

# 1 Introdução

O alumínio e outros metais (magnésio, zinco, cobre e ferro) são presentes em grandes quantidades nas placas amilóides e nos emaranhados neurofibrilares encontrados nos cérebros de pacientes acometidos pelo mal de Alzheimer (Berthon, 1996, Barquero-Quiros, Vargas-Rojas e Blanco-Saenz, 2001, Freitas, Brilhante e Almeida, 2001, Domingo, 2006, Drago *et al.*, 2008a e Ferreira *et al.*, 2008). No entanto, a barreira hematoencefálica deveria ser seletivamente impermeável a íons.

Alguns estudos (Aremu e Meshitsuka, 2005, Cui *et al.*, 2005 e Hamley, 2012) apontam uma provável ruptura da barreira hematoencefálica como uma explicação para a contaminação de astrócitos e neurônios por íons metálicos oriundos do plasma sanguíneo. Outros demonstraram que, uma vez em concentração excessiva no fluido neural-espinhal, o alumínio promoveria a agregação do peptídeo  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ) e a hiperfosforilação da proteína Tau (Vieira *et al.*, 2007), com consequente degeneração neuronal (Domingo, 2006 e Drago *et al.*, 2008a).

Não obstante, mesmo em situações normais, complexos lipossolúveis de baixa massa molecular podem atravessar as membranas das células endoteliais dos capilares do córtex cerebral de forma passiva e alcançar incólumes o fluido neuro-espinhal (Vieira *et al.*, 2007 e De Felice *et al.*, 2009). Portanto, a capacidade de coordenação dos íons metálicos, como o alumínio(III), com ligantes simples, como a adenosina 5'-trifosfato (ATP), a fosfocreatina (PCr) e aminoácidos, constituiria uma via alternativa de contaminação do tecido cerebral com efeitos pouco conhecidos. Aminoácidos e ligantes fosfatados são ligantes em potencial conhecidos para o Al<sup>3+</sup> (Greger, 1993 e Schäfer e Jahreis, 2006).

A motivação original deste estudo era a busca por agentes quelantes capazes de se coordenarem com o alumínio e impedirem a absorção pelo aparelho digestório. Entretanto, os resultados demonstraram a formação de complexos estáveis em pH baixo, o que poderia ocorrer no começo do trato digestivo se os ligantes analisados fossem consumidos por via oral ou enteral. Como consequência, surgiu um indicativo de que o consumo de suplementos alimentares proteicos ou energéticos potencializaria a contaminação do organismo pelo

alumínio naturalmente presente na água e em outros nutrientes. Os resultados apontaram a necessidade premente da realização de pesquisas *in vivo* e epidemiológica sobre os riscos e benefícios da administração de alguns suplementos a pacientes idosos diagnosticados com demência. Paralelamente, dever-se-ia considerar se o atual consumo exacerbado de suplementos nutricionais por jovens em busca de melhor desempenho físico poderia traduzir-se em antecipação ou expansão dos casos de Alzheimer nas próximas décadas.

A absorção do alumínio ocorre principalmente no estômago e no duodeno proximal (Kiss, Gajda-Schranz e Zatta, 2006). O estudo de complexos estáveis formados em pH ácido ou neutro entre o alumínio e ligantes biológicos é essencial para o entendimento dos mecanismos químicos que facilitariam a absorção.

Algumas investigações indicaram ocorrer maior absorção de alumínio quando administrado concomitantemente a aminoácidos, tanto pelo aparelho digestório quanto pelo cérebro (Greger, 1993, Aremu e Meshitsuka, 2005 e Aikoh, Yamato e Shibahara, 2007). Entretanto, a absorção seria insignificante quando o metal é administrado isoladamente. A maior parte desses estudos com aminoácidos foi realizada com a glicina devido a sua simplicidade.

O mecanismo pelo qual o alumínio penetraria a barreira hematoencefálica juntamente com aminoácidos ainda é ignoto, embora a difusão passiva pareça ser um deles (Aremu e Meshitsuka, 2005). Apesar de haver diferenças na absorção do alumínio por células cerebrais conforme o aminoácido, apenas a glicina, a serina e o glutamato foram investigados (Aremu e Meshitsuka, 2005).

A falta de conhecimento sobre complexos de alumínio e ligantes, como aminoácidos e compostos fosfatados, representa um obstáculo à compreensão dos mecanismos de absorção e biodisponibilidade do alumínio. Pouco se sabe também sobre seu metabolismo e suas interações com compostos biológicos. Isso ocorre porque o estudo da química de coordenação do alumínio(III) é particularmente desafiador. A hidrólise acentuada do íon se inicia em valores baixos de pH, o que dificulta o estudo em solução e até impede a síntese no estado sólido.

## 1.1 Justificativa

O aumento da expectativa de vida conquistado nas últimas décadas é um fenômeno global. O número de idosos cresce aceleradamente, juntamente com a incidência de doenças relacionadas à velhice. Dentre as doenças degenerativas e

demências, sobretudo destaca-se o aumento epidêmico do mal de Alzheimer. Nessa patologia, a pronunciada associação entre íons metálicos, como o alumínio, e as placas amilóides formadas no cérebro afetado permanece um mistério. A elucidação dessa relação poderia conduzir a novas formas de prevenção e tratamento da doença. Nessa conjuntura insere-se a importância do estudo de complexos de  $Al^{3+}$ .

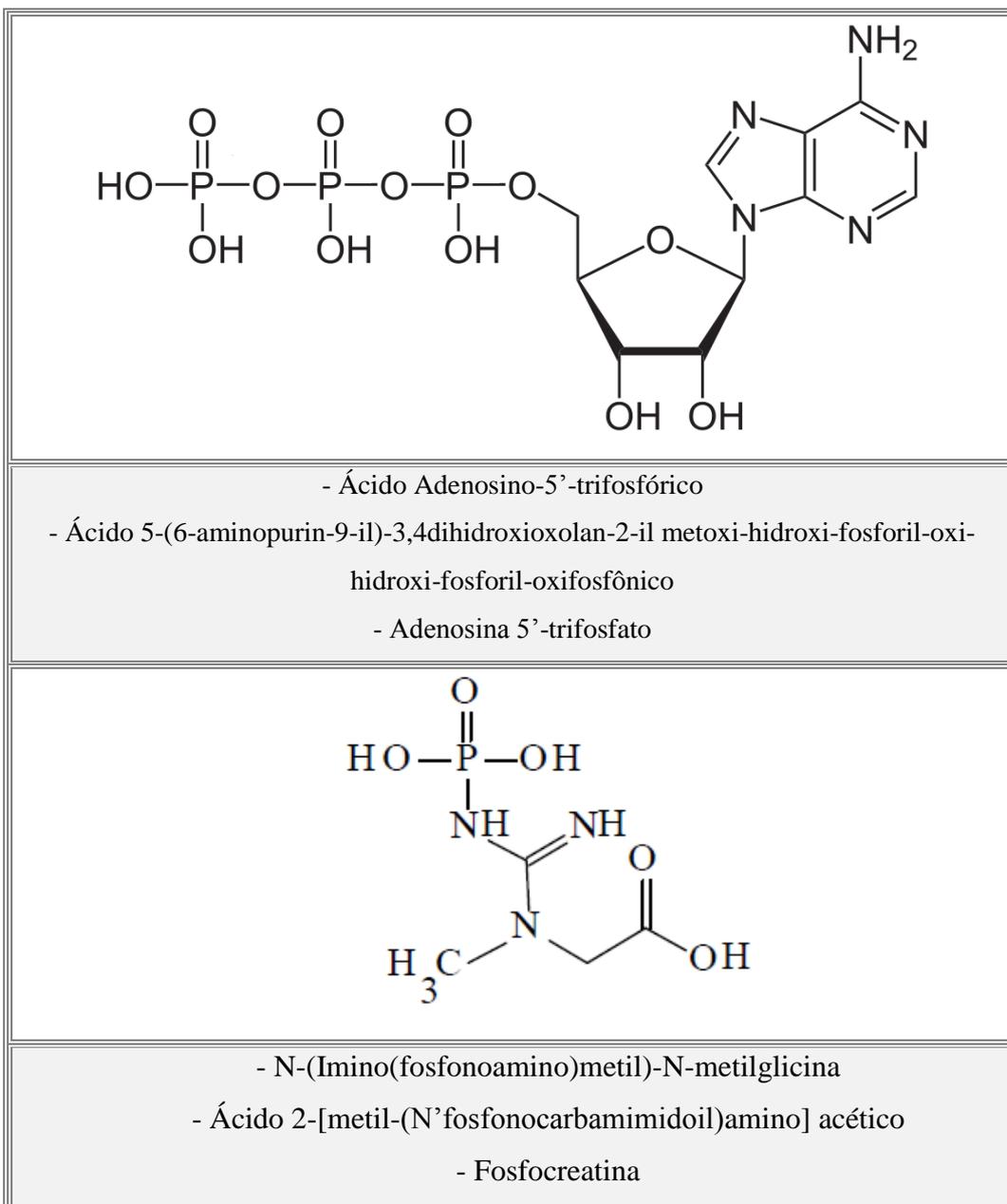


Figura 1.1 - Ligantes fosfatados estudados na tese.

Um dos propósitos desta tese é subsidiar e auxiliar possíveis estudos nutricionais, médicos e farmacológicos sobre a prevenção e o tratamento de

doenças neurodegenerativas a partir do conhecimento sobre os complexos formados pelo  $Al^{3+}$  com ligantes biológicos em meio aquoso.

A complexação entre o alumínio(III) e o ATP ou a PCr com alguns aminoácidos foi investigada pelas técnicas de titulação potenciométrica, espectroscopia Raman e cálculos teóricos em solução aquosa, de modo a conhecer as características dos compostos formados.

O ATP e a PCr (Figura 1.1) são compostos bioenergéticos essenciais, pervasivos em quase todas as formas de vida. São encontrados em abundância no cérebro humano. Contudo, seus níveis sofrem forte depleção nos cérebros acometidos pela doença de Alzheimer (Pettegrew *et al.* 1997), principalmente por causa de alterações no transporte de glicose acarretadas pelo peptídeo A $\beta$  (Keller *et al.*, 1997 e Butterfield, 2002).

Os aminoácidos pesquisados foram a metionina (Met), a cisteína (Cis), a homocisteína (Hcis) e a penicilamina (Pen). Suas estruturas químicas são observadas na Figura 1.2. Esses aminoácidos diferem em relação ao tamanho da cadeia e ramificações, mas em comum possuem o enxofre na estrutura, como sulfidril livre na Cis, Hcis e Pen, e como tioéter na Met.

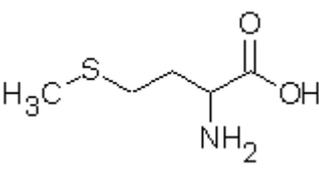
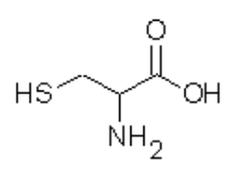
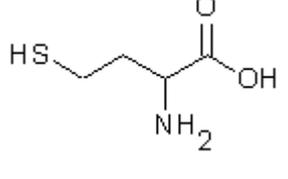
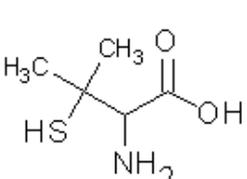
			
- Ácido (S)-2-amino-4-(metil sulfonil)-butanóico  -Metionina	- Ácido 3-tiol-2-amino-propanóico  - Cisteína	- Ácido 2-amino-4-mercaptobutanóico  -Homocisteína	- Dimetilcisteína - Ácido 2-amino-3-mercapto-3-metilbutírico - Penicilamina

Figura 1.2 - Aminoácidos investigados na tese.

A Cis, a Hcis e a Met são aminoácidos normalmente presentes no organismo humano e contribuem para a quantidade total celular de enxofre. A Met integra a sequência primária do A $\beta$  (Suh e Checler, 2002) e atua como provável sítio de ligação para íons metálicos neste peptídeo. A Cis e a Hcis estão relacionadas ao

estresse oxidativo, característico nas doenças neurodegenerativas (Townsend, Tew e Tapiero, 2004).

A Pen é um aminoácido sintético empregado como agente quelante em intoxicação por metais e na doença de Wilson – enfermidade marcada pela alta concentração de níveis séricos e de excreção urinária de cobre – (Aronson, 2006). Os efeitos na quelação de metais desse aminoácido têm sido pesquisados como possibilidade terapêutica para o Alzheimer (Cherny *et al.*, 2000, Rossi *et al.*, 2002 e Cui *et al.*, 2005).

Os estudos em solução aquosa são importantes, pois meios biológicos são prevalentemente aquosos. Os estudos *in vitro* e quantomecânicos realizados fornecem uma perspectiva inicial do que poderia ocorrer *in vivo*. O uso combinado de diferentes técnicas permite determinar e ratificar o grau de afinidade do cátion metálico pelos ligantes, a estabilidade das espécies em função dos valores de pH, os sítios de coordenação dos ligantes, a geometria dos complexos e conhecer um pouco sobre as forças de ligação intermoleculares dos complexos e dos adutos.

Nesta tese foi analisada a possibilidade de formação em meio aquoso de complexos binários e ternários do  $Al^{3+}$  com os ligantes citados. Os adutos moleculares dos ligantes também foram considerados.

## 1.2 Panorama da pesquisa

A pesquisa das metaloproteínas, complexos formados entre metais e proteínas, constitui o ramo mais importante da Química Bioinorgânica nos dias atuais (Vallet *et al.*, 2003). Embora o número de estudos de complexos formados com ligantes biológicos seja significativo, há uma lacuna de conhecimento sobre a química de coordenação do  $Al^{3+}$  com aminoácidos e com ligantes fosfatados. Um extensivo levantamento de artigos sobre o tema em diversas bases de dados revelou pouquíssimos trabalhos.

Complexos do alumínio com ligantes fosfatados como o ácido adenosina 5'-monofosfórico (Atkari *et al.*, 1996), o ácido guanosina 5'-monofosfórico (Atkari *et al.*, 1996), o ácido adenosina 5'-difosfórico (Kiss, Sóvágó e Martin, 1991) e a fosfoserina (Kiss *et al.*, 1998 e Rubini *et al.*, 2002) foram estudados *in vitro*.

O ATP como ligante é comumente investigado por ser um depósito de energia importante. Pesquisas *in vitro* envolveram o cálcio(II) (Azab, Orabi e El-

Salam, 2001), o zinco(II) (Mohan e Aquikhan, 1979) e o lantânio(III) (Smith, Martell e Chen, 1991).

Alguns autores (Viola, Morrison e Cleland, 1980, Jackson e Voji, 1987, Kiss, Sóvágó e Martin, 1991, Dellavia *et al.*, 1994 e Wang *et al.*, 1997) analisaram o sistema alumínio:ATP, mas propostas estruturais para os complexos formados são escassas. Efeitos *in vitro* do complexo AlATP nas funções cerebrais (Exley, 1999 e Exley e Korchazhkina, 2001) foram particularmente analisados e a conexão com a etiologia do Alzheimer proposta (Exley e Korchazhkina, 2001).

Investigações de compostos formados entre a PCr e íons metálicos como o sódio(I) (Cecconi *et al.*, 2002), o potássio(I) (Cecconi *et al.*, 2002), o magnésio(II) (Cecconi *et al.*, 2002) e o cobre(II) (Szyfman *et al.*, 2011) foram realizadas. Contudo, artigos sobre o sistema alumínio:PCr não puderam ser encontrados dentro das bases de dados analisadas. O primeiro sobre o assunto foi publicado pela autora (Tenório *et al.*, 2014).

Os aminoácidos figuram como bons ligantes para o alumínio. Pesquisas a respeito da complexação com este íon foram feitas com a alanina (Djurdjevic e Jellic, 1989), o ácido aspártico (Kiss *et al.*, 1997 e Bohrer *et al.*, 2004), a asparagina (Kiss *et al.*, 1997), o ácido glutâmico (Kiss *et al.*, 1997 e Bohrer *et al.*, 2004), a glicina (Kiss *et al.*, 1997, Mercero *et al.*, 2000, Berthon, 2002 e Dayde *et al.*, 2002), a histidina (Kiss *et al.*, 1997 e Djurdjevic, Cvijovic e Zakrzewska, 2005), a lisina (Bohrer *et al.*, 2004), a serina (Kiss *et al.*, 1997 e Téllez, Silva e Felcman, 2004), a tirosina (Bohrer *et al.*, 2004 e Rezabal *et al.*, 2007) e a treonina (Kiss *et al.*, 1997), mas poucas apresentaram investigações estruturais profundas (Téllez, Silva e Felcman, 2004).

A complexação entre o alumínio e os aminoácidos sulfurados foi ainda menos estudada. As pesquisas encontradas traziam apenas o valor de constantes de estabilidade, sem um procedimento experimental detalhado ou propostas estruturais. O sistema alumínio(III):Cis foi estudado por titulação potenciométrica (Ramamoorthy e Manning, 1975). Enquanto a mobilidade eletroforética foi analisada para o alumínio(III):Met (Tewari, 1998) e alumínio(III):Pen (Tewari, Srivastava e Kamaluddin, 1996). Artigos sobre o sistema alumínio(III):Hcis não foram encontrados. Um estudo avaliou por meio de cálculos teóricos no vácuo a possibilidade da ligação entre o alumínio e o enxofre a partir de parâmetros

geométricos e distribuição eletrônica (Mercero *et al.*, 2001), mas nenhum complexo em particular foi examinado.

Complexos entre a Cis e íons como o bismuto(III) (Napoli, 1982), o céσιο(III) (Iftekhar e Dubey, 1984), o cromo(III) (Maslowska e Chruscinski, 1986), o lantânio(III) (Iftekhar e Dubey, 1984) e o ferro(III) (Sisley e Jordan, 1995) foram descritos. Também podem ser citadas investigações da Met com o cromo(III) (Maslowska e Chruscinski, 1986), o ferro(III) (Tewari, 1996) e o zinco(II) (Gao *et al.*, 1998) bem como da Pen com o cromo(III) (Hojo, Sigiura e Tanaka, 1977), o ferro(III) (Baiocchi *et al.*, 1983) e o zinco (Tewari, Singh e Yadava, 1991).

Grande parte das pesquisas sobre complexos binários formados entre o alumínio e aminoácidos ou ligantes fosfatados não discutem aspectos estruturais, mas confirmam a formação de complexos em solução aquosa.

Artigos sobre os complexos ternários em questão não puderam ser encontrados. Uma pesquisa com a técnica de titulação potenciométrica citou a formação de complexos entre o alumínio(III), o ATP e alguns ácidos carboxílicos (Kiss *et al.*, 1994). Artigos acerca de complexos entre o alumínio(III), a PCr e outros ligantes aparentaram ser inexistentes, dentro do conhecimento da autora. Dois artigos de complexos ternários entre o  $Al^{3+}$ , os aminoácidos e outros ligantes (Khan e Hussain, 1980, Tewari, Srivastava e Kamaluddin, 1995) estão disponíveis.

Esta tese foi iniciada em 2010, inserida no grupo de pesquisa de bioinorgânica, sob a orientação da Professora Judith Felcman<sup>†</sup> (Departamento de Química, PUC-Rio).

Entrementes, dentro do tema “Química do cérebro” foram produzidas dissertações (Alves, 2010, Oliveira, 2010 e Reis, 2010) e teses (Ondar, 2005, Pinto, 2010 e Szyfman, 2011).

A química de coordenação do íon alumínio e de ligantes biológicos foi explorada por Lopes (1996), Lopes (2001), Silva (2003), Pinheiro (2004) e Alves (2010).

---

<sup>†</sup> Falecida em 2012.

### 1.3 Objetivos

Verificar a formação de complexos e estudar o modo de coordenação dos aminoácidos e ligantes fosfatados nos complexos binários e ternários com o alumínio(III) em solução aquosa. Para isso foi indispensável:

- a) Fazer titulações potenciométricas dos ligantes: ATP, PCr, Met, Cis, Hcis e Pen;
- b) Fazer titulações potenciométricas dos sistemas ternários: Al:ATP:Met, Al:ATP:Cis, Al:ATP:Hcis, Al:ATP:Pen, Al:PCr:Met, Al:PCr:Cis, Al:PCr:Hcis e Al:PCr:Pen;
- c) Definir as constantes de formação dos complexos ternários e dos adutos moleculares;
- d) Construir as curvas de especiação dos sistemas ternários em função dos valores de pH;
- e) Realizar a atribuição vibracional (experimental e teórica) dos complexos  $[Al(ATP)(H_2O)_4]$ ,  $[Al(PCr)(H_2O)]$ ,  $[AlMetATP(H_2O)_3]^{1-}$ ,  $[AlMetPCr(H_2O)]^{1-}$ ,  $[AlCisATP(H_2O)_2]^{2-}$  e  $[AlCisPCr(H_2O)]^{2-}$ .
- f) Obter a geometria otimizada desses complexos por modelagem molecular;
- g) Conhecer a distribuição de cargas de Mulliken dos complexos;
- h) Examinar as linhas de contorno do potencial eletrostático dos complexos;
- i) Determinar a densidade eletrônica total mapeada com o potencial eletrostático em uma iso superfície dos complexos  $[Al(ATP)(H_2O)_4]$ ,  $[Al(PCr)(H_2O)]$ ,  $[AlMetATP(H_2O)_3]^{1-}$ ,  $[AlMetPCr(H_2O)]^{1-}$ ,  $[AlCisATP(H_2O)_2]^{2-}$  e  $[AlCisPCr(H_2O)]^{2-}$ .

Na tese, todos os complexos foram estudados em solução aquosa. Não houve sucesso na tentativa de síntese em estado sólido. Os seguintes sistemas foram investigados por potenciometria: Al:ATP:Met, Al:ATP:Cis, Al:ATP:Hcis, Al:ATP:Pen, Al:PCr:Met, Al:PCr:Cis, Al:PCr:Hcis e Al:PCr:Pen. Desses, quatro foram analisados por espectroscopia Raman e cálculos teóricos: Al:ATP:Met, Al:ATP:Cis, Al:PCr:Met e Al:PCr:Cis.

Os sistemas Al:ATP e Al:PCr também foram pesquisados, de modo a aprofundar investigações realizadas no passado (Alves, 2010). Artigos relativos a cada um desses complexos binários foram publicados durante o doutorado (Tenório *et al.*, 2013 e Tenório *et al.*, 2014). A primeira página de cada artigo pode ser vista no anexo 10.1.

#### 1.4 Organização da tese

O capítulo 2 é uma revisão de pesquisas importantes sobre o alumínio(III), os aminoácidos sulfurados, o ATP e a PCr. Alguns estudos mencionados brevemente na introdução foram discutidos detalhadamente neste capítulo. No capítulo 3, são apresentados os procedimentos experimentais, com informações sobre a potenciometria e a espectroscopia Raman. No capítulo 4, são introduzidos os programas computacionais empregados e feitas considerações sobre os cálculos teóricos realizados. Os capítulos 5, 6 e 7 trazem os dados experimentais e teóricos obtidos para os complexos em estudo. No capítulo 5, é discutida a atribuição vibracional dos complexos tetraaquadenosina5'-trifosfato alumínio(III) e aquafosfocreatina alumínio(III). No capítulo 6, são analisadas as curvas potenciométricas, as constantes de estabilidade e a especiação dos sistemas ternários. O capítulo 7 mostra o estudo vibracional dos complexos adenosina5'-trifosfatodiaquacisteína aluminato(III), aquacisteínafosfocreatina aluminato(III), adenosina5'-trifosfatotriaquametionina aluminato(III) e aquafosfocreatinametionina aluminato(III). O capítulo 8 discorre sobre as principais conclusões e perspectivas da tese.