

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DA INTERAÇÃO COM BSA E HSA DE NOVOS COMPLEXOS DE Cu(II) CONTENDO LIGANTE BASE DE SCHIFF

Alecia Ferreira da Silva¹; Adriana Castro Pinheiro²

¹Universidade Federal de Pelotas – alecia.spo@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – adrianacastropinheiro@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o número de casos de câncer aumentou de forma expressiva em todo o mundo. Embora novas terapias tenham surgido, a quimioterapia continua sendo um dos principais tratamentos, mas ainda enfrenta barreiras importantes, como a quimiorresistência e efeitos colaterais severos. Nesse contexto, cresce a busca por estratégias capazes de potencializar a eficácia, reduzir a toxicidade e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Entre essas estratégias, destaca-se o uso da albumina sérica, proteína mais abundante no plasma e responsável pelo transporte de inúmeras biomoléculas. A albumina pode prolongar a meia-vida circulatória, melhorar o perfil farmacocinético e direcionar agentes anticâncer aos tumores por meio do efeito de permeabilidade e retenção. Essa abordagem já se mostrou eficaz em aplicações clínicas, como no Abraxane®, uma formulação de paclitaxel ligada à albumina sérica humana (HSA) para o tratamento de tumores avançados (Cho, *et. al.* 2022). No entanto, a força de ligação entre fármaco e proteína precisa ser equilibrada para garantir estabilidade sem comprometer a fração livre ativa, tornando essencial compreender a interação entre proteínas séricas e moléculas bioativas (Tripathi, *et. al.* 2024).

Na química medicinal, a química de coordenação vem se destacando no desenvolvimento de metalofármacos, cuja atividade pode ser modulada pela escolha do metal e do ligante. O cobre vem ganhando destaque por ser o terceiro metal de transição mais abundante no corpo humano, participando de diversos processos vitais no organismo. Além disso estudos mostram que tecidos tumorais apresentam níveis mais elevados de cobre do que tecidos saudáveis, e que compostos à base desse metal podem inibir o crescimento tumoral, inclusive por meio da cuproptose, um mecanismo de morte celular programada mediado pelo cobre (Huang, *et. al.* 2024). Entre os ligantes utilizados, as bases de Schiff, obtidas pela condensação entre aminas primárias e aldeídos ou cetonas, destacam-se pela versatilidade estrutural e pela capacidade de formar complexos estáveis (Pinheiro, *et. al.* 2023)

Neste trabalho, propõe-se a variação do coligante e do contra-íon em complexos de cobre(II) contendo base de Schiff, tomando como referência o complexo **1a**, previamente publicado pelo grupo (Pinheiro, *et. al.* 2023). Esse composto apresentou citotoxicidade relevante contra as linhagens celulares SW620 (carcinoma colorretal) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama), com valores de IC₅₀ de 4,1 ± 0,3 µM e 5,3 ± 0,7 µM, respectivamente, mas não teve sua interação com albumina investigada. Assim, os novos complexos foram sintetizados, caracterizados e avaliados quanto à interação com albumina sérica bovina e humana.

2. METODOLOGIA

2.1. Síntese do ligante

O pré-ligante **1** foi sintetizado conforme descrito na literatura, pela reação equimolar de 8-aminoquinolina (2,16 g, 15 mmol) e 3,5-di-terc-butil-2-

hidroxibenzaldeído (3,52 g, 15 mmol), ambos dissolvidos separadamente em etanol (15 mL) e posteriormente misturados. A reação foi conduzida sob refluxo a 80 °C por 24 h, seguida de resfriamento à temperatura ambiente e cristalização a –18 °C. O sólido laranja formado foi filtrado, lavado e seco a vácuo, o rendimento de 77,0%.

2.2. Síntese do complexo

O composto pré-ligante **1** (100 mg; 0,277 mmol), previamente solubilizado em metanol (10 mL) a 40°C, foi adicionado gota a gota a uma solução de CuCl₂·2H₂O (47,2 mg; 0,277 mmol) em metanol (5 mL). A reação prosseguiu sob agitação por 3 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, a solução resultante **1a** foi submetida a secagem a vácuo e lavada com hexano, resultando na formação do complexo **1a** sólido de cor marrom. O rendimento da reação foi de 87%.

O complexo **1b** foi sintetizado conforme descrito para **1a**, a partir de **1** (100 mg; 0,277 mmol) e Cu(ClO₄)₂·6H₂O (102,8 mg; 0,277 mmol). O composto **1b** gerou cristais marrons escuros, com um rendimento de 76%.

O complexo **1c** foi sintetizado conforme descrito para **1a**, a partir de **1** (100 mg; 0,277 mmol) e Cu(NO₃)₂·3H₂O (51,90 mg; 0,277 mmol). O composto **1c** gerou cristais marrons escuros, com um rendimento de 80%.

2.3. Caracterização dos complexos

Os complexos foram caracterizados por UV-Vis, FITR e DRX de Monocristal. Espectros no ultravioleta visível foram obtidos em um espectrofotômetro, na região de 200 a 800 nm em diclorometano. Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro IRAffinity-1, SHIMADZU, na região de 4000 a 500cm⁻¹, sob o acessório ATRZnSe, em modo: transmitância, número de scans: 60, resolução: 4cm⁻¹. A Difração de Raios X de monocristal foram realizadas em um difratômetro Synergy-Dualflex-HyPix-Cu, os dados foram medidos usando varreduras ω de 0,5° por quadro utilizando radiação Cu Kα.

2.4. Interação com albumina sérica bovina e humana

Os ensaios de fluorescência foram realizados em um espectrofotômetro PerkinElmer LS-55, com lâmpada de xenônio, utilizando comprimento de onda de excitação de 280 nm, varredura de 200–575 nm. Soluções de BSA (0,10 μM) e HSA (0,14 μM) foram fixados e adicionados volumes graduais (5–195 μL) dos compostos, obtendo concentrações finais de 0,9–32 μM. Após cada adição, registraram-se os espectros para monitorar alterações na intensidade e possíveis deslocamentos das bandas de fluorescência.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos obtidos e seus respectivos rendimentos são apresentados na **Figura 1**, alterando o coligante Clorido [CuLCl] (**1a**) por aqua [Cu(L)(H₂O)]ClO₄ (**1b**), nitrato [Cu(L)(NO₃)] (**1c**). Estes complexos foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho, UV-vis e Difração de Raios X de monocristal

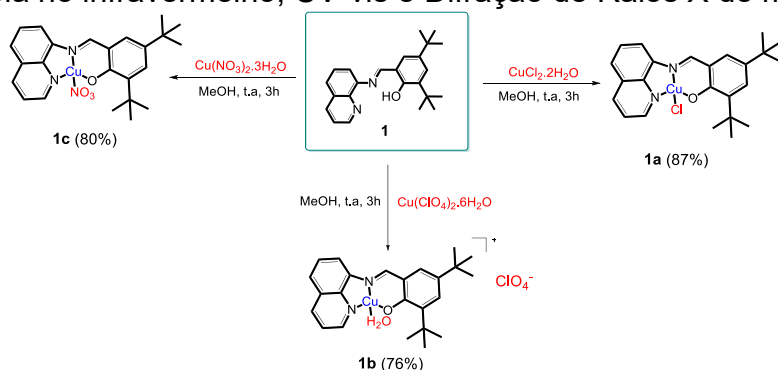


Figura 1. Rota geral de síntese dos complexos **1a** – **1c**.

Na **Figura 2** é apresentado o resultado da XDR do complexo **1b**, que foi selecionado para discussão. O complexo **1b** cristaliza no sistema triclinico, grupo espacial P-1, o que indica a ausência de simetria interna além da identidade. Os ângulos de ligação O1-Cu1-N2 de 175,20(6) e N1-Cu1-O2 de 176,02(6) definem uma geometria quadrada ligeiramente distorcida em torno do centro metálico. Essa geometria sofre um desvio da planaridade, evidenciado pelos seguintes ângulos: O1-Cu1-N1 de 94,13(6), N2-Cu1-N1 de 83,82(6), O1-Cu1-O2 de 89,81(6) e N2-Cu1-O2 de 92,21(6). A distância Cu(1)–O(3) observada (2,635 Å) excede a soma dos raios covalentes de Cu e O (2,05 Å), indicando ausência de ligação covalente efetiva. No entanto, é ligeiramente inferior à soma dos raios de van der Waals (2,92 Å), sugerindo uma interação fraca entre o centro metálico e o oxigênio do ânion.

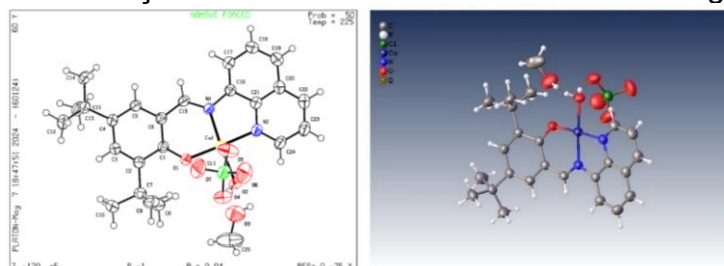


Figura 2. Estrutura cristalina e molecular do complexo **1b**.

A albumina sérica bovina (BSA) é usada como modelo por sua alta similaridade (~76%) com a albumina humana (HSA), baixo custo e fácil purificação. Estudos com BSA fornecem informações iniciais importantes sobre a ligação de novos compostos a proteínas plasmáticas, embora diferenças estruturais entre elas possam afetar afinidade e comportamento espectroscópico. A interação dos compostos **1–1c** com as proteínas BSA e HSA foi investigada por espectroscopia de fluorescência. Nas titulações, a concentração de BSA foi mantida fixa, enquanto as concentrações dos compostos foram gradualmente aumentadas no intervalo de $9,0 \times 10^{-4}$ mM a $2,0 \times 10^{-2}$ mM. Os espectros de fluorescência obtidos para a interação com a BSA, foram selecionados para exemplificação dos resultados e estão apresentados na **Figura 3**.

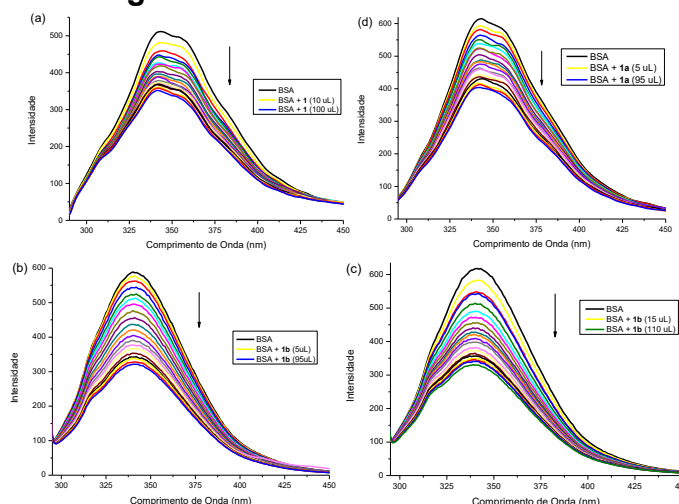


Figura 3. Espectros de emissão de fluorescência da BSA na presença do (a) pré-ligante **1** e dos complexos (b) **1a**, (c) **1b** e (d) **1c**.

Em todos os espectros de emissão, observou-se uma diminuição na intensidade de fluorescência da BSA à medida que a concentração dos compostos aumentava. Esse efeito de supressão está relacionado a modificações no microambiente dos resíduos de triptofano, resultantes da interação com os ligantes. Para caracterizar esse processo, foram determinados alguns parâmetros, como:

constante de Stern–Volmer (K_{sv}), constante de supressão bimolecular (K_q), constante de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e variação da energia livre de Gibbs (ΔG). Apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Propriedades espectrais de fluorescência do pre-ligante **1** e seus respectivos complexos **1a–1c** em interação com BSA e HSA.

Macromolécula		K_{sv} M^{-1}	K_q $M^{-1} \cdot s^{-1}$	K_b M^{-1}	n	ΔG kJ/mol
1	BSA	$2,46 \times 10^4$	$2,46 \times 10^{12}$	$2,73 \times 10^3$	0,79	-19,61
	HSA	$1,49 \times 10^4$	$1,49 \times 10^{12}$	$1,62 \times 10^3$	0,80	-18,32
1a	BSA	$2,98 \times 10^4$	$2,98 \times 10^{12}$	$1,96 \times 10^4$	0,99	-24,50
	HSA	$1,29 \times 10^4$	$1,29 \times 10^{12}$	$1,1 \times 10^4$	0,98	-23,09
1b	BSA	$5,22 \times 10^4$	$5,22 \times 10^{12}$	$1,32 \times 10^6$	1,29	-34,34
	HSA	$1,24 \times 10^5$	$1,24 \times 10^{13}$	$1,74 \times 10^6$	1,24	-35,62
1c	BSA	$4,69 \times 10^4$	$4,69 \times 10^{12}$	$8,41 \times 10^4$	1,05	-28,12
	HSA	$3,89 \times 10^4$	$3,89 \times 10^{12}$	$3,50 \times 10^4$	0,99	-25,94

A análise de fluorescência de BSA e HSA evidenciou supressão predominantemente estática, com constantes de taxa de colisão (K_q) superiores ao limite de difusão ($2,0 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$) e constantes de ligação na faixa de 10^3 – $10^6 M^{-1}$, indicando afinidade moderada a forte, compatível com compostos de interesse farmacológico. Em ambos os casos, $n \approx 1$ sugere a presença de uma única classe de sítio de ligação, e os valores negativos de ΔG indicam que as interações são termodinamicamente espontâneas. A afinidade com BSA/HSA seguiu a ordem **1b** > **1c** > **1a** > **1**, sendo todos os complexos superiores ao ligante livre, possivelmente devido à formação de adutos metaloproteicos nos quais resíduos doadores da albumina coordenam o centro metálico. O complexo **1b** apresentou maior afinidade, provavelmente favorecida pelo coligante aqua, de caráter lábil, e pela carga positiva do centro metálico, fatores que podem facilitar interações eletrostáticas iniciais e subsequente coordenação.

4. CONCLUSÕES

Os novos complexos de cobre foram caracterizados por IV, UV-Vis e difração de raios X. As interações com BSA e HSA indicaram um mecanismo de extinção de fluorescência predominantemente estático, evidenciado pelos elevados valores de K_q , constantes de ligação compatíveis com afinidade moderada a forte. Os complexos apresentaram maior afinidade pelas proteínas que o ligante livre, com destaque para o complexo **1b**. Esses resultados reforçam o potencial biológico dos complexos, tendo como perspectiva a investigação da interação com ct-DNA, análise de citotoxicidade e estudos *in vivo* em **1b** e **1c** para explorar o potencial anticancerígeno desses complexos em comparação ao complexo **1a**.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cho, H., *et. al.* Emerging Albumin-Binding Anticancer Drugs for Tumor-Targeted Drug Delivery: Current Understandings and Clinical Translation. *Pharmaceutics*, v. 14, **2022**.
- Huang, X.Y., *et. al.* Cuproptosis in cancers: Function and implications from bench to bedside. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 176, **2024**
- Pinheiro A.C., *et. al.* Antioxidant and Anticancer Potential of the New Cu(II) Complexes Bearing Imine-Phenolate Ligands with Pendant Amine N-Donor Groups *Pharmaceutics*, v. 15, **2023**
- Tripathi M., *al. et.* Binding interaction of four azo linked copper (II) complexes with Human Serum Albumin (HSA): Spectroscopic and molecular docking explorations. *Results in Chemistry*, v. 9, **2024**.