UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

CLÉIA JUSTINO NUNES

**Investigação da reatividade de miméticos de
tirosinase na viabilidade celular de melanomas**

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5859

O original se encontra disponível na secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

06/05/2013

CLÉIA JUSTINO NUNES

**Investigação da reatividade de miméticos de tirosinase na
viabilidade de melanomas**

Dissertação de Mestrado

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

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

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Nunes, Cléia Justino
N972i   Investigação da reatividade de miméticos de tirosinase na
viabilidade de melanomas / Cléia Justino Nunes. -- São Paulo,
2013.
106p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Ferreira, Ana Maria da Costa

1. Química bioinorgânica 2. Complexos de cobre I. T. II.
Ferreira, Ana Maria da Costa, orientador.

546.3   CDD

Cléia Justino Nunes

**Investigação da reatividade de miméticos de tirosinase na
viabilidade de melanomas**

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*À minha mãe, fonte de inspiração e exemplo de
força, à minha família por todo amor e apoio,
e à minha querida Lívia presente especial, que
me fortificou enchendo minha vida de alegria.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que esse trabalho fosse desenvolvido e concluído.

À querida Prof^a Ana Maria da Costa Ferreira, pela orientação, amizade e companheirismo, por ter aceitado me orientar de bom coração desde o primeiro contato, e me auxiliar com sua experiência e motivação.

Ao Prof. Marius Réglier e equipe, em especial Renaud Hardré e Bruno Faure, pelo ligante 2,2 –bis(aminometil)difenil, e compostos[CuN22] e [CuN22-22].

Ao Dr. Roger Chammas, da Faculdade de Medicina da USP.

À Prof^a Dra. Lia Nakao e sua aluna Beatriz Essenfelder Borges, Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, por terem me recebido em seu laboratório e pela colaboração nos experimentos com os melanomas, que foram essenciais para o tema estudado nesta dissertação, pelos comentários, discussões e esclarecimentos de assuntos pertinentes ao trabalho desenvolvido.

À Prof.^a Dra. Carla Columbano de Oliveira e a sua aluna Marcela Bach Pietro, do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química USP, pela colaboração nos experimentos com DNA e pelas discussões, que foram de grande ajuda na realização deste trabalho.

À Dra Vivian Chagas da Silveira pelas instruções de procedimentos experimentais e pela amizade.

Aos Professores Dra.Vera Regina Constantino, Dra. Helena Petrilli, Dr. Breno Espósito e Dra. Denise Oliveira Silva e aos seus alunos pelas discussões nos seminários de grupo.

Aos amigos funcionários Ricardo Couto pelo auxílio e ajuda na realização de experimentos e utilização dos equipamentos do laboratório, e à Maria Aparecida Paiva Lopes por sempre ser tão prestativa e amiga.

À amiga Juliana de Carvalho pelo incentivo de realizar meu mestrado, e à Prof^a Fátima Paredes pelo esclarecimento em relação ao mundo acadêmico.

Aos Professores Dr. Koiti Araki, Dra. Neyde Yukie Murakami Iha, Dr Henrique Toma e novamente a Dra. Vera Constantino pela oportunidade de monitorar em suas aulas e contar com o apoio sempre que necessário.

Aos amigos que fazem ou fizeram parte do grupo Maurício, ao querido Lincoln, Henri, Paulo, Saulo, Ricardo, a querida amiga Queite e Gustavo pela companhia, discussões científicas e não científicas.

Aos amigos da salinha Karina e Otávio pela agradável convivência, e aos das minhas casas por esse percurso Amanda, Raul, Gabi, Gui pela companhia e pela boa convivência.

Ao Pessoal da secretária sempre muito prestativo.

Ao querido José Carlos e Gustavo serem tão prestativos e gentis e sua orientadora Dra. Shirley Schreier.

À querida amiga Mayara que tive a sorte de conhecer e conviver, por toda ajuda tanto científica quanto pessoal, ao amigo Kassio com o qual pude contar em muitos momentos difíceis, ao amigo Iguatinã que sempre me apoiou muito, a minha amiga Rita de tempos antigos e presente, a Carol Luz pela amizade e companhia desde a graduação, ao amigo Marcos Brown, aos amigos Alfredo, Gustavo Peroti, queridas Ana Paula e Michele, Douglas, André e Manu e a todos do grupo da Física.

A minha mãe por todo apoio, por saber que ela viveu meus sentimentos, tanto os bons quanto os ruins e por estar sempre presente, ao meu querido pai por sempre confiar em mim, e mostrar que com ele sempre poderei contar, a minha irmã por todo amor e carinho, ao meu cunhado por estar sempre presente, agradeço por ter essa família unida.

À amiga Milena que no início me apoiou bastante, quando a distância de casa incomodava, a amiga Matsuko por me receber em sua casa com tanto carinho.

Ao João Vitor por me ajudar a formar o maior projeto da minha vida, à minha filhinha Lívia, o anjo que mesmo tão pequeno pôde me proporcionar tanta alegria.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

E a todos que direta e indiretamente participaram da realização deste trabalho, que torceram e torcem por mim, e se agradam das minhas vitórias, que eu possa retribuir sempre as boas vibrações que meus amigos depositam sobre mim.

RESUMO

Nunes, C. J. - **Investigação da reatividade de miméticos de tirosinase na viabilidade celular de melanomas**. 2013 (106 p.). Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Compostos de cobre(II) dinucleares, contendo ligantes nitrogenados, foram preparados, caracterizados por diversas técnicas espectroscópicas (UV/Vis, IV e EPR) e tiveram sua reatividade frente a células melanomas (B16F10 e TM1) verificada. Estes compostos são miméticos da tirosinase, enzima contendo em seu sítio ativo dois íons de cobre, presente em bactérias, plantas, animais e humanos, sendo responsável pela oxidação de fenóis a catecóis e destes às correspondentes quinonas. São enzimas relacionadas também à melanogênese, isto é, síntese de melanina, com formação de polímeros eumelanina e feomelanina, responsáveis pela pigmentação de nossa pele, olhos e cabelos. Os compostos mononucleares correspondentes foram também preparados e estudados, para efeito de comparação. Os resultados indicaram que os complexos dinucleares são mais ativos, tanto como miméticos da tirosinase, quanto em relação à citotoxicidade frente a melanomas, que os análogos mononucleares, mostrando que a estrutura é um fator determinante de ambas as atividades biológicas aqui estudadas. Ensaio de interação com as biomoléculas DNA e albumina humana (HSA) através de espectroscopia de UV/Vis e dicroísmo circular (CD) respectivamente, também foram realizados e complementaram os estudos. Atividade nuclease significativa foi observada para os complexos dinucleares, em presença de peróxido de hidrogênio, através de ensaios de clivagem em gel de agarose, buscando uma possível elucidação dos mecanismos de ação dos complexos em estudo.

Palavras-chave: Cobre, miméticos de tirosinase, melanoma, citotoxicidade, DNA, HSA.

ABSTRACT

Nunes, C. J. - **Investigation on the reactivity of tyrosinase mimics in the cell viability of melanomas.** 2013 (106 p.). Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Dinuclear copper(II) complexes with nitrogenated ligands were prepared, characterized by spectroscopic techniques (UV/Vis, IR and EPR) and had their reactivity verified towards melanoma cells (B16F10 and TM1). These compounds are tyrosinase mimics, an enzyme present in bacteria, fungi, animals and humans, capable of catalyzing the oxidation of phenols to catechols, and catechols to the corresponding quinines, and containing two copper ions in its active site. Tyrosinases are also enzymes related to melanogenesis, assisting the formation of eumelanin and pheomelanin polymers, responsible for the colour of our eyes, skin and hair. The corresponding mononuclear copper(II) complexes were also prepared and comparative studies were performed. The results indicated that the dinuclear species are more reactive than the mononuclear ones, both as tyrosinase mimics as in cytotoxicity damage to melanoma cells, showing that the structure of such species is a determining factor of both biological activities. Experiments at the interactions of these complexes with the biomolecule DNA and human serum albumin, were also conducted by UV/Vis and circular dichroism spectroscopies, respectively, and complemented the previous studies. Nuclease activity was also assessed, in the presence of hydrogen peroxide, monitored by cleavage assays in agarose gel, in order to contribute to the elucidation of the mechanisms of action of these complexes.

Keywords: Copper, mimics of tyrosinase, melanoma, cytotoxicity, DNA, HSA.

OBJETIVOS:

Os estudos aqui relatados visaram verificar a influência de complexos dinucleares de cobre, miméticos da tirosinase, sobre a viabilidade celular de melanomas. O principal objetivo seria correlacionar as características estruturais da enzima tirosinase, que é necessária para a síntese de melanina em melanócitos, com uma possível influência desta enzima no crescimento de células transformadas, os melanomas. A ideia central era de que um composto mimético da tirosinase, com atividade similar ou estrutura semelhante à de seu sítio ativo, além de mimetizar melhor a chamada atividade tirosinase, de oxidação de substratos fenólicos e/ou de catecóis, poderia ter também uma influência maior na viabilidade celular de células malignas, isto é, poderia ser capaz de ativar ou, ao contrário, causar mais danos às células cancerosas que um complexo de cobre não-mimético desta enzima. Para tanto, dois complexos de cobre, contendo ligantes do tipo amina e imina, $[Cu_2(N22-22)]^{2+}$ e $[Cu_2(apyhist)_2(dpam)]^{4+}$, foram sintetizados e caracterizados através de diferentes técnicas, incluindo espectroscopias UV/Vis, Infravermelha e Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR). Posteriormente, estes compostos tiveram sua atividade tirosinase verificada e sua possível toxicidade analisada frente a dois tipos de células melanomas, TM1 e B16F10. Investigações análogas foram feitas com os complexos mononucleares correspondentes, $[Cu(apyhist)H_2O]^{2+}$ e $[Cu(N22)]^+$, para efeito de comparação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sítio ativo da tirosinase no estado Cu(II) (oxi-tirosinase) com ligação na forma $\mu - \eta^2:\eta^2$.

Figura 2. Ciclo catalítico da tirosinase, segundo ref.30.

Figura 3. Etapas da biossíntese de melanina.

Figura 4. Possível associação entre mutação genética e predominância das etapas de síntese de feomelanina.

Figura 5. Modelos de progressões de metástases.

Figura 6. Estruturas moleculares de monômeros da (A) feomelanina e (B) eumelanina.

Figura 7. Estrutura do DNA e principais pontos de ligações de metais.

Figura 8. Etapas da síntese do complexo $\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}(\text{ClO}_4)_2$.

Figura 9. Etapas da síntese do ligante ponte.

Figura 10. Etapas da síntese do complexo $\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}(\text{ClO}_4)_4$.

Figura 11. Síntese do ligante mononuclear (N22).

Figura 12. Síntese do ligante (N22-22).

Figura 13. Espectros eletrônicos do complexo $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (1).

Figura 14. Espectros eletrônicos do complexo $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (2).

Figura 15. Espectros eletrônicos do complexo $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ (3) e $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (4).

Figura 16. Espectro vibracional do composto $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (1).

Figura 17. Espectro vibracional do composto $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (2).

Figura 18. Espectro vibracional do composto $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ (3).

Figura 19. Espectro vibracional do composto $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (4).

Figura 20. Espectros de EPR dos complexos no estado sólido, a 77K. $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (1); $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (2); $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ (3) e $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (4).

Figura 21. Espectros de EPR dos complexos em solução saturada, a 77K. $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (1) em água; $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (2) em acetonitrila; $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ (3) em acetona; $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (4) em acetona.

Figura 22. Etapas da oxidação de fenóis a catecóis, e catecóis a quinonas.

Figura 23. Curvas de oxidação da L-Dopa, variando-se a concentração do complexo $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (1).

Figura 24. Dependência da velocidade inicial de oxidação da L-dopa em função da concentração do complexo $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (1).

Figura 25. Curvas de oxidação da L-Dopa, variando-se a concentração do complexo $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (2).

Figura 26. Curvas de oxidação da L-Dopa, variando-se a concentração do complexo $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (2), referentes ao 1º processo.

Figura 27. Dependência da velocidade inicial de oxidação da L-dopa em função da concentração do complexo $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (2). A) 1ª. etapa; B) 2ª. etapa.

Figura 28. Curvas de oxidação da L-Dopa, variando-se a concentração do complexo $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ (3).

Figura 29. Dependência da velocidade inicial da oxidação da L-dopa em função da concentração do complexo $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ (3).

Figura 30. Curvas de oxidação da L-Dopa, variando-se a concentração do complexo $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (4).

Figura 31. Dependência da velocidade inicial da oxidação da L-dopa em função da concentração do complexo $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (4).

Figura 32. Curvas de oxidação da L-Dopa em variadas concentrações (4-8 mM) catalisada pelo complexo $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^+$ (1).

Figura 33. Dependência da velocidade inicial da oxidação da L-dopa, catalisada pelo complexo $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (1).

Figura 34. Curvas de oxidação da L-Dopa em variadas concentrações (4-8 mM) catalisada pelo complexo $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (2).

Figura 35. Dependência da velocidade inicial da oxidação da L-dopa, catalisada pelo complexo $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (2).

Figura 36. Curvas de oxidação da L-Dopa em variadas concentrações (4-8 mM) catalisada pelo complexo $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ (3).

Figura 37. Dependência da velocidade inicial da oxidação da L-dopa, catalisada pelo complexo $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ (3).

Figura 38. Curvas de oxidação da L-Dopa em variadas concentrações (4-8 mM) catalisada pelo complexo $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (4).

Figura 39. Curva da velocidade inicial da oxidação da L-dopa, catalisada pelo complexo $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (4).

Figura 40. Comparação da atividade catalítica dos complexos em função do tempo.

Figura 41. Comparação das velocidades obtidas em função das concentrações dos complexos utilizados.

Figura 42. Curva analítica da amplitude dicróica, em 564 nm, *versus* concentração da espécie $[\text{Cu}(\text{HSA})]$.

Figura 43. Espectros de CD da titulação de HSA com os respectivos compostos $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$, $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ e $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$.

Figura 44. Espectro de CD para monitoramento da variação na estrutura secundária da HSA, em função da interação com os complexos $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$, $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ e $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$.

Figura 45. Ensaios de viabilidade celular de células melanoma B16F10, encubadas com os diferentes complexos de cobre(II), durante 24 horas.

Figura 46. Ensaio de viabilidade celular de células melanoma TM1MNG-3 encubadas com os diferentes complexos de cobre, durante 24 horas.

Figura 47. Ensaios de adesão das células B16F10, incubadas com os complexos de cobre por 24 horas, realizados em microplacas previamente tratadas com matrigel.

Figura 48. Espectros eletrônicos da titulação dos complexos de cobre(II): $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$, $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ e $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$, titulados com quantidades crescentes de DNA.

Figura 49. Reta da intensidade de absorção pela concentração de DNA (calf-thymus) adicionado, para os complexos estudados.

Figura 50. Regressão linear dos complexos para cálculo da constante de interação com DNA.

Figura 51. Diferentes formas de DNA.

Figura 52. Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com os complexos, em tempos e concentrações variadas, sem adição de peróxido de hidrogênio.

Figura 53. Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com os complexos na concentração de 0,5mM durante 60 min, sem adição de peróxido de hidrogênio.

Figura 54. Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com os complexos na concentração de 0,9 mM durante 60 min, sem adição de peróxido de hidrogênio.

Figura 55. (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (**1**) por períodos variados, com peróxido de hidrogênio. (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A).

Figura 56. (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (**2**) por períodos variados, com peróxido de hidrogênio. (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A).

Figura 57. (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ (**3**) por períodos variados, com peróxido de hidrogênio. (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A).

Figura 58. (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (**4**) por períodos variados, com peróxido de hidrogênio. (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados de análise elementar para os compostos sintetizados.

Tabela 2. Caracterização das bandas observadas ($\lambda_{\text{máx}}$) e respectivos valores de absortividade molar (ϵ) dos complexos.

Tabela 3. Principais bandas de absorção observadas na região do infravermelho para os complexos estudados.

Tabela 4. Valores dos parâmetros de $g_{\perp}$ e $g_{\parallel}$ dos compostos sintetizados, no estado sólido, a 77K.

Tabela 5. Valores do parâmetro g e das constantes hiperfinas (A) dos compostos sintetizados, em solução congelada a 77K.

Tabela 6. Velocidades iniciais da oxidação da *L*-Dopa para diferentes concentrações do Complexo **1**; [L-Dopa] = 8,0 mM.

Tabela 7. . Velocidades iniciais da oxidação da *L*-Dopa para diferentes concentrações do Complexo **2**; [L-Dopa] = 8,0 mM.

Tabela 8. . Velocidades iniciais da oxidação da *L*-Dopa para diferentes concentrações do Complexo **3**, [L-Dopa] = 8,0 mM.

Tabela 9. Velocidades iniciais da oxidação da *L*-Dopa para diferentes concentrações do Complexo **4**; [L-Dopa] = 8,0 mM.

Tabela 10. Velocidades iniciais em função da concentração de L-Dopa, para a reação catalisada pelo [Complexo **1**]=320 μ M.

Tabela 11. Velocidades iniciais em função da concentração de L-Dopa, para a reação catalisada pelo [Complexo **2**] = 320 μ M.

Tabela 12. Velocidades iniciais em função da concentração de L-Dopa, para a reação catalisada pelo [Complexo **3**]=320 μ M.

Tabela 13. Velocidades iniciais em função da concentração de L-Dopa, para a reação catalisada pelo [Complexo **4**] = 320 μ M.

Tabela 14. Valores encontrados para a constante de pseudo 1ª ordem da cinética catalítica dos compostos.

Tabela 15. Valores encontrados para a constante de 2ª ordem da cinética catalítica dos compostos.

Tabela 16. Valores de constantes de estabilidade relativas, determinadas para os compostos de cobre em experimentos competitivos com a HSA.

Tabela 17. Porcentagens estimadas para α - hélice da HSA, usando os cálculos de aproximação, através das curvas de Dicroísmo Circular.

Tabela 18. Porcentagens estimadas da viabilidade celular das células B16F10, relacionadas às concentrações utilizadas dos complexos de cobre.

Tabela 19. Porcentagens estimadas da viabilidade celular das células TM1MNG-3, relacionadas às concentrações utilizadas dos complexos de cobre.

Tabela 20. Tabela das porcentagens aproximadas de adesão das células B16F10 incubadas com os complexos estudados.

ESTRUTURAS DOS COMPLEXOS DE COBRE(II) PREPARADOS E ESTUDADOS

$[\text{Cu}(\text{apyhyst})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$
Composto 1

$[\text{Cu}_2(\text{apyhyst})_2\text{dpam}]^{4+}$
Composto 2

$[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$
Composto 3

$[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$
Composto 4

*OTf = CF_3SO_3^-

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO	18
2. PARTE EXPERIMENTAL I – Síntese e Caracterização	33
2.1. Reagentes e Soluções	33
2.2. Sínteses	33
2.3. Métodos de Caracterização e Instrumentação	37
3. PARTE EXPERIMENTAL II – Reatividade e Interações com Biomoléculas	38
3.1. Verificação da Atividade Tirosinase, Catálise da Oxidação da L-Dopa	38
3.2. Medidas de Dicroísmo Circular: Estabilidade Termodinâmica	38
3.3. Medidas de Dicroísmo Circular: Modificações na Estrutura Secundária da HSA	38
3.4. Ensaio de Viabilidade Celular com Células Melanoma B16F10 e TM1MNG-3	39
3.5. Ensaio de Adesão Celular com Células B16F10	40
3.6. Interações dos Complexos com DNA – Titulação dos Complexos com DNA	40
3.7. Reatividade frente ao DNA: Experimentos de Atividade Nuclease	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO I - Síntese e Caracterização	42
4.1. Análise Elementar	42
4.2. Caracterização Espectroscópica dos Complexos	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO II - Reatividade e Interações com Biomoléculas	56
5.1. Verificação da Atividade Tirosinase – Catálise da Oxidação da L-Dopa	56
5.2. Medidas de Dicroísmo Circular: Estabilidade Termodinâmica	72
5.3. Medidas de Dicroísmo Circular: Modificações na Estrutura Secundária da HSA	76
5.4. Ensaio de Viabilidade Celular com Células Melanoma B16F10 e TM1MNG-3	79
5.6. Ensaio de Adesão Celular com Células B16F10	83
5.7. Interações dos Complexos com DNA – Titulação dos Complexos com DNA	85
5.8. Reatividade frente ao DNA: Experimentos de Atividade Nuclease	89
6. CONCLUSÕES	98
7. REFERÊNCIAS	101

1. INTRODUÇÃO

Os organismos vivos são constituídos basicamente de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, e em doses um pouco menores, fósforo e enxofre. Mas esses elementos sozinhos não propiciariam a vida como a conhecemos, em suas múltiplas e variadas formas. É fundamental a presença de vários elementos químicos, tais como sódio, potássio, cálcio e magnésio, que estão presentes nos seres vivos em altas concentrações. Outros, como cobalto, cobre, ferro e zinco são conhecidos como elementos-traço, cuja necessidade diária é muito menor do que dos primeiros, mas que são também essenciais para a manutenção da vida. Cada um destes elementos tem uma homeostase bem controlada, uma vez que em excesso ou em falta podem causar transtornos [1]. Por exemplo, a falta de ferro ou de cobre causa doenças como a anemia [2] e, por outro lado, se em níveis excessivos no organismo estes íons podem ser tóxicos [3].

O reconhecimento da importância de metais em biologia, medicina e no meio ambiente, tem aumentado consideravelmente nos últimos 25 anos. Íons metálicos como manganês, ferro e cobre são essenciais à vida e estão presentes em metaloproteínas e metaloenzimas. O manganês, por exemplo, apresenta um sítio tetranuclear em fotossistemas de plantas que realizam a redução catalisada de água. Entretanto, a sua grande participação diz respeito a um outro período geológico, em que cianobactérias apresentam enzimas dependentes de manganês. A reação envolvida gerava oxigênio, liberado para a atmosfera, e que foi mudando naturalmente e progressivamente a atmosfera terrestre redutora para uma atmosfera oxidante. Isso permitiu que o processo de produção de ATP fosse mais eficiente (respiração *versus* fermentação) e provocou uma maior biodisponibilidade do cobre divalente, devido ao aparecimento da molécula de dióxigênio, em detrimento do ferro divalente, oxidado ao ferro trivalente. Assim, enquanto em atmosfera redutora predominavam íons de Fe^{2+} e de Cu^+ , ao se passar para atmosfera oxidante, esses íons passaram a estar presentes nas formas oxidadas, isto é, como Fe^{3+} e Cu^{2+} . Sabe-se que os íons metálicos apresentam estruturas diferentes, dependendo de seu estado de oxidação, podendo se coordenar a grupos nitrogenados, oxigenados ou sulfurados, e desempenhando as funções mais variadas: transporte de oxigênio, armazenamento do metal, catálise da oxidação de substratos como aminas, carboidratos, fenóis ou catecóis, transferência de elétrons e redução de substratos, como nas enzimas nitrito redutase ou sulfato redutase, entre outras [4].

No caso do ferro, biodisponível graças a quelantes que permitem sua solubilização na forma de compostos de Fe^{3+} , são inúmeras as enzimas e proteínas dependentes deste metal que são exaustivamente estudadas. A ferritina é uma proteína que mantém a reserva de ferro dentro das células mudando seu estado de oxidação de Fe^{2+} para Fe^{3+} para o armazenamento, impedindo a

toxicidade do ferro livre, e liberando-o quando necessário, concomitante com a sua redução [5]. Há também as ferroporfirinas (hemoglobina, mioglobina, diversos citocromos, catalases e peroxidases) [6], que contêm o grupo hemínico, a hemeritrina, que pode se ligar reversivelmente ao dioxigênio e que, diferentemente da hemoglobina, possui um sítio ativo com dois átomos de ferro ligados a carboxilatos e histidinas, e as proteínas não-hemínicas, como as de ferro-enxofre, ativas na transferência de elétrons [6,7,8].

Para o cobre, também é extensa a lista de proteínas contendo este metal no seu sítio ativo. Estas proteínas incluem compostos mononucleares, como estelacianina, azurina e a plastocianina, eficientes transportadoras de elétrons [4, 9]; espécies dinucleares, como a superóxido dismutase, que contém um sítio contendo íons de cobre e de zinco, e que desempenha função antioxidante, dismutando radicais superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio [10], ou as tirosinases e as catecol oxidases, que catalisam a oxidação de fenóis e/ou catecóis [11]; e mesmo espécies polinucleares, como as lacases, com 4 centros de cobre capazes de oxidar polifenóis, fenóis metóxi-substituídos, diaminas e outros substratos, ou a ceruloplasmina, com 6 sítios ativos contendo íons de cobre, que fazem parte do metabolismo do ferro [12,13]. A variedade de estruturas apresentadas por estas enzimas e proteínas é enorme e explica as diferentes funções que desempenham nos seres vivos.

1.1 Cobre como elemento essencial

O cobre é um elemento essencial à vida. Em seres humanos a absorção do cobre se dá no estômago e intestino delgado e a sua reposição é realizada através da dieta. O cobre está presente, principalmente em frutos do mar, carnes, grãos, vegetais e cereais, devendo ser constante na alimentação para garantir uma vida saudável [14].

Cobre é um metal de transição com três estados de oxidação acessíveis: Cu^0 , Cu^+ e Cu^{2+} , sendo os dois últimos encontrados nos sistemas biológicos. A necessidade de cobre em plantas e animais foi percebida facilmente devido à atuação da hemocianina que contém cobre em seu sítio ativo, sendo uma molécula transportadora de oxigênio em invertebrados. Entretanto, seu papel essencial somente foi reconhecido após 1921 quando o cobre foi identificado no cérebro humano por Bodansky [15,16] ou em 1928 quando Hart [17,18] mostrou que a presença de cobre é essencial para a eritropoiese (processo no qual ocorre a síntese dos glóbulos vermelhos) em ratos.

Muitas outras proteínas e enzimas importantes contêm íons de cobre em seus sítios ativos, os quais estão associados a uma variedade de funções biológicas vitais, como ativação e transporte de oxigênio, transferência de elétrons, metabolismo de ferro e dismutação do ânion superóxido. A

proteína impõe uma geometria e estrutura eletrônica incomum ou peculiar ao sítio de cobre. Como consequência, proteínas com cobre comumente exibem espectros UV/Vis característicos e únicos em comparação a pequenos complexos do metal. Este comportamento espectral permite estudar a correlação entre a estrutura eletrônica e a função biológica do sítio ativo [18].

Um dos maiores objetivos de se estudar sítios ativos de proteínas cobre-dependentes é entender justamente este comportamento espectral associado à estrutura do sítio ativo. As propriedades espectrais dão informação sobre a estrutura apresentada, que é determinante para as funções desempenhadas pelo cobre no meio biológico. A partir disso, as proteínas foram classificadas em três tipos gerais, de acordo com suas características espectrais, que por sua vez refletem a vizinhança de seu sítio ativo:

- **tipo I** – o chamado centro de cobre azul, geralmente exercendo função transportadora de elétrons, como a estelacianina, plastocianina e azurina, com o cobre coordenado a grupos contendo N e S, numa geometria tetraédrica distorcida e apresentando forte banda de absorção a 600-620 nm (com $\epsilon \approx 3.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), atribuída à transição de transferência de carga ligante metal da cisteína para o cobre: $\text{Cys (S)} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ (LMCT) [19];
- **tipo II** – considerado centro de cobre normal, isto é, com o metal coordenado de maneira similar a complexos de Cu(II) com ligantes simples, como Cl^- ou aminoácidos, apresentando geometria tetragonal, com alguma distorção tetraédrica. Devido à ausência de grupos tióis possui fraca absorção no visível e, dessa forma, não apresenta a coloração azul característica dos sítios tipo I, e no EPR apresentam bandas com valores altos do parâmetro A. As proteínas mais conhecidas com este tipo de sítio ativo são as oxidases, que catalisam a oxidação de alcoóis a aldeídos em plantas e também a desaminação oxidativa de aminas e diaminas biológicas a aldeídos em humanos, bem como as nitrito redutases, que através da transferência de um elétron reduzem o nitrito a óxido nítrico [16,20];
- **tipo III** – com centro ativo contendo dois átomos de cobre acoplados antiferromagneticamente e capazes de oxidar substratos ou transportar oxigênio [16]. Exemplos típicos são a hemocianina, as tirosinases e as catecol oxidases.

Uma classe adicional de proteínas contendo cobre é a das oxidases multimetaladas, que contêm uma combinação desses três tipos de sítios ativos de cobre, em geral com 4 ou 6 centros metálicos. Exemplos típicos são: as lacases, com sítios para 4 cobres (tipo I, isolado, tipo II e tipo III formando um *cluster* trinuclear); a ceruloplasmina, com sítios para 6 cobres (três do tipo I, um do tipo II e do tipo III formando também um *cluster* trinuclear,), exercendo várias funções; e a citocromo c oxidase, contendo 3 centros de cobre (denominados Cu_A -dinuclear e Cu_B -

mononuclear) além de dois sítios de ferro hemínico, realizando papel relevante em nossa cadeia respiratória [21].

Esse metal essencial possui um mecanismo homeostático muito bem regulado, que mantém as quantidades do metal nas concentrações ideais para cada organismo, envolvendo um controle bastante eficiente de sua absorção, armazenamento, transporte e eliminação do metal em excesso [22].

O cobre está presente nos seres vivos em uma concentração muito baixa, no estado dito “livre”, isto é, coordenado a ligantes simples, devido à sua facilidade em se coordenar aos ligantes biológicos, que contêm nitrogênio. Sendo os íons Cu^{2+} de fronteira, segundo a teoria de Pearson, preferem se ligar a ligantes contendo nitrogênio, que são mais duros, enquanto íons Cu^+ preferem ligantes mais moles, como os contendo enxofre. Deste modo, não são permitidas grandes quantidades de cobre “livre” no organismo [4]. Na homeostase do cobre ocorre a biossíntese de apoproteínas específicas, de acordo com a concentração do íon no meio. Um exemplo é a metalotioneína, presente no citosol das células, que retira o cobre do meio, armazenando-o na forma reduzida, coordenado a grupos tióis. Após sua absorção, a maior parte do cobre é incorporada à ceruloplasmina, proteína que pode conter seis átomos de cobre, e que pode transportar o metal no organismo, podendo entregá-lo a outras proteínas, sendo também uma importante proteína necessária na homeostase do ferro. O restante do cobre pode ser transportado ao se ligar a outras proteínas do plasma, como a albumina. Assim, o cobre é transportado até o fígado e armazenado nas cobretioneínas, até que haja a necessidade deste metal no organismo, sendo então o íon incorporado mais uma vez à ceruloplasmina. Dentro da célula, pequenas proteínas especializadas, chamadas chaperonas, são responsáveis pelo recebimento, transporte e entrega do metal a enzimas cobre-dependentes, como a SOD ou a citocromo c oxidase, presentes no citosol ou nas organelas [23].

Em alguns casos, pode ocorrer a falta deste elemento, como no caso da doença de Menkes, uma doença que pode ser causada por uma dieta pobre em cobre, ou ser desencadeada por fatores genéticos implicados no transporte do metal, levando à deficiência de ATPases específicas. A falta destas ATPases, como a ATP7A presente na membrana celular e responsável pela incorporação de cobre à célula e também pela sua excreção, provoca a baixa atividade de proteínas cobre-dependentes, com maiores implicações em danos cerebrais. Também o excesso deste metal pode se tornar tóxico, como na doença de Wilson, doença causada por mutações no gene da ATP7B que dificulta a incorporação do cobre à ceruloplasmina, diminuindo a capacidade de transporte do cobre, e provocando assim o acúmulo de cobre em algumas partes do organismo, com implicações diretas

no fígado e também no cérebro [24]. Por esta razão, a homeostase do cobre em seres vivos é um processo altamente regulado, tendo sido estimada em 10^{-18} mol/L a concentração de cobre “livre” nas células, calculada a partir da constante de inserção do cobre na superóxido dismutase [25].

Dessa maneira, podemos verificar tanto o papel essencial do cobre, quanto suas funções danosas ao organismo, na qual devido à sua atividade redox pode gerar espécies reativas de oxigênio (EROS), convertendo o H_2O_2 em radicais hidroxil e, conseqüentemente, oxidando substratos presentes nas células, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, em reações denominadas tipo-Fenton [26].

Assim, as etapas acima citadas iniciam o que chamamos de estresse oxidativo. Esse processo, que envolve a reatividade do cobre, é modulado pela vizinhança do metal, ou seja, os ligantes que estão coordenados ao íon metálico [27]. Os ligantes podem modificar a geometria ao redor do íon metálico e mudar seu potencial de redução acentuadamente. Deste modo, podem favorecer a estabilidade da espécie de cobre reduzida ou a oxidada. Nesse intuito, são avaliados os ligantes que podem ser utilizados para uma ação específica, como por exemplo, no desenvolvimento de metalofármacos. Ligantes que favorecem a formação de espécies reativas tendem a ser mais eficientes, quando o objetivo é causar danos a biomoléculas.

1.2 Tirosinases

Dentre outras enzimas de cobre, neste trabalho temos especial interesse nas tirosinases. Essas enzimas possuem um núcleo de cobre tipo III, conhecidas por serem proteínas dinucleares, apresentando dois átomos de cobre em seu sítio ativo, ligados a 6 resíduos de histidinas (3 para cada átomo de cobre). Em espectros UV/Vis, apresentam forte absorção em aproximadamente 330 nm, e em espectros de EPR apresentam sinal silencioso, devido ao forte acoplamento antiferromagnético verificado entre os dois centros de cobre [4].

A atividade cresolase das tirosinases possibilita que a enzima catalise a oxidação de monofenóis, enquanto a atividade catecolase garante a oxidação de difenóis às correspondentes quinonas. Sendo assim, as tirosinases se apresentam no estado deoxi- Cu(I), met- Cu(II) sem a ligação com o oxigênio, e no estado oxi- Cu(II), com os dois centros metálicos ligados ao oxigênio na forma

$\mu-\eta^2:\eta^2$, conforme mostrado na **Figura 1**. Este centro apresenta características espectroscópicas de um grupo peroxo ligado a dois íons de cobre, com intensa banda em aproximadamente 350 nm e ϵ de $20.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, devido a transições de transferência de carga, muito similar ao sítio ativo das hemocianinas, que foram utilizadas durante muito tempo para se entender melhor o sítio das tirosinases, já que na época não havia uma estrutura cristalina determinada para as mesmas [26,28].

Figura 1. Forma de coordenação do oxigênio ao sítio da enzima no estado oxidado (oxi-tirosina) com ligação tipo $\mu-\eta^2:\eta^2$.

Mesmo possuindo um sítio ativo similar, essas proteínas estão envolvidas em diferentes funções, como carregadores de oxigênio em moluscos e artrópodes, no caso da hemocianina, pois a mesma possui um sítio que não catalisa reações, devido à estrutura mais fechada desta proteína que protege o sítio ativo, deixando a cavidade pequena e impossibilitando a entrada de um substrato. Ao contrário, com atividades cresolase e catecolase, no caso das tirosinases, ou apenas catecolase no caso das catecol oxidases, estas enzimas agem na ativação do oxigênio para oxidar substratos [29,30]. O ciclo catalítico da tirosinase pode ser observado na **Figura 2**, tratando-se de dois ciclos interligados. Este ciclo pode se iniciar com a enzima na forma deoxi-reduzida (CuI), com a coordenação da molécula de oxigênio ao dois centros metálicos. Em seguida, a forma oxi-Cu(II) converte o substrato monofenol ao correspondente *o*-difeno (atividade cresolase), e, subsequentemente, o *o*-difeno também conhecido como catecol é convertido à correspondente *o*-quinona, fazendo com que a tirosinase volte ao seu estado deoxi-Cu(I), capaz de coordenar novamente uma molécula de dioxigênio, e passando intermediariamente pelo estado D-met Cu(II). O segundo ciclo de reatividade catalítica, partindo também do estado deoxi-Cu(I), com coordenação e ativação da molécula de oxigênio, consiste na oxidação de substratos *o*-difenois (atividade catecolase ou difenolase), gerando derivados met-Cu(II) da tirosinase, sendo este intermediário capaz de transferir dois elétrons na oxidação, convertendo *o*-difeno a *o*-quinona, fechando o ciclo catecolase e voltando ao estado deoxi-Cu(I). Algumas divergências podem existir para a **Figura 2**, em relação à hidroxilação do monofenol, que pode estar relacionada a uma substituição eletrofílica [30].

Figura 2. Ciclo catalítico da tirosinase [30].

1.3 Melanina e melanomas

A enzima tirosinase também está implicada em um processo muito importante que é a melanogênese, que consiste na síntese de pigmentos melaninas nos melanócitos, dentro de organelas especializadas, os melanossomas, para suas devidas funções [31].

Melanina é um pigmento largamente disseminado em bactérias, fungos, plantas e animais, secretado por células, chamadas de melanócitos, localizadas na camada basal da derme. No corpo humano ela é encontrada na pele, cabelos, olhos, cérebro e interior do ouvido. Considerada um biopolímero polifenólico heterogêneo, possui coloração que varia de amarelo a preto, sendo que a distinção da coloração da melanina é baseada em seus constituintes, sendo dois os principais deles: a feomelanina (pigmento vermelho), constituído por átomos de enxofre e resíduos de benzotiazinas e a eumelanina (pigmento preto) com resíduos indólicos, sendo que ambas as formas de melanina estão presentes na pele humana [32]. A pigmentação por melanina desempenha um papel muito importante na proteção contra efeitos de radiações provenientes do sol, além de determinar as colorações na aparência (fenótipo) das espécies [31].

A síntese da melanina em mamíferos se inicia a partir do aminoácido tirosina que serve de substrato, através de etapas químicas e enzimáticas, envolvendo as enzimas tirosinase e as enzimas

relacionadas a ela, denominadas TRP-1 e TRP-2, conforme mostrado na **Figura 3**. Esse processo inicia-se pela hidroxilação da L-tirosina a L-dopa, seguida da oxidação da L-dopa até L-dopaquinona. Ambas reações são catalisadas pela tirosinase (monofenol oxigenase, EC 1.14.18.1). A primeira etapa é determinante da velocidade na síntese da melanina, uma vez que as demais se processam espontaneamente em pH fisiológico. A etapa subsequente de conversão da dopaquinona em dopa e dopacromo ocorre através de auto-oxidação. L-dopa é então novamente oxidada à dopaquinona pela tirosinase. Em presença de glutathione (GSH) ou cisteína (Cys), dopaquinona é convertida a glutathionil-dopa ou cisteinil-dopa, respectivamente. A seguir, é formada a feomelanina, através de intermediários da benzotiazina. Finalmente, eumelanina é formada através de uma série de reações de oxidação a partir de di-hidroxi-indol (DHI) e de ácido di-hidroxi-indol-2-carboxílico (DHICA), formados a partir de dopacromo [33]. Além de eumelanina e feomelanina, existem outros polímeros melanínicos relacionados a monômeros fenólicos diferentes da tirosina, que são denominados alomelaninas, encontrados em fungos e plantas [34]. Os estudos relacionados à estrutura da melanina estão baseados na oxidação e redução degradativa dos pigmentos, seguidos de identificação e quantificação das estruturas químicas encontradas, que supostamente estão na porção do pigmento original analisado, porém essa estrutura não foi totalmente elucidada, e varia de organismo para organismo [35].

Estudos sobre compostos precursores das melaninas mostraram que os pigmentos podem aceitar um ou até dois elétrons, em etapas redutivas, indicando que as melaninas provavelmente podem ser receptoras de elétrons, oferecendo mecanismos para a captura de radicais livres (potenciais agentes antioxidantes) ou geradoras de espécies reativas (potenciais agentes citotóxicos) [34,36].

O fenômeno de escurecimento que pode ser observado em frutas e cogumelos, também é devido a polimerizações oxidativas, semelhantes ao fenômeno da melanogênese [34].

Figura 3. Etapas da biossíntese de melanina [35].

Artigos de revisão, recentes na literatura, sobre a pigmentação provocada pela melanina visam esclarecer melhor quais os fatores que fazem com que as etapas que levam à formação de eumelanina ou as que levam à feomelanina prevaleçam. Eumelanina é formada a partir da polimerização de 5,6-hidroxi-indóis e parece ser fotoprotetora, enquanto feomelanina, originada de 1,4-benzotiazinas, devido a seu potencial em gerar radicais livres pode contribuir mais para danos à pele causados por luz UV. A descoberta de que indivíduos com cabelo vermelho apresentam mutações no gene receptor melanocortin 1 (MC1R) abriu novas possibilidades para elucidar melhor o problema [37]. Estudos epidemiológicos e biológicos extensos indicaram que mutações em diversos genes responsáveis pela pigmentação parecem predispor os indivíduos à maior incidência de formação de melanomas e ao câncer de pele [32,38]. Na **Figura 4** é mostrado um esquema associando mutações nesse gene MC1R e a predominância de formação de feomelanina.

Figura 4. Possível associação entre mutação genética e predominância das etapas de síntese de feomelanina [38].

Melanomas são neoplasias malignas geralmente bastante agressivas, e estima-se que cerca de 132.000 casos de melanomas ocorrem no mundo a cada ano [39]. Usualmente, eles crescem na pele (melanomas cutâneos) e podem advir de melanócitos congênitos ou displásicos nevi (*dysplastic nevi*), mas também podem ser formados em outros sítios anatômicos, incluindo o sistema gastrointestinal, os olhos, o trato urinário e o sistema reprodutivo. Sua incidência é baixa, mas sua letalidade é alta devido à ocorrência de metástases. Melanomas existem em camadas mais profundas da pele e, frequentemente, estes tumores apresentam metástase em nódulos linfáticos, no fígado, pulmões e no cérebro, levando rapidamente à morte. Melanomas em estágio inicial de desenvolvimento (fase de crescimento radial) são curáveis, possíveis de serem removidos por cirurgia. Porém, quando as células de melanomas estão em estágio invasivo, progressivamente perdem as interações de adesão e o prognóstico para esse estágio metastático apresenta uma taxa de sobrevivência de 12% em 5 anos [40]. Entre os cânceres de pele o melanoma maligno está relacionado a 80% das mortes. Vários métodos de análises e avaliação, tais como sexo, idade, localização do melanoma, distâncias das metástases, ulcerações, raio mitótico e terapias anti-melanoma têm sido usadas, mas o prognóstico

adverso e a crescente toxicidade dos tratamentos demonstram a necessidade de busca por novas drogas ou novos protocolos quimioterapêuticos, que garantam maior eficiência e toxicidade mais baixa. Mesmo sendo retirados cirurgicamente, os tumores primários levam 44% dos pacientes à morte por complicações metastáticas [41,42]. Os melanomas podem progredir de várias formas, dois modelos separados por etapas podem ser visualizados na Figura abaixo:

Figura 5. Modelos de progressões de metástases [41].

A metástase provocada por células tumorais únicas se espalha rapidamente, mas pode permanecer dormente por muito tempo quando existem sinais de supressão tumoral, reduzindo assim, a proliferação celular. Mas quando não há essa supressão tumoral, a metástase espalha-se rapidamente [41].

A feomelanina, um dos polímeros formados a partir da tirosina, é potencialmente mais reativa do que a eumelanina, e alguns estudos mostram estruturas de melanossomas contendo feomelanina encapsuladas por eumelanina. Há hipóteses de que o aumento da susceptibilidade ao câncer de pele em pessoas mais claras esteja ligado ao grande efeito fototóxico da feomelanina e à sua facilidade em gerar estresse oxidativo, visto que em análises de melanomas pode-se encontrar um aumento acentuado deste pigmento em comparação ao melanócito sadio. A exposição do núcleo de feomelanina pode ocorrer devido à exposição a radiação UV, que induz a formação de radicais e causa danos à eumelanina, expondo ou liberando o pigmento que se encontrava encapsulado, que seria mais sensível. Já foi comprovado que a radiação UV aumenta significativamente o processo de melanogênese, que pode levar a uma produção exagerada do pigmento. Assim, fatores ambientais e alta exposição solar podem aumentar a incidência de câncer de pele [43]. Fatores genéticos também estão relacionados ao aparecimento de melanomas; pessoas com casos de melanomas na família possuem predisposição para desenvolver a doença. Alguns genes também parecem estar relacionados ao aparecimento de melanomas e indivíduos que os possuem podem ser monitorados para o caso de um tratamento na fase inicial do câncer [44].

Esta geração de espécies reativas, responsáveis pelo estresse oxidativo, parece também estar relacionada à capacidade da feomelanina e da eumelanina em coordenar íons metálicos com

atividade redox, como cobre ou ferro. Artigo recente mostrou que tanto feomelaninas como eumelaninas podem levar à clivagem das fitas do DNA, independentemente de serem irradiadas (em ausência de luz). Como são capazes de coordenar íons metálicos, como ferro ou cobre, devido à presença de grupos coordenantes como carboxilatos, catecolatos ou aminas em sua estrutura (vide **Figura 6**), podem participar de reações do tipo-Fenton gerando espécies reativas ou capturando-as [45]. Além disso, as melaninas podem se associar às alças menores do DNA prevenindo o acesso de enzimas de reparo, além de causar essas lesões. Desta forma, têm um comportamento dual, como pró- e anti-oxidantes.

Figura 6. Estruturas moleculares de monômeros da (A) feomelanina e (B) eumelanina [45].

No desenvolvimento de melanomas malignos, ocorre um aumento no processo de melanogênese, bem como na expressão e na atividade das tirosinases, que são enzimas essenciais nesse processo. Dessa forma, as tirosinases também têm sido utilizadas como alvo promissor em terapias anti-câncer [44].

1.4 Complexos Miméticos de Tirosinase

Uma poderosa ferramenta no estudo de sítios ativos de enzimas que contenham metais de transição é o uso de moléculas de baixo peso molecular, capazes de mimetizar ou imitar o sítio ativo de tais enzimas. Tais compostos, chamados de miméticos, podem ser denominados como funcionais ou estruturais, podendo mimetizar uma delas ou as duas funções.

Complexos com iminas podem mimetizar o sítio ativo de diversas enzimas dependentes de cobre, como a Cu, Zn superóxido dismutase, enzima de proteção em processos oxidativos. Estes complexos miméticos mostram características do íon cobre tanto pró-oxidantes como antioxidantes, moduladas pelos ligantes imínicos [46,47], diferentemente da enzima nativa, que em geral apresenta quase exclusivamente atividade antioxidante. Ligantes imínicos apropriados também podem

mimetizar o sítio ativo das tirosinases, visando estudos espectroscópicos [48,49] e também a verificação da atividade catalítica para uso eficiente dos complexos na catalise de fenóis e catécóis às respectivas quinonas [50,51]. O uso de complexos imínicos miméticos de oxidases também levou ao desenvolvimento de bio-sensores, com eletrodos modificados contendo complexos miméticos capazes de analisar, por exemplo, peróxido de hidrogênio [52]. Nos últimos anos esses complexos têm sido estudados por suas propriedades redox, como potenciais agentes antitumorais [53,54]. Buscando verificar possíveis mecanismos de ação desses compostos, estudos foram desenvolvidos tendo como alvos o DNA, em experimentos de clivagem e interações, nos quais os complexos levam à geração de espécies reativas e consequente dano oxidativo, além de induzir apoptose [55]. Além disso, esses complexos podem ter como alvo a mitocôndria [56], atuando como agentes desacopladores, isto é, diminuindo o potencial da membrana interna da mitocôndria e interrompendo a síntese do ATP [57]. Compostos deste tipo podem ainda atuar como inibidores de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, como as kinases, por exemplo a AMPK [58], ou envolvidas em mecanismos de reparo aos ácidos nucleicos, como as topoisomerases [59]. Dessa forma, busca-se aprofundar e desvendar o verdadeiro modo de ação destes complexos, que desencadeia a cascata de eventos que levam células tumorais à apoptose.

Os estudos de miméticos da tirosinase foram muito importantes na elucidação tanto de sua estrutura, especialmente da estrutura do intermediário ativo, $[\text{Cu}(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{ O}_2)\text{Cu}]$, como de sua reatividade frente a fenóis e catecóis. Vários grupos de pesquisa interessaram-se pelo assunto, especialmente os grupos de K. Karlin, E. Solomon e de W. Tolman, nos USA, L. Casella, na Itália, e Kitajima e Murooka, no Japão [60,61,62,63,64]. Vários compostos miméticos, principalmente com ligantes do tipo amina, foram sintetizados por esses grupos e caracterizados, tanto estrutural como espectroscopicamente, levando a importantes descobertas quanto à relação entre estrutura e reatividade. Cada um deles contribuiu sobremaneira para os estudos destas enzimas. Karlin e colaboradores estudaram miméticos e nativos de enzimas contendo cobre, mostrando dados espectroscópicos que facilitaram os estudos sobre a reatividade dos mesmos, como as distâncias entre os centros metálicos, intermediários ativos, sistemas de Cu^+ e Cu^{2+} , a formação de compostos di- ou trinucleares baseado nas concentrações de reagentes (monômeros ou oxigênio) que foram bem caracterizados [65]. Tolman realizou diversos estudos comparativos, de diferentes intermediários, tentando verificar suas características mais importantes, especialmente os modos de ligação entre o cobre e a molécula de dioxigênio, $[\text{Cu-O}_2\text{-Cu}]$ [66]. Solomon foi o espectroscopista que mais contribuiu e ainda contribui para o campo, com artigos que se tornaram clássicos na área [67]. Casella e seu grupo foram responsáveis por determinar várias das características cinéticas e mecanísticas do processo de oxidação de fenóis, bem como a verificação de ligantes enantioseletivos

[68], e a caracterização do intermediário formado pela coordenação da molécula de dioxigênio com os centros de cobre da tirosinase [69]. Mas foi o grupo de Kitajima e Murooka que logrou preparar pioneiramente o intermediário com as mesmas características (ligação entre os centros de cobre e a molécula de dioxigênio) do intermediário enzimático [70].

Artigos mais recentes mostram que os estudos do sítio ativo das enzimas utilizando os modelos propostos tem trazido grande avanço para a bioinorgânica [71,72] e que a conquista de um grupo apoia e auxilia muitos outros. Estes estudos mostram que os ligantes influenciam na estabilização dos intermediários ativos ou, ao contrário, aumentam a sua desestabilização. Os ligantes também estão relacionados com o tipo de ligação do oxigênio com os íons de cobre no complexo, facilitando assim os estudos dos mesmos [73,74], e influenciam significativamente a reatividade do complexo, sendo responsáveis por diferenças nos mecanismos apresentados [75,76].

Estudos mais antigos mostram uma atividade citotóxica para melanomas murinos relacionadas a complexos de cobre, com valores aproximados de inibição de crescimento ($ID_{50} = 20\text{ng/mL}$) ao da droga cis-DDP ($ID_{50} = 8\text{ng/mL}$), onde DDP = diaminadichloroplatina(II), conhecida como cisplatina e utilizada na época como excelente terapia [77]. Além da verificação da atividade antitumoral de complexos de cobre testados frente a células B16F10 [78]. Testes de viabilidade celular mostram que o complexo formado é mais reativo, do que só o ligante ou do sal de cobre, verificando-se que após a complexação há um aumento na atividade antiproliferativa do ligante, bem como na sua reatividade dose dependente [79]. São também utilizados, na produção de miméticos, ligantes requeridos para biossínteses fundamentais, que podem servir como um possível agente quimioterápico seletivo, responsáveis pelo aumento da produção celular em estados cancerígenos ou infecções, como por exemplo o 5-amino-imidazol nucleotídeo, requerido na síntese de nucleotídeos de purinas [80].

Ação sobre alvos biológicos

Um dos principais alvos de estudos no combate a doenças terminais como câncer, doenças do coração e doenças neurodegenerativas é o DNA, após se verificar associações de danos oxidativos ao mesmo e o desencadeamento de tais doenças. Sendo a molécula de DNA propícia a ligações com cátions metálicos, devido aos seus grupos nitrogenados ou oxigenados (grupos doadores) e fosfatos [81] (vide **Figura 7**), essa molécula tão importante para a sobrevivência se torna um alvo interessante para interação com complexos potencialmente pró-apoptóticos [82].

Figura 7. Estrutura dos constituintes do DNA, e principais pontos de ligações de metais.

Estudos de interações de complexos metálicos com DNA têm sido então desenvolvidos, visando seu uso como possíveis agentes quimioterápicos, devido ao grande sucesso de compostos como a cisplatina e seus derivados [83]. Esses complexos podem se intercalar entre as fitas de DNA, nas alças, chegando a clivar a dupla fita (mono ou dupla cisão); ou o reconhecimento molecular pode ocorrer pela estrutura do ligante, através de interações eletrostáticas, ligação às cavidades, intercalação, que podem ser inter-, intra- e cruzada nas fitas, e também ligações de hidrogênio [84,85]. Um composto intercalador pode ter sua atividade nuclease aumentada a partir da coordenação com um metal com atividade redox [86]. A ação desses complexos pode-se dar por via oxidativa pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), particularmente o radical hidroxil, geradas pela ação redox do metal, podendo ser potencializada pela presença de peróxido de hidrogênio, ou outros ativantes [87,88]. Esse processo pode ocorrer também por via hidrolítica, no qual a clivagem ocorre geralmente sem a adição de peróxido ou qualquer agente redutor. Com a utilização de “*scavengers*” ou captadores do radical hidroxil (por exemplo, DMSO ou t-BuOH), ou captadores do radical superóxido (enzima SOD) é possível ter-se a indicação se o mecanismo de ação dos complexos é oxidativo ou hidrolítico [89,90].

2. PARTE EXPERIMENTAL I - Síntese e Caracterização

2.1. Reagentes e Soluções

Os reagentes: 2-(acetil)piridina (99%), hidrocloreto de histamina(99%), perclorato de cobre(II) hexahidratado (98%), foram de procedência da Aldrich Chemical Co. Os solventes etanol (96 %), etanol absoluto (99%), metanol absoluto (99%), diclorometano (99%) e acetona (99%) e o ácido clorídrico foram obtidos da Merck Chemical Co. DNA calf thymus (CT-DNA), na forma de sal de sódio, e a albumina humana (HSA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

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

2.2. Sínteses

As sínteses dos complexos de cobre têm sido realizadas em nosso laboratório há vários anos, com diferentes estruturas (mono-, di- e polinucleares) [91,92], baseadas em métodos descritos na literatura para compostos similares [93,94], fazendo-se modificações ou adaptações adequadas em cada caso.

2.2.1. Composto $[Cu(\text{apyhist})H_2O](ClO_4)_2$ - Composto 1

A 368 mg (2 mmol) de hidrocloreto de histamina dissolvidos em 40 mL de metanol, sob agitação, adicionou-se lentamente 740mg (2 mmol) de perclorato de cobre dissolvidos em 20 mL de água deionizada. A solução passou de incolor a amarelo e, por final, a verde claro, sendo então o pH da solução ajustado com algumas gotas NaOH diluído, quando a solução tornou-se azul escura. Adicionou-se, em seguida, 223,7 μ L (2 mmol) de 2-(acetil)piridina dissolvidos em 10 mL de metanol, o que escureceu ainda mais a solução.

Figura 8. Etapas da síntese do complexo $Cu(\text{apyhist})H_2O](ClO_4)_2$

Após 2 horas de reação a solução foi concentrada em roto-evaporador e deixada na geladeira durante 10 dias, quando um precipitado foi observado, o precipitado foi filtrado e lavado com água deionizada e metanol gelados, e então secos em dessecador a vácuo, conforme método já desenvolvido em nosso laboratório e descrito na literatura [95].

2.2.3. Ligante ponte, 2,2'-bis(aminometil)difenila

Na síntese do ligante ponte, partiu-se do ácido difenílico comercial, sendo a esterificação em metanol a primeira etapa, obtendo-se o éster metílico correspondente, que foi reduzido por tetrahidroaluminato de lítio em THF a 2,2'-bis(hidroximetil)difenil, por bromação com tribrometo de fósforo em diclorometano, que levou a formação de derivados difenílicos, em seguida, os grupos brometos são substituídos por azida de conforme o esquema na **Figura 9**. Por final, a diazida é reduzida por hidrogênio na presença de paládio sobre carbono, ou tetrahidroaluminato de lítio em 100% de THF.

Figura 9. Etapas da síntese do ligante ponte.

O ligante ponte, 2,2'-bis(aminometil)difenila, foi gentilmente cedido pelo Prof. Marius Réglier (Aix- Marseille Université, Marseille, France), durante projeto COFECUB em colaboração (2009/2011), tendo sido preparado pelos Drs. Renaud Hardré e Bruno Faure, conforme a literatura [96].

2.2.2. Composto $[Cu_2(apyhist)_2(dpam)](ClO_4)_4$ - Composto 2

A 0,8835g (4,8 mmol) de hidrocloreto de histamina dissolvidos em 40 mL de metanol, sob agitação, adicionou-se lentamente 1,7785g (4,8 mmol) de perclorato de cobre dissolvidos em 20 mL de acetona. A solução passou de incolor a amarelo e, por final, a verde claro, sendo então o pH da solução ajustado com algumas gotas NaOH diluído, quando a solução tornou-se azul escura. Adicionou-se, em seguida, 537μL (4,8 mmol) de 2-(acetil)piridina dissolvidos em 10 mL de metanol, o

que escureceu ainda mais a solução. Após 2 horas de agitação, foram adicionados 0,500g (2,4 mmol) de 2,2'-bis(aminometil)difenila dissolvido em 10 mL de acetona.

Figura 10. Etapas da síntese do complexo $[Cu_2(apyhist)_2dpam](ClO_4)_4$

A agitação foi mantida por mais uma hora e meia e a coloração da solução escureceu, tendendo ao violeta. A reação foi mantida por 13 horas e, posteriormente, a solução foi concentrada em roto-evaporador. Após 15 dias, havia se formado um precipitado marrom-arroxeadado que foi filtrado e lavado com 30 mL de metanol gelado, sendo então seco e armazenado em dessecador sobre sílica-gel.

2.2.4. Composto $[Cu(N22)(H_2O)(CF_3SO_3)](CF_3SO_3)$ ou $[Cu(N22)]^+$ - Composto 3

Para o composto mononuclear partiu-se da vinilpiridina reagindo com uma amina secundária, formando um dímero, e em seguida reação com brometo de benzila.

Figura 11. Síntese ligante mononuclear (N22).

Após a síntese do ligante, para se obter o complexo de cobre(II) correspondente, foram adicionados sais de cobre(II) em solventes apropriados, em seguida, o complexo foi precipitado e

lavado com éter etílico, o complexo foi descrito pela primeira vez por Karlin em 1984, tendo sido preparado e caracterizado pelos Drs. Renaud Hardré e Bruno Faure, conforme a literatura [96].

2.2.5. Composto $[Cu_2(N22-22)(H_2O)_2(CF_3SO_3)_2](CF_3SO_3)_2$ ou $[Cu_2(N22-22)]^{2+}$ - Composto 4

A partir do ligante 2,2'-bis(aminometil)difenila, foi realizada uma adição de Michael com vinilpiridina em meio ácido.

Figura 12. Síntese ligante (N22-22).

Após a síntese do ligante, para se obter o complexo de cobre(II) correspondente, foram adicionados sais de cobre(II) em solventes apropriados, em seguida, o complexo foi precipitado e lavado com éter etílico, tendo sido preparado e caracterizado pelos Drs. Renaud Hardré e Bruno Faure, conforme a literatura [96].

2.3. Métodos de Caracterização e Instrumentação

2.3.1. Análise Elementar

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

As análises de cobre por *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy* (ICP-OES) foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química, usando um equipamento ICP-OES, modelo Arcos-FHS12, marca Spectro.

2.3.2. Espectroscopia Eletrônica

Os espectros eletrônicos na região de Ultravioleta/Visível (UV/Vis) foram obtidos no espectrofotômetro modelo UV-1650PC da Shimadzu, utilizando cubetas de quartzo de caminho óptico de 1,00 cm e soluções dos vários complexos na faixa de 10^{-4} mol/L.

A absorvidade molar (ϵ , mol⁻¹ L cm⁻¹) característica de cada um dos compostos foi obtida a partir dos coeficientes angulares dos gráficos de absorção *versus* concentração da espécie, para cada uma das bandas (máximos de absorção) observadas.

2.3.3. Espectroscopia na região do Infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro ABB BOMEM, modelo MB com transformada de Fourier, por reflectância difusa, na faixa de 400 – 4000 cm⁻¹. As amostras foram maceradas em KBr (~20 mg complexo/200 mg KBr), previamente seco a 120°C em estufa.

2.3.4. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

Os espectros de EPR foram registrados em espectrômetro da BRUKER, modelo EMX, operando na banda X ($\nu = 9,33$ GHz) com potência de 20 mW, utilizando Dewar para baixas temperaturas (77 K) e tubos de quartzo, da marca Wilmad, de 4 mm de diâmetro interno ou tubinhos de polietileno, também com 4 mm de diâmetro interno. As medidas foram feitas em sólido e em solução de acetona ou acetonitrila. DPPH (α , α' -difenil- β -picrilhidrazil) foi usado como calibrador de frequência.

3. PARTE EXPERIMENTAL II – Reatividade e Interações com Biomoléculas

3.1. Verificação da Atividade Tirosinase, Catálise da Oxidação da L-Dopa

Através de medidas espectrofotométricas, utilizando espectrofotômetro modelo UV-1650PC da Shimadzu, e cubetas de acrílico descartáveis de caminho óptico de 1,00 cm, foram conduzidos experimentos de cinética dos complexos estudados para avaliar sua atividade catalítica frente ao substrato L-Dopa (catecol). Utilizou-se esse tipo de cubeta devido ao escurecimento verificado pela aderência do produto de oxidação do substrato nas paredes das cubetas de quartzo. O experimento consistiu em avaliar a oxidação do substrato a sua correspondente quinona, monitorada pelo aumento da banda em 475 nm, com $\epsilon = 3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [97]. Foram utilizadas soluções iniciais de 10 mM de L-Dopa e 2 mM dos complexos. Os ensaios foram realizados primeiramente variando-se a concentração dos complexos (80 - 400 μM) e mantendo a concentração de L-Dopa (8 mM) no volume final da cubeta de 2,5 mL. Em seguida, foram feitos experimentos variando-se a concentração da L-Dopa (4 - 8 mM) com as concentrações dos complexos constante (320 μM) num volume final de 2,5 mL, utilizando tampão fosfato 50 mM (pH 7,00) na temperatura de 25° C. Este procedimento foi adaptado de estudos anteriores do grupo [48].

3.2. Medidas de Dicroísmo Circular (CD): Estabilidade Termodinâmica

Para verificar a estabilidade termodinâmica relativa dos complexos de cobre estudados foi utilizada a proteína albumina humana (HSA), como ligante competitivo. Titulações da proteína com os diversos complexos de cobre foram realizadas e espectros de CD foram registrados, em espectropolarímetro JASCO J-720, no intervalo de 300 a 650 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo esférica de 1,00 cm de caminho óptico. Todas as medidas foram feitas em temperatura ambiente, com velocidade de leitura de 100 nm/min e tempo de resposta de 1s. Foram adicionadas alíquotas sucessivas dos complexos de cobre(II) (concentrações de 0 a 1,0 mM) a uma solução de albumina (0,50 a 0,70 mM) em tampão fosfato 50 mM, pH 7,40. Após cada adição dos complexos de cobre(II) o respectivo espectro de CD foi registrado. Utilizou-se como controle uma solução do qua-complexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, onde supõe-se que todo o cobre adicionado é inserido na proteína HSA.

3.3. Medidas de Dicroísmo Circular: Modificações na Estrutura Secundária da HSA

Neste estudo, utilizou-se novamente a espectroscopia de dicroísmo circular. Entretanto, neste caso utilizou-se uma cubeta de quartzo esférica de 0,10 cm e o espectro foi registrado no intervalo de 190 a 300 nm, à temperatura ambiente. Os espectros foram registrados com velocidade de leitura de 100 nm/min e tempo de resposta de 1s. Cada espectro foi feito com acúmulo de 3 varreduras (*scans*). As reações foram realizadas em microtubos, utilizando concentrações de $3,3 \times 10^{-7}$ a 15×10^{-6} M dos complexos de cobre, adicionados a solução de albumina 5×10^{-6} M, em tampão fosfato

50 mM, contendo NaCl 0,1M em pH 7,40. Os resultados foram expressos como elipsicidade residual (θ), em $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$, que é definida como:

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

onde **CD** é o valor obtido em miligraus, **n** é o número de resíduos de aminoácidos que no caso da albumina humana é 585, **l** é caminho ótico da cubeta e **Cp** é a concentração da proteína [98].

3.4. Ensaios de Viabilidade Celular com Células Melanoma B16F10 e TM1MNG-3

Estes ensaios de viabilidade e adesão foram obtidos com a colaboração da aluna de doutorado Beatriz E. Borges, no laboratório da Dra. Lia Nakao, do Departamento de Patologia Básica, da Universidade Federal do Paraná.

Para estes ensaios foram utilizadas linhagens de células B16F10, obtidas comercialmente e linhagens de células TM1, cedidas pelo Dr. Roger Chammass, da Faculdade de Medicina da USP. As células B16F10 são melanomas murinos usualmente utilizados em ensaios similares descritos na literatura [99] e foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB Cultilab), em pH 7,40. O repique celular foi realizado 3 vezes por semana, numa proporção de 1:3, em placas p100. A linhagem TM1 foi obtida durante a progressão tumoral de melanócitos murino (melan-a) após inúmeros ciclos de desadesão [100], cultivadas em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 - Cultilab), em pH 6,90, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB Cultilab). O repique celular foi realizado 3 vezes por semana, numa proporção de 1:5 em placas p100. As duas linhagens foram mantidas em estufa a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ e umidade controlada.

As duas linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 96 poços, com 10⁴ células/poço, em meio específico. As células foram deixadas na estufa a 37 °C por 24 horas, para que aderissem. O meio de cultura das células foi substituído por outro contendo 1% de SFB, soro fetal bovino (ligante competitivo de íons cobre), e, em seguida, as células foram tratadas com os compostos de cobre em estudo, nas concentrações 5 µM, 10 µM, 15 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 125 µM e 150 µM, para a B16F10 e 15 µM, 20 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 125 µM e 150 µM para as TM1, os controles utilizados continham as linhagens celulares em meio adequado e a quantidade utilizada de DMSO (utilizado para solubilizar o complexo) em cada ensaio, posterior ao tratamento as células ficaram por mais 24 horas na estufa a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂.

Após esse tempo de tratamento, as células foram submetidas ao ensaio de MTT (metiltiazotetrazólio) da seguinte maneira: o meio foi aspirado e 200 µl de uma solução 0,5 mg/ml de MTT (preparada em HBSS – solução salina balanceada de Hank) foram adicionados a cada poço. As células foram incubadas em estufa de CO₂ a 37° C durante 3 horas. O meio contendo MTT foi cuidadosamente retirado e 200 µl de DMSO (Sigma) foram adicionados em cada poço. O meio foi homogeneizado 10 vezes. O conteúdo de cada poço foi transferido para outra placa de 96 poços devidamente identificada. A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 570 nm e descontada dos valores de absorbância em 655 nm [101]. Esses ensaios foram realizados em triplicatas para cada condição de experimento, em 3 experimentos independentes.

3.5. Ensaio de Adesão Celular com Células B16F10

Placas de 96 poços foram tratadas com 15 µg/mL de matrigel diluída em PBS (solução salina tamponada com fosfato), durante 16 horas a 4 °C. Os poços foram lavados para retirar as proteínas não ligadas e então bloqueados com 1% de albumina bovina (BSA) por 2 horas, a 37 °C.

Enquanto isso, células B16F10 foram incubadas com os compostos cobre nas seguintes concentrações: Composto (1) 150µM, Composto (2) 5 µM, Composto (3) 75 µM e Composto (4) 5 µM por 24 horas. Após este período de incubação, as células viáveis (avaliadas pelo método de exclusão de Tripán Blue) foram soltas das placas, contadas em câmara de Neubauer e ressuspensas em tampão HEPES (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mg/mL D-glicose, pH 7,40) adicionando também cátions divalentes (Mg²⁺ e Ca²⁺ na concentração de 1 mM cada). Após esse processo, as células foram plaqueadas (10⁵ células/poço) sobre os poços previamente tratados com matrigel e as placas mantidas a 37 °C, durante duas horas, para que ocorresse a adesão. Os poços foram então lavados três vezes para remoção das células não aderidas. As células aderidas foram coradas com azul de metileno (0,4% de azul de metileno em 30% metanol), o corante foi extraído (0,5% ácido acético, 50% metanol) e a absorbância foi mensurada em 650 nm [102]. Esses ensaios foram realizados em quintuplicatas para cada experimento, em 3 experimentos independentes.

3.6. Interações dos Complexos com DNA

As soluções dos complexos de cobre(II) (partindo-se da concentração 10 µM para todos os complexos estudados) foram tituladas com quantidades crescentes de DNA (0 – 98,6 µM) em tampão fosfato 50 mM e pH 7,40, com o objetivo de verificar possíveis interações com o DNA. Medidas de Absorbância a 260 nm foram realizadas após cada adição de alíquotas de DNA, utilizando espectrofotômetro modelo UV-1650PC da Shimadzu, e cubetas de quartzo de caminho óptico de 1,00 cm. A concentração do DNA foi determinada pela intensidade de absorção em 260 nm, com

valor de coeficiente de absorvidade molar conhecida de $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [103] utilizando o mesmo espectrofotômetro do experimento.

3.7. Reatividade frente ao DNA: Experimentos de Atividade Nuclease

Utilizamos a bactéria *E. coli* que foi transformada com o plasmídeo pBluescript II de 2961 pares de bases (Stratagene) para obter o DNA plasmidial. Esses ensaios foram obtidos com a colaboração da aluna de doutorado Marcela Pietro Bach, do laboratório da Dra. Carla Columbano de Oliveira, do Instituto de Química USP. Após esta etapa, o DNA plasmidial foi extraído e purificado usando um “kit” de purificação da Qiagen. A concentração de DNA plasmidial obtida foi de $360 \text{ ng}/\mu\text{L}$, que foi determinada pela intensidade de absorção em 260 nm , com valor de coeficiente de absorvidade molar conhecida de $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, utilizando o equipamento *nanodrop*, no qual é adicionado um volume de $2 \mu\text{L}$ no equipamento efetuando-se em seguida a medida de absorbância [104]. As amostras reacionais ($20 \mu\text{L}$ volume total) contendo 36 ng de DNA superenovelado (Forma I), 50 mM tampão fosfato em $\text{pH } 7,40$, em presença ou ausência de $125 \mu\text{M}$ de H_2O_2 e com diferentes concentrações de complexos de cobre(II), na faixa de 25 a $900 \mu\text{M}$, foram incubadas a 37°C , variando-se o tempo de incubação. Após a incubação, adicionaram-se $4 \mu\text{L}$ de tampão contendo revelador, sendo então as amostras submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%), em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) $1\times$ à 100 V , por 2 h .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO I - Síntese dos complexos de cobre

4.1. Análise Elementar

Os complexos preparados foram coerentes com a estrutura esperada em cada caso, de acordo com os dados de análise elementar: composto **(1)** $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$, composto **(2)** $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}](\text{ClO}_4)_4$, além dos compostos **(3)** $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})(\text{CF}_3\text{SO}_3)](\text{CF}_3\text{SO}_3)$ e $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ composto **(4)**, que já haviam sido sintetizados e caracterizados anteriormente. Ver Esquema 1.

O composto **(1)** já havia sido estudado em nosso laboratório, tanto do ponto de vista estrutural como de reatividade. Dependendo do pH, pode ser isolado como espécie mononuclear (pH ~5-6, ou como espécie cíclica polinuclear (pH ~9), [105]. No presente estudo a espécie mononuclear foi usada para preparar o correspondente complexo dinuclear **(2)**, utilizando o ligante ponte diamínico, 2,2'-bis(aminometil)difenila.

Esquema 1

Tabela 1. Resultados de análise elementar para os compostos sintetizados:

Composto	% C	% H	% N	% Cu
[Cu(apyhist)H₂O](ClO₄)₂ 1 MM = 494,69g.mol ⁻¹	29,26 (29,14)	3,50 (3,26)	11,30 (11,33)	12,63 (12,83)
[Cu₂(apyhist)₂dpam](ClO₄)₄ 2 MM = 1165,72g.mol ⁻¹	40,06 (39,15)	3,83 (3,80)	11,48 (12,00)	11,89 (10,90)
[Cu(N22)(H₂O)(CF₃SO₃)](CF₃SO₃) 3 MM = 1392,22g.mol ⁻¹	41,09 (39,63)	3,14 (3,61)	6,25 (6,03)	9,22 (9,11)
[Cu₂(N22-22)(H₂O)₂(CF₃SO₃)₂](CF₃SO₃)₂ 4 MM = 697,11g.mol ⁻¹	41,25 (39,68)	3,18 (3,48)	6,23 (6,04)	8,96 (9,12)

Os valores calculados estão entre parênteses, considerando a fórmula mínima.

4.2. Caracterização Espectroscópica dos Complexos

4.2.1. Espectroscopia Eletrônica

Nos espectros UV/Vis de complexos metálicos, as principais bandas de absorção observadas podem ser atribuídas basicamente a três tipos de transições eletrônicas [106]. As absorções na região do ultravioleta, de alta energia, estão relacionadas com as transições internas dos ligantes (LT) ($n \rightarrow \pi$ e $\pi \rightarrow \pi^*$), onde n é orbital não ligante, π é orbital ligante e π^* é orbital anti-ligante. As bandas que aparecem na região do ultravioleta próximo/visível estão relacionadas geralmente a transições de transferência de carga metal ligante ou ligante metal (TCML ou TCLM). Em uma transição, um elétron é movido entre orbitais que são predominantemente dos ligantes e orbitais que são predominantemente do metal. A transição é classificada como transição de transferência de carga do ligante para o metal, TCLM ($\pi \rightarrow d\pi$) ou como transferência de carga do metal para o ligante, TCML ($d\pi \rightarrow \pi^*$). Este tipo de transição é mais frequentemente observada em complexos com ligantes que possuem orbitais π^* semipreenchidos, especialmente ligantes aromáticos. O outro tipo de transição observada na região do visível é a chamada transição d-d, de menor intensidade ($\epsilon \approx 10$ a 10^2 mol⁻¹ L cm⁻¹), fundamentalmente entre orbitais preferencialmente centrados no metal.

Para os ligantes orgânicos do tipo bases de Schiff, as transições LT $\pi \rightarrow \pi^*$, referentes aos grupos cromóforos C=N, C=C, são registradas na literatura, em geral na região entre 196 – 313 nm, com coeficiente de absorvidade molar (ϵ) maior que $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, indicando transições completamente permitidas pelas regras de seleção (Laporte e Spin) [107]. Nos complexos, estas bandas podem sofrer deslocamentos devido à coordenação ao íon metálico. As bandas referentes às transições LMCT ($\pi \rightarrow d\pi$) aparecem na região de 320 – 450 nm, com valores de ϵ característicos em torno de $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Estas bandas também são permitidas pelas regras de seleção e se caracterizam por intensas absorções na região do visível e UV próximo [106].

As **Figuras 13, 14 e 15** referem-se aos espectros eletrônicos obtidos para os compostos sintetizados, e que foram utilizados para os estudos do projeto, sendo que os valores respectivos de $\lambda_{\text{máx}}$ e ϵ estão na **Tabela 2**.

Figura 13. Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (**1**) em água.

Figura 14. Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (2) em água, contendo 1% DMSO.

Figura 15. Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ (3) e $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (4), em água.

Os parâmetros espectroscópicos obtidos das Figuras acima estão relacionados na **Tabela 2** a seguir. As bandas d-d características dos complexos (1) e (2) apareceram em 632 e 664 nm, respectivamente. Para os complexos (3) e (4) as bandas d-d têm intensidade muito baixa, não sendo mensurável até concentrações de 2 mM.

Tabela 2. Caracterização das bandas observadas ($\lambda_{\text{máx}}$) e respectivos valores de absorvidade molar (ϵ) dos complexos.

	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ (mol ⁻¹ L cm ⁻¹)	Transição
[Cu(apyhist)H₂O](ClO₄)₂ 1	208	$3,15 \times 10^4$	LT ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	277 (om*)	$4,1 \times 10^3$	LT ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	285	$8,0 \times 10^3$	LT ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	295 (om)	$5,8 \times 10^3$	LT ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	632	84	d - d
[Cu₂(apyhist)₂dpam](ClO₄)₄ 2	277 (om)	$1,6 \times 10^4$	LT ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	285	$1,8 \times 10^4$	LT ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	295 (om)	$1,4 \times 10^4$	LT ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	383	$3,4 \times 10^2$	LMCT
	510	$4,8 \times 10^2$	LMCT
	664	175	d - d
[Cu(N22)(H₂O)(CF₃SO₃)](CF₃SO₃) 3	261	$9,1 \times 10^3$	LT ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	268 (om)	$6,7 \times 10^3$	LT ($\pi \rightarrow \pi^*$)
[Cu₂(N22-22)(H₂O)₂(CF₃SO₃)₂](CF₃SO₃)₂ 4	261	$1,7 \times 10^4$	LT ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	268 (om)	$1,3 \times 10^4$	LT ($\pi \rightarrow \pi^*$)

*om = ombro

4.2.2. Espectroscopia na região do Infravermelho

As frequências das vibrações obtidas através de espectros no infravermelho permitem caracterizar as ligações presentes nos compostos e alguns grupos específicos [108]. Os espectros obtidos podem ser observados nas **Figuras 16, 17, 18 e 19**.

Figura 16. Espectro vibracional na região do infravermelho do composto $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (1).

Figura 17. Espectro vibracional na região do infravermelho do composto $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (2).

As bandas encontradas para o composto **(1)** foram as mesmas encontradas para o composto **(2)**, indicando a proximidade entre as estruturas, e atribuídas à presença dos mesmos grupos.

Para o composto **(2)**, pode-se observar uma banda em 1597 cm^{-1} que é referente à presença da imina (estiramento $\text{C}=\text{N}$) coordenada ao metal. A banda em $1140 - 1060\text{ cm}^{-1}$ relacionada ao estiramento do ânion perclorato e também a banda em 623 cm^{-1} mostrando uma deformação para o próprio ânion, indicando que neste complexo o ânion perclorato atua como contra-íon (Figura 3). A banda em 1430 cm^{-1} se refere à presença de $\text{C}=\text{N}$ e $\text{C}=\text{C}$ do anel da piridina.

Foi observada ainda uma banda em torno de $1125 - 1143\text{ cm}^{-1}$ atribuída à deformação angular do N-H no plano, característica do anel imidazol, presente no ligante histamina. E uma banda em torno de 3332 cm^{-1} atribuída ao grupo N-H da imina e outra em torno de 1630 cm^{-1} , a banda larga em torno de 3500 que pode ser atribuída a amina primária do complexo.

Figura 18. Espectro vibracional na região do infravermelho do composto $[\text{Cu}(\text{N}22)(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ (**3**).

Figura 19. Espectro vibracional na região do infravermelho do composto $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (**4**).

As principais bandas observadas para os compostos (**3**) e (**4**) são muito semelhantes, as diferenças estão nas intensidades dessas bandas, pois os compostos contêm os mesmos grupos, sendo o composto (**4**) um dímero do composto (**3**).

Para o composto (**4**) é possível observar a banda em $3080\text{-}3010\text{ cm}^{-1}$ que podem ser atribuídas ao grupo piridina presentes na estrutura, o anel aromático apresenta bandas em torno de $900\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ devido às vibrações angulares fora do plano, em aproximadamente 640 cm^{-1} é possível observar uma banda que pode ser atribuída a esses grupos, e uma confirmação do anel aromático geralmente é feita na faixa de $1650\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ e $1500\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$, onde podemos observar picos em 1490 e 1455 cm^{-1} referentes a estiramento $\nu(\text{C}=\text{C})$. A presença de amina terciária mostra a ausência de bandas em torno de 3500 cm^{-1} . As bandas em torno de $1310\text{-}1135\text{ cm}^{-1}$ podem ser atribuídas à amina terciária ligada ao metal. As bandas de alta energia entre 3100 e 2900 cm^{-1} , podem ser atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{CH})$ da piridina, e a banda em 1615 cm^{-1} pode indicar estiramento $\nu(\text{C}=\text{C})$ $\nu(\text{C}=\text{N})$ também do anel da piridina [109].

A banda em aproximadamente 1033 cm^{-1} está relacionada ao estiramento do ânion triflato livres, atuando como contra-íon e também em $774\text{-}759\text{ cm}^{-1}$ como espécies agregadas [110].

Para melhor análise dos resultados, as principais bandas observadas nos espectros destes complexos estão listadas na **Tabela 3** abaixo.

Tabela 3. Principais bandas de absorção observadas na região do infravermelho para os complexos estudados:

	νOH	$\nu\text{C}=\text{N}$ $\nu\text{C}=\text{C}$	$\nu\text{C}=\text{N}$ $\nu\text{C}-\text{N}$	$\nu\text{N}-\text{H}$	$\delta\text{N}-\text{H}$	νClO_4^- δClO_4^-	νOTf^- δOTf^-
$[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$	3597	1499	1624 1092	3598 3456	1143	1099 621	-
$[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{2+}$	-	1430	1597 1142-1026	3574 3332	1143	1090 623	-
$[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})(\text{OTf})]^+$	3375	1615 1600-1430	1600 1200	-	1310-1135	-	759 1033
$[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$	3375	1615 1600-1430	1700 1250	-	1310-1135	-	759 1033

ν = estiramento, δ = deformação.

4.2.3. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

A Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) é uma técnica poderosa para estudar complexos com elétrons desemparelhados. Há várias técnicas de EPR, cada uma com vantagens distintas. A mais popular, devido à sua viabilidade, é a espectroscopia EPR de onda contínua, onde a radiação de microondas (GHz) é aplicada à amostra continuamente [111]. O EPR baseia-se no fato de que um spin eletrônico pode adotar duas orientações ao longo da direção definida por um campo magnético aplicado, β . A diferença de energia entre os estados $m_s = +1/2$ e $-1/2$ é:

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

Onde o valor de g , chamada constante giromagnética, depende da identidade da partícula e μ é o momento magnético [106]. Para o elétron livre, g_e é 2,0023. O fator g em um complexo difere de g_e por uma quantidade que depende da habilidade do campo aplicado de induzir campos magnéticos locais no complexo. Se $g > g_e$, o campo local é maior do que o aplicado; se $g < g_e$, o campo local é menor. O sinal e a magnitude dos campos locais induzidos dependem da separação dos níveis de energia do complexo. Quanto mais próximos eles estão, mais fácil é para o campo aplicado induzir a circulação dos elétrons, e consequentemente produzir um campo magnético local. O valor de g indica a simetria do ambiente ligante e dá uma indicação da disponibilidade quanto aos níveis de energia do complexo. As linhas observadas em um espectro de EPR podem ser desdobradas pela interação do spin eletrônico com o spin nuclear de átomos vizinhos, que apresentem momento magnético. Em espectros de íons metálicos paramagnéticos, o desdobramento dominante vem do próprio íon metálico chamado estrutura hiperfina (A). O espectro apresenta-se usualmente com muitas linhas, porque os valores de g e das constantes hiperfinas (A) são anisotrópicas, isto é, possuem valores diferentes dependendo do eixo de simetria. Por exemplo, para o íon cobre com momento nuclear $I = 3/2$ o sinal hiperfino será desdobrado em $n = 2I + 1 = 4$ linhas. A absorção de energia para mudar a orientação de spin de um elétron isolado gera um espectro que normalmente é registrado na forma de 1ª derivada.

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

Deste modo, a interpretação dos espectros de EPR permite obter informações sobre a configuração eletrônica de íons metálicos paramagnéticos, seu estado de oxidação e suas características estruturais, como por exemplo, distorções ao redor do íon [112].

Primeiramente foram obtidos espectros de EPR dos complexos preparados no estado sólido.

Figura 20. Espectros de EPR dos complexos no estado sólido, a 77K. $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (1) $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (2); $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})(\text{OTf})]^+$ (3); $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (4). Todos os espectros foram registrados com ganho de $4,48 \times 10^2$, amplitude de modulação de 15G, constante de tempo de 20,48 s e 3 varreduras

Os valores correspondentes dos parâmetros $g_{\perp}$ e $g_{\parallel}$ de cada um dos complexos, no estado sólido, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores dos parâmetros de $g_{\perp}$ e $g_{\parallel}$ dos compostos sintetizados, no estado sólido, a 77K.

Composto	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$
1	2,060	2,208
2	2,061	2,206
3	2,125 (g_{iso})	-
4	2,094 (g_{iso})	-

Como os espectros foram obtidos com amostras de um pó cristalino, o espectro apresenta todas as direções superpostas e com linhas mais largas e distorcidas. Observou-se que o composto **(2)** apresenta simetria axial, ou seja, o ambiente ao redor do íon cobre no eixo z é diferente do ambiente no eixo xy, que são iguais, e o parâmetro $g_{//}$ tem maior valor do que o $g_{\perp}$. Já os compostos **(3)** e **(4)** apresentaram um único valor de g no estado sólido, um g isotrópico, que é o mesmo em todas as direções, não permitindo a visualização da estrutura hiperfina. Neste caso, os ligantes são mais flexíveis, que no caso dos compostos **1** e **2**, permitindo maior movimentação dos grupos ligantes ao redor do metal.

Os espectros de EPR dos compostos estudados também foram obtidos em soluções congeladas. Esses espectros são apresentados na **Figura 21**.

Figura 21. Espectros de EPR dos complexos em solução saturada, a 77K. $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^+$ **(1)** em água; $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{2+}$ **(2)** em acetonitrila; $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})(\text{OTf})]^+$ **(3)** em acetona; $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ **(4)** em acetona. Todos os espectros foram registrados com ganho de $3,56 \times 10^2$, amplitude de modulação de 15G, constante de tempo de 20,48 s e 3 varreduras.

Neste caso, foi possível observar estruturas hiperfinas, devido às interações spin eletrônico-spin nuclear do íon de cobre, obtendo-se então maiores informações sobre as espécies em solução.

A **Tabela 5** apresenta os parâmetros correspondentes, medidos nos espectros de EPR obtidos com soluções dos compostos sintetizados e do aqua-complexo, $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ (como perclorato de cobre(II)), usado como controle.

Tabela 5. Valores do parâmetro g e das constantes hiperfinas (A) dos compostos sintetizados, em solução congelada a 77K.

Composto	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel} (\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1})$	$g_{\parallel} / A_{\parallel} (\text{cm})$
1	2,062	2,262	176	128
2	2,081	2,225	182	122
3	2,071	2,253	152	148
4	2,078	2,227	166	134
$[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$	2,075	2,361	154	153

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

A relação empírica $g_{\parallel} / A_{\parallel} (\text{cm})$ tem sido usada para caracterizar complexos miméticos de diversas proteínas de cobre, entre elas a proteína SOD (superóxido dismutase), e fornece um indicativo da extensão da distorção tetraédrica num ambiente tetragonal ao redor do metal. Se esta razão estiver na faixa de 105 – 135 cm, a geometria observada ao redor do íon será provavelmente mais corretamente descrita como quadrado planar, e se esta relação for > 250 cm, a geometria será mais tetraédrica [113]. Portanto, quanto maior o valor desta relação, maior a extensão da distorção tetraédrica na esfera de coordenação do metal.

Baseado em nossos resultados, o composto **1**, que já foi estudado em nosso grupo [114], apresentou a relação $g_{\parallel}/A_{\parallel}$ como 128, sugerindo que a geometria ao redor do íon metálico é mais quadrado planar, com pequena distorção tetraédrica. O composto **2** apresentou a relação $g_{\parallel}/A_{\parallel}$

como 122, o que indica uma estrutura ao redor do íon cobre muito parecida com seu análogo mononuclear, também sugerindo uma estrutura quadrado planar.

Tanto o composto **3** como o composto **4** parecem também possuir uma estrutura mais tetragonal ou quadrado planar, pois o valor $g_{//}/A_{//}$ encontrado foi de 148 e 134, respectivamente, tendo sido já descritos na literatura [96].

5. Resultados e Discussão II - Reatividade e Interações com Biomoléculas

5.1. Verificação da atividade tirosinase - Catálise da oxidação da L-Dopa

Buscando verificar a atividade tirosinase dos complexos estudados, foram conduzidos experimentos cinéticos para comparar a atividade catalítica dos compostos na oxidação da *L*-Dopa (di-hidroxifenilalanina), utilizando tampão fosfato pH 7,00 e $T = 25^{\circ}\text{C}$, monitorando-se a evolução da reação através da formação da respectiva dopaquinona em 475 nm.

Esquema 2: Sítio ativo da tirosinase no estado Cu(II) oxi com ligação na forma $\mu - \eta^2 : \eta^2$

A tirosinase apresenta um sítio ativo com dois centros de cobre, acoplados magneticamente, coordenados a grupos imidazólicos de histidina. Entre os centros de cobre se insere a molécula de oxigênio, conforme mostrado no Esquema acima, sendo então capaz de oxidar fenóis a catecóis (ou *o*-dihidroxibenzenos) e estes às correspondentes quinonas:

Figura 22. Etapas da oxidação de fenóis a catecóis, e catecóis a quinonas.

a) Variação da concentração dos complexos

No primeiro ciclo de ensaios variou-se a concentração dos complexos na faixa de 80-400 μM , mantendo-se constante a concentração de *L*-Dopa (8,0 mM).

Figura 23. Curvas de oxidação da *L*-Dopa, variando-se a concentração do complexo $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (**1**) de 80-400 μM , $[\text{L-Dopa}] = 8\text{mM}$, em tampão fosfato pH 7,0 e $T = 25^\circ\text{C}$.

Com os dados obtidos, podem-se calcular as velocidades iniciais para cada concentração do complexo, como mostra a **Tabela 6** a seguir.

Tabela 6. Velocidades iniciais da oxidação da *L*-Dopa em função das concentrações do Complexo **1**; $[\text{L-Dopa}] = 8,0\text{ mM}$.

$[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}, 10^{-5}\text{M}$	$V_i (\text{s}^{-1}), 10^{-5}$
0,0	0,00
8,0	1,01
32,0	5,00
40,0	6,32

A curva a seguir mostra uma dependência de pseudo-primeira ordem da velocidade de reação em função da concentração do complexo $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$.

Figura 24. Dependência da velocidade inicial de oxidação da L-dopa em função da concentração do complexo $[Cu(apyhist)H_2O]^{2+}$ (1);

A partir destes dados, estimou-se então uma constante de velocidade igual a $k_{obs} = 0,156 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, para o complexo em estudo.

Figura 25. Curvas de oxidação da L-Dopa, variando-se a concentração do complexo $[Cu_2(apyhist)_2dpam]^{4+}$ (2) de 80-400 μM , $[L\text{-Dopa}] = 8 \text{ mM}$, em tampão fosfato pH 7,0 e $T = 25^\circ C$.

Neste caso, as curvas indicaram dois processos consecutivos, um mais rápido (na faixa 0 a 50 s, **Figura 26**) e outro (acima de 150 s). Este comportamento poderia ser interpretado como uma decomposição do composto dinuclear **2**, durante o processo catalítico, formando o complexo análogo **1**, sem a ponte diamina (dpam). As velocidades para as duas etapas foram determinadas,

conforme mostrado na **Tabela 7**. Na concentração mais baixa (80 μM), observou-se um período de indução (até 25 s).

Figura 26. Curvas de oxidação da *L*-Dopa catalisada pelo complexo $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (**2**), referentes ao 1º processo.

Com os dados obtidos puderam ser calculadas as velocidades iniciais em função da concentração do complexo, como mostra a Tabela abaixo.

Tabela 7. Velocidades iniciais em função das concentrações do Complexo **2**; [L-Dopa] = 8 mM.

$[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}, 10^{-5}\text{M}$	$V_i (\text{s}^{-1}), 10^{-4}$ 1a. etapa	$V_i (\text{s}^{-1}), 10^{-4}$ 2a. etapa
0,0	0,00	0,00
8,0	0,95	0,86
16,0	0,82	0,99
32,0	8,17	1,12
40,0	5,72	1,17

A **Figura 27** mostra uma dependência de pseudo-primeira ordem com a concentração do complexo $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (**2**) referente tanto à 1ª. etapa, como à 2ª. etapa da oxidação catalisada da *L*-Dopa.

Figura 27. Dependência da velocidade inicial de oxidação da *L*-dopa, catalisada pelo complexo $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (**2**) em função da concentração do catalisador; $[\text{L-Dopa}] = 8 \text{ mM}$, tampão fosfato pH 7,00. A) 1ª. etapa; B) 2ª. etapa.

Com o gráfico obtido, pode-se estimar uma constante de velocidade igual a $k_{\text{obs}(1)} = 1,91 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, para a 1ª. etapa e $k_{\text{obs}(2)} = 0,235 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, para a 2ª. etapa. Assim, a 2ª etapa é cerca de 10 vezes mais lenta que a 1ª. Esta segunda etapa provavelmente envolve a catálise pela espécie mononuclear, menos ativa cataliticamente, formada a partir da dissociação da espécie dinuclear. Verificou-se que esta constante cinética determinada para a 2ª. etapa ($0,235 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) é da mesma ordem de grandeza que a correspondente constante para o composto **1** ($0,156 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) corroborando esta interpretação.

Figura 28. Curvas de oxidação da L-Dopa, variando-se a concentração do complexo $[\text{Cu}(\text{N}22)(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^{2+}$ (**3**) de 80-400 μM , $[\text{L-Dopa}] = 8 \text{ mM}$, em tampão fosfato pH 7,0 e $T = 25^\circ\text{C}$.

As velocidades iniciais calculadas para a dependência com a concentração do complexo $[\text{Cu}(\text{N}22)(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^{2+}$ (**3**) são mostradas na **Tabela 8** abaixo.

Tabela 8. Velocidades iniciais em função das concentrações do Complexo **3**, $[\text{L-Dopa}] = 8 \text{ mM}$.

$[\text{Cu}(\text{N}22)(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^{2+}, 10^{-5}\text{M}$	$V_i (\text{s}^{-1}), 10^{-5}$
0,0	0,00
8,0	6,64
16,0	12,6
32,0	22,1
40,0	26,6

Também neste caso o gráfico abaixo mostrou uma dependência de pseudo-primeira ordem para o complexo $[\text{Cu}(\text{N}22)(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^{2+}$ (**3**).

Figura 29. Dependência da velocidade inicial da oxidação da *L*-dopa, em função da concentração do complexo $[Cu(N22)(H_2O)OTf]^+ (3)$.

A partir do gráfico obtido pode-se estimar uma constante de velocidade igual a $k_{obs} = 0,68 M^{-1} s^{-1}$ para o complexo em estudo.

Figura 30. Curvas de oxidação da *L*-Dopa, variando-se a concentração do complexo $[Cu_2(N22-22)(H_2O)_2(OTf)_2]^{2+} (4)$ de 80-400 μM , $[L-Dopa] = 8 mM$, em tampão fosfato pH 7,0 e $T = 25^\circ C$.

Com os dados obtidos pode-se calcular as velocidades iniciais para o complexo $[Cu_2(N22-22)(H_2O)_2(OTf)_2]^{2+} (4)$, como mostra a **Tabela 9** a seguir.

Tabela 9. Velocidades iniciais em função das concentrações do Complexo **4**; [L-Dopa] = 8 mM.

$[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}, 10^{-5}\text{M}$	$V_i (\text{s}^{-1}), 10^{-4}$
0,0	0,0
8,0	1,54
16,0	19,2
32,0	74,9
40,0	82,4

A curva obtida mostrou também uma dependência de pseudo-primeira ordem para o complexo $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (**4**).

Figura 31. Dependência da velocidade inicial da oxidação da L-dopa em função da concentração do complexo $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (**4**).

A partir deste gráfico obtido pode-se estimar uma constante de velocidade igual a $k_{\text{obs}} = 20,4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para o complexo em estudo.

b) Variação da concentração do substrato

No segundo ciclo de ensaios variou-se a concentração da *L*-Dopa na faixa de 4 a 8 mM, mantendo-se constante a concentração dos diferentes complexos, $[\text{CuL}] = 320\mu\text{M}$.

Figura 32. Curvas de oxidação da *L*-Dopa em variadas concentrações (4-8 mM), catalisada pelo complexo $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^+$ (**1**) na concentração de $320\mu\text{M}$ em função do tempo. Tampão fosfato pH 7,00 e $T = 25^\circ\text{C}$.

Com os dados obtidos pode-se calcular as velocidades iniciais para o complexo $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^+$ (**1**), como mostra a Tabela abaixo

Tabela 10. Velocidade inicial para diferentes concentrações de *L*-Dopa, $[\text{Complexo } \mathbf{1}] = 320\mu\text{M}$.

$[\text{L-Dopa}] \times 10^{-3}\text{M}$	$V_i (\text{s}^{-1}), 10^{-5}$
0,0	0,0
4,0	1,97
5,6	3,14
7,2	3,98
8,0	5,00

A curva abaixo mostra uma dependência de pseudo-primeira ordem com relação à concentração de substrato, para a reação catalisada pelo complexo $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^+$ (**1**).

Figura 33. Dependência da velocidade inicial da oxidação da L-dopa, catalisada pelo complexo $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^+$ (**1**) em função da concentração do substrato.

Com o gráfico obtido pode-se estimar uma constante de velocidade igual a $k_{\text{obs}} = 0,57 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para o complexo **1** em estudo.

Figura 34. . Curvas de oxidação da L-Dopa em variadas concentrações (4-8 mM), catalisada pelo complexo $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (**2**) na concentração de $320 \mu\text{M}$ em função do tempo. Tampão fosfato pH 7,00 e $T = 25^\circ\text{C}$.

Com os dados obtidos pode-se calcular as velocidades iniciais para o complexo $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (**2**), como mostra a tabela abaixo.

Tabela 11. Velocidade inicial em função da concentração de L-Dopa, para a reação catalisada pelo [Complexo **2**] = 320 μM .

[L-Dopa], 10^{-3}M	V_i (s^{-1}), 10^{-4}
0,0	0,00
4,0	5,00/0,55*
5,6	5,90/0,62*
7,2	6,80/0,84*
8,0	8,17/0,77*

* 2º processo referente a uma segunda etapa de reação ainda desconhecida.

Figura 35. Dependência da velocidade inicial da oxidação da L-dopa, catalisada pelo complexo $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (**2**) em função da concentração do substrato.

Com o gráfico obtido pode-se estimar uma constante de velocidade igual a $k_{\text{obs}} = 1,02 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para o complexo **2** em estudo.

Figura 36. . Curvas de oxidação da *L*-Dopa em variadas concentrações (4-8 mM), catalisada pelo complexo $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ (**3**) na concentração de $320\mu\text{M}$ em função do tempo. Tampão fosfato pH 7,00 e $T = 25^\circ\text{C}$.

Com os dados obtidos pode-se calcular as velocidades iniciais para o complexo $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ (**3**), como mostra a tabela abaixo.

Tabela 12. Velocidade inicial para diferentes concentrações de *L*-Dopa, $[\text{Complexo } \mathbf{3}]=320\mu\text{M}$.

$[\text{L-Dopa}] , 10^{-3}\text{M}$	$V_i (\text{s}^{-1}), 10^{-5}$
0,0	0,0
4,0	24,2
5,6	24,5
7,2	23,0
8,0	22,1

A curva mostrou um efeito de saturação para concentrações mais altas do substrato, para a reação catalisada pelo complexo $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ (**3**).

Figura 37. Dependência da velocidade inicial da oxidação da L-dopa, catalisada pelo complexo $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ (**3**) em função da concentração do substrato.

A curva mostra uma tendência a saturação, onde o aumento da concentração do substrato não aumenta significativamente a velocidade da reação.

Figura 38. Curvas de oxidação da L-Dopa em variadas concentrações (4-8 mM), catalisada pelo complexo $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (**4**) na concentração de $320\mu\text{M}$ em função do tempo. Tampão fosfato pH 7,00 e $T = 25^\circ\text{C}$.

Com os dados obtidos pode-se calcular as velocidades iniciais para o complexo $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (**4**), como mostra a **Tabela 13**.

Tabela 13. Velocidades iniciais para diferentes concentrações de *L*-Dopa, reação catalisada pelo [Complexo 4] = 320μM.

[L-Dopa] , 10 ⁻³ M	Vi (s ⁻¹), 10 ⁻⁴
0,0	0,0
4,0	31,5
5,6	29,2
7,2	36,7
8,0	74,9

A curva mostra uma dependência de pseudo-primeira ordem para o complexo [Cu₂(N22-22)(H₂O)₂(OTf)₂]²⁺ (4).

Figura 39. Dependência da velocidade inicial da oxidação da *L*-dopa, catalisada pelo complexo [Cu₂(N22-22)(H₂O)₂(OTf)₂]²⁺ (4) em função da concentração do substrato.

Com o gráfico obtido pode-se estimar uma constante de velocidade igual a $k_{\text{obs}} = 7,06 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para o complexo 4 em estudo.

A comparação entre os diversos complexos é apresentada no gráfico abaixo, verificando através das velocidades iniciais que os complexos [Cu₂(N22-22)(H₂O)₂(OTf)₂]²⁺ e [Cu₂(apyhist)₂dpam]⁴⁺ são mais reativos em relação à oxidação da *L*-Dopa do que os complexos [Cu(N22)(H₂O)OTf]⁺ e [Cu(apyhist)H₂O]²⁺.

Figura 40. Comparação da atividade catalítica dos complexos em função do tempo, considerando o substrato L-dopa [8,0 mM], os complexos dinucleares [160 μM] (nos quais haveria o dobro de íons Cu), e os complexos mononucleares [320 μM].

Figura 41. Comparação das velocidades obtidas em função das concentrações dos complexos utilizados.

Resumindo os dados determinados para a dependência com a concentração do catalisador:

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

Tabela 14. Valores encontrados para a constante de pseudo 1ª ordem da cinética catalítica dos compostos. [L-dopa] = 8,0 mM

Complexo de Cobre	Constante cinética (pseudo-primeira ordem) $k_{\text{obs}}, \text{s}^{-1}$
$[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (1)	0,156
$[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (2)	1,91 / 0,235
$[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ (3)	0,68
$[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (4)	20,4
Tirosinase*	65,5

*referência para oxidação de substratos utilizando tirosinase de cogumelo (115)

Considerando a dependência da velocidade inicial de oxidação da L-dopa, tanto com a concentração do catalisador como do substrato:

$$V_i = k [\text{CuL}].[L\text{-dopa}], \quad \text{sendo } k = k_{\text{obs}}/[L\text{-dopa}]$$

Tabela 15. Valores encontrados para a constante de 2ª ordem da cinética catalítica dos compostos estudados.

Complexo de Cobre	Constante cinética (segunda ordem) $k, 10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
$[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (1)	0,195
$[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (2)	2,38 / 0,294
$[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ (3)	0,85
$[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (4)	25,5

Deste modo, constata-se que os complexos dinucleares, $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (2) e $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (4), são melhores catalisadores que os correspondentes mononucleares na oxidação da L-dopa. Isto já era esperado, uma vez que os dinucleares mimetizam melhor o sítio ativo das enzimas tirosinases. Além disso, verifica-se que o composto dinuclear de estrutura mais flexível, complexo 4 é mais eficiente que o de estrutura mais rígida, complexo 2.

5.2. Medidas de Dicroísmo Circular : Estabilidade Termodinâmica

A estabilidade termodinâmica relativa dos complexos de cobre(II) estudados foi obtida através da técnica de Dicroísmo Circular, utilizando a proteína HSA como ligante competitivo. O dicroísmo circular é uma técnica espectroscópica que depende da assimetria estrutural da molécula, e pode ser definida como a interação entre a diferença de absorção entre a luz polarizada à esquerda com a luz polarizada à direita por uma molécula opticamente ativa, produzindo então um espectro característico. Esta técnica é muito empregada no estudo de mudanças conformacionais, vizinhanças locais, interações de ligantes com proteínas e também como uma sonda qualitativa ou semi-quantitativa da estrutura secundária da proteína [116].

Neste experimento, utilizou-se a albumina humana (HSA), um quelante fisiológico eficiente para íons de cobre, que possui um sítio N-terminal (Asp-Ala-His) específico em uma coordenação quadrado planar com os íons cobre(II) [117]. O íon metálico ligado à albumina proporciona uma mudança das transições eletrônicas observadas próximas à região de 490-570 nm. A amplitude dessa banda característica negativa de Cotton corresponde à formação de uma espécie $[Cu^{II}(HSA)]$, em que o íon cobre se insere seletivamente no sítio N-terminal da proteína, e é diretamente proporcional à sua concentração [113]. A constante de estabilidade desta espécie $[Cu^{II}(HSA)]$ é bastante alta, com $\log K = 16,2$ para a HSA e 12.8 para a BSA (albumina bovina) [118,119].

A HSA foi titulada com quantidades crescentes de cada um dos compostos de cobre e a estabilidade termodinâmica relativa para cada um deles foi deduzida, através das respectivas constantes relativas de estabilidade, calculadas a partir da regressão linear da amplitude do CD, referente à banda a 564 nm, em função da concentração de $[Cu^{II}(HSA)]$ formado.

A capacidade de competição entre as bases de Schiff e a albumina humana na coordenação de íons cobre(II) foi comparada, para determinar a correspondente constante de estabilidade levando-se em conta os seguintes equilíbrios [113]:

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

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

onde:

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

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

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

$[\text{Cu(II)}]_0$ = concentração total de cobre adicionado ao meio

$[\text{HSA}]_0$ = concentração total de HSA presente em solução

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

Figura 42. Curva analítica da amplitude dicróica, em 564 nm, *versus* concentração para o composto $[\text{Cu}(\text{HSA})]$.

Através da equação desta reta foi possível calcular o valor de $[Cu^{II}HSA]$ após cada adição do composto de cobre, pois:

$$y = a + bx$$

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

Para cada ponto teremos um valor de y que fornecerá um valor de β_{rel} , e assumindo que $\log K = 16,2$ para $[Cu^{II}HSA]$ [113], obteremos um valor médio de $\log K$ para cada composto de cobre(II).

Figura 43. Espectro de CD da titulação de HSA (0,7 mM) com os compostos $[Cu(apyhist)H_2O]^{2+}$, $[Cu_2(apyhist)_2dpam]^{4+}$, $[Cu(N22)(H_2O)OTf]^+$ e $[Cu_2(N22-22)(H_2O)_2(OTf)_2]^{2+}$, em tampão fosfato 50mM pH7,4, temperatura ambiente, região do visível.

No entanto, os compostos **(1)** e **(2)** mostraram uma banda situada em 370 nm, conforme mostrado na **Figura 43**, ao invés da usual banda em torno de 564 nm, identificada como devida à inserção do íon cobre no sítio N-terminal da proteína [117,120]. Essa banda a 370 nm indica a coordenação do íon cobre ou do complexo a outro sítio da proteína, identificado como sendo o sítio de um resíduo de cisteína (Cys34) [14,121, 122]. Dessa forma, podemos supor que o ligante,

modulando a reatividade do complexo, faz com que o mesmo interaja com um sítio diferente do usual, visto que tanto os compostos **(3)** e **(4)**, quanto a espécie cobre-aqua e outros complexos imínicos estudados em nosso grupo, interagem geralmente no sítio N-terminal da proteína [123].

Para os compostos **(3)** e **(4)**, observou-se uma amplitude dicróica negativa em 564 nm da banda de Cotton característica, conforme a **Figura 43**. Esse conjunto de bandas positivas e negativas na região do visível é associada à ligação de íons cobre(II) no sítio N-terminal da albumina (sítio I), referente à transição d-d do íon Cu(II) coordenado ao sítio I da proteína [117].

Tabela 16. Valores de constantes de estabilidade relativas, determinadas para os compostos de cobre em experimentos competitivos com a HSA.

Composto		log K
1	$[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$	*17,62
2	$[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$	*17,67
3	$[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$	15,94
4	$[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$	16,00

*considerando a concentração do composto que interagiu com o sítio N-terminal.

As constantes obtidas possuem a mesma ordem de grandeza da constante de formação para a espécie $[\text{Cu}(\text{HSA})]$, com $\log K[\text{Cu}(\text{HSA})] = 16,2$, considerando o sítio N-terminal. Assim, observa-se que os ligantes dos compostos estudados podem competir eficientemente pelo cobre em meio biológico, por possuírem afinidade semelhante à do sítio N-terminal da HSA por estes íons. Os complexos estudados podem, portanto, ser transportados no plasma sanguíneo, onde apresentam um equilíbrio competitivo com a HSA.

5.3. Medidas de Dicroísmo Circular: Modificação na Estrutura Secundária da HSA

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

$$\% \alpha\text{-hélice} = \frac{[\theta]_{208} - 4000}{33000 - 4000} \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

onde 33000 é a elipsidade molecular para 100% de conteúdo α -hélice e 4000 é a elipsicidade molecular para 0% de estrutura α -hélice na proteína [124]. Os experimentos foram realizados utilizando concentrações mais baixas de albumina e cubeta de 0,10 cm [98]. De acordo com alguns autores, é necessário que o tampão possua NaCl para manter a força iônica, permitindo que a proteína fique enovelada, isto é, que mantenha sua estrutura secundária usual [125]. Portanto, realizaram-se os experimentos na presença do tampão fosfato 50 mM, contendo NaCl 0,1M.

Nenhum dos compostos causou uma mudança muito significativa na conformação da proteína; todos se comportaram semelhantemente ao complexo cobre-aqua, isto é, apresentando uma variação discreta do conteúdo em ambas as estruturas α -hélice e β -folha.

Através dos espectros registrados, pode-se também verificar que não houve mudanças na estrutura terciária da albumina humana, já que não houve variações na região de 260 a 280 nm, conforme visto nas Figuras abaixo. Caso houvesse modificações, deveria ser observada uma banda nesta região.

Figura 44. Espectro de CD para monitoramento da variação na estrutura secundária da HSA (5×10^{-6} M) em tampão fosfato 50 mM, contendo NaCl 0,1M, em função da interação com várias concentrações dos complexos de cobre(II): $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$, $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ e $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ nas proporções indicadas nas figuras.

A **Tabela 17** mostra os percentuais da α -hélice calculados para cada um dos compostos, a partir da fórmula (equação 1). A porcentagem estimada de estrutura α -hélice calculada para a HSA inicial, antes da adição dos complexos, é em média de 51%.

Também foram realizados cálculos utilizando o algoritmo k2d3, e os resultados não mostraram variações dentro da faixa de 190 a 240 nm, comprimento de onda que é analisado pelo programa, os valores e cálculos foram baseados no artigo de S. M. Kelly et al, e a faixa de valores relacionados a estrutura em α -hélice ficaram em torno de 67% para todos os ensaios [126].

Tabela 17. Porcentagens estimadas para α - hélice da HSA usando os cálculos de aproximação, através das curvas de Dicroísmo Circular.

Proporção Cu:HSA	α -HÉLICE (%)				
	$[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$	Composto 1	Composto 2	Composto 3	Composto 4
1:15	55	51	62	59	45
1:10	57	65	53	57	46
1:5	67	51	53	60	51
1:3	52	51	47	73	46
1:2	62	55	56	67	47
1:1	54	58	49	59	43
2:1	53	25	60	58	34
3:1	54	49	61	47	51
HSA	50	52	52	50	47

Portanto, através da técnica de dicroísmo circular na região do ultravioleta, pode-se ainda verificar possíveis modificações causadas na estrutura secundária da proteína, moduladas pelo ligante imínico. Verificou-se que os compostos analisados não foram capazes de modificar significativamente a estrutura secundária da HSA, conforme as Figura e a Tabela, pois as porcentagens de estruturas α -hélice permaneceram, em presença destes complexos.

5.4. Ensaios de viabilidade celular com células B16F10

Foram feitas as análises da citotoxicidade induzida pelos compostos $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$, $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ e $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$, em células melanomas B16F10 e TM1MNG-3, utilizando ensaio com MTT [101].

Ensaios de citotoxicidade permitem a determinação da citotoxicidade basal, assim como o estabelecimento de uma faixa de concentração biologicamente ativa para um determinado composto [100]. Dessa maneira, os ensaios foram realizados para que pudéssemos saber quais as concentrações dos compostos eram mais efetivas em causar morte celular. As células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos por 24 horas.

Figura 45. Ensaios de viabilidade celular de células melanoma B16F10, encubadas com os diferentes complexos de cobre(II), durante 24 horas.

Os resultados demonstram que os compostos dinucleares causaram mais morte celular na faixa de concentração empregada. Para concentração de 25 μM a porcentagem de morte observada foi acima de 50%, conforme medido pelo método de MTT, e podendo ser visualizada pelos cálculos na **Tabela 18**, principalmente para o composto **(2)** e, a partir dessa concentração, o composto não altera significativamente a viabilidade celular. O composto **(4)**, que na concentração média de 20 μM induziu aproximadamente 50% de morte celular, também se mostrou bastante reativo. Portanto, os

dois complexos dinucleares mostraram-se bastante citotóxicos para estas células. O complexo mononuclear **(3)** mostrou-se razoavelmente reativo, com indução de aproximadamente 50% de morte celular na concentração de 75 μM . Ao contrário, o composto **(1)** alterou pouco a viabilidade celular das linhagens de melanoma, quando comparado ao controle (veículo), pois obtivemos uma viabilidade de 79% mesmo em uma concentração de 150 μM do complexo, concentração esta elevada para esse tipo de ensaios.

A **Tabela 18** abaixo foi normalizada pelos controles utilizados para 100%, assim, é possível comparar as concentrações em relação às barras do gráfico de citotoxicidade da **Figura 45**.

Tabela 18. Porcentagens estimadas da viabilidade celular das células B16F10, relacionadas às concentrações utilizadas dos complexos de cobre.

Concentração	Complexo 1	Complexo 2	Complexo 3	Complexo 4
05 μM	-	86,3	-	96,6
10 μM	-	69,8	-	85,2
15 μM	-	48,2	-	34,4
25 μM	88,9	24,8	78,6	31,9
50 μM	90,2	20,3	64,4	40,2
75 μM	85,1	18,4	48,4	35,5
100 μM	80,0	-	24,1	-
125 μM	85,3	-	-	-
150 μM	79,0	-	-	-
IC₅₀	*	15 μM	75 μM	20 μM **

*Valor não observado para os ensaios conduzidos.

**valor aproximado pela média observada.

Ensaio análogos foram realizados para a linhagem de células melanomas TM1MNG-3, podendo-se avaliar o comportamento dos complexos frente a diferentes linhagens de células melanomas. Para a determinação da citotoxicidade induzida pelos compostos $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$, $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ e $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$, também foi utilizado o ensaio com MTT [98].

As células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos, por 24 horas. A **Figura 46**, mostra um perfil de viabilidade após esse tratamento.

Figura 46. Ensaio de viabilidade celular de células melanoma TM1MNG-3 encubadas com os diferentes complexos de cobre, durante 24 horas.

Os ensaios com as células TM1MNG3, utilizando os compostos nas concentrações de 100 μ M, 125 μ M e 150 μ M para o composto **(1)**; 15 μ M, 20 μ M e 25 μ M para o composto **(2)**; 100 μ M, 125 μ M e 150 μ M para o composto **(3)**; 25 μ M, 50 μ M e 75 μ M para o composto **(4)**, mostram que com esta linhagem celular, os complexos dinucleares também são os mais reativos. Para estes complexos dinucleares, na concentração de aproximadamente 15 μ M a morte observada foi acima de 50%.

O composto **(2)** na concentração de 15 μ M induziu uma viabilidade de 40% e utilizando concentrações acima de 20 μ M não se alterou significativamente a viabilidade, que já estava na faixa de 20%. O complexo **(4)** também se mostrou bastante reativo, com 21 % de viabilidade quando se utilizou uma concentração de 25 μ M. O complexo **(3)** induziu uma viabilidade de 50% na concentração de 100 μ M, indicando que o composto é razoavelmente reativo.

O composto **(1)**, ao contrário, alterou muito pouco a viabilidade celular das linhagens de melanoma, quando comparado ao controle (veículo), pois obtivemos uma viabilidade de 86% mesmo em uma concentração de 150 μ M do complexo, concentração bastante elevada para esse tipo de ensaios.

Tabela 19. Porcentagens estimadas da viabilidade celular das células TM1MNG-3, relacionadas às concentrações utilizadas dos complexos de cobre.

Concentração	Complexo 1	Complexo 2	Complexo 3	Complexo 4
15 μ M	-	40,0	-	-
20 μ M	-	20,5	-	-
25 μ M	-	19,8	-	21,4
50 μ M	-	-	-	17,0
75 μ M	-	-	-	18,2
100 μ M	-	-	50,8	-
125 μ M	90,2	-	51,5	-
150 μ M	86,2	-	30,2	-
IC₅₀	*	15 μ M	100 μ M	15 μ M **

*Valor não observado para os ensaios conduzidos.

**valor aproximado pela média observada.

Comparando os ensaios de viabilidade com as duas linhagens celulares utilizadas, os resultados se mostram muito próximos, isto é, para ambas as células os complexos dinucleares mostraram-se bem mais reativos ao induzir morte celular do que seus análogos mononucleares.

5.5. Ensaios de adesão celular com células B16F10

Os ensaios aqui relatados foram realizados para verificar o comportamento adesivo das células B16F10. Adesão é uma propriedade importante quando se trata de células tumorais, uma vez que sua pouca aderência favorece a ocorrência de metástase, agravando significativamente o quadro clínico de pacientes. Isto é ainda mais importante no caso de melanomas, que ultrapassam a epiderme e entram na corrente sanguínea.

Assim, as células foram tratadas com os compostos de cobre(II) nas seguintes concentrações: Composto **(1)** 150 μ M, Composto **(2)** 5 μ M, Composto **(3)** 75 μ M e Composto **(4)** 5 μ M, durante 24 horas. Essas concentrações foram escolhidas de acordo com a citotoxicidade induzida pelos complexos nos ensaios anteriores. Após esse período, as células foram plaqueadas (10^5 células/poço) sobre poços previamente tratados com matrigel (proteína de matriz extracelular), e estas placas foram mantidas a 37 °C durante 2 horas. Após esse período de adesão, podemos observar na **Figura 47** que em comparação aos respectivos controles, o composto **(1)** permite a maior adesão das células após tratamento com o mesmo, sendo seguido pelos complexos **(2)**, **(3)** e **(4)** nesta ordem, além de mostrar a adesão da B16F10 sobre a BSA.

O composto **(1)**, mesmo em uma concentração elevada de 150 μ M, foi o complexo que permitiu a maior adesão das células, se comparado com o controle. Normalizando o valor do controle para 100 %, pode-se observar uma adesão proporcional a 73,4% para a ação deste composto sobre as células, após 24 horas de incubação.

O composto **(2)** dinuclear, análogo do composto 1, teve uma adesão menor comparada a seu controle, mas comparando-se os valores de concentração utilizadas, de 5 μ M versus 150 μ M, sua ação é maior sobre a adesão celular, inibindo-a relativamente bem mais, em comparação com seu análogo, com um valor proporcional de 62,8% de adesão.

O composto **(3)** na concentração de 75 μ M induziu uma adesão proporcional a 51,7% sobre as proteínas de matriz relacionadas a seu controle, enquanto o composto **(4)** induziu a menor adesão, comparada aos outros complexos estudados neste trabalho. Com incubação de 24 horas e na concentração de 5 μ M, este complexo induziu uma adesão de apenas 41,1% relacionada ao seu controle, sendo então o complexo menos ativo neste quesito.

Entretanto, a correlação entre ocorrência de metástases e adesão celular tem sido questionada na literatura, devido à relação direta entre a adesão celular e a sobrevivência das células [127].

Figura 47. Ensaios de adesão das células B16F10, incubadas com os complexos de cobre por 24 horas, realizados em microplacas previamente tratadas com matrigel.

A **Tabela 20** relaciona a porcentagem proporcional de adesão à concentração utilizada na incubação com as células melanomas, para cada um dos compostos estudados, podendo-se observar assim, que os complexos dos análogos **(1)** e **(2)** proporcionam aparentemente uma maior adesão em relação aos complexos análogos **(3)** e **(4)**. Estes resultados indicam uma forte dependência da reatividade destes complexos com seus ligantes. Verificou-se que nas duas séries os complexos mononucleares foram mais ativos neste quesito que os análogos dinucleares.

Tabela 20. Tabela das porcentagens aproximadas de adesão das células B16F10 incubadas com os complexos.

Composto	Concentração	% de adesão*
1	150 µM	73,4
2	5 µM	62,8
3	75 µM	51,7
4	5 µM	41,1

*Valor calculado de acordo com os controles utilizados para cada complexo.

No entanto, como foram escolhidas concentrações que causaram aproximadamente 50 % de morte celular, é provável que esta % de adesão esteja refletindo a viabilidade das células.

5.6. Interações dos Complexos com DNA – Titulação dos Complexos com DNA.

Com o objetivo de elucidar possíveis interações dos complexos de cobre(II) estudados com o DNA, os correspondentes espectros de absorção foram registrados após a adição de DNA às soluções dos compostos como na literatura [84,128]. Os espectros de UV/Vis para a titulação dos complexos com DNA são mostrados na **Figura 48**. Interações com o DNA levam usualmente a danos irreversíveis, podendo levar à inibição da transcrição das informações genéticas, dificultando os processos de reparo e induzindo morte celular programada ou apoptose de células [129,130,131]. Complexos capazes de danificar o DNA de células tumorais são potencialmente agentes farmacológicos, os mais ativos causam clivagem dupla das hélices do DNA, em presença de peróxido de hidrogênio, geralmente pela geração de EROs através da redução do peróxido [132].

No entanto, para observar as interações entre os complexos e a biomolécula é melhor que este experimento seja realizado na ausência de H_2O_2 , visto que este reagente em geral causa algum dano oxidativo ao DNA, podendo provocar clivagem simples das hélices [55].

Um hipocromismo, caracterizado por uma diminuição na intensidade de absorção em 260 nm poderia ser observado, devido às intercalações π - π de tunelamento dos grupos aromáticos dos ligantes com DNA, um hipercromismo com pontos isobésticos e até um batocromismo também poderia ocorrer [59], havendo interação eficiente entre os complexos estudados e o DNA. Resultados que mostraram a interação de complexos de cobre com geometrias quadrado planar ou piramidal, já foram descritos na literatura [130,131]. Estes estudos mostraram que compostos podem interagir com o DNA de várias formas, muitas vezes moduladas pelo ligante do complexo, assim, estudos espectroscópicos podem nos dar indícios dos possíveis mecanismos de ação dos complexos, bem como seu modo de interação com o DNA [133].

Figura 48. Espectros eletrônicos de absorção no UV-Visível da titulação dos complexos de cobre(II): $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$, $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ e $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$, todos na concentração inicial de $10\mu\text{M}$, foram titulados com quantidades crescentes de DNA ($0\text{--}100\mu\text{M}$), como indicado na legenda, em tampão fosfato 50 mM ($\text{pH } 7,4$).

Com todos os complexos de cobre aqui estudados, observou-se um aumento na absorbância em torno de 260 nm . Isto poderia ser um forte indicativo de uma intercalação clássica dos complexos de cobre entre as fitas do DNA. Usualmente, após a adição de DNA, observa-se na banda de absorção da biomolécula, em 260 nm , um hipercromismo (aumento da absorbância) ou hipocromismo (diminuição da absorbância) devido a distorções na dupla-hélice do DNA, causado por uma forte ligação ou intercalação dos complexos metálicos [134].

Foram construídas retas, relacionando a intensidade da banda em 260 nm com a concentração crescente de DNA adicionado, e os resultados mostraram que os aumentos observados da banda foram proporcionais ao aumento da concentração do DNA, pois o valor da inclinação da reta foi muito próximo ao valor de ϵ para a banda característica do DNA, tendo um pequeno aumento apenas para o composto (4).

Figura 49. Reta da intensidade de absorção pela concentração de DNA (calf-thymus) adicionado, para os complexos estudados.

Foram também calculadas regressões lineares em busca da constante de ligação para os complexos, conforme mostrado na **Figura 50**. Os valores obtidos foram baixos e até negativos, com valores de r muito baixo, utilizando a equação descrita abaixo [59].

$$[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{DNA}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/[K_b/(\epsilon_a - \epsilon_f)]$$

onde $[\text{DNA}]$ é a concentração de DNA adicionada, ϵ_a é a absorbância encontrada pela concentração do complexo, ϵ_f e ϵ_b representam as absorvidades molares do complexo livre, e do complexo ligado ao DNA, respectivamente.

Figura 50. Regressão linear dos complexos para cálculo da constante K de interação.

Portanto, não foi observada variação significativa na intensidade das absorvâncias medidas, diferente dos valores esperados pelo acréscimo na absorvância, correspondente à adição de DNA, indicando assim, que não há evidências de uma interação forte dos complexos estudados com o DNA.

5.7. Reatividade frente ao DNA: Experimentos de Atividade Nuclease

Experimentos de clivagem do DNA foram conduzidos por eletroforese em gel de agarose, utilizando um DNA plasmidial superenovelado, aqui chamado também de forma I vide **Figura 51**. Através destes experimentos verifica-se a possível atividade “nuclease” dos complexos estudados, isto é, sua reatividade em clivar as hélices do DNA. Estes experimentos foram realizados incubando-se os complexos com DNA superenovelado, em concentrações e tempos diferentes, na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio [55]. Esses estudos são de grande importância no desenvolvimento de metalodrogas, uma vez que o DNA é um alvo bastante específico no combate a certas doenças, como câncer, doenças neurodegenerativas, e do coração. A atividade nuclease que cliva a fita de DNA pode desencadear uma série de evoluções, chegando até a morte celular por apoptose. Alguns compostos são capazes de clivar as fitas de dupla hélice de DNA, por clivagem simples (forma II) na fita ou clivagem dupla nas fitas (forma II) **Figura 51**, sendo a dupla cisão mais desejada para quimioterápicos, por ser de difícil reparo [135].

Figura 51. Diferentes formas de DNA.

Os primeiros ensaios foram feitos pela necessidade de verificar a faixa de concentração com atividade mensurável para cada complexo, iniciando em concentrações de 1, 25 e 50 μM para cada um deles, e com tempos de incubação de 15, 30 e 60 minutos. Nestas condições experimentais, na ausência de peróxido de hidrogênio, não foram verificadas quebras no DNA, observando-se que o DNA se manteve inalterado, semelhante ao controle, de acordo com a **Figura 52**.

Figura 52. Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com os complexos por 15, 30 e 60 min, sem adição de peróxido de hidrogênio. Canaletas: 1Kb marcador; DNA, DNA plasmidial (36ng/μL); H₂O₂, DNA + H₂O₂(125μM); As concentrações de CuL, os complexos e os tempos de incubação estão indicadas na figura.

A intensidade das bandas é proporcional à concentração do DNA e, assim, nas concentrações de 500μM, pôde-se observar que o complexo **(2)** levou a uma diminuição da banda I indicando o desenovelamento da fita, com pequeno aumento de intensidade da forma II, **Figura 53**.

Figura 53. Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com os complexos por 60 min, sem adição de peróxido de hidrogênio. Canaletas: Marcador, marcador de peso molecular; DNA, DNA plasmidial (36ng/μL); As concentrações de CuL, os complexos e os tempos de incubação estão indicadas na figura.

Com concentração de aproximadamente 1mM de complexo, obteve-se tanto para o complexo **(1)** como para o complexo **(2)** um arraste da fita de DNA, isto é, um contínuo de bandas que indica degradação acentuada desta biomolécula, com pequena diminuição da intensidade da banda I. Para o complexo **(3)** foi observado uma diminuição na banda referente à forma I, com pequeno aumento na forma II, enquanto o complexo **(4)** também se observou uma pequena diminuição na intensidade da banda I, mas apenas um sutil aumento na banda II, **Figura 54**.

Figura 54. Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com os complexos por 60 min, sem adição de peróxido de hidrogênio. Canaletas: Marcador, marcador de peso molecular; DNA, DNA plasmidial (36ng/μL); As concentrações de CuL, os complexos e os tempos de incubação estão indicadas na figura.

Em conclusão, todos os complexos estudados mostraram-se pouco reativos em relação à clivagem do DNA, sem a adição de peróxido. Isto também indica que o mecanismo hidrolítico não está presente na reatividade dos complexos, pois há a necessidade de uma ativação com H_2O_2 para iniciar a atividade nuclease [132], como veremos a seguir. De todos os compostos estudados até agora em nosso grupo de pesquisa, apenas um mostrou-se reativo sem a adição de peróxido, na concentração de 50 μM, um composto derivado de oxindol e contendo grupo piridina [55,85].

Foram conduzidos então novos ensaios de atividade nuclease, em presença do peróxido de hidrogênio. A princípio, o peróxido de hidrogênio induziu pouca clivagem na ausência dos complexos de cobre, observando-se uma pequena diminuição na intensidade da banda referente à forma I (superenrolada) e um aumento muito sutil na banda referente à forma II (relaxada), o que pode ser observado na canaleta contendo apenas o peróxido de hidrogênio, nas **Figuras 55, 56, 57 e 58**.

No entanto, na incubação dos complexos com DNA em presença de peróxido de hidrogênio, utilizado como agente ativante, houve a geração de danos ao DNA muito maiores, observando-se a forma II e a forma III, relaxada e linear respectivamente, embora a forma III tenha sido pouco observada, mesmo nos maiores tempos e nas maiores concentrações.

Para o complexo **(1)**, observou-se um pequeno aumento na intensidade na banda referente à forma II, melhor observado após 40 minutos de incubação, na concentração de 10 μ M. A intensidade dessa banda aumentou progressivamente com o aumento da concentração e com tempos maiores, e a partir da concentração de 50 μ M, no maior tempo, pode-se observar o aparecimento da forma III (linear), em pequena concentração. Já a forma I nas concentrações de 100 μ M foi diminuindo progressivamente com os tempos de incubação, à medida que a concentração da espécie relaxada foi aumentando (forma II), **Figura 55**.

Figura 55. (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (**1**) por 10, 20 e 40 min, com peróxido de hidrogênio. Canaletas: 1Kb marcador; DNA, DNA plasmidial (36ng/ μL); H_2O_2 , DNA + H_2O_2 (125 μM); As concentrações de CuL, e os tempos de incubação estão indicadas no gel. (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A), utilizando o programa *ImageJ 1.46* para a quantificação.

Para o complexo (**2**), observou-se um aumento na intensidade na banda referente à forma II, observado já com 10 minutos de incubação, na concentração de 10 μM , e essa intensidade aumentou progressivamente para 20 e 40 minutos de incubação. A partir da concentração de 50 μM , no menor tempo, pode-se observar o aparecimento da forma III (linear) ainda muito sutilmente, e também o início do desaparecimento da forma I, que a partir de 20 minutos tinha sumido. Na concentração de 100 μM , com todos os tempos de incubação, só puderam ser observadas as formas II (relaxada), em maior concentração, e a forma III (linear), como pode ser visto na **Figura 56**.

(A)

(B)

Figura 56. (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$ (**2**) por 10, 20 e 40 min, com peróxido de hidrogênio. Canaletas: 1Kb marcador; DNA, DNA plasmidial (36ng/μL); H₂O₂, DNA + H₂O₂(125μM); As concentrações de CuL, e os tempos de incubação estão indicadas no gel. (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A), utilizando o programa *ImageJ 1.46* para a quantificação.

Para o complexo **(3)**, observou-se um aumento muito sutil na intensidade da banda referente à forma II, verificado com 40 minutos de incubação, na concentração de 10 μM . A partir da concentração de 50 μM e no menor tempo, pode-se observar o aumento da intensidade da banda da forma II (relaxada), e o aparecimento da forma III (linear), com a concomitante diminuição da intensidade na banda da forma I (superenrolada). Na concentração de 100 μM , com todos os tempos de incubação, pode-se observar o aparecimento da forma III (linear) e da forma II (relaxada) em maior concentração, e a diminuição da concentração da forma I, com o seu quase desaparecimento. Pôde-se observar também o início de um arraste, o que indica a degradação do DNA, conforme mostrado na **Figura 57**.

(A)

(B)

Figura 57. (A) Gel de agarose do plasmídeo de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo $[\text{Cu}(\text{N}22)(\text{H}_2\text{O})\text{OTf}]^+$ **(3)** por 10, 20 e 40 min, com peróxido de hidrogênio. Canaletas: 1Kb marcador; DNA, DNA plasmidial (36ng/ μL); H_2O_2 , DNA + H_2O_2 (125 μM); As concentrações de CuL, e os Tempos de incubação estão indicadas no gel. (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A), utilizando o programa *ImageJ 1.46* para a quantificação.

Para o complexo **(4)**, observou-se um aumento na intensidade na banda referente à forma II a partir da concentração de 10 μM , com apenas 10 minutos de incubação. Esse aumento na concentração da forma II (relaxada) foi se intensificando progressivamente, de acordo com o maior tempo de incubação. Para a concentração de 50 μM após 10 minutos observou-se o aparecimento da forma linear III e o completo desaparecimento da forma superenrolada I. No entanto, o início de um arraste da molécula de DNA também foi observado para a concentração de 50 μM deste complexo, e, nas concentrações de 100 μM em todos os tempos, houve o total desaparecimento das bandas características, indicando assim que o DNA foi todo fragmentado e arrastado, conforme mostrado na **Figura 58**.

Figura 58. (A) Gel de agarose do plasmídeo de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ (**4**) por 10, 20 e 40 min, com peróxido de hidrogênio. Canaletas: 1Kb marcador; DNA, DNA plasmidial (36ng/ μL); H_2O_2 , DNA + H_2O_2 (125 μM); As concentrações de CuL, e os tempos de incubação estão indicadas no gel. (B) Razão da Forma II/Forma

I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A), utilizando o programa *ImageJ* 1.46 para a quantificação.

Os ensaios conduzidos sem a adição de peróxido de hidrogênio indicaram que os complexos estudados não apresentam atividade nuclease mensurável. Por outro lado, experimentos adicionais indicaram que com o auxílio do peróxido de hidrogênio, todos os complexos estudados são capazes de causar danos ao DNA, mas que os mesmos apresentaram reatividades diferentes. Em presença de peróxido o complexo mais reativo é o **(4)**, seguido pelo complexo **(2)**, **(3)** e por último pelo complexo **(1)**. Portanto, as espécies dinucleares foram as que mais causaram danos ao DNA, apresentando atividade nuclease mais acentuada.

6. CONCLUSÕES

Quatro complexos de cobre(II), composto **(1)** $[\text{Cu}(\text{apyhist})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, composto **(2)** $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2\text{dpam}]^{4+}$, composto **(3)** $[\text{Cu}(\text{N22})(\text{H}_2\text{O})(\text{OTf})]^+$ e composto **(4)** $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$ foram sintetizados e caracterizados por análise elementar e espectroscopias UV/Vis, Infravermelha e EPR. Todas estas técnicas colaboraram para a determinação da estrutura proposta de cada um dos complexos.

Dois dos complexos estudados foram planejados como miméticos da enzima tirosinase, sendo foram então realizados experimentos de cinética, onde se pôde observar a oxidação de um substrato (L-Dopa). Nesses experimentos verificou-se que a atividade tirosinase dos complexos mononucleares é bastante mais baixa em comparação com seus respectivos análogos dinucleares, conforme esperado. Os complexos dinucleares apresentaram, por outro lado, reatividades diferentes, o que mostrou uma modulação do ligante nessa reatividade do íon cobre. O complexo $[\text{Cu}_2(\text{N22-22})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OTf})_2]^{2+}$, com um ligante mais flexível, mostrou ser o mais eficiente como catalisador da oxidação da L-dopa na série estudada.

Foram realizados ensaios de estabilidade termodinâmica dos complexos estudados, utilizando dicroísmo circular e albumina humana como ligante competitivo. Nestes ensaios observou-se uma estabilidade relativa dos vários complexos de mesma ordem de grandeza que o íon cobre inserido no sítio N-terminal da albumina, espécie $[\text{Cu}(\text{HSA})]$. Isto demonstrou uma alta estabilidade do cobre coordenado a ambos os tipos de ligantes estudados. Além disso, com esses ensaios também foi possível observar que os compostos **(1)** e **(2)**, interagem em um sítio diferente do usual, geralmente esperado para compostos de cobre. No caso desses dois compostos temos uma interação com o sítio da cisteína 34 (Cys34), ao invés de no sítio preferencial N-terminal da albumina. Isto se deve a um reconhecimento molecular do ligante *apyhist* na cavidade referente ao sítio da Cys34 [122]. Com essa mesma técnica, é possível verificar se os compostos são capazes de modificar a estrutura secundária da proteína, mudando sua porcentagem de estruturas de α -hélice, mas nos ensaios realizados não foram observadas variações significativas para nenhum dos complexos em estudo.

Como objetivo principal deste trabalho, foram realizados ensaios experimentais com o intuito de observar se miméticos da enzima tirosinase teriam algum efeito sobre a viabilidade de melanomas. Assim, foram realizados testes de viabilidade celular em várias concentrações dos diversos complexos estudados. Os complexos dinucleares se mostraram os mais reativos: na concentração de 15 μM o composto **(2)** foi capaz de induzir aproximadamente 60% de morte celular tanto de células melanomas B16F10, como também na linhagem TM1MNG-3. O complexo **(4)**, em

concentração 20 μM para células B16F10 e 15 μM para células TM1MNG-3, pode induzir praticamente 50 % de morte celular. Assim, as reatividades destes dois complexos dinucleares não foram muito diferentes, com relação aos melanomas. Já os compostos mononucleares se mostraram bem menos reativos, necessitando de uma concentração aproximadamente 10 vezes maior para o composto **(1)** e 5 vezes maior para o composto **(3)**. Portanto, o complexo **(3)** com ligante mais flexível foi mais reativo que o **(1)**, com ligante imínico mais rígido (planar).

Além dos ensaios de viabilidade, foram conduzidos ensaios de adesão celular. Estes ensaios são interessantes, pois células melanomas são cânceres que mais sofrem metástase e, dessa forma, um composto que permitisse uma maior adesão celular seria de grande vantagem. Neste caso, os compostos mononucleares apresentaram poder adesivo maior em relação aos seus respectivos análogos dinucleares. Mesmo utilizando uma concentração mais elevada, 150 μM do complexo **(1)**, ele foi o que apresentou maior adesão, na média de 76%, seguido pelo complexo **(2)** 62,8% para concentração 5 μM , complexo **(3)** 51,7% para 75 μM e complexo **(4)** 41,1% para 5 μM .

Esses ensaios de adesão, entretanto, parecem apenas refletir os ensaios de viabilidade, e dessa forma, simplesmente contribuíram para uma complementação desses estudos.

Para tentar verificar a reatividade destes complexos quanto à capacidade de se ligar ao DNA, pois interações de complexos com essa biomolécula podem levar a danos irreversíveis, foram realizados experimentos de titulação monitorando-se os espectros de absorção. Em havendo interação, um hipocromismo ou hiperchromismo com pontos isosbéticos, e até um possível batocromismo, poderiam ser observados. Nos ensaios realizados, entretanto, não foi possível observar nenhuma dessas evidências de interação acentuada e uma regressão linear mostrou que o aumento observado na banda em 260 nm era referente às sucessivas adições de DNA.

Ainda no intuito de observar se o DNA poderia ser um alvo preferencial desses complexos, tendo em vista sua reatividade em relação à viabilidade celular, foram conduzidos novos ensaios e os complexos foram testados em busca de uma possível atividade nuclease. Utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose, buscou-se observar a ocorrência de clivagens simples ou duplas, nas fitas do DNA plasmidial superenrolado. Na ausência de peróxido de hidrogênio, não foi observada nenhuma clivagem, nas concentrações usuais para este tipo de ensaio. Porém, quando se adicionou peróxido de hidrogênio como agente ativador à mistura (DNA + complexo) houve uma grande atividade para alguns dos compostos estudados. O complexo mais reativo é o **(4)**, seguido pelo complexo **(2)**, **(3)** e por último pelo complexo **(1)**, dessa forma observa-se que os complexos mais

uma vez apresentam reatividades diferentes, dependendo da estrutura e do ligante. A ordem observada de atividade nuclease foi a mesma verificada nos ensaios de viabilidade de melanomas.

As diferentes reatividades podem ser explicadas pelas diferenças estruturais entre os ligantes ao redor do cobre. A série dos compostos **(1)** e **(2)** possuem ligantes mais rígidos em relação à série **(3)** e **(4)**, cujos ligantes permitem uma maior movimentação dos átomos ligantes ao redor do metal, lembrando que o grupamento-ponte utilizado nos complexos dinucleares é o mesmo. Todos os complexos apresentaram uma geometria ao redor do íon cobre mais próxima do quadrado planar ou tetragonal com distorção tetraédrica, conforme verificado pelos parâmetros de EPR.

Portanto, com este trabalho foi possível verificar que compostos dinucleares possuem maior reatividade do que análogos mononucleares, tanto como miméticos das enzimas tirosinases, como agentes causadores de danos a melanomas.. Porém, constatou-se que a ordem dos compostos estudados não é a mesma se considerarmos a atividade tirosinase (capacidade de catalisar a oxidação de L-dopa) e a atividade de induzir danos em melanomas. Enquanto na mimetização de uma oxidase o ligante mais flexível foi mais eficiente (complexo **4**), na atividade nuclease (e também na capacidade de causar danos a células melanomas) os complexos dinucleares **(2 e 4)** foram praticamente iguais em reatividade. Mesmo sendo miméticos da enzima tirosinase, os mesmos não proporcionaram uma progressão das células melanomas. Ao contrário, provocaram uma morte celular acentuada. Isto demonstra que a estrutura dinuclear do complexo foi mais importante, no caso de danos aos melanomas, do que a flexibilidade do ligante.

Referências

---

1. M. R. Bleackley, R. T. A. MacGillivray, *Biometals*. 24 (2011) 785-809.
2. J. Wu, M. Ricker, J. Muench, *J. Am. Board. Fam. Med.* 19 (2006) 191-194.
3. E. C. Theil, K. N. Raymond, Transition-Metal Storage, Transport and Biomineralization. In: I. Bertine et al, *Bioinorganic Chemistry*. California: University Science Books (1994) cap.1, p.1-36.
4. R. R. Crichton, *Biological Inorganic Chemistry: An Introduction*, Elsevier. 14 (2008).
5. M. W. Hentze, M. U. Muckenthaler, *Cell*. 117 (2004) 285-297.
6. R. R. Crichton, J. L. Pierre, *Biometals*. 14 (2001) 99-112.
7. R. E. Stenkamp, *Chem, Rev.* 94 (1994) 715-726.
8. D. R. Richardson, P. Ponka, *Biochim. Biophys. Acta*. 1331 (1997) 1-40.
9. J. Peisach, L. Powers, W. E. Blumberg, B. Chance, *J. Biophys. Soc.* 38 (1982) 277-285.
10. I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 7761-7764.
11. C. Eicken, B. Krebs, J. C. Sacchettini, *Current Opinion in Structural Biology*. 9 (1999) 677-683.
12. C. F. Thurston, *Microbiology*. 140 (1994) 19-26.
13. N. E. Hellman, J. D. Gitlin, *Annu. Rev. Nutr.* 22 (2002) 439-458.
14. a) M. C. Linder, M. H. -Azam, *Am. J. Clin. Nutr.* 63 (1996) 797S-811S.
15. M. Bodansky, *J. Biol. Chem.* 48 (1921) 361-364.
16. V. Sargentelli, A. E. Mauro, A. C. Massabni, *Química Nova*. 19 (1996) 290-293.
17. E. B. Hart, H. Steenbock, J. Waddell, C. A. Elvehjem, *J. Biol. Chem.* 77 (1928) 797-812.
18. R. Uauy, M. Olivares, M. Gonzalez, *Am. J. Clin. Nut.* 67 (1998) 952S-959S.
19. E. I. Solomon, A. J. Augustine, J. Yoon, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2008) 3921-3932.
20. I. S. Macpherson, M. E. P. Murphy, *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (2007) 2887 – 2899.
21. E. I. Solomon, E. M. Sundaram, T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2563-2605.
22. J. S. Valentine, E. B. Gralla, *Advances in Protein Chemistry: Copper-Containing Proteins*, Elsevier Science, 60 (2002).
23. M. D. Harrison, C. E. Jones, C. T. Dameron, *J. Biol. Inorg. Chem.* 4 (1999) 145-153.
24. V. Desai, S. G. Kaler, *Am. J. Clin. Nutr.* (2008) 855S-855S.
25. T. D. Rae, P. J. Schmidt, R. A. Pufahl, V. C. Culotta, T. V. O'Halloran, *Science*. 284 (1999) 805-808.
26. R. H. Holm, P. Kennepohl e E. I. Solomon, *Chem, Rev.* 96 (1996) 2239-2314.
27. a) G. Rotilio, M. T. Carrí, L. Rossi, M. R. Ciriolo, *IUBMB Life* 50 (2000) 309-314; b) M. E. Letelier, A. M. Lepe, M. Fáunderz, J. Salazar, R. Marín, P. Aracena, H. Speisky, *Chem. Biol. Interact.* 151 (2005) 71-82.
28. R. S. Himmerwright, N. C. Eickman, C. D. Lubein, K. Lerch, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 7339-7344.
29. H. Decker, F. Tuzek, *Tibs*. 25 (2000) 392-397.
30. M. Rolff, J. Schottenheim, H. Decker, F. Tuzek, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 4077-4098.
31. H. Y. Park, M. Kosmadaki, M. Yaar, B. A. Gilchrest, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 1493 - 1506.
32. J. D. Simon, D. N. Peles, *Acc. Chem. Res.* 43 (2010) 1452-1460.

-
33. C. Jiménez-Cervantes, F. Solano, T. Kobayashi, K. Uraben, V.J. Hearing, J. A. Lozano, J. C. Garcia-Borrón. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 17993-18000.
  34. F. O. V. Mackenzie, *Estrutura eletrônica de precursores de alomelaninas*. Dissertação de Mestrado, setembro (2008), Instituto de Física, UNICAMP, Sp, Brasil.
  35. T. -S. Chang, *Int. J. Mol. Sci.* 10 (2009) 2440-2475.
  36. P. M. Plonka, M. Grabacka, *Acta Biochim. Pol.* 53 (2006) 429-443.
  37. P. Valverde, E. Healy, I. Jackson, J.L. Rees, A.J. Thody, *Nature Genetics* 11 (1995) 328-330.
  38. A. Napolitano, L. Panzella, L. Leone, M. D'Ischia, *Acc. Chem. Res.* 46 (2013) 519-528.
  39. <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>
  40. G. A. de Souza, L. M. Godoy, V. R. Teixeira, A. H. Otake, A. Sabino A, J. C. Rosa, A. R. Dinarte, D. G. Pinheiro, W. A. Silva Jr, M. N. Eberlin, R. Chammas, L. J. Greene, *Proteomics*. 6 (2006) 1460-1470.
  41. A. Irelande, M. Millward, R. Pearce, M. Lee, M. Ziman, *Clin Exp Metastasis*. 28 (2011) 327-336.
  42. K. Naliwaiko, A.C. Luvizon, L. Donatti, R. Chammas, A. F. Mercadante, S. M. Zanata, L.S. Nakao, *Chem.-Biol. Interact.* 173 (2008) 122-128.
  43. S. Pavel et al, *Eur. J. Cancer*. 40 (2004) 1923-1430.
  44. S. Jawaid, T. H. Khan, H. M. I. Osborn, N. A. O. Williams, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 9 (2009) 717-727.
  45. A. A. Suzukawa, A. Vieira, S. M. B. Winnischofer, A. C. Scalfo, P. Di Mascio, A. M. da Costa Ferreira, J.-L. Ravanat, D. de L. Martins, M. E. M. Rocha, G. R. Martinez, *Free Rad. Biol. Med.* 52 (2012) 1945-1953.
  46. M. L. P. Santos, A. F. -Alário, A. S. Mangrich, A. M. D. C. Ferreira, *J. Inorg. Biochem.* 71 (1998) 71-78.
  47. a) M. A. A. Azzellini, I. A. Bagatin, A. M. D. C. Ferreira, *Redox Report (Edinburgh)* 11 (2006) 25-37. b) M. A. A. Azzellini, I. A. Bagatin, E. M. Pereira, A. M. D. C. Ferreira, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2001) 838-844.
  48. W. A. Alves, I. A. Bagatin, A. M. D. C. Ferreira, *Inorg. Chim. Acta*. 321 (2001) 11-21.
  49. W.A. Alves, R.H. de Almeida Santos, A. Paduan-Filho, C.C. Becerra, A.C. Borin, A.M.D.C. Ferreira, *Inorg. Chim. Acta*. 357 (2004) 2269-2278.
  50. W. A. Alves, S. A. Almeida-Filho, M. V. Almeida, A. Paduan-Filho, C. C. Becerra, A. M. D. C. Ferreira, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 198 (2003) 63-75.
  51. W.A. Alves, G. Cerchiaro, A. Paduan-Filho, D.M. Tomazela, M.N. Eberlin, A.M.D.C. Ferreira, *Inorg. Chim. Acta*. 358 (2005) 3581-3591.
  52. W. A. Alves et al, *European Journal of Inorganic Chemistry*. (2009) 2219-2228.
  53. G. Cerchiaro, K. Aquilano, G. Filomeni, G. Rotilio, M. R. Ciriolo, A. M. D. C. Ferreira, *J. Inor. Biochem.* 99 (2005) 1433-1440.
  54. G. Cerchiaro, A. M. D. C. Ferreira, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 1473-1485.
  55. V. C. Silveira, J. S. Luz, C. C. Oliveira, I. Graziani, M. R. Ciriolo, A. M. C. Ferreira, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1090-1103.
  56. G. filomeni et al. *J. Biol. Chem.* 282 (2007)12010-12021.

-
57. G. Filomeni, S. Piccirillo, I. Graziani¹, S. Cardaci, A. M. D. C. Ferreira, G. Rotilio, M. R. Ciriolo, *Carcinogenesis*. 30 (2009) 1115–1124.
58. G. Filomeni et al, *Biochem. J.* 437 (2011) 443–45.
59. Z.-F. Chen, M.-X. Tan, L.-M. Liu, Y.-C. Liu, H.-S. Wang, B. Yang, Y. Peng, H.-G. Liu, H. Liang, C. Orvig, *Dalton Trans.* 48 (2009) 10824–10833.
60. a) K. D. Karlin, Y. Gultneh, J. P. Hutchinson, J. Zubieta, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 5240–5242. b) M. J. Henson, M. A. Vance, C. X. Zhang, H. Liang, K. D. Karlin, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 5186–5192. c) V. S. I. Sprekel, M. C. Feiters, W. Meyer-Klaucke, M. Klopstra, J. Brinksma, B. L. Feringa, K. D. Karlin, R. J. M. Nolte, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2005) 3522–3534.
61. a) B. T. Op't Holt, M. A. Vance, L. M. Mirica, D. E. Heppner, T. D. P. Stack, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 6421–6438; b) E. I. Solomon, F. Tuzcek, D. E. Root, C. A. Brown, *Chem. Rev.* 94 (1994) 827– c) P. K. Ross, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 3246–3259; d) M. J. Baldwin, D. E. Root, J. E. Pate, K. Fujisawa, N. Kitajima, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10421–10431.
62. a) P. L. Holland, W. B. Tolman, *Coor. Chem. Rev.* 190–192 (1999) 855–869; b) E. A. Lewis, W. B. Tolman, *Chem. Rev.* 104 (2004) 1047–1076.
63. a) L. Casella, L. Rigoni, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1985) 1668–1669; b) L. Casella, M. Gullotti, R. Radaelli, P. Di Gennaro, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1991) 1611–1612; c) G. Alzuet, L. Casella, M. L. Villa, O. Carugo, M. Gullotti, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 4789–4794.
64. a) N. Kitajima, Y. Moro-oka, *Chem. Rev.* 94 (1994) 737–757. b) Y. Muro-oka, K. Fujisawa, N. Kitajima, *Pure and Appl. Chem.* 67 (1995) 241–248.
65. a) K. D. Karlin, K. Kaderli, A. D. Zuberbühler, *Acc. Chem. Res.* 30 (1997) 139–147; (b) Z. Tyeklár, K. D. Karlin, *Acc. Chem. Res.* 22 (1989) 241–248; (c) K. D. Karlin, R. W. Cruse, Y. Gultneh, J. C. Hayes, J. Zubieta, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 3372–3374; d) K. D. Karlin et al, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 2121–2128; e) Z. Tyeklár, R. R. Jacobson, N. Wei, N. N. Murthy, J. Zubieta, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 2677–2689.
66. a) J. A. Halfen, S. Mahapatra, E. C. Wilkinson, S. Kaderli, V. G. Young, L. Que Jr., A. D. Zuberbühler, W. B. Tolman, *Science* 271 (1996) 1397–1400. b) W. B. Tolman, *Acc. Chem. Res.* 30 (1997) 227–237.
67. a) E. I. Solomon, *Inorg. Chem.* 45 (2006) 8012–8025; b) L. M. Mirica, M. Vance, D. J. Rudd, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, T. D. P. Stack, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 9332–9333; c) L. M. Mirica, M. Vance, D. J. Rudd, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, T. D. P. Stack, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 2654–2665.
68. a) M. C. Mimmi, M. Gullotti, L. Santagostini, G. Battaini, E. Monzani, R. Pagliarin, G. Zoppellaro, L. Casella, *Dalton Trans.* (2004) 2191–2201; b) F. G. Mutti, M. Gullotti, L. Casella, L. Santagostini, R. Pagliarin, K. K. Andersson, M. F. Lozzi, G. Zoppellaro, *Dalton Trans.* 40 (2011) 5436–5457.
69. A. Spada, S. Palavicini, E. Monzani, L. Bubacco, L. Casella, *Dalton Trans.* (2009) 6468–6471.
70. a) N. Kitajima, K. Fujisawa, Y. Moro-oka, K. Toriumi, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 8975–8976; b) N. Kitajima, K. Fujisawa, C. Fujimoto, Y. Moro-oka, S. Hashimoto, T. Kitagawa, K. Toriumi, K. Tatsumi, A. Nakamura, *J.*

-
- Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 1277-1291; c) M. J. Baldwin, D.E. Root, J.E. Pate, K. Fujisawa, N. Kitajima, E.I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10421-10431.
71. a) E. I. Solomon, J. W. Ginsbach, D. E. Heppner, M.T. Kieber-Emmons, C. H. Kjaergaard, P. J. Smeets, L. Tian, J. S. Woertink, *Faraday Discuss.* 148 (2011) 11-39.
72. I. Garcia-Bosch et al, *Angew. Chem. Int.* 49 (2010) 2406-2409.
73. D Maiti, J. S. Woertink, A. A. N. Sarjeant, E. I. Solomon, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.* 47 (2008) 3787-3800.
74. S. Fukuzumi, K. D. Karlin, *Coord. Chem. Rev.* 257 (2013) 187-195.
75. a) R. W. Cruse, S. Kaderli, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 5020-5024; b) D. E. Wilcox, A. G. Porras, Y. T. Hwang, K. Lerch, M. E. Winkler, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 4015-4027; c) B. Jung, K. D. Karlin, A. D. Zuberbühler, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 3763-3764.
76. L. M. Mirica, M. Vance, D. J. Rudd, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, T. D. P. Stack, *Science* 308 (2005) 1890-1892.
77. H. Tamura, H. Imai, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 6870-6871.
78. N. H. Gokhale, S. S. Padhye, S. B. Padhye, C. E. Anson, A. K. Powell, *Inorg. Chim. Acta* 319 (2001) 90-94.
79. M. Collins et al, *Inorg. Chem. Comm.* 3 (2000) 453-457.
80. U. Sandbhor, P. Kulkarni, S. Padhye, G. Kundu, G. Mackenzie, R. Pritchard, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 2877-2882.
81. G. L. Eichhorn, J. J. Butzow, Y. A. Shin, *Proc. Int. Symp. Biomol. Struct. Interactions, Suppl. J. Biosci.* 8 (1985), 527-535.
82. X. Lu, K. Zhu, M. Zhang, H. Liu, J. Kang, *J. Biochem. Biophys. Methods* 52 (2002) 189-200.
83. P. P. Silva et al, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 6414-6424.
84. V. Uma, M. Elango, B.U. Nair, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2007) 3484-3490.
85. V. C. Silveira, H. Benezra, J. S. Luz, R. C. Georg, C. C. Oliveira, A. M.D.C. Ferreira, *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 1692-1703.
86. J. K. Barton, *Pure & Appl. Chem.* 61 (1989) 563-564.
87. C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1109-1151.
88. B. K. Santra, P. A. N. Reddy, G. Neelakanta, S. Mahadevan, M. Nethajia, A. R. Chakravarty, *J. Inorg. Biochem.* 89 (2002) 191-196.
89. D. -D. Li, F. -P. Huang, G. -J. Chen, C. -Y. Gao, J. -L. Tian, W. Gu, X. Liu, S. -P. Yan, *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 431-441.
90. Y. An, M.-L. Tong, L.-N. Ji, Z.-W. Mao, *Dalton Trans.* 17 (2006) 2066-2071.
91. M. L. P. dos Santos, A. Faljoni-Alário, A. S. Mangrich, A. M. D. C. Ferreira, *J. Inorg. Biochem.* 71 (1998) 71-78.
92. W. A. Alves, S. A. de Almeida-Filho, R. H. A. Santos & A.M. Da Costa Ferreira. *Inorg. Chem. Commun.* 6 (2003) 294-299.
93. P. A. Vigato, S. Tamburini, *Coord. Chem. Rev.* 248 (2004) 1717-2128.
94. P. Guerriero, S. Tamburini, P. A. Vigato, *Coord. Chem. Rev.* 139 (1995) 17-243.

95. M. P. Abbott, *Modificações oxidativas em proteínas em presença de complexos de cobre(II)*. Tese de Doutorado, setembro (2007), Instituto de Química, USP, SP, Brasil.
96. E. Peyroux, *Complexes dinucléaires de cuivre: biomimétisme et réactivité vis-à-vis de l'oxygène*. These de Docteur, décembre/2008, Faculté des Sciences et Techniques, UPC Aix-Marseille, France.
97. A. M. Mayer, E. Harel, R. Ben-Shaul. *Phytochemistry*. 5 (1966) 783-789.
98. Y. Kumar, S. Tappayab, S. Muzammil, *Arch. Biochem. Biophys.* 426 (2004) 3-10.
99. C. S. Novais, *Caracterização estrutural por difração de raios x e estudo de atividade citotóxica de complexos de platina*. Dissertação de Mestrado, 2009, Instituto de Química, UFU, MG, Brasil.
100. B. E. Borges, *Papel da galectina-3 frente a estímulos de estresse oxidativo promovido pelos compostos $[Cu(isaepy)_2](ClO_4)_2$, $[Zn(isaepy)Cl_2]$ e $[Cu(enim)H_2O](ClO_4)_2$ em células de melanoma TM1G3 E TM1MNG3*, Tese de Mestrado, 2009, Instituto de Ciências Biológicas, UFPR, Brasil.
101. A. H. Otake, *Papel de dissialogangliosídeos na proliferação e morte celular induzida de melanócitos e melanomas in vitro*, Tese de Doutorado, 2005, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
102. A. Luque, F. S. Madrid, C. Cabanas. *FEBS Letters*. V. 346 (1994) 278-284.
103. T. Ihara, T. Ikegami, T. Fujii, Y. Kitamura, S. Sueda, M. Takagi, A. Jyo, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1744-1754.
104. M. E. Reichmann, S. A. Rice, C. A. Thomas, P. Doty. *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 3047-3053.
105. M. A. A. Azzellini, I. A. Bagatin, A. M. D. C. Ferreira, *Redox Report*, 11 (2006).
106. D. F. Shriver, P. W. Atkins, *Química Inorgânica*, (2003), Bookman, 816p.
107. M. Tumer, H. Koksall, S. Serin, *Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem.* 27 (1997) 775.
108. R. M. Silverstein, G. C. Bassler, T. C. Morrill, *"Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos"*, 5ª Ed. Guanabara Koogan 1994, 387p.
109. G. Socrates, *"Infrared and Raman Characteristic group frequencies"*, 3ª Ed. Nova York: John Wiley. (2001) 211p.
110. M. C. Gonçalves, V. d. Z. Bermudez, D. Ostrovskii, L. D. Carlos, *Ionics*. 8 (2001) 64-72.
111. F. E. Mabbs, *Chem. Soc. Rev.* 22 (1993) 313.
112. P. F. Knowles, D. Marsh, H. W. E. Rattle, *Magnetic Resonance of Biomolecules*, John Wiley & Sons (1976) 343.
113. J. Muller, K. Felix, C. Maichle, E. Langfelder, J. Strachle, F. U. Weser, *Inorg. Chim. Acta* 233 (1995) 11.
114. W. A. Alves, R. H. de A. Santos, A. Paduan-Filho, C. C. Becerra, A. C. Borin, A. M. D. C. Ferreira, *Inorg. Chim. Acta* 357 (2004) 2269-2278.
115. C. A. Ramsden, P. A. Riley, *Arkivoc*. (2010) 248-254.
116. A. Rodger, B. Nórden, *Circular Dichroism and Linear Dichroism*, Oxford University Press, Oxford, (1997).
117. Y. Zhang, D. E. Wilcox, *J. Biol. Inorg. Chem.* 7 (2002) 327-337.

-
118. M. A. A. Azzellini, M. P. Abbott, A. Machado, M. T. Miranda, L. C. Garcia, G. F. Caramori, M. B. Gonçalves, H. M. Petrilli, A. M. D. C. Ferreira, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1303-1317.
119. A. I. Ivanov, J. A. Parkinson, E. Cossins, J. Woodrow, P. J. Sadler, *J. Biol. Inorg. Chem.* 5 (2000) 102-109.
120. W. Bal, J. Christodoulou, P. J. Sadler, A. Tucker, *J. Inorg. Biochem* 70 (1998) 33-39.
121. M. Rózga, M. Sokolowska, A. M. Protas, W. Bal, *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (2007) 913-918.
122. V.C. Silveira, M.P. Abbott, M. Cavicchioli, M.B. Gonçalves, H.M. Petrilli, L. de Rezende, A.T. Amaral, D.E.P. Fonseca, G.F. Caramori, A.M. da Costa Ferreira, *Dalton Trans.* 42(2013) 6386–6396.
123. V. C. Silveira, G. V. Caramori, M. P. Abbbot, M.B. Gonçalves, H. M. Petrilli, A. M. D. C. Ferreira, *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 1331-1341.
124. N. Greenfield, G. D. Fasman, *Biochemistry* 8 (1969) 4108-4116.
125. M. Cusumano, M. L. Di Pietro, A. Giannetto, P. A. Vainiglia, *Inorg. Chem.* 46 (2007) 7148-7153.
126. S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *Biochim. Biophys. Acta* 1751 (2005) 119-139.
127. a) P. Matarrese, O. Fusco, N. Tinari, C. Natoli, F.-T. Liu, M. L. Semerario, W. Malorni, S. Iacobelli, *Int. J. Cancer*: 85 (2000) 545–554. b) N. Boudreau, C. J. Simpson, Z. Werb, M. J. Bissell, *Science*, 267 (1995) 891–893.
128. V. C. Silveira, *Investigação da atividade biológica de complexos de cobre(II) com ligantes inspirados em biomoléculas*, Tese de Doutorado, Nov/2008, Instituto de Química, USP, SP, Brasil.
129. W.H. Ang, M. Myint, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* 132(21), (2010) 7429–7435.
130. C. Liu, J. Zhou, Q. Li, L. Wang, Z. Liao, H. Xu, *J. Inorg. Biochem.* 75 (1999) 233-240.
131. M. Baldini, M. Belichi-Ferrari, F. Bisceglie, P.P. Dall'Aglio, G. Pelosi, S. Pinelli, P. Tarasconi, *Inorg. Chem.* 43 (2004) 7170-7179.
132. J. Borrás, G. Alzuet, M. G.-Alvarez, J. L. G.-Giménez, B. Macías, M. L.-González, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2007) 822-834.
133. S. Thyagarajan, N. N. Murthy, A. A. N. Sarjeant, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 7003-7008.
134. M. Navarro, E.J. Cisneros-Fajardo, M. Fernandez-Mestre, D. Arrieché, E. Marchan, *J. Inorg. Biochem.* 97 (2003) 364-369.
135. P. U. Maheswari, K. Lappalainen, M. Sfregola, S. Barends, P. Gamez, U. Turpeinen, I. Mutikainen, G. P. van Wezel, J. Reedijk, *Dalton Trans.* 33 (2007) 3676-3683.