

2 Ligantes

2.1 Ligantes Aminados: Poliaminas

2.1.1 Introdução

A amina 1,4-diaminobutano, também conhecida como putrescina (Put), a N-(3aminopropil)butano-1,4-diamino conhecida como espermidina (Spd) e a N,N'-bis(3aminopropil)butano-1,3-diamina, conhecida como espermina (Spm) (Figura 2.1) são poliaminas naturais, que apresentam em sua estrutura grupos amino separados por cadeias metilênicas hidrofóbicas. As poliaminas estão presentes nas células de praticamente todos os organismos vivos, principalmente nas células jovens e nas células cancerígenas, sendo que nestas últimas se apresentam em altas concentrações. Elas desempenham papéis importantes em vários processos bioquímicos. (3, 4, 5, 6).

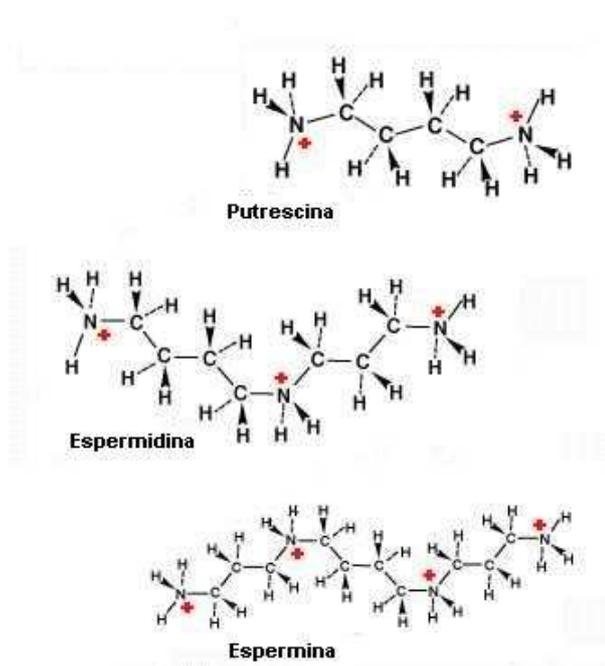


Figura 2.1: Estrutura das poliaminas naturais

Outro grupo de poliaminas naturais que também são encontradas no meio biológico, porém em menores quantidades, são o 1,3-diaminopropano ($NH_2(CH_2)_3NH_2$) (Tn) e a cadaverina ($NH_2(CH_2)_5NH_2$) (3), além de outras poliaminas. A putrescina e a cadaverina foram isoladas de tecidos em decomposição bacteriana (4); a putrescina também é encontrada em tecidos pulmonares, no fígado, no pâncreas, no sêmen e em diversas bactérias. Como pode-se ver pela estrutura da putrescina (Figura 1) ela é na verdade uma diamina, mas devido ao seu papel como precursora das demais poliaminas ela é considerada uma poliamina. A espermina apresenta quatro grupos amino e é encontrada apenas em organismos superiores, enquanto a espermidina, uma triamina, e as demais aminas são encontradas em todos os organismos vivos (4, 3), tais como: no fluido biológico de plantas, bactérias, fungos e animais e desempenham vários papéis nos processos biológicos (7).

Desde a descoberta das poliaminas, por Antoni van Leeuwenhoek, estes compostos têm sido objeto de intensa pesquisa no intuito de tentar esclarecer vários processos biológicos e patológicos dos quais elas participam. Apesar das várias décadas de pesquisa, o modo de ação das poliaminas a nível molecular ainda é largamente desconhecido (4).

Muitas são as funções biológicas das poliaminas. Estes compostos policatiônicos estão essencialmente envolvidos nos processos de crescimento e diferenciação celular (4). Elas influenciam o estágio de transcrição na síntese das proteínas, estabilizam membranas, modulam funções neurofisiológicas e agem como mensageiros intracelulares (4). Estão envolvidas em várias reações: reagem como substrato para síntese de hormônios ou agem como fragmentos de coenzimas (8).

2.1.2

Aspectos biológicos

A amina biogênica mais comum é a putrescina, que é a primeira amina a ser biossintetizada a partir da arginina, além de ser a precursora da espermina e espermidina (9). O metabolismo das poliaminas é um processo altamente integrado envolvendo biossíntese, assimilação e o catabolismo. O mecanismo de biossíntese das poliaminas está bem estabelecido. Em plantas e bactérias mais desenvolvidas, a primeira etapa na biossíntese de poliaminas é a formação da putrescina. Esta etapa ocorre pela descarboxilação dos aminoácidos arginina ou ornitidina. As respectivas reações são catalisadas pelas enzimas arginina descarboxilase (ADC) e ornitidina descarboxilase (ODC). As poliaminas espermidina e espermina são formadas pela subsequente adição de grupos aminopropil à putrescina. Essas reações são catalisadas pelas enzimas aminopropiltransfe-

rase espermidina e espermina sintases. O grupo aminopropil é formado pela descarboxilação da S-adenosilmetionina (AdoMet) em uma reação catalisada pela enzima AdoMet descarboxilase (AdoMetDC) (10) (Figura 2.2).

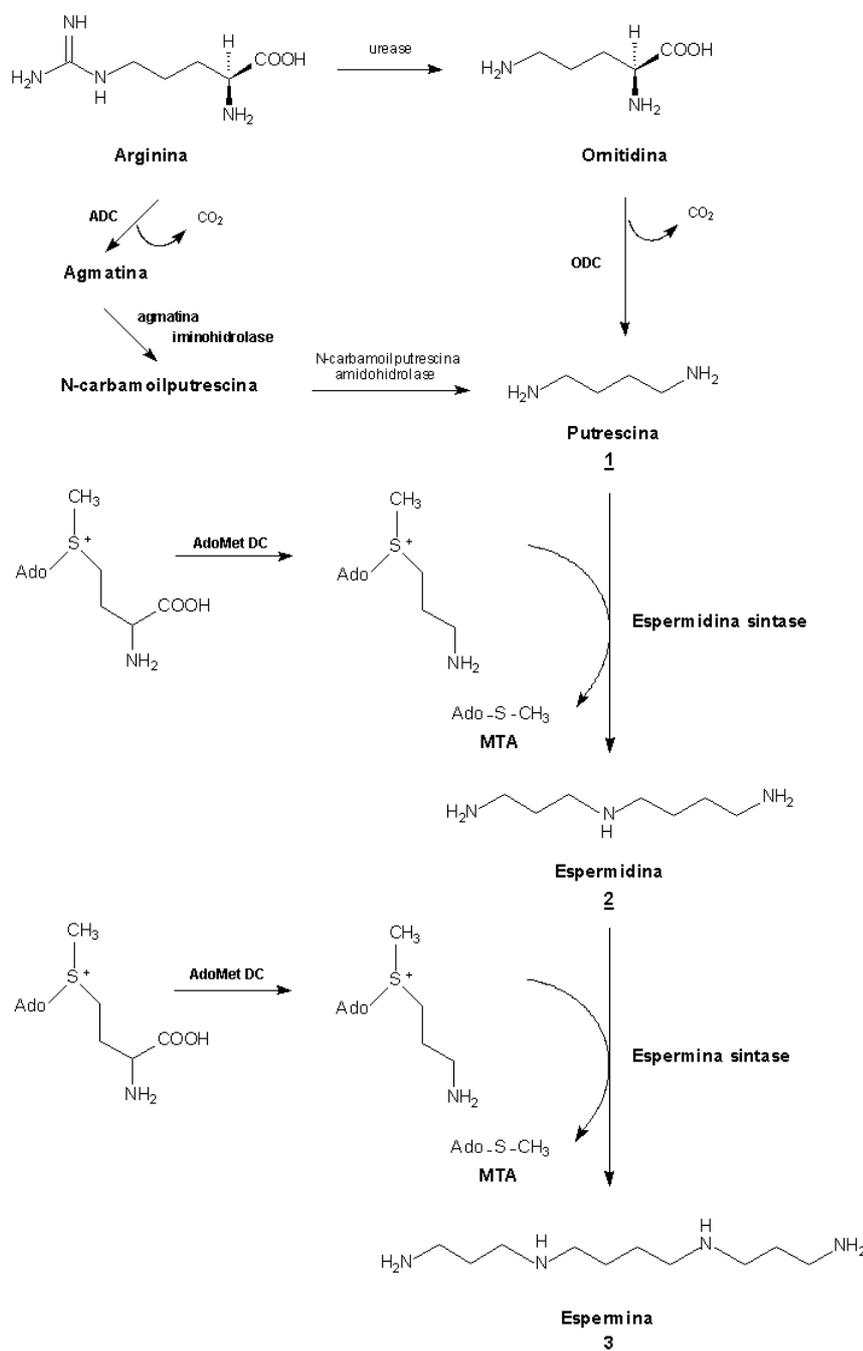


Figura 2.2: Biossíntese das poliaminas

Vários estudos mostram que as poliaminas podem agir como promotoras de fatores carcinogênicos apresentando-se em concentrações muito altas em células cancerígenas (4). Na tentativa de reduzir a elevada concentração de poliaminas celulares (espermidina e espermina), vários grupos de pesquisa vêm investigando, em culturas de células humanas com vários tipos de tumo-

res, a ação de drogas como α -(difluorometil)ornitina (DMFO) e metilglicoxal bis(guanilhidrazona) (MGBG), além de outras drogas, que atuam como poderosos inibidores de enzimas ornitina descarboxilase e S-adenosilmetionina descarboxilase, cuja função é catalisar a biossíntese das poliaminas (3). Infelizmente apenas algumas das drogas estudadas se mostram eficientes inibidores do crescimento tumoral. Um outro processo que parece funcionar em vários experimentos feitos com animais é a quimioprevenção do câncer com antime-tabólitos de poliaminas.

O mecanismo de transporte das poliaminas nos mamíferos e nas bactérias é pouco conhecido no nível molecular. O transporte, além da entrada e saída das poliaminas nas células, é constituído de uma rede de processos que consomem energia (ATP dependente) e que podem transportar as poliaminas contra um gradiente de concentração, o que sugere a existência de mecanismos mediados por substâncias carreadoras (11) .

Na década de 90, derivados de poliaminas com estrutura análoga, foram preparados e eles têm demonstrado inibir o crescimento celular a baixas concentrações. Um exemplo é o composto bis(etil)nospermina que é um protótipo de composto que mimetiza as poliaminas (12). Estudos sugerem que as poliaminas desempenham um papel de grande importância na angiogênese dos tumores. De fato, resultados de estudos demonstram que células com grande concentrações de ODC podem induzir a vascularização de tumores em ratos, que DMFO pode inibir a angiogênese induzida pelo tumor e que as poliaminas podem induzir a angiogênese (13).

Já está firmemente estabelecido que as poliaminas desempenham um papel chave na proliferação celular. De fato um dos primeiros eventos da proliferação celular é a indução da biossíntese das poliaminas, o que antecede até mesmo a síntese das proteínas e dos ácidos nucleicos (13).

O catabolismo das poliaminas não é tão bem caracterizado quanto a biossíntese. Trata-se de uma etapa do mecanismo celular em que substâncias complexas são convertidas em substâncias mais simples, restabelecendo uma concentração adequada destes compostos no organismo (4). Muitas enzimas podem oxidar as poliaminas a aldeídos. Algumas das enzimas envolvidas no processo são enzimas extracelulares, por isso não é muito claro a sua função no catabolismo intracelular das poliaminas. Uma das funções do catabolismo é, junto com o transporte das poliaminas, regular a homeostase intracelular destas aminas biológicas (4). Donde se pode concluir que os mecanismos de biossíntese, transporte e catabolismo são altamente regulados (14).

A quantidade de poliaminas no meio celular é regulada pelas enzimas através de reações de acetilação e oxidação. Em uma primeira etapa, esper-

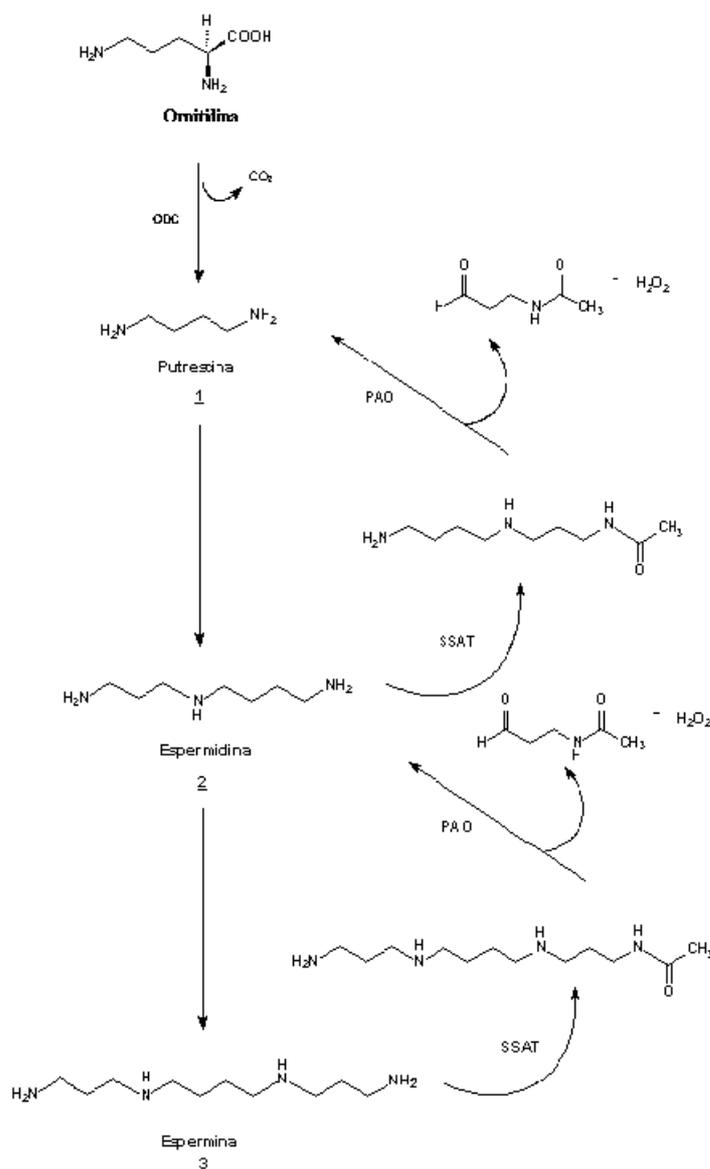


Figura 2.3: Catabolismo das poliaminas naturais

mina e espermidina são acetiladas pelas enzimas espermina/espermidina-N-acetiltransferase (SSAT), respectivamente. As espermina e espermidina acetiladas agem como substrato para a poliamina oxidase (PAO), uma enzima Cu^{2+} dependente (4), a qual catalisa a formação de 3-acetamidopropionaldeído e/ou putrescina ou espermidina, respectivamente (Figura 2.3)

Desta forma, espermina/espermidina-N-acetiltransferase (SSAT), juntamente com as poliaminas oxidases, são enzimas responsáveis por um conjunto de reações químicas que se processam no organismo visando a interconversão de poliaminas em aminas mais simples no meio celular.

2.1.3

Interações Intermoleculares: Características Estruturais

Como pode facilmente ser observado dos resultados de estudos biológicos *in vivo* e *in vitro*, as poliaminas presentes nas células interagem com outros bioligantes negativamente carregados, tais como aminoácidos, proteínas, fosfolípidos, nucleotídeos e ácidos nucleicos para o desempenho de suas funções bioquímicas (6, 15). Estas interações entre os bioligantes e as poliaminas ocorrem em uma faixa de pH, na qual as poliaminas estão protonadas e os bioligantes estão desprotonados. Estas interações devem ser explicadas como de natureza eletrostática e deve-se considerar também a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio entre os grupos carregados negativamente dos bioligantes (ânions) e os grupamentos amino protonados das poliaminas (cátions). Em pH fisiológico as poliaminas se encontram na forma protonada (NH_3^+) (5, 16, 7) e apresentam uma característica única em sua estrutura: as cargas positivas são regularmente espaçadas por cadeias metilênicas hidrofóbicas (4).

Os grupamentos amino protonados separados por um número apropriado de carbonos se comportam como dois grupos catiônicos isolados. Se a cadeia carbônica entre os grupamentos amino é menor do que 3, pelo menos um dos valores do pK será menor que 7 e desta forma a poliamina estará desprotonada em pH fisiológico. Isto explica a baixa atividade biológica de algumas aminas sintéticas quando comparada às aminas naturais (15). Pode-se observar pela Figura 2.4 que a basicidade das diaminas tende a aumentar ao fazerem ligações de hidrogênio intramolecular (17).

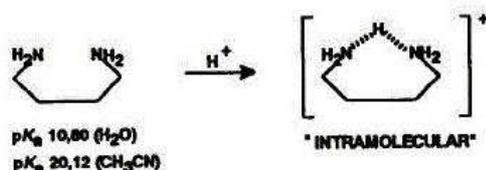


Figura 2.4: Putrescina em ligação de hidrogênio

A protonação do nitrogênio introduz rigidez à estrutura da poliamina, pois cargas positivas em nitrogênios adjacentes irão fazer com que a amina adote uma orientação estendida com o objetivo de minimizar as repulsões eletrostáticas. O grau de rigidez também depende do tamanho da cadeia carbônica entre os grupamentos amino. A repulsão eletrostática de grupamentos amino separados por cadeias propilênicas é menor do que a repulsão dos grupamentos catiônicos separados por cadeias metilênicas (18).

A dicotomia rigidez versus flexibilidade nos bioligantes é um ponto interessante a ser considerado. Interações envolvendo um ânion que apresenta

características estruturais definidas, com ligantes protonados que apresentam uma estrutura rígida devido às cargas presentes no composto e que também apresente grupamentos que possibilitem outras interações além das eletrostáticas, apresentam uma maior afinidade e rigidez, uma vez que as interações só são facilitadas se ocorrer o “encaixe” entre as biomoléculas. O gasto energético para estas interações é baixo. Por outro lado, cátions mais flexíveis, que podem se adaptar a necessidades estereoquímicas de um determinado ânion, à medida que as interações eletrostáticas ocorrem, deve entretanto pagar o custo energético para a reorganização molecular (18). Contudo, quanto mais flexível um bioligante é mais ele poderá se auto-adaptar a interação molecular e conseqüentemente o custo energético a ser pago pelo encaixe estereoquímico e pelas características eletrônicas da molécula alvo será menor, o que justifica a escolha de moléculas flexíveis, que não se ligam muito fortemente aos substratos, nos sistemas enzimáticos (18).

As interações com as poliaminas espermidina e espermina provocam mudanças significativas na estrutura do DNA (3). Estas duas aminas podem funcionar como uma ponte ou um gancho unindo duas moléculas diferentes ou duas partes da mesma molécula, como ocorre no DNA. Ainda que estas interações não sejam bem compreendidas, acredita-se que as alterações estruturais causadas pelas interações sejam importantes no processo de diferenciação e divisão celular (4).

Experimentos realizados em embriões, mostram a possibilidade de relação direta entre as poliaminas e os ácidos nucleicos. Resultados dos experimentos mostram que, não somente em condições fisiológicas, mas também em condições extremas *in vitro*, quando a concentração das poliaminas aumentam ou diminuem nos embriões estudados, a concentração dos ácidos nucleicos apresentam um comportamento similar, aumentando ou diminuindo a concentração. A concentração dos nucleotídeos livres também apresenta o mesmo comportamento uma vez que eles vão ser mais ou menos utilizados para síntese dos ácidos nucleicos (19).

As poliaminas também regulam a estrutura do tRNA e de outros RNAs. Devido ao fato das poliaminas serem cátions flexíveis apresentando diferentes cargas e tamanhos de cadeia, elas têm o potencial para regular as transições do RNA de maneira perspicaz (20). Para a estabilidade do RNA é essencial a presença de contraíons. Enquanto íons metálicos se ligam especificamente a sítios bem definidos do DNA ou do RNA a maioria dos bioligantes catiónicos são atraídos de uma maneira não específica pelas cargas negativas do RNA. À medida que ocorrem mudanças na estrutura do RNA as aminas policatiônicas podem mover-se junto com a molécula (flutuar) e por isso se ligam mais fra-

camente ao ácido nucleico. Portanto elas contribuem significativamente para a estabilidade da estrutura do RNA, diminuindo cerca de 75-95% as repulsões eletrostáticas entre as cargas negativas dos grupos fosfatos, permitindo desta forma, a mudança conformacional na molécula e levando a estruturas mais compactas (21). Em estudos cristalográficos as poliaminas são encontradas interagindo com sítios específicos da dupla fita do DNA ou do tRNA. Estudos em solução, entretanto, têm mostrado que as poliaminas interagem primeiramente com os grupos fosfatos, mas não especificamente e que íons multivalentes neutralizam os grupos fosfatos mais efetivamente do que os íons monovalentes (20). Portanto o modelo de interações eletrostáticas sugerido muitas vezes não consegue explicar a alta especificidade de certos processos biológicos (16).

Bunce e Kong mostraram através de estudos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , que a poliamina espermidina interage com o nucleotídeo adenosina 5' monofosfato (AMP) através dos seus dois átomos de nitrogênio protonados (separados pela cadeia de três átomos de carbono) e o átomo de oxigênio carregado negativamente do grupo fosfato (Figura 2.5)(22)

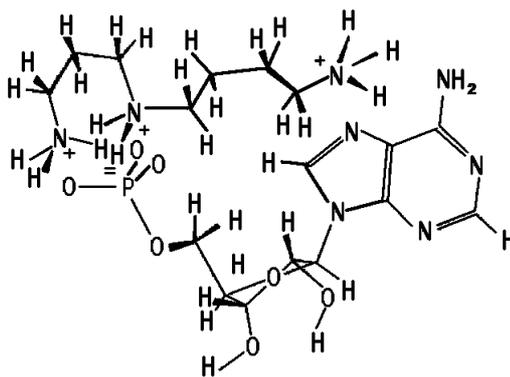


Figura 2.5: Modelo de interação entre a Spd e o AMP em pH biológico

Não é apenas as cargas dos bioligantes catiônicos que influenciam na compactação dos ácidos nucleicos. O formato e o tamanho do contraíon determinam os aspectos cinéticos e termodinâmicos das mudanças conformacionais para estruturas mais compactas do DNA e do RNA. Isto ocorre pois, cátions flexíveis, como as poliaminas, ao interagirem com macroíons como os ácidos nucleicos, perdem a entropia conformacional e conseqüentemente as poliaminas estabilizam menos efetivamente as cargas negativas (20).

Trabalhos experimentais e teóricos sobre a associação não covalente da dupla fita do DNA com as poliaminas sugerem como o tamanho do contraíon pode influenciar as interações eletrostáticas com os ácidos nucleicos. Primeiro, contraíons com um grande raio iônico não conseguem aproximar as duplas fitas do DNA tão bem quanto os cátions pequenos. Em segundo lugar, o número de contraíons nas cadeias condensadas ao redor do ácido nucleico

depende do volume que ficará "excluído" dos íons. A Figura 2.6 mostra as interações de duas poliaminas com o RNA. As moléculas da cadaverina (1,5-pentanodiamina, B) quando interagem com os grupos fosfato do RNA ficam mais próximas e causam uma maior repulsão umas às outras do que as moléculas de etilenodiamina (A). Consequentemente a cadaverina cria uma estrutura menos estável, e menos compacta, o que justifica, mais uma vez a escolha de bioligantes que estabeleçam interações fracas para estabilização dos complexos moleculares, o que permite futuras mudanças conformacionais necessárias ao desempenho das funções bioquímicas dos RNAs (20).

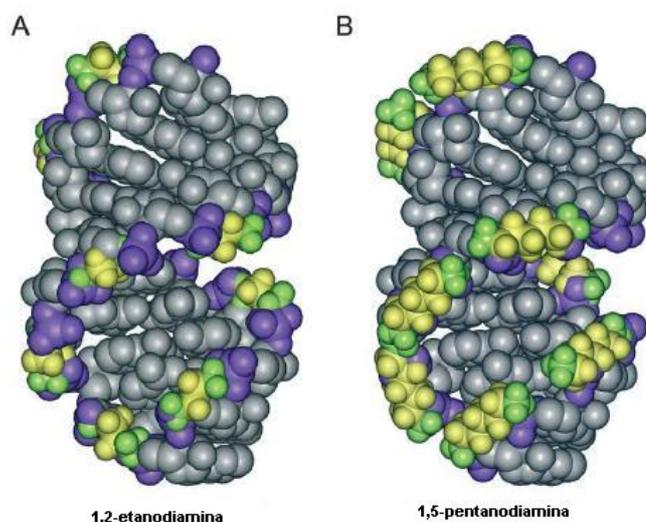


Figura 2.6: Interação das poliaminas com RNA (20)

Algumas das características mais interessantes das interações das poliaminas no meio biológico são as que envolvem complexos de nucleotídeos com íons metálicos e as poliaminas biológicas. Reações dos íons metálicos com bioligantes levam a mudanças conformacionais nos bioligantes (8). Poucas tentativas têm sido feitas com o objetivo de elucidar as interações de sistemas mais complicados, como é o caso dos sistemas ternários, que além da ligação metal-ligante, interações não covalentes ligante-ligante (que são importantes nos sistemas biológicos) também podem estar presentes (15).

2.1.4

Interações com íons metálicos: sistemas ternários

A formação de complexos nos fluidos biológicos pode ser descrita como um equilíbrio multimetal-multiligante envolvendo íons metálicos e biomoléculas. Devido ao fato dos bioligantes se apresentarem em maior concentração nos fluidos biológicos do que os íons metálicos é mais comum que ocorra

a formação de complexos ternários, também chamados de complexos de ligantes mistos, em que envolvem dois ligantes diferentes e um ou mais íons metálicos, do que complexos binários em que somente um ligante está presente. Os complexos ternários e as interações ligante-ligante desempenham papel importante no transporte de íons metálicos, reações enzimáticas, além de outras funções biológicas, variando de reconhecimento molecular e catálise de metaloenzimas até transferência de informações por neurotransmissores e hormônios, em que há necessidade da presença do íon metálico para o desempenho desta função (23).

As interações ligante-ligante são de natureza não-covalentes e são classificadas da seguinte maneira: interações eletrostáticas ou ligações de hidrogênio entre grupos eletricamente carregados ou grupos polares; interações hidrofóbicas entre grupos alifáticos ou grupos aromáticos; interações por impedimento estérico devido a presença de grupos volumosos. Enquanto o impedimento estérico favorece a formação dos complexos ternários sem nenhum tipo de tensão na estrutura, o que gera uma seletividade dos ligantes, as interações eletrostáticas e as ligações de hidrogênio contribuem para a estabilização dos complexos ternários. A presença de interações ligante-ligante pode facilitar no isolamento de complexos ternários com cadeias laterais ou com grupos coordenados, capazes de interações e pode também, auxiliar no aumento da estabilidade dos complexos, como foi visto através das mudanças espectrais devido a formação de complexos e por análises de raios-X (2).

Os centros de interações entre os bioligantes e as poliaminas são átomos doadores de alta densidade eletrônica. Estes átomos doadores também servem como potenciais sítios em que são formadas ligações de coordenação com metais presentes nos sistemas biológicos. Geralmente os íons pertencentes ao grupos dos metais alcalinos terrosos, que são considerados como íons “duros” interagem com os átomos “duros” de oxigênio, enquanto os átomos de nitrogênio das bases púricas e pirimidínicas considerados “macios”, interagem com os íons “macios” dos metais de transição. O metal pode ser tratado desta forma como um fator interferindo nas interações entre os bioligantes. A estabilidade dos complexos com poliaminas e os ácidos nucleicos ou seus fragmentos depende muito do tipo de metal que está presente (6, 7, 8).

A presença de muitos grupos doadores nos nucleotídeos e a possibilidade de diferentes tipos de coordenação é fonte de controvérsia, mesmo em se tratando de complexos binários de nucleotídeos com íons metálicos. Os nucleotídeos e os íons metálicos interagem com as poliaminas participando da função de transferência de informações genéticas. As poliaminas catiônicas são capazes de remover o íon metálico ligado ao nucleotídeo (algumas reações en-

zimáticas envolvendo o complexo ATP-metal-poliamina geram a forma ativa do ATP) (24). Portanto, informações sobre os processos envolvendo poliaminas, nucleotídeos e íons metálicos são muito importantes.

Dadas as circunstâncias, pode-se concluir que as poliaminas desempenham um papel essencial em vários processos biológicos, porém o mecanismo de ação das poliaminas ainda não é muito claro. Não há também dados confiáveis do grau de envolvimento dos metais nestes processos. Existe uma correlação entre a estrutura das poliaminas e o seu modo de interação com as biomoléculas e os íons metálicos. A formação de complexos metálicos mudam a natureza das poliaminas, como a estrutura, o comportamento cinético, a carga, a distribuição eletrônica e conseqüentemente influencia suas interações com os bioligantes, particularmente seu controle dinâmico da conformação do DNA e RNA (15).

As propriedades de coordenação das poliaminas, presentes nos sistemas biológicos, aos íons metálicos são importantes devido ao papel desempenhado pelo sistema em vários processos celulares.

2.1.5

Interações com íons metálicos: sistemas binários

Os ânions têm uma grande relevância do ponto de vista biológico pois mais de 70 % de todos os cofatores e substratos envolvidos na biologia são de natureza aniônica. Apesar disso, estudos envolvendo a síntese de ligantes que interagem com ânions apresenta um desenvolvimento bastante lento se comparada aos estudos da química de receptores catiônicos (2).

De todos os tipos de ligantes receptores(hospedeiros) aniônicos os mais estudados são os baseados em diferentes formas de íons amônio substituídos. Sais alquil-amônio têm a vantagem de cargas positivas para a ligação com a espécie aniônica, via interações eletrostáticas. Apresentam também grupos polares do tipo (N-H) para formação das ligações de hidrogênio, além de uma extensa versatilidade no trabalho de síntese, possibilitando que o ligante seja incorporado em uma vasta variedade de estruturas hospedeiras multidentadas com a solubilidade e a geometria desejada. Além do mais, hospedeiros aniônicos baseados em íons amônio são derivados dos ligantes biológicos catiônicos tais como as poliaminas (2).

Um exemplo muito simples é a etilenodiamina que forma vários complexos metálicos com vários metais. Da mesma forma, o cátion $NH_3^+(CH_2)_2NH_3^+$ forma sais simples com ânions como o citrato (Figura 2.7(B)). Em contraste com a estabilização de complexos metálicos pelo ligante quelante, as interações da etilenodiamina protonada, não são de natureza quelante, uma vez que a

ligação C-C adota uma configuração *cis* com as duas aminas protonadas ligadas a diferentes ânions. O modo de interação com o ânion em ponte é atribuído à necessidade das duas cargas positivas se posicionarem o mais longe possível uma da outra, minimizando desta forma a repulsão entre as mesmas. Uma situação similar é encontrada na estrutura da poliamina putrescina na Figura 2.7(A) interagindo com o ânion difosfato, que é o modelo para o estudo de interações dos ácidos nucleicos e das poliaminas, que divide os ânions $H_2PO_4^-$ ligados pela putrescina protonada em ponte (2). Em um sistema biológico real, resíduos de fosfato são encontrados interagindo com a espermina, e a poliamina mais uma vez adota uma conformação linear não quelante. Estas observações apontam a diminuição da tendência de poliaminas lineares formarem complexos quelatos com ânions devido a necessidade da separação dos centros catiônicos formados pelos nitrogênios protonados (2).

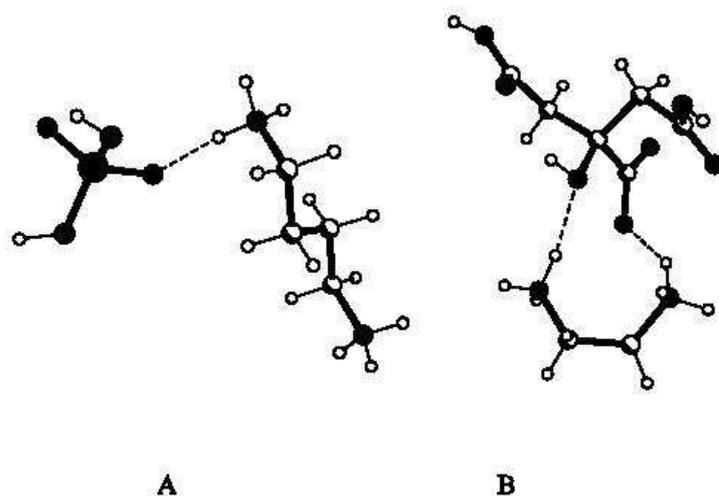


Figura 2.7: (A) Complexo da putrescina diprotonada com o $H_2PO_4^{2-}$. (B) Complexo da etilenodiamina diprotonada com o citrato (25)

Várias determinações feitas por raio-X demonstram que as ligações de ânions em sistemas biológicos resultam de múltiplas ligações de hidrogênios e de um processo que seleciona o tamanho adequado do ânion (2). Para o estudo das interações dos ânions no meio biológico, algumas características devem ser levadas em consideração. Primeiramente os ânions são grandes quando comparados com os íons metálicos. Um exemplo que pode ser citado é o F^- que é o menor ânion e apresenta um raio iônico de 135 pm, que é muito próximo da medida do raio do K^+ que é de 133 pm e que pode ser considerado um cátion de raio iônico de tamanho médio. O segundo aspecto que deve ser considerado é a variedade de geometrias que os ânions podem apresentar. Eles podem ser de formato esférico (F^- , Cl^-), triangular (NO_3^- ,

HCO_3^- etc), tetraédricos (SO_4^{2-} , fosfato etc), quadrado planar ($PdCl_4^{2-}$, $Pt(CN)_4^{2-}$ etc), octaédrico (PF_6^- , $Fe(CN)_6^{4-}$), ou formas mais complexas que muitos ânions biológicos adotam como os policarboxilatos (malonatos, citrato etc), nucleotídeos (AMP, ADP, ATP) e também os polímeros de natureza aniônica, DNA e RNA, que são reconhecidos por ligantes biológicos catiônicos e participam de passos fundamentais da vida nos sistemas biológicos. A terceira particularidade dos ânions leva em consideração a energia de hidratação comparada à energia de hidratação dos cátions metálicos. Esta característica que está relacionada a suas habilidades em fazer ligações de hidrogênio, faz com que a complexação dos ânions em meio aquoso seja mais dispendiosa energeticamente, do que a complexação dos íons metálicos esféricos. Outra característica muito importante para o estudo da química de coordenação de ânions é que deve-se levar em consideração em que faixa de pH em que eles existem. Finalmente a última característica de interesse é a que os ânions são espécies que podem ter sua esfera de coordenação saturada. Portanto somente o reconhecimento de cargas (interações eletrostáticas) e as ligações de hidrogênio é que são utilizadas por biomoléculas para o reconhecimento destas espécies aniônicas nos sistemas biológicos (18).

Pela razões que acabamos de descrever fica claro que a ligação dos ânions nos sistemas biológicos ocorrem muito menos prontamente do que a ligação dos sistemas que envolvem os cátions. Uma tentativa de esclarecer estes sistemas é tentar atribuir aos ânions a geometria de coordenação preferencial, análoga a geometria que é tão bem estabelecida para vários cátions metálicos (2).

A molécula resultante da interação de diferentes tipos de moléculas com complexos aniônicos envolvendo metais de transição são chamadas supercomplexos. Esta espécie também chamada de complexos de segunda esfera de coordenação se apresenta de forma que a espécie poliamina é colocada na segunda esfera de coordenação do metal interagindo eletrostaticamente, através de ligações de hidrogênio e de outros tipo de forças com o ânion complexo (18, 25).

Vários estudos envolvendo diferentes complexos aniônicos de metais de transição de diferentes geometrias podem ser citados. Poliazamacrociclos, uma classe de ligantes cíclicos apresentando varios grupos amino protonados, de diferentes tamanhos, têm sido examinados com espécies quadrado planar $PdCl_4^{2-}$, $Pt(CN)_4^{2-}$, e com espécies octaédricas do tipo $M(CN)_6^{n-}$, $M = Fe, Co, Cr, e Ru$ que em geral é observado a proporção de 1:1 na formação dos complexos (25).

A estrutura cristalina de um poliazamacrociclo com o ânion $PdCl_4^{2-}$, na Figura 2.8 mostra que o ânion está incluído na cavidade do decaprotonado

macrociclo (18).



Figura 2.8: Estrutura de um ligante poliazamacrocíclico com ânions tetracloropalladato (II) (ligações de hidrogênio estão representadas pelas linhas pontilhadas azuis) (18)

O uso de metalocianetos como substratos para a interação com o ligante poliamino protonado não é casual. Estes íons oferecem uma maneira simples de analisar as influências da carga negativa nas interações do ânion com o ligante receptor, enquanto outros fatores como a geometria do ânion é mantida constante. Os estudos mostram que a afinidade entre os complexos e os ligantes tende a crescer à medida que o grau de protonação do ligante aumenta, ou à medida que a carga negativa do complexo aniônico aumenta (18, 25). Todos os dados obtidos no trabalho confirmam que as interações entre os poliazamacrociclos e os complexos aniônicos são regidas por interações eletrostáticas (atração de cargas opostas), o que aponta uma dificuldade de definir a seletividade do ligante de um ânion sobre outro ânion (18).

Um outro ponto de interesse é levar em consideração a natureza polimérica ou monomérica do aduto formado em solução e no estado sólido. A natureza do aduto formado em solução pode ser diferente da natureza da espécie formada no estado sólido. Espécies formadas em solução podem apresentar um caráter monomérico e nenhuma indicação de agregados maiores. Já no estado sólido uma estrutura determinada por raio-X pode apresentar uma estrutura polimérica em camadas alternando com os complexos aniônicos (18) como na Figura 2.9

Muitos complexos tetraédricos com metais de transição nos sistemas biológicos apresentam a forma MX_4^{2-} em que X são haletos. Tetrahaletos de cobre(II) ou de cobalto(II) são geralmente usados como modelos de compostos para estudar os sítios ativos de metaloenzimas ou de metaloproteínas. Estudos também já foram realizados para compostos com tetraclorocadmato(II) e tetraclorozincato(II) (26).

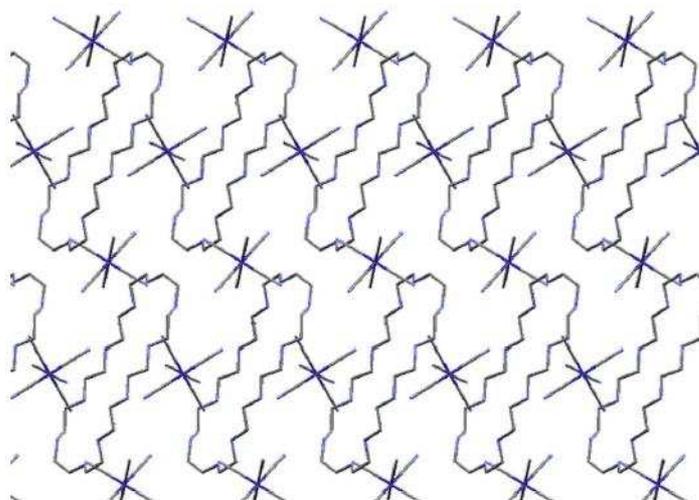


Figura 2.9: Porção da estrutura cristalina de um ligante poliazamacrociclo com ânions hexacianocobaltato (III) (18)

Compostos apresentados no estado sólido além de serem de interesse fundamental possuem uma ampla gama de aplicações. A estrutura de muitos complexos binários e ternários ainda não foram explicadas. Desta forma o estudo no estado sólido das moléculas formadas por metais e poliaminas é de grande interesse, uma vez que o comportamento em fase sólida permite analisar uma série de interações químicas que não são possíveis de se observar em solução.

2.2

Ligantes Fosfatados: Adenosina 5' trifosfato (ATP)

Entre os ânions biologicamente mais relevantes estão os nucleotídeos polifosfatos, em particular adenosina mono-, di-, e trifosfato, que são componentes básicos na bioenergética de todos os seres vivos, sendo que o centro de estocagem e transferência de energia é a cadeia polifosfato. A complexação e a transformação dos substratos biologicamente importantes são de particular relevância. Apesar das reações de clivagem estarem sendo exaustivamente estudadas as reações de síntese, em que ocorre a formação de ligações químicas continuam sendo um desafio para os pesquisadores (2).

Os processos de transferência do grupo fosfato desempenham importantes funções nos sistemas energéticos de todos os organismos vivos. Eles geralmente envolvem espécies aniônicas e pode participar tanto da quebra quanto da formação de ligações químicas. Sob este ponto de vista os nucleotídeos são de interesse especial pois eles sofrem tanto processos de desfosforilação quanto processos de fosforilação (2).

O ATP (Figura 2.9) junto com o ADP são responsáveis pela bioenergética

celular. As células obtêm energia livre, em forma química, pela degradação de nutrientes, particularmente carboidratos e gorduras, e utilizam esta energia para (27):

1. sintetizar biomoléculas a partir de precursores menores;
2. realizar trabalho mecânico, como na contração muscular;
3. transportar biomoléculas ou íons através de membranas e contra gradientes de concentrações crescentes.

O ATP age como transportador de energia dos processos que liberam energia para os processos que necessitam de energia. A hidrólise do ATP ocorre em sistemas biológicos sendo catalisado por enzimas altamente específicas chamadas ATPases. Estes catalizadores naturais são importantes em vários processos biológicos. Portanto existe um grande interesse em analisar os fatores que controlam os seus mecanismos (27). A hidrólise não catalisada do ATP ocorre quase exclusivamente no grupo fosfato terminal, pelo ataque de uma molécula de água, levando a formação de uma molécula de ADP e um grupo fosfato livre. Estudos envolvendo a clivagem da ligação O-P-O mostram que ela ocorre rapidamente em pH ácido e lentamente em pH neutro (2).

Apesar das amins biogênicas, putrescina, espermina e espermidina se ligarem aos nucleotídeos, à princípio não apresentam nenhum efeito na taxa de hidrólise do ATP. Já amins sintéticas lineares quando ligadas ao ATP mostram uma aumento na taxa de hidrólise do grupo fosfato (2).

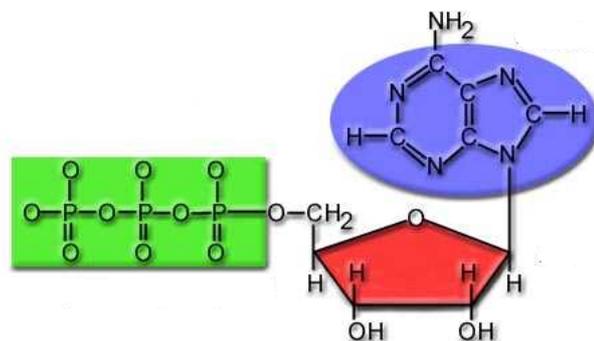


Figura 2.10: ATP

O ATP e seus produtos de hidrólise sucessiva, adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP), são nucleotídeos que se constituem de uma base púrica, um açúcar com 5 átomos de carbono e um ou mais grupos fosfato

(27). Ao considerarmos o papel do ATP como portador de energia, podemos focalizar sua porção trifosfato. O ATP é uma molécula rica em energia porque sua unidade trifosfato contém duas ligações fosfoanidrido (28).

Em pH 7,0 o ATP e ADP ocorrem como os ânions ATP^{4-} e ADP^{3-} , pois seus grupos fosfatos estão praticamente ionizados neste pH. Entretanto no fluido intracelular que contém altas concentrações de Mg^{2+} , o ATP e o ADP existem principalmente como os complexos MgATP^{2-} e MgADP^{-} (29).

Através dos heteroátomos das bases nucleotídicas e/ou pelos oxigênios negativamente carregados do grupo fosfato podem ser formados complexos com íons metálicos. Com o ATP vários quelatos metálicos com os grupos α , β , γ , dos fosfatos têm sido identificados por cristalografia de raios X e por espectroscopia de RMN com ^{31}P . Em particular o complexo de Mg^{2+} deste poliânion é frequentemente requerido como substrato para enzimas fosforil e nucleotil transferase. A estrutura proposta para alguns de seus complexos é mostrada na Figura 2.11 (28).

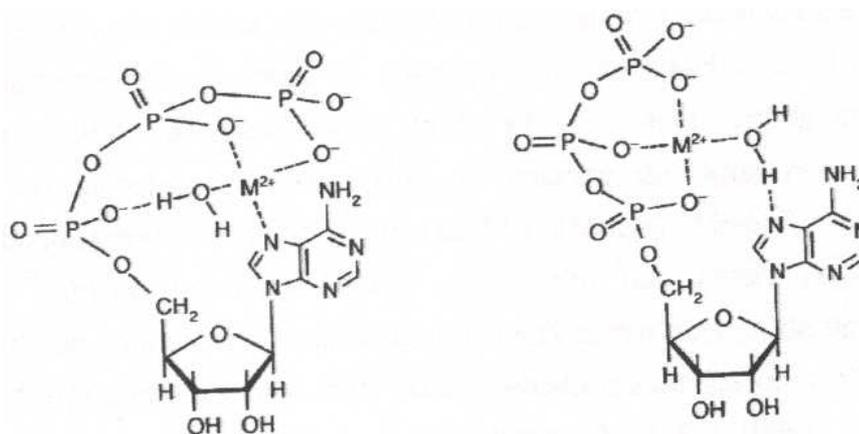


Figura 2.11: Estruturas propostas para complexos com ATP e alguns íons metálicos divalentes (28)

O estudo de interações entre íons metálicos e o ATP tem despertado muito interesse devido ao envolvimento de íons divalentes nos processos enzimáticos de transferência do grupo fosfato. Estudos mostram que estes processos ocorrem através da formação de complexos enzima-metal-ATP (30).

De maneira análoga, complexos ternários têm sido implicados na participação do transporte e do estoque de ATP através da membrana devido a sua inatividade frente a hidrólise (30). Muitas reações enzimáticas envolvidas nos processos de armazenagem e estocagem do ATP requerem dois íons metálicos para interagirem com o mesmo nucleotídeo por sítio ativo. Fatos como estes justificam muito do esforço dos pesquisadores para elucidar a estrutura de complexos binários M-ATP e complexos ternários M-ATP-L em solução e no

estado sólido como modelos de sistemas enzimáticos envolvendo ATP e íons metálicos (31).

Muitos estudos mostram que o ATP é um ligante requisitado quando se trata de uma reação em sistemas biológicos que necessita de muita especificidade. Além disso, complexos com ligantes mistos são parte integrante dos fluidos biológicos. Portanto é de grande interesse o estudo da influência de um segundo ligante na reatividade dos complexos mistos de cobre(II) e ATP (30).

Estudos abordando complexos ternários envolvendo as poliaminas naturais com os nucleosídeos e nucleotídeos têm sido frequentemente publicados. Contudo a formação, a estabilidade e os tipos de interações que ocorrem entre as poliaminas naturais e estes grupos de bioligantes ainda não são bem esclarecidas.

Nakai e Gilnsmann (32) e Kimura et al. (33), mostraram através de estudos de equilíbrio químico que as poliaminas putrescina, espermidina e espermina ligam-se também ao ATP, pelos mesmos sítios de coordenação onde o íon magnésio(II) se coordena e que a interação destas poliaminas com o ATP não depende somente da carga das poliaminas mas também da estrutura das mesmas. Nakai e Gilnsmann (32) em seus estudos concluíram que a poliamina espermidina possivelmente compete com o íon magnésio(II) pelo ATP, *in vivo*, e conseqüentemente a interação entre a espermidina e o ATP funciona como um regulador nas reações enzimáticas que dependem do íon magnésio(II) livre e coordenado ao ATP (3), mais uma vez evidenciando a importância dos estudos acerca das interações entre os ligantes biológicos.

Nos nucleotídeos a base púrica (átomos doadores N-1 e N-7), a base pirimídica (N-3 e os átomos de oxigênio dos grupos fosfatos) são os principais centros de interações com bioligantes e também com íons metálicos (8). Em estudos realizados em sistemas sem a presença do metal, mostram que as interações entre os bioligantes ocorrem pelos grupos acima citados e pelos nitrogênios protonados das poliaminas. Resultados de estudos na presença do íon metálico Cu(II) com ATP e ADP revelaram mudanças nos grupos que participam das interações ligante-ligante devido a coordenação do metal ao grupo fosfato e aos nitrogênios da poliamina. Porém, os resultados indicam que ainda estão presentes as interações intermoleculares dos ligantes, através dos átomos que não participam do sítio de coordenação do metal, uma vez que as interações aumentam a estabilidade dos complexos formados (24).

Embora através da síntese e caracterização de compostos ternários no estado sólido algumas questões possam ser esclarecidas, o número de espécies ATP-metal-L isoladas e caracterizadas no estado sólido ainda é muito pequeno, pois a maior dificuldade está no preparo de cristais apropriados para

caracterização, isolados de soluções aquosas (31). A síntese destes compostos tem como objetivo criar modelos que possibilitam o estudo das diversas interações entre os bioligantes e os íons metálicos.

A seleção do ATP para o desenvolvimento de estudo no estado sólido recai na sua importância biológica, cuja ação, em muitos casos, está associada a PCr e ao fato de possuir mais de um grupo fosfato, diferentemente da PCr que só apresenta um grupo fosfato, possibilitando também um estudo mais completo do comportamento deste grupamento na coordenação de metais.

2.3

Ligantes Fosfatados: Fosfocreatina (PCr)

Outro exemplo de biomolécula que armazena energia é a fosfocreatina. Ela atua como uma forma de armazenamento temporário de grupo fosfato (29). Desta maneira, a fosfocreatina atua na manutenção da concentração de ATP constante e em altos níveis nos músculos esqueléticos. Como o conteúdo de PCr do músculo é 3 a 4 vezes maior que o do ATP, ela pode armazenar grupos fosfato suficientes para manter o nível de ATP durante curtos períodos de atividade intensa (28).

Compostos fosforilados atuam em muitos processos enzimáticos nos sistemas biológicos. A clivagem que ocorre em compostos naturais liberando o grupo fosfato serve como fonte de energia para muitos organismos vivos (29). A fosfocreatina (PCr) é um composto orgânico encontrados nos tecidos musculares capaz de armazenar e prover energia para a contração muscular convertendo ADP e PCr em ATP e creatina (28). Ela mantém a concentração de ATP constante e em alto nível nos tecidos musculares. Existem vários estudos envolvendo o processo de desfosforilação da PCr que, tal como o ATP, se mostra bastante estável em soluções alcalinas mas sofre hidrólise rapidamente quando em solução ácida (34). A transferência do grupo fosfato para o ADP ocorre através de uma reação catalizada pela enzima denominada creatina quinase conforme mostrado na Figura 2.12 (27):

A reação é reversível, de modo que a ressíntese da fosfocreatina pode ocorrer quando houver disponibilidade de ATP, conforme ocorre no período de recuperação depois de uma contração muscular. A transferência do grupo fosfato do ATP para a creatina, a fim de formar a fosfocreatina, é catalisada pela enzima ATP-creatina-transfosforilase (28). Cada reagente representado na Figura 2.12 deve ser entendido como um sistema em equilíbrio com outras espécies. Por exemplo, o ATP sempre está em equilíbrio com o complexo $ATP - Mg^{2+}$. Em pH fisiológico, a PCr está presente como o ânion PCr^{2-} e esta espécie pode se coordenar aos cátions metálicos(35). Portanto a espécie

PCr^{2-} compete com outros ânions contendo o grupo fosfato como o ADP e o ATP pelas espécies catiônicas presentes no meio (35).

A molécula de PCr apresenta três centros doadores possíveis: um átomo de oxigênio do grupo fosfato, o átomo de nitrogênio do grupo guanidino e o átomo de oxigênio do grupo carboxilato. Existe portanto a possibilidade da molécula de PCr atuar como um ligante tridentado. Resultados de estudos em solução, mostram que a PCr atua como um ligante bidentado sendo que o átomo de nitrogênio é um dos átomos que se coordenam ao metal (28). Entretanto, não foi possível concluir qual a origem do segundo átomo doador envolvido na esfera de coordenação: se é o oxigênio do grupo fosfato ou se é o oxigênio do grupo carboxilato (28). Informações sobre a estabilidade de complexos envolvendo a PCr é essencial para a determinação da concentração das espécies presentes no meio citossólico(35).

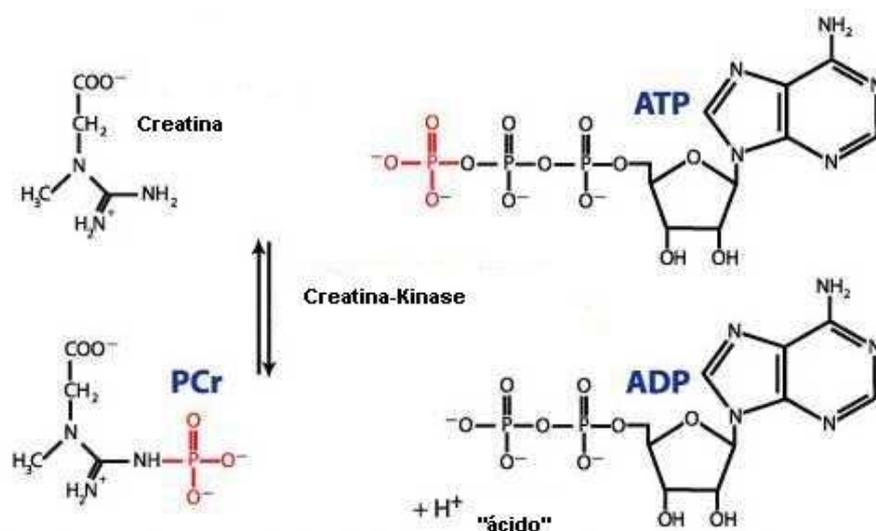


Figura 2.12: Síntese da Fosfocreatina

Assim como nos tecidos musculares, a ação reparadora de energia da PCr pode também ocorrer no coração, que também é um músculo. Por isso vários laboratórios têm focado seus estudos em definir a função intracelular da PCr (29). Atualmente na prática clínica a PCr tem sido usada no tratamento de pacientes com moléstias do coração, com o nome comercial de Neoton (36).

A PCr tem ainda outra função devido a sua natureza anfipática. As características iônicas da PCr tornam possível a ligação às cabeças fosfolipídicas polares das membranas. Ligando-se aos fosfolipídeos, a fosfocreatina diminui a fluidez da membrana e faz com que se diminua a passagem de material celular. Essa estabilização da membrana evita alguns problemas como a isquemia e a hipoxia. A fosfocreatina protege as células de serem danificadas por diminuição ou perda de material citoplasmático. Por essa propriedade a fos-

fosfocreatina tem sido indicada para ser usada por pacientes infartados ou com problemas isquêmicos no coração (29). Pesquisas experimentais sobre o mecanismo de danos irreversíveis das células cardíacas indicam uma estreita relação com o esgotamento de fosfatos de alta energia (29).

Semenovsky et al. (37) concluíram, através de testes clínicos com 78 pacientes (onde 41 foram tratados com PCr e 37 formaram o grupo de controle), que a PCr adicionada à solução sanguínea cardioplégica exerce clara ação de proteção na isquemia do miocárdio durante operações cardiovasculares.

Na literatura, poucos estudos mostram que pode haver alguma relação indireta entre a PCr e o cobre e a PCr e as poliaminas. Kleihues et al. (38) em seus estudos submetem macacos adultos a situação de isquemia cerebral completa durante uma hora e logo após, a circulação cerebral foi reativada por um período de 24 horas. Os animais que demonstraram sinais de recuperação exibiram um suprimento parcial de fontes de energia celulares, tais como ATP e PCr. Após as três primeiras horas de reativação cerebral, apareceram também evidências da indução de enzimas envolvidas na síntese de poliaminas (ornitina descarboxilase e S-adenosil-metionina descarboxilase). Não foram observadas mudanças na atividade destas enzimas no final do período de isquemia, indicando não apenas a inibição da síntese, mas também do catabolismo das poliaminas durante o período de isquemia completa.

Um outro estudo envolvendo ratos com alimentações diferenciadas, mostrou que ratos com uma alimentação deficiente em cobre apresentaram um nível de NAD e fosfocreatina maior do que o grupo controle (ratos que receberam uma alimentação normal e não apresentavam deficiência em cobre). Já o nível cardíaco de ATP apresentou-se igual nos dois grupos (39).

Desta forma, na tentativa de tornar a pesquisa *in vitro* mais representativa dos fenômenos que ocorrem no processo biológico *in vivo* é interessante o estudo dos sistemas binários e ternários formados pela fosfocreatina, o cobre e as poliaminas.