



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química

Saulo Quintana Gomes

COMPLEXOS FOSFINAOURO(I):
INTERAÇÕES COM METALO- β -LACTAMASES
E DEDOS DE ZINCO.

Campinas
2017

Saulo Quintana Gomes

COMPLEXOS FOSFINAOURO(I):
INTERAÇÕES COM METALO- β -LACTAMASES
E DEDOS DE ZINCO.

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Química na área de Química Inorgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Camilla Abbehausen

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno Saulo Quintana Gomes, e orientada pela Profa. Dra. Camilla Abbehausen.

Campinas
2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 152782/2012-5

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Maria Lúcia Nery Dutra de Castro - CRB 8/1724

Q45c Quintana Gomes, Saulo, 1992-
Complexos fosfinaouro(I) : interações com metalo-beta-lactamases e dedos de zinco / Saulo Quintana Gomes. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Camilla Abbehausen.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Compostos de ouro. 2. Metaloproteínas. 3. Química bioinorgânica. I. Abbehausen, Camilla. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Phosphinegold(I) complexes : interactions with metallo-beta-lactamases and zinc fingers

Palavras-chave em inglês:

Gold compounds

Metalloproteins

Bioinorganic chemistry

Área de concentração: Química Inorgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Inorgânica

Banca examinadora:

Camilla Abbehausen [Orientador]

Regina Buffon

Wilton Rogério Lustrí

Data de defesa: 02-03-2017

Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Camilla Abbehausen (Orientadora)

Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri (UNIARA-Araraquara)

Profa. Dra. Regina Buffon (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da
Dissertação de Mestrado defendida pelo aluno
SAULO QUINTANA GOMES, aprovada pela
Comissão Julgadora em 2 de março de 2017.

Estava ali um homem que se encontrava enfermo há trinta e oito anos. Jesus, vendo-o deitado e sabendo que estava assim há muito tempo, lhe diz: “queres tornar-te são?”

João, 5:5-6

“A colheita é comum, mas o capinar é sozinho.”

João Guimaraes Rosa, 1956
“Grande Sertão: Veredas”

“There are ancient cathedrals which, apart from their consecrated purpose, inspire solemnity and awe. Even the curious visitor speaks of serious things, with hushed voice, and as each whisper reverberates through the vaulted nave, the returning echo seems to bear a message of mystery. The labor of generations of architects and artisans has been forgotten, the scaffolding erected for the toil has long since been removed, their mistakes have been erased, or have become hidden by the dust of centuries. Seeing only the perfection of the completed whole, we are impressed as by some superhuman agency. But sometimes we enter such an edifice that is still partly under construction; then the sound of hammers, the reek of tobacco, the trivial jests bandied from workman to workman, enable us to realize that these great structures are but the result of giving to ordinary human effort a direction and a purpose.

Science has its cathedrals, built by the efforts of a few architects and many workers.”

Gilbert Newton Lewis, 1923
“Thermodynamics”

Kennete man recht nach chemischen Gründen die natürlichen Verrichtungen im Körper, die Ursachen der Krankheiten und die Wirkungen der Arzeneymittel; so müsste die Chemie gewiss Wunder ausführen können.

Carl Wilhelm Scheele, 1777
"Chemische Abhandlung von der Luft und dem Feuer"

Agradecimentos

Agradeço a meus pais Reginaldo e Silmara, não só pela constituição de nossa família, pelo amor e pela formação, mas pela generosidade, manifestada em incontáveis pequenas e grandes ações de carinho, motivação e amparo, sem as quais eu não teria dado os passos que dei. Agradeço também a todos os meus demais familiares, nominalmente às minhas avós Nilce e Lourdes, pelo amor sincero e desinteressado, e aos meus primos Laura, Lorena, Estêvão e Alice, por tornarem o mundo um lugar bem mais empolgante.

Agradeço à Profa. Dra. Camilla Abbehausen pela oportunidade de desenvolver um projeto pelo qual tenho um interesse genuíno, pela orientação atenciosa e por todo o valioso aprendizado científico.

Agradeço também à Profa. Dra. Regina Buffon, pelos quase cinco meses de orientação oficial e todos os meses de chás, cafés e tortei.

Agradeço ao Dr. Frederico A. Lima pela imprescindível colaboração na aquisição e no tratamento dos dados de espectroscopia de absorção de raios X.

Agradeço a meus colegas de laboratório pelo carinho, pelo companheirismo, e pela atenção incansável. A Carolina Galuppo, pela direção de arte deste texto, pela flexibilidade dos horários de almoço e pelas curiosas jornadas musicais; a Eduardo G. R. Arruda pelas muitas sugestões científicas e pedagógicas, além do estímulo às minhas ideias mais aleatórias; a Maria G. O. Silva por trazer ordem e coerência à convivência agitada do nosso grupo; a Rafael L. P. Rocha pela lição mais sincera de simplicidade que eu já recebi; a Manoel V. F. Barrionuevo pelas conversas mais agradáveis e menos prováveis que se poderia esperar; a Catherine M. Teles pela memória e pelo sistemático reforço positivo a hábitos saudáveis; também a Letícia, minha prima, a Bruno, a Tainá, a Arnaldo, a Bárbara, a Felipe e a Laura pelo aprendizado e pelas longas risadas. Ao Zé, particularmente, eu agradeço por uma das histórias mais interessantes que eu tenho para contar.

Agradeço a todos os funcionários do Instituto de Química da Unicamp pela colaboração imprescindível, especialmente aos técnicos Anderson Pedrosa, Gustavo Shimamoto e Cláudia Martelli pela atenção e eficiência, e a Marcos Tadeu Magalhães pela grande gentileza e prontidão na confecção de equipamentos de vidro. À Universidade Estadual de Campinas agradeço pela estrutura, assim como às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro.

Agradeço ao Prof. André Toffoli pela apresentação de uma nova maneira de ver o mundo e pelo convite para construir junto um novo mundo. Agradeço também aos numerosos amigos que em sua generosidade me apoiaram em todas as minhas decisões, mesmo discordando de várias delas e relevaram minhas muitas ausências e meias presenças. Finalmente, agradeço muitíssimo a Camila S. Oliveira por ter sido a melhor surpresa que o ano difícil de 2016 me reservou.

Resumo

Zinco-proteínas desempenham papéis fundamentais em organismos. Os íons Zn^{II} , que atuam nestas proteínas, são classificados conforme seu papel, catalítico ou estrutural. Como estão envolvidas em diversos processos de doença, a inibição ou regulação da atividade de várias zinco-proteínas pode representar a cura de muitas delas. Porém um dos grandes desafios no desenvolvimento de inibidores de zinco-proteínas é obter seletividade. Neste trabalho, compostos fosfinaouro(I) foram avaliados frente a modelos de zinco estrutural, representados por domínios dedos de zinco encontrados em uma proteína do vírus HIV-1 (NCp7) e em um fator de transcrição humano (Sp1), e frente a um modelo de zinco catalítico, representado por uma metalo- β -lactamase, visando compreender sua forma de atuação em cada um dos casos. Essa classe de compostos foi selecionada pois, dentre os complexos de ouro descritos na literatura, os fosfinaouro(I) se destacam por apresentarem uma forma de atuação singular frente a dedos de zinco. O fármaco comercial auranofina, utilizado na clínica, pertence a essa classe e tem despertado especial interesse.

No caso do zinco estrutural, a remoção ou substituição do Zn^{II} causa inibição da atividade. Sabe-se que compostos de Au^I e Au^{III} promovem a substituição de Zn^{II} em proteínas dedo de zinco, mas pouco se conhece sobre o mecanismo ou a estrutura das proteínas substituídas, chamadas de dedos de ouro. Com o objetivo de desvendar essas estruturas a interação de compostos fosfinaouro(I) com os dois modelos de proteínas dedos de zinco foi estudada por espectroscopia de absorção de raios X. Observou-se que, no caso desses complexos, a reatividade depende da estrutura do dedo de zinco utilizado, o que não foi observado para outros complexos de ouro. Esse resultado demonstra que é possível modular a reatividade dos complexos metálicos através dos ligantes, permitindo o desenvolvimento de metalofármacos mais seletivos.

Do ponto de vista do zinco catalítico, este trabalho representa o primeiro estudo da atividade inibitória de complexos de ouro frente a β -lactamases. Os resultados sugerem que alguns complexos de Au^I apresentam atividade inibitória. Esta primeira evidência de interação apresenta uma nova classe de compostos interessantes para estudos como inibidores de metalo- β -lactamases.

Buscando modular a seletividade e melhorar a eficiência dos compostos de ouro nestes sistemas, foi também desenvolvido um novo complexo hidrossolúvel de Au^I com tri(carboxietil)fosfina, que apresentou atividade inibitória frente a β -lactamases, mas não frente aos dedos de zinco estudados.

Abstract

Zinc-proteins play key roles in organisms. The Zn^{II} ions, which act on these proteins, can be classified in catalytic or structural according to their role. As they are involved in various disease processes, the inhibition or regulation of their activity may represent the cure of many of them. However, one of the major challenges in developing zinc-protein inhibitors is to achieve selectivity. In this work, phosphinegold(I) compounds were evaluated as inhibitors of structural zinc models represented by zinc finger domains found in the HIV-1 protein NCp7 and in the human transcription factor Sp1, and as inhibitors of a catalytic zinc model represented by a metallo- β -lactamase, in order to understand their way of action in each case. This class of compounds has been selected because among the gold complexes described in the literature, the phosphinegold(I) are distinguished by their unique performance against zinc fingers. The clinically approved drug auranofin, belongs to this class and has attracted much interest.

In the case of structural zinc, the removal or replacement of Zn^{II} causes inhibition of its activity. It is known that Au^I and Au^{III} compounds promote the replacement of Zn^{II} in zinc finger proteins, therefore the mechanism and structure of the substituted proteins, called gold fingers, are unknown. In order to unravel these structures, the interaction of phosphinegold(I) compounds were studied with two models of zinc finger proteins by X-ray absorption spectroscopy. It was observed that, in the case of these complexes, the reactivity depends on the structure of the zinc finger used, which was not observed for other gold complexes. This result demonstrates that it is possible to modulate the metal complexes reactivity through the ligands, allowing the development of more selective metallodrugs.

From the point of view of catalytic zinc, this work represents the first study of the inhibitory activity of gold complexes against β -lactamases. The results suggest that some Au^I complexes have inhibitory activity. This first evidence of interaction presents a new class of interesting compounds for studies as inhibitors of metallo- β -lactamases.

Aiming to modulate the selectivity and to improve the efficiency of the gold compounds in these systems, a new water soluble complex of Au^I with tri(carboxyethyl)phosphine was also developed, which inhibited the activity of β -lactamases, but not of the zinc fingers studied.

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Três possíveis vias de reação da água tipicamente presente em zinco-enzimas. Esquema adaptado da referência 10..... | 17 |
| Figura 2: Complexos de ouro(I) usados no tratamento de tuberculose e artrite reumatoide..... | 19 |
| Figura 3: Proteína ZIF268 de <i>Mus musculus</i> em estrutura cristalina com um trecho de fita de DNA (PDB 1A1L). Os íons Zn^{II} estão destacados (esferas cinza) bem como os resíduos de aminoácidos que coordenam estes íons..... | 21 |
| Figura 4: ZF aminoterminal da PARP-1, com resíduos coordenados ao Zn^{II} em destaque. Alguns complexos de Au^I e Au^{III} , inibidores deste domínio, são mostrados assim como uma proposta para seu mecanismo de ação por ataque eletrofílico à cisteína do ZF. Figura adaptada da referência 38..... | 23 |
| Figura 5: Diversas funções do ciclo viral do HIV-1. Figura adaptada da referência 50..... | 24 |
| Figura 6: Sítio ativo da ACE de <i>Drosophila melanogaster</i> coordenado ao inibidor captopril (PDB 2X8Z). Em destaque resíduos de aminoácidos coordenados ao Zn^{II} formando, com o grupo tiolato do inibidor, uma estrutura tetraédrica..... | 27 |
| Figura 7: Representação dos sítios ativos de diferentes classes de MBLs. Figura adaptada da referência 73..... | 29 |
| Figura 8: Mecanismo da reação catalisada pela CcrA bimetálica(B1). Adaptado da referência 80..... | 30 |
| Figura 9: Fotografia do gel de poliacrilamida utilizado na análise de eletroforese da BCE. As duas bandas observadas, uma de SBL e uma de MBL, estão destacadas, bem como os pesos moleculares do padrão..... | 37 |
| Figura 10: Estruturas dos principais compostos utilizados nesse trabalho..... | 39 |
| Figura 11: Reação de hidrólise da nitrocefina (15) promovida pela BCE..... | 45 |
| Figura 12: ESI-MS(+) dos produtos de interação do complexo $[AuCl(PET_3)]$ com os modelos de ZF NCp7 (A) e Sp1 (B)..... | 48 |

- Figura 13: Espectros de NMR ^{31}P do complexo $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ e da mistura imediata $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{NCp7}$50
- Figura 14: Espectros de XANES na borda L_3 do ouro dos compostos modelo. A linha vertical tracejada indica a posição da borda da folha de ouro metálico, em 11.919 eV. Na legenda estão representados (0) ouro metálico, (1) $[\text{Au}(\text{nac})]$, (2) $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$, (3) $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$, (4) $[\text{Au}(\text{dmap})(\text{PPh}_3)]^+$, (5) $[\text{Au}(\text{mtz})(\text{PPh}_3)]$, (6) auranofina, (7) $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ e (8) $[\text{Au}(\text{CN})(\text{PPh}_3)]$51
- Figura 15: Detalhe da região da linha branca dos espectros de XANES na borda L_3 do ouro dos compostos (1) $[\text{Au}(\text{nac})]$, (5) $[\text{Au}(\text{mtz})(\text{PPh}_3)]$ e (6) auranofina. Todos estes compostos apresentam ligantes tiolato. O ouro metálico (0) também é representado para comparação.....53
- Figura 16: Detalhe da região da linha branca dos espectros de XANES na borda L_3 do ouro dos compostos (2) $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ e (3) $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$, ambos complexos do tipo fosfina-ouro-cloro. O ouro metálico (0) também é representado para comparação.....54
- Figura 17: Detalhe da região da linha branca dos espectros de XANES na borda L_3 do ouro dos compostos (3) $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$, (4) $[\text{Au}(\text{dmap})(\text{PPh}_3)]^+$ e (5) $[\text{Au}(\text{mtz})(\text{PPh}_3)]$. Todos estes compostos apresentam o ligante trifenilfosfina. O ouro metálico (0) também é representado para comparação.....55
- Figura 18: Detalhe da região da linha branca dos espectros de XANES na borda L_3 do ouro dos compostos $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ (7) e $[\text{Au}(\text{CN})(\text{PPh}_3)]$ (8). Ambos os complexos apresentam ligantes cianeto. O ouro metálico(0) também é representado para comparação.....56
- Figura 19: Espectros de XANES na borda L_3 do ouro dos compostos $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (2) e auranofina (6), assim como seus produtos de interação com NCp7. Para comparação o espectro do composto $[\text{Au}(\text{mtz})(\text{PPh}_3)]$ (5) é também mostrado.....58
- Figura 20: Espectros de XANES na borda L_3 do ouro dos compostos $[\text{Au}(\text{nac})]$ (1) e $[\text{Au}(\text{dmap})(\text{PPh}_3)]^+$ (4), além dos adutos $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{NCp7}$ e auranofina + NCp7. O ouro metálico (0) também é representado para comparação.....59
- Figura 21: Espectros de EXAFS de $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{NCp7}$, auranofina + NCp7 e da auranofina (6), no espaço k. Os espectros são virtualmente idênticos.....60

| | |
|---|----|
| Figura 22: Região da linha branca de espectros de XANES simulados no FEFF9 do complexo [AuCl(PEt ₃)] (2), bem como de três complexos hipotéticos formados substituindo-se o cloreto do [AuCl(PEt ₃)] por uma cisteína (Cist.), uma histidina (Hist.) ou uma segunda trietilfosfina (Bifosf.)..... | 61 |
| Figura 23: Espectros de XANES na borda L ₃ do ouro do [AuCl(PEt ₃)] + Sp1. São mostrados para comparação os espectros dos compostos [Au(nac)] (1), [AuCl(PEt ₃)] (2) e auranofina (6) assim como do sistema [AuCl(PEt ₃)] + NCp7 e da folha de ouro metálico (0)..... | 62 |
| Figura 24: Espectros de EXAFS de [AuCl(PEt ₃)] + Sp1 e 1, no espaço k..... | 63 |
| Figura 25: Esquema de reação entre [AuCl(PEt ₃)] (2) e os peptídeos modelo. Para o NCp7 três possíveis coordenações são apresentadas..... | 64 |
| Figura 26: Atividade enzimática relativa de BCE na hidrólise da nitrocefina..... | 65 |
| Figura 27: Distância média do centro de massa dos resíduos de triptofano 89 e 219 em relação ao zinco catalítico do sítio da cisteína. O resíduo 89 é exposto ao solvente.(PDB: 4C1H)..... | 68 |
| Figura 28: Figura ORTEP referente à estrutura cristalina do AuTCEP..... | 71 |
| Figura 29: Estruturas de cela do monocristal de AuTCEP. (a) Vista pelo eixo a . (b) Vista pelo eixo b . (c) Vista pelo eixo c | 72 |
| Figura 30: Espectros de ³¹ P NMR do complexo AuTCEP e do ligante livre TCEP..... | 73 |
| Figura 31: Espectros de ¹ H NMR do complexo AuTCEP e do ligante livre TCEP. | 74 |
| Figura 32: Espectros de ¹³ C NMR do complexo AuTCEP e do ligante livre TCEP. | 76 |
| Figura 33: Espectros de ¹ H NMR do AuTCEP obtidos de soluções em diferentes valores de pH..... | 77 |
| Figura 34: Espectros de ³¹ P NMR do AuTCEP obtidos de soluções em diferentes valores de pH..... | 78 |
| Figura 35: Curvas de titulação do ligante TCEP (13) acompanhada por ³¹ P NMR. Figura adaptada da referência 154..... | 79 |

| | |
|---|----|
| Figura 36: Espectros de ^{31}P NMR do complexo AuTCEP em solução (D_2O) e no estado sólido..... | 80 |
| Figura 37: Espectros de ^{13}C NMR do complexo AuTCEP em solução (D_2O) e no estado sólido..... | 81 |
| Figura 38: Espectro de massa no modo negativo (ESI-MS(-)) do complexo AuTCEP..... | 82 |
| Figura 39: Espectros de IR do ligante TCEP e do complexo AuTCEP..... | 83 |
| Figura 40: ESI-MS(+) do produto de interação AuTCEP + NCp7 imediatamente após a mistura, 1 hora e 6 horas depois..... | 85 |
| Figura 41: Espectros de dicroísmo circular do NCp7 e apopeptídeo correspondente puros ou interagindo com TCEP e AuTCEP..... | 87 |
| Figura 42: Espectros de ^1H NMR do complexo AuTCEP e da mistura AuTCEP + BCE em pH = 5,0..... | 88 |
| Figura 43: Espectros de ^{31}P NMR do complexo AuTCEP e da mistura AuTCEP + BCE em pH = 5,0..... | 89 |
| Figura 44: Espectros de ^1H NMR do complexo AuTCEP e das misturas AuTCEP + NCp7 e AuTCEP + Sp1 em pH = 5,0..... | 90 |
| Figura 45: Espectros de ^{31}P NMR do complexo AuTCEP e das misturas AuTCEP + NCp7 e AuTCEP + Sp1 em pH = 5,0..... | 90 |
| Figura 46: Espectros de ^{31}P NMR do complexo AuTCEP e das misturas AuTCEP + NAC e AuTCEP + HIS em pH = 5,0..... | 91 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Valores de posição da borda, estado de oxidação e simetria pontual dos compostos modelo 1 – 8 , além do ouro metálico (0)..... | 52 |
| Tabela 2: Atividade enzimática relativa de BCE na hidrólise da nitrocefina..... | 66 |
| Tabela 3: Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos sinais de ^1H NMR do TCEP e do AuTCEP..... | 75 |
| Tabela 4: Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos sinais de ^{13}C NMR do TCEP e do AuTCEP..... | 76 |
| Tabela 5: Valores de deslocamento químico e variação de deslocamento químico dos estudos de espectroscopia de NMR de ^1H e ^{31}P em solução (D_2O) do complexo AuTCEP (12). A variação de deslocamento químico está apresentada em relação à solução que não teve seu pH corrigido..... | 78 |
| Tabela 6: Atribuição das principais bandas dos espectros de IR do ligante TCEP e do complexo AuTCEP..... | 84 |
| Tabela 7: Atividade enzimática de BCE em presença dos inibidores AuTCEP (12), $\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$ (7) e EDTA (17), bem como do ligante TCEP (13) livre..... | 87 |

Sumário

| | |
|--|-----|
| Capítulo 1: Introdução..... | 15 |
| 1.1. Íons metálicos em sistemas biológicos..... | 15 |
| 1.1.1. O Zinco em sistemas biológicos..... | 16 |
| 1.1.2. O uso de complexos metálicos em medicina..... | 18 |
| 1.2. Zinco com função estrutural como alvos de interesse: dedos de zinco..... | 21 |
| 1.3. Zinco com função catalítica como alvos de interesse: metalo- β -lactamases | 26 |
| 1.4. A espectroscopia de absorção de raios X no estudo de biomoléculas..... | 32 |
| Capítulo 2: Objetivos | 36 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 36 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 36 |
| Capítulo 3: Parte Experimental | 37 |
| 3.1 Materiais..... | 37 |
| 3.2. Métodos..... | 40 |
| Capítulo 4: Zinco estrutural: Interação de complexos de ouro(I) com dedos de zinco | 48 |
| 4.1. Espectrometria de Massas | 48 |
| 4.2. ^{31}P NMR do aduto NCp7 + $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ | 50 |
| 4.4. Espectroscopia de absorção de raios X | 51 |
| 4.4.1. Compostos Modelo | 51 |
| 4.4.2. Interação de $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ e auranofina com NCp7 e Sp1 | 57 |
| Capítulo 5: Zinco Catalítico: Inibição de β -lactamases por complexos metálicos..... | 65 |
| Capítulo 6: AuTCEP – Novo complexo fosfinaouro(I) hidrossolúvel..... | 70 |
| 6.1. Síntese e caracterização..... | 70 |
| 6.3. Estudo da capacidade de inibição da atividade enzimática de BCE por AuTCEP..... | 87 |
| 6.4. Estudo da interação de AuTCEP com metalo- β -lactamase e dedos de zinco por espectroscopia de ressonância magnética nuclear | 88 |
| Capítulo 7: Conclusões e Perspectivas..... | 93 |
| Referências Bibliográficas | 95 |
| Anexo | 103 |

Capítulo 1: Introdução

1.1. Íons metálicos em sistemas biológicos

Numerosos metais ocorrem naturalmente e exercem papéis cruciais na maioria dos processos bioquímicos nos organismos¹. Esses metais são denominados endógenos ou essenciais e estão presentes na forma de íons metálicos. Eles podem atuar isolados, como sinalizadores ou portadores de carga, mas muito frequentemente exercem seus papéis coordenados a proteínas. Nessas proteínas, conhecidas como metaloproteínas, os íons metálicos podem desempenhar tanto funções catalíticas quanto estabilizar – ou até mesmo determinar – sua estrutura terciária ou quaternária.

A seleção evolutiva de um íon específico para desempenhar um determinado papel em sistemas biológicos depende de um grande número de fatores químicos como carga, raio, preferência por ligantes, reatividade em meio aquoso e disponibilidade no ambiente². As funções exercidas por estes íons metálicos são diversas. De um modo geral, sódio e potássio atuam criando gradientes de concentração iônica através de membranas e na manutenção do equilíbrio osmótico. Por outro lado, íons cálcio e magnésio desempenham papéis estruturais e em vias de controle e sinalização metabólica, além de envolverem-se no metabolismo de fosfato e na fotossíntese. Íons zinco não apenas desempenham importantes atividades estruturais como também atuam como ácidos de Lewis em diversos processos enzimáticos. Metais de transição como ferro, cobre e manganês catalisam diversas reações redox, além de participar no transporte de moléculas importantes, como oxigênio^{3,4}.

Desequilíbrios na concentração de metais endógenos, tanto por excesso quanto por carência, podem causar doenças⁵, como a anemia ferropênica, causada pela carência de ferro(II), ou a doença de Wilson, causada pelo excesso de íons cobre(II)^{5,6}. O tratamento usual para uma condição de carência de um determinado íon metálico consiste na administração de formas farmacêuticas deste íon associadas a fatores que facilitem sua absorção. No caso de excesso, agentes quelantes específicos são administrados.

Vários outros metais não ocorrem naturalmente nos organismos e são denominados exógenos. Acima de certos níveis de concentração, específicos para cada elemento, os metais exógenos são tóxicos. Agentes quelantes são necessários para combater os danos causados por metais exógenos em concentrações elevadas e devem ser específicos, evitando o desequilíbrio na concentração dos íons metálicos endógenos.

Contudo, dentro de faixas adequadas de concentração muitos íons de metais exógenos podem ser – e são – utilizados como fármacos⁵. Características químicas dos íons metálicos, como número de oxidação, geometria preferencial, labilidade, caráter ácido de Pearson, assim como características dos ligantes coordenados a eles, permitem a modulação da atividade dos metais exógenos e a síntese de fármacos seguros e específicos.

Desse modo, interessa ao campo da química bioinorgânica compreender em detalhes os papéis e mecanismos de atuação dos metais, tanto endógenos como exógenos, em diversas faixas de concentração nos organismos. O entendimento dos processos de saúde e doença pode então ser utilizado na promoção da saúde e do bem estar, tanto do ponto de vista preventivo e diagnóstico, quanto no que diz respeito à descoberta de novos agentes terapêuticos, inorgânicos inclusive.

1.1.1. O Zinco em sistemas biológicos

Dentre os metais endógenos do bloco d, o zinco figura como segundo metal mais abundante nos seres humanos, perdendo apenas para o ferro. Dentre as metaloproteínas, as zinco-proteínas compõem um grupo amplo, compreendendo 10% do proteoma humano¹. Em muitos microrganismos as zinco-proteínas também estão presentes, tornando o zinco essencial também para estes organismos¹.

A pergunta que se estabelece então é: por que a evolução selecionou o zinco para as funções essenciais que ele desempenha? O zinco se apresenta usualmente no estado de oxidação 2+, com configuração eletrônica [Ar] 3d¹⁰. Como o raio do Zn^{II} é de apenas 65 pm ele apresenta uma carga relativamente grande concentrada num pequeno raio, se comparado à maioria dos cátions orgânicos³. Por outro lado, ele apresenta uma alta afinidade eletrônica, maior do que Mg^{II} e Ca^{II}, por exemplo, o que o caracteriza como um forte ácido de Lewis (pelo menos no que diz respeito ao meio biológico). No que diz respeito à acidez de Pearson, o Zn^{II} apresenta um caráter intermediário, interagindo bem tanto com bases duras (O-doadoras, como glutamato) quanto com bases moles (S-doadoras, como cisteína).

Mas, ao contrário do ferro e do cobre, o zinco não participa de reações de oxirredução, sendo preferido em casos onde processos redox seriam indesejáveis. Além disso, considerando a teoria do campo cristalino, a configuração d¹⁰ é caracterizada por uma energia de estabilização do campo cristalino nula independentemente da geometria em que se acomodem os ligantes, não se observando para o Zn^{II} uma geometria ou número de coordenação preferenciais⁷.

Em geral, se dividem as funções do zinco no meio biológico entre catalíticas e estruturais. É possível diferenciar estas funções pelas diferentes esferas de coordenação que o metal assume. Íons zinco com função catalítica apresentam quase sempre uma molécula de água coordenada. Esse ligante lábil pode ser facilmente substituído pelo substrato da enzima, embora a água possa também ser polarizada, atuando como eletrófilo em virtude da coordenação ou ainda perder um próton indo a hidróxido, favorecendo o ataque nucleofílico a substratos⁸⁻¹⁰. Essas três vias de reação estão esquematicamente representadas na Figura 1. Além da água, é comum encontrar coordenados a íons Zn^{II} catalíticos resíduos de glutamato (O-doador), aspartato (O-doador), histidina (N-doador) e cisteína (S-doador). Em oposição, íons zinco estruturais são coordenados quase sempre por quatro ligantes que pertencem todos à cadeia peptídica (nenhuma água) em geometria tetraédrica⁹. Os resíduos mais comuns nestes sítios são histidina e cisteína¹¹.

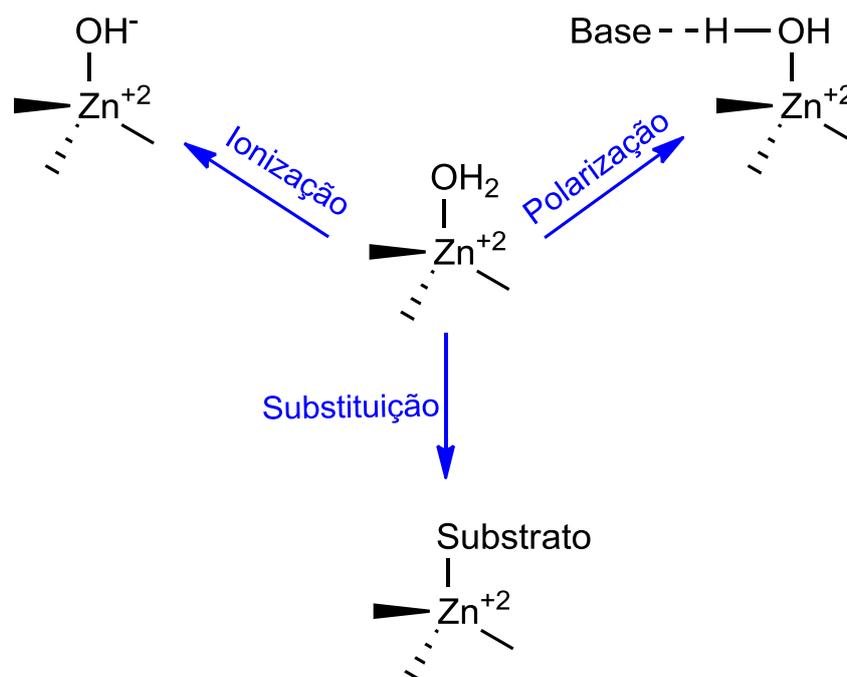


Figura 1: Três possíveis vias de reação da água tipicamente presente em zinco-enzimas. Esquema adaptado da referência 10.

Essas características fazem do zinco um metal versátil permitindo que as zinco-enzimas desempenhem diferentes funções no meio biológico, como por exemplo: hidrolases, liases, ligases, transferases e isomerases¹². Como o Zn^{II} não faz reações de oxirredução e faz ligações fortes com cisteína e histidina, a natureza encontra nele uma ótima maneira de fixar determinadas estruturas em proteínas que têm como funções mais comuns replicação,

transcrição e reparo dos ácidos desoxirribonucleicos (do inglês *desoxyribonucleic acids*, DNA)¹³. É também importante destacar que muitas zinco-proteínas, tanto humanas como de organismos patogênicos, têm se demonstrado alvos atrativos no tratamento de diversas doenças, como infecções bacterianas e fúngicas, hipertensão, câncer e AIDS¹⁴. Este trabalho foca em dois desses alvos farmacológicos, discutindo estratégias de inibição utilizando complexos metálicos.

1.1.2. O uso de complexos metálicos em medicina

O uso de íons metálicos está presente em práticas médicas desde a antiguidade¹⁵. A preparação dos medicamentos se dava, contudo, numa perspectiva muito mais mágica ou mística do que científica. No século XIX, com novas descobertas em torno da estrutura química dos compostos e avanços acentuados nas técnicas de manipulação, o desenvolvimento de fármacos passou a se basear em evidências de atividade e na relação entre atividade e estrutura química. Os primeiros estudos sistemáticos de metais em medicina, datados do fim do séc. XIX até a primeira metade do séc. XX, trouxeram grandes avanços no reconhecimento de metais endógenos, bem como as doenças relacionadas a suas deficiências, além dos tratamentos para tais doenças. Além disso, embora a toxicidade de muitos metais já fosse conhecida há vários séculos, a partir do século XIX reconhece-se uma relação entre a toxicidade e o benefício médico e nutricional dependente da dosagem¹⁵.

O uso de agentes terapêuticos metálicos se iniciou com espécies como o dicianoaurato de potássio no tratamento da tuberculose e a arsfenamina (3,3'-diamino-4,4'-diidroxidiarsenobenzol) no tratamento de sífilis¹⁶, ambos usados como antimicrobianos. Além destes, compostos de prata têm sido amplamente utilizados há anos no tratamento de infecções bacterianas. Os exemplos mais antigos envolvem compostos como nitrato e tiocianato de prata(I), mas outros derivados foram introduzidos depois, como a sulfadiazina de prata, na década de 1960¹⁷. Ainda hoje, diversos estudos continuam sendo feitos em torno de complexos de Ag^I com diversos ligantes como carbenos N-heterocíclicos, fosfinas, sulfonamidas, entre outros, no tratamento de infecções¹⁷⁻¹⁹.

Atualmente, os compostos metálicos utilizados na clínica são divididos em dois grupos principais por suas aplicações: terapêuticos ou diagnósticos. No que diz respeito a agentes diagnósticos, podem ser citados como exemplos o sulfato de bário, que é usado há mais de cem anos como contraste em radiografia, compostos de gadolínio, que são utilizados como contraste para ressonância magnética nuclear, e complexos de ^{99m}Tc, ⁶⁷Ga e ¹¹¹In, desenvolvidos e

aprimorados para técnicas de rádio imagem (como as diversas cintilografias)¹⁵. Recentemente, diversos novos compostos vêm sendo desenvolvidos e testados utilizando características conhecidas de certos complexos metálicos como paramagnetismo e luminescência em conjunto com grupos orgânicos biomarcadores de doenças. São exemplos dessa abordagem estudos envolvendo complexos luminescentes de Ir^{III} para diagnóstico de câncer²⁰, além de espécies de Gd^{III} e Re^I para diagnóstico de mal de Alzheimer^{21,22}.

Compostos de platina têm uma aplicação já muito sedimentada no tratamento de câncer. A cis-diaminodicloroplatina(II), frequentemente denominada cisplatina, é um potente quimioterápico para o combate de células cancerígenas, particularmente o câncer de testículo¹⁵. Descoberta em 1965 por Rosenberg²³, ela revolucionou a terapia anticâncer²³ e impulsionou as pesquisas recentes em torno do uso de metalofármacos. A cisplatina é um intercalante do DNA, promovendo um ataque eletrofílico a nucleobases e formando adutos com ligações cruzadas, o que é a causa de sua citotoxicidade²⁴. Dois derivados de cisplatina foram aprovados para uso clínico, a carboplatina, em 1989, e a oxaliplatina, em 2002²⁵. Atualmente, novas fármacos anticâncer baseados em Pt^{II} vem sendo propostos, incluindo avanços como ligantes volumosos que promovam proteção estérica, ligantes bioativos, estruturas polinucleares, entre outros²⁴⁻²⁶.

Uma longa série de complexos de ouro(I) foi desenvolvida durante o século XX para o tratamento da tuberculose e de artrite reumatoide, dentre os quais podem-se destacar como mais importantes o aurotiomalato (Miocrisina®, Rhône-Poulenc), a aurotioglicose (Solganol®, Schering U.S.A.) e a auranofina (Fidaura®, Smith-Klein-French)²⁷. As estruturas desses compostos podem ser observadas na Figura 2.

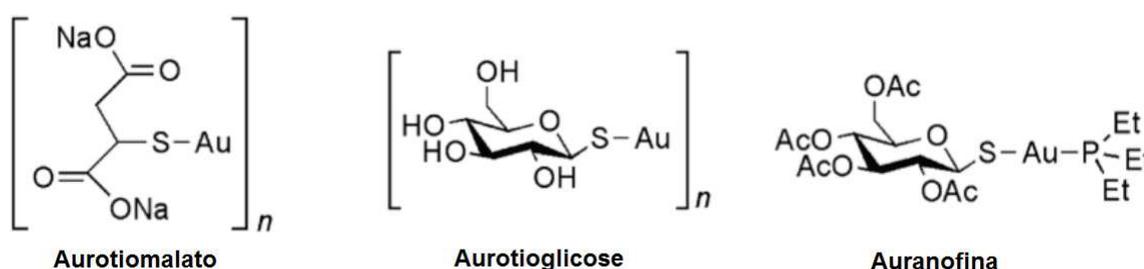


Figura 2: Complexos de ouro(I) usados no tratamento de tuberculose e artrite reumatoide.

O aurotiomalato e a aurotioglicose são compostos bastante semelhantes em que o íon Au^I está coordenado linearmente a dois ligantes tiolatos, formando oligômeros ou polímeros, e sua via de administração é parenteral²⁷. Já a auranofina, além de um ligante tiolato (tioglicose tetraacetilada) apresenta também um ligante trietilfosfina e é administrada oralmente. Todos estes compostos geram dúvidas quanto a seu mecanismo de ação, embora esteja claro que, ao

serem absorvidos, o ouro perde pelo menos um de seus ligantes e coordena-se a proteínas do sangue²⁷. Outros complexos de ouro vêm sendo estudados para o tratamento de infecções bacterianas promovidas tanto por organismos Gram-positivos quanto Gram-negativos, assim como infecções fúngicas e diversas doenças envolvendo outros parasitas, como leishmaniose e doença de Chagas, assim como no tratamento de câncer^{28,29}. Neste contexto, tanto Au^I quanto Au^{III} coordenados a diversas classes de ligantes como fosfinas mono- e bidentadas, tiolatos, carbenos N-heterocíclicos, entre outros, vêm sendo estudados^{28,29}.

A auranofina desperta especial interesse no contexto deste trabalho. Apesar de considerada mais segura que outros anti-reumáticos baseados em ouro, essa droga é menos eficiente que anti-inflamatórios não esteroidais, como o metotrexato³⁰. Contudo, mesmo não sendo hoje a opção preferida para o tratamento de artrite reumatoide, diversas novas aplicações médicas têm sido estudadas para a auranofina, como o tratamento de algumas linhagens de câncer, infecções e doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson³⁰⁻³².

Foi demonstrado que a auranofina é capaz de inibir a forma reduzida da tiorredoxina em concentrações na faixa de 10^{-9} mol L⁻¹ *in vitro*³³. A tiorredoxina é uma enzima central num sistema antioxidante capaz de controlar o estresse oxidativo. A inibição da tiorredoxina é uma das possíveis vias que levam à citotoxicidade da auranofina, e a posiciona como candidata a fármaco antitumoral³³. Recentemente, a importância da tiorredoxina na atividade das neurotoxinas do tétano e do botulismo foi demonstrada e a auranofina foi indicada como possível base para o desenvolvimento de fármacos inibidores dessas toxinas^{34,35}.

Outra importante possível nova aplicação da auranofina se relaciona à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (do inglês *human immunodeficiency virus*, HIV). Uma primeira análise neste sentido foi relatada por Shapiro e Masci³⁶ em 1996. Esses pesquisadores observaram a diminuição na contagem de linfócitos T CD4+ em um paciente intolerante ao tratamento anti-HIV então utilizado, que estava sob tratamento para psoríase com auranofina. Desde então, observou-se que a auranofina inibe a capacidade proliferativa de linfócitos T *in vitro*, além de diminuir a produção de citocinas relacionadas à inflamação em macrófagos e células T *in vivo*³⁷. Foi demonstrado que a auranofina também induz a apoptose em células da linhagem Jurkat-T³⁷. Em 2011, Lewis e colaboradores³⁷ mostraram que a auranofina leva a uma diminuição nas células reservatório do SIVmac251 (vírus da imunodeficiência de símios) em macacos rhesus infectados.

Desse modo, os metalofármacos compõem uma classe consolidada de medicamentos que permanece, ainda assim, em franco desenvolvimento. Dentre os metalofármacos, a auranofina desperta especial atenção por tratar-se de uma droga já aprovada para uso em humanos, mas

que apresenta uma série de potenciais novas aplicações em estudo³⁰. O presente trabalho, tendo em vista essa interessante característica, busca compreender a interação entre a auranofina e outros complexos fosfinaouro(I), estruturalmente similares, com zinco-proteínas, como uma contribuição ao entendimento das atividades biológicas dessa classe de compostos.

1.2. Zinco com função estrutural como alvos de interesse: dedos de zinco.

As proteínas dedos de zinco (do inglês *zinc fingers*, ZF) constituem a classe mais abundante de zinco-proteínas em humanos. Nos domínios ZF o íon Zn^{II} apresenta papel estrutural essencial para a atividade da proteína.

Essas proteínas são classicamente fatores de transcrição, mas também estão envolvidas em outros processos celulares como reparo e replicação de DNA, sinalização celular, metabolismo e apoptose, e as exercem por reconhecerem sequências específicas de ácidos nucleicos^{13,38}. Nelas, o íon zinco(II) se coordena tetraedricamente a resíduos de cisteína (Cis) e histidina (His), permitindo a classificação dos ZFs entre Cis_2His_2 , Cis_3His e Cis_4 . A Figura 3 representa a estrutura cristalina da proteína ZIF268 de *Mus musculus* interagindo com um trecho de fita de DNA (PDB 1A1L). Ela apresenta três domínios ZF do tipo Cis_2His_2 .

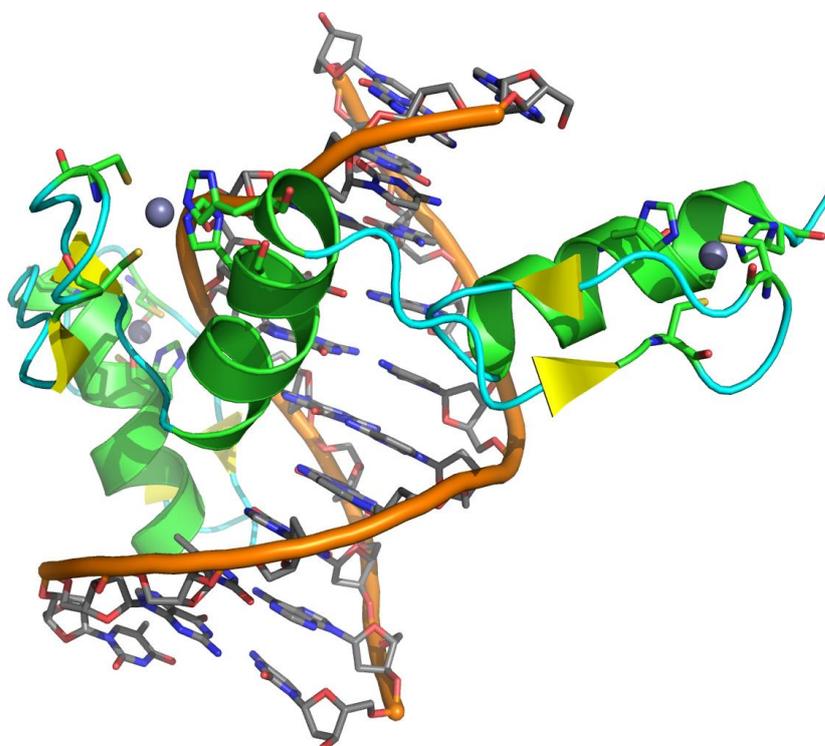


Figura 3: Proteína ZIF268 de *Mus musculus* em estrutura cristalina com um trecho de fita de DNA (PDB 1A1L). Os íons Zn^{II} estão destacados (esferas cinza) bem como os resíduos de aminoácidos que coordenam estes íons.

Um exemplo importante de proteínas dedos de zinco é o grupo das poliadenosina difosfato ribose polimerases (do inglês *polyadenosine diphosphate ribose polymerase*, PARP). Essas enzimas já foram chamadas de “os anjos guardiões do DNA” por desempenharem um papel central na detecção e reparo de regiões rompidas da fita de DNA^{38,39}. Outro exemplo interessante é a proteína especial 1 (do inglês *special protein 1*, Sp1), um fator de transcrição específico para a enzima RNA polimerase II, possuindo três domínios ZF do tipo Cis_2His_2 ⁴⁰. Ela pertence a uma família que inclui pelo menos outras vinte estruturas entre proteínas Sp e fatores de Krüppel⁴¹. Uma característica interessante do Sp1, e de outras proteínas de seu grupo, é que ele é superexpressado em certos tipos de células tumorais⁴¹.

Há grande interesse do ponto de vista farmacêutico nas proteínas dedos de zinco, principalmente como alvos para fármacos antitumorais justamente devido às suas interações com oncogenes e supressores de tumor³⁸. Nesse contexto, a inibição dos ZFs é desejada. A perda ou substituição do Zn^{II} assim como a mutação dos resíduos que se coordenam ao metal frequentemente levam à perda de estrutura e da atividade biológica dessas proteínas⁹.

Muitos compostos foram planejados visando a inibição de ZFs e eles seguem duas estratégias gerais: a remoção do Zn^{II} através de um composto quelante específico é uma dessas estratégias, representada por moléculas como o bis-tiodiazolbenzeno-1,2-diamina⁴²; e o ataque eletrofilico a um dos aminoácidos ligados ao metal, promovendo sua descoordenação, realizada por moléculas como 3-nitrobenzamida, ditiobisbenzamida, azodicarbonamida, entre outras¹³.

Uma abordagem alternativa para a inibição de zinco-proteínas, na busca por fármacos progressivamente mais específicos e seguros, é o uso de compostos de coordenação. Sabe-se que diversos íons metálicos como Cd^{II} , Hg^{II} , Pb^{II} , Ni^{II} , Pt^{II} , Co^{II} , Pd^{II} , Au^I e Au^{III} realizam ataque eletrofilico aos resíduos de aminoácidos coordenados ao Zn^{II} nos sítios ativos de zinco-proteínas. Essa é, possivelmente, a principal causa da toxicidade de metais como Cd^{II} , Hg^{II} e Pb^{II} ^{43,44}. A atuação destes íons metálicos é totalmente inespecífica, contudo, complexos de coordenação podem ser preparados para modular os diversos fatores que interferem na especificidade e na estabilidade em meio biológico, como solubilidade, labilidade, simetria e eletrofilicidade, através de variáveis bem controláveis como natureza dos ligantes, geometria e estado de oxidação do metal⁴⁵. Essa versatilidade torna os compostos de coordenação candidatos a inibidores de zinco-proteínas e, conseqüentemente, candidatos a novos fármacos. Muitos metalo-fármacos têm sido estudados para a inibição dos ZFs, para a qual se propõe, em geral, um mecanismo de ação por um ataque eletrofilico, seguido de substituição do Zn^{II} pelo metal do fármaco.

A inibição de PARP, por exemplo, se mostrou eficiente na sensibilização de algumas linhagens de câncer resistentes ao tratamento com antitumorais como a cisplatina^{38,46}. A Figura 4 apresenta o ZF aminoterminal da PARP-1, do tipo Cis₃His, assim como alguns complexos de ouro capazes de inibir *in vitro* este domínio e um modelo de inibição proposto.

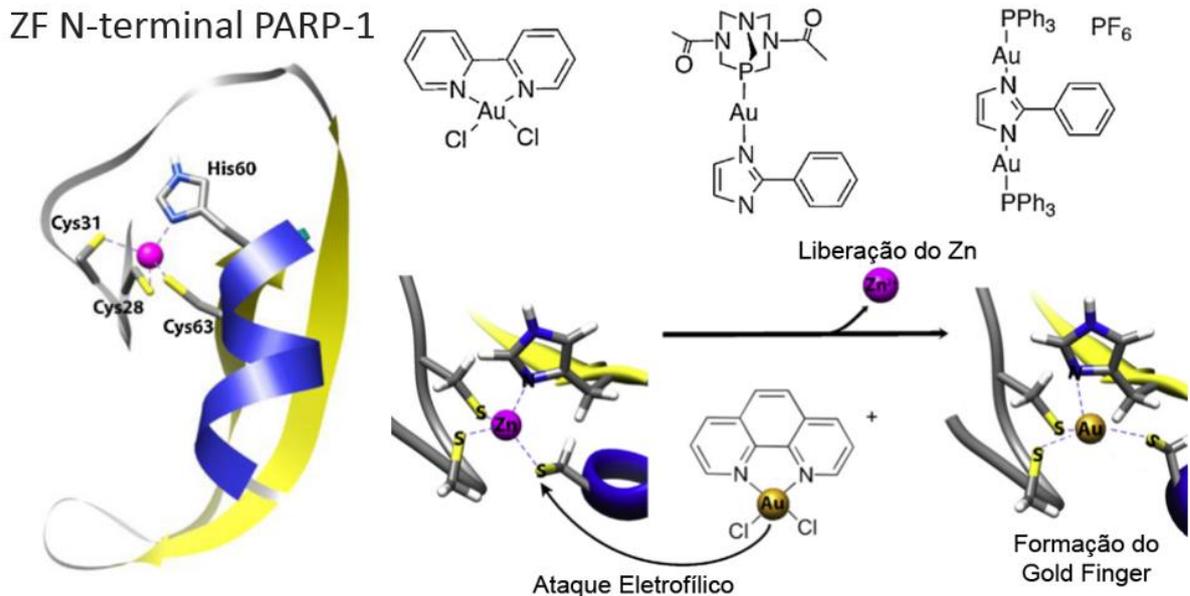


Figura 4: ZF aminoterminal da PARP-1, com resíduos coordenados ao Zn^{II} em destaque. Alguns complexos de Au^I e Au^{III}, inibidores deste domínio, são mostrados assim como uma proposta para seu mecanismo de ação por ataque eletrofílico à cisteína do ZF. Figura adaptada da referência 38.

Outro exemplo interessante desse tipo de aplicação são complexos de Co^{III} coordenados a bases de Schiff tetradentadas e ligantes axiais lábeis^{13,47}. Um desses compostos, o Doxovir®, com dois 2-metil-imidazol como ligantes axiais, foi aprovado para o tratamento de psoríase, mas seu uso tem sido estudado para o tratamento de herpes e infecções por adenovírus e papilomavírus^{48,49}. O mecanismo de ação proposto para este fármaco, no caso da psoríase, é o ataque e coordenação do Co^{III} por uma de suas posições axiais a uma histidina coordenada ao Zn^{II} dos domínios ZF presentes no fator de transcrição Glis 1, associado à doença⁴⁹.

1.2.1. A proteína 7 do nucleocapsídeo do vírus HIV-1 (NCp7)

Um alvo de destaque dentre as proteínas dedos de zinco é uma proteína do nucleocapsídeo do vírus HIV-1, o NCp7. Essa proteína possui dois domínios de ZFs, do tipo Cis₃His, e é essencial em diversas funções do ciclo viral⁵⁰, resumidas na Figura 5. A remoção dos íons Zn^{II}

do NCp7 causa a inibição da proteína⁵¹. Além disso, é interessante notar que o NCp7 é mutacionalmente não permissivo, uma vez que mutações levam a vírus não infecciosos⁵¹.

A sensibilidade a mutações e a possibilidade de inibição pela remoção do Zn^{II} tornam o NCp7 um alvo muito atrativo, uma vez que um inibidor desta proteína poderia ser ativo frente a diversos mutantes do HIV-1, permanecendo eficiente mesmo frente a cepas resistentes aos demais fármacos das terapias combinatórias.

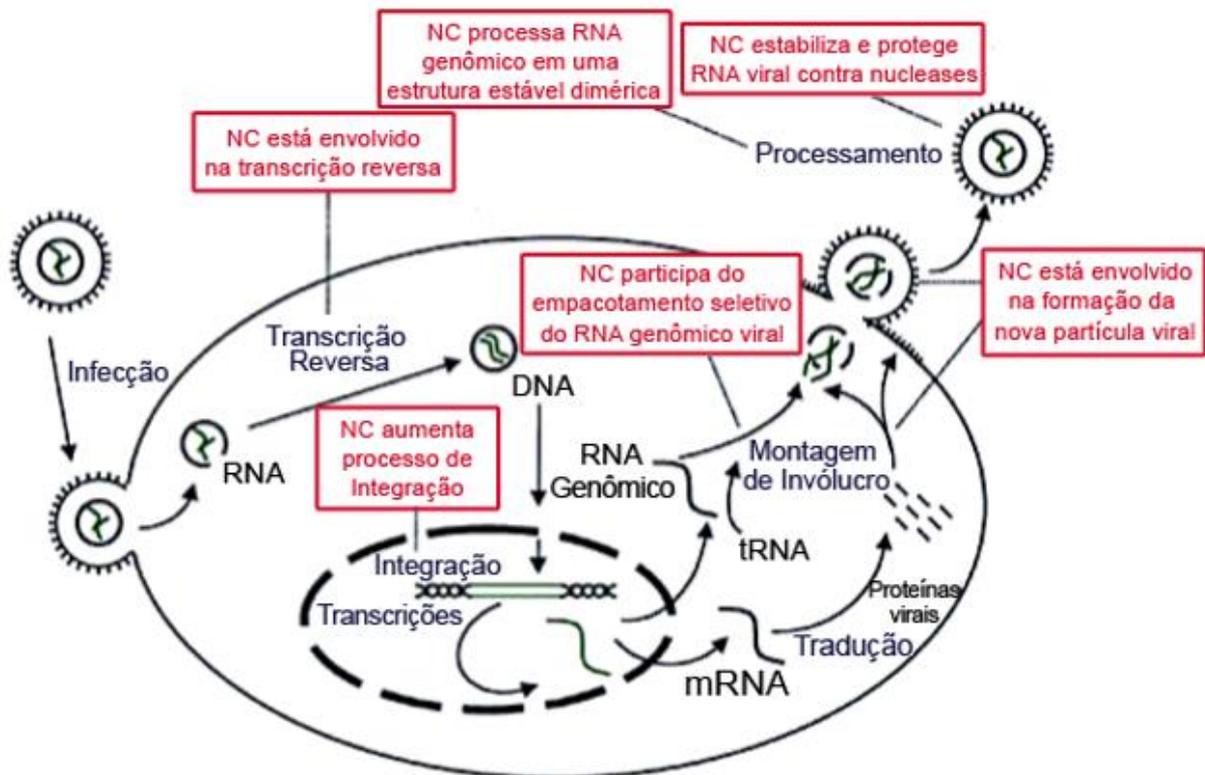


Figura 5: Diversas funções do ciclo viral do HIV-1. Figura adaptada da referência 50.

Existem diversos estudos sobre a remoção de Zn^{II} em NCp7 utilizando compostos orgânicos, tanto como quelantes quanto como agentes eletrofílicos⁵¹, contudo compostos de coordenação também vêm sendo pesquisados. Complexos de fórmula $[M(X)Cl]_n$, no qual M pode ser Pt^{II} , Pd^{II} e Au^{III} e X pode ser terpiridina (terpy) ou dietilenotriamina (dien), mostram que a cinética de substituição do Zn^{II} segue uma ordem de velocidade $Pt < Pd < Au$ e $dien < terpy$ ^{40,52}.

Estudos envolvendo Au^{III} com outros ligantes, assim como Au^I , também foram realizados⁵³⁻⁵⁵ e comprovam a eficiência na substituição do Zn^{II} no NCp7 promovida pelos complexos estudados, em particular os complexos de Au^{III} ou auranofina (Au^I). Como o ouro,

em geral, permanece ligado ao peptídeo, a estrutura formada é conhecida como dedo de ouro (do inglês *gold finger*, AuF).

A interação do NCp7 com os ácidos nucleicos se dá amparada por interações não covalentes diversas. Uma interação de grande importância nesses sistemas é o empilhamento- π do resíduo de triptofano W37 com as nucleobases citosina e guanina⁵⁶. Anzellotti e colaboradores⁵⁶ exploraram esse empilhamento- π desenvolvendo complexos de Pt^{II} com nucleobases. Os autores confirmaram a interação triptofano-citosina/guanina e ressaltaram a importância das interações não covalentes como chave de especificidade.

Abbehausen e colaboradores⁵⁷ sintetizaram e caracterizaram uma série de complexos de fórmula genérica [AuL(PPh₃)]⁺, onde PPh₃ representa a trifenilfosfina e L representa ligantes N-heterocíclicos picolinatos, e analisaram a interação desses complexos com ZFs pelas técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (do inglês *nuclear magnetic resonance*, NMR), dicroísmo circular e espectroscopia de massas. Os resultados demonstraram que o Zn^{II} é rapidamente substituído pelo Au^I, que se coordena à cadeia peptídica mantendo a PPh₃ coordenada por longo tempo. Esse resultado é bastante interessante pela possível aplicação de compostos fosfinaouro(I) como inibidores de ZFs, com versatilidade de variações tanto nas cadeias laterais da fosfina quanto no ligante de saída (L) para obtenção de compostos mais seletivos e seguros. Contudo, a permanência da fosfina coordenada coloca também estes complexos, juntamente com o iodoacetato e a N-etil-maleimida, como sondas para estrutura e função dos ZFs, particularmente pelas vantagens associadas ao NMR de ³¹P.

A natureza “mole” do ouro sugere que a interação do ouro nesses sistemas se dê através do ataque eletrofílico aos resíduos de cisteínas presentes no sítio de coordenação dos ZFs^{39,57-59}, em oposição ao ataque observado do Doxovir às histidinas⁴⁹. Contudo, a verificação desta hipótese não pôde se dar por estudos cristalográficos, uma vez que, até agora, não se obtiveram cristais dos AuFs ou ZFs, devido à flexibilidade das cadeias dessas proteínas. Entender o modo de coordenação do ouro nos AuFs poderia auxiliar no entendimento do mecanismo do ataque promovido por seus complexos, com evidente implicação no planejamento de novos e mais seletivos inibidores. É nesse sentido que este trabalho se coloca, buscando utilizar a técnica de espectroscopia de absorção de raios X para ampliar o entendimento da esfera de coordenação do ouro em AuFs.

Além disso, a questão de especificidade é sempre o desafio na inibição de zinco-proteínas. Desse modo, um modelo de ZF humano foi selecionado para comparações com o NCp7, buscando diferenças de reatividade. O modelo selecionado foi o terceiro domínio ZF do Sp1.

1.3. Zinco com função catalítica como alvos de interesse: metalo- β -lactamases

Como destacado no item 1.1.1, as zinco-enzimas compõem um grupo bastante diverso em termos de funções, mas todas são caracterizadas pela presença de pelo menos um íon Zn^{II} catalítico, quase sempre coordenado a uma molécula de água (ou hidróxido). Diversas dessas enzimas estão associadas à hidrólise de ésteres e amidas, fundamentais para o metabolismo, como carboxipeptidases, aminopeptidases, colagenases, termolisina e glioxalase II³. Outras zinco-enzimas não estão associadas com degradação, mas com síntese. Dentre elas a RNA polimerase, a transcriptase reversa e a excinuclease atuam na síntese de ácidos nucleicos, enquanto a deidroquinato sintase e a aspartame transcarbamilase atuam na síntese de aminoácidos e nucleotídeos, respectivamente³. Algumas zinco-enzimas estão também relacionadas a processos redox embora o próprio Zn^{II} não mude de estado de oxidação durante a reação, mas algum cofator como o dinucleotídeo de nicotinamida e adenina. Um exemplo desse tipo de enzima é a álcool desidrogenase³.

A inibição de zinco-enzimas é uma estratégia no tratamento de diversas doenças. Uma possível abordagem neste sentido é o bloqueio dos sítios ativos usando compostos quelantes com alta afinidade por Zn^{II} . Essa abordagem é utilizada em casos como da enzima conversora da angiotensina (do inglês *angiotensin-converting enzyme*, ACE), uma metaloproteinase que converte a angiotensina I (um decapeptídeo) em angiotensina II (um octapeptídeo), que tem atividade vasoconstritora.⁶⁰

A ACE desempenha um papel fundamental na regulação da pressão sanguínea e sua inibição é efetiva no combate à hipertensão e a outras doenças relacionados ao sistema cardiovascular⁶⁰. Ela é alvo de inibidores sintéticos como captopril (Ácido (2S)-1-[(2S)-2-metil-3-sulfanilpropanoil]-pirrolidino-2-carboxílico), lisinopril, enalapril e fosinopril⁶⁰, todos comercialmente disponíveis. A Figura 6 mostra uma representação do sítio ativo de uma ACE de *Drosophila melanogaster* coordenado ao inibidor captopril retirado da estrutura cristalina PDB 2X8Z⁶¹.

Outro interessante grupo de zinco-enzimas reconhecidas como alvos farmacológicos é o das anidrases carbônicas, um conjunto de isoenzimas responsáveis por mediar a interconversão de dióxido de carbono e bicarbonato na faixa de pH biológico. Inibidores específicos dessas enzimas têm aplicações terapêuticas diversas, entre elas tratamento de glaucoma, câncer e obesidade³⁸. Os primeiros inibidores utilizados foram sulfonamidas, contudo essa classe de moléculas possui baixa seletividade⁶², ainda sim, a acetazolamina (Diamox) ainda está disponível no mercado para o tratamento de glaucoma por uso tópico. Novos inibidores

específicos para determinadas isoformas foram desenvolvidos⁶², incluindo interessantes complexos de íons como Zn^{II} , Cu^{II} , Ni^{II} e Co^{II} além de lantanídeos(III) com sulfonamidas – que demonstraram aumentar a atividade dos ligantes frente a isoformas específicas⁶³.

Recentemente foi aprovado o uso da suberoilânilida do ácido hidroxâmico (Vorinostat) para o tratamento de um linfoma cutâneo. Essa substância atua através da inibição de um grupo de histona deacetilases dependentes de zinco, associadas a esse tipo de câncer¹⁴. Outros exemplos de zinco-proteínas cuja inibição tem interesse terapêutico são metalo-proteinases de matriz, farnesil transferase, adenosina deaminase, superóxido dismutase, entre outras^{9,14}.

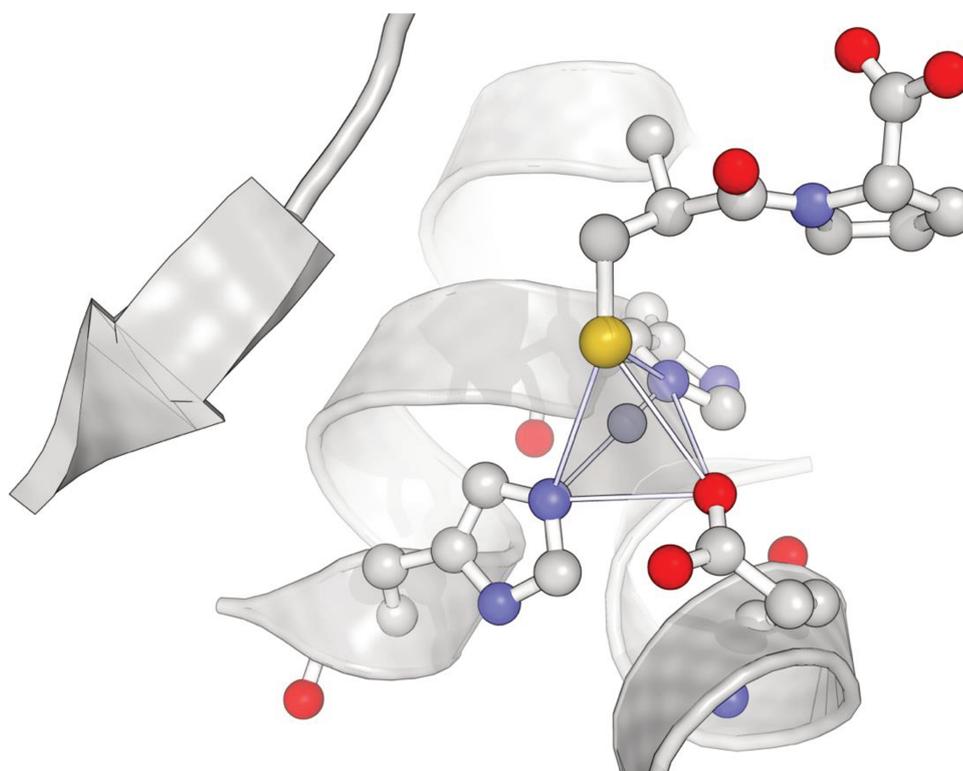


Figura 6: Sítio ativo da ACE de *Drosophila melanogaster* coordenado ao inibidor captopril (PDB 2X8Z)⁶¹. Em destaque resíduos de aminoácidos coordenados ao Zn^{II} formando, com o grupo tiolato do inibidor, uma estrutura tetraédrica.

É importante ressaltar que frente a tanta diversidade no que diz respeito a zinco-proteínas, interessa do ponto de vista da química medicinal diferenciar proteínas que estejam envolvidas em processos de doença daquelas que estão cumprindo adequadamente seu papel metabólico, com o intuito de promover uma inibição seletiva das primeiras, com eficiência terapêutica e com o mínimo de efeitos adversos.^{9,14}.

1.3.1. β -lactamases e resistência bacteriana

A Organização Mundial de Saúde tem alertado que a resistência bacteriana a antimicrobianos é um problema global. Em recentes relatórios da organização⁶⁴⁻⁶⁶, a resistência bacteriana é classificada como um dos maiores desafios da saúde pública global e um problema que ainda vem crescendo. Essa não é uma observação surpreendente. Há mais de 70 anos antibióticos vêm sendo usados como uma panaceia das infecções, mesmo em casos inapropriados⁶⁶. Esse é precisamente o cenário para o qual o próprio Alexander Fleming – ganhador do prêmio Nobel pelo desenvolvimento da penicilina – apontou em 1945⁶⁷, em que antibióticos são utilizados sem um preciso controle de suas dosagens e organismos desenvolvem resistência. E se o problema da resistência a antimicrobianos é um desafio para as administrações públicas no que diz respeito a campanhas de conscientização, educação formal e informal e políticas de saúde, ele é certamente um desafio para a comunidade científica, da qual se espera uma resposta tão logo quanto possível.

Neste panorama destaca-se o caso dos antibióticos β -lactâmicos. Embora esta seja uma classe antiga de antibióticos comerciais (a penicilina foi o primeiro destes compostos disponibilizados para consumo, há mais de sete décadas⁶⁸), os β -lactâmicos continuam sendo a principal família de fármacos utilizados no tratamento de infecções bacterianas graves, causadas por organismos resistentes a múltiplos antibacterianos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*⁶⁹. Estes compostos se ligam e inibem uma enzima essencial ao processo de síntese de parede bacteriana, a transpeptidase, também conhecida como proteína que se liga à penicilina (do inglês *penicilin binding protein*)^{70,71}.

O desenvolvimento de bactérias resistentes acentuou as buscas por novas classes de compostos ativos. Dentre eles, novos antibacterianos β -lactâmicos como as cefalosporinas e, mais recentemente, os carbapenêmicos foram desenvolvidos. Dentre os mecanismos de resistência podem-se destacar quatro principais⁷²:

- I. Produção de β -lactamases,
- II. Mutações nas transpeptidases, diminuindo sua afinidade pelos β -lactâmicos,
- III. Redução da permeabilidade da membrana celular,
- IV. Efluxo.

As β -lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel beta-lactâmico responsável pela atividade destes compostos e representam o mais importante mecanismo de resistência. Ambler

as classificou em quatro classes baseadas na sequência de aminoácidos: A, B, C e D^{73,74}. As classes A, C e D são evolucionariamente distintas, mas têm em seu sítio ativo uma cadeia lateral de serina que atua como nucleófilo e, por isso, são chamadas de serina- β -lactamases (SBLs). A classe B compreende as metalo- β -lactamases (MBLs), que são caracterizadas por apresentarem íons zinco coordenados no sítio ativo e diretamente envolvidos nos mecanismos de hidrólise^{73,74}.

As MBLs podem ainda ser divididas em três classes, de acordo com a estrutura dos sítios ativos e a reatividade. A Figura 7, adaptada da referência 73, apresenta as estruturas dos sítios ativos de cada uma dessas classes. Destaca-se que as enzimas da classe B1 podem atuar tanto com apenas um Zn^{II} coordenado quanto com dois, como mostra a figura.

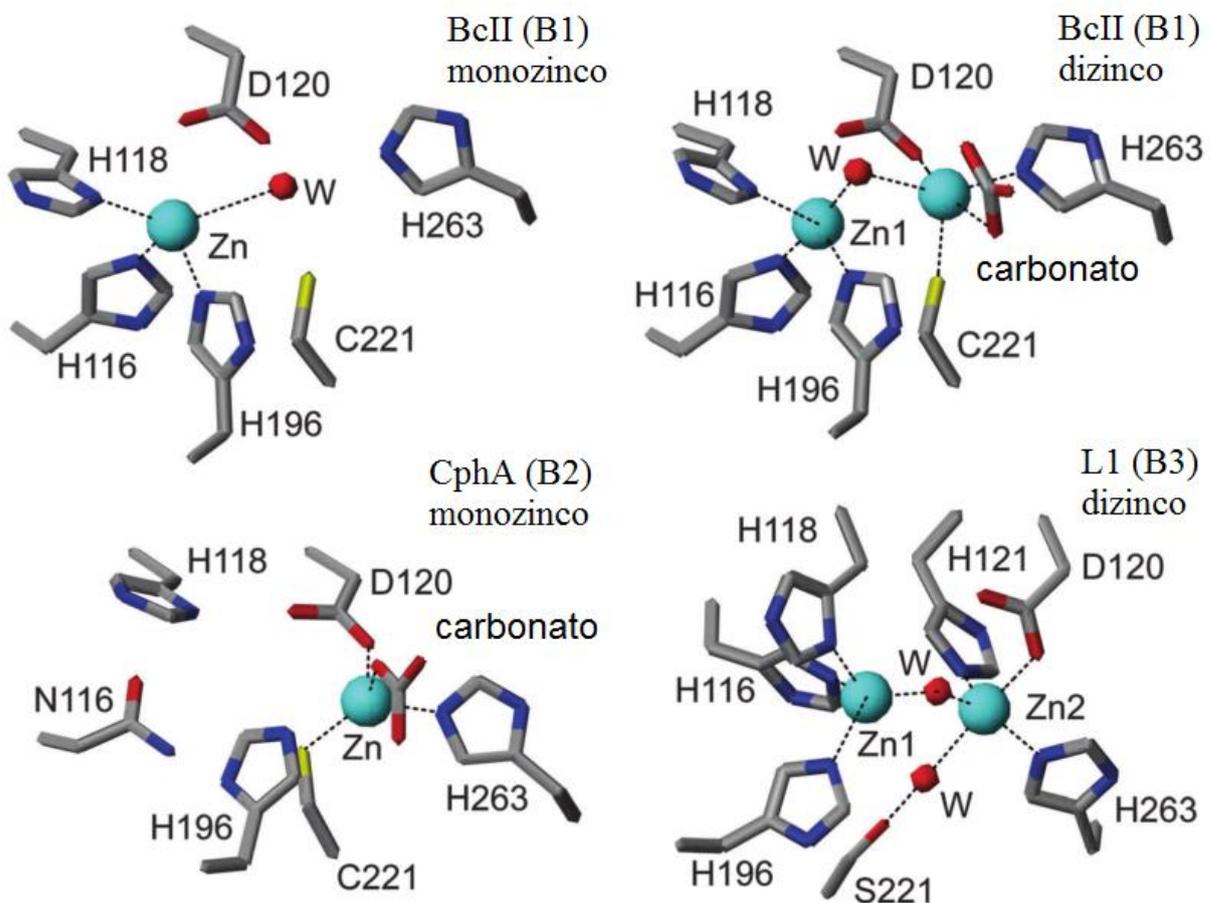


Figura 7: Representação dos sítios ativos de diferentes classes de MBLs. Figura adaptada da referência 73.

As classes B1 e B3 incluem metalo- β -lactamases de amplo espectro, hidrolisando penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. A classe B2, contudo, é composta por carbapenemases exclusivas, em que somente as formas monometálicas são ativas, com o Zn^{II}

coordenado num sítio análogo ao sítio de cisteína das B1. Nesta classe, quando um segundo íon zinco é coordenado, a atividade enzimática é inibida^{75,76}.

As propostas de mecanismos catalíticos das MBLs são bastante consistentes, principalmente para as enzimas bimetálicas⁷⁷⁻⁷⁹, no caso das MBLs monometálicas, o mecanismo apresenta grande similaridade com outras zinco-hidrolases, como a carboxipeptidase⁷⁶.

A primeira MBL identificada e uma das mais descritas é a BcII de *Bacillus cereus* (da classe B1). Ela foi primeiramente cristalizada e descrita como enzima monometálica, cujo mecanismo, como representado na Figura 8A, se inicia pela coordenação do oxigênio do anel β -lactâmico ao zinco, mudando o número de coordenação de 4 para 5. Em seguida, um aspartato desprotona a água presente no sítio que pode, então, atacar a carbonila. O oxigênio abandona o zinco enquanto o nitrogênio é agora protonado pelo aspartato e o produto de hidrólise é liberado. Uma molécula de água do meio se coordena agora ao zinco, regenerando o catalisador⁸⁰.

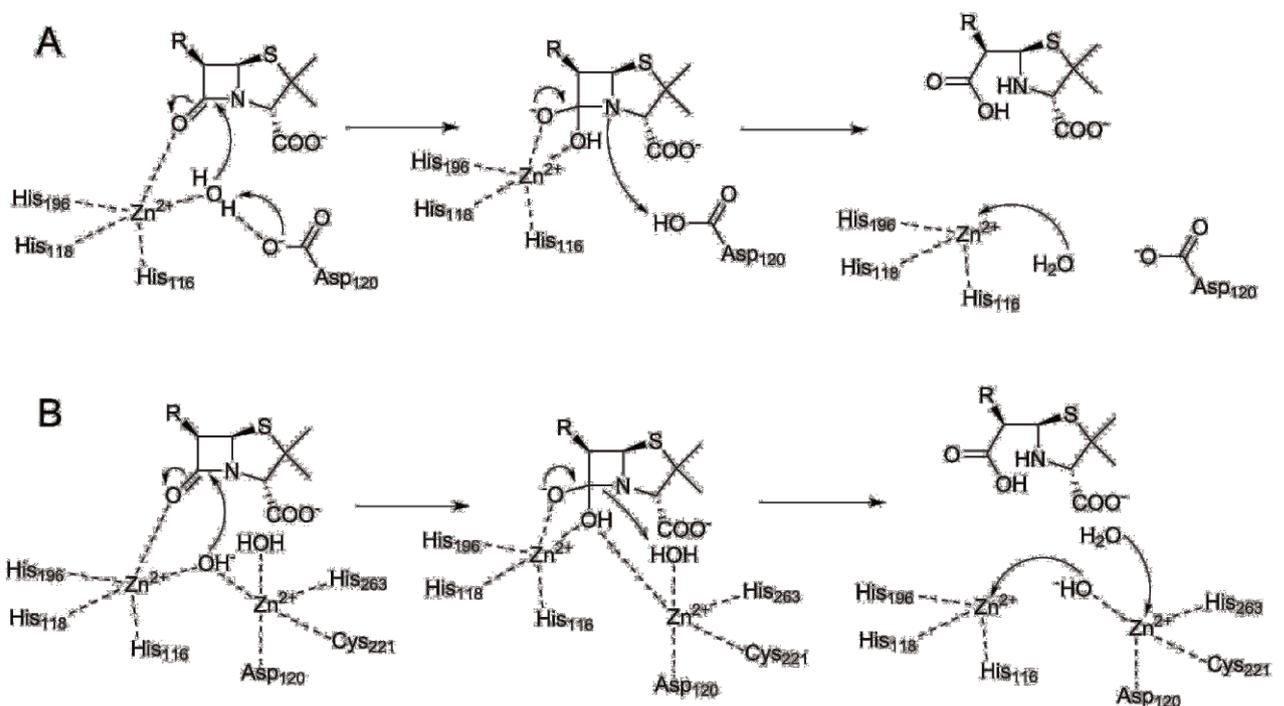


Figura 8: Mecanismo da reação catalisada por MBLs. A: BcII (B1) em atuação como enzima monometálica. B: CcrA (B1) bimetálica. Adaptado da referência 80.

Uma proposta como a da Figura 8B, construída para a MBL CcrA (também pertencente ao grupo B1), é adequada para MBLs bimetálicas. O ataque eletrofílico à carbonila é realizado pelo grupo hidroxila em ponte enquanto o próton atacado pelo nitrogênio vem da molécula de água vizinha⁸⁰.

Uma estratégia eficiente para superar a resistência causada por várias SBLs é administrar conjuntamente com o antimicrobiano um inibidor de β -lactamase. São exemplos deste tipo de terapia combinatória, ácido clavulânico com amoxicilina e tazobactam com piperacilina, que já são amplamente utilizadas na clínica médica. Contudo, não se conhece ainda um inibidor de uso clínico para MBLs. Desta forma, o desenvolvimento de inibidores para as MBLs pode representar um grande passo na luta contra a resistência bacteriana e beneficiar o gerenciamento de infecções⁸¹.

Alguns compostos foram investigados como inibidores de MBLs e alguns apresentaram atividade inibitória da ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$ *in vitro*. Dentre eles estão compostos como derivados de β -lactama e ciclobutanona, derivados do ácido borônico, do ácido succínio e do ácido ftálico, as piridinas dicarboxilatos, o ebselen e tióis, como o ácido tiomandélico e o próprio captopril, assim como numerosos quelantes, como os ácidos 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético e 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético⁸²⁻⁸⁹.

Devido às reações cruzadas com outras metaloenzimas do paciente, mesmo os inibidores mais ativos *in vitro* não oferecem especificidade para serem usados na clínica⁹⁰. Portanto, a busca por inibidores de maior especificidade, que tenham utilidade clínica, é um problema de grande relevância para toda comunidade científica.

Refletindo novamente sobre a interação de metais com zinco-proteínas, a substituição dos íons Zn^{II} por vários íons metálicos nas MBLs já foi demonstrada há mais de 40 anos⁹¹. Particularmente, enzimas substituídas com Co^{II} têm sido utilizadas para análises espectrofotométricas na região do UV-Vis^{91,92}, enquanto aquelas substituídas com $^{113}\text{Cd}^{\text{II}}$ são especialmente utilizadas para análises por NMR⁹³.

Em 2007, Baradau e Page⁹² reportaram a atividade da BcII substituída com Cd^{II} , Co^{II} e Mn^{II} , bem como sua variação de acordo com o pH do meio, demonstrando que em algumas faixas de pH diferente do fisiológico e para alguns substratos a atividade das enzimas substituídas *in vitro* pode ser maior do que a da enzima nativa, mas em pH fisiológico é sempre menor.

Mais recentemente, Baier e colaboradores⁹⁴ mostram que diferentes MBLs permanecem ativas *in vitro* quando substituídas com Cd^{II} , Co^{II} , Fe^{II} , Mn^{II} e Ni^{II} , com atividades aproximadamente iguais ou, na maior parte dos casos, inferiores à atividade das enzimas contendo Zn^{II} , em pH 7,5.

Porém, sais contendo íons de metais de transição também atuam como inibidores das MBLs. Os íons Fe^{II} , Fe^{III} , Cu^{II} e Hg^{II} são reportados como inibidores *in vitro*⁹⁵⁻⁹⁸. Íons ferro e cobre, da primeira série de transição, estão, contudo, presentes nos organismos⁹⁹, demonstrando

que, ao menos nos níveis de biodisponibilidade, sua atividade inibitória não é suficientemente grande. No que diz respeito ao mercúrio, pertencente à terceira série de transição, é possível, embora muito pouco provável, que se alcance um fármaco de uso interno baseado neste metal, já que o mercúrio está entre os mais tóxicos dos elementos, sem qualquer benefício biológico conhecido⁹⁹. Mas sabe-se que o íon mercúrio(II) interage muito bem com aminoácidos que contêm enxofre¹⁰⁰. Particularmente, vários complexos deste metal com L-cisteína têm constantes de formação significativamente maiores do que seus complexos com iodeto, cianeto, sulfeto e tiosulfato, entre outros¹⁰¹.

Compostos de coordenação de metais de transição parecem, dessa forma, interessantes candidatos a inibidores de MBLs, embora a verificação dessa hipótese tenha sido, até o presente momento, negligenciada na literatura, salvo o ácido 4-cloromercúrio-benzóico^{82,95,97}. Esse organomercúrio foi capaz de potencializar a atividade do β -lactâmico imipenem frente a algumas cepas bacterianas⁸².

Dentro da abrangência deste projeto, foram selecionados alguns complexos metálicos fosfinaouro(I), partindo de duas hipóteses centrais: que este metal poderia atuar de maneira semelhante ao que já foi demonstrado para o mercúrio frente a MBLs, além de apresentar, frente a MBLs, um comportamento semelhante ao observado para ZFs. Os complexos selecionados foram testados frente a um modelo de enzimas β -lactamases de *B. cereus*, através de uma reação de hidrólise de um composto β -lactâmico cromóforo. Embora alguns complexos comerciais simples de Au^{III} e outros complexos isoeletrônicos de Pd^{II} e Pt^{II} tenham sido testados, mais atenção foi dada aos complexos fosfinaouro(I), em virtude dos interessantes resultados obtidos em reações desses complexos com ZFs⁵⁷ e a possibilidade de comparação entre essas duas classes de zinco-proteínas.

1.4. A espectroscopia de absorção de raios X no estudo de biomoléculas

Como discutido anteriormente a estrutura dos AuFs (dedos de ouro) não é conhecida. Até o momento não foi possível obter cristais dessas moléculas, impossibilitando o uso da técnica de difração de raios X de monocristal. A espectroscopia de absorção de raios X (do inglês *x-ray absorption spectroscopy*, XAS) é uma técnica extremamente poderosa, utilizada em estudos estruturais quando é impossível a obtenção de monocristais. Inclusive, XAS pode ser aplicada tanto em amostras no estado sólido quanto em solução, uma significativa vantagem no contexto de biomoléculas, uma vez que esta classe de compostos muitas vezes pode perder sua estrutura

nativa ao sair de solução aquosa. Nesse sentido, esta técnica foi selecionada para um estudo estrutural dos AuF neste trabalho.

A técnica de XAS se baseia na exposição de uma amostra a uma fonte variável de raios X. Todo material é caracterizado por aumentos abruptos na intensidade da absorção de raios X em valores específicos de energia da radiação. Essas regiões – notavelmente estreitas – de aumento de intensidade de absorção são chamadas de bordas de absorção e estão relacionadas à excitação de um elétron interno para um orbital não preenchido de menor energia (do inglês *lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO) ou para o contínuo (efeito fotoelétrico)¹⁰². As bordas de todos os compostos de um determinado elemento ocorrem próximas, de modo que, selecionando a faixa de energia varrida num experimento, o espectro obtido pode conter informações sobre apenas um elemento presente na amostra, o que torna a técnica elemento-seletiva.

As bordas de absorção são identificadas de acordo com a origem dos elétrons nela excitados. Assim, na borda K elétrons do orbital 1s são excitados, enquanto na borda L ocorre a promoção de elétrons dos orbitais 2s e 2p¹⁰².

Os espectros de XAS são usualmente divididos em duas regiões distintas para interpretação^{102,103}. A região próxima à borda é conhecida como XANES (do inglês *x-ray absorption near edge structure*), de onde se obtém informações da estrutura eletrônica do elemento estudado. O XANES reflete, portanto, aspectos importantes da estrutura dos complexos como geometria e número de coordenação, estado de oxidação do átomo absorvedor, densidade eletrônica e a natureza dos ligantes coordenados^{102,103}. Ela permite, inclusive, diferenciar mesmo átomos leves na primeira esfera de coordenação, como C, N, O, P ou S¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

Em valores de energia superiores à necessária para se atingir o LUMO, o elétron promovido possui energia para ser ejetado para o contínuo. Todo excesso de energia é carregado como energia cinética pelo fotoelétron, que pode ser caracterizado em termos de comprimento de onda, se o elétron for tratado como um fenômeno ondulatório¹⁰². As oscilações da região conhecida como EXAFS (do inglês *extended x-ray absorption fine structure*) são consequência direta da natureza ondulatória do fotoelétron ejetado pelo átomo absorvedor que sofre espalhamentos nos átomos vizinhos (espalhadores). A onda eletrônica “saindo” do átomo absorvedor sofre interferência das componentes espalhadas pelos átomos espalhadores nas vizinhanças¹⁰² e essa interferência fica registrada no espectro, dependendo de distâncias e ângulos de ligação.

O uso da técnica de XAS em experimentos de bioinorgânica tem rendido interessantes resultados¹⁰⁷. Dois exemplos notáveis são a proposição de estruturas para o sítio de manganês e cálcio produtor de oxigênio no fotossistema II¹⁰⁸ bem como para o cofator de ferro e molibdênio da nitrogenase¹⁰⁹⁻¹¹¹. E não apenas útil na busca por resposta em questões científicas desafiadoras, XAS se desenvolveu até tornar-se uma técnica padrão no estudo de amostras não cristalinas, especialmente aquelas que contenham íons como Au^I, K^I, Zn^{II}, Ca^{II}, Mg^{II} e Ga^{III}, silenciosos em outras técnicas espectroscópicas¹⁰⁴.

Pelas características apresentadas, fica evidente que a técnica de XAS é bastante útil no estudo do sítio ativo de metaloproteínas¹⁰³. Exemplos desta aplicação incluem a elucidação da estrutura local de uma Cu/Zn superóxido dismutase em solução usando XANES combinado com cálculos *ab initio*¹¹². Estudos complementares foram realizados, por exemplo, através de miméticos dessa enzima utilizando XAS na caracterização e no entendimento de mecanismos catalíticos¹¹³. EXAFS foi usado por Chan e colaboradores¹¹⁴ para verificar a esfera de coordenação do Zn^{II} em estudos sobre as propriedades de ligação deste íon ao ZF C-terminal da proteína supressora do tumor de Wilms¹¹⁴. A interação de zinco-enzimas como metionina sintase, anidrase carbônica e metaloproteinases de matrix com substratos e inibidores tem sido também estudada pela técnica¹¹⁵⁻¹¹⁷. Estudos sobre o papel individual de íons Zn^{II} em enzimas homobimetálicas têm sido realizados aproveitando a seletividade de XAS para elementos químicos^{118,119}. Exemplos interessantes envolvem o uso de Co^{II} e Cd^{II} substituindo sítios específicos em enzimas como fosfatases alcalinas e MBLs^{118,120}. Ainda sobre MBLs, Breece e colaboradores¹²¹ mostraram a movimentação do sítio catalítico durante a hidrólise de nitrocefina, estudando a variação da distância Zn^{II}-Zn^{II} por XAS.

XAS tem sido também amplamente utilizada para investigar a interação de complexos metálicos com biomoléculas. Estudos envolvendo drogas de Pt^{II} como a cisplatina frente a moléculas como cisteína, glutatona, metionina, assim como estudos do comportamento dessas drogas em solução aquosa em diversas condições de pH, concentração salina, etc, foram realizados utilizando tanto XANES quanto EXAFS¹⁰⁴. E não apenas complexos de Pt^{II}, mas também Pt^{IV}, Ru^{III}, Ga^{III}, Co^{II} e Co^{III} foram estudados^{104,105}, além de, como pode ser esperado, Au^{III} e Au^I. Destacando o interesse em complexos de ouro, Messori e colaboradores¹⁰⁶ utilizaram a técnica de XAS para explorar a interação da auranofina e dois outros complexos de Au^{III} com as proteínas transferrina e albumina, ambas presentes no plasma sanguíneo. Jacques e colaboradores¹²² estudaram por XAS a reatividade de um ZFs do tipo Cis₄ frente a complexos de Au^{III}, mostrando que esses complexos sofrem redução tanto em presença quanto

ausência de íons livres, de modo que sempre se observam íons Au^{I} coordenados ao AuF formado.

Neste trabalho, a técnica de XAS foi explorada buscando compreender o modo de interação de dois complexos fosfinaouro(I) com peptídeos modelos de ZF, buscando evidências da coordenação de fosfina, histidina ou cisteína nos adutos formados. Tanto os espectros nas regiões de XANES quanto de EXAFS foram obtidos e analisados.

Capítulo 2: Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar as interações entre complexos de coordenação de ouro, particularmente do tipo fosfinaouro(I), frente a modelos de zinco-proteínas da classe dos dedos de zinco e das metalo- β -lactamases e, a partir dos resultados obtidos, propor, sintetizar e caracterizar um complexo de coordenação de ouro inédito, bem como avaliar sua atividade inibitória frente a estas enzimas.

2.2. Objetivos Específicos

- Investigar o modo de coordenação/interação de complexos fosfinaouro(I) com modelos de domínios dedos de zinco utilizando a técnica de espectroscopia de absorção de raios X;
- Investigar a atividade inibitória de complexos de coordenação de ouro frente a uma enzima da classe das metalo- β -lactamases;
- Comparar a reatividade de complexos fosfinaouro(I) frente a dedos de zinco e metalo- β -lactamases;
- Propor, sintetizar e caracterizar um complexo inédito da classe fosfinaouro(I);
- Avaliar a interação do complexo inédito sintetizado frente a dedos de zinco e metalo- β -lactamases.

Capítulo 3: Parte Experimental

3.1 Materiais

3.1.1. β -lactamases

As β -lactamases utilizadas nesse estudo foram adquiridas da Sigma-Aldrich® como um produto sólido, liofilizado. Este produto é composto por duas enzimas provenientes de *Bacillus cereus* (em inglês *B. cereus enzymes*, BCE), uma serina- β -lactamase e uma metalo- β -lactamase da classe B1, conhecida como BcII. O sequenciamento genético do *B. cereus* mostra que os genes codificadores de β -lactamases são genômicos e a bactéria expressa as duas enzimas simultaneamente¹²³. O fabricante indica uma atividade específica de 1.500 a 3.000 unidades internacionais (medida realizada usando benzilpenicilina como substrato) por miligrama de produto.

Foi realizada análise por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE), conforme indicado no item 3.2.9, mostrada na Figura 9. Duas bandas foram encontradas próximas a 31 kDa, representando as duas enzimas informadas pelo fabricante. É importante observar que, assim como destacado pelo fabricante, a mistura enzimática contém uma quantidade maior da SBL do que da MBL. A proporção entre as duas enzimas não foi determinada.

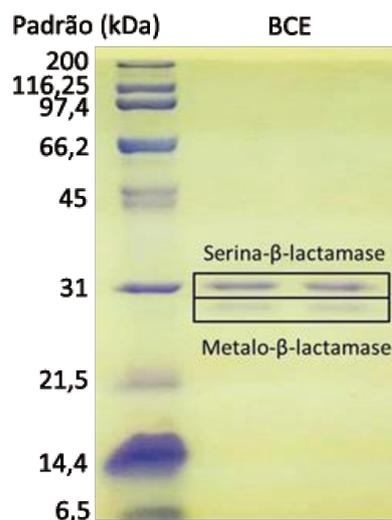


Figura 9: Fotografia do gel de poliacrilamida utilizado na análise de eletroforese da BCE. As duas bandas observadas, uma de SBL e uma de MBL, estão destacadas, bem como os pesos moleculares do padrão.

A concentração de íons zinco na BCE foi determinada por espectrometria de emissão óptica com plasma. O valor determinado foi 0,14 mg de Zn^{II} por grama de BCE.

Esse material foi utilizado sem demais purificações.

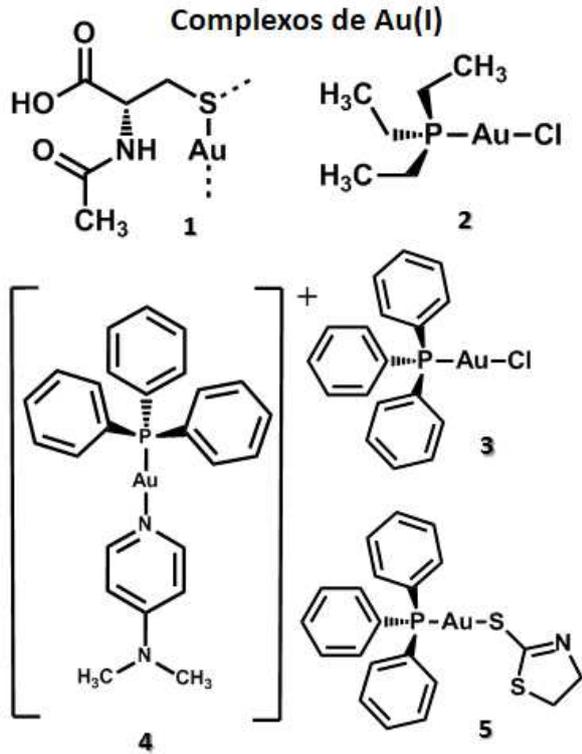
3.1.2. Peptídeos modelo

Dois peptídeos de sequência KGCWKCGKEGHQMKNCTER, de massa monoisotópica 2224,46 gmol⁻¹, e KKFACPECPKRFMSDHLKHIKTHQNKK, de massa monoisotópica 3366,95 gmol⁻¹, foram adquiridos da Aminotech Co. (São Paulo, Brasil) e sua identidade foi verificada por espectrometria de massas. Eles representam, respectivamente, o segundo domínio ZF da NCp7 (modelo do alvo farmacológico) e o terceiro domínio ZF do fator de transcrição humano Sp1 (modelo comparativo humano).

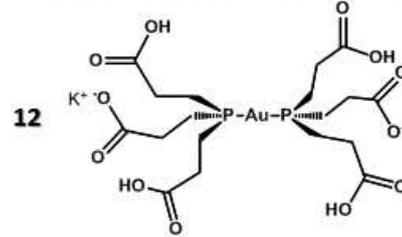
3.1.3. Demais substâncias

As estruturas dos principais compostos utilizados neste trabalho são apresentados na Figura 10. Os complexos metálicos (N-acetil-cisteínas)ouro(I) ([Au(nac)], **1**), cloro(trifenilfosfina)ouro(I) ([AuCl(PPh₃)], **3**), trifenilfosfina(4-dimetilaminopiridina)ouro(I) ([Au(dmap)(PPh₃)]⁺, **4**), trifenilfosfina(2-mercaptotiazolina)ouro(I) ([Au(mtz)(PPh₃)], **5**) e ciano(trifenilfosfina)ouro(I) ([Au(CN)(PPh₃)], **8**) foram sintetizados e purificados pelo grupo de pesquisa de acordo com procedimentos disponíveis na literatura^{57,124-126}.

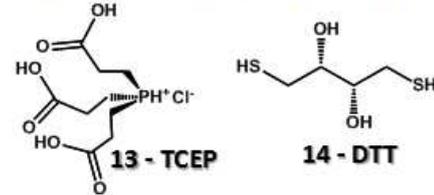
Os complexos metálicos cloro(trietilfosfina)ouro(I) ([AuCl(PEt₃)], **2**), 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-mercaptop-β-D-glucopiranosato-S(trietilfosfina)ouro(I) (auranofina, **6**), dicianoaurato (I) de potássio (**7**), tetracloroaurato(III) de potássio (**9**), tetracloropaladato(II) de potássio (**10**) e tetracloroplatinato(II) de potássio (**11**), bem como os compostos orgânicos tri(2-carboxietil)fosfina (**13**), RS-ditiotreitól (**14**), ácido (6*R*)-3-[(1*E*)-2-(2,4-dinitrofenil)etenil]-8-oxo-7*R*-[(2-tioenilacetil)amino]-5-tio-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxílico (nitrocefina, **15**), clavulanato de potássio (do inglês *potassium clavulanate*, CLV, **16**), ácido etileno-diamino-tetraacético dissódico (do inglês *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA, **17**), N-acetil-cisteína (NAC, **18**) e histidina (HIS, **19**), além de sais, tampões e solventes deuterados foram adquiridos da Sigma Aldrich, Cayman Chemical Company ou Acros, e utilizados sem demais purificações. Os solventes e demais reagentes são de uso comum em laboratórios químicos.



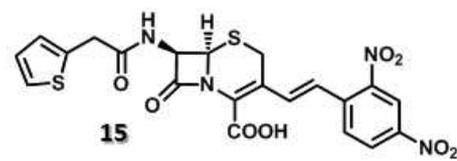
Novo complexo hidrossolúvel AuTCEP



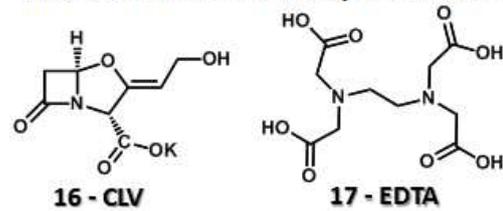
Compostos da síntese de AuTCEP



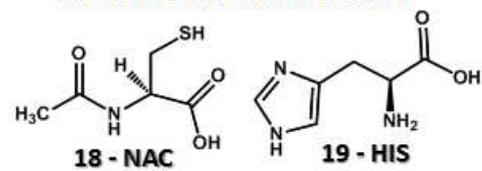
Nitrocefina



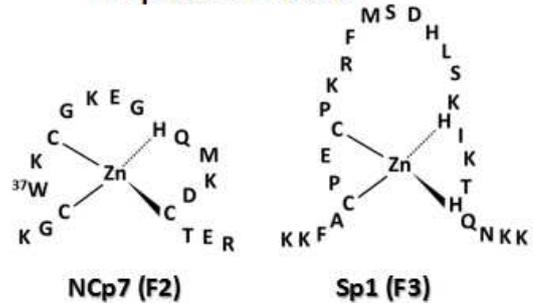
Inibidores clássicos de β -lactamases



Modelos de aminoácidos



Peptídeos modelo



Demais complexos metálicos

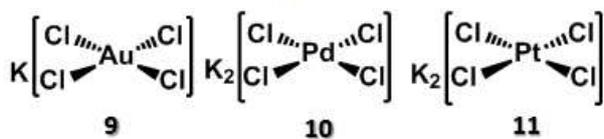


Figura 10: Estruturas dos principais compostos utilizados nesse trabalho.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação dos peptídeos modelo

Soluções estoque modelos ZFs foram preparados pela dissolução dos apo-peptídeos em uma solução de acetato de zinco $1,00 \cdot 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ em água deionizada e degasada numa proporção molar de 1:1,3 (peptídeo/ Zn^{II}). A solução estoque foi diluída em tampão acetato ($2,6 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7) para uma concentração de $3,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para as análises de absorção de raios X. Por outro lado, a solução estoque teve seu pH ajustado para 7,4 com solução de hidróxido de amônio e foi diluída em água deionizada para $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para análises de espectrometria de massas e para $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para análises de dicroísmo circular. Para análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, soluções estoques dos apo-peptídeos e de acetato de zinco foram preparadas em D_2O e misturadas numa proporção molar de 1:1,3 (peptídeo/ Zn^{II}) e o ajuste de pH para 7,4 foi realizado com solução de KOD 1% em D_2O .

Em todas as análises os compostos inibidores testados foram dissolvidos em dimetilformamida, acetonitrila ou água, dependendo da solubilidade, e adicionados à solução de ZF em proporções molares de 1:1,3.

3.2.2. Estudo da interação de complexos ouro com ZFs por espectroscopia de absorção de raios X

Medidas de absorção de raios X foram realizadas para os complexos $[\text{Au}(\text{nac})]$ (**1**), $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**), $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ (**3**), $[\text{Au}(\text{dmap})(\text{PPh}_3)]^+$ (**4**), $[\text{Au}(\text{mtz})(\text{PPh}_3)]$ (**5**), auranofina (**6**), $[\text{Au}(\text{CN})_2]$ (**7**) e $[\text{Au}(\text{CN})(\text{PPh}_3)]$ (**8**), utilizados como modelo para estudo das interações dos compostos $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**) e auranofina (**6**) com os peptídeos NCp7 e Sp1. Os complexos modelo, com exceção da auranofina (**6**), foram preparados pela dissolução dos compostos sólidos em nitreto de boro em concentração adequada para um máximo de absorção de aproximadamente uma unidade. As amostras foram cuidadosamente misturadas e transformadas em um pó fino em almofariz de ágata e prensadas em pastilhas circulares de 13 mm de diâmetro em prensa hidráulica numa pressão de aproximadamente 0,5 ton. Soluções estoque dos compostos $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**) e auranofina (**6**) foram preparadas pela sua dissolução em dimetilformamida até uma concentração final de $1,00 \cdot 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. Volumes adequados da solução foram adicionados a 10 μL de solução de cada ZF para uma proporção molar final de

1:1. As soluções foram colocadas em porta-amostras de acrílico de 3 μL . Tanto as amostras sólidas quanto as em solução foram mantidas nos porta-amostras com auxílio de uma fita autoadesiva de poliimida (Kapton) de 40 μm de espessura, mas as soluções foram congeladas em criostato de hélio líquido e mantidas em temperatura abaixo de 50 K durante as medidas. Excepcionalmente, a auranofina (**6**) foi analisada em solução, juntamente com as análises dos peptídeos.

Foram feitas medidas de XAS na borda L_3 do ouro. As amostras sólidas e em solução foram analisadas nas linhas de luz XAFS1 e XAFS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (CNPEM/LNLS), respectivamente^{127,128}. Na linha XAFS1 a energia incidente foi selecionada usando um monocromador do tipo “channel-cut” equipado com cristal de silício (111), enquanto na XAFS2 se utilizou um monocromador de cristal duplo do tipo “fixed-exit”. O tamanho do feixe de radiação na amostra foi de aproximadamente 2,5 x 0,5 mm^2 (horz. X vert.) na XAFS1 e 0,4 x 0,4 mm^2 na XAFS2, com um fluxo de raios X estimado de 10^8 ph/sec (XAFS1) e 10^9 ph/sec (XAFS2). A energia do raio X incidente foi calibrada pelo máximo da primeira derivada da absorção de raio X (borda L_3) de uma folha de ouro metálico, a que foi atribuído o valor de 11919 eV. Para as amostras sólidas foi utilizado o modo de aquisição de dados por transmissão. As câmaras de ionização foram preenchidas com uma mistura de hélio e nitrogênio. No caso das soluções, um sistema de detecção de fluorescência, com um detector de 15 elementos de estado sólido de germânio (modelo GL055S - Canberra Inc.), foi empregado. Uma janela de integração de em torno de 170 eV entre as linhas de emissão $L\alpha_1$ e $L\alpha_2$ do ouro (9713,3 eV e 9628,0 eV, respectivamente) foi utilizada.

Não foram observados sinais de degradação das amostras através de inspeções rápidas através de espectros de XANES. Mais ainda, o primeiro e o último espectro de cada série de medidas do mesmo composto são idênticos.

O tratamento de dados (média, subtração de “background”, normalização) foi realizado através do software ATHENA¹²⁹. Após a obtenção de alguns espectros de cada amostra (tantos quanto possível), uma média dos espectros foi feita para otimizar a relação sinal-ruído. O processamento se iniciou com a normalização dos espectros no espaço energia para remover distorções experimentais. Nessa etapa, as informações do XANES já podem ser obtidas pela comparação dos espectros de diferentes substâncias. Uma segunda etapa de processamento consistiu na extração das oscilações de EXAFS no espaço de momento (espaço k)¹⁰³ definida pela Equação 1, onde E_0 é a posição da borda de absorção, $\mu_0(E)$ é o *back ground* utilizado como fator de normalização e $\Delta\mu_0(E_0)$ é o passo da borda, ou a variação no *back ground* associada à borda de absorção.

$$\chi(k) = \frac{\mu(E) - \mu_0(E)}{\Delta\mu_0(E_0)} \quad Eq. 1$$

A função $\chi(k)$ pode ser racionalizada em termos da equação clássica proposta por Sayers, Stern and Lytle¹³⁰, que leva em consideração fatores estruturais e característicos do átomo absorvedor. Diversos programas podem ser usados para a extração e tratamento do EXAFS assim como a para o ajuste de funções teóricas com espectros experimentais, de onde podem ser obtidos valores de distâncias e ângulos de ligação.

3.2.3. Estudo da interação dos complexos metálicos com ZFs por ESI-MS, NMR e CD

Medidas por espectrometria de massas por tempo de voo com ionização por eletrospray (do inglês *electrospray ionization mass spectrometry*, ESI-MS) foram realizadas em um equipamento Waters Xevo QTof MS. Uma solução estoque de $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol L⁻¹ de [AuCl(PEt₃)] (**2**) foi preparada em dimetilformamida enquanto uma solução estoque de mesma concentração de AuTCEP (**12**) foi preparada em água. As amostras de ZF foram misturadas em quantidades adequadas das soluções de complexos para uma proporção molar de 1:1,3 (ZF/inibidor). Alíquotas dessas amostras foram diluídas numa mistura metanol/água 1:1 (v/v) e analisadas imediatamente após a diluição. Essas amostras foram mantidas a 37 °C e analisadas novamente em intervalos de 1, 2, 3 e 6 horas. A injeção foi realizada por infusão direta a $1,0 \cdot 10^{-6}$ L min⁻¹, utilizando uma voltagem de cone de 40 V. A fonte foi mantida a 110 °C com uma voltagem de $2,75 \cdot 10^6$ a $2,95 \cdot 10^6$ V durante todo o experimento.

Medidas de NMR de ³¹P foram obtidas no espectrômetro de ressonância nuclear magnética Bruker, modelo Avance III 500 MHz, tendo como referência o ácido fosfórico 85%. Uma amostra de ZF em D₂O foi misturada a um quantidade adequada de solução $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol L⁻¹ de [AuCl(PEt₃)] (**2**) em acetonitrila deuterada para uma proporção molar de 1:1,3 (ZF/inibidor) e as análises feitas imediatamente após a mistura das soluções.

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos em um Espectropolarímetro Jasco, modelo J720. Soluções estoque de $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol L⁻¹ dos compostos AuTCEP (**12**) e TCEP (**13**) foram preparadas em água e adicionadas às soluções de ZF na proporção molar de 1:1 e analisadas imediatamente após a mistura, de 190 a 250 nm, em séries com 8 varreduras, a 20 nm min⁻¹, em microcubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico.

3.2.4. Simulação de espectros de XANES

Simulações de espectros de XANES foram realizadas utilizando o FEFF 9¹³¹⁻¹³³, um programa amplamente utilizado para cálculo *ab initio* de espectros de XAS. Os espectros de XANES do complexo [AuCl(PEt₃)] (**2**) e de três complexos hipotéticos formados substituindo-se o cloreto de [AuCl(PEt₃)] por uma cisteína, uma histidina ou uma segunda trietilfosfina foram simulados usando um *cluster* contendo moléculas completas para produzir os potenciais utilizados no cálculo de espalhamento múltiplo. A estrutura cristalina do complexo [AuCl(PEt₃)] (**2**)¹³⁴ e as estruturas otimizadas UFF (*Universal Force Field*) dos compostos hipotéticos (tomando as coordenadas de [AuCl(PEt₃)] como ponto de partida) foram usadas como input das simulações.

3.2.5. Síntese do complexo AuTCEP

Em um balão de fundo redondo de 25 mL foi preparada uma solução de 93 mg de ditioneitol (DTT, **14**) ($6,0 \cdot 10^{-4}$ mol) no mínimo volume de água necessário para completa dissolução. Sob agitação, foi adicionada ao balão uma solução de 226 mg ($6,0 \cdot 10^{-4}$ mol) de tetracloroaurato(III) de potássio (**9**), também no mínimo de água necessário para completa dissolução, dando origem a uma suspensão marrom. A essa suspensão foi adicionada lentamente uma solução aquosa contendo 406 mg ($1,6 \cdot 10^{-3}$ mol) de hidrocloreto de tri(2-carboxietil)fosfina (TCEP, **13**) no menor volume possível de solvente. Conforme TCEP é adicionada, a suspensão se dissolve levando a uma solução incolor, de pH ~ 1, com pouco resíduo de sólido. Esta mistura foi mantida à temperatura ambiente por 30 minutos, período no qual o sólido residual se dissolve, e depois foi filtrada em sílica. O filtrado teve seu solvente removido em rota- evaporador a baixa pressão até a *secura*. O sólido branco obtido foi então lavado com acetona, novamente seco e dissolvido em 5 mL de água. Essa solução foi evaporada a baixa pressão até o aparecimento dos primeiros cristais em sua superfície, quando algumas gotas de acetona foram adicionadas, levando à precipitação de um sólido branco. O sólido foi então filtrado em funil de Gooch, lavado com acetona e seco em dessecador sob baixa pressão, em presença de pentóxido de fósforo. Para obtenção de monocristais, o sólido foi dissolvido no mínimo possível de água e deixado em repouso à temperatura ambiente, permitindo a evaporação lenta do solvente. O sólido foi caracterizado por análise elementar, ¹H, ¹³C e ³¹P NMR, espectroscopia vibracional no infravermelho (do inglês *infrared vibrational*

spectroscopy, IR) e ESI-MS. Os cristais foram caracterizados por difração de raios X de monocristal.

3.2.5.1. Equipamentos utilizados na caracterização do AuTCEP

As análises elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas em um equipamento Perkin-Elmer, modelo 2400 CHNS/O. Os estudos de ESI-MS foram realizados em um espectrômetro Waters, modelo TQD Quattro Micro API. Espectros de IR foram obtidos por reflectância atenuada total num espectrofotômetro de absorção Agilent, modelo CARY 630 FTIR. Os espectros de ^1H , ^{13}C e ^{31}P NMR em solução de D_2O foram obtidos no espectrômetro de ressonância nuclear magnética Bruker, modelo Avance III 500 MHz, à temperatura ambiente, tendo como referência do ^1H e ^{13}C o tetrametilsilano, e como referência do ^{31}P , ácido fosfórico 85%. Os espectros de ^{13}C e ^{31}P NMR no estado sólido foram obtidos no espectrômetro de ressonância nuclear magnética Bruker, modelo AvanceII+ 400MHz, à temperatura ambiente. Para o ^{13}C NMR uma combinação de polarização cruzada, desacoplamento de próton e rotação no ângulo mágico foi utilizada, com tempo de aquisição de 30 ms, tempo de contato de 4.000 μs e intervalo entre os pulsos de 1 s, a janela espectral utilizada foi de 295,8 ppm com o aparelho operando a 100 MHz para o ^{13}C e 400MHz para o ^1H , com 10.240 varreduras e tendo o adamantano como referência. Já para as análises de ^{31}P NMR foi utilizado desacoplamento de próton, com tempo de aquisição de 42,6 ms e intervalo entre os pulsos de 2 s, a janela espectral utilizada foi de 593,6 ppm com o aparelho operando a 162 MHz para o ^{13}C e 400MHz para o ^1H , com 128 varreduras e tendo o ácido fosfórico 85% como referência. Os estudos de difração de raios X de monocristal foram realizados num difratômetro Bruker, modelo Apex Duo.

3.2.6. Determinação do coeficiente de extinção molar da nitrocefina e de seu produto de hidrólise

O produto de hidrólise da nitrocefina (**15**) tem um máximo de absorção em 490 nm, que foi usado para quantificar a formação dessa espécie. Contudo, a própria nitrocefina (**15**) tem uma absorção não desprezível nessa região, de modo que foi necessário determinar o coeficiente de extinção molar (ϵ) de ambos nesse comprimento de onda. Para determinação do ϵ da nitrocefina uma solução estoque do composto foi preparada em tampão fosfato ($5,0 \cdot 10^{-2}$ mol L^{-1} pH 7,0), com concentração $1,7 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1} . Diluições foram preparadas no mesmo tampão na faixa entre $5,5 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} e $2,4 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} e tiveram sua absorbância a 490 nm medida

a 37°C em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico, num espectrofotômetro de Absorção UV-Vis HP, modelo HP8453.

Para a obtenção do produto de hidrólise foi utilizada a própria BCE. Soluções de nitrocefina e a BCE em tampão fosfato ($5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0) foram preparadas e misturadas de modo a obter concentrações de $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de nitrocefina e $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ g L}^{-1}$ de BCE e a mistura foi mantida ao abrigo da luz em temperatura ambiente por 2 h, garantindo a conversão total da nitrocefina em seu produto de hidrólise, através da reação mostrada na Figura 11. Diluições desta solução foram então preparadas no mesmo tampão para concentrações na faixa de $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e medidas de absorbância em 490 nm foram obtidas.

Os valores de $\epsilon = 6,6 \cdot 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a nitrocefina e $\epsilon = 5,1 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para seu produto de hidrólise foram determinados em 490 nm, utilizando a lei de Lambert-Beer.

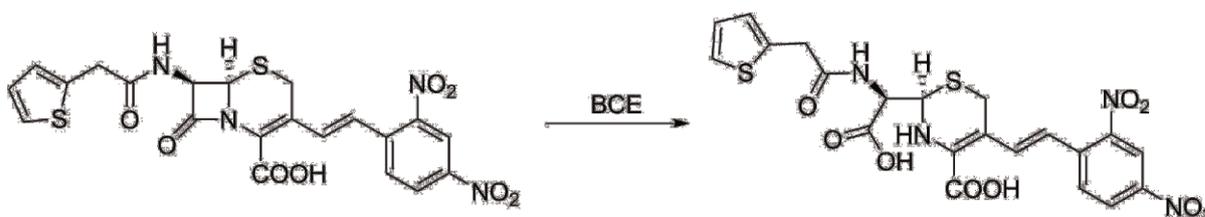


Figura 11: Reação de hidrólise da nitrocefina (15) promovida pela BCE.

3.2.7. Estudo da capacidade inibitória de complexos metálicos sobre a atividade de BCE

Os compostos $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**), $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ (**3**), $[\text{Au}(\text{CN})_2]$ (**7**), tetracloroaurato(III) de potássio (**9**), tetracloropaladato(II) de potássio (**10**) e tetracloroplatinato(II) de potássio (**11**), AuTCEP (**12**), TCEP (**13**), CLV (**16**) e EDTA (**17**) foram estudados como inibidores da atividade enzimática de BCE. A velocidade inicial (v_0) da reação de hidrólise de nitrocefina (**15**) foi obtida acompanhando-se o aumento no máximo de absorção do produto de hidrólise da nitrocefina, em 490 nm. A velocidade inicial foi calculada como o coeficiente angular da região linear da curva de absorção versus tempo, em conversões sempre inferiores a 10 %.

Para essa medida foram preparadas soluções estoque de nitrocefina ($2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), BCE ($8,0 \cdot 10^{-6} \text{ g L}^{-1}$) e dos possíveis inibidores ($4,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato ($5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0). Os inibidores insolúveis em água $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**) e $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ (**3**) foram inicialmente dissolvidos em dimetilformamida e então diluídos em tampão fosfato ($5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0). Em cada experimento, as soluções de BCE e do possível inibidor eram

misturadas numa proporção 1:1 (v/v), 30 minutos antes de serem diluídas e misturadas à solução de nitrocefina para dar início à reação de hidrólise. As reações foram acompanhadas a 37 °C em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico num espectrofotômetro de Absorção UV-Vis HP, modelo HP8453. As concentrações finais foram mantidas sempre em $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de nitrocefina, $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de inibidor e $1 \cdot 10^{-6} \text{ g L}^{-1}$ de BCE. A concentração final de dimetilformamida nos casos de inibidores insolúveis foi de 0,25 % (v/v) para o [AuCl(PEt₃)] (2) e 0,75 % (v/v) para o [AuCl(PPh₃)] (3). Todas as soluções foram mantidas em banho de gelo e ao abrigo da luz enquanto não estavam sendo manipuladas. As análises foram comparadas a reações sem presença de inibidor (branco), feitas sempre 15 minutos antes do experimento com inibidor. Brancos contendo 0,25 e 0,75 % de DMF foram também medidos para os casos em que foi necessário o uso de solvente. Todas as análises foram feitas em triplicata e todas as soluções foram preparadas imediatamente antes de seu uso, salvo a solução estoque de nitrocefina que pôde ser estocada ao abrigo da luz a -20°C por até duas semanas.

As atividades enzimáticas relativas de BCE em presença de potenciais inibidores foram calculadas seguindo a Equação 1, comparando-se sempre um experimento sem inibidor (branco) e o experimento com inibidor realizado em sequência. A atividade basal de BCE é, portanto, considerada 100% e todas as atividades em presença de inibidores são apresentadas em relação a ela.

$$\textit{Atividade Relativa} = \frac{v_0^{(\textit{com inibidor})} \cdot 100}{v_0^{(\textit{sem inibidor})}} \quad \textit{Eq. -2}$$

3.2.8. Estudo da interação do AuTCEP com BCE, ZFs e modelos de aminoácidos por NMR

Foram preparadas soluções estoque de $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ de AuTCEP (12) em 400 μL D₂O. Foram também preparadas soluções de N-acetil-cisteína (18), histidina (19), BCE, NCp7 e Sp1 em concentração de $1,3 \cdot 10^{-2} \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ em D₂O. As soluções de ZFs tiveram um preparo idêntico ao descrito no item 3.2.1. Misturas foram preparadas utilizando 400 μL das soluções de AuTCEP e 200 μL de uma das soluções de modelos biológicos. Nos casos indicados, o pH foi ajustado para 5,0 com uma solução de KOD 1% em D₂O. Espectros ¹H e ³¹P foram obtidos imediatamente após a mistura de cada uma das amostras, num espectrômetro de ressonância nuclear magnética Bruker, modelo Avance III 500 MHz, e mantidos a 4 °C por 24h para uma nova análise no mesmo equipamento. Os espectros foram calibrados por padrão interno (em

tubo capilar de vidro) de ácido fosfórico 85% no caso do ^{31}P , e pelo pico residual de água no caso do ^1H .

3.2.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi utilizada para verificação da integridade e da composição da BCE. Uma amostra da BCE foi dissolvida em tampão ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$ tris(hidroximetil)aminometano, $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ DTT (**14**), $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ dodecil sulfato de sódio, $3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ azul de bromofenol, 20% (v/v) glicerol, pH 6,8 e quantidade suficiente de água). A análise foi conduzida utilizando-se um aparato Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-rad) com gel de empacotamento 5% e gel de separação 10%¹³⁵ sob diferença de potencial constante de 300 V por uma hora, num tampão de corrida ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$ tris(hidroximetil)aminometano, $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ dodecil sulfato de sódio, $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ DTT (**14**), pH 6,8, e quantidade suficiente de água). Tanto a amostra de BCE quanto um padrão de pesos moleculares foram submetidos à eletroforese em diferentes poços de um mesmo gel, que foi, depois, corado por 15 minutos numa solução etanol : ácido acético : água, 3:1:6 (v:v:v) com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de azul de Comassie e descorado numa solução etanol : ácido acético : água, 1:1:8 (v:v:v). O resultado está reportado na Figura 9.

Capítulo 4: Zinco estrutural: Interação de complexos de ouro(I) com dedos de zinco

4.1. Espectrometria de Massas

Uma técnica útil no estudo da interação de complexos metálicos com domínios ZF é a espectrometria de massas. A Figura 12 mostra espectros de massas da interação dos modelos NCp7 e Sp1 com o complexo $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**), imediatamente após a mistura. É possível notar que a interação de $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ com NCp7, Figura 12A, gera muitos sinais, enquanto poucos sinais são observados para a interação de $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ com Sp1, Figura 12B.

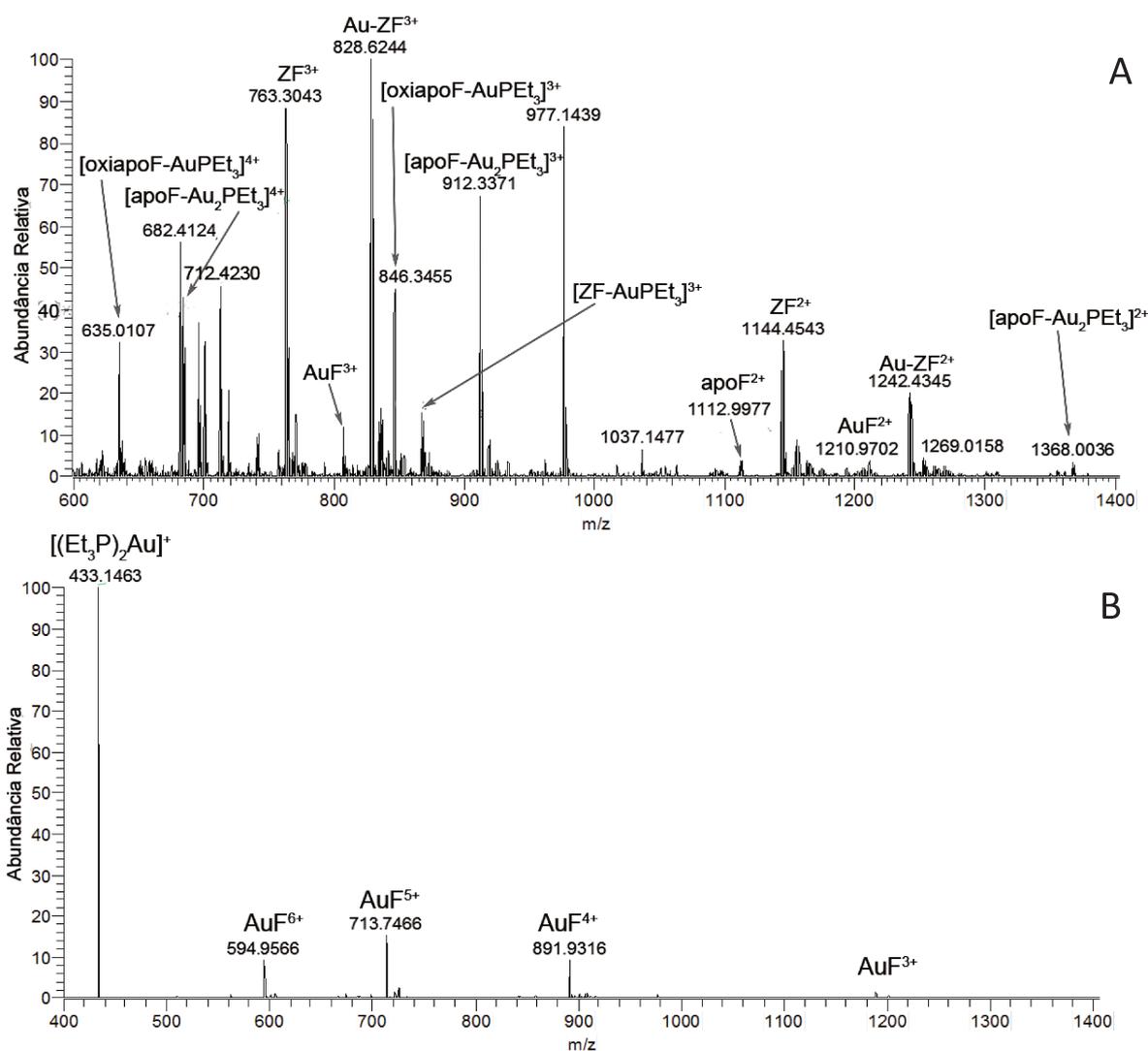


Figura 12: ESI-MS(+) dos produtos de interação do complexo $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ com os modelos de ZF NCp7 (A) e Sp1 (B).

No espectro da reação com o NCp7 (Figura 12A) são observados sinais referentes à substituição do Zn^{II} pelo Au^I sem nenhum outro ligante coordenado ($[AuF]^{n+}$) em m/z 1211,0 e 807,3, estrutura conhecida como dedo de ouro (AuF). Podem, também, ser vistos sinais referentes ao peptídeo sem coordenação de ouro, tanto mantendo o Zn^{II} coordenado ($[ZF]^{n+}$), em m/z 1144,5 e 763,3, quanto com perda de Zn^{II} ($[apoF]^{n+}$) em m/z 1113,0. A presença de sinais em m/z 1368,0, 912,3 e 682,4 representa estruturas onde o Zn^{II} foi substituído por dois íons Au^I e um grupo trietilfosfina ($[apoF-Au_2PEt_3]^{n+}$) enquanto os sinais em m/z 846,4 e 635,0 representam espécies onde o Zn^{II} foi substituído por um grupo $[AuPEt_3]^+$ num processo envolvendo a oxidação do peptídeo ($[oxiapoF-AuPEt_3]^{n+}$). Aparecem, também, sinais provenientes de uma espécie onde existe a coordenação do Au^I ao peptídeo, sem, no entanto, ser observada a perda de Zn^{II} ($[Au-ZF]^{n+}$) em m/z 1242,4 e 828,6, além de um sinal referente a uma estrutura onde um grupo $[AuPEt_3]^+$ se coordena ao ZF sem perda de Zn^{II} ($[ZF-AuPEt_3]^{3+}$), em $m/z = 868,0$.

Por outro lado, ao reagir $[AuCl(PEt_3)]$ (**2**) com Sp1 são observados apenas cinco sinais no espectro de massas (Figura 12B). O sinal monocarregado em 433,1 representa a estrutura $[(Et_3P)_2Au]^+$, presente em solução segundo um equilíbrio de troca de ligantes previamente descrito para esse tipo de composto fosfinaouro¹³⁶⁻¹³⁸. Já os sinais em m/z 1188,9, 891,9, 713,7 e 594,9 podem ser atribuídos a uma estrutura onde o Au^I substituiu o Zn^{II} formando dedo de ouro ($[AuF]^{n+}$).

A presença de numerosas espécies no caso do NCp7 (Figura 12A) permite hipotetizar que possam ocorrer ataques das espécies contendo ouro a diferentes regiões do peptídeo, e que espécies intermediárias contendo trietilfosfina são abundantes. Abbehausen e colaboradores⁵⁷ mostraram que a reação de NCp7 com $[AuCl(PPh_3)]$ (**3**) gera espécies análogas, $[Au(PPh_3)F]^{n+}$, demonstrando ainda que esses adutos apresentam longa vida (acima de 78h). Além disso, a presença de espécies $[Au-ZF]^{n+}$ sugere que a coordenação do ouro pode ocorrer antes da saída do zinco, o que corrobora a hipótese mais aceita para a formação dos AuFs, de um ataque eletrofílico do ouro aos resíduos de aminoácidos que coordenam o Zn^{II} nos ZF, seguido pela substituição do zinco pelo ouro^{13,57,122}. Por outro lado, a interação do Sp1 com $[AuCl(PEt_3)]$ (**2**) gera somente $[AuF]^{n+}$, sugerindo uma única forma de ataque com perda das fosfinas coordenadas.

4.2. ^{31}P NMR do aduto NCp7 + $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$

Como observado por ESI-MS, a interação de $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**) com NCp7 pode ser também verificada por NMR de ^{31}P , pela presença de espécies $[\text{AuF}(\text{PEt}_3)]$. O espectro obtido dos produtos de interação assim como o espectro do $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**) puro estão representados na Figura 13. Nesta figura é possível observar um único sinal de $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**) em 33,6 ppm. Já o aduto $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{NCp7}$ apresenta dois sinais, um em 43,0 e outro em 49,6 ppm.

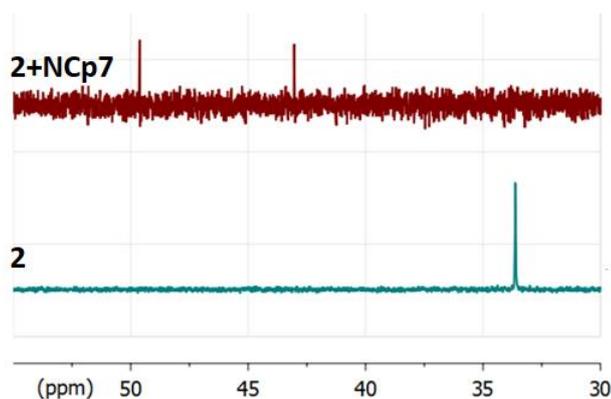


Figura 13: Espectros de NMR ^{31}P do complexo $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ e da mistura imediata $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{NCp7}$.

O não aparecimento do sinal em 33,6 ppm no espectro do aduto $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{NCp7}$ indica que a espécie $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ de alguma forma interagiu com o peptídeo, dando origem aos sinais que se observa. Duas hipóteses podem justificar o aparecimento desses dois sinais. Primeiramente, o peptídeo apresenta mais de um sítio de coordenação e são observadas espécies diversas no espectro de massas da mistura $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{NCp7}$, de modo que cada um dos sinais pode representar diferentes ambientes químicos do fósforo causados pela coordenação do grupo $[\text{AuPEt}_3]^+$ ao NCp7 de diferentes maneiras. Uma outra hipótese é que o sinal em 49,6 ppm se deva ao óxido de trietilfosfina, formado pela manipulação do $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ ao ar, enquanto o sinal em 43,0 ppm se refira a uma espécie onde o $[\text{AuPEt}_3]^+$ se coordena ao peptídeo¹³⁹. Os valores de deslocamento químico do óxido de trietilfosfina relatados na literatura dependem fortemente do solvente em que as análises de NMR se dão, variando de 43,1 ppm em n-hexano a 49,2 ppm em acetonitrila e 64,6 ppm em água¹⁴⁰. Como esta análise foi realizada numa mistura acetonitrila/água 1:1 (v/v), tendo em vista a solubilidade dos reagentes, é impossível comparar o deslocamento obtido com os valores encontrados na literatura.

4.4. Espectroscopia de absorção de raios X

Com o objetivo de obter informações sobre as estruturas eletrônica e geométrica dos produtos de interação do complexo $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**) e da auranofina (**6**) com os ZFs, principalmente no que diz respeito à natureza dos resíduos de aminoácidos que se ligam ao ouro, foram feitas medidas de XAS de uma série de oito compostos modelo (1 a 8 – Figura 10), representando possíveis esferas de coordenação, bem como dos materiais de partida e dos produtos de interação de NCp7 e Sp1 com os complexos.

4.4.1. Compostos Modelo

Os espectros normalizados na região próxima à borda de absorção L_3 do ouro dos oito compostos modelo são mostrados na Figura 14. Cada curva nesta figura representa o espectro de um composto, numerado conforme a Figura 10. **0** representa o ouro metálico, utilizado como referência. A linha vertical tracejada indica a posição da borda de absorção, definida como o ponto de máximo da primeira derivada do espectro do ouro metálico (**0**), no valor de 11919 eV. A transição eletrônica atribuída à borda L_3 do ouro é de um elétron de um orbital $2p_{3/2}$ para o LUMO, que pode ser um orbital de caráter $5d_{3/2}$ ou $5d_{5/2}$, dependendo da interação destes com os orbitais dos ligantes coordenados ao ouro^{105,141,142}.

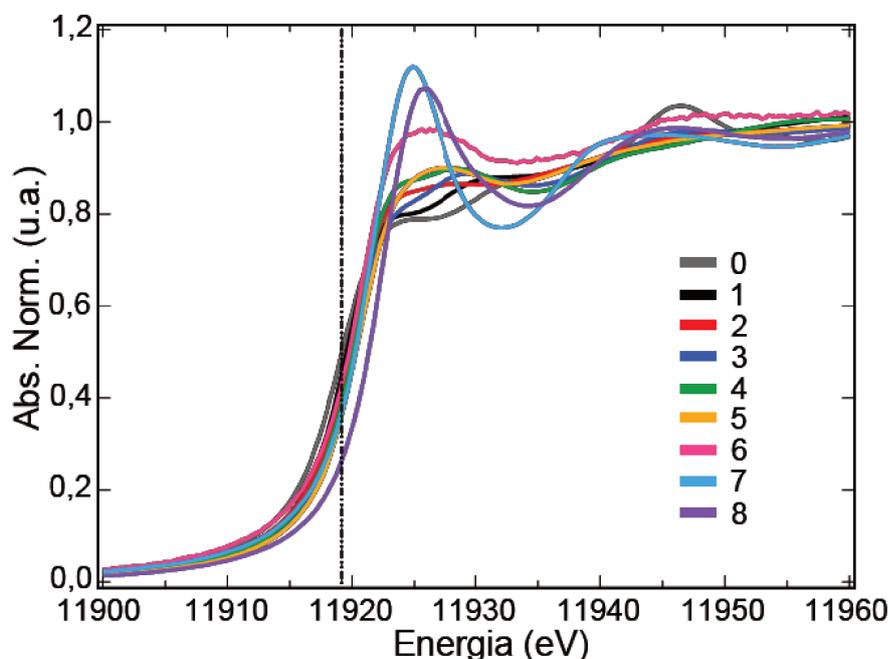


Figura 14: Espectros de XANES na borda L_3 do ouro dos compostos modelo. A linha vertical tracejada indica a posição da borda da folha de ouro metálico, em 11.919 eV. Na legenda estão representados (**0**) ouro metálico, (**1**) $[\text{Au}(\text{nac})]$, (**2**) $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$, (**3**) $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$, (**4**) $[\text{Au}(\text{dmap})(\text{PPh}_3)]^+$, (**5**) $[\text{Au}(\text{mtz})(\text{PPh}_3)]$, (**6**) auranofina, (**7**) $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ e (**8**) $[\text{Au}(\text{CN})(\text{PPh}_3)]$.

Tabela 1: Valores de posição da borda, estado de oxidação e simetria pontual dos compostos modelo **1 – 8**, além do ouro metálico (**0**).

| Composto | | Posição da Borda / eV | Estado de Oxidação | Simetria Pontual (ao redor do Au) |
|----------|---|-----------------------|--------------------|-----------------------------------|
| # | Nome | | | |
| 0 | Au metálico | 11919,0 | 0 | |
| 1 | [Au(nac)] | 11919,7 | +1 | $D_{\infty h}$ |
| 2 | [AuCl(PEt ₃)] | 11920,0 | +1 | $C_{\infty v}$ |
| 3 | [AuCl(PPh ₃)] | 11920,2 | +1 | $C_{\infty v}$ |
| 4 | [Au(dmap)(PPh ₃) ⁺] | 11920,7 | +1 | $C_{\infty v}$ |
| 5 | [Au(mtz)(PPh ₃)] | 11920,4 | +1 | $C_{\infty v}$ |
| 6 | auranofina | 11920,4 | +1 | $C_{\infty v}$ |
| 7 | [Au(CN) ₂] ⁻ | 11921,5 | +1 | $D_{\infty h}$ |
| 8 | [Au(CN)(PPh ₃)] | 11922,3 | +1 | $C_{\infty v}$ |

A posição da borda é um dado frequentemente utilizado para definir estados de oxidação uma vez que, na maior parte dos casos, quanto menor a densidade eletrônica sobre o átomo absorvedor (decorrente aqui de um maior número de oxidação) maior é a energia dessa transição. A Tabela 1 apresenta as posições das bordas para os compostos modelo analisados, além de destacar também os estados de oxidação e os grupos pontuais de simetria dos complexos ao redor do centro metálico (obtidos na literatura)^{57,124–126,134,143}.

Estudos cristalográficos e espectroscópicos dos compostos **1-8** indicam indiretamente que eles são formalmente complexos de ouro no estado de oxidação 1+, em geometria linear^{57,124–126,134,143}. As bordas de absorção destes complexos variam de 11919,7 a 11922,3 eV, valores acima da borda do Au⁰, como esperado.

As diferenças observadas na Figura 14 entre os espectros dos compostos **1-8** não se devem a diferenças nos estados de oxidação formais, mas decorrem, possivelmente, de desvios na simetria linear ideal e distâncias de ligação na primeira esfera de coordenação, além da diferente

natureza dos átomos ligados diretamente ao metal. Esses fatores afetam a distribuição eletrônica nos orbitais 5d, ou mais precisamente, nos orbitais moleculares com grande contribuição dos orbitais atômicos 5d, afetando, portanto, o pico adjacente à borda de absorção conhecida como “linha branca”. É importante resaltar que a intensidade da linha branca é inversamente proporcional à densidade eletrônica nos orbitais de caráter d, nestes sistemas¹⁰⁵. Além disso, os fatores citados afetam todas as demais características espectrais que estabelecem, em conjunto, um *padrão* do modo de coordenação do ouro no respectivo complexo. Cada um dos oito compostos modelo será analisado em detalhes a seguir.

A Figura 15 apresenta uma ampliação dos espectros de XANES dos complexos (1) [Au(nac)], (5) [Au(mtz)(PPh₃)] e (6) auranofina, destacando o perfil próximo à borda de absorção. Todos os complexos selecionados apresentam ligantes tiolato.

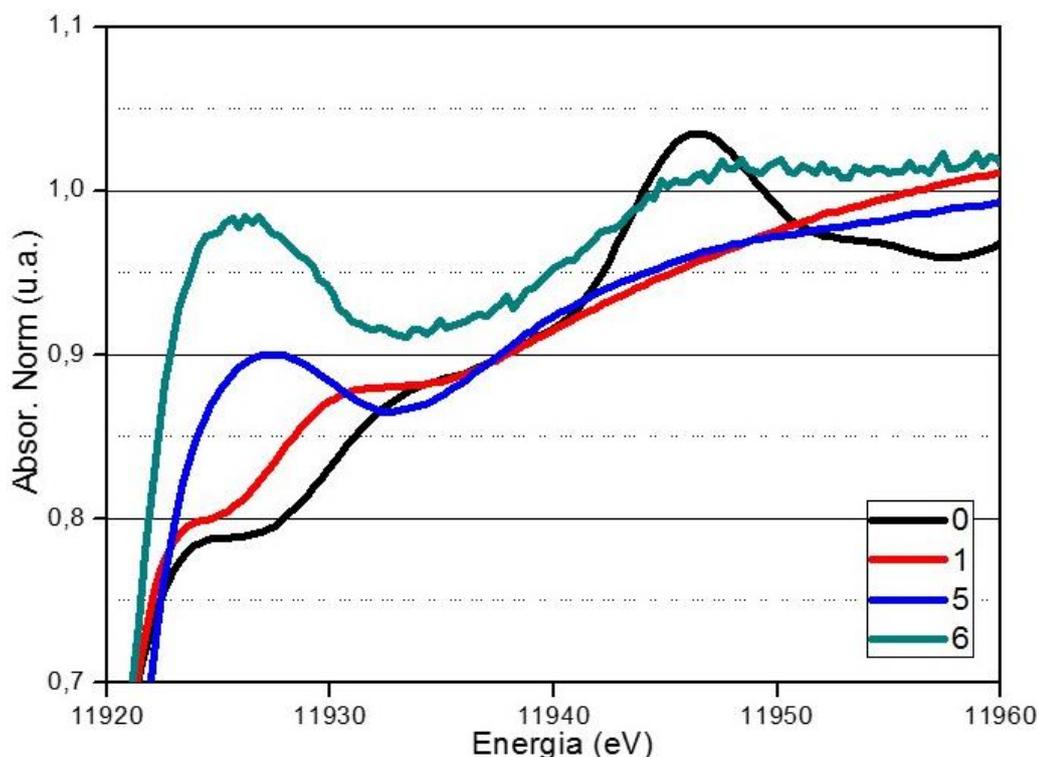


Figura 15: Detalhe da região da linha branca dos espectros de XANES na borda L₃ do ouro dos compostos (1) [Au(nac)], (5) [Au(mtz)(PPh₃)] e (6) auranofina. Todos estes compostos apresentam ligantes tiolato. O ouro metálico (0) também é representado para comparação.

O [Au(nac)] (1) é caracterizado por uma primeira esfera de coordenação S-Au-S e seu espectro apresenta, na região da linha branca, dois picos separados por 7 eV, como pode ser observado na Figura 15. Ele é o composto com menor intensidade de linha branca na série estudada, muito próxima da intensidade da linha branca do ouro metálico. Isso evidencia uma

alta densidade eletrônica nos orbitais com caráter 5d, coerente com o caráter σ -doador do enxofre. Além disso, a estrutura polimérica proposta para o composto $[\text{Au}(\text{nac})]^{125}$ pode contribuir para uma intensa delocalização da densidade eletrônica por toda a cadeia $[\text{S}-\text{Au}-\text{S}]$, contribuindo também com a baixa intensidade da linha branca.

Já os compostos $[\text{Au}(\text{mtz})(\text{PPh}_3)]$ (**5**) e auranofina (**6**) têm em seu espectro uma única estrutura muito alargada na região da linha branca, centradas em 11.927 eV para o $[\text{Au}(\text{mtz})(\text{PPh}_3)]$ e 11.926 eV para a auranofina. Esses dois compostos apresentam praticamente as mesmas características espectrais, o que se justifica pela presença, nos dois casos, de uma coordenação P-Au-S.

As linhas brancas desses compostos seguem uma ordem de intensidade auranofina (**6**) > $[\text{Au}(\text{mtz})(\text{PPh}_3)]$ (**5**) > $[\text{Au}(\text{nac})]$ (**1**), indicando que, nos dois primeiros casos, a densidade eletrônica sobre os orbitais de caráter d é menor do que no último. Isso se dá porque as fosfinas são ligantes capazes de promover interações do tipo π com os orbitais d do metal, recebendo retrodoação e, portanto, diminuindo a densidade eletrônica sobre o metal. A diferença de intensidade da linha branca entre a auranofina e $[\text{Au}(\text{mtz})(\text{PPh}_3)]$, por sua vez, é grande e não esperada, mas pode estar relacionada a um forte efeito indutivo dos oxigênios presentes na tetraacetiltioglicose, que limita a capacidade desse ligante como σ -doador.

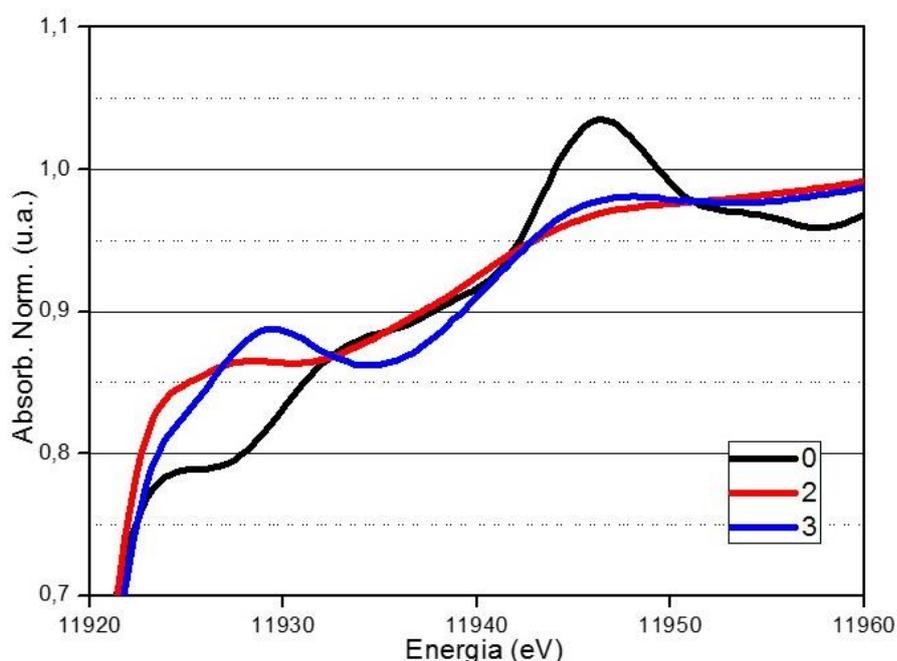


Figura 16: Detalhe da região da linha branca dos espectros de XANES na borda L_3 do ouro dos compostos (**2**) $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ e (**3**) $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$, ambos complexos do tipo fosfina-ouro-cloro. O ouro metálico (**0**) também é representado para comparação.

A Figura 16 apresenta um perfil dos espectros de XANES dos complexos (2) $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ e (3) $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$. Ambos são complexos do tipo $[\text{AuCl}(\text{PR}_3)]$ nos quais a fosfina varia entre uma trialquil- e uma triarilfosfina. Nos dois casos, os espectros de XANES apresentam praticamente as mesmas características, como seria esperado para compostos tão semelhantes. A região da linha branca de ambos apresenta dois picos alargados. Em ambos o primeiro máximo se encontra em 11.924 eV. O segundo máximo de $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ aparece em 11.928 eV, enquanto que o segundo máximo de $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ aparece em 11.929 eV.

É interessante observar que, enquanto na região da linha branca do espectro de $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ o primeiro pico é um pouco menos intenso do que o segundo, no espectro de $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ se observa o contrário, com o segundo pico significativamente mais intenso do que o primeiro. Além disso, a linha branca de $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ é ligeiramente mais intensa do que a do $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ – diferença de 0,023 unidades arbitrárias. Esse comportamento se justifica pela diferença de disponibilidade do par eletrônico entre as duas fosfinas: PEt_3 é um σ -doador melhor que PPh_3 , além de pior π -receptor. As diferenças entre estas duas fosfinas serão mais amplamente discutidas no Capítulo 5.

A Figura 17 detalha os espectros de XANES dos complexos $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ (3), $[\text{Au}(\text{dmap})(\text{PPh}_3)]^+$ (4) e $[\text{Au}(\text{mtz})(\text{PPh}_3)]$ (5), todos contendo o ligante trifenilfosfina. O ouro metálico (0) também é representado para comparação.

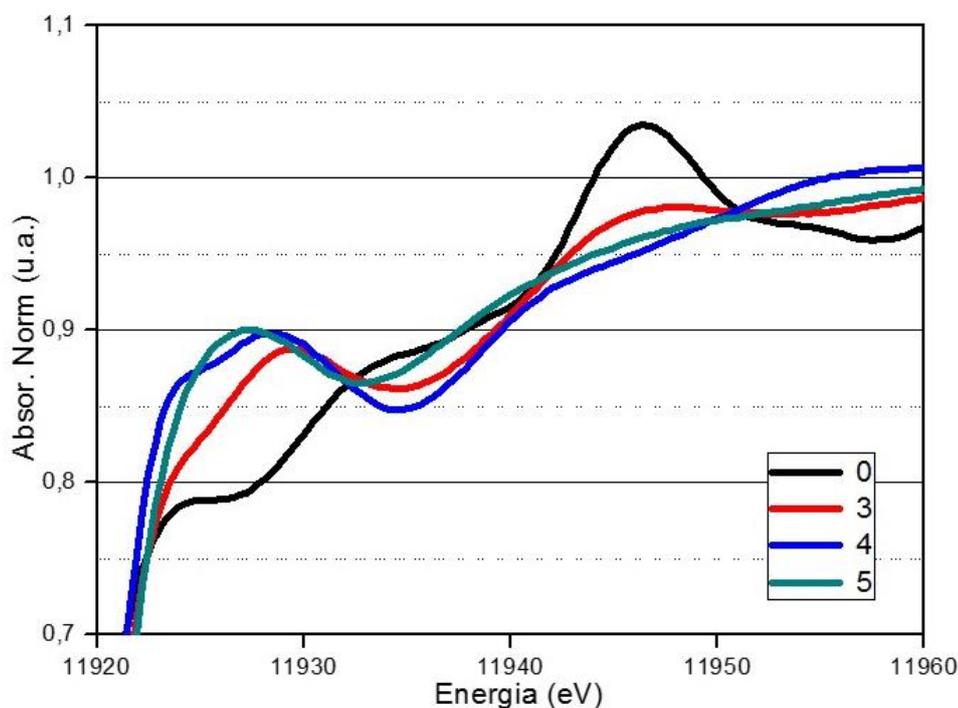


Figura 17: Detalhe da região da linha branca dos espectros de XANES na borda L_3 do ouro dos compostos (3) $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$, (4) $[\text{Au}(\text{dmap})(\text{PPh}_3)]^+$ e (5) $[\text{Au}(\text{mtz})(\text{PPh}_3)]$. Todos estes compostos apresentam o ligante trifenilfosfina. O ouro metálico (0) também é representado para comparação.

O espectro do composto $[\text{Au}(\text{dmap})(\text{PPh}_3)]^+$, assim como os espectros dos compostos $[\text{Au}(\text{nac})]$ (1), $[\text{AuCl}(\text{PET}_3)]$ (2) e $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ (3), discutidos anteriormente, apresentam dois picos alargados na região da linha branca, com máximos em 11.924 e 11.929 eV. Este composto representa uma esfera de coordenação P-Au-N, onde N pertence a um ligante N-heterocíclico. Os espectros do $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ (3) e do $[\text{Au}(\text{mtz})(\text{PPh}_3)]$ (4) já foram apresentados, contudo cabe ainda discutir a relação de intensidades de linha branca que se estabelece na Figura 17, com $[\text{Au}(\text{mtz})(\text{PPh}_3)] = [\text{Au}(\text{dmap})(\text{PPh}_3)]^+ > [\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$. O $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ tem a menor intensidade de linha branca, como reflexo da maior densidade eletrônica sobre o ouro neste complexo. Isso se justifica, uma vez que o cloreto não recebe carga eletrônica do metal por retrodoação, enquanto os ligantes 4-dimetil-amino-piridina e 2-mercapto-tiazolina podem fazê-lo. Pelos dados de XAS, as densidades eletrônicas sobre o ouro no $[\text{Au}(\text{mtz})(\text{PPh}_3)]$ e no $[\text{Au}(\text{dmap})(\text{PPh}_3)]^+$ devem ser muito próximas.

A Figura 18 apresenta os espectros de XANES dos complexos $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ (7) e $[\text{Au}(\text{CN})(\text{PPh}_3)]$ (8), ambos contendo o ligante cianeto, com o objetivo de ressaltar a influência deste ligante na densidade eletrônica do Au^{I} .

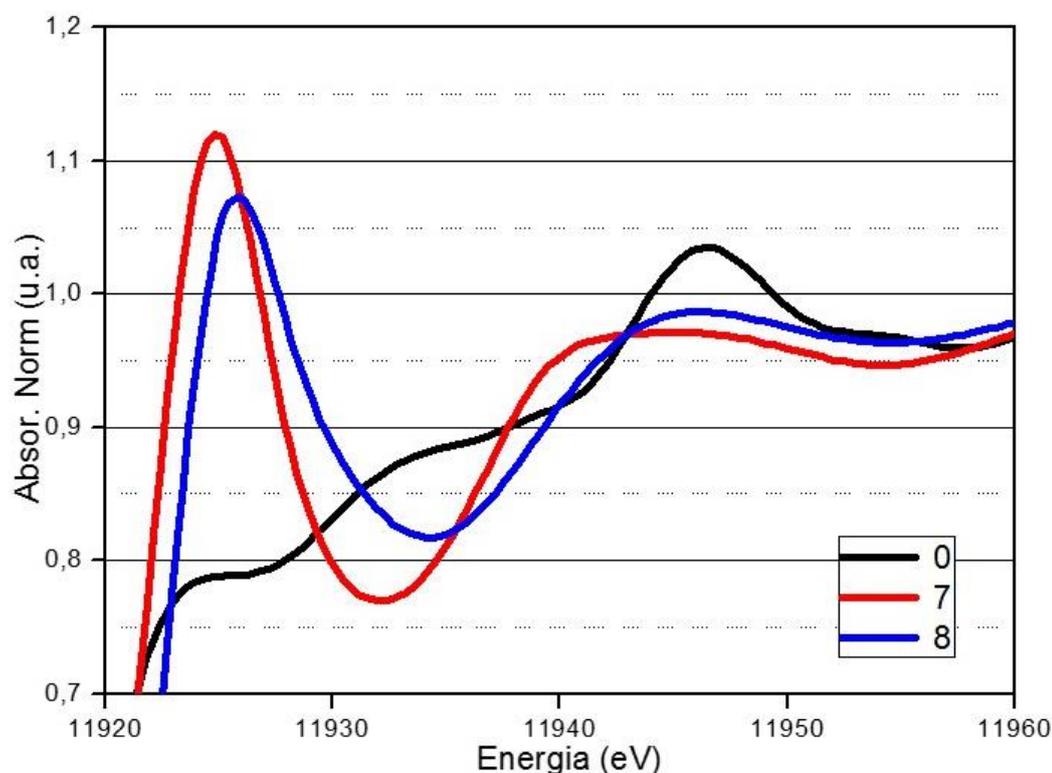


Figura 18: Detalhe da região da linha branca dos espectros de XANES na borda L_3 do ouro dos compostos $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ (7) e $[\text{Au}(\text{CN})(\text{PPh}_3)]$ (8). Ambos os complexos apresentam ligantes cianeto. O ouro metálico(0) também é representado para comparação.

Os espectros da Figura 18 se destacam pelas linhas brancas dos compostos $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ (**7**) e $[\text{Au}(\text{CN})(\text{PPh}_3)]$ (**8**), que apresentam um único pico, mais estreito que em todos os demais compostos da série estudada, de grande intensidade, com máximos em 11.925 e 11.926 eV, respectivamente. Estas intensidades de linha branca elevadas não são esperadas em compostos com orbitais d preenchidos, como os de Au^I , configuração $[5d^{10}, 6s^0]$. Essa observação revela uma baixa densidade eletrônica sobre os orbitais de caráter d centrados no metal, causada pela forte interação destes orbitais com os π^* do cianeto. O $[\text{Au}(\text{CN})(\text{PPh}_3)]$ tem a linha branca menos intensa uma vez que a retrodoação é menos pronunciada com o ligante trifenilfosfina do que com o cianeto.

4.4.2. Interação de $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ e auranofina com NCp7 e Sp1

Uma vez que a série de compostos modelo com diversas esferas de coordenação foi estudada, é possível comparar os espectros obtidos para os modelos com aqueles obtidos pela análise dos produtos de interação do $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**) e da auranofina (**6**) com NCp7 e Sp1 e obter dados sobre número de oxidação, geometria e esfera de coordenação. A hipótese de interação é de um ataque eletrofílico seguido de uma substituição do Zn^{II} por Au^I , onde o Au^I coordena-se através de resíduos de cisteína (S-doador), como discutido anteriormente. Contudo, resíduos de histidina (N-doador) estão presentes nos peptídeos e podem participar da coordenação. Além disso, interessa obter mais informações sobre a permanência ou não de uma fosfina coordenada ao ouro nessas reações.

As posições das bordas de absorção observadas nos espectros dos produtos de interação são: 11.920,8 eV, para o aduto $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{NCp7}$; 11920,9 eV, para o aduto auranofina + NCp7; e 11920,3 eV, para o aduto $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{Sp1}$. Essas posições de borda estão dentro da faixa apresentada pelos compostos modelo, todos complexos de Au^I . Isso garante que a reação de ambos os ZFs com $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ e auranofina não envolve uma mudança no estado de oxidação do ouro.

A Figura 19 apresenta os espectros de XANES dos adutos deste ZF com $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**) e auranofina (**6**), assim como dos complexos de partida e do composto $[\text{Au}(\text{mtz})(\text{PPh}_3)]$ (**5**), de ambiente de coordenação P-Au-S, permitindo sua comparação. Uma observação que se destaca nesta figura é a grande semelhança entre os espectros de XANES dos adutos $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{NCp7}$, auranofina + NCp7 e da auranofina livre (**6**). Por outro lado, comparando os adutos com $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**), se observa um aumento na intensidade da linha branca e um deslocamento de 2,2 eV para maiores energias. A grande semelhança dos espectros dos produtos de reação

[AuCl(PEt₃)] + NCp7 e auranofina + NCp7 com o espectro da auranofina sugere que o ambiente de coordenação dos adutos seja predominantemente semelhante ao da auranofina livre, P-Au-S. A maior intensidade da linha branca desses sistemas em comparação a [AuCl(PEt₃)] (**2**) sugere uma menor densidade eletrônica sobre o ouro nos adutos com o peptídeo. Uma ligação Au-S, muito mais covalente que Au-Cl, causa maior delocalização eletrônica e corrobora a hipótese de substituição do cloreto por um grupo tiol. Ainda, comparando os espectros [AuCl(PEt₃)] + NCp7 e auranofina + NCp7 com [Au(mtz)(PPh₃)] (**5**), embora existam diferenças de intensidades, a posição dos picos – devidos a espalhamentos múltiplos – é bastante semelhante, como destacado pelas linhas tracejadas na Figura 19. Essa é mais uma evidência de um ambiente de coordenação P-Au-S. As únicas fontes possíveis de tiolato na estrutura do NCp7 são as cadeias laterais das três cisteínas presentes no sítio responsável pela coordenação do Zn^{II}.

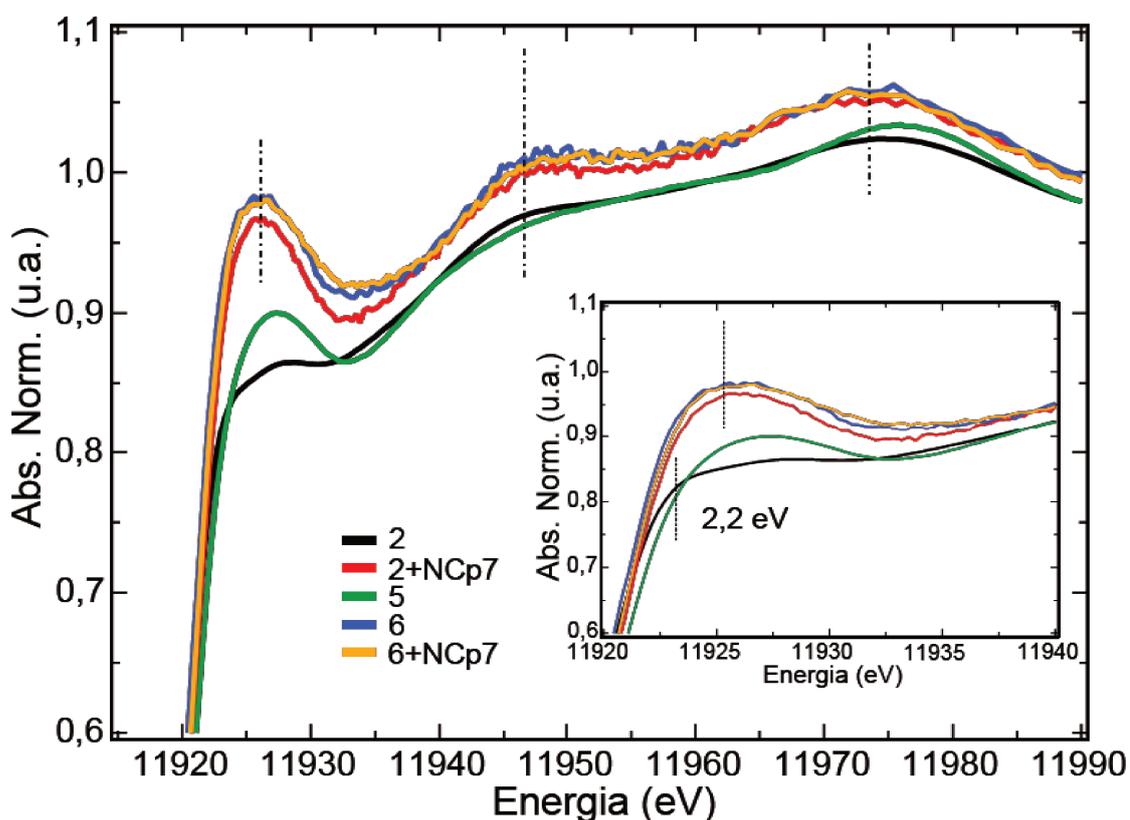


Figura 19: Espectros de XANES na borda L₃ do ouro dos compostos [AuCl(PEt₃)] (**2**) e auranofina (**6**), assim como seus produtos de interação com NCp7. Para comparação, o espectro do composto [Au(mtz)(PPh₃)] (**5**) é também mostrado.

Considerando a possibilidade de coordenações S-Au-S e P-Au-N, conforme discutido anteriormente, uma comparação entre os espectros dos adutos do NCp7 e dos compostos

modelo [Au(nac)] (**1**, S-Au-S) e [Au(dmap)(PPh₃)]⁺ (**4**, P-Au-N) pode ser feita ao observar-se a Figura 20. Os espectros de ambos os modelos têm intensidade de absorção sempre abaixo da intensidade dos adutos [AuCl(PEt₃)] + NCp7 e auranofina + NCp7. Além disso, enquanto a região da linha branca do [Au(nac)] (**1**) e do [Au(dmap)(PPh₃)]⁺ (**4**) apresenta dois picos largos, a linha branca dos adutos apresenta apenas um pico largo e intenso. Ainda é possível observar que os dois picos que aparecem em 11.949 e 11.975 eV nos espectros dos adutos não se apresentam nos espectros do [Au(nac)] (**1**) e do [Au(dmap)(PPh₃)]⁺ (**4**). Enquanto o [Au(nac)] apresenta apenas um pico muito largo, com máximo em torno de 11.971 eV, o [Au(dmap)(PPh₃)]⁺ apresenta dois picos em 11.955 e 11.975 eV. O pico em 11.975 eV pode estar relacionado à presença de uma fosfina, uma vez que ele aparece em todos os espectros dos compostos modelo estudados contendo PPh₃ e PEt₃, com pequenas variações de posição (no máximo 1 eV).

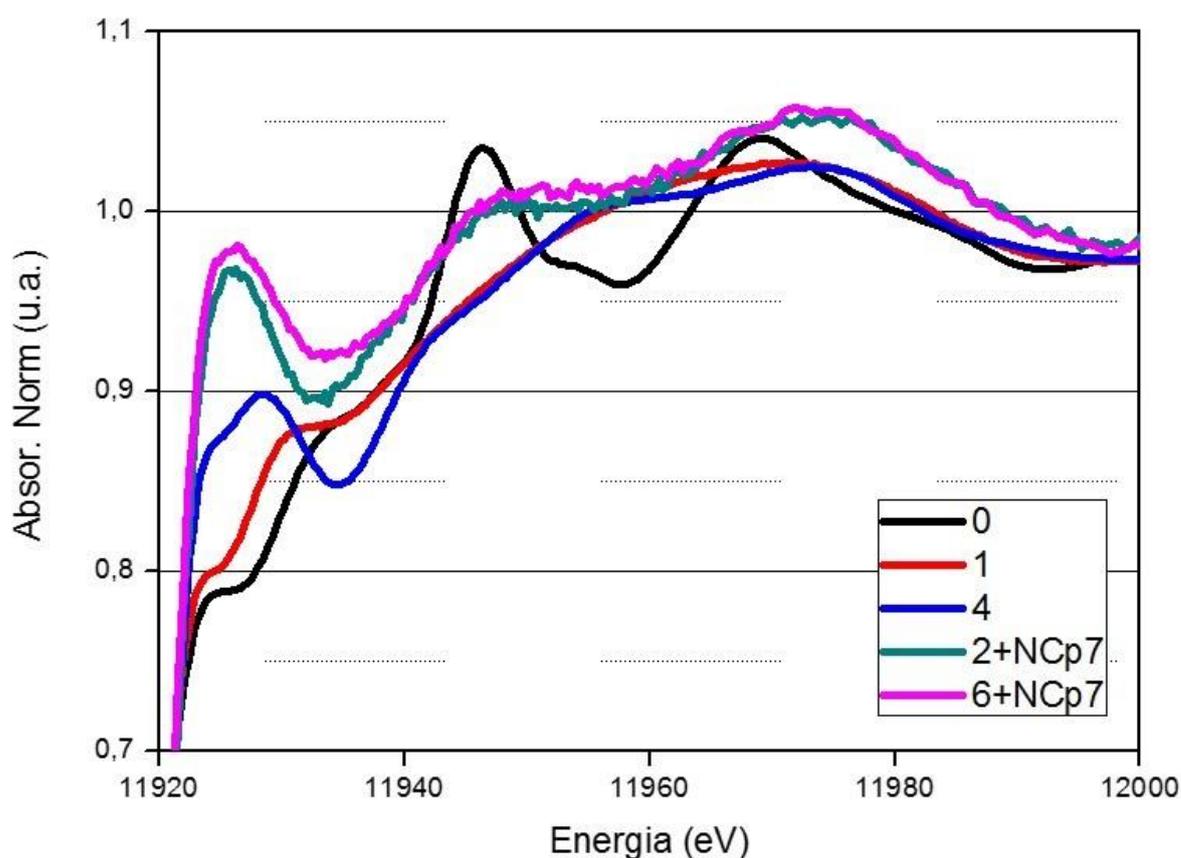


Figura 20: Espectros de XANES na borda L₃ do ouro dos compostos [Au(nac)] (**1**) e [Au(dmap)(PPh₃)]⁺ (**4**), além dos adutos [AuCl(PEt₃)] + NCp7 e auranofina + NCp7. O ouro metálico (**0**) também é representado para comparação.

A proposta de uma esfera de coordenação do Au^I majoritariamente Et₃P-Au-S para os produtos de interação [AuCl(PEt₃)] + NCp7 e auranofina + NCp7 pode ainda ser suportada pela estrutura fina estendida de absorção de raios X (*extended X-ray absorption fine structure*, EXAFS). EXAFS é capaz de fornecer informações sobre o sítio de ligação do metal, tais como distâncias de ligação, número de coordenação e natureza dos átomos vizinhos¹⁰³.

A Figura 21 mostra os espectros de EXAFS, no espaço k, de [AuCl(PEt₃)] + NCp7 e auranofina + NCp7 assim como da auranofina. Como se pode observar, os espectros de EXAFS de [AuCl(PEt₃)] + NCp7 e auranofina + NCp7 são virtualmente superponíveis ao da auranofina (6) livre até k=10 Å⁻¹. Essa é uma indicação de que as distâncias entre o ouro e os átomos espalhadores da primeira esfera de coordenação são praticamente idênticas nesses três sistemas. Como a estrutura cristalográfica da auranofina já foi resolvida¹⁴³, esse resultado é uma indicação consistente da estrutura dos adutos. As distâncias observadas por cristalografia na auranofina devem ser praticamente as mesmas nos produtos de interação [AuCl(PEt₃)] + NCp7 e auranofina + NCp7, sugerindo um modelo estrutural do tipo P-Au-S, com distâncias aproximadas de 2,29 Å para a ligação Au-S e 2,26 Å para a Au-P, em geometria aproximadamente linear (o ângulo P-Au-S na auranofina é de 173,6°)¹⁴³.

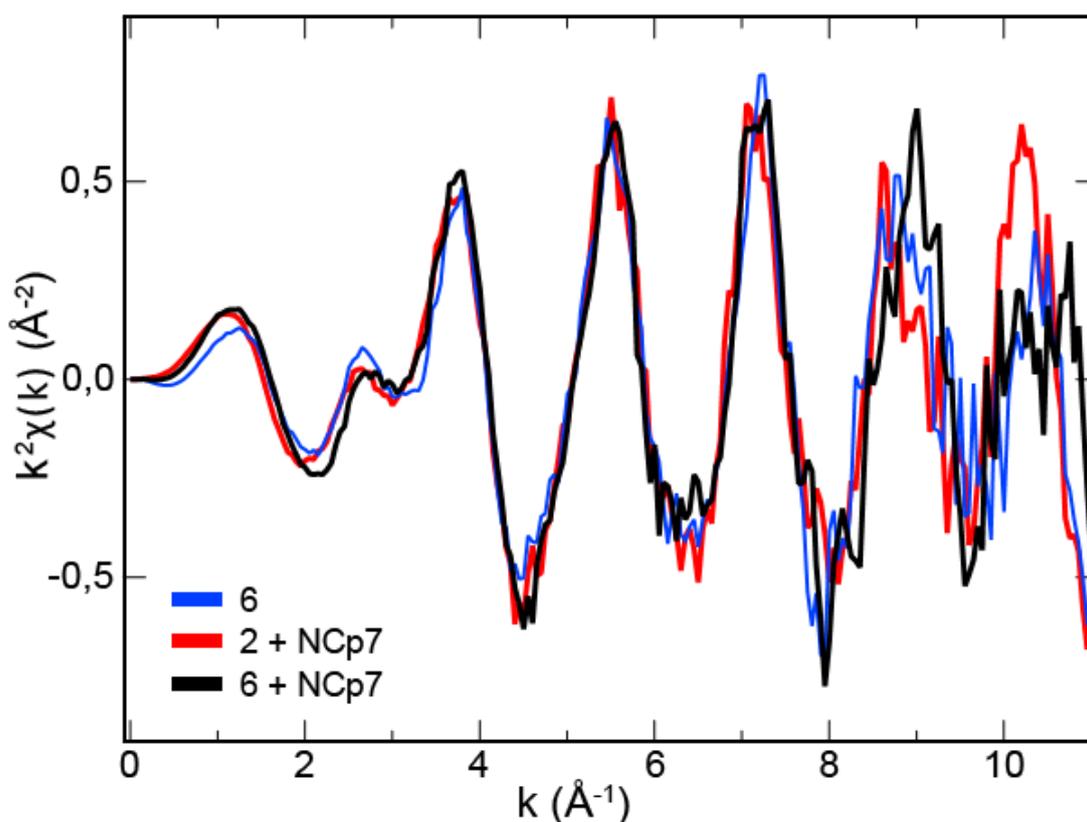


Figura 21: Espectros de EXAFS de [AuCl(PEt₃)] + NCp7, auranofina + NCp7 e da auranofina (6), no espaço k. Os espectros são virtualmente idênticos.

Buscando mais uma confirmação para o modelo estrutural proposto para os adutos do NCp7 com complexos fosfinaouro(I), uma série de simulações de XANES foi feita usando o FEFF9¹³¹⁻¹³³. O FEFF9 é um programa amplamente utilizado para cálculo *ab initio* de espectros de XAS e estrutura eletrônica, usando o formalismo completo de espalhamentos múltiplos. Os espectros simulados obtidos podem ser observados na Figura 22.

O espectro simulado de $[\text{AuCl}(\text{PET}_3)]$ reproduz o padrão de dois picos entre 11950 e 11980 eV, entretanto o pico duplo na região da linha branca não foi bem reproduzido. Isso pode ser resultado de um alargamento superestimado durante a simulação. Corrigindo o termo associado ao potencial de correlação de troca dependente da energia de Hedin-Lundqvist, é possível aproximar o espectro simulado ao empírico, contudo, nenhum parâmetro fornecido pelo FEFF9 foi corrigido empiricamente para que, assim, os espectros obtidos pudessem ser comparados entre si (todos os espectros são igualmente afetados pelos mesmos parâmetros).

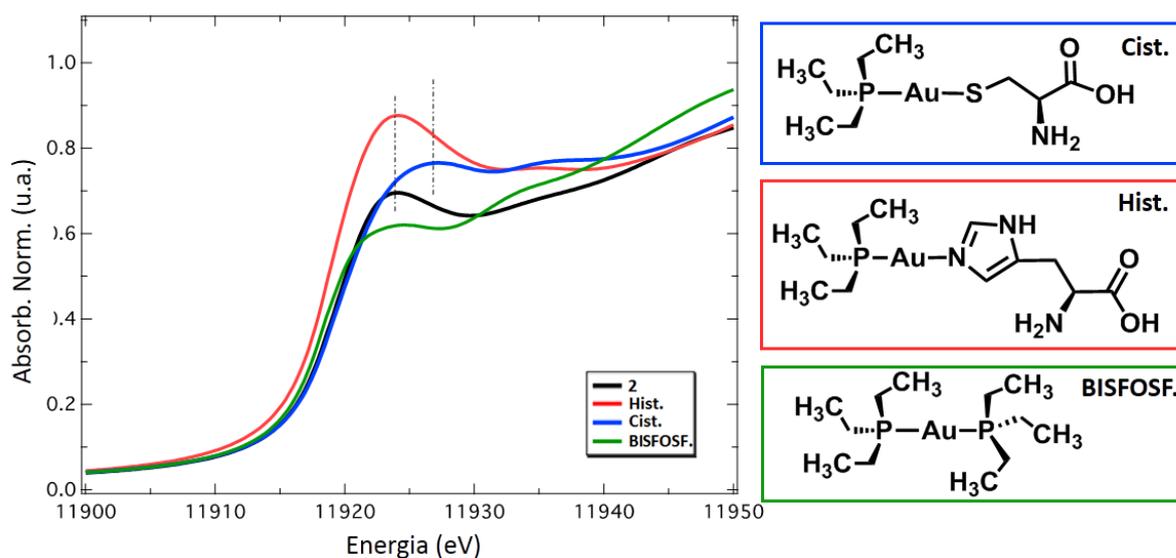


Figura 22: Região da linha branca de espectros de XANES simulados no FEFF9 do complexo $[\text{AuCl}(\text{PET}_3)]$ (2), bem como de três complexos hipotéticos formados substituindo-se o cloreto do $[\text{AuCl}(\text{PET}_3)]$ por uma cisteína (Cist.), uma histidina (Hist.) ou uma segunda trietilfosfina (Bisfosf.)

O espectro simulado para o complexo hipotético contendo histidina apresenta o máximo da região da linha branca na mesma posição em relação ao espectro simulado de $[\text{AuCl}(\text{PET}_3)]$ (2), mas um aumento significativo de intensidade é observado. De maneira oposta, o complexo hipotético bisfosfina apresenta uma diminuição na intensidade da linha branca sem mudança na posição do máximo. Já o complexo hipotético contendo cisteína apresenta um deslocamento na posição de máximo da linha branca para maiores energias, em torno de 2,8 eV, como apontado

pelas linhas tracejadas verticais da Figura 22, além de um aumento na intensidade em relação ao espectro simulado de $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**). O comportamento geral observado nas simulações para o $[\text{Au}(\text{Cis})(\text{PEt}_3)]$ corresponde ao observado experimentalmente com os adutos $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{NCp7}$ e auranofina + NCp7, corroborando o modelo proposto.

Como demonstrado por espectrometria de massas (Figura 12), o comportamento do aduto $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{Sp1}$ é bastante diferente. Ele apresenta apenas uma espécie de dedo de ouro (AuF), que pôde ser isolada e purificada. O espectro de XANES desta amostra está representado na Figura 23, juntamente com os espectros de $[\text{Au}(\text{nac})]$ (**1**), $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**), auranofina (**6**) e $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{NCp7}$ e do ouro metálico (**0**). Na região da linha branca, o espectro do $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{Sp1}$ mostra uma estrutura composta por dois picos pouco intensos, de modo muito similar ao $[\text{Au}(\text{nac})]$ (**1**), mas diferente de $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{NCp7}$ e auranofina. O $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**), utilizado na síntese do $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{Sp1}$, também apresenta dois picos nesta região, contudo a relação de intensidades é invertida e a separação dos picos é menor. Além disso, a região após a borda do espectro de $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{Sp1}$ exibe apenas um pico muito alargado, como também pode ser observado no espectro do $[\text{Au}(\text{nac})]$. Essas evidências corroboram a hipótese de um ambiente de coordenação S-Au-S.

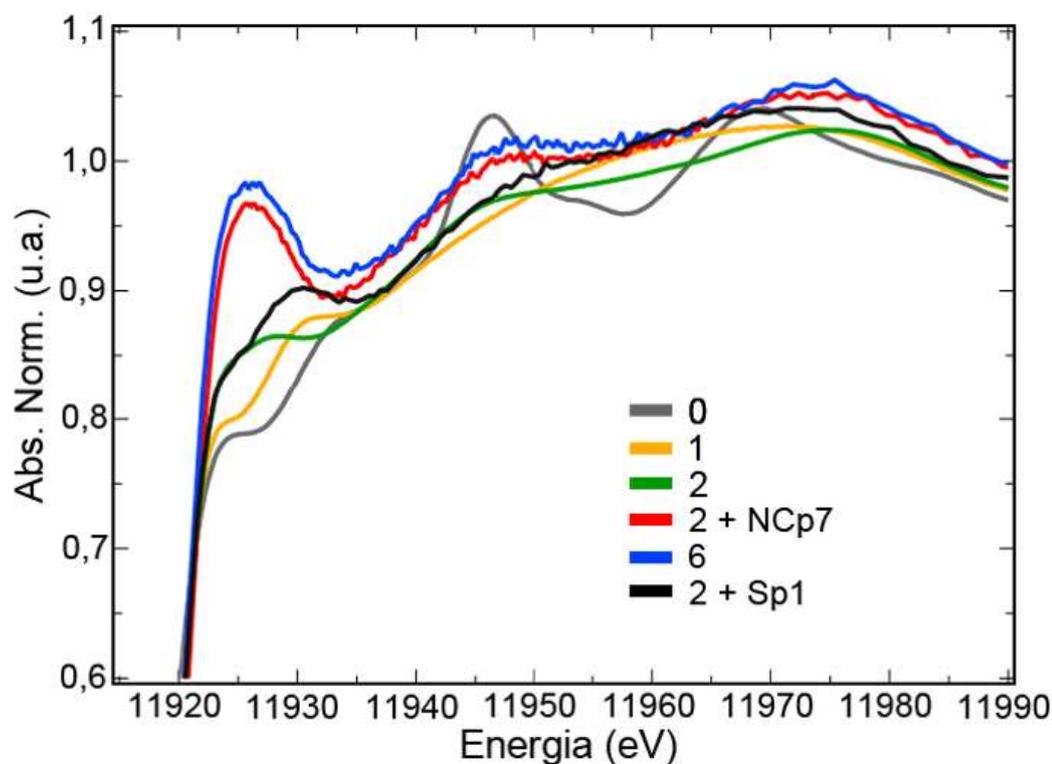


Figura 23: Espectros de XANES na borda L_3 do ouro do $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{Sp1}$. São mostrados para comparação os espectros dos compostos $[\text{Au}(\text{nac})]$ (**1**), $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**) e auranofina (**6**) assim como do sistema $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{NCp7}$ e da folha de ouro metálico (**0**).

Quando se comparam, por outro lado, os espectros do $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{Sp1}$ com os espectros de $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{NCp7}$ e auranofina + NCp7 , apresentados na Figura 23, estes últimos apresentam intensidades de linha branca muito superiores ao primeiro, com um pico não duplicado. Essa diferença de intensidade aponta para um centro metálico com maior densidade eletrônica nos orbitais com caráter 5d no produto de interação com Sp1 . Essa observação pode ser justificada pelo caráter fortemente doador dos grupos tiol em contraste com o caráter σ -doador mas π -receptor dos grupos fosfina.

A análise do EXAFS mostra que, diferentemente do sistema $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{NCp7}$, o espectro de EXAFS do $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{Sp1}$ não é idêntico ao da auranofina (dado não apresentado). A Figura 24 apresenta os espectros de EXAFS no espaço k de $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{Sp1}$ e do $[\text{Au}(\text{nac})]$ (1). Embora não sejam também exatamente superponíveis, os EXAFS do $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{Sp1}$ e do $[\text{Au}(\text{nac})]$ (1) mostram diversas similaridades. A ausência de uma estrutura cristalográfica resolvida do $[\text{Au}(\text{nac})]$ limita, contudo, uma análise mais detalhada da possível estrutura do aduto de $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{Sp1}$, mas é uma evidência significativa de que pelo menos a primeira esfera de coordenação seja estruturalmente semelhante nos dois casos. A proposta de estrutura do composto $[\text{Au}(\text{nac})]$ é um polímero de Au(I) e N-acetil-cisteína, com tiolatos em ponte entre dois átomos de ouro, formando uma cadeia¹²⁵, desse modo o modelo de coordenação proposto para $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{Sp1}$ é do ouro ligado a dois resíduos de cisteína presentes no sítio de coordenação do Zn^{II} do peptídeo.

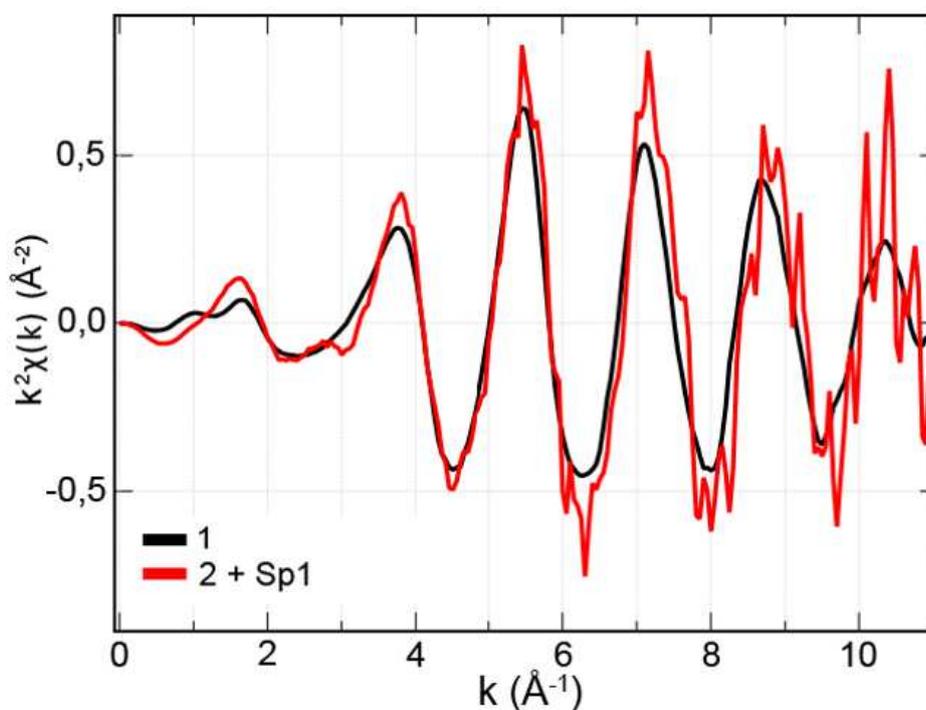


Figura 24: Espectros de EXAFS de $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{Sp1}$ e 1, no espaço k .

O conjunto destas evidências suporta a esfera de coordenação P-Au-S como mais provável para os produtos de interação $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{NCp7}$ e auranofina + NCp7 e a esfera S-Au-S como mais provável para $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)] + \text{Sp1}$. Nas interações estudadas entre ZF e compostos de Au(I) não se observou qualquer evidência de interação do ouro com as histidinas presentes nos peptídeos, apenas cisteínas. A presença de um tioaçúcar na auranofina (6) e de um cloreto em $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (2) não ocasionou diferenças na reatividade destes complexos frente ao NCp7, pelo menos quanto à estrutura final do aduto formado.

Diferentes produtos finais foram, portanto, observados para cada um dos dois peptídeos. As análises sugerem que o ouro se mantém no estado de oxidação +1 em uma geometria linear quando seus complexos reagem com ambos os modelos de ZFs. No caso do NCp7, o maior conteúdo de cisteína não causa a perda da fosfina coordenada ainda que haja coordenação do ouro ao peptídeo com esfera de P-Au-S, como demonstrado por XAS. O Sp1, por sua vez, mesmo com menor conteúdo de cisteína, reage com $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ causando a perda da fosfina e coordenação numa estrutura S-Au-S. Baseando-se nestas evidências, a Figura 25 apresenta os modelos propostos para as reações do $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ com os ZFs, destacando as diferentes possibilidades de coordenação no caso do NCp7. Essas observações confirmam os complexos fosfinaouro(I) como potenciais modelos no estudo de ZFs, bem como potenciais inibidores seletivos.

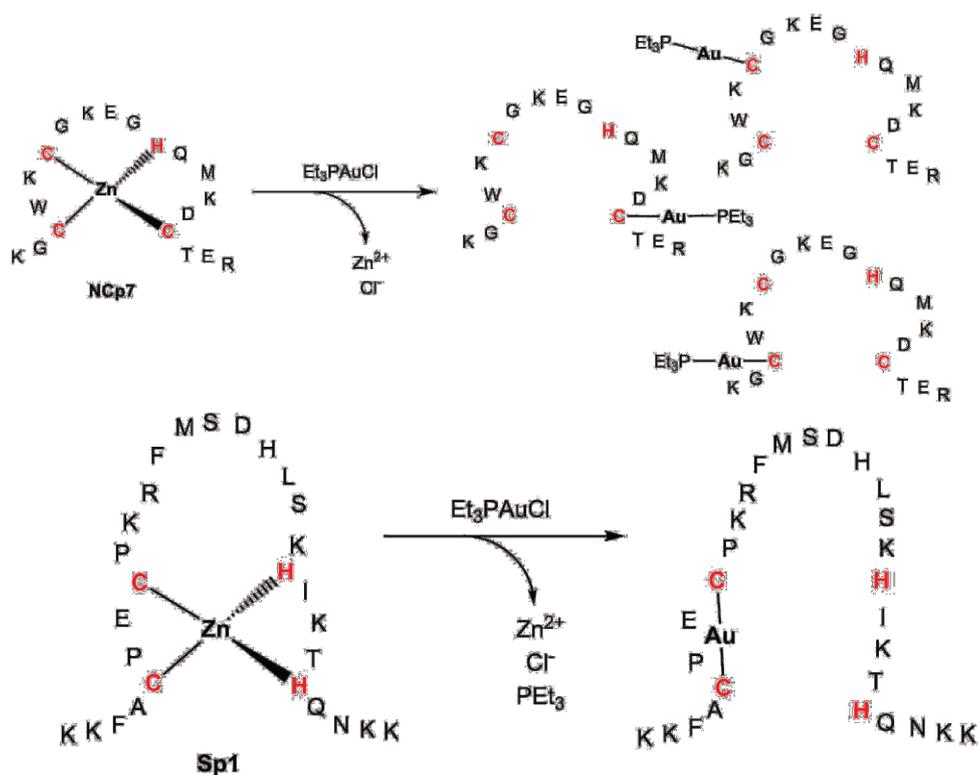


Figura 25: Esquema de reação entre $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (2) e os peptídeos modelo. Para o NCp7 três possíveis coordenações são apresentadas.

Capítulo 5: Zinco Catalítico: Inibição de β -lactamases por complexos metálicos

Observada a reatividade dos complexo fosfinaouro(I) frente a ZFs, elaborou-se a hipótese de que essa classe de compostos poderia também atuar como inibidora de zinco-enzimas. As MBLs foram selecionadas como alvo devido à urgência em encontrar-se inibidores para essas enzimas. Nesse contexto a BCE foi utilizada como modelo inicial pois, além de comercialmente disponível, ela representa de maneira realista o desafio representado por bactérias resistentes que expressam simultaneamente MBLs e SBLs.

A reação de hidrólise da nitrocefina (**15**) foi utilizada para investigação do efeito de complexos metálicos sobre a atividade enzimática das β -lactamases. As atividades enzimáticas relativas de BCE em presença de potenciais inibidores foram calculadas segundo a Equação 1, apresentada no Capítulo 2 deste trabalho.

A Figura 26, bem como a Tabela 2, expressam os valores de atividade relativa obtidos em presença dos complexos fosfinaouro(I), do dicianoaurato(I) (**7**), do tetracloroaurato(III) (**9**), do tetracloropaladato(II) (**10**) e do tetracloroplatinato(II) (**10**). Os valores obtidos com os inibidores clássicos de β -lactamases, clavulanato de potássio (CLV, **16**) e EDTA (**17**), são também apresentados.

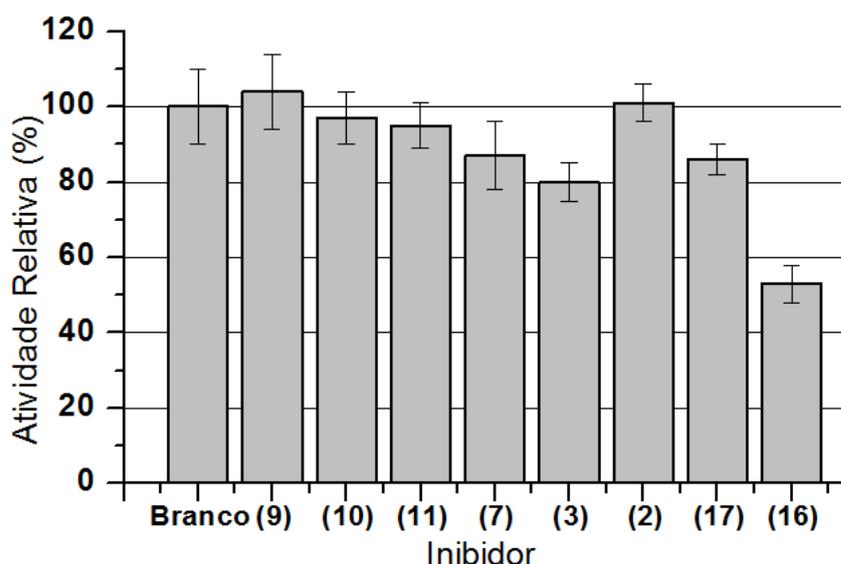


Figura 26: Atividade enzimática relativa de BCE na hidrólise da nitrocefina.

Tabela 2: Atividade enzimática relativa de BCE na hidrólise da nitrocefina.

| Inibidor | Atividade Relativa (%) |
|---|------------------------|
| Branco | 100 ± 10 |
| K[AuCl ₄] (9) | 104 ± 10 |
| K ₂ [PdCl ₄] (10) | 97 ± 7 |
| K ₂ [PtCl ₄] (11) | 95 ± 6 |
| K[Au(CN) ₂] (7) | 87 ± 9 |
| Ph ₃ PAuCl (3) | 80 ± 5 |
| Et ₃ PAuCl (2) | 101 ± 5 |
| EDTA (17) | 86 ± 4 |
| CLV (16) | 53 ± 5 |

O complexo tetracloroaurato(III) e os compostos análogos de Pd^{II} (**10**) e Pt^{II} (**11**) não causaram diminuição na atividade enzimática da BCE frente à hidrólise de nitrocefina. Diferentemente, o dicianoaurato(I) (**7**) reduziu a atividade enzimática relativa de BCE para 87 ± 9%. O [AuCl(PPh₃)] (**3**) diminuiu a atividade enzimática para 80 ± 5%, contudo o [AuCl(PEt₃)] (**2**) não a alterou. O CLV (**16**) diminui a atividade enzimática relativa para 53 ± 5%, enquanto na presença de EDTA (**17**) a diminui para 86 ± 4%. É importante destacar a diferença de atuação destes compostos. O EDTA é um sequestrante clássico de íons metálicos. Foi demonstrado que este composto remove o zinco das MBLs⁹⁴, impedindo sua atuação catalítica^{91,97,144}, mas sem afetar as SBLs. Por outro lado, o CLV atua como inibidor seletivo de SBLs, promovendo uma acilação do resíduo de serina catalítico, fazendo com que percam sua atividade^{9,145}. A redução da atividade enzimática pelo CLV é mais pronunciada do que a do EDTA uma vez que, como observado no item 3.1.1, BCE contém uma quantidade maior de SBL do que de MBL.

O resultado obtido para complexos de metais d⁸ é interessante uma vez que já foram observadas interações de todos esses íons metálicos com diversos sistemas biológicos^{9,146}, incluindo outras zinco-proteínas, como ZFs^{13,147}. É desejável que existam diferenças de

reatividade dos complexos frente às diferentes zinco-proteínas e esta é uma observação que demonstra a possibilidade de sintetizar compostos que atuem seletivamente.

No caso do complexo dicianoaurato(I) (**7**), é interessante observar como a queda na atividade enzimática é semelhante com o uso de mesmas concentrações de EDTA (**17**). Embora este teste seja insuficiente para afirmar que o complexo de Au^I esteja atuando seletivamente sobre a zinco-enzima, assim como o composto quelante, essa se apresenta como uma hipótese plausível, a ser verificada.

Os resultados dos experimentos cinéticos envolvendo os complexos fosfinaouro(I) demonstram que o composto [AuCl(PPh₃)] (**3**) leva a uma queda de atividade ligeiramente maior do que a observada com o dicianoaurato (**7**) e o EDTA (80 ± 5%). Por outro lado, o [AuCl(PEt₃)] (**2**) não apresenta qualquer atividade inibitória. Esta interação é diferente da observada para os ZF. Nos dois exemplos estudados neste trabalho, a reação do ZF com [AuCl(PEt₃)] é imediata, levando a substituição do Zn^{II} por Au^I. Já foi mostrado que reações de ZFs com **3** apresentam comportamento análogo⁵⁷.

Esse experimento é insuficiente para determinar a razão pela qual se observa essa diferença de reatividade com a BCE, contudo algumas propriedades químicas diferem entre os complexos [AuCl(PEt₃)] (**2**) e [AuCl(PPh₃)] (**3**), e podem ser elencadas como possíveis responsáveis. Primeiramente, quanto ao volume, [AuCl(PPh₃)] é mais volumoso do que [AuCl(PEt₃)], como pode ser destacado através dos ângulos de cone das fosfinas ($\theta_{\text{PPh}_3} = 145^\circ$; $\theta_{\text{PEt}_3} = 132^\circ$)¹⁴⁸. Além disso, existe uma diferença de solubilidade: [AuCl(PPh₃)] é mais lipossolúvel do que [AuCl(PEt₃)]. A densidade eletrônica sobre o metal também é diferente nos dois casos, como discutido anteriormente para os experimentos de XAS. A Figura 9 mostra que a intensidade da linha branca no espectro de [AuCl(PEt₃)] é um pouco menor do que no de [AuCl(PPh₃)], sugerindo uma maior densidade eletrônica no ouro em [AuCl(PEt₃)]. A diferença se deve principalmente à basicidade das duas fosfinas ($\text{pK}_{\text{aPPh}_3} = 2,73$; $\text{pK}_{\text{aPEt}_3} = 8,69$)¹⁴⁹, que reflete a capacidade como σ -doador, embora a diferença na capacidade como π -receptor deva ser também considerada. Esses dois caracteres, doador e receptor de elétrons, podem ser racionalizados simultaneamente pelo Parâmetro Eletrônico de Tolman, ν , definido como a frequência do modo vibracional A₁ da carbonila em complexos do tipo [Ni(CO)₃L]¹⁴⁸. Quanto menor o valor de ν , maior a densidade eletrônica sobre o metal. PPh₃ é pior σ -doador e melhor π -receptor do que PEt₃ ($\nu_{\text{PPh}_3} = 2068,9 \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{PEt}_3} = 2061,7 \text{ cm}^{-1}$)¹⁴⁸ o que permite deduzir que [AuCl(PPh₃)] seja um melhor eletrófilo, como confirmado nas análises de XAS apresentadas neste trabalho. Essa é uma relação importante, principalmente quando se considera a hipótese de um ataque eletrofílico do complexo metálico aos resíduos de aminoácidos do sítio ativo da

MBL, de maneira análoga ao mecanismo proposto para a interação com os ZF. No entanto, seriam necessários mais experimentos para embasar de maneira contundente essa justificativa para o comportamento observado.

Outra diferença importante entre os complexos $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ (**2**) e $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ (**3**) está na presença de grupos aromáticos em $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ mas não em $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$. Existem alguns resíduos de triptofano presentes na BcII, a MBL presente na BCE, e, particularmente, um exposto ao solvente e muito próximo do sítio ativo, como apresentado na Figura 27. A distância do centro de massa do resíduo de triptofano 89 em relação ao zinco no sítio da cisteína numa estrutura cristalográfica obtida na presença do ligante captopril (PDB: 4C1H) é de apenas 6,5Å.

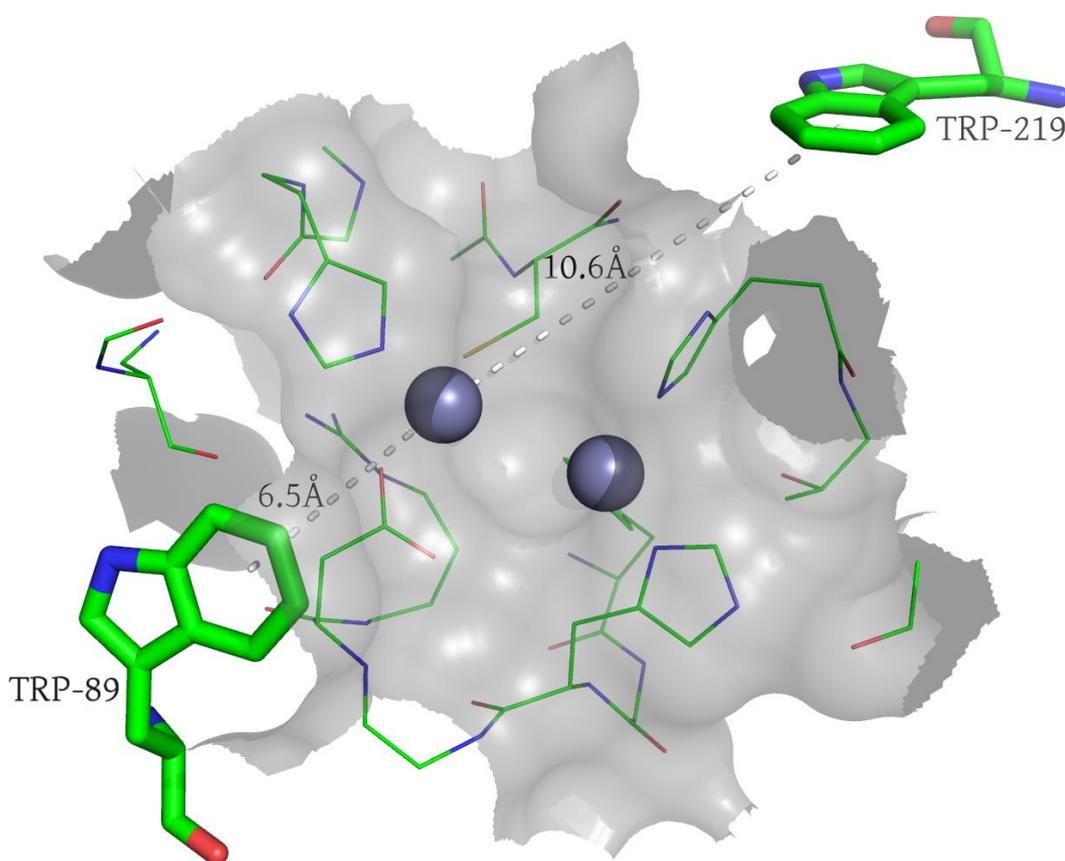


Figura 27: Distância média do centro de massa dos resíduos de triptofano 89 e 219 em relação ao zinco catalítico do sítio da cisteína. O resíduo 89 é exposto ao solvente. (PDB: 4C1H)

Dois aspectos são muito importantes em relação a esse resíduo de triptofano 89. Por um lado, resíduos de triptofano em geral são muito importantes para interações entre biomoléculas, no que diz respeito a empilhamento- π entre ele e outros grupos aromáticos. O empilhamento- π através de um triptofano foi, por exemplo, destacado anteriormente aqui como fator determinante para a ligação do ZF NCp7 ao DNA⁵⁶.

Um eventual empilhamento- π com as fênilas do complexo $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ (**3**) poderia justificar a atuação deste como inibidor em detrimento do outro complexo, que contém uma alquilfosfina. Essa é também uma hipótese para a qual não se apresenta qualquer verificação neste trabalho, contudo ela vai ao encontro de algumas observações feitas por outros grupos. Huntley e colaboradores¹⁵⁰ destacam o papel fundamental de um resíduo análogo de triptofano numa MBL obtida de *Bacteroides fragilis* promovendo mutações nesse resíduo e observando o comportamento das enzimas mutantes em comparação à selvagem. Karsisiotis e colaboradores¹⁵¹ destacam também como fundamental a atuação não só do triptofano, mas também de outros resíduos hidrofóbicos como valina e fenilalanina (também capaz de promover empilhamento- π) na BcII. Importa ainda destacar que em ambos os trabalhos citados^{150,151}, assim como em numerosos outros¹⁵²⁻¹⁵⁴, enfatiza-se a localização destes resíduos hidrofóbicos e capazes de promover empilhamento- π nas proximidades do sítio ativo de diversas MBLs.

Este resultado mostra uma clara diferença de reatividade frente à BCE entre dois complexos fosfinaouro(I), causada pela substituição da cadeia lateral na fosfina coordenada, embora sejam apresentadas apenas hipóteses sobre as causas dessa diferença. Essa é uma *prova de conceito* da modulação da atividade de complexos metálicos através da escolha de ligantes aplicada diretamente ao caso das β -lactamases, reforçando o interesse na pesquisa e desenvolvimento de metalofármacos inibidores desta classe enzimática.

Capítulo 6: AuTCEP – Novo complexo fosfinaouro(I) hidrossolúvel

6.1. Síntese e caracterização

6.1.1. Síntese

Tendo em vista os resultados obtidos para os complexos $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ e $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ no ensaio de inibição de MBL e os resultados obtidos e conhecidos na literatura para ensaios de inibição de ZF, um novo complexo de Au^{I} contendo fosfina foi proposto, sintetizado e caracterizado. Uma das dificuldades em utilizar-se complexos fosfinaouro(I) é a baixa solubilidade em água. A adição de solventes em sistemas enzimáticos causa muitas vezes perda de atividade, instabilidade e dificulta diversas análises. Buscando contornar essa limitação foi selecionada como ligante a tri(2-carboxietil)fosfina (TCEP – **13**), por tratar-se de uma fosfina hidrossolúvel. Além disso, ela é uma fosfina de basicidade menor do que PEt_3 , mas maior do que PPh_3 ($\text{pK}_{\text{aTCEP}} = 7,68$)¹⁵⁵. É de se esperar que a capacidade de TCEP como π -receptor seja muito semelhante à de PEt_3 , mas, como sua basicidade é menor, um complexo de Au^{I} contendo esta fosfina e um cloreto deveria ser um eletrófilo intermediário, entre os compostos $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ e $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$.

Buscou-se, desse modo, a síntese de um complexo linear de Au^{I} contendo TCEP e cloreto como ligantes, análogo aos compostos estudados frente a ZFs e BCE. Numa primeira abordagem sintética, um precursor de Au^{III} , tetracloroaurato(III), foi misturado diretamente a dois equivalentes de TCEP em solução aquosa. Esse método é bastante empregado na síntese de compostos do tipo fosfinaouro(I), e conveniente pelo uso da mesma substância como ligante e redutor. Contudo, este método levou à redução do Au^{III} a Au^0 .

Numa segunda abordagem, optou-se por um redutor mais brando, o *S,R*-ditiotreitól (**14**, DTT). Ao adicionar o DTT ao precursor de Au^{III} uma suspensão marrom opaca foi formada, que se dissolveu pela adição de TCEP, dando origem a uma solução incolor. O complexo isolado desse sistema se apresenta como um sólido branco, com solubilidade de aproximadamente 5 mg por mL de água e foi denominado AuTCEP (**12**). Monocristais foram obtidos por recristalização do produto obtido em água.

O sólido isolado da síntese foi submetido a análise elementar para determinação de sua fórmula mínima. Os resultados obtidos foram 26,23% de carbono e 4,10% de hidrogênio, mas

esses resultados não concordam satisfatoriamente aos valores calculados para nenhuma estrutura. Submetendo, porém, os cristais do complexo a análise elementar obteve-se 29,53% de carbono e 3,95% de hidrogênio, que são coerentes com os valores calculados para uma fórmula mínima $\text{K}[\text{Au}(\text{PC}_9\text{H}_{14}\text{O}_6)_2]$, 29,44% de carbono e 3,84% de hidrogênio. Esses resultados sugerem que o sólido bruto possa ser uma mistura de diferentes espécies, provavelmente de um mesmo complexo, mas com diferente número de íons potássio em sua estrutura.

6.1.2. Difração de raio X de monocristal

Os monocristais obtidos tiveram sua estrutura resolvida por difração de raios X, como apresenta a Figura 28. A estrutura de cela cristalina é ortorrômbica e está representada em três diferentes vistas na Figura 29. As dimensões dos lados e ângulos na cela são: $a = 11,4853 \text{ \AA}$, $b = 13,3432 \text{ \AA}$ e $c = 15,5624 \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Os parâmetros da análise cristalográfica estão disponíveis em anexo.

É importante destacar que o ouro encontra-se coordenado a dois fósforos com distância Au-P de $2,2872 \text{ \AA}$ e ângulo P-Au-P de $176,47^\circ$. Dois dos grupos carboxílicos dos ligantes se encontram desprotonados e o composto apresenta um potássio como contraíon. Essa estrutura associa-se a um fórmula mínima $\text{K}[\text{Au}(\text{PC}_9\text{H}_{14}\text{O}_6)_2]$, com massa molar de $734,42 \text{ g mol}^{-1}$.

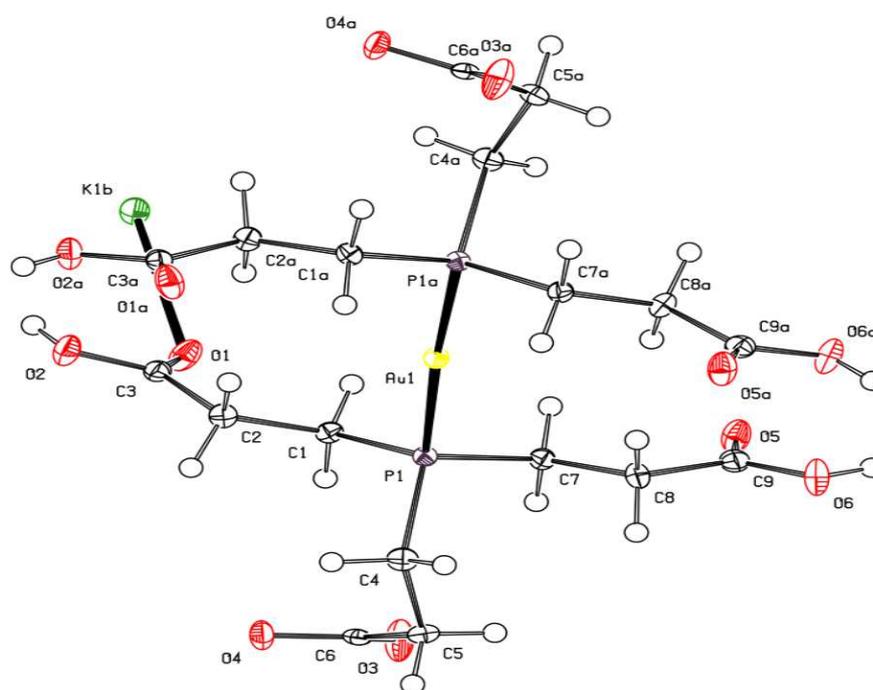


Figura 28: Figura ORTEP referente à estrutura cristalina do AuTCEP.

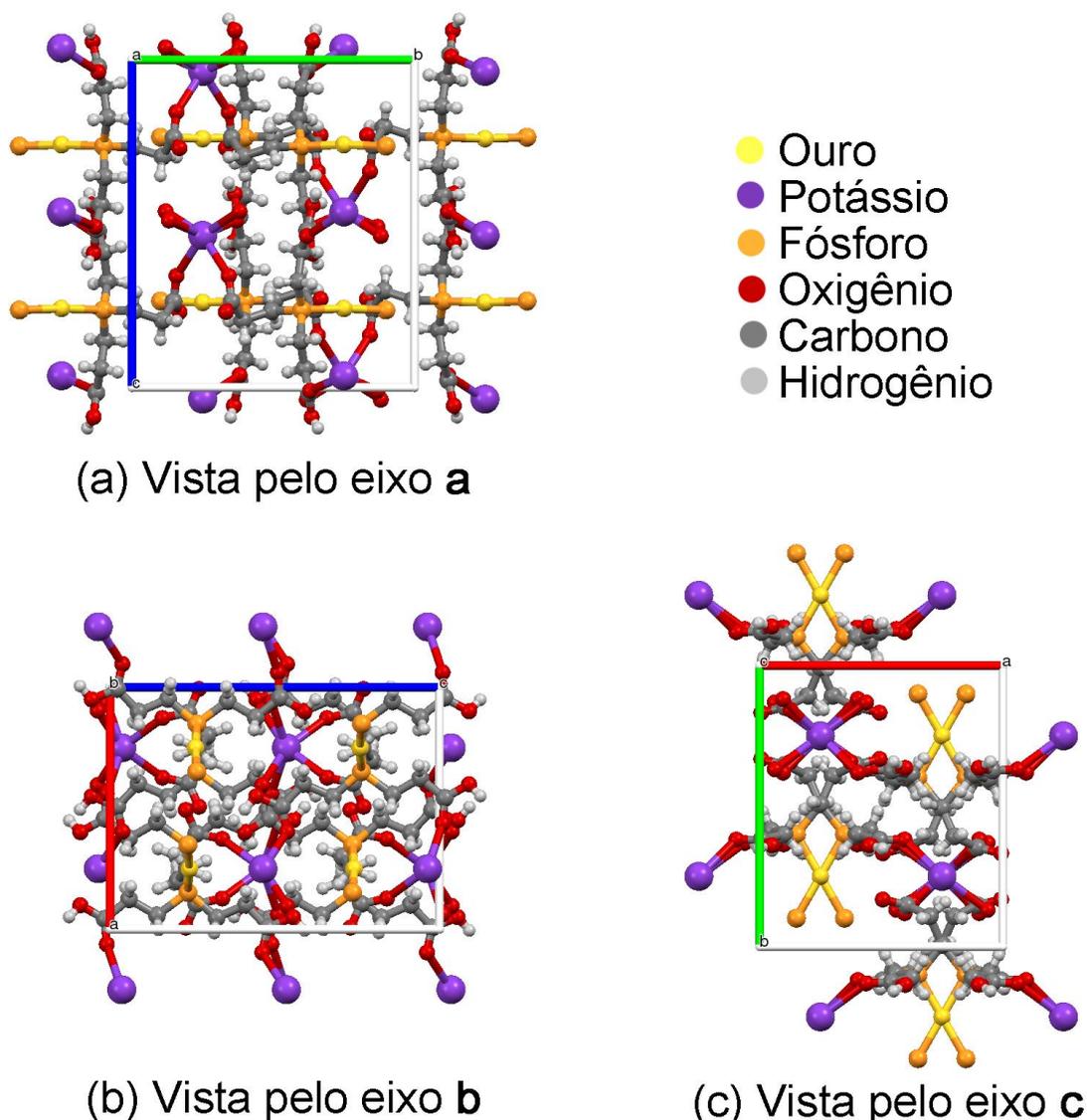


Figura 29: Estruturas de cela do monocristal de AuTCEP. (a) Vista pelo eixo a. (b) Vista pelo eixo b. (c) Vista pelo eixo c.

6.1.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear em solução

O complexo AuTCEP (**12**) foi caracterizado por espectroscopia de ^1H , ^{13}C e ^{31}P NMR em solução (D_2O). Os espectros de NMR do ligante TCEP (**13**) foram também obtidos para comparação com o complexo.

A Figura 30 apresenta os espectros de ^{31}P NMR do complexo AuTCEP e do ligante livre. Ambos os compostos apresentam apenas um sinal de fósforo, como esperado. O sinal do AuTCEP aparece como um simpleto muito estreito em 40,93 ppm, enquanto o sinal do TCEP aparece como um simpleto ligeiramente mais alargado em 15,88 ppm.

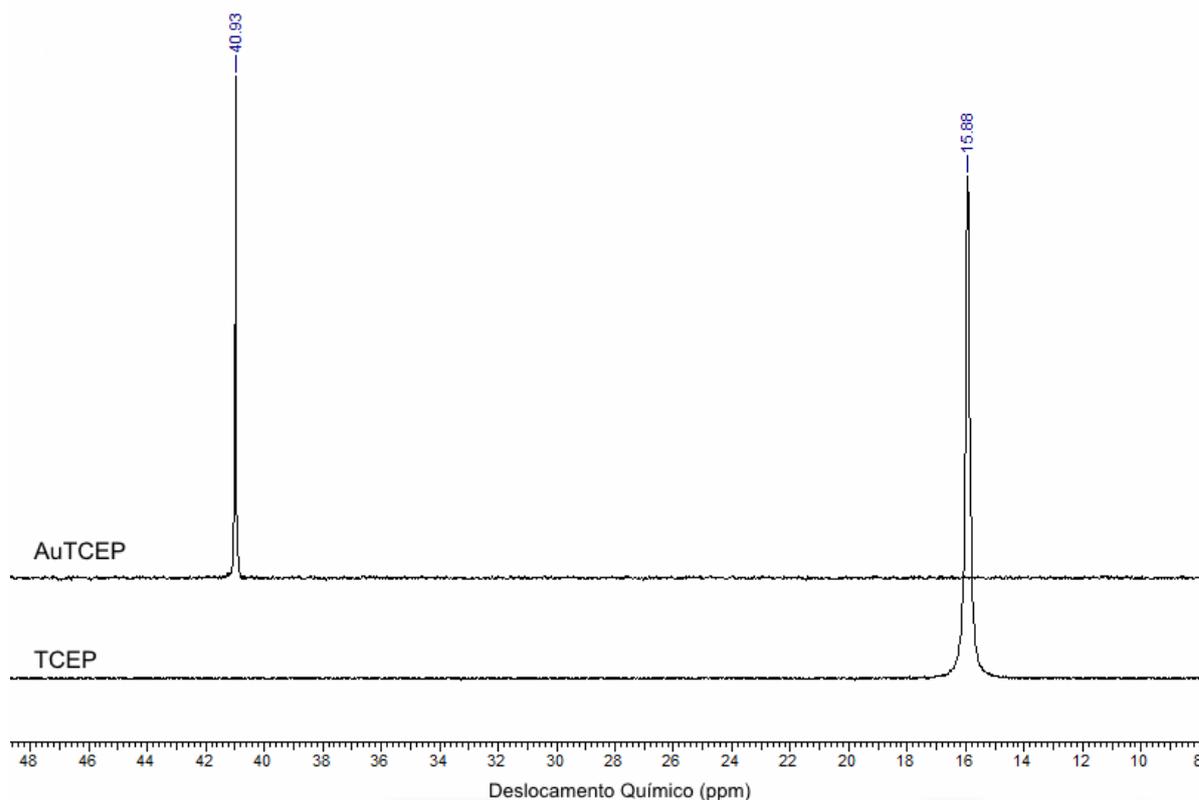


Figura 30: Espectros de ^{31}P NMR do complexo AuTCEP e do ligante livre TCEP.

O deslocamento de 25 ppm entre os sinais de fósforo do ligante livre e do complexo corrobora a hipótese de coordenação pelo fósforo, uma vez que, como σ -doador, espera-se que o fósforo desblinde com a coordenação. É possível observar também, pelos espectros de ^{31}P do complexo, que em solução não há sinal de ligante livre, além de não se observar sinal da fosfina oxidada. O sinal estreito do AuTCEP sugere que ele não apresenta fluxionalidade, ou seja, que não participa de equilíbrio rápido de troca de ligantes; por outro lado, o sinal mais alargado de TCEP aponta para a possibilidade de troca química do hidrogênio ligado ao fósforo.

A Figura 31 apresenta os espectros de ^1H NMR do complexo AuTCEP e do ligante TCEP. Os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros da Figura 31 são apresentados na Tabela 3. Tanto o TCEP quanto o AuTCEP apresentam apenas dois conjuntos de sinais de hidrogênio, com deslocamentos químicos caindo na região entre 2,0 e 3,0 ppm. Os sinais de menor deslocamento estão associados aos hidrogênios do grupo CH_2 ligado ao fósforo (i), enquanto os sinais de maior deslocamento se associam ao grupo CH_2 ligado à carbonila (ii). Os sinais dos hidrogênios dos grupos ácido carboxílico assim como do hidrogênio ligado ao fósforo, no caso do TCEP, não aparecem nos espectros devido a sua rápida troca química por deutério.

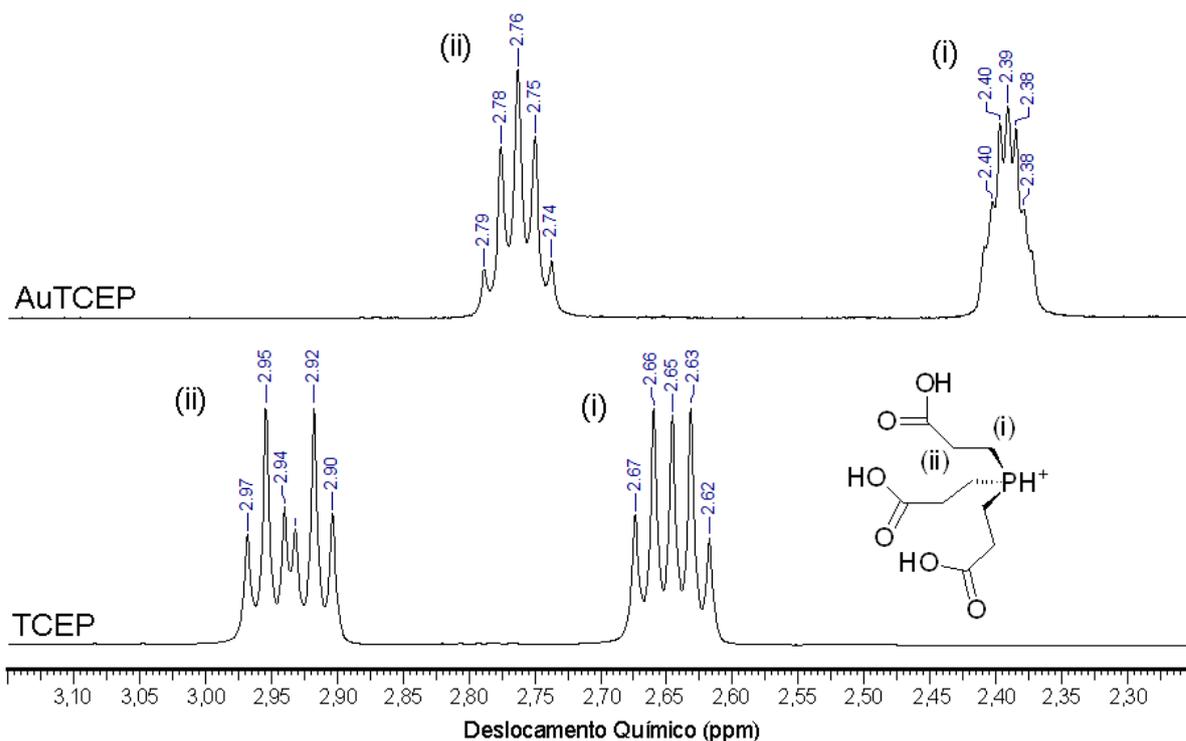


Figura 31: Espectros de ¹H NMR do complexo AuTCEP e do ligante livre TCEP, em D₂O.

Quanto à multiplicidade dos sinais, se observa um dupletto de tripletos no sinal centrado em 2,94 ppm (ii) do espectro do TCEP. Numa primeira inspeção, os demais sinais apresentados são multipletos. Contudo, é coerente interpretar o sinal em 2,65 ppm (i) do espectro do TCEP também como um dupletto de tripletos. Todos os picos deste sinal são separados por 7,2 Hz, uma constante coerente com um acoplamento $^3J_{H-H}$, e pode ser esperado um acoplamento $^2J_{P-H}$, para o qual a constante 14,1 Hz é coerente¹⁵⁶. Como a constante de acoplamento $^3J_{H-H}$ é aproximadamente a metade da constante $^2J_{P-H}$, apenas cinco sinais são observados. O mesmo raciocínio pode ser empregado no sinal em 2,76 ppm (ii) do AuTCEP, onde $^3J_{H-H} = 7,7$ Hz e $^3J_{P-H} = 15,4$ Hz. Como a constante de acoplamento $^3J_{H-H}$ é a metade da constante $^3J_{P-H}$, o dupletto de tripletos se apresenta como multipletto. O sinal em 2,39 ppm (i) do AuTCEP é o que apresenta a menor separação entre os picos, 3,6 Hz, dificultando a interpretação de sua multiplicidade, tendo em vista a resolução do espectro.

A variação de deslocamento dos sinais de ¹H NMR do AuTCEP em relação aos do TCEP livre apontam também para uma coordenação do ligante ao Au^I através do átomo de fósforo, uma vez que a variação de deslocamento dos sinais mais próximos do fósforo é maior do que dos sinais mais distantes (-0,26 e -0,18 ppm respectivamente).

Tabela 3: Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos sinais de ^1H NMR do TCEP e do AuTCEP.

| Sinal | TCEP | | AuTCEP | | $\Delta\delta$ (ppm) |
|---------------|----------------|---|----------------|---|-------------------------|
| | δ (ppm) | J (Hz) | δ (ppm) | J (Hz) | |
| H (i) | 2,65 dt | $^3J_{\text{H-H}} = 7,2$ $^2J_{\text{P-H}} = 14,1$ | 2,39 m | $^3J_{\text{H-H}} = 7,2$ $^2J_{\text{P-H}} = 11,0$ | -0,26 |
| H (ii) | 2,94 dt | $^3J_{\text{H-H}} = 7,2$ $^3J_{\text{P-H}} = 18,1$ | 2,76 dt | $^3J_{\text{H-H}} = 7,7$ $^3J_{\text{P-H}} = 15,4$ | -0,18 |

A Figura 32 apresenta os espectros de ^{13}C NMR do complexo AuTCEP e do ligante TCEP. Os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros da Figura 32 são apresentados na Tabela 4. Em cada espectro da Figura 32 é possível observar três conjuntos de sinais. O primeiro deles aparece na região entre 10 e 20 ppm e pode ser atribuído ao carbono (i) ligado ao fósforo; o sinal que aparece na região entre 25 e 30 ppm pode ser atribuído ao grupo CH_2 (ii) ligado à carbonila; já o sinal com alto deslocamento químico, perto de 175 ppm é atribuído ao carbono da própria carbonila (iii).

São observados em ambos os espectros acoplamentos carbono-fósforo. É comum observar constantes de acoplamento $^1J_{\text{P-C}}$ grandes (entre 20 e 60 Hz). Já as constantes de acoplamento $^2J_{\text{P-C}}$ costumam ser pequenas (abaixo de 5Hz). As constantes $^3J_{\text{P-C}}$, por outro lado, apresentam usualmente valores intermediários (entre 7 e 15 Hz)¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. Essa é a tendência das constantes de acoplamento reportadas na Tabela 4, que diminuem do ligante livre para o complexo. A constante $^2J_{\text{P-C}}$ no complexo AuTCEP não é observada, contudo não é incomum que carbonos a duas ligações do fósforo produzam sinais simpletos no ^{13}C NMR^{158,159}.

Os deslocamentos dos sinais de ^{13}C NMR do AuTCEP em relação aos do TCEP livre indicam novamente uma coordenação ao Au^{I} através do fósforo, uma vez que os sinais dos carbonos próximos do fósforo são mais sensíveis à coordenação do que os distantes.

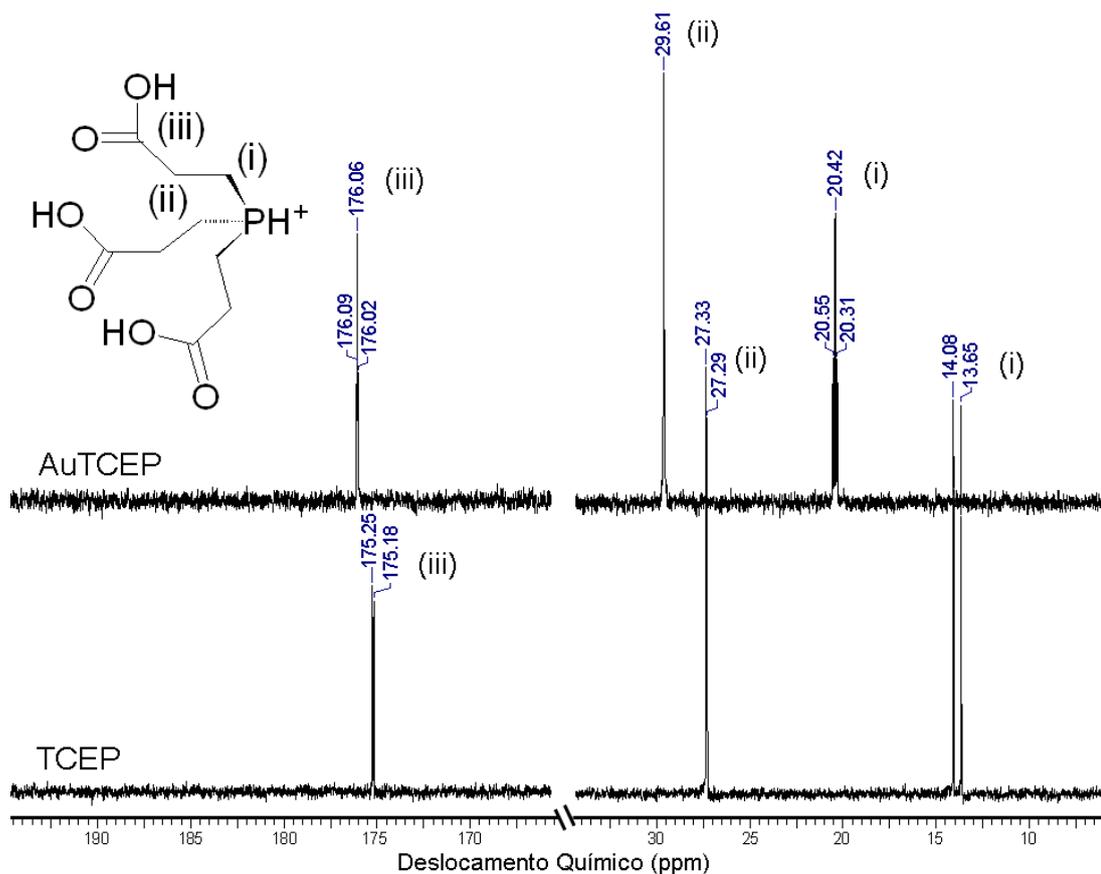


Figura 32: Espectros de ^{13}C NMR do complexo AuTCEP e do ligante livre TCEP.

Tabela 4: Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos sinais de ^{13}C NMR do TCEP e do AuTCEP.

| Sinal | TCEP | | AuTCEP | | $\Delta\delta$ (ppm) |
|----------------|----------------|---------------------------|----------------|---------------------------|-------------------------|
| | δ (ppm) | J (Hz) | δ (ppm) | J (Hz) | |
| C (i) | 13,87 d | $^1J_{\text{P-C}} = 53,1$ | 20,42 t | $^1J_{\text{P-C}} = 17,6$ | +6,55 |
| C (ii) | 27,31 d | $^2J_{\text{P-C}} = 5,1$ | 29,61 s | | +2,3 |
| C (iii) | 175,21 d | $^3J_{\text{P-C}} = 8,6$ | 176,06 t | $^3J_{\text{P-C}} = 5,0$ | +0,85 |

6.1.4. Estudo do efeito do pH sobre o complexo AuTCEP em solução

Os estudos de espectroscopia de NMR de ^1H e ^{31}P em solução (D_2O) do complexo AuTCEP (**12**) foram ampliados para o entendimento do efeito da variação de pH no composto. A Figura 33 apresenta os espectros de ^1H NMR do AuTCEP obtidos em diferentes pHs.

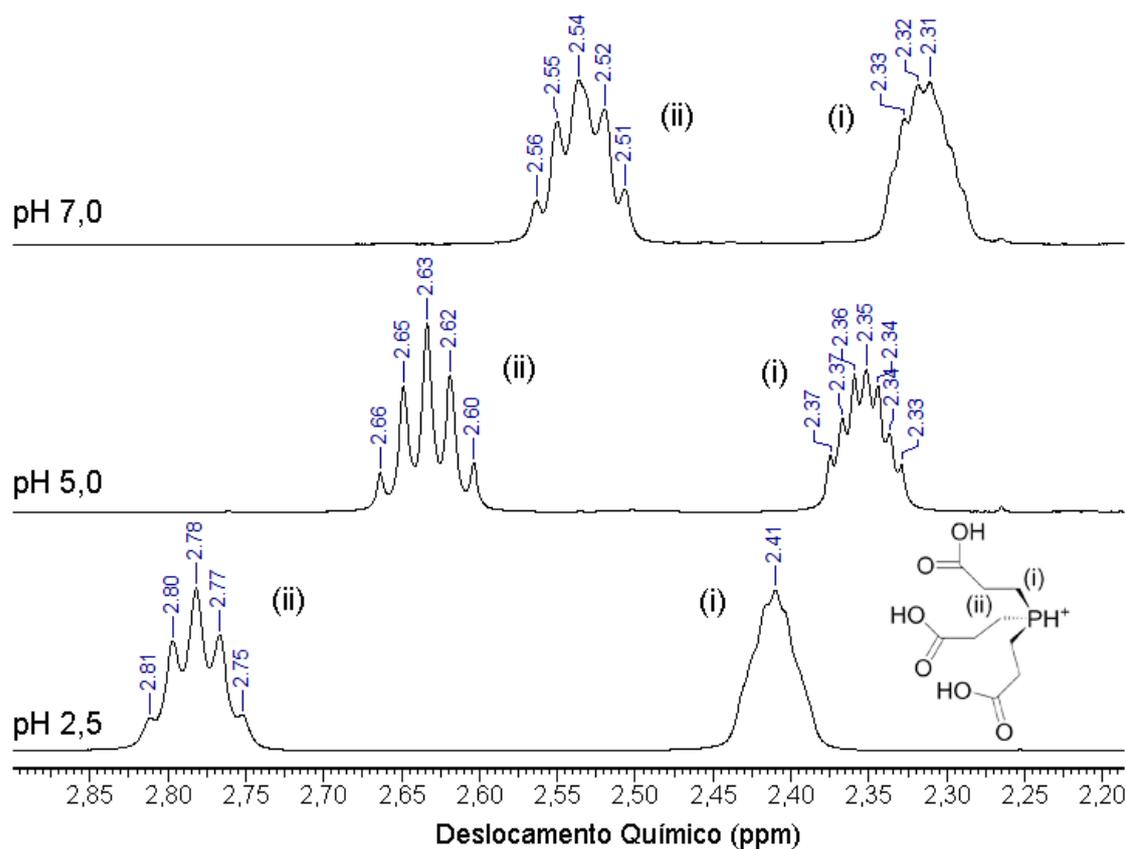


Figura 33: Espectros de ^1H NMR do AuTCEP adquiridos em soluções com diferentes valores de pH.

Os resultados mostram que o aumento no valor de pH das soluções de AuTCEP acarreta um deslocamento dos dois sinais de ^1H NMR para campo alto. Os valores de deslocamento químico e sua variação com o pH estão apresentados na Tabela 5. Esse deslocamento é mais importante no sinal (ii), atribuído aos hidrogênios do grupo CH_2 vizinho à carbonila, do que no sinal (i), atribuído aos hidrogênios do grupo CH_2 vizinho ao fósforo. Isso se dá pois a variação de pH afeta de maneira direta o equilíbrio de protonação dos grupos carboxilato, consequentemente interferindo mais intensamente nos sinais dos grupos mais próximos às carbonilas.

A Figura 34 apresenta os espectros de ^{31}P NMR do AuTCEP em solução obtidos em diferentes pHs.

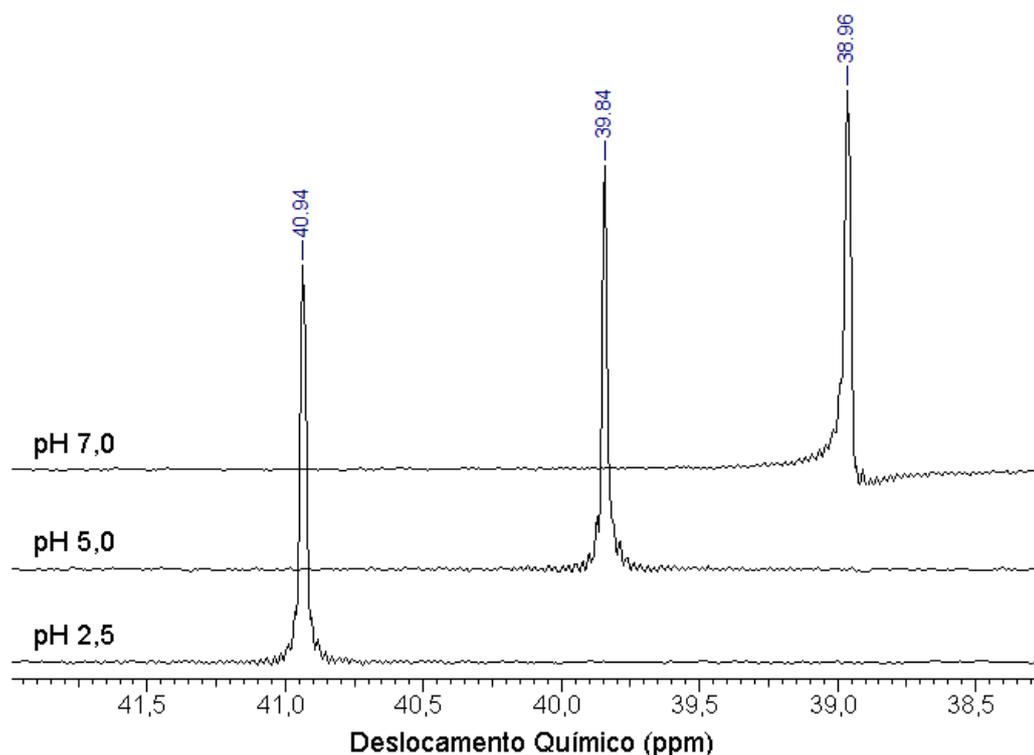


Figura 34: Espectros de ^{31}P NMR do AuTCEP obtidos de soluções em diferentes valores de pH.

A Figura 34 permite observar que o aumento no valor de pH das soluções de AuTCEP acarreta um deslocamento do sinal de ^{31}P NMR para campo alto, assim como observado com os sinais de ^1H NMR. Os valores de deslocamento químico e variação de deslocamento químico estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de deslocamento químico e variação de deslocamento químico dos estudos de espectroscopia de NMR de ^1H e ^{31}P em solução (D_2O) do complexo AuTCEP (**12**). A variação de deslocamento químico está apresentada em relação à solução em pH 2,5.

| pH | 2,5 | | | 5,0 | | | 7,0 | | |
|----------------------|--------------|------|-----------------|--------------|------|-----------------|--------------|------|-----------------|
| | ^1H | | ^{31}P | ^1H | | ^{31}P | ^1H | | ^{31}P |
| Núcleo | i | ii | | i | ii | | i | ii | |
| δ (ppm) | 2,41 | 2,78 | 40,94 | 2,35 | 2,64 | 39,85 | 2,32 | 2,54 | 38,26 |
| $\Delta\delta$ (ppm) | 0 | 0 | 0 | 0,06 | 0,15 | 1,09 | 0,10 | 0,25 | 2,68 |

Um comportamento muito semelhante ao observado para o AuTCEP foi descrito por Krężel e colaboradores¹⁵⁵ ao estudarem o ligante TCEP (**13**) com relação à variação de pH por titulação potenciométrica e ^{31}P NMR. A Figura 35, adaptada da referência 155, mostra os deslocamentos químicos dos sinais de ^{31}P NMR do TCEP em função do pH.

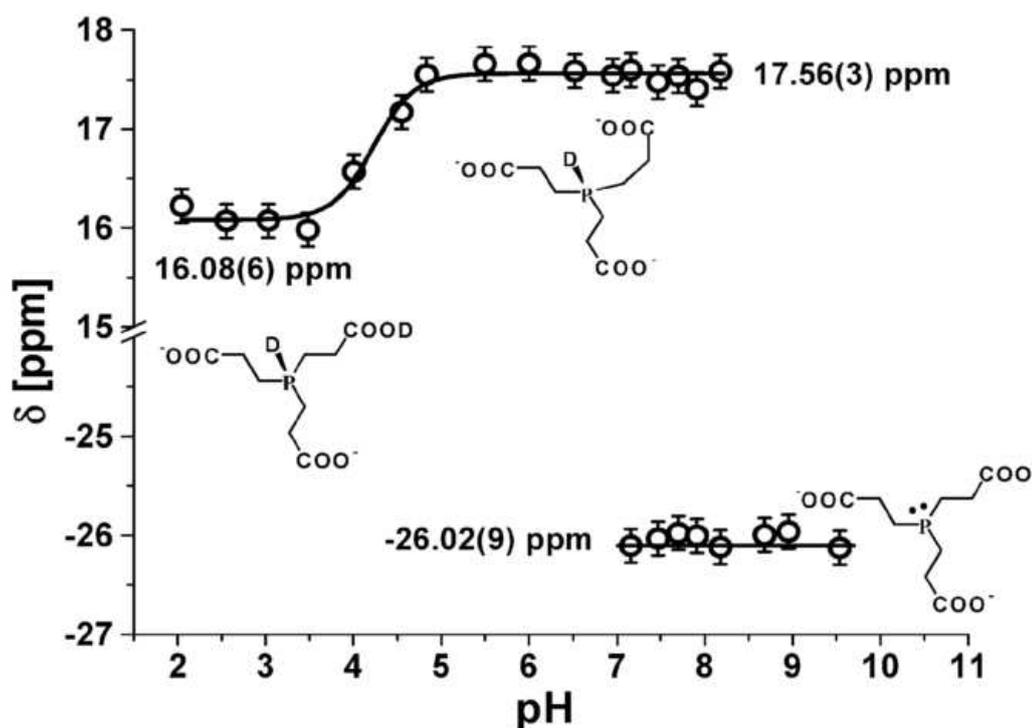


Figura 35: Curvas de titulação do ligante TCEP (**13**) acompanhada por ^{31}P NMR. Figura adaptada da referência 155.

A coordenação de dois ligantes TCEP ao Au^{I} afeta a distribuição de carga sobre todo o complexo, assim como aumenta o número de hidrogênios ionizáveis por molécula (de quatro para seis). Esses dois fenômenos afetam a constante de dissociação de cada um dos hidrogênios ionizáveis do complexo, razão pela qual não se espera que as constantes de ionização sejam as mesmas para o TCEP e para o AuTCEP. Além disso, é interessante observar que próximo a pH 5 o TCEP tem seu sinal de ^{31}P NMR deslocado para campo baixo com o aumento do pH, de maneira oposta ao observado para o AuTCEP.

Tanto o TCEP quanto o AuTCEP apresentam apenas um sinal de ^{31}P NMR em virtude da troca rápida de seus hidrogênios ionizáveis (deutérios ionizáveis, em solução de D_2O), não sendo possível, na escala de tempo do experimento, observar as múltiplas espécies em equilíbrio de protonação presentes em solução. O mesmo fenômeno é observado nos espectros dos outros núcleos (^1H e ^{13}C).

6.1.5. Estudos do AuTCEP no estado sólido por espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Além dos estudos envolvendo pH, estudos do complexo AuTCEP (**12**) no estado sólido foram também realizados por espectroscopia de NMR de ^{31}P e ^{13}C . A Figura 36 apresenta os espectros de ^{31}P NMR em solução (D_2O) e no estado sólido.

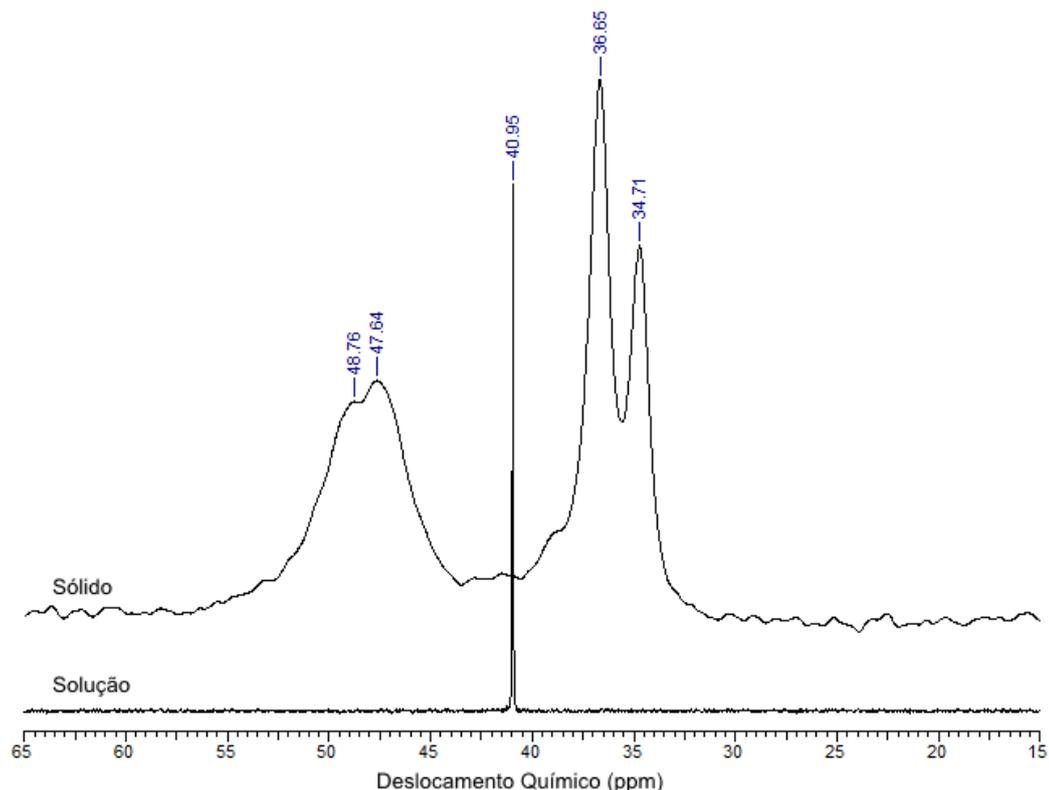


Figura 36: Espectros de ^{31}P NMR do complexo AuTCEP em solução (D_2O) e no estado sólido.

Na Figura 36 é possível observar o sinal único de ^{31}P NMR que o complexo AuTCEP apresenta em solução em oposição aos sinais múltiplos e alargados que o mesmo material (sólido não recristalizado) apresenta no estado sólido. Quatro sinais são observados para o composto sólido numa faixa de 15 ppm. A presença de um único sinal de ^{31}P NMR para a espécie em solução, mas múltiplos picos para o composto sólido sugere que o material sólido isolado da síntese por precipitação com acetona seja composto de uma mistura de espécies, variando apenas no número de grupos carboxílicos protonados. É interessante observar que o sinal obtido em solução representa aproximadamente a média dos picos que o espectro obtido no estado sólido apresenta, o que pode indicar que, ao dissolver-se o material, todas as espécies

presentes no sólido participam de um mesmo equilíbrio de troca rápida de hidrogênio, levando ao mesmo sinal no espectro em solução.

A mesma interpretação pode ser aplicada aos espectros de ^{13}C NMR do complexo AuTCEP em solução (D_2O) e no estado sólido apresentados na Figura 37.

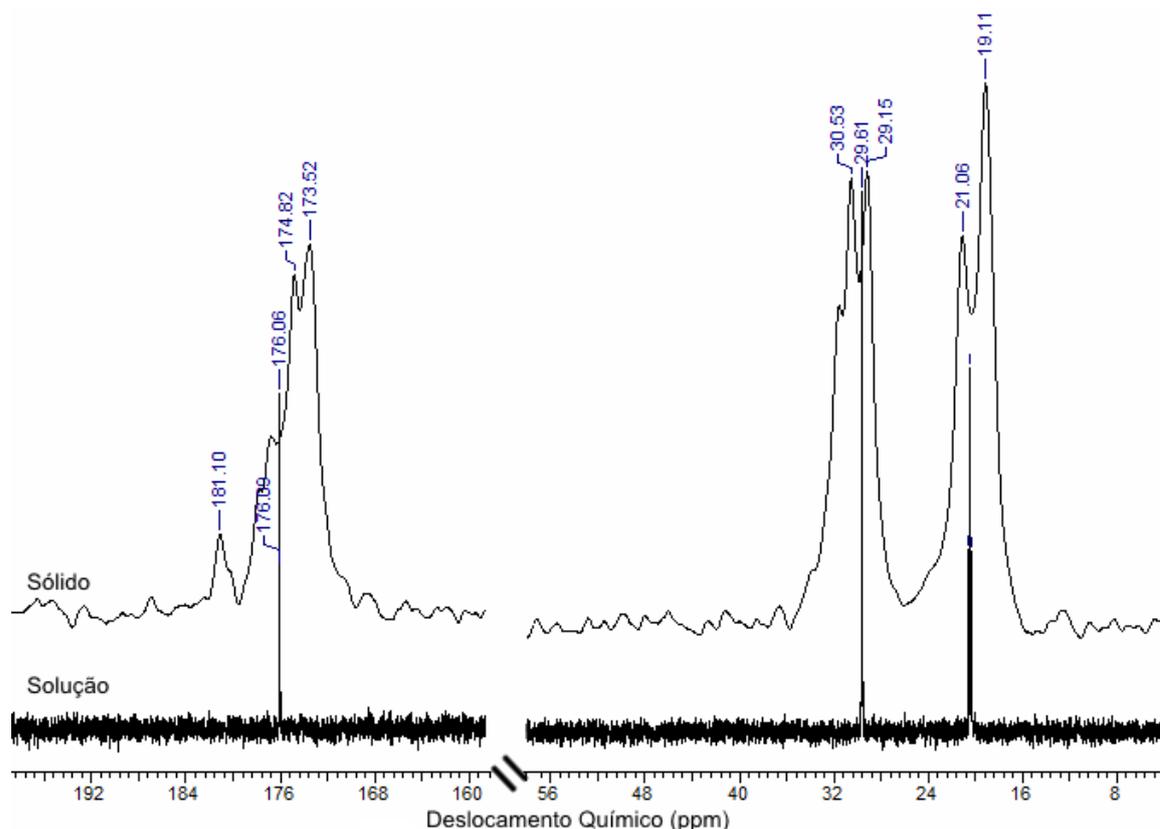


Figura 37: Espectros de ^{13}C NMR do complexo AuTCEP em solução (D_2O) e no estado sólido.

Na Figura 37 são observados sinais largos no espectro de ^{13}C NMR mais ou menos homogeneamente distribuídos em torno da posição onde aparecem os sinais em solução. Se destaca no espectro obtido no estado sólido o sinal da carbonila, que apresenta quatro pontos de máximo numa faixa de 8 ppm, de maneira similar ao observado no espectro de ^{31}P NMR.

Esses resultados de NMR vão ao encontro dos obtidos por análise elementar, sugerindo que o material sólido seja composto por espécies com diferente número de grupos carboxílicos desprotonados. Como a síntese ocorre em pH muito baixo (abaixo de 1) e a dissolução do material sólido isolado leva a uma solução de pH também baixo (em torno de 2,5) é provável que as espécies presentes variem entre nenhum e, pelo menos, quatro grupos carboxílicos desprotonados.

6.1.6 Espectrometria de massas

O complexo foi também analisado por espectrometria de massas com ionização por *electrospray*. No espectro obtido no modo positivo apenas um sinal, de razão massa/carga 697,1, é observado, e pode ser atribuído à estrutura $[\text{Au}(\text{PC}_9\text{H}_{15}\text{O}_6)_2]^+$. O espectro obtido no modo negativo está representado na Figura 38.

Nele podem ser observados três grupos de sinais. Em m/z 695,7 aparece um sinal que pode ser atribuído à espécie $[\text{Au}(\text{PC}_9\text{H}_{14}\text{O}_6)_2]^-$, acompanhado de sinais em m/z 733,6 e 771,7, referentes à mesma estrutura com substituição de um ou dois hidrogênios ácidos por potássio ($[\text{Au}(\text{PC}_9\text{H}_{14}\text{O}_6)_2 + \text{K}^+ - \text{H}^+]^-$ e $[\text{Au}(\text{PC}_9\text{H}_{14}\text{O}_6)_2 + 2\text{K}^+ - 2\text{H}^+]^-$, respectivamente). Um sinal de m/z 481,5, atribuído a $[\text{AuCl}(\text{PC}_9\text{H}_{14}\text{O}_6)]^-$, pode ser ainda observado, assim como dois sinais em m/z 249,4 e 265,4, que podem ser atribuídos à fosfina livre ($\text{PC}_9\text{H}_{14}\text{O}_6^-$) e à fosfina oxidada ($\text{PC}_9\text{H}_{14}\text{O}_7^-$), respectivamente.

As análises de espectrometria de massas corroboram a formação do complexo bisfosfino pela presença dos íons moleculares em m/z 697,1 (modo positivo) e 695,7 (modo negativo). Como nos espectros de NMR não se observam sinais de TCEP e TCEP=O livres, sugere-se que os sinais de ligante livre e óxido de fosfina, assim como o sinal de $[\text{AuCl}(\text{PC}_9\text{H}_{14}\text{O}_6)]^-$ vistos no espectro adquirido no modo negativo (Figura 38) são resultados de fragmentação durante o processo de ionização.

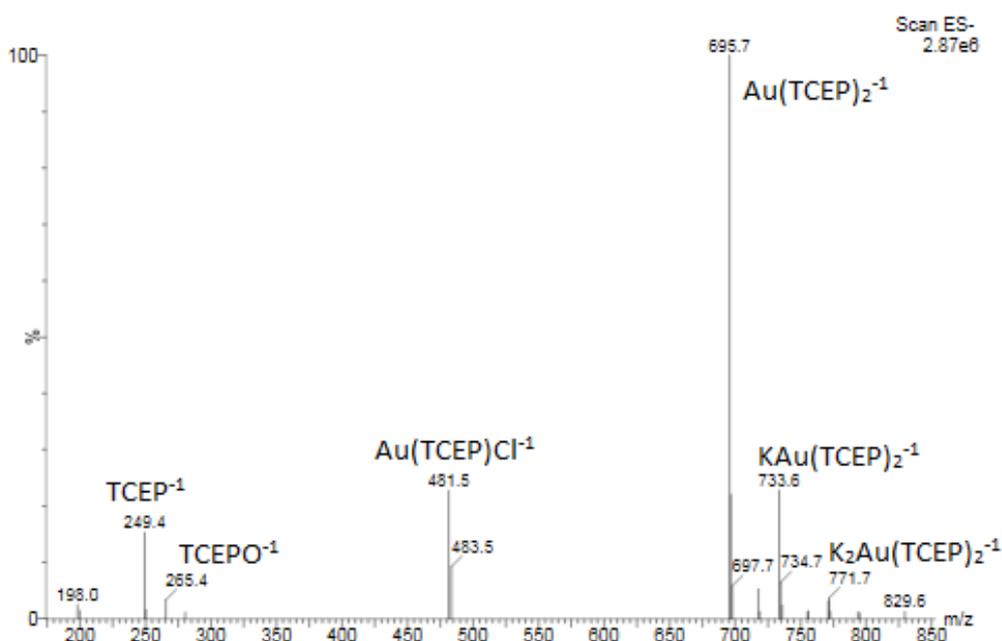


Figura 38: Espectro de massa no modo negativo (ESI-MS(-)) do complexo AuTCEP.

6.1.7. Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho

O complexo AuTCEP (**12**) foi caracterizado por espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (IR). Os espectros de IR do complexo e do ligante TCEP (**13**) são apresentados na Figura 39.

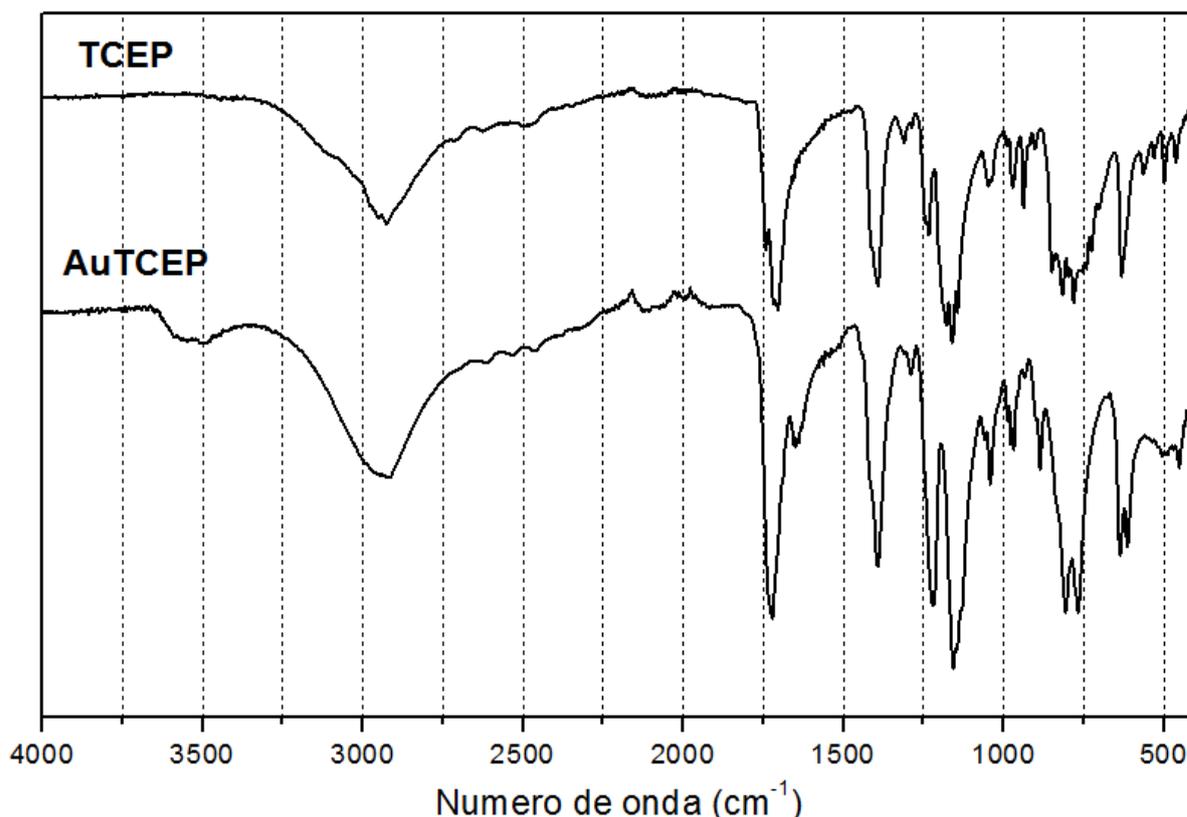


Figura 39: Espectros de IR do ligante TCEP e do complexo AuTCEP.

Os espectros vibracionais são muito semelhantes entre si. A maior parte das bandas observadas no espectro do ligante são observadas também no espectro do complexo, com pequenas variações. As principais bandas presentes nos espectros estão destacadas na Tabela 6 e podem ser atribuídas a modos de vibração, de acordo com a literatura¹⁵⁶. Primeiramente, se observa uma banda muito larga de 3500 a 2500 cm^{-1} , que pode ser associada ao estiramento da ligação O-H em ácidos carboxílicos, que está presente em ambos os espectros. Da mesma forma, aparecem em ambos os espectros sinais associados aos estiramentos assimétrico e simétrico do grupo COO em ácidos carboxílicos e carboxilatos. No TCEP essas bandas apresentam vibrações em 1704 e 1389 cm^{-1} , respectivamente, enquanto no AuTCEP os estiramentos estão posicionados em 1721 e 1393 cm^{-1} . Ainda neste grupo de sinais, se destaca

a banda em 1649 cm^{-1} que está presente apenas no complexo. Ela pode ser associada a um estiramento assimétrico de grupos carboxilato desprotonados. Os deslocamentos das bandas e a presença de uma banda associada a carboxilato apenas no complexo concordam com a estrutura proposta a partir dos estudos de NMR e da difração de raios X de monocristal, onde o complexo apresenta dois grupos carboxilato desprotonados. É comum que fosfinas apresentem uma absorção atribuída à deformação P-C-H em torno de 1400 cm^{-1} ¹⁵⁶, contudo essa banda não é observada, provavelmente porque cai junto com o estiramento simétrico dos grupos carboxílicos.

Tabela 6: Atribuição das principais bandas dos espectros de IR do ligante TCEP e do complexo AuTCEP.

| TCEP (cm^{-1}) | AuTCEP (cm^{-1}) | Atribuição |
|------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 2924 | 2923 | $\nu(\text{O-H})$ |
| 1704 | 1721 1649 | $\nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-)$ |
| 1389 | 1393 | $\nu_{\text{sim}}(\text{COO}^-)$ |

6.2. Estudo da interação de AuTCEP com NCp7 por ESI-MS e CD

De maneira análoga ao que foi feito anteriormente para os outros complexos fosfinaouro(I) estudados, a interação entre o AuTCEP (**12**) e um dos modelos de ZF, o NCp7, foi acompanhada por espectrometria de massas. Neste experimento a mistura NCp7 + AuTCEP foi incubada e analisada ao longo do tempo (0h, 1h, 2h, 3h e 6h após a mistura). Na Figura 40 são apresentados os espectros de massas imediatamente, 1 e 6 horas após a mistura.

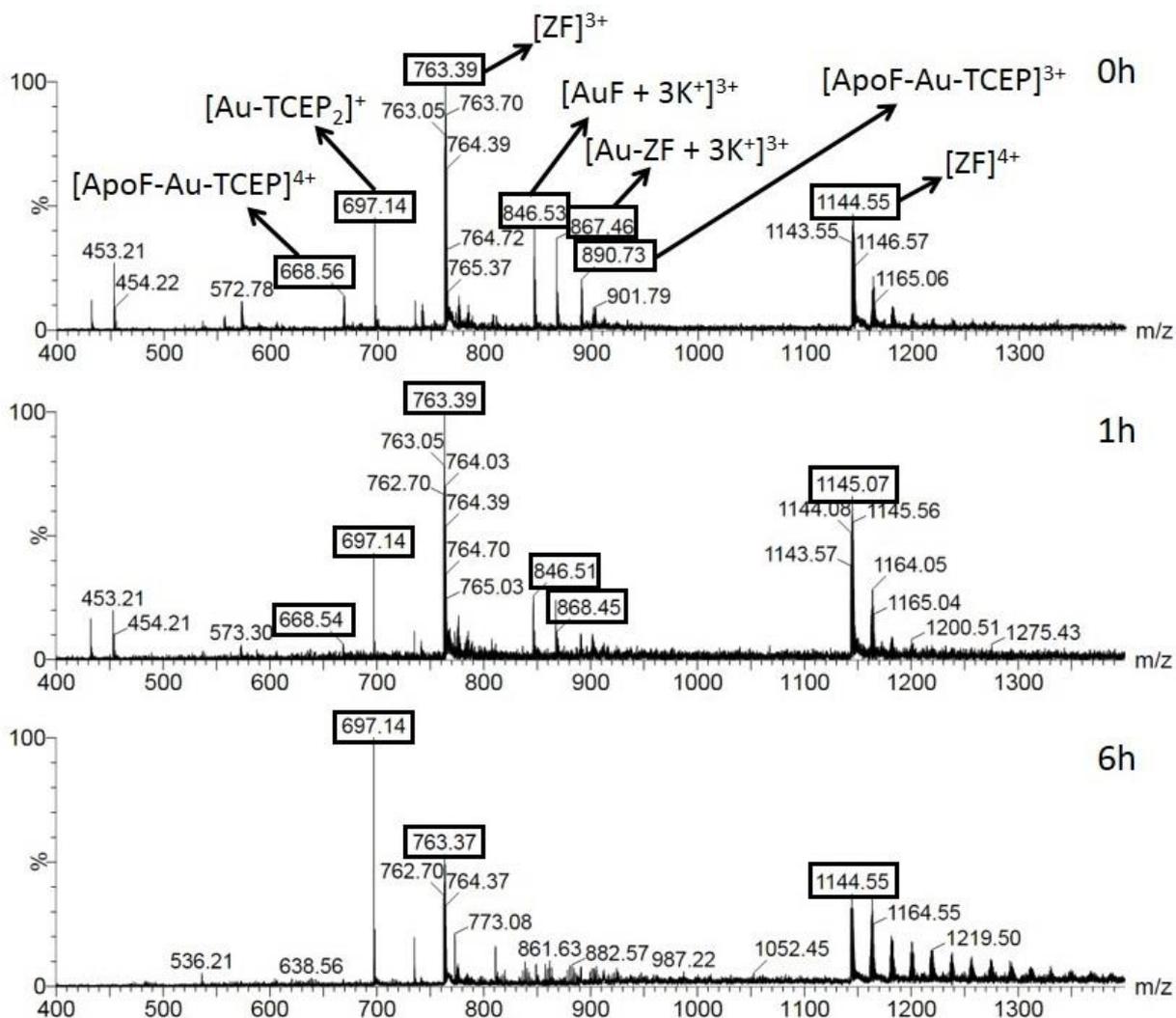


Figura 40: ESI-MS(+) do produto de interação AuTCEP + NCp7 imediatamente após a mistura, 1 hora e 6 horas depois.

No tempo zero são observados sinais do NCp7 em m/z 763,4 representando $[Zf]^{3+}$ e 1144,6 representando $[Zf]^{2+}$ como sinais de maior abundância relativa. O sinal em m/z 697,1 representa o $[Au-(TCEP)_2]^+$. O sinal em m/z 890,8 é atribuído à espécie $[TCEP-AuF]^{3+}$. Essa espécie aparece novamente como $[TCEP-AuF]^{4+}$ em m/z 668,6. São observados sinais atribuídos a AuFs. Em m/z 846,5 o sinal é atribuído a $[AuF + 3K^+]^{3+}$ e em 867,5, a $[Au-ZF + 3K^+]^{3+}$.

Com o passar do tempo os sinais referentes a $[TCEP-AuF]^{n+}$ bem como aqueles referentes a $[AuF + 3K^+]^{3+}$ e a $[Au-ZF + 3K^+]^{3+}$ diminuem em abundância relativa. Após 6h de incubação a 37 °C, o sinal de $[Au-(TCEP)_2]^+$ virtualmente aumenta, muito provavelmente apenas porque os sinais de ZF em m/z 763,4 e 1144,6 diminuem. Se destacam os sinais após 1144,6 que apresentam um espaçamento constante de 19 unidades, sugerindo a substituição de H^+ por K^+

em sítios ionizáveis do peptídeo, dando origem a estruturas do tipo $[ZF + nK^+ - nH^+]^{2+}$. Essas estruturas com potássio já eram observadas no espectro imediatamente após a mistura, mas se intensificam significativamente após 6h de incubação. Essa é possivelmente a causa do aumento virtual do sinal de $[Au-(TCEP)_2]^+$ e diminuição dos sinais atribuídos a estruturas relacionadas ao ZF.

Esse comportamento é diverso do observado para o caso do composto $[AuCl(PEt_3)]$ (**2**), apresentado previamente na Figura 12A, em que imediatamente após a mistura do complexo metálico com o peptídeo os sinais mais abundantes (obtidos nas mesmas condições experimentais) são os de espécies com ouro ligado ao peptídeo. Da mesma forma, estudos anteriores do grupo⁵⁷ (realizados também nas mesmas condições experimentais) apontam que complexos do tipo trifenilfosfinaouro(I) apresentam um comportamento semelhante ao do complexo $[AuCl(PEt_3)]$ frente ao NCp7. A permanência dos sinais provenientes do ZF como mais abundantes no experimento sugerem uma baixa reatividade do AuTCEP frente ao NCp7.

Para a verificação desta possível baixa reatividade, análises de dicroísmo circular foram também realizadas e são apresentadas na Figura 41. O espectro do apo-peptídeo mostra um perfil característico de estrutura randômica. O sinal positivo na região de 235 - 215 nm sugere que espécies oxidadas (formação de ponte dissulfeto) estejam presentes. Apesar do leve grau de oxidação, a curva do NCp7 indica a formação do ZF pela intensificação e extensão do sinal positivo na região de 235 a 210 nm, pelo leve deslocamento para o vermelho do máximo negativo assim como o sinal positivo em 195 nm. A adição do TCEP (**13**) ao apo-peptídeo reduz as pontes de dissulfeto tornando-o completamente reduzido, como evidenciado pela diminuição na elipticidade do sinal negativo, pelo desaparecimento da elipticidade positiva na região entre 235 - 210 nm e pelo deslocamento do máximo negativo para 200 nm. No caso do NCp7 a adição de TCEP não causa nenhuma mudança no espectro de dicroísmo, sugerindo que o ligante não interaja com o ZF.

A adição de AuTCEP ao apo-peptídeo leva a uma curva bastante similar à do NCp7, o que corrobora a coordenação do metal ao peptídeo acarretando um ganho de estrutura. Contudo, quando o complexo é adicionado ao modelo de ZF, não se observa grande mudança conformacional, mas uma pequena diminuição na intensidade dos sinais. Esse comportamento não permite elaborar conclusões a respeito do tipo de interação que ocorre nesta mistura, uma vez que não é possível diferenciar apo-peptídeo + AuTCEP de NCp7. Contudo, o resultado concorda com as informações obtidas por espectrometria de massas, nas quais se verificou que o AuTCEP apresenta baixa reatividade com o NCp7.

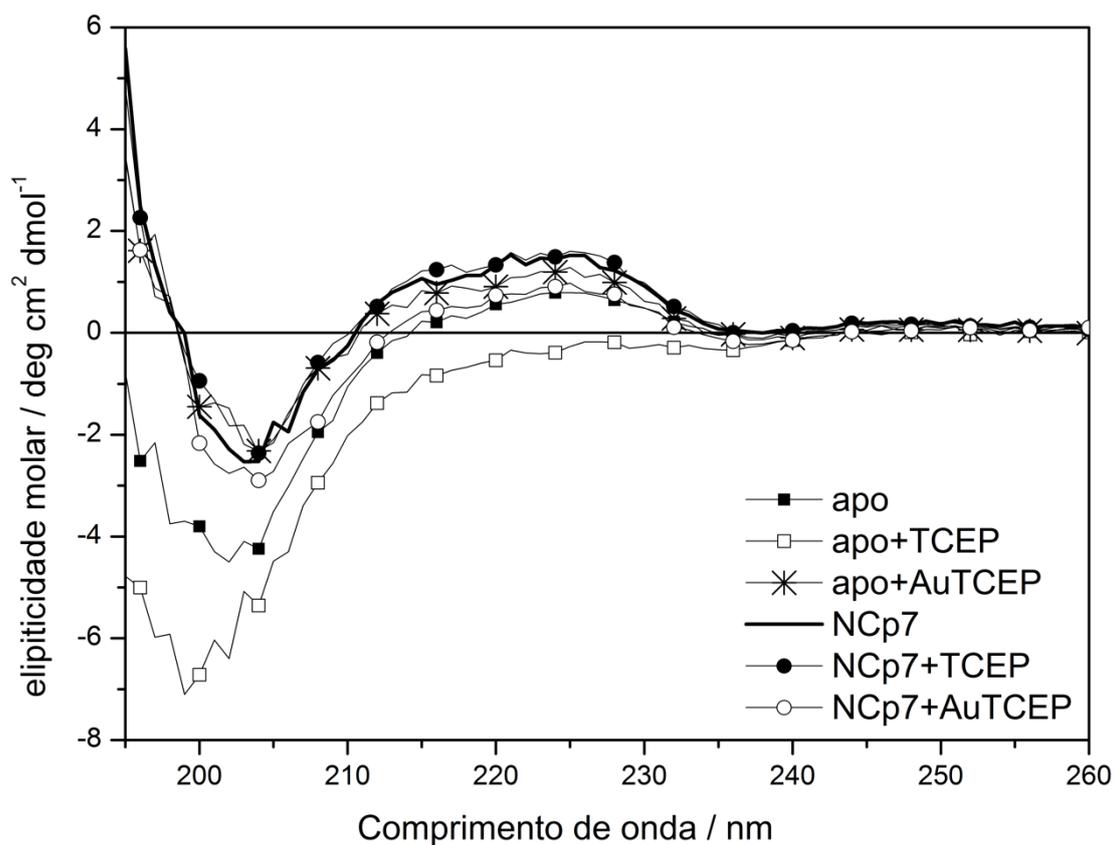


Figura 41: Espectros de dicroísmo circular do NCP7 e apo-peptídeo antes e após a adição de TCEP e AuTCEP.

6.3. Estudo da capacidade de inibição da atividade enzimática de BCE por AuTCEP

A capacidade de inibição da atividade enzimática de BCE por AuTCEP e TCEP foi avaliada através da reação de hidrólise da nitrocefina, nas mesmas condições dos experimentos realizados para os demais inibidores, apresentados no Capítulo 4. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Atividade enzimática de BCE em presença dos inibidores AuTCEP (12), $K[Au(CN)_2]$ (7) e EDTA (17), bem como do ligante TCEP (13) livre.

| Inibidor | AuTCEP (12) | TCEP (13) | $K[Au(CN)_2]$ (7) | EDTA (17) |
|------------------------|----------------|--------------|----------------------|--------------|
| Atividade Relativa (%) | 87 ± 9 | 99 ± 14 | 87 ± 9 | 86 ± 4 |

A atividade relativa em presença do AuTCEP foi $87 \pm 9 \%$, um valor similar ao observado para $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ (**3**) e $\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$ (**7**). Novamente, esta atividade relativa é bastante similar à obtida adicionando-se EDTA (**17**) à mistura e muito diferente do observada empregando-se CLV. Essa observação permite hipotetizar que o AuTCEP interaja com BCE promovendo uma inibição da BcII, mas não da SBL presente, como discutido no Capítulo 4.

Como o ligante TCEP apresenta três grupos carboxilato, foi importante verificar se este ligante não atua no sistema como quelante de zinco, de maneira similar ao EDTA. Para tanto o teste foi repetido com o ligante livre, sem que se observasse redução na atividade enzimática ($99 \pm 14\%$) em decorrência da sua presença.

6.4. Estudo da interação de AuTCEP com metalo- β -lactamase e dedos de zinco por espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Tendo sido demonstrada a atividade inibitória AuTCEP (**12**) frente à BCE, e tendo em vista sua hidrossolubilidade, este complexo foi selecionado para testes por NMR, tanto para confirmar a interação quanto para estudar a natureza desta. Foram adquiridos espectros de ^{31}P e ^1H NMR do complexo misturado à BCE. Como os sinais de NMR do complexo são sensíveis à variação de pH, esses espectros foram adquiridos em soluções com pH ajustado para 5,0. A Figura 42 apresenta os espectros de ^1H NMR, enquanto a Figura 43 mostra os espectros de ^{31}P NMR.

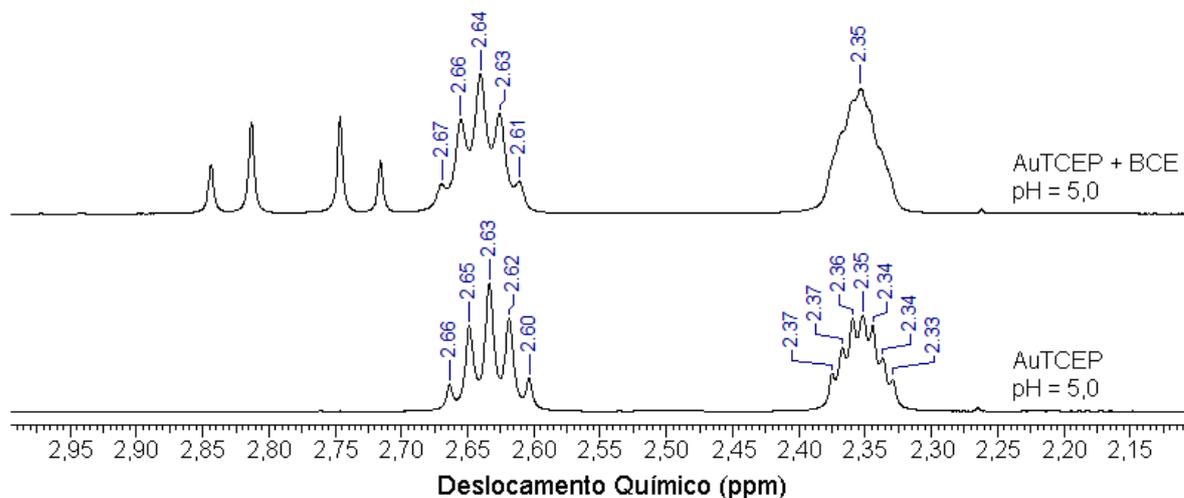


Figura 42: Espectros de ^1H NMR do complexo AuTCEP e da mistura AuTCEP + BCE em pH = 5,0.

As Figuras 42 e 43 permitem observar, como já discutido na sessão 3.1.4, que a mudança de pH desloca os sinais de NMR do complexo AuTCEP para campo alto. A adição de BCE ao AuTCEP em pH 5,0 não ocasiona uma variação no deslocamento químico nos espectros de ^1H NMR. No ^{31}P NMR se observa uma variação de 0,10 ppm para campo baixo no sinal da mistura em relação ao complexo. A mudança observada por NMR quando BCE é adicionada ao AuTCEP em pH 5,0 é pequena, e demonstra que não há variação no ambiente químico do ligante. Isso sugere que não há alteração na esfera de coordenação do metal ligado diretamente ao fósforo. Por outro lado, o processo de interação do AuTCEP com BCE pode se dar por outras vias, diferentes da coordenação ao metal.

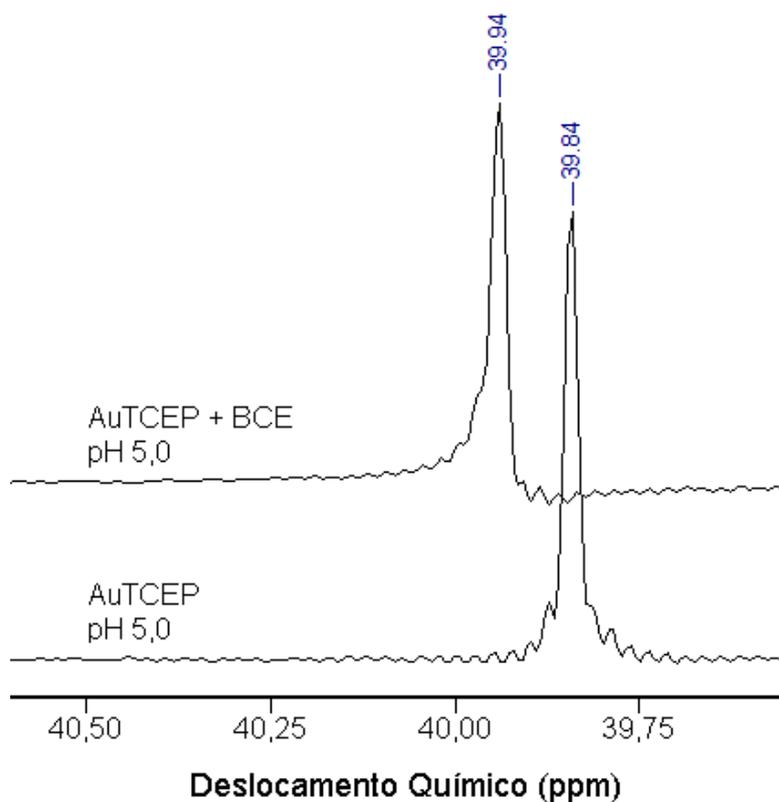


Figura 43: Espectros de ^{31}P NMR do complexo AuTCEP e da mistura AuTCEP + BCE em pH = 5,0.

O mesmo tipo de experimento foi realizado com os modelos de ZF NCp7 e Sp1. A Figura 44 mostra os espectros de ^1H NMR, enquanto a Figura 45 mostra os espectros de ^{31}P NMR.

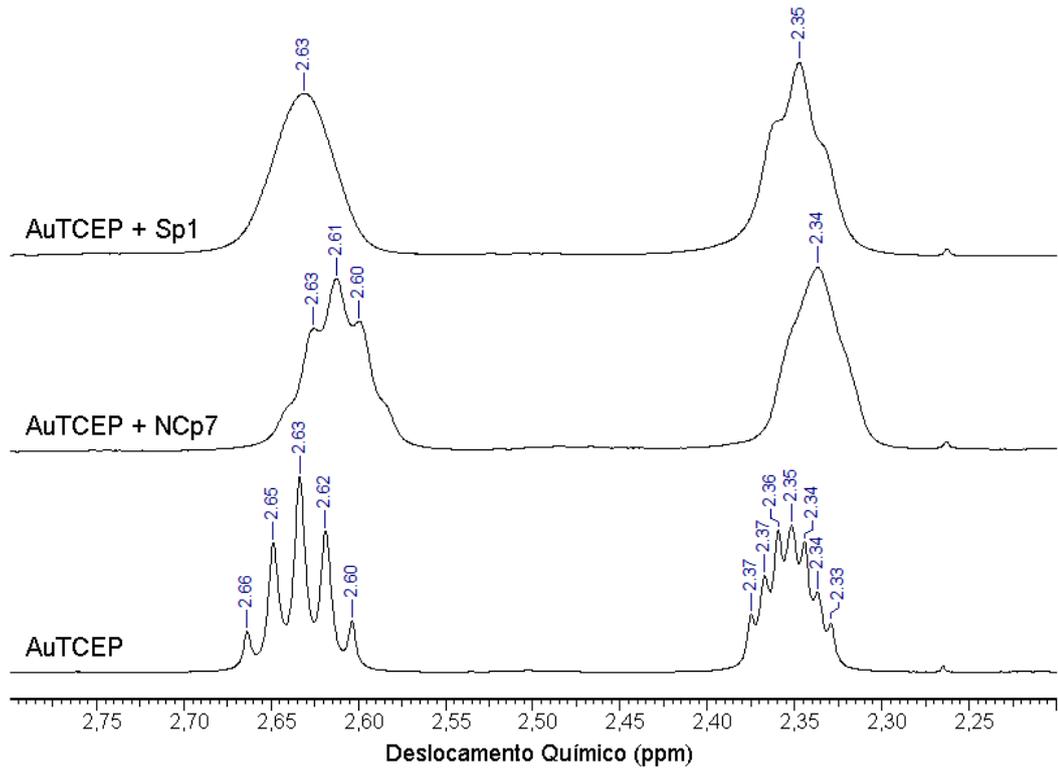


Figura 44: Espectros de ^1H NMR do complexo AuTCEP e das misturas AuTCEP + NCp7 e AuTCEP + Sp1 em pH = 5,0.

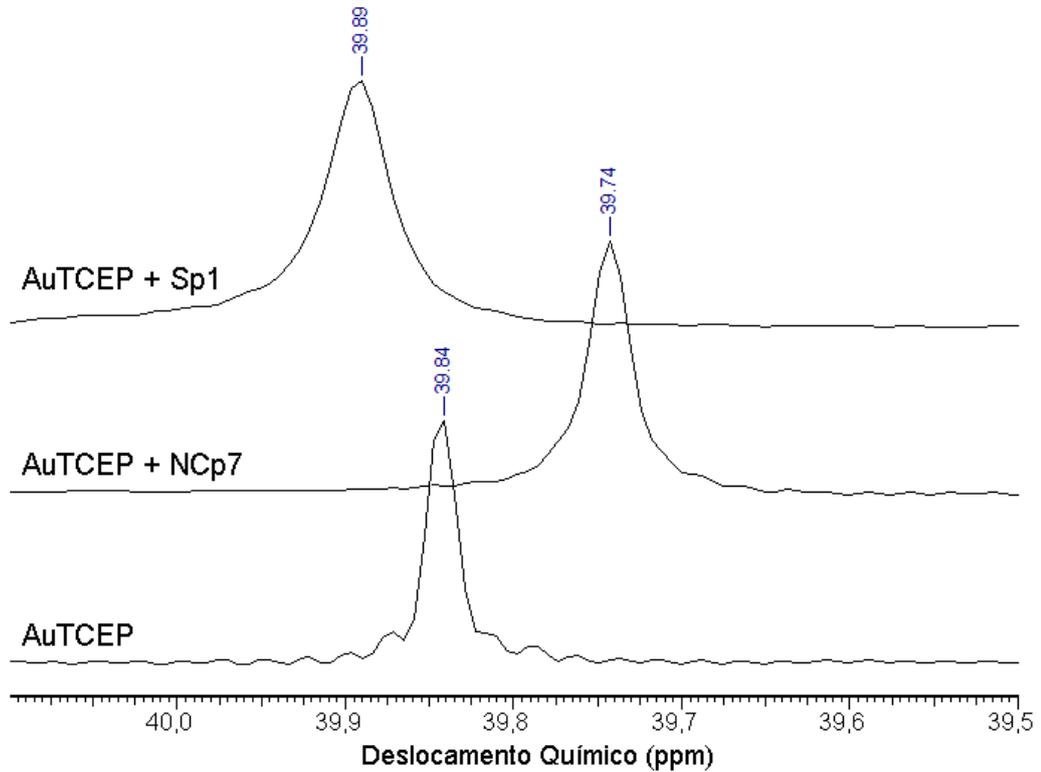


Figura 45: Espectros de ^{31}P NMR do complexo AuTCEP e das misturas AuTCEP + NCp7 e AuTCEP + Sp1 em pH = 5,0.

Assim como observado no experimento com BCE, não se verifica um deslocamento nos sinais de ^1H NMR. Por outro lado, o sinal de ^{31}P NMR apresenta um comportamento interessante. Ao misturar o complexo AuTCEP com o modelo de ZF NCp7 um deslocamento de 0,10 ppm para campo alto é observado. Em oposição, ao misturar-se o Sp1 ao AuTCEP um deslocamento de 0,05 ppm agora para campo baixo é verificado, mas em ambos os casos se verifica um alargamento dos picos. Apesar disso, as variações de deslocamento observadas são muito pequenas para serem interpretadas como uma evidência de mudanças na esfera de coordenação do ouro, que influenciem os sinais de fósforo, sugerindo, também por NMR, uma baixa reatividade do AuTCEP com ZFs.

Ainda uma última tentativa de observar interações do AuTCEP por NMR foi realizada misturando agora o complexo com N-acetil-cisteína (NAC), um modelo do aminoácido cisteína, e com histidina (HIS). Novamente, os experimentos foram realizados ajustando-se o pH para 5,0. A Figura 46 mostra os espectros de ^{31}P NMR obtidos. Os espectros de ^1H NMR foram também obtidos mas não estão representados pois não se observa qualquer variação nos deslocamentos químicos do complexo.

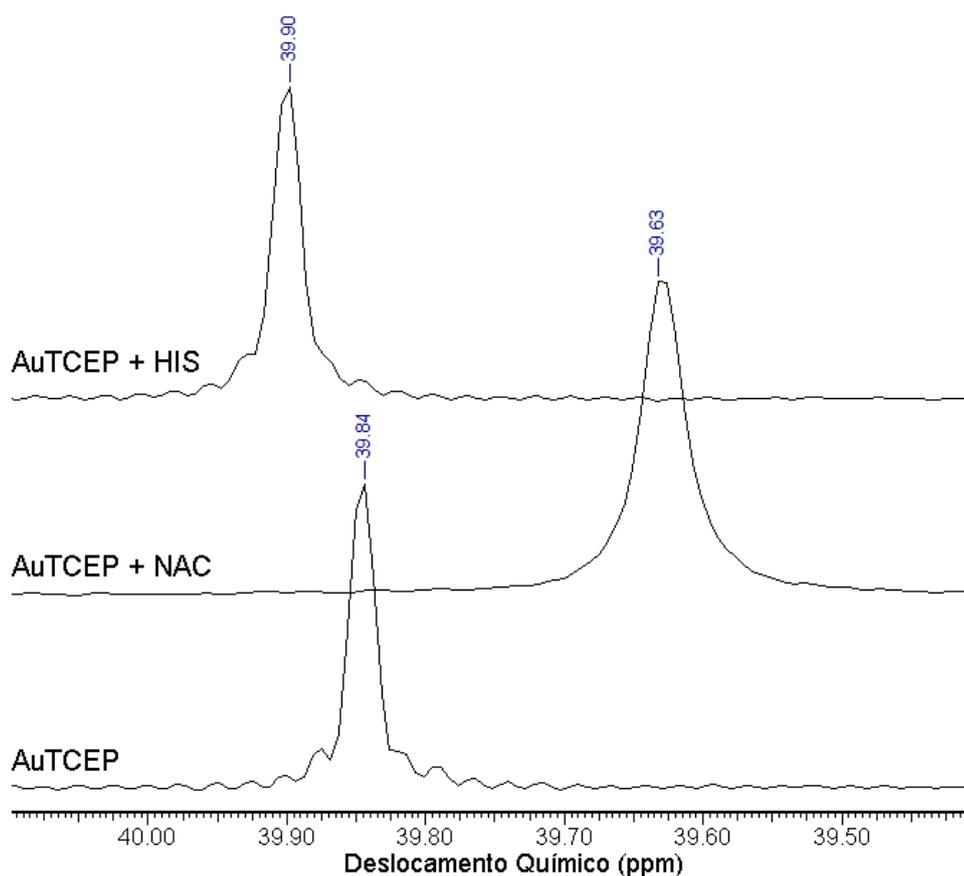


Figura 46: Espectros de ^{31}P NMR do complexo AuTCEP e das misturas AuTCEP + NAC e AuTCEP + HIS em pH = 5,0.

Na Figura 46 é possível observar uma variação de deslocamento de 0,21 ppm para campo alto quando NAC é adicionada ao AuTCEP, bem como um alargamento do pico, enquanto se verifica uma variação de 0,05 ppm para campo baixo quando HIS é adicionada. É interessante observar que o comportamento dos modelos de ZF na Figura 45 se reproduz quando os modelos de aminoácidos são adicionados ao AuTCEP. Ainda assim, variações de deslocamento químico tão baixas não podem ser interpretadas como evidências de coordenação.

Esses resultados compõem uma primeira indicação de que o AuTCEP possa interagir de maneira diversa ao ataque eletrofílico do ouro a um resíduo de cisteína dos modelos de zinco-proteínas estudados (como foi demonstrado por XAS para o complexo cloro(trietilfosfina)ouro(I), por exemplo), uma vez que não se observa evidência de coordenação por NMR. Mais ainda, não se observam evidências de coordenação nem quando se utilizam os modelos de aminoácidos não coordenados ao zinco, apontando uma surpreendente estabilidade do complexo frente ao ataque de nucleófilos.

Capítulo 7: Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho foi possível comparar a reatividade de alguns complexos metálicos frente a duas importantes classes de zinco-proteínas, dedos de zinco e metalo- β -lactamases, buscando evidências sobre o mecanismo de interação e observando a eficiência como inibidores.

No que diz respeito aos dedos de zinco, utilizando principalmente a técnica de espectroscopia de absorção de raios X, foi proposto um modelo consistente de ligação do ouro aos peptídeos. Os complexos $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$ e auranofina reagem com o ZF C-terminal do NCp7 (modelo de HIV-1) levando a uma esfera de coordenação P-Au-S, corroborando um ataque eletrofílico do metal ao resíduo de cisteína. Por outro lado, foi possível observar uma diferença de reatividade numa reação análoga envolvendo outro peptídeo ZF estruturalmente diverso, o modelo humano Sp1. Nele também se confirma o ataque do ouro a um resíduo de cisteína. Contudo, a esfera final de coordenação pode ser descrita como S-Au-S, de mais alta densidade eletrônica sobre o metal. Nenhuma fosfina permanece ligada, em oposição ao observado na reação com NCp7.

Essa diferença de reatividade indica uma perspectiva de seletividade na inibição de dedos de zinco com complexos fosfinaouro(I) e vai ao encontro do que já foi observado para o caso de complexos contendo trifenilfosfina. Além disso, a evidência concreta de uma interação pelas cisteínas contribui para um futuro desenvolvimento racional de novos complexos inibidores através da busca por ligantes que propiciem a modulação desse ataque, promovendo seletividade.

No que diz respeito às metalo- β -lactamases, os tetraclorocomplexos de Au(III), Pt(II) e Pd(II) – de configuração eletrônica d^8 – não apresentaram diminuição da atividade enzimática, frente ao modelo enzimático utilizado contendo tanto uma SBL quanto uma MBL. Por outro lado tanto o $\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$ quanto o $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ apresentaram atividade inibitória. O complexo $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$, em oposição, não apresentou qualquer atividade, um resultado bem diverso do que foi observado com os dedos de zinco. Esse resultado não apenas posiciona os complexos de Au(I) como uma nova classe de possíveis inibidores de metalo- β -lactamases, como dá indicativos de uma importante diferença de reatividade e seletividade do $[\text{AuCl}(\text{PEt}_3)]$. Estudos de atividade do mesmo modelo enzimático frente aos inibidores clássicos EDTA e clavulanato complementam a interpretação dos dados apresentados. Tanto o $\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$ quanto o $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ diminuem a atividade enzimática do modelo de maneira similar ao EDTA, e de maneira diversa ao clavulanato.

Este é o primeiro estudo descrito sobre a interação desses complexos com um modelo de MBL. Ele convida a futuros experimentos, envolvendo não apenas o efeito sobre a atividade enzimática, mas também abordagens estruturais que descrevam a natureza dessas interações. Estudos computacionais seriam também bem vindos, direcionando os esforços experimentais. Além disso, interessa verificar a atuação desses complexos metálicos diretamente sobre cepas bacterianas resistentes a antibióticos β -lactâmicos.

Avançando mais na química de complexos fosfinaouro(I), foi possível sintetizar e caracterizar um novo complexo desta classe solúvel em água, o AuTCEP. A hidrossolubilidade coloca este complexo como importante modelo para estudos em meio biológico e melhor candidato a metalofármaco. O complexo mostrou interação de menor amplitude com o modelo de ZF NCp7, como visto por ensaios de espectrometria de massas, dicroísmo circular e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, quando comparado a outros complexos estudados, mas apresentou atividade inibitória semelhante à do EDTA e de outros complexos de Au^I no ensaio de inibição do modelo de MBL.

Mais ainda, em estudos de NMR não foram observadas evidências de uma coordenação ou troca de ligantes no complexo quando misturado a BCE, NCp7, Sp1, NAC ou HIS. Esse resultado contrasta com o que foi demonstrado por XAS para o complexo cloro(trietilfosfina)ouro(I). Com este complexo se observa sempre interação pela cisteína. Essa é uma primeira sugestão de complexo fosfinaouro(I) que reage por um mecanismo possivelmente diferente do ataque eletrofílico às cisteínas das zinco-proteínas, além de sugerir uma significativa estabilidade do complexo frente a nucleófilos.

Essa conclusão convida ao aprofundamento do estudo desse complexo por técnicas diversificadas, por sugerir uma diferença muito importante de reatividade que pode ser racionalizada para o desenvolvimento de novos fármacos. Uma abordagem que merece destaque nesse contexto é a espectroscopia de absorção de raios X, já que essa técnica pode contribuir com uma caracterização estrutural e eletrônica dos produtos de interação obtidos entre o complexo e zinco-proteínas.

Referências Bibliográficas

- (1) Andreini, C.; Banci, L.; Bertini, I.; Rosato, A. *J. Proteome Res.* **2006**, 5 (1), 196–201.
- (2) Roat-Malone, R. M. *Bioinorganic chemistry a short course*, 5th ed.; 2008.
- (3) Fraústo da Silva, J. J. R.; Williams, R. J. P. *The biological chemistry of the elements: The inorganic chemistry of life*, 2nd ed.; Oxford University Press: Oxford, 2009.
- (4) Crichton, R. R. *Biological Inorganic Chemistry: An introduction*, 1st ed.; Elsevier B.V., 2008.
- (5) Farrell, N. P. *Transition metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1989.
- (6) Harper, H. A. *Manual de Química Fisiológica*, 4^o ed.; Atheneu Editora São Paulo S.A.: São Paulo, 1977.
- (7) Krężel, A.; Maret, W. *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, 611, 3–19.
- (8) Laitaoja, M.; Valjakka, J.; Jänis, J. *Inorg. Chem.* **2013**, 52 (19), 10983–10991.
- (9) Anzellotti, A. I.; Farrell, N. P. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37 (8), 1629–1651.
- (10) Mccall, K. A.; Huang, C.-C.; Fierke, C. A. *J. Nutr* **2000**, 130, 1437–1446.
- (11) Maret, W.; Li, Y. *Chem. Rev.* **2009**, 109 (10), 4682–4707.
- (12) Parkin, G. *Chem. Rev.* **2004**, 104 (2), 699–767.
- (13) Quintal, S. M.; dePaula, Q. A.; Farrell, N. P. *Metallomics* **2011**, 3 (2), 121–139.
- (14) Rouffet, M.; Cohen, S. M. *Dalt. Trans.* **2011**, 40 (14), 3445–3454.
- (15) Kraatz, H.-B., Metzler-Nolte, N., *Concepts and Models in Bioinorganic Chemistry*; Wiley-VCH, 2006.
- (16) Hay, R. W. *Bio-Inorganic Chemistry*; Ellis Horwood Ltd., 1987.
- (17) Medici, S.; Peana, M.; Crisponi, G.; Nurchi, V. M.; Lachowicz, J. I.; Remelli, M.; Zoroddu, M. A. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, 327 (328), 349–359.
- (18) Lustri, W. R.; Lazarini, S. C.; Lustri, B. C.; Corbi, P. P.; Silva, M. A. C.; Resende Nogueira, F. A.; Aquino, R.; Amaral, A. C.; Treu Filho, O.; Massabni, A. C.; da Silva Barud, H. *J. Mol. Struct.* **2017**, 1134 (3), 386–394.
- (19) Fiori, A. T. M.; Nakahata, D. H.; Cuin, A.; Lustri, W. R.; Corbi, P. P. *Polyhedron* **2017**, 121, 172–179.
- (20) Liu, C.; Yang, C.; Lu, L.; Wang, W.; Tan, W.; Leung, C.-H.; Ma, D.-L. *Chem. Commun.* **2017**.
- (21) Salerno, M.; Santo Domingo Porqueras, D. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, 327 (328), 27–34.
- (22) Chan, C. Y.; Noor, A.; McLean, C. A.; Donnelly, P. S.; Barnard, P. J. *Chem. Commun.*

- 2017**, 3–6.
- (23) Cutillas, N.; Yellol, G. S.; De Haro, C.; Vicente, C.; Rodríguez, V.; Ruiz, J. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, 257 (19-20), 2784–2797.
- (24) Dilruba, S.; Kalayda, G. V. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2016**, 77 (6), 1103–1124.
- (25) Bradford, S. S.; Cowan, J. A. *Metalloodrugs* **2014**, 1, 10–23.
- (26) Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **2016**, 116 (5), 3436–3486.
- (27) Papp, K. A.; Shear, N. H. *Clin. Dermatol.* **1991**, 9 (4), 535–551.
- (28) Glišić, B. Đ.; Djuran, M. I. *Dalt. Trans.* **2014**, 43 (16), 5950–5969.
- (29) Messori, L.; Scaletti, F.; Massai, L.; Cinellu, M. a; Gabbiani, C.; Vergara, A.; Merlino, A. *Chem. Commun.* **2013**, 49 (86), 10100–10102.
- (30) Roder, C.; Thomson, M. J. *Drugs R. D.* **2015**, 15 (1), 13–20.
- (31) Hokai, Y.; Jurkowicz, B.; Fernández-Gallardo, J.; Zakirkhodjaev, N.; Sanaú, M.; Muth, T. R.; Contel, M. J. *Inorg. Biochem.* **2014**, 138, 81–88.
- (32) Harbut, M. B.; Vilchèze, C.; Luo, X.; Hensler, M. E.; Guo, H.; Yang, B.; Chatterjee, A. K.; Nizet, V.; Jacobs, W. R.; Schultz, P. G.; Wang, F. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, 112 (14), 4453–4458.
- (33) Tonissen, K. F.; Di Trapani, G. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, 53 (1), 87–103.
- (34) Pirazzini, M.; Bordin, F.; Rossetto, O.; Shone, C. C.; Binz, T.; Montecucco, C. *FEBS Lett.* **2013**, 587 (2), 150–155.
- (35) Pirazzini, M.; Tehran, D. A.; Zanetti, G.; Megighian, A.; Scorzeto, M.; Fillo, S.; Shone, C. C.; Binz, T.; Rossetto, O.; Lista, F.; Montecucco, C. *Cell Rep.* **2014**, 8 (6), 1870–1878.
- (36) Shapiro, D. L.; Masci, J. R. *J. Rheumatol.* **1996**, 23 (10), 1818–1820.
- (37) Lewis, M. G.; Dafonseca, S.; Chomont, N.; Palamara, A. T.; Tardugno, M.; Mai, A.; Collins, M.; Wagner, W. L.; Yalley-ogunro, J.; Greenhouse, J.; Chirullo, B.; Norelli, S.; Garaci, E.; Savarino, A. *AIDS* **2011**, 25, 1347–1356.
- (38) De Almeida, A.; Oliveira, B. L.; Correia, J. D. G.; Soveral, G.; Casini, A. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, 257 (19-20), 2689–2704.
- (39) Jacques, A.; Lebrun, C.; Casini, A.; Kieffer, I.; Proux, O.; Latour, J.-M.; Sénèque, O. *Inorg. Chem.* **2015**, 54 (8), 4104–4113.
- (40) Larabee, J. L.; Hocker, J. R.; Hanas, J. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, 18 (12), 1943–1954.
- (41) Archer, M. C. *Genes Cancer* **2011**, 2 (7), 712–719.
- (42) Pannecouque, C.; Szafarowicz, B.; Volkova, N.; Bakulev, V.; Dehaen, W.; Mely, Y.;

- Daelemans, D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (4), 1461–1468.
- (43) Witkiewicz-Kucharczyk, A.; Bal, W. *Toxicol. Lett.* **2006**, *162* (1 SPEC. ISS.), 29–42.
- (44) Berg, J. M.; Godwin, H. A. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, *26*, 357–371.
- (45) Mjos, K. D.; Orvig, C. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (8), 4540–4563.
- (46) Citta, A.; Scalcon, V.; Göbel, P.; Bertrand, B.; Wenzel, M.; Folda, A.; Rigobello, M. P.; Meggers, E.; Casini, A. *RSC Adv.* **2016**, *6* (82), 79147–79152.
- (47) Heffern, M. C.; Reichova, V.; Coomes, J. L.; Harney, A. S.; Bajema, E. A.; Meade, T. J. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (18), 9066–9074.
- (48) Epstein, S. P.; Pashinsky, Y. Y.; Gershon, D.; Winicov, I.; Srivilasa, C.; Kristic, K. J.; Asbell, P. A. *BMC Ophthalmol.* **2006**, *6* (1), 22–33.
- (49) Gershon, D. Method for the treatment of Psoriasis. US7964588B2, 2011.
- (50) Levin, J. G.; Guo, J.; Rouzina, I.; Musier-Forsyth, K. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2005**, *80* (05), 217–286.
- (51) de Rocquigny, H.; Shvadchak, V.; Avilov, S.; Dong, C. Z.; Dietrich, U.; Darlix, J.-L.; Mély, Y. *Mini Rev. Med. Chem.* **2008**, *8* (1), 24–35.
- (52) de Paula, Q. A.; Liu, Q.; Almaraz, E.; Denny, J. A.; Mangrum, J. B.; Bhuvanesh, N.; Darensbourg, M. Y.; Farrell, N. P. *Dalt. Trans.* **2009**, *2009* (48), 10896–10903.
- (53) Franzman, M. A.; Barrios, A. M. *Inorg. Chem.* **2008**, *47* (10), 3928–3930.
- (54) Spell, S. R.; Farrell, N. P. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (1), 79–86.
- (55) Spell, S. R.; Mangrum, J. B.; Peterson, E. J.; Fabris, D.; Ptak, R.; Farrell, N. P. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (1), 91–94.
- (56) Anzellotti, A. I.; Liu, Q.; Bloemink, M. J.; Scarsdale, J. N.; Farrell, N. *Chem. Biol.* **2006**, *13* (5), 539–548.
- (57) Abbehausen, C.; Peterson, E. J.; de Paiva, R. E. F.; Corbi, P. P.; Formiga, A. L. B.; Qu, Y.; Farrell, N. P. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (19), 11280–11287.
- (58) Shaw III, C. F. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2589–2600.
- (59) Berners-Price, S. J.; Filipovska, A. *Metallomics* **2011**, *3* (9), 863–873.
- (60) Zhou, M.; Du, K.; Ji, P.; Feng, W. *Biophys. Chem.* **2012**, *168-169*, 60–66.
- (61) Akif, M.; Georgiadis, D.; Mahajan, A.; Dive, V.; Sturrock, E. D.; Isaac, R. E.; Acharya, K. R. *J. Mol. Biol.* **2010**, *400* (3), 502–517.
- (62) Supuran, C. T. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2015**, *6366* (December), 1–16.
- (63) Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Casini, A. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23* (2), 146–189.
- (64) World Health Organization. *Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance*; 2015.

- (65) World Health Organization. *Global action plan on antimicrobial resistance*.; 2015.
- (66) World Health Organization. *Antimicrobial resistance: Global Report on surveillance*; 2014.
- (67) Fleming, S. A. In *Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1942-1962*; 1964; pp 83–93.
- (68) KPMG LLP. *The global economic impact of anti-microbial resistance*; 2014.
- (69) von Nussbaum, F.; Schiffer, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53* (44), 11696–11698.
- (70) Butler, M. S.; Blaskovich, M. A.; Cooper, M. A. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2013**, *66* (10), 571–591.
- (71) Sauvage, E.; Kerff, F.; Terrak, M.; Ayala, J. A.; Charlier, P. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (2), 234–258.
- (72) Mattei, P.-J.; Neves, D.; Dessen, A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20* (6), 749–755.
- (73) Karsisiotis, A. I.; Damblon, C. F.; Roberts, G. C. K. *Metallomics* **2014**, *6* (7), 1181–1197.
- (74) Stojanoski, V.; Chow, D.-C.; Fryszczyn, B.; Hu, L.; Nordmann, P.; Poiriel, L.; Sankaran, B.; Prasad, B. V. V.; Palzkill, T. *Biochemistry* **2015**, *54* (21), 3370–3380.
- (75) Selevsek, N.; Tholey, A.; Heinzle, E.; Liénard, B. M. R.; Oldham, N. J.; Schofield, C. J.; Heinz, U.; Adolph, H.; Frère, J.-M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17* (7), 1000–1004.
- (76) Daumann, L. J.; Schenk, G.; Gahan, L. R. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, No. 18, 2869–2885.
- (77) Drawz, S. M.; Bonomo, R. A. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23* (1), 160–201.
- (78) Kaminskaia, N. V.; Spingler, B.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (27), 6411–6422.
- (79) Kaminskaia, N. V.; Spingler, B.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (27), 6555–6563.
- (80) Page, M. I.; Badarau, A. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2008**, *2008* (5), 1–14.
- (81) Ambler, R. P.; Coulson, A. F. W.; Frère, J. M.; Ghuyssen, J. M.; Joris, B.; Forsman, M.; Levesque, R. C.; Tiraby, G.; Waley, S. G. *Biochem. J.* **1991**, *276* (1), 269–270.
- (82) Farina, D.; Spyrikis, F.; Venturelli, A.; Cross, S.; Tondi, D.; Costi, M. P. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 1405–1434.
- (83) Somboro, A. M.; Tiwari, D.; Bester, L. A.; Parboosing, R.; Chonco, L.; Kruger, H. G.; Arvidsson, P. I.; Govender, T.; Naicker, T.; Essack, S. Y. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70* (5), 1594–1596.

- (84) Chiou, J.; Wan, S.; Chan, K.-F.; So, P.-K.; He, D.; Chan, E. W.; Chan, T.; Wong, K.; Tao, J.; Chen, S. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (46), 9543–9546.
- (85) Horsfall, L. E.; Garau, G.; Liénard, B. M. R.; Dideberg, O.; Schofield, C. J.; Frère, J. M.; Galleni, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, 51 (6), 2136–2142.
- (86) Lienard, B. M. R.; Garau, G.; Horsfall, L.; Karsisiotis, A. I.; Damblon, C.; Lassaux, P.; Papamicael, C.; Roberts, G. C. K.; Galleni, M.; Dideberg, O.; Frere, J.-M.; Schofield, C. *J. Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6 (13), 2282–2294.
- (87) Nagano, R.; Adachi, Y.; Imamura, H.; Yamada, K.; Hashizume, T.; Morishima, H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43 (10), 2497–2503.
- (88) Nagano, R.; Adachi, Y.; Hashizume, T.; Morishima, H. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, 45 (3), 271–276.
- (89) Walter, M. W.; Felici, A.; Galleni, M.; Soto, R. P.; Adlington, R. M.; Baldwin, J. E.; Frere, J. M.; Gololobov, M.; Schofield, C. J. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1996**, 6 (20), 2455–2458.
- (90) Daiyasu, H.; Osaka, K.; Ishino, Y.; Toh, H. *FEBS Lett.* **2001**, 503 (1), 1–6.
- (91) Davies, R. B.; Abraham, E. P. *Biochem. J.* **1974**, 143 (1), 129–135.
- (92) Badarau, A.; Damblon, C.; Page, M. I. *Biochem. J.* **2007**, 401 (1), 197–203.
- (93) Damblon, C.; Prosperi, C.; Lian, L. Y.; Barsukov, I.; Soto, R. P.; Galleni, M.; Frère, J. M.; Roberts, G. C. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121 (49), 11575–11576.
- (94) Baier, F.; Chen, J.; Solomonson, M.; Strynadka, N. C. J.; Tokuriki, N. *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10 (7), 1684–1693.
- (95) Concha, N. O.; Rasmussen, B. A.; Bush, K.; Herzberg, O. *Protein Sci.* **1997**, 6 (12), 2671–2676.
- (96) Marumo, K.; Takeda, A.; Nakamura, Y.; Nakaya, K. *Microbiol. Immunol.* **1995**, 39 (1), 27–33.
- (97) Watanabe, M.; Iyobe, S.; Inoue, M.; Mitsuhashi, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, 35 (1), 147–151.
- (98) Cahill, S. T.; Tarhonskaya, H.; Rydzik, A. M.; Flashman, E.; McDonough, M. A.; Schofield, C. J.; Brem, J. J. *Inorg. Biochem.* **2016**, 163, 185–193.
- (99) Greenwood, N. N.; Earnshaw, A. *Chemistry of the Elements*, 2nd ed.; Elsevier Ltd, 1997.
- (100) Yamamoto, R.; Sumino, K.; Nakamae, K. *Arch. Toxicol.* **69** (2), 127–131.
- (101) Starý, J.; Kratzer, K. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **126** (1), 69–75.
- (102) Yano, J.; Yachandra, V. K. *Photosynth. Res.* **2009**, 102 (2-3), 241–254.
- (103) Ortega, R.; Carmona, A.; Llorens, I.; Solari, P. L. *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, 27, 2054–

- 2065.
- (104) Hummer, A. A.; Rompel, A. *Metallomics* **2013**, *5* (6), 597–614.
- (105) Ascone, I.; Messori, L.; Casini, A.; Gabbiani, C.; Balerna, A.; Dell'Unto, F.; Congiu Castellano, A. *Inorg. Chem.* **2008**, *47* (19), 8629–8634.
- (106) Messori, L.; Balerna, A.; Ascone, I.; Castellano, C.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Marchioni, C.; Jaouen, G.; Congiu Castellano, A. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16* (3), 491–499.
- (107) Kowalska, J. K.; Lima, F. A.; Pollock, C. J.; Rees, J. A.; DeBeer, S. *Isr. J. Chem.* **2016**, *56* (9-10), 803–815.
- (108) Kirby, J. A.; Goodin, D. B.; Wydrzynski, T.; Robertson, A. S.; Klein, M. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (2), 5537–5542.
- (109) Bjornsson, R.; Lima, F. A.; Spatzal, T.; Weyhermüller, T.; Glatzel, P.; Bill, E.; Einsle, O.; Neese, F.; DeBeer, S. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (8), 3096–3103.
- (110) Bjornsson, R.; Delgado-jaime, M. U.; Lima, F. A.; Sippel, D.; Schlesier, J.; Weyhermüller, T.; Einsle, O.; Neese, F.; Debeer, S. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2015**, *641* (1), 65–71.
- (111) Bjornsson, R.; Neese, F.; Schrock, R. R.; Einsle, O.; DeBeer, S. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2015**, *20* (2), 447–460.
- (112) Wang, Y.; Jin, S.; Li, J.; Zhou, J.; Zhang, L.; Wang, J.; Zhang, S.; Wei, X.; Jiang, Z.; Huang, Y.; Cui, P.; Zhao, H.; Chu, W. *Radiat. Phys. Chem.* **2015**.
- (113) Daier, V. A.; Rivière, E.; Mallet-Ladeira, S.; Moreno, D. M.; Hureau, C.; Signorella, S. R. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *163*, 162–175.
- (114) Chan, K. L.; Bakman, I.; Marts, A. R.; Batir, Y.; Dowd, T. L.; Tierney, D. L.; Gibney, B. R. *Inorg. Chem.* **2014**, *53* (li), 6309–6320.
- (115) Peariso, K.; Zhou, Z. S.; Smith, A. E.; Matthews, R. G.; Penner-Hahn, J. E. *Biochemistry* **2001**, *40* (4), 987–993.
- (116) Kleifeld, O.; Kotra, L. P.; Gervasi, D. C.; Brown, S.; Bernardo, M. M.; Fridman, R.; Mobashery, S.; Sagi, I. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (20), 17125–17131.
- (117) Martin, D. P.; Blachly, P. G.; Marts, A. R.; Woodruff, T. M.; De Oliveira, C. A. F.; McCammon, J. A.; Tierney, D. L.; Cohen, S. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (14), 5400–5406.
- (118) Tierney, D. L.; Schenk, G. *Biophys. J.* **2014**, *107* (6), 1263–1272.
- (119) Meini, M. R.; Llarrull, L. I.; Vila, A. J. *FEBS Lett.* **2015**, *589* (22), 3419–3432.
- (120) Mangani, S.; Carloni, P.; Viezzoli, M. S.; Coleman, J. E. *Inorg.Chim.Acta* **1992**, *191*, 161–165.

- (121) Breece, R. M.; Hu, Z.; Bennett, B.; Crowder, M. W.; Tierney, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (33), 11642–11643.
- (122) Jacques, A.; Lebrun, C.; Casini, A.; Kieffer, I.; Proux, O.; Latour, J. M.; Sénèque, O. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (8), 4104–4113.
- (123) Davies, R. B.; Abraham, E. P. *Biochem. J.* **1974**, *143* (1), 115–127.
- (124) Tiekink, E. R. T. *Acta Crystallogr. Sect. C* **1989**, *45*, 1233–1234.
- (125) Corbi, P. P.; Quintão, F. A.; Ferraresi, D. K. D.; Lustri, W. R.; Amaral, A. C.; Massabni, A. C. *J. Coord. Chem.* **2010**, *63* (8), 1390–1397.
- (126) Grant, T. A.; Forward, J. M.; Fackler, J. P. **1996**, *003* (I), 483–484.
- (127) Figueroa, S. J. A.; Mauricio, J. C.; Murari, J.; Beniz, D. B.; Piton, J. R.; Slepicka, H. H.; de Sousa, M. F.; Espíndola, A. M.; Levinsky, A. P. S. *J. Phys. Conf. Ser.* **2016**, *712*, 12022–12026.
- (128) Tolentino, H. C. N.; Ramos, A. Y.; Alves, M. C. M.; Barrea, R. A.; Tamura, E.; Cezar, J. C.; Watanabe, N. *J. Synchrotron Radiat.* **2001**, *8* (3), 1040–1046.
- (129) Ravel, B.; Newville, M. *J. Synchrotron Radiat.* **2005**, *12* (4), 537–541.
- (130) Sayers, D. E.; Stern, E. A.; Lytle, F. W. *Phys. Rev. Lett.* **1971**, *27* (18), 1204–1207.
- (131) Rehr, J. J.; Albers, R. C. *Rev. Mod. Phys.* **2000**, *72* (3), 621–654.
- (132) Rehr, J. J.; Kas, J. J.; Prange, M. P.; Sorini, A. P.; Takimoto, Y.; Vila, F. *Comptes Rendus Phys.* **2009**, *10* (6), 548–559.
- (133) Rehr, J. J.; Kas, J. J.; Vila, F. D.; Prange, M. P.; Jorissen, K. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (21), 5503–5513.
- (134) Tiekink, E. R. T. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* **1989**, *45* (8), 1233–1234.
- (135) Laemmlli, U. K. *Nature* **1970**, *227* (5259), 680–685.
- (136) Abbehausen, C.; Manzano, C. M.; Corbi, P. P.; Farrell, N. P. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *165*, 136–145.
- (137) Hormann-Arendt, A. L.; Shaw, C. F. *Inorg. Chem.* **1990**, *29* (23), 4683–4687.
- (138) Isab, A. A.; Hussain, M. S.; Akhtar, M. N.; Wazeer, M. I. M.; Al-Arfaj, A. R. *Polyhedron* **1999**, *18* (10), 1401–1409.
- (139) Carlock, M. T.; Shaw, C. F.; Eidsness, M. K.; Watkins, J. W.; Elder, R. C. *Inorg. Chem.* **1986**, *25* (3), 333–339.
- (140) Kolling, O. W. *Trans. Kansas Acad. Sci.* **1984**, *87* (3/4), 115–118.
- (141) Lu, Z. H.; Sham, T. K.; Vos, M.; Bzowski, A.; Mitchell, I. V.; Norton, P. R. *Phys. Rev. B* **1992**, *45* (15), 8811–8814.

- (142) Pantelouris, A.; Kueper, G.; Hormes, J.; Feldmann, C.; Jansen, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (47), 11749–11753.
- (143) Hill, D. T.; Sutton, B. M. *Cryst. Struct. Communucations* **1980**, *9*, 679–686.
- (144) Bush, K.; Jacoby, G. A.; Medeiros, A. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39* (6), 1211–1233.
- (145) Bush, K.; Bradford, P. A. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2016**, *6* (8).
- (146) Louie, A. Y.; Meade, T. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2711–2734.
- (147) Du, Z.; de Paiva, R. E. F.; Qu, Y.; Farrell, N. *Dalt. Trans.* **2016**, *45* (21), 8712–8716.
- (148) Tolman, C. a. *Chem. Rev.* **1977**, *77* (3), 313–348.
- (149) Streuli, C. A. *Anal. Chem.* **1960**, *32* (8), 985–987.
- (150) Huntley, J. J. a; Fast, W.; Benkovic, S. J.; Wright, P. E.; Dyson, H. J. *Protein Sci.* **2003**, *12* (7), 1368–1375.
- (151) Karsisiotis, A. I.; Damblon, C. F.; Roberts, G. C. K. *Biochem. J.* **2013**, *456* (3), 397–407.
- (152) Valdez, C. E.; Sparta, M.; Alexandrova, A. N. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9* (1), 730–737.
- (153) Concha, N. O.; Janson, C. a; Rowling, P.; Pearson, S.; Cheever, C. a; Clarke, B. P.; Lewis, C.; Galleni, M.; Frère, J. M.; Payne, D. J.; Bateson, J. H.; Abdel-Meguid, S. S. *Biochemistry* **2000**, *39*, 4288–4298.
- (154) Brem, J.; van Berkel, S. S.; Zollman, D.; Lee, S. Y.; Gileadi, O.; McHugh, P. J.; Walsh, T. R.; McDonough, M. A.; Schofield, C. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (1), 142–150.
- (155) Krężel, A.; Latajka, R.; Bujacz, G. D.; Bal, W. *Inorg. Chem.* **2003**, *42* (6), 1994–2003.
- (156) Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. *Introduction to Spectroscopy*, 4th ed.; Brooks/Cole: Belmont, CA, USA, 2009.
- (157) Krannich, L. K.; Kanjolia, R. K.; Watkins, C. L. *Magn. Reson. Chem.* **1987**, *25* (4), 320–324.
- (158) Pruchnik, H.; Lis, T.; Pruchnik, F. P. *J. Organomet. Chem.* **2015**, *791*, 124–129.
- (159) Pruchnik, H.; Latocha, M.; Zielińska, A.; Pruchnik, F. P. *J. Organomet. Chem.* **2016**, *822*, 74–79.

Anexo

Dados cristalográficos de AuTCEP

| | |
|----------------------------------|---|
| $C_{18}H_{28}AuKO_{12}P_2$ | $D_x = 2.045 \text{ Mg m}^{-3}$ |
| $M_r = 734.41$ | Mo $K\alpha$ radiation, $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ |
| Orthorhombic, $Pccn$ | Cell parameters from 74 reflections |
| $a = 11.4853 (4) \text{ \AA}$ | $\theta = 6.0\text{--}20.3^\circ$ |
| $b = 13.3432 (5) \text{ \AA}$ | $\mu = 6.54 \text{ mm}^{-1}$ |
| $c = 15.5624 (6) \text{ \AA}$ | $T = 150 \text{ K}$ |
| $V = 2384.95 (15) \text{ \AA}^3$ | Needle, colorless |
| $Z = 4$ | $0.11 \times 0.10 \times 0.04 \text{ mm}$ |
| $F(000) = 1440$ | |

Data collection

| | |
|---|--|
| Bruker APEX CCD detector diffractometer | 2536 independent reflections |
| Radiation source: fine-focus sealed tube | 2004 reflections with $I > 2\sigma(I)$ |
| Detector resolution: $8.3333 \text{ pixels mm}^{-1}$ | $R_{\text{int}} = 0.049$ |
| phi and ω scans | $\theta_{\text{max}} = 26.7^\circ$, $\theta_{\text{min}} = 2.3^\circ$ |
| Absorption correction: multi-scan SADABS (Bruker, 2010) | $h = -14 \rightarrow 14$ |
| $T_{\text{min}} = 0.593$, $T_{\text{max}} = 0.746$ | $k = -16 \rightarrow 16$ |
| 36906 measured reflections | $l = -19 \rightarrow 19$ |

Refinement

| | |
|---------------------------------|---|
| Refinement on F^2 | 0 restraints |
| Least-squares matrix: full | Hydrogen site location: mixed |
| $R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.015$ | H-atom parameters not refined |
| $wR(F^2) = 0.032$ | $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0104P)^2 + 2.0427P]$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$ |
| $S = 1.05$ | $(\Delta/\sigma)_{\text{max}} = 0.005$ |
| 2536 reflections | $\Delta_{\text{max}} = 0.38 \text{ e \AA}^{-3}$ |
| 161 parameters | $\Delta_{\text{min}} = -0.37 \text{ e \AA}^{-3}$ |

Special details

Geometry. All esds (except the esd in the dihedral angle between two l.s. planes) are estimated using the full covariance matrix. The cell esds are taken into account individually in the estimation of esds in distances, angles and torsion angles; correlations between esds in cell parameters are only used when they are defined by crystal symmetry. An approximate (isotropic)

| |
|---|
| treatment of cell esds is used for estimating esds involving l.s. planes. |
|---|

Fractional atomic coordinates and isotropic or equivalent isotropic displacement parameters (\AA^2) for (AuTCEP)

| | x | y | z | $U_{\text{iso}}^*/U_{\text{eq}}$ |
|-----|--------------|--------------|--------------|----------------------------------|
| Au1 | 0.7500 | 0.7500 | 0.74090 (2) | 0.01109 (4) |
| K1 | 0.7500 | 0.2500 | 0.46440 (4) | 0.01676 (14) |
| P1 | 0.65134 (5) | 0.60119 (5) | 0.73638 (4) | 0.00993 (12) |
| O1 | 0.40392 (16) | 0.61934 (15) | 0.96237 (12) | 0.0211 (4) |
| O2 | 0.54988 (17) | 0.63966 (15) | 1.05578 (11) | 0.0197 (4) |
| O3 | 0.50710 (17) | 0.33208 (16) | 0.73028 (11) | 0.0256 (5) |
| O4 | 0.62660 (15) | 0.34261 (14) | 0.84089 (11) | 0.0180 (4) |
| O5 | 0.43761 (16) | 0.63122 (16) | 0.49028 (11) | 0.0206 (5) |
| O6 | 0.59902 (17) | 0.63604 (16) | 0.41012 (12) | 0.0215 (5) |
| C1 | 0.5479 (2) | 0.58691 (19) | 0.82370 (15) | 0.0119 (5) |
| H1A | 0.4858 | 0.6354 | 0.8162 | 0.014* |
| H1B | 0.5136 | 0.5206 | 0.8203 | 0.014* |
| C2 | 0.6006 (2) | 0.6008 (2) | 0.91278 (16) | 0.0142 (6) |
| H2A | 0.6437 | 0.5411 | 0.9286 | 0.017* |
| H2B | 0.6546 | 0.6567 | 0.9118 | 0.017* |
| C3 | 0.5071 (2) | 0.6203 (2) | 0.97868 (16) | 0.0139 (6) |
| C4 | 0.7498 (2) | 0.49398 (17) | 0.73320 (14) | 0.0144 (4) |
| H4A | 0.8137 | 0.5106 | 0.6951 | 0.017* |
| H4B | 0.7823 | 0.4853 | 0.7902 | 0.017* |
| C5 | 0.6996 (2) | 0.39281 (18) | 0.70442 (16) | 0.0145 (5) |
| H5A | 0.6687 | 0.4000 | 0.6467 | 0.017* |
| H5B | 0.7622 | 0.3441 | 0.7021 | 0.017* |
| C6 | 0.6044 (2) | 0.35269 (18) | 0.76231 (16) | 0.0130 (5) |
| C7 | 0.5580 (2) | 0.59659 (19) | 0.64238 (15) | 0.0124 (5) |
| H7A | 0.5182 | 0.5325 | 0.6412 | 0.015* |
| H7B | 0.4993 | 0.6486 | 0.6472 | 0.015* |
| C8 | 0.6237 (2) | 0.6104 (2) | 0.55796 (15) | 0.0148 (5) |
| H8A | 0.6755 | 0.6675 | 0.5630 | 0.018* |
| H8B | 0.6709 | 0.5515 | 0.5471 | 0.018* |
| C9 | 0.5427 (3) | 0.6268 (2) | 0.48331 (17) | 0.0155 (6) |
| H2 | 0.500 (3) | 0.652 (2) | 1.090 (2) | 0.023* |
| H6 | 0.550 (3) | 0.646 (2) | 0.368 (2) | 0.023* |

Atomic displacement parameters (\AA^2) for (AuTCEP)

| | U^{11} | U^{22} | U^{33} | U^{12} | U^{13} | U^{23} |
|-----|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Au1 | 0.01187 (6) | 0.01017 (6) | 0.01123 (6) | -0.00288 (6) | 0.000 | 0.000 |
| K1 | 0.0131 (3) | 0.0217 (4) | 0.0155 (3) | -0.0027 (4) | 0.000 | 0.000 |
| P1 | 0.0093 (3) | 0.0097 (3) | 0.0107 (3) | -0.0012 (2) | -0.0003 (2) | -0.0002 (2) |
| O1 | 0.0144 (10) | 0.0319 (12) | 0.0170 (9) | 0.0025 (9) | 0.0008 (8) | -0.0074 (9) |
| O2 | 0.0187 (10) | 0.0283 (11) | 0.0122 (10) | 0.0018 (9) | 0.0013 (8) | -0.0023 (8) |
| O3 | 0.0209 (10) | 0.0412 (13) | 0.0146 (9) | -0.0148 (9) | -0.0029 (8) | 0.0039 (9) |
| O4 | 0.0193 (10) | 0.0239 (10) | 0.0108 (9) | 0.0022 (8) | -0.0013 (7) | 0.0024 (7) |
| O5 | 0.0141 (10) | 0.0333 (12) | 0.0145 (10) | 0.0017 (9) | -0.0037 (8) | -0.0027 (8) |
| O6 | 0.0190 (10) | 0.0343 (13) | 0.0113 (9) | -0.0048 (9) | -0.0011 (8) | 0.0046 (9) |
| C1 | 0.0099 (11) | 0.0127 (13) | 0.0131 (12) | 0.0004 (10) | 0.0002 (9) | -0.0014 (10) |
| C2 | 0.0121 (12) | 0.0161 (14) | 0.0143 (13) | 0.0004 (11) | 0.0004 (10) | 0.0004 (11) |
| C3 | 0.0180 (15) | 0.0107 (13) | 0.0131 (13) | -0.0012 (11) | 0.0021 (11) | 0.0000 (10) |
| C4 | 0.0103 (10) | 0.0151 (10) | 0.0178 (11) | 0.0010 (12) | 0.0012 (14) | -0.0005 (9) |
| C5 | 0.0152 (12) | 0.0106 (12) | 0.0176 (12) | 0.0011 (10) | 0.0018 (10) | -0.0028 (10) |
| C6 | 0.0172 (12) | 0.0069 (11) | 0.0150 (12) | 0.0021 (9) | 0.0012 (10) | 0.0003 (10) |
| C7 | 0.0136 (12) | 0.0117 (12) | 0.0119 (12) | -0.0006 (10) | 0.0000 (10) | 0.0002 (10) |
| C8 | 0.0160 (13) | 0.0166 (13) | 0.0117 (12) | -0.0008 (11) | -0.0009 (10) | 0.0030 (10) |
| C9 | 0.0188 (14) | 0.0113 (14) | 0.0164 (15) | -0.0028 (11) | -0.0022 (11) | -0.0005 (10) |

Geometric parameters (\AA , $^\circ$) for (AuTCEP)

| | | | |
|----------------------|-------------|-----------------------|-----------|
| Au1—P1 ⁱ | 2.2872 (6) | O6—C9 | 1.316 (3) |
| Au1—P1 | 2.2872 (6) | O6—H6 | 0.88 (3) |
| K1—O4 ⁱⁱ | 2.6889 (18) | C1—C2 | 1.524 (3) |
| K1—O4 ⁱⁱⁱ | 2.6889 (18) | C1—H1A | 0.9700 |
| K1—O1 ^{iv} | 2.7319 (19) | C1—H1B | 0.9700 |
| K1—O1 ^v | 2.7319 (19) | C2—C3 | 1.508 (3) |
| K1—O5 ^{vi} | 2.7662 (19) | C2—H2A | 0.9700 |
| K1—O5 ^{vii} | 2.7662 (19) | C2—H2B | 0.9700 |
| K1—C3 ^{iv} | 3.535 (3) | C3—K1 ^{viii} | 3.535 (3) |
| K1—C3 ^v | 3.535 (3) | C4—C5 | 1.535 (3) |
| P1—C7 | 1.815 (2) | C4—H4A | 0.9700 |
| P1—C1 | 1.815 (2) | C4—H4B | 0.9700 |
| P1—C4 | 1.824 (2) | C5—C6 | 1.514 (3) |
| O1—C3 | 1.212 (3) | C5—H5A | 0.9700 |

| | | | |
|---|-------------|--------------------------|-------------|
| O1—K1 ^{viii} | 2.7319 (19) | C5—H5B | 0.9700 |
| O2—C3 | 1.322 (3) | C7—C8 | 1.526 (3) |
| O2—H2 | 0.80 (3) | C7—H7A | 0.9700 |
| O3—C6 | 1.254 (3) | C7—H7B | 0.9700 |
| O4—C6 | 1.257 (3) | C8—C9 | 1.504 (4) |
| O4—K1 ^{ix} | 2.6890 (18) | C8—H8A | 0.9700 |
| O5—C9 | 1.214 (3) | C8—H8B | 0.9700 |
| O5—K1 ^{vi} | 2.7662 (19) | | |
| | | | |
| P1 ⁱ —Au1—P1 | 176.47 (3) | P1—C1—H1B | 108.7 |
| O4 ⁱⁱ —K1—O4 ⁱⁱⁱ | 88.74 (8) | H1A—C1—H1B | 107.6 |
| O4 ⁱⁱ —K1—O1 ^{iv} | 158.83 (6) | C3—C2—C1 | 110.9 (2) |
| O4 ⁱⁱⁱ —K1—O1 ^{iv} | 70.36 (6) | C3—C2—H2A | 109.5 |
| O4 ⁱⁱ —K1—O1 ^v | 70.36 (6) | C1—C2—H2A | 109.5 |
| O4 ⁱⁱⁱ —K1—O1 ^v | 158.83 (6) | C3—C2—H2B | 109.5 |
| O1 ^{iv} —K1—O1 ^v | 130.69 (9) | C1—C2—H2B | 109.5 |
| O4 ⁱⁱ —K1—O5 ^{vi} | 92.00 (5) | H2A—C2—H2B | 108.0 |
| O4 ⁱⁱⁱ —K1—O5 ^{vi} | 109.24 (6) | O1—C3—O2 | 123.8 (2) |
| O1 ^{iv} —K1—O5 ^{vi} | 91.84 (6) | O1—C3—C2 | 123.5 (2) |
| O1 ^v —K1—O5 ^{vi} | 75.83 (6) | O2—C3—C2 | 112.7 (2) |
| O4 ⁱⁱ —K1—O5 ^{vii} | 109.24 (6) | O1—C3—K1 ^{viii} | 40.63 (13) |
| O4 ⁱⁱⁱ —K1—O5 ^{vii} | 92.00 (5) | O2—C3—K1 ^{viii} | 89.29 (15) |
| O1 ^{iv} —K1—O5 ^{vii} | 75.83 (6) | C2—C3—K1 ^{viii} | 148.21 (17) |
| O1 ^v —K1—O5 ^{vii} | 91.84 (6) | C5—C4—P1 | 117.71 (19) |
| O5 ^{vi} —K1—O5 ^{vii} | 150.46 (8) | C5—C4—H4A | 107.9 |
| O4 ⁱⁱ —K1—C3 ^{iv} | 147.60 (6) | P1—C4—H4A | 107.9 |
| O4 ⁱⁱⁱ —K1—C3 ^{iv} | 60.92 (6) | C5—C4—H4B | 107.9 |
| O1 ^{iv} —K1—C3 ^{iv} | 16.79 (6) | P1—C4—H4B | 107.9 |
| O1 ^v —K1—C3 ^{iv} | 138.44 (6) | H4A—C4—H4B | 107.2 |
| O5 ^{vi} —K1—C3 ^{iv} | 107.84 (6) | C6—C5—C4 | 114.1 (2) |
| O5 ^{vii} —K1—C3 ^{iv} | 64.27 (6) | C6—C5—H5A | 108.7 |
| O4 ⁱⁱ —K1—C3 ^v | 60.92 (6) | C4—C5—H5A | 108.7 |
| O4 ⁱⁱⁱ —K1—C3 ^v | 147.60 (6) | C6—C5—H5B | 108.7 |
| O1 ^{iv} —K1—C3 ^v | 138.44 (6) | C4—C5—H5B | 108.7 |
| O1 ^v —K1—C3 ^v | 16.79 (6) | H5A—C5—H5B | 107.6 |
| O5 ^{vi} —K1—C3 ^v | 64.27 (6) | O3—C6—O4 | 123.0 (2) |
| O5 ^{vii} —K1—C3 ^v | 107.84 (6) | O3—C6—C5 | 119.0 (2) |
| C3 ^{iv} —K1—C3 ^v | 150.97 (9) | O4—C6—C5 | 118.0 (2) |
| C7—P1—C1 | 102.32 (11) | C8—C7—P1 | 113.45 (17) |
| C7—P1—C4 | 108.52 (11) | C8—C7—H7A | 108.9 |
| C1—P1—C4 | 110.09 (11) | P1—C7—H7A | 108.9 |

| | | | |
|--------------------------|-------------|------------|-----------|
| C7—P1—Au1 | 110.30 (9) | C8—C7—H7B | 108.9 |
| C1—P1—Au1 | 113.10 (8) | P1—C7—H7B | 108.9 |
| C4—P1—Au1 | 112.01 (9) | H7A—C7—H7B | 107.7 |
| C3—O1—K1 ^{viii} | 122.58 (17) | C9—C8—C7 | 112.2 (2) |
| C3—O2—H2 | 112 (2) | C9—C8—H8A | 109.2 |
| C6—O4—K1 ^{ix} | 148.44 (16) | C7—C8—H8A | 109.2 |
| C9—O5—K1 ^{vi} | 145.64 (19) | C9—C8—H8B | 109.2 |
| C9—O6—H6 | 110.3 (19) | C7—C8—H8B | 109.2 |
| C2—C1—P1 | 114.12 (17) | H8A—C8—H8B | 107.9 |
| C2—C1—H1A | 108.7 | O5—C9—O6 | 124.2 (2) |
| P1—C1—H1A | 108.7 | O5—C9—C8 | 123.6 (2) |
| C2—C1—H1B | 108.7 | O6—C9—C8 | 112.3 (2) |

Symmetry codes: (i) $-x+3/2, -y+3/2, z$; (ii) $x, -y+1/2, z-1/2$; (iii) $-x+3/2, y, z-1/2$; (iv) $x+1/2, -y+1, -z+3/2$; (v) $-x+1, y-1/2, -z+3/2$; (vi) $-x+1, -y+1, -z+1$; (vii) $x+1/2, y-1/2, -z+1$; (viii) $-x+1, y+1/2, -z+3/2$; (ix) $x, -y+1/2, z+1/2$.

Hydrogen-bond geometry (Å, °) for (AuTCEP)

| <i>D</i> —H... <i>A</i> | <i>D</i> —H | H... <i>A</i> | <i>D</i> ... <i>A</i> | <i>D</i> —H... <i>A</i> |
|---------------------------|-------------|---------------|-----------------------|-------------------------|
| C5—H5A...O5 ^{vi} | 0.97 | 2.49 | 3.430 (3) | 163 |
| O2—H2...O4 ^x | 0.80 (3) | 1.81 (3) | 2.598 (3) | 169 (3) |
| O6—H6...O3 ^{vi} | 0.88 (3) | 1.69 (3) | 2.538 (3) | 163 (3) |

Symmetry codes: (vi) $-x+1, -y+1, -z+1$; (x) $-x+1, -y+1, -z+2$.

Document origin: *publCIF* [Westrip, S. P. (2010). *J. Apply. Cryst.*, **43**, 920-925]