reativo, derivado do aduto, reage com a tirosina para produzir o radical tirosil, $\cdot\text{NO}_2$ e HCO_3^- e subsequente o radical tirosil se une ao $\cdot\text{NO}_2$ formando a nitrotirosina.

Cálculos termodinâmicos [73] sugerem que o aduto sofre tanto a homólise como a heterólise, para produzir o par radicalar $\cdot\text{NO}_2/\text{CO}_3^{\bullet-}$ e o par iônico $\cdot\text{NO}_2/\text{CO}_3^{2-}$. Na homólise, a constante de velocidade de formação do par radicalar “caged” é maior que $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, dando CO_2 e NO_3^- [175]. O radical livre $\cdot\text{NO}_2$ pode reversivelmente dimerizar produzindo N_2O_4 [138]; (**Equação 48**):

A dimerização do $\text{CO}_3^{\bullet-}$ a C_2O_6 é lenta (equação (49), $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), comparando-se com a reação do radical $\text{NO}_2^{\bullet}$ com o radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ($1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) podendo ser ignorada [173, 174]. O radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$ é um oxidante mais potente, $E^\circ (\text{CO}_3^{\bullet-} / \text{CO}_3^{2-}) = 1,5 \text{ V}$ do que o $\text{NO}_2^{\bullet}$, com $E^\circ (\text{NO}_2^{\bullet} / \text{NO}_2^-) = 1,04\text{V}$ [175], podendo explicar a maior reatividade do peroxinitrito em presença de dióxido de carbono.

IV.6. Atividade Catalítica na Peroxidação Lipídica

Apesar de suas propriedades antioxidantes acentuadas, observou-se que estes compostos podem também causar peroxidação lipídica de membranas. A peroxidação lipídica pode ser iniciada por peroxinitrito ou peróxido de hidrogênio, que em presença de íons cobre produzem espécies reativas, que podem causar extensos danos biológicos comparados a aqueles produzidos por reações tipo Fenton. O peróxido de hidrogênio em presença de íons de cobre gera espécies radicalares que podem causar degradação oxidativa de inúmeras biomoléculas [176, 99].

Esta atividade catalítica dos íons cobre é bastante dependente do ligante utilizado, que usualmente media e/ou modula a reatividade observada [177].

No caso do reagente peroxinitrito, foi verificado que compostos de ferro(III) e de cobre(II) modificam sua reatividade, provocando reações de nitratação, principalmente de compostos fenólicos, como resíduos de tirosina em proteínas e enzimas [74, 153, 154, 177, 178].

A peroxidação foi realizada em sistemas a partir de incubações contendo fosfatidilcolina (2,5 mg/mL), compostos de cobre a variadas concentrações, em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 e peroxinitrito 1,0 mM, ou peróxido de hidrogênio 3,0 mM, adicionados como último reagente. Estas soluções foram incubadas por 5 minutos ou 40 minutos, respectivamente, a 37°C. Posteriormente, 500 µL de solução da amostra, foram adicionadas a 500 µL do reagente contendo TBA (0,37% m/v), HCl 250 mM hidroxitolueno butilato (BHT) 4 mM e o detergente Triton X-100 (1% m/v). A mistura final

foi aquecida por 40 minutos e depois de resfriada foi centrifugada a 3000 rpm, durante 10 minutos. Subseqüentemente, a mistura foi purificada usando um filtro Millipore^R e a absorbância lida a 532 nm. A extensão da peroxidação lipídica foi monitorada através da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As concentrações de hidroperóxidos lipídicos formados foram calculadas através da formação destas espécies, usando o coeficiente de extinção molar $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (532 nm) já descontando-se as impurezas contidas na fosfatidilcolina (lipossomos em tampão fosfato 50 mM pH 7,4). Todos os resultados foram obtidos por uma de média de no mínimo dois experimentos independentes, cada um realizado em triplicata.

Nossos estudos mostram a extensão da lipoperoxidação, iniciada pelo peroxinitrito ou pelo peróxido de hidrogênio e a dependência com a concentração dos compostos de cobre, conforme **Tabelas 15, 16 e Figuras 29 e 30**.

Tabela 15 - Variação das concentrações dos complexos de cobre, em tampão fosfato 50mM pH 7,4, na peroxidação lipídica estimulada por ONOO⁻ (1,0 mM)

Compostos de Cobre	Concentrações			
	TBARS (nmol/mg lipídio)			
<i>Cu(pyal-en)(ClO₄)₂</i>	<i>0μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>	<i>150μM</i>
Tampão/lipossomas/Cu ²⁺		0,86	0,88	0,91
Tampão/lipossomas/Cu ²⁺ /ONOO ⁻		1,99	2,087	2,20
Tampão/lipossomas/ONOO ⁻	1,44	----	----	----
<i>Cu(apz-pn)(ClO₄)₂·H₂O</i>	<i>0μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>	<i>150μM</i>
Tampão/lipossomas/Cu ²⁺		0,19	0,45	0,96
Tampão/lipossomas/Cu ²⁺ /ONOO ⁻		0,74	1,22	1,72
Tampão/lipossomas/ONOO ⁻	0,49	----	-----	-----
<i>Cu(dmbi)(ClO₄)₂</i>	<i>0μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>	<i>150μM</i>
Tampão/lipossomas/Cu ²⁺		0,41	0,47	0,61
Tampão/lipossomas/Cu ²⁺ /ONOO ⁻		1,066	1,078	1,11
Tampão/lipossomas/ONOO ⁻	0,74	----	-----	-----
<i>Cu(depy)(ClO₄)₂</i>	<i>0μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>	<i>150μM</i>
Tampão/lipossomas/Cu ²⁺		0,61	0,72	0,85
Tampão/lipossomas/Cu ²⁺ /ONOO ⁻		0,77	1,16	1,55
Tampão/lipossomas/ONOO ⁻	0,86	----	-----	-----
<i>Cu(dpbi)(ClO₄)₂·H₂O</i>	<i>0μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>	<i>150μM</i>
Tampão/lipossomas/Cu ²⁺		0,37	0,41	0,43
Tampão/lipossomas/Cu ²⁺ /ONOO ⁻		0,76	0,67	0,77
Tampão/lipossomas/ONOO ⁻	0,41	----	-----	-----
<i>Cu(H₂O)₄(SO₄)</i>	<i>0μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>	<i>150μM</i>
Tampão/lipossomas/Cu ²⁺		0,93	1,18	1,54
Tampão/lipossomas/Cu ²⁺ /ONOO ⁻		1,11	1,38	1,66
Tampão/lipossomas/ONOO ⁻	0,41	----	-----	-----

Figura 29 - Peroxidação lipídica: medida da produção de espécies reativas com o TBA (TBARS) em fosfatidilcolina incubada por 5 minutos, variando-se as concentrações dos complexos de cobre em tampão fosfato 50 mM pH 7,4; [peroxinitrito] = 1,0 mM.

O composto $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ apresentou uma atividade maior quando comparado aos demais compostos. Para uma melhor avaliação do seu comportamento, variou-se a sua concentração numa faixa de 10 μM a 150 μM , mantendo-se as mesmas condições utilizadas anteriormente, conforme mostrado na **Figura 30**.

Figura 30 - Peroxidação lipídica de lipossomas em presença do composto $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ a variadas concentrações em tampão fosfato 50mM, pH 7,4; [peroxinitrito] = 1,0 mM.

A **Tabela 16** mostra os dados da peroxidação lipídica frente a H_2O_2 3,0mM.

Tabela 16 - Variação das concentrações dos complexos de cobre, em tampão fosfato 50mM pH 7,4, na peroxidação lipídica estimulada por H_2O_2 - 3,0 mM.

Compostos de Cobre	Concentrações			
	TBARS (nmol/mg lipídio)			
<i>Cu(pyal-en)(ClO₄)₂</i>	<i>0 μM</i>	<i>50 μM</i>	<i>100 μM</i>	<i>150 μM</i>
T+L+Cu ²⁺	-----	0,343 nM	0,428 nM	0,379 nM
T+L+Cu ²⁺ +H ₂ O ₂	-----	0,546 nM	0,590 nM	0,610 nM
T+L+H ₂ O ₂	0,292 nM	-----	-----	-----
<i>Cu(apz-pn)(ClO₄)₂.H₂O</i>	<i>0 μM</i>	<i>50 μM</i>	<i>100 μM</i>	<i>150 μM</i>
T+L+Cu ²⁺	-----	0,928 nM	0,928 nM	1,035 nM
T+L+Cu ²⁺ +H ₂ O ₂	-----	1,592 nM	1,817 nM	1,908 nM
T+L+H ₂ O ₂	0,238 nM	-----	-----	-----
<i>Cu(dmbi)(ClO₄)₂</i>	<i>0 μM</i>	<i>50 μM</i>	<i>100 μM</i>	<i>150 μM</i>
T+L+Cu ²⁺	-----	0,595 nM	0,595 nM	0,610 nM
T+L+Cu ²⁺ +H ₂ O ₂	-----	0,431 nM	0,492 nM	0,528 nM
T+L+H ₂ O ₂	0,0718 nM	-----	-----	-----
<i>Cu(depy)(ClO₄)₂</i>	<i>0 μM</i>	<i>50 μM</i>	<i>100 μM</i>	<i>150 μM</i>
T+L+Cu ²⁺	-----	0,179 nM	0,246 nM	0,328 nM
T+L+Cu ²⁺ +H ₂ O ₂	-----	0,228 nM	0,551 nM	0,646 nM
T+L+H ₂ O ₂	0,1076 nM	-----	-----	-----
<i>Cu(dpbī)(ClO₄)₂.H₂O</i>	<i>0 μM</i>	<i>50 μM</i>	<i>100 μM</i>	<i>150 μM</i>
T+L+Cu ²⁺	-----	0,066 nM	0,087 nM	0,062 nM
T+L+Cu ²⁺ +H ₂ O ₂	-----	0,197 nM	0,21 nM	0,214 nM
T+L+H ₂ O ₂	0,12 nM	-----	-----	-----
<i>Cu(H₂O)₄(SO₄)</i>	<i>0 μM</i>	<i>50 μM</i>	<i>100 μM</i>	<i>150 μM</i>
T+L+Cu ²⁺	-----	0,682 nM	0,849 nM	0,884 nM
T+L+Cu ²⁺ +H ₂ O ₂	-----	1,076 nM	1,123 nM	1,151 nM
T+L+H ₂ O ₂	0,0718 nM	-----	-----	-----

Figura 31 - Peroxidação lipídica: medida da produção de espécies reativas com o TBA (TBARS) em fosfatidilcolina, estimulada por H_2O_2 3,0 mM, incubada por 40 minutos, variando-se as concentrações dos complexos de cobre, em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4.

Para melhor avaliar o sistema, mantendo-se as mesmas condições experimentais, variou-se a concentração da H_2O_2 de 3,0 para 6,0 mM. A **Figura 32** mostra o comportamento observado.

Figura 32 - Peroxidação lipídica: medida da produção de espécies reativas com o TBA (TBARS) em fosfatidilcolina, estimulada por H_2O_2 6,0 mM, incubada por 40 minutos, variando-se as concentrações dos complexos diimínicos de cobre(II) preparados em tampão fosfato 50mM, pH 7,4.

Estes resultados mostram que os complexos estudados catalisam a peroxidação de lipossomos, obtidos da L- α -fosfatidilcolina, na presença tanto de peróxido de hidrogênio como de peroxinitrito, levando a substancial formação de produtos oxidados, analisados espectrofotometricamente pelo método TBARS, a 532 nm. O complexo mais ativo na peroxidação lipídica iniciada por peróxido de hidrogênio foi o composto $[\text{Cu}(\text{apz-pn})]^{2+}$, que foi também o melhor modelo funcional da SOD, mostrando um baixo valor do IC_{50} ($0,0902\mu\text{mol/L}$) [179a]. Aumentando-se a concentração do oxidante, H_2O_2 , em duas vezes, a produção de TBARS não aumentou na mesma proporção, provavelmente porque a ligação do peróxido de hidrogênio no sítio de coordenação do Cu^{II} é limitada pela concentração dos complexos de cobre.

As seguintes etapas podem ocorrer no sistema:

As duas primeiras correspondem a etapas do tipo Fenton, formando radicais livres hidroxil, principal responsável por danos oxidativos a alvos biológicos. Estes radicais “livres” podem ser capturadas por captadores de spin, por exemplo, nos experimentos de EPR. Entretanto, existe a possibilidade de se formar uma espécie alternativa “engaiolada” (cage), com reatividade semelhante à dos radicais hidroxil livres, mas não detectadas pelos captadores de radicais. Esta espécie seria mais seletiva nos danos causados, levando a oxidações sítio-seletivas, isto é, danos preferenciais no sítio em que é formada. As duas últimas etapas de reação, correspondem à atividade SOD, apresentada pelos compostos estudados.

A ordem de reatividade observada na peroxidação lipídica, com peróxido de hidrogênio, concorda com a capacidade de geração de radicais livres dos catalisadores, isto é, os compostos mais reativos são os que geram mais radicais $\bullet\text{OH}$,

conforme já mostrado à página 45. Portanto, neste caso os danos parecem ser preferencialmente causados por radicais hidroxil “livres”. Estudos recentes em nosso laboratório indicaram que certas biomoléculas, como carboidratos, apresentam danos do tipo sítio-seletivo, isto é, compostos de cobre com maior interação com o substrato são os mais reativos, enquanto outras, como aminoácidos, mostram ordem de reatividade mais consistentes com àqueles causados por radicais hidroxil “livres” [179b].

Entretanto, na presença de peroxinitrito os complexos estudados exibiram uma ordem de reatividade diferente. A atividade catalítica de todos eles foi muito similar ou menor que a do aqua-composto $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, com exceção do $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$, que exibiu uma atividade maior, cerca de duas vezes em relação aos demais. Os complexos $[\text{Cu}(\text{dpbi})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$ mostraram uma atividade muito baixa, quase independente da concentração usada, no intervalo de 50 a 150 μM . Portanto, a modulação da atividade catalítica pelo ligante foi observada com os dois oxidantes. Entretanto, os mecanismos de reação provavelmente são diferentes. No caso do peroxinitrito, uma interação do reagente com o centro metálico, parece ser fundamental, com provável formação de uma espécie hidroxil coordenada, conforme será mostrado a seguir.

Em ambos os casos, a lipofilicidade parece não ter um papel preponderante nesta reatividade, embora as espécies mais hidrofílicas (ou menos lipofílicas) sejam as que apresentaram maior reatividade frente aos danos oxidativos.

IV.6.1. Efeito de Bicarbonato e de Nitrito na Atividade Peroxidásica de Complexos Diimínicos de Cobre(II)

Dados recentes na literatura de Kalyanaraman e colab., descrevem um aumento pronunciado na atividade peroxidásica da enzima nativa Cu_2Zn_2 SOD em presença dos ânions bicarbonato ou nitrito [166]. Esta atividade pró-oxidante da enzima foi atribuída à formação de uma espécie $[\text{LCu}(\cdot\text{OH})]^{2+}$, responsável pela oxidação de íons bicarbonato

a radicais carbonato, ou do próprio nitrito a $\cdot\text{NO}_2$, ou ainda de outros substratos, como ABTS e DMPO [140].

A peroxidação lipídica de lipossomos de L- α -fosfatidilcolina mediada pelos sistemas CuL - H_2O_2 , foi então monitorada na presença de HCO_3^- , NO_2^- ou de ambos os ânions, através da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), analisadas espectrofotometricamente, a 532 nm.

A adição de íons HCO_3^- 25 mM à solução dos lipossomos incubados, por 40 minutos, com CuL 100 μM e H_2O_2 3,0 mM, em tampão fostato 50 mM, pH 7,4 resultou em um aumento mais significativo na formação de TBARS do que na presença de NO_2^- 1,0 mM, para o composto $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$.

Ao contrário, para o composto $[\text{Cu}(\text{apz-pn})]^{2+}$ observou-se um efeito mais pronunciado dos íons nitrito. Entretanto, na presença de ambos os ânions, a formação de TBARS foi ainda mais acentuada para todos os compostos em estudo. Veja **Figura 33**.

Figura 33 - Efeito do HCO_3^- (25,0 mM) e/ou NO_2^- (1,00 mM) na peroxidação lipídica mediada por $[\text{CuL}] = 100\mu\text{M}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 3,00\text{ mM}$, Tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 e Lipossomos = 2,50 mg/mL.

O aumento da produção de TBARS na presença de HCO_3^- pode ser atribuído à oxidação do ânion bicarbonato ao radical $\text{CO}_3^\bullet$ pela espécie oxidante, $[\text{LCu}(\bullet\text{OH})]^{2+}$ ou por radicais $\bullet\text{OH}$ livres [136, 167], formados durante a reação com H_2O_2 (Veja **Equações 55-56**). Radicais carbonato também são causadores de danos oxidativos, aumentando assim a atividade peroxidásica dos compostos de cobre estudados.

Para os íons nitrito, o efeito observado poderia ser atribuído à oxidação do nitrito a $\bullet\text{NO}_2$ pela espécie $[\text{LCu}(\bullet\text{OH})]^{2+}$ formada, isto é, radical hidroxil coordenado ao centro metálico (**Equação 57**). Essa espécie $\bullet\text{NO}_2$ também é capaz de causar danos oxidativos, semelhantemente ao observado com a enzima nativa $\text{Cu}_2, \text{Zn}_2 \text{SOD}$ [140].

IV.7. Investigação da Geometria ao redor do Cu(II) na reação do $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ na presença de Peroxinitrito e Bicarbonato

A possível ocorrência de espécies intermediárias entre o complexo de cobre e ânions bicarbonato ou peroxinitrito foi investigada através de espectroscopia EPR, monitorando variações na geometria do centro metálico, em presença desses reagentes.

A adição de solução de peroxinitrito na faixa de 10^{-3} M a uma solução do complexo $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ em tampão fosfato 100 mM pH 6,92 levou a variações nos parâmetros espectroscópicos, observados no espectro deste composto (**Figura 34**).

Figura 34 - Espectro EPR do $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+} = 2,97 \times 10^{-4} \text{ M}$ na presença de $[\text{ONOO}^-] = 9,26 \times 10^{-4} \text{ M}$ e $[\text{HCO}_3^-] = 4,00 \times 10^{-2} \text{ M}$ e Tampão fosfato 100 mM pH 6,92, a 77K.

Estas variações foram mais acentuadas no caso dos parâmetros $g_{\parallel}$ e $A_{\parallel}$, conforme mostrado na **Tabela 17**. Variações semelhantes foram observadas em presença de bicarbonato ou de ambos (peroxinitrito e bicarbonato).

Tabela 17 – Parâmetros EPR obtidos para $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+} = 2,97 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{ONOO}^-] = 9,26 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{HCO}_3^-] = 4,5 \times 10^{-2} \text{ M}$ em tampão fosfato 100 mM, pH = 6,92.

Sistema Reacional	Parâmetros EPR				
	$g_{\parallel}$	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}'$	$A_{\parallel}$	$A_{\parallel}'$
$[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$	2,228	2,051	-----	184	-----
$[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}/\text{HCO}_3^-$	2,250	2,054	-----	172	-----
$[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}/\text{ONOO}^-$	2,246	2,051	2,214	179	193
$[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}/\text{HCO}_3^-/\text{ONOO}^-$	2,241	2,053	-----	179	-----

Entretanto, para o composto $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$, não se observou nenhuma variação nos espectros EPR e, conseqüentemente, nas constantes hiperfinas, nas mesmas

condições experimentais utilizadas anteriormente, indicando a não coordenação destas espécies ao íon metálico. (**Figura 35**).

Figura 35 - Espectro EPR do $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+} = 1,02 \times 10^{-4} \text{ M}$ na presença de $[\text{ONOO}^-] = 1,59 \times 10^{-3} \text{ M}$ e $[\text{HCO}_3^-] = 4,00 \times 10^{-2} \text{ M}$, tampão fosfato 100mM pH 6,92.

Assim, estas observações corroboram a provável formação de outra espécie no sistema, principalmente em presença do peroxinitrito, quando duas espécies simultâneas de cobre (dois valores de $g_{\parallel}$) foram detectadas. Esta nova espécie seria responsável pela maior reatividade do $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ frente ao peroxinitrito, quando comparado ao $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$.

Em experimentos análogos, com os compostos $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{apz-pn})]^{2+}$, e o peróxido de hidrogênio, não se obteve nenhuma evidência de mudanças na geometria ao redor do cobre. Os espectros de soluções congeladas dos complexos em presença de H_2O_2 foram idênticos aos obtidos na sua ausência.

IV.8. Efeito do ânion HCO_3^- na geração de radicais hidroxil no sistema $\text{CuL}/\text{H}_2\text{O}_2$

O efeito do ânion HCO_3^- na geração de radicais hidroxil livres no sistema $\text{CuL}/\text{H}_2\text{O}_2$ foi investigado também por EPR, monitorando-se a formação do aduto DMPO-OH , em presença do captador DMPO , para os compostos $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ e para o aqua-composto $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$. Os espectros EPR foram registrados utilizando-se $[\text{CuL}]$ na faixa de 10^{-5} M, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,52$ mM e $[\text{DMPO}] = 0,10$ M, em tampão fosfato 100 mM e $\text{pH} = 7,23$. As respectivas concentrações de aduto $[\text{DMPO-OH}]$ formado foram obtidas dos espectros correspondentes, por integração dupla, usando solução de tempol 38,2 μM para calibração.

Dados da literatura [140] mostram que o bicarbonato induz a hidroxilação do DMPO na presença de $\text{Cu}_2\text{Zn}_2 \text{SOD}/\text{H}_2\text{O}_2$. Na ausência deste ânion, a formação do aduto DMPO-OH ($a_N = a_H = 14,9\text{G}$) é menor. Kalyanaraman e colab. sugeriram que o DMPO é oxidado no sítio ativo da $\text{Cu}_2\text{Zn}_2 \text{SOD}$ pela espécie, $[\text{SOD-Cu}(\cdot\text{OH})]^{2+}$, a DMPO-OH [180].

Para o composto $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$, um aumento significativo ($\sim 35\%$) foi observado para a formação do aduto DMPO-OH na presença do ânion HCO_3^- . Provavelmente este ânion interage com o íon cobre, onde pode ser oxidado a $\text{CO}_3^{\cdot-}$ pela espécie $[\text{LCu}(\cdot\text{OH})]^{2+}$, formada com o peróxido de hidrogênio (sítio específico). Neste caso este intermediário reativo também poderia oxidar DMPO a DMPO-OH e os radicais carbonato oxidariam o DMPO a um cátion radical, que com água daria o aduto DMPO-OH [140].

Ao contrário, para o composto $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ observou-se uma redução ($\sim 50\%$) na formação do aduto DMPO-OH , possivelmente devido à não formação do intermediário ativo neste caso e à competição entre íons bicarbonato e DMPO pelos radicais $\cdot\text{OH}$ livres presentes no sistema.

Para o $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, praticamente nenhuma alteração foi observada, dentro do erro experimental (10-15%) (**Tabela 18**).

Tabela 18 – Efeito do HCO_3^- na geração de radicais hidroxil no sistema $\text{CuL}/\text{H}_2\text{O}_2$ tampão fosfato 100 mM pH = 7,23 após 5 minutos de reação.

<i>Composto</i>	<i>Sistema Reacional</i>	[DMPO-OH], μM
[Cu(pyal-en)](ClO_4) ₂	$\text{CuL} + \text{H}_2\text{O}_2$	0,672
	$\text{CuL} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{HCO}_3^-$	0,912
[Cu(depy)](ClO_4) ₂	$\text{CuL} + \text{H}_2\text{O}_2$	1,55
	$\text{CuL} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{HCO}_3^-$	0,982
[Cu(H ₂ O) ₄](SO ₄) ₂	$\text{CuL} + \text{H}_2\text{O}_2$	1,13
	$\text{CuL} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{HCO}_3^-$	1,18

IV.9. Medidas Eletroquímicas – Voltametria Cíclica

Alguns complexos diimínicos de cobre(II) são também conhecidos por exibir citotoxicidade, particularmente quando ativados por agentes redutores [23,24], como glutatona e subseqüentemente reoxidados pelo oxigênio molecular, disparando um ciclo redox onde espécies reativas de oxigênio são formadas.

Experimentos eletroquímicos foram então executados por voltametria cíclica, com o objetivo de correlacionar o seu comportamento redox com suas atividades catalíticas, especialmente na geração de espécies reativas de oxigênio.

O comportamento redox do complexo $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ 5mM, preparado em dimetilformamida contendo TEAP, 0,10 M, foi investigado no intervalo de -1,5 V a +0,5

V vs EPH. Em atmosfera de argônio, o composto apresentou um processo bem comportado, com uma onda de transferência de 1 elétron, a $E^0 = +0,03 \text{ V}$ (**Figura 36a**), reversível, correspondente ao par Cu(II)/Cu(I). Resultados similares foram relatados para o complexo $[\text{Cu}(\text{dmgh})_2]$, onde dmgh é o ligante dimetilglioximato e outros complexos de cobre(II) [168, 183]. A redução do Cu(II) a Cu(I) a um potencial mais positivo, (+0,03V), quando comparado ao $[\text{Cu}(\text{dmgh})_2]$ e $[\text{Cu}(\text{salacopd})]\text{Cl}_2$ (onde salacopd é também um ligante di-imina), -0,86 V e -0,78 V, respectivamente, é consistente com uma geometria intermediária entre quadrado planar e tetragonal, ao redor do íon cobre. Além disso, a presença de um nitrogênio insaturado como átomo doador no ligante estabiliza mais o estado de oxidação mais baixo, Cu(I), do que uma ligação saturada, devido a retroligação π entre o metal e o átomo de nitrogênio [184].

Apesar dos complexos de cobre(I) serem usualmente bons agentes redutores, este complexo na forma reduzida, $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{depy})]^+$, não reagiu com o oxigênio molecular. Entretanto, quando o voltamograma foi registrado até um potencial mais negativo, sob condições aeróbicas (**Figura 36b**), um forte pico catódico a -0,87 V foi observado, e o pico anódico atribuído a formação do Cu(II) desapareceu ($E_{\text{pa}} = +0,06\text{V}$). Este pico a um potencial mais negativo é consistente com a redução do oxigênio em DMF a radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) [185], que subsequente são dismutados pelo complexo de cobre(II), mimético da SOD, conforme mostrado anteriormente.

O complexo $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{depy})]^+$ reagiu também com peróxido de hidrogênio, adicionado à solução, sob condições anaeróbicas (**Figura 36c**). Portanto, a forma reduzida do complexo é estável na presença de oxigênio molecular, embora sendo completamente oxidado por radicais superóxido ou peróxido de hidrogênio, como mostra a **Figura 36**.

Figura 36 – Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ 5,0 mM em DMF, contendo TEAP, 0,10 M, **a)** sob atmosfera de argônio, **b)** em presença de dióxigênio, **c)** com adição de peróxido de hidrogênio.

Medidas espectroeletroquímicas deste complexo em solução, no intervalo de +0,50 a -0,25V, mostrou um decaimento da banda a 260 nm, atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do ligante macrocíclico e o crescimento de duas novas bandas, a 317 e 380 nm, provavelmente devido a transições de transferência de carga metal ligante (MLCT), $d(\text{Cu}^I) \rightarrow \pi(\text{py})$ e $d(\text{Cu}^I) \rightarrow \pi(\text{imina})$, respectivamente [186], como mostra a **Figura 37**. Outra banda observada a 558 nm pode também ser atribuída a transição de transferência de carga, $d(\text{Cu}^I) \rightarrow \pi(\text{imina})$, previamente observada em compostos similares [185].

Figura 37 – Espectro eletroquímico UV-Vis do complexo $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ 3,0 mM em acetonitrila, contendo TEAP 0,10 M, no intervalo de $-0,25$ a $+0,50$ V vs. EPH.

Ao contrário do $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$, todos os demais compostos estudados exibiram ondas irreversíveis, a potenciais mais positivos, tanto na ausência como na presença de oxigênio molecular. Os complexos $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{dpbi})]^{2+}$ mostraram uma onda quase reversível próximo de 0 V, atribuída a redução $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ (**Figura 38**). Enquanto o primeiro composto apresentou dois processos sucessivos, uma onda quase reversível ($\Delta E_p = 100$ mV), a $E = -0,13$ V, e outra onda irreversível, a $+0,04$ V, o complexo $[\text{Cu}(\text{dpbi})]^{2+}$ mostrou somente um processo quase reversível a $+0,07$ V ($\Delta E_p = 70$ mV). O processo sucessivo para $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$ já era esperado, uma vez que este complexo também exibiu dois sinais de cobre no espectro EPR, a pH ~ 6 , sugerindo uma estrutura oligomérica contendo espécies onde o grupo imidazol aparece na forma protonada e deprotonada. Uma onda adicional irreversível foi observada para ambos os complexos: $+0,53$ V, $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$ e $+0,98$ V para o $[\text{Cu}(\text{dpbi})]^{2+}$, atribuída à oxidação do grupo benzimidazol no ligante.

Figura 38 – Voltamograma cíclico dos complexos $[\text{Cu}(\text{dpbi})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$ 5,0 mM em DMF, contendo TEAP, 0,10 M, sob atmosfera de argônio.

Relatos conflitantes sobre o potencial redox da Cu_2Zn_2 SOD têm sido publicados. Alguns autores [187, 188], através de medidas eletroquímicas por voltametria cíclica, no intervalo de 280–420 mV, usando um eletrodo de ouro e ferricianeto como mediador, obtiveram um valor de $E = +403$ mV vs EPH, a pH 7,0, quando a absorção máxima a 680 nm foi monitorada, depois de estabelecer o equilíbrio entre as formas oxidada e reduzida da proteína, a cada potencial aplicado [189]. Estes resultados, entretanto são bastante controversos na literatura.

Mais recentemente, um valor médio de $E = +120$ mV vs. EPH foi obtido, a partir de titulações redox, monitoradas por EPR a pH 7,5, $T = 22^\circ\text{C}$ e $I = 0,2\text{M}$ [190]. Esta

redução mostrou ser reversível, depois de sua reoxidação com o ferricianeto. Nossos resultados, com modelos de SOD, são mais próximos a este valor.

Para os complexos $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{apz-pn})]^{2+}$ [191] um comportamento redox mais complexo foi observado. Dependendo da direção em que o potencial é registrado, ou da faixa de potencial monitorada, diferentes ondas irreversíveis foram observadas, com reações químicas acopladas atestando a alta reatividade destes complexos. Estudos eletroquímicos mais detalhados seriam necessários para elucidar melhor estes sistemas.

IV.10. Estabilidade Termodinâmica – Medidas de Dicroísmo Circular (CD)

A estabilidade termodinâmica para os complexos $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{dpbi})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$, foi estimada por dicroísmo circular [119], utilizando-se a albumina bovina (BSA) [192] como quelante competitivo de cobre. A ligação do cobre à albumina bovina proporciona uma mudança das transições eletrônicas observadas próximas à região de 564 nm, no espectro de dicroísmo circular. A amplitude dessa banda característica negativa de Cotton corresponde à formação de Cu(II)BSA e é diretamente proporcional à sua concentração [193].

O dicroísmo circular é uma técnica espectroscópica, onde uma molécula opticamente ativa pode interagir de forma diferente com os componentes da luz circularmente polarizada [194] dependendo da assimetria estrutural da molécula. Esta técnica é sensível às interações locais, mesmo em casos onde interações complexas estejam ocorrendo, e é bastante empregada no estudo de mudanças conformacionais, vizinhanças locais, interação de ligantes com as proteínas e ainda como uma estimativa qualitativa do conteúdo de estrutura secundária em proteínas.

Uma molécula opticamente ativa pode interagir de forma diferente com os componentes da luz polarizada. A técnica de CD detecta essa interação pela diferença na absorção, por meio da polarização circular, onde primeiramente o feixe de radiação deve ser plano polarizado e em segundo lugar o feixe polarizado deve passar por um dispositivo que o desdobre em componentes polarizados circularmente à direita e à esquerda, atrasando um componente em relação ao outro de exatamente $\frac{1}{4}$ de

comprimento de onda, resultando em um espectro característico [194b]. As vantagens que este método proporciona são: alta sensibilidade às mudanças conformacionais; o tempo de análise é muito menor comparado à espectrometria de massa ou à cromatografia gasosa para uma determinação quantitativa; requer pequenas quantidades de amostras (100 a 500 $\mu\text{g/mL}$); as curvas de dicroísmo circular apresentam maior resolução, uma vez que cada faixa corresponde a uma particular faixa de absorção. Entretanto devemos controlar a temperatura do sistema e homogeneizar a solução na cubeta para se obter bons resultados.

A albumina bovina foi titulada com quantidades crescentes dos compostos de cobre estudados e os espectros correspondentes foram monitorados no intervalo de 300 a 650 nm. A estabilidade termodinâmica relativa foi deduzida a partir da regressão da amplitude do CD a 564 nm versus a concentração de Cu(II)BSA formado. Adicionamos alíquotas dos complexos de cobre a uma solução concentrada de albumina em tampão fosfato, pH 7,2 e os espectros foram registrados após cada adição.

Neste experimento, utilizamos concentrações iniciais na faixa de 1,2 - 1,5 mM para os complexos de cobre em estudo e 0,7 mM para a albumina bovina, em tampão fosfato 10mM pH 7,23. A **Figura 39** mostra os espectros de CD obtidos no caso dos três novos complexos. Nas **Figuras 40-42** são mostrados os espectros análogos para os complexos $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{apz-pn})]^{2+}$, para comparação, e a curva padrão para o composto $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, usado como referência.

Figura 39 - Espectro de CD da [BSA] 0,7 mM em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 com; A) $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$ com concentrações (1) 0,0mM, (2) 0,047 mM, (3) 0,091 mM, (4) 0,13mM, (5) 0,21mM (6) 0,33mM. B) $[\text{Cu}(\text{dpbi})]^{2+}$ com concentrações (1) 0,0mM, (2) 0,044mM, (3) 0,084mM, (4) 0,122mM, (5) 0,16mM, (6) 0,19mM, (7) 0,25mM. C) $[\text{Cu}(\text{dmbi})]^{2+}$ com concentrações (1) 0,0mM, (2) 0,053mM, (3) 0,102mM, (4) 0,15mM, (5) 0,19mM, (6) 0,23mM, (7) 0,302mM. $T = 30,0 (\pm 0,1)^\circ\text{C}$

Figura 40 - Espectro CD, [BSA] = 0,7mM em tampão borato 100mM (pH 7,2) com $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{SO}_4)$ (1) 0mM, (2) 0,14mM, (3) 0,18mM, (4) 0,22mM, (5) 0,28mM. $T = (30,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Figura interna – amplitude, cm, versus $[\text{CuL}]$, mM.

Figura 41 – Espectro CD, [BSA] = 0,7mM em tampão borato 100mM (pH 7,2) com $[\text{Cu}(\text{apz-pn})]^{2+}$ (6) 0mM, (7) 0,05mM, (8) 0,09mM, (9) 0,14mM, (10) 0,18mM, (11) 0,22mM, (12) 0,28mM, $T = (30,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$.

Figura 42 – Espectro CD, [BSA] = 0,7mM em tampão borato 100mM (pH 7,2) com $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ (13) 0mM, (14) 0,05mM, (15) 0,09mM, (16) 0,14mM, (17) 0,18mM, (18) 0,22mM, (19) 0,28mM, $T = (30,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$.

Determinou-se a constante de estabilidade ($\log K$) em cada caso, através da capacidade de competição entre os complexos diimínicos e a albumina bovina, na coordenação dos íons de cobre.

A constante de estabilidade para os complexos em estudo foi calculada levando-se em conta os equilíbrios envolvidos no sistema, como mostram as equações abaixo, assumindo que $\log K = 16,2$ para $[\text{Cu(II)BSA}]$ [195] e a partir da constante de estabilidade relativa (β) e da curva analítica obtida para o $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ usado como referência [119, 193].

$$\beta_{\text{rel}} = \frac{K_{\text{Cu(II)BSA}}}{K_{\text{Cu(II)L}}} = \frac{[\text{Cu(II)BSA}][\text{L}]}{[\text{BSA}][\text{Cu(II)L}]} \quad (67)$$

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

$$K_{\text{Cu(II)L}} = \frac{K_{\text{Cu(II)BSA}}}{\beta_{\text{rel}}} \quad (68)$$

A **Tabela 19** mostra a amplitude e os valores das concentrações para as espécies envolvidas no sistema.

Tabela 19 - Valores da amplitude obtida através dos Espectros de CD e as concentrações das espécies envolvidas no sistema.

	Cu(II)_{T} (mM)	Amplitude (cm)	$[\text{BSA}]_{\text{T}}$ (mM)	$[\text{Cu(II)L}]$ (mM)	$[\text{Cu(II)BSA} \sim [\text{L}]]$ (mM)
$[\text{Cu(depy)}]^{2+}$	0,047	0,05	0,67	0,037	0,0096
	0,091	0,10	0,65	0,074	0,0162
	0,13	0,13	0,63	0,50	0,0204
	0,21	0,20	0,58	0,178	0,0316
	0,33	0,35	0,51	0,278	0,0513
$[\text{Cu(dpbi)}]^{2+}$	0,044	0,10	0,67	0,027	0,0163
	0,084	0,25	0,65	0,047	0,0370
	0,122	0,40	0,63	0,063	0,0583
	0,16	0,50	0,60	0,087	0,0724
	0,19	0,70	0,55	0,149	0,1004
$[\text{Cu(dmbi)}]^{2+}$	0,102	0,20	0,65	0,072	0,0302
	0,150	0,25	0,63	0,112	0,0373
	0,190	0,60	0,60	0,103	0,0863
	0,230	0,65	0,58	0,136	0,0933
	0,302	0,70	0,55	0,201	0,1004

A partir dos valores da constante de estabilidade (log K) (**Tabela 20**) podemos verificar que o $[\text{Cu(depy)}](\text{ClO}_4)_2$ com $\log k = 18,97 \pm 0,97$ é duas ordens de magnitude

mais estável que Cu(II)BSA ($\log K = 16,8$) e $[\text{Cu}(\text{pyal-en})](\text{ClO}_4)_2$ ($\log K = 16,2$) [179]. Já os complexos $[\text{Cu}(\text{dpbi})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}(\text{dmbi})](\text{ClO}_4)_2$ são uma ordem de magnitude menor, comparados ao anterior, $[\text{Cu}(\text{depy})](\text{ClO}_4)_2$. Para o composto $[\text{Cu}(\text{dpbi})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ observou-se ainda o aparecimento de bandas na região de 380 nm, provavelmente devido à interação do composto com um outro sítio da BSA. [196]. A constante de estabilidade para o composto $[\text{Cu}(\text{apz-pn})]^{2+}$ não foi possível calcular, uma vez que através dos espectros de CD [179], observou-se que este composto perdeu mais metal para a albumina até mesmo do que o $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, usado como referência. Os resultados foram interpretados como uma interação da própria espécie complexa $[\text{Cu}(\text{apz-pn})]^{2+}$ com a albumina por associação às suas cavidades, uma vez que a albumina é uma macromolécula e o composto referido apresenta em sua molécula o grupo pirazina, com dois átomos de nitrogênio disponíveis para possíveis ligações com grupos da proteína. Medidas espectrofotométricas complementares corroboraram esta interpretação [179].

Usualmente, os íons de cobre se coordenam ao sítio terminal da BSA, apresentando os resíduos de histidina, treonina e aspartato: -His-Thr-Asp [197]. Novos experimentos serão necessários para esclarecer melhor essa interação dos complexos diimínicos de cobre com a albumina e atualmente são objetos de estudos, realizados por Maria Amélia Azzellini [181], em nosso laboratório.

Tabela 20 - Valores da Constante de Estabilidade ($\log K$) e Constante Relativa (β_{rel}) para os compostos CuL em tampão fosfato 10 mM, pH 7,2 a 30°C.

<i>Composto</i>	<i>β_{rel}</i>	<i>Constante de Estabilidade, $\log K$</i>
$[\text{Cu}(\text{depy})](\text{ClO}_4)_2$	$0,0053 \pm 0,01$	$18,97 \pm 0,97$
$[\text{Cu}(\text{dpbi})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$0,0519 \pm 0,07$	$17,89 \pm 0,90$
$[\text{Cu}(\text{dmbi})](\text{ClO}_4)_2$	$0,0638 \pm 0,14$	$17,79 \pm 0,90$
$[\text{Cu}(\text{pyal-en})](\text{ClO}_4)_2$	$0,097 \pm 1,11$	$16,27 \pm 0,40$

dados da referência [179]

Estes resultados mostram que, apesar de apresentarem atividades catalíticas distintas frente aos oxidantes peróxido de hidrogênio e peroxinitrito, todos os compostos em estudo são muito estáveis, podendo sobreviver em sistemas biológicos na presença de quelantes competitivos, como a albumina, importante carregador biológico de cobre.

V. CONCLUSÕES

Novos complexos de cobre(II), com ligantes diimínicos tetradentados, foram sintetizados e caracterizados por análise elementar, espectroscopia UV/Vis, infravermelha, EPR e por medidas magnéticas.

Todos os complexos obtidos apresentaram, nos espectros eletrônicos, bandas intensas na região do UV atribuídas às transições dos ligantes $n \rightarrow \pi$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ e bandas largas menos intensas, a 600 – 700 nm, devido às transições d-d do metal. Os espectros no infravermelho mostraram bandas características de compostos diimínicos, como a banda de estiramento $\nu_{C=N}$ a $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$, consistentes com a estrutura proposta e dados obtidos por outras técnicas.

Todos os complexos estudados apresentaram propriedades antioxidantes, evidenciadas através da atividade mimética de Cu_2Zn_2 SOD, apresentando estrutura tetragonal com alguma distorção tetraédrica. Esse estudo indicou que o complexo $[\text{Cu}(\text{apz-pn})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ é o melhor mimético da SOD, dentre os descritos na literatura, com um IC_{50} igual a $0,0902\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ [179].

Entretanto, estes complexos também apresentaram atividade pró-oxidante, verificada a partir da peroxidação lipídica, em presença de H_2O_2 ou de peroxinitrito (ONOO^-), bem como na geração de radicais hidroxil, $^{\bullet}\text{OH}$, detectados através de EPR com o uso de captadores específicos. Detectou-se uma maior formação do aduto DMPO-OH no caso do composto $[\text{Cu}(\text{apz-pn})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Como este complexo foi também o mais ativo na peroxidação lipídica, em presença de peróxido de hidrogênio, provavelmente os danos oxidativos verificados são devidos à geração de radicais hidroxil na forma livre e não como resultado de ataques sítio-específico. Já na peroxidação lipídica frente ao ONOO^- , o composto $[\text{Cu}(\text{pyal-en})](\text{ClO}_4)_2$ foi o mais ativo, gerando cerca de 2 vezes mais espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico do que qualquer um dos outros compostos. Neste caso, do peroxinitrito, o ataque aos lipossomos parece ser sítio específico, devido provavelmente à formação de uma espécie $[\text{LCu}(^{\bullet}\text{OH})]^{2+}$, análoga à proposta em estudos de peroxidação com a própria enzima nativa [136].

A atividade peroxidásica, com peróxido de hidrogênio, catalisada pelos compostos $[\text{Cu}(\text{pyal-en})](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Cu}(\text{apz-pn})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}(\text{depy})](\text{ClO}_4)_2$, investigada na presença dos ânions HCO_3^- e NO_2^- , causou maiores danos aos lipossomos de fosfatidilcolina, devido à provável formação dos radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e/ou $^{\bullet}\text{NO}_2$. Comparado ao composto $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4](\text{SO}_4)_2$ o complexo $[\text{Cu}(\text{apz-pn})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ apresentou uma atividade pró-oxidante mais acentuada, enquanto os outros complexos apresentaram atividade menor, na ausência daqueles ânions.

A decomposição do peroxinitrito, monitorada por medidas de cinética rápida (stopped-flow), mostrou que alguns dos compostos em estudo apresentaram uma atividade catalítica moderada. O composto $[\text{Cu}(\text{pyal-en})](\text{ClO}_4)_2$ exibiu uma atividade catalítica em toda a faixa de pH estudada, com um valor máximo de $k_{\text{obs}} = 1,68 \text{ s}^{-1}$ a pH = 6,3, e valores de $k_{\text{obs}} = 0,64$ e $0,59 \text{ s}^{-1}$, a pH 7,0 e 7,4, respectivamente. A atividade do composto $[\text{Cu}(\text{apz-pn})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ foi menor, com $k_{\text{obs}} = 1,27 \text{ s}^{-1}$ a pH = 6,0 e $0,48 \text{ s}^{-1}$ a pH = 7,0. Para o composto $[\text{Cu}(\text{depy})](\text{ClO}_4)_2$ nenhum efeito significativo foi verificado. As constantes de velocidade de segunda ordem (k) determinadas para estes complexos citados, na decomposição do peroxinitrito, foram de $(2,80 \pm 0,18) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $(1,87 \pm 0,20) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $(1,60 \pm 0,15) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente, a pH 6,30 e $T = (25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$. Para a reação não catalisada o valor de k determinado neste pH foi de $(1,63 \pm 0,20) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Os demais compostos foram praticamente inativos em toda a faixa de pH estudada (5,5 – 8,3).

Dados da literatura [150] mostram que porfirinas de ferro solúveis em água, como a $[\text{Fe}(\text{III})\text{TMPyP}]$, podem catalisar eficientemente a decomposição do peroxinitrito, com uma constante de velocidade de segunda ordem de $1,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, produzindo a espécie ferril, $\text{O}=\text{Fe}(\text{IV})$. Esta por sua vez reage com o peroxinitrito, formando um composto $\text{O}=\text{Fe}(\text{IV})\text{-ONOO}^-$, em condições fisiológicas ($T = 37^\circ\text{C}$), com a coordenação do peroxinitrito ao centro metálico como 5º ligante, facilitando assim as transferências de elétrons entre os reagentes.

Analogamente, Groves e colab. [65] observaram que porfirinas de manganês, na presença de antioxidantes biológicos como o ascorbato, a glutathione e o Trolox, catalisam a redução do peroxinitrito ($k \sim 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) a nitrito e dióxido de nitrogênio. Neste processo, a presença de um redutor é necessária para completar o ciclo catalítico [65]. Tanto no caso de complexos de ferro, como de manganês, espécies em alto estado de oxidação, ferril e manganil, respectivamente, são formadas como intermediários cataliticamente ativos.

Estudos análogos com compostos de cobre, constituídos pela 1,10-fenantrolina e aminoácidos como ligantes, também mostraram atividade catalítica na decomposição do peroxinitrito, mas somente a $\text{pH} > 7,0$, com $k_{\text{obs}} \sim 0,54 \text{ s}^{-1}$ a $\text{pH}=7,0$ e $T= 25^\circ\text{C}$ [19]. Neste trabalho a espécie cataliticamente ativa é apenas descrita como decorrente da coordenação do peroxinitrito ao centro de cobre, sem nenhuma evidência experimental comprobatória. Portanto, em nossos estudos o composto $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ mostrou-se cerca de 1,2 vezes mais reativo ($k_{\text{obs}}=0,64 \text{ s}^{-1}$) que este $[\text{Cu}(\text{o-phen})(\text{serina})]$, anteriormente estudado.

Nossos estudos da reação de nitração do 4-HPA pelo peroxinitrito, catalisada por $[\text{Cu}(\text{pyal-en})](\text{ClO}_4)_2$, indicaram que este composto tem uma atividade catalítica também moderada nesta reação, com constante de velocidade de segunda ordem $k = (1,37 \pm 0,14) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a $\text{pH} 6,82$. Para a nitração não catalisada $k = (0,90 \pm 0,15) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Os outros compostos estudados foram muito menos ativos. A nitração do 4-HPA pelo peroxinitrito já havia sido observada com $\text{Cu}_2\text{Zn}_2 \text{ SOD}$, com uma constante de velocidade de segunda ordem de $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em condições fisiológicas ($T = 37^\circ\text{C}$) [20].

Embora menos reativos que as porfirinas de ferro ou manganês, os complexos diimínicos de cobre mostraram atividade catalítica moderada tanto na decomposição do peroxinitrito, como na nitração do 4-HPA promovida pelo peroxinitrito. Dentre os compostos de cobre descritos na literatura, os nossos compostos diimínicos são os mais ativos. As constantes cinéticas para a decomposição e a nitração do 4-HPA, considerando o composto mais reativo, foram próximas. Comparando-se com a própria SOD, levando em consideração o efeito da temperatura (a cada 10°C a constante cinética dobra), a constante

determinada é cerca de 50 vezes menor ($1,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, a pH 7,29 e $T = 25^\circ\text{C}$) que a da enzima ($1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, a pH 7,40 e $T = 37^\circ\text{C}$).

Em ambos os processos, um efeito pronunciado nas velocidades de reação foi observado em presença de íons bicarbonato, fortemente dependente do pH do meio. Este efeito foi atribuído à formação de um aduto peroxinitrito- CO_2 que provavelmente também interage com o centro metálico. Evidências para esta interação, tanto do peroxinitrito como do aduto com CO_2 , foram detectadas através de mudanças significativas nos espectros EPR do cobre, em presença de peroxinitrito e de bicarbonato, apenas no caso do composto mais reativo, $[\text{Cu}(\text{pyal-en})](\text{ClO}_4)_2$.

Visando correlacionar a reatividade dos complexos com parâmetros termodinâmicos, estudos eletroquímicos foram também realizados. Experimentos de voltametria cíclica mostraram uma onda de transferência de 1 elétron a $E_{1/2} = +0,03\text{V}$ vs SHE, correspondente ao processo reversível $\text{Cu(II)}/\text{Cu(I)}$, no caso do composto $[\text{Cu}(\text{depy})](\text{ClO}_4)_2$. A formação da espécie reduzida deste complexo foi comprovada através de experimentos espectroeletroquímicos, que mostraram a formação de bandas a $\sim 400 \text{ nm}$, características de transições de transferência de carga, $d(\text{Cu}^I) \rightarrow \pi^*(\text{imina})$. Por outro lado, os compostos $[\text{Cu}(\text{dmbl})](\text{ClO}_4)_2$ e $[\text{Cu}(\text{dpbi})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ exibiram ondas quase-reversíveis a potenciais mais positivos, $+0,04\text{V}$ e $+0,07\text{V}$, respectivamente. A ordem observada nos valores de potencial é consistente com a idéia de que ligantes mais delocalizados eletronicamente levam a potenciais mais positivos, devido à maior estabilização da forma reduzida do metal. Estes valores determinados para o potencial redox dos complexos de cobre não são muito diferentes do valor verificado para a enzima nativa $\text{Cu}_2\text{Zn}_2 \text{ SOD}$, $+0,120\text{V}$ [190].

Entretanto, um comportamento redox mais complexo foi observado para os compostos $[\text{Cu}(\text{pyal-en})](\text{ClO}_4)_2$ e $[\text{Cu}(\text{apz-pn})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Dependendo da direção de varredura do potencial registrado, diferentes ondas irreversíveis foram observadas, com reações químicas acopladas, atestando a alta reatividade desses complexos. O comportamento eletroquímico indicou que suas

propriedades antioxidantes e pró-oxidantes dependem de muitos fatores e não somente dos potenciais redox LCu^{II} / LCu^I .

A lipofilicidade não parece ser um fator determinante da reatividade desses complexos de cobre, tanto na atividade SOD como na geração de radicais hidroxil, embora os melhores miméticos da SOD tenham sido os mais hidrofílicos ou menos lipofílicos, isto é, com coeficientes de partição (K_p , octanol-água) mais baixos.

Verificamos ainda, através de equilíbrios competitivos com albumina monitorados por dicroísmo circular, que todos os compostos em estudo são bastante estáveis ($\log K_{[CuL]} \sim 10^{16} - 10^{19}$), podendo sobreviver em sistemas biológicos na presença de quelantes competitivos.

Nos esquemas, a seguir, são propostas representações dos ciclos catalíticos, antioxidante e pró-oxidante, relacionando a atividade SOD e a geração de radicais, responsáveis pelos danos observados na peroxidação lipídica, dos compostos de cobre estudados.

Atividade pró-oxidante

Atividade antioxidante versus pró-oxidante

O complexo é mais antioxidante se a etapa de redução é favorecida, cinética e termodinamicamente (ciclo *B*) e, ao contrário, será pró-oxidante se a etapa de oxidação for favorecida (ciclo *A*).

No esquema pró-oxidante é enfatizada a presença de uma espécie reativa em comum, $[LCu(\cdot OH)]^{2+}$, na interação do centro de cobre com ambos os oxidantes peroxídicos: H_2O_2 e $O=NOO^-$, embora haja vários exemplos de experimentos e opiniões controversas na literatura. O efeito catalítico maior, em presença de íons bicarbonato, observado tanto nas reações do peróxido de hidrogênio como de peroxinitrito, pode ser explicado pela formação de radicais carbonato, $CO_3^{\cdot -}$, a partir da oxidação direta de íons bicarbonato pela espécie ativa sítio-específica, $[LCu(\cdot OH)]^{2+}$ [139]. Esta espécie de cobre associada a um radical hidroxil seria a responsável pela oxidação e consequente inativação da enzima Cu_2Zn_2 SOD, em presença de peróxido de hidrogênio:

Estes radicais carbonato formados são também capazes de oxidar vários substratos e, recentemente, foram admitidos como únicos intermediários observáveis na reação de ONOO^- com CO_2 [155]. O aduto ONOO-CO_2 teria uma meia-vida $< 0,5$ ms, não se acumulando no sistema. A reação desses radicais carbonato com o próprio peroxinitrito foi estudada por radiólise de pulso, verificando-se ser muito rápida ($k = 7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [134]:

Reagiriam ainda com fenóis, como tirosina, com k da ordem de $10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, formando radicais fenoxil, que reagiriam então com dióxido de nitrogênio para dar a nitro-tirosina ou, numa etapa de terminação, dariam a ditirosina :

Uma outra explicação, para o efeito do bicarbonato, entretanto, é a de que íons bicarbonato induziriam a hidroxilação do captador de spin DMPO em presença de Cu_2Zn_2 SOD, através da formação intermediária de um aduto DMPO-radical carbonato, seguida de hidrólise, ou da oxidação do DMPO a um cátion radical, seguida também de hidrólise [140]:

Isto explicaria a maior obtenção de aduto DMPO-OH, nos experimentos de EPR, em presença de íons bicarbonato. Evidências para estas reações foram obtidas com o uso de água isotopicamente marcada, H_2^{17}O . Na ausência de bicarbonato, a formação de DMPO-OH é desprezível, no caso da reação catalisada pela enzima Cu_2Zn_2 SOD [140].

Entretanto, no caso de nossos miméticos da Cu_2Zn_2 SOD, obtivemos tanto o aumento da formação de adutos DMPO-OH, na reação com peróxido de hidrogênio, para o composto $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$, como uma diminuição desses adutos, para o composto $[\text{Cu}(\text{depy})]^{2+}$. Deste modo, acreditamos que no caso dos miméticos da SOD também seja formada uma espécie análoga sítio-específica, $[\text{LCu}(\bullet\text{OH})]^{2+}$, porém em maior ou menor grau, dependendo do ligante. Indícios da interação do centro de cobre com bicarbonato e com ONOO^- , só foram obtidos no caso do primeiro composto, $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$, que foi o mais ativo frente ao peroxinitrito, tanto nas reações de decomposição e nitração, como na peroxidação lipídica. Neste caso, o intermediário ativo preponderante seria uma espécie desse tipo. Uma dificuldade nesta explicação é o alto potencial redox do sistema $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{\bullet-}$, descrito como +1,8V [85].

Ao contrário, na peroxidação lipídica pelo peróxido de hidrogênio o composto mais ativo foi o $[\text{Cu}(\text{apz-pn})]^{2+}$, que também foi o que mais gerou radicais livres $\bullet\text{OH}$, embora tenha sido o que apresentou melhor atividade SOD.

Neste caso, provavelmente o intermediário mais ativo em causar os danos oxidativos seja o radical $\cdot\text{OH}$ livre.

Uma espécie análoga, $\text{APP-Cu}^{\text{II}}-\cdot\text{OH}$, foi proposta como responsável por danos de fragmentação sítio-específicos, em presença de peróxido de hidrogênio, no caso da proteína precursora $\text{A}\beta$ de fragmentos amilóide, uma proteína de cobre envolvida na doença de Alzheimer e na síndrome de Down [198]. Doenças degenerativas têm sido descritas devido a enzimas SOD mutantes, que além da atividade SOD, apresentam uma atividade peroxidásica bastante acentuada, atribuída à geração de radicais livres [199, 200], degenerando neurônios e levando à paralisia.

Baseado nos estudos realizados percebe-se uma modulação de todas as propriedades dos complexos estudados pelos ligantes diimínicos. A partir de mudanças discretas no ligante conseguimos obter espécies muito reativas como o $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{apz-pn})]^{2+}$ ou o $[\text{Cu}(\text{pyal-en})]^{2+}$ e também obter espécies resistentes ao oxigênio, na forma reduzida, como $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{depy})]^+$.

Analisando todos os resultados de reatividade para os complexos de cobre estudados podemos concluir que vários fatores influenciam a reatividade do cobre, como a natureza dos ligantes na sua esfera de coordenação, seus potenciais de oxido-redução, além de fatores estéricos, lipofilicidade e ligação de hidrogênio.

A distorção tetraédrica ao redor do íon cobre, obtida através dos parâmetros EPR, mostram que estes compostos não apresentam uma diferença significativa nas suas geometrias, porém mínimas alterações da estrutura não-planar permitem maior ou menor acesso do substrato fazendo com que alguns compostos se tornem mais eficazes em suas atividades catalíticas.

Outro detalhe importante é presença de grupos pirazinas, provavelmente devido à interação do átomo de nitrogênio deste grupo com outras espécies químicas, através de ligações de hidrogênio. É também um melhor receptor de elétrons devendo estabilizar algum intermediário de reação e provavelmente aumentar o potencial de redução do sistema.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. N. Kitajima, *Adv. Inorg. Chem.* 1992, **39**, 1.
2. D. E. Fenton, *Chem. Soc. Rev.* 1999, **28**, 159.
3. E. T. Adman, *Adv. Protein. Chem.* 1991, **42**, 145.
4. J. Müller, K. Felix, C. Maichle, E. Lengefelder, J. Strahle e U. Weser, *Inorg. Chim. Acta*, 1995, **233**, 11.
5. J. Müller, D. Schubl, C. Maichle-Mossmer, J. Strahle e U. Weser, *J. Inorg. Biochem.* 1999, **75**, 63.
6. K. D. Karlin, Z. Tyeklár e A. D. Zuberbuhler, in: *Bioinorganic Catalysis*, ed. J. Reedijk, Marcel Dekker, New York, 1993, 261-315.
7. N. Kitajima, K. Fujisawa e Y. Moro-oka, *J. Am. Chem. Soc.* 1989, **111**, 8975; N. Kitajima e Y. Moro-oka, *Chem. Res.* 1994, **94**, 737.
8. E. Monzani, L. Casella, M. Gullotti, N. Panigada, F. Franceschi e V. Papaefthymiou, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 1997, **117**, 199.
9. a) D. M. Corsi, N. M. Murthy, V. G. Young Jr e K. D. Karlin, *Inorg. Chem.* 1999, **38**, 848; b) S. Oga, *Fundamentos de Toxicologia*, Atheneu. São Paulo, 1996, 37.
10. R. H. Burdon, *Free Rad. Biol. Med.* 1995, **18**, 775.
11. B. Halliwell e J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press. Inc. New York 1999, 60.
12. T. D. Rae, P. J. Schmidt, R. A. Pufahl, V. C. Culotta e T. V. O'Halloran, *Science*, 1999, **284**, 805.
13. B. Alvarez, H. Rubbo, M. Kirk, S. Barnes, B. A. Reeman, R. Radi, *Chem. Toxicol.* 1996, **9**, 390.
14. S. Padmaja, G. L. Squarito, W. A. Pryor, *Arch. Biochem. Biophys.* 1998, **349**, 1.
15. L. Castro, M. Rodrigues, R. Radi, *J. Biol. Chem.* 1994, **269**, 29409.
16. P. A. King, V. E. Anderson, J. O. Edwards, G. Gustafson, R. C. Plumb, J. W. Suggs, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, **114**, 5430.
17. R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush, B. A. Freeman, *Arch. Biochem. Biophys.* 1991, **288**, 481.

18. D. Bartlett, D. F. Church, P. L. Bounds, W. H. Koppenol, *Free Radical Biol. Med.* 1995, **18**, 85
19. G. Ferrer-Sueta, L. Ruiz-Ramírez e R. Radi, *Chem. Res. Toxicol.* 1997, **10**, 1338.
20. a) J. S. Beckman, H. Ischiropoulos, L. Zhu, M. Van der Woerd, C. Smith, J. Chen, J. Harrison, J. C. Martin e M. Tsai, *Arch. Biochem. Biophys.* 1992, **298**, 438; b) H. Ischiropoulos, L. Zhu, J. Chen, M. Tsai, J. C. Martin, C. Smith e J. S. Beckman, *Arch. Biochem. Biophys.* 1992, **298**, 431.
21. M. K. Stern, M. P. Jensen, K. Kramer, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, **118**, 8735.
22. J. T. Groves, S. S. Marla, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, **117**, 9578.
23. C. Steinkühler I. Mavelli, L. Rossi, J. Z. Pedersen, G. Melino, U. Weser e G. Rotilio, *Biochem. Pharmacol.* 1990, **39**, 1473.
24. C. Steinkühler, J. Z. Pedersen, U. Weser e G. Rotilio, *Biochem. Pharmacol.* 1991, **42**, 1821.
25. W. Kaim e B. Schwederski, *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*. John Wiley & Sons Ltd., 1994, 187-214.
26. a) W. Kaim e J. Rall, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996, **35**, 43; b) J. S. Valentine e E. B. Gralla, *Science*, 1997, **278**, 817.
27. B. A. Averill, *Angew. Chem.* 1994, **106**, 2145; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1994, **33**, 2057.
28. C. E. Ruggiero, S. M. Carrier, W. B. Tolman, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1994, **106**, 917 e 1994, **33**, 895.
29. A. M. da C. Ferreira, *Ciências Tecnológicas*, 1998, **III**, 5.
30. M. Didonato, B. Sarkar, *Biochem. Biophys. Acta*, 1997, **1360**, 3.
31. J. S. Valentine e E. B. Gralla, *Science*, 1997, **278**, 817.
32. R. F. Jameson, *Metal Ions in Biological Systems*, 1981, **27**, 8509.
33. A. Naqui, B. Chance e E. Cadenas, *Ann. Res. Biochem.* 1986, **55**, 137.
34. O. T. G. Jones e A. R. Cross, in: *Biological Oxidants: generation and injurious consequences* (Cochrane, C. G. e Gimbone, M. A. Jr., ed.) 1992, 119 Academic Press, New York.

35. A. M. Leone, R. M. J. Palmer, R. G. Knowles, P. L. Francis, D. S. Aston e S. Moncada, *J. Biol. Chem.* 1991, **266**, 23790.
36. C. Nathan, *FASEB J.* 1992, **6**, 3051.
37. Kanner, *Methods in Enzymology*, 1996, **269**, 219.
38. D. A. Wink e J. B. Mitchell, *Free Rad. Biol. Med.* 1998, **25**, 434.
39. R. Radi, H. Rubbo e B. A. Freeman, *Ciência e Cultura*, 1995, **47**, 288.
40. F. Laval, D. A. Wink, J. A. Laval, *Res. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1996, **131**, 175.
41. D. A. Wink, I. Hanbauer, F. Laval e J. A. Cook, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994, **738**, 278.
42. D. A. Wink, M. Feelisch, Y. Vodovotz, J. Fukuto, M. B. Grisham, *Reactive Oxygen Species in Biological Systems*, in press, 1998.
43. R. E. Huie, S. Padmaja, *Free Rad. Res. Commun.* 1993, **10**, 221.
44. S. Goldstein e G. Czapaski, *Free Rad. Biol. Med.* 1995, **19**, 505.
45. Fridovich, *J. Biol. Chem.* 1989, **264**, 7761.
46. V. S. Sharma, T. G. Traylor e R. Gardiner, *Biochem.* 1987, **26**, 3837.
47. T. G. Traylor e V. S. Sharma, *Biochem.* 1992, **31**, 2847.
48. H. Ischiropoulos, L. Zhu e J. S. Beckman, *Arch. Biochem. Biophys.* 1992, **298**, 446.
49. F. Wang, P. Komarov, H. Sies e H. de Groot, *Biochem. J.* 1991, **279**, 311.
50. N. W. Kooy e J. A. Royal, *Arch. Biochem. Biophys.* 1994, **310**, 357.
51. M. C. Carreras, G. A. Pargament, S. Catz, J. J. Poderoso e A. Boveris *FEBS, Lett*, 1994, **341**, 65.
52. J. S. Beckman, Y. Z. Ye, P. Anderson, J. Chen, M. A. Accavitti, M. M. Tarpey e C. R. White, *Biol. Chem. Hopp-Seyler*, 1994, **357**, 81.
53. N. W. Kooy, S. J. Lewis, J. A. Royal, D. R. Kelly e J. S. Beckman, *Crit. Care Med.* 1997, **25**, 812.
54. S. Petruzzelli, R. Puntoni, P. Mimotti, N. Pulera, F. Baliva, E. Fornai e C. Giuntini, *Am. J. Crit. Care. Med.* 1997, **156** (6), 1902.
55. S. Giorgio, E. Linares, H. Ischiropoulos, F. J. Von Zuben, A. Yamada e O. Augusto, *Infect. Immun.* 1998, **66** (2) 807.

56. R. Radi, *Chem. Res. Toxicol.* 1998, **11**, 720.
57. J. S. Beckman e J. P. Crow, *Biochem. Soc. Trans.* 1993, **21**, 330.
58. S. V. Lymar e J. K. Hurst, *Chem. Res. Toxicol.* 1998, **11**, 714.
59. J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. M. Marshall e B. A. Freeman, *Proc. Nat. Acad. Sci (USA)*, 1990, **87**, 1620.
- 60.a) S. V. Lymar, J. K. Hurst, *Inorg. Chem.* 1998, **37**, 294; J. P. Crow, C. Spruell, C. Gunn, H. Schiropoulos, M. Tasai, C. D. Smith, R. Radi, W. H. Koppenol e J. S. Beckman, *Free Rad. Biol. Med.* 1994, **16**, 331; b) G. Merényi, J. Lind, S. Goldstein e G. Czapski, *Chem. Res. Toxicol.* 1998, **11**, 712; c) J. W. Coddington, J. W. Hurst e S. V. Lymar, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, **121**, 2438.
- 61.W. H. Koppenol, J. J. Moreno, W. A. Pryor, H. Ischiropoulos e J. S. Beckman, *Chem. Res. Toxicol.* 1992, **5**, 834.
- 62.Artigos do Forum de Debates: Reactive Species of Peroxynitrite publicados coletivamente in *Chem. Res. Toxicol.*1998, **11**, 709-721.
- 63.S. V. Lymar e J. K. Hurst, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, **117**, 8867.
- 64.R. M. Uppu, G. L. Squadrito, W. A. Squadrito e W. A. Pryor, *Arch. Biochem. Biophys.* 1996, **372**, 335.
- 65.J. Lee, J. A. Hunt e J. T. Groves, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, **120**, 7493.
- 66.W. A. Pryor, G. L. Squadrito, *Am. J. Physiol.* 1995, **268**,L-699.
- 67.J. S. Beckman, W. H. Koppenol, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1996, **271**, C1424.
68. S. V. Lymar e J. K. Hurst, *Inorg. Chem.* 1998, **37**, 294.
- 69.S. Pfeiffer, A. C. F. Gorren, K. Schmidt, E. R. Werner, B. Hansert, D. S. Mayer, *J. Biol. Chem.*1997, **272**, 3465.
70. O. Augusto, R. M. Gatti e R. Radi, *Arch. Biochem. Biophys.* 1994, **310**, 118.
- 71 R. M. Gatti, B. Alvarez, J. Vasquez-Vivar, R. Radi e O. Augusto, *Arch. Biochem. Biophys.* 1998, **349**, 36.
72. J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall e B. A. Freeman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, **87**, 1620.
73. S. Goldstein e G. Czapski, *Inorg. Chem.* 1995, **34**, 4041.
74. R. A. Marcus e N. Sutin, *Biochem. Biophys. Acta*, 1985, **811**, 265.

75. K. N. Houk, K. R. Condroski e W. A. Pryor, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, **118**, 13002.
76. J. P. Crow, C. Spruell, C. Gunn, H. Schiropoulos, M. Tasai, C. D. Smith, R. Radi, W. H. Koppenol e J. S. Beckman, *Free Rad. Biol. Med.* 1994, **16**, 331.
77. S. V. Lymar, Q. Jiang e J. K. Hurst, *Biochem.* 1996, **35**, 7855.
78. S. Goldstein e G. Czapski, *Inorg. Chem.* 1997, **36**, 5113.
79. S. Goldstein, G. L. Squadrito, W. A. Pryor, G. Czapski, *Free Rad. Biol. Med.* 1996, **21**, 965.
80. R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush, B. A. Freeman, *J. Biol. Chem.* 1991, **266**, 4244.
81. W. A. Pryor, X. Jin, G. L. Squadrito, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 11173.
82. S. Goldstein, D. Meyerstein, R. Van Eldik, G. Czapski, *J. Phys. Chem.* 1997, **101**, 7114.
83. a) J. W. Coddington, S. Wherland, J. K. Hurst, *Inorg. Chem.* 2001, **40**, 528; b) R. M. Gatti, *Reatividade do Peroxinitrito: O produto de reação do ânion superóxido e do óxido nítrico*, Tese de Doutorado, I.Q.- USP, 1998.
84. G. L. Squadrito e W. A. Pryor, *Free Rad. Biol. e Med.* 1998, **25**, 392.
85. M. G. Bonini, R. Radi, G. Ferrer-Sueta, A. M. da C. Ferreira e O. Augusto, *J. Biolog. Chem.* 1999, **274**, 10802.
86. S. Goldstein e G. Czapski, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, **120**, 3458.
87. A. Denicola, B. A. Freeman, M. Trujilo e R. Radi, *Arch. Biochem. Biophys.* 1996, **333**, 49.
88. C. E. Richeson, P. Mulder, V. W. Bowry e K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, **120**, 7211.
89. W. A. Pryor, *Free Rad. Biol. Med.* 1988, **4**, 219.
90. R. H. Bisby, S. A. Johnson A. W. Parker e S. M. Tavender, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1998, **94**, 2069.
91. R. M. Uppu, G. L. Squadrito, R. M. Bolzan e W. A. Pryor, *J. Am. Chem. Soc.* 2000, **122**, 6911.
92. V. W. Bowry e K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.* 1999, **32**, 27.

93. D. L. Steinberg, *Lancet*, 1995, **346**, 36.
94. E. Maggi, R. Chiesa, G. Melissano, R. Castellano, D. Astore, A. Grossi, G. Finardi e G. Bellomo, *Arterioscler. Thromb.* 1994, **14**, 1892.
95. P. Holvoet, D. Collen, *FASEB J.* 1994, **8**, 1279.
96. W. Palinski, V. A. Ord, A. S. Plump, J. L. Breslow D. Steinberg, J. L. Witztum, *Arterioscler. Thromb.* 1994, **14**, 605.
97. M. H. G. Medeiros, V. M. Carvalho, L. P. Farias e A. P. M. Loureiro, *Ciência e Cultura*, 1995, **47** (5/6), 336.
98. K. L. Retsky e F. Baltz, *Biochem. Biophys. Acta*, 1995, **1257**, 279.
99. B. Halliwell e J. M.C. Gutteridge, *Free Rad. Biol. Med.* Clarendon Press, Oxford, New York, 1999, 3^a ed.
100. R. Kissner, T. Nauser, P. Bugnon, P. G. Lye e W. E. Koppenol, *Chem. Res. Toxicol.* 1997, **10**, 1285.
101. W. G. Keith e R. E. Powell, *J. Chem. Soc.* 1969, **A**, 90.
102. W. A. Pryor, R. Cueto. X. Jin, W. H. Koppenol, M. Ngu-Schwemlein, G. L. Squadrito, P. L. Uppu e R. M. Uppu, *Free Rad. Biol. Med.* 1995, **18**, 75.
103. G. R. Buettner e R. P. Mason, *Methods Enzymol.* 1990, **186**, 127.
104. P. Tordo, *Electron Paramagnetic Resonance* 1998, **16**, 116.
105. a) G. R. Buettner e L. W. Oberley, *Biochem. Biophys. Commun.* 1978, **83**, 69;
b) G. R. Buettner, In: L. W. Oberley (Ed.), *Superoxide Dismutase*, vol. 2, CRC Press, Boca Raton, 1982, p. 63.
106. F. E. Mabbs e D. J. Machin, *Magnetism and Transition Metal Complexes*, Chapman Hall, London, 1973.
107. A. Saha, S. Goldstein, D. Cabelli e G. Czapki, *Free Rad. Biol. Med.* 1998, **24**, 653.
108. O. W. Howart e J. R. Hunt, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1979, **9**, 1388.
109. Z. Y. Jiang, A. C. S. Woolard e S. P. Wolff, *Lipids*, 1990, **26**, 853.
110. H. Esterbauer e K. H. Cheeseman, *Meth. Enzymol.* 1990, **186**, 407.
111. M. Linss e U. Weser, *Inorg. Chim. Acta*, 1987, **138**, 163.
112. C.-M. Liu, R.-G. Xiong, X.-Z. You, *Polyhedron*, 1997, **16**, 119.
113. M. Shakir, O. S. M. Nasman e S. P. Varkey, *Polyhedron*, 1996, **15**, 309.

114. P. S. Subramanian e D. Srinivas, *Polyhedron*, 1996, **15**, 985.
115. a) H. M. Hassan, *Free Rad. Biol. Med.* 1988, **5**, 377; b) S. F. A. Kettle, In: *Physical Inorganic Chemistry - A Coordination Chemistry Approach*, Oxford, New York, 1998, 75-84
116. B. H. J. Bielski, G. G. Shiue e S. Bajuk, *J. Phys. Chem.* 1980, **84**, 830.
117. M. Linss e U. Weser, *Inorg. Chim. Acta* 1986, **125**, 117.
118. A. M. Ramadan e M. M. El-Naggar, *J. Inorg. Biochem.* 1996, **63**, 143.
119. M. L. P. dos Santos, Compostos de Cobre com Bases de Schiff Polidentadas: Preparação, Caracterização e Estudos de Reatividade, *Tese de Mestrado, I. Q. – USP- SP*, 1997.
120. E. Monzani, L. Quinti, A. Perrotti, L. Casella, M. Gullotti, L. Randaccio, S. Geremia, G. Nardin, P. Faleschini e G. Tabbi, *Inorg. Chem.* 1998, **37**, 553.
121. A. L. Nivorozhkin, H. Toftlund, P. L. Jorgensen e L. E. Nivorozhkin, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1996, 1215.
122. R.–G. Xiong, B.–L. Song, J.–L. Zuo e X.–Z. You, *Polyhedron* 1996, **15**, 903.
123. K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectroscopy of Inorganic and Coordination Compounds*, 1978, J. Wilwey, Nova York, p.212.
124. I. S. Butler e J. F. Harrod, *Química Inorgánica*, Addison-Wesley Iberoamericana, S. A. 1992, 429.
125. M. E. Hossain, M. N. Alam, M. A. Ali, M. Nazimuddin, F. E. Smith e R. C. Hynes, *Polyhedron*, 1996, **15**, 973.
126. R. K. Parashar, R. C. Sharma e G. Moham, In: *Biology of Copper Complexes*, J. R. Sorenson ed. Humana Press, Clifton, 1987, 533.
127. E. N. Fielden, G. Rotilio, In R. Lontie (Ed.) *Copper Proteins and Copper Enzymes*, Vol. II, cap. 2 CRC Press, Boca Raton, 1984.
128. N. Matsumoto, T. Nazaki, H. Ushio, K. Motoda, M. Ohba, G. Mago e H. Okawa, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1993, 2157.
129. M. Mimura, T. Nakashima e N. Matsumoto, *Inorg. Chem.* 1998, **37**, 3553
130. L.-O. Klotz, J. Muller, M. Fausel, R. Gebhardt e U. Weser, *Biochem. Pharmacol.* 1996, **51**, 919.
131. R. Schubert, *Proc MoBBEL* 1994, **8**, 11.

132. J. S. Beckman, W. H. Koppenol, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1996, **271**, C 1424.
133. P. M. Hanna e R. P. Mason, *Arch. Biochem. Biophys.* 1992, **295**, 205.
134. E. K. Hodgson e I. Fridovich, *Biochem.* 1975, **14**, 5299.
135. a) S. Goldstein, A. Saha, S. V. Lymar e G. Czapski, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, **120**, 5549; b) K. Uchida e S. Kawakishi, *J. Biol. Chem.* 1994, **269**, 2405.
136. M. B. Yim, P. B. Chock e E. R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**, 5006.
137. M. B. Yim, P. B. Chock e E. R. Stadtman, *J. Biol. Chem.* 1993, **268**, 4099.
138. S. Sankarapandi e J. L. Zweier, *J. Biol. Chem.* 1999, **274**, 1226.
139. S. Goss, R. J. Singh e B. Kalyanaraman, *J. Biol. Chem.* 1999, **274**, 28233.
140. H. Zang, J. Joseph, F. Christopher e B. Kalyanaraman, *J. Biol. Chem.* 2000, **275**, 14038.
141. A. Denicola, J. M. Souza, R. M. Gatti, O. Augusto e R. Radi, *Free Rad. Biol. Med.* 1995, **19**, 11.
142. T. J. Evans, L. D. K. Buttery, A. Carpenter, D. R. Springall, J. M. Polak e J. Cohnen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, **93**, 9553.
143. J. K. Hurst, e S. V. Lymar, *Acc. Chem. Res.* 1999, **32**, 520.
144. M. Denis, *J. Leukocyte Biol.* 1994, **55**, 682.
145. J. W. Coddington, S. Wherland e J. K. Hurst, *Inorg. Chem.* 2001, **40**, 528.
146. S. V. Lymar, J. K. Hurst, *Chem. Res. Toxicol.* 1998, **11**, 714.
147. M. K. Stern, M. P. Jensen e K. Kramer, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, **118**, 8735.
148. R. M. Uppu, G. L. Squadrito, W. A. Pryor, *Arch. Biochem. Biophys.* 1996, **327**, 335.
149. R. Radi, T. P. Cosgrove, J. S. Beckman e B. A. Freeman, *Biochem. J.* 1993, **290**, 51.
150. R. Melli, T. Nauser, W. H. Koppenol, *Helv. Chim. Acta*, 1999, **103**, 722.
151. S. Goldstein, G. Czapski, *J. Am. Soc.* 1999, **121**, 2444.
152. J. S. Beckman, In *Nitric Oxide. Principles and Actions*; Lancaster, Ed.; Academic Press: San Diego, 1996, 1-82.
153. S. V. Lymar e J. K. Hurst, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, **117**, 8867.

154. J. A. Dean, *Lange's Handbook of Chemistry* 12th Ed., 1979, pp 5-13, McGraw-Hill Book Co., New York.
155. S. Goldstein, G. Czapski, J. Lind e G. Merényi, *Chem. Res. Toxicol.* 2001, **14**, 1273.
156. J. P. Eiserich, A. G. Estévez, T. V. Bamberg, Y. Z. Ye, P. H. Chumley, J. S. Beckman, B. A. Freeman, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 1999, **96**, 6365.
157. H. Ischiropoulos, *Arch. Biochem. Biophys.* 1998, **356**, 1.
158. A. Van der Vliet, J. P. Eiserich, B. Halliwell e C. E. Cross, *J. Biol. Chem.* 1997, **272**, 7617.
159. J. P. Eiserich, M. Hristova, C. E. Cross, A. D. Jones, B. A. Freeman, B. Halliwell e A. Van der Vliet, *Nature*, 1998, **391**, 393.
160. M. R. Gunther, L. C. Hsi, J. F. Curtis, L. J. Marnett, T. E. Eling e R. P. Mason, *J. Biol. Chem.* 1997, **272**, 17086.
161. S. Pfeiffer e B. Mayer, *J. Biol. Chem.* 1998, **273**, 27280.
162. K. A. Skinner, C. R. White, R. Patel, S. Tan, S. Barnes, M. Kirk, V. Darley-Usmar e D. A. Parks, *J. Biol. Chem.* 1998, **273**, 24491.
163. C. X. Santos, E. I. Anjos e O. Augusto, *Arch. Biochem. Biophys.* 1999, **372**, 285.
164. L. A. MacMillan-Crow e J. A. Thompson, *Arch. Biochem. Biophys.* 1999, **366**, 82.
165. K. Hensley, M. L. Maidt, Q. N. Pye, C. A. Stewart, M. Wack, T. Tabatabaie e R. A. Floyd, *Anal. Biochem.* 1997, **251**, 187.
166. J. S. Beckman, *Chem. Res. Toxicol.* 1996, **9**, 836.
167. S. P. A. Goss, N. Hogg e B. Kalyanaraman, *Arch. Biochem. Biophys.* 1999, **363**, 333.
168. S. Gehring, P. Fleischauser, B. Nuber e J. Weiss, *Inorg. Chem.* 1991, **30**, 2148.
169. J. T. Groves e S. S. Maria, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, **117**, 9578.
170. M. S. Ramezani, S. Padmaja e W. H. Koppenol, *Chem. Res. Toxicol.* 1996, **9**, 232.
171. R. Radi, *Chem. Res. Toxicol.* 1998, **11**, 720.

172. a) H. Zhang, G. L. Squadrito e W. Pryor, *Nitric Oxide: Biol. Chem.* 1997, **1**, 301; b) A. Daiber, M. Mehl e V. Ulrich, *Nitric Oxide: Biol. Chem.* 1998, **2**, 259.
173. J-N. Lemerrier, S. Padmaja, R. Cueto, G. L. Squadrito R. M. Uppu, W. A. Pryor, *Arch. Biochem. Biophys.* 1997, **345**, 160.
174. S. N. Chen, V. W. Cope e M. Z. Hoffman, *J. Phys. Chem.* 1973, **77**, 1111.
175. J. Lilic, R. J. Hanrahan e A. Henglein, *Radiat. Phys. Chem.* 1978, **11**, 225.
176. A. Nagele, K. Felix e E. Lengfelder, *Biochem. Pharmacol.* 1994, **47**, 555.
177. A. Gow, D. Duran, S. R. Thom e H. Ischiropoulos, *Arch. Biochem. Biophys.* 1996, **333**, 42.
178. S. V. Lymar, Q. Jiang e J. K. Hurst, *Biochem.* 1996, **35**, 7855.
179. M. L. P. dos Santos, A. F. Alário. A. S. Mangrich e A. M. da Costa Ferreira, *J. Inorg. Biochem.* 1998, **71**, 71.
180. K. Sato, J. Akaike, M. Kohno, M. Ando e N. Maeda, *J. Biol. Chem.* 1992, **267**, 25371.
181. M. A. A. Azzellini e A. M. D. C. Ferreira, *J. Inorg. Biochem.* 2001, manuscrito submetido.
182. B. Kratochvil, E. Lorah e C. Garber, *Anal. Chem.* 1969, **41**, 1793.
183. E. J. Baran, B. S. Parajón-Costa, T. Rojo, R. Sáez-Puche, F. Fernández, R. M. Tótaró, M. C. Apella, S. B. Etcheverry e M.H. Torre, *J. Inorg. Biochem.* 1995, **58**, 279.
184. K. Jeyasubramanian, S. A. Samath, S. Thambidurai, R. Murugesan e S. K. Ramalingan, *Transition Met. Chem.* 1995, **20**, 76.
185. M. Munakata e s. Kitagawa, In: *Copper Coordination Chemistry: Biochemical and Inorganic Perspectives*, Ed. Adenine Press, New York, 1983, pp. 473-481.
186. D. N. Hendrickson, R. C. Long, Y. T. Hwang e H-R. Chang, In: *Biological & Inorganic Copper Chemistry*, Ed. Adenine Press, New York, 1985, pp. 223-237.
187. J. A. Fee e P. E. Di Corleto, *Biochem.* 1973, **12**, 4893.
188. G. D. Lawrence e D. T. Sawyer, *Biochem.* 1979, **18**, 3045.
189. C. S. St. Clair, H. B. Gray e J. S. Valentine, *Inorg. Chem.* 1992, **31**, 925.

190. M. F. J. M. Verhagen, E. T. M. Meussen e W. R. Hagen, *Biochem. Biophys. Acta*, 1995, **1244**, 99.
191. M. L. P. Santos, I. A. Bagatin, E. m. Pereira e A. M. Da C. Ferreira, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2001, 838.
192. R. Werner, *Essential Biochemistry and Molecular Biology*, 1992, Apleton & Lange, USA, 304.
193. J. Müller, K. Felix, C. Maicchle, E. Lengfelder, J. Strahle e U. Weser, *Inorg. Chim. Acta*, 1995, **233**, 11.
194. a) C. R. Cantor e P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry*, Parte II, 1980, W. H. Freeman e Company, Nova York; b) G. W. Ewing, *Métodos Instrumentais de Análise Química*, vol I, 1972, ed. Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 188.
195. S. J. Lau, B. Sarkar, *J. Biol. Chem.* 1971, **246**, 5938.
196. B. Wojciech, J. Christodoulou, P. J. Sadler, A. Tucker, *J. Inorg. Biochem.* 1998, **70**, 33.
197. T. Peters, *Adv. Protein Chem.* 1985, **37**, 161.
198. G. Multhaup, T. Ruppert, A. Schlcksupp, L. Hesse, E. Bill, R. Pipkorn, C.L. Masters e K. Beyreuther, *Biochem.* 1998, **37**, 7224.
199. M. Wiedau-Pazos, J. J. Goto, S. Rabizadeh, E. B. Gralla, J. A. Roe, M. K. Lee, J. S. Valentine e D. E. Bredesen, *Science*, 1996, **271**, 515.
200. H. S. Yim, J. H. Kang, P. B. Chock, E. R. Stadtman e M. B. Yim, *J. Biol. Chem.* 1997, **272**, 8861.