

# Complexos de Iões Metálicos em Meios Biológicos: Relevância da sua Especificação

João Costa Pessoa  
Isabel Correia

## Metal Complexes in Biological Media:

**Relevance of Assessing their Speciation.** *When discussing interactions and biological effects of complexes of labile metal ions added to biological media, researchers often assume that the complexes maintain their integrity. Mainly using examples of complexes of copper(II) and vanadium(IV and V), we demonstrate that this is often incorrect. In fact, when these complexes of labile metal ions are added to biological media, they will undergo hydrolysis, exchange of ligands and/or redox reactions, and these reactions depend on the pH and concentration of the species present. As the concentration of complex decreases and/or the number and concentration of potential ligands increases, more extensive hydrolysis and/or exchange of ligands will occur. In this work, we highlight that when observing a biological effect upon the addition of a metal complex, any proposal for mechanisms of action or the identification of biologically active species must take into account the speciation of these metal ions in the systems under study.*

*Quando se estudam interações e efeitos biológicos de complexos de iões metálicos lábeis, os investigadores admitem frequentemente que os compostos mantêm a forma em que foram preparados. Usando exemplos de compostos de cobre(II) e de vanádio(IV e V), chama-se a atenção e demonstra-se que isso normalmente não acontece. Quando estes complexos, cujos iões são cineticamente lábeis, são adicionados a meios biológicos, irão ocorrer reações de hidrólise, troca de ligandos e/ou de oxidação-redução, que dependem do pH e da concentração das espécies presentes nesses meios. Quanto menor a concentração do complexo no meio em que é dissolvido, ou maior o número e/ou a concentração de potenciais ligandos, mais extensamente os processos de hidrólise e/ou troca de ligandos se dão. Conclui-se que propostas de mecanismos de ação ou de identificação de espécies biologicamente ativas têm de considerar a especificação desses metais nos sistemas em estudo.*

## Introdução

A natureza, nos processos de evolução, incorporou diversos iões de metais de transição nos organismos vivos para executar eficazmente um grande número de tarefas. Muitos possuem características adequadas para interatuar com moléculas presentes nos seres vivos, modulando ou modificando as suas propriedades e/ou função [1,2]. Exemplos relevantes neste contexto são os iões de Mo, Fe, Zn, Cu, Mn e V. A escolha do ião metálico na evolução dos seres vivos dependeu não só das suas propriedades intrínsecas, mas também da sua abundância na crosta terrestre e/ou ambiente marinho/aquático.

Os iões metálicos possuem nos organismos vivos um papel funcional e/ou estrutural, quer por si só, quer por interação com biomoléculas. Além do estudo do seu papel nos meios biológicos, os investigadores e a indústria farmacêutica têm recorrido a complexos de iões metálicos de transição como produtos úteis quer no diagnóstico, quer no tratamento de doenças. Alguns

exemplos relevantes são a cisplatina,  $cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ , no tratamento de diversos tipos de cancro [3], complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  e Gd como agentes de imagem, compostos de Ag para tratamento de diversos problemas de pele e complexos de Au para tratamento de artrites [4]. Complexos de radionuclídeos  $\beta$ -emissores de  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{90}\text{Y}$  e  $^{186/188}\text{Re}$  têm também sido usados em terapias radionucleares [5]. Estes são apenas alguns exemplos, pois muitos outros complexos são ou foram usados em clínica, e várias centenas foram ou estão em ensaios clínicos [6]. Milhares de outros têm sido sintetizados como potenciais produtos terapêuticos e testados em sistemas biológicos.

Sucedem num grande número de estudos em que se avaliam as interações dos complexos com moléculas biológicas, ou em que se procede a ensaios *in vitro* e em alguns casos também *in vivo*, os investigadores partem do princípio de que os complexos mantêm a forma

original em que foram obtidos, o que normalmente não acontece. Os complexos metálicos quando dissolvidos em meio aquoso normalmente sofrem hidrólise ou troca de ligandos parcial ou total, sendo esses processos instantâneos quando os íons são cineticamente lábeis. Exemplos deste tipo de sistemas lábeis são os complexos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{V}^{\text{IV}}$ ,  $\text{V}^{\text{V}}$ ,  $\text{Mn}^{\text{II}}$  e de  $\text{Zn}^{\text{II}}$ . Ao não se ter em conta esses processos, quaisquer propostas de mecanismos de ação ou de identificação de espécies biologicamente ativas não estarão corretas. Neste texto ir-se-á chamar a atenção para estas questões dando exemplos de complexos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  e de  $\text{V}^{\text{IV}}$  ou  $\text{V}^{\text{V}}$ .

O vanádio é um metal de transição que está presente em quantidades importantes nos solos, petróleos, água do mar e também em suspensão no ar, pelo que não é de surpreender que seja um elemento essencial para muitos seres vivos, embora nunca tenha sido confirmado como tal nos humanos. Os estados de oxidação mais relevantes nos sistemas biológicos são os  $\text{V}^{\text{III}}$ ,  $\text{V}^{\text{IV}}$  e  $\text{V}^{\text{V}}$ . O  $\text{V}^{\text{IV}}$  está normalmente na forma de  $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}^{2+}$  e o  $\text{V}^{\text{V}}$  na de  $\text{V}^{\text{V}}\text{O}^{3+}$  ou  $\text{V}^{\text{V}}\text{O}_2^+$ . Quando introduzido num meio biológico, cada um destes íons estará envolvido em reações de hidrólise e redox que dependem do pH, concentração e força iónica [7-9]. Por outro lado, os íons de vanádio podem ligar-se a uma grande variedade de compostos como proteínas, metabolitos, açúcares, etc. [10-12], e essas interações dependem do pH e da natureza e concentração de todas as espécies que se possam ligar ao V, como por exemplo:  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{H}_n\text{PO}_4^{-(3-n)}$ .

O cobre é um elemento essencial nos organismos vivos e tem um papel importante nos processos redox, de crescimento e desenvolvimento. É fundamental no funcionamento de muitas enzimas e proteínas envolvidas nos metabolismos de energia, respiração e síntese de DNA [13]. A presença de Cu, exercendo funções nas células, exige mecanismos de homeostase estritamente regulados para que estejam presentes apenas as quantidades necessárias de Cu sem que se produzam efeitos tóxicos. Por essa razão, os complexos de cobre têm sido escolhas preferenciais no desenvolvimento de compostos com

objetivos terapêuticos. A existência de mecanismos de regulação e de eliminação permite antecipar que em qualquer ensaio testando complexos de cobre, se este entra nas células, a forma em que irá estar no seu interior não será a mesma da que existia no complexo adicionado.

No domínio da Química Bioinorgânica ou Medicinal, normalmente a concentração dos íons metálicos é muito baixa, da ordem do micromolar ( $\mu\text{M}$ ), e deve ter-se especial atenção a pelo menos dois aspetos: (1) os estudos de caracterização dos complexos são feitos com soluções com concentrações da ordem do milimolar e com a diluição dão-se alterações significativas na composição da solução, e (2) quanto mais baixa a concentração do complexo, em maior grau se dão os processos de hidrólise e de troca de ligandos.

### Efeito da diluição na natureza das espécies presentes em solução

A simples diluição de uma solução de um complexo em água origina frequentemente alterações significativas na natureza das espécies presentes. Este efeito é especialmente pronunciado para os complexos de íons metálicos lábeis suscetíveis à hidrólise e/ou polinucleares. Um exemplo significativo é o dos decavanadatos ( $\text{V}_{10}$ ,  $\text{H}_n\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{-6+n}$ ), que são estáveis em solução aquosa no intervalo de pH 3,5-5,5 se a concentração total de V ( $[\text{V}]_T$ ) for superior a  $\sim 10$  mM. Para concentrações mais baixas formam-se outras espécies (Figura 1): pentavanadatos ( $\text{V}_5$ ), tetravanadatos ( $\text{V}_4$ ), divanadatos ( $\text{V}_2$ ) e monovanadatos ( $\text{V}_1$ ). Mesmo em concentrações elevadas, se o pH de uma solução de  $\text{V}_{10}$  subir de 4 para 7 ou 8, as espécies  $\text{V}_{10}$  deixam de ser termodinamicamente estáveis. Embora a cinética da sua decomposição seja lenta, esta inicia-se assim que o pH da solução aumenta. Se uma solução de decavanadatos for adicionada a um sistema biológico a pH = 7, ficando com  $[\text{V}]_T$  da ordem dos  $\mu\text{M}$ , na avaliação de qualquer efeito biológico deve ser cuidadosamente analisado se este se deve a um decavanadato, a uma espécie resultante da sua decomposição e/ou à formação de um complexo de uma dessas espécies com algum ligando presente [14]. No entanto,

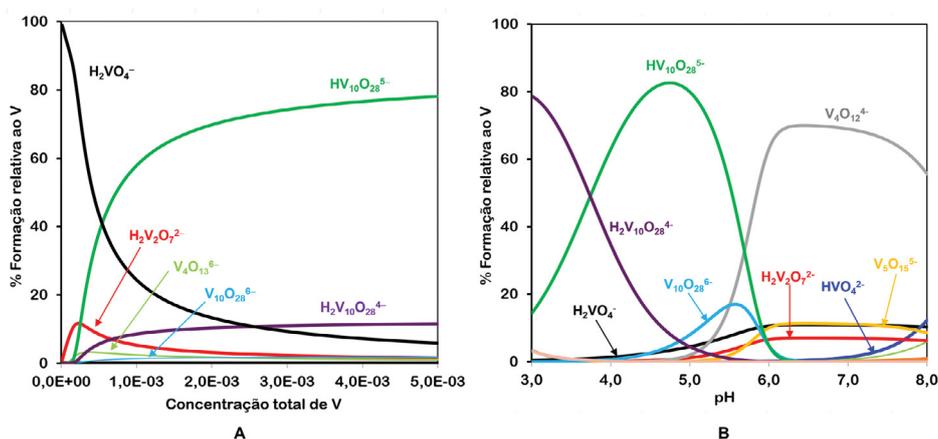


Figura 1 - Diagrama de distribuição em solução aquosa de espécies de  $\text{V}^{\text{V}}$ . (A) a pH = 5 variando a  $[\text{V}]_T$ ; (B) para  $[\text{V}]_T = 0,05$  M variando o pH. Usaram-se as constantes de formação de [7,8,15] e o programa HySS [16].

esta avaliação frequentemente não é feita (e deveria ser).

Outro exemplo são os complexos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  com 1,10-fenantrolina (phen) ou seus derivados (dphen). A fenantrolina forma complexos com o  $\text{Cu}^{\text{II}}$  com constantes de formação elevadas, tendo sido preparadas dezenas de compostos do tipo  $(\text{An})_n\text{Cu}(\text{dphen})_2$  sendo An um anião. Este tipo de complexos foi proposto para o tratamento de diversos tipos de cancro e alguns têm estado em ensaios clínicos [17].

No entanto, a simples dissolução e subsequente diluição de um composto deste tipo em água provoca hidrólise parcial do complexo adicionado. Por exemplo, admitindo que a concentração total de complexo de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  que se dissolveu é de  $10 \mu\text{M}$ , a percentagem de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  na forma de  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ ,  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$  e de  $\text{Cu}(\text{phen})_3^{2+}$  a pH 7 é de 78, 20 e 2%, respetivamente. Em ensaios *in vitro* com células cancerígenas, os valores de  $\text{IC}_{50}$  com complexos  $(\text{NO}_3)_2\text{Cu}(\text{dphen})_2$  são da ordem de  $1\text{--}20 \mu\text{M}$  [18]. Não considerando a presença de outros ligandos, para o caso de  $(\text{NO}_3)_2\text{Cu}(\text{phen})_2$  (Figura 2) com concentração  $2 \mu\text{M}$  ter-se-ia ~39 e ~60% de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  nas formas  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$  e  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ , respetivamente.

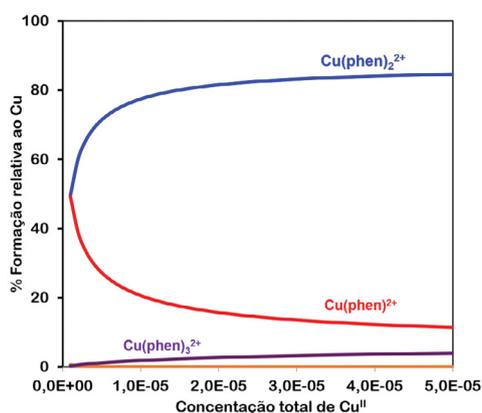
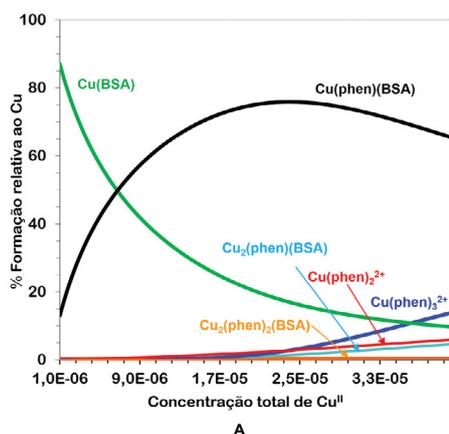
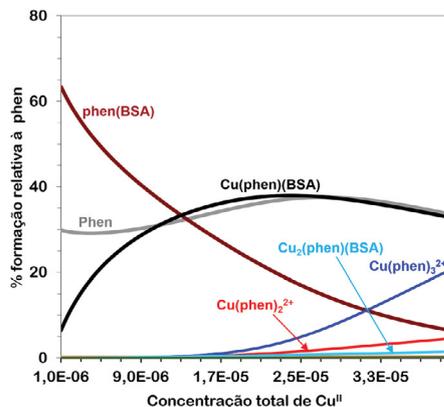


Figura 2 - Diagrama de distribuição em solução aquosa de espécies de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  após dissolução de  $(\text{An})_n\text{Cu}(\text{phen})_n$  em água a pH = 7. Representa-se a percentagem de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  na forma de  $\text{Cu}(\text{phen})_n^{2+}$  ( $n=1\text{--}3$ ; as espécies  $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_m$  têm concentração muito baixa) na gama de concentração total de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  entre  $1\text{--}50 \mu\text{M}$ . Para o cálculo usaram-se as constantes de formação de [19] e o programa HySS [16].



A



B

Figura 3 - Diagramas de distribuição de espécies para o sistema  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-BSA-phen}$  a pH = 7,4, considerando a formação de  $\text{Cu}(\text{phen})_n$  ( $n = 1\text{--}3$ ) e de espécies  $\text{Cu-BSA-phen}$ , em função da concentração total de  $[\text{Cu}(\text{phen})_n]^{2+}$  adicionada, na gama  $1\text{--}40 \mu\text{M}$  [18], e tomando  $[\text{BSA}]_T = 40 \mu\text{M}$ . A: representação das espécies que contêm  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ; B: representação das espécies que contêm phen. Para os cálculos usou-se o programa HySS [16] e as constantes de formação de [18].

### Efeito da presença de agentes complexantes na natureza das espécies presentes em solução

Na grande maioria dos artigos com dados de citotoxicidade de complexos de iões metálicos lábeis, normalmente os compostos são preparados e caracterizados no estado sólido e também em solução por técnicas variadas em que os complexos estão dissolvidos em concentrações da ordem do mM em solventes contendo uma proporção apreciável de componentes orgânicos (por exemplo, metanol e DMSO). Por outro lado, os complexos são adicionados aos meios de incubação das células em concentrações na gama  $0,1\text{--}100 \mu\text{M}$  e usados tempos de incubação entre 3 e 72 h. Na grande maioria dos estudos não se têm em conta as mudanças que podem ocorrer na esfera de coordenação do complexo, quer pela elevada diluição após adição ao meio de incubação, quer pela presença de inúmeros agentes complexantes existentes nesse meio. Normalmente, também não se têm em conta mudanças no estado de oxidação do ião metálico nos casos em que isso pode ser relevante. No entanto, para ser possível determinar qual a 'espécie ativa' e/ou estabelecer um mecanismo de ação biológica, no mínimo têm de ser identificadas as espécies relevantes presentes no meio de incubação.

Foram publicados estudos chamando a atenção para essas questões [20], nomeadamente para complexos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  e de  $\text{V}^{\text{IV}}$  com fenantrolina e derivados [18,21,22]. No caso dos complexos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  e de  $\text{V}^{\text{IV}}$ , e para os meios tipicamente usados em testes de citotoxicidade com células de mamíferos (por ex., RPMI e DMEM), verificou-se que o agente complexante mais relevante é a albumina bovina (BSA), que é adicionada através do soro fetal bovino (FBS). Nos cálculos de especiação verificou-se que os ligandos presentes em maior concentração (aminoácidos, iões inorgânicos, etc.), não deslocam significativamente a phen da sua ligação ao  $\text{Cu}^{\text{II}}$  ou  $\text{V}^{\text{IV}}$ . No caso dos ligandos com constantes de ligação elevadas ao  $\text{Cu}^{\text{II}}$  e/ou envolvidos em reações redox, como é o caso da

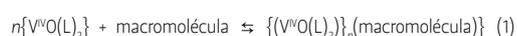
cisteína e da glutatona, estes estão em concentrações muito baixas nos meios de incubação.

Na Figura 3 representam-se diagramas de distribuição para o sistema Cu<sup>II</sup>-BSA-phen a pH 7,4, em que se modela o resultado da adição de complexos (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>[Cu(phen)<sub>2</sub>] a um meio de incubação de células típico, em que a concentração de BSA total presente ([BSA]<sub>T</sub>) é de 40 μM [18], que corresponde a ter-se adicionado 10% de FBS ao meio de incubação. Nos diagramas verifica-se que a maior parte do Cu<sup>II</sup> não está na forma de complexos [Cu(phen)<sub>n</sub>]<sup>2+</sup>, mas sim ligado à BSA, e uma parte significativa do ligando, que é bioativo, não está ligado ao Cu<sup>II</sup>. Estes factos são certamente relevantes nos mecanismos de captação celular das várias espécies presentes em solução, colocando-se também a questão de qual a espécie a que se poderá atribuir o efeito biológico.

### Estudos de interação de complexos com proteínas

Em estudos de interação de complexos com proteínas, ou em que o efeito do complexo na reação de uma enzima é testado, normalmente não é tido em conta que haverá uma troca parcial ou total de ligandos, quer quando o complexo preparado é adicionado ao meio a testar, quer quando a solução onde está dissolvido é diluída.

Um caso típico frequente é quando se avalia a interação de complexos com a BSA ou HSA (albumina do soro humano) por medidas de supressão de fluorescência. Estas são feitas com concentrações das proteínas de ~1 μM adicionando o complexo previamente dissolvido de forma a ter concentrações deste na gama 0,2-15 μM. Observando-se uma supressão de fluorescência, os tratamentos de dados efetuados podem ser mais ou menos complexos, mas normalmente assumem que a integridade do composto adicionado se manteve. Por exemplo, considerando a adição de um complexo de V<sup>IV</sup> do tipo [V<sup>IV</sup>O(L)<sub>2</sub>], a sua reação com uma biomolécula é normalmente escrita como:



A constante de associação pode ser traduzida como:

$$K^{BC} = \frac{[(V^{IV}O(L)_2)_n(\text{macromolécula})]}{[V^{IV}O(L)_2]^n [\text{macromolécula}]} \quad (2)$$

Quando moléculas se ligam de forma independente a um conjunto de locais equivalentes de uma macromolécula, o valor de K<sup>BC</sup> pode ser obtido pela eq. 3 [23]:

$$\log\left[\frac{(I_0 - I)}{I}\right] = \log K^{BC} + n \log [Q] \quad (3)$$

I<sub>0</sub> e I são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do agente supressor, [Q] é a concentração do agente de supressão livre e n o n.º de locais de ligação na macromolécula. Com esta metodologia, se se obtiver uma relação linear de

log[(I<sub>0</sub> - I)/I] vs. log[Q], podem ser determinados os valores de K<sup>BC</sup> e n. Além de outras aproximações, este tratamento pressupõe que a natureza do agente de supressão, neste caso V<sup>IV</sup>O(L)<sub>2</sub>, se mantém, o que não é verdade na maioria dos casos.

Ir-se-á exemplificar com o caso da ligação de V<sup>IV</sup>O(acac)<sub>2</sub> (Hacac = acetilacetona) à apotransferrina (apoHTF), que foi descrito em [24,25]. Foram medidos os espectros de fluorescência com [apoHTF] = 1,02 μM adicionando progressivamente uma solução de V<sup>IV</sup>O(acac)<sub>2</sub> de forma a obter soluções com [V]<sub>T</sub>:[apoHTF] entre 1 e 18 a pH = 7,4. Admitindo que a supressão de fluorescência observada é devida à ligação de V<sup>IV</sup>O(acac)<sub>2</sub> (molécula não emissiva) à apoHTF, portanto que se está numa situação de supressão estática, usando a eq. 3 obteve-se K<sup>BC</sup> = 1,0 × 10<sup>4</sup> e n = 1,15.

Estes procedimentos são muito simples, pelo que têm sido muito usados. No entanto, mesmo não considerando as aproximações feitas, na sua maioria estão errados. Na verdade, em soluções aquosas contendo acetilacetona e V<sup>IV</sup>O<sup>2+</sup>, à medida que o pH aumenta de 2 até ~8, as espécies que predominam são: V<sup>IV</sup>O(H<sub>2</sub>O)<sub>5</sub><sup>2+</sup> → V<sup>IV</sup>O(acac)<sup>+</sup> → V<sup>IV</sup>O(acac)<sub>2</sub>. Tomando as constantes de formação de [26] e as de hidrólise do V de [27], obtém-se o diagrama de especiação da Figura 4. Pode verificar-se que a espécie inicialmente adicionada às soluções em que se medem os espectros de fluorescência, V<sup>IV</sup>O(acac)<sub>2</sub>, se decompõe quase totalmente, pelo que a utilização de eqs. do tipo de (3) dará resultados errados. No entanto, apesar de errado, este tipo de procedimentos continua a ser usado frequentemente na literatura.

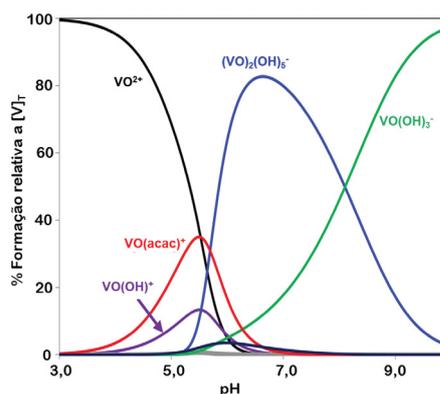
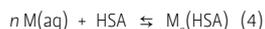


Figura 4 - Diagrama de distribuição de espécies, calculado com o programa HySS [16] para [V]<sub>T</sub> = 2 μM e [acac] = 4 μM, considerando as constantes de formação de VO(acac)<sub>2</sub> de [26] e as constantes de hidrólise do VO<sup>2+</sup> de [27].

### Transporte no sangue

Se um composto terapêutico for administrado por via oral ou intravenosa, será transportado para os tecidos pela corrente sanguínea. O sangue é um sistema

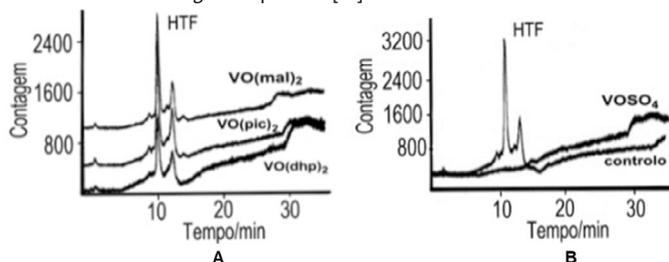
biológico muito complexo e mesmo considerando apenas o plasma, este contém um grande número de agentes complexantes de íons metálicos. No caso do  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , os mais relevantes nos humanos são a ceruloplasmina e a albumina. Considerando a HSA, esta está presente com concentração de  $\sim 630 \mu\text{M}$ , formando-se complexos  $\text{Cu}_n(\text{HSA})$  [28]:



As constantes de formação dos complexos 1:1 e 2:1 são  $\log\{\beta_{\text{Cu}(\text{HSA})}\} \approx 12,5$  e  $\log\{\beta_{\text{Cu}_2(\text{HSA})}\} \approx 21,5$  a  $\text{pH} = 7,4$  [18,28]. Sendo estes valores elevados, se um complexo  $\text{Cu}(\text{L})_m$  for adicionado, o ligando L tem de competir com a HSA na ligação ao íon  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . A especiação do  $\text{Cu}^{\text{II}}$  no plasma irá depender não só das constantes de formação de todos os complexos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  que se podem formar, mas também das concentrações das espécies participantes ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ , L, ceruloplasmina, HSA, etc.). Portanto, ao interpretar a ação terapêutica resultante da administração de  $\text{Cu}(\text{L})_m$ , não se pode partir simplesmente da ideia de que esta se deve ao composto  $\text{Cu}(\text{L})_m$  adicionado.

No caso de compostos de vanádio introduzidos na corrente sanguínea, a situação tem uma complicação adicional que é o vanádio poder ter vários estados de oxidação relevantes:  $\text{V}^{\text{III}}$ ,  $\text{V}^{\text{IV}}$  e  $\text{V}^{\text{V}}$  [10,29]. Complicando ainda mais a avaliação do sistema do mecanismo de ação, sabe-se que, além de serem transportados no plasma, os compostos de vanádio podem entrar nos glóbulos vermelhos [30-32]. No plasma sanguíneo, o vanádio pode ligar-se a várias proteínas (albumina, transferrina, imunoglobulinas), bem como ao citrato, lactato e outros componentes [31,33]. Verificou-se que para este íon o agente complexante mais relevante é a transferrina [27,34-36]. Na verdade, num trabalho em que foram adicionados vários complexos distintos a plasma sanguíneo, determinou-se por HPLC-ICP-MS (cromatografia líquida – espectrometria de massa de plasma acoplado indutivamente) que quase todo o vanádio ficou ligado à fração contendo transferrina (Figura 5) [37].

Figura 5 - Cromatogramas HPLC-ICP-MS obtidos após incubação; A: de plasma sanguíneo com soluções de  $\text{V}^{\text{VO}}(\text{mal})_2$ ,  $\text{V}^{\text{VO}}(\text{pic})_2$ ,  $\text{V}^{\text{VO}}(\text{dhp})_2$ , (Hmal = maltol, Hpic = ácido picolínico, Hdhp = 1,2-dimetil-3-hidroxi-4(1H)-piridinona); B: de uma solução de apoHTF com  $\text{V}^{\text{VO}}\text{OSO}_4$ . As bandas observadas a cerca de 10 e 12 min. correspondem a bandas da HTF. Figura adaptada de [37].



### Captação celular e interação com biomoléculas

Mesmo admitindo que no meio em contacto com células, seja um meio de incubação ou um vaso sanguíneo em contacto com os tecidos celulares, os complexos mantêm a sua integridade, põe-se a questão de como se dá a sua captação pelas células, e no seu interior com que biomoléculas se darão as interações mais favoráveis.

No caso da incubação de células cancerígenas do ovário (A2780) com os complexos  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ ,  $\text{VO}(\text{phen})_2^{2+}$  ou  $\text{VO}(\text{acac})_2$ , apesar de, como se referiu atrás, quase não existirem nos meios de incubação as espécies  $\text{Cu}(\text{phen})_n^{2+}$  [18],  $\text{VO}(\text{phen})_n^{2+}$  [22], ou  $\text{VO}(\text{acac})_n$  [24], o total de Cu e de V determinado por ICP-MS no interior das células é significativamente maior do que quando a incubação é feita com  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  [18] ou  $\text{VOSO}_4$  [22]. Um outro aspeto é que, quer o vanádio, quer o cobre, não se distribuem uniformemente nas várias frações celulares analisadas: membranas, citoesqueleto, núcleo e citosol. Por exemplo, na incubação de células A2780 com  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ , cerca de 50% do Cu concentrou-se no citoesqueleto [18], enquanto que com  $\text{VO}(\text{phen})_2^{2+}$  mais de 60% ficou associado ao sistema membranar (este inclui a mitocôndria) [24]. Além disso, foi também observado que o tipo de ligando presente no complexo original tem influência na distribuição do metal pelas várias frações celulares [24,38]. Ou seja, a presença do ligando no meio de incubação teve influência na captação do Cu e do V. As razões pelas quais isto acontece não são conhecidas. Nos casos de incubação com  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$  ou  $\text{VO}(\text{phen})_2^{2+}$ , nas condições que correspondem aos  $\text{IC}_{50}$ , as diferenças mais significativas nas especiações são a presença de  $\text{Cu}(\text{phen})(\text{BSA})$  e  $\text{VO}(\text{phen})(\text{BSA})$ , respetivamente. Pode suceder que estas espécies sejam mais eficazmente absorvidas pelas células do que  $[\text{Cu}_n(\text{BSA})]$  ou  $[(\text{VO})_n(\text{BSA})]$  (as predominantes na ausência de phen no meio), mas isso nunca foi demonstrado.

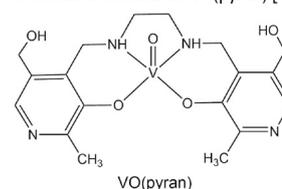
Considerando o cobre, há vários aspetos que devem ser comentados. Por exemplo, foram propostos mecanismos de ação na morte celular por compostos  $\text{Cu}(\text{dphen})_2^{2+}$  em que o DNA é quebrado por esses complexos. No entanto, a maior parte dos estudos foram feitos em soluções com os complexos em contacto direto com DNA e nos ensaios com células é pouco provável que os complexos  $\text{Cu}(\text{dphen})_2^{2+}$  atinjam os núcleos [39]. Na verdade, boa parte dos complexos de Cu de relevância terapêutica, incluindo os anticancerígenos, são desenhados para dar origem a ROS (espécies reativas de oxigénio) dentro das células que irão quebrar ligações nas moléculas biológicas. Para isso, além de terem potencial redox adequado, terão de resistir à sua decomposição. Ora o Cu estará presente

principalmente como  $\text{Cu}^I$ , sendo que no citosol abundam metalotioninas (MTs) e glutationa (GSH), as quais têm uma grande afinidade pelo  $\text{Cu}^I$ . Foi demonstrado que de uma forma geral os complexos não são estáveis na presença MTs e GSH [40], o que não só coloca problemas na identificação da espécie ativa na ação biológica, bem como constitui um desafio adicional no *design* de moléculas adequadas à sua utilização em terapêutica.

Considerando o vanádio, embora não sejam conhecidos no interior das células de mamíferos ligandos que o possam sequestrar, os seus complexos têm grande tendência para se hidrolisarem quando presentes em concentrações baixas, da ordem do  $\mu\text{M}$ , como sucede no interior das células. Isso foi demonstrado, por exemplo, com o complexo  $\text{V}^{\text{VO}}(\text{pyran})$  (Figura 6) o qual tem uma constante de formação muito elevada ( $\log \beta \approx 33$ ) [41]. Além disso, foi demonstrado com diversas proteínas, que mesmo quando os complexos estão presentes em concentração muito elevada ( $\sim 10 \text{ mM}$ ), na ligação à proteína estes sofrem hidrólise parcial ou total. Por exemplo, na incubação de proteínas com  $\text{VO}(\text{pic})_2$  obteve-se a ligação do complexo intacto à lisozima [42] e à tripsina [12], enquanto que com o  $\text{VO}(\text{bipy})_2^{2+}$  obtiveram-se apenas adutos com a tripsina e a

lisozima contendo  $\text{V}^{\text{VO}}(\text{bipy})_2^{2+}$  e com  $\text{V}^{\text{VO}}(\text{phen})_2^{2+}$  obteve-se um aduto contendo  $\text{V}^{\text{VO}}_2(\text{phen})(\text{Im})$  (Figura 7) (o imidazole veio do meio de incubação) [12]. Na incubação de lisozima com  $\text{V}^{\text{VO}}\text{OSO}_4$  obteve-se uma estrutura com três locais de ligação do  $\text{V}^{\text{VO}}_2^{2+}$  à proteína (Figura 7).

Figura 6 - Representação da estrutura molecular do  $\text{VO}(\text{pyran})$  [41].



### Conclusões

Em muitos trabalhos publicados em que se estudam as interações e efeitos biológicos ou catalíticos de complexos de iões metálicos lábeis, os investigadores admitem que os compostos mantêm a forma em que foram adicionados aos meios em estudo. Neste texto, dando exemplos de compostos de vanádio e de cobre, chama-se a atenção e demonstra-se que isso normalmente não acontece e que quanto menor for a concentração do complexo no meio em que é dissolvido ou maior o número e/ou a concentração

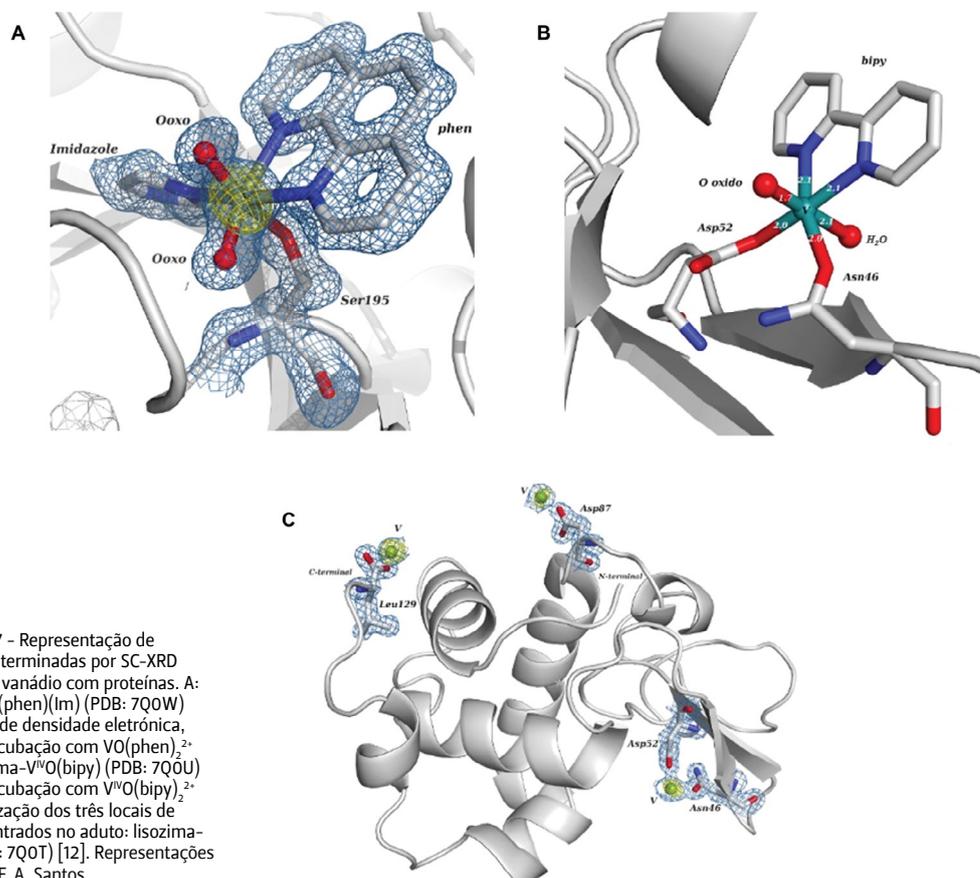


Figura 7 - Representação de estruturas determinadas por SC-XRD de adutos de vanádio com proteínas. A: tripsina- $\text{V}^{\text{VO}}_2(\text{phen})(\text{Im})$  (PDB: 7Q0W) e dos mapas de densidade eletrónica, obtido por incubação com  $\text{VO}(\text{phen})_2^{2+}$  [12]; B: lisozima- $\text{V}^{\text{VO}}(\text{bipy})$  (PDB: 7Q0U) obtido por incubação com  $\text{V}^{\text{VO}}(\text{bipy})_2^{2+}$  [12]; C: localização dos três locais de ligação encontrados no aduto: lisozima- $\text{V}^{\text{VO}}\text{OSO}_4$  (PDB: 7Q0T) [12]. Representações feitas por M. F. A. Santos.

de potenciais ligandos, mais extensamente correm os processos de hidrólise e/ou troca de ligandos. Por essa razão, propostas de mecanismos de ação ou de identificação das espécies catalítica ou biologicamente ativas têm de incluir, ou de alguma forma adequada ter em conta, a especiação desses metais nos sistemas em estudo.

## Referências

- [1] R. J. P. Williams, J. J. R. Fraústo da Silva, "The Natural Selection of the Chemical Elements - The Environment and Life's Chemistry", Oxford University Press, Oxford, **1996**.
- [2] R. J. P. Williams, J. J. R. Fraústo da Silva, "The Chemistry of Evolution - The Development of our Ecosystem", Elsevier, Amsterdam, **2006**.
- [3] L. Rosenberg, L. VanCamp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature* **1969**, 222, 385-386. DOI: 10.1038/222385a0.
- [4] K. D. Mjos, C. Orvig, *Chem. Rev.* **2014**, 114, 4540-4563. DOI: 10.1021/cr400460s.
- [5] C. F. Ramogida, C. Orvig, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 4720-4739. DOI: 10.1039/C3CC41554F.
- [6] D. C. Crans, K. Kostenkova, *Commun. Chem.* **2020**, 3, 104. DOI: 10.1038/s42004-020-00341-w.
- [7] L. Pettersson, I. Andersson, A. Gorzszas, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, 237, 77-87. DOI: 10.1016/S0010-8545(02)00223-0.
- [8] K. Elvingsson, A. Gonzalez Baro, L. Pettersson, *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 3388-3393. DOI: 10.1021/ic951195s.
- [9] L. F. Vilas Boas, J. C. Pessoa, "Vanadium", in G. Wilkinson, R. D. Gillard, J. A. McCleverty (Eds.), "Comprehensive Coordination Chemistry", Vol. 3, Pergamon, Oxford, **1987**, 453-583.
- [10] D. C. Crans, J. J. Smee, E. Gaidamauskas, L. Yang, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 849-902. DOI: 10.1021/cr020607t.
- [11] J. C. Pessoa, E. Garribba, M. F. A. Santos, T. Santos-Silva, *Coord. Chem. Rev.* **2015**, 301, 49-86. DOI: 10.1016/j.ccr.2015.03.016.
- [12] M. F. A. Santos, G. Sciortino, I. Correia, A. C. P. Fernandes, T. Santos-Silva, F. Pisanu, E. Garribba, J. C. Pessoa, *Chem. Eur. J.* **2022**, 28, e202200105. DOI: 10.1002/chem.202200105.
- [13] F. Tisato, C. Marzano, M. Porchia, M. Pellei, C. Santini, *Med. Res. Rev.* **2010**, 30, 708-749. DOI: 10.1002/med.20174.
- [14] M. Aureliano, N. I. Gumerova, G. Sciortino, E. Garribba, C. C. McLauchlan, A. Rempel, D. C. Crans, *Coord. Chem. Rev.* **2022**, 454, 214344. DOI: 10.1016/j.ccr.2021.214344.
- [15] A. Selling, I. Andersson, L. Pettersson, C. M. Schramm, S. L. Downey, J. H. Grate, *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 3141-3150. DOI: 10.1021/ic00092a021.
- [16] L. Alderighi, P. Gans, A. Lenco, D. Peters, A. Sabatini, A. Vacca, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 184, 311-318. DOI: 10.1016/S0010-8545(98)00260-4.
- [17] R. Galindo-Murillo, J. C. Garcia-Ramos, L. Ruiz-Azuara, T. E. Cheatham, F. Cortes-Guzman, *Nucleic Acids Res.* **2015**, 43, 5364-5376. DOI: 10.1093/nar/gkv467.
- [18] P. Nunes, I. Correia, F. Marques, A. P. Matos, M. M. C. Santos, C. G. Azevedo, J. L. Capelo, H. M. Santos, S. Gama, T. Pinheiro, I. Cavaco, J. C. Pessoa, *Inorg. Chem.* **2020**, 59, 9116-9134. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.0c00925.
- [19] C. V. Banks, R. I. Bystroff, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 6153-6158. DOI: 10.1021/ja01532a013.
- [20] A. Levina, D. C. Crans, P. A. Lay, *Coord. Chem. Rev.* **2017**, 352, 473-498. DOI: 10.1016/j.ccr.2017.01.002.
- [21] M. Le, O. Rathje, A. Levina, P. A. Lay, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2017**, 22, 663-672. DOI: 10.1007/s00775-017-1453-4.
- [22] P. Nunes, I. Correia, I. Cavaco, F. Marques, T. Pinheiro, F. Avecilla, J. C. Pessoa, *J. Inorg. Biochem.* **2021**, 217, 111350. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2020.111350.
- [23] P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 1305-1323. DOI: 10.1039/C0CS00062K.

&gt;

### Isabel Correia

Centro de Química Estrutural, Institute of Molecular Sciences.

Departamento de Engenharia Química, Instituto Superior Técnico.

É professora auxiliar do Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa.

Desenvolve o trabalho de investigação no Centro de Química Estrutural (CQE) em Química Bioinorgânica.

icorreia@tecnico.ulisboa.pt

ORCID.org/0000-0001-7096-4284

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Fraústo da Silva pelo envolvimento na criação do Centro de Química Estrutural e da sua componente forte em Química Bioinorgânica. Agradecem o suporte financeiro à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (projetos: UIDB/00100/2020, UIDP/00100/2020, LA/P/0056/2020).

- [24] I. Correia, I. Chorna, I. Cavaco, S. Roy, M. L. Kuznetsov, N. Ribeiro, G. Justino, F. Marques, T. Santos-Silva, M. F. A. Santos, M. S. E. Hugo, J. L. Capelo, J. Douth, J. C. Pessoa, *Chem. Asian J.* **2017**, 12, 2062-2084. DOI: 10.1002/asia.201700469.
- [25] J. C. Pessoa, I. Correia, *Inorganics* **2021**, 9, 17. DOI: 10.3390/inorganics9020017.
- [26] D. C. Crans, A. R. Khan, M. Mahroof-Tahir, S. Mondal, S. M. Miller, A. la Cour, O. P. Anderson, T. Jakusch, T. Kiss, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, 3337-3345. DOI: 10.1039/B101718G.
- [27] J. C. Pessoa, *J. Inorg. Biochem.* **2015**, 147, 4-24. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2015.03.004.
- [28] W. Bal, J. Christodoulou, P. J. Sadler, A. Tucker, *J. Inorg. Biochem.* **1998**, 70, 33-39. DOI: 10.1016/S0162-0134(98)00010-5.
- [29] N. D. Chasteen, J. K. Grady, C. E. Holloway, *Inorg. Chem.* **1986**, 25, 2754-2760. DOI: 10.1021/ic00236a021.
- [30] T. C. Delgado, A. I. Tomaz, I. Correia, J. C. Pessoa, J. G. Jones, C. F. G. C. Geraldes, M. M. C. A. Castro, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99, 2328-2339. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2005.08.014.
- [31] D. Sanna, M. Serra, G. Micera, E. Garribba, *Inorg. Chem.* **2014**, 53, 1449-1464. DOI: 10.1021/ic402366x.
- [32] D. Sanna, J. Palomba, G. Lubinu, P. Buglyó, S. Nagy, F. Perdihi, E. Garribba, *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 654-664. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01330.
- [33] J. C. Pessoa, I. Tomaz, *Curr. Med. Chem.* **2010**, 17, 3701-3738. DOI: 10.2174/092986710793213742.
- [34] J. C. Pessoa, S. Etchevery, D. Gambino, *Coord. Chem. Rev.* **2015**, 301, 24-48. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.12.002.
- [35] J. C. Pessoa, G. Goncalves, S. Roy, I. Correia, S. Mehtab, M. F. A. Santos, T. Santos-Silva, *Inorg. Chim. Acta* **2014**, 420, 60-68. DOI: 10.1016/j.ica.2013.11.025.
- [36] S. Mehtab, G. Goncalves, S. Roy, I. Tomaz, T. Santos-Silva, M. F. A. Santos, M. J. Romão, T. Jakusch, T. Kiss, J. C. Pessoa, *J. Inorg. Biochem.* **2013**, 121, 187-195. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2012.12.020.
- [37] T. Jakusch, D. Hollender, É. A. Enyed, C. S. Gonzalez, M. Montes-Bayon, A. Sanz-Medel, J. C. Pessoa, I. Tomaz, T. Kiss, *Dalton Trans.* **2009**, 2428-2437. DOI: 10.1039/B817748A.
- [38] G. Scalse, I. Correia, J. Benitez, S. Rostan, F. Marques, F. Mendes, A. P. Matos, J. C. Pessoa, D. Gambino, *J. Inorg. Biochem.* **2017**, 166, 162-172. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2008.11.004.
- [39] N. Z. Fantoni, Z. Molyph, C. Slator, G. Menounou, G. Toniolo, G. Mitrikas, V. McKee, C. Chatgililoglu, A. Kellett, *Chem. Eur. J.* **2019**, 25, 221-237. DOI: 10.1002/chem.201804084.
- [40] A. Santoro, J. S. Calvo, M. D. Peris-Díaz, A. Krezel, G. Meloni, P. Faller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59, 7830-7835. DOI: 10.1002/anie.201916316.
- [41] I. Correia, J. C. Pessoa, M. T. Duarte, R. T. Henriques, M. F. M. Piedade, L. F. Veiros, T. Jakusch, T. Kiss, A. Dörnyei, M. M. C. A. Castro, C. F. G. C. Geraldes, F. Avecilla, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 2301-2317. DOI: 10.1002/chem.200305317.
- [42] M. F. A. Santos, I. Correia, A. R. Oliveira, E. Garribba, J. C. Pessoa, T. Santos-Silva, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, 3293-3297. DOI: 10.1002/ejic.201402408.

&gt;

### João Costa Pessoa

Centro de Química Estrutural, Institute of Molecular Sciences.

Departamento de Engenharia Química, Instituto Superior Técnico.

É professor catedrático aposentado do Instituto Superior Técnico, Uni-

versidade de Lisboa. Desenvolveu o trabalho de investigação no Centro de Química Estrutural (CQE) em Catálise e Química Bioinorgânica. Foi Coordenador do CQE de 2009 a 2014.

joao.pessoa@ist.utl.pt

ORCID.org/0000-0002-3978-9964