

**Teresa Margarida dos Santos**

**Química de coordenação de Crómio  
relacionada com os efeitos biológicos de  
compostos de Cr(III) e de Cr(VI)**

**Departamento de Química  
Universidade de Aveiro**

**1995**

## ERRATA

| Local         | Página.. | Linha        | Onde se lê  | Deve ler-se  |
|---------------|----------|--------------|---|--|
| Abst.         | 2        | 7            | DC  | CD   |
|               |          | 10           | nucleic   | nuclei   |
| Lista de Tab. | I        | Tab. 3.1     | pseudo-primeira   | pseudo-primeira ordem  |
| Lista de Tab. | II       | Tab. 3.8     | constantes de velocidade                                      | constantes observadas de..   |
| Lista de Tab. | II       | Tab. 3.10    | $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$                                  | $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3 \text{ cm}^{-1}$                                 |
| Lista de Tab. | II       | Tab. 3.12    | $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$                                  | $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3 \text{ cm}^{-1}$                                 |
| Lista de Fig. | V        | Fig. 1.5     | [24]  | [10]   |
| Lista de Fig. | V        | Fig. 2.3     | estrutura cristalina do                                       | estrutura do   |
| Lista de Fig. | V        | Fig. 3.3     | acrescentar...  | (o-valores experimentais;<br>--função de ajuste)                             |
| Lista de Fig. | VIII     | Fig. 4.4     | =transmitância  | %=transmitância  |
| Lista de Fig. | VIII     | Fig. 4.7/4.9 | a.u.=   | u.a.=  |
| Lista de Fig. | X        | Fig. 7.A.1   | "sopped-flow"   | "stopped-flow"   |
| Índice        | XI       | 2.2.2.1-     | pg. 25  | pg.24  |
| Índice        | XIV      | 5.3-         | pg.141  | pg.142   |
| Índice        | XIV      | 5.3.1-       | pg.141  | pg.142   |
| Índice        | XIV      | 5.3.2-       | pg.141  | pg.142   |
| Índice        | XIV      | 5.3.4.3-     | pg.149  | pg.150   |
| Cap.1         | 3        | Tab.1.1      | 0.001-0.08  | 0.0001-0.08  |
| Cap.1         | 3        | Tab.1.1      | $3 \times 10^{-5}$  | $3 \times 10^{-4}$   |
| Cap.1         | 4        | Tab.1.2      | $\text{K}_3[\text{Cr}(\text{CN})_6] \cdot \text{H}_2\text{O}$ | $\text{K}_3[\text{Cr}(\text{CN})_4]$   |
| Cap.1         | 4        | Tab.1.2      | $\text{Na}[\text{OCr}(\text{O}_2\text{COEt})_2]$              | $\text{Na}[\text{OCr}(\text{O}_2\text{COEt})_2]$                             |
| Cap.1         | 6        | 6            | e Cr(VI).   | e Cr(VI) [19].   |
| Cap.1         | 7        | 22           | $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]\text{Cl}_3$                | $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6](\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ |
| Cap.1         | 14       | 19           | redução, podem  | redução do Cr(VI), podem   |
| Cap.1         | 14       | 22           | ADN"  | ADN"(DNA-protein cross-links)  |
| Cap.1         | 19       | 4            | substractos   | substratos   |
| Cap.1         | 19       | 12           | ...85,86]   | ...85-89]  |
| Cap.1         | 20       | 11           | [87,88]   | [90]   |
| Cap.1         | 20       | 23           | [90]  | [91]   |
| Cap.1         | 21       | 12           | [91,92]   | [92,93]  |
| Cap.1         | 21       | 17/22        | [92]  | [93]   |
| Cap.1         | 22       | 3            | [92,93]   | [93,94]  |
| Cap.1         | 22       | Tab.2.2      | $\text{Cr}_2\text{O}_3^{2-}$                                  | $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$   |
| Cap.1         | 22       | Tab.2.2      | $\text{CNS}^-$  | $\text{SCN}^-$   |
| Cap.1         | 22       | Tab.2.2/leg. | [92]  | [19,93]  |

|       |     |                   |   |   |
|-------|-----|-------------------|---|---|
| Cap.3 | 96  | 3                 | referidos reacções complexos  | referidos complexos   |
| Cap.3 | 100 | 16                | $k_2(\text{obs})$   | $k_1(\text{obs})$   |
| Cap.4 | 109 | Tab.4.2           | $[\text{Cr}(\text{H}_3\text{L})(\text{H}_2\text{L})].3(\text{H}_2\text{O})_6$ | $\text{K}_2[\text{Cr}(\text{H}_3\text{L})(\text{H}_2\text{L})].3\text{H}_2\text{O}$         |
| Cap.4 | 111 | 11                | cortar  | Tabela 4.3, Secção 4.3).  |
| Cap.4 | 111 | Nota rodapé 4.1   | [166]   | [179]   |
| Cap.4 | 112 | Tab.4.3/leg.      | [43,171]  | [171,172]   |
| Cap.4 | 113 | 13                | [...128,160,176]  | [...128,177]  |
| Cap.4 | 113 | 20                | [177]   | [178]   |
| Cap.4 | 113 | 21                | [178]   | [177]   |
| Cap.4 | 114 | 8/9               | As bandas...[179]   | deslocar para o fim da alínea iv)   |
| Cap.4 | 114 | 12                | [4,35]  | [127,168]   |
| Cap.4 | 114 | 13/14             | [143] (Ver...4.4)   | [143].  |
| Cap.4 | 114 | Fig.4.4           | acrescentar na 1ª parte da legenda  | 2800.....2400   |
| Cap.4 | 114 | Fig.4.4/leg.      | (3700-2500)   | (3700-200)  |
| Cap.4 | 114 | Fig.4.4/leg.      | =transmitância  | =% transmitância  |
| Cap.4 | 116 | 11                | trans-S, cis-o e cis-N  | <i>trans</i> -S, <i>cis</i> -O e <i>cis</i> -N  |
| Cap.4 | 116 | 22                | ...160,178]   | ...160,78]  |
| Cap.4 | 123 | Tab.4.4/3ª coluna | 534 (-0.94)   | 534 (+ 0.94)  |
| Cap.4 | 123 | Tab.4.4/leg.      | $\text{mol dm}^3 \text{ cm}^{-1}$   | $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3 \text{ cm}^{-1}$  |
| Cap.4 | 123 | Tab.4.4/leg.      | $\text{mol dm}^3 \text{ cm}^{-1}$   | $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3 \text{ cm}^{-1}$  |
| Cap.4 | 124 | Fig.4.9/leg.      | a.u.=   | u.a.=   |
| Cap.4 | 125 | 18                | $\Delta\epsilon_{\text{obs}}$   | $\Delta A_{\text{obs}}$   |
| Cap.4 | 126 | Fig.4.10/eixoyy   | $\Delta\epsilon_o - \Delta\epsilon_{\text{obs}}$                              | $\Delta A_o - \Delta A_{\text{obs}}$  |
| Cap.4 | 126 | Fig.4.10/eixoxx   | $\text{H}^+ \times 10^{-4}$   | $\text{H}^+ \times 10^4 / \text{mol dm}^{-3}$   |
| Cap.4 | 126 | 2/4/11            | $\Delta\epsilon_{\text{obs}}$   | $\Delta A_{\text{obs}}$   |
| Cap.4 | 126 | 3/12              | $\Delta\epsilon_o$  | $\Delta A_o$  |
| Cap.4 | 126 | 5                 | $\Delta\epsilon_o - \Delta\epsilon_{\text{obs}}$                              | $\Delta A_o - \Delta A_{\text{obs}}$  |
| Cap.4 | 126 | 11                | $\epsilon_{\text{dir}} - \Delta\epsilon_{\text{esq}}$                         | $A_{\text{dir}} - A_{\text{esq}}$   |
| Cap.4 | 126 | depois 8          | acrescentar   | $[\text{CH}] = [\text{Cr}(\text{L-cys})(\text{L-cysSH})$<br>(solvente)], complexo protonado |
| Cap.4 | 127 | 4                 | $\Delta\epsilon_{\text{obs}}$   | $\Delta A_{\text{obs}}$   |
| Cap.4 | 127 | 6                 | $\Delta\epsilon_o - \Delta\epsilon_{\text{obs}}$                              | $\Delta A_o - \Delta A_{\text{obs}}$  |
| Cap.4 | 133 | Fig.4.13/eixoxx   | $\text{H}^+ (a \text{ H}^+)$  | $\text{H}^+ / (a \text{ H}^+) / \text{mol dm}^{-3}$   |
| Cap.4 | 133 | 7                 | 0.019-0.075   | 0.010-0.075   |
| Cap.4 | 135 | Tab.4.6/Refª      | [128]   | [167]   |
| Cap.4 | 137 | 20                | reversibilidadde  | reversibilidade   |
| Cap.4 | 138 | 15                | paasso  | passo   |
| Cap.5 | 142 | 25                | Secção 5.2.1  | Secção 5.2  |
| Cap.5 | 145 | Tab.5.2/Título    | $\text{DC}_{\text{máx}}$  | $\lambda_{\text{máx}}$  |
| Cap.5 | 148 | 17/18             | UV/Vis, em que....com desl.   | UV/Vis, com deslocamento  |

|       |       |                  |  |  |
|-------|-------|------------------|--|--|
| Cap.1 | 22    | 7                | [87,89-94]   | [87,95,96]   |
| Cap.1 | 22    | 9                | [85,88,89,94,96]   | [85,87-89,95,96]   |
| Cap.1 | 22    | 11               | N <sub>3</sub>   | N <sub>3</sub> <sup>-</sup>  |
| Cap.2 | 34    | Fig.2.3/leg.     | estrutura cristalina   | estrutura molecular  |
| Cap.2 | 34    | 10               | normalmente pelos átomos de O                                      | ---  |
| Cap.3 | 37    | 12               | tem lugar a reacção que dá...                                      | têm lugar as reacções que dão...   |
| Cap.3 | 37    | Nota rodapé 3.1  | cisteinil e glutatiónil  | cisteinilo e glutatiónilo  |
| Cap.3 | 40    | 4                | 3.4.2  | 3.4.3  |
| Cap.3 | 41    | 10               | catalisar  | interferir   |
| Cap.3 | 42    | Tab.3.1/leg.     | -primeira  | -primeira ordem  |
| Cap.3 | 42    | Tab.3.1/leg.     | d), e) e f)  | e) e f)  |
| Cap.3 | 46    | Fig.3.3/leg.     | acrescentar  | (o-valores experimentais;<br>---representação da f. de ajuste)   |
| Cap.3 | 47    | Tab.3.4/título   | k <sub>1</sub> /s <sup>-1</sup> ou k <sub>2</sub> /s <sup>-1</sup> | k <sub>1</sub> (obs)/s <sup>-1</sup> ou k <sub>2</sub> (obs)/s <sup>-1</sup>                               |
| Cap.3 | 47    | Tab.3.4/título   | **k <sub>2</sub> (obs)   | 10 <sup>4</sup> x ** k <sub>2</sub> (obs)/s <sup>-1</sup>  |
| Cap.3 | 47    | Tab.3.4/leg.     | reações  | reacções   |
| Cap.3 | 47    | Tab.3.4/leg.     | acrescentar  | meio não tamponizado;<br>pH ajustado inicialmente a 7.0  |
| Cap.3 | 48/49 | Fig.3.4/eixo yy  | ...x 10 <sup>-3</sup>  | ...x 10 <sup>+3</sup>  |
| Cap.3 | 56    | Nota rodapé 3.8  | 3.4.3  | 3.4.3.1.2  |
| Cap.3 | 65    | Nota rodapé 3.9  | soluções tamponizadas3.4.3   | soluções não tamponizadas  |
| Cap.3 | 67    | Tab.3.8/leg.     | acrescentar  | [Cr(VI)]=1x10 <sup>-4</sup> mol dm <sup>-3</sup>   |
| Cap.3 | 69    | Fig.3.12/eixoyy  | ...x 10 <sup>-3</sup>  | ...x 10 <sup>+3</sup>  |
| Cap.3 | 73    | Fig.3.15/eixoyy  | k <sub>1</sub> ou k <sub>2</sub>                                   | k <sub>1</sub> (obs)/min <sup>-1</sup> ou k <sub>2</sub> (obs)/min <sup>-1</sup>                           |
| Cap.3 | 74    | 4                | ou há ou uma   | ou há uma  |
| Cap.3 | 74    | 5                | tamponizads  | tamponizadas   |
| Cap.3 | 75    | Fig.3.17/eixo yy | k <sub>1</sub> (obs) (x 10 <sup>-3</sup> ) ou k <sub>2</sub> (obs) | k <sub>1</sub> obs.10 <sup>3</sup> /s <sup>-1</sup> ou k <sub>2</sub> obs.10 <sup>4</sup> /s <sup>-1</sup> |
| Cap.3 | 78    | 25               | ...147,148]  | ...147,159]  |
| Cap.3 | 80    | 21/24            | cis(N,O)trans(S)   | cis(N,O)trans(S)   |
| Cap.3 | 81    | Nota rodapé 3.10 | pode resultar  | pode não resultar  |
| Cap.3 | 82    | 19               | (ADN-protein croos links)  | (DNA-protein croos links)  |
| Cap.3 | 84    | 19               | Figura 3.22  | Figura 3.23  |
| Cap.3 | 86    | Tab.3.10(20)     | DC: (1.9) 500  | DC: (-1.9) 500   |
| Cap.3 | 86    | Tab.3.10/leg.    | mol <sup>-1</sup> dm <sup>3</sup>                                  | mol <sup>-1</sup> dm <sup>3</sup> cm <sup>-1</sup>   |
| Cap.3 | 87    | 4                | Fig. 3.19-a  | Fig. 3.19-1  |
| Cap.3 | 87    | 9                | Fig. 3.19-b  | Fig. 3.19-6  |
| Cap.3 | 89    | 13               | constado   | constatado   |
| Cap.3 | 90    | 21               | Fig.3.9  | Fig.3.19   |
| Cap.3 | 94    | Tab. 3.11/título | k <sub>obs</sub> /s  | k <sub>obs</sub> /s <sup>-1</sup>  |
| Cap.3 | 94    | Tab. 3.12/leg.   | mol <sup>-1</sup> dm <sup>3</sup>                                  | mol <sup>-1</sup> dm <sup>3</sup> cm <sup>-1</sup>   |

|              |     |                   |  |  |
|--------------|-----|-------------------|--|--|
| Cap.5        | 154 | Esquema 5.1       | $\alpha = \text{trans}(+) = \Delta$<br>$\alpha' = \text{trans}(+) = \Lambda$<br>$\beta = \text{cis}(+) = \Delta$<br>$\beta' = \text{cis}(-) = \Lambda$ | $\alpha = \text{trans}(+) = \Lambda$<br>$\alpha' = \text{trans}(-) = \Delta$<br>$\beta = \text{cis}(+) = \Lambda$<br>$\beta' = \text{cis}(-) = \Delta$ |
| Cap.5        | 155 | 11                | DC   | UV/Vis   |
| Cap.5        | 166 | 1                 | $\lambda\text{-}\beta(+)\text{-}$  | $\Lambda\text{-}\beta(+)\text{-}$  |
| Cap.5        | 166 | 4                 | $\lambda\text{-}\text{tris}(\text{oxalato})\text{....}$  | $\Lambda\text{-}\text{tris}(\text{oxalato})\text{....}$  |
| Cap.5        | 166 | 4                 | $\lambda\text{-}\text{tris}(\text{etilenodiamina})\text{....}$   | $\Lambda\text{-}\text{tris}(\text{etilenodiamina})\text{....}$   |
| Cap.5        | 166 | 7-12              | cortar   | O comportamento....complexo  |
| Cap.5        | 169 | 10                | (Figura 5.9-a e b)   | (Fig. 5.1-(B) e Fig.5.9-b e c)   |
| Cap.5        | 169 | 12                | (Figura 5.9-a e b)   | (Fig.5.9-a, b e c)   |
| Cap.5        | 171 | 12                | obtêm  | obtêm  |
| Cap.5        | 172 | 3                 | $[\text{Cr}_2(\text{L-valO}^-)_2(\text{L-valO}^-)_5]^+$  | $[\text{Cr}_2(\text{L-valO}^-)_5(\text{L-valO}^-)_2]^+$  |
| Cap.5        | 172 | 5                 | $[\text{Cr}_2(\text{L-valOH})]^+$  | $[\text{Cr}_2(\text{L-valOH})_3]^+$  |
| Cap.5        | 174 | 3                 | $[\text{Cr}(\text{L-H})_3]^+$  | $[\text{Cr}(\text{L-ligO}^-)_3 + \text{H}^+]^+$  |
| Cap.5        | 174 | 4                 | $[\text{Cr}_2(\text{L-H})_5]^+ (\text{L-H}=\dots)$   | $[\text{Cr}_2(\text{L-H})_5]^+ (\text{L-ligO}^-=\dots)$  |
| Cap.5        | 174 | 9                 | Figura 5.9-a, b e c)   | Figura 5.9-b e c)  |
| Cap.5        | 175 | 6                 | difracção de cristal   | difracção de raios X de cristal  |
| Cap.5        | 174 | 26                | Figura 5.9-a   | Figura 5.9-b e c)  |
| Cap.6        | 191 | 12                | transferina  | transferrina   |
| Cap.7        | 211 | 16                | $25^\circ \pm 0.5^\circ$   | $25 \pm 0.5^\circ$   |
| Cap.7        | 213 | Fig.7.A.1/leg.    | "sopped-flow"  | "stopped-flow"   |
| Cap.7        | 214 | 28                | comprimento de onda  | número de onda   |
| Cap.7        | 224 | 21                | a absorvidade molar  | o diferencial de absorvidade   |
| Cap.7        | 229 | Tab. 7.D.1/título | T. inc.  | T. inc./min  |
| Bibliografia | 238 | [87]              | Srnivasan,V e....1974, <b>96</b> ,127  | Hasan,F....1975, <b>97</b> (6),1444  |
|              | 238 | [89]              | .....1975, <b>97</b> (6),1444  | ....1977, <b>99</b> (1),137  |
|              | 238 | [90]              | Gordon....   | Srnivasan,K,Roach,J., <i>ACS</i> ,1978, <b>100</b> (9),2789  |
| ...          | 239 |                   | [88],[89],[90],[91],[92],[93],[94]   | [96],[95],[91],[92],[93],[94],[96]   |
|              | 239 |                   | [95]   | [89]   |
|              | 239 |                   | [96]   | [88]   |
|              | 241 | [143]             | ...1986, pg. 242, Tab. 5   | ...1986.   |

## Resumo

O crómio, em especial no seu estado de oxidação mais elevado, +6, é conhecido como um agente mutagénico e carcinogénico. Pretendeu-se com este trabalho estudar alguns aspectos da química do crómio que permitissem esclarecer e contribuir para a compreensão dos mecanismos de toxicidade deste elemento.

Assim, nos Capítulos 1 e 2 desta dissertação é feita uma revisão bibliográfica dos aspectos da química do crómio e de alguns dos seus redutores, ou potenciais ligandos, com importância para o estudo dos seus efeitos biológicos.

O trabalho experimental desenvolvido ao longo desta tese visou, essencialmente, a compreensão dos aspectos atrás referidos. Assim, o Capítulo 3 descreve a cinética dos processos de redução do Cr(VI) por redutores que contêm o grupo tiol. Por diversos métodos espectroscópicos, foram estudadas as reacções de redução de Cr(VI) pela glutathiona, pela cisteína e pela penicilamina, este último aminoácido utilizado na perspectiva de um composto modelo. Aplicaram-se, a estas reacções de redução, novos métodos de tratamento de dados, nomeadamente no estudo da reacção de redução pela glutathiona, considerado como um processo bifásico, e métodos de cinética rápida, no caso das reduções com a cisteína e a penicilamina. Foi possível, a partir destes estudos, identificar e caracterizar os intermediários do tipo tioéster formados nestas reacções, assim como estudar a sua cinética de formação e de decomposição. Os resultados obtidos sustentam novos argumentos para a atribuição ou a confirmação dos respectivos mecanismos de redução. Na tentativa de identificar aspectos estruturais do intermediário formado na reacção de redução com a glutathiona, foi também usada espectroscopia de Raman. Os resultados obtidos permitiram alargar à zona de pH fisiológico algumas hipóteses anteriormente postas apenas para condições de pH mais acídicas. Ainda neste Capítulo é, também, referida a identificação de alguns dos produtos finais das referidas reacções de redução e estudada a cinética da sua formação.

O Capítulo 4 descreve as condições de síntese e a caracterização de complexos de Cr(III) com cisteína, penicilamina e ácido tiomálico, alguns dos quais preparados pela primeira vez. Discutem-se, ainda, resultados de estudos da cinética de hidrólise dos dois primeiros, a qual permitiu determinar as respectivas constantes de hidrólise. Surpreendentemente, os valores destas últimas são anormalmente elevados para complexos de Cr(III), mesmo considerando o carácter lábil de complexos com ligações Cr-S. O comportamento destes compostos em solução foi também estudado do ponto de vista termodinâmico, em soluções não aquosas (DMF).

Tendo sido constatados alguns problemas na atribuição de configurações absolutas a complexos de Cr(III), mesmo com os  $\alpha$ -aminoácidos mais simples, este assunto foi revisto e sistematizado no Capítulo 5. Prepararam-se alguns daqueles complexos, tendo sido sintetizado um complexo novo de Cr(III) com L-valina, cuja estrutura cristalina foi estabelecida por Raios-X de cristal único. A fim de procurar resolver ambiguidades na interpretação de resultados espectroscópicos sobre aqueles complexos, nomeadamente em dicroísmo circular, aplicou-se, pela primeira vez, a espectrometria de massa com ionização por bombardeamento com átomos rápidos, o que permitiu identificar cinco novas estruturas para este tipo de complexos.

No Capítulo 6 apresentam-se resultados de estudos de interacção de compostos de Cr(III) com núcleos celulares extraídos do timo de vitelo. Os resultados obtidos, devido ao comportamento invulgar em termos de toma experimentado pelos complexos possuidores de ligações Cr-S, abrem novas perspectivas em relação à interpretação do comportamento biológico deste tipo de complexos. Em particular, procuraram formular-se algumas considerações sobre o envolvimento de compostos com crómio neste estado de oxidação, nos mecanismos da toxicidade deste elemento.

Finalmente, no Capítulo 7 são descritos em detalhe os métodos e as técnicas experimentais que levaram à obtenção dos resultados discutidos nos restantes capítulos.

# Abstract

Chromium, in its higher oxidation state +6, is known as a strong mutagenic and carcinogenic agent. The aim of this thesis is to contribute to a better understanding of the mechanisms of toxicity of this element, exploring some aspects of the bioinorganic chemistry of chromium.

Chapters 1 and 2 are a review of some aspects of the chemistry of chromium and of some of its biological reductants, which may also act as potential ligands after chromium reduction.

In Chapter, 3 the kinetics of Cr(VI) reduction processes by thiol containing reductants is described. In particular, reduction reactions of Cr(VI) by glutathione, cysteine or penicillamine were studied using several spectroscopic techniques. New data treatment methods were applied to the reduction reaction by glutathione (considering it as having a biphasic behaviour). Fast kinetic methods were utilised in the Cr(VI) reduction reactions by cysteine and penicillamine. All these studies allowed the identification and characterisation of thioester intermediates formed during reduction, as well as their formation and decomposition kinetics. Results support new arguments in favour of the attribution of a certain type of mechanism to those reactions. Raman spectroscopy was applied to study structural aspects of the thioester intermediates, under physiological conditions. This Chapter deals also with the identification and kinetics of formation of final Cr(III) products obtained from Cr(VI) reduction reactions with cysteine, penicillamine and glutathione.

Chapter 4 describes the syntheses and the characterisation of Cr(III) complexes with cysteine, penicillamine and thiomalic acid. Hydrolysis kinetic results for the two first complexes are discussed. Surprisingly, the hydrolysis rate constants are abnormally high, even if considering the unusual labile behaviour of Cr(III) complexes containing Cr-S bonds. Their behaviour in an non-aqueous solution (DMF) was also studied.

Because of found contradictions in the attribution of absolute configurations to Cr(III) complexes with the simplest aminoacids this subject was reviewed in Chapter 5. Some of this type complexes were prepared and a new compound with L-valine was synthesised and its crystal structure determined by single-crystal X-Ray diffraction methods. Mass spectrometry with ionisation by fast atom bombardment was applied for the first time to these Cr(III) complexes with  $\alpha$ -aminocarboxylic acids, in order to solve ambiguities in the interpretation of spectroscopic results (DC). Successful results allowed the identification of five new structures, mainly dimeric-type.

In Chapter 6, results from the interaction of Cr(III) compounds with calf thymus isolated nucleic are presented. Because of the unusual uptake of the compounds containing Cr-S bonds, the results obtained open new perspectives into the interpretation of the mechanisms and of the biological role of chromium compounds in +3 oxidation state.

In Chapter 7, at last, experimental methods and conditions concerning the results presented in the previous chapters are described in detail.

## Lista de Tabelas

**Tabela 1.1** - Distribuição do crómio na Natureza; adaptado de [14] e [15]\*

**Tabela 1.2** - Compostos de crómio com este elemento nos vários números de oxidação conhecidos

**Tabela 2.1** - Espécies de Cr(VI) em solução aquosa:  ${}^*{}^-\text{HCr}_2\text{O}_7^-$ ,  $\text{Cr}_3\text{O}_{10}^{2-}$  e  $\text{Cr}_4\text{O}_{13}^{2-}$  existem em quantidades desprezáveis a  $\text{pH}>1$  [52]

**Tabela 2.2** - Constantes de equilíbrio de formação de ésteres de cromato em meio ácido; espécie oxidante:  $\text{HCrO}_4^-$  [92]

**Tabela 2.3** - Alguns exemplos de proteínas contendo iões metálicos coordenados por resíduos de cisteína (adaptado de [108], pg. 770)

**Tabela 2.4** - Potenciais de redução dos principais redutores biológicos (e análogos), encontrados no interior das células ( $\text{pH}\approx 7$ ;  $25^\circ\text{C}$ ); \* Difícil de determinar, pois formam-se complexos tiol-metal na superfície dos eléctrodos

**Tabela 2.5** - Constantes de acidez dos aminoácidos cisteína e penicilamina [108]

**Tabela 2.6** - Constantes de formação de complexos tridentados com L-cisteína e L-penicilamina; (1) constantes determinadas por métodos espectrofotométricos ou potenciométricos (entre parêntesis); (2) [128];  $\log K_3$  não é considerado na ref<sup>a</sup> [108]; (3) Ref<sup>a</sup> [108], pg. 743

**Tabela 3.1** - Constantes de velocidade de pseudo-primeira ( $k_{\text{obs}} \times 10^3$ ) para a reacção de redução de Cr(VI) por GSH; a)-Este trabalho: cálculo a partir da representação gráfica de  $\ln(A_{\text{obs}}-A_{\infty})$  em função do tempo, em água,  $\text{pH}=7$ ; b)-Este trabalho: cálculo pelo método das velocidades iniciais (idem); c)-Reacção repetida nas mesmas condições experimentais de d), em água,  $\text{pH}=7$ ; d)-Ref<sup>a</sup> [100],  $\text{pH}=7$ , e)-Ref<sup>a</sup> [100], em HEPES,  $\text{pH}=7$ ; f)- Ref<sup>a</sup> [100], em água (d), e) e f) pelo método de integração; g)-Ref [100], em água (método das velocidades iniciais)

**Tabela 3.2** - Parâmetros cinéticos calculados para a reacção de redução de Cr(VI) com GSH (desvios padrão entre parêntesis); E.t.= este trabalho

**Tabela 3.3** - % de Cr(VI) reduzido pela GSH, após 2.5 minutos de reacção ( $\text{pH}=7.0$ ); adap. de [113], Fig.4

**Tabela 3.4** - Constantes de velocidade (observadas), determinadas por ajuste da equação (3.7) aplicada à variação de absorvância com o tempo, durante a redução de Cr(VI) pela GSH (372 nm);  $[\text{Cr(VI)}] = 2.5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  ${}^*[\text{Cr(VI)}] = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $k_{2(\text{obs})}$  calculadas a partir da 2ª parte destas reacções de redução:  $\ln(A_{\text{obs}}-A_{\infty})$  linear

**Tabela 3.5** - Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem,  $k_{obs}$ , para as reacções de redução de Cr(VI) com cisteína ou com penicilamina, obtidas por "stopped-flow"; soluções tamponizadas com Tris.HCl ou HEPES  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}=7.0$ ;  $[\text{Cr(VI)}]=2.5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$

**Tabela 3.6** - Parâmetros cinéticos de 2ª ordem, para reacções de redução de Cr(VI) por cisteína e por penicilamina; a) - determinados por um ajuste não linear, admitindo a lei de velocidade:

$$k_{obs} = \frac{ab [\text{Tiol}]^2}{1 + b [\text{Tiol}]}$$

b) - determinada por ajuste linear de  $k_{obs} = a [\text{Tiol}]$  (ver explicações à frente, no texto)

**Tabela 3.7** - Modos vibracionais fundamentais, activos em Raman, na molécula de  $\text{CrO}_4^{2-}$  (só os dois últimos modos são activos em infravermelho)

**Tabela 3.8** - Constantes de velocidade de formação ( $k_1$ ) e de decomposição ( $k_2$ ) de tioésteres, para a redução de Cr(VI) pela cisteína ("stopped-flow");  $R^*$ =coeficiente de correlação do ajuste efectuado

**Tabela 3.9** - Constantes de velocidade (observadas) de formação ( $k_1$ ) e de decomposição ( $k_2$ ) de tioésteres, para reacções de redução de Cr(VI) por glutatona (dados obtidos por espectrofotometria de UV/Vis;  $\lambda = 433 \text{ nm}$ ;  $[\text{Cr(VI)}] = 2.5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ; \*  $[\text{Cr(VI)}] = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  (desvios padrão entre parêntesis)

**Tabela 3.10** - Características espectroscópicas dos produtos resultantes da redução de Cr(VI) com glutatona, ou da síntese de compostos de Cr(III) com GSH ou com GSSG: a)-Compostos obtidos em solução aquosa:  $[\text{Cr(VI)}]=1\text{mM}$ ;  $[\text{GSH}]=5-100 \text{ mM}$ ;  $\text{pH}$  neutro; b)- Espectros de reflectância (Vis) obtidos em Nujol; c)-Espectros (DC) obtidos no estado sólido (pastilhas de KBr); d)-Sólidos usados como "modelo" (Ver texto); e)-Sólidos referidos como d), liofilizados após terem sido mantidos em água durante 1 hora; f)-Solução aquosa; g)-Reflectância (valores entre parêntesis:  $\epsilon$  ou  $\Delta\epsilon / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3$ )

**Tabela 3.11** - Constantes de velocidade,  $k_{obs}$ , de formação de  $[\text{Cr(L-cys)}_2]^-$  e de  $[\text{Cr(L-pen)}_2]^-$ , resultantes da redução de Cr(VI) por L-cisteína ou L-penicilamina em condições de pseudo-1ª ordem;  $[\text{Cr(VI)}]=5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $[\text{L-Penicilamina}] = [\text{L-Cisteína}] = 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  (1 Cr(VI) : 20 L-Aminoácido)

**Tabela 3.12** - Concentrações molares ( $\times 10^4$ ) em  $[\text{Cr(L-cys)}_2]^-$  e em  $[\text{Cr(L-pen)}_2]^-$  e percentagens em relação à concentração inicial de Cr(VI) (entre parêntesis), atingidas ao fim de 16 minutos de reacção;  $[\text{Cr(VI)}] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $[\text{L-Aminoácido}] = 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ; reacções estudadas por Dicroísmo Circular:  $\Delta\epsilon$  ( $[\text{Cr(L-cys)}_2]^-$ )=  $+1.56 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$  e  $\Delta\epsilon$  ( $[\text{Cr(L-pen)}_2]^-$ ) =  $+1.48 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$

- Tabela 4.1** - Análise elementar (C, H e N ou S) e termogravimétrica (% H<sub>2</sub>O) dos complexos de Cr(III) com penicilamina e com ácido tiomálico: (a)-Resultados calculados para KCrC<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>H<sub>18</sub>.2H<sub>2</sub>O; (b)-Resultados calculados para Na<sub>3</sub>CrC<sub>8</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub>H<sub>6</sub>.7H<sub>2</sub>O; (c)-pen=D ou L-penicilaminato<sup>2-</sup>; tma=tiomalato<sup>3-</sup> (Calc=% calculada; Enc.=% encontrada)
- Tabela 4.2** - Comparação de dados de espectroscopia electrónica para vários complexos de Cr(III), em solução aquosa; E.t. = este trabalho; \* = ombro; \*\* = isómero *trans*-imidazola; H<sub>2</sub>L= GSH<sup>3-</sup>
- Tabela 4.3** - Configuração electrónica d<sup>3</sup>: transições electrónicas e transições proibidas (-) ou permitidas por dipólo magnético para diferentes simetrias; transições permitidas com polarização ao longo dos eixos dos xx e yy (||) e com polarização ao longo do eixo dos zz (⊥) [143,171]
- Tabela 4.4** - Comparação dos dados espectrais (electrónicos e de dicroísmo circular) dos iões complexos [Cr(L-cys)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> e [Cr(L-pen)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, em solução aquosa e em DMF; λ(nm); ε(mol dm<sup>3</sup>cm<sup>-1</sup>); Δε(mol dm<sup>3</sup>cm<sup>-1</sup>); \* ombro
- Tabela 4.5** - Constantes de velocidade de pseudo 1ª ordem, k<sub>obs</sub>, para as reacções de hidrólise ácida dos aniões complexos [Cr(L-cys)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (5.0x10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup>) e [Cr(D-pen)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (7.55x10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup>), com HClO<sub>4</sub>, em NaClO<sub>4</sub> (0.1 mol dm<sup>-3</sup>); T=24°C; os resultados apresentados são uma média de 3-5 experiências. \*CONINFIN: programa de ajuste de resultados cinéticos; valores de a(H<sup>+</sup>) calculados segundo [183] (Ver Capítulo 7 - SecçãoB)
- Tabela 4.6** - Constantes de velocidade de reacções de substituição (por moléculas de água), para alguns compostos de coordenação de Cr(III), possuidores de ligações Cr-S; E.t.= este trabalho
- Tabela 5.1** - Análise elementar dos complexos [Cr(L-ala)<sub>3</sub>] sintetizados segundo diversos métodos (detalhes no Capítulo 7 - Secção C); (a)- % calculadas para [Cr(L-ala)<sub>3</sub>]; (b)- % calculadas para [Cr<sub>2</sub>(L-ala)<sub>4</sub>(OH)<sub>2</sub>], apenas como exercício de comparação
- Tabela 5.2** - Propriedades espectroscópicas (DC) do complexo [Cr(L-ala)<sub>3</sub>]; adaptada de [190]: a)-Sinal e intensidade das bandas entre parêntesis; b)-Isómero insolúvel segundo Minor *et al* [175]; c)-Sinal e intensidade (Δε<sub>M</sub>) segundo Minor *et al*, Fig. 4 [175]; d)-Δε<sub>Cr</sub> calculado por mole de átomos de Cr; e)-Espectro obtido imediatamente após a dissolução do composto; f)-Espectro obtido 30 minutos depois do espectro e), anterior; g)-Isómero solúvel segundo Minor *et al* [175]; h)-Espectro obtido tão rapidamente quanto possível; i)-Intensidades relativas das bandas; j)-Espectro obtido em pastilha de KBr; k)-Sólido preparado segundo Gillard *et al* [157]; l)-Sólido referente ao isómero insolúvel de acordo com Minor *et al* [175]; m)-Sólido preparado segundo Oki *et al* [184], pelo método do "estado sólido"; n)-Sólido preparado segundo Oki *et al* [184], pelo método "em solução" [189]

**Tabela 5.3** - Transições permitidas por spin, para complexos do tipo  $d^6$ , ou analogamente para complexos do tipo  $d^3$ ; \*cada uma das transições do estado fundamental para estados triplamente degenerados, em  $O_h$ , dá origem a...em  $C_3$  e a...em  $C_1$

**Tabela 5.4** - Sinais dos efeitos Cotton (bandas em DC) para cada transição permitida em complexos de Co(III) do tipo trisquelato

**Tabela 5.5** - Compostos obtidos na síntese de complexos de Cr(III) com L-valina

**Tabela 5.6** -  $[Cr(L-valO-)_2(L-valOH)_2]NO_3 \cdot 6H_2O$ : alguns comprimentos e ângulos de ligação, (esfera de coordenação do crómio) [208]

**Tabela 5.7** - Características espectroscópicas do complexo  $[Cr(L-valO-)_2(L-valOH)_2] \cdot NO_3 \cdot 6H_2O$

**Tabela 5.8** - Esquemas de fragmentação (a partir de espectros de FAB) dos compostos de coordenação de Cr(III) com L-valina (1), L-isoleucina (2 e 4), L-leucina (3) e L-alanina

**Tabela 5.9** - Métodos de caracterização de diferentes estruturas para compostos de Cr(III) com  $\alpha$ -aminoácidos

**Esquema 5.1** - Designações comuns, equivalentes, para os quatro isómeros ópticos dos complexos, do tipo trisquelato,  $[M(aa)_3]$ ; M = Co(III) ou Cr(III); aa =  $\alpha$ -aminoácido bidentado; os símbolos (+) e (-) referem-se ao sinal da banda dominante, na região visível, em DC [173,185]; as cores dos diferentes isómeros são semelhantes para os complexos dos dois metais

**Tabela 6.1** - Mutagénese e outros efeitos genotóxicos provocados por compostos de (a): Cr(III); (b): de Cr(VI) [adaptado de [6], figuras 1 e 4]

**Tabela 6.2** - Alguns exemplos relevantes de interações de compostos de Cr(III) com células ou componentes celulares; \* desvios químicos de  $^{31}P$ -RMN

**Tabela 7.A.1** - Equipamento e métodos de obtenção de espectros de...

**Tabela 7.D.1** - Toma de complexos de Cr(III) por núcleos isolados de timo de vitelo, considerando os desvios padrão do conjunto de ensaios efectuados

**Tabela 7.D.2** - Programa de temperaturas (um único passo), destinado a um tubo de grafite novo

**Tabela 7.D.3** - Programa de Temperaturas (\*fornecido pela Perkin-Elmer ao grupo de Bioquímica da Universidade de Bremen)

## Lista de Figuras

- Figura 1.1** - Potenciais de redução das diferentes espécies de crómio em solução aquosa [5]
- Figura 1.2** - Distribuição de equilíbrio do crómio, em função do pH, pelas diferentes espécies formadas em solução aquosa:  $[Cr]_{Tot} = 0.001 \text{ mol dm}^{-3}$  [32]
- Figura 1.3** - Distribuição, na Tabela Periódica, dos elementos essenciais à vida: (—) elementos biológicos "bulk", ou estruturais ; (===) elementos essenciais que se crê serem essenciais a plantas e a animais; (\*\*\* ) elementos vestigiais possivelmente essenciais (adaptação de [15], Fig.1.1)
- Figura 1.4** - Estados de oxidação do potássio ao zinco, biologicamente disponíveis ou não, compilados entre iões monoatômicos e oxoiões em solução aquosa, óxidos estequiométricos, halogenetos e outros sais simples (adaptado de [15]); (○): estados de oxidação comuns / (☆) mas não disponíveis em biologia; (●): estados menos comuns / (★) mas não disponíveis em biologia
- Figura 1.5** - Modelo de "entrada-redução" (uptake-reduction) [24]
- Figura 2.1** - a)-Esquema de ionização da GSH em solução (constantes microscópicas); b) - Especificação das várias formas protonadas da GSH, em função do pH ( $f$ =fracção molar) [109]
- Figura 2.2** - Potenciais locais de coordenação na GSH
- Figura 2.3** - Estrutura cristalina do ácido ascórbico [117]
- Figura 3.1** - Diminuição da absorvância com o tempo, correspondente à reacção de redução de Cr(VI) por glutathiona;  $[Cr(VI)]=1\text{mM}$ ;  $[GSH]=10, 20, 30, 40, 60$  e  $80 \text{ mM}$ ;  $\text{pH}=7.0$ ; temperatura ambiente;  $\lambda = 372 \text{ nm}$
- Figura 3.2** - Variação de  $\ln(A_{\text{obs}}-A_{\infty})$  com o tempo, em condições de pseudo-primeira ordem, para diferentes concentrações de GSH (reacções seguidas a  $372 \text{ nm}$ )
- Figura 3.3** - Ajuste da equação (3.7) à variação de absorvância com o tempo:  $[Cr(VI)] = 0.25 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $[GSH] = 1.00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  (1 Cr(VI) : 40 GSH);  $\text{pH} = 7.0$ , HEPES  $0.2 \text{ mol dm}^{-3}$
- Figura 3.4** - Determinação das constantes de 2ª ordem (estimativas) relativas aos dois primeiros passos das reacções de Cr(VI) por GSH: ( $a_1$ )- $k'_1$  ( $\approx 0.426 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ ); ( $a_2$ )-representação gráfica de  $k_{\text{obs}}$  em função de  $[GSH]$ : (●) ref<sup>a</sup> [100], em HEPES; (○)  $k_{1(\text{obs})}$ , segundo ajuste à equação (3.7), a partir dos resultados da Tabela 3.4; (Δ) segundo ajuste à equação (3.7), a partir dos resultados da Tabela 3.4, para as soluções não tamponizadas\*, com  $[GSH]=40$  e  $80 \text{ mM}$ ; ( $b_1$ )- $k'_2$  ( $\approx 4.02 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ ); ( $b_2$ )-representação gráfica de  $k_{\text{obs}}$  em

função de [GSH]: (o)  $k_{2(\text{obs})}$ , segundo ajuste à equação (3.7), a partir dos resultados da Tabela 3.4, soluções tamponizadas; ( $\Delta$ ) segundo ajuste à equação (3.7), a partir dos resultados da Tabela 3.4, para as soluções não tamponizadas\*, com [GSH]=20, 30 e 40 mM; ( $\bullet$ )  $k_2$  calculados a partir da 2ª parte das reacções de redução, soluções não tamponizadas\*,  $\ln(A_{\text{obs}}-A_{\infty})$  linear

**Figura 3.5** - Variação da absorvância com o tempo de reacção, a 372 nm, para reacções de redução de Cr(VI) com glutatona: [Cr(VI)] = 1 mM e [GSH] = 10 mM; ( $\diamond$ )-soluções com pH ajustado previamente a 7.0; ( $\bullet$ )-soluções tamponizadas com HEPES 0.2 mol dm<sup>-3</sup>

**Figura 3.6** - Determinação gráfica de  $k_{\text{obs}}$ , a partir da variação de absorvância com o tempo, obtida por "stopped-flow": reacção de redução de Cr(VI) com L-cisteína (1:500); [Cr(VI)] =  $2.5 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>; [L-cisteína]=0.125 mol dm<sup>-3</sup>

**Figura 3.7** - Espectro de Raman da glutatona, no estado sólido, na região 200-3800 cm<sup>-1</sup> (fenda 640  $\mu$ m; passos de 1s)

**Figura 3.8** - Diminuição, com o tempo, da banda de Raman correspondente ao grupo sulfidrílo da GSH; (2584 cm<sup>-1</sup>;  $\lambda_{\text{excitação}}$ =514,5 nm; passos de 1 segundo; 2 Cr(VI) : 1 GSH)

**Figura 3.9** - Variação da intensidade da banda Raman do cromato, a 850 cm<sup>-1</sup>, com o tempo de reacção (1 Cr(VI) / 2 GSH: diminuição da intensidade; 1 Cr(VI) : 0.5 GSH: aumento de intensidade); gráficos reconstruídos a partir dos espectros originais

**Figura 3.10** - Formação e decomposição dos tioésteres, em reacções de redução de Cr(VI) com L-cisteína; soluções tamponizadas com Tris.HCl 0.05 mol dm<sup>-3</sup>; pH 6.5-7.0; temperatura ambiente;  $\lambda = 460$  nm

**Figura 3.11**- Ajuste, da variação de absorvância ao longo do tempo de reacção, a uma função não-linear (equação 3.7, ver texto), que traduz a formação e a decomposição de tioésteres em reacções de redução de Cr(VI) com L-cisteína (resultados de "stopped-flow"); [Cr(VI)] =  $2.5 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>: (a) [L-cis] = 0.5 mol dm<sup>-3</sup> (Tris.HCl 0.05 mol dm<sup>-3</sup>); (b) [L-cis]=0.125 mol dm<sup>-3</sup> (HEPES 0,05 mol dm<sup>-3</sup>)

**Figura 3.12** - Relação entre as constantes de velocidade (observadas) relativas à redução de Cr(VI) por L-cisteína (372 nm) e à formação e decomposição de tioésteres para a mesma reacção; dados referentes às Tabelas 3.5 e 3.8

**Figura 3.13** - Formação e decomposição de tioésteres em função do tempo de reacção;  $\lambda=433$  nm; [GSH] = (10, 20, 30, 40, 80)  $\times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>; [Cr(VI)] =  $1 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>; pH das soluções previamente ajustado a 7.0, com solução de KOH

**Figura 3.14** - Formação de tioésteres para 1Cr(VI) : 5, 1 e 0.5 GSH; [Cr(VI)] =  $1 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>

**Figura 3.15** - Dependência entre  $k_{(obs)}$  e  $k_{(2obs)}$  de formação e de decomposição de tioésteres e a concentração de GSH, em reacções de redução de Cr(VI) por GSH (foram excluídos dos gráficos os resultados correspondentes a  $[GSH] = 80 \text{ mM}$ );  $\lambda = 433 \text{ nm}$ ; as constantes de 2ª ordem obtidas (devem considerar-se como estimativas) são:  $k_1 = 0.143 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$  e  $k_2 = 6.15 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$

**Figura 3.16** - Sobreposição da variação de absorvância correspondente à redução de Cr(VI) (372 nm) e à formação do tioéster (433 nm)

**Figura 3.17** - (a) -  $k_{1(obs)}$  e (b) -  $k_{2(obs)}$  em função de  $[GSH]$ ; dados das Tabelas 3.4 (372 nm) e 3.9 (433 nm)

**Figura 3.18** - Espectros de DC, dos aniões complexos  $[Cr(L-cys)_2]^-$  e  $[Cr(D-pen)_2]^-$  obtidos da redução de Cr(VI) com L-cisteína ou com D-penicilamina, ao fim de 2.5 horas ; 1 Cr(VI): 20 aminoácido; pH neutro; temperatura ambiente; soluções tampão Tris.HCl  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$

**Figura 3.19** - Espectros de UV/Vis (obtidos em pasta de Nujol) dos compostos **1** e **6** (Tabela 3.10)

**Figura 3.20** - Espectro de DC (obtido em pastilha de KBr) do composto **1**

**Figura 3.21** - Espectros de DC (obtidos em pastilha de KBr) dos compostos: **6** (---) e **11** (—)

**Figura 3.22** - Redução de Cr(VI) pela cisteína: aumento de absorvância com o tempo a  $\lambda = 612 \text{ nm}$ ;  $[Cr(VI)] = 5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  e  $[L-cisteína] = 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  (1 Cr(VI) : 20 L-cisteína); soluções aquosas a  $pH = 7.0$ , ajustado antes do início da reacção com KOH, ou tamponizadas com Tris.HCl ou HEPES  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$ ; especificações de pH, na figura.

**Figura 3.23** - a)-Banda de sinal negativo em DC ( $\lambda_{m\acute{a}x} = 500 \text{ nm}$ ), resultante da redução de Cr(VI) por glutathiona, após 24 horas de reacção (proporções Cr : GSH especificadas na figura); b)-Variação da intensidade das referidas bandas com o tempo de reacção (1 Cr(VI): 80GSH); os tempos de reacção estão especificados na figura

**Figura 3.24** - Relação entre a intensidade da banda, de sinal negativo, a 500 nm (DC) e o tempo de reacção (redução de Cr(VI) pela glutathiona)

**Figura 4.1** - a)-Espectros electrónicos dos iões complexos  $[Cr(L-cys)_2]^-$  (A),  $[Cr(L- \text{ ou } D-pen)_2]^-$  (B) e  $[Cr(\text{tiomalato})_2]^{3-}$  (C), na região visível, obtidos em solução aquosa

**Figura 4.2** - Espectros electrónicos, em solução aquosa, dos iões complexos  $[Cr(L-cys)_2]^-$  (A),  $[Cr(L- \text{ ou } D-pen)_2]^-$  (B) e  $[Cr(\text{tiomalato})_2]^{3-}$  (C), obtidos na zona do ultravioleta

**Figura 4.3** - Espectros de dicroísmo circular, em solução aquosa, dos iões complexos  $[Cr(L-cys)_2]^-$  (—),  $[Cr(L-pen)_2]^-$  (---) e  $[Cr(D-pen)_2]^-$  (-.-)

**Figura 4.4** - Comparação dos espectros de infravermelho ( $3700\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ ) do ácido tiomálico (A), da L(+)-penicilamina (B) e dos complexos  $\text{Na}_3[\text{Cr}(\text{tma})_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (C) e  $\text{K}[\text{Cr}(\text{L-pen})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (D), em KBr (ordenadas = transmitância)

**Figura 4.5** - Especificação de soluções de  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$ , na gama de pH entre 7.0 e 4.5 ( $\alpha$  = fracção molar de cada espécie)

**Figura 4.6** - Espectros electrónicos a) e de dicroísmo circular b), de soluções aquosas de  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$ , a diferentes valores de pH; (a)- (—) pH=7.3, (---) pH=4.7 e (····) pH=3.5; (b) - (—) pH=6.7, (----) pH=5.2 e (····) pH=3.0; concentração das soluções  $1.0 \times 10^{-2}\text{ mol dm}^{-3}$ ; pH ajustado com  $\text{HClO}_4$   $1.0 \times 10^{-2}\text{ mol dm}^{-3}$

**Figura 4.7** - Evidência para a reversibilidade das ligações Cr-S, nas reacções de hidrólise de  $[\text{Cr}(\text{L-pen})_2]^-$  com ácido, estudadas por dicroísmo circular; (—) solução aquosa do complexo, pH=6.0; (---) imediatamente após adição de ácido ( $\text{HClO}_4$ ), pH=3.2; (· · · ·) 6 horas após adição de base (KOH), pH=6.3; (····) 48 horas depois, pH=6.4; a.u. = unidades arbitrárias

**Figura 4.8** - Diminuição da intensidade da banda de transferência de carga S $\rightarrow$ Cr, por adição de ácido (solução aquosa de  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$ , adição de  $\text{HClO}_4$ )

**Figura 4.9** - Titulação de  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$ , com  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , em DMF, seguida por espectrofotometria de DC; a.u. = unidades arbitrárias

**Figura 4.10** - ( $\Delta\epsilon_{\text{O}} - \Delta\epsilon_{\text{obs}}$ ) em função da concentração de ácido adicionada, na titulação de  $[\text{Cr}(\text{L-pen})_2]^-$  com  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , em DMF, seguida por espectrofotometria de DC. A variação da absorvância foi medida no comprimento de onda do máximo da banda mais intensa, no Vis, a 624 nm.

**Figura 4.11** - Mecanismo de abertura e de fecho de anel (ligação Cr-S) para o ião complexo  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$

**Figura 4.12** - (a) - Variação da absorvância (medida indirectamente) em função do tempo, para a mistura reaccional de  $[\text{Cr}(\text{D-pen})_2]^-$  com  $\text{HClO}_4$ , seguida no comprimento de onda do máximo da banda de menor energia ( $\lambda \approx 606\text{ nm}$ ) deste complexo;  $[\text{HClO}_4] = 4 \times 10^{-1}\text{ mol dm}^{-3}$  e  $[\text{Cr}(\text{D-pen})_2]^- = 7.56 \times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$ ; força iónica ajustada com  $\text{NaClO}_4$   $0.1\text{ mol dm}^{-3}$ ; (b) -  $\ln(A_{\text{obs}} - A_{\infty})$  em função do tempo;  $A_{\text{obs}}$  = absorvância medida em cada ponto;  $A_{\infty}$  = absorvância no tempo considerado como o fim da reacção;  $[\text{HClO}_4] = 5.0 \times 10^{-2}\text{ mol dm}^{-3}$  e  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^- = 5.20 \times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$ ; força iónica ajustada a com  $\text{NaClO}_4$   $0.1\text{ mol dm}^{-3}$  (outros detalhes experimentais no Capítulo 7 - SecçãoB)

**Figura 4.13** -  $k_{\text{obs}}$  em função de  $[\text{H}^+]$  (●), para a reacção de  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$  ( $5.0 \times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$ ) e em função de  $a_{\text{H}^+}$  (○), para a reacção de  $[\text{Cr}(\text{D-pen})_2]^-$  ( $7.5 \times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}$ ), com  $\text{HClO}_4$ , (concentrações referidas no texto); soluções em  $\text{NaClO}_4$   $0.1\text{ mol dm}^{-3}$ ; T=24°C; na

representação gráfica correspondente a  $[\text{Cr}(\text{D-pen})_2]^-$ , foram utilizados os valores de  $k_{\text{obs}}$  calculados com o programa CONINFIN\*, tendo sido omitidos, na regressão linear, o ponto correspondente à concentração de ácido mais elevada

**Figura 4.14** - Variação da absorvância com o tempo, no decorrer da reacção de hidrólise ácida, com  $\text{HClO}_4$ , do anião complexo  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$  (reacção seguida por "stopped-flow"); tempo máximo: (a) = 10 segundos; (b) = 1 segundo

**Figura 5.1** -  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$ : (A) - espectro UV/Vis ( $\epsilon_{370 \text{ nm}} \approx 365$  e  $\epsilon_{510 \text{ nm}} \approx 270 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ); (B) DC, em solução aquosa ( $\Delta\epsilon_M(505 \text{ nm}) \approx 3.46 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ) (\*\*); em DMSO (—) e no estado sólido (-.-)

**Figura 5.2** - Evolução, com o tempo, das características espectroscópicas (UV/Vis) de uma solução aquosa de  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$

**Figura 5.3** - Evolução da actividade óptica (DC) de soluções saturadas de  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$ ; (a) temperatura ambiente ( $\approx 24^\circ\text{C}$ ) (intervalos de tempo variados); (b)  $32^\circ\text{C}$  (ciclos de 30 minutos); tempo total  $\approx 220$  minutos; u.a = unidades arbitrárias

**Figura 5.4** - Alterações espectrais em soluções ácidas de  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$ ; (A)- DC; i)-espectro obtido imediatamente após a dissolução (—); ii)-ao fim de 10 min (---); iii)-ao fim de 35 min (\*\*);  $\Delta\epsilon$  em unidades arbitrárias; (B)- UV/Vis; ciclos de 2 minutos

**Figura 5.5** - Estabilidade de uma solução de  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$  em DMSO: espectro imediato (—); ao fim de 30 horas (---); ao fim de 6 dias (\*\*); u.a. = unidades arbitrárias

**Figura 5.6** - Espectros de DC de  $\Lambda$ -cis(+)- $[\text{Co}(\text{L-ala})_3]$ :  $\text{H}_2\text{O}$  (—);  $\text{HClO}_4$  20% (\*\*); e no estado sólido, em pastilha de KBr (-.-); u.a. = unidades arbitrárias

**Figura 5.7** - Esquema da estrutura cristalina do complexo  $[\text{Cr}(\text{L-valO-})_2(\text{L-valOH})_2].\text{NO}_3.6\text{H}_2\text{O}$

**Figura 5.8** - Espectros de DC de  $[\text{Cr}(\text{L-valO-})_2(\text{L-valOH})_2].\text{NO}_3.6\text{H}_2\text{O}$  (ver legendas na figura)

**Figura 5.9** - Espectros de DC em: (a)-solução aquosa; (b)-DMSO; (c)-estado sólido (pastilha de KBr);  $[\text{Cr}(\text{L-valO-})_2(\text{L-valOH})_2].\text{NO}_3.6\text{H}_2\text{O}$  (1);  $\text{Cr}(\text{III})+\text{L-isoleucina}$  (2);  $\text{Cr}(\text{III})+\text{L-leucina}$  (3);  $\text{Cr}(\text{III})+\text{L-isoleucina}$  (4);  $\Delta\epsilon$  em unidades arbitrárias (ver detalhes nas figuras)

**Figura 5.10** - Espectro de CID da espécie dimérica de  $\text{Cr}(\text{III})$  com L-valina

**Figura 6.1** - Toma de : a)-  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$  e b)-  $[\text{Cr}(\text{en})_3]^{3+}$  por núcleos isolados de timo de vitelo (tempos de incubação e concentrações iniciais referidos na figura: as linhas definidas nos gráficos unem pontos correspondentes à mesma concentração de complexo para tempos de

incubação diferentes: (—) com agitação, (---) sem agitação; unidades de toma  $10^{17}$  x mol de Cr/núcleo"

**Figura 6.2** - Quantidade de crómio ligada aos núcleos após incubação com uma série de complexos de Cr(III): unidades de toma  $10^{17}$  x mol de Cr/núcleo"; ver legendas inseridas nas figuras: a)- com e b)-sem agitação durante a incubação

**Figura 6.3** - (a) - Toma dos compostos  $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$  (com agitação) e toma de (b) -  $[\text{Cr}(\text{en})_3]^{3+}$  e  $[\text{Cr}(\text{Hedta})(\text{H}_2\text{O})]$  (sem agitação)

**Figura 6.4** - Comparação entre as toma de  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Cr}(\text{hist})_2]^+$ ,  $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+}$  e  $[\text{Cr}(\text{en})_3]^{3+}$ , por núcleos isolados de timo de vitelo (complexos com várias concentrações iniciais)

**Figura 6.5** - Ligação do ião complexo  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$  a eritrócitos, em função do tempo de incubação; representação gráfica a partir dos dados da Tabela I [55]

**Figura 7.A.1** - Esquema de um equipamento de "sopped-flow" [Ref<sup>a</sup> [282], Fig.26.2, pg780]

# Índice

**Resumo**

**Abstract**

**Lista de Tabelas** I

**Lista de Figuras** V

**Índice** XI

**1** 1

## **1 - Aspectos da Química do Crómio no estudo da sua Toxicologia**

**1.1 - Utilização industrial do crómio: breve referência a problemas de exposição ocupacional e a aspectos ambientais** 1

**1.2 - Química do crómio** 4

**1.3 - Crómio em biologia** 9

1.3.1 - Noções de essencialidade e de toxicidade 9

1.3.2 - Disponibilidade biológica 10

1.3.3 - Funções biológicas do crómio. 11

1.3.4 - Efeitos genotóxicos dos compostos de crómio. 12

1.3.4.1 - Modelo de "entrada-redução" (uptake-reduction) 12

1.3.4.2 - Efeitos intracelulares do crómio 14

**2 - Estudos de reacções de redução de Cr(VI)** 16

**2.1 - Aspectos gerais das reacções de redução de Cr(VI)** 16

2.1.1 - Espécies de Cr(VI) em solução aquosa 16

2.1.2 - Breve referência a reacções de redução de Cr(VI) por substractos inorgânicos: cinética e mecanismos de reacção 19

**2.2 - Reacções de redução de Cr(VI) por tióis** 23

2.2.1 - Importância de moléculas biológicas com grupos tiol como redutores de Cr(VI) 23

2.2.2 - Principais redutores intracelulares 24

2.2.2.1 - Glutathiona 25

2.2.2.2 - Cisteína e penicilamina 26

2.2.2.3 - Ácido ascórbico 27

2.2.3 - Química dos redutores biológicos considerados 28

2.2.3.1 - Química de oxidação-redução 28

2.2.3.2 - Química de ácido-base e química de coordenação 29

i) - Glutathiona 30

|  |           |
|--|-----------|
| ii) - Cisteína e penicilamina  | 32        |
| iii) - Ácido ascórbico   | 34        |
| <b>3 - Cinética de reacções de redução de Cr(VI) por tióis</b>   | <b>35</b> |
| <b>3.1 - Introdução</b>  | <b>35</b> |
| <b>3.2 - Mecanismos de redução de Cr(VI) por tióis</b>   | <b>36</b> |
| <b>3.3 - Estudos cinéticos de redução de Cr(VI)</b>  | <b>39</b> |
| 3.3.1 - Estudos cinéticos por espectrofotometria de UV/Vis (meio neutro)   | 39        |
| 3.3.1.1 - Resultados   | 39        |
| 3.3.1.2 - Discussão de resultados  | 40        |
| 3.3.2 - Redução de Cr(VI) por glutatona: tratamento cinético de um sistema bifásico  | 45        |
| 3.3.2.1 - Resultados   | 46        |
| 3.3.2.2 - Discussão de resultados  | 51        |
| 3.3.3 - Estudos cinéticos por "stopped-flow"   | 53        |
| 3.3.3.1 - Resultados   | 54        |
| 3.3.3.2 - Discussão dos resultados   | 55        |
| <b>3.4 - Intermediários em reacções de redução de Cr(VI) por tio-redutores</b>   | <b>59</b> |
| 3.4.1 - Intermediários de Cr(VI)   | 59        |
| 3.4.2 - Aspectos estruturais de intermediários de Cr(VI)   | 61        |
| 3.4.2.1 - Aplicação da espectroscopia de Raman ao estudo da estrutura de tioésteres  | 61        |
| 3.4.2.2 - Resultados   | 63        |
| 3.4.2.3 - Discussão de resultados  | 64        |
| 3.4.3 - Cinética de formação e de decomposição de tioésteres em reacções de redução de Cr(VI) por alguns tióis                   | 65        |
| 3.4.3.1 - Formação e decomposição de tioésteres em reacções de redução de Cr(VI) com cisteína, por "stopped-flow"                | 66        |
| 3.4.3.1.1 - Resultados   | 66        |
| 3.4.3.1.2 - Discussão de resultados  | 68        |
| 3.4.3.2 - Formação e decomposição de tioésteres em reacções de redução de Cr(VI) com glutatona, por espectrofotometria de UV/Vis | 70        |
| 3.4.3.2.1 - Resultados   | 70        |
| 3.4.3.2.2 - Discussão de resultados  | 72        |
| <b>3.5 - Produtos finais da redução de Cr(VI) por tióis</b>  | <b>76</b> |
| 3.5.1 - Introdução   | 76        |
| 3.5.2 - Identificação de produtos finais   | 78        |
| 3.5.2.1 - Produtos finais da redução de Cr(VI) com cisteína e com penicilamina   | 78        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.5.2.1.1 - Resultados   | 78         |
| 3.5.2.1.2 - Discussão de resultado   | 79         |
| 3.5.2.2 - Produtos finais da redução de Cr(VI) com glutatona   | 82         |
| 3.5.2.2.1 - Resultados   | 84         |
| 3.5.2.2.2 - Discussão de resultados  | 85         |
| 3.5.3 - Cinética de formação de produtos finais de reacções de redução de Cr(VI) por tióis   | 92         |
| 3.5.3.1 - Reacções de redução com cisteína e com penicilamina  | 92         |
| 3.5.3.1.1 - Resultados   | 93         |
| 3.5.3.1.2 - Discussão de resultados  | 95         |
| 3.5.3.2 - Reacções de redução com glutatona  | 97         |
| 3.5.3.2.1 - Resultados e discussão   | 97         |
| <b>3.6 - Resumo e considerações finais</b>   | <b>99</b>  |
| <br>   |            |
| <b>4 - Síntese, caracterização espectroscópica e estudos cinéticos de compostos de coordenação de Cr(III) com ligações Cr-S</b>  | <b>102</b> |
| <br>   |            |
| <b>4.1 - Introdução</b>  | <b>102</b> |
| <b>4.2 - Síntese e caracterização dos compostos de coordenação de Cr(III) <math>M[Cr(L-cys)_2] \cdot 2H_2O</math> (M= Na ou K), <math>K[Cr(pen)_2] \cdot 2H_2O</math> (pen=D- ou L-pen) e <math>Na_3[Cr(tiomalato)_2] \cdot 7H_2O</math></b> | <b>103</b> |
| 4.2.1 - Síntese química  | 103        |
| 4.2.2 - Caracterização dos complexos sintetizados  | 106        |
| 4.2.3 - Estudos espectroscópicos   | 107        |
| <b>4.3 - Reacções de substituição em compostos de coordenação de Cr(III) com ligações Cr-S</b>   | <b>116</b> |
| 4.3.1 - Especificação de soluções aquosas de $[Cr(L-cys)_2]^-$   | 116        |
| 4.3.2 - Reacções de substituição de ligandos envolvendo a quebra e formação da ligação Cr-S, em solução aquosa   | 118        |
| 4.3.3 - Reacções de substituição de ligandos envolvendo a quebra e a formação da ligação Cr-S, num solvente não aquoso (DMF)   | 122        |
| 4.3.4 - Estudos cinéticos de reacções de abertura e fecho de anel envolvendo ligações Cr-S   | 127        |
| 4.3.4.1 - Introdução   | 127        |
| 4.3.4.2 - Breve referência a estudos cinéticos com compostos de coordenação de Cr(III) com ligações Cr-S efectuados em meio moderadamente ácido  | 128        |
| 4.3.4.3 - Estudos cinéticos de abertura de ligações Cr-S em meio ácido.  | 130        |
| <b>4.4 - Resumo e considerações finais</b>   | <b>137</b> |

|   |     |
|---|-----|
| <b>5 - Compostos de coordenação de Cr(III) com aminoácidos do tipo <math>\alpha</math>-aminocarboxílico</b>   | 139 |
| <b>5.1 - Introdução</b>   | 139 |
| <b>5.2 - Métodos de síntese</b>   | 140 |
| <b>5.3 - Síntese e caracterização do complexo [Cr(L-ala)<sub>3</sub>]</b>   | 141 |
| 5.3.1 - Revisão bibliográfica   | 141 |
| 5.3.2 - Preparação e caracterização de [Cr(L-ala) <sub>3</sub> ]  | 141 |
| 5.3.3 - Propriedades espectroscópicas do complexo [Cr(L-ala) <sub>3</sub> ]   | 143 |
| 5.3.4 - Comportamento químico em solução  | 146 |
| 5.3.4.1 - Comportamento em soluções aquosas neutras   | 146 |
| 5.3.4.2 - Comportamento em soluções ácidas.   | 148 |
| 5.3.4.3 - Comportamento num solvente não aquoso (DMSO).   | 149 |
| <b>5.4 - Síntese, separação e caracterização de isómeros ópticos do complexo [Co(L-ala)<sub>3</sub>]</b>  | 150 |
| 5.4.1 - Introdução  | 150 |
| 5.4.2 - Identificação dos isómeros de [Co(L-ala) <sub>3</sub> ].  | 151 |
| <b>5.5 - Atribuição de uma configuração absoluta ao isómero do complexo [Cr(L-ala)<sub>3</sub>] preparado neste trabalho</b>  | 153 |
| 5.5.1 - Isomerismo em complexos octaédricos do tipo trisquelato:<br>breves considerações de simetria  | 154 |
| 5.5.2 - Relação entre as características espectroscópicas e a configuração absoluta dos isómeros de complexos de Cr(III) e de Co(III) do tipo trisquelato, com aminoácidos bidentados | 155 |
| <b>5.6 - Síntese e caracterização de complexos de Cr(III) com L-leucina, L-isoleucina e L-valina</b>  | 160 |
| 5.6.1 - Introdução  | 160 |
| 5.6.2 - Preparação e caracterização dos compostos   | 162 |
| 5.6.2.1 - Síntese e caracterização estrutural de um novo complexo de Cr(III) com L-valina   | 163 |
| 5.6.2.2 - Síntese e caracterização dos restantes complexos.   | 167 |
| 5.6.3 - Características espectroscópicas  | 168 |
| 5.6.4 - Aplicação da Espectrometria de Massa com ionização por bombardeamento com átomos rápidos (FAB) a complexos de Cr(III) com $\alpha$ -aminoácidos                               | 171 |
| 5.6.5 - Espectrometria de Massa e Dicroísmo Circular  | 175 |
| <b>5.7 - Conclusões.</b>  | 176 |
| <b>5.8 - Algumas considerações sobre a estrutura e o comportamento de complexos de Cr(III) com aminoácidos naturais relacionados com a acção biológica do crómio</b>                  | 176 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>6 - Interação de compostos de crómio com materiais biológicos</b>   | 178 |
| <b>6.1 - Introdução Geral</b>  | 178 |
| <b>6.2 - Revisão bibliográfica</b>   | 180 |
| 6.2.1 - Modelo de "entrada-redução" (uptake-reduction)   | 180 |
| 6.2.2 - Carcinogénese e mutagénese provocadas por compostos de crómio  | 182 |
| 6.2.2.1 - Modelo metabólico da genotoxicidade do crómio  | 182 |
| 6.2.2.2 - Algumas considerações sobre a mutagénese de compostos de crómio                                    | 186 |
| 6.2.3 - Interações do crómio a nível intracelular  | 188 |
| 6.2.4 - Efeitos na membrana  | 190 |
| 6.2.5 - Localização e ligação do crómio a componentes celulares  | 191 |
| 6.2.5.1 - Introdução   | 191 |
| 6.2.5.2 - Formação de complexos de Cr(III) com ADN   | 192 |
| 6.2.6 - Considerações finais   | 194 |
| 6.2.7 - Alguns exemplos da acção específica de compostos de Cr(III)<br>sobre células e componentes celulares | 194 |
| <b>6.3 - Interação de complexos de Cr(III) com núcleos isolados de timo de vitelo</b>                        | 198 |
| 6.3.1 - Resultados   | 199 |
| 6.3.2 - Discussão de resultados  | 202 |
| <b>6.4 - Resumo e considerações finais</b>   | 208 |
| <br>   |     |
| <b>7 - Parte experimental</b>  | 210 |
| <br>   |     |
| <b>7.A - Parte experimental correspondente ao Capítulo 3</b>   | 210 |
| <b>7.A.1 - Estudos cinéticos de reacções de redução de Cr(VI) por tióis</b>                                  | 210 |
| 7.A.1.1 - Estudos cinéticos por espectrofotometria de UV/Vis: redução de Cr(VI)<br>pela glutatona            | 210 |
| 7.A.1.1.1 - Reagentes e equipamento  | 210 |
| 7.A.1.1.2 - Método experimental  | 211 |
| 7.A.1.1.3 - Tratamento de dados  | 211 |
| i) - Método das velocidades iniciais   | 211 |
| ii) - Determinação de $k_{obs}$ em condições de pseudo-primeira ordem  | 211 |
| iii) - Outros métodos  | 211 |
| 7.A.1.1.4 - Tratamento cinético de um sistema de duas reacções consecutivas<br>de 1ª ordem                   | 212 |
| 7.A.1.2 - Estudos cinéticos por "stopped-flow"   | 213 |
| 7.A.1.2.1 - Reagentes e equipamento  | 213 |
| 7.A.1.2.2 - Método experimental  | 213 |

|   |     |
|---|-----|
| 7.A.1.2.3 - Método de tratamento de dados   | 214 |
| 7.A.1.3 - Estudos de formação e de decomposição de intermediários tioéster em reacções de redução de Cr(VI) com tióis                       | 214 |
| 7.A.1.3.1 - Estudo por espectroscopia de Raman, de aspectos estruturais do intermediário tioéster, na reacção de redução de Cr(VI) pela GSH | 214 |
| 7.A.1.3.2 - Estudo cinético de formação e decomposição de intermediários tioéster em reacções de redução de Cr(VI) com tióis                | 215 |
| 7.A.1.3.2.1 - Redução de Cr(VI) com GSH (UV/Vis)  | 215 |
| 7.A.1.3.2.2 - Estudos por "stopped-flow"  | 215 |
| <b>7.A.2 - Produtos finais em reacções de redução de Cr(VI)</b>   | 215 |
| 7.A.2.1 - Reagentes, equipamento e método experimental  | 215 |
| 7.A.2.2 - Identificação de produtos finais  | 216 |
| 7.A.2.2.1 - Reacções com cisteína e penicilamina  | 216 |
| 7.A.2.2.2 - Reacções com glutatona  | 216 |
| 7.A.2.3 - Cinética de formação de produtos finais   | 216 |
| 7.A.2.3.1 - Com cisteína e com penicilamina   | 216 |
| 7.A.2.3.2 - Com glutatona   | 217 |
| <b>7.B - Parte experimental correspondente ao Capítulo 4.</b>   | 217 |
| <b>7.B.1- Compostos de coordenação contendo a ligação Cr-S</b>  | 217 |
| 7.B.1.1 - Reagentes e equipamento   | 217 |
| 7.B.1.2 - Método de síntese de compostos de coordenação contendo ligações Cr-S  | 217 |
| 7.B.1.2.1 - Síntese de $M[Cr(cys)_2] \cdot 2H_2O$ (M=Na ou K)   | 217 |
| 7.B.1.2.2 - Síntese de $K[Cr(pen)_2] \cdot 2H_2O$ (pen=D- e L-penicilamina )  | 218 |
| 7.B.1.2.3 - Síntese de $Na_3[Cr(tiomalato)_2] \cdot 7H_2O$  | 218 |
| <b>7.B.2 - Estudos de equilíbrio e estudos cinéticos</b>  | 219 |
| 7.B.2.1 - Condições experimentais típicas   | 219 |
| 7.B.2.2 - Titulação de soluções dos complexos com $CF_3COOH$ , em DMF   | 219 |
| <b>7.B.3 - Estudos cinéticos por "stopped-flow"</b>   | 219 |
| 7.B.3.1 - Método experimental.  | 219 |
| 7.B.3.2 - Tratamento de dados   | 220 |
| 7.B.3.2.1 - Determinação das constantes de velocidade de 1ª ordem   | 220 |
| 7.B.3.2.2 - Determinação das constantes de velocidade de 2ª ordem   | 220 |
| <b>7.C - Parte experimental correspondente ao Capítulo 5</b>  | 221 |
| <b>7.C.1 - <math>[Cr(L-ala)_3]</math>.</b>  | 221 |
| 7.C.1.1 - Síntese de $[Cr(L-ala)_3]$  | 221 |
| 7.C.1.2 - Caracterização elementar  | 221 |
| 7.C.1.3 - Preparação de soluções saturadas de $[Cr(L-ala)_3]$   | 221 |
| 7.C.1.4 - Determinação de $\epsilon$ e de $\Delta\epsilon$ de $[Cr(L-ala)_3]$ , em solução aquosa   | 222 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>7.C.2 - Síntese e separação dos isómeros ópticos do complexo [Co(L-ala)<sub>3</sub>].</b>  | 222 |
| 7.C.2.1 - Introdução  | 222 |
| 7.C.2.2 - Síntese e separação dos isómeros de [Co(L-ala) <sub>3</sub> ]   | 222 |
| a) - Isómeros trans(+), trans(-) e cis(-)   | 222 |
| b) - Isómero cis(+)   | 223 |
| 7.C.2.3 - Determinação da solubilidade, em água, do isómero β-cis(+)-[Co(L-ala) <sub>3</sub> ]  | 223 |
| 7.C.2.4 - Determinação de ε e de Δε de [Co(L-ala) <sub>3</sub> ], em solução aquosa   | 224 |
| <b>7.C.3 - Síntese de complexos de Cr(III) com L-leucina, L-isoleucina e L-valina</b>   | 224 |
| 7.C.3.1 - Cr(III) / L-leucina: método em solução [184]  | 224 |
| 7.C.3.2 - Cr(III) / L-isoleucina  | 225 |
| i) - Segundo o método geral descrito no Capítulo 5, Secção 5.2  | 225 |
| ii) - Segundo [184], método em solução  | 225 |
| 7.C.3.3 - Cr(III) / L-valina: síntese de [Cr(L-valO-) <sub>2</sub> (L-valOH) <sub>2</sub> ]NO <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O   | 225 |
| 7.C.3.4 - Determinação da estrutura cristalina do complexo de Cr(III) com L-valina:<br>[Cr(L-valO-) <sub>2</sub> (L-valOH) <sub>2</sub> ]NO <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 225 |
| 7.C.3.5 - Aplicação da Espectrometria de Massa a estudos estruturais de complexos de<br>Cr(III) com L-alanina, L-leucina, L-isoleucina e L-valina                           | 226 |
| <b>7.D - Parte experimental correspondente ao Capítulo 6</b>  | 226 |
| <b>7.D.1 - Interação de compostos de coordenação de crómio(III) com material biológico<br/>(núcleos do timo de vitelo)</b>  | 226 |
| 7.D.1.1 - Obtenção de núcleos do timo de vitelo   | 226 |
| 7.D.1.1.1 - Preparação da solução "tampão-padrão"   | 226 |
| 7.D.1.1.2 - Extracção dos núcleos de células de timo  | 227 |
| 7.D.1.1.3 - Contagem dos núcleos  | 227 |
| 7.D.1.2 - Incubação dos núcleos isolados com complexos de crómio(III)   | 227 |
| 7.D.1.3 - Mineralização dos núcleos, após incubação   | 228 |
| 7.D.1.4 - Determinação da quantidade de crómio (crómio total) nos núcleos incubados,<br>por Absorção Atómica com Atomização Electrotérmica e plataforma de L'vov            | 228 |
| <b>7.D.2 - Tentativa de estudo da toma de [Cr(cys)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, com variação de pH</b>   | 230 |
| 7.D.2.1 - Método experimental   | 230 |
| 7.D.2.2 - Isolamento dos núcleos  | 231 |
| <b>7.D.3 - Características do equipamento de Absorção Atómica utilizado e condições<br/>    experimentais</b>   | 231 |
| <b>7.D.4 - Algumas considerações acerca da determinação de crómio em amostras biológicas</b>  | 232 |
| <b>Bibliografia</b>   | 234 |

## **1. Aspectos da Química do Crómio no estudo da sua Toxicologia**

A importância crescente da utilização do crómio a nível industrial, os efeitos da exposição ocupacional dos trabalhadores ligados a essas indústrias e os problemas ambientais a elas associados, tornam pertinente uma sistematização, embora não exaustiva, de alguns dos aspectos da química do crómio ligados à utilização industrial, à química ambiental e ao estudo da toxicologia deste elemento [1-3].

### **1.1 - Utilização industrial do crómio: breve referência a problemas de exposição ocupacional e a aspectos ambientais**

A extracção do crómio, feita a partir da cromite, minério misto de crómio e ferro, de fórmula geral  $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ , atinge, a nível mundial, vários milhões de toneladas / ano. No processamento deste elemento e dos seus compostos há a considerar não só as indústrias metalúrgicas, em especial as de produção de aço e ligas metálicas e as de electrodeposição

e cromagem, como também as de curtumes, de fabrico de pigmentos para tintas, de preservação de madeiras ou de soldadura [3,4].

Considerada a expressão económica e a difusão destas indústrias, o controlo dos processos de tratamento dos respectivos efluentes e da eventual recuperação de resíduos de crómio são problemas de importância ecológica e económica fundamentais. Se se tiver presente que uma parte daquelas indústrias envolve basicamente crómio(III) (como é o caso dos curtumes) ou crómio(VI) (caso das indústrias de cromagem e algumas de pigmentos e de preservação de madeiras) entende-se que sejam estes os estados de oxidação que normalmente são tratados por quem se interessa pela toxicologia deste elemento. Parece assim evidente que tanto a problemática ambiental das indústrias utilizadoras do crómio como a compreensão dos processos associados à sua toxicologia, justifiquem um esforço de investigação sobre a química dos estados de oxidação mais relevantes em tais situações. A dispersão do crómio no ambiente e os processos químicos ou biotecnológicos de tratamento de efluentes contendo este elemento exigem também a compreensão de aspectos das respectivas química, biologia e bioquímica, que são ainda pouco conhecidos.

Um grande número de pessoas em todo o mundo trabalha em indústrias ligadas à extracção e ao processamento do crómio. As consequências da exposição ocupacional a este elemento (por exemplo, dermatites, problemas das vias respiratórias, cancro pulmonar) dependem, naturalmente, do tipo de compostos a que os trabalhadores estão expostos nos seus locais de trabalho, ou seja, das diferentes espécies químicas, estados de oxidação, solubilidade, tamanho das partículas sólidas e, como é evidente, também dos respectivos grau e tipo de exposição [1,3,5-8]. Para além disso, a distribuição de crómio no corpo de um indivíduo exposto a este elemento (sob a forma de partículas sólidas ou em solução), depende da capacidade de cada um dos compostos de crómio para atravessar os diferentes tipos de membranas celulares, especialmente quando no estado de oxidação +6, como adiante se verá. Apesar de estar devidamente provado que as espécies de Cr(VI) são as primeiras responsáveis pelos efeitos tóxicos do crómio

[1,8,9], este assunto continua a ser alvo de intensa pesquisa. Nomeadamente, desde que foram encontradas algumas evidências de que a interacção de compostos de Cr(III) com núcleos de células e com ADN pode ter consequências em termos dos danos causados no material genético, levando a questionar o papel dos compostos de Cr(III) nos mecanismos de toxicidade do crómio, eventualmente mais activo do que aquele que lhe tem vindo a ser atribuído [10,11].

Sob o ponto de vista de abundância, o crómio ocupa o 21º lugar entre os elementos constituintes da crosta terrestre, encontrando-se distribuído pelos mais variados tipos de materiais (Tabela 1.1). Na natureza (ar, solos, águas) acaba por estar presente quase exclusivamente em formas trivalentes (espécies solúveis ou insolúveis), uma vez que o Cr(VI) é com facilidade reduzido pela matéria orgânica. Por isso, salvo

| <b>Material</b>     | <b>Cr / ppm</b>                                       |
|---------------------|---|
| Solos               | 5 - 3000  |
| Água doce           | 0.001-0.08  |
| Água do mar         | $5 \times 10^{-5}$ ( $3 \times 10^{-5}$ )*            |
| Plantas terrestres  | 0.23  |
| Plantas marinhas    | 1   |
| Animais terrestres  | 0.075   |
| Animais marinhos    | 0.2 - 1   |
| Tecidos (mamíferos) | 0.025 - 0.85  |
| Eritrócitos         | 0.0015 (120 átomos de Cr / célula vermelha de sangue) |

Tabela 1.1 - Distribuição do crómio na Natureza; adaptado de [14] e [15]\*

algumas excepções, a elevada quantidade de compostos de Cr(VI) e os problemas associados à sua toxicidade no meio ambiente foram afinal criados pelo próprio homem [1,3,12,13]. E uma vez que, os compostos de Cr(VI) parecem ser os mais nocivos, uma possível maneira de tentar minimizar os problemas ecológicos relacionados com a poluição

ambiental, provocada por este elemento, pode passar pela redução prévia, a Cr(III), dos resíduos de Cr(VI). Aí poder-se-ão transformar em hidroxocomplexos, poliméricos, insolúveis e inertes, praticamente incapazes de interagir com os sistemas biológicos.

Outro tipo de soluções para estes problemas passa pela reciclagem e reutilização de compostos de crómio utilizados a nível industrial, tal como já acontece, por exemplo, nas indústrias de curtumes [3].

## 1.2 - Química do crómio

O crómio é o 24º elemento da Tabela Periódica, pertence à primeira série de transição e tem configuração electrónica  $[Ar] 3d^5 4s^1$ . Pode formar compostos com praticamente todo o tipo de elementos, desde compostos binários com elementos não metálicos, a compostos organometálicos ou a compostos de coordenação com os ligandos

| Composto  | Estado de oxidação |
|---|--------------------|
| $Na_2[Cr(CO)_5]$  | -2                 |
| $Na_2[Cr_2(CO)_{10}]$   | -1                 |
| $[Cr(CO)_6]$ ; $[Cr(bipy)_3]$ ; $Cr(PF_3)_6$  | 0                  |
| $K_3[Cr(CN)_6] \cdot H_2O$ ; $[Cr(bipy)_3]ClO_4$  | +1                 |
| $[Cr(CH_3COO)_2]_2 \cdot 2H_2O$ ; $Na_4[Cr(CN)_6]$ ; $[Cr(gly-O)_2] \cdot H_2O$ ;<br>$[Cr(CH_2SiMe_3)_2]$ | +2                 |
| $Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ ; $CrCl_3(NMe_3)_2$ ; $Na[Cr(L-cys)_2] \cdot 2H_2O$                              | +3                 |
| $Cr(OBu)_4$ ; $[Cr(en)(O_2)_2] \cdot H_2O$ ; $Na_4CrO_4$  | +4                 |
| $Na_4Cr(GSH)_4 \cdot 8H_2O$ ; $CrF_5$ ; $Na[OCr(O_2COEt)_2]$  | +5                 |
| $K_2Cr_2O_7$ ; $BaCrO_4$ ; $CrF_6$ ; $CrOpy(O_2)_2$   | +6                 |

Tabela 1.2 - Compostos de crómio com este elemento nos vários números de oxidação conhecidos

mais variados. O seu nome, que vem do grego "chroma" (χρoμα), cor, é alusivo à extensa variedade de cores apresentada pelos seus múltiplos e diferentes compostos. Este elemento pode ocorrer com qualquer número de oxidação de -2 a + 6 (Tabela 1.2).

Em solução aquosa, o estado de oxidação +2 é o mais baixo que se observa em

compostos de crómio. Mas, o facto do par oxi-redutor Cr(III) / Cr(II) ter potencial negativo mostra que, naquele estado de oxidação, o crómio é um forte agente redutor (Figura 1.1). Em solução, o crómio(II) apenas é estável em condições estritamente anaeróbicas, embora, mesmo assim, se decomponha lentamente, por redução da água e com libertação de H<sub>2</sub> [16]. Assim, a síntese de compostos de Cr(II) apenas pode ser efectuada em atmosfera inerte, caso contrário este catião metálico é rapidamente oxidado a Cr(III). O aquaião de crómio(II) tem sido um dos reagentes mais usados, como redutor, na investigação de mecanismos de reacções redox rápidas de esfera interna. Como o Cr(III) resultante é cineticamente inerte, consegue-se obter evidência da formação de estados intermediários em que o redutor e o oxidante estão ligados entre si por uma ponte, através da qual se processa uma troca muito rápida de electrões [17].

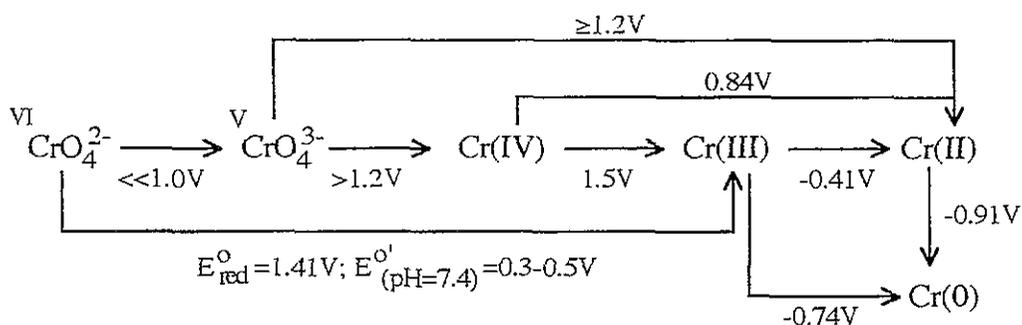


Figura 1.1 - Potenciais de redução das diferentes espécies de crómio em solução aquosa [5]

É conhecido um número muitíssimo elevado de compostos de crómio no estado de oxidação +6, os quais, na natureza, ocorrem com maior frequência sob a forma de cromatos e de dicromatos [16,18]. Em qualquer destas formas aniónicas, o Cr(VI) é estável em solução aquosa e o seu elevado potencial de redução evidencia a forte capacidade oxidante desta(s) espécie(s). Em solução ácida e na presença de redutores adequados, o Cr(VI) é facilmente reduzido a Cr(III), mesmo apesar das reacções de redução poderem implicar a transferência em simultâneo de três electrões e/ou se processarem por mecanismos complexos, com mais do que um passo e com formação de intermediários, o que as torna, em geral, e por isso, lentas [19,20]. Embora o potencial de redução diminua com o aumento de pH, em condições fisiológicas (pH cerca de 7.4)

aquele potencial é ainda de +0.52 V. Como veremos, é importante ter presente este potencial de redução na discussão da transformação destas espécies de Cr(VI) em ambientes biológicos (Ver Capítulo 2).

Em solução aquosa, a química do crómio nos estados de oxidação +4 e +5 é ainda pouco conhecida. Embora se encontre Cr(IV) e Cr(V) em muitos óxidos e halogenetos, estas espécies tendem a dismutar-se em Cr(III) e Cr(VI). Nas reacções de redução "biológica" de Cr(VI) é, em geral, possível detectar e observar vários tipos de intermediários, tanto tioésteres, nos quais o crómio se encontra presente ainda no estado de oxidação +6 [21,22], como outras espécies com crómio nos estados de oxidação +5 ou +4 [23-25]. Continua a haver grande interesse na investigação destes intermediários, especialmente nos de Cr(V), devido às fortes evidências de que os efeitos tóxicos do Cr(VI) sejam mediados por estas espécies [26,27]. Tais intermediários observam-se, por exemplo, em reacções de redução de Cr(VI) com glutathiona e com cisteína, em meio neutro, tendo sido isolado, no estado sólido, pelo menos um composto de Cr(V) daquele tipo, a partir da reacção de redução com glutathiona [28]. Como os tempos de vida média dos intermediários de Cr(V) são suficientemente longos, a sua formação e decomposição pode, em geral, ser seguida por métodos de detecção não específicos de reacções muito rápidas (normalmente por métodos espectrofotométricos vulgares ou por RPE) [25,28]. Neste tipo de reacções, ao contrário do que verifica com os anteriores intermediários, as espécies químicas que contêm Cr(IV), não sendo também estáveis em solução (Figura 1.1), têm-se apresentado de detecção difícil [24].

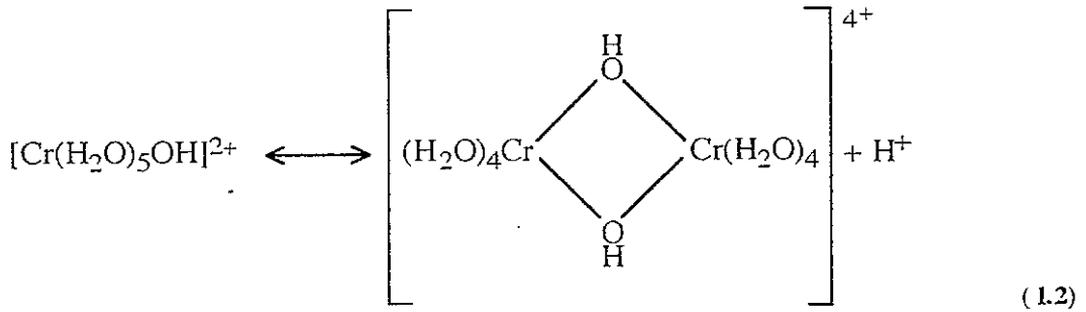
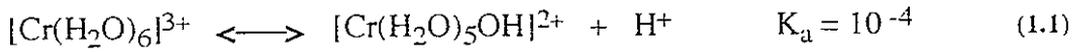
Os outros estados de oxidação mais baixos, -2 a +1, só ocorrem em compostos organometálicos, com ligandos bons aceitadores- $\pi$  de electrões, do tipo carbonilo ou outros (Ver Tabela 1.2) [18,29].

No estado de oxidação +3, mais estável, o crómio existe na forma de compostos de coordenação. A química de coordenação do crómio(III) foi investigada pela primeira vez, de um modo sistemático, por Pfeiffer e Werner, no virar deste século. Qualquer molécula ou ião capaz de actuar como base de Lewis é, potencialmente, capaz de se

coordenar ao ião crómio(III), considerado como "ácido duro", dando origem a compostos de coordenação, em geral com geometria octaédrica ou "pseudo-octaédrica". Este aspecto é característico da química do Cr(III) e está patente nos milhares de compostos de coordenação que se conhecem, acrescidos ainda, para cada caso, das diferentes formas possíveis de isomerismo. Deste estado de oxidação do crómio é ainda típica a cinética de substituição lenta, que tem possibilitado o isolamento de muitos complexos, mesmo em condições termodinamicamente instáveis, e a resolução dos que são opticamente activos [16,18,29].

A adição de base a uma solução de Cr(III) leva de imediato à formação de óxidos e de hidróxidos hidratados, de estruturas pouco conhecidas e com composições variadas, que podem ser dissolvidos por adição de ácido. Todavia, o "envelhecimento" destas soluções torna irreversível a formação daqueles compostos [16,30]. Este aspecto é um factor importante a ter em conta na síntese de complexos com ligandos básicos, a qual, normalmente, não pode ser efectuada por "via directa", ou seja, por reacção de sais de Cr(III) e do ligando. Por isso, muitas vezes, utiliza-se a passagem por intermediários com outros números de oxidação, mais lábeis e menos sujeitos à formação daqueles produtos secundários, como acontece, por exemplo, na síntese do complexo  $[\text{Cr}(\text{en})_3]\text{Cl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , em que o crómio, inicialmente presente na forma de Cr(III), é reduzido, em meio anidro, a Cr(II) [31].

Em solução aquosa e na ausência de outros ligandos, o crómio(III) pode existir sob a forma do aquaião  $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ , de estrutura octaédrica regular. Este ião também ocorre nas estruturas cristalinas de numerosos sais, como no  $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]\text{Cl}_3$  ou nos alúmens de crómio, por exemplo. Ao contrário do que se verifica com o cobalto(III), os compostos de crómio(III) são susceptíveis de sofrer hidrólise, da qual resultam hidroxocomplexos (1.1) os quais, posteriormente, se podem ainda constituir em espécies diméricas (1.2) ou em estruturas polinucleares de dimensões coloidais, de massas moleculares elevadas, nas quais os centros de crómio estão ligados entre si por pontes de  $\text{OH}^-$  ou de oxigénio [14,16,18].



O estudo da polimerização resultante da hidrólise de Cr(III) em solução aquosa foi iniciado por Bjerrum em 1908, que postulou a existência de uma espécie dimérica em soluções básicas de Cr(III). Embora a estrutura dessa espécie ainda não tenha sido determinada sem ambigüidade, é quase certo que pode ser ilustrada pela Equação (1.2) [18,32]. Mais recentemente, um grupo de investigadores estudou, com detalhe, o processo de polimerização resultante da adição de base a soluções aquosas de  $\text{Cr}^{3+}$ , o que lhes permitiu estudar não só a evolução das diferentes espécies poliméricas em solução, ao longo do tempo, como a interconversão entre as várias espécies formadas.

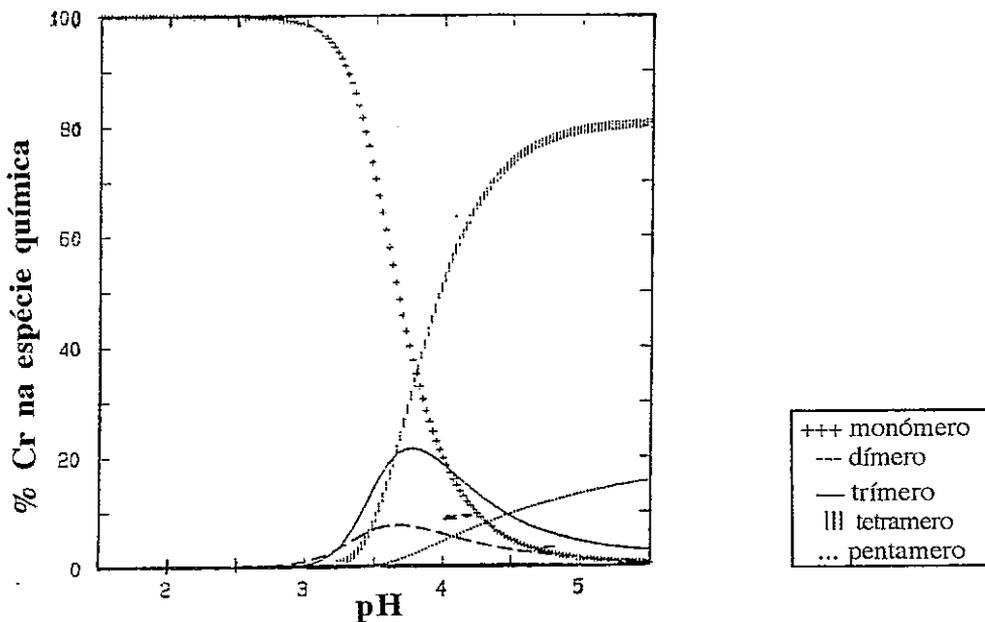


Figura 1.2 - Distribuição de equilíbrio do crômio, em função do pH, pelas diferentes espécies formadas em solução aquosa:  $[\text{Cr}]_{\text{Tot}}=0.001 \text{ mol dm}^{-3}$  [32]

Os mesmos autores, isolaram algumas dessas espécies e determinaram as constantes de acidez e de formação de cada uma delas, o que lhes permitiu tirar conclusões acerca do modo como os equilíbrios são atingidos [32-34]. Na Figura 1.2 estão patentes as percentagens, em função do pH, de cada uma daquelas espécies em equilíbrio, para uma determinada concentração total de crómio em solução, sendo de notar o desaparecimento das formas mais simples à medida que o pH aumenta.

### 1.3 - Crómio em biologia

#### 1.3.1 - Noções de essencialidade e de toxicidade

Em termos gerais, um elemento é considerado essencial se se encontra presente em certas espécies biológicas, de tal modo que a sua deficiência nas fontes nutritivas dessa espécie conduz a estados patológicos [15,35,36]. À noção de essencialidade contrapõe-se a noção de toxicidade, designando-se por tóxicos todos os elementos, essenciais ou não, que após serem absorvidos provocam, de modo passageiro ou durável, perturbações de uma ou mais funções, podendo mesmo conduzir à morte [35,37]. Estas noções reportam-se sempre a valores quantitativos do elemento em questão, em referência a alguma(s) das suas formas específicas [3,38].

|    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| H  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | He |
| Li | Be |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | B  | C  | N  | O  | F  | Ne |
| Na | Mg |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | Al | Si | P  | S  | Cl | Ar |
| K  | Ca | Sc | Ti | V  | Cr | Mn | Fe | Co | Ni | Cu | Zn | Ga | Ge | As | Se | Br | Kr |
| Rb | Sr | Y  | Zr | Ni | Mo | Tc | Ru | Rh | Pd | Ag | Cd | In | Sn | Sb | Te | I  | Xe |
| Cs | Ba | Ln | Hf | Ta | W  | Re | Os | Ir | Pt | Au | Hg | Tl | Pb | Bi | Po | At | Rn |
| Fr | Ra | Ac | Th | Pa | U  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

Figura 1.3 - Distribuição, na Tabela Periódica, dos elementos essenciais à vida: (—) elementos biológicos "bulk", ou estruturais ; (==) elementos essenciais que se crê serem essenciais a plantas e a animais; (··) elementos vestigiais possivelmente essenciais (adaptação de [15], Fig. 1.1)

Desde o trabalho de Mertz e Schwarz, publicado em 1955 [39], que o crómio, no estado de oxidação +3, é considerado como elemento vestigial essencial para os animais e nomeadamente para o homem [14,15], presente em quantidades da ordem dos ng de Cr / g de tecido [40] (Figura 1.3). Na forma hexavalente, pelo contrário, está comprovado que o Cr(VI) é carcinogénico e mutagénico [6,40].

### 1.3.2 - Disponibilidade biológica

Quando se definiram quais as espécies químicas estáveis em solução aquosa e se discutiu a química redox do crómio, foram indicadas pistas que, de algum modo, permitissem compreender a disponibilidade e a acessibilidade biológica daquelas mesmas espécies. Assim, deve considerar-se que, se a intervenção do crómio em sistemas biológicos envolve, por um lado, o estado de oxidação +3, seja na forma de aquaiões seja na de outros compostos de coordenação, pode também esperar-se que o Cr(VI) e as espécies resultantes da sua redução, *in vivo*, quer sejam de Cr(V) ou de Cr(IV), possam ser da maior relevância na compreensão do metabolismo do crómio. Espécies químicas no estado de oxidação +2, pelo contrário, não sendo estáveis em solução aquosa aeróbica, terão pouca probabilidade de actuar a nível biológico [5] (Figura 1.4).

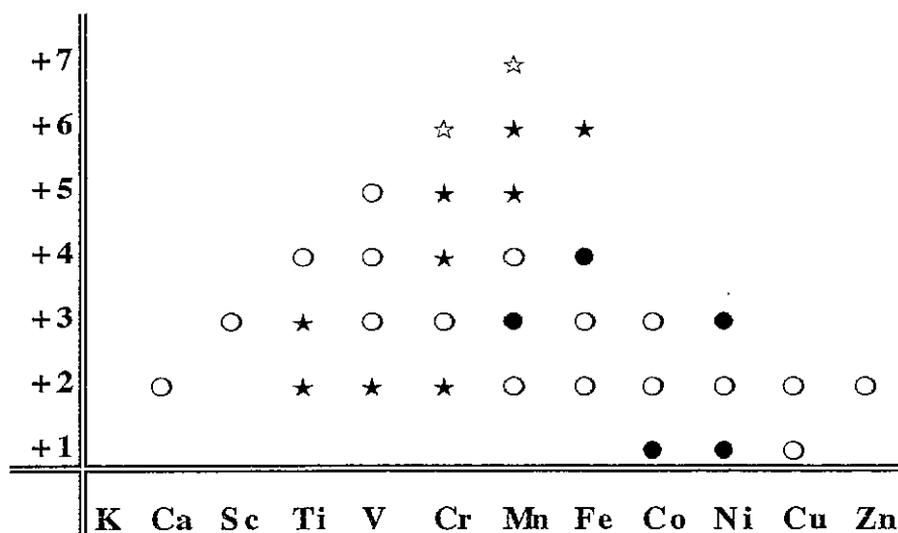


Figura 1.4 - Estados de oxidação do potássio ao zinco, biologicamente disponíveis ou não, compilados entre iões monoatômicos e oxoiões em solução aquosa, óxidos estequiométricos, halogenetos e outros sais simples(adaptado de [15]); (○):estados de oxidação comuns / (☆) mas não disponíveis em biologia; (●): estados menos comuns / (★) mas não disponíveis em biologia

Num meio a pH fisiológico, esperar-se-à que o Cr(III) polimerize, excepto se isso for evitado ou minimizado por coordenação com outros ligandos diferentes da H<sub>2</sub>O ou de OH<sup>-</sup>. Uma polimerização pronunciada tornaria o Cr(III) biologicamente inacessível, uma vez que, nas condições "suaves" dos sistemas biológicos, uma reacção daquele tipo seria provavelmente irreversível [14].

### 1.3.3 - Funções biológicas do crómio

Embora haja estudos extensos sobre os efeitos biológicos do crómio, essencialmente no que se refere a processos relacionados com o metabolismo da glucose e dos lípidos, o crómio é um dos elementos essenciais vestigiais cujas funções biológicas não estão ainda definidas de forma inquestionável [15,35]. A deficiência nutritiva neste elemento leva a uma diminuição progressiva da tolerância à glucose, estando associada a doenças como a diabetes adquirida e/ou a doenças cardiovasculares [41]. Na prevenção e eliminação destes sintomas, foi considerado particularmente eficaz um composto de Cr(III), o chamado factor de tolerância da glucose (FTG), o qual existiria, por exemplo, na levedura da cerveja e teria capacidade para potenciar a acção da insulina no metabolismo da glucose [42,43].

Em todas as tentativas de, a partir de substâncias naturais, se extrair, isolar e caracterizar o FTG, ou outros compostos com actividade biológica do mesmo tipo da deste composto, os rendimentos dessas reacções foram sempre muito baixos. Foi então, por isso, feito um grande esforço para sintetizar compostos que pudessem servir de modelo ao FTG. Estes trabalhos resultaram na síntese e caracterização de grande quantidade de compostos de Cr(III) com ácido nicotínico e outros ligandos, em especial alguns aminoácidos [44,45].

O modelo proposto para o FTG [46] é constituído por um centro metálico, octaédrico, de Cr<sup>3+</sup>, com duas unidades de ácido nicotínico coordenadas, sendo as outras posições ocupadas pelos aminoácidos cisteína, ácido glutâmico e glicina. Mertz [46], baseando-se no facto do principal produto da reacção de Cr(III) com ácido nicotínico ser

o catião *trans*-tetraaquabis(nicotinato)crómio(III), o qual manifestava acentuada actividade biológica, propôs que o factor estrutural significativo para que um composto possuísse actividade biológica fosse a disposição *trans* dos átomos de N, do anel de piridina do ácido nicotínico. Mas, contraditoriamente, Cooper *et al* [47], ao sintetizarem outros compostos com ácido nicotínico, verificaram que apenas aqueles em que o ácido estava coordenado pelos átomos de oxigénio apresentavam actividade biológica. Foi ainda contraposto que o arranjo *trans* dos átomos de azoto, pudesse ter sido mantido no resto da molécula, mesmo que a coordenação fosse efectuada por átomos de oxigénio. Eventualmente, essa estrutura seria então aquela capaz de ser reconhecida pelos receptores envolvidos na acção da insulina. Mas, Haylock *et al* [48,49] publicaram posteriormente um trabalho em que afirmaram que a presença do crómio não era essencial no "composto" vulgarmente designado por FTG, visto que algumas das fracções obtidas, por purificação daquele composto pelo método de Toepfer *et al* [50], eram biologicamente activas, mesmo não contendo qualquer vestígio de crómio. Apesar da controvérsia e interesse gerados, o FTG não foi ainda satisfatoriamente purificado. O seu modo de acção a nível celular está também por esclarecer cabalmente, pelo que continua a ser objecto de estudo [51].

### **1.3.4 - Efeitos genotóxicos dos compostos de crómio**

#### **1.3.4.1 - Modelo de "entrada-redução" (uptake-reduction)**

Com base em estudos epidemiológicos, em testes feitos com animais e em estudos de mutagénese em bactérias e em células de mamíferos, os compostos de Cr(VI) têm sido identificados como carcinogénicos e mutagénicos, o que não é considerado, em princípio, em relação aos compostos de Cr(III) [1,7,10,52].

Segundo o modelo de "entrada-redução" (uptake-reduction), proposto por Wetterhahn *et al* [52,53], no processo de entrada do Cr(VI) nas células estão envolvidos dois passos fundamentais: a difusão dos aniões para o interior da célula e a sua subsequente e rápida redução a Cr(III) ( Figura 1.5). O Cr(VI), que devido às condições

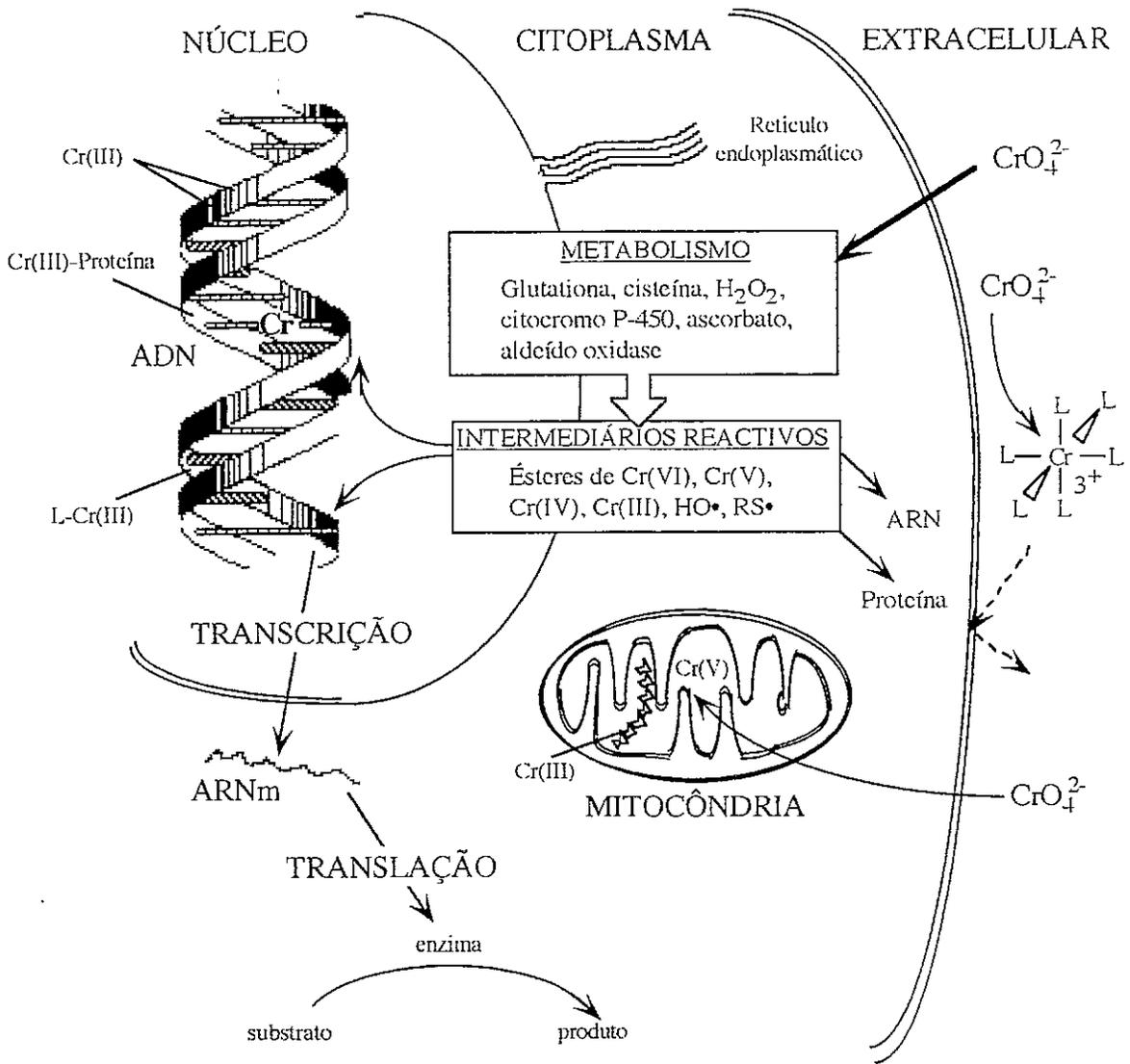


Figura 1.5 - Modelo da "entrada-redução" (uptake-reduction) [24]

de pH e de concentração se encontra essencialmente sob a forma de cromato, solúvel, difunde-se através das membranas celulares utilizando os canais transportadores dos aniões sulfato e fosfato (Ver Capítulo 2 - Secção 2.1). Este deve ser o passo limitante da velocidade de entrada, apesar de permitir, ao longo do tempo, a passagem de praticamente 100% do Cr(VI) extracelular disponível [10]. Devido ao seu elevado potencial de redução (+0.52V), o cromato consegue oxidar componentes celulares de baixo peso molecular, tais como a cisteína, a glutaciona ou o ácido ascórbico, sendo por eles reduzido, em última instância, a Cr(III) [10,52]. Os compostos de Cr(III), ao contrário do que se verifica com os de Cr(VI), dificilmente conseguem ultrapassar a membrana celular [54], entrando nas células muito lentamente, com uma velocidade cerca de 1000 vezes menor que a dos compostos de Cr(VI) em condições análogas [55]. Têm,

também, sido sugeridos processos de endocitose como responsáveis pela entrada de algum do Cr(III) presente no interior das células [54,56,57].

Naquelas reacções de redução, formam-se intermediários de crómio(V) e/ou de Cr(IV), pensando-se actualmente que os primeiros desencadeiam a formação de radicais livres, responsáveis pelos severos danos intracelulares provocados pelo Cr(VI) [26,27]. Como produtos finais da redução, é mais plausível que no interior das células se formem complexos de Cr(III) com os redutores referidos atrás ou com outros componentes intracelulares e não o hexaquaião,  $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ , ou hidróxidos de Cr(III), " $\text{Cr}(\text{OH})_3$ ". *In vivo*, nenhum desses compostos foi identificado, mas *in vitro*, têm sido detectados variados compostos de Cr(V) e de Cr(III) [58-61]. À cinética daquelas reacções de redução, *in vitro*, dependendo das concentrações do oxidante e dos redutores presentes, estão associados tempos de vida-média da ordem de minutos ou até de horas. Isto significa que os processos redox envolvem intervalos de tempo suficientemente alargados para que, quer os intermediários, quer os produtos finais das reacções possam alcançar os compartimentos intracelulares e aí permaneçam, danificando-os.

#### 1.3.4.2 - Efeitos intracelulares do crómio

Os diferentes tipos de compostos de crómio, ou seja, espécies de Cr(VI), Cr(V), Cr(IV) e Cr(III), bem como radicais livres,  $\text{OH}\cdot$  e  $\text{RS}\cdot$ , formados no interior das células nas reacções de redução, podem conduzir a diferentes tipos de danos a nível do ADN [10,62,63]. Aquelas espécies podem originar "ligações-cruzadas" (cross-links), "ligações-cruzadas entre cadeias" (interstrand cross-links), "ligações-cruzadas entre proteínas e ADN" e ainda "quebra de cadeias" (strand-breaks), em mamíferos e aves, *in vivo*, [64] e em culturas de células, *in vitro* [10,65]. Mas a pH fisiológico, *in vitro*, não se verifica qualquer reacção do Cr(VI) com o ADN isolado [7,55,66,67], a menos que também estejam presentes componentes celulares com capacidade redutora, como, por exemplo, a glutathione [55,62].

O Cr(III), apesar de ser cineticamente muitíssimo menos reactivo que o Cr(VI),

na presença de sistemas metabolizantes [55], em condições de incubação prolongada (>40 horas) pode também ligar-se ao ADN [69]. Deve, ainda, esperar-se que as espécies de Cr(III) geradas *in situ* por redução de Cr(VI), na presença de complexantes biológicos fortes, aminoácidos, péptidos, proteínas ou ADN, gerem complexos de Cr(III). Não é, pois, surpreendente que comecem a aparecer indicações mais concretas de que o crómio no estado de oxidação +3, possa ser a espécie envolvida nas "ligações-cruzadas com ADN", induzidas ou não pelo Cr(VI) [70,71].

O estudo dos mecanismos de toxicidade envolvidos na interacção do crómio com sistemas biológicos tem conduzido, recentemente, à publicação de um número significativo de trabalhos neste campo [11,61-70,72]. A detecção, obtenção e caracterização de intermediários e de produtos finais nas reacções de redução do cromato com alguns dos redutores intracelulares, tais como a cisteína ou a glutatona, que existem em quantidades milimolares no interior das células, tem sido também alvo de intensa investigação [21,26,27,60,73,74]. Têm sido sintetizados compostos que poderão servir como modelos dos que se formam intracelularmente [75-78], nomeadamente compostos com ligações Cr-S, as quais têm grande probabilidade de estar presentes nos produtos finais das reacções em que os redutores possuam grupos tiol. Aquela ligação parece revestir-se de características invulgares, porque contrariamente à cinética de substituição inerte usual nos compostos de coordenação de Cr(III), é muito lábil, mesmo em meios a pH praticamente neutro [78,79].

A transposição dos resultados obtidos *in vitro* para situações *in vivo* é, no entanto, muito complexa e tem de ser feita cuidadosamente, sendo uma das questões mais problemáticas a simplificação dos sistemas utilizados como modelos, que deixam ausente todo o complexo sistema enzimático intracelular. Estas constatações levam-nos, pelo menos, a preconizar que ainda há muito trabalho a ser desenvolvido nesta área, apesar do grande impulso dado nestes últimos anos, para que seja possível tirar conclusões que conduzam a uma compreensão mais completa dos mecanismos envolvidos na acção biológica do crómio.

## **2. Estudos de reacções de redução de Cr(VI)**

Quer no que respeita aos equilíbrios que se estabelecem entre as diferentes espécies de Cr(VI) presentes em solução, quer no que se refere a reacções de redução por substractos diversos, nomeadamente por moléculas biológicas pequenas e, em especial, pelas que contêm grupos tiol, o conhecimento da química do Cr(VI) reveste-se de particular importância para a compreensão dos aspectos fundamentais do comportamento biológico deste elemento. Com este objectivo, são desenvolvidos, ao longo do presente Capítulo, alguns daqueles aspectos.

### **2.1 - Aspectos gerais das reacções de redução de Cr(VI)**

#### **2.1.1 - Espécies de Cr(VI) em solução aquosa**

Ao contrário do que se verifica com os óxidos menos acídicos de V(V), Mo(VI) e W(VI), no caso do crómio não são conhecidos quaisquer iso- ou heteropolianióes com mais de quatro átomos deste elemento, o que poderá dever-se a uma maior deslocalização da ligação múltipla Cr=O para o ião crómio, que tem um raio menor que

os iões daqueles elementos. Compostos que contêm os aniões tricromato,  $\text{Cr}_3\text{O}_{10}^{2-}$  e tetracromato,  $\text{Cr}_4\text{O}_{13}^{2-}$ ,  $(\text{pyH})_2\text{Cr}_3\text{O}_{10}$  e  $\text{K}_2\text{Cr}_4\text{O}_{13}$ , por exemplo [18], apresentam estruturas que resultam da associação de tetraedros de  $\text{CrO}_4$  que partilham átomos de oxigénio situados em vértices. No limite daquele tipo de estruturas [2,16], o  $\text{CrO}_3$  pode considerar-se constituído por cadeias infinitas de  $-\text{O}-\text{CrO}_2-\text{O}-$ .

Admite-se, de um modo geral, que o Cr(VI) está presente, em solução, nas formas predominantes que estão consideradas na Tabela 2.1. Um estudo detalhado destas soluções pode fornecer informação quantitativa sobre a abundância relativa de cada uma daquelas espécies, em função da concentração total de Cr(VI) e do pH das soluções, de acordo com as constantes de equilíbrio associadas às equações que relacionam aquelas espécies entre si. Por exemplo, para concentrações de Cr(VI) superiores a  $1 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{H}_2\text{CrO}_4$  e  $\text{HCr}_2\text{O}_7^-$  só foram detectados, por métodos potenciométricos e espectrofotométricos, a pH menor que zero [2,19,80].

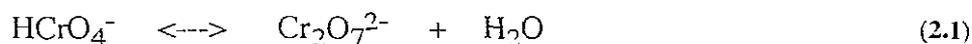
| pH  | $[\text{Cr}_T]/\text{mol dm}^{-3}$               | Espécie predominante de Cr(VI)* |
|-----|--|---------------------------------|
| < 0 | $>10^{-2} \text{ M}$                             | $\text{H}_2\text{CrO}_4$        |
| < 6 | $10^{-2} \text{ M}$                              | $\text{HCrO}_4^-$               |
| < 7 | $>10^{-2} \text{ M}$                             | $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$    |
| > 6 | $[\text{Cr}_T]$ pequena ( $<10^{-2} \text{ M}$ ) | $\text{CrO}_4^{2-}$             |
| > 7 | $[\text{Cr}_T]$ elevada ( $>10^{-2} \text{ M}$ ) | $\text{CrO}_4^{2-}$             |

Tabela 2.1 - Espécies de Cr(VI) em solução aquosa: \* $\text{HCr}_2\text{O}_7^-$ ,  $\text{Cr}_3\text{O}_{10}^{2-}$  e  $\text{Cr}_4\text{O}_{13}^{2-}$  existem em quantidades desprezáveis a  $\text{pH}>1$  [52]

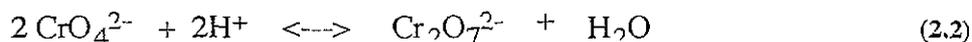
A espécie  $\text{HCrO}_4^-$  deveria apresentar, tal como acontece com outros compostos do tipo  $\text{CrO}_3\text{-X}$ , seis modos vibracionais fundamentais, em comparação com os quatro do ião  $\text{CrO}_4^{2-}$ , devido ao abaixamento de simetria de  $T_d$  para  $C_{3v}$ , que provoca o desdobramento das vibrações degeneradas [2]. Recentemente, no entanto, Michel *et al* [81], argumentaram que a espécie química  $\text{HCrO}_4^-$  não existe em solução aquosa, pois,

analisando os espectros de Raman de  $\text{CrO}_4^{2-}$  e de  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ , não observaram quaisquer vibrações relacionadas com aquele ião. Os mesmos autores [82], num estudo posterior, pretenderam mostrar que, tal como para a espécie  $\text{HCrO}_4^-$ , também não eram visíveis quaisquer sinais dos iões  $\text{H}_2\text{CrO}_4$  e  $\text{HCr}_2\text{O}_7^-$  os quais, por isso, nem sequer necessitavam de ser considerados em solução.

Se se considerar o equilíbrio (2.1),

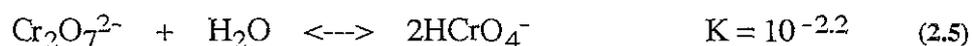
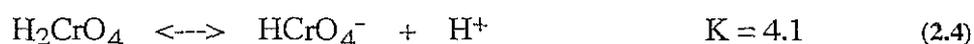
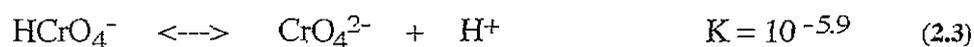


a concentração em solução de  $\text{HCrO}_4^-$  deveria aumentar por diluição. Mas, mais uma vez, os espectros de Raman não confirmaram a existência, em solução, de qualquer forma protonada do oxoanião de Cr(VI). Por isso, aqueles autores propuseram um outro equilíbrio, para a gama de pH entre 1 e 11 (Equação 2.2),



já que, a pH=11, após diluição da solução, 100% do Cr(VI) se apresentava sob a forma de  $\text{CrO}_4^{2-}$ , enquanto que a pH 1.2, 100% do Cr(VI) estava sob a forma de  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ . Para soluções a pH cerca de 6, apareciam apenas as bandas características do cromato e do dicromato, enquanto que em meios muito ácidos os espectros mostravam a presença de policromatos ( $\text{Cr}_2\text{O}_{10}^{2-}$  e  $\text{Cr}_4\text{O}_{13}^{2-}$ ) [81,82].

Tanto quanto nos é dado saber, os trabalhos daqueles autores são os únicos a pôr em causa a existência do anião  $\text{HCrO}_4^-$ . Note-se que, em qualquer livro fundamental de Química Inorgânica [16], tal espécie é sempre tida em conta nos equilíbrios sugeridos para a zona de pH 2-6, para os quais estão publicadas as respectivas constantes de equilíbrio (2.3 a 2.5):



Sendo assim, os resultados obtidos por Michel *et al* [81,82], necessitam de confirmação por outros métodos para que, eventualmente, possam vir a ser considerados em futuros estudos deste tipo de equilíbrios.

### **2.1.2 - Breve referência a reacções de redução de Cr(VI) por substractos inorgânicos: cinética e mecanismos de reacção**

Os compostos de Cr(VI) são vulgarmente utilizados como oxidantes em reacções químicas. O dicromato de potássio, por exemplo, é usado em análise química como substância oxidante padrão e o óxido de crómio, CrO<sub>3</sub>, é um reagente comum na oxidação de substâncias orgânicas [83,84].

As variadas reacções de oxidação-redução em que o Cr(VI) actua como oxidante, podem processar-se por uma multiplicidade de mecanismos, que dependem não só da natureza dos redutores como também das condições de reacção [19,85,86].

Neste tipo de reacções, alguns redutores transferem apenas um electrão de cada vez, numa sucessão de passos. É o que se verifica, por exemplo, na reacção de oxidação do ião [Fe(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>2+</sup> a [Fe(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup> [19]. O estudo destas reacções pode ser extremamente informativo acerca das espécies intermediárias de Cr(V) e de Cr(IV) que se formam durante o processo de redução.

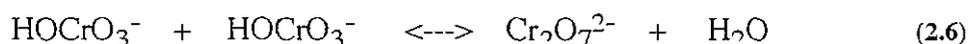
Outros redutores, contribuem com dois electrões num passo inicial que é, normalmente, o passo determinante da velocidade de reacção, seguindo-se um outro passo em que apenas está envolvido um electrão. Este é, em geral, o que se observa na oxidação de alcoóis por Cr(VI). Também se verifica que, àquele passo (que envolve dois electrões) se siga a conversão de Cr(IV) em Cr(V) e, só depois, a redução de Cr(V) a Cr(III). O passo inicial pode ser ou uma transferência de átomos ou de dois electrões através de grupos capazes de servir de ponte entre o Cr(VI) e o redutor. Porém, também pode suceder que seja transferido, inicialmente, só um electrão, seguindo-se um segundo passo em que estão envolvidos os dois electrões necessários para a redução completa até Cr(III) [19].

Finalmente, estas reacções também se podem efectuar por um único passo em que, ao mesmo tempo, estão envolvidos três electrões e duas moléculas de redutor [86], uma delas libertando dois electrões e a outra apenas um, como na oxidação de  $\text{HSO}_3^-$  a  $\text{SO}_4^{2-}$  e a  $\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$  [19]. Este tipo de mecanismo também se verifica na redução simultânea de  $\alpha$ -hidroxiácidos e de álcoois (cooxidação), em que há formação de radicais livres [87-89]. Nalguns destes casos, como acontece com o ácido 2,7-dihidroxi-heptanóico, a oxidação dá-se em dois grupos funcionais da mesma molécula (álcool e ácido), produzindo-se  $\text{CO}_2$  e o radical livre intermediário,  $\text{OCH}(\text{CH}_2)_4\text{C}^*\text{HOH}$ , o qual é em seguida oxidado, dando origem a um dialdeído. A formação deste intermediário é interpretada em termos de uma transferência interna de três electrões no complexo de Cr(VI) com o dihidroxiácido [87,88].

Verificando-se, na redução de Cr(VI) a Cr(III), passos que envolvem a transferência de um ou de dois electrões, formam-se espécies intermediárias de Cr(V) e/ou de Cr(IV). E como, nestas últimas espécies, a substituição de ligandos pode ser mais rápida que a transferência electrónica, de um modo geral, a substituição (coordenação) que vai corresponder à existente nos produtos finais da redução, efectuar-se-à durante o tempo de vida destas espécies. Ao processo de redução estão associadas modificações estruturais, tais como, por exemplo, a expansão da esfera de coordenação do crómio. Esta vai passar de 4 (no cromato tetraédrico) para 5 (no Cr(V) e Cr(IV)) e para 6 (no Cr(III) e também, pelo menos, em alguns compostos de Cr(IV)). A reacção de oxidação de U(IV) a U(V) pelo Cr(VI), por exemplo, processa-se por um mecanismo de esfera interna com captura do redutor para a esfera de coordenação do cromato, o qual, então, sofre uma expansão da sua esfera de coordenação [90]. Alterações estruturais deste tipo, já que implicam modificações nos complexos activados e respectivos estados de transição, têm consequências na determinação do passo determinante das velocidades de reacção [19].

Na gama de pH de 1-5, na qual  $\text{HCrO}_4^-$  é considerada a forma predominante de Cr(VI), podem formar-se ésteres com espécies que contêm o grupo -OH. Nestas

condições de pH, haverá protonação de pelo menos alguns átomos de O do  $\text{CrO}_4^{2-}$ , o que os torna mais lábeis que os oxigénios não protonados. Nas reacções de redução em presença de oxoácidos, as alterações verificadas nos espectros electrónicos de  $\text{HCrO}_4^-$ , são interpretadas pela formação daquele tipo de ésteres, como, por exemplo, nos casos de  $\text{HSO}_4^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{HS}_2\text{O}_3^-$ , em que os ésteres formados são  $\text{CrSO}_7^{2-}$ ,  $\text{HCrPO}_7^{2-}$  e  $\text{CrS}_2\text{O}_6^{2-}$  [19]. A formação do dicromato (2.6) é considerada como o protótipo deste tipo de reacções:



A literatura propõe mecanismos para a formação daqueles compostos em meio ácido que comportam a formação de intermediários pentacoordenados com uma ligação Cr-X fraca em equilíbrio com os reagentes, seguida da transferência de um protão e posterior perda de uma molécula de água [91,92]. A transferência de um protão da solução, ou de uma espécie acídica fracamente associada ao grupo hidroxilo no Cr(VI), para formar a molécula de água que sai, é considerada, em geral, o passo determinante da velocidade destas reacções. Em meio neutro, não sendo favorável a transferência de um protão, aceita-se, para aquela hidrólise, um mecanismo por catálise nucleófila, como alternativa à catálise ácida [92].

A ter em conta no Capítulo seguinte são a formação de ésteres, ou de tioésteres, como é o caso da reacção de oxidação do tiosulfato pelo cromato. A cinética desta reacção segue o mecanismo típico da formação de um (tio)éster,  $\text{CrS}_2\text{O}_6^{2-}$ , embora a sua constante de formação seja duas ou três ordens de grandeza mais elevada que a dos oxoésteres comuns. Segundo a literatura [92], parece razoável atribuir aquele valor às diferentes características das ligações Cr-O e Cr-S. Como o átomo de S é mais polarizável que o de O, num mecanismo em que se prevê a formação de um intermediário pentacoordenado seguido da transferência de um protão (passo determinante da velocidade) e a perda de uma molécula de água, estabelecem-se condições de estabilidade mais favoráveis para a formação de tioésteres do que para a

de oxoésteres análogos. Este facto é atribuído à formação de ligação(ões) Cr-S naquele intermediário, a(s) qual(is) também poderá(ão) explicar as diferenças encontradas entre as constantes de formação de  $\text{CrSO}_7^{2-}$  e de  $\text{CrS}_2\text{O}_6^{2-}$  [92,93].

| Redutor                     | Éster                         | K                 |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------|
| $\text{HCrO}_4^-$           | $\text{Cr}_2\text{O}_3^{2-}$  | 98                |
| $\text{HSO}_4^-$            | $\text{CrSO}_7^{2-}$          | 4.1               |
| $\text{H}_2\text{PO}_4^-$   | $\text{HCrPO}_7^{2-}$         | 2.9               |
| $\text{H}^+ + \text{CNS}^-$ | $\text{CrO}_3\text{SCN}^-$    | 220               |
| $\text{HS}_2\text{O}_3^-$   | $\text{CrS}_2\text{O}_6^{2-}$ | $1.0 \times 10^4$ |

Tabela 2.2 - Constantes de equilíbrio de formação de ésteres de cromato em meio ácido; espécie oxidante:  $\text{HCrO}_4^-$  [92]

Na redução de Cr(VI) é importante mencionar os intermediários de Cr(V), normalmente identificáveis por um sinal característico em RPE ( $g=1.978$ ) e por uma banda de absorção a cerca de 750 nm, tendo alguns compostos deste tipo sido isolados e caracterizados [85,87-89,94]. Recentemente, tem sido salientada a importância destes intermediários na reavaliação e/ou reinterpretação de alguns dos mecanismos de oxidação pelo Cr(VI) anteriormente propostos [85,88,89,94-96], com especial pertinência em estudos que se referem à redução biológica do Cr(VI) [24,85].

Se a redução do Cr(VI) se der na presença de ligandos complexantes ( $\text{N}_3$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), ou quelantes ( $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ,  $\text{HP}_2\text{O}_7^{2-}$ ), os produtos resultantes tanto podem ser o hexaquaião de Cr(III), como complexos de Cr(III) com iões pouco reactivos ou outros agentes redutores presentes em solução, que coordenam quer na forma reduzida quer na oxidada. Estes complexos parecem formar-se via espécies intermediárias de Cr(V) e/ou de Cr(IV), que sendo, em princípio, bastante mais lábeis que o Cr(III), são posteriormente reduzidos a complexos de crómio neste último estado de oxidação [19,97,98].

## 2.2 - Reacções de redução de Cr(VI) por tióis

### 2.2.1 - Importância de moléculas biológicas com grupos tiol como redutores de Cr(VI)

Com o objectivo de compreender e de esclarecer os mecanismos associados à toxicidade do crómio, a redução de Cr(VI) por moléculas biológicas com grupos tiol tem dado origem a grande número de trabalhos nesta área [1,27,52,60,72,99].

Como já referimos no Capítulo 1, o crómio, especialmente no estado de oxidação +6, além de ser considerado mutagénico em sistemas celulares (bactérias, mamíferos), também é carcinogénico, contrariamente ao que, em princípio, se verifica com o Cr(III) que parece ser pouco activo nos mesmos sistemas [1,6,52,71,72]. Sendo a entrada de crómio(VI) nas células explicada pelo modelo de "entrada-redução" [10,52,100-102], a sua redução posterior pode ter lugar no citosol, nos mitocôndria, no retículo endoplasmático ou no núcleo, efectuada por moléculas simples de baixo peso molecular (cisteína, glutatona, ascorbato), por macromoléculas (proteínas), ou ainda pelos sistemas enzimáticos [26,27,52,56,72,99,102-104] (Ver Figura 1.5). Como o Cr(III), após ter sido reduzido, tem a possibilidade de formar complexos estáveis com alguns dos componentes intracelulares, nomeadamente com os redutores já citados, com proteínas ou mesmo com o ADN, vai interferir desse modo nas funções biológicas daqueles componentes [5,71,72].

Ao pretender eleger os componentes intracelulares que, a pH fisiológico, possuem mais hipóteses de actuar eficazmente no processo de redução do Cr(VI), devem ter-se em conta os respectivos potenciais de redução, a sua capacidade de interferir por complexação na estabilização de intermediários, além de factores cinéticos. Àquele pH, não se observa redução com alguns dos ácidos carboxílicos redutores que, à partida, satisfariam os requisitos adequados quanto ao potencial de redução (ácidos fórmico, oxálico, málico, pirúvico, por exemplo) [52,99]. Noutros casos, como com o ácido láctico, o cromato acaba por ser reduzido, mas a cinética é

demasiado lenta, tornando-o, provavelmente, num redutor irrelevante a nível intracelular [99]. Se se compararem velocidades de redução de Cr(VI) com diversos componentes intracelulares, *in vitro* e em condições fisiológicas, pode verificar-se que, para além do que acontece com o ácido ascórbico, as velocidades mais elevadas ocorrem com compostos que contêm um "ambiente" do tipo tiol [52,60,61,99,100].

Apesar do crómio ser um ácido "duro" e do enxofre uma base "macia", o grupo tiol, SH, interacciona, de um modo particularmente eficaz, com o ião cromato (a espécie de Cr(VI) predominante em soluções neutras - Ver Tabela 2.1). As substâncias que contêm este grupo são, assim, especialmente efectivas na redução do Cr(VI), tanto mais que também se sabe que em reacções redox de esfera interna, o átomo de S é uma ponte muito eficiente na transferência de electrões [17].

O estudo da redução do Cr(VI) por tióis, quer eles sejam metabolitos naturais ou compostos modelo, tem, assim, uma importância fundamental no desenvolvimento do conhecimento das condições de reacção e dos mecanismos de redução do Cr(VI).

Os compostos com ligações metal-enxofre são, de um modo geral, objecto de estudo intensivo, especialmente no que se refere a sistemas modelo de processos biológicos que envolvem metaloproteínas, como são os casos, por exemplo, das proteínas com ferro do tipo não-heme, das "proteínas azuis de cobre", como a plastocianina e das ferredoxinas [15,105,106].

## **2.2.2 - Principais redutores intracelulares**

### **2.2.2.1 - Glutathione**

Dos redutores intracelulares que contêm enxofre deve destacar-se a glutathione, nas suas formas reduzida e oxidada, designadas por GSH ou por GSSG, respectivamente. Trata-se de um tripeptídeo,  $\gamma$ -glutamyl-L-cisteinyl-glicina, que ocorre naturalmente nas células e é considerado o tiol mais abundante (2-8 mM) no seu interior (2-3 mM em eritrócitos, 7mM no tecido hepático) [9,72,106,107]. Na forma

oxidada, a glutathiona está também presente nas células: nos eritrócitos, por exemplo, é cerca de 1% da concentração de GSH. Tanto a glutathiona reduzida como a oxidada, combinam um elevado número de grupos funcionais hidrófilos com um baixo peso molecular, o que lhes confere uma solubilidade elevada em água. Constituem, por isso, um sistema tiol/dissulfureto biologicamente adequado à interconversão rápida entre dois estados de oxidação [72]. Por exemplo, na protecção das membranas celulares, a GSH é oxidada a GSSG à medida que são consumidos hidroperóxidos, numa reacção catalisada pela glutathiona peroxidase. Participa na redução de dissulfuretos de proteínas e de outras moléculas e pode formar conjugados, que tanto podem ser de origem endógena como exógena. Pode condicionar, além disso, o comportamento químico de iões metálicos, reagindo com eles, isto é, complexando-os e/ou contribuindo para a sua redução intracelular, influenciando desse modo o seu metabolismo e toxicidade [101,106,108-111].

Há alguns anos, Cupo e Wetterhahn [112], observaram que o cromato causava um número muito elevado de "quebra de cadeias" (*strand-breaks*) em células hepáticas de embriões de frango se, previamente, lhes tivesse sido adicionada GSH. A partir daquela observação, foi posta a hipótese de que a interacção cromato/GSH fosse, de algum modo, responsável pelo metabolismo e pela toxicidade do Cr(VI), isto é, pela formação intracelular de espécies capazes de danificar o ADN [55,56,71,101,112]. Em condições fisiológicas, a GSH reage com o Cr(VI), *in vitro* [52,99-101,107], dependendo da concentração deste redutor, e aumentando com ela, a capacidade de, na sua presença, o Cr(VI) provocar danos no ADN [112-114].

Aaseth *et al* [9], por exemplo, verificaram que lisatos de eritrócitos reduzem rapidamente o Cr(VI), tendo relacionado este facto com a presença de GSH no interior daquelas células. Foi também observado que o Cr(VI), ao contrário do Cr(III), penetrava nos eritrócitos quase quantitativamente, num curto espaço de tempo [9]. No entanto, se extracelularmente fosse adicionada glutathiona, a quantidade de Cr(VI) que entrava nas células diminuía de maneira drástica. E se, no interior das células, os

grupos tiol da GSH fossem inibidos por intermédio de agentes bloqueadores do grupo SH, a entrada de Cr(VI) também diminuía, indicando assim que a GSH desempenhava um papel importante na entrada e na redução intracelular do crómio. A acção directa da GSH sobre eritrócitos intactos foi também estudada por RMN de protão, observando-se, por adição de cromato, o desaparecimento quase total do espectro de GSH, contrariamente a outros componentes celulares [115].

### 2.2.2.2 - Cisteína e penicilamina

A cisteína é um aminoácido relativamente abundante nos organismos vivos (no plasma sanguíneo humano a sua concentração é de cerca de 10 mM). Este aminoácido, por si só ou como resíduo de proteínas, pode actuar como ligando privilegiado em processos de coordenação de proteínas a metais, devido à grande afinidade que, em geral, se verifica entre o átomo de S e certos metais (Tabela 2.3). O seu grupo -SH participa, além disso, e muitas vezes em simultâneo com processos de complexação, em reacções de oxidação-redução [105,106,108].

| Proteína/Ião metálico | "Locais de coordenação" a metais                        |
|-----------------------|---|
| Azurina/Cu(II)        | S(cisteína); 2 N (histidina)                            |
| Rubredoxina/Fe(II)    | 4 S (cisteína)  |
| Plastocianina/Cu(II)  | S(cisteína); S(metionina), 5 N <sub>3</sub> (histidina) |

Tabela 2.3 - Alguns exemplos de proteínas contendo iões metálicos coordenados por resíduos de cisteína (adaptado de [108], pg. 770)

A penicilamina, por sua vez, embora seja um aminoácido que não ocorre naturalmente, pode considerar-se derivada da cisteína por metilação dos dois átomos de H ligados ao mesmo átomo de C que o grupo SH. Este composto é um bom modelo de aminoácido natural para verificar, por exemplo, o efeito de um ambiente estereoquímico mais volumoso que o da cisteína. Estas diferenças entre a penicilamina

e a cisteína revestem-se de grande importância no estudo de relações entre velocidades de redução, de Cr(VI), por exemplo, em que estão implicados factores de impedimento; estereoquímico (Ver Capítulo 3).

O isómero D- da penicilamina, que é utilizado no tratamento da doença de Wilson provocada pela acumulação de cobre no organismo, tem uma actividade terapêutica distinta da do seu outro isómero L-, que é tóxico [108]. Este aminoácido também tem sido usado no tratamento da artrite reumatóide e parece provado [105] que um determinado complexo de D-penicilamina com cobre apresenta uma actividade antiinflamatória acentuada.

A capacidade da penicilamina formar complexos estáveis com metais está também na base da sua utilização em tratamentos de intoxicação por metais pesados, tais como o chumbo ou o mercúrio [105]. Sugiura *et al* [116], estudaram também a acção deste aminoácido no processo de desintoxicação por complexação, do crómio ligado à hemoglobina.

### **2.2.2.3 - Ácido ascórbico**

O ácido ascórbico, conhecido por vitamina C, encontra-se numa grande variedade de plantas e de animais. Sendo essencial ao homem, não é produzido por ele e como a sua fonte é apenas nutricional, é necessário ingerir diariamente 30-60 mg deste composto. Desde 1955 que é utilizado no tratamento e na protecção de trabalhadores expostos a vapores de ácido crómico, sendo usado na impregnação do material aplicado em máscaras respiratórias protectoras usadas por aqueles trabalhadores [52,117].

Apesar de não ser um composto tiólico, o ácido ascórbico é hoje considerado um dos redutores do Cr(VI) mais eficazes no interior das células [52,99,101,117-118]. Num trabalho recente [119] aponta-se para que, no fígado e nos rins de ratos, *in vivo*, o ascorbato seja o principal redutor não enzimático do Cr(VI). Há também evidências de que níveis crescentes de ascorbato nas células façam aumentar o número de "ligações

cruzadas", induzidas pelo Cr(VI), entre ADN e proteínas. Comparações feitas entre a cinética de redução de Cr(VI) por GSH e por ascorbato, mostraram que este último, *in vitro* e em condições fisiológicas, reduz mais rapidamente o crómio(VI), observando-se mesmo sinergismo quando aqueles dois redutores são usados simultaneamente [120,121,122].

### 2.2.3 - Química dos redutores biológicos considerados

#### 2.2.3.1 - Química de oxidação-redução

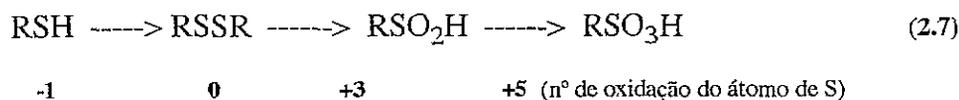
Como vimos, o potencial de redução do par Cr(VI) / Cr(III), é + 0.52 V, a pH fisiológico. Portanto, muitas das moléculas de baixo peso molecular que existem no interior das células têm condições para actuar como redutores do Cr(VI) aí presente (Tabela 2.4).

Com excepção do ácido ascórbico, o metabolismo e o papel biológico destes redutores estão estreitamente relacionados com a oxidação do grupo -SH.

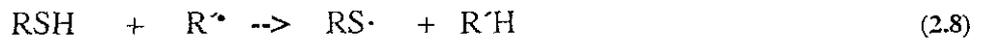
| Redutor      | E°/V   | Ref <sup>a</sup> |
|--------------|--------|------------------|
| Glutathiona* | - 0.24 | [109]            |
| Cisteína     | - 0.32 | [99]             |
| Penicilamina | —      | "                |
| Ascorbato    | + 0.08 | "                |

Tabela 2.4 - Potenciais de redução dos principais redutores biológicos (e análogos), encontrados no interior das células (pH≈7; 25°C) \*Difícil de determinar, pois formam-se complexos tiol-metal na superfície dos eléctrodos

Em processos biológicos, o grupo tiol é, em geral, oxidado a dissulfureto, podendo, nalguns casos, a oxidação estender-se a ácido sulfínico ou mesmo a ácido sulfónico (2.7):



Um outro aspecto importante a considerar no papel biológico dos tióis é a sua grande reactividade em relação a radicais livres. As reacções (2.8) e (2.9), podem ser tomadas como representativas de processos de eliminação de radicais livres por tióis [72,122]:



No caso do ácido ascórbico, ou do ascorbato, conforme a espécie predominante em solução, e tal como se verifica com a glutatona [27,99], a redução de Cr(VI) dá origem a intermediários de Cr(V), de tempo de vida relativamente longo, assim como a radicais livres (o radical ascorbato, A<sup>•</sup> ou o radical ácido ascórbico, HA<sup>•</sup>, se apenas for transferido um electrão, pois no caso de haver transferência de dois electrões, o produto da reacção de redução é o ácido dehidroxoascórbico) [58,117]. Apesar do ácido ascórbico ser muito estável em solução ácida na ausência de oxigénio, em ambiente neutro ou alcalino é rapidamente oxidado a ácido dehidroxoascórbico e posteriormente, devido à instabilidade do anel lactona, a outros produtos inactivos (ácido oxálico, por exemplo) [117,123].

Todas estas reacções são catalisadas, de um modo geral, por iões de metais de transição, em particular por cobre(II) e por ferro(III), mesmo que presentes apenas em quantidades vestigiais [106,108,109].

### **2.2.3.2 - Química de ácido-base e química de coordenação**

Além das propriedades oxi-redutoras, é importante referir também as propriedades ácido-base e respectivas capacidades de complexação das moléculas que temos estado a considerar. Em todas elas existem pares de electrões não compartilhados, que lhes dão a possibilidade de actuarem como potenciais ligandos. Ao complexarem com iões metálicos, a densidade electrónica dos seus grupos dadores

varia, por deslocalização para outras partes da molécula, alterando o seu comportamento químico, após complexação [106,108].

i) - Glutathiona

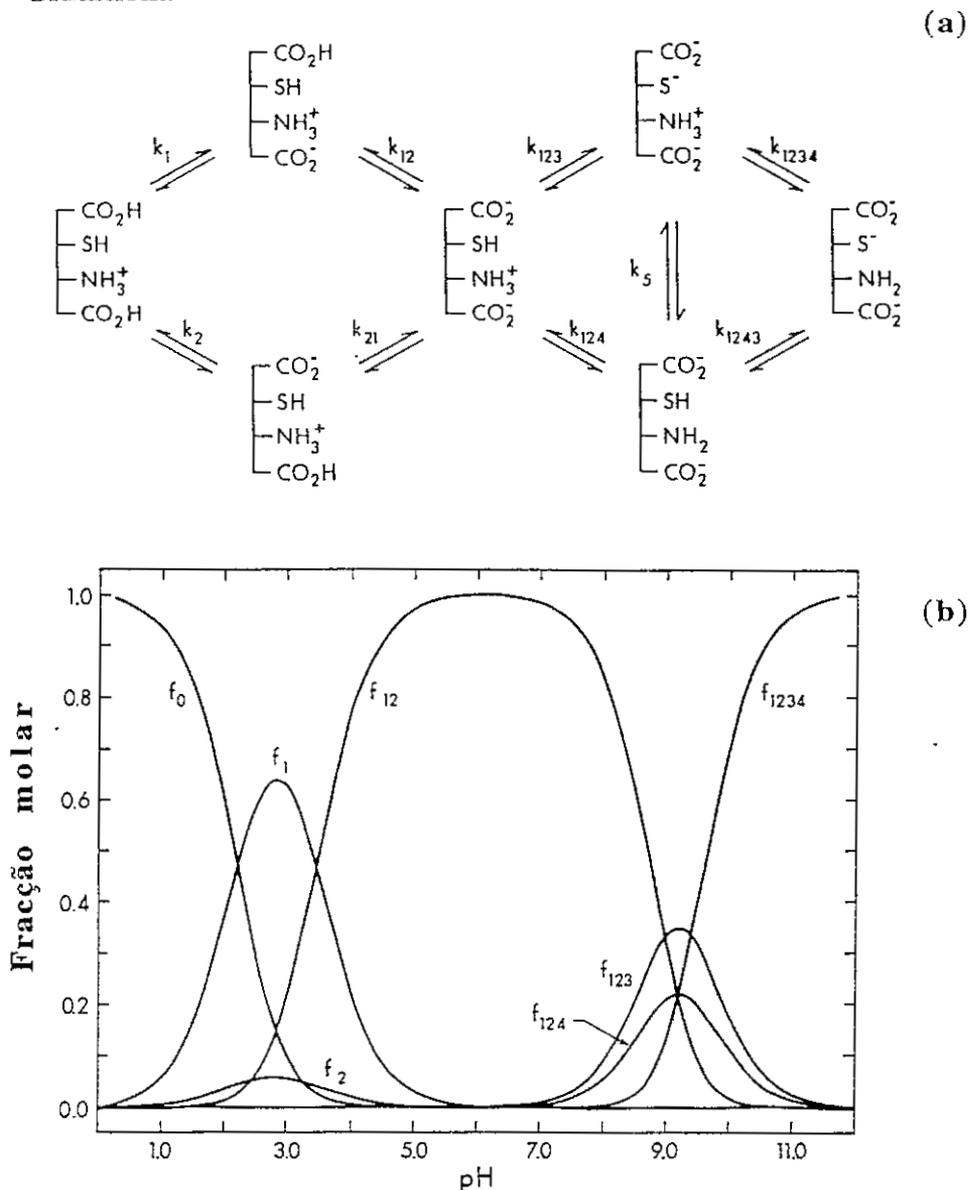


Figura 2.1 - a) - Esquema de ionização da GSH em solução (constantes microscópicas); b) - Especificação das várias formas protonadas da GSH, em função do pH ( $f$ =fracção molar) [109]

Na gama de pH de 1 a 13, quatro dos seus grupos funcionais estão envolvidos em reacções de ácido-base (grupos carboxílicos:  $pka \pm 2 / \pm 3.5$ ; grupo sulfidrilo:  $pka \pm 9$ , grupo amónia:  $pka \pm 9.5$ ), o que é demonstrado pelo elevado número de espécies possíveis de existir em solução (Figura 2.1).

A pH neutro, o isómero predominante da glutathiona reduzida possui oito locais

de coordenação disponíveis: duas ligações peptídicas, dois grupos carboxílicos, um grupo amina e um grupo tiol, que possibilitam vários tipos de coordenação (Figura 2.2). Por razões de estereoquímica, no entanto, dificilmente se poderão coordenar mais de três grupos a um mesmo centro metálico. A sua química de coordenação é caracterizada, por isso, pela formação de variados complexos protonados e/ou polinucleares [106,109]. Por vezes, a GSH coordena-se apenas na sua forma oxidada, após ter reduzido o ião metálico respectivo, como acontece no caso do Cu(II) [106] e, pelo menos nalgumas situações, também no caso do Cr(VI) [124]. Portanto, há que nunca negligenciar a possibilidade de ocorrerem "simultaneamente" reacções de complexação, de oxidação-redução e de ácido-base, as quais, em geral, acabam por ser processos não dissociáveis. Considerando a abundância de GSH nas células, o número de locais de coordenação e a afinidade do grupo sulfidrilo para se coordenar a certos metais, há, por isso, grande probabilidade de que, *in vivo*, se formem complexos de Cr(III) com GSH, reduzida ou oxidada, como discutiremos posteriormente (Capítulo 3, Secção 3.5).

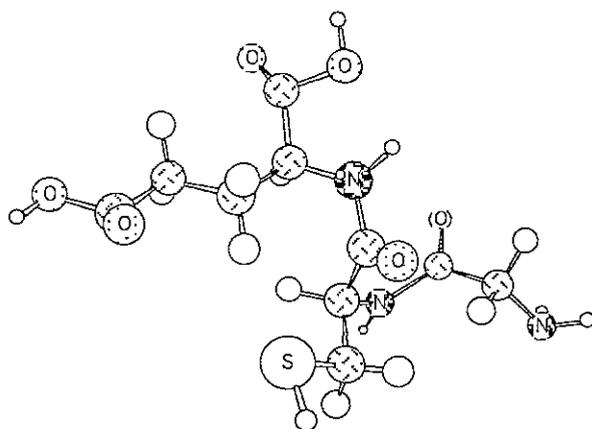


Figura 2.2 - Potenciais locais de coordenação na GSH

Apesar da literatura referir alguns trabalhos sobre a obtenção e a caracterização de compostos com aquele metal [52,124-126], não foram ainda determinadas quaisquer estruturas cristalinas capazes de esclarecer os locais exactos de coordenação neste tripeptídeo. A eventual presença, nesses complexos, de determinados tipos de ligações, nomeadamente da ligação Cr-S, excepcionalmente lábil em complexos de Cr(III), pode

influenciar e vir a explicar o comportamento deste tipo de complexos em sistemas biológicos. Contudo, apesar da existência daquela ligação ter sido proposta nalguns casos, em nenhum deles conseguiu ser devidamente comprovada [124,126].

## ii) - Cisteína e penicilamina

A cisteína e a penicilamina possuem três grupos funcionais ( $\text{COO}^-$ ,  $\text{NH}_2$  e  $\text{S}^-$ ) susceptíveis de se coordenarem a iões metálicos. A desprotonação dos grupos amina e tiol têm lugar em paralelo, pois são processos com valores de  $\text{pK}_a$  praticamente sobrepostos, embora o grupo tiol seja menos ácido que o grupo amina protonada (Tabela 2.5). O grupo SH, na penicilamina, tem um carácter um pouco mais básico que na cisteína, devido ao efeito de repulsão electrónica dos grupos  $-\text{CH}_3$  [105, 108,127].

| Redutor      | $\text{pK}_{a1}$ ( $\alpha\text{-COOH}$ ) | $\text{pK}_{a2}$ ( $\text{NH}_3^+$ ) | $\text{pK}_{a3}$ (SH) |
|--------------|---|--------------------------------------|-----------------------|
| Cisteína     | 1.91 "                                    | 8.16 "                               | 10.29 "               |
| Penicilamina | 1.90 "                                    | 7.92 "                               | 10.6 "                |

Tabela 2.5 - Constantes de acidez dos aminoácidos cisteína e penicilamina [108]

Como ligandos, estes aminoácidos apresentam uma natureza ambivalente. Isto é, o tipo de complexos que podem formar, depende das condições experimentais da síntese, especialmente do pH, e das características de cada ião metálico.

De modo geral, a cisteína e a penicilamina formam complexos semelhantes com o mesmo tipo de catiões metálicos, mas, no caso da penicilamina, os dois grupos metilo impedem o átomo de S de actuar como ponte entre dois centros metálicos, não permitindo a formação de estruturas polinucleares [106,127].

Os dissulfuretos de cisteína e de penicilamina, formados por oxidação, podem coordenar-se com metais da 1ª série de transição pelas "pontas" de cada molécula, ou seja, pelos átomos de O e de N, não se observando qualquer interacção com o "ambiente" -S-S-. No entanto, se os centros metálicos forem de natureza "macia",

como, por exemplo, o Pd(II), estudos efectuados por DC e por <sup>1</sup>H RMN apontam para a formação de ligações fortes M-S com o grupo dissulfureto [108].

Na Tabela 2.6, apresentam-se algumas constantes de estabilidade de complexos de metais de transição com cisteína e com penicilamina.

Dada a semelhança entre os dois aminoácidos coordenados, as constantes de estabilidade dos complexos de Cr(III) com aqueles ligandos parecem-nos demasiado díspares entre si (Tabela 2.6), o que aliás não se verifica para os complexos com outros metais. Na formação do bis(cisteinato)cromato(III), a referência [128] é bastante confusa quanto ao tipo de complexos formados, não sendo claramente referido se a cisteína se encontra coordenada ao Cr(III) de modo bidentado ou tridentado. Como as condições experimentais utilizadas são omissas, nomeadamente quanto ao pH das soluções, não é possível explicar aqueles valores, não se podendo, por isso, tirar deles o partido necessário para fazer comparações entre os complexos de Cr(III) que se formam com aqueles dois ligandos.

| Ião metálico | Aminoácido     | logK <sub>1</sub> | logK <sub>2</sub> | logK <sub>3</sub>         | Ref <sup>a</sup> |
|--------------|----------------|-------------------|-------------------|---------------------------|------------------|
| Cr(III)      | L-cisteína (1) | 8.32 (8.05)       | 7.69 (7.45)       | 6.94(6.32) <sup>(2)</sup> | [18]             |
|              | L-penicilamina | 15.97             | 12.42             | ---                       | [127]            |
| Co(II)       | L-cisteína     | 9.3               | 16.6              | ---                       | [108] (3)        |
|              | L-penicilamina | ---               | ---               | ---                       | "                |
| Ni(II)       | L-cisteína     | 9.8               | 20.7              | ---                       | "                |
|              | L-penicilamina | 10.63             | 22.97             | ---                       | "                |
| Zn(II)       | L-cisteína     | 9.04              | 18.12             | ---                       | "                |
|              | L-penicilamina | 9.5               | 19.40             | ---                       | "                |
| Cd(II)       | L-cisteína     | 12.9              | 19.6              | ---                       | "                |
|              | L-penicilamina | 12.68             | 20.68             | ---                       | "                |

Tabela 2.6 - Constantes de formação de complexos tridentados com L-cisteína e L-penicilamina; (1) constantes determinadas por métodos espectrofotométricos ou potenciométricos (entre parêntesis); (2) [128]; logK<sub>3</sub> não é considerado na ref<sup>a</sup> [108]; (3) Ref<sup>a</sup> [108], pg.743

### iii) - Ácido ascórbico

A característica mais notória da estrutura do ácido ascórbico, determinada por Raios-X, é o arranjo ceto-enólico do seu anel (Figura 2.3). É um ácido forte, devido à presença do grupo enólico (o H do grupo 3-hidroxil é o protão mais ácido) e, por exemplo, uma solução aquosa deste ácido, a 2 %, tem pH 2.8. Como os valores dos seus  $pK_a$  são 4.12 e 11.52, a espécie predominante em solução a pH fisiológico, é o anião ascorbato [99,117].

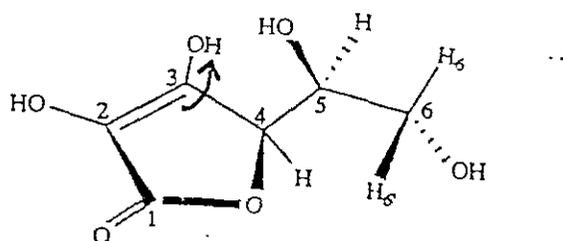


Figura 2.3 - Estrutura cristalina do ácido ascórbico [117]

O ácido ascórbico forma compostos de coordenação com praticamente todos os metais de transição, actuando, em geral, como ligando bidentado. Ao coordenar-se, na sua forma ceto-enólica, normalmente pelos átomos de O, forma anéis estáveis de cinco átomos [117]. Recentemente, no entanto, foi determinada a estrutura cristalina de um complexo com Pt(II), que possui uma ligação metal-carbono [129].

Concluindo, a redução "biológica" do Cr(VI) efectuada por redutores que estão presentes intracelularmente e cujas características foram discutidas neste capítulo, pode levar à formação de compostos de coordenação entre o centro metálico e os diferentes redutores (que são ligandos potenciais). O tipo de compostos obtidos depende destes últimos, dos diferentes centros metálicos e da preferência destes por determinadas geometrias, as quais condicionam o tipo de coordenação que se estabelece com os átomos dadores dos redutores considerados, além de depender do pH do meio e de outros factores, como, por exemplo, de factores estereoquímicos.

### **3. Cinética de reacções de redução de Cr(VI) por tióis**

#### **3.1 - Introdução**

A capacidade redutora e as concentrações fisiológicas intracelulares de alguns compostos, como a glutathiona e a cisteína (Ver Capítulo 2), associadas a algumas das suas funções biológicas, como por exemplo, a protecção das células, pela glutathiona, contra a acção de agentes oxidantes [109], têm feito destes redutores os alvos privilegiados dos estudos de redução de Cr(VI) por tióis. Encontram-se, por isso, na literatura um número razoável de trabalhos nesta área, a maioria dos quais efectuada em meio ácido [21,73,74]. Porém, dada a importância de que continua a revestir-se o estudo dos mecanismos da toxicidade do crómio, tem crescido o interesse por conhecer o comportamento destes sistemas em condições fisiológicas [52,60,99,100,130-133], sendo as reacções de redução de Cr(VI) por tióis, propostas, habitualmente, como modelo da redução intracelular do crómio(VI) [72].

Quando se comparam resultados cinéticos obtidos em estudos diferentes, somos confrontados com uma grande diversidade de condições experimentais, o que não facilita a interpretação dos mesmos [60,99,100]. Põem-se-nos também algumas questões quanto à razoabilidade das propostas de mecanismo apresentadas e quanto à interpretação e significado de alguns dos parâmetros cinéticos obtidos [99,100]. A formação e a decomposição de intermediários, bem como a identificação e caracterização dos produtos finais destas reacções, são também questões que estão ainda longe de ser cabalmente conhecidas [24,60,99,100,124,127].

O objectivo geral deste Capítulo é, de um modo geral, contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de redução de Cr(VI) por redutores biológicos. O trabalho experimental aqui descrito teve em vista a obtenção de resultados susceptíveis de esclarecer algumas das questões postas atrás.

Em resumo, foram estudadas:

i) - reacções de redução com redutores do tipo referido (glutathiona, cisteína e penicilamina), por espectrofotometria de UV/Vis e por "stopped-flow", tendo esta última técnica sido usada para investigar, em algumas daquelas reacções, o(s) passo(s) inicial(is) muito rápido(s);

ii) - a formação e a decomposição de intermediários nas reacções referidas na alínea anterior, por técnicas espectroscópicas (UV/Vis, DC, Raman), numa tentativa de esclarecer as respectivas estruturas;

iii) - a obtenção, identificação e cinética de formação dos produtos finais das referidas reacções;

### **3.2 - Mecanismos de redução de Cr(VI) por tióis**

As reacções associadas à redução do crómio, desde o estado de oxidação +6 ao +3, comportam a passagem por dois estados de oxidação intermédios (+4, +5). Contudo, apesar da diversidade e da complexidade desses processos, é possível, com base na literatura [21,60,73,74,99,100], generalizar um mecanismo comum, aplicável tanto às reacções em meio ácido como às efectuadas em meio neutro, desde que as restrições

inerentes a cada um destes casos sejam salvaguardadas.

Na presença de excesso de tiol (RSH), pode, assim, esquematizar-se o mecanismo seguinte:



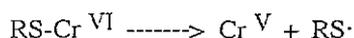
No passo inicial da reacção forma-se um complexo intermediário entre uma molécula de Cr(VI) e outra de tiol, um tioéster de fórmula geral Cr<sup>VI</sup> - SR, na proporção de 1:1 (3.1). Esta espécie decompõe-se posteriormente, por redução catalisada por ácido (3.2) e por reacção com uma segunda molécula do tiol (3.3)<sup>31</sup> (se o meio for neutro a redução dá-se apenas por aquele segundo passo). Finalmente, tem lugar a reacção que dá origem a complexos de Cr(III) (3.4).

Nestas reacções, os intermediários tioéster são análogos aos ésteres que, de modo geral, se formam em quaisquer outras reacções de redução de Cr(VI) e têm sido observados com variados redutores contendo enxofre, tanto em meio ácido [21,73,74] como em meio neutro [52,99,100,132] (Ver Capítulo 2).

Para o mecanismo atrás referido, pressupondo um passo inicial de pré-equilíbrio, pode deduzir-se a seguinte lei de velocidade:

---

<sup>31</sup> Na redução do tioéster, em meio neutro, além da reacção com uma segunda molécula de tiol, passo em que só está envolvida a transferência de dois electrões, Connett *et al* [99], por exemplo, propõem um outro passo alternativo, em que se dá a redução unimolecular do tioéster, com envolvimento de um único electrão, podendo formar-se intermediários de Cr(V) e radicais livres:



A introdução deste passo no mecanismo da reacção é devidamente fundamentada, pois que, neste tipo de reacções, foi identificada a formação dos radicais livres cisteinil e glutationil [132-134]. A presença destes radicais pode ter uma importância fundamental no que se refere a danos a nível de ADN causados indirectamente pelo crómio(VI), como veremos mais detalhadamente no Capítulo 6.

$$-\frac{d [\text{Cr(VI)}]}{dt} = \frac{K_1 (k'_1 [\text{H}^+] + k_2 [\text{RSH}]) [\text{RSH}] [\text{Cr(VI)}]}{1 + K_1 [\text{RSH}]} \quad (3.5)$$

O termo que engloba o factor  $[\text{H}^+]$  pode ser desprezado, desde que o meio seja neutro [52,99,100]. A lei de velocidade (3.5) transforma-se, então, em (3.6), podendo os parâmetros **a** e **b** assumir significados diferentes, conforme o mecanismo que se considere aplicável à formação e posterior decomposição do intermediário tioéster.

$$-\frac{d [\text{Cr(VI)}]}{dt} = \frac{ab [\text{RSH}]^2 [\text{Cr(VI)}]}{1 + b [\text{RSH}]} \quad (3.6)$$

De um modo geral, são propostos dois tipos de mecanismos para estas reacções:

i) - um mecanismo de estado estacionário, aplicado ao intermediário tioéster, se a sua concentração se mantiver praticamente constante durante os passos (3.1) e (3.3). A velocidade de formação do tioéster deverá ser lenta, quando comparada com a velocidade posterior de redução e, nesse caso:

$$a = k_1 ; b = k_2 / k_{-1}$$

ii) - um mecanismo de pré-equilíbrio, em que o intermediário tioéster é formado num passo inicial rápido (3.1). A redução posterior deste intermediário é o passo determinante da velocidade de reacção (3.3), correspondente à constante de velocidade  $k_2$ . Neste caso, então:

$$a = k_2 ; b = K_1 (K_1 = \text{constante de equilíbrio})$$

Os dois tipos de mecanismos são, de algum modo, "ditados" pelos valores dos parâmetros **a** e **b**, os quais são calculados a partir dos resultados experimentais. Estes valores, ao darem indicações acerca das constantes cinéticas e termodinâmicas das reacções e da formação e decomposição dos intermediários levam, então, à atribuição, a cada uma das reacções em questão, de um dos mecanismos referidos [60,99,100].

### **3.3 - Estudos cinéticos de redução de crómio(VI)**

No trabalho descrito neste Capítulo, as reacções de redução de Cr(VI) pelos vários redutores tiólicos, foram estudadas por espectrofotometria de UV/Vis, reacções de redução com GSH, e por "stopped-flow" (cinética de paragem de fluxo), reacções de redução com cisteína e com penicilamina.

Sempre que tal se tenha julgado relevante para a compreensão dos resultados, são apresentados alguns detalhes experimentais ao longo do texto, em tabelas ou em gráficos e figuras, embora no Capítulo 7 (Secção A) seja feita uma descrição pormenorizada das experiências efectuadas.

#### **3.3.1 - Estudos cinéticos por espectrofotometria de UV/Vis (meio neutro)**

Com base na literatura [21,22,52,73,74,99] e em experiências preliminares, que permitiram otimizar as condições experimentais a utilizar, foram escolhidos os comprimentos de onda adequados para seguir o curso das referidas reacções por UV/Vis: 372 nm para o desaparecimento de Cr(VI), no máximo da banda de transferência de carga característica do ião  $\text{CrO}_4^{2-}$ , espécie de Cr(VI) predominante em solução a pH 7 [80] e, também, alguns outros comprimentos de onda à volta de 440 nm, destinados a detectar a formação e o desaparecimento de intermediários do tipo tioéster. Os dados obtidos para a variação de absorvância em função do tempo aos vários comprimentos de onda considerados, foram analisados e tratados de acordo com tentativas de ajuste a leis simples de velocidade.

##### **3.3.1.1 - Resultados**

A intensidade da banda a 372 nm diminui no decorrer da reacção, tanto mais rapidamente quanto maior a concentração de GSH, sendo aquela diminuição acompanhada por um ligeiro deslocamento do seu máximo para maiores comprimentos de onda (Figura 3.1). Este resultado está em concordância com a substituição de um átomo de O por um átomo de S na esfera de coordenação do crómio, quando se forma um tioéster como intermediário [73,74,99,100].

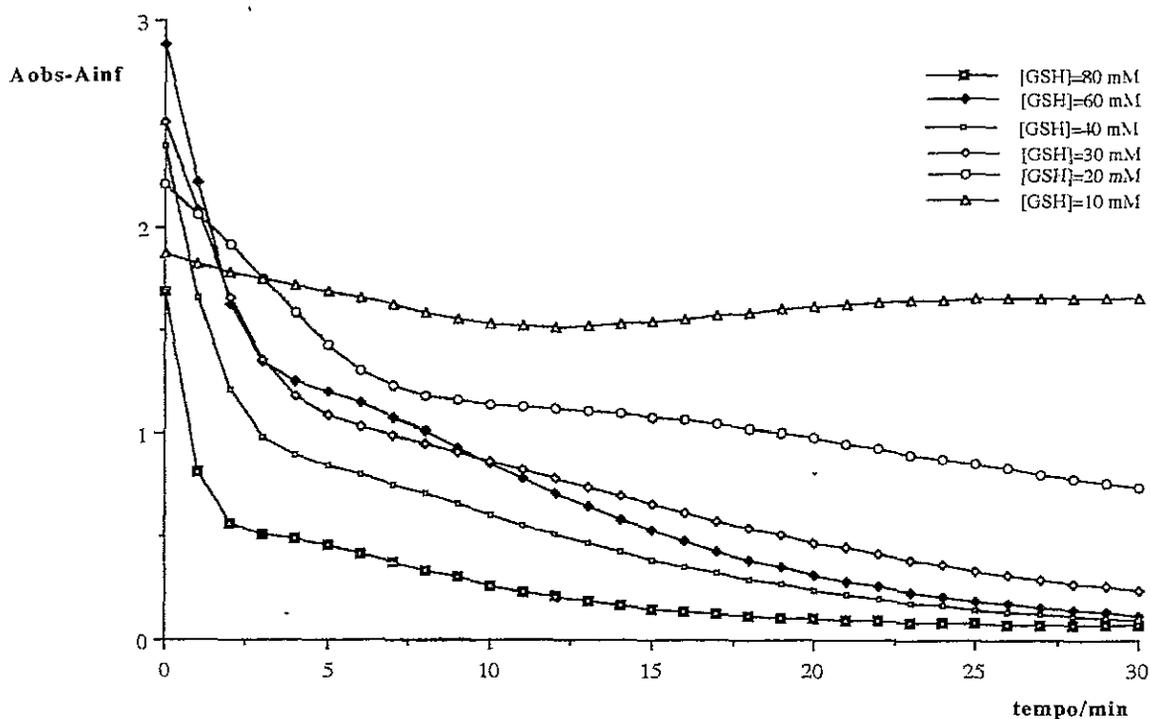


Figura 3.1 - Diminuição da absorvância com o tempo, correspondente à reacção de redução de Cr(VI) por GSH; [Cr(VI)]=1mM; [GSH]=10, 20, 30, 40, 60 e 80 mM; pH = 7.0; temperatura ambiente;  $\lambda = 372$  nm

A formação da espécie intermediária observa-se pelo crescimento de uma banda entre 430-450 nm, detectável nos espectros obtidos ao longo do tempo de reacção. As velocidades de formação e posterior decomposição deste intermediário são tanto mais rápidas quanto maior a concentração de glutathione. Na Secção 3.4.2 é estudada e discutida a formação e a decomposição deste tipo de intermediários.

### 3.3.1.2 - Discussão dos resultados

Embora as reacções de redução se tenham processado em condições de pseudo-primeira ordem (1 Cr(VI) : 10-80 GSH), a diminuição da concentração de cromato ao longo do tempo, não se rege, na sua globalidade, por uma lei de velocidade simples. A representação gráfica dos resultados apenas é linear (em termos de uma cinética de 1ª ordem) no início das reacções (2-3 minutos no caso do redutor com concentração mais elevada, Figura 3.2).

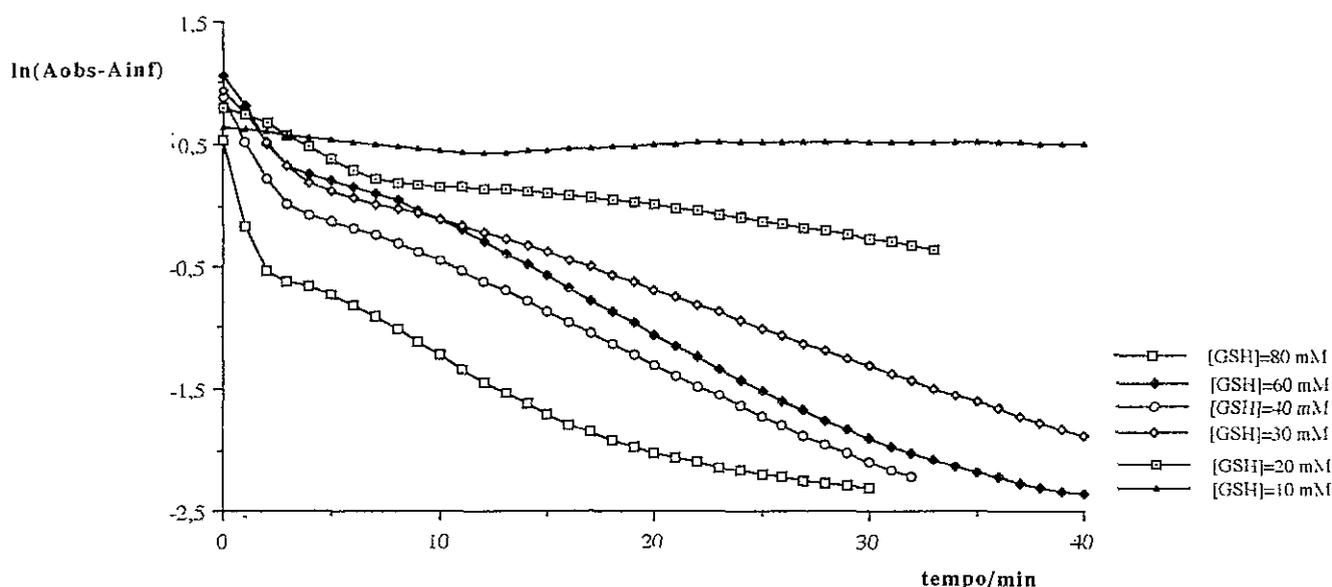


Figura 3.2 - Variação de  $\ln(A_{obs} - A_{\infty})$  com o tempo, em condições de pseudo-primeira ordem, para diferentes concentrações de GSH (reacções seguidas a 372 nm)

A verificação da não linearidade na totalidade destas reacções de redução já antes havia sido referida por Connitt *et al* [99] e, mais recentemente por outros autores [132], que lhes atribuíram um carácter bifásico, ou mesmo multifásico [52], apesar de alguma literatura fazer esperar o contrário [100]. A diminuição inicial, muito rápida, da concentração de Cr(VI) é também citada em vários outros trabalhos [113,135]. Branca *et al* [135], por exemplo, observaram, por polarografia diferencial pulsada, que durante os três primeiros minutos de reacção, 50% da totalidade do Cr(VI) era reduzido pela glutathiona, o que, aparentemente, não foi tão extenso no trabalho de Connitt *et al* [99]. Estas diferenças talvez possam ter explicação na utilização, neste último trabalho [99], de soluções tamponizadas com Tris.HCl, uma vez que este tampão parece catalisar este tipo de reacções [113] (Ver Tabela 3.3, à frente).

Numa primeira tentativa, o cálculo das constantes de velocidade daquelas reacções foi efectuada a partir da tangente da representação gráfica de  $\ln(A_{obs} - A_{\infty})$  em função do tempo (método de integração), usando apenas as primeiras partes, lineares, dos referidos gráficos (Figura 3.2). Foi igualmente tentado o método das velocidades iniciais, já que assim era suposto evitar-se a interferência dos intermediários que demoram "um certo tempo" a começar a formar-se. No entanto, os resultados obtidos apenas evidenciaram a falta de precisão no cálculo daquelas constantes, por se terem

apenas alguns pontos no início da reacção, aspecto que é mais acentuado para as reacções em que se utilizaram concentrações de redutor mais elevadas, que são as reacções mais rápidas.

Na Tabela 3.1 estão comparados os resultados obtidos neste trabalho com os de um outro efectuado em condições experimentais análogas, entretanto realizado e publicado por outro grupo de investigação [100].

| [GSH] mM | $k_{obs}/s^a$ | $k_{obs}/s^b$ | $k_{obs}/s^c$ | $k_{obs}/s^{d,e}$ | $k_{obs}/s^{d,f}$ | $k_{obs}/s^{d,g}$ |
|----------|---------------|---------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 10       | 0.32          | 0.35          | ---           | ---               | ---               | ---               |
| 20       | 1.45          | 1.06          | 1.81          | 5.27              | 3.71              | 3.6               |
| 30       | 3.44          | 2.80          | ---           | ---               | ---               | ---               |
| 40       | 5.56          | 3.08          | 5.72          | 12.1              | 8.58              | 8.0               |
| 60       | ---           | ---           | ---           | 19.5              | 14.2              | 12.9              |
| 80       | 11.94         | 3.44          | ---           | 25.2              | 20.8              | 18.8              |
| 100      | ---           | ---           | ---           | 33.8              | 26.7              | 25.0              |

Tabela 3.1 - Constantes de velocidade de pseudo-primeira ( $k_{obs} \times 10^3$ ) para a reacção de redução de Cr(VI) por GSH; a)-Este trabalho: cálculo a partir da representação gráfica de  $\ln(A_{obs} - A_{\infty})$  em função do tempo, em água, pH=7; b)-Este trabalho: cálculo pelo método das velocidades iniciais (idem); c)-Reacção repetida nas mesmas condições experimentais de d), em água, pH=7; d)-Ref<sup>a</sup> [100], pH=7, e)-Ref<sup>a</sup> [100], em HEPES, pH=7; f)- Ref<sup>a</sup> [100], em água; d), e) e f) pelo método de integração; g)-Ref [100], em água (método das velocidades iniciais).

Como as constantes de velocidade observadas, de pseudo-primeira ordem, por nós determinadas, tinham sido, de um modo geral, inferiores às apresentadas no outro trabalho [100], na tentativa de explicar as diferenças encontradas, começou-se, numa primeira abordagem, por identificar as condições experimentais exactas utilizadas naquele estudo. Pequenas diferenças em alguns pormenores experimentais poderiam, eventualmente, ter sido a causa dos diferentes resultados obtidos nos dois trabalhos (outro método de adição de reagentes, capaz de possibilitar a obtenção de maior número de dados no início da reacção e utilização de soluções termostatzadas a 25°C). Foram, assim, repetidas algumas das nossas primeiras experiências, exactamente nas mesmas condições experimentais da referência citada [100].

Todavia, mais uma vez os resultados obtidos não foram coincidentes com os do outro trabalho, embora fossem um pouco mais aproximados (Tabela 3.1). No entanto, se forem representados todos os valores de  $k_{obs}$  em função da concentração de glutathiona, constata-se uma dispersão de resultados comum a ambos os trabalhos, sendo todos eles da mesma ordem de grandeza. Os valores numéricos de  $k_{obs}$  parecem, além disso, depender do meio em que a reacção se processa e serem sensíveis ao método de determinação das constantes de velocidade.

Os parâmetros cinéticos **a** e **b** foram calculados de acordo com a lei geral de velocidade referida na Secção 3.2, equação (3.6)<sup>32</sup>, apenas com base na primeira fase rápida das reacções de redução, sendo comparados, Tabela 3.2, com os obtidos em situações análogas.

| Condições experimentais                        | a (valor estimado) | a(=k <sub>2</sub> )/s <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> dm <sup>3</sup> | b (=K)    | Ref <sup>a</sup> |
|--|--------------------|---|-----------|------------------|
| H <sub>2</sub> O; pH=7.0;<br>21°C              | 0.150              | 0.180 (±0.014)  | 64 (±24)  | E.t.             |
| H <sub>2</sub> O; pH=7.0;<br>25°C              | 0.291              | 0.321 (±0.130)  | 50 (±9.5) | [100]            |
| HEPES 0.05 M;<br>pH=7.0; 25°C                  | 0.351(±0.011)      | 0.358 (±0.015)  | 131 (±59) | "                |
| NaClO <sub>4</sub> ; pH=7.0;<br>25°C           | 0.330(±0.004)      | 0.330 (±0.011)  | 91.5(±24) | "                |
| Tris.HCl (1M);<br>pH=7.4; 25°C                 | —                  | 0.20 (±0.03)  | 21 (±7)   | [99]             |
| "  | —                  | 0.433 (1ª fase, rápida)<br>0.068 (±0.025)(2ª fase)                    | —         | [52]             |
| Citrato (0.068 M);<br>I=0.41M; pH=6.6;<br>25°C | —                  | 0.078 (±0.002)  | 231 (±4)  | [132]            |

Tabela 3.2 - Parâmetros cinéticos calculados para a reacção de redução de Cr(VI) com GSH (desvios padrão entre parêntesis); E.t.= este trabalho

<sup>32</sup>  

$$k_{obs} = \frac{ab [Tiol]^2}{1 + b [Tiol]}$$

A atribuição de um mecanismo de pré-equilíbrio à reacção que temos vindo a estudar, em que  $a=k_2$  e  $b=K$  (Tabela 3.2), é justificada pelo facto de um valor elevado do parâmetro **b** ( $K$ =constante de equilíbrio) pressupôr a formação do tioéster, Cr-SR, em quantidade considerada razoável, o que, aliás, pode ser observado pouco tempo após o início da redução, pela cor laranja intensa da mistura em reacção ( $\lambda_{\text{máx}}$  de absorção a cerca de 440 nm). Argumentos idênticos têm sido discutidos na literatura para a redução de Cr(VI) por outros tio-redutores. O'Brien *et al* [100], por exemplo, baseando-se nos valores de **a** e de **b** obtidos a partir de resultados experimentais, concluíram que às reacções de redução do Cr(VI) por GSH e por ácido tiomálico, em meio neutro, se podia atribuir o tipo de mecanismo atrás referido, enquanto que para a redução efectuada pela cisteína ou por ésteres de GSH, era mais consistente considerar um mecanismo de estado estacionário.

Convém também focar que tem vindo a ser contestada a utilização de alguns dos tampões usados para manter constantes o pH e a força iónica daquelas misturas em reacção. Kortenkamp *et al* [113], por exemplo, verificaram diferenças acentuadas nas velocidades de redução de Cr(VI) pela glutatona, em condições experimentais idênticas excepto quanto aos tampões utilizados, tendo observado que, ao fim do mesmo intervalo de tempo, a percentagem de Cr(VI) reduzida variava substancialmente com o tipo de tampão (Tabela 3.3). Comparando o Tris.HCl com o HEPES, ou com o fosfato, o primeiro interfere comprovadamente na velocidade da redução, catalisando-a [113].

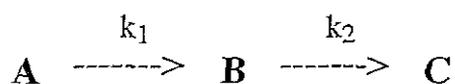
| Tampão             | % de Cr(VI) reduzido |
|--------------------|----------------------|
| Fosfato            | 42                   |
| HEPES              | 76                   |
| Tris.HCl           | 90.5                 |
| s/tampão (em NaCl) | 95                   |

Tabela 3.3 - % de Cr(VI) reduzido pela glutatona após de 2.5 minutos de reacção (pH=7.0); adap. de [113], Fig.4

Em resumo, para estas reacções, embora havendo diferenças entre os valores de  $k_{\text{obs}}$  e os parâmetros **a** e **b** por nós determinados e os da literatura, todos eles são da mesma ordem de grandeza. As diferenças encontradas, embora possam ter alguma origem em pormenores experimentais, resultam também da "aplicabilidade" de cada método de tratamento de dados aos resultados obtidos, da "atribuição" de um determinado tipo de mecanismo que pressupõe, à partida, a determinação de certos parâmetros e, mais provavelmente ainda, da demasiada simplificação de um sistema que já se adivinhava dever ser bastante complexo.

### 3.3.2 - Redução de Cr(VI) por glutatona: tratamento cinético de um sistema bifásico

O sistema Cr(VI) / GSH, em meio neutro, já tinha sido considerado como bifásico [99] ou multifásico [52], o mesmo acontecendo em meio ácido [24]. Por isso, as "anomalias" verificadas em relação a um comportamento cinético simples de 1ª ordem, levaram-nos a efectuar um estudo aprofundado do comportamento cinético das referidas reacções. Começou-se, assim, por estudar estas reacções durante períodos de tempo mais alargados, ou seja, para além do(s) passo(s) inicial(is) de redução rápida. O "perfil de redução" observado, isto é, a variação de absorvância na banda do cromato ao longo do tempo de reacção (Ver Figura 3.1), sugeriu-nos um tratamento de resultados pressupondo uma sequência de, pelo menos, dois passos, cuja cinética pudesse ser, eventualmente, ajustada a uma equação capaz de traduzir um sistema de duas reacções consecutivas de 1ª ordem, segundo o esquema seguinte:



Os dados espectrofotométricos obtidos (variação de absorvância com o tempo, a 372 nm, no decorrer das reacções de redução), foram então ajustados à equação não linear (3.7) [136] <sup>33</sup>.

---

<sup>33</sup> Considerando  $D = \epsilon_A A + \epsilon_B B + \epsilon_C C$  (coeficientes de absorvidade molar das espécies A, B, e C),

$$Abs = (\epsilon_A - \epsilon_C) \exp(-k_1 t) + k_1(\epsilon_B - \epsilon_C) [ \exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 t) ] / (k_1 - k_2) + \epsilon_C \quad (3.7)$$

Nesta equação,  $k_1$  e  $k_2$  (constantes de velocidade para cada um dos passos daquelas reacções) e  $\epsilon_B$  (coeficiente de absorvidade molar do intermediário B), são parâmetros desconhecidos, que vão sendo ajustados por um método iterativo, após serem fornecidas estimativas desses mesmos parâmetros [136,137]. Da resolução da equação (3.7) obtêm-se dois conjuntos de soluções, correspondendo um deles às constantes de velocidade  $k_1$  e  $k_2$  (constantes observadas) referentes àqueles dois processos. No Capítulo 7 - Secção A, são dados pormenores do tratamento matemático efectuado.

### 3.3.2.1 - Resultados

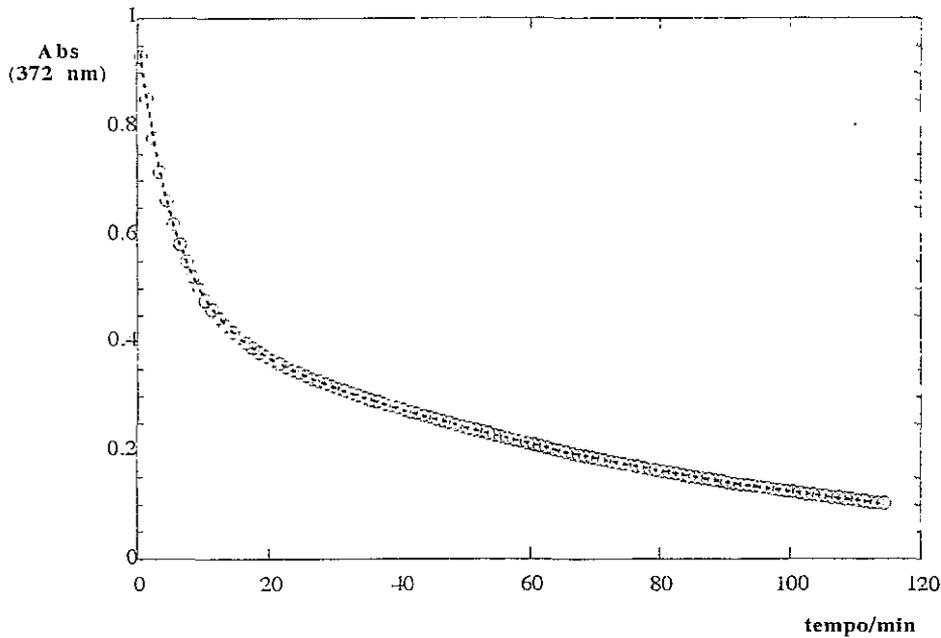


Figura 3.3 - Ajuste da equação (3.7) à variação de absorvância com o tempo:  $[Cr(VI)] = 0.25 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $[GSH] = 1.00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  (1 Cr(VI) : 40 GSH); pH=7.0 (HEPES  $0.2 \text{ mol dm}^{-3}$ )

O ajuste da equação (3.7) aos dados de variação de absorvância com o tempo foi,

$[A_0]=1$  e  $D$ = densidade óptica da mistura em reacção no tempo  $t$ :

$$D = (\epsilon_A - \epsilon_C) \exp(-k_1 t) + k_1(\epsilon_B - \epsilon_C) [ \exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 t) ] / (k_1 - k_2) + \epsilon_C$$

de um modo geral, conseguido para as diversas condições experimentais utilizadas (exemplo na Figura 3.3), a partir do qual foram determinadas as respectivas constantes de velocidade de reacção,  $k_1$  (obs) e  $k_2$  (obs) (Tabela 3.4) <sup>3.4</sup>. No entanto, este ajuste foi

| [GSH] / mM | Condições experimentais | $10^3 \times k_1/s^{-1}$ | $10^4 \times k_2/s^{-1}$ | ** $k_2$ (obs) |
|------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------|
| 1.25       | Hepes 0.2 M             | 1.84 (0.04)              | 0.65 (0.15)              | ---            |
| 1.25       | sem O <sub>2</sub>      | 1.98 (0.12)              | 0.037 (0.050)            | ---            |
| 2.5        | sem O <sub>2</sub>      | 1.67 (0.01)              | 1.10 (0.10)              | ---            |
| 2.5        | Hepes 0.2 M             | 2.71 (0.02)              | 0.55 (0.03)              | ---            |
| 5.0        | meio não tamponizado    | 1.22 (0.02)              | 0.05 (0.01)              | ---            |
| 5.0        | Hepes 0.05 M            | 2.75 (0.01)              | 1.27 (0.02)              | ---            |
| 5.0        | Hepes 0.2 M             | 2.54 (0.02)              | 1.21 (0.07)              | ---            |
| 10.0       | Hepes 0.05 M            | 3.05 (0.02)              | 2.48 (0.07)              | ---            |
| 20.0*      | não tamponizada         | 14.37 (1.30)             | 3.82 (0.02)              | 4.30           |
| 30.0*      | "                       | 14.35 (0.98)             | 10.84 (0.07)             | 9.91           |
| 40.0*      | "                       | 17.10 (1.27)             | 16.78 (2.05)             | 13.82          |
| 80.0*      | "                       | 20.40 (1.96)             | 15.66 (2.11)             | 16.79          |

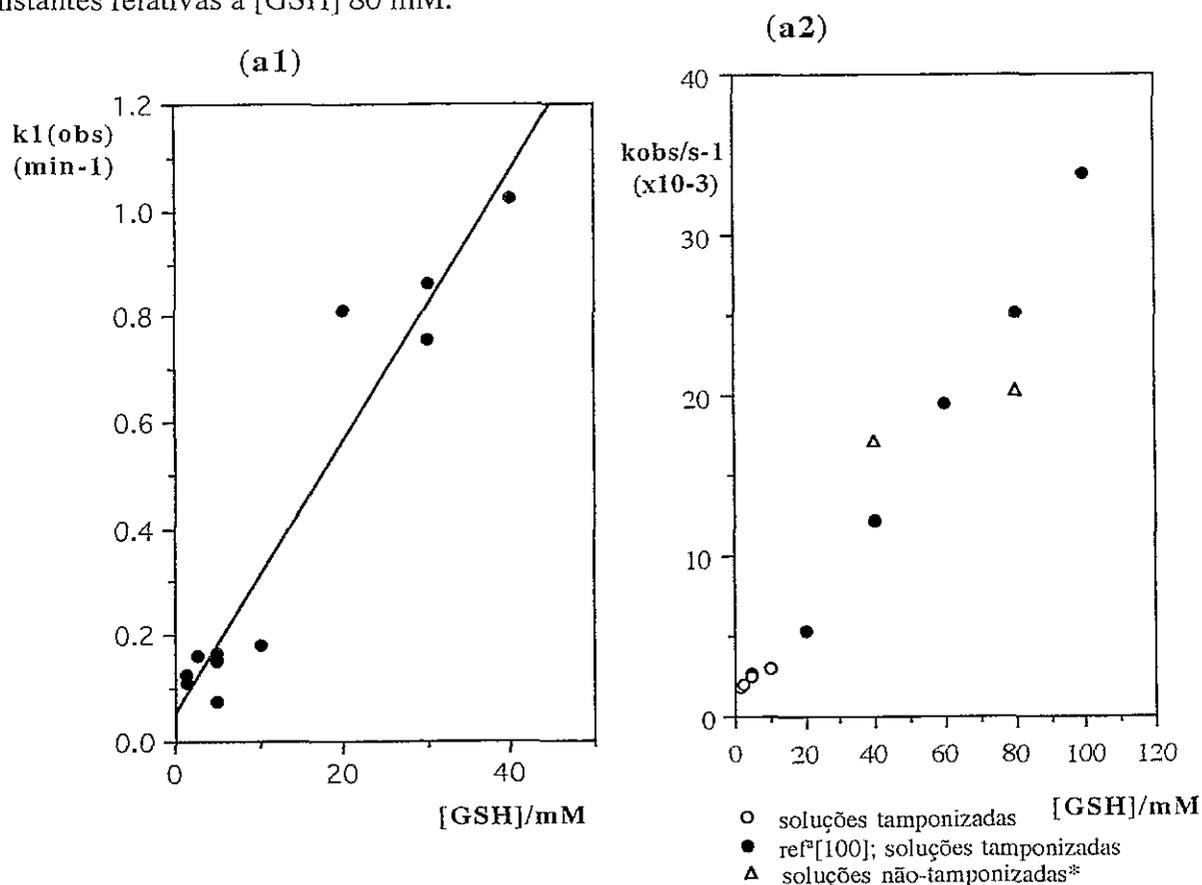
Tabela 3.4 - Constantes de velocidade (observadas), determinadas a partir da equação (3.7) aplicada à variação de absorvância com o tempo, durante a redução de Cr(VI) pela GSH (372 nm); [Cr(VI)] =  $2.5 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>; \* [Cr(VI)] =  $1.0 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>; \*\*  $k_2$ (obs) calculadas a partir da 2ª parte destas reacções de redução:  $\ln(A_{obs}-A_{\infty})$  linear

menos bem conseguido para as reacções em que se utilizaram concentrações de GSH mais elevadas (soluções não tamponizadas, assinaladas com \* na Tabela 3.4). Nestes casos, isso pode dever-se às alterações de pH que se verificam durante a redução (para

<sup>3.4</sup> Os valores de  $\epsilon_B$  determinados pelo ajuste anterior são da ordem de grandeza do coeficiente de absorvidade molar proposto para o intermediário tioéster por McAuley *et al* [21,73,74] (Ver detalhes destes valores no Capítulo 7 - Secção A).

as soluções com menores concentrações de GSH, não tamponizadas) e que originam "perfis de redução" diferentes (ver Figura 3.1). Para as reacções em que se usaram concentrações de GSH mais elevadas, apesar de haver tamponização pela própria solução de GSH, o ajuste foi "pobre" em consequência do reduzido nº de pontos conseguido no início das reacções, sendo assim  $k_1$  a constante mais afectada. Se se determinarem constantes de velocidade a partir apenas da 2ª parte daquelas reacções, obtêm-se valores que se coadunam com as constantes  $k_2$  determinadas a partir do ajuste à equação (3.7) (coluna \*\* na Tabela 3.4).

A análise destas constantes de velocidade (Tabela 3.4), permite constatar que, apesar da gama alargada de concentrações de glutathiona utilizadas nas diferentes experiências, se verifica uma dependência, praticamente linear, entre os valores destas constantes e a concentração do redutor (GSH), se se excluírem as constantes obtidas para [GSH] 80 mM, pelas razões já apontadas atrás. Da referida relação "constantes de velocidade / [GSH]" é possível determinar estimativas para as constantes de velocidade de 2ª ordem relativas aos dois passos atrás referidos (Figura 3.4), excluindo, de novo, as constantes relativas a [GSH] 80 mM.



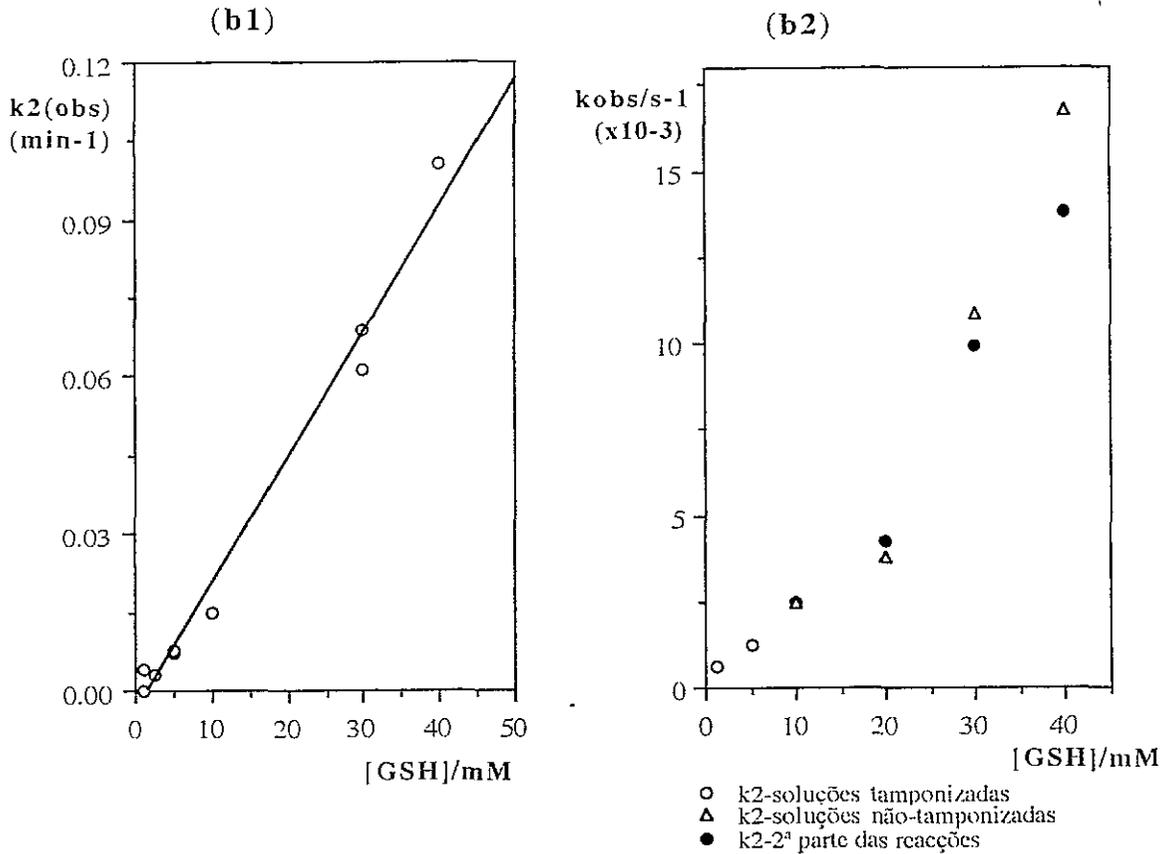


Figura 3.4 - Determinação das constantes de 2ª ordem (estimativas), relativas aos dois primeiros passos das reacções de redução de Cr(VI) por GSH: (a<sub>1</sub>)-k' <sub>1</sub> (≈0.426 mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>); (a<sub>2</sub>)- representação gráfica de k<sub>obs</sub> em função de [GSH]: (●) ref<sup>a</sup> [100], em HEPES; (○) k<sub>1</sub>(obs), segundo ajuste à equação (3.7), a partir dos resultados da Tabela 3.4; (△) segundo ajuste à equação (3.7), a partir dos resultados da Tabela 3.4, para as soluções não tamponizadas\*, com [GSH]=40 e 80 mM; (b<sub>1</sub>)- k' <sub>2</sub> (≈ 4.02 x 10<sup>-2</sup> mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup>s<sup>-1</sup>); (b<sub>2</sub>)-representação gráfica de k<sub>obs</sub> em função de [GSH]: (○) k<sub>2</sub>(obs), segundo ajuste à equação (3.7), a partir dos resultados da Tabela 3.4, soluções tamponizadas; (△) segundo ajuste à equação (3.7), a partir dos resultados da Tabela 3.4, para as soluções não tamponizadas\*, com [GSH]=20 , 30 e 40 mM; (●) k<sub>2</sub> (calculados a partir da 2ª parte das reacções de redução, soluções não tamponizadas\* (ln(A<sub>obs</sub>-A<sub>∞</sub>) linear)

O "perfil de redução" destas reacções sofre alterações drásticas para proporções Cr(VI) : GSH menores (ou iguais se as soluções não forem tamponizadas) que 1: 10. Ao contrário do que se esperaria, a partir de um determinado intervalo de tempo, ao comprimento de onda a que foram seguidas estas reacções, 372 nm, a, observa-se um aumento de absorvância com o tempo de reacção (Figura 3.5), não sendo possível ajustar os dados à equação (3.7).

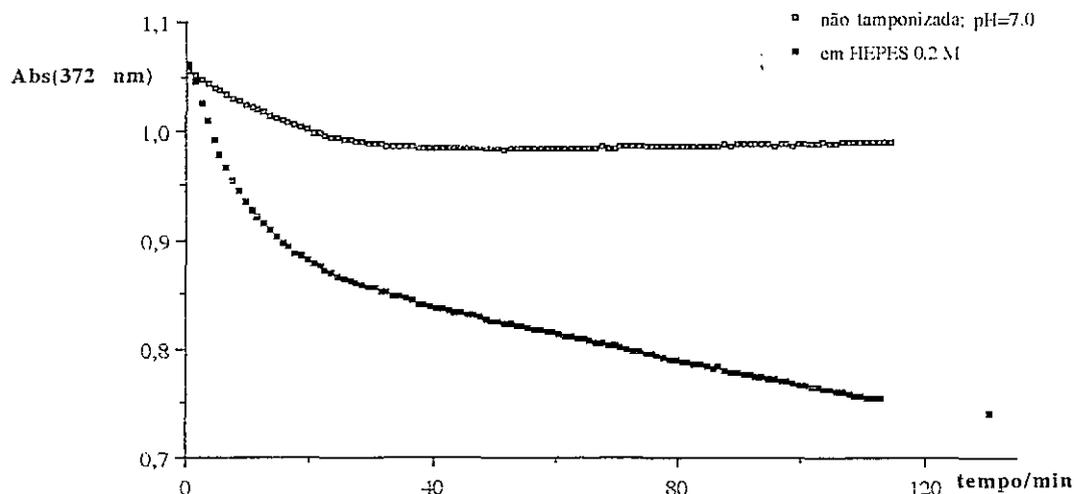


Figura 3.5 - Variação da absorvância com o tempo de reacção, a 372 nm, para as reacções de redução de Cr(VI) com glutatona: [Cr(VI)]=1 mM e [GSH]=10 mM; (□)-soluções com pH ajustado previamente a 7,0; (■)-soluções tamponizadas com HEPES 0,2 M

Quais os factores responsáveis pelo aumento de absorvância, após a diminuição rápida inicial (Figura 3.5)? Numa primeira análise, poderia pensar-se na interferência de alguma(s) espécie(s) formada(s) na reacção, que também absorvesse(m) àquele comprimento de onda. Como as reacções de redução tinham sido efectuadas sem exclusão do contacto com o oxigénio do ar, pôs-se a hipótese de que um processo paralelo de oxidação pudesse ser a causa daquele comportamento anómalo. Algumas das experiências foram repetidas em condições anaeróbicas, mas não se observaram diferenças notórias <sup>3.5</sup>. Uma vez que no primeiro conjunto de experiências não tinham sido utilizadas soluções tamponizadas (o pH das soluções de Cr(VI) e de GSH fora apenas previamente ajustado a 7,0 com KOH), levantou-se a questão das misturas em reacção poderem levar a alterações significativas de pH durante a redução, especialmente nos casos das menores proporções de Cr(VI) / GSH, para as quais se tinham observado as "anomalias" mais acentuadas. Embora no caso das proporções Cr(VI) / GSH mais elevadas aquelas alterações de pH, num período de mais de 2 horas,

<sup>3.5</sup> O grupo do Dr. Kortenkamp tem estado a trabalhar neste problema, utilizando estas proporções de Cr(VI)/GSH, mas com concentrações de Cr(VI) e de GSH muito baixas. Nestas condições, o O<sub>2</sub> também parece contribuir para a oxidação da GSH, fazendo prever um mecanismo alternativo à redução intracelular do Cr(VI).

não fossem superiores a 0.5, para as proporções mais baixas constataram-se variações de até 1.5 unidades de pH <sup>36</sup>. Algumas daquelas reacções foram, então, repetidas com soluções tamponizadas, em HEPES, cuja concentração, após várias tentativas, foi optimizada a 0.2 mol dm<sup>-3</sup> (a respectiva capacidade tampão é excedida para concentrações menores). À variação de absorvância correspondente à diminuição da concentração de cromato foi então também possível, para alguns destes últimos casos, fazer o ajuste da equação anterior (3.7) e determinar as constantes de velocidade  $k_1$  e  $k_2$  (Tabela 3.4).

### 3.3.2.2 - Discussão de resultados

O significado a atribuir às constantes de velocidade  $k_1$  e  $k_2$  (constantes observadas) calculadas na Secção anterior (Tabela 3.4) e a sua eventual relação com as constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem,  $k_{obs}$ , anteriormente determinadas (Tabela 3.1), foi o objectivo seguinte deste trabalho. Do conjunto de resultados obtidos nos dois casos, a única correspondência possível de estabelecer, dada a variedade de concentrações de glutatona envolvidas, está entre os valores de  $k_1$  (Tabela 3.4) e os de  $k_{obs}$  (Tabelas 3.1). Aquelas constantes,  $k_{obs}$ , devem corresponder, provavelmente, ao 1º passo da reacção de redução agora estudado, ou seja, à transformação rápida do cromato em tioéster, devendo-se a "fraca coincidência" entre aqueles valores, possivelmente, à interferência da constante  $k_2$  na determinação de  $k_{obs}$ , a partir apenas da 1ª parte da reacção de redução. A 2ª constante,  $k_2$ , deve, pois, representar a decomposição desse mesmo tioéster, mais lenta.

Muito recentemente [132], um outro grupo de autores usou um sistema matemático análogo ao tratamento cinético que foi aplicado neste trabalho, resultando daí também, além das outras constantes cinéticas, a determinação da constante de

---

<sup>36</sup> Esta variação de pH está em concordância com o esperado consumo de protões, a partir da equação química que traduz a reacção, o qual, para os casos em que a concentração da glutatona é mais elevada (a concentração de Cr(VI) foi a mesma para todas as reacções) é compensado pelo efeito tampão proporcionado pela própria glutatona, presente em excesso, na mistura em reacção.

equilíbrio da referida reacção, a partir do conhecimento da constante  $k_{-1}$  (Ver Secção 3.2, equação 3.1). As respectivas constantes de 2ª ordem,  $k_1 = 0.411 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ , correspondente ao 1º passo da redução e  $k_2 = 7.8 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ , relativa ao 2º passo, estão em concordância com os resultados obtidos neste trabalho, ou seja,  $k'_1 = 0.426 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$  e  $k'_2 = 4.02 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ , (Figura 3.4). No entanto, a comparação com outros resultados da literatura [99,100] não se apresenta fácil, parecendo-nos que apenas é possível fazê-lo no caso da referência [52], a qual já reportava o sistema Cr(VI) / GSH como bifásico e para a qual  $k_1 = 0.433 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$  e  $k_2 = 6.8 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ . No primeiro trabalho [132], as comparações feitas para justificar a aplicação do sistema matemático utilizado, parecem-nos assentar em alguma confusão na identificação dessas constantes<sup>37</sup>. Mesmo assim, as constantes determinadas pelo ajuste matemático a um sistema bifásico reforçam, mais uma vez, os argumentos a favor da atribuição, à redução de Cr(VI) pela glutathiona em meio neutro, de um mecanismo de pré-equilíbrio (Ver Secção 3.2) [52,99,100,131,132].

Outras evidências para este mecanismo são dadas quer pela observação directa da formação do tioéster (cor laranja das soluções), quer pelos resultados obtidos para a variação de absorvância em função do tempo, a 433 nm (formação e decomposição do tioéster), como veremos mais detalhadamente na Secção 3.4.

Para proporções Cr(VI)/GSH abaixo das condições de pseudo-primeira ordem, porém, torna-se difícil estabelecer considerações do mesmo tipo. Como a quantidade de GSH não é suficiente para garantir sequer as condições estequiométricas de reacção (considerando 1Cr(VI)/1 GSH ou 0.5 GSH) para que o segundo passo da reacção (reacção com a segunda molécula de tiol) se possa efectivar de um modo quantitativo, propiciam-se, provavelmente, condições para que predominem outros passos de redução, por vias em que esteja envolvido apenas "um único electrão" [131]. Desse

---

<sup>37</sup> Por exemplo, segundo Connett *et al* [99], a constante de velocidade de 2ª ordem ( $0.200 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ ) é identificada nesse trabalho como  $k_2$  enquanto que no trabalho de Perez-Benito *et al* [132] é considerada, para efeitos de comparação, como  $k_1$ .

modo, poder-se-ão formar outros intermediários, de Cr(V), Cr(IV) ou radicais livres, por exemplo, que noutras circunstâncias não seriam dominantes. Poderá pôr-se mesmo a hipótese de que a presença destes compostos possa ter sido a responsável pelas "anomalias" do aumento de absorvância encontrado atrás. Dependendo do pH e em condições experimentais diferentes das que se observam com grande excesso de ligando, há possibilidades de ocorrer um conjunto de reacções diferente do habitual, o que não facilita a compreensão destes processos [24,100].

### **3.3.3 - Estudos cinéticos por "stopped-flow"**

Embora o modelo de mecanismo que comporta uma situação de pré-equilíbrio inicial seja, normalmente, adoptado para a redução de Cr(VI) pela glutathione, os mecanismos sugeridos para reacções análogas com outros tióis [52,60,99,100,127] e, em especial para os casos em que o redutor é a cisteína, não são concordantes entre si, não se apresentando, na literatura, argumentos claros a favor das propostas apresentadas [60,100]. Uma vez que no estudo da redução de Cr(VI) pela glutathione se constatou a existência de um passo inicial muito rápido, pareceu-nos adequado seguir a primeira parte destas reacções por métodos aplicados a cinética rápida, isto é, por "stopped-flow". Assim, foram estudadas reacções de redução de Cr(VI) com cisteína e com penicilamina, em meio neutro. Com a glutathione, não foi possível efectuar este trabalho em meio neutro, porque as concentrações elevadas de redutor que seria necessário utilizar, por limitações do equipamento de "stopped-flow" disponível, excediam a capacidade tampão das soluções.

As reacções decorreram em condições de pseudo-primeira ordem, em soluções tamponizadas com Tris.HCl ou HEPES. No Capítulo 7 - Secção A estão descritos os detalhes das experiências efectuadas, apesar de no texto, em tabelas, gráficos ou figuras serem referidas, sempre que se tenha julgado necessário, algumas das condições experimentais usadas.

### 3.3.3.1 - Resultados

A redução de Cr(VI) foi seguida a 372 nm (máximo da banda do cromato). Observou-se uma diminuição da absorvância com o tempo (Ver Capítulo 7-Secção A), tanto nas reacções com cisteína como com penicilamina. As reduções seguiram uma cinética de 1ª ordem, excepto para as concentrações mais elevadas de cisteína, nas quais se verificaram desvios da linearidade, ao fim de intervalos de tempo tanto mais curtos quanto maior a concentração do redutor.

[Cys]=0,125 M (1 Cr(VI):500 Cisteína), em Tris.HCl 0.05M

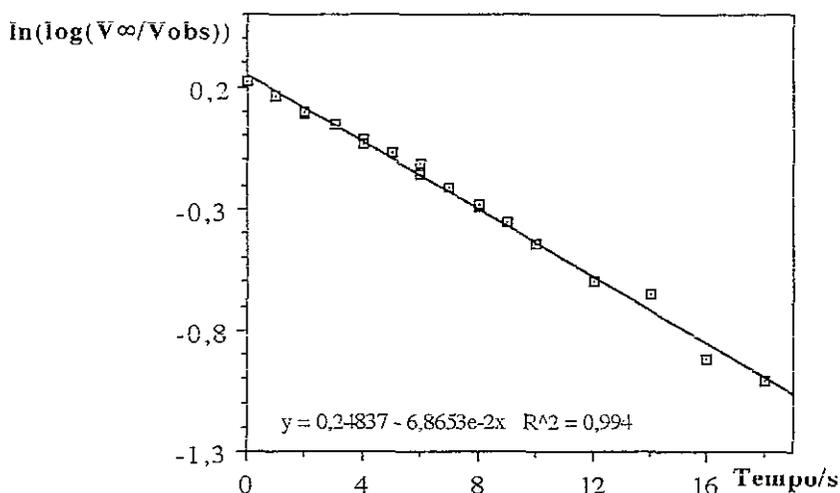


Figura 3.6 - Determinação gráfica de  $k_{obs}$ , a partir da variação de absorvância com o tempo, obtida por "stopped-flow": reacção de redução de Cr(VI) com L-cisteína (1:500);  $[Cr(VI)] = 2.5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $[L\text{-cisteína}] = 0.125 \text{ mol dm}^{-3}$

As respectivas constantes de velocidade de redução de pseudo-primeira ordem,  $k_{obs}$ , foram obtidas pelo método de integração, a partir de representações gráficas (lineares) de  $\ln(A_{obs} - A_{\infty})$  em função do tempo, (Figura 3.6) e estão compiladas na Tabela 3.5. Uma vez que a literatura refere, para estas reacções de redução, a acção catalítica do tampão Tris.HCl [113], esperava-se que as constantes obtidas nessas soluções fossem superiores às obtidas em HEPES. No entanto, isso só foi observado, e de modo pouco significativo, para a reacção em que se usou a concentração de cisteína mais baixa.

| [Redutor] / mol dm <sup>-3</sup> | 10 <sup>3</sup> x k <sub>obs</sub> / s <sup>-1</sup> (Cisteína) |        | 10 <sup>3</sup> x k <sub>obs</sub> / s <sup>-1</sup> (Penicilamina) |       |
|----------------------------------|---|--------|---|-------|
|                                  | Tris.HCl  | HEPES  | Tris.HCl  | HEPES |
| 0.005                            | 8.38  | ---    | ---   | ---   |
| 0.025                            | 13.76   | ---    | ---   | ---   |
| 0.050                            | 33.60   | 27.84  | 8.49  | ---   |
| 0.100                            | --  | ---    | ---   | 22.20 |
| 0.125                            | 68.65   | 86.34  | 27.16   | ---   |
| 0.250                            | 132.86  | 148.89 | ---   | 62.89 |
| 0.500                            | 192.84  | 255.74 | ---   | ---   |

Tabela 3.5 - Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem, k<sub>obs</sub>, para as reacções de redução de Cr(VI) com cisteína, ou com penicilamina, obtidas por "stopped-flow"; soluções tamponizadas com Tris.HCl ou HEPES 0.05 mol dm<sup>-3</sup>, pH=7.0; [Cr(VI)]=2.5 x 10<sup>-4</sup> mol dm<sup>-3</sup>

### 3.3.3.2 - Discussão dos resultados

A comparação entre os resultados obtidos em trabalhos diferentes é dificultada, mais uma vez, pelo facto de haver diversidade de condições experimentais, nomeadamente no que diz respeito às concentrações do redutor e ao tipo de tampão utilizado. No entanto, embora os valores de k<sub>obs</sub> obtidos por "stopped-flow", sejam, de um modo geral, mais elevados que os obtidos por espectrofotometria de UV/Vis, verifica-se uma concordância aceitável entre todos eles [60,99,100].

Se se compararem estas constantes de redução de Cr(VI) pela L-cisteína com as da redução pela GSH, os valores mais elevados das primeiras (obtidos por "stopped-flow") podem ser devidos à possibilidade de detecção, por este método, de um 1º passo mais rápido, correspondente à constante de velocidade k<sub>1</sub>, que não foi possível obter para a glutatona e que, por UV/Vis, aparece um pouco "mascarado" pela influência do 2º passo, mais lento (Ver Secção 3.3.2.2). De qualquer modo, as constantes mais elevadas no caso da cisteína são, muito mais marcadamente, influenciadas pela carga do ligando. Enquanto que, em meio neutro, no caso da glutatona estão envolvidas duas

espécies aniónicas, com a acisteína há uma espécie neutra e outra aniónica.

Foram também determinadas constantes de velocidade de 2ª ordem para estas reacções de redução (Tabela 3.6, ver legenda), que são comparadas com as obtidas noutros trabalhos 3.8.

| Redutor                  | pH      | T/°C | Condições experimentais   | $k_2 / M^{-1} s^{-1}$ | K                   | Ref. <sup>a</sup> |
|--------------------------|---------|------|---|-----------------------|---------------------|-------------------|
| L-cisteína               | 1.0-1.7 | 25   | I=1.0M (NaClO <sub>4</sub> /HClO <sub>4</sub> )                                     | 0.012±0.003           | 1030±110            | [21]              |
| "                        | 7.0     | 25   | H <sub>2</sub> O  | 1.17±0.003            | 197±3.1             | [100]             |
| "                        | 7.0     | 25   | NaClO <sub>4</sub> 1M   | 0.730±0.026           | 247±62              | "                 |
| "                        | 7.0     | 25   | HEPES   | 0.890±0.011           | 582±111             | "                 |
| "                        | 7.02    | 25   | CH <sub>3</sub> COOH/CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup><br>I=1.0 M NaClO <sub>4</sub> | 0.64±0.13             | 220±25              | [60]              |
| "                        | 7.02    | 15   | "   | 0.30                  | 250±25              | "                 |
| "                        | 7.4     | 25   | Tris.HCl 1M   | 1.250±0.133           | 65                  | [99]              |
| "                        | 7.0     | 21   | Tris.HCl 0.05 M   | 0.57                  | ~10 <sup>4</sup> a) | E.t.              |
| "                        | 7.0     | 21   | HEPES 0.05 M  | 0.54                  | ~10 <sup>4</sup> a) | E.t.              |
| D,L-<br>penicilamina     | ~1      | 25   | I=1.0M NaClO <sub>4</sub>   | 0.143±0.01            | 700±40              | [73,74]           |
| D- ou L-<br>penicilamina | 7.0     | 21   | Tris.HCl 0.05 M   | 0.249 b)              | ---                 | E.t.              |
| "                        | 7.0     | 21   | HEPES 0.05 M  | 0.271 b)              | ----                | E.t.              |
| "                        | 7.0     | 30   | CH <sub>3</sub> COOH/CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>                               | 0.549±0.046 b)        | ---                 | [127]             |
| "                        | 7.4     | 25   | Tris.HCl 1M   | 0.348±0.063 b)        | ---                 | [52]              |

Tabela 3.6 - Parâmetros cinéticos de 2ª ordem, para reacções de redução de Cr(VI) por cisteína e por penicilamina; a) - determinados por um ajuste não linear, admitindo a lei de velocidade:

$$k_{obs} = \frac{ab [Tiol]^2}{1 + b [Tiol]}$$

b) - determinada por ajuste linear de  $k_{obs} = a [Tiol]$  (Ver explicação à frente, no texto)

Da análise desta Tabela pode constatar-se, para o mesmo redutor e em condições

38 Admitindo um mecanismo de pré-equilíbrio, cuja atribuição é discutida na Secção 3.4.3

experimentais idênticas, alguma concordância entre aquelas constantes, excepto para reacções efectuadas em meio muito ácido.

Como a formação do tioéster parece ser influenciada pela carga do redutor poderia prever-se, em termos estritamente electrostáticos, que as reacções de formação deste intermediário fossem tanto mais favoráveis quanto menos negativa fosse a carga daqueles [99,100], o que concorda com o facto de que, num meio muito mais ácido, os redutores estejam protonados, não apresentando, por isso, carga negativa (e daí os valores das constantes de equilíbrio,  $K$ , serem muito mais elevadas em meio ácido). Quanto à constante  $k_2$ , correspondente à redução do tioéster, que em meio neutro é efectuada por reacção com uma segunda molécula de tiol e em meio ácido por reacção simultânea e competitiva deste intermediário com  $H^+$ , é difícil prever qualquer ordem de grandeza que possibilite a comparação entre resultados obtidos nos dois meios.

É usual, nestas reacções de redução, fazer-se a atribuição de um determinado tipo de mecanismo, com base essencialmente em dois factores, com os quais se pretende, evidenciar a formação, ou não, de um intermediário do tipo tioéster, no início da reacção. Neste caso, partindo da hipótese de que um dos mecanismos propostos para estas reacções (Ver Secção 3.2) reúne argumentos suficientes a seu favor, a sua adopção é admitida. Aqueles factores são:

- i) - a observação da formação e decomposição do tioéster, directamente pela cor da solução ou por dados de espectrofotometria (Ver Secção 3.4, à frente);
- ii) - a ordem de grandeza do parâmetro **b**, obtido a partir de um ajuste não-linear de dados à equação (3.6).

A evidência da presença do tioéster e um valor muito elevado do parâmetro **b**, são assim, em geral, condições suficientes para a atribuição de um mecanismo de pré-equilíbrio a estas reacções. Se **b** for pequeno e não houver indícios de formação do tioéster, é atribuído um mecanismo de estado estacionário (Ver Secção 3.2).

Observando a Tabela 3.6, pode verificar-se que o parâmetro **b**, determinado a partir do ajuste não linear à equação (3.6), apresenta um valor muito elevado (Ver

também legenda da Tabela 3.6). No entanto, como a representação gráfica das constantes  $k_{obs}$  em função da concentração de cisteína se desviou muito pouco da linearidade, o valor estimado de **a** praticamente coincidiu com o mesmo valor determinado por ajuste não linear, o que implicou alguma indeterminação na obtenção de **b**, complicando as conclusões que possam ser tiradas apenas com base neste parâmetro. Muito embora a cor laranja característica do tioéster nem sempre se tenha observado no decorrer destas reacções, no estudo efectuado por "stopped-flow" com a cisteína foi detectada a formação e a decomposição de um intermediário, com um máximo de absorção entre 430-460 nm, isto é, na região típica do máximo de absorção destes compostos. Apesar de com estes redutores, só ter havido, até aqui, evidência da presença deste intermediário em meio muito ácido [21,74], neste trabalho, além da sua detecção, foram obtidos resultados cinéticos para as respectivas formação e decomposição (Ver Secção 3.4, a seguir). É pois, com base nestes dois factores, que propomos um mecanismo de pré-equilíbrio para a redução do Cr(VI) pela cisteína, em meio neutro. A literatura é confusa nesta matéria, pois enquanto alguns autores assumem para esta reacção o mecanismo de pré-equilíbrio aqui proposto, com uma base pouco clara [99] ou por tentativa de comparação com o que se verifica em meio ácido [60], também é admitido um mecanismo de estado estacionário [100], fundamentando-se na não observação do tioéster e na interpretação do parâmetro **a** (que representa a constante  $k_1$  no mecanismo de estado estacionário), o qual apresentou valores pequenos neste último trabalho.

A reacção com penicilamina é mais lenta, não se conhecendo da literatura, outros dados de  $k_{obs}$  obtidos por "stopped-flow", para comparação. Já em reacções de substituição por abertura de anel em complexos de Cr(III), as reacções com penicilamina apresentavam velocidades menores por comparação com as observadas para a cisteína (Ver Capítulo 4). Factores de impedimento estereoquímico poderão estar na origem destas diferenças, uma vez que o "acesso" ao grupo tiol deste aminoácido, oxidado pelo Cr(VI) durante a reacção, é dificultado pela presença dos dois grupos metilo que o rodeiam, muito embora aqueles grupos sejam dadores de carga eléctrica. A

dependência entre as constantes de velocidade e a concentração do redutor, é, neste caso, perfeitamente linear, o que permitiu determinar uma constante de velocidade de 2ª ordem, razoavelmente concordante com outros resultados obtidos por espectrofotometria de UV/Vis, também em meio neutro (Tabela 3.6) [99]. A atribuição de um mecanismo às reacções efectivadas com este redutor pareceu-nos, pois, pacífica. Como não foi observada a formação do tioéster (o que pode ter sido, mais uma vez, devido às limitações do equipamento de "stopped-flow", por não permitir obter dados numa escala de tempo superior a 20 segundos) e se verifica uma relação linear entre  $k_{obs}$  e a concentração de penicilamina, a cinética desta reacção de redução pode ser explicada por um mecanismo em que o passo determinante da velocidade seja a reacção deste aminoácido com o Cr(VI), formando um tioéster que é, em seguida, reduzido rapidamente. Neste caso, as constantes cinéticas de 2ª ordem correspondem à constante  $k_1$ , definida na Secção 3.2.

### **3.4 - Intermediários em reacções de redução de Cr(VI) por tioredutores**

A formação e a decomposição de intermediários é um facto comum nas reacções de redução de Cr(VI) e uma consequência directa da passagem obrigatória do crómio, no seu trajecto de redução, do estado de oxidação +6 até ao +3. No âmbito do trabalho que tem vindo a ser apresentado nesta dissertação, consideraram-se, em particular, os intermediários formados quando a redução do Cr(VI) é efectuada por redutores que contêm o grupo tiol. Nesta Secção, dar-se-à especial atenção aos aspectos estruturais e à cinética de formação de intermediários do tipo tioéster, nos quais o crómio ainda se encontra no estado de oxidação +6.

#### **3.4.1 - Intermediários de Cr(VI)**

A formação de tioésteres é aceite em todos os trabalhos publicados sobre a redução de Cr(VI) por tio-redutores, sendo à partida prevista (e proposta) em todos os mecanismos aplicáveis a estas reacções (Ver Secção 3.2), tendo a sua presença sido detectada tanto em meio ácido (reacções com cisteína, glutathiona e penicilamina)

[21,73,74], como em meio neutro (especialmente no caso da redução com glutationala) [22,52,99,100]. Tioésteres com características semelhantes foram também observados em reacções de redução de Cr(VI), em meio ácido, efectivadas por redutores doutros tipos, mas que também contêm átomo(s) de enxofre, como acontece, por exemplo, com a tioureia [98] ou o tiosulfato [138,139]. E não apenas em solução aquosa, pois em soluções de DMF, estes tipos de intermediários foram isolados na forma de sais de catiões volumosos (tetrafenilarsónio, por exemplo) [140]. Além disso, também se formam em reacções de redução de outros catiões metálicos, como por exemplo com o Fe(III) ou o Co(III) [141,142].

Tal como temos vindo a considerar, dependendo da velocidade de formação e da quantidade de composto formado, são postas duas hipóteses quanto ao aparecimento de tioésteres no início da redução: num passo inicial de pré-equilíbrio, muito rápido, que implica uma elevada constante de formação (constante de equilíbrio), seguido de um passo de redução mais lento, ou então uma situação de estado estacionário, na qual a concentração do tioéster se mantém praticamente constante durante a parte inicial da reacção, seguindo-se depois uma redução mais rápida [99,100]. Além disso, sem que para tal tenha ainda sido apresentada uma explicação teórica convincente, as constantes de formação destes intermediários são algumas ordens de grandeza superiores às dos oxoésteres correspondentes (Tabela 2.2, Capítulo 2).

Durante a redução, estes intermediários são detectados pelo aumento, seguido de desaparecimento, da intensidade de uma banda com  $\lambda_{\text{máx}}$  entre 420-440 nm, ao mesmo tempo que as soluções em reacção adquirem uma cor alaranjada intensa, que a seguir vão perdendo. Embora se especule acerca das ligações M-X envolvidas nestes tioésteres, a presença provável da ligação Cr-S é demonstrada pelo deslocamento do máximo da banda do cromato, a cerca de 370 nm, para comprimentos de onda maiores, devido à substituição, no cromato, de uma ligação Cr-O por uma Cr-S.

### 3.4.2 - Aspectos estruturais de intermediários de Cr(VI)

Somente com base nos resultados obtidos por espectrofotometria de UV/Vis, a técnica que tem sido mais utilizada para seguir a evolução destas reacções na quase totalidade dos trabalhos publicados [21,52,60,74,99,100], não é possível obter muita informação acerca das alterações estruturais nas espécies de crómio, que vão tendo lugar ao longo da redução. Apenas num trabalho recente [22], se estudou, por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{17}\text{O}$ , a redução de Cr(VI) pela glutathione, em proporções inferiores a condições de pseudo-primeira ordem,  $\text{Cr(VI)} / \text{GSH} \approx 1:0.5$ , e a baixa temperatura, para retardar a formação e a decomposição do tioéster formado. Deste modo, foi possível obter evidência de que, no tioéster, a GSH se coordena ao Cr(VI) apenas pelo grupo SH do resíduo de cisteína, formando um composto do tipo  $\text{GS-Cr-O}_3^-$ , tendo-se também observado que a coordenação do grupo tiólico provoca alterações conformacionais nas cadeias laterais dos resíduos glutamyl e cisteinyl daquele tripeptídeo.

#### 3.4.2.1 - Aplicação da espectroscopia de Raman ao estudo da estrutura de tioésteres

Partindo-se do cromato, tetraédrico, no final das reacções de redução de Cr(VI) chega-se a compostos de Cr(III), octaédricos. Quer o passo determinante da velocidade destas reacções seja a redução do tioéster (segundo o mecanismo de pré-equilíbrio), quer a sua formação (segundo o mecanismo de estado estacionário), estão sempre envolvidas alterações estruturais drásticas na espécie de crómio inicialmente presente em solução.

O cromato apresenta algumas bandas típicas em Raman (Tabela 3.7). Quando há substituição de uma ligação Cr-O por uma ligação Cr-SR, a estrutura tetraédrica regular do cromato é modificada, havendo abaixamento de simetria ( $T_d \rightarrow C_{3v}$ ). O seu espectro vibracional sofre então alterações, já que os modos degenerados se desdobram, em simetrias mais baixas, em componentes não degenerados. Ligeiras alterações na simetria daquele anião afectam efectivamente o seu espectro vibracional, constituindo uma prova segura de modificações estruturais [2,143].

| $\nu / \text{cm}^{-1}$ | Atribuição da banda ( $T_d$ ) | Atribuição da banda ( $C_{3v}$ ) | Ref <sup>a</sup> [143] | Ref <sup>a</sup> [81] |
|------------------------|-------------------------------|----------------------------------|------------------------|-----------------------|
| $\nu_1$                | $A_1$                         | $A_1$                            | 847                    | 846                   |
| $\nu_2$                | E                             | E                                | 348                    | 348                   |
| $\nu_3$                | $T_2$                         | $A_1 + E$                        | 884                    | 887                   |
| $\nu_4$                | $T_2$                         | $A_1 + E$                        | 368                    | 371                   |

Tabela 3.7 - Modos vibracionais fundamentais, activos em Raman, na molécula de  $\text{CrO}_4^{2-}$  (apenas os dois últimos modos são activos em infravermelho)

A glutatona, por sua vez, tem um espectro muito rico, apresentando as vibrações comuns a peptídeos e a proteínas, originadas a partir das ligações C-C, C-N, C-H, C-S, C-O, C=O, N-H e S-H (Figura 3.7). Entre todos estes modos vibracionais a vibração do grupo S-H aparece na região 2500-2600  $\text{cm}^{-1}$ , mais precisamente a 2584  $\text{cm}^{-1}$ , havendo, por isso, pouca interferência ou ambiguidade na detecção deste grupo [144].

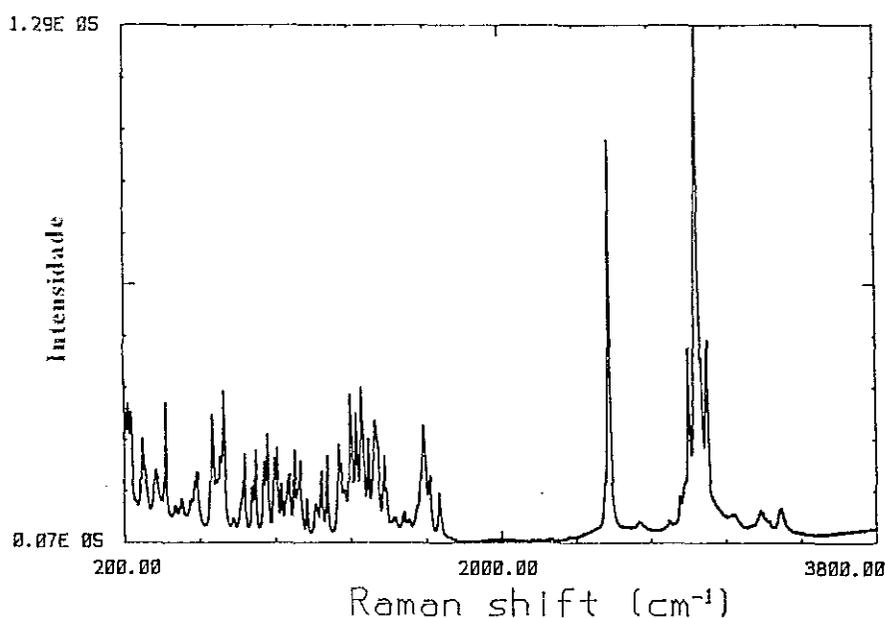


Figura 3.7 - Espectro de Raman da glutatona, no estado sólido, na região 200-3800  $\text{cm}^{-1}$  (fenda 640 $\mu\text{m}$ ; passos de 1s)

Sendo assim, numa tentativa de obter mais informação acerca das alterações

estruturais provocadas pela interacção Cr(VI) / GSH quando se forma o intermediário tioéster, O<sub>3</sub>Cr-SR, aplicou-se a espectroscopia de Raman ao estudo destas reacções de redução. As reacções foram seguidas, ao longo do tempo, em duas bandas do cromato, a 850 e a 906 cm<sup>-1</sup>, e na banda do grupo sulfidrilo, a 2584 cm<sup>-1</sup>. Para outros detalhes experimentais, ver o Capítulo 7 - Secção A.

### 3.4.2.2 - Resultados

Foi feito um estudo preliminar para a situação em que o cromato reage com a glutathiona, na proporção de 1 Cr(VI):2 GSH, em solução aquosa, a pH 7.0. Observaram-se variações na intensidade da banda de Raman do cromato a 850 cm<sup>-1</sup>, simultaneamente com o desaparecimento da outra banda, mais fraca, a cerca de 900 cm<sup>-1</sup>, e da banda correspondente à *elongação do grupo -SH da glutathiona*. Apesar de todas estas bandas sofrerem alterações com o tempo, pareceu-nos que a banda do cromato, a 850 cm<sup>-1</sup>, poderia fornecer resultados mais elucidativos, pois que a correspondente ao grupo sulfidrilo desaparecia muito rapidamente (Figura 3.8).

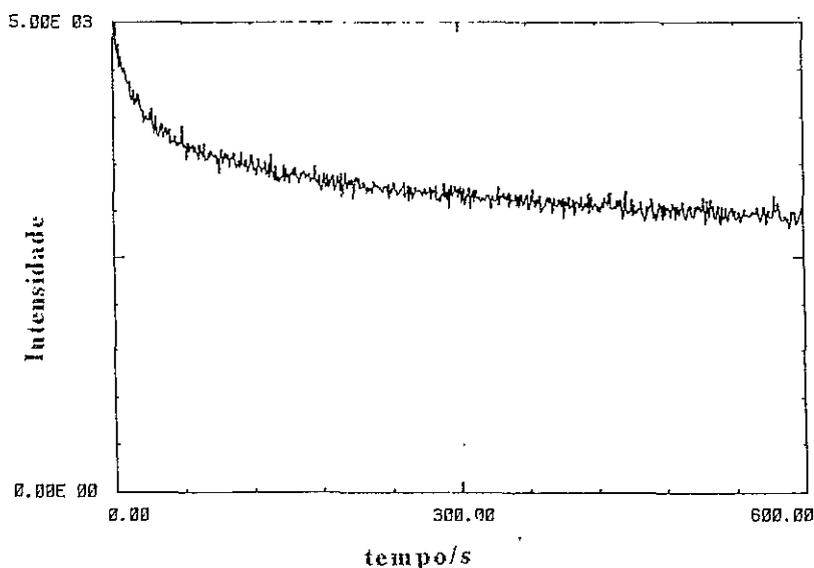


Figura 3.8 - Diminuição, com o tempo, da banda de Raman correspondente ao grupo sulfidrilo da GSH; (2584 cm<sup>-1</sup>;  $\lambda$  excitação = 514,5 nm; passos de 1 segundo; 2 Cr(VI) : 1 GSH)

Quando a redução é seguida nas bandas do cromato verifica-se que a banda

menos intensa a  $906\text{ cm}^{-1}$  desaparece ao fim de um pequeno intervalo de tempo (cerca de 5 minutos) enquanto que a intensidade da outra, a  $850\text{ cm}^{-1}$ , sofre uma diminuição menos drástica. No entanto, diminuindo as proporções de Cr(VI) / GSH de 1:2 para proporções mais baixas, no intervalo de 1:2 a 1:0.5, o "perfil de variação" é profundamente alterado (Figura 3.9), passando-se de uma diminuição contínua da intensidade da banda (1:2), para situações intermédias (1:1 e 1:0.7) e, finalmente, para a situação oposta em que se observa aumento de intensidade com o tempo de reacção (1 : 0.5).

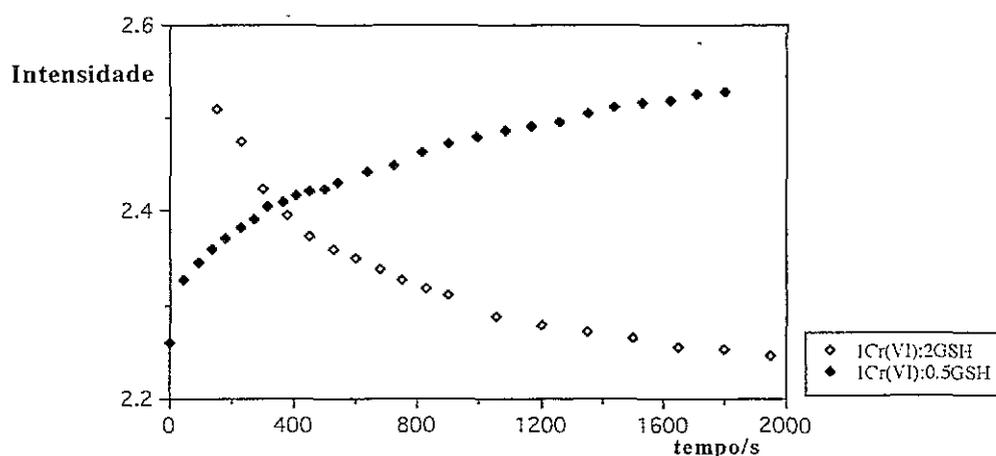


Figura 3.9 - Variação da intensidade da banda Raman do cromato, a  $850\text{ cm}^{-1}$ , com o tempo de reacção (1 Cr(VI) / 2 GSH: diminuição de intensidade; 1 Cr(VI) / 0.5 GSH: aumento de intensidade); gráficos reconstruídos a partir dos espectros originais

### 3.4.2.3 - Discussão de resultados

Perante os resultados obtidos, torna-se complexo aventar explicações capazes de relacionar as alterações espectrais observadas com modificações estruturais no cromato. Neste processo de redução observa-se, em geral <sup>3.9</sup>, diminuição da intensidade da banda

<sup>3.9</sup> Quando a proporção de Cr(VI) / GSH é de 1 : 0.5, a intensidade da banda do cromato, a  $850\text{ cm}^{-1}$ , aumenta com o tempo de reacção, ao contrário de quando se utilizam proporções mais elevadas. As razões para tal comportamento carecem para já de explicação, parecendo-nos que poderão estar relacionadas com eventuais outros tipos de mecanismos de reacção, que se apliquem à redução de Cr(VI) pela GSH nestas condições experimentais. Um comportamento análogo a este, foi também constatado, por UV/Vis, sempre que se utilizaram proporções Cr(VI) / GSH inferiores às estequiométricas, tendo aí sido atribuído a

do cromato e da do grupo sulfidrilo, que traduzem alterações na estrutura tetraédrica daquele ião e a desprotonação do grupo SH. As referidas alterações deverão significar a formação de um estado de transição, intermediário, tetra ou pentacoordenado, que poderá estar na origem de um complexo de esfera interna ou de um aducto de esfera externa, no qual a ligação do redutor ao centro metálico é estabelecida pelo átomo de enxofre [22]. Num estudo muito recente [145], embora a pH inferior ao utilizado neste trabalho, foram obtidas novas evidências para a formação daquela ligação, ao serem identificadas, também por espectroscopia de Raman, bandas correspondentes a vibrações  $\nu_{\text{Cr-S(Cys)}}$ , confirmando a ligação da GSH ao cromato pelo grupo sulfidrilo do resíduo de cisteína. Como no estudo efectuado não se observou o aparecimento de novas bandas, não foi possível obter dados susceptíveis de contribuir para a identificação da estrutura daquele intermediário, mas apenas indícios de alterações na estrutura do cromato, que são resultantes da interacção  $\text{CrO}_4^{2-} / \text{GSH}$ . Será pois necessário, no futuro, proceder a um estudo sistemático desta interacção em condições experimentais diversificadas que possam conduzir a explicações cabais sobre a formação e a estrutura de tioésteres neste tipo de reacções, nomeadamente com soluções tamponizadas e a baixas temperaturas, para evitar a decomposição rápida daquele intermediário.

### **3.4.3 - Cinética de formação e de decomposição de tioésteres em reacções de redução de Cr(VI) por alguns tióis**

A literatura refere a formação rápida e a posterior decomposição, mais lenta, de tioésteres, para alguns estudos de reacções de redução de Cr(VI) com glutathione, cisteína e penicilamina, efectuados em meio ácido, por "stopped-flow" [21,24,73,74]. Em meio neutro, apesar da formação destes compostos ter também sido detectada e estudada por UV/Vis, tanto quanto sabemos, é a primeira vez que estes intermediários são observados em reacções de redução de Cr(VI) com cisteína (e de algum modo, também com penicilamina).

Neste trabalho, a formação e a decomposição de tioésteres em reacções de redução de Cr(VI) com cisteína (e com penicilamina) foi estudada por métodos de "stopped-flow" e, com glutatona, por espectrofotometria de UV/Vis.

### **3.4.3.1 - Formação e decomposição de tioésteres em reacções de redução de Cr(VI) com cisteína, por "stopped-flow"**

A formação e decomposição dos intermediários tioésteres foi seguida, ao longo do tempo, a 460 nm, ou seja, a um comprimento de onda um pouco superior à gama comum de 420-440 nm, na tentativa de evitar a eventual interferência de outras espécies nos valores de absorvância lidos, nomeadamente, o prolongamento da banda do cromato para esta região do espectro. Todas as experiências foram efectuadas à temperatura ambiente, a  $\text{pH} \approx 6.5-7.0$ , com soluções tamponizadas com Tris.HCl ou HEPES  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$  (Capítulo 7 - Secção A).

#### **3.4.3.1.1 - Resultados**

Para qualquer das concentrações de cisteína utilizadas foi observado um aumento de absorvância com o tempo de reacção, atingindo-se um valor máximo de absorvância, seguido de diminuição, apenas para as reacções em que foram utilizadas concentrações de redutor mais elevadas (Figura 3.10). Com penicilamina, apesar de também se terem detectado indícios da presença daqueles intermediários, através de um aumento muito pequeno de absorvância ao comprimento de onda típico do respectivo máximo, por limitações do equipamento de "stopped-flow" utilizado, não foi possível seguir as reacções durante intervalos de tempo mais alargados, o que não permitiu confirmar a presença daqueles compostos.

Como se pode observar na Figura 3.10, a velocidade de formação destes compostos aumenta com a concentração do redutor, para uma mesma concentração inicial de Cr(VI). As respectivas constantes, observadas, de velocidade de formação e de decomposição,  $k_1$  e  $k_2$  (Tabela 3.8), foram determinadas por ajuste dos dados de

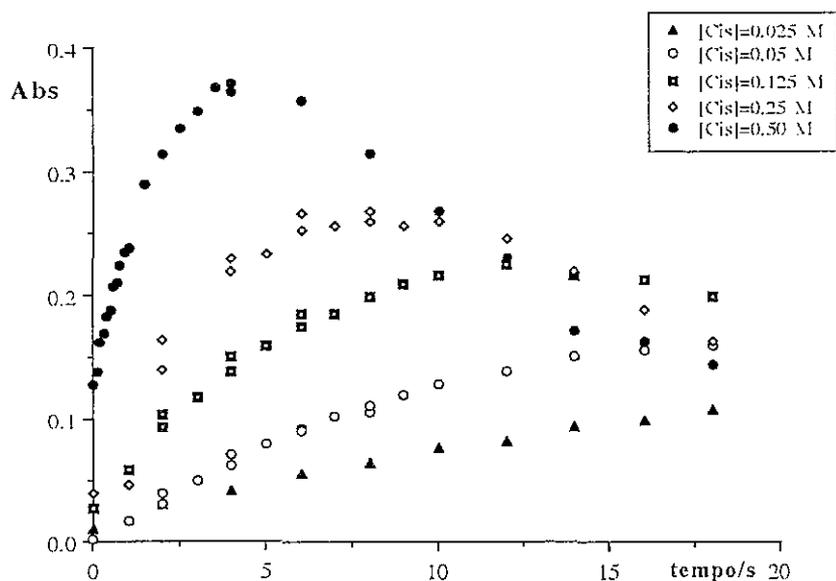


Figura 3.10 - Formação e decomposição dos tioésteres, em reacções de redução de Cr(VI) com L-cisteína; soluções tamponizadas com Tris.HCl 0.05M; pH 6.5 - 7.0; temperatura ambiente;  $\lambda = 460$  nm

absorbância a uma equação não linear que traduz uma sequência de dois processos consecutivos de 1ª ordem [146] (Detalhes na Secção 3.3.2).

| [Cys]/<br>mol dm <sup>-3</sup> | Condições<br>experimentais | $k_1 / s^{-1}$ | $k_2 / s^{-1}$  | R*    |
|--------------------------------|----------------------------|----------------|-----------------|-------|
| 0.500                          | Tris.HCl 0.05 M            | 0.325 (0.074)  | 0.0798 (0.0058) | 0.997 |
| 0.250                          | "                          | 0.129 (0.002)  | 0.0574 (0.0019) | 0.998 |
|                                | HEPES 0.05 M               | 0.183 (0.004)  | 0.1414 (0.0003) | 0.998 |
| 0.125                          | Tris.HCl 0.05 M            | 0.075 (0.003)  | 0.0280 (0.0002) | 0.998 |
|                                | HEPES 0.05 M               | 0.074 (0.002)  | 0.0264 (0.0009) | 0.999 |

Tabela 3.8 - Constantes de velocidade de formação ( $k_1$ ) e de decomposição ( $k_2$ ) de tioésteres, para a redução de Cr(VI) pela cisteína ("stopped-flow"); R\*=coeficiente de correlação do ajuste efectuado

Na Figura 3.11 estão representados graficamente alguns dos ajustes efectuados.

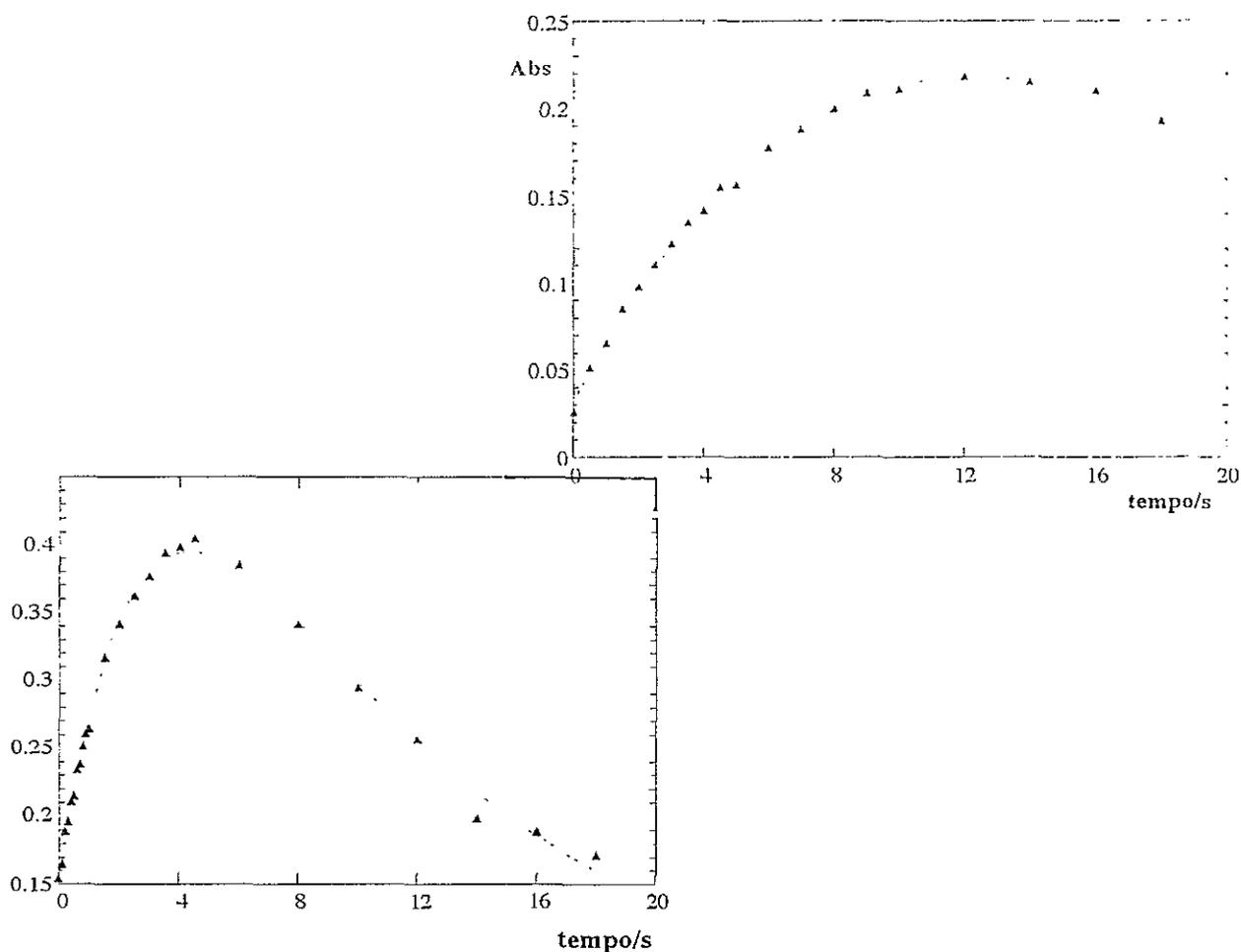


Figura 3.11 - Ajuste, da variação de absorvância ao longo do tempo de reação, a uma função não-linear (equação 3.7, ver texto), que traduz a formação e a decomposição de tioésteres, em reações de redução de Cr(VI) com L-cisteína (resultados de "stopped-flow");  $[Cr(VI)] = 2.5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ : (a)  $[L\text{-cis}] = 0.5 \text{ M}$  (Tris.HCl 0.05 M); (b)  $[L\text{-cis}] = 0.125 \text{ M}$  (HEPES 0.05 M)

### 3.4.3.1.2 - Discussão de resultados

Põe-se de novo a questão que julgamos fundamental neste estudo: de que modo estas constantes de velocidade de formação e de decomposição do intermediário tioéster,  $k_1$  e  $k_2$ , são comparáveis às constantes  $k_{obs}$  determinadas em relação à diminuição da quantidade total de Cr(VI) (redução do Cr(VI) presente em solução) (Ver Secção 3.3.3, Tabela 3.5)? Analisando ambas as tabelas (3.5 e 3.8) verifica-se uma coincidência quase perfeita entre os valores das constantes calculadas para a redução do cromato ( $k_{obs}$ , Tabela 3.5) e para a formação do tioéster ( $k_1$ , Tabela 3.8). De igual modo, à relação entre as constantes de redução do cromato,  $k_{obs}$ , que são apresentadas

na literatura para a mesma reacção de redução [60,100], e as constantes de formação do intermediário tioéster,  $k_1$ , podem aplicar-se os mesmos argumentos discutidos na Secção 3.3.2.2 [147], quanto ao mecanismo de reacção.

A Figura 3.12 esquematiza os resultados referentes às constantes de velocidade de redução do cromato e de formação de tioésteres na redução de Cr(VI) por L-cisteína.

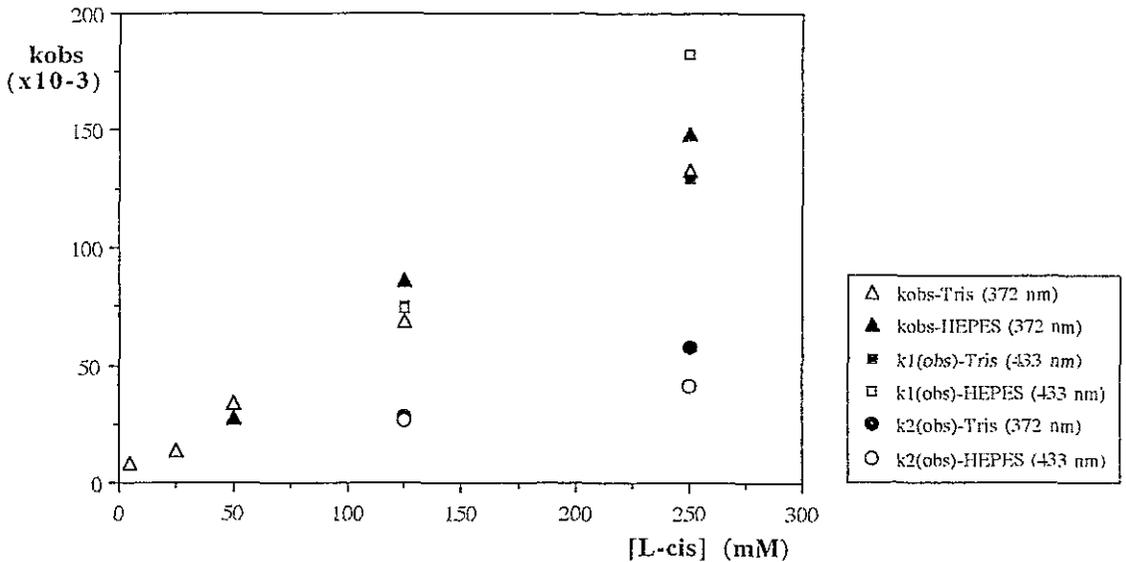


Figura 3.12 - Relação entre as constante de velocidade (observadas) relativas à redução de Cr(VI) por L-cisteína (372 nm) e à formação e decomposição de tioésteres para a mesma reacção; dados referentes às Tabelas 3.5 e 3.8

Das constatações anteriores podem inferir-se algumas conclusões:

i) - o primeiro passo, muito rápido, detectado no estudo efectuado por "stopped-flow", corresponde possivelmente à formação do tioéster, cuja constante de velocidade é dada por  $k_1$ . Este 1º passo não tinha sido correctamente observado nos trabalhos anteriores efectuados por espectrofotometria de UV/Vis [100] ou por "stopped-flow" [60]. Neste último trabalho, a sua não observação foi devida, provavelmente, a terem sido usadas concentrações de cisteína muito menores que as utilizadas neste estudo, com variações de absorvância muito menores e, portanto, não consideradas facilmente como variação de concentração de uma dada espécie. A evidência daquele primeiro passo rápido corrobora o mecanismo de "pré-equilíbrio" que atrás propusémos para a

redução de Cr(VI) pela cisteína (Ver Seccção 3.3.3.2);

ii) - a constante de velocidade de formação do intermediário,  $k_1$ , estando directamente relacionada com as anteriores constantes,  $k_{obs}$ , de redução do cromato, pode, assim, traduzir a formação do tioéster "à custa" do cromato que é gasto no primeiro passo da redução (ambos lidos, simultaneamente, pela variação de absorvância a 433 e 372 nm, respectivamente), o que é outro argumento forte a favor do mecanismo de pré-equilíbrio proposto para a redução de Cr(VI) pela L-cisteína.

### **3.4.3.2 - Formação e decomposição de tioésteres em reacções de redução de Cr(VI) com glutathione, por espectrofotometria de UV/Vis**

No caso da redução de Cr(VI) pela glutathione, a formação e a decomposição de tioésteres foi seguida por espectrofotometria de UV/Vis, ao longo do tempo, a diversos comprimentos de onda entre 420 e 440 nm, tendo-se concluído que o respectivo máximo de absorvância se situava a 433 nm. Para cada experiência, foi registada a variação de absorvância àquele comprimento de onda, em função do tempo (Ver condições experimentais detalhadas no Capítulo 7 - Secção A).

#### **3.4.3.2.1 - Resultados**

Numa primeira série de experiências, a formação e a decomposição dos tioésteres foi estudada, em condições de pseudo-primeira ordem, isto é, em proporções Cr(VI):GSH na gama de 1 : 10 - 80 (Figura 3.13).

Numa segunda fase do trabalho, o estudo deste mesmo tipo de intermediários foi efectuado para proporções de Cr(VI)/GSH da ordem de 1:5, 1:1 e 1:0.5, ou seja, para proporções inferiores às condições de pseudo-primeira ordem. Até à proporção de 1:5 ainda foi possível detectar um máximo de absorvância e, portanto, observar a decomposição daqueles compostos, mas para 1:1 e 1: 0.5, apenas foi possível verificar que o máximo de absorvância atingido se manteve constante por mais de 3 horas de reacção (mesmo assim com uma variação total muito pequena), (Ver Figura 3.14).

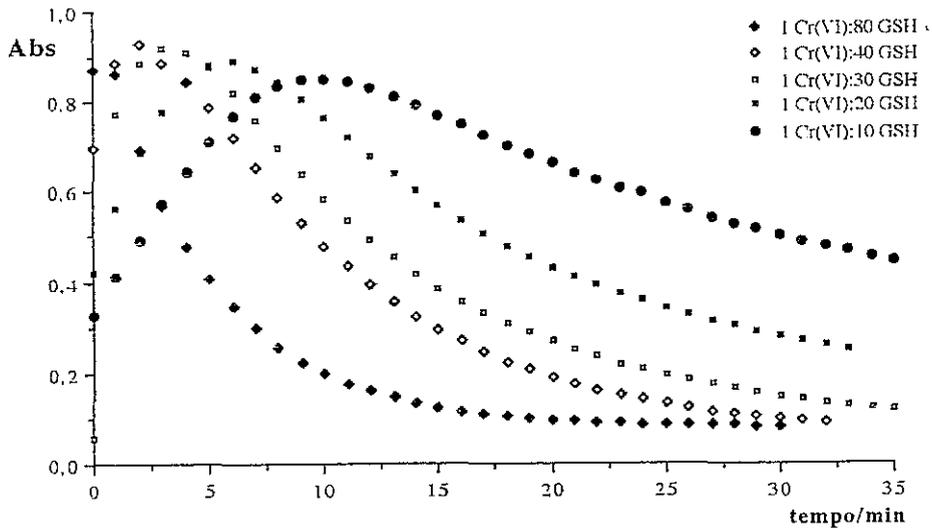


Figura 3.13 - Formação e decomposição de tioésteres em função do tempo de reacção;  $\lambda=433$  nm;  $[GSH]=(10, 20, 30, 40, 80) \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $[Cr(VI)]=1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ; pH das soluções previamente ajustado a 7,0, com solução de KOH

Além disso, verificou-se que, de um modo geral, a utilização de soluções tamponizadas parece aumentar a quantidade de tioéster formado, apesar da literatura só referir este aspecto quando é usado o tampão Tris.HCl e esse não ter sido o nosso caso.

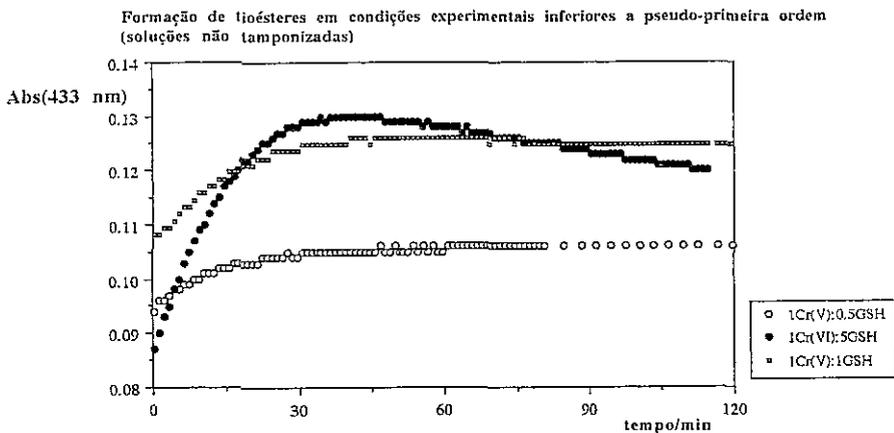


Figura 3.14 - Formação de tioésteres para 1 Cr(VI) : 5, 1 e 0.5 GSH;  $[Cr(VI)] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

As constantes de velocidade de formação e de decomposição de tioésteres,  $k_1$  e  $k_2$ , foram, mais uma vez, determinadas por ajuste dos dados de absorvância a uma equação não linear correspondente a uma sequência de dois processos de 1ª ordem (Ver

Secção 3.3.2). Para cada um dos casos estudados em que foi possível fazer o referido ajuste, as constantes  $k_1$  e  $k_2$  (constantes observadas) assim determinadas, estão compilados na Tabela 3.9.

| [GSH] / mM | Condições experimentais  | $10^3 \times k_1 / s^{-1}$ | $10^4 \times k_2 / s^{-1}$ |
|------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1.25       | Hepes 0.2M               | 1.51 (0.16)                | 0.56 (0.09)                |
| 2.5        | excluindo O <sub>2</sub> | 1.68 (0.18)                | 1.04 (0.10)                |
| 2.5        | Hepes 0.2M               | 2.33 (0.03)                | 0.68 (0.05)                |
| 5.0        | não tamponizada          | 3.51 (0.07)                | 1.17 (0.08)                |
| 5.0        | Hepes 0.05M              | 2.20 (0.16)                | 1.25 (0.05)                |
| 5.0        | Hepes 0.2M               | 2.22 (0.17)                | 1.45 (0.05)                |
| 10.0       | Hepes 0.05M              | 2.25 (0.14)                | 2.69 (0.05)                |
| 20.0*      | não tamponizada          | 3.66 (0.27)                | 11.80 (0.35)               |
| 30.0*      | "                        | 6.15 (0.45)                | 17.70 (0.40)               |
| 40.0*      | "                        | 7.17 (0.50)                | 23.33 (5.00)               |
| 80.0*      | "                        | 32.53 (0.48)               | 34.57 (6.17)               |

Tabela 3.9 - Constantes de velocidade (observadas) de formação ( $k_1$ ) e de decomposição ( $k_2$ ) de tioésteres, para reacções de redução de Cr(VI) por glutatona (dados obtidos por espectrofotometria de UV/Vis;  $\lambda = 433$  nm;  $[Cr(VI)] = 2.5 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>; \*  $[Cr(VI)] = 1.0 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> (desvios padrão entre parêntesis)

As velocidades de formação (e de decomposição) daqueles intermediários dependem da concentração de glutatona, sendo possível estabelecer relações praticamente lineares entre estas constantes e a concentração de GSH (Figura 3.15).

#### 3.4.3.2.2 - Discussão de resultados

Pôs-se-nos novamente a questão do estabelecimento de uma relação entre estas constantes de velocidade,  $k_1$  e  $k_2$ , e as constantes determinadas anteriormente, quando

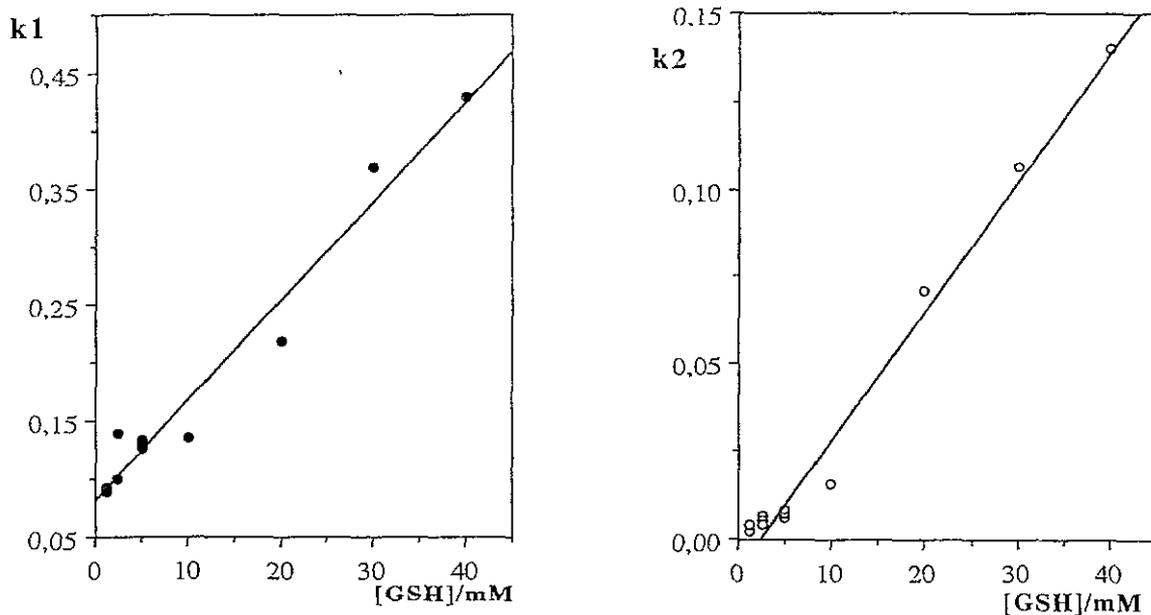


Figura 3.15 - Dependência entre  $k_1(\text{obs})$  e  $k_2(\text{obs})$  de formação e de decomposição de tioésteres e a concentração de GSH, em reacções de redução de Cr(VI) por GSH (foram excluídos dos gráficos os resultados correspondentes a  $[\text{GSH}] = 80 \text{ mM}$ );  $\lambda = 433 \text{ nm}$ ; as constantes de 2ª ordem obtidas (devem considerar-se como estimativas) são:  $k_1 = 0.143 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$  e  $k_2 = 6.15 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$

se estudou a redução de Cr(VI) pela glutatona (Secção 3.3.2.1, Tabela 3.4). A concordância de valores encontrada para a redução com cisteína parece não existir neste caso. Comparando as Tabelas 3.4 e 3.9, pode verificar-se que:

- a) - os valores de  $k_1$  (da Tabela 3.4; 372 nm) são mais elevados que os de  $k_1$  (da Tabela 3.9; 433 nm);
- b) - os valores de  $k_2$  (da Tabela 3.4; 372 nm) são menores que os de  $k_2$  (da Tabela 3.9; 433 nm)

Os resultados da alínea a) podem, provavelmente, ser explicados se, quando se mede o desaparecimento de Cr(VI) se está, simultaneamente, a ler o desaparecimento do tioéster, que se formou rapidamente, havendo assim interferência do intermediário na absorvância correspondente à banda do cromato (Figura 3.16). Neste caso, as constantes de velocidade  $k_{1(\text{obs})}$  referentes à redução do cromato apenas podem ser encaradas sob um ponto de vista qualitativo.

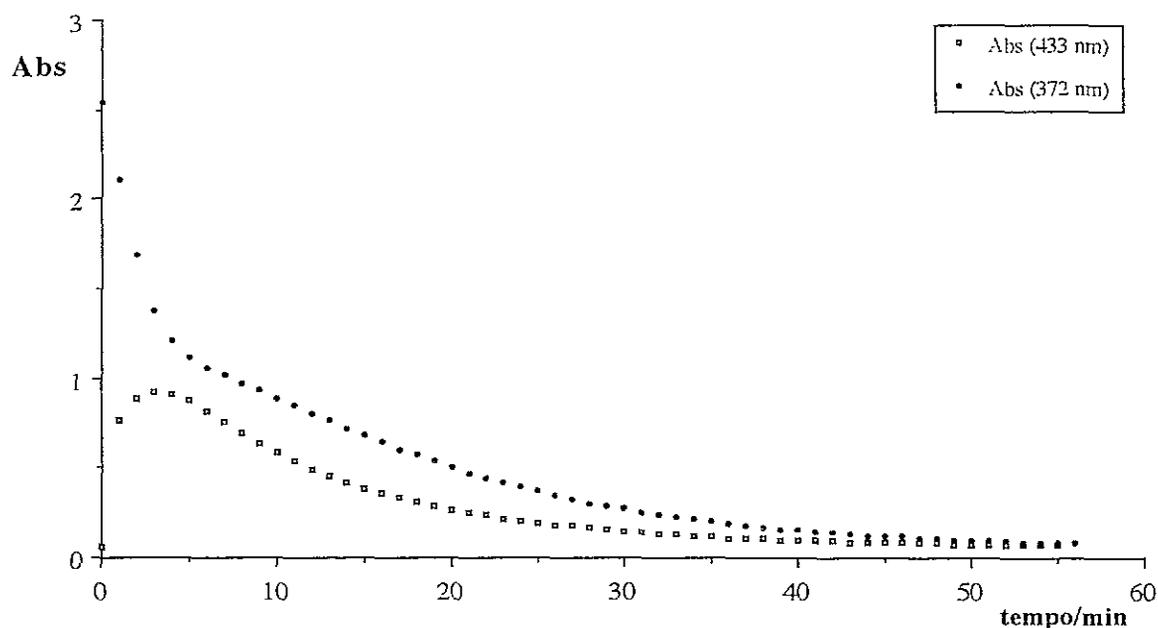


Figura 3.16 - Sobreposição da variação de absorvância correspondente à redução de Cr(VI) (372 nm) e à formação do tioéster (433 nm)

Se for feita a comparação entre as constantes  $k_{1(\text{obs})}$  obtidas a 372 nm e a 433 nm (Figura 3.17-a), pode observar-se que as diferenças mais acentuadas se verificam, precisamente, para as reacções em que foram usadas concentrações de GSH muito elevadas. Para estas reacções, ou há ou uma grande indeterminação no seu cálculo ou, pelo facto de essas soluções não terem sido tamponizadas, poderão verificar-se mecanismos de reacção mais complexos com formação de espécies que poderão interferir na obtenção dos dados.

Quanto à alínea b), as constantes de velocidade de desaparecimento do tioéster devem corresponder apenas à decomposição deste intermediário, pois são obtidas a partir de dados de absorvância lidos numa região "limpa" da influência da banda do cromato. A 372 nm, ao fim de tempo de reacção suficiente para que já haja decomposição do intermediário, ainda é de considerar a absorvância do cromato. No entanto, se se analisar a Figura 3.17-b, em que estão representadas as constantes  $k_{2(\text{obs})}$  obtidas a 372 nm e a 433 nm, assim como as que foram determinadas apenas a partir da 2ª parte das reacções não tamponizadas, pode verificar-se facilmente que o factor com

maior influência na definição destas constantes deve ser, provavelmente, o facto das soluções estarem ou não tamponizadas. Aquelas últimas são praticamente coincidentes com as que tinham sido obtidas por um ajuste não linear.

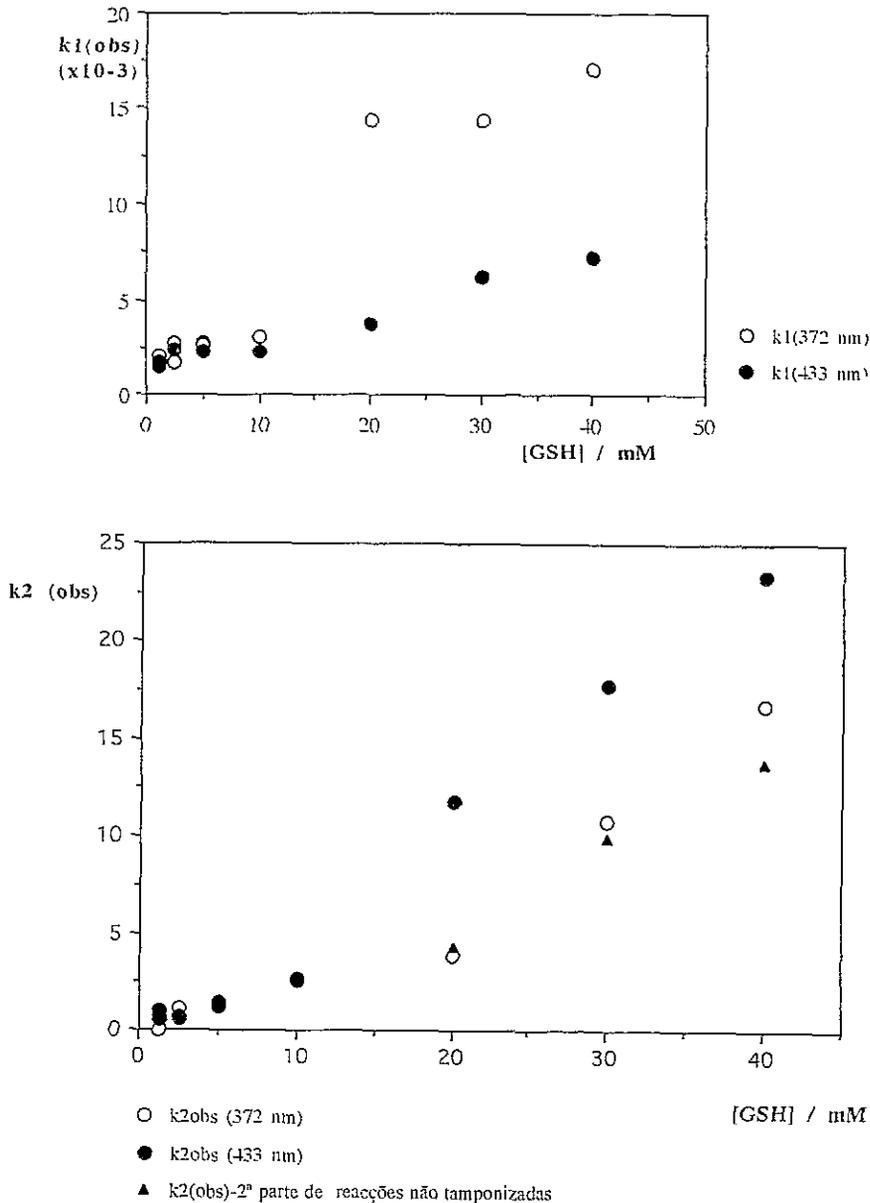


Figura 3.17 - (a)  $k_1(\text{obs})$  e (b)  $k_2(\text{obs})$  em função de [GSH]; dados das Tabelas 3.4 (372nm) e 3.9 (433nm)

O facto de na redução pela cisteína existir coincidência entre aquelas constantes, pode também estar relacionado com o coeficiente de absorvidade molar do tioéster formado na reacção com a glutathione que não é garantidamente o mesmo que o do tioéster formado com a cisteína, interferindo de modo diferente, nos valores de

absorvância lidos que levaram ao cálculo destas constantes (Ver valores detalhados dos coeficientes de absorvidade molar no Capítulo 7 - Secção A).

Para as reacções efectuadas em condições de não pseudo-primeira ordem, não se observou decomposição do tioéster, seguindo a reacção por UV/Vis ao comprimento de onda habitual (433 nm), contraditoriamente ao que afirmam Brauer *et al* [22]. No entanto, estes autores também encontraram contradições entre resultados obtidos por UV/Vis e por outras técnicas, nomeadamente por RMN. Como nesse trabalho se utilizou um valor de pH de reacção mais baixo ( $\text{pH} \approx 5.8$ ) que o normalmente usado nos estudos em meio neutro, isto pode estar na origem das diferenças encontradas. O simples facto de, para estas proporções, a quantidade de glutatona ser deficitária na reacção de redução, pode ser responsável pela eventual não aplicação do mesmo tipo de mecanismo de reacção, isto é, predominar um passo de redução "por um electrão", tal como o que é referido por O'Brien *et al* [100,131].

### 3.5 - Produtos finais da redução de Cr(VI) por tióis

#### 3.5.1 - Introdução

Como vimos, a entrada de compostos de Cr(VI) nas células e a sua redução no interior das mesmas é explicada em termos do modelo de "entrada-redução" [10]. *In vivo* ou *in vitro* e independentemente da passagem por formas intermédias de Cr(V) e/ou de Cr(IV), o Cr(III) é o estado final em que este elemento, após ter sido reduzido, se pode encontrar intracelularmente. Quaisquer que sejam os mecanismos envolvidos, os produtos finais obtidos dessas reacções serão pois, sempre, compostos de coordenação de Cr(III), com aqueles redutores, ou com outros ligandos presentes no meio em reacção (Ver Capítulo 1). Sendo assim, uma das etapas fundamentais no estudo dos mecanismos associados à toxicidade do crómio é a identificação dos possíveis compostos de Cr(III) resultantes da redução intracelular do Cr(VI).

Sempre que se pretenda modelar a redução intracelular do Cr(VI), há que ter em

conta que, no meio em reacção, além do ião metálico, o redutor, normalmente em excesso, está, em princípio, presente em ambas as formas oxidada e reduzida, o que, de algum modo, traduz as condições existentes a nível intracelular (Ver Capítulo 2). No entanto, mesmo considerando a grande capacidade (termodinâmica) de complexação destes redutores, na forma reduzida ou não (Ver Capítulo 2, Tabela 2.6), a inércia característica dos complexos de Cr(III) em reacções de substituição é um factor a não desprezar. E convém também não esquecer, que a formação dos produtos finais de Cr(III) também pode ter lugar a partir de espécies em estados de oxidação intermédios, muito mais lábeis, sendo o crómio, já complexado, finalmente reduzido a Cr(III) [19].

Finalmente, a velocidade com que são obtidos os produtos finais das reacções de redução de Cr(VI), também tem, obviamente, interesse na discussão dos mecanismos da toxicidade do crómio. Dependendo dos efeitos que estes compostos, ou os intermediários seus precursores, possam provocar em termos genéticos, é importante ter conhecimento do tempo necessário para que eles se formem, assim como da sua estabilidade em solução, para se poder avaliar as possibilidades de provocarem esses danos.

Na presente Secção deste Capítulo descreve-se o estudo da formação dos produtos finais obtidos em reacções de redução de Cr(VI) com cisteína, penicilamina e glutatona. Nos dois primeiros casos, foram identificados, em solução, os iões complexos bis(cisteinato) e bis(penicilaminato)cromato(III). Contudo, da reacção com glutatona apenas foi possível propôr, com base em características espectroscópicas, a formação de pelo menos um produto final de redução, isto é, um(s) complexo(s) de Cr(III) com aquele ligando na forma reduzida e/ou oxidada. Foi também estudada a cinética de formação dos produtos finais destas reacções.

### **3.5.2 - Identificação de produtos finais**

#### **3.5.2.1 - Produtos de redução de Cr(VI) com cisteína e com penicilamina**

A redução de Cr(VI) por L-cisteína e L- ou D-penicilamina, redutores possuidores de um grupo tiol, foi efectuada em meio neutro, tamponizado ou não, à temperatura ambiente, em condições de excesso de redutor. A formação dos produtos finais foi seguida, ao longo do tempo, por espectrofotometria de UV/Vis e de DC, até não se observarem alterações significativas nos espectros respectivos (entre 1.5 a 2.5 horas). No Capítulo 7 - Secção A, estas experiências são descritas detalhadamente, embora ao longo do texto, em tabelas ou em gráficos, sejam referidos alguns pormenores considerados relevantes para o entendimento dos resultados obtidos.

##### **3.5.2.1.1 - Resultados**

Experiências preliminares efectuadas em solução aquosa e seguidas por espectrofotometria de UV/Vis, permitiram identificar, os aniões complexos  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$  e  $[\text{Cr}(\text{pen})_2]^-$ , (cys=L-cisteína; pen=L- ou D-penicilamina), como produtos finais das reacções de redução de Cr(VI) com aqueles aminoácidos. Como estes aniões são opticamente activos, na sua identificação foi também usada a espectrofotometria de DC. Em qualquer dos casos, os espectros de UV/Vis e de DC, obtidos no final das reacções de redução, são característicos das soluções aquosas destes iões complexos, tanto quanto à posição como quanto à intensidade relativa das respectivas bandas (Figura 3.18 - Comparar com a Figura 4.1 do Capítulo 4). A espectrofotometria de DC permitiu testar, além disso, se houve formação de apenas um ou de uma mistura dos vários isómeros possíveis para este tipo de complexos. Em qualquer dos casos, verificou-se que só se obtinha o isómero, opticamente activo, *cis(N,O)trans(S)*, tal como na síntese "directa" destes complexos, isto é, a partir da reacção de Cr(III) com o aminoácido respectivo (formação estereoespecífica) [78,147,148].

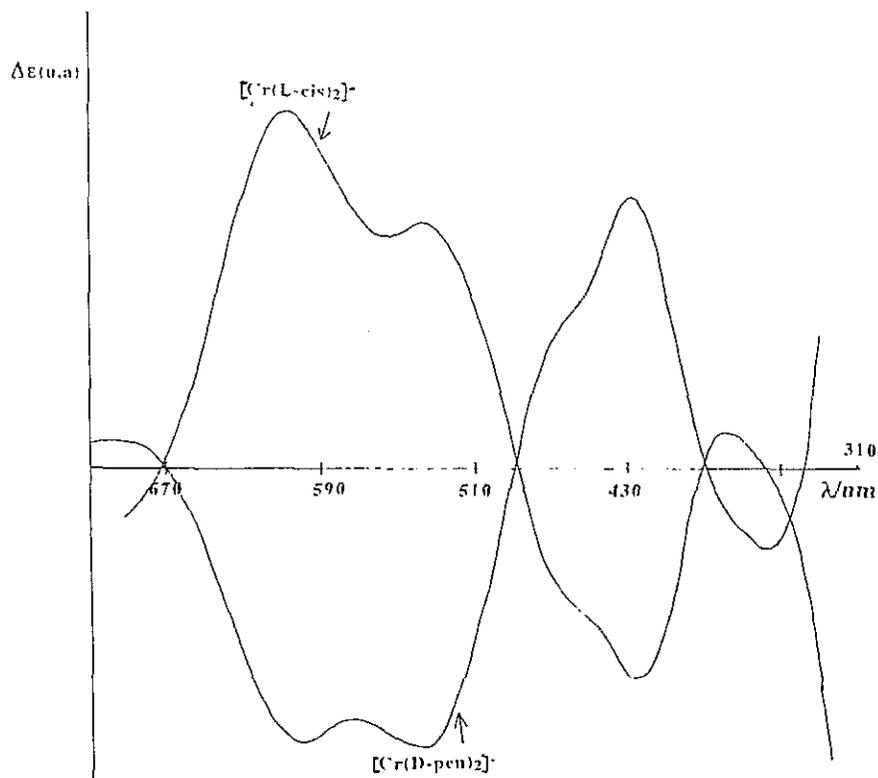


Figura 3.18 - Espectros de DC, dos aniões complexos  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$  e  $[\text{Cr}(\text{D-pen})_2]^-$  obtidos da redução de Cr(VI) com L-cisteína ou com D-penicilamina, ao fim de 2.5 horas ; 1 Cr(VI): 20 aminoácido; pH neutro; temperatura ambiente; em soluções tampão Tris.HCl  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$

### 3.5.2.1.2 - Discussão de resultados

Durante as reacções, associando a cor das soluções aos compostos que aí se estão a formar, é possível ter uma primeira ideia dos produtos finais obtidos. Em ambos os casos, as soluções passam de amarelo a amarelo-laranja, laranja mais escuro (formação rápida do intermediário do tipo tioéster), verde, verde-acastanhado (estas duas cores são possivelmente devidas à presença de intermediários de Cr(V) de cor verde, com um máximo de absorção a cerca de 650 nm [149]), violeta, violeta-azulado e finalmente azul, que é a cor característica dos referidos aniões em solução aquosa, a pH neutro (Ver Capítulo 4, Secção 4.2). Algumas horas após o início da reacção, 2.5 em média, a cor azul começa a alterar-se para violeta e finalmente para vermelho-violeta, o que pode dever-se à hidrólise ácida dos iões complexos que se formaram, a qual se traduz pelo rompimento de ligações Cr-S com substituição destas ligações pela coordenação de moléculas de água [78,79,126,150]. Na reacção de redução com cisteína,

por exemplo, quando seguida por UV/Vis, a abertura daquelas ligações é patente na diminuição de intensidade da banda a 605 nm e no desaparecimento dos dois ombros a 540 e a 460 nm, originando-se apenas duas bandas a 550 e a 410 nm. Estas modificações espectrais correspondem a uma mudança no ambiente de coordenação do crómio(III), alterado de  $N_2O_2S_2$  para  $N_2O_3S$  e finalmente para  $N_2O_4$  [78,79,151] (Ver Capítulo 4 - Figura 4.6). Connett *et al.* [52], numa experiência idêntica à aqui descrita, justificaram aquele tipo de alterações espectrais pela descoordenação da cisteína não oxidada, que se tinha ligado inicialmente ao Cr(III). No entanto, não discutiram quais as ligações que estariam envolvidas na descoordenação.

Com a penicilamina, nem sempre foi possível observar o aparecimento da cor azul característica do complexo  $[Cr(\text{pen})_2]^-$  no final das reacções, o que também se verificou em algumas das experiências efectuadas com cisteína, apesar das constantes de formação destes complexos serem muito elevadas (Ver Capítulo 2, Tabela 2.6) e do ligando se encontrar em grande excesso. A coexistência de diversas espécies em solução, tais como complexos com o ligando na forma reduzida, tricoordenado ou em outros modos diferentes de coordenação, ou complexos com o ligando coordenado na forma oxidada, poderá estar na origem destas observações, como foi, aliás, referido num outro trabalho [127].

A obtenção do anião  $[Cr(\text{cys})_2]^-$  como produto final da redução de Cr(VI) pela cisteína, em meio neutro, tinha sido proposta num estudo anterior [60], no qual apenas se tinha posto a hipótese do composto formado poder ser o isómero *cis*(N,O)*trans*(S), cujas preparação e estrutura cristalina haviam sido recentemente publicadas [148]. No presente trabalho, a formação estereoespecífica do bis(cisteinato)cromato(III), na forma do isómero *cis*(N,O)*trans*(S), é inequivocamente demonstrada por DC, comparando o espectro obtido no final da reacção de redução com o daquele composto puro [78,126,147,148].

A reacção análoga com penicilamina foi estudada por Hojo e Sugiura [127], que

descreveram um complexo tridentado de Cr(III) e penicilamina como produto final da reacção, não especificando qual o isómero obtido. A descrição espectroscópica desse composto não é coincidente com a do complexo puro, que preparámos posteriormente [78] (Capítulo 4). O facto de, no espectro de UV/Vis apresentado nesse trabalho, não estarem definidas a banda mais intensa a 604 nm e o ombro a ela associado a 538 nm, características do referido complexo (semelhantemente ao espectro do  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$ ), além de não ser feita referência à banda de *transferência de carga* a cerca de 260 nm, típica das ligações Cr-S, leva-nos a argumentar que o produto obtido por aqueles autores não correspondia ao complexo puro, mas eventualmente a uma mistura daquele composto com outras espécies com o ligando coordenado na forma oxidada, por exemplo [78,127,151].

A redução de Cr(VI) por estes aminoácidos foi também já estudada em meio muito ácido (pH 1-1.7) [21,74]. Em qualquer dos dois casos, após separação cromatográfica por troca iónica, foram obtidos pelo menos dois tipos de produtos, todos de cor violeta. Na redução com cisteína foi proposto que a primeira daquelas espécies a ser eluída, contendo cerca de 60% do crómio total inicial, fosse um complexo de Cr(III) com cistina (cisteína oxidada), na proporção de 1:1, coordenada apenas pelos grupos amina e carboxílico, uma vez que os grupos tiol estariam "bloqueados" no ligando oxidado. Esta hipótese baseava-se apenas em argumentos mecanísticos<sup>3.10</sup> [19,97], além de que a carga de um complexo desse tipo (+3) nem sequer coincidia com a do composto eluído inicialmente (+2). Além disso, as ligações Cr-N-R ou Cr-O-R', têm

---

<sup>3.10</sup> A redução de Cr(VI) processa-se por mecanismos que envolvem intermediários reactivos de Cr(V) e/ou de Cr(IV), ambos mais lábeis que o Cr(III) (Ver Capítulo 2 - Secção 2.1.2). Sendo assim, a "incorporação" de ligandos nas formas reduzida e/ou oxidada, pode resultar directamente dos passos de redução que dão origem aos complexos de Cr(III) (produtos finais). Tem sido admitido que, se o primeiro passo da redução envolver a transferência de um único electrão, os ligandos coordenados nos produtos finais estarão na forma oxidada e, se aquela transferência for de dois electrões, aqueles ligandos estarão na forma reduzida [19,97]. Este argumento costuma também ser utilizado em sentido inverso, isto é, usando a identificação dos produtos de reacção para justificar a atribuição de um determinado mecanismo (redução de Cr(VI) pela cisteína, por exemplo [60]).

pouca probabilidade de se manterem em condições tão ácidas [150], parecendo-nos duvidosa, por isso, a existência em solução do referido complexo. No caso da penicilamina, a natureza dos produtos obtidos nunca foi mencionada, sendo apenas afirmado que os compostos eluídos, em condições de pH e de força iónica mais drásticas, apresentavam uma cor violeta intensa. Após hidrólise prolongada, aquelas espécies transformar-se-iam lentamente no aquaião de Cr(III), levando aqueles autores a considerarem-nas espécies muito complexas, eventualmente dímeros com carga +4 formados em reacções paralelas com o ião dicromato, que nas condições ácidas da reacção, está presente em solução em percentagens que têm que ser consideradas (5-10% da quantidade total de crómio) [80].

Neste trabalho, e tomando por base os espectros de UV/Vis e de DC obtidos no final das reacções de redução (intensidade relativa e posição das bandas), não foi obtida qualquer evidência de que se tivessem formado outros complexos de Cr(III) além dos já referidos, nomeadamente complexos com aqueles aminoácidos coordenados nas formas oxidadas.

### 3.5.2.2 - Produtos finais da redução de Cr(VI) com glutatona

A redução intracelular de Cr(VI), processo "essencial" para que este elemento provoque lesões a nível do ADN, tem na glutatona um dos seus mais prováveis candidatos, *in vivo*. Experiências efectuadas com Cr(VI) e GSH, *in vitro*, têm resultado na formação de "ligações-cruzadas ADN-proteínas" (ADN-protein cross-links) e de outros aductos com compostos de Cr(III) / GSH ou Cr(III) / GSSG, de baixo peso molecular [61,113,114,152].

A redução de Cr(VI) pela glutatona tem vindo a ser estudada desde há alguns anos, tanto em meio ácido [24,74], como em meio neutro [28,52,100,116,124,149,153]. Os produtos finais destas reacções têm sido caracterizados como complexos de Cr(III) com glutatona, coordenada na forma reduzida [52,74,100] ou oxidada [124,125], além de espécies com crómio noutros estados de oxidação intermédios [24,28]. A literatura

descreve a preparação de alguns modelos destes compostos, a partir da redução de Cr(VI) pela glutathione [28,124,154,155], ou por síntese de Cr(III) com GSH ou GSSG [126,154,156]. Parece haver, no entanto, uma grande indefinição acerca da composição e da estrutura destes compostos. Põem-se dúvidas quanto ao modo como os ligandos estão coordenados ao ião central, quanto à forma, reduzida ou oxidada, em que os ligandos se encontram [28,124,126] e, ainda, quanto ao grau de polimerização dos compostos obtidos [52,125]. Até agora, não foi determinada a estrutura cristalina de nenhum destes compostos, o que seria determinante para se poderem estabelecer comparações com os compostos já preparados.

Tomando como objectivo racionalizar a informação disponível quanto aos compostos que se obtêm como produtos finais da redução de Cr(VI) com GSH, ou como resultado de sínteses a partir de Cr(III) e de GSH (ou GSSG), levou-se a cabo a preparação de compostos deste tipo, em solução e/ou no estado sólido, usando quer os métodos descritos na literatura quer novas condições experimentais, de modo a poder comparar e/ou identificar as características de cada composto, ou de cada grupo de compostos, além de, eventualmente, estabelecer conclusões acerca das respectivas composição e natureza. Definiu-se, para isso, uma estratégia de trabalho que contemplasse circunstâncias experimentais variadas:

1º) - Partindo de soluções aquosas de Cr(VI) e de GSH, a pH neutro, com diferentes proporções Cr(VI) / GSH: as soluções foram deixadas a reagir durante intervalos de tempo suficientemente longos para que as respectivas reacções de redução se completassem.

2º) - i) - Partindo da redução de Cr(VI) pela GSH:

- preparação de um composto sólido, segundo o processo descrito por Cieslak-Golonka *et al* [154].

- obtenção de dois compostos, também no estado sólido, destinados a serem utilizados como "compostos-modelo", a partir de Cr(VI) e de GSH em proporções de

1Cr(VI) : 2.5 e 5 GSH, usando um método semelhante ao descrito por O'Brien *et al* [28].

ii)- Com o objectivo de isolar produtos sólidos resultantes da reacção entre Cr(VI) e GSH, mas em diferentes estádios, intermédios, de redução, foram postas a reagir diversas misturas, contendo Cr(VI) em concentração fixa e GSH, em proporções Cr(VI) / GSH variadas (1: 5 - 80). Todas as misturas foram congeladas ao fim do mesmo intervalo de tempo (1 hora), sendo posteriormente liofilizadas.

iii)- Síntese "directa" de complexos a partir de um sal de Cr(III) e de GSH, de modo a obter o complexo  $[\text{Cr}(\text{H}_3\text{L})(\text{H}_2\text{L})]$  (GSH= $\text{H}_5\text{L}$ ) pelo método descrito por Abdullah *et al* [126].

iv)- Síntese de complexos "Cr(III)/GSSG", partindo de Cr(III) e de GSSG.

A descrição detalhada do trabalho experimental efectuado é apresentada no Capítulo 7 - Secção A.

### **3.5.2.2.1 - Resultados**

#### **1º)- Compostos obtidos em solução**

No final das reacções de redução de Cr(VI) pela GSH foram obtidas soluções de cor rosa-violeta, cuja característica mais notória, comum a todas as proporções Cr(VI)/GSH utilizadas, é uma banda simétrica, de grande intensidade, com sinal negativo, a cerca de 500 nm, nos espectros de DC (Ver Figura 3.22 - Secção 3.5.3.2.1, à frente).

#### **2º)- Compostos obtidos no estado sólido**

i)- Seguindo o método proposto por Cieslak-Golonka *et al* [154], obteve-se um sólido de cor verde-escura, instável, que, quando exposto ao ar, originava um óleo de cor roxa.

Pelo método semelhante ao descrito por O'Brien *et al* [28], prepararam-se compostos sólidos, também de cor verde escura, muito higroscópicos, que se decompõem em solução.

ii)- Das reacções de redução de Cr(VI) pela GSH (cujas soluções foram congeladas e liofilizadas) resultou um conjunto de misturas, que apresentavam, no momento da congelação, todas as cores correspondentes às diversas fases da redução do crómio, desde Cr(VI) até Cr(III) (amarelo, alaranjado, esverdeado, verde, rosa e violeta). Mas após a liofilização apenas se obtiveram sólidos de cor verde ou rosa-violeta, a maior parte deles contaminada por um sólido branco.

iii)- As várias preparações do composto de Cr(III) com GSH, supostamente  $[\text{Cr}(\text{H}_3\text{L})(\text{H}_2\text{L})]$ , pelo método de Abdullah *et al* [126], originaram sólidos de cor rosa-violeta, cuja identificação espectroscópica não foi coincidente com a descrita para aquele composto.

iv)- Finalmente, da tentativa de preparação de um complexo de Cr(III) com glutatona oxidada, obteve-se uma solução de cor vermelha, a partir da qual não se conseguiu isolar qualquer sólido.

Os compostos referidos nesta Secção, tanto os obtidos em solução como no estado sólido, foram analisados por métodos espectroscópicos. As características de UV/Vis e de DC estão compiladas na Tabela 3.10, onde são comparadas com as de compostos análogos conhecidos. Excluíram-se desta Tabela os dados de IV, dos quais não foi possível obter qualquer relação clara que fornecesse informação adicional à já extraída dos outros métodos espectroscópicos.

#### 3.5.2.2.2 - Discussão de resultados

As misturas em solução deverão, em princípio, ser constituídas por várias substâncias: GSH, quando presente em excesso, GSSG, resultante da oxidação pelo Cr(VI), complexos de Cr(III) / GSH e / ou Cr(III) / GSSG, além de eventuais possíveis outras espécies com crómio noutros estados de oxidação, nomeadamente Cr(V). A análise espectroscópica das referidas misturas e dos compostos que foram obtidos no estado sólido, permitiu, no entanto, a obtenção de resultados que podem esclarecer alguns aspectos da química de redução de Cr(VI) pela glutatona.

| Nº    | Composto<br>(origem);<br>Cr(VI)/GSH                      | Cor    | UV/Vis :<br>$\lambda_{máx}/nm$   | DC : $\lambda_{máx}/nm$                   | Ref <sup>n</sup> |
|-------|--|--------|--|---|------------------|
| 1     | 1:5 a)   | verde  | 380 652 b)   | (+390 (-)430 (+)480 (-)540 (+)620 c)      | E.t.             |
| 2     | 1:10   | "      | 390 659 b)   | (+390 (-)500 (-)560 c)                    | "                |
| 3     | 1:15   | rosa   | 410 570 b)   | (+390 (-)500 (-)570 c)                    | "                |
| 4     | 1:20   | "      | 440 520 b)   | (+390 (-)500 (-)580 c)                    | "                |
| 5     | 1:25   | "      | 418 550 b)   | (+390 (-)500 (-)570 c)                    |                  |
| 6     | 1:30   | "      | 390 540 b)   | (+390 (-)500 (-)580 c)                    | "                |
| 7/8   | 1:40 / 50  | "      | 400 540 b)   | (+390 (-)500 (-)570 c)                    | "                |
| 9     | 1:60   | videta | --- 545 b)   | (+390 (-)500 c)                           | "                |
| 10/11 | 1:80 / 100   | "      | --- ---  | (-) 500 c)                                | "                |
| 12/13 | 1:2.5 / 5 d)   | verde  | 670 b)   | (+390 (-)435 (+)480 (-)540 (-)630 c)      | "                |
| 14    | 1:2.5 d,e)   | ---    | 375 555 b)   | (+390 (-)500 (-)590 c)                    | "                |
| 15    | 1:5 d,e)   | ---    | ≈ 400 570 b)   | (+390 (-)500 (-)590 c)                    | "                |
| 16    | "Cr/GSH"   | verde  | 405 570 b)   | (+390 (-)500 c)                           | [154]            |
| 17/18 | [Cr(H <sub>3</sub> L)(H <sub>2</sub> L)]                 | roxo   | 408(69.5)546(62.4)<br>262(4.04x10 <sup>-3</sup> ) f)<br>258 300 420 550 g) | (+0.019) 402 (-0.244) 503 (+0.041) 612 f) | [126]            |
| 19    | "Cr(H <sub>3</sub> L)(H <sub>2</sub> L)"                 | videta | 390 500 b)   | (+390 (-)500 (-)600 f)                    | E.t.             |
| 20    | Na <sub>2</sub> [Cr(GSH) <sub>2</sub> ]                  | ---    | 395(68) 545(59.9) f)   | (-0.5) 378 (1.9) 500 (-1.6) 580 f)        | [124]            |
| 21    | "Cr(III)/GSSG"   | rosa   | 402 553 f)   | (+395 (-)500 (-)595 f)                    | E.t.             |
| 22    | Na <sub>4</sub> [Cr(GSH) <sub>4</sub> ]8H <sub>2</sub> O | ---    | ≈ 640 900  | ?   | [28]             |

Tabela 3.10 - Características espectroscópicas dos produtos resultantes da redução de Cr(VI) com glutatona, ou da síntese de compostos de Cr(III) com GSH ou com GSSG: a)-Compostos obtidos em solução aquosa: [Cr(VI)]=1mM; [GSH]=5-100 mM; pH neutro; b)-Espectros de reflectância (Vis) obtidos em Nujol; c)-Espectros (DC) obtidos no estado sólido (pastilhas de KBr); d)-Sólidos usados como "modelo" (Ver texto); e)-Sólidos do "tipo" d), liofilizados após terem sido mantidos em água durante 1 hora; f)-Solução aquosa; g)-Reflectância (valores entre parêntesis:  $\epsilon$  ou  $\Delta\epsilon / mol^{-1} dm^3$ )

A análise da Tabela 3.10 permitiu agrupar os compostos "Cr/GSH" em dois conjuntos, Tipo I e Tipo II, caracterizados pelas propriedades seguintes:

- I)
- cor verde
  - espectro de UV/Vis com máximo centrado a 650 nm (Figura 3.19-a)
  - espectros de DC com um grande número de bandas, com sinais que alternam entre (+) e (-) (Figura 3.20)
- II)
- cor rosa-violeta
  - espectro de UV/Vis com as principais bandas no visível centradas sensivelmente a 400 e a 550 nm (Figura 3.19-b)
  - espectros de DC caracterizados por uma banda de sinal negativo, muito intensa, a 500 nm, a qual, nalguns casos, apresenta uma outra banda associada, a 580- 600 nm (Figura 3.21).

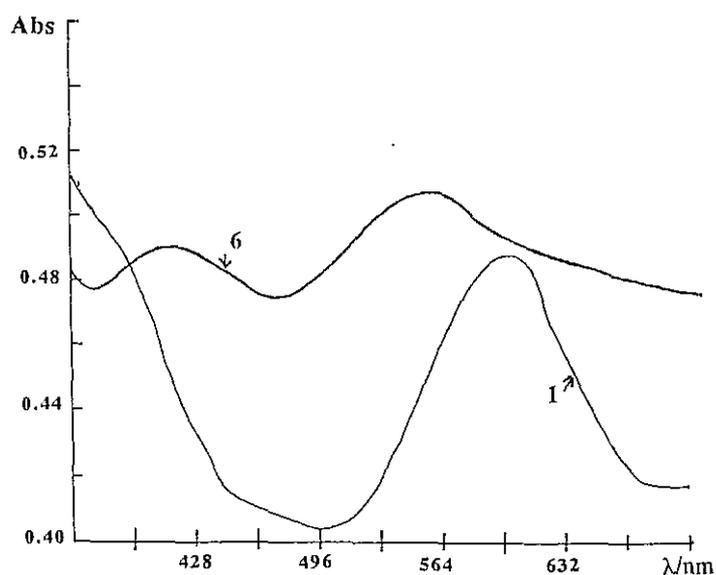


Figura 3.19 - Espectros de UV/Vis (obtidos em pasta de Nujol) dos compostos 1 e 6 (Tabela 3.10)

No **Tipo I** estão agrupados os compostos 1, Tabela 3.10, para o qual houve paragem da reacção numa fase quase inicial da redução, 12 e 13, obtidos segundo um método análogo ao da preparação de compostos de Cr(V) [28,124] e 22, especificamente um complexo de Cr(V) com GSH [124]. Considerando as respectivas características espectroscópicas, pode dizer-se que todos parecem ser compostos de (ou com) Cr(V)

que, pelo menos, deve existir nestas amostras em quantidade apreciável. A cor verde característica destes sólidos tem origem na transição electrónica  ${}^2T_2 \rightarrow {}^2E$  ( $\text{Cr(V)}=d^1$ ), de baixa energia, característica do crómio neste estado de oxidação, que se traduz na banda de absorção observada a cerca de 650 nm [23,124]. Os espectros de DC destes compostos, por sua vez, apresentam um "padrão" completamente diferente do normalmente apresentado por compostos de Cr(III) (Figura 3.20). Este "padrão" parece indicar a existência de uma mistura complexa no sólido que se está a analisar.

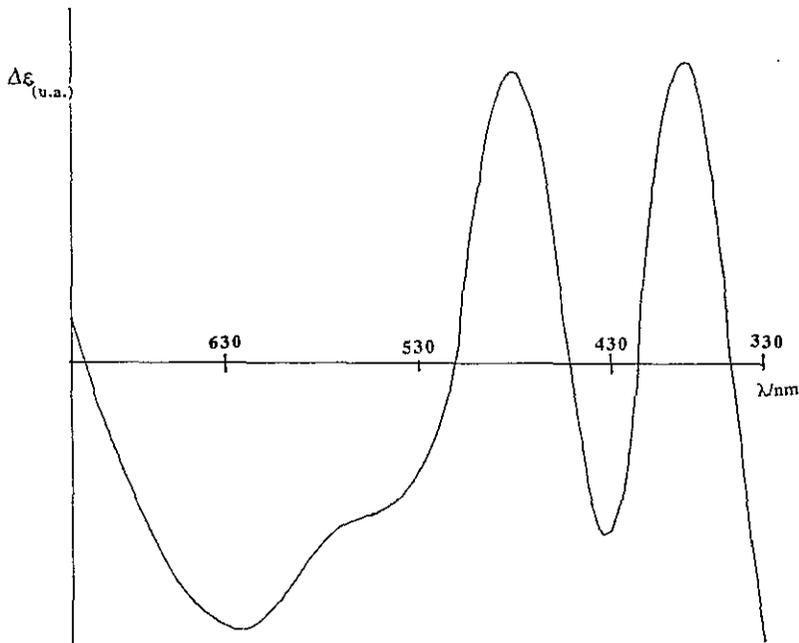


Figura 3.20 - Espectro de DC (obtido em pastilha de KBr) do composto I

Por sua vez, o **Tipo II** é declaradamente formado por complexos de Cr(III), também com base nas suas características espectroscópicas (número de bandas na região visível e espectros de DC). No entanto, parece englobar dois tipos de situações distintas: uma, para a qual os espectros de DC apresentam apenas uma banda de sinal negativo a 500 nm (compostos 9,10,11,16,17) e outra, em que associada àquela, aparece, a 580-600nm, uma segunda banda de menor intensidade (compostos 2,3,4,5,6,7,8,14,15,19, 20 e 21) (Figura 3.21).

Os espectros electrónicos destes complexos de Cr(III) apresentam a banda de menor energia a cerca de 550 nm, que traduz um campo de ligandos um pouco mais

fraco que o dos tris(aminocarboxilatos) (Ver Capítulo 5 - Secção 5.3.3), o que pode significar uma esfera de coordenação do tipo  $N_2O_4$ , em vez da  $N_3O_3$  destes últimos [18,126,157,158].

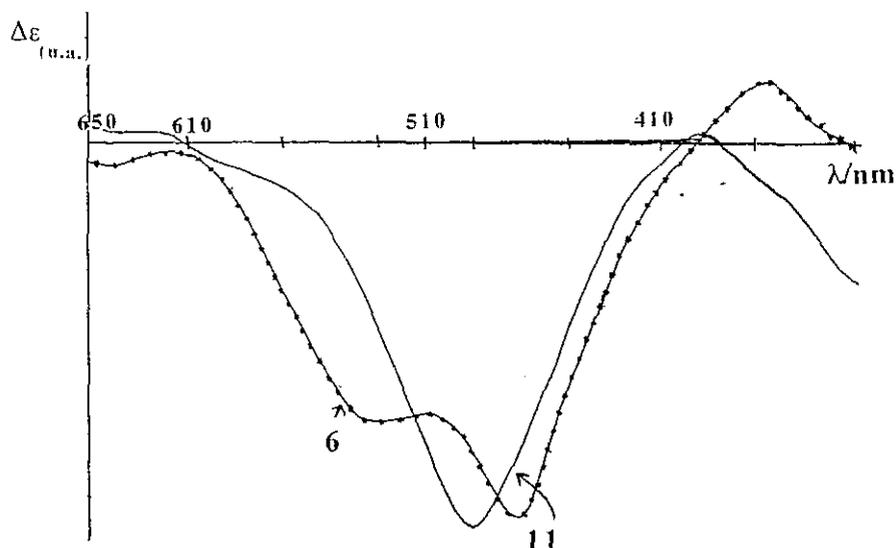


Figura 3.21 - Espectros de DC (obtidos em pastilha de KBr) dos compostos: 6 (---) e 11 (—)

O facto dos espectros de DC dos compostos do **Tipo II** serem dominados por uma banda de sinal negativo a 500 nm, é invulgar, pois nos complexos de simetria mais baixa a banda correspondente à transição de menor energia ( ${}^4A_{2g} \rightarrow {}^4T_{2g}$ , em complexos octaédricos) apresenta-se, geralmente, desdobrada em duas componentes de sinal oposto [126,157,158] (Ver Capítulo 5). Após ter havido redução completa do Cr(VI) e como as bandas na região visível se devem a transições d-d do centro metálico de Cr(III), assimétrico (o DC detecta apenas espécies opticamente activas), a GSH que não reagiu e/ou a GSSG (os sólidos não foram purificados) deve encontrar-se coordenada ao crómio produzindo centros quirais responsáveis por aquele tipo de espectros.

Na Secção 3.3 tinha-se constado que a velocidade de redução de Cr(VI) pela GSH dependia da concentração desta última. Uma vez que todas as experiências foram efectuadas com proporções Cr(VI) / GSH superiores às estritamente estequiométricas e como a redução foi parada ao fim do mesmo intervalo de tempo, as diferentes misturas

não estavam na mesma fase de redução, aquando dessa paragem. O composto resultante da proporção 1 Cr(VI) / 5 GSH é constituído, provavelmente, por um complexo de Cr(V), em primeira análise devido à sua cor verde, ao contrário de todos os outros obtidos a partir das proporções mais elevadas, com excepção feita ao resultante da proporção 1:10, que parece estar numa "zona de fronteira". As misturas 1:10, 20 e 25 também apresentavam cor verde no momento da congelação, mas após a liofilização, verificou-se que se tinham alterado para rosa-violeta, ou seja, mesmo a baixa temperatura e num processo de exclusão progressiva de água, a reacção de redução ainda prosseguiu. Este mesmo comportamento foi também observado para os compostos "modelo de Cr(V)" (12 e 13), que tinham cor verde no estado sólido, mas que quando em solução durante algum tempo, se decompuseram (reduziram). Essa transformação foi visível quer pelas alterações da cor (verde → rosa-violeta) quer das suas características espectrais (14 e 15).

Analisando novamente a Tabela 3.10, verifica-se que, por um lado, os compostos que apresentam espectros de DC com uma única banda (500 nm), são os que resultam da redução de Cr(VI) pela GSH em proporções Cr(VI) / GSH muito elevadas (>1:60) (9,10, 11) (soluções liofilizadas) e o que foi obtido pelo método de Cieslak *et al* [154] (16), além daquele que, supostamente, é à partida um complexo de Cr(III) com GSH coordenada (17). Este mesmo tipo de espectros foi também obtido para todas as proporções Cr(VI) / GSH usadas (1:10, 20, 30, 40, 60, 80), quando se esperou tempo suficiente para que as reacções de redução se completassem (Ver Figura 3.9 e Secção 3.5.3.2.1 - Figura 3.24). A semelhança entre os espectros obtidos sugere, embora não prove, que para todas aquelas proporções Cr(VI) / GSH se forma um único composto, ou então uma mistura "relativamente uniforme" de compostos, que originam espectros do mesmo tipo.

Todavia, os compostos cujos espectros têm uma segunda banda (ombro) a 580-600 nm, são aqueles em que se utilizaram menores proporções de Cr(VI) / GSH (2,3,4,5, 6,7,8), os que resultaram da decomposição em solução dos "compostos modelo", que

tinham sido preparados a partir de proporções baixas de Cr(VI) / GSH ( e 15), o composto de Cr(III) que se admite ter GSSG coordenada (20) [124], o composto obtido em solução, a partir de Cr(III) e de GSSG (21) e o resultante da síntese do complexo de Cr(III) com GSH segundo Abdullah *et al* [126], cuja caracterização não foi coincidente com a daquela referência (19).

Sendo assim, pareceu-nos possível aventar a hipótese de que a glutathiona oxidada, quando coordenada ao Cr(III), pudesse ser a responsável pela segunda banda, a 580-600 nm, nos espectros de DC daqueles últimos compostos. De notar que esta banda deixa de estar presente nos espectros de DC dos compostos resultantes da redução com proporções baixas de Cr(VI) / GSH, desde que as reduções sejam levadas até ao fim (várias horas de reacção). É provável que, durante a redução de Cr(VI), possa ser a GSSG que inicialmente se vai coordenar ao centro de crómio, seja já ao Cr(III) ou ainda às formas nos estados de oxidação intermédios, Cr(IV) ou Cr(V). Como, a pH neutro, a GSSG contém, por unidade, maior número de locais de coordenação do tipo "duro" (carboxilatos) que a glutathiona reduzida, estando esses locais disponíveis na forma aniónica, deve ter "melhor" capacidade para coordenar ao crómio durante a redução. Mas, desde que o redutor esteja presente em grande excesso na forma reduzida (GSH), há, possivelmente competição, entre as duas formas de glutathiona e a GSH vai substituindo a GSSG que inicialmente estava coordenada, o que justificaria o não aparecimento daquela segunda banda nos espectros obtidos das experiências em que as misturas reagiram até se completar a redução, mesmo para as proporções Cr(VI) / GSH mais baixas, as quais, de qualquer modo, também contêm o redutor em excesso.

Esta tentativa de distinção entre GSH e GSSG coordenada, concorda com a proposta de mecanismo que foi analisada atrás (nota de rodapé 3.10, Secção 3.5.2.1.2), segundo a qual, sempre que o processo de redução se dá por transferência inicial de um electrão, o ligando "aparece" nos produtos finais coordenado na sua forma oxidada. Este facto é corroborado pelas evidências da presença de complexos de Cr(V) nos passos iniciais da redução (complexos agrupados no Tipo I) [19,52,60,97,124].

A espectrofotometria de UV/Vis, ao contrário da de DC, parece ser incharacterística na distinção de complexos com glutathiona reduzida ou oxidada. Por esta técnica, tentou verificar-se se se observava alguma banda a cerca de 260 nm, que pudesse justificar a existência da ligação Cr-S, servindo assim para distinguir, eventualmente, glutathiona coordenada na forma oxidada ou reduzida. Contudo, apenas se conseguiram detectar alterações na intensidade de um ombro nessa região do espectro, que primeiro aumenta e depois diminui com o tempo, o qual já estava também presente nas soluções iniciais tanto de GSH como de GSSG.

Finalmente, os espectros de infravermelho obtidos das soluções liofilizadas, de um modo geral, apresentam bandas largas e pouco informativas. Mesmo nos casos em que foram utilizadas as proporções Cr(VI) / GSH mais elevadas, nem sempre foi óbvia a presença da banda de alongamento do grupo sulfidrílo -SH, a cerca de 2550 cm<sup>-1</sup>, que deveria ser clara quando há excesso de GSH. Na região em que se situa a banda de alongamento da ligação -S-S-, a cerca de 520 cm<sup>-1</sup>, embora sejam visíveis algumas bandas pouco intensas que poderão, eventualmente, corresponder àquele grupo, foi impossível identificá-la.

### **3.5.3 - Cinética de formação de produtos finais de reacções de redução de Cr(VI) por tióis**

#### **3.5.3.1 - Reacções de redução com cisteína e com penicilamina**

A cinética de formação dos iões complexos [Cr(L-cys)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> e [Cr(L- e D-pen)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, identificados como produtos finais da redução de Cr(VI) pela cisteína ou pela penicilamina, foi estudada em condições experimentais variadas, a pH neutro ou aproximado. As reacções foram seguidas por DC <sup>3.11</sup>, tendo a variação de absorvância com o tempo, sido controlada a comprimento de onda fixo correspondente ao λ<sub>máx</sub> de

---

<sup>3.11</sup> Usou-se espectrofotometria de DC preferencialmente à de UV/Vis, porque, por razões de sensibilidade do equipamento utilizado, a variação de intensidade das bandas escolhidas para seguir a reacção é mais significativa por aquele primeiro método.

absorção da banda de maior intensidade característica de cada um dos complexos, 612 nm para  $[\text{Cr}(\text{L-cys}_2)]^-$  e 610 nm para  $[\text{Cr}(\text{L-pen})_2]^-$ , até se atingir, em cada caso, um valor que se manteve constante durante um intervalo de tempo bastante alargado (Para outros detalhes experimentais ver Capítulo 7 - Secção A).

### 3.5.3.1.1 - Resultados

Tanto na reacção com cisteína como com penicilamina, observou-se um aumento de absorvância em função do tempo, para qualquer das condições experimentais usadas (Figura 3.22).

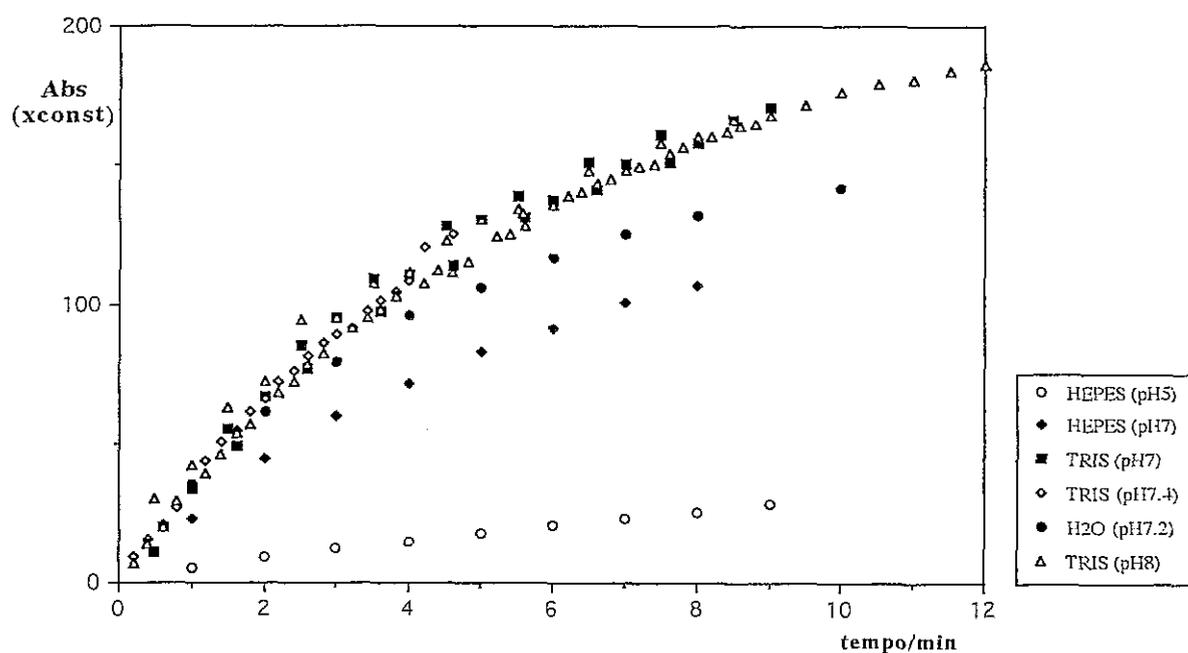


Figura 3.22 - Redução de Cr(VI) pela cisteína: aumento de absorvância com o tempo:  $\lambda = 612 \text{ nm}$ ;  $[\text{Cr}(\text{VI})] = 5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  e  $[\text{L-cisteína}] = 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  (1 Cr(VI) : 20 L-cisteína); soluções aquosas a  $\text{pH}=7.0$ , ajustado antes do início da reacção com KOH, ou tamponizadas com Tris.HCl ou HEPES  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$ ; especificações de pH, na figura.

Aos dados de absorvância foi aplicado um tratamento de cinética de 1ª ordem, constatando-se haver linearidade nas representações gráficas de  $\ln(A_\infty - A_{\text{obs}})$  em

função do tempo, durante pelo menos 2 ou 3 tempos de vida média. As constantes de velocidade de formação,  $k_{obs}$ , dos produtos finais destas reacções, obtidas em condições experimentais de pseudo-primeira ordem, foram calculadas a partir das referidas representações gráficas (Tabela 3.11).

| Condições experimentais    | Cisteína                | Penicilamina            |
|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                            | $10^3 \times k_{obs}/s$ | $10^3 \times k_{obs}/s$ |
| Tris.HCl (pH=8.0)          | 2.44                    | 0.98                    |
| Tris.HCl (pH=7.4)          | 2.34                    | 1.10                    |
| Tris.HCl (pH=7.0)          | 2.56                    | 1.34                    |
| HEPES (pH=7.0)             | 1.36                    | ----                    |
| HEPES (pH=5.1)             | 0.96                    | ----                    |
| H <sub>2</sub> O (pH=7.2)  | 1.76                    | ----                    |
| H <sub>2</sub> O (pH=7.68) | ----                    | 0.75                    |

Tabela 3.11 - Constantes de velocidade,  $k_{obs}$ , de formação de  $[Cr(L-cys)_2]^-$  e de  $[Cr(L-pen)_2]^-$ , resultantes da redução de Cr(VI) por L-cisteína ou L-penicilamina em condições de pseudo-1ª ordem;  $[Cr(VI)] = 5.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $[L\text{-Penicilamina}] = [L\text{-Cisteína}] = 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  (1 Cr(VI) : 20 L-Aminoácido)

A análise da Tabela 3.11 permite constatar que, de um modo geral,  $k_{obs}$  depende do redutor, do pH do meio e do tipo de tampão utilizado, isto é:

- i) -  $k_{obs}$  é tanto menor quanto mais ácida for a solução;
- ii) -  $k_{obs}$ , para o mesmo pH, depende do meio ter sido ou não tamponizado;
- iii) - para soluções tamponizadas, ao mesmo pH, as constantes de velocidade de formação são mais elevadas quando se utiliza o tampão Tris.HCl;
- iv) - aquelas constantes de velocidade, no caso da reacção com penicilamina, são cerca de metade das da cisteína.

A partir dos coeficientes de absorvidade molar dos complexos  $[Cr(L-cys)_2]^-$  e

$[\text{Cr}(\text{L-pen})_2]^-$  (Ver Capítulo 4), conhecidos da literatura [78,126], foram calculadas, para um mesmo intervalo de tempo, as concentrações em solução de cada um dos complexos formados, bem como as respectivas percentagens em relação à quantidade de Cr(VI) inicialmente presente em solução (Tabela 3.12). Depois de se terem atingido valores de absorvância constantes, ou seja, após cerca de 2.5 horas de reacção, essas percentagens máximas foram de 57%, para  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$  e de 35%, para  $[\text{Cr}(\text{L-pen})_2]^-$ . Estes resultados reflectem, mais uma vez, as diferenças já anteriormente constatadas entre as reacções de redução com estes dois aminoácidos.

| Ião<br>complexo formado                     | Tris.HCl      |               |               | HEPES         |               | H <sub>2</sub> O |               |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------------|---------------|
|   | pH=7.0        | pH=7.4        | pH=8.0        | pH=7.0        | pH=5.1        | pH=7.4           | pH=6.7        |
| $10^4 \times [\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$ | 2.55<br>(53%) | 2.51<br>(50%) | ----          | 1.82<br>(36%) | 1.36<br>(27%) | 2.15<br>(43%)    | ----          |
| $10^4 \times [\text{Cr}(\text{L-pen})_2]^-$ | 1.14<br>(23%) | 1.09<br>(22%) | 1.08<br>(21%) | ----          | ----          | ----             | 0.78<br>(16%) |

Tabela 3.12 - Concentrações molares ( $\times 10^4$ ) em  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$  e em  $[\text{Cr}(\text{L-pen})_2]^-$  e percentagens em relação à concentração inicial de Cr(VI) (entre parêntesis), atingidas ao fim de 16 minutos de reacção;  $[\text{Cr}(\text{VI})] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $[\text{L-Aminoácido}] = 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ; reacções estudadas por Dicroísmo Circular:  $\Delta\epsilon ([\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-) = +1.56 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$  e  $\Delta\epsilon ([\text{Cr}(\text{L-pen})_2]^-) = +1.48 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$  [78]

### 3.5.3.1.2 - Discussão de resultados

Como veremos no Capítulo 4, onde os iões complexos bis(cisteinato) e bis(penicilaminato)cromato(III) são estudados em detalhe, há determinadas condições experimentais ideais para que aqueles complexos se formem em solução. O pH do meio é muito importante na "disponibilidade" dos locais para a coordenação. A pH 5, por exemplo, é patente que, para o mesmo intervalo de tempo, se forma menor quantidade de complexo, em relação às outras experiências efectuadas a pH neutro ou aproximado (Tabela 3.12). Em meios mais acídicos, os grupos SH estão possivelmente protonados na quase totalidade ( e, eventualmente, também os grupos amina), não se coordenando

ao ião metálico central e, portanto, não dando origem ao aumento de intensidade que se esperaria das bandas características das ligações Cr-S naqueles complexos, usadas como controle da velocidade de formação dos referidos reacções complexos.

O tipo de tampão também parece influenciar a velocidade destas reacções e consequentemente a formação dos respectivos produtos finais. O próprio tampão Tris.HCl, pelo menos segundo a literatura [113], actua como catalisador destas reacções, podendo esta hipótese explicar as constantes de velocidade mais elevadas, obtidas sempre que foi utilizado aquele tampão.

É importante notar que as velocidades de formação destes iões complexos (Tabela 3.11) são muito menores que as velocidade de redução para o mesmo sistema (Tabela 3.5). O processo de formação destes complexos implica a coordenação de ligandos por três átomos dadores (forma tridentada), com reacções de fecho de anel. Estas reacções são, de um modo geral, bastante mais lentas que as reacções redox.

Relativamente às diferenças entre as velocidades de formação dos complexos com cisteína ou com penicilamina, elas poderão dever-se a mecanismos de redução distintos, que podem implicar velocidades diferentes para os diversos passos e, portanto, velocidades de reacção globais, também diferentes [99,100,127], tal como foi proposto no estudo dos mecanismos de redução do Cr(VI) por estes aminoácidos, que efectuámos neste trabalho (Ver Secções 3.3.3 e 3.4.3). Sendo assim, a velocidade com que o Cr(III), ou os intermediários de Cr(V), ou de Cr(IV), se formam em solução, tornando-os "acessíveis" a coordenarem o aminoácido, na forma reduzida ou oxidada, será também diferente [19,60,97,99,100,127]. As constantes de estabilidade daqueles complexos são também factores a ser tidos em conta, embora apenas por considerações termodinâmicas.

As quantidades máximas dos referidos complexos obtidas no "final" das reacções de redução,  $[\text{Cr}(\text{L-cys}_2)]^-$  (57%) e  $[\text{Cr}(\text{L-pen})_2]^-$  (35%), poderão reflectir a formação em solução de espécies variadas, originadas no processo de redução ou

produtos de reacção de hidrólise, e pelas quais a quantidade inicial de crómio é distribuída. Essas espécies não são, provavelmente, opticamente activas e, por isso, não interferem nos espectros de dicroísmo circular.

### **3.5.3.2 - Reacções de redução com glutatona**

Tal como foi visto na Secção 3.5.2.2, a redução de Cr(VI) pela GSH, em condições experimentais de excesso de ligando, dá origem a espécie(s) de Cr(III) opticamente activa(s), cujos espectros de DC se caracterizam, essencialmente, por uma banda muito intensa, de sinal negativo, com um máximo a cerca de 500 nm.

Experiências preliminares mostraram que, para uma mesma concentração de Cr(VI), a intensidade desta banda depende da concentração de GSH e do tempo de reacção. Em consequência destas observações foi efectuado o estudo cinético da formação do(s) complexo(s) de Cr(III), o(s) qual(is), tal como se discutiu na Secção 3.5.2.2.2, pensamos ser(em) complexo(s) de Cr(III) e glutatona reduzida. O aumento de intensidade da referida banda, a 500 nm, foi seguido, em função do tempo de reacção, por espectrofotometria de DC.

#### **3.5.3.2.1 - Resultados e discussão**

Para o mesmo tempo de reacção, a formação da banda negativa a 500 nm, é tanto mais rápida, e a banda é tanto mais intensa, quanto maior a concentração de GSH presente na solução em reacção. Para cada caso individual, quanto maior é o tempo de reacção maior a intensidade da referida banda (Figura 3.23-a e b).

Representando a altura daquela banda em função da concentração de glutatona, para os mesmos tempos de reacção verifica-se, de um modo geral, uma proporcionalidade directa entre a intensidade e a respectiva concentração de glutatona, até à proporção máxima de 1 Cr(VI):  $\approx$  40 GSH (Figura 3.24). Para proporções mais elevadas, atinge-se um "patamar", correspondente a um valor limite máximo de quantidade de composto em solução. Estes resultados indicam claramente que a

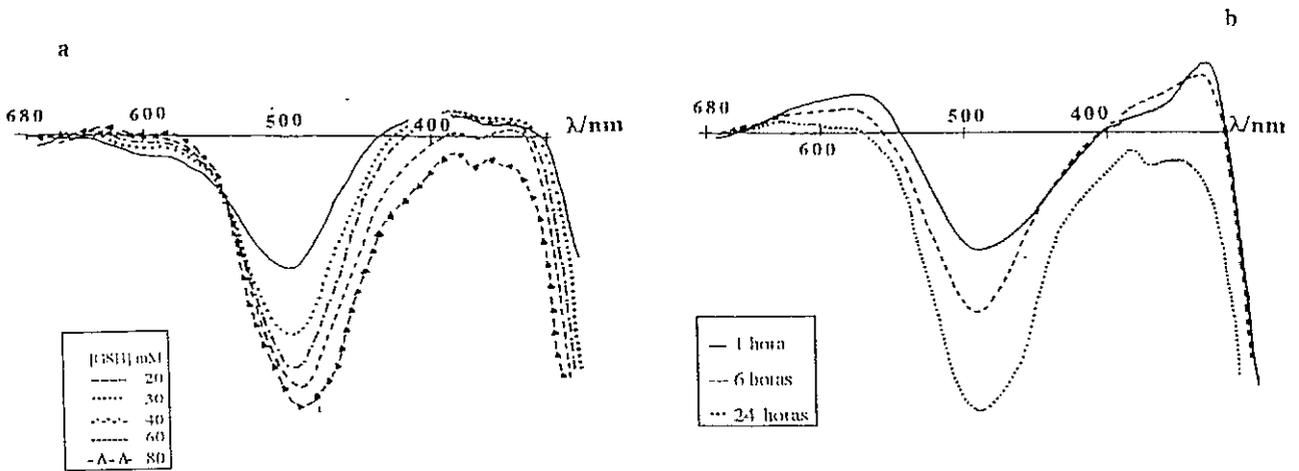


Figura 3.23 - a)-Banda de sinal negativo em DC ( $\lambda_{\text{m\acute{a}x}} = 500 \text{ nm}$ ), resultante da redu\c{c}\~ao de Cr(VI) por GSH, ap\~os 24 horas de reac\c{c}\~ao (propor\c{c}\~oes Cr:GSH especificadas na figura); b)-Varia\c{c}\~ao da intensidade das referidas bandas com o tempo de reac\c{c}\~ao (1 Cr(VI): 80GSH); os tempos de reac\c{c}\~ao est\~ao especificados na figura

forma\c{c}\~ao da esp\~ecie (ou esp\~ecies) respons\~avel pela referida banda a 500 nm nos espectros de DC est\~a condicionada pela quantidade de cr\~omio presente em solu\c{c}\~ao, pois que a GSH se encontra sempre em grande excesso.

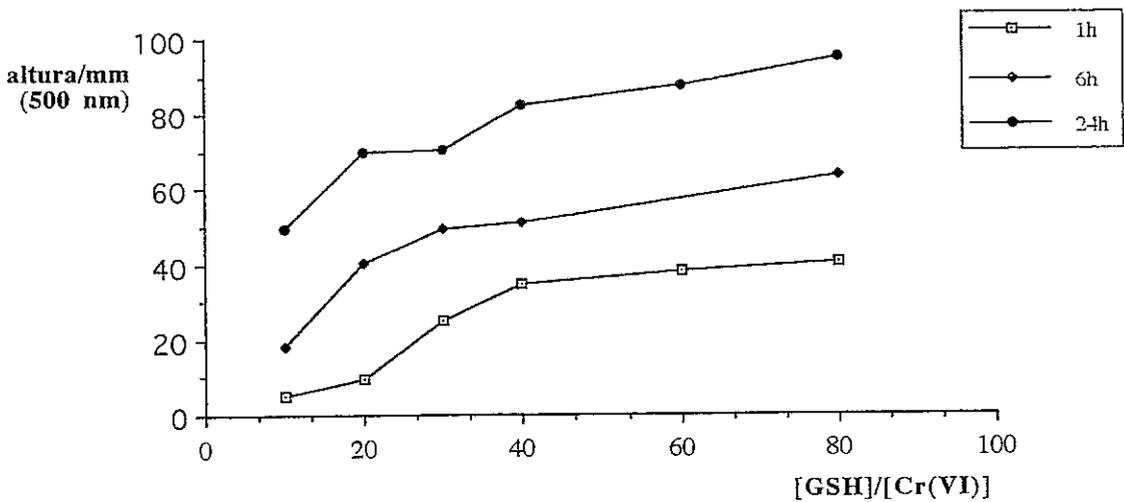


Figura 3.24 - Rela\c{c}\~ao entre a intensidade da banda, de sinal negativo, a 500 nm (DC) e o tempo de reac\c{c}\~ao (redu\c{c}\~ao de Cr(VI) pela glutathiona)

A forma\c{c}\~ao do(s) complexo(s) n\~ao segue uma cin\~etica de ordem simples, n\~ao tendo sido poss\~ivel estabelecer uma lei de velocidade que descreva este processo. Ao

comprimento de onda a que foi feito o estudo destas reacções (500 nm). verifica-se, na fase inicial da redução, o aparecimento de uma banda de sinal positivo, pouco intensa, que rapidamente começa a dar origem à banda negativa que temos estado a referir. Este tipo de evolução espectral traduz, muito provavelmente, a formação e a decomposição de espécies intermediárias, nomeadamente de Cr(V), que interferem nos espectros do(s) produto(s) final(is) (Ver Secção 3.5.2.2.2, Tabela 3.10 e compostos 1, 12 e 13).

### 3.6 - Resumo e considerações finais

O conhecimento da interação do crómio com sistemas biológicos incide quase obrigatoriamente no estudo da interrelação entre este elemento e redutores intracelulares com grupos tiólicos (glutathiona e cisteína), dadas as concentrações fisiológicas de alguns destes compostos aliadas às suas propriedades redutoras.

Neste Capítulo, foram postas em evidência as dificuldades que dominam o estudo da cinética e dos mecanismos das reacções de redução de Cr(VI) com alguns daqueles redutores tiólicos, dada a diversidade de condições experimentais utilizadas pelos diferentes autores que levam a uma dispersão de resultados de difícil comparação. Embora se esteja ainda longe de conclusões definitivas, foram exploradas algumas situações novas, que permitiram obter resultados com interesse para a compreensão dos mecanismos destas reacções. Nomeadamente, do tratamento das reacções de redução de Cr(VI) pela GSH como sistemas bifásicos, foi possível obter os parâmetros cinéticos referentes aos dois primeiros passos destas reacções. Estes parâmetros permitiram relacionar a redução do Cr(VI) com a formação e a decomposição de intermediários, do tipo tioéster, que foram também identificados e caracterizados, em concordância com o tipo de mecanismo normalmente aceite na literatura. A constatação de passos iniciais muito rápidos levou-nos a estudos cinéticos por "stopped-flow", que possibilitaram a observação de um tioéster, pela primeira vez detectado na reacção de redução do Cr(VI) pela cisteína, em meio neutro. A "identificação" deste intermediário é

considerada um factor de peso na atribuição inequívoca, a este tipo de reacções, de um mecanismo de pré-equilíbrio, desfazendo assim alguma especulação existente na literatura. Os resultados obtidos para as reduções de Cr(VI) com penicilamina permitiram a confirmação de outro tipo de mecanismo, corroborando dados anteriormente obtidos por outros métodos.

O interesse pelos aspectos estruturais destes intermediários levou-nos a estudar, por espectroscopia de Raman, a reacção de redução de Cr(VI) pela GSH, em meio neutro. Deste estudo obtivemos evidência para o envolvimento do grupo sulfidrilo com o cromato na formação do intermediário, concordando com resultados a pH mais baixo.

A aplicação do mesmo modelo matemático usado no estudo da redução do Cr(VI) tornou possível determinar constantes cinéticas de pseudo-primeira ordem (e de 2ª ordem na reacção com GSH) para a formação e decomposição daqueles intermediários. E se no caso da reacção com cisteína as referidas constantes estão em quase perfeita concordância com os parâmetros obtidos para a redução de Cr(VI), isto é, de tal modo que a constante de velocidade,  $k_{1(\text{obs})}$ , de redução do cromato é praticamente igual à constante,  $k_{2(\text{obs})}$ , de formação do tioéster, confirmando o mecanismo de pré-equilíbrio atribuído, na redução com glutatona o processo apresentou-se mais complexo. Pelo facto de neste último caso  $k_1(372 \text{ nm})$  ser superior a  $k_1(433 \text{ nm})$ , parece indicar interferência do tioéster nos valores de absorvância lidos para controlar a redução do Cr(VI) (na banda característica do cromato a 372 nm), estando-se simultaneamente a ler o desaparecimento daquele intermediário, que se forma rapidamente e se vai entretanto acumulando (o passo de decomposição é mais lento). Isto levou-nos a encarar aquelas primeiras constantes apenas de um ponto de vista qualitativo, o que poderá, eventualmente, explicar a dispersão de outros resultados existentes na literatura. De qualquer modo, foi inovador o estudo de comparação entre os parâmetros cinéticos de dois processos simultâneos e concorrentes neste tipo de reacções.

Outros aspectos de grande importância para o tema focado neste Capítulo foram a identificação dos produtos finais formados nas reacções de redução de Cr(VI) pelos referidos redutores e a sua cinética de formação. Para as reduções com cisteína e com penicilamina, a pH neutro, foram identificados como produtos finais complexos de Cr(III) com aqueles aminoácidos coordenados na forma reduzida. Apesar de não termos informação acerca deste tipo de complexos com os respectivos aminoácidos nas formas oxidadas, pôs-se a hipótese de que a formação deste último tipo de compostos não se tivesse verificado, pois não encontramos quaisquer indícios nos espectros de dicroísmo circular, onde certamente eles se manifestariam. Como resultado das reduções com glutathiona, pensamos ter obtido apenas misturas, na grande maioria dos casos. No entanto, dada a variedade de situações que foram testadas, foi possível tecer algumas considerações que julgamos pertinentes. Os espectros de DC destes compostos apresentam, praticamente, uma única banda muito intensa, de sinal negativo, a cerca de 500 nm, e são característicos das reduções em que o redutor estava presente em grande excesso, enquanto que os resultantes de reacções com menores quantidades de GSH apresentam também um ombro associado àquela banda, a 580-590 nm. Este ombro pode ser indicativo de GSSG coordenada, a qual iria sendo substituída pela GSH, tanto mais rapidamente quanto maior for esse excesso. Além disso, nos casos em que não se permitiu que a redução se completasse, os espectros de DC são bastante complexos, fazendo prevêr a presença de outras espécies, as quais pela cor verde que apresentam (em solução ou no estado sólido quando essas soluções foram liofilizadas), contêm certamente, e ainda, crómio no estado de oxidação +5, mesmo ao fim de 1 hora de reacção! (os espectros electrónicos nestes casos têm uma banda a cerca de 650 nm, considerada característica do Cr(V)). O facto de complexos de Cr(V) poderem ser gerados a pH neutro, em intervalos de tempo razoáveis, permite extrapolar para situações *in vivo*, pois que a sua presença é um aspecto importante a ter em conta na redução de Cr(VI), já que se julga serem eles os responsáveis pela formação de radicais livres, importantes nos mecanismos de toxicidade do crómio.

## **4. Síntese, caracterização espectroscópica e estudos cinéticos de compostos de coordenação de Cr(III) com ligações Cr-S**

### **4.1 - Introdução**

Ao longo dos três Capítulos anteriores, foram focados alguns aspectos da química do crómio em solução (Capítulo 1) e estudadas reacções de redução nas quais este elemento está envolvido (Capítulo 2), dando-se particular atenção, em ambos os casos, aos aspectos que, de algum modo, possam ser relevantes para compreender o comportamento biológico deste elemento (Capítulos 2 e 3). Em relação a este último aspecto, focaram-se, em particular, os redutores que contêm enxofre, tanto pela sua capacidade para reduzirem o cromato, como por se ligarem ao centro metálico, dando origem a compostos de coordenação de Cr(III) com ligações Cr-S (Capítulo 3).

Sendo hoje aceite que o resultado final da redução de Cr(VI), *in vivo*, pode ser a formação de complexos de Cr(III) com aminoácidos, peptídeos ou proteínas contendo resíduos de cisteína, considerou-se ser do maior interesse investigar em profundidade a cinética de substituição em complexos modelo daquelas situações, bem como outros aspectos da respectiva química em solução. Em termos da cinética de substituição de compostos de coordenação de Cr(III), considerados normalmente inertes, a ligação Cr-S comporta-se de maneira que se pode considerar "invulgar", pois hidroliza-se de modo rápido e relativamente reversível, em condições de pH não muito diversas das do pH fisiológico [79,151,160,161].

No presente Capítulo, são estudados, nomeadamente por métodos espectroscópicos, os comportamentos em solução (aquosa ou não) de alguns complexos de Cr(III) que contêm aquela(s) ligação(ões) Cr-S, assim como a sua cinética de substituição por hidrólise ácida. Para isso, começou-se por sintetizar e caracterizar alguns complexos daquele tipo, tais como  $M[Cr(cys)_2].2H_2O$  ( $M=Na/K$ ),  $K[Cr(pen)_2].2H_2O$  ( $pen=D\text{-}e\text{-}L\text{-}$ ) e  $Na_3[Cr(tma)_2].7H_2O$ , em que  $cys=(cisteinato)^{2-}$ ,  $pen=(penicilaminato)^{2-}$  e  $tma=(tiomalato)^{3-}$ .

Os resultados destes estudos permitem inferir algumas considerações em relação à estrutura e ao comportamento em solução deste género de compostos, que são relevantes para compreender alguns dos processos biológicos associados à toxicidade do Cr(VI) e a outras propriedades biológicas deste elemento.

## **4.2 - Síntese e caracterização dos compostos de coordenação de Cr(III)**

**$M[Cr(L\text{-}cys)_2].2H_2O$  ( $M=Na$  ou  $K$ ),  $K[Cr(pen)_2].2H_2O$  ( $pen=D\text{-}$  ou  $L\text{-}pen$ ) e  $Na_3[Cr(tiomalato)_2].7H_2O$**

### **4.2.1 - Síntese química**

Dos complexos de Cr(III) que contêm ligações Cr-S,  $M[Cr(L\text{-}cys)_2].2H_2O$  ( $M=Na$  ou  $K$ ) [126,148,151],  $[Cr(L\text{-}hist)(D\text{-}pen)] H_2O$  [162] e  $[Cr(L\text{-}cys)(L\text{-}hist)] 3.5H_2O$

[163], são dos que melhor estão caracterizados na literatura, uma vez que as suas estruturas cristalinas foram estabelecidas. Alguns outros compostos do mesmo tipo, como é o caso de complexos de Cr(III) com glutathiona [126] e com penicilamina [127], não têm estruturas determinadas, embora se disponha de informação espectroscópica que permita sugerir determinadas propriedades estruturais.

Os complexos de Cr(III) por nós estudados, foram sintetizados seguindo métodos de preparação sensivelmente análogos ao descrito para o bis(L-cisteinato)cromato(III) [148], com algumas modificações. Em particular, foram encontradas condições apropriadas de síntese para os complexos  $K[Cr(L\text{- ou }D\text{-pen})_2].2H_2O$ , que ainda não tinham sido obtidos com grau de pureza comprovado, assim como para a preparação de um outro complexo novo, com o ácido tiomálico como ligando tridentado,  $Na_3[Cr(\text{tiomalato})_2].7H_2O$ .

Todas estas sínteses foram efectuadas em solução aquosa, a pH neutro, partindo de um sal de crómio(III) e do aminoácido (ou do tioácido) respectivo, nas proporções de 1 Cr(III): 2-3 Ligando. A descrição detalhada de cada uma das referidas sínteses encontra-se no Capítulo 7 - Secção B.

A estrutura cristalina do complexo  $M[Cr(\text{cys})_2].2H_2O$  (M=Na ou K) foi estabelecida há alguns anos [148], mas a do composto análogo de penicilamina, até à data, não foi ainda obtida. Neste trabalho, com base nos métodos referidos na literatura [127,164], começou por se tentar sintetizar este último composto. No entanto, todas as tentativas para o reproduzir, segundo qualquer dos métodos atrás referidos, conduziram inevitavelmente a sólidos de cor roxo-púrpura, não cristalinos e, aparentemente, contaminados com excesso de ligando. Os resultados obtidos das análises elementares efectuadas a estes sólidos também não foram reprodutíveis. Consequentemente, após um estudo mais detalhado daquelas referências [127,164], constatou-se que as fórmulas empíricas calculadas apresentadas naqueles dois trabalhos, eram  $KCrC_{10}N_2O_4S_2H_{18}.0.4HNO_3$ , segundo Hojo *et al* [127] e  $KCrC_{10}N_2O_4S_2H_{20}.KCl.C_2H_5OH$ , de acordo

com Freni *et al* [164], o que logo levantou sérias dúvidas quanto à pureza destes compostos. De igual modo, as respectivas caracterizações espectroscópicas também se nos apresentaram pouco elucidativas, quer quanto à pouca clareza dos espectros apresentados na referência [164], quer pelas acentuadas dissemelhanças, especialmente na definição das bandas a maior comprimento de onda, existentes entre o complexo com penicilamina e o análogo com cisteína [127,164], sem que para tal fossem apresentadas quaisquer razões. Efectuando modificações naqueles dois métodos de síntese (Ver Capítulo 7 - Secção B), foi possível preparar sólidos cristalinos, com a composição química esperada para o composto que se pretendia obter. A análise e a caracterização detalhada destes sólidos, permite que se presuma ter sido a primeira vez que este complexo de Cr(III) com penicilamina,  $K[Cr(L\text{- ou }D\text{-pen})_2].2H_2O$  foi sintetizado numa forma não contaminada. Usando qualquer dos dois isómeros, L- e D-penicilamina, obtêm-se o mesmo tipo de cristais, em forma de agulha, de cor azul escura. No entanto, a partir do aminoácido racémico (D,L-penicilamina) não se conseguiu preparar qualquer sólido cuja composição química fosse reprodutível [78].

Tanto a cor dos sólidos (roxo-púrpura) como as análises elementares dos sólidos obtidos por reprodução de qualquer dos dois métodos de síntese referidos anteriormente [127,164], apontam para estruturas correspondentes a composições químicas diversas, algumas delas provavelmente poliméricas, nas quais coexistam alguns ligandos tridentados e outros com número de coordenação menor, podendo também verificar-se a formação de pontes, as quais, afinal, são comuns quando se trabalha com Cr(III) numa zona de pH próxima da neutralidade.

O complexo de Cr(III) que contém o anião tiomalato coordenado, tanto quanto nos é dado saber, foi também, neste trabalho, sintetizado pela primeira vez. Infelizmente, também neste caso, não foram obtidos cristais adequados para efectuar a análise estrutural por difracção de Raios-X de cristal único.

#### 4.2.2 - Caracterização dos complexos sintetizados

O complexo  $M[Cr(cys)_2] \cdot 2H_2O$  ( $M = Na$  ou  $K$ ) foi identificado através dos resultados de espectroscopia electrónica e de dicroísmo circular, os quais foram comparados com os valores publicados em trabalhos anteriores [126,148].

A composição química dos dois compostos restantes foi determinada por análise elementar (carbono, hidrogénio, azoto ou enxofre, sódio ou potássio e crómio) e por termogravimetria (quantidade de água) (Tabela 4.1).

| Composto                            | % C   |       | % N   |      | % H   |      | % S   |       | % H <sub>2</sub> O |       |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|------|-------|------|-------|-------|--------------------|-------|
|                                     | Calc. | Enc.  | Calc. | Enc. | Calc. | Enc. | Calc. | Enc.  | Calc.              | Enc.  |
| $K[Cr(pen)_2] \cdot 2H_2O^{a,c}$    | 28.49 | 28.76 | 6.65  | 6.65 | 5.26  | 4.88 | -     | -     | 7.98               | 8.58  |
| $Na_3[Cr(tma)_2] \cdot 7H_2O^{b,c}$ | 17.75 | 17.92 | -     | -    | 3.75  | 3.13 | 11.84 | 11.13 | 23.64              | 23.30 |

Tabela 4.1 - Análise elementar (C, H e N ou S) e termogravimétrica (% H<sub>2</sub>O) dos complexos de Cr(III) com penicilamina e com ácido tiomálico: a) - Resultados calculados para  $KCrC_{10}N_2O_4S_2H_{18} \cdot 2H_2O$ ; b) - Resultados calculados para  $Na_3CrC_8O_{10}S_2H_6 \cdot 7H_2O$ ; c) - pen=D ou L-penicilaminato<sup>2-</sup>; tma=tiomalato<sup>3-</sup> (Calc.= percentagem calculada; Enc.=percentagem encontrada)

Em relação ao primeiro composto, o conteúdo em água (perda de massa a cerca de 99°C), é o correspondente a duas moléculas por molécula de complexo, as quais, por analogia com o complexo semelhante de cisteína, serão possivelmente águas de cristalização que integram a respectiva estrutura cristalina. No caso do complexo que contém o ião tiomalato como ligando, os resultados obtidos apontam para sete moléculas de água por molécula de complexo. Isto não implica que esse número corresponda apenas a águas de cristalização. Apesar das tentativas para secar convenientemente o composto, também poderá existir alguma água adsorvida, que intercalada na rede cristalina é provável que forme, por exemplo, um conjunto de ligações por pontes de hidrogénio. As perdas de massa a 109 e 139°, ou seja em duas etapas a temperaturas diferentes,

correspondentes a 10.61 e a 13.04 %, respectivamente, poderão ser atribuídas a perdas de água de dois tipos distintos. Os resultados de espectroscopia de infravermelho levam a idênticas suposições, como veremos a seguir neste Capítulo.

### 4.2.3 - Estudos espectroscópicos

A composição química dos complexos com penicilamina e com ácido tiomálico, faz prever, tal como se verifica no complexo com cisteína [148], uma coordenação tridentada daqueles ligandos ao centro metálico. No entanto, estudos espectroscópicos com estes complexos, fornecem evidência adicional, mais segura, acerca das suas estruturas.

Os espectros electrónicos destes complexos apresentam algumas das características típicas dos compostos de coordenação deste metal. Para complexos do tipo  $d^3$ , com geometria octaédrica, são esperadas três transições electrónicas permitidas por spin. Duas, na região visível, com energias correspondentes às transições  ${}^4A_{2g} \rightarrow {}^4T_{2g}$  e  ${}^4A_{2g} \rightarrow {}^4T_{1g}(F)$  e uma terceira, na região do ultravioleta próximo, referente à transição  ${}^4A_{2g} \rightarrow {}^4T_{1g}(P)$ , que geralmente se apresenta oculta por banda(s) muito intensa(s) de transferência de carga [29]. No caso dos compostos que estamos a estudar, as duas bandas na região do visível desdobram-se, apresentando, cada uma delas, um ombro associado (Figura 4.1). Este facto, prende-se com uma coordenação tridentada por átomos diferentes, a qual provoca distorção da geometria pseudo-octaédrica regular e, devido a um abaixamento de simetria, dá origem ao desdobramento daquelas duas bandas. Esta interpretação dos espectros electrónicos, já anteriormente proposta para o cisteinato de Cr(III) [126,127,151], também se pode aplicar ao complexo com penicilamina e, possivelmente, também ao de tiomalato. Como se pode observar na Figura 4.1, os espectros electrónicos dos complexos com cisteína e com penicilamina, em solução aquosa, são muito semelhantes, sugerindo a existência de um cromóforo comum, do tipo  $Cr(S_2N_2O_2)$  [126,151,165]. No caso do bis(tiomalato)cromato(III) (Figura 4.1), o espectro electrónico respectivo, embora um pouco diferente dos anteriores,

nomeadamente por ser menos acentuado o segundo ombro, a comprimento de onda menor, apresenta características idênticas às dos espectros dos outros complexos.

Os espectros de reflectância daqueles compostos são idênticos aos obtidos em solução aquosa neutra, o que pressupõe que tanto no estado sólido como em solução estejam presentes as mesmas espécies complexas [126,151].

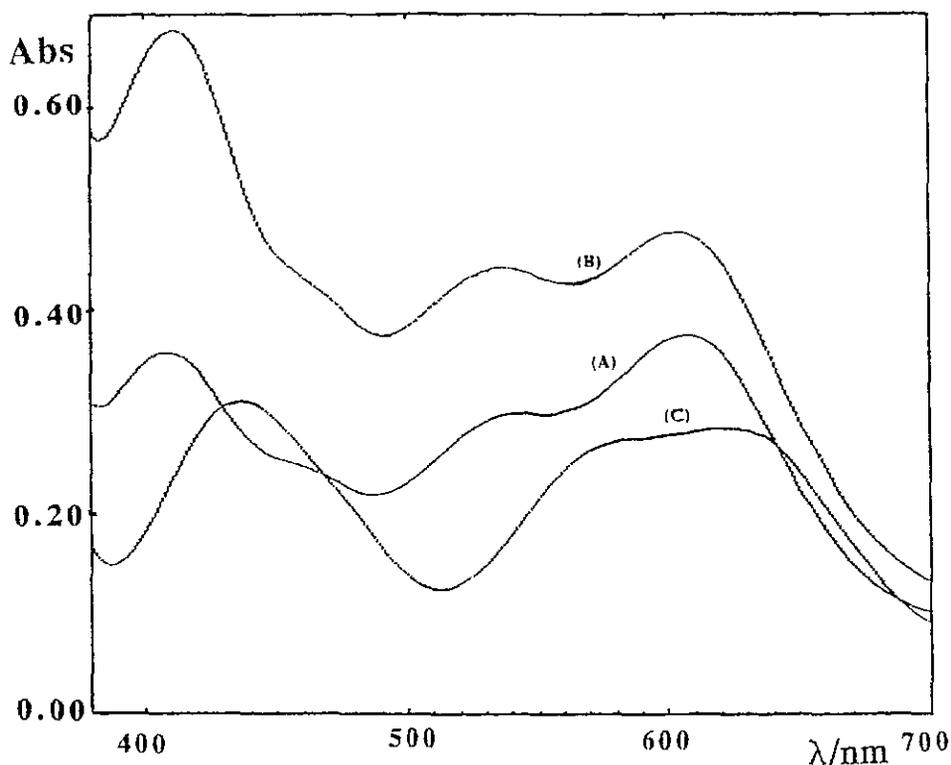


Figura 4.1 - a)-Espectros eletrônicos dos íões complexos  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^{3-}$  (A),  $[\text{Cr}(\text{L- ou D-pen})_2]^{3-}$  (B) e  $[\text{Cr}(\text{tiomalato})_2]^{3-}$  (C), na região visível, obtidos em solução aquosa

De notar ainda que, nestes compostos, em comparação com outros complexos de Cr(III), as bandas de menor energia apresentam máximos a comprimentos de onda elevados (Tabela 4.2), em concordância com a série espectroquímica de ligandos, desde que os átomos de enxofre estejam coordenados ao crômio central, como se verifica nos complexo  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^{3-}$  [126,148],  $[\text{Cr}(\text{L-hist})(\text{D-pen})]$  [162] e  $[\text{Cr}(\text{L-cys})(\text{L-hist})]$  [163].

No ultravioleta e para os três complexos estudados, observam-se bandas muito intensas, identificadas como bandas de transferência de carga, ligando→metal. Estas ban-

| Composto   | Cromóforo                                       | $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ( $\epsilon / \text{mol dm}^{-3} \text{cm}^{-1}$ ) |            |           |                            |                            | Ref <sup>o</sup> |
|--|---|---|------------|-----------|----------------------------|----------------------------|------------------|
| $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$  | $\text{Cr}(\text{S}_2\text{N}_2\text{O}_2)$     | 605   | 540*       | 460*      | 405                        |                            | E.t.             |
| $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$  | $\text{Cr}(\text{S}_2\text{N}_2\text{O}_2)$     | 606(89.5)   | 540*(67.9) | 460*      | 408(89.1)                  | 259(1.04x10 <sup>4</sup> ) | [126]            |
| $[\text{Cr}(\text{L-pen})_2]^-$  | $\text{Cr}(\text{S}_2\text{N}_2\text{O}_2)$     | 604(68.0)   | 537*       | 475*      | 413(96.7)                  | 258(~1.0x10 <sup>4</sup> ) | E.t.             |
| " $[\text{Cr}(\text{L-pen})_2]^-$ "  | " $\text{Cr}(\text{S}_2\text{N}_2\text{O}_2)$ " | 575*  | 550        | 455*      | 412                        |                            | [127]            |
| " $[\text{Cr}(\text{L-pen})_2]^-$ "  | " $\text{Cr}(\text{S}_2\text{N}_2\text{O}_2)$ " | 560   |            |           | 430                        |                            | [164]            |
| $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{L})(\text{L-cys})]^{2-}$                         | $\text{Cr}(\text{S}_2\text{N}_2\text{O}_2)$     | 560(62.5) (muito larga)   |            | 418(67.0) | 260(7x10 <sup>3</sup> )    |                            | [163]            |
| $[\text{Cr}(\text{H}_3\text{L})(\text{H}_2\text{L})]3(\text{H}_2\text{O})_6$ | $\text{Cr}(\text{SN}_2\text{O}_3)$              | 546(62.4)   |            | 408(69.5) | 262(4.04x10 <sup>3</sup> ) |                            | [126]            |
| $[\text{Cr}(\text{SH})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$                          | $\text{Cr}(\text{SO}_5)$                        | 575(27.5)   |            | 435(43.0) | 258(6520)                  |                            | [18]             |
| $[\text{Cr}(\text{tma})_2]^{3-}$   | $\text{Cr}(\text{S}_2\text{O}_4)$               | 625   | 565*       | 476 *     | 425                        | 256(intensa)               | E.t.             |
| $[\text{Cr}(\text{L-hist})_2]^+$   | $\text{Cr}(\text{N}_4\text{O}_2)$               |   |            | 488(67)   | 363(27)                    |                            | [166]            |
| $[\text{Cr}(\text{en})_3]^{3+}$  | $\text{Cr}(\text{N}_6)$                         |   |            | 460(74)   | 353(65)                    |                            | [18]             |
| $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$  | $\text{Cr}(\text{O}_6)$                         | 570   |            |           | 420                        |                            | [18]             |
| $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$                                     | $\text{Cr}(\text{O}_6)$                         | 575   |            |           | 405                        | 270                        | [16]             |

Tabela 4.2 - Comparação de dados de espectroscopia electrónica para vários complexos de Cr(III), em solução aquosa; E.t.=este trabalho; \* = ombro; \*\* = isómero *trans*-imidazola; H<sub>2</sub>L = GSH<sup>3-</sup>

-das de transferência de carga, com máximos a 259, 258 e 256 nm, para o bis(cisteinato), o bis(penicilaminato) e o bis(tiomalato)cromato(III), respectivamente, correspondem às transferências de carga S<sup>-</sup>→Cr, típicas em todos os compostos de coordenação de Cr(III) com ligações Cr-S [18]. No entanto, a maiores comprimentos de onda que os máximos atrás referidos, estas bandas não são simétricas apresentando ombros associados, pouco nítidos, excepto no caso do tiomalato, em que o ombro se diferencia numa outra banda de

menor intensidade que as anteriores (Figura 4.2). Este desdobramento é comparável aos resultados obtidos noutros complexos com ligações Cr-S, nomeadamente com alguns tiolato-complexos de Cr(III) [126,160,167,168].

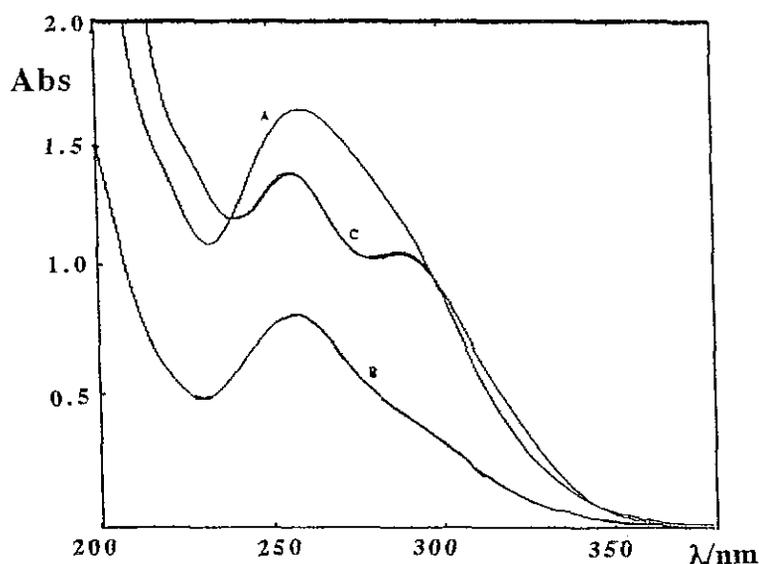


Figura 4.2 - Espectros eletrônicos, em solução aquosa, dos iões complexos  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$  (A),  $[\text{Cr}(\text{L- ou D-pen})_2]^-$  (B) e  $[\text{Cr}(\text{tiomalato})_2]^{3-}$  (C), obtidos na zona do ultravioleta

Em compostos análogos de cobalto(III), nesta região do espectro também se observam bandas semelhantes às dos complexos de Cr(III), as quais correspondem, de igual modo, a transferências de carga ligando  $\rightarrow$  metal,  $\text{S} \rightarrow \text{Co}$  [169,170].

Tanto nos complexos de Cr(III) estudados por nós, como nos de cobalto(III) que acabámos de referir, a intensidade das bandas de transferência de carga diminui por adição de ácido, deslocando-se os seus máximos para comprimentos de onda ligeiramente superiores. Nos compostos de Cr(III), a diminuição de intensidade e o deslocamento destas bandas ocorre paralelamente ao desaparecimento dos ombros na zona visível (Ver Figuras 4.6 e 4.8, à frente, Secção 4.3.2). Como veremos, este facto explica-se pela hidrólise da ligação Cr-S com conseqüente transformação do cromóforo anteriormente referido,  $\text{CrS}_2\text{N}_2\text{O}_2$ , num outro do tipo  $\text{CrN}_2\text{O}_4$  [79,151], ou como no caso do tiomalato, de  $\text{CrS}_2\text{O}_4$  para  $\text{CrO}_6$ .

Os espectros de *dicroísmo circular* dos complexos de Cr(III) com cisteína e com penicilamina (na síntese do tiomalato de Cr(III) foi utilizado ácido tiomálico não opticamente activo), são muito semelhantes em termos de posição, de intensidade e de sinal das bandas, o que sugere estruturas semelhantes para estes compostos (Figura 4.3). E se o complexo com cisteína se forma estereoespecificamente, é de admitir que o mesmo aconteça com os dois complexos de penicilamina, obtendo-se, em qualquer dos casos, apenas um único tipo de isómero, com ambiente de coordenação *trans*-Cr-S, *cis*-Cr-O e *cis*-Cr-N, identificado na estrutura cristalina do bis(cisteinato)cromato(III)<sup>4.1</sup> [78,126,148]. Sendo assim, seria de esperar que os espectros de *dicroísmo circular* dos complexos de penicilamina,  $[\text{Cr}(\text{L-pen})_2]^-$  e  $[\text{Cr}(\text{D-pen})_2]^-$ , apresentassem um padrão simétrico, o que é verificado experimentalmente (Figura 4.3 e Tabela 4.3, Secção 4.3).

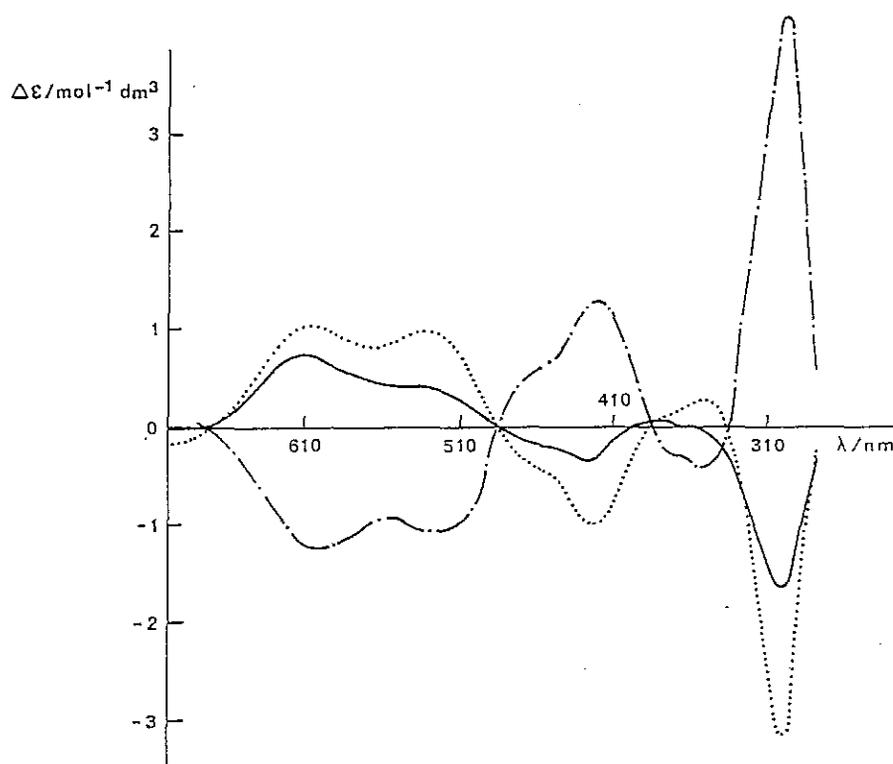


Figura 4.3 - Espectros de *dicroísmo circular*, em solução aquosa, dos iões complexos  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$  (—),  $[\text{Cr}(\text{L-pen})_2]^-$  (···) e  $[\text{Cr}(\text{D-pen})_2]^-$  (-.-)

<sup>4.1</sup> A formação do isómero *trans*-S, *cis*-O e *cis*-N foi confirmada para o complexo  $[\text{Cr}(\text{D-pen})_2]^-$ , por Hoggard *et al* [166], através de um estudo exaustivo do seu espectro de (Vis) pelo Modelo da Sobreposição Angular

Como se pode observar na Figura 4.3, os espectros de DC destes complexos apresentam um número de bandas, positivas ou negativas, superior ao dos espectros electrónicos correspondentes, devido às diferentes regras de selecção que regem os dois tipos de espectroscopia [171,172].

A literatura é rica em estudos espectroscópicos de compostos com cromóforos de simetria  $C_3$ ,  $[M(ab)_3]$  ( $ab$ =ligando assimétrico bidentado), como é o caso, por exemplo, dos  $\beta$ -cis- $[M(ala)_3]$  ( $M$ =Co(III) e Cr(III)), porventura os compostos mais bem estudados por dicroísmo circular [157,173-175]. Todavia, como os espectros de DC dos complexos de Cr(III) que temos estado a estudar apresentam características bastantes diferentes dos anteriores e não havendo informação da literatura que nos permita fazer um estudo comparativo, a atribuição das respectivas bandas pode ser discutida à luz das características de simetria destes compostos, devendo, no entanto, ser encarada apenas como uma primeira tentativa.

Como vimos, o único isómero do bis(cisteinato)cromato(III) que se obtém é o *trans*-S, que pertence ao grupo de simetria  $C_{2v}$ . Para esta simetria, tal como se pode constatar na Tabela 4.3, esperam-se em princípio, pelas regras de selecção relativas às

|                    |                            |            |                                |                              |       |
|--------------------|----------------------------|------------|--------------------------------|------------------------------|-------|
| 2ª Estado excitado | $T_{1g}(-)$                | A(∥), E(⊥) | $A_2(-)$ , $2B(\perp)$         | $2A(\parallel)$ , $B(\perp)$ | 3A    |
| 1ª Estado excitado | $T_{2g}(\parallel)(\perp)$ | A(∥), E(⊥) | $A_1(\parallel)$ , $2B(\perp)$ | A(∥), $2B(\perp)$            | 3A    |
| Estado fundamental | $A_{2g}$                   | A          | $A_2$                          | B                            | A     |
| Simetria           | $O_h$                      | $C_3$      | $C_{2v}$                       | $C_2$                        | $C_1$ |

Tabela 4.3 - Configuração electrónica  $d^3$ : transições electrónicas e transições proibidas (-) ou permitidas por dipólo magnético para diferentes simetrias; transições permitidas com polarização ao longo dos eixos dos xx e yy (∥) e com polarização ao longo do eixo dos zz (⊥) [143,171]

transições permitidas por momento dipolar, três efeitos Cotton correspondentes a cada uma das transições electrónicas permitidas na geometria octaédrica original (região visível). Tanto no caso do complexo com cisteína como no dos complexos com penicilamina, este número de bandas é observado experimentalmente (Figura 4.3 e Tabelas 4.2 e 4.4). O "padrão" apresentado, (-),(+),(+) (1ª transição para o 1º estado excitado) e (-),(-),(+) (2ª transição, para o 2º estado excitado), é comum nos espectros de DC deste tipo de compostos [78,126,157,171].

A espectroscopia de infravermelho consolidou algumas das hipóteses estruturais postas para os complexos de Cr(III) com penicilamina e com ácido tiomálico, que têm vindo a ser discutidos neste Capítulo. Assim, os espectros de infravermelho de todos eles apresentam as bandas comuns a este tipo de compostos, sendo, por sua vez, os espectros dos complexos com penicilamina (D- e L-) muito semelhantes ao do composto análogo com cisteína [127,128,160,176].

Assim, e de um modo geral, são os seguintes os aspectos mais relevantes dos espectros de infravermelho dos referidos complexos são:

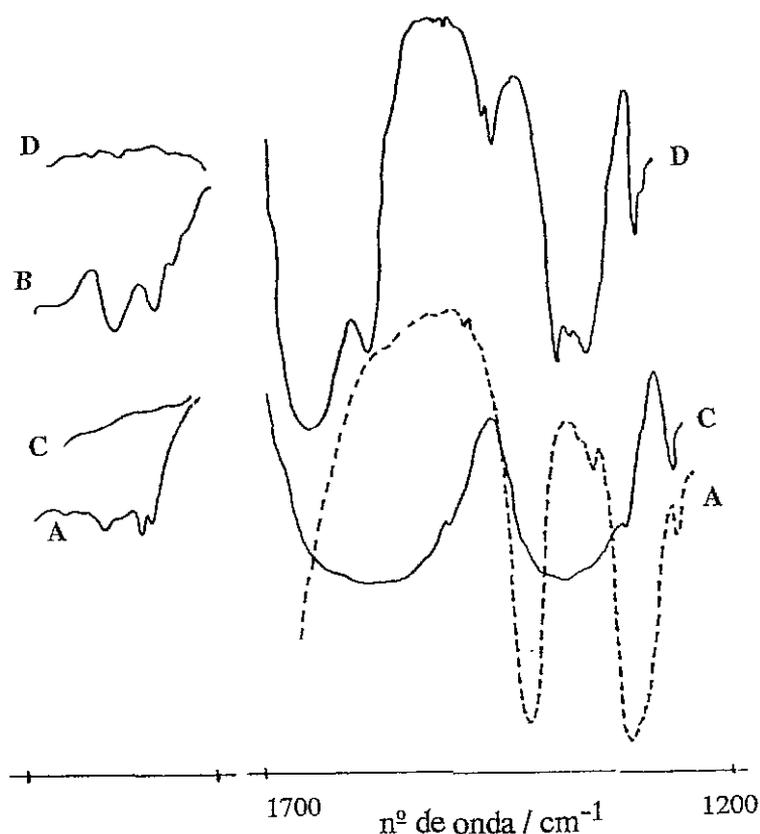
i) - ausência, a  $2550-2560\text{ cm}^{-1}$ , da banda de elongação característica do grupo SH, o que implica que este grupo está desprotonado e, em princípio, coordenado ao Cr(III) (Figura 4.4). A coordenação deste grupo é suportada, ainda, pelo facto de, nestes complexos, a banda a  $680\text{ cm}^{-1}$ , atribuída à vibração  $\nu(\text{C-S})$ , estar deslocada para frequências menores do que no ligando livre, ou seja para  $660\text{ cm}^{-1}$  no tiomalato [177] e  $670\text{ cm}^{-1}$  no penicilaminato [128].

ii) - as bandas correspondentes aos grupos carboxilato livres,  $\nu_{\text{as}}\text{COO}$ , que se situam a  $1700-1690\text{ cm}^{-1}$ , não são visíveis nos espectros dos complexos. Por sua vez, a posição das bandas correspondentes aos grupos carboxílicos ionizados, aparecem deslocadas para menores energias, cerca de  $1560\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ , e de  $1390\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ , confirmando que aqueles grupos possivelmente estão coordenados ao metal central, nos dois casos [143,177,178]. A coordenação do grupo carboxilato, no penicilaminato, também

pode ser confirmada pela banda correspondente à elongação  $\nu_s(\text{COO})$ , a  $1650 \text{ cm}^{-1}$  [179].

iii) - no tiomalato, provavelmente, pelo facto do complexo se encontrar muito hidratado, não se observa a banda a  $1560 \text{ cm}^{-1}$ , devido à sobreposição, na mesma região, da banda de deformação da água. Neste composto, a região  $2800\text{--}3600 \text{ cm}^{-1}$  é ocupada por uma banda muito larga (Figura 4.4), que pode traduzir a grande quantidade de água que o composto contém e a existência de uma rede de ligações OH, que podem formar pontes intra ou intermoleculares (em concordância com os resultados de termogravimetria) (Figura 4.4). As bandas de elongação, características em complexos de Cr(III) com aminas,  $\nu(\text{Cr-N})$ , aparecem a  $475 \text{ cm}^{-1}$ , neste complexo [179].

iv) - no penicilaminato, aquela última região apresenta bandas muito melhor resolvidas, pois aparecem também as que correspondem às elongações dos grupos  $\text{NH}_2$  ( $3190$  e  $3275 \text{ cm}^{-1}$ ) e  $\text{CH}_3$  ( $2905$  e  $2960 \text{ cm}^{-1}$ ) [4,35], que não existem no tiomalato, além das bandas referentes às águas de cristalização, a cerca de  $3550 \text{ cm}^{-1}$  [143] (Ver também a Figura 4.4).



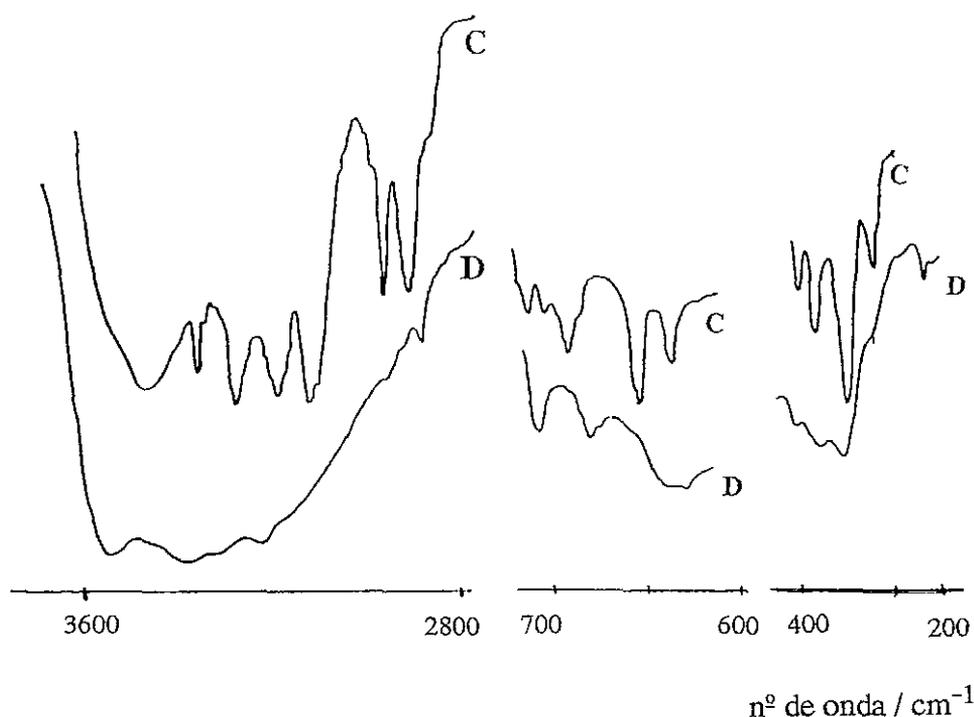


Figura 4.4 - Comparação dos espectros de infravermelho (3700-2500  $\text{cm}^{-1}$ ) do ácido tiomálico (A), de L(+)-penicilamina (B) e dos complexos  $\text{Na}_3[\text{Cr}(\text{tma})_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (C) e  $\text{K}[\text{Cr}(\text{L-pen})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (D), em KBr (ordenadas=transmitância)

v) - neste tipo de complexos, as bandas observadas a cerca de  $350 \text{ cm}^{-1}$  são atribuídas normalmente às vibrações  $\nu(\text{M-O})$ , sensíveis à natureza do metal central, que muitas vezes, em quelatos, aparecem acopladas a outras vibrações [178].

vi) - dependendo do ligando, as elongações  $\nu(\text{M-S})$  são observadas entre 350 e  $200 \text{ cm}^{-1}$ , mas são difíceis de ser atribuídas pois toda a região é rica em bandas pouco intensas, não sendo possível saber qual delas corresponde exactamente àquela elongação. A literatura aponta-as para cerca de  $340 \text{ cm}^{-1}$  em alguns tiolatos de Cr(III) [167],  $350 \text{ cm}^{-1}$  no caso do penicilaminato e  $250\text{-}200 \text{ cm}^{-1}$ , para o tiomalato [178].

A composição química e a análise espectroscópica dos novos complexos de Cr(III) com penicilamina e com ácido tiomálico, que aqui foram sintetizados, sugere, pois, as seguintes considerações:

1) - Estes complexos apresentam estruturas pseudo-octaédricas, com algum grau

grau de distorção, o que só poderá ser comprovado quando as respectivas estruturas cristalinas forem estabelecidas.

2) - Os ligandos coordenam-se ao catião metálico central por três átomos dadores (ligandos tridentados): S do grupo tiol, N do grupo amina e O de grupo carboxílico, no penicilaminato e, no tiomalato, S do grupo tiol e 2xO dos dois grupos carboxílicos.

3) - A ligação Cr-S está presente em todos os complexos, como parece estar demonstrado pela banda de transferência de carga, no ultravioleta, S $\rightarrow$ Cr, e pelos resultados de espectroscopia de infravermelho.

4) - No complexo com penicilamina, o único isómero que se forma, a julgar pelos espectros de dicroísmo circular é o trans-S, cis-O e cis-N, por comparação com o composto análogo de cisteína. Para poder fazer comparações idênticas com o tiomalato de Cr(III) será necessário sintetizar este composto a partir do ligando opticamente activo.

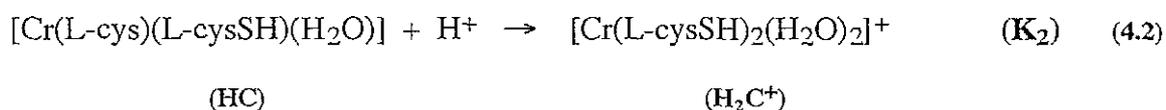
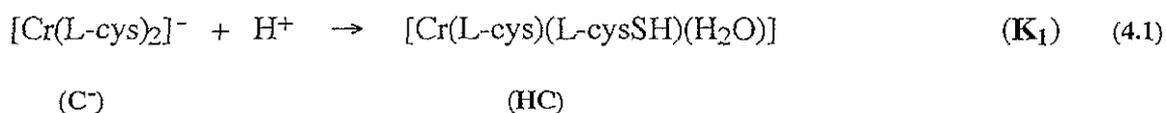
### **4.3 - Reacções de substituição em compostos de coordenação de Cr(III) com ligações Cr-S**

#### **4.3.1 - Especificação de soluções aquosas de [Cr(L-cys)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>**

Como tem vindo a ser salientado, porventura o aspecto mais relevante dos compostos de coordenação de Cr(III) com ligações Cr-S é a labilidade desta ligação, invulgar em complexos de Cr(III) que são considerados tradicionalmente inertes. Esta ligação hidroliza-se rapidamente tanto em meio ácido como em meio básico e, de um modo geral, de maneira reversível [151,160,178].

Embora a literatura refira alguns estudos detalhados de hidrólise de complexos de Cr(III) em meio ácido [150,160], praticamente não foi prestada qualquer atenção a este tipo de reacções, em meios com pH mais próximo da neutralidade. Em

consequência disso, em trabalho por nós efectuado e publicado anteriormente [79,161,170], relatam-se estudos de equilíbrio e de cinética, efectuados com o anião complexo bis(cisteinato)cromato(III), a pH entre 7 e 4.5, isto é, em meio acídico moderado. A hidrólise deste anião foi estudada, de forma preliminar, por espectrofotometria de UV/Vis e de DC, podendo os resultados então obtidos ser explicados, em princípio, pelos equilíbrios a seguir referidos (4.1) e (4.2). No entanto, aqueles resultados não foram satisfatórios já que as constantes de protonação,  $K_1$  e  $K_2$ , não são suficientemente separadas para poderem ser calculadas por aquele método, o qual permitiu apenas uma estimativa "grosseira" para  $K_1$  (cerca de 4.9). As constantes de protonação ácida daquele anião complexo foram então determinadas potenciométricamente, por titulação de soluções aquosas do complexo com ácido, tendo sido calculados os valores de 5.31 e de 4.46, para  $\log_{10} K_1$  e  $\log_{10} K_2$ , respectivamente. O mesmo modelo de equilíbrio, (4.1) e (4.2), foi mais uma vez usado para explicar a protonação e a descoordenação "simultânea" e progressiva dos átomos de S coordenados ao catião crómio central.



Com base naquelas constantes, foi construído um gráfico de especiação, na região de pH em que se verificava reversibilidade para os equilíbrios anteriores (Figura 4.5), que evidencia as hipóteses postas quanto às espécies químicas que se tinha admitido estarem presentes em solução.

Neste Capítulo discutem-se, em particular, estudos em que se alargou o trabalho efectuado com o anião complexo bis(cisteinato)cromato(III), aos aniões  $[\text{Cr}(\text{L-pen})_2]^-$  e/ou  $[\text{Cr}(\text{D-pen})_2]^-$ . Esta investigação foi ainda estendida a soluções não aquosas (em DMF).

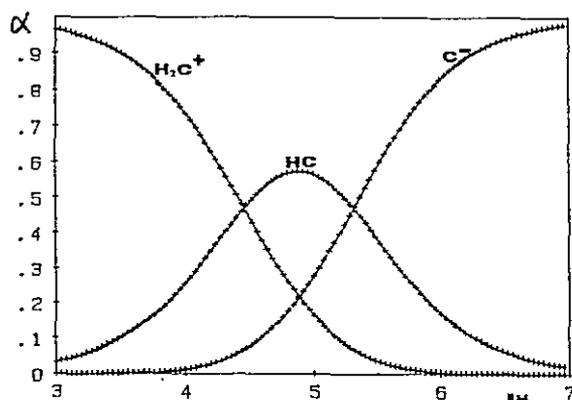


Figura 4.5 - Especiação de soluções de  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$ , na gama de pH entre 7.0 e 4.5 [79] ( $\alpha$ =fracção molar de cada espécie)

#### 4.3.2 - Reações de substituição de ligandos envolvendo a quebra e a formação da ligação Cr-S, em solução aquosa

Quando se adiciona ácido a soluções aquosas dos aniões complexos  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$ ,  $[\text{Cr}(\text{L-pen})_2]^-$  e  $[\text{Cr}(\text{D-pen})_2]^-$ , neutras, observam-se alterações imediatas na cor dessas soluções. As cores das soluções de qualquer dos complexos, variam de azul para roxo-violeta, ou para vermelho, conforme a quantidade de ácido adicionada. Estas modificações estão associadas a alterações no tipo e na quantidade das espécies químicas presentes em solução. A cor azul (pH~7), no caso do cisteinato, foi atribuída à presença do ião complexo  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$ , a vermelha (pH≤4) a  $[\text{Cr}(\text{L-cysSH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^+$  e a cor intermédia, roxo-violeta (pH ~ 5-5.5), à mistura das espécies aniônica, catiónica e neutra  $[\text{Cr}(\text{L-cys})(\text{L-cysSH})(\text{H}_2\text{O})]$  [78,170]. Os resultados deste trabalho confirmaram aquelas observações e demonstraram um comportamento análogo para os complexos com penicilamina. As alterações de cor referidas são congruentes com as variações observadas por espectroscopia, tanto electrónica como de dicroísmo circular. Nos dois últimos complexos, com penicilamina, de maneira semelhante ao que acontecia com  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$ , na zona visível, à medida que o pH das soluções vai diminuindo pela adição de ácido, tanto a posição como o perfil das bandas sofrem alterações no sentido da formação de duas bandas únicas, verificando-se

mesmo, a  $\text{pH} < 4$ , o desaparecimento total dos ombros associados. Para a banda a maior comprimento de onda, observa-se, ainda, um efeito hipsocrômico (deslocamento do máximo de absorção de uma banda para menor comprimento de onda) (Figura 4.6). Nesta mesma figura podem também ser observadas as alterações equivalentes registadas por dicroísmo circular, que, como seria de esperar, são mais drásticas, especialmente a valores de  $\text{pH}$  mais baixos.

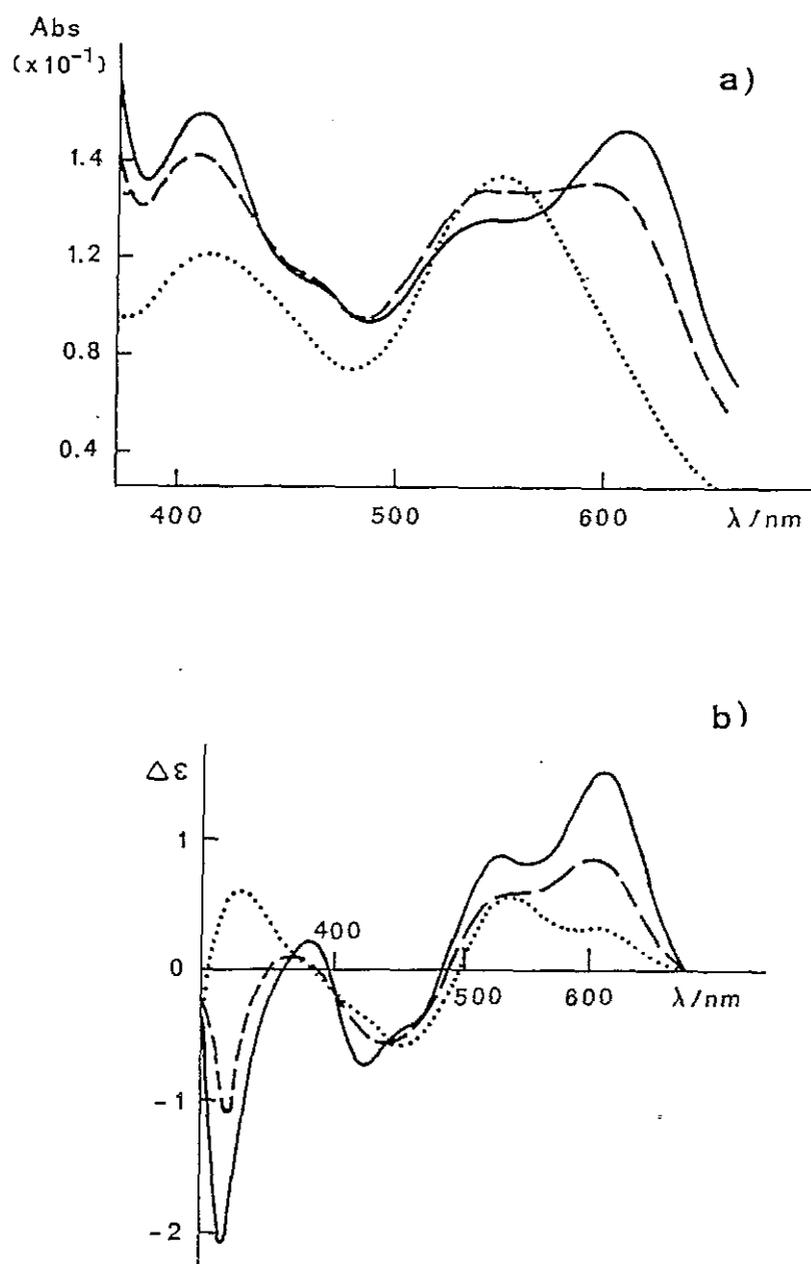


Figura 4.6 - Espectros electrónicos (a) e de dicroísmo circular (b), de soluções aquosas de  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$ , a diferentes valores de  $\text{pH}$ ; (a) (—)  $\text{pH}=7.3$ , (---)  $\text{pH}=4.7$  e (···)  $\text{pH}=3.5$ ; (b) (—)  $\text{pH}=6.7$ , (---)  $\text{pH}=5.2$  e (···)  $\text{pH}=3.0$ ; concentrações das soluções  $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ ;  $\text{pH}$  ajustado com  $\text{HClO}_4$   $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$  [170]

Os resultados experimentais deste trabalho estão em consonância com o estudo realizado por Còoper *et al* [151], só com o anião  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$ . Nesse trabalho comparava-se o espectro electrónico do bis(cisteinato)cromato(III), obtido após acidificação, com o de uma solução contendo o anião  $[\text{Cr}(\text{gly})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ , pois este último complexo possui o mesmo tipo de cromóforo que os aniões complexos hidrolizados que têm estado aqui a ser estudados. Para ambos os casos, os resultados descritos podem ser interpretados em termos da conversão do cromóforo  $\text{CrN}_2\text{O}_2\text{S}_2$  em  $\text{CrN}_2\text{O}_4$ , já que as esferas de coordenação do crómio se alteram pela substituição das ligações Cr-S por ligações Cr-OH<sub>2</sub> [78,126,170]. Cooper *et al* [151], além disso, identificaram nas soluções acidificadas daquele composto, dois grupos SH livres por mole de complexo, comprovando que ocorre protonação dos átomos de S coordenados durante o processo de quebra da ligação. As modificações espectrais verificadas na zona visível têm correspondência, no ultravioleta, na diminuição da intensidade da banda de transferência de carga S $\rightarrow$ Cr, tal como já se tinha referido na Secção.4.2.3. E são análogas às observadas com complexos de Co(III) possuidores de ligações Co-S, em condições experimentais idênticas, sendo também atribuídas à protonação dos átomos de S e à consequente abertura da ligação Co-S [169].

Um outro aspecto que é importante salientar neste estudo é que os efeitos provocados pela acção da adição de ácido podem ser revertidos, pelo menos parcialmente, entre pH 7 e 4, por adição de quantidade equivalente de base, verificando-se a tendência para regenerar os espectros iniciais. Esta reversibilidade, embora seja rápida, não é instantânea, como é sugerido na literatura [151]. Após se ter efectuado um estudo detalhado deste facto, por UV/Vis e por DC, comprovou-se que existe reversibilidade na abertura e fecho daquela ligação, mas o espectro inicial não se regenera num período curto de tempo. Como pode ser observado na Figura 4.7, após 48 horas parece haver ainda "deslocamento" do espectro no sentido do espectro do complexo obtido inicialmente, em solução aquosa.

Quando as soluções dos complexos são deixadas em repouso a pH menor que 4,

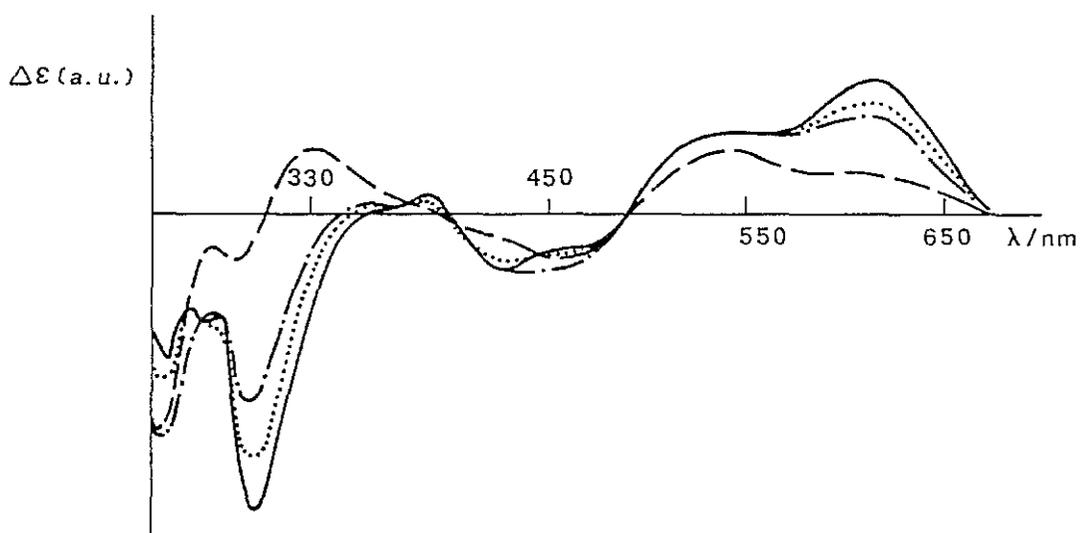


Figura 4.7 - Evidência para a reversibilidade das ligações Cr-S nas reacções de hidrólise de  $[\text{Cr}(\text{L-pen})_2]^{3+}$  com ácido, estudadas por dicroísmo circular; (—) solução aquosa do complexo, pH=6.0; (---) imediatamente após adição de ácido ( $\text{HClO}_4$ ), pH=3.2; (-·-·-) 6 horas após adição de base ( $\text{KOH}$ ), pH=6.3; (····) 48 horas depois, pH=6.4; a. u.=unidades arbitrárias

parece haver competição entre a hidrólise das ligações Cr-S e das ligações Cr-N e Cr-O, tal como é verificado noutros complexos com ligandos coordenados pelo átomo de enxofre, análogos aos aqui estudados [150,160]. Esta competitividade poderá explicar as alterações irreversíveis observadas, para períodos mais longos de tempo, em meios mais fortemente ácidos e poderá também estar relacionada com o facto da banda  $\text{S} \rightarrow \text{Cr}$ , de transferência de carga, ainda manter uma intensidade apreciável, mesmo a pH menor que 2 (Figura 4.8).

Deutsch *et al* [150], propuseram, para alguns complexos de Cr(III) do tipo  $[(\text{en})_2\text{Cr}(\text{SXCOO})]^+$  ( $\text{X} = -\text{CH}_2-$ ;  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ;  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ ), que um tiol protonado pendente pudesse "assistir" a hidrólise de ligações adjacentes, por um mecanismo idêntico àquele que em Química Orgânica é conhecido por assistência anquimérica. Esta "ajuda", provocada por grupos tiol e/ou tioéter, verifica-se em reacções de substituição nucleófila interna. O grupo tiol, que fica pendente após ter sido protonado, pode então favorecer a hidrólise das ligações a ele adjacentes, ou seja, as ligações Cr-N e Cr-O (ou C-O) [150,169]. As velocidades relativas destas reacções vão depender,

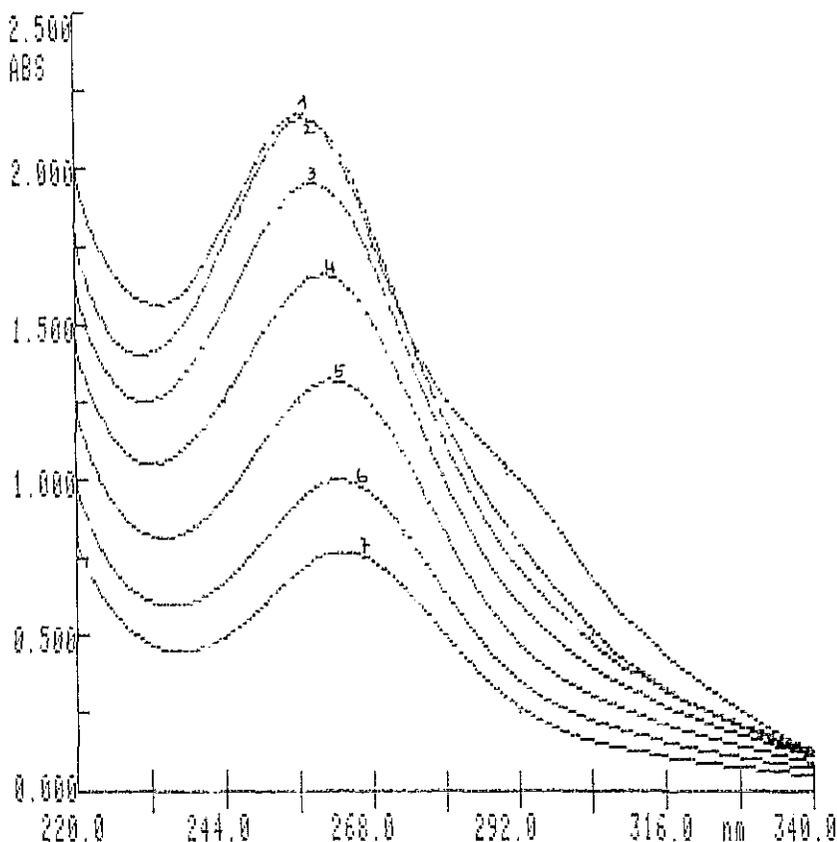


Figura 4.8 - Diminuição da intensidade da banda de transferência de carga S → Cr, por adição de ácido (solução aquosa de  $[Cr(L-cys)_2]^-$ , adição de  $HClO_4$ )

essencialmente, do tamanho e da "tensão angular" do anel formado depois do ataque nucleófilo pelo anel protonado pendente. Note-se, por exemplo, que a constante de velocidade de quebra da ligação Cr-N induzida pelo grupo tiol nos compostos acima referidos, cerca de  $10^{-4}$  ( $k \sim 10^{-4} s^{-1}$ ), é aproximadamente duas ordens de grandeza superior à verificada em complexos de Cr(III) com aminas e com etilenodiamina ( $k \sim 10^{-6} - 10^{-8} s^{-1}$ ), nas quais não há qualquer grupo tiol presente. E é da mesma ordem de grandeza da constante de velocidade da abertura de anel que determinámos para o bis(cisteinato)cromato(III) (Ver Secção 4.3.4.2, à frente).

#### 4.3.3 - Reacções de substituição de ligandos envolvendo a quebra e a formação da ligação Cr-S, num solvente não aquoso (DMF)

Com o objectivo de melhor entender a hidrólise dos complexos de Cr(III) com cisteína e com penicilamina, evitando ao mesmo tempo a hidrólise ácida favorecida

pela água, as referidas reacções de hidrólise ácida foram estudadas num solvente não aquoso, dimetilformamida (DMF), por espectrofotometria de UV/Vis e de DC.

Como abordagem preliminar, foram obtidos espectros, electrónicos e de DC, dos complexos com cisteína e com penicilamina, em DMF, de modo a verificar se se observavam alterações significativas em relação aos espectros em solução aquosa. Os referidos espectros, de um modo geral, são semelhantes nos dois solventes, quer em termos do número e do sinal das bandas, quer quanto aos respectivos coeficientes de absorção molar, à parte um deslocamento dos máximos das bandas mais intensas para comprimentos de onda mais elevados (Tabela 4.4). Este deslocamento é certamente devido a um efeito de solvente. Quando os complexos se encontram "disseminados" num determinado solvente, admitindo que ele seja inerte em termos de coordenação, isto é, que não participe em reacções de substituição competindo com os ligandos coordenados ao centro metálico, há, no mínimo, alterações na sua segunda esfera de coordenação, que provocam modificações na estrutura electrónica global do complexo.

| Complexo                               | H <sub>2</sub> O  |                         | DMF          |                        |
|--|-------------------|-------------------------|--------------|------------------------|
|  | UV/Vis[λ; ε]      | DC[λ; Δε]               | UV/Vis[λ; ε] | DC[λ; Δε]              |
| [Cr(L-cys) <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> | 606 (90) 541(68)* | 691(-0.21)604(+1.49)    | 621 (125)    | 635 (+1.69)546*(+0.3)  |
|  | 408 (89) [126]    | 523(+0.84)454(-0.39)    | 555(103)     | 480(-0.60) 444 (-0.90) |
|  |                   | 424(-0.78)380(+0.22)    | 415(99)      | 398(+0.55)328(-2.91)   |
| [Cr(L-pen) <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> | 604 (68) 538*     | 608(+1.03) 470 (-0.35)  | 621 (122)    | 624(+1.88)540*(+0.2)   |
|  | 413 ( 97) [78]    | 534 (-0.94) 428 (-0.98) | 551 (76)     | 485*(-0.49)433 (-0.96) |
|  |                   | 384(+0.17) 355 (+0.30)  | 422 (88)     | 387 (+0.36)365(+0.33)  |
|  |                   | 305 (-3.20) [78]        |              |                        |

Tabela 4.4 - Comparação dos dados espectrais (electrónicos e de dicroísmo circular) dos iões complexos [Cr(L-cys)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> e [Cr(L-pen)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, em solução aquosa e em DMF; λ (nm); ε (mol dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>); Δε (mol dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>); \*ombro

Espera-se, por isso, que haja deslocamentos na posição dos máximos das bandas de absorção. Neste solvente (DMF), não foram observadas praticamente quaisquer alterações nos espectros dos complexos, ao fim de intervalos de tempo relativamente longos (1 a 2 dias).

Quando se titulam soluções, em DMF, de qualquer dos complexos de cisteína ou de penicilamina, com ácido  $CF_3COOH$ , também em DMF, as alterações espectrais que se observam (neste caso por DC) são semelhantes às observadas aquando da protonação da ligação Cr-S daqueles dois complexos, em solução aquosa. No decorrer da titulação, até ser atingido o primeiro ponto de equivalência, definem-se, no caso do complexo  $[Cr(L-cys)_2]^-$ , quatro pontos isocróicos (545, 490, 452 e 420 nm), o que implica que as concentrações dos vários componentes na mistura estejam linearmente relacionadas entre si (Figura 4.9).

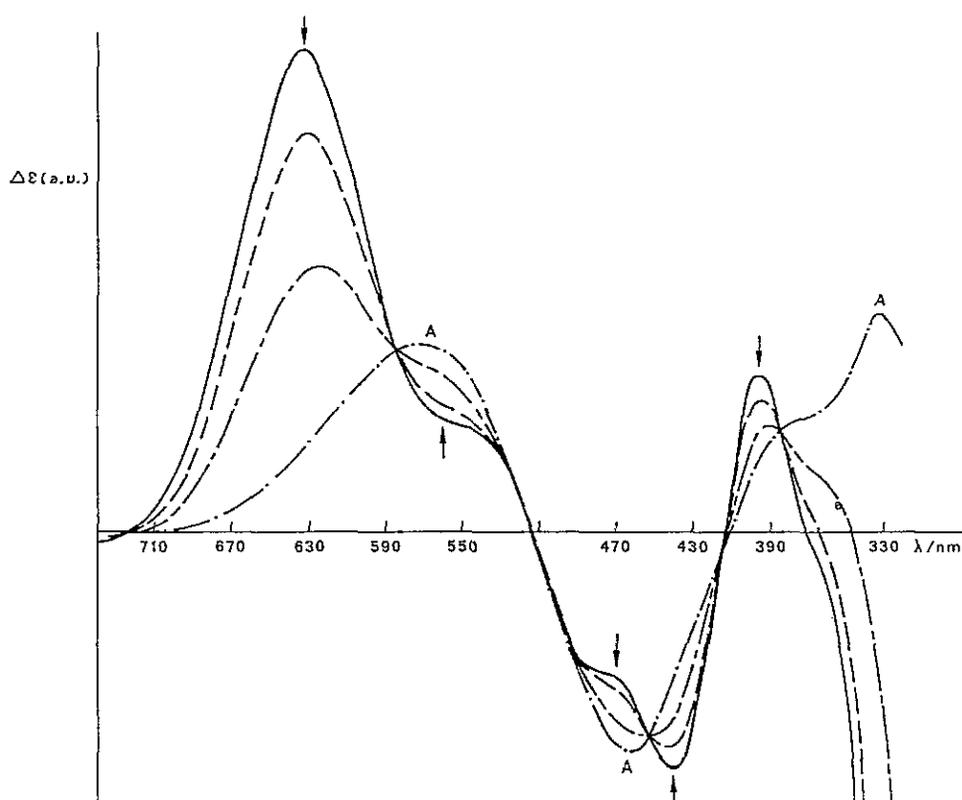


Figura 4.9 - Titulação de  $[Cr(L-cys)_2]^-$ , com  $CF_3COOH$ , em DMF, seguida por espectrofotometria de DC; a.u.=unidades arbitrárias

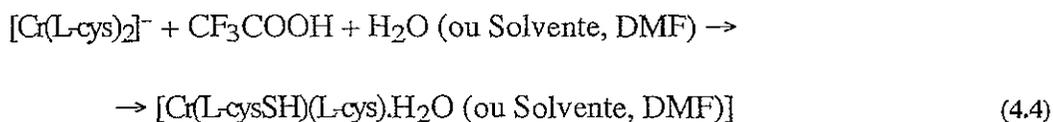
Se se admitir um equilíbrio de protonação semelhante ao proposto em (4.1) para a reacção representada por (4.3), isto é:



a reacção com um equivalente de ácido origina a transformação do ião complexo inicial numa segunda espécie, na qual um átomo de S foi protonado e substituído, na ligação ao crómio central, por uma molécula de solvente. Noutras titulações, neste mesmo solvente, seguidas por UV/Vis, foram obtidos resultados equivalentes, verificando-se, inclusivamente, um ponto isobéstico a cerca de 580 nm, que, aliás, também pode ser observado em soluções aquosas, a 590 nm. No entanto, até ao primeiro ponto de equivalência estes pontos isobésticos são dificilmente observáveis. Depois de se ultrapassar a quantidade de ácido equivalente a uma das ligações Cr-S ter sido protonada, os espectros tornam-se mais complexos e difíceis de interpretar, provavelmente não apenas devido à existência em solução de mais do que duas espécies capazes de absorver radiação na região visível, mas também, como já se discutiu anteriormente, devido à competição entre a solvólise das ligações Cr-S, Cr-N e Cr-O.

Durante a titulação, tanto para os complexos de cisteína como para os de penicilamina, verifica-se, além disso, que a variação de absorvância,  $\Delta\epsilon_{\text{obs}}$ , medida nos máximos das respectivas bandas, de sinal positivo, mais intensas a menor comprimento de onda, é linearmente dependente da concentração de ácido adicionada (Figura 4.10).

Embora não tenham sido tomadas precauções especiais para excluir contaminações mínimas de água das soluções em DMF, se considerarmos que a reacção que predomina em solução é provavelmente:



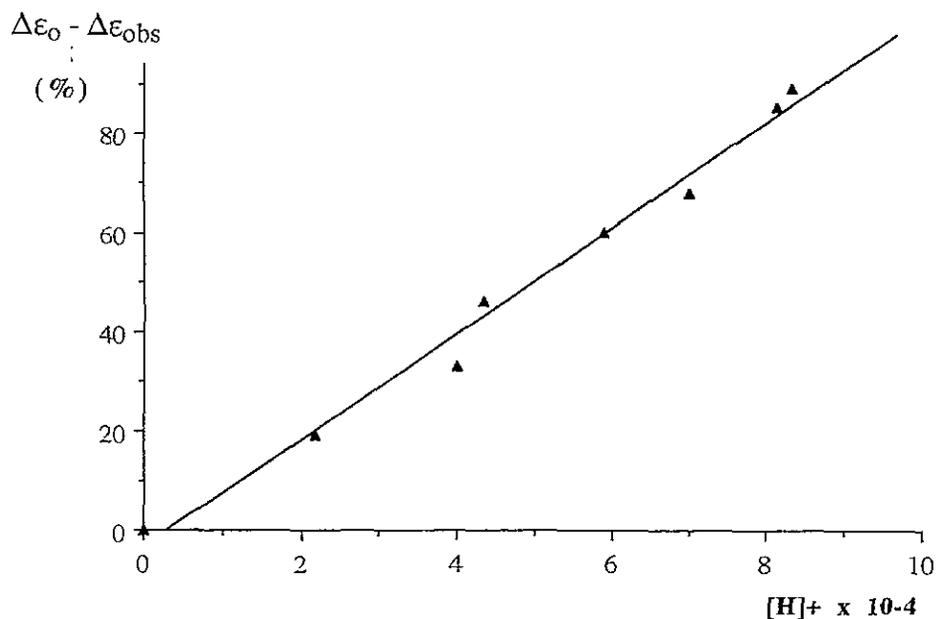


Figura 4.10 -  $(\Delta\epsilon_0 - \Delta\epsilon_{obs})$  em função da concentração de ácido adicionada, na titulação de  $[Cr(L-pen)_2]^-$  com  $CF_3COOH$ , em DMF, seguida por espectrofotometria de DC. A variação da absorvância foi medida no comprimento de onda do máximo da banda mais intensa, no Vis, a 624 nm.

podem deduzir-se as seguintes equações:

$$\Delta\epsilon_{obs} = \Delta\epsilon_C [C] + \Delta\epsilon_{CH} (t - x)$$

$$\Delta\epsilon_0 = \Delta\epsilon_C C_0$$

$$\Delta\epsilon_{obs} = \Delta\epsilon_C (C_0 - t + x) + \Delta\epsilon_{CH} (t - x)$$

$$\Delta\epsilon_0 - \Delta\epsilon_{obs} = t(\Delta\epsilon_C - \Delta\epsilon_{CH}) - x(\Delta\epsilon_C - \Delta\epsilon_{CH}) \quad (4.5)$$

com:

$t$  = concentração total de ácido

$[C]$  =  $[Cr(L-cys)_2]^-$ , complexo não protonado

$C_0$  = concentração total das espécies de crômio

$x$  = quantidade de ácido livre presente na solução

$\Delta\epsilon_{obs}$  = absorvância diferencial,  $\epsilon_{dir.} - \epsilon_{esq.}$ , observada em cada ponto

$\Delta\epsilon_0$  = absorvância diferencial inicial

$\Delta\epsilon_C$  = coeficiente de absorção diferencial do complexo não protonado

$\Delta\epsilon_{CH}$  = coeficiente de absorção diferencial do complexo protonado

Se houver apenas uma quantidade muito pequena de ácido livre em solução, isto é, se a reacção do ácido com o complexo for praticamente estequiométrica, então pode explicar-se a dependência linear entre a quantidade de ácido adicionado e a intensidade da banda de dicroísmo circular,  $\Delta\epsilon_{\text{obs}}$ , observada antes do primeiro ponto de equivalência. Neste caso, o segundo termo do lado direito, na equação (4.5) será insignificante. O declive da representação gráfica de  $\Delta\epsilon_0 - \Delta\epsilon_{\text{obs}}$  em função da concentração total de ácido (Figura 4.10) representa a diferença entre os coeficientes de absorção diferencial dos complexos, nas formas protonada e não protonada.

Em resumo, os resultados obtidos neste estudo em DMF confirmam que os equilíbrios que se estabelecem por adição ou libertação de prótons nas soluções que contêm este tipo de complexos têm de ser tratados com algum cuidado. Contudo, se nos restringirmos apenas a uma gama mais estreita de pH, até se atingir a zona do primeiro ponto de equivalência, como foi o caso do estudo efectuado inicialmente em solução aquosa e agora em DMF, é possível ter uma visão mais clara do comportamento em solução deste tipo de compostos [78].

#### **4.3.4 - Estudos cinéticos de reacções de abertura e fecho de anel envolvendo ligações Cr-S**

##### **4.3.4.1 - Introdução**

A hidrólise da ligação Cr-S é referida na literatura por vários autores [150,160,167,180,181], tendo, em geral, sido estudada em meio ácido [160,168]. Deutsch *et al* [160], por exemplo, descrevem reacções de substituição de compostos de Cr(III) com tióis, mostrando que elas se processam, predominantemente, via abertura da ligação Cr-S (abertura de anel), catalisada por ácido. Asher e Deutsch [180] propuseram, para aquele tipo de reacções, um mecanismo que interpreta a lei de velocidade encontrada em função de um pré-equilíbrio rápido de protonação que precede o passo determinante da velocidade de aquação. As reacções de abertura e de fecho de anel (ligação Cr-S) são, pois, geralmente dependentes da concentração de ácido, envolvendo a protonação

prévia do átomo de S (RSH e RS<sup>-</sup>R, por exemplo, "são substituídos" com muito mais facilidade do que o grupo RS- não protonado). No entanto, as velocidades relativas à abertura desta ligação, assim como da ligação Cr-N, por passos independentes da concentração de ácido podem competir com as reacções anteriores, embora sejam mais lentas [150].

Os ligandos coordenados pelo átomo de enxofre têm capacidade de exercer efeitos trans (cinéticos e estruturais) tanto em complexos de Cr(III) como de Co(III), residindo a principal diferença no comportamento cinético destes dois tipos de complexos no facto da labilização também provocar, nos primeiros, a rotura da ligação Cr-S. Esta é muito mais instável que a ligação Co-S, uma vez que, nos complexos de Cr(III), ao contrário do que acontece nos de Co(III), não se verifica estabilização do estado fundamental, provocada por retrodoação de carga ião metálico →S [170].

#### **4.3.4.2 - Breve referência a estudos cinéticos com compostos de coordenação de Cr(III) com ligações Cr-S efectuados em meio neutro ou moderadamente ácido**

Os estudos prévios de protonação que efectuámos com o ião complexo [Cr(cys)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> [79,161,170], permitiram estabelecer as condições experimentais adequadas ao estudo cinético das reacções de abertura e de fecho de anel naquele complexo. No entanto, o estudo da reacção de abertura de anel torna-se complicado pelo facto de, num meio moderadamente ácido (pH < 5.5), se tender para uma mistura de três espécies em equilíbrio (H<sub>2</sub>C<sup>+</sup>, HC e C<sup>-</sup>) (Ver equações 4.1 e 4.2 e a Figura 4.5).

Assim, com o objectivo de direccionar a reacção de hidrólise do complexo [Cr(cys)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> no sentido da formação de [Cr(L-cys)(L-cysSH)(H<sub>2</sub>O)], abertura de anel, (Ver equação 4.1) e de constatar qual o espectro correspondente, na medida do possível, apenas a esta espécie em solução, a evolução daquela reacção foi seguida por UV/Vis e por DC, na região visível. Adicionando ácido à solução aquosa do referido ião complexo, a intervalos de tempo regulares, de modo a que o pH da mistura fosse sendo

ajustado a cerca de 5.5, verificou-se que, além de haver consumo de protões, os espectros de UV/Vis e de DC se alteravam no sentido dos espectros típicos daquele complexo àquele pH (Ver Figura 4.6, Secção 4.3.2). Esta informação foi utilizada na definição das condições ideais para o estudo cinético da reacção de abertura de anel, isto é, da quebra da ligação Cr-S no complexo  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$ . Se o pH das soluções for mantido constante, na zona 5.5 - 5.7, pode admitir-se que existem em solução apenas aquelas duas espécies,  $\text{C}^-$  e  $\text{HC}$ , podendo, nesse caso, a transformação de  $\text{C}^-$  em  $\text{HC}$  ser modelada como um sistema simples [79,161,170].

Por neutralização de soluções do complexo, a pH 5.5, com soluções-tampão a pH 7, a reacção (de fecho de anel) processar-se-ia de modo completo, deslocando-se o equilíbrio, totalmente, para a formação da espécie  $\text{C}^-$ . Na região de pH estudada e nas condições experimentais utilizadas, verificou-se que a velocidade desta reacção (fecho de anel) era independente da concentração de  $\text{H}^+$  e do tipo de tampão usado. Os resultados deste estudo conduziram às leis de velocidade seguintes:

$$k_{\text{obs}} = k K_a / [\text{H}]^+ + K_a \quad (4.6)$$

$$\text{velocidade} = k [\text{C}_0] \quad (4.7)$$

sugerindo o mecanismo esquematizado na Figura 4.11.

O facto da velocidade de fecho de anel ser independente da concentração de ácido indica que  $K_a$  (4.6) é muito superior a  $[\text{H}]^+$ .  $K_a$  tanto pode referir-se ao grupo RSH como à molécula de água coordenada no complexo  $[\text{Cr}(\text{L-cysSH})(\text{L-cys})(\text{H}_2\text{O})]$ , embora a literatura favoreça esta última alternativa [182]. A constante de velocidade da reacção seria assim uma constante de velocidade unimolecular correspondente ao fecho de anel do complexo desprotonado. Os parâmetros de activação e em particular a baixa energia de activação sugerem também que a transferência de protão e o fecho de anel possam ser um processo concertado [79,161,170].

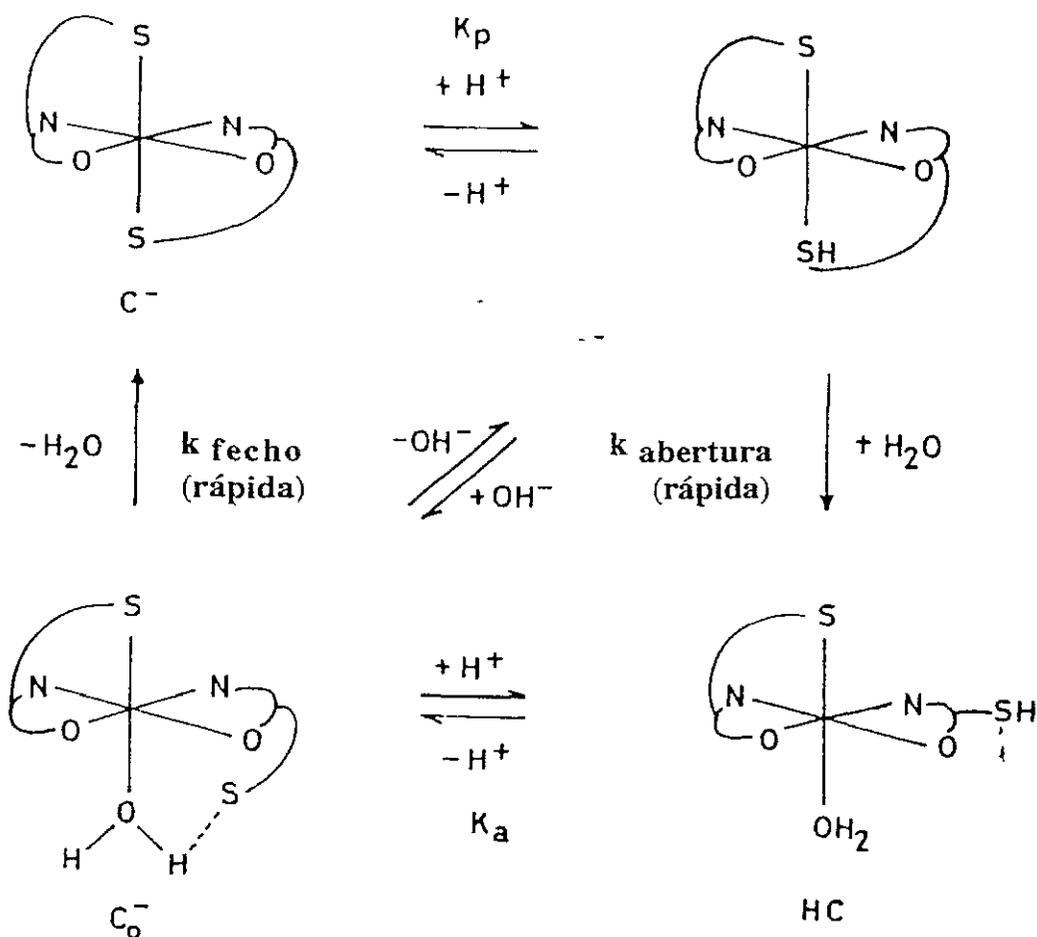


Figura 4.11 - Mecanismo de abertura e de fecho de anel (ligação Cr-S); íon complexo  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$  [79]

#### 4.3.4.3 - Estudos cinéticos de abertura de ligações Cr-S em meio ácido

Após os estudos cinéticos efectuados com soluções do anião  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$ , em meio ácido moderado, como se descreveu atrás, ficou clara a peculiaridade do comportamento em solução daquele complexo aniónico de Cr(III), devido à presença da ligação Cr-S. Tornou-se, pois, pertinente estudar as alterações, rápidas, sofridas por aquele complexo e por outros do mesmo tipo, após adição de ácido, as quais são traduzidas, numa primeira análise, por alterações na cor das soluções.

As reacções de hidrólise ácida, rápida, dos aniões  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$  e  $[\text{Cr}(\text{pen})_2]^-$  (pen=D- e/ou L-) foram, assim, estudadas pelo método de "stopped-flow". Detalhes experimentais destas experiências estão descritos no Capítulo 7 - Secção B.

Na Figura 4.12-a) está representada a variação de absorvância que se observa

quando se adiciona ácido a uma solução aquosa de  $[\text{Cr}(\text{D-pen})_2]^-$ . Os resultados obtidos, para diferentes concentrações de ácido, com os complexos de cisteína e de penicilamina, traduzem uma cinética de 1ª ordem durante, pelo menos, dois tempos de vida média, tal como é demonstrado na Figura 4.12-b), para o caso da hidrólise de  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$ .

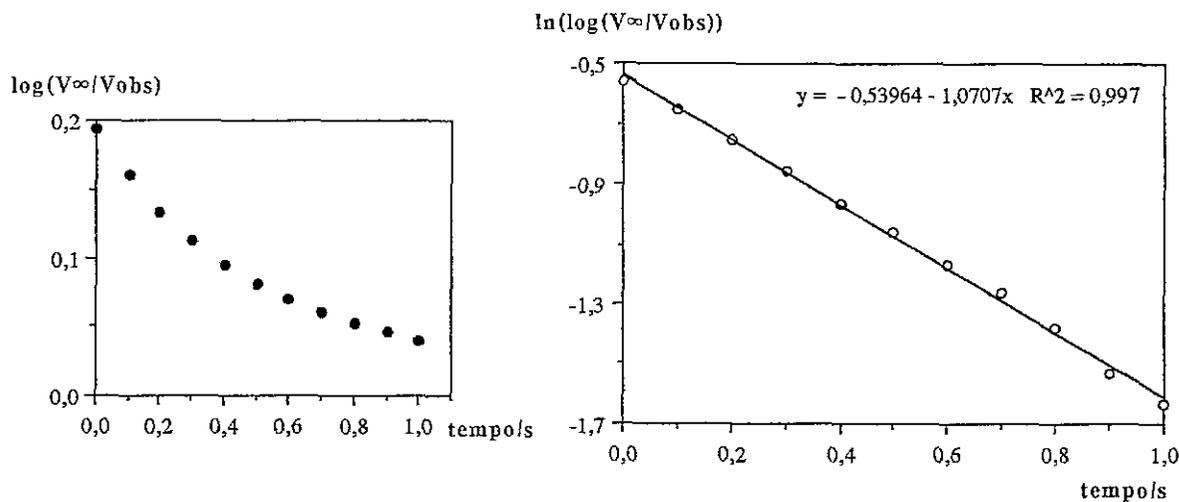


Figura 4.12. - a)-Variação da absorvância (medida indirectamente) em função do tempo, para a mistura reaccional de  $[\text{Cr}(\text{D-pen})_2]^-$  com  $\text{HClO}_4$ , seguida no comprimento de onda do máximo da banda de menor energia ( $\lambda=606 \text{ nm}$ ) deste complexo;  $[\text{HClO}_4] = 0.4 \text{ mol dm}^{-3}$  e  $[\text{Cr}(\text{D-pen})_2]^- = 7.56 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ; força iónica ajustada com  $\text{NaClO}_4$   $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$ ; b)- $\ln(A_{\text{obs}} - A_{\infty})$  em função do tempo;  $A_{\text{obs}}$ =absorvância medida em cada ponto;  $A_{\infty}$ =absorvância no tempo considerado como o fim da reacção;  $[\text{HClO}_4] = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$  e  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^- = 5.20 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ; força iónica ajustada a  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  com  $\text{NaClO}_4$  (outros detalhes experimentais no Capítulo 7 - SecçãoB)

A partir das representações gráficas de  $\ln(A_{\text{obs}} - A_{\infty})$  em função do tempo, calcularam-se as constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem,  $k_{\text{obs}}$ , para as reacções de hidrólise ácida de ambos os complexos (Tabela 4.5).

Os resultados apresentados na Tabela 4.5 satisfazem, para a reacção de abertura da ligação Cr-S, uma lei de velocidade (4.8) constituída por dois termos:  $k_0$  independente da concentração de ácido e  $k_1$  dependente daquela concentração,

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_1[\text{H}^+] \quad (4.8)$$

| [Cr(cys) <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>        |                                     |                    | [Cr(pen) <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                |                                       |           |
|---|-------------------------------------|--------------------|---|---------------------------------------|-----------|
| [H] <sup>+</sup><br>(mol dm <sup>-3</sup> ) | k <sub>obs</sub> (s <sup>-1</sup> ) | a(H <sup>+</sup> ) | k <sub>obs</sub> (s <sup>-1</sup> )                 |                                       |           |
|   |                                     |                    | Tratamento<br>de reacção de<br>1 <sup>a</sup> ordem | Método das<br>velocidades<br>iniciais | CONINFIN* |
| 0.010                                       | 0.32                                | —                  | —   | —                                     | —         |
| 0.020                                       | 0.63                                | —                  | —   | —                                     | —         |
| 0.025                                       | 1.10                                | —                  | —   | —                                     | —         |
| 0.030                                       | 1.13                                | —                  | —   | —                                     | —         |
| 0.040                                       | 1.56                                | —                  | —   | —                                     | —         |
| 0.050                                       | 1.99                                | 0.040              | 0.22  | 0.25                                  | 0.31      |
| 0.060                                       | 2.51                                | —                  | —   | —                                     | —         |
| 0.070                                       | 2.60                                | —                  | —   | —                                     | —         |
| 0.075                                       | 2.88                                | 0.060              | 0.33  | 0.32                                  | 0.51      |
| 0.10  | —                                   | 0.080              | 0.45  | 0.42                                  | 0.54      |
| 0.15  | —                                   | 0.120              | 0.61  | 0.59                                  | 0.78      |
| 0.25  | —                                   | 0.196              | 1.04  | 0.82                                  | 1.24      |
| 0.40  | —                                   | 0.306              | 1.45  | 1.38                                  | 1.84      |
| 0.50  | —                                   | 0.384              | 1.57  | 1.60                                  | 1.95      |

Tabela 4.5 - Constantes de velocidade de pseudo 1<sup>a</sup> ordem, k<sub>obs</sub>, para as reacções de hidrólise ácida dos aniões complexos [Cr(L-cys)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (5.0x10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup>) e [Cr(D-pen)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (7.55x10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup>), com HClO<sub>4</sub>, em NaClO<sub>4</sub> (0.1 mol dm<sup>-3</sup>); T=24°C; os resultados apresentados são uma média de 3-5 experiências. \*CONINFIN: programa de ajuste de resultados cinéticos; valores de a(H<sup>+</sup>) calculados segundo [183] (Ver Capítulo 7- Secção B)

verificando-se uma relação linear (Figura 4.13) entre as constantes de velocidade observadas e as respectivas concentrações de ácido utilizadas [78].

O complexo de penicilamina só reage com velocidades significativas em soluções comparativamente mais ácidas que no caso do complexo com cisteína. Sendo assim, foi necessário utilizar concentrações de ácido muito elevadas (0.05 a 0.50 M em

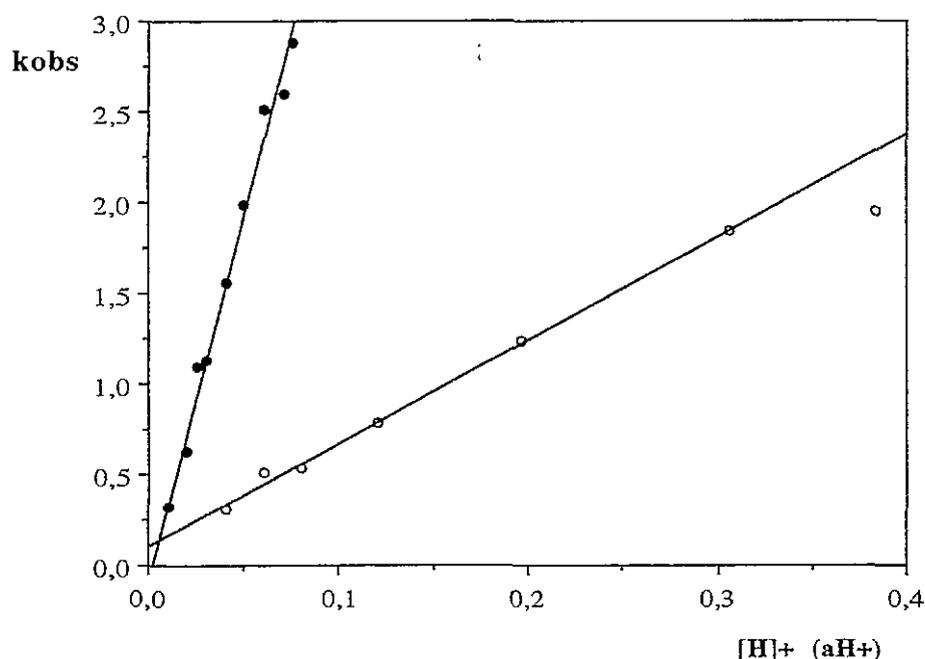


Figura 4.13 -  $k_{obs}$  em função de  $[H^+]$  (●) para a reacção de  $[Cr(L-cys)_2]^-$  ( $5.0 \times 10^{-3}$  mol  $dm^{-3}$ ) e em função de  $a_{(H^+)}$  (○) para a reacção de  $[Cr(D-pen)_2]^-$  ( $7.5 \times 10^{-3}$  mol  $dm^{-3}$ ), com  $HClO_4$ , (concentrações referidas no texto); soluções em  $NaClO_4$  0.1 mol  $dm^{-3}$ ;  $T=24^\circ C$ ; na representação gráfica das constantes correspondentes a  $[Cr(D-pen)_2]^-$ , foram utilizados os valores de  $k_{obs}$  calculados com o programa CONINFIN\*, tendo sido omitidos, na regressão linear, o ponto correspondente à concentração de ácido mais elevada

$[H^+]$ ), para que, nas condições experimentais utilizadas, condicionadas pelo equipamento disponível, fosse possível determinar as respectivas constantes de velocidade de hidrólise. Devido aos valores elevados da força iónica do meio, atingidos quando se utilizam concentrações de ácido tão elevadas, tornou-se necessário converter essas concentrações (em mol  $dm^{-3}$ ) em valores de actividade [183], de modo a ser possível relacionar linearmente aquelas constantes de velocidade com as quantidades de ácido utilizadas. No caso do cisteinato, ( $[H^+] = 0.019 - 0.075$  mol  $dm^{-3}$ ), essa conversão não foi necessária, pois não se observaram desvios significativos à relação linear referida anteriormente.

Da representação gráfica de  $k_{obs}$  em função de  $[H^+]$ , para o anião  $[Cr(L-cys)_2]^-$ , obtiveram-se então os seguintes resultados:

$$k_{\text{obs}} = -0.094 (\pm 0.04) + 40.7 (\pm 2.0) [\text{H}^+] \text{ (s}^{-1}\text{)} \quad (4.9)$$

A equação (4.9), para além da constante de velocidade de abertura de anel que é de  $40.7 \pm (2.0)$ , dá-nos indicação de que o passo predominante da reacção é o da quebra da ligação Cr-S, mais rápido, enquanto que o passo independente da concentração de ácido tem uma velocidade que, além de ser pouco significativa, é determinada com pouca precisão.

Tal como foi visto anteriormente para este composto [79], em meio moderadamente ácido a velocidade de formação da ligação Cr-S (fecho de anel) foi de  $1.98 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . As duas constantes de velocidade, abertura e fecho da mesma ligação, podem então ser usadas

$$K_{\text{eq}} = k_{\text{ fecho de anel}} / k_{\text{ abertura de anel}} \quad (4.10)$$

para estimar a constante de equilíbrio da reacção (4.10).  $\log_{10} K_{\text{eq}}$  é igual a 4.31, em concordância com o valor de  $\log_{10} K_1 = 4.42$ , determinado, por potenciometria, para a mesma reacção, no trabalho anteriormente referido [79].

Para o ião complexo  $[\text{Cr}(\text{D-pen})_2]^-$ , os resultados obtidos (Tabela 4.5) permitem admitir também uma cinética semelhante à proposta para a reacção com o complexo de cisteína, tendo, também neste caso, sido determinada a respectiva constante de velocidade de 2ª ordem, isto é:

$$k_{\text{obs}} = 0.099 (\pm 0.04) + 5.79 (\pm 2.0) a_{\text{H}^+} \text{ (s}^{-1}\text{)} \quad (4.11)$$

As velocidades de reacção determinadas neste trabalho são comparadas, Tabela 4.6, com as obtidas para outros complexos de Cr(III) com ligações Cr-S.

No decorrer das reacções de hidrólise ácida do anião complexo  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$ , é nítida uma segunda reacção, mais lenta, após um primeiro passo rápido, tal como se pode inferir da Figura 4.14. À diminuição inicial de absorvância segue-se um segundo

| Composto                           | $k_0(s^{-1})$<br>(passo independente de ácido) | $k_1(M^{-1}s^{-1})$<br>(passo dep. da conc. de ácido) | Condições experimentais  | Ref <sup>a</sup> |
|------------------------------------|--|---|--|------------------|
| $[Cr(SH)(H_2O)_5]^{2+}$            | $(3.09 \pm 0.07) \times 10^{-5}$               | $(3.82 \pm 0.16) \times 10^{-5}$                      | T=40°C;<br>I=1.00M(LiClO <sub>4</sub> );<br>[H <sup>+</sup> ] = 0.01-1.00 M        | [167]            |
| $[Cr(en)_2(S-C(CH_3)_2CO_2)]^+$    | $(0.54 \pm 0.16) \times 10^{-4}$               | $(8.0 \pm 0.3) \times 10^{-4}$                        | T = 25°C; I = 1.00 M;<br>[H <sup>+</sup> ] = 0.1-0.9 M                             | [150]            |
| $[Cr(SCH_2CH_2NH_3)(H_2O)_5]^{2+}$ | $(4.5 \pm 0.2) \times 10^{-5}$                 | $(1.31 \pm 0.02) \times 10^{-4}$                      | T = 25°C; I = 2.00 M;<br>[H <sup>+</sup> ] = 0.00013-1.99 M                        | [128]            |
| $[Cr(en)_2(SCH_2CO_2)]^+$          | $2.51 \times 10^{-5}$                          | $1.1 \times 10^{-4}$                                  | T = 25°C; I = 1.00 M;<br>[H <sup>+</sup> ] = 0.03-1.00 M                           | [160]            |
| $[Cr(en)_2(SCH_2CH_2NH_2)]^{2+}$   | $5.72 \times 10^{-6}$                          | $2.23 \times 10^{-5}$                                 | T = 25°C; I = 1.00 M;<br>[H <sup>+</sup> ] = 0.20-1.00 M                           | [160]            |
| $[Cr(L-cys)_2]^-$                  | —  | $40.7 \pm 2.0$  | T = 24°C;<br>I = 0.1 M (NaClO <sub>4</sub> );<br>[H <sup>+</sup> ] = 0.01- 0.075 M | E.t.             |
| $[Cr(D-pen)_2]^-$                  | $0.099 \pm 0.050$                              | $5.79 \pm 0.52$                                       | T=24°C;<br>I = 0.1 M (NaClO <sub>4</sub> );<br>[H <sup>+</sup> ] = 0.050-0.50 M    | E.t.             |

Tabela 4.6 - Constantes de velocidade de reacções de substituição (por moléculas de água), para alguns compostos de coordenação de Cr(III), possuidores de ligações Cr-S; E.t.= este trabalho.

passo, em que há um aumento lento na curva de absorvância em função do tempo, com se pode inferir da Figura 4.14. À diminuição inicial de absorvância segue-se um segundo passo, em que há um aumento lento na curva de absorvância em função do tempo, com excepção para as reacções em que foram usadas concentrações de ácido menores que 0.010 mol dm<sup>-3</sup>. Analogamente, no caso do anião  $[Cr(D-pen)_2]^-$  também se observa uma segunda reacção, embora apenas para concentrações de ácido superiores a 0.5 mol dm<sup>-3</sup>. Estas segundas reacções podem dever-se a competição entre a quebra de ligações Cr-S (mais rápida) e de ligações Cr-N e/ou Cr-O [150,160,170], pois há evidência de que as espécies resultantes da substituição na ligação Cr-N interferem nas alterações espectrais observadas, especialmente na região visível [171].

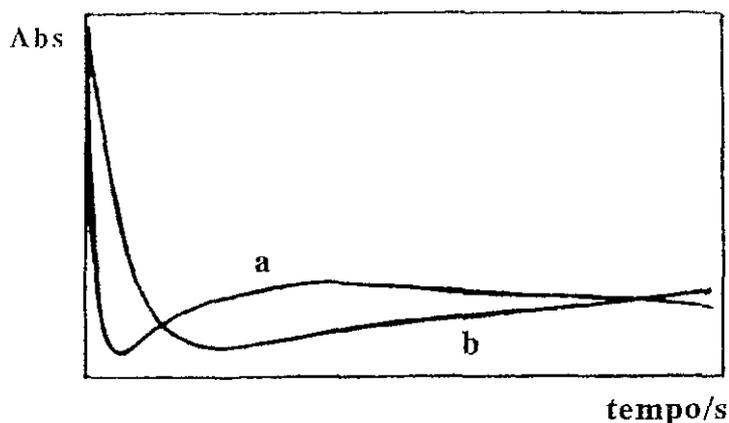


Figura 4.14 - Variação da absorvância com o tempo, no decorrer da reacção de hidrólise ácida, com  $\text{HClO}_4$ , do anião complexo  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$  (reacção seguida por "stopped-flow"); tempo máximo: (a)=10 segundos; (b)=1 segundo

A hidrólise do complexo com cisteína é muito mais rápida que a do complexo com penicilamina, como se pode constatar pelo valor da constante de velocidade associada ao passo dependente da concentração de ácido, o qual é 10 vezes mais rápido no primeiro caso (Ver Tabela 4.6). Esta diferença de velocidades pode, em parte, ser reflexo das diferenças entre os valores de  $\text{pK}_a$  dos grupos tiol da cisteína (10.3) e da penicilamina (10.6). Além de prováveis factores de impedimento estereoquímico devidos à presença dos dois grupos metilo junto do átomo de S coordenado, o complexo com penicilamina é muito mais hidrofóbico que o de cisteína, factos que por si sós podem ser responsáveis por uma maior dificuldade de protonação e consequentemente pelas menores velocidades de reacção verificadas com aquele complexo.

Como a hidrólise catalisada por ácido é muito mais rápida nestes dois complexos que em todos os outros que foram estudados até agora, possuidores do mesmo tipo de ligação, o factor determinante dessa diferença pode ter a ver com a carga dos complexos que temos estado aqui a estudar (Tabela 4.6). Os complexos de Cr(III) com cisteína e com penicilamina são os únicos com carga negativa, uma vez que todos os outros são catiónicos sendo, por isso, menos favoráveis, por exemplo, à

associação inicial de um protão, no processo de protonação do átomo de S.

#### 4.4 - Resumo e considerações finais

Uma vez que se admite que os produtos finais da redução de Cr(VI) por redutores intracelulares podem ser complexos de Cr(III) com aminoácidos, ou péptidos, que, por exemplo, possuam resíduos de cisteína, tornou-se pertinente um estudo aprofundado deste tipo de compostos.

Assim, foram sintetizados e caracterizados complexos de Cr(III) com L-cisteína (um complexo conhecido), com L- ou com D-penicilamina (complexos que não tinham anteriormente sido preparados numa forma pura) e com ácido tiomálico (composto novo), tendo-se demonstrado, através dos resultados de DC, que estas sínteses são estereoespecíficas no caso dos dois primeiros compostos (com formação de um único isómero, o *trans*-S, *cis*-O,N).

O comportamento destes complexos foi estudado em solução aquosa e também num solvente não aquoso (DMF). Como a ligação Cr-S, presente em todos eles, apresenta um comportamento peculiar por ser particularmente lábil, partindo-se do conhecimento anterior da especiação do anião  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$ , em meio neutro ou moderadamente ácido, fez-se o estudo das reacções de substituição, por quebra e formação daquela ligação, experimentadas pelos referidos complexos em solução quando lhes é adicionado ácido. Este trabalho, efectuado nomeadamente por DC, permitiu a optimização do intervalo de pH dentro do qual há total reversibilidade da ligação Cr-S, sendo possível desse modo, tratar os equilíbrios que se estabelecem entre as espécies em solução como sistemas muito simples.

Anteriormente tínhamos verificado que a velocidade de abertura de anel (ligação Cr-S), no anião complexo  $[\text{Cr}(\text{L-cys})_2]^-$ , era independente da concentração de ácido em solução, numa região estreita de pH (7.0 - 5.5), mas se essa zona fosse alargada para valores de pH inferiores, aquele complexo sofria hidrólise ácida, tão

rápida que podia ser estudada por "stopped-flow". O estudo cinético destas reacções permitiu chegar a uma lei de velocidade de dois termos, um independente e outro dependente da concentração de ácido:  $k_{obs} = k_0 + k_1[H^+]$ . Da combinação de  $k_{obs}$  de abertura de anel com  $k_{obs}$  de formação da ligação Cr-S, no caso do anião complexo  $[Cr(L-cys)_2]^-$ , foi possível calcular a respectiva constante de equilíbrio ( $K=4.31$ ), que está em perfeito acordo com a mesma constante, determinada num nosso trabalho anterior por potenciometria ( $K=4.42$ )! A partir daquelas constantes de velocidade de abertura e de fecho de anel foram calculadas as constantes de 2ª ordem para estes processos: 40.7 para  $[Cr(L-cys)_2]^-$  e 5.79 para o complexo  $[Cr(D-pen)_2]^-$ . A constatação de que as velocidades das reacções de hidrólise nestes complexos são muito mais elevadas que as de outros compostos possuidores do mesmo tipo de ligação, tem certamente a ver com o facto destes compostos terem carga negativa, enquanto que os outros, por serem catiónicos, são muito menos favoráveis a interacções com a carga positiva de  $H^+$ , no processo de protonação inicial do átomo de S, admitido como o primeiro paasso nos mecanismos de abertura da ligação Cr-S.

O facto das reacções de hidrólise com os complexos de penicilamina serem mais lentas (velocidades 10 vezes menores) que as com o de L-cisteína, devido, provavelmente, a factores de impedimento estereoquímico e/ou a diferenças nos respectivos  $pK_a$ , pode ser relevante na previsão da reactividade de outros compostos análogos, naturais ou modelos, de cujo comportamento seja importante ter um melhor conhecimento.

## **5. Compostos de coordenação de Cr(III) com aminoácidos do tipo $\alpha$ -aminocarboxílico**

### **5.1 - Introdução**

O trabalho descrito nos capítulos anteriores evidencia a importância que a coordenação do Cr(III) gerado na redução intracelular de Cr(VI) pode ter na explicação da toxicidade deste estado de oxidação. Porém, ao procurar-se documentação científica sobre a química de coordenação de Cr(III) a biomoléculas, verifica-se que, mesmo no que diz respeito a aminoácidos simples, os resultados descritos variam de autor para autor e estão longe de ser esclarecedores do comportamento do Cr(III) na presença daqueles ligandos.

Assim, procedeu-se a uma revisão cuidada e ao aprofundamento de certos aspectos da química preparativa, da estereoquímica e da espectroquímica de tais

complexos. Um novo complexo de Cr(III) com L-valina foi sintetizado, tendo a sua estrutura cristalina sido determinada por difracção de Raios-X de cristal único.

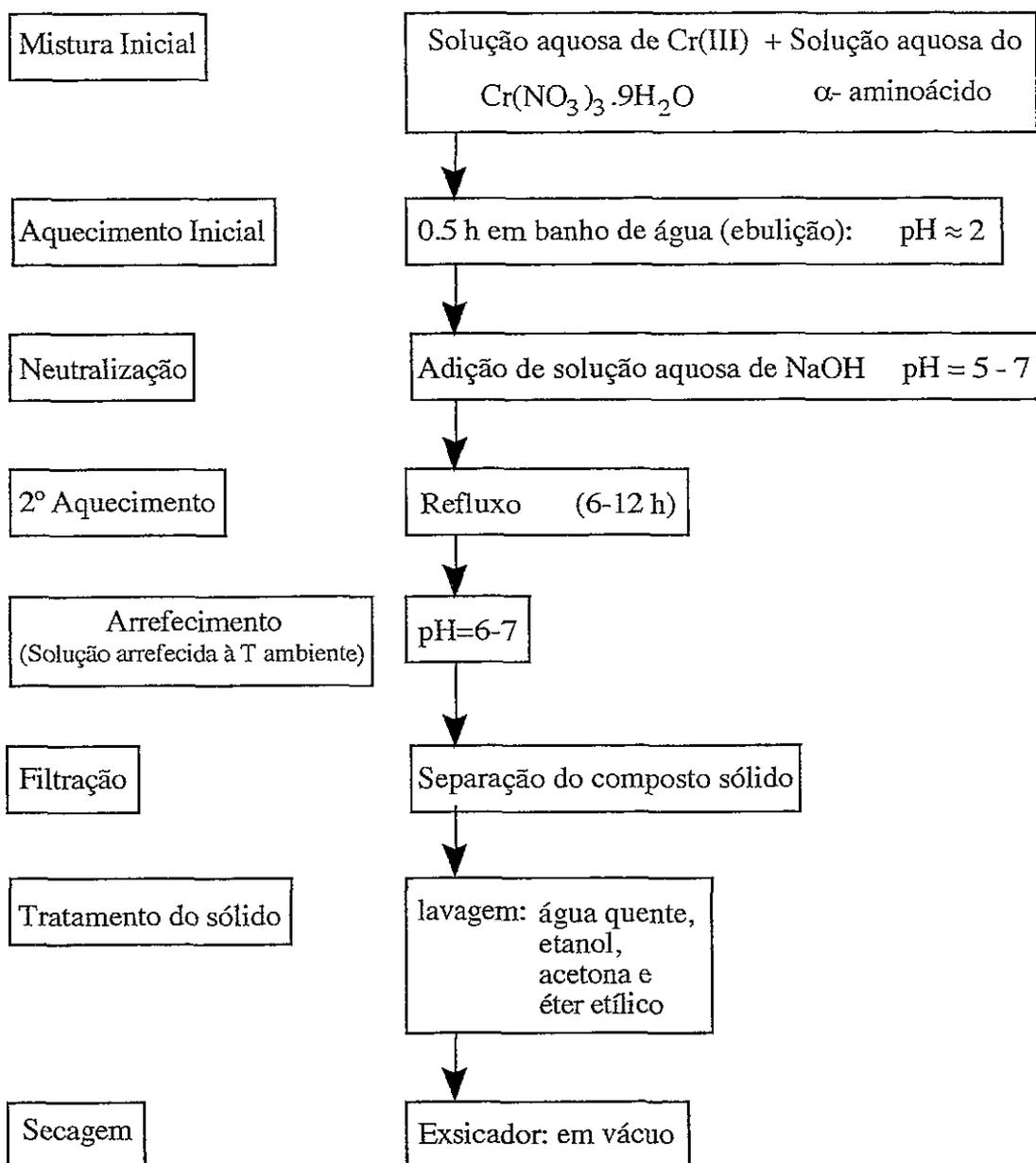
Na caracterização dos referidos compostos deu-se especial ênfase aos estudos efectuados por espectrofotometria de dicroísmo circular. No entanto, dadas as ambiguidades surgidas na interpretação dos resultados obtidos, foram aplicadas, com sucesso, técnicas de espectrometria de massa, tanto quanto nos é dado saber pela primeira vez, que permitiram identificar novas estruturas além das que a literatura, habitualmente, propõe para este tipo de compostos.

As estruturas do tipo da do cristal de Cr(III) com L-valina e dos novos compostos díméricos propostos por espectrometria de massa, pouco vulgares em compostos de Cr(III), são discutidas em termos das suas possíveis implicações na explicação dos efeitos genotóxicos do crómio.

## **5.2 - Métodos de síntese**

Na literatura são referidos vários métodos de síntese de compostos de coordenação de Cr(III) com aminoácidos do tipo  $\alpha$ -aminocarboxílico. Oki *et al* [158,184,185], por exemplo, utilizam dois métodos de síntese. Num deles, promovem a reacção de um sal de crómio(III) com o aminoácido, por reacção no estado sólido. O segundo método utiliza a mesma reacção em solução. Outros autores [186], partem de sais de crómio diversos como reagente de partida, como por exemplo  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  ou  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  [187]. Na maior parte destas reacções de síntese, embora se trabalhe em zonas estreitas de pH, formam-se, além dos complexos trisquelatos, outros complexos do tipo bisquelato, dímeros com grupos OH ou  $\text{H}_2\text{O}$  coordenados, além de possíveis espécies poliméricas [157,158,184-187]. As cores destes "produtos secundários", em geral, variam entre púrpura, violeta e vermelho, ao contrário dos complexos trisquelato, que serão, em princípio, de cor rosa. Uma constatação comum a todos os trabalhos conhecidos é a ausência de uma caracterização fundamentada dos complexos obtidos.

**Método geral adoptado para a síntese de compostos de coordenação de Cr(III) com aminoácidos  $\alpha$ -aminocarboxílicos**



Adaptando o conjunto de métodos atrás referidos [186-188], estabeleceu-se, neste trabalho, um método geral para sintetizar este tipo de compostos, que foi aplicado à preparação dos complexos de Cr(III) descritos neste capítulo.

### **5.3 - Síntese e caracterização do complexo [Cr(L-ala)<sub>3</sub>]**

#### **5.3.1 - Revisão bibliográfica**

A síntese de um composto de Cr(III) com L-alanina que, pela primeira vez, aparece descrita na literatura é atribuída a Ley e Winkler, em 1909 [188], embora segundo outros autores [187], o primeiro complexo de Cr(III) com este aminoácido tenha sido obtido em 1910, por Tchougaeff e Serbin, os quais, por ebulição de uma solução de cloreto de pentaaminaclorocrómio(III) com excesso de L-alanina, até a maior parte do NH<sub>3</sub> se libertar da solução amoniacal resultante, obtiveram cristais tipo "agulha", de cor rosa, cuja composição atribuíram a [Cr(ala)<sub>3</sub>].

O método de síntese deste composto foi sofrendo modificações ao longo do tempo. Gillard *et al*, em 1974 [157], por exemplo, prepararam um sólido de cor rosa, por neutralização de uma mistura de soluções aquosas de Cr(III) e de L-alanina. Por sua vez, Minor *et al* em 1976 [175], embora referindo a obtenção de dois isómeros deste complexo, um solúvel e o outro insolúvel em água, também obtiveram, em princípio, este mesmo complexo, após refluxo de uma mistura neutralizada de Cr(III) e L-alanina. Oki *et al* [158,184,185] prepararam, de igual modo, este mesmo composto tanto por reacção no estado sólido como por reacção em solução. Mais recentemente [189], outras publicações têm continuado a referir a obtenção deste mesmo composto por métodos semelhantes aos descritos, mas, aparentemente, com um grau de pureza mais elevado.

#### **5.3.2 - Preparação e caracterização de [Cr(L-ala)<sub>3</sub>]**

Neste trabalho, este complexo foi sintetizado pelo método geral descrito na Secção 5.2.1, partindo de soluções em que a relação molar entre Cr(III) e L-alanina era de 1:10 (Capítulo 7 - Secção C). Porém, procurou-se ainda preparar o composto usando

alguns dos métodos descritos na literatura [175,184,185,187], de forma a esclarecer qual o produto efectivamente originado em cada um dos processos de síntese conhecidos.

De uma maneira geral, todas as sínteses deram origem a sólidos de cor rosa, com uma aparência microcristalina quando observados ao microscópio. Estes sólidos foram caracterizados por análise elementar e por técnicas espectroscópicas (IV, UV/Vis e DC).

Os resultados das análises elementares estão compilados na Tabela 5.1. Para algumas das amostras, a quantidade de crómio, determinada por Absorção Atómica, deu resultados um pouco inferiores aos previstos, o que pareceu confirmar alguma contaminação resultante do excesso de aminoácido utilizado no processo de síntese. A hipótese, eventual, da presença de água de cristalização em algumas dessas amostras foi rejeitada, pois as respectivas análises termogravimétricas não evidenciaram perdas de massa à temperatura esperada (a 1ª perda de massa só acontece a cerca de 260 °C).

| Método de síntese usado...                     | Resultados de análise elementar |      |       |
|--|---------------------------------|------|-------|
|  | % C                             | % H  | % N   |
| ....(a)  | 34.18                           | 5.74 | 13.29 |
| ...Minor <i>et al</i> [175], isómero insolúvel | 34.82                           | 5.73 | 13.25 |
| ....Este trabalho                              | 33.79                           | 5.69 | 12.99 |
| "  | 34.66                           | 5.54 | 13.16 |
| ...Gillard <i>et al</i> [157], 1ª colheita     | 33.36                           | 5.52 | 12.63 |
| ...Gillard <i>et al</i> [157], 2ª colheita     | 34.84                           | 5.70 | 13.16 |
| ....(b)  | 29.39                           | 5.34 | 12.47 |

Tabela 5.1 - Análise elementar dos complexos  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$  sintetizados segundo diversos métodos (ver detalhes no Capítulo 7 - Secção C); (a) - % calculadas para  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$ ; (b) - % calculadas para o dímero  $[\text{Cr}_2(\text{L-ala})_4(\text{OH})_2]$ , apenas como exercício de comparação

### 5.3.3 - Propriedades espectroscópicas do complexo $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$

Embora Ang *et al* [187] tenham referenciado uma ligeira solubilidade, em água, para o sólido  $[\text{Cr}(\text{ala})_3]$ , a generalidade da literatura refere este composto como

totalmente insolúvel naquele solvente. Por isso, todos os espectros, electrónicos ou de DC, publicados até à data, foram obtidos a partir de soluções ácidas, com excepção do que se refere ao "isómero solúvel" citado por Minor *et al* [175], referido atrás.

O trabalho por nós desenvolvido permitiu que se obtivessem espectros de UV/Vis e de DC deste composto em solução aquosa não acidificada (Figura 5.1). Registaram-se também os espectros de DC no estado sólido, em pastilhas de KBr, os quais são comparados com os correspondentes espectros em solução, na Figura 5.1-b.

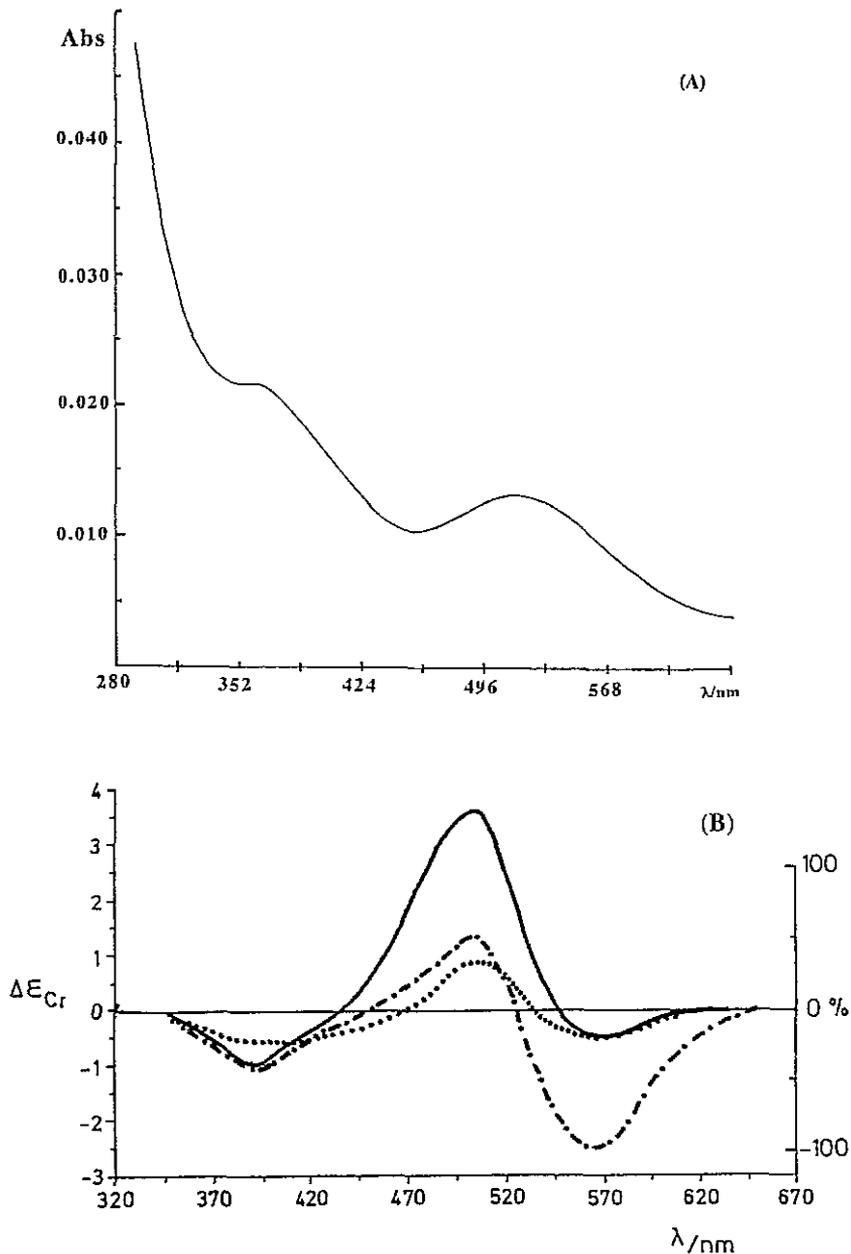


Figura 5.1 -  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$ : (A) espectro UV/Vis ( $\epsilon_{370 \text{ nm}} \approx 365$  e  $\epsilon_{510 \text{ nm}} \approx 270 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ); (B) DC, em solução aquosa ( $\Delta\epsilon_{\text{M}}(505 \text{ nm}) \approx 3.46 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ) (•••); em DMSO (—) e no estado sólido (-·-·)

A Tabela 5.2 resume os resultados de DC obtidos para amostras do composto, dissolvido em diversos solventes e no estado sólido. Os espectros electrónicos de todas as amostras preparadas pelos métodos já descritos apresentaram características análogas às do espectro da Figura 5.1-a).

| Composto  | Condições experimentais    | DC <sub>máx</sub> /nm ( $\Delta\epsilon$ máx) <sup>a</sup> |             |              | Ref <sup>a</sup>   |
|---|----------------------------|--|-------------|--------------|--------------------|
|   |                            |  |             |              |                    |
| $\Lambda(+)\text{-}\beta\text{-}[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$              | HClO <sub>4</sub> 50%      | ---  | 522 (+0.1)  | -400 (+0.13) | [157]              |
| $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]^{\text{b,c}}$                                | ácido                      | 606 (+0.02)  | 526 (-0.10) | -408 (+0.05) | [175]              |
| $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]^{\text{d}}$                                  | HClO <sub>4</sub> 20%      | 580 (-0.19)  | 510 (+0.61) | -400 (-0.17) | E.t. <sup>e</sup>  |
| "   | "                          | ---  | 530 (-0.19) | 410 (+0.03)  | E.t. <sup>f</sup>  |
| $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]^{\text{c,g}}$                                | H <sub>2</sub> O           | 565 (-0.15)  | 505 (+0.22) | -400 (-0.12) | [175]              |
| $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]^{\text{d}}$                                  | "                          | 570 (-0.53)  | 505 (+3.64) | 385 (-0.96)  | E.t. <sup>h</sup>  |
| "   | DMSO                       | 570 (-0.54)  | 505 (+0.86) | 395 (-0.56)  | E.t.               |
| $\Lambda(+)\text{-}\beta\text{-}[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]^{\text{a,i}}$ | Estado sólido <sup>j</sup> | 546 (-0.80)  | 478 (+1.00) | ---          | [157]              |
| $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]^{\text{a,i}}$                                | "                          | 560 (-0.77)  | 500 (+1.00) | 385 (-0.51)  | E.t. <sup>k</sup>  |
| "   | "                          | 566 (-1.00)  | 500 (+0.80) | 385 (-0.50)  | E.t. <sup>l</sup>  |
| "   | "                          | 560 (-1.00)  | 500 (+0.47) | 388 (-0.40)  | E.t.               |
| "   | "                          | 580 (-0.45)  | 510 (+1.00) | 395 (-0.32)  | E.t. <sup>m</sup>  |
| "   | "                          | 550 (-1.60)  | 500 (+2.80) | 385 (-1.05)  | [189] <sup>n</sup> |

Tabela 5.2 - Propriedades espectroscópicas (DC) do complexo  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$ ; adaptada de [190]

- a)-Sinal e intensidade das bandas entre parêntesis;
- b)-Isómero insolúvel segundo Minor *et al* [175];
- c)-Sinal e intensidade ( $\Delta\epsilon_M$ ) segundo Minor *et al*, Fig. 4 [175];
- d)- $\Delta\epsilon_C$  calculado por mole de átomos de Cr;
- e)-Espectro obtido imediatamente após a dissolução do composto;
- f)-Espectro obtido 30 minutos depois do espectro e), anterior;
- g)-Isómero solúvel segundo Minor *et al* [175];
- h)-Espectro obtido tão rapidamente quanto possível;
- i)-Intensidades relativas das bandas;
- j)-Espectro obtido em pastilha de KBr;
- k)-Sólido preparado segundo Gillard *et al* [157];
- l)-Sólido referente ao isómero insolúvel de acordo com Minor *et al* [175];
- m)-Sólido preparado segundo Oki *et al* [184], pelo método do "estado sólido";
- n)-Sólido preparado segundo Oki *et al* [184], pelo método "em solução" [189].

Se se analisarem os resultados da Tabela 5.2, verifica-se que, tanto em solução aquosa como em solução ácida (espectro registado imediatamente após dissolução do composto neste solvente), em DMSO ou no estado sólido, todos os espectros apresentam em comum o "padrão" espectral (-), (+), (-), isto é, três bandas de dicroísmo

circular com sinais alternados, sendo muito mais intensa a banda intermédia, de sinal positivo.

### 5.3.4 - Comportamento químico em solução

#### 5.3.4.1 - Comportamento em soluções aquosas neutras

Apesar da solubilidade do complexo em água ser extremamente baixa, uma dada amostra de  $[\text{Cr}(\text{ala})_3]$  foi completamente dissolvida, por preparação de sucessivas soluções saturadas, seguidas de separação das duas fases. Os espectros de DC, e/ou de UV/Vis, das soluções saturadas, foram registados imediatamente após filtração de cada porção de solução (Ver Capítulo 7 - Secção C).

Nos espectros de cada uma das referidas alíquotas, pôde constatar-se o seguinte:

- para tempos iguais de agitação, correspondentes a cada extracção, todos os espectros de DC são idênticos, o que pressupõe a mesma quantidade de sólido dissolvido (soluções saturadas);
- se se aumentar o tempo de agitação durante a extracção, a intensidade da banda de absorção diminui: ligeiramente, se se passar de 0.5 para 2 horas, de modo drástico, se a agitação se mantiver cerca de 12 horas (ou mais);
- a actividade óptica das soluções aquosas do composto desaparece completamente ao fim de cerca de um dia.

Simultaneamente com o decréscimo de actividade óptica, os espectros de UV/Vis também sofrem alterações (Figura 5.2), com diminuição da intensidade das bandas e deslocamento dos seus máximos para maiores comprimentos de onda.

O desaparecimento da actividade óptica destas soluções indica a ausência de espécie(s) com características quirais. Esta modificação pode resultar de reacções de substituição dos ligandos quirais (aminoácidos) por ligandos não quirais ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ). A evolução das características espectroscópicas destas soluções, com deslocamento dos máximos de absorvância para comprimentos de onda mais elevados, leva a sustentar a

hipótese de que as novas espécies correspondem a formas em que algumas das ligações Cr-N foram substituídas por ligações Cr-O, a que correspondem campos de ligandos mais fracos.

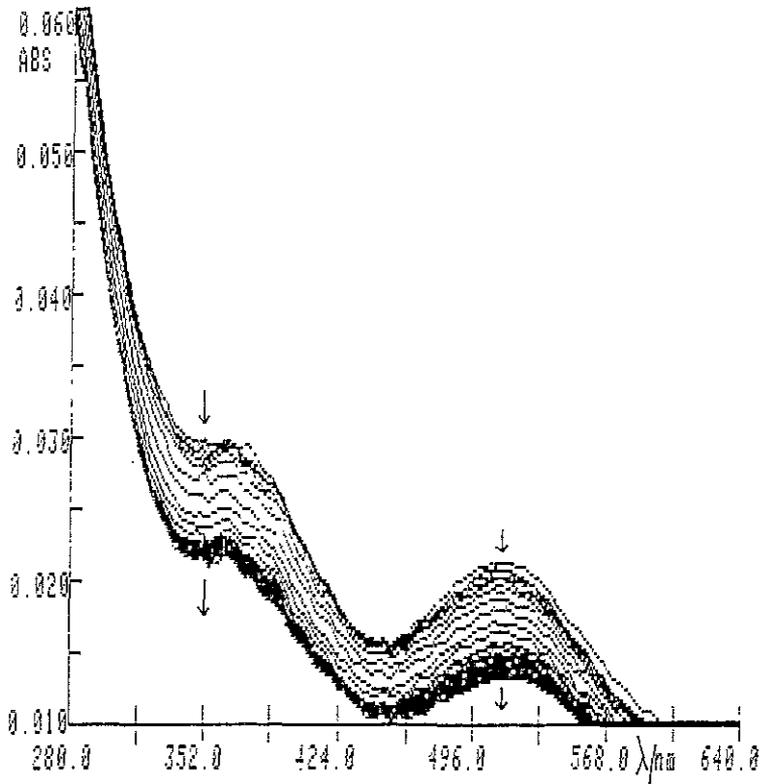


Figura 5.2 - Evolução, com o tempo, das características espectroscópicas (UV/Vis) de uma solução aquosa de  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$

Foi também verificado que a velocidade de diminuição da actividade óptica destas soluções era dependente da temperatura (Figura 5.3), aumentando com esta.

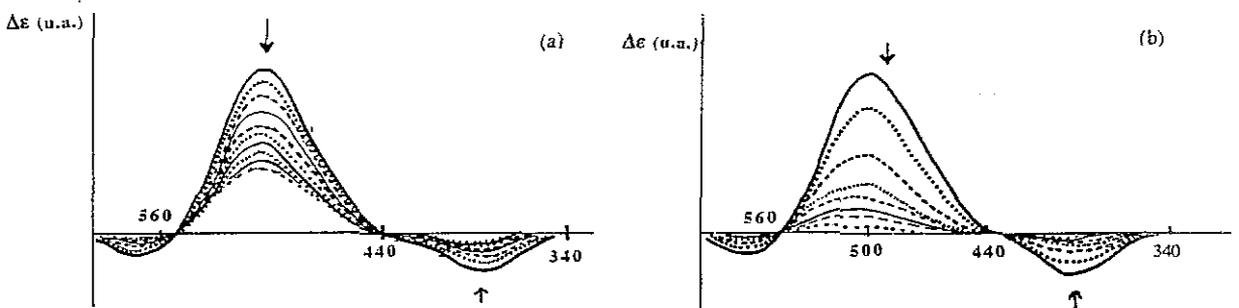


Figura 5.3 - Evolução da actividade óptica (DC) de soluções saturadas de  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$ ; (a) temperatura ambiente ( $\approx 24^\circ\text{C}$ ) (intervalos de tempo variados); (b)  $32^\circ\text{C}$  (ciclos de 30 minutos); tempo total  $\approx 220$  minutos; u.a. = unidades arbitrárias

### 5.3.4.2 - Comportamento em soluções ácidas

Ao contrário do que acontece em água, o composto é muito solúvel em soluções de ácidos. Porém, nestas soluções, observam-se alterações drásticas, notórias sobretudo por dicroísmo circular. Embora inicialmente, os espectros de DC se assemelhem aos obtidos em solução aquosa, evoluem rapidamente no sentido de uma inversão completa dos sinais das bandas, acabando, também neste caso, pela sua actividade óptica desaparecer ao fim de algum tempo (Figura 5.4-a). Por isso, na Tabela 5.2, os dados dos espectros de DC deste composto em soluções ácidas referem-se ao momento em que, após dissolução completa da amostra, esses espectros foram registados. Algumas das contradições nos resultados de DC encontradas na literatura [157,175], no que se refere à intensidade e ao sinal da banda a cerca de 510-530 nm, podem, assim, ser explicadas se se tiverem presentes estas modificações espectrais com o tempo. Alguns autores tinham já comentado esta instabilidade [157,187], em especial porque ela se traduz em comportamentos substancialmente diferentes entre as soluções destes compostos e as de compostos semelhantes de cobalto(III).

A hidrólise da(s) espécie(s) presente(s) em solução, muito mais acentuada em soluções fortemente ácidas, e a evolução espectral observada por UV/Vis, em que há inversão da intensidade relativa das duas bandas na região visível com deslocamento dos seus máximos de absorção para comprimentos de onda mais elevados (Figura 5.4-b), é, mais uma vez, posta como explicação para as alterações observadas, podendo pressupôr-se, de facto, reacções de substituição com mudanças nas esferas de coordenação iniciais.

O aspecto mais inesperado no processo de hidrólise ácida deste composto é, no entanto, o seu carácter reversível. Se, após acidificação de uma solução de  $[\text{Cr}(\text{ala})_3]$ , o pH for ajustado de novo ao seu valor inicial, por adição de solução alcalina, o espectro de DC, por exemplo, retoma as suas características iniciais. Este fenómeno é invulgar em compostos de coordenação de crómio(III) deste tipo. O facto da reacção ocorrer

num intervalo de tempo de minutos sugere uma "genuína" reacção química, de abertura e fecho de anel para este caso, e não a formação de, por exemplo, um complexo de esfera externa [190].

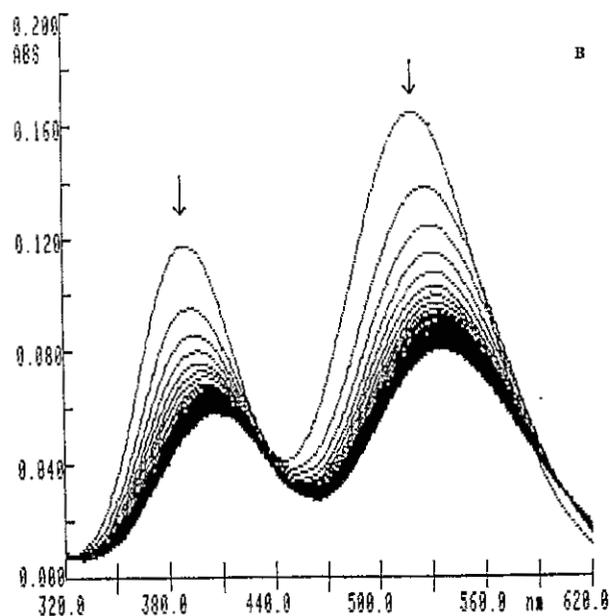
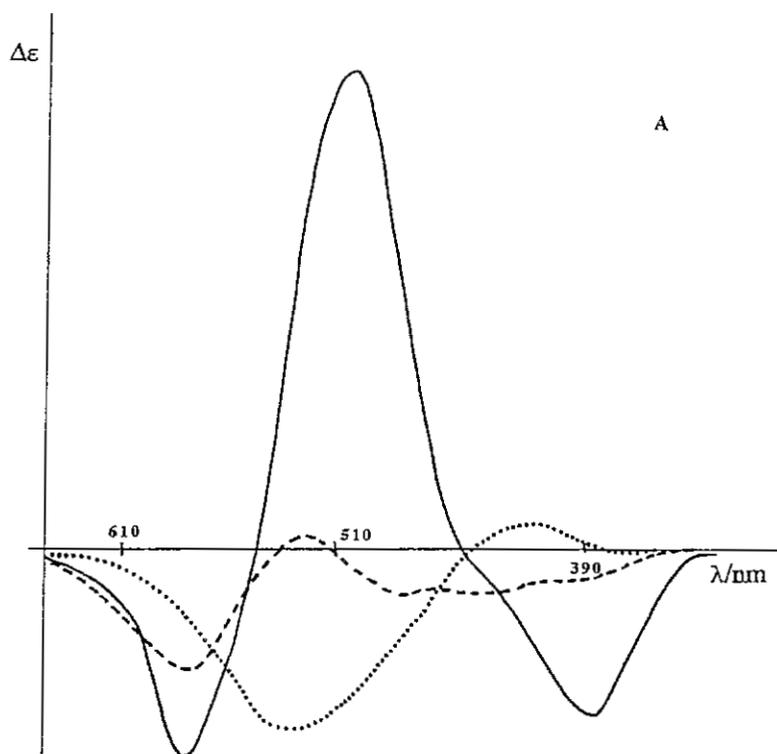


Figura 5.4- Alterações espectrais em soluções ácidas de  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$ ; (A)- DC; i)-espectro obtido imediatamente após a dissolução (—); ii)-ao fim de 10 min (- - -); iii)-ao fim de 35 min (•••);  $\Delta\epsilon$  em unidades arbitrárias; (B)- UV/Vis; ciclos de 2 minutos

### 5.3.4.3 - Comportamento num solvente não aquoso (DMSO)

Em DMSO, os espectros de DC têm características um pouco diferentes dos obtidos nas soluções anteriores (o complexo é mais solúvel neste solvente do que em água), embora a posição e o sinal das bandas não apresente alterações significativas, sugerindo a presença do mesmo tipo de espécies complexas. Mas, contrariamente ao observado nos outros solventes estudados, as características quirais da solução mantêm-se estáveis, mesmo ao fim de alguns dias (Figura 5.5). Se forem usadas, como solvente, misturas de H<sub>2</sub>O / DMSO, quanto maior a proporção de H<sub>2</sub>O na mistura, mais rapidamente o espectro sofre alterações e menor a intensidade das bandas, o que está em concordância com o comportamento deste composto em solução aquosa.

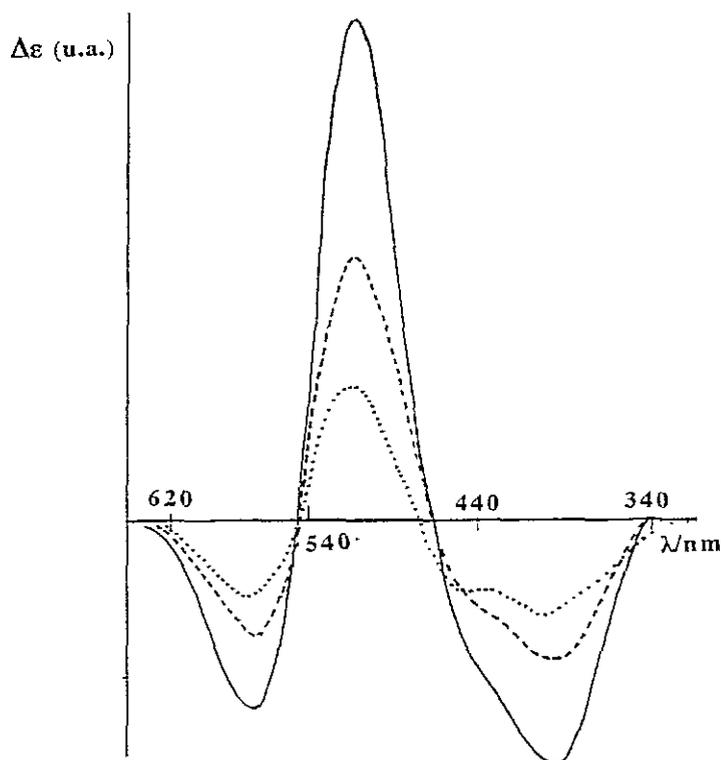


Figura 5.5 - Estabilidade de uma solução de  $[Cr(L-ala)_3]$  em DMSO: espectro imediato (—); ao fim de 30 horas (- - -); c)-ao fim de 6 dias (\*\*); u.a.=unidades arbitrárias

## 5.4 - Síntese, separação e caracterização de isômeros ópticos do complexo $[Co(L-ala)_3]$

### 5.4.1 - Introdução

Com o objectivo de explicar, atribuir e justificar, uma configuração absoluta ao

composto de Cr(III) com L-alanina,  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$ , procurou-se relacionar as propriedades espectroscópicas destes compostos com as de compostos análogos de cobalto(III). Assim, foram sintetizados e separados os quatro isómeros ópticos do complexo análogo de Co(III),  $[\text{Co}(\text{L-ala})_3]$ , procedendo-se à respectiva caracterização espectroscópica e estereoquímica.

A síntese e a separação dos isómeros ópticos de  $[\text{Co}(\text{L-ala})_3]$  está publicada desde 1961 [191], embora a preparação de três deles, os dois isómeros faciais,  $\beta$ , de cor vermelha e um dos meridionais,  $\alpha$ , de cor violeta, já apareça referenciada [188] em 1909. Neste trabalho, a síntese e a separação dos isómeros  $\text{trans}(+)$ ,  $\text{trans}(-)$  e  $\text{cis}(-)$  foi efectuada usando o método descrito por Denning *et al* [173]. O isómero  $\text{cis}(+)$  foi sintetizado com base no método de Mori *et al* [191]. Os detalhes experimentais deste trabalho estão descritos no Capítulo 7 -Secção C.

#### 5.4.2 - Identificação dos isómeros de $[\text{Co}(\text{L-ala})_3]$

Os quatro isómeros ópticos obtidos foram identificados por comparação dos respectivos espectros electrónicos e de dicroísmo circular com os anteriormente publicados [192]. Este último tipo de espectrofotometria é particularmente vantajoso, pois permite, também, testar o grau de pureza de cada um dos isómeros. Os do tipo  $\alpha$  ( $\text{trans}(+)$  e  $\text{trans}(-)$ ), assim como o isómero  $\text{cis}(-)$  do tipo  $\beta$ , apresentaram, quer em solução aquosa quer em solução ácida, espectros de UV/Vis e de DC concordantes com a literatura [192]. Para o isómero  $\beta$ - $\text{cis}(+)$ , no entanto, apenas se pôde fazer essa comparação em soluções ácidas, já que tem sido considerado como totalmente insolúvel em água. Apesar disso, foi possível obter espectros de UV/Vis e de DC deste isómero de  $[\text{Co}(\text{L-ala})_3]$ , em água, tal como já se tinha verificado para o complexo  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$ , o que se deve, provavelmente, à possibilidade de se dispôr, actualmente, de equipamento de DC com maior sensibilidade. Tal como se verifica para os outros isómeros deste composto, o "padrão" do espectro obtido em água é muito semelhante ao dos espectros obtidos em ácido (Figura 5.6), embora, devido à muito menor

intensidade das bandas naquele solvente, as que aparecem a menores comprimentos de onda sejam praticamente "invisíveis" e não tenham, por isso, correspondência nas dos espectros de soluções ácidas.

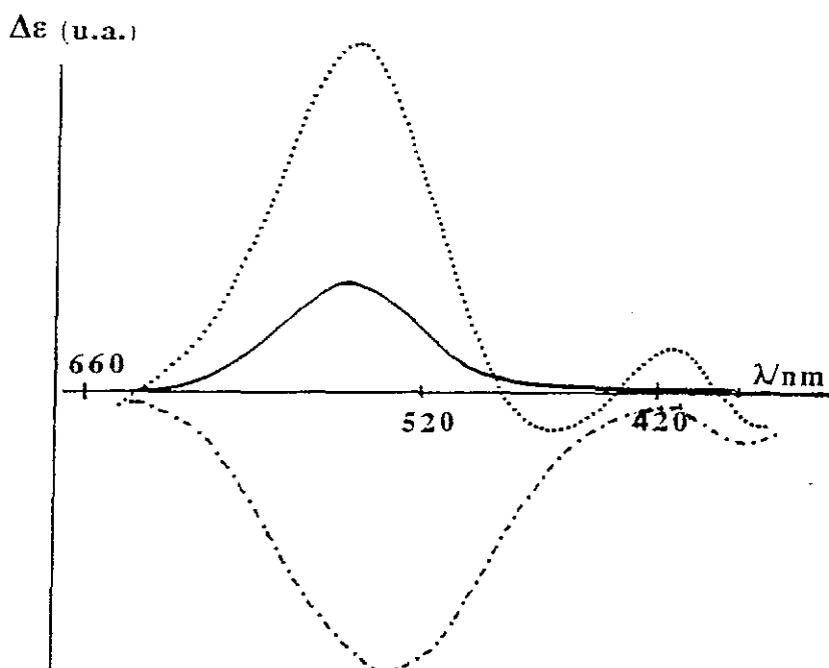


Figura 5.6 - Espectros de DC de  $\Delta$ -cis(+)-[Co(L-ala)<sub>3</sub>]: H<sub>2</sub>O (—); HClO<sub>4</sub> 20% (···) e no estado sólido, em pastilha de KBr (---); u.a. = unidades arbitrárias

Ao contrário do composto análogo de Cr(III), o comportamento em solução deste isômero de Co(III) caracteriza-se pela estabilidade, tanto em solução aquosa como em ácido, mantendo as mesmas características e, nomeadamente, a actividade óptica, após alguns dias em solução, o que, aliás, também se verifica para os outros isômeros deste complexo.

A atribuição da configuração absoluta aos quatro isômeros ópticos do composto [Co(L-ala)<sub>3</sub>], inicialmente feita apenas com base no sinal da banda de menor energia do respectivo espectro de DC, foi posteriormente confirmada quando a estrutura cristalina de um dos isômeros deste composto, o  $\Delta$ -(+)- $\alpha$ -[Co(L-ala)<sub>3</sub>], foi determinada por difracção de Raios-X de cristal único [193].

## 5.5 - Atribuição de uma configuração absoluta ao isómero do complexo

### [Cr(L-ala)<sub>3</sub>] preparado neste trabalho

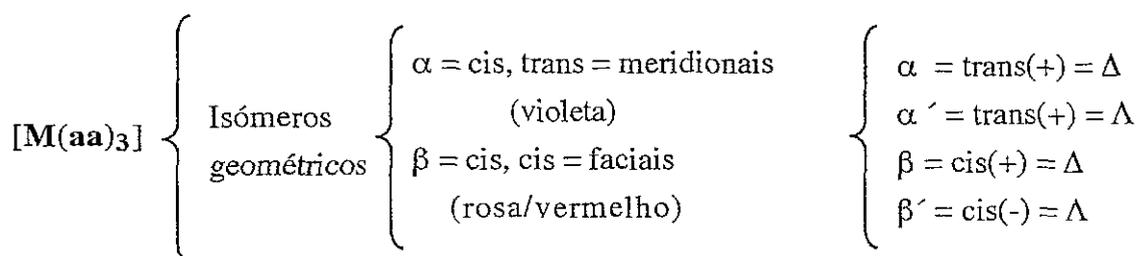
A atribuição de configurações absolutas com base em características espectroscópicas, especialmente de DC, está bem documentada na literatura para alguns grupos de compostos de Co(III), nomeadamente para os  $\alpha$ -aminocarboxilatos deste metal [173,175], mas para complexos de Cr(III) do mesmo tipo, o assunto não foi ainda convenientemente explorado. Enquanto que no caso do cobalto(III), têm sido isolados todos os diastereoisómeros possíveis, no caso dos complexos de Cr(III) análogos, apenas se tem obtido um único isómero, o que sugere que a formação destes complexos é estereoespecífica [157,186]. Deste modo, o nosso objectivo foi identificar qual(is) o(s) isómero(s) que se obtêm na preparação do complexo [Cr(L-ala)<sub>3</sub>] e qual(is) a(s) configuração(ões) absoluta(s) que lhe(s) pode(m) ser atribuída(s).

A predominância da cada isómero resultante da síntese de [Cr(L-ala)<sub>3</sub>], tem a ver com a respectiva solubilidade, num dado solvente. A quase total insolubilidade em água, comum ao(s) produto(s) obtido(s) destas sínteses, Tabela 5.1, parece, à partida, favorecer a formação, ou, pelo menos, a predominância de um único tipo de isómero, de cor rosa, o isómero facial  $\Lambda$ - $\beta$ (+)-[Cr(L-ala)<sub>3</sub>], como veremos mais adiante (Secção 5.5.2). Uma vez que os isómeros mais insolúveis do composto semelhante de Co(III), são os de estrutura facial e, em particular, o  $\Lambda$ - $\beta$ (+)-[Co(ala)<sub>3</sub>] e sendo este último isómero isomorfo do composto de Cr(III) aqui preparado (por comparação entre difractogramas de Raios-X de pó, que também obtivemos), ambos deverão, em princípio, apresentar estruturas análogas [157]. A insolubilidade deste tipo de isómeros pode ser atribuída a forças intermoleculares particularmente fortes, as quais dependem directamente da sua estrutura. Há, por exemplo, estudos com compostos do mesmo tipo, com aminoácidos possuidores de grupos metilo em posições diferentes, para os quais, à medida que as interacções através de ligações de H se tornam menos acentuadas, a respectiva solubilidade aumenta [184].

A identificação de isómeros de compostos de coordenação de Cr(III) é feita, em geral, por comparação das respectivas características espectroscópicas (de DC, em particular), com as de compostos de Co(III) análogos. Devido à simetria específica de cada tipo de isómero, alguns dos aspectos dos espectros electrónicos, de dicroísmo circular ou de infravermelho, permitem, pelo menos em primeira aproximação, distinguir entre si os isómeros dos complexos com aminoácidos bidentados do tipo trisquelato [157,184-186]. Neste trabalho, foi possível fundamentar ainda melhor a atribuição da estrutura do isómero de  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$ , por se dispôr de informação de difracção de Raios-X, que possibilitou uma discussão aprofundada da relação entre a simetria e as propriedades ópticas.

### 5.5.1 - Isomerismo em complexos octaédricos do tipo trisquelato: breves considerações de simetria

Quando três moléculas de um aminoácido se coordenam a um catião metálico, dando origem a um complexo trisquelato de geometria octaédrica, é possível obter dois tipos de isómeros geométricos:  $\alpha$  (cis,trans) e  $\beta$  (cis,cis), podendo cada um deles, por sua vez, apresentar-se sob a forma de duas configurações absolutas opostas ( $\Lambda$  ou  $\Delta$ ) (Esquema 5.1).



Esquema 5.1 - Designações comuns, equivalentes, para os quatro isómeros ópticos dos complexos, do tipo trisquelato,  $[\text{M}(\text{aa})_3]$ ; M = Co(III) ou Cr(III); aa =  $\alpha$ -aminoácido bidentado; os símbolos (+) e (-) referem-se ao sinal da banda dominante, na região visível, em DC [173,185]; as cores dos diferentes isómeros são semelhantes para os complexos dos dois metais

Os isómeros do tipo facial,  $\beta$ , cis(+) e cis(-), têm três eixos de rotação ternários, pertencendo, portanto, ao grupo de simetria  $C_3$ , enquanto que os do tipo  $\alpha$  não possuem eixos de simetria, sendo, por isso, do grupo  $C_1$ . Por exemplo, para complexos de

Co(III), de spin baixo,  $d^6$ , com simetria octaédrica, e, de modo semelhante, para complexos de Cr(III) análogos,  $d^3$ , as transições electrónicas, permitidas por spin, "desdobram-se" se a simetria baixar para  $C_3$  ou, ainda mais, para  $C_1$  (Tabela 5.3).

| Simetria | Transições permitidas                              |
|----------|--|
| $O_h$    | ${}^1A_{1g} \rightarrow {}^1T_{1g} + {}^1T_{2g}^*$ |
| $C_3$    | ${}^1A \rightarrow {}^1A + {}^1E$                  |
| $C_1$    | ${}^1A \rightarrow {}^1A + {}^1A + {}^1A$          |

Tabela 5.3 - Transições permitidas por spin, para complexos do tipo  $d^6$ , ou analogamente para complexos do tipo  $d^3$ ; \*cada uma das transições do estado fundamental para estados triplamente degenerados, em  $O_h$ , dá origem a...em  $C_3$  e a...em  $C_1$

### 5.5.2 - Relação entre as características espectroscópicas e a configuração absoluta dos isómeros de complexos de Cr(III) e de Co(III) do tipo trisquelato, com aminoácidos bidentados

Como os espectros electrónicos dos isómeros do tipo  $\alpha$ , meridional, apresentam um desdobramento maior nas bandas de menor energia, em relação aos isómeros tipo  $\beta$ , faciais, é possível, em princípio, atribuir uma determinada estrutura ao composto, pelo tipo de espectro apresentado. Por exemplo, para os compostos de Cr(III) com L-alanina que foram preparados neste trabalho, a forma das bandas, nos espectros de DC, é a mesma que a apresentada pelos complexos análogos de Co(III) com estrutura  $\beta$ -facial, embora os máximos de absorção, no primeiro caso, estejam deslocados para comprimentos de onda mais elevados [158,184,186].

Por espectrofotometria de IV, é também possível distinguir os isómeros faciais dos meridionais. Nos espectros dos isómeros de cobalto(III), por exemplo, há diferenças, essencialmente, nas bandas de alongamento do grupo  $NH_2$ , na região 3400-3180  $cm^{-1}$  e na banda de torção do mesmo grupo, entre 1600 e 1650  $cm^{-1}$ , que se

apresenta desdobrada nos isómeros de tipo facial [184,186,192]. Comparando os espectros de IV das várias amostras de  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$ , Tabela 5.1, com os dos diferentes isómeros do complexo análogo de cobalto(III), apenas se observam semelhanças com os do isómero facial  $\beta(+)$  = cis(+), fazendo, por isso, prevêr uma configuração do mesmo tipo.

Normalmente, a atribuição de configurações absolutas a complexos de Cr(III) é feita com base na semelhança entre os espectros de DC destes compostos e dos compostos análogos de Co(III) e/ou ainda, por comparação com espectros de classes de compostos cujas configurações absolutas foram estabelecidas por Raios-X [157,194]. Existe uma regra empírica que relaciona, em DC, o sinal da componente da banda de menor energia na região visível, com a configuração absoluta desse isómero [157,175]. Segundo o princípio de que duas moléculas, opticamente activas, com o mesmo tipo de ligandos e com estruturas semelhantes, têm a mesma configuração absoluta se apresentarem efeitos Cotton do mesmo sinal na zona da transição electrónica de menor energia comum a ambas as moléculas, é-lhes atribuída a mesma configuração absoluta [194-196]. Não havendo desvios significativos da simetria  $C_3$ , para complexos de Co(III) e de Cr(III) com ligandos análogos, esperam-se, em DC, duas bandas de sinais opostos, na zona da 1ª transição permitida por spin, se as respectivas configurações absolutas forem idênticas [175,194,197]. Para o isómero  $\beta(+)$  do complexo de Co(III), em ácido (Ver Figura 5.6), são observadas duas das quatro transições permitidas por momento magnético para a 1ª banda (Tabela 5.3), mas para a 2ª apenas se nota uma delas. No espectro em água é visível só uma única banda em todo o espectro devido, provavelmente, a razões de solubilidade. Por outro lado, se para a 1ª banda, de menor energia, se verificarem as condições da Tabela 5.4, isto é, uma banda de sinal (-) seguida de uma banda positiva a configuração absoluta deste isómero é do tipo  $\Lambda$ . E se a ordem de energia dos termos, sinal das bandas, for inversa à anterior, a configuração será do tipo  $\Delta$  <sup>51</sup>.

---

<sup>51</sup>Para a simetria  $C_3$  há um desdobramento trigonal do estado T excitado nos estados E e A. O DC

| Transição                 | Características da transição             | Sinal da transição | $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ |
|---------------------------|--|--------------------|----------------------------------|
| ${}^1A \rightarrow {}^1E$ | $\perp$ ao eixo de simetria ternário     | (+)                | $\approx 550$                    |
| ${}^1A \rightarrow {}^1A$ | $\parallel$ ao eixo de simetria ternário | (-)                | $\approx 485$                    |

Tabela 5.4 - Sinais dos efeitos Cotton (bandas em DC) para cada transição permitida em complexos de Co(III) do tipo trisquelato

Admitindo que a ordenação dos referidos níveis, no complexo  $[\text{Co}(\text{L-ala})_3]$ , é a mesma do complexo  $\Lambda\text{-}(+)\text{-}[\text{Cr}(\text{en})_3]^+$ , para o qual a ordem e energia dos termos foi identificada como  $A > E$ , os isómeros  $\beta(+)$  deste composto de Co(III) têm configuração  $\Lambda$  e os  $\beta(-)$  configuração  $\Delta$ , de acordo com os sinais das bandas dos respectivos espectros de DC (Figura 5.6) [157,173,198]. No caso dos espectros dos compostos de Cr(III) é necessário um outro tipo de explicação, como veremos a seguir.

A aplicação da regra atrás referida tem tido resultados confirmados num elevado número de complexos de Co(III) e de Cr(III), do tipo trisquelato, como, por exemplo, nas tris(diaminas) e tris(oxalatos) de ambos os metais [199] e ainda nos  $\beta$ -dicetonatos de Cr(III) [175]. No entanto, há exceções, sobretudo quando é aplicada comparando, em simultâneo, espectros em solução e no estado sólido. Nestes últimos, em geral, constata-se o domínio de uma banda intensa, de sinal negativo, na região de menor energia, para praticamente todos os isómeros estudados de Co(III) com configuração  $\Lambda$ , tal como para o complexo de Cr(III) com L-alanina sintetizado, que é isomorfo do isómero  $\Lambda\text{-}\beta(+)\text{-}[\text{Co}(\text{ala})_3]$ . Embora variados factores possam contribuir para estas anomalias espectrais, em geral, elas são atribuídas, quase exclusivamente, a interações intermoleculares [157,200]. Segundo Gillard *et al* [157], a não aplicação a compostos de

---

-servado na região da 1ª banda, tem origem nas duas transições do estado fundamental para os estados E e A. Quando se observa apenas uma banda (um sinal) na referida região, é sempre assumido que ela é proveniente de uma transição  $A \rightarrow E$  [197]

Cr(III) da regra atrás referida pode dever-se a:

i) em solução - aos solventes ácidos utilizados, que podem levar ao aparecimento em solução de outras espécies de simetria mais baixa, às quais as regras de selecção do grupo  $C_3$  não são aplicáveis, não podendo as respectivas configurações absolutas ser deduzidas desta maneira.

ii) no estado sólido - a alterações nas energias relativas dos níveis A e E no isómero monomérico, isto é, o espectro de DC poderá ser o do cristal em vez do da molécula. Neste estado físico são possíveis unidades não monoméricas, resultantes da associação molecular por ligações de H ou por ligações tipo ponte.

A amplitude das bandas de DC e, por isso, o sinal da banda dominante na zona de menor energia, são dependentes do solvente. Para o isómero  $\Lambda$ - $\beta$ (+)-[Co(ala)<sub>3</sub>], em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50% o sinal é positivo e no estado sólido é negativo. No isómero  $\Delta$ - $\beta$ (-)-[Co(ala)<sub>3</sub>] acontece o inverso, assim como no isómero  $\Lambda$ - $\beta$ (+)-[Rh(ala)<sub>3</sub>], insolúvel em água, para o qual são diferentes todos os espectros de DC no estado sólido, em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e em CF<sub>3</sub>COOH [157,201]. Os vários solventes podem causar solvatações dissimétricas, originando, por exemplo, distorções nos átomos dadores ou nas ligações de H. A solvatação, nalguns casos, pode mesmo causar inversão de sinal [173,202]. Os espectros no estado sólido poderão, assim, ser aqueles que fornecem uma base de interpretação da estrutura dos compostos mais aproximada da realidade [198]. Deste modo, a relação "regra simples - actividade óptica - configuração absoluta" pode não ser sempre aplicável.

A literatura é praticamente unânime em afirmar que apenas se formam complexos de Cr(III) com  $\alpha$ -aminoácidos, do tipo trisquelato, com estrutura facial [157,175,184,185]. A única estrutura de tipo meridional, proposta por Israilly [158,203] para o complexo de Cr(III) com glicina, o *mer*-[Cr(gly)<sub>3</sub>], foi posteriormente identificada [157] como sendo afinal o dímero [Cr<sub>2</sub>(gly)<sub>4</sub>(OH)<sub>2</sub>]. Mais recentemente, Hoggard *et al* [204] afirmaram ter obtido o isómero  $\alpha$  do complexo [Cr(gly)<sub>3</sub>], baseando-se em

características espectroscópicas, embora essa estrutura não tenha sido confirmada cristalograficamente.

Considere-se, agora, o complexo de Cr(III) com L-alanina. Embora a maioria dos autores tenha atribuído a este complexo, por analogia com o isómero  $\Lambda$ - $\beta$ (+)-[Co(ala)<sub>3</sub>], a configuração absoluta  $\Lambda$  (sinal (+) da banda dominante no Vis) [157,184,185], Gillard *et al* [157] constataram contradições entre os espectros no estado sólido e em ácido. Minor *et al* [175], por sua vez, também referiram anomalias nos espectros deste composto, em água e em ácido, mas contornaram o problema admitindo a existência de dois isômeros distintos, um solúvel em água e outro apenas em ácido, com sinais da banda dominante em DC, (+) e (-), respectivamente. Na tentativa de identificarem aqueles dois isômeros, compararam os seus espectros de Raios-X de pó com os dos quatro isômeros de [Co(L-ala)<sub>3</sub>], verificando que o do isómero  $\Lambda$ - $\beta$ (+) era semelhante ao do isómero de Cr(III) insolúvel em água, mas que o difractograma do isómero solúvel não apresentava qualquer semelhança com nenhum dos de Co(III). Partindo do princípio de que compostos isomorfos têm a mesma configuração absoluta, atribuíram ao isómero de Cr(III) insolúvel em água, a configuração  $\Lambda$ - $\beta$ (+) e ao solúvel, com sinal (-) dominante, uma quiralidade oposta ao primeiro, portanto uma configuração  $\Delta$ , embora o seu espectro não fosse semelhante a qualquer dos dos isômeros de Co(III).

Comparando os resultados anteriores com os obtidos neste trabalho para os compostos de Cr(III) com L-alanina sintetizados por vários métodos (Tabela 5.2), pensamos que, no caso de Gillard *et al* [157], as contradições espectrais encontradas advêm quer de não se conhecer o espectro do composto em solução aquosa, por, até essa data, ele ser considerado totalmente insolúvel nesse solvente, quer pelo espectro em ácido ter, muito provavelmente, sido registrado algum tempo após a dissolução do complexo, tendo, portanto, sido negligenciada a sua hidrólise rápida em ácido (Figura 5.4). Quanto a Minor *et al* [175], os isômeros "insolúvel" e "solúvel" parecem-nos ser o mesmo, este último eventualmente contaminado com outra espécie diferente que

justifique as diferenças encontradas nos difractogramas. Os espectros de DC, tanto do isómero "solúvel" em água como do "insolúvel" em ácido, são concordantes com os dos espectros, nos dois solventes, dos compostos que preparámos, tendo, além disso, sido também constatada a instabilidade destas espécies em solução (Secção 5.3.4). Estes factos apontam, pois, para que os compostos por nós preparados sejam idênticos aos obtidos por estes autores [157,175].

Contudo, mantém-se a contradição entre o sinal da banda a menor energia e a configuração absoluta do complexo. A identificação das transições de menor energia em trisquelatos de Cr(III), isto é, a ordenação da energia dos termos A e E, tem sido alvo de algum debate [194,205], sabendo-se, por exemplo, que a ordenação daqueles termos é diferente (inversa) nos complexos de Cr(III)  $[\text{Cr}(\text{en})_3]^{3+}$  e  $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$ . Consequentemente, o sinal da componente E que está, em princípio, relacionado com a configuração absoluta do complexo tem de ser determinado com cuidado [157,194]. Como, neste caso, um dos isómeros de Co(III) é isomorfo do complexo de Cr(III), pode sugerir-se que ambos tenham configuração  $\Lambda$ - $\beta(+)$ , tanto mais que os respectivos espectros de DC no estado sólido apresentam o mesmo padrão. Sendo assim, os espectros de DC do complexo de Cr(III) são consistentes com uma ordenação dos termos A seguida de E, tal como se verifica no  $\Lambda$ -tris(oxalato)cromato(III) [190,194,206,207], o que explica a constância do "padrão"  $(-)/(+)/(-)$  nos dois solventes e no estado sólido.

## **5.6 - Síntese e caracterização de complexos de Cr(III) com L-leucina, L-isoleucina e L-valina**

### **5.6.1 - Introdução**

O estudo efectuado com o complexo  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$  foi estendido a compostos de Cr(III) com outros aminoácidos do mesmo tipo. Para tal foram sintetizados compostos de Cr(III) com L-valina, L-leucina e L-isoleucina.

Pretendeu-se, como primeiro objectivo, otimizar as condições de síntese daqueles compostos, já que na literatura não existe uniformidade nem quanto ao método de preparação, nem quanto à composição química e à estrutura dos sólidos assim preparados. Destas sínteses, em condições experimentais aparentemente muito semelhantes, podem obter-se diferentes tipos de complexos, tais como trisquelatos, bisquelatos mistos ou dímeros, além de misturas com composições variadas, difíceis de separar e de purificar devido à sua marcada insolubilidade [184-186]. A respectiva caracterização estrutural pode tornar-se, por isso, bastante problemática, já que, associado à probabilidade de formação de misturas e à falta de cristais adequados para a determinação de estruturas cristalinas por Raios-X de cristal único, há ainda a ter em conta o paramagnetismo do Cr(III) que torna impossível a obtenção de informação estrutural por técnicas de RMN. A abordagem usual para estes casos traduz-se, normalmente, na identificação de aspectos estruturais com base em resultados de análise elementar destes compostos e na comparação de dados espectroscópicos, nomeadamente de DC, com dados de compostos de Cr(III) conhecidos ou de complexos análogos de Co(III), os quais, de um modo geral, são mais fáceis de preparar e de isolar [157,186,202]. Uma vez que, na sua quase totalidade, estes compostos apresentam actividade óptica, afigurou-se-nos importante tentar relacionar e/ou racionalizar as suas características espectroscópicas de DC com prováveis estruturas. A determinação da estrutura cristalina de um complexo novo de Cr(III) com L-valina que, de algum modo, poderia ter ajudado a atingir esses objectivos, foi infrutífera perante o conjunto de resultados obtidos.

Os problemas referidos levaram-nos a aplicar ao estudo destes compostos, com sucesso e pela primeira vez, a Espectrometria de Massa e, em particular, a técnica de ionização por bombardeamento com átomos rápidos (FAB). A aplicação desta técnica permitiu identificar três novas estruturas e confirmar todas as que tinham sido propostas para compostos resultantes das sínteses de Cr(III) com L-valina, L-leucina e L-isoleucina (trisquelatos), incluindo a do novo complexo de L-valina, cuja estrutura foi,

entretanto, determinada, assim como também a estrutura do complexo com L-alanina  $[\text{Cr}(\text{L-ala})]_3$ , discutida nas Secções anteriores.

### 5.6.2 - Preparação e caracterização dos compostos

A síntese de complexos de Cr(III) com aminoácidos do tipo  $\alpha$ -aminocarboxílico está descrita na literatura por vários grupos de investigadores [184-186]. Oki *et al.*, em particular [184,185], sintetizaram, de modo sistemático, um grande número destes compostos e tentaram relacionar as características espectroscópicas / estruturais dos produtos obtidos com o método de preparação (reacção no estado sólido ou em solução), ou com o solvente utilizado na recristalização [185], o que lhes permitiu apresentar previsões quanto à obtenção de complexos do tipo tris(bidentado) ou complexos mistos, isto é, com alguns dos ligandos actuando de forma bidentada e outros como monodentados, além de algumas moléculas do solvente poderem também estar coordenadas.

Foram preparados alguns complexos de Cr(III) com os  $\alpha$ -aminoácidos referidos pelo processo descrito na Secção 5.2 (com L-valina e L-isoleucina) e também por alguns dos métodos descritos na literatura (com L-leucina e L-isoleucina) (Ver Capítulo 7 - Secção C). Todavia, apesar das tentativas de reproduzir estas sínteses em condições experimentais aparentemente idênticas, a preparação de sólidos com características reprodutíveis e, sobretudo, sob a forma cristalina, apresentou-se bastante difícil. Exceptuou-se o composto obtido de uma das sínteses com L-valina, um sólido cristalino, cuja estrutura foi posteriormente estabelecida. O comportamento em solução, de muitos destes complexos, os quais, na maioria dos casos, podem sofrer reacções de decomposição (hidrólise) com relativa facilidade, pode ser a causa de algumas das discrepâncias encontradas nos produtos resultantes. A título de exemplo, a Tabela 5.5 demonstra, em relação aos compostos de Cr(III) com L-valina, a variedade de produtos que têm sido propostos pelos vários autores, em condições experimentais semelhantes.

| Condições experimentais |  |                          | Características dos compostos preparados |   |                  |
|-------------------------|--|--------------------------|--|---|------------------|
| Cr:<br>Valina           | Reagentes de partida   | Método de preparação     | Cor                                      | Fórmula proposta  | Ref <sup>a</sup> |
| 1 : 3                   | L,D-valina<br>[Cr(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>  | Reacção no estado sólido | cristais púrpura<br>claro                | [Cr(OH)(val) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O   | [84]             |
| —                       | L,D-valina<br>[Cr(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>  | em solução               | cristais púrpura                         | [Cr(OH)(val) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O   | "                |
| 1 : 3                   | L-valina<br>[Cr(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>    | em solução               | cristais rosa                            | [Cr(val) <sub>2</sub> (valO-)(NH <sub>3</sub> )] <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O  | "                |
| 1 : 3                   | L-valina<br>[Cr(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>    | em solução               | cristais rosa<br>sólido<br>púrpura       | (+)-[Cr(val) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub> O<br>[Cr(val) <sub>2</sub> (valO-)(NH <sub>3</sub> )] <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O<br>ou [Cr(OH)(val) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | "                |
| 1 : 2                   | L-valina<br>CrCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O                 | em solução               | cristais púrpura<br>claro                | [Cr(L-val) <sub>2</sub> (OH)(H <sub>2</sub> O)] <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O  | [185]            |
| 1 : 4                   | L-valina<br>Cr(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O | em solução               | cristais<br>vermelhos                    | [Cr(L-val) <sub>2</sub> (valOH) <sub>2</sub> ]NO <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O  | Et               |

Tabela 5.5 - Compostos obtidos na síntese de complexos de Cr(III) com L-valina

### 5.6.2.1 - Síntese e caracterização estrutural de um novo complexo de Cr(III) com L-valina

O complexo [Cr(L-valO<sup>-</sup>)<sub>2</sub>(L-valOH)<sub>2</sub>]NO<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O foi sintetizado por um método análogo ao descrito na Secção 5.2, tendo sido isolados cristais de cor vermelha, com forma hexagonal. Os detalhes da preparação e os dados cristalográficos deste composto<sup>5.2</sup> encontram-se descritos no Capítulo 7 - Secção C.

A análise estrutural deste composto demonstrou a fórmula molecular a seguir indicada, [Cr(L-valO<sup>-</sup>)<sub>2</sub>(L-valOH)<sub>2</sub>]NO<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, correspondente à fórmula empírica CrC<sub>20</sub>H<sub>54</sub>N<sub>5</sub>O<sub>17</sub>. Os resultados analíticos referentes às percentagens em C, H, N e H<sub>2</sub>O encontradas, foram os seguintes: (% calculadas para aquela fórmula empírica, entre

<sup>5.2</sup> A estrutura cristalina deste composto foi resolvida pelo Grupo de Cristalografia do Departamento de Química, do Queen Mary and Westfield College da Universidade de Londres [208]

parêntesis): % C 34.40 (34.88); % H 7.65 (7.90); % N 9.91 (10.17); % H<sub>2</sub>O 16.81 (15.70). Na estrutura cristalina foram localizadas apenas seis moléculas de água de cristalização, apesar do conteúdo em água, determinado por termogravimetria, apontar para um valor mais próximo de 6.5 moléculas de água por átomo de crómio.

Na Figura 5.7 mostra-se um diagrama molecular com a estrutura do ião complexo  $[\text{Cr}(\text{L-valO})_2(\text{L-valOH})_2]^+$ , conjuntamente com o esquema usado na numeração dos átomos. A estrutura deste ião caracteriza-se por uma coordenação octaédrica distorcida, com os dois átomos de N dos ligandos bidentados em posição *trans* e os dois átomos de O dos ligandos monodentados em posição *cis*. O plano equatorial é formado pelos átomos de oxigénio O<sub>3</sub> e O<sub>3</sub>' de grupos carboxilato de duas valinas monodentadas, na forma L-valOH, e pelos átomos de oxigénio O<sub>1</sub> e O<sub>1</sub>' de dois grupos carboxilato de duas valinas na forma L-valO<sup>-</sup>, bidentadas. A coordenação 6 é completada pelos átomos de azoto N<sub>1</sub> e N<sub>1</sub>' das duas valinas na forma L-valO<sup>-</sup>. O ângulo entre os dadores axiais é de 165°, mais pequeno do que o valor esperado para uma geometria octaédrica ideal, de 180°. A interacção estereoquímica entre os grupos metilo de uma valina monodentada e de outra na forma bidentada pode ser responsável pelo valor daquele ângulo e pela "não cristalização" de um cristal do tipo trisquelato, devido ao "volume" ocupado pelos grupos metilo no "ambiente" de coordenação do ião metálico. Esta estrutura cristalina invulgar é a primeira conhecida para complexos de Cr(III) com  $\alpha$ -aminoácidos, em que, exclusivamente, ligandos idênticos se encontram coordenados a um mesmo centro metálico, nas formas bidentada e monodentada.

Na Tabela 5.6 apresentam-se as distâncias e os comprimentos de ligação para a esfera de coordenação do crómio. Os comprimentos da ligação Cr-O dos átomos de O relativos tanto aos grupos carboxilato quelantes como aos monodentados são muito semelhantes. Por exemplo, o comprimento das ligações Cr-O<sub>1</sub> e Cr-O<sub>3</sub> é de 1.955(4) e 1.964(4) Å, respectivamente, enquanto que o comprimento da ligação Cr-N<sub>1</sub> é de 2.062(4) Å. Estas distâncias são comparáveis às observadas em complexos de Cr(III) octaédricos com outros aminoácidos e péptidos [148,209-211].

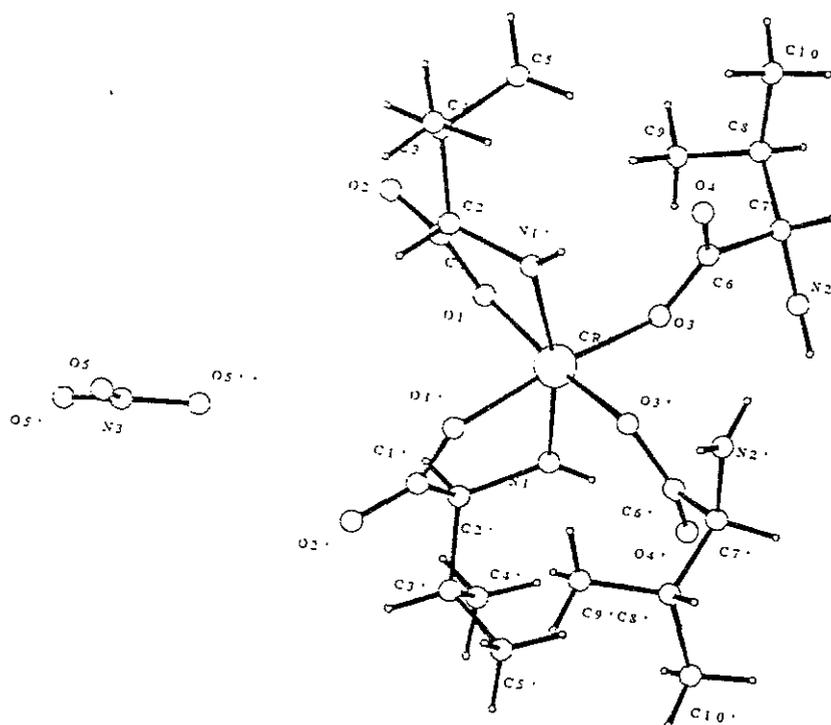


Figura 5.7 - Esquema da estrutura cristalina do complexo  $[Cr(L\text{-valO-})_2(L\text{-valOH})_2]NO_3 \cdot 6H_2O$

| Comprimentos de ligação (Å) |          | Ângulos de ligação (°)                 |          |
|-----------------------------|----------|--|----------|
| Cr - O <sub>1</sub>         | 1.955(4) | O <sub>1</sub> - Cr - O <sub>3</sub>   | 172.6(2) |
| Cr - O <sub>3</sub>         | 1.964(4) | O <sub>1</sub> - Cr - N <sub>1</sub>   | 81.3(2)  |
| Cr - N <sub>1</sub>         | 2.062(4) | O <sub>3</sub> - Cr - N <sub>1</sub>   | 98.5(2)  |
|                             |          | N <sub>1</sub> - Cr - N <sub>1</sub> ' | 165.9(3) |

Tabela 5.6 -  $[Cr(L\text{-valO-})_2(L\text{-valOH})_2]NO_3 \cdot 6H_2O$ : alguns comprimentos e ângulos de ligação, (esfera de coordenação do crómio) [208]

A referida estrutura cristalina pressupõe uma esfera de coordenação com configuração absoluta do tipo  $\Lambda$ , embora os espectros de DC do composto, tanto em solução como no estado sólido, não estejam, de novo, em concordância com este facto. Tal como se observa na Figura 5.8 (Ver também Tabela 5.7, na qual se compilaram as características espectroscópicas deste complexo), tanto nos vários solventes como no estado sólido, os espectros de DC são dominados, na região Vis a maior comprimento de onda, por uma banda de grande intensidade com sinal negativo. Este "padrão" espectral em DC faria prever uma configuração oposta, isto é, do tipo  $\Delta$ , o que pode,

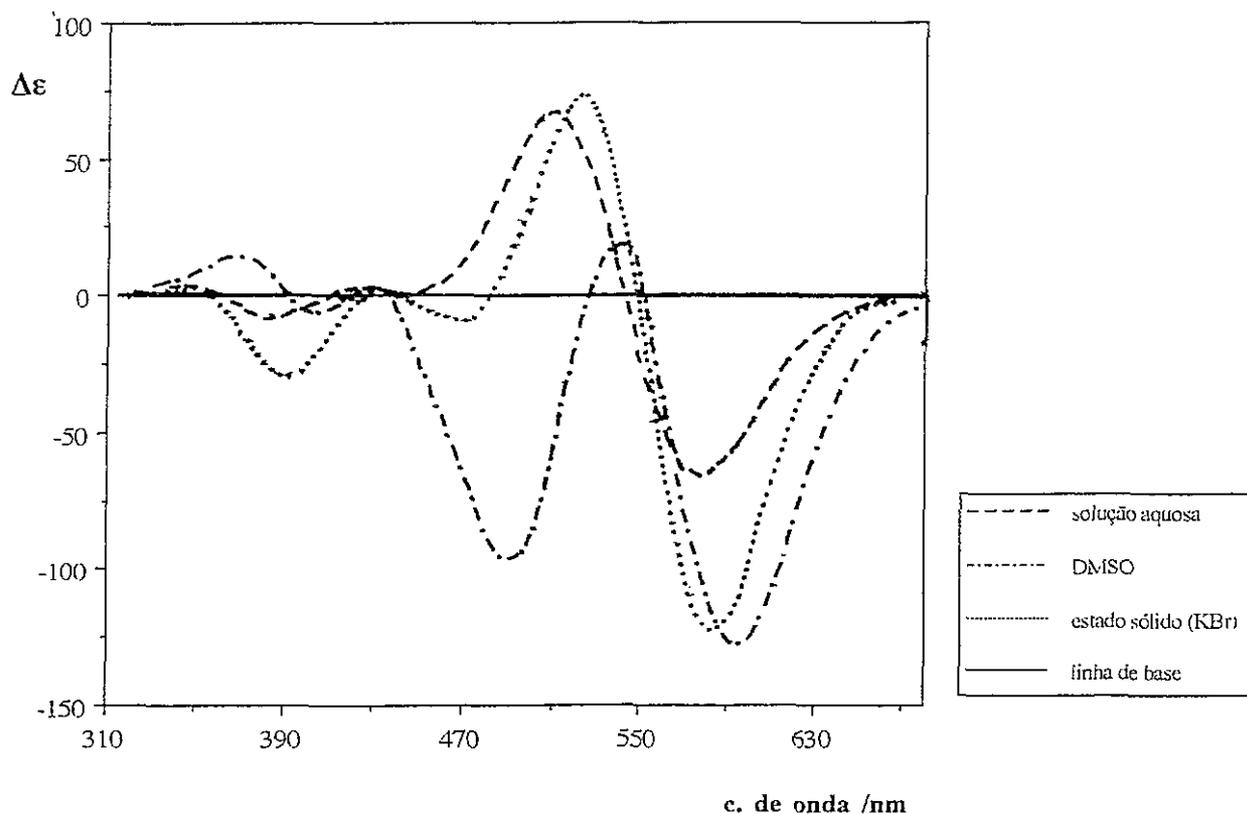


Figura 5.8 - Espectros de DC de  $[\text{Cr}(\text{L-valO-})_2(\text{L-valOH})_2]\text{NO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (ver legendas na figura)

uma vez mais, ser explicado nos mesmos termos já utilizados para o complexo  $\lambda$ - $\beta$ (+)- $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$ , Secção 5.5.2. Naquele composto, a ordenação da energia dos termos espectroscópicos, A e E, pode, provavelmente, ser a que corresponde à do anião complexo  $\lambda$ -tris(oxalato)cromato(III) e não à do  $\lambda$ -tris(etilendiamina)crômio(III), nos quais a energia daqueles termos apresenta uma ordenação inversa, apesar de ambos terem a mesma configuração absoluta [190,211].

O comportamento em solução deste composto, tanto em solução aquosa como em ácido, tem características análogas às do complexo  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$  (Secção 5.3.4). Por UV/Vis, ao longo do tempo observa-se um deslocamento dos máximos de absorvância para maiores comprimentos de onda, com diminuição da intensidade das bandas. Por DC, em solução aquosa, os espectros vão apresentando uma actividade óptica cada vez menor, embora esta diminuição seja muito mais lenta que a verificada no complexo

| UV/Vis   |  | DC   |  |
|--|--|--|--|
| $\lambda_{\text{máx}} / \text{nm};$<br>( $\epsilon / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$ ) | Condições<br>experimentais                       | $\lambda_{\text{máx}} / \text{nm};$<br>$\Delta\epsilon / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$ | Condições<br>experimentais   |
| 380 505  | Reflectância                                     | 390(+0.24) 470(-0.07)<br>522(+0.59) 587(1.00)  | em pastilha de KBr;<br>intensidades relativas das<br>bandas em %                 |
| 387.5 (87)<br>517 (69)   | solução aquosa<br>(espectro imediato)            | 385(-0.15) 510(+1.00)<br>580(-0.97)  | Solução aquosa (espectro<br>imediato); intensidades<br>relativas das bandas em % |
| 390 (37)<br>523 (46)   | solução aquosa (2 horas<br>depois da dissolução) | 395(-0.05) 474(-0.12)<br>526(+0.35) 591(-<br>0.71)   | Solução aquosa (1.5<br>horas após dissolução)                                    |
| —  | —  | 370(+0.10) 404(-0.07)<br>492(-0.72) 538(+0.15)<br>598(-0.10)   | DMSO; $\Delta\epsilon$ em<br>unidades arbitrárias                                |

Tabela 5.7 - Características espectroscópicas do complexo  $[\text{Cr}(\text{L-valO-})_2(\text{L-valOH})_2]\text{NO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

O comportamento em solução deste composto, tanto em solução aquosa como em ácido, tem características análogas às do complexo  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$  (Secção 5.3.4). Por UV/Vis, ao longo do tempo observa-se um deslocamento dos máximos de absorvância para maiores comprimentos de onda, com diminuição da intensidade das bandas. Por DC, em solução aquosa, os espectros vão apresentando uma actividade óptica cada vez menor, embora esta diminuição seja muito mais lenta que a verificada no complexo  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$ . Em ácido, os espectros evoluem para um "padrão" simétrico ao dos obtidos imediatamente após dissolução. Estas observações pressupõem, de novo, que a espécie em solução participa em reacções de hidrólise e de substituição que levam a alterações na sua estrutura e conseqüentemente na sua actividade óptica.

### 5.6.2.2 - Síntese e caracterização dos restantes complexos

Os compostos resultantes das sínteses de Cr(III) com L-valina (1), cristais de cor vermelha, L-isoleucina (2), sólido roxo-púrpura, ambos preparados segundo o

método da Secção 5.2, com L-leucina (3), sólido rosa, e com L-isoleucina (4), sólido rosa, segundo Oki *et al* [184], foram estudados com mais detalhe, na tentativa de comparar as suas características espectroscópicas com as de complexos de Cr(III) com estrutura conhecida e com resultados da literatura para complexos com os mesmos ligandos.

Os resultados das análises elementares efectuadas aos referidos compostos, com excepção do composto de L-valina (1), não permitiram esclarecer, de maneira inequívoca, qual a sua composição química. Estas dificuldades podem ter sido devidas a uma eventual contaminação dos sólidos, quase sempre obtidos sob a forma de pós, por coprecipitação ou adsorção de água (alguns dos termogramas indicam a presença de água que não é de cristalização), de ligando usado em excesso, de nitrato de sódio ou de potássio (em alguns casos, % de N inexplicavelmente elevadas) provenientes do sal de crómio e do hidróxido utilizado na neutralização da mistura em reacção, quando da síntese dos compostos e também à provável formação de misturas (Ver Capítulo 7 - Secção C).

### 5.6.3 - Características espectroscópicas

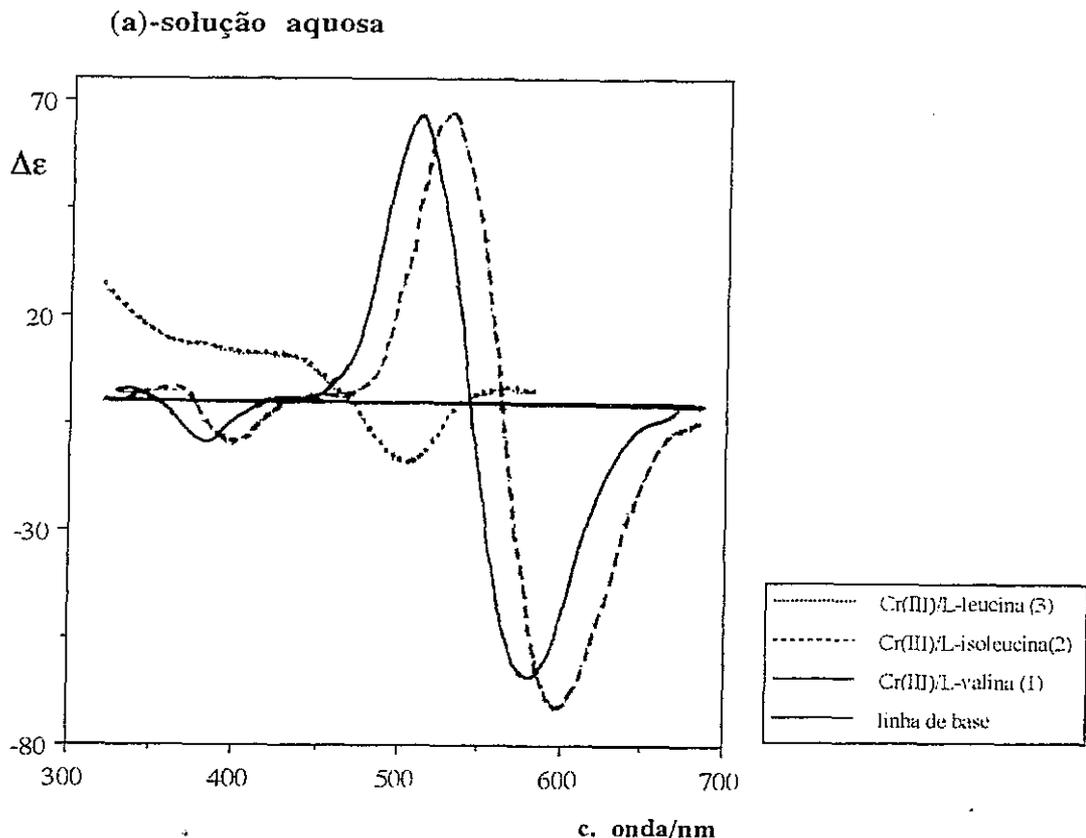
Os espectros de UV/Vis dos referidos compostos são caracterizados, na região visível, por duas bandas com intensidades aproximadas, não sendo suficientemente distintos para permitirem estabelecer conclusões acerca do ambiente de coordenação de cada composto ou mesmo distinguir eventuais diferenças entre eles.

A espectroscopia de infravermelho, por sua vez, embora permita, essencialmente, obter informação acerca da coordenação, ou não, dos grupos doadores, carboxilatos ou amina, também não foi suficientemente conclusiva, pois tudo aponta para que todos os compostos sejam constituídos por misturas.

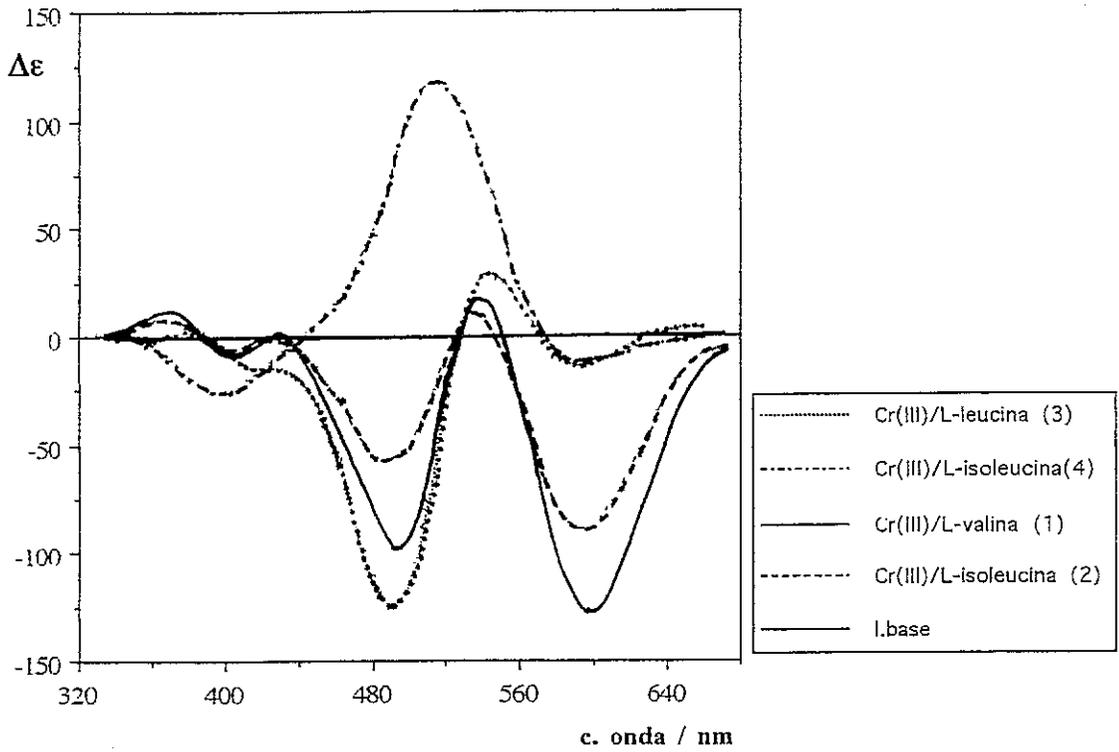
Pressupondo que compostos com estruturas idênticas devem apresentar espectros de DC semelhantes [157,175,185], a espectroscopia de DC, deveria, em

princípio, permitir obter resultados mais específicos em relação à estrutura de cada um dos compostos. Nesta base, a interpretação que foi possível fazer-se a partir dos dados espectrais de DC referentes às amostras estudadas apontou para três conjuntos de resultados: o primeiro, para o sólido de Cr(III) / L-isoleucina (4), o segundo, para os sólidos de Cr(III) / L-valina (1) e de Cr(III) / L-isoleucina (2) e o terceiro, para o de Cr(III) / L-leucina (3).

Assim, o composto de cor rosa de Cr(III) / L-isoleucina (4), poderá possuir uma estrutura facial, de tipo trisquelato, idêntica à que foi anteriormente identificada, por métodos espectroscópicos, para o isômero de configuração  $\Lambda$ - $\beta$ -cis(+) do complexo  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$  (Figura 5.9 - a e b) [157,184,185,190]. Para os compostos de Cr(III) / L-isoleucina de cor roxa (2) e o de Cr(III) / L-valina (1), a complexidade dos respectivos espectros de DC sugere estruturas menos simples (Figura 5.9-a e b), com ambientes de coordenação diferentes, eventualmente semelhantes à existente na estrutura cristalina que foi determinada para o complexo de L-valina (Figura 5.7) [208], ou então,



(b)-DMSO



(c)-estado sólido (KBr)

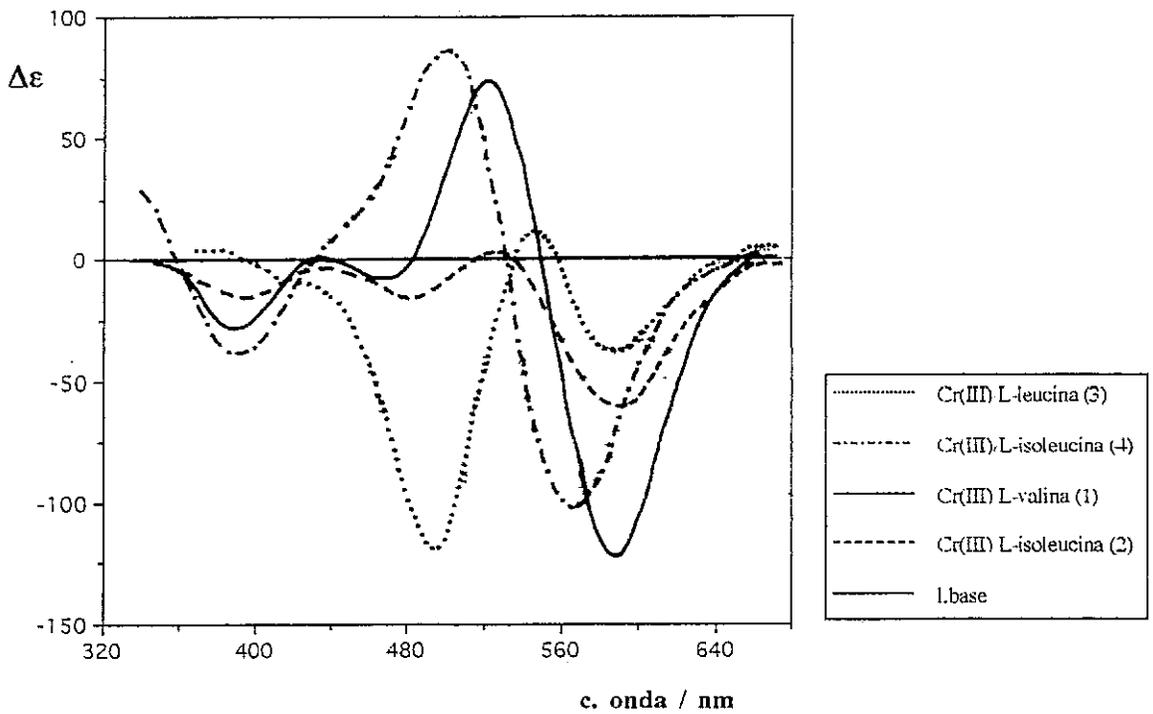


Figura 5.9 - Espectros de DC em: (a)-solução aquosa; (b)-DMSO; (c)-estado sólido (pastilha de KBr);  $[\text{Cr}(\text{L-valO})_2(\text{L-valOH})_2]\text{NO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1); Cr(III) + L-isoleucina (2); Cr(III) + L-leucina (3); Cr(III) + L-isoleucina (4);  $\Delta\epsilon$ : em unidades arbitrárias (ver detalhes nas figuras)

a existência de misturas. De igual modo por comparação com a literatura [184,185], o composto de Cr(III) / L-leucina (**3**) poderá ser do tipo trisquelato, com configuração oposta à do isómero  $\Lambda$ - $\beta$ -cis(+)-[Cr(L-ala)<sub>3</sub>], pois apresenta um espectro de DC, em solução aquosa, com apenas uma banda de fraca intensidade, com sinal negativo (Figura 5.9-a). Aos espectros de DC obtidos no estado sólido (em pastilhas de KBr) pode aplicar-se o mesmo tipo de considerações (Figura 5.9-c).

#### **5.6.4 - Aplicação da Espectrometria de Massa, com ionização por bombardeamento com átomos rápidos (FAB) a complexos de Cr(III) com $\alpha$ -aminoácidos**

"Embora, em Química Inorgânica, a espectrometria de massa possa ser utilizada numa grande diversidade de situações, as informações mais imediatas que esta técnica é capaz de fornecer são as que se obtêm a partir de espectros de baixa resolução de um dado composto em particular" [212]. Assim, os espectros de baixa resolução dos complexos de Cr(III) com  $\alpha$ -aminoácidos que têm estado a ser estudados neste Capítulo, ao mostrarem perdas sequenciais de aminoácidos, permitem estabelecer relações entre aquelas perdas e as respectivas estruturas moleculares. Embora, na sua quase totalidade, as amostras estudadas sejam, de facto, formadas por misturas, foi possível identificar alguns iões moleculares. Os resultados de FAB (bombardeamento por átomos rápidos) para os compostos de Cr(III) com L-valina (**1**), L-isoleucina (**2** e **4**) e L-leucina (**3**) são apresentados na Tabela 5.8, assim como as tentativas de atribuição das correspondentes fórmulas moleculares.

A técnica de Dissociação Induzida por Colisões (Collisional Induced Dissociation), CID, foi utilizada no estudo da fragmentação de todos os iões moleculares observados nos espectros de FAB. O espectro de CID de espécies diméricas de Cr(III) com L-valina (**1**), por exemplo, Figura 5.10, mostra perdas consecutivas de ligando. O facto de não ter sido possível identificar nenhum pico correspondente à espécie monomérica aponta para que, em FAB normal, o espectro deva corresponder a, pelo menos, dois iões moleculares diferentes.

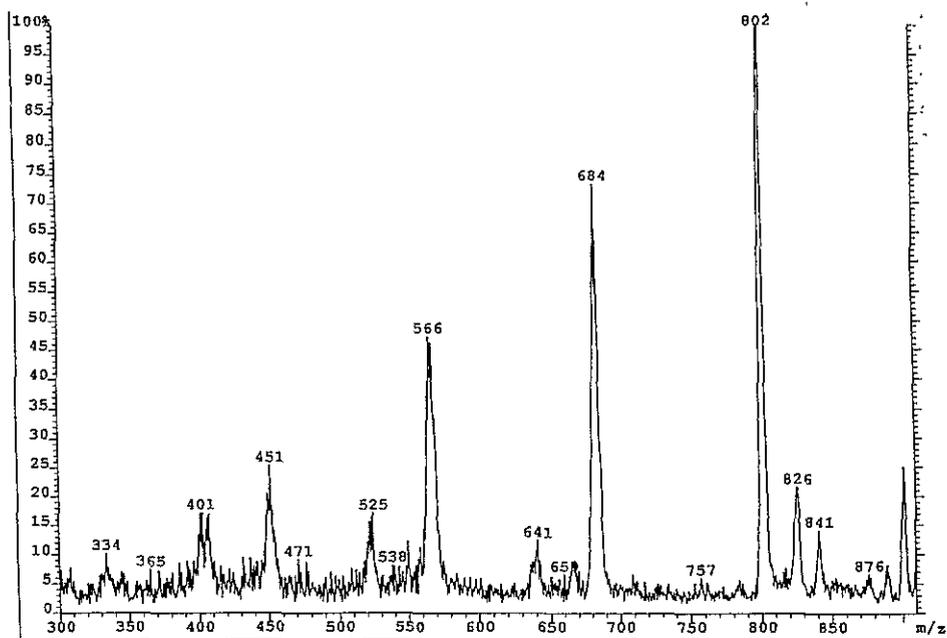


Figura 5.10 - Espectro de CID da espécie dimérica de Cr(III) com L-valina

Os espectros de massa (FAB) do composto com L-valina (1), Tabela 5.8, mostram que no composto sintetizado estão presentes duas ou três espécies diferentes. Ao pico com  $m/z$  918 foi atribuída a fórmula molecular  $[\text{Cr}_2(\text{L-valO-})_2(\text{L-valOH})_5]^+$ . Este ião complexo sofre perdas sequenciais de ligandos L-valina, com redução de Cr(III) a Cr(II) durante o processo, originando, provavelmente,  $[\text{Cr}_2(\text{L-valOH})]^+$ . O ião de fórmula molecular  $[\text{Cr}(\text{L-valO-})_2(\text{L-valOH})_2]^+$ , com  $m/z$  518, cuja estrutura cristalina foi previamente estabelecida por difracção de Raios-X de cristal único, fragmenta-se com perda de um ligando formando o ião  $[\text{Cr}(\text{L-valO-})_2(\text{L-valOH})]^+$ , com  $m/z$  401.

Por sua vez, o espectro de CID do ião  $[\text{Cr}(\text{L-valO-})_2(\text{L-valOH})_2]^+$  apresenta pouca fragmentação. A partir da abundância relativa do ião com  $m/z$  401,  $[\text{Cr}(\text{L-valO-})_2(\text{L-valOH})]^+$ , e da baixa fragmentação do ião com  $m/z$  518, pode admitir-se que o primeiro é um ião molecular.

Os dados para os compostos com L-leucina (3) e L-isoleucina (2 e 4), Tabela 5.8, mostram que estes dois ligandos se coordenam ao crómio do mesmo modo.

| Perdas de massa        | m/z | Fórmula molecular                                     | Abundância relativa (%) | Nº oxid. ão      |
|------------------------|-----|---|-------------------------|------------------|
|                        | 918 | $[\text{Cr}_2(\text{L-valO-})_5(\text{L-valOH})_2]^+$ | 1.20                    | Cr(III)          |
| -117                   | 801 | $[\text{Cr}_2(\text{L-valO-})_5(\text{L-valOH})]^+$   | 3.64                    | Cr(III)          |
| -117                   | 684 | $[\text{Cr}_2(\text{L-valO-})_5]^+$                   | 12.53                   | Cr(III)          |
| -116                   | 568 | $[\text{Cr}_2(\text{L-valO-})_4]^+$                   | 12.25                   | Cr(III) e Cr(II) |
| -116                   | 518 | $[\text{Cr}(\text{L-valO-})_2(\text{L-valOH})_2]^+$   | 39.85                   | Cr(III)          |
| -117                   | 452 | $[\text{Cr}_2(\text{L-valO-})_3]^+$                   | 4.35                    | Cr(II)           |
|                        | 401 | $[\text{Cr}(\text{L-valO-})_2(\text{L-valOH})]^+$     | 100.00                  | Cr(III)          |
| -116                   | 285 | $[\text{Cr}(\text{L-valO-})(\text{L-valOH})]^+$       | 73.68                   | Cr(II)           |
| -88                    | 317 | $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3+\text{H}]^+$              | 4.09                    | Cr(III)          |
| -88                    | 229 | $[\text{Cr}(\text{L-ala})_2+\text{H}]^+$              | 3.59                    | Cr(II)           |
| -88                    | 141 | $[\text{Cr}(\text{L-ala})+\text{H}]^+$                | 2.59                    | Cr(I)            |
| -88                    | 52  | $\text{Cr}^+$   | 1.11                    | Cr(I)            |
| leu(3) isol(2) isol(4) |     |   |                         |                  |
|                        | 754 | $[\text{Cr}_2(\text{L-ligO-})_5]^+$                   | 13.80 7.34 22.26        | Cr(III)          |
| -130                   | 624 | $[\text{Cr}_2(\text{L-ligO-})_4]^+$                   | 10.93 7.96 20.39        | Cr(III) e Cr(II) |
| -130                   | 494 | $[\text{Cr}_2(\text{L-ligO-})_3]^+$                   | 13.97 10.72 14.15       | Cr(II)           |
| -130                   | 443 | $[\text{Cr}(\text{L-ligO-})_3+\text{H}]^+$            | 24.85 25.12 38.60       | Cr(III)          |
| -130                   | 364 | $[\text{Cr}_2(\text{L-ligO-})_2]^+$                   | 9.69 4.38 5.26          | Cr(II) e Cr(I)   |
| -130                   | 313 | $[\text{Cr}(\text{L-ligO-})_2+\text{H}]^+$            | 36.90 31.77 43.49       | Cr(II)           |
|                        | 234 | $[\text{Cr}_2(\text{L-ligO-})]^+$                     | 10.00 2.8 2.7           | Cr(I)            |
| -130                   | 183 | $[\text{Cr}(\text{L-ligO-})+\text{H}]^+$              | 11.39 3.74 7.54         | Cr(I)            |
|                        | 52  | $\text{Cr}^+$   | 40.68 64.47 48.41       | Cr(I)            |

Tabela 5.8 - Esquemas de fragmentação (a partir de espectros de FAB) dos compostos de coordenação de Cr(III) com L-valina (1), L-isoleucina (2 e 4), L-leucina (3) e L-alanina

casos, ocorrem perdas sequenciais dos ligandos L-leucina, ou L-isoleucina, com sucessivas reduções, por processos de um único electrão, de Cr(III) a Cr(I), podendo identificar-se dois iões moleculares, correspondentes às estruturas  $[\text{Cr}(\text{L-H})_3]^+$ , monomérica, e dímica,  $[\text{Cr}_2(\text{L-H})_5]^+$  (L-H=ligando mono-desprotonado, mono-negativo). Nas espécies díméricas, existe a probabilidade de que duas moléculas de água, não visíveis nos espectros de massa, completem a coordenação do crómio. Como os dois compostos com L-isoleucina (**2** e **4**) foram obtidos por métodos diferentes e os respectivos espectros de DC são substancialmente distintos (Figura 5.9-a, b e c), não é de excluir a possibilidade de, nas duas amostras, cada espécie existir em diferentes concentrações, uma vez que, nos respectivos espectros de massa, a relação entre  $m/z$  754 e  $m/z$  418 é diferente.

Nos espectros de massa do complexo de L-alanina, Tabela 5.8, apenas foi identificada a forma monomérica correspondente à forma molecular  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3+\text{H}]^+$ . Este composto sofre uma fragmentação semelhante à da forma monomérica do composto de L-leucina (**3**).

| Cr(III) / $\alpha$ -aminoácido | Fórmula molecular                                    | Método de atribuição da estrutura             | Ref <sup>a</sup> |
|--------------------------------|--|---|------------------|
| L-alanina                      | $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$                        | UV/Vis; DC; IV                                | [157,185]        |
|                                |  | DC; EM  | E.t.             |
| L-valina                       | $[\text{Cr}(\text{L-val})_3]$                        | UV/Vis; DC; IV                                | [184,185]        |
|                                | $[\text{Cr}_2(\text{L-valO})_5(\text{L-valOH})_2]^+$ | DC; EM  | E.t.             |
|                                | $[\text{Cr}(\text{L-valO})_2(\text{L-valOH})_2]^+$   | Difracção de Raios-X de cristal único; DC; EM | E.t.             |
| L-leucina                      | $[\text{Cr}(\text{L-leu})_3]$                        | UV/Vis; DC; IV                                | [184-186]        |
|                                | $[\text{Cr}_2(\text{L-leu})_5]^+$                    | DC; EM  | E.t.             |
| L-isoleucina                   | $[\text{Cr}(\text{L-isoleu})_3]$                     | UV/Vis; DC; IV                                | [184-186]        |
|                                | $[\text{Cr}_2(\text{L-isoleu})_5]^+$                 | DC; EM  | E.t.             |

Tabela 5.9 - Métodos de caracterização de diferentes estruturas para compostos de Cr(III) com  $\alpha$ -aminoácidos

Em resumo, para os compostos de Cr(III) com  $\alpha$ -aminoácidos estudados, foram confirmadas, por Espectrometria de Massa, cinco estruturas já apresentadas na literatura para os mesmos compostos e foram propostas outras três, que não tinham anteriormente sido descritas, Tabela 5.9.

O resultado mais inesperado deste estudo foi o obtido para o composto com L-valina (1). A estrutura cristalina proposta a partir de resultados de difracção de cristal único, corresponde apenas a um dos dois compostos identificados por EM. Na amostra sólida, de onde foi seleccionado o cristal com a referida estrutura, há também que considerar uma outra espécie, a qual, correspondendo a um dímero da primeira, não dá origem a resultados distintos na análise elementar.

### 5.6.5 - Espectrometria de Massa e Dicroísmo Circular

Todas as amostras sólidas estudadas revelarem ser formadas por misturas, que, além da espécie tris(bidentada), contêm outros compostos com estruturas do tipo bis(quelato) e/ou estruturas diméricas. Pelo menos aparentemente, as duas amostras de Cr(III) com L-isoleucina (2 e 4), contêm o mesmo tipo de compostos. A análise por EM do complexo  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$  comprovou a presença de uma estrutura tris(bidentada), o que confirma o que era esperado a partir de resultados espectroscópicos [190].

Se todas as sínteses efectuadas deram origem a misturas, com excepção do caso do complexo com L-alanina, a interpretação dos espectros de DC pode levar a conclusões erradas. Mesmo que uma dada espécie exista em muito pequena quantidade na amostra sólida, se ela tiver um coeficiente de absorvidade elevado, como parece ser o caso das espécies do tipo trisquelato, ela pode facilmente dominar o "padrão" do respectivo espectro de DC. No caso da amostra de cor rosa de Cr(III) com L-isoleucina (4), o que parecia ser um espectro de DC de um complexo trisquelato puro, com configuração absoluta  $\Lambda$ - $\beta$ -cis(+), dominado por uma banda intensa de sinal positivo, Figura 5.9-a, pode, na realidade, esconder outras espécies com bandas negativas muito menos intensas, como parece ser característico de espécies do tipo bisquelato mistas,

que têm uma estrutura muito menos simétrica que a anterior [213]. No entanto, apesar dos aspectos controversos, cinco das estruturas identificadas por EM já anteriormente haviam sido propostas, apenas com base em resultados de análise elementar e espectroscópicos [214].

### 5.7 - Conclusões

A caracterização espectroscópica do complexo  $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$  por dicroísmo circular, em especial a partir do conhecimento do respectivo espectro em solução aquosa, permitiu concluir da formação estereoespecífica do isómero  $\Lambda$ - $\beta$ -(+) deste composto. Para esclarecer as dúvidas existentes quanto à correspondência entre a configuração absoluta e o sinal da banda dominante, a comprimento de onda mais elevado, nos espectros de DC deste composto, propôs-se a inversão da energia dos termos A e E como responsável pelas características espectrais encontradas. Este mesmo aspecto ficou também patente na configuração absoluta atribuída ao complexo de Cr(III) com L-valina, cuja estrutura foi estabelecida por difração de Raios-X de cristal único. A comparação das características espectroscópicas de outros complexos de Cr(III) com  $\alpha$ -aminoácidos com as dos compostos com L-alanina e L-valina, numa primeira aproximação, deveria permitir prevêr o tipo de estrutura que lhes deu origem, embora uma explicação inequívoca esteja ainda longe de poder ser dada. A aplicação, pela primeira vez, da espectrometria de massa, FAB em particular, ao estudo deste tipo de amostras permitiu identificar novas estruturas e comprovar outras já anteriormente propostas a partir apenas de resultados de análise elementar e espectroscópicos, provando ser uma técnica a não deixar de ser considerada em trabalhos futuros [214].

### 5.8 - Algumas considerações sobre a estrutura e o comportamento de complexos de Cr(III) com aminoácidos naturais relacionados com a acção biológica do crómio

Em paralelo com o que, desde há muito tempo, tem sido postulado quanto ao papel desempenhado pelo crómio na indústria de curtumes, ao estabelecer ligações por

ponte entre os grupos carboxilato das cadeias de colagénio [205], talvez com excepção das espécies do tipo trisquelato, as estruturas atribuídas ao complexo de Cr(III) com L-valina e as das outras espécies com L-leucina e L-soleucina identificadas por EM, são as primeiras, para aminoácidos simples, a poder modelar aquele tipo de ligação. Havendo grupos amina protonados pendentos em estruturas bem definidas, ou ligandos capazes de formar pontes entre unidades diferentes, estas estruturas, embora pouco comuns em compostos de crómio(III), têm, pelo menos potencialmente, capacidade para interactuar com receptores em sistemas biológicos, dando suporte à sugestão de que este ião pode promover a formação de "ligações-cruzadas" entre os seus complexos e o ADN. Estes aspectos, ligados à constatação do carácter lábil / reversível demonstrado em solução, nomeadamente pelo complexo de Cr(III) com L-alanina, podem ter implicações importantes em termos da compreensão dos efeitos genotóxicos deste elemento.

## **6. Interação de compostos de crómio com materiais biológicos**

### **6.1 - Introdução**

No tema que tem vindo a ser desenvolvido ao longo desta dissertação, as características biológicas do crómio têm ocupado lugar de destaque.

O crómio é considerado um elemento vestigial essencial para os mamíferos e para o homem, requerido no controle do metabolismo da glicose e dos lípidos, se em quantidades subcitotóxicas [42]. Mas este elemento, se por um lado é considerado essencial, por outro, pode actuar como um agente mutagénico e carcinogénico, se em quantidades mais elevadas [1,11,41,72,215-219], o que se verifica, por exemplo, em indústrias ligadas ao processamento do crómio, em que este elemento é conhecido há mais de 50 anos como causador de cancro pulmonar [41,42,215,218].

Sabe-se que o crómio entra facilmente nas células sob a forma de Cr(VI) (Ver Capítulo 1 e Secção 6.2.1 deste Capítulo), ao contrário do que se verifica com os compostos de Cr(III) [10,41,72,218]. Enquanto o Cr(VI) é considerado a causa principal dos danos celulares a nível do material genético, esse papel não é normalmente atribuído às formas trivalentes deste elemento, a menos que elas resultem da redução intracelular do Cr(VI) [63,72]. Naquele último estado de oxidação, este elemento tem possibilidade de formar complexos com biomoléculas, parecendo poder interactuar então com as células e/ou seus componentes. No entanto, estudos mais recentes apontam para uma maior facilidade de entrada de compostos de Cr(III) nos organismos vivos, a qual, embora lenta, pode atingir níveis de crómio intracelular equivalentes a sistemas comparáveis de Cr(VI), ao fim de intervalos de tempo suficientemente alargados. A possibilidade de certas espécies de Cr(III) poderem ter propriedades tóxicas, eventualmente semelhantes às do Cr(VI) [11,54,220] é um aspecto a que não se pode deixar de prestar atenção.

Os intermediários produzidos na redução do Cr(VI), não podem também deixar de ser mencionados. A presença de intermediários de Cr(V) foi primeiramente proposta por Wetterhahn [221], para a redução de Cr(VI) por microsomas, *in vitro*. Estudos posteriores, também *in vitro*, demonstraram a sua presença em reacções de redução de Cr(VI) com outros redutores intracelulares [19,27,120,222-226]. E, recentemente, estes foram também detectados em eritrócitos de embriões de frango, após administração de dicromato de sódio [227,228] e em ratos, *in vivo* [229]. Tem sido proposto que estas últimas espécies possam ser as responsáveis pelos danos do ADN atribuídos ao Cr(VI) [26,27,61,230]. Complexos de Cr(V), do tipo do bis(2-hidroxi-2-metilbutirato) oxocromato(V) [89] ou um complexo de Cr(V) com uma teraamina macrocíclica [231] dão origem a "lquebras de cadeias de ADN" (DNA strand beaks) após reagirem com este material. O Cr(V) está associado à formação de radicais livres, os quais, pela sua grande reactividade, podem desempenhar papéis fundamentais nos processos associados à toxicidade deste metal [11,27,152,230,232].

Os mecanismos propostos para explicar a redução de Cr(VI), em meio neutro, também têm em conta os intermediários de Cr(IV), em paralelo com a formação de espécies de Cr(V). O Cr(IV) pode formar-se no início da redução, por um passo que envolve dois electrões, sofrendo dismutação posterior e dando origem a compostos de Cr(V) e de Cr(III) [24,99,233]. Estudos muito recentes, *in vitro*, indicam que, não só o par redox Cr(VI)/Cr(V) pode actuar como dador / receptor de electrões capaz de produzir espécies reactivas de oxigénio, como esse papel também pode ser desempenhado pelo par Cr(III)/Cr(II) [226,234].

A redução intracelular do Cr(VI) continua a ser considerada um factor chave para compreender os efeitos genotóxicos e mutagénicos associados a compostos de crómio. Utilizando material biológico de natureza diversa, têm sido efectuados muitos e variados estudos, os quais, fundamentalmente, se têm centrado na interacção de compostos de Cr(VI) e/ou de Cr(III) com células e/ou material genético [55,68,235-238]. Em muito menor quantidade e mais recentemente, a literatura tem também feito referência a trabalhos sobre interacções directas entre componentes celulares e compostos de coordenação de Cr(III), não resultantes da redução intracelular do Cr(VI) [54,55,72,152,220,232,235].

O objectivo do presente Capítulo foi proceder a um estudo sistemático da interacção de núcleos isolados (sistema aberto, possuidor de membrana) com complexos de crómio(III), nomeadamente, complexos com aminoácidos naturais, tendo-se estudado a toma destes compostos por núcleos de timo de vitela. A partir dos resultados obtidos, a toma de cada complexo foi, tentativamente, relacionada com as características de cada composto (carga, tipo de ligandos, presença de determinadas ligações Cr-X), sendo apresentadas algumas propostas explicativas desses resultados.

## **6.2 - Revisão bibliográfica**

### **6.2.1 - Modelo de "entrada-redução" (uptake-reduction)**

De um modo geral, os dois estados de oxidação do crómio mais estáveis em

sistemas biológicos, Cr(VI) e Cr(III), diferem de maneira considerável nos seus efeitos genotóxicos, devido, essencialmente, a mecanismos de entrada celular distintos e às suas diferentes propriedades cinéticas e de ligação a materiais biológicos.

O modelo de "entrada-redução" é aceite como explicação para a entrada de crómio nas células [11,52,72] (Ver Figura 1.5, Capítulo 1). Tanto com eritrócitos como com células nucleadas, por exemplo, o Cr(VI) atravessa as membranas celulares num único sentido (entrada), por um processo activo de transporte de aniões, semelhante ao dos aniões sulfato ou fosfato [10,72,239,240]. Aquelas membranas não são, de um modo geral, permeáveis a compostos de Cr(III) extracelulares, ou ao Cr(III) entretanto formado no interior das células em resultado da redução do Cr(VI). No entanto, se determinados tipos de ligandos estiverem coordenados ao catião Cr(III) (algumas aminas aromáticas, por exemplo), proporcionando-lhes ambientes hidrófobos, é permitida a passagem (lenta) desses compostos através daquelas membranas [54,55,241, 242]. *In vitro*, com eritrócitos humanos, foi observado que alguns compostos de Cr(III) atravessavam a membrana celular, embora com uma velocidade três ordens de grandeza menor que a dos compostos de Cr(VI) [55].

Estudos com ratos, *in vivo*, comprovaram que, após injeções intraperitoneais de sais simples de Cr(III), como CrCl<sub>3</sub> "comercial" ou Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, estes compostos, ainda com o mesmo número de oxidação, embora provavelmente já numa forma diferente da inicial, se ligavam aos tecidos de alguns órgãos, nomeadamente do fígado e dos rins [220]. Numa experiência análoga, mas utilizando um composto de Cr(VI), verificou-se que, após um intervalo de tempo relativamente longo (40 horas), a quantidade de crómio ligada ao ADN era, curiosamente, idêntica nos dois casos [220]. Uma vez que nos organismos vivos é improvável que as formas trivalentes de crómio se transformem espontaneamente em formas hexavalentes ( $E^{\circ}_{Cr(III) \rightarrow Cr(VI)} = -1.33 \text{ V}$ ) [13,52], foi posta a hipótese de que a toma lenta do Cr(III) pelos tecidos do fígado e dos rins, *in vivo*, se devesse à formação lenta, por reacções de substituição, de complexos de Cr(III) com ligandos biológicos capazes de permear as membranas celulares [220].

Alguns compostos de crómio, de Cr(III) ou, em especial, de Cr(VI), pouco solúveis, podem também entrar nas células por processos de endocitose [11,54,215,216, 218,243].

Como consequência da redução rápida do Cr(VI) pelos constituintes intracelulares, o crómio parece ficar retido intracelularmente [244]. Sehlmeier *et al.* [245], observaram, *in vitro*, usando células V79, que a acumulação intracelular de crómio dependia da concentração extracelular de Cr(VI) (5 vezes a concentração extracelular). Com núcleos isolados do mesmo tipo de células, aqueles autores verificaram que, após incubação com cromato, ao fim de 3 horas, a concentração intracelular de crómio era cerca de 60 vezes a extracelular. A acumulação intracelular de crómio, foi também verificada, *in vitro*, com timócitos de rato [56] e *in vivo*, em células do fígado e dos rins de coelho [246]. A velocidade de toma do crómio naquele tipo de células (V79) [245] era da mesma ordem de grandeza que a observada com eritrócitos humanos [55], isto é, a mesma espécie de crómio apresenta velocidades de toma semelhantes em materiais biológicos diferentes.

### **6.2.2 - Carcinogénese e mutagénese provocadas por compostos de crómio**

Como regra geral, considera-se que o Cr(VI) é muito mais tóxico que o Cr(III) quando administrado a animais. *In vitro* e *in vivo*, têm sido observadas diferenças muito significativas nos efeitos citotóxicos de compostos de crómio naqueles dois estados de oxidação. Mas embora a carcinogénese dos compostos de Cr(VI) se encontre perfeitamente documentada em estudos epidemiológicos no homem e em estudos experimentais com animais, têm sido obtidos resultados negativos ou ambíguos *in vivo* e em culturas de células, com a maior parte dos compostos de Cr(III) [1,6,11,63,71,72,215-218,247].

#### **6.2.2.1 - Modelo metabólico da genotoxicidade do crómio**

Os variados aspectos da toxicidade do Cr(VI) são ainda pouco claros, quer eles sejam mediados por espécies intermediárias reactivas de Cr(V) e/ou de Cr(IV) [241],

quer sejam devidos a interações directas com compostos de Cr(III) [71], ou indirectas com os produtos formados na redução do Cr(VI), como é o caso, por exemplo, do  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$ , formado na reacção de redução de Cr(VI) com cisteína, na presença de ADN [61], quer ainda aos "danos oxidativos" (oxidative damage) resultantes da acção de radicais livres derivados dos redutores ou de espécies reactivas de oxigénio geradas durante a redução de Cr(VI) [26,27,61,72,230,232]. O Cr(III), sendo a forma mais estável no meio ambiente ou no interior das células (constitui cerca de 90% do crómio total nas mesmas) tem fortes probabilidades de reagir com electrófilos intracelulares, tais com ácidos nucleicos e proteínas [71]. No entanto, e apesar de não estar devidamente comprovado, as interações redox e as "ligações cruzadas com ADN" (DNA cross links) que resultam daquela redução, incluindo os danos produzidos pela "danos oxidativos das bases" (oxidative base damage), são consideradas as causas mais prováveis da genotoxicidade do cromato [11,64,71,248].

A redução intracelular do cromato pode processar-se por mecanismos diversos, podendo cada um deles direccionar-se para "pontos finais" toxicológicos distintos [11,52,72,220]. Pode ser levada a cabo por enzimas microssomais, onde se incluem os citocromos P-450 [11,68,112,221,224,243,248-251], por componentes do sistema de transporte de electrões dos mitocôndria [11], pela glutathione [63,225,226,252] e por outros tióis não proteicos de pequena massa molecular [52,61,72,99], pelo ácido ascórbico [11,42,117,119,120,222,253,254], pela riboflavina (vitamina B2) [223], além de um conjunto variado de outros compostos [11]. Como se tem vindo a referir, naquele processo de redução intracelular são formadas espécies de Cr(V) [224-229,256] e radicais livres [52,255,257,258], verificando-se, eventualmente, acumulação de Cr(III) (reduzido) no interior dos mitocôndria e do núcleo, onde provavelmente a maior parte do crómio se encontra ligado ao ADN e a proteínas nucleares [11,237,245,248,259].

Connett e Wetterhahn [52] foram os primeiros a referir que o metabolismo intracelular do cromato poderia estar sob controle cinético e não termodinâmico, isto é, que os doadores de electrões cineticamente mais activos seriam os mais efectivos na

redução daquela espécie de crómio. A glutathiona, nomeadamente, é um redutor celular importante (Capítulo 2), que tanto pode promover, rápida e eficientemente, a eliminação de elevado número de agentes tóxicos, como ligar-se-lhes, formando conjugados. No processo de redução do Cr(VI) pela glutathiona (e por outros tióis não proteicos, como a cisteína, por exemplo), formam-se intermediários do tipo tioéster (Ver Capítulo 3) [19, 22,99,100], que são posteriormente reduzidos pelo excesso de glutathiona (ou de outro redutor), segundo um mecanismo que envolve pelo menos dois passos, com passagem, comprovada, por espécies intermediárias de Cr(V) [11,59,61,134,149,155,256,257,260] e por radicais livres, glutathionilo [27,134], cisteinilo [61,114] e radicais com oxigénio [27,152]. O comportamento da glutathiona como redutor intracelular é particularmente interessante, pois aquele composto pode actuar também como agente protector contra a "peroxidação lipídica" (lipid peroxidation), que é também induzida pela redução do Cr(VI) [255]. Verificando-se que, quando há aumento da quantidade intracelular de GSH também há aumento do número de "quebras de cadeias de ADN" (DNA single strand-breaks) (e vice-versa), isso dá, pelo menos, uma indicação de que existe uma relação entre a concentração de redutor e a intensidade dos danos genéticos produzidos [11,220, 251,252,255].

Há outros agentes intracelulares que também interactivam com o Cr(VI), danificando o ADN. Na presença de peróxido de hidrogénio, *in vitro*, o Cr(VI) dá origem a compostos de Cr(V), como o tetraperoxocrómio(V), conduzindo à formação de radicais hidroxilo, os quais, por sua vez promovem o aparecimento de "quebras de cadeias" e de "danos oxidativos das bases" (oxidative base damage) [27,230,232,255,257]. Note-se que o peróxido de hidrogénio é produzido intracelularmente em diversos processos metabólicos. Por outro lado, da reacção do Cr(V) com peróxidos e com hidroperóxidos lipídicos resultam outros radicais livres (OH•, por exemplo) [261]. Surpreendentemente, o Cr(III) também pode dar origem a radicais livres por reacção com peróxido de hidrogénio e com hidroperóxidos lipídicos [27,62,258].

Alguns estudos, *in vitro* e *in vivo*, referem a utilização de vitaminas, ou de anti-

oxidantes em geral, para tratamento de células, pois que a alteração do seu estado redox, pode modificar a resposta ao crómio. Um tratamento prévio efectuado com vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) [222,255], conseguiu reduzir a toxicidade e a mutagénese do Cr(VI) em células V79. No entanto, vitaminas como a riboflavina (vitamina B2) provocam um aumento no número de "quebras de cadeias de ADN", via formação (ou via tempo de vida mais prolongado) de espécies de Cr(V) e de radicais hidroxilo [223,255].

O ácido ascórbico é apontado, actualmente, como um dos redutores com maior importância para o crómio, *in vivo* [119,222,243,253,254]. O ião ascorbato encontra-se não só em concentrações elevadas (mmolar) no interior das células como também faz parte da composição dos fluidos extracelulares e, em especial, dos dos pulmões (Ver Capítulo 1, no que se refere à exposição ocupacional ao crómio). E se, por um lado, este ácido tem sido usado como agente extracelular desintoxicante do Cr(VI), diminuindo a quantidade extracelular de Cr(VI) e impedindo por isso a sua toma através das membranas [11,120,222,223,243], por outro, a redução intracelular do Cr(VI) por este redutor, dá origem a espécies reactivas de oxigénio, aumentando assim a toxicidade do crómio [119]. Um aumento da quantidade intracelular de ascorbato resulta num aumento de "ligações-cruzadas entre o ADN e proteínas" (DNA protein cross links) induzidas pelo cromato [119,253], havendo, no entanto, menor formação de espécies de Cr(V) e mais de Cr(III) [11,222]. O ácido ascórbico parece também actuar sinergeticamente com a glutatona no metabolismo do cromato intracelular [120,121].

Em resumo, a redução do cromato dá origem a um espectro variado de danos celulares e(ou) genotóxicos. A redução enzimática provoca toxicidade celular por inactivação de enzimas e/ou por diminuição da quantidade de um ou mais metabolitos celulares. A redução de Cr(VI) por tióis não proteicos origina, em geral, a formação de intermediários Cr(VI)-tioésteres, Cr(V) e radicais livres (tílo ( $\text{SH}^\bullet$ ), hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ )). Estes intermediários dão origem a "ligações cruzadas entre cadeias de ADN" (DNA interstrand cross links), "ligações-cruzadas entre ADN e proteínas" e "quebra de cadeias de ADN". Embora o papel concreto destas lesões na mutagénese e na carcinogénese do

Cr(VI) seja desconhecido, a sua natureza e presença persistente nestes processos sugere implicações muito prováveis na genotoxicidade do crómio.

#### **6.2.2.2 - Algumas considerações sobre a mutagénese de compostos de crómio**

As mutações genéticas são estabelecidas predominantemente pelo Teste de Ames [6], que emprega populações de células de várias estirpes da bactéria *Salmonella Typhymurium*. Têm também sido usadas estirpes de uma outra bactéria, a *Escherichia Coli*, em testes comparáveis àquele. Todavia, para o mesmo composto, as respostas a estes testes variam consoante o tipo e a estirpe de bactéria usada [6,11].

O Cr(VI), *in vitro*, comporta-se como mutagénico na maioria dos testes [6,72]. Os compostos de Cr(III), pelo contrário, não são, em geral, mutagénicos. Embora no teste de Ames se tenham obtido alguns resultados positivos com estes compostos, é necessária uma quantidade de Cr(III) 10 a 100 vezes superior à de Cr(VI), para que haja reacção àquele teste [6].

As diferenças mutagenéticas encontradas entre aqueles dois estados de oxidação do crómio, tendem a ser, quase exclusivamente, atribuídas à "disponibilidade" intracelular de crómio(VI), o que tem a ver com a sua passagem através das membranas celulares. A endocitose pode, no entanto, contribuir para a entrada nas células de compostos insolúveis, como é o caso da cromite, Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, que dá resposta positiva em termos de mutagénese [6]. A toxicidade genética do Cr(III) parece ser dependente do tipo de ligandos coordenados àquele catião metálico, nomeadamente, ligandos lipofílicos, como por exemplo, a bipyridina e a 1,10-ortofenantrolina, que "melhoram" a toma destes compostos, como sugeriram Warren *et al* [242]. Outros factores, como a carga (positiva), parecem também concorrer para as diferenças entre os vários complexos de Cr(III) [54,242,262]. No entanto, a contaminação de compostos de Cr(III) por vestígios de Cr(VI), frequente nos compostos de origem industrial [6], é um aspecto que tem de ser considerado, sempre que as respostas àqueles testes são positivas. Para compostos cuja entrada no organismo seja por via oral, a redução do cromato pode

efectuam-se extracelularmente, tal como acontece, por exemplo, no tracto gastrointestinal ou na saliva [6,8,72].

A Tabela 6.1-a e b, ilustra as diferenças de mutagénese entre compostos de Cr(III) e de Cr(VI), em termos de número de estudos citados na literatura.

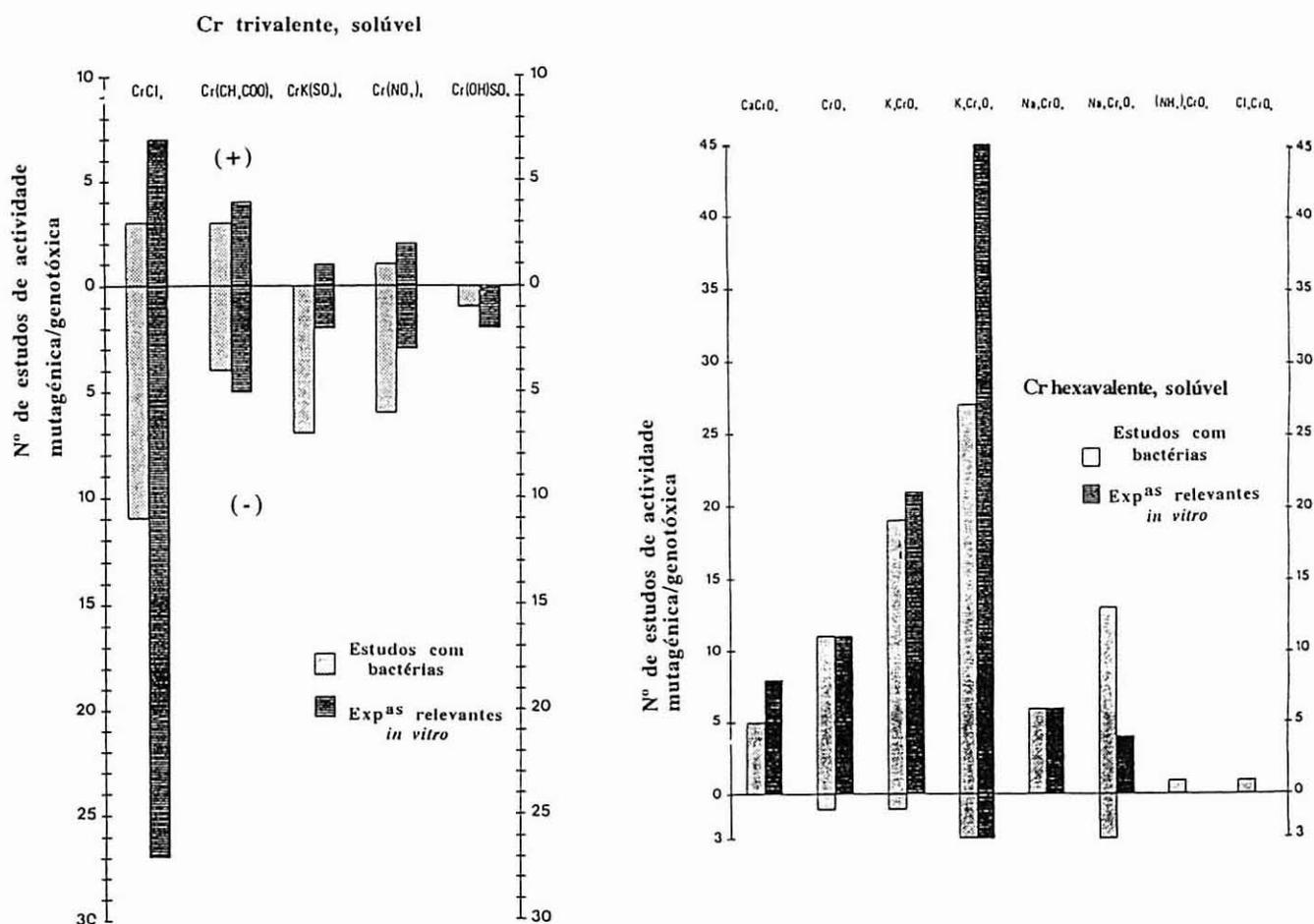


Tabela 6.1 - Mutagénese e outros efeitos genotóxicos provocados por compostos de (a): Cr(III); (b): de Cr(VI) [adaptado de [6], figuras 1 e 4]

Convém apenas referir, que qualquer análise mais superficial da globalidade dos resultados experimentais levaria a considerar, de um modo geral, as espécies de Cr(III), provenientes da redução intracelular do Cr(VI) como responsáveis "últimas" pela mutagénese e pelos outros efeitos genotóxicos do crómio. Mas, cada vez mais estudos têm fornecido novas provas que levam a atribuir aos intermediários daquelas reduções o papel fundamental em todos os processos genotóxicos associados ao crómio.

### 6.2.3 - Interações do crómio a nível intracelular

Pareceu-nos importante investigar os tipos de interacção do crómio, nas suas diferentes formas, a nível intracelular. Tentou-se, assim, fazer uma compilação da literatura mais relevante no assunto, que demonstrasse algumas dessas interacções e dos efeitos provocados por compostos de crómio, Cr(VI) ou Cr(III), tanto *in vitro* como *in vivo*.

Pelas razões discutidas no ponto anterior, os compostos de crómio(III) não são significativamente tóxicos em células intactas, contrariamente aos de Cr(VI) [6,215,216, 218,238,247]. No entanto, em ensaios de genotoxicidade com ADN e com outros componentes intracelulares, o Cr(III) é muito mais efectivo que o Cr(VI) [11,72,262]. Embora se saiba que o crómio induz danos a nível do ADN, *in vivo* e *in vitro*, não se sabe com precisão quais as formas deste elemento que produzem esses danos, ou quais os tipos específicos dos danos produzidos, o que se torna especialmente importante para a compreensão da toxicidade deste elemento, *in vivo*. Como consequência, ainda não se definiu com segurança se aqueles danos são devidos à interacção directa de alguma(s) espécie(s) de crómio em particular, que pode(m) ter sido gerada(s) intracelularmente, ou a mecanismos em que estejam envolvidas espécies extremamente reactivas, nomeadamente formas de crómio no estado de oxidação +5 [26,58,61,134,221,224,228,232, 256] ou radicais livres [26,27,134,230,232,255,258]. Há, no entanto, mais do que fortes suspeitas de que sejam algumas espécies de oxigénio activas geradas durante aquele processo de redução que estejam envolvidas na geração de "quebra de cadeias de ADN"[26,152,232,258].

A redução extracelular do Cr(VI), pelo contrário, é considerada um processo de desintoxicação, daí a utilização de ascorbato como meio de protecção de trabalhadores de indústrias ligadas ao crómio [263].

Na literatura há muitas referências a trabalhos sobre a interacção de crómio com componentes celulares, a maioria dos quais incide sobre interacções específicas com

ADN. E se o Cr(VI), sózinho, não interactua nem com o ADN [61,67,68] nem com outros constituintes celulares [27,235,262], a presença simultânea de redutores provoca o aparecimento de "quebra de cadeias de ADN", de "ligações cruzadas entre cadeias de ADN" e de "ligações cruzadas entre ADN e proteínas" [67,259,264]. Embora não se tenham detectado danos no ADN em culturas de células tratadas com Cr(III) [113,262], a reacção directa de compostos de Cr(III) com núcleos isolados dá origem a "quebras de cadeias de ADN" e a "ligações cruzadas entre ADN e proteínas" [54,244].

Tanto a acção directa do Cr(III) sobre o ADN, como a do Cr(VI) em conjunto com redutores, em culturas de células [61,265] e *in vivo* [74,60,220], faz-se inicialmente com formação de aductos [27,61,67,114], os quais contribuem para o aparecimento das lesões referidas atrás. Aquelas lesões interferem com a actividade de enzimas de restrição (endonucleases), inibindo a sua acção por bloqueio dos seus locais activos [11, 61,266,267,268]. A quantidade e a natureza dos aductos depende, em primeira análise, do redutor utilizado, mas também de outros factores, como sejam a razão Cr/tiol redutor e a própria conformação inicial do ADN [61]. Alguns trabalhos têm tentado mostrar possíveis relações entre o número das "quebras de cadeias de ADN" e os diferentes factores capazes de as provocarem, em especial os intermediários reactivos, como os complexos de Cr(V) e os radicais hidroxilo [152] ou glutationilo [27,134]. Mas a variedade de respostas obtidas (proporcional à concentração de GSH [112], ou de espécies de Cr(V) [223], na presença ou ausência de tratamento prévio com anti-oxidantes [230,255]), reflecte de novo o facto de não haver ainda uma compreensão cabal dos mecanismos envolvidos na redução metabólica do Cr(VI) [62].

Existe alguma polémica à volta da formação de "quebras de cadeias de ADN", após a redução de Cr(VI) por alguns redutores, em especial no caso da redução ser efectuada por um dos candidatos intracelulares mais pertinentes, ou seja, pela glutationa. Na referida redução, Borges *et al* [61] não constataram a presença daquele tipo de lesões, tendo posto a hipótese de isso se ter devido aos níveis muito baixos de crómio ligado ao ADN, os quais poderiam ter sido insuficientes para produzir as

alterações conformacionais necessárias para serem detectáveis pelo método experimental usado. Aiyar *et al* [27], por sua vez, usando quantidades elevadas de cromato e de GSH, detectaram este mesmo tipo de lesões, mas em muito pequena quantidade, talvez por se ter, previamente, purificado os reagentes de contaminantes de ferro, que poderiam ter sido os responsáveis pelos resultados positivos obtidos por Kortenkamp *et al*, num estudo semelhante [113]. Também foram detectadas "quebras de cadeias de ADN" (single DNA strand breaks) fazendo reagir directamente com o ADN o composto de Cr(V),  $\text{Na}_4[\text{CrGSH}]_4$  [152,232] e complexos estáveis de Cr(V), do tipo descrito por Rocek *et al* [257,269]. Este resultado suporta as sugestões feitas inicialmente por Jennette *et al* [221] e depois por outros autores [26,61,152,256,270], quanto ao envolvimento de compostos de Cr(V) na geração de "quebras de cadeias de ADN". De qualquer modo, se se sabe que as "quebras de cadeias de ADN" são inibidas pela adição de "scavengers" de radicais hidroxilo [27,134,152], parece viável que estes últimos provoquem a sua ocorrência no decurso da conversão de Cr(VI) a Cr(III), embora nada garanta que os responsáveis pelo seu aparecimento não sejam radicais livres resultantes da decomposição daquele composto de Cr(V) em solução [113]. De notar que a combinação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e cromato também produz "quebras de cadeias de ADN" *in vitro* [27]. Alguns autores, no entanto, apontam para o facto destas lesões resultarem, muito dificilmente, de uma acção directa daqueles compostos sobre o ADN. Aqueles danos genéticos teriam mais hipótese de serem originados por nucleases activadas por processos de reparação de ADN, por sua vez induzidos pelo aparecimento de "ligações cruzadas entre ADN e proteínas" [54].

#### **6.2.4 - Efeitos na membrana**

O Cr(VI), para além da sua acção nas células, nos componentes celulares e no material genético, pode começar por afectar a estrutura e as funções das membranas celulares. Verificou-se com eritrócitos humanos, que o cromato, em concentrações inferiores a 1 mM e a pH neutro, alterava o tamanho e a forma das células, diminuindo a acção do seu anião transportador e provocando modificações nos constituintes das

membranas. Ao reagir com eles, e em especial com constituintes tiólicos, provocava "ligações cruzadas" entre as proteínas da membrana por formação de pontes dissulfureto, S-S. Também se constatou a formação de espécies reactivas de oxigénio, as quais podem, por sua vez, reagir com proteínas e lípidos da membrana celular [240,271]. Foi, no entanto, posta uma hipótese semelhante em relação a compostos de Cr(III), os quais também parecem induzir a formação de componentes reactivos por reacção com as membranas celulares [247].

## **6.2.5 - Localização e ligação do crómio a componentes celulares**

### **6.2.5.1 - Introdução**

O estado de oxidação do crómio é um factor selectivo e crucial na sua localização e consequente ligação, no interior das células. O Cr(III), por exemplo, é transportado pela corrente sanguínea ligando-se às proteínas do plasma (transferina), sem praticamente penetrar nos eritrócitos [239]. Mesmo sob a forma de complexos com ligandos lipofílicos [242], a sua toma pelos eritrócitos é em muitíssimo menor escala que a do Cr(VI) [55]. Este, por sua vez, é reduzido em muito pequena quantidade no plasma, concentrando-se selectivamente no interior dos eritrócitos, onde sofre desactivação metabólica à forma trivalente [67,72,217], ligando-se depois à hemoglobina, já sob a forma reduzida [239].

Intracelularmente, o crómio(III) aparece ligado a uma variedade de constituintes, que podem ser, *in vivo*, após administração intravenosa [11] ou intraperitoneal [220], núcleos das células de alguns órgãos, onde se concentra em quantidades consideráveis ou, *in vitro*, núcleos de células V79, por exemplo [245], núcleos isolados de timo [67,235] ou ainda nucleótidos e ácidos nucleicos, especialmente as regiões destes ácidos ricas em GC [11,68,262,272-274].

A ligação de Cr(III) a nucleótidos naturais, a pH neutro, *in vitro* [68,77,220,260], parece ocorrer via grupos fosfato, tal como é indicado por <sup>31</sup>P-RMN [272,275,276]. Nalguns casos, os átomos dadores das bases podem também estar envolvidos,

dependendo da composição dos pares de bases dos ácidos nucleicos considerados [68, 77], embora esta dependência não esteja em concordância com resultados mais recentes [237]. Mas a formação de complexos de Cr(III) com grupos fosfato é um assunto problemático. Wolf *et al* [272,275] consideraram existir complexação entre o catião metálico e grupos fosfatos do ATP, discutindo mesmo constantes de formação e competição entre ATP e GSH como ligandos, desde que o Cr(III) fosse proveniente da redução de Cr(VI) e estivesse complexado com GSH. *In vitro* e *in vivo* poderiam, assim, existir situações diferentes, devido à quantidade celular de GSH, fazendo pender o equilíbrio, *in vivo*, para a formação de complexos com GSH. A GSH poderia, desse modo, evitar danos no ADN, já que os complexos Cr-ATP causam "quebras de cadeias de ADN" em culturas de células [251] e lesões não especificadas *in vivo* [244]. Kortenkamp *et al* [276], tendo em conta a inércia do Cr(III) e questionando o não terem sido mencionados fenómenos de hidrólise, a pH fisiológico, associados às espécies hexaquacrómio(III), consideraram improvável a formação daqueles complexos. Num trabalho análogo, também por <sup>31</sup>P-RMN, obtiveram evidência da ligação de Cr(III) aos grupos fosfato do ATP, mas apenas na forma de complexos de esfera externa, isto é, por atracção electrostática. Fazendo reagir alguns complexos de Cr(III) de composição definida com ATP, observaram interações acentuadas, especialmente quando a carga dos mesmos é positiva e elevada. Neste contexto, reportam-se a recentes observações de que complexos tripositivos ou de carga superior podem provocar condensação do ADN, por neutralização da carga dos grupos fosfato (Ver Secção seguinte) [277-279]. Num trabalho mais recente [237], concluiu-se que o Cr(III) dá origem a "ligações cruzadas entre ADN e proteínas" por formação de complexos com os resíduos mais reactivos de algumas proteínas (por exemplo, cisteína, tirosina e histidina). Os aductos formados ligam-se, então, ao "esqueleto de fosfato" do ADN.

#### **6.2.5.2 - Formação de complexos de Cr(III) com ADN**

*In vitro*, o Cr(III) forma complexos com o ADN. Num trabalho recentemente publicado nesta área [274], descreve-se a formação de complexos deste tipo, com

diferentes estequiometrias. Um deles, um complexo do tipo  $BA_{20}$  (A: nucleótidos de ADN, B: Cr(III)), pode formar-se para concentrações metal/ligando análogas às do meio fisiológico (neste caso, foi usado um pH bastante menor, 4.8, no sentido de evitar a presença de hidróxido-espécies de crómio(III)). Este complexo parece ser a espécie predominantemente formada em concentrações ultravestigiais de Cr(III) ( $B < 0.01\% A$ ). Foi aventada a hipótese de que possa ficar "encurralado" no interior de uma "anxa" (groove) da estrutura do ADN (uma "anxa" é formada por cerca de 20 nucleótidos e corresponde a uma volta da estrutura do  $\beta$ -ADN), permitindo-lhe assim interagir com uma vasta área do ADN. Esta espécie pode, por isso, ser usada como modelo na discussão de mecanismos moleculares da carcinogénese de crómio, salvaguardando o facto da sua formação ser certamente sensível ao pH [236]. No mesmo trabalho, foram detectados outros complexos do tipo BA e  $BA_2$ , que parecem ser de natureza electrostática (de esfera externa), pois as respectivas constantes de estabilidade (do complexo BA, pelo menos) diminuem com o aumento da força iónica do meio [274,280].

A teoria de Manning [277] propõe que para forças iónicas baixas, uma determinada concentração de iões multivalentes (normalmente de carga +3 ou superior) provoque a condensação, ou o também chamado colapso, do ADN, por efeito de contração entre os catiões e os grupos fosfato ou as bases. Em solução, a condensação do ADN pode então ocorrer quando uma fracção crítica da carga fosfato-ADN é neutralizada por catiões adsorvidos ao ADN. A intercalação de catiões metálicos no ADN tem sido, aliás, bastante estudada [279], sugerindo-se que seja do tipo "ligação cruzada" electrostática, por ponte, efectuada entre catiões trivalentes, ou de carga superior, e grupos fosfato, em segmentos adjacentes de ADN [278]. Devido à alta densidade de carga na dupla hélice de ADN, os contra-íões serão adsorvidos da solução até que a carga negativa total seja reduzida a um valor limite que depende só da valência do contra-íão (exemplos com  $[Co(NH_3)_6]^{3+}$  e  $[Co(en)_3]^{3+}$ ) [278]. Embora as características estruturais de cada íon sejam importantes, se não ocorrerem reacções de substituição, a ligação destes complexos ao ADN pode ser relativamente independente do centro metálico. Pode então ser útil agrupar os complexos em classes de compostos

isomorfos, mesmo de metais diferentes, para explicar estes efeitos do tipo electrostático [276,281],

### **6.2.6 - Considerações finais**

A pesquisa no âmbito dos mecanismos associados ao metabolismo intracelular do crómio e à genotoxicidade induzida por este elemento necessita de ser continuada e extensiva a diferentes áreas.

O cromato pode ser considerado como uma "toxina" ambiental complexa, capaz de provocar diferentes efeitos no metabolismo e na genotoxicidade celular. Actuando de maneira análoga a numerosos carcinogénicos orgânicos, o crómio requer uma "activação celular" prévia, reagindo depois com muitos dos constituintes celulares. Tal como muitos dos compostos xenobióticos que são metabolizados por enzimas do tipo do citocromo P-450, o cromato pode alterar a expressão genética destas enzimas e interferir no metabolismo celular de oxidação. Os danos genotóxicos induzidos pelo crómio são pois complexos e não estão completamente determinados. A compreensão dos mecanismos da genotoxicidade do crómio é fundamental para o entendimento da toxicidade deste elemento e requer investigação continuada e coordenada em química inorgânica, em bioquímica e em biologia celular [11,72,237,252].

### **6.2.7 - Alguns exemplos da acção específica de compostos de Cr(III) sobre células e componentes celulares**

Antes de passarmos à apresentação e discussão dos resultados obtidos no estudo experimental da acção de compostos de crómio(III) sobre núcleos isolados de células de timo de vitela, far-se-à uma breve referência a alguns casos mais relevantes referidos na literatura mais recente sobre a interacção directa de compostos de Cr(III) com células ou componentes celulares. Na Tabela 6.2 é feito um resumo dos estudos dessas interacções.

| Composto   | Material biológico                          | Ligação a células ou a componentes celulares (técnica usada)   | Danos genéticos   | Ref <sup>a</sup> |
|--|---|--|---|------------------|
| CrCl <sub>3</sub> , comercial  | <i>in vivo</i> (injeção intraperitoneal)    | Liga-se à cromatina, associado a proteínas e ao ADN. Aparentemente não provoca lesões                        | ---   | [220]            |
| CrCl <sub>3</sub> ou [Cr(H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> | Núcleos isolados de timo de vitelo          | Ligação aos núcleos dependente da concentração e do tempo de incubação                                       | "ligações cruzadas" na cromatina e/ou no ADN, em especial "ligações cruzadas entre ADN e proteínas" | [235]            |
| CrCl <sub>3</sub>  | Núcleos isolados de células de vários tipos | ---  | "ligações cruzadas com ADN" e "quebras de cadeia de ADN"  | [262]            |
| [Cr(H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>                      | Núcleos isolados de timo de vitelo          | Ligação aos núcleos dependente da concentração e do tempo de incubação                                       | "ligações cruzadas entre ADN e proteínas" e "quebras de cadeia de ADN"                              | [244]            |
| [Cr(H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>                      | células V79 (Teste de mutagênese HGPRT)     | Mutagênese não significativa   | ---   | [54]             |
| [Cr(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ] <sup>3+</sup>                                     | ATP   | Composto de esfera externa com ATP; pequena reprodutibilidade por provável formação de hidróxidos insolúveis | ---   | [276]            |
| [Cr(gly) <sub>3</sub> ]  | Núcleos isolados de timo de vitelo          | Ligação aos núcleos dependente da concentração e do tempo de incubação                                       | "ligações cruzadas entre ADN e proteínas" e "quebras de cadeia de ADN"                              | [244]            |
| [Cr(gly) <sub>3</sub> ]  | células V79 (Teste de mutagênese HGPRT)     | Não apresenta mutagênese   | ---   | [244]            |
| [Cr(gly) <sub>3</sub> ]  | ATP   | Composto de esfera externa com ATP; pequeno desvio químico: complexo de natureza polar                       | ---   | [276]            |
| [Cr(gly) <sub>3</sub> ]  | Eritrócitos humanos                         | Toma dependente do tempo de incubação  |   | [55]             |

|  |  |  |     |          |
|--|--|--|-----|----------|
| $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$      | Eritrócitos humanos                      | Toma dependente do tempo de incubação  |     | [55]     |
| $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$      | células V79 (Teste de mutagénesse HGPRT) | Mutagénesse significativa  | --  | [54]     |
| $[\text{Cr}(1,10\text{-phen})_2\text{Cl}_2]^+$ | Eritrócitos humanos                      | Toma dependente do tempo de incubação  |     | [55]     |
| $[\text{Cr}(1,10\text{-phen})_2\text{Cl}_2]^+$ | células V79 (Teste de mutagénesse HGPRT) | Mutagénesse significativa  | --  | [54,244] |
| $[\text{Cr}(\text{en})_3]^{3+}$                | ATP                                      | Composto de esfera externa com ATP; Resultados análogos a $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ mas reprodutíveis; dependência linear da concentração do complexo             | --- | [276]    |
| $[\text{Cr}(1,10\text{-phen})_3]^{3+}$         | ATP                                      | Composto de esfera externa com ATP; pequenos desvios, embora a altura dos picos aumente consideravelmente em relação a soluções sem crômio; lig. hidrófobos, complexos volumosos | --- | [276]    |
| $[\text{Cr}(\text{bipy})_3]^{3+}$              | ATP                                      | idem   | --- | [276]    |
| $[\text{Cr}(\text{GSH})_2]^{2-}$               | Núcleos isolados de timo de vitelo       | Ligação aos núcleos dependente do tempo de incubação   | --  | [67]     |
| $[\text{Cr}(\text{GSH})_2]^{2-}$               | ATP                                      | Composto de esfera externa com ATP; Desvios químicos muito pequenos  | --- | [276]    |
| $[\text{Cr}(\text{GSH})_2]^{2-}$               | Eritrócitos humanos                      | Toma dependente do tempo de incubação  | --- | [55]     |
| $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$                  | Eritrócitos humanos                      | A toma não é claramente dependente do tempo de incubação   | --- | [55]     |
| $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$                  | ATP                                      | Composto de esfera externa com ATP; Desvios químicos pequenos; alguma hidrólise do complexo, com formação de espécies neutras  | --- | [276]    |
| $[\text{Cr}(2,4\text{-aac})_3]$                | Eritrócitos humanos                      | Toma dependente do tempo de incubação  | --  | [55]     |

Tabela 6.2 - Alguns exemplos relevantes de interações de compostos de Cr(III) com células ou componentes celulares; \* desvios químicos de  $^{31}\text{P}$ -RMN

Warren et al [242] testaram uma série de complexos de Cr(III) com ligandos inorgânicos, segundo o critério de os ligandos serem semelhantes a muitas moléculas biológicas (ou ambientais), em tamanho, reactividade e propriedades de transporte. Alguns deles, os que possuem aminas aromáticas como ligandos, têm carga +1 ou +2 e ligandos mais lábeis, normalmente em configuração *cis*, apresentam toxicidade genética apreciável (Teste de Ames) [6,242]. Parecem de algum modo, ser característico desses compostos o terem massa molecular moderada (< 500 Da), carga eléctrica pouco elevada ou nula, estabilidade em relação a reacções de hidrólise, relativa inércia cinética e serem lipofílicos (condição necessária para a toma do complexo por células vivas [11, 72,241]). Kortenkamp *et al* [55] investigaram a ligação e a toma de uma série de complexos de Cr(III) por eritrócitos humanos. Todos eles entram significativamente nas células (muito mais lentamente que os compostos de Cr(VI)), dependendo do tempo de incubação, com excepção do complexo de Cr(III) com cisteína, que se liga principalmente à membrana celular (sedimenta com a membrana, após hemólise dos eritrócitos), eventualmente devido à presença naquele complexo da ligação Cr-S [79]. Neste grupo de compostos foi detectada apenas uma pequena correlação entre a toma de crómio e a carga ou a hidrofobicidade dos ligandos. A toma de CrCl<sub>3</sub> por núcleos isolados de timo de vitelo é dependente da concentração do composto e do tempo de incubação, tendo sido estudada por Köster *et al* [235], também detectaram a formação de "ligações cruzadas entre ADN e proteínas". Kortenkamp *et al* [67] obtiveram o mesmo tipo de resultados com um complexo de Cr(III) com glutathiona [126], usando o mesmo tipo de material biológico. Beyersmann *et al* [244], ainda com o mesmo tipo de material biológico ou com células V79 de ratos (Chinese Hamster) , ou com estas últimas e ADN isolado [54] testaram também alguns complexos de Cr(III). Os resultados obtidos no primeiro caso foram mais uma vez análogos aos obtidos nos trabalhos referidos anteriormente, verificando-se a produção de "ligações cruzadas entre ADN e proteínas" e de "quebras de cadeias de ADN", resultantes da acção dos complexos de Cr(III) com os núcleos isolados. Com ADN isolado, no entanto, foi nulo o resultado da interacção de compostos de Cr(III), ou de Cr(VI) sem a presença de redutores [54,67]. Aqueles

autores [244] propuseram um modelo para as "ligações cruzadas entre ADN e proteínas, em termos de ligações semelhantes às existentes entre as moléculas de crómio e colagénio, no processo de curtimento das peles [205]. Nesta reacção, o Cr(III) liga-se, provavelmente, aos grupos carboxílicos laterais do colagénio estabelecendo também ligações cruzadas entre proteínas e complexos ou hidroxocomplexos polinucleares.

### **6.3 - Interação de compostos de coordenação de Cr(III) com núcleos isolados de timo de vitelo**

O estudo da interacção de complexos de Cr(III) com componentes celulares tem como objectivo investigar se estes compostos se ligam de modo significativo a núcleos de células e, se possível, estabelecer uma relação entre a toma e a natureza destes compostos.

Foram testados os seguintes complexos:  $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$ ,  $[\text{Cr}(\text{pen})_2]^-$ ,  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$ ,  $[\text{Cr}(\text{Hedta})(\text{H}_2\text{O})]$ ,  $[\text{Cr}(\text{hist})_2]^+$ ,  $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$  (ião complexo de Cr(III) contido em  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ),  $[\text{Cr}(\text{en})_3]^{3+}$  e  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (cloreto de crómio comercial), que foi utilizado como controle e que, em solução, está presente, predominantemente, na forma *trans*- $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ . Não foi possível estudar, neste trabalho, o comportamento do complexo  $[\text{Cr}(\text{L-hist})_2(\text{D-pen})_2]$ , por não ser solúvel na solução tampão utilizada.

Embora as estruturas dos complexos de Cr(III) isolados após administração de crómio(VI), *in vivo*, apontem para uma mistura de ligandos coordenados ao catião central [55], alguns dos complexos usados neste estudo podem ser tomados como modelos adequados daquele tipo de complexos, que possam ser formados, *in vivo*. Referimo-nos, em especial, aos complexos  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$  e  $[\text{Cr}(\text{hist})_2]^+$ .

Os núcleos utilizados neste estudo foram previamente extraídos e isolados de células de timo de vitelo, um material biológico acessível, por um processo experimental que permite a sua obtenção de forma intacta [235]. A quantidade de crómio (crómio total) que ficou ligado a esses mesmos núcleos, após incubação com o conjunto de complexos de Cr(III) referidos, com ou sem agitação durante este processo,

foi determinada por espectrofotometria de A. A. com atomização electrotérmica.

O método experimental seguido é descrito detalhadamente no Cap. 7 - Secção D.

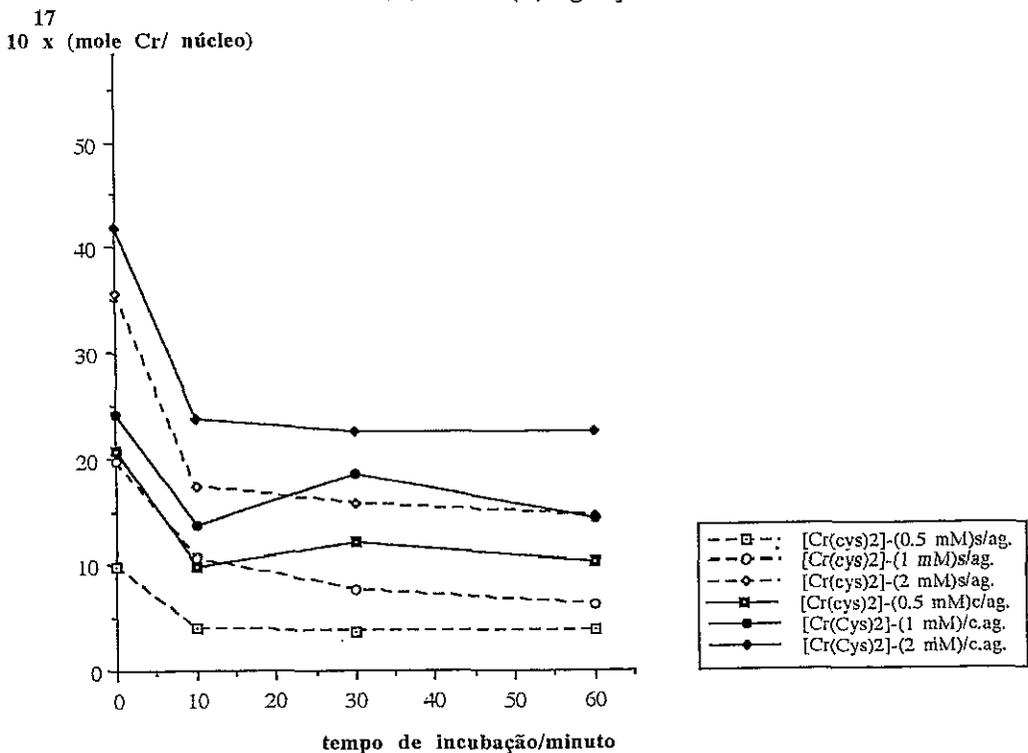
### 6.3.1 - Resultados

Numa 1ª série de experiências, os núcleos foram incubados, em repouso, com os complexos de Cr(III). Posteriormente, realizou-se uma 2ª série de experiências, com agitação mecânica da mistura em reacção, durante o tempo de incubação.

Na Figura 6.1-a e b estão representadas a toma pelos núcleos, de dois dos complexos estudados.

A quantidade de crómio que se liga aos núcleos depende de, durante o tempo de incubação, os núcleos terem ou não sido agitados mecanicamente, sendo mais elevada no primeiro caso, como se pode observar na Figura.6.1. Pode observar-se também (Figuras 6.1-a e b e 6.2), que a quantidade de crómio ligada aos núcleos depende do composto usado e, de um modo geral, aumenta com a concentração inicial do complexo

(a) Comparação da toma de [Cr(cys)2]- com ( ) e sem (--) agitação mecânica



(b) Comparação da toma de  $[\text{Cr}(\text{en})_3]^{3+}$  com e sem agitação mecânica

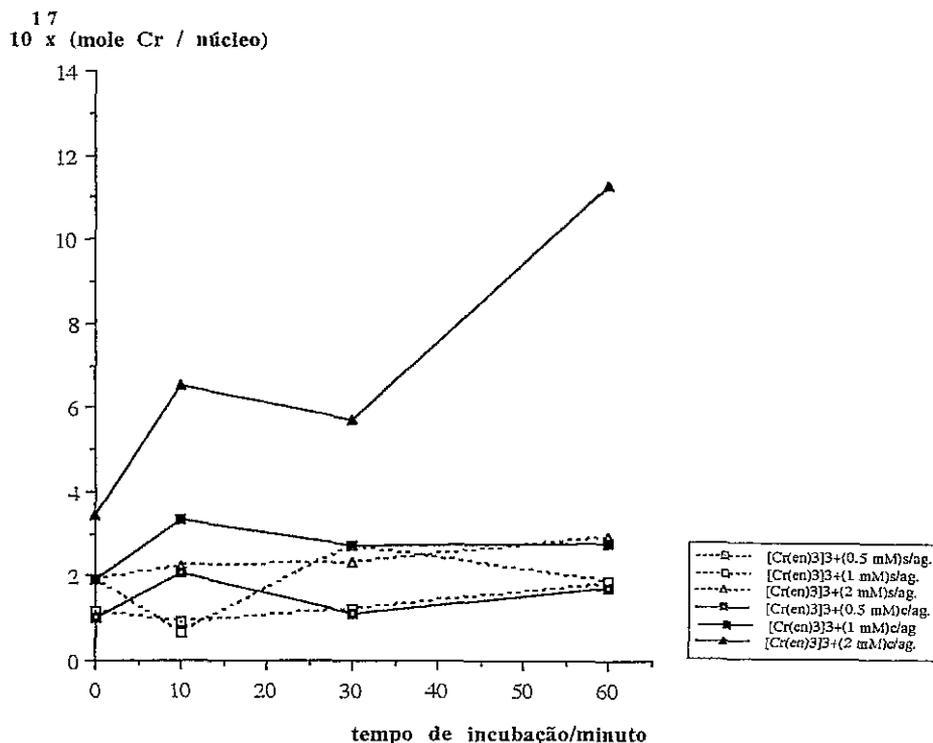
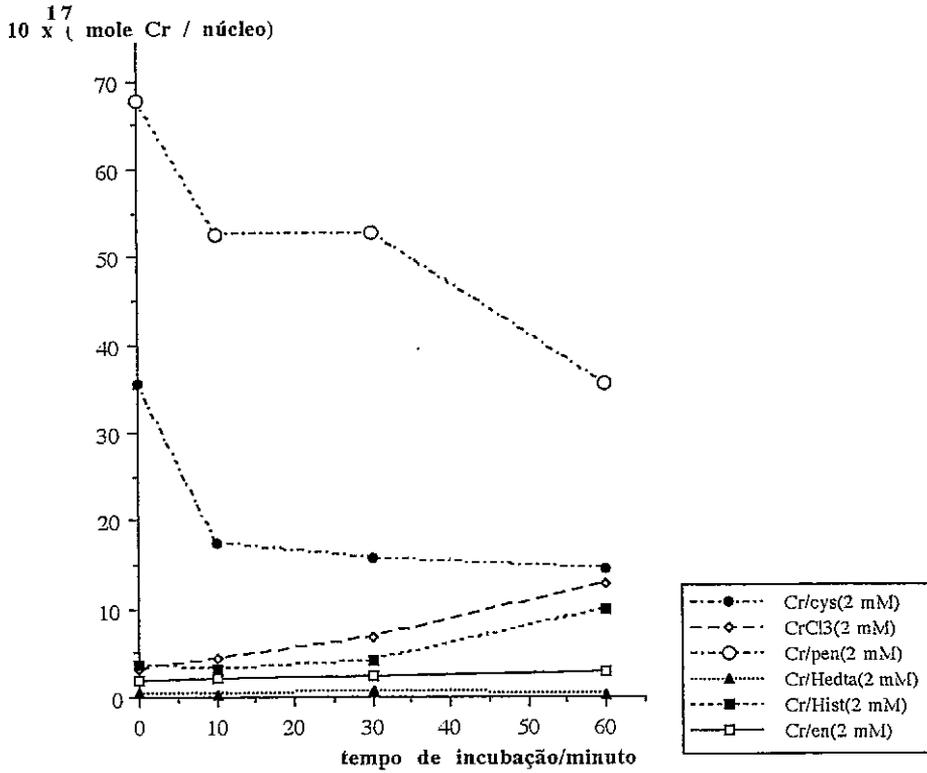


Figura 6.1 - Toma de: a) -  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$  e b) -  $[\text{Cr}(\text{en})_3]^{3+}$ , por núcleos isolados de timo de vitelo (tempos de incubação e concentrações iniciais dos complexos referidas na figura; as linhas definidas nos gráficos unem pontos correspondentes à mesma concentração de complexo para tempos de incubação diferentes: (—) com agitação, (---) sem agitação; unidades de toma " $10^{17} \times$  mol de Cr / núcleo"

e com o tempo de incubação das amostras, quer as experiências se tenham efectuado com ou sem agitação. Exceptuam-se os resultados obtidos com os complexos  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$  e  $[\text{Cr}(\text{pen})_2]^-$ , para os quais, depois de uma toma imediata, muito elevada não só em relação aos tempos de incubação mais prolongados como também à verificada com os outros complexos (Figuras 6.2-a e b), se observa uma diminuição brusca daquela quantidade, atingindo-se um patamar a partir do segundo tempo de incubação (10 minutos), que acaba, no caso do complexo  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$ , por corresponder a valores de toma semelhantes aos dos compostos que se "ligaram" em maior quantidade, isto é  $[\text{Cr}(\text{his})_2]^+$  e " $\text{CrCl}_3$ " (Figuras 6.1-a e 6.2-a). Com o ião complexo  $[\text{Cr}(\text{pen})_2]^-$  não se conseguiram resultados reprodutíveis para todos os ensaios efectuados, "fugindo" algumas vezes ao padrão de comportamento encontrado para o

(a) Comparação da toma dos diferentes complexos de Cr(III) - sem agitação



(b) Comparação da toma de diferentes complexos de Cr(III) (2mM): núcleos com agitação mecânica

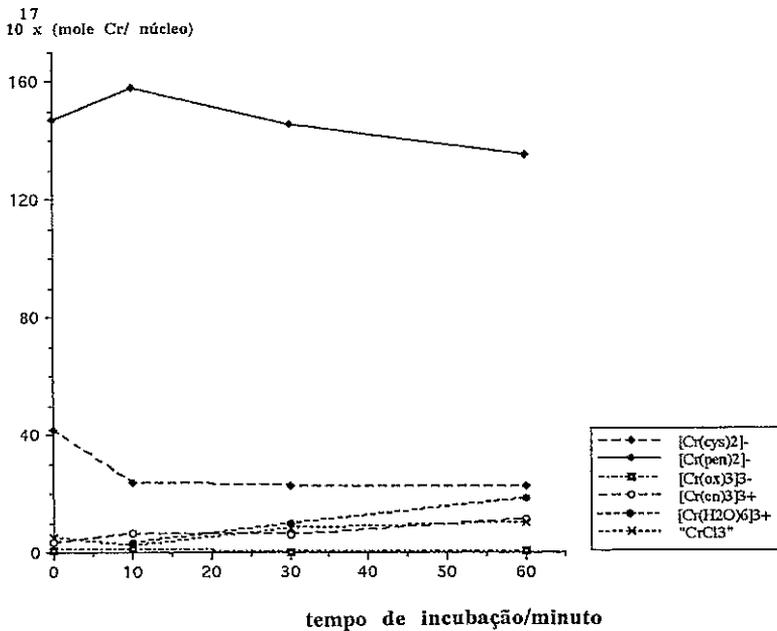


Figura 6.2 - Quantidade de crómio ligada aos núcleos após incubação com uma série de complexos de Cr(III); unidades de toma  $10^{17} \times \text{mol de Cr/núcleo}$ ; ver legendas inseridas nas figuras: a)-com e b)-sem agitação durante a incubação

complexo  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$ . A respectiva toma, ao fim de 60 minutos de incubação, embora seja inferior aos valores iniciais, é ainda maior que a verificada para todos os outros compostos, incluindo o  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$ .

No entanto, como para alguns dos compostos, a toma foi diminuta (Figura 6.3) não se nos apresentou fácil concluir (Ver Tabela 7.D.1 no Capítulo 7-Secção D), se houve ou não variação na toma do composto ao longo do tempo de incubação, já que, perante os erros associados a cada determinação, um aumento ou diminuição daquelas quantidades pode ser apenas aparente.

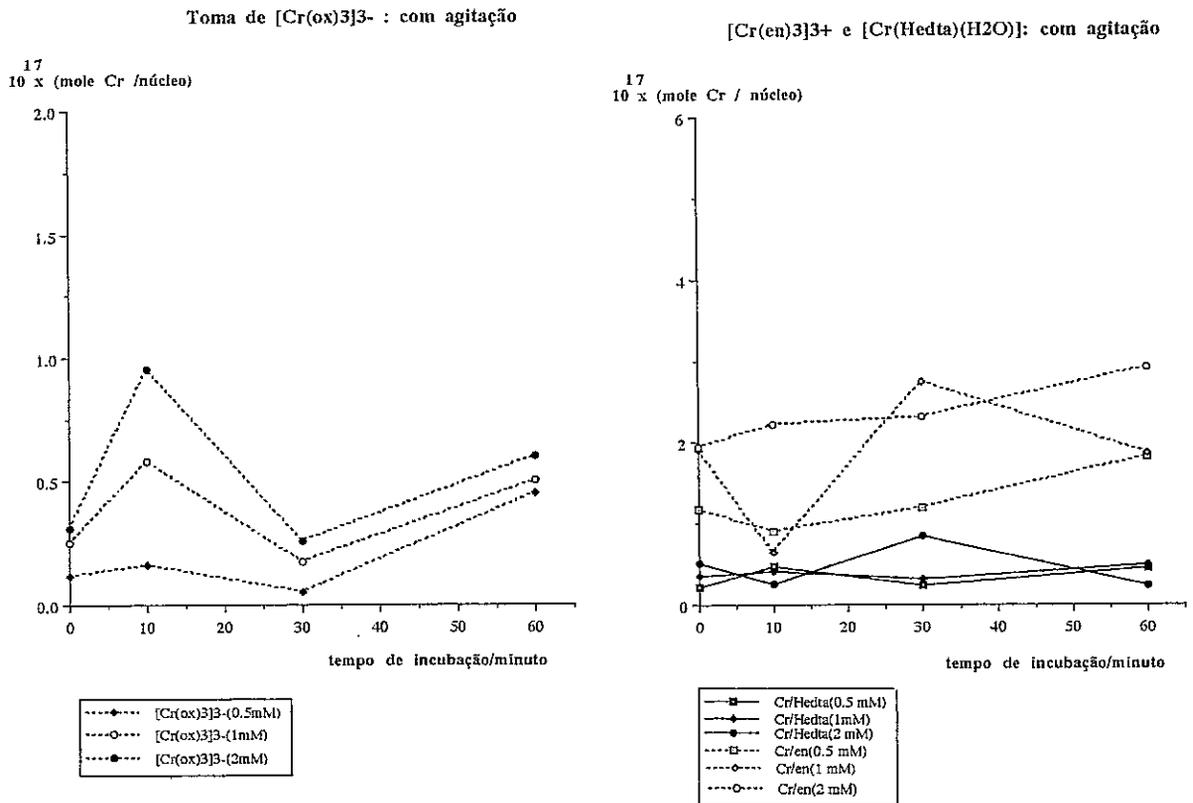


Figura 6.3 - (a)-Toma dos compostos  $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$  (com agitação) e toma de (b)-  $[\text{Cr}(\text{en})_3]^{3+}$  e  $[\text{Cr}(\text{Hedta})(\text{H}_2\text{O})]$  (sem agitação)

### 6.3.2 - Discussão dos resultados

Como foi repetidamente focado na revisão bibliográfica que iniciou este Capítulo, o Cr(VI) atravessa as membranas das células. E qualquer que seja o mecanismo que explique a redução intracelular do Cr(VI), a espécie de crómio final,

estável, é o Cr(III). Estudos recentes mostraram que o Cr(III) era a forma de crómio que estava ligada ao ADN e a proteínas nucleares após incubação de Cr(VI) com células ou com redutores, *in vitro* [114,237,238,264]. Em ensaios com componentes subcelulares, e em especial com núcleos isolados, alguns compostos de Cr(III) ligaram-se eficientemente a estes últimos [67,235,238], provocando a formação de "ligações-cruzadas entre ADN e proteínas" e a "quebra de cadeias de ADN" [235,237,244,262], enquanto o Cr(VI) é muito menos activo naqueles efeitos, a não ser quando em presença de redutores, uma vez que a redução de Cr(VI) é sempre um pré-requisito para a formação de aductos de crómio com constituintes dos núcleos das células [55,61,67,276]. Tsapakos *et al* [68] sugeriram dois mecanismos possíveis para a formação dos danos induzidos pelo Cr(VI) no ADN. Um, mediado por intermediários resultantes da redução de Cr(VI) e outro, presumivelmente mais lento, por complexos de Cr(III) cineticamente inertes. Contudo, Köster e Beyersmann [235] verificaram que, após apenas 15 minutos de incubação, se observavam níveis elevados de complexos de Cr(III) ligados a núcleos isolados, em contradição com os resultados daqueles primeiros autores [68]. No caso da redução de Cr(VI) por tióis, a quantidade de crómio que se liga ao ADN é fortemente dependente do redutor tiólico usado, sendo muito sensível ao ambiente que rodeia o grupo sulfidrílico e à quantidade destes grupos. De um conjunto de quatro redutores (glutathiona, cisteína,  $\beta$ -mercaptoetanol e ditioneitol) este último foi muitíssimo mais eficiente no aparecimento de quantidades elevadas de aductos de crómio com ADN, após redução de Cr(VI) *in vitro*, na presença de ADN isolado [61].

Neste trabalho, os complexos estudados ligaram-se rapidamente aos núcleos, dependendo as respectivas quantidades de crómio ligadas, das concentrações iniciais respectivas, do tempo de incubação e da reacção se processar com ou sem agitação. A capacidade de ligação dos complexos aos núcleos parece ser relativamente elevada pois, nunca se atingiu saturação, até concentrações iniciais de 2 mM, com nenhum dos complexos. No entanto, quando a toma do complexo de crómio é muito pequena (e, aparentemente quase constante), não é possível distinguir de forma clara se houve variação daquelas quantidades com o tempo de incubação (Figura 6.1-b e 6.3-a). De

qualquer modo, a dependência entre a toma de qualquer dos complexos e a concentração inicial dos mesmos ou o tempo de incubação pode ser facilmente explicada, qualquer que seja o mecanismo de entrada ou o tipo de ligação, desde que não se atinja uma situação de saturação.

Como era de esperar, quando a incubação se processa com agitação, provoca-se um maior contacto entre os núcleos e a solução que contém o complexo, evitando a sedimentação daqueles, observando-se, portanto, quantidades de crómio ligadas sempre um pouco superiores no primeiro caso (foram tidos em conta os desvios padrão dos valores determinados) (Ver Tabela 7.D.1, Capítulo 7 - Secção D). Uma vez que este factor interfere apenas com a quantidade total de crómio ligado, não alterando o tipo de "comportamento" do complexo, independentemente do modo como as experiências foram efectuadas, o conjunto de resultados obtidos permite-nos, "grosso modo", agrupar os compostos testados, atendendo às características seguintes: carga de cada complexo, quantidade de crómio que se liga aos núcleos e variação da toma com o tempo de incubação. Assim:

1) - Compostos com carga neutra,  $[\text{Cr}(\text{Hedta})(\text{H}_2\text{O})]$  (Figura 6.3-b), bem como compostos com carga fortemente negativa,  $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$  (Figura 6.3-a), praticamente não se ligaram aos núcleos.

2) - Os complexos com carga positiva,  $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ ,  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $[\text{Cr}(\text{en})_3]^{3+}$ , apresentaram, ao longo dos vários tempos de incubação, um "padrão" de ligação semelhante entre si, do mesmo tipo do já referido na literatura para o segundo daqueles compostos [235], isto é, com aumento da quantidade de crómio ligada com o aumento da concentração inicial do complexo e do tempo de incubação. O mesmo se verificou com o complexo  $[\text{Cr}(\text{hist})_2]^+$ , também de carga positiva (+1), (Figura 6.4). Aparentemente, nenhum dos dois primeiros complexos deu origem, em solução, à formação de quaisquer hidroxio-espécies, sob a forma de sólidos, como por vezes é referido na literatura [238,276].

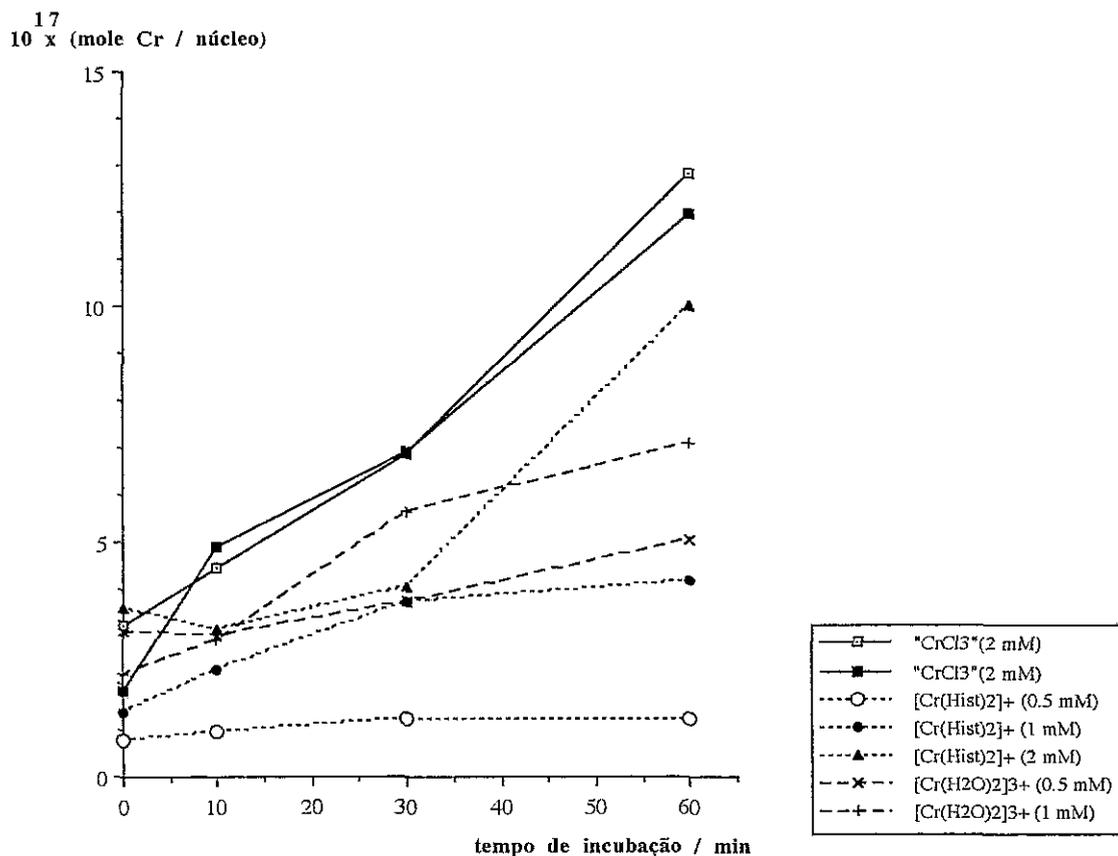


Figura 6.4 - Comparação entre as tomas de  $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ ,  $[Cr(hist)_2]^+$ ,  $[Cr(H_2O)_6]^{3+}$  e  $[Cr(en)_3]^{3+}$ , por núcleos isolados de timo de vitelo (complexos com várias concentrações iniciais)

3) - Para os compostos com carga negativa -1,  $[Cr(pen)_2]^-$  e  $[Cr(cys)_2]^-$ , a quantidade de complexo que se liga aos núcleos apresentou um valor máximo no ponto inicial, sem ainda ter havido incubação, diminuindo depois para um valor que se conservou praticamente constante durante os 60 minutos de tempo máximo de incubação que experimentámos.

A entrada, nos núcleos, dos complexos de Cr(III) aqui estudados pode ter-se processado através dos poros da membrana celular, por mecanismos que respondam a gradientes de concentração, ou por mecanismos passivos de transporte. Dependendo da carga global do complexo, esta entrada pode ser facilitada ou impedida por efeitos de repulsão da própria membrana. Não tendo sido removidos, pelas sucessivas lavagens após o período de incubação (Ver Capítulo 7 -Secção D), a ligação dos complexos aos núcleos não deverá, por conseguinte, consistir somente numa adsorção à membrana nuclear, devendo estabelecer-se algum tipo de ligação química. Os complexos poderão

ficar ligados a constituintes da membrana, especialmente a proteínas, embora a extensão dessa ligação vá depender da cinética de substituição de cada um deles, a menos que a ligação que se estabeleça seja de natureza puramente electrostática. Neste caso, os complexos com carga positiva deveriam ser, em princípio, aqueles com maior afinidade para se ligarem à membrana e, de modo tanto mais eficiente, quanto mais elevada fosse a carga do complexo. Pelas mesmas razões, os complexos de carga neutra ou negativa deveriam ser repelidos. Ainda pelos mesmos motivos, uma vez no interior dos núcleos aqueles complexos poder-se-ão ligar a proteínas e ou ao ADN. Os complexos com carga positiva podem estabelecer interações com os grupos fosfato do ADN, formando, provavelmente, complexos do tipo de esfera externa, como também já comentámos em relação a um trabalho recentemente publicado sobre o assunto [276]. Os complexos de carga negativa, por sua vez, se entretanto (durante o processo de incubação) não sofrerem alterações muito significativas, poderão, eventualmente, interagir com as histonas, as quais, sendo ricas em lisina e em arginina, possuem zonas carregadas positivamente. Mas como as histonas também possuem grupos -SH livres, há, de igual modo, a hipótese de se verificarem reacções de substituição com os referidos complexos, mais difíceis de "desfazer" no caso do complexo com penicilamina, cuja cinética, de um modo geral, é mais lenta. Esta hipótese não explica, porém, a fraca ligação do complexo tris(oxalato)cromato(III), com carga negativa (-3), o que leva a supôr que ele é fortemente repellido pela membrana e não entra nos núcleos de modo significativo. E, sendo assim, talvez pressuponha que se tenha estabelecido um qualquer equilíbrio, do tipo reversível de abertura-fecho de ligações Cr-S, no caso dos complexos  $[\text{Cr}(\text{pen})_2]^-$  e  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$ , mais lento para este primeiro composto (Ver Figura 6.2-a e Capítulo 4). Como ambos os complexos (sem os núcleos) se mantiveram estáveis em solução, à temperatura e durante o tempo de incubação das experiências, aquele comportamento não pode ser explicado por eventuais alterações estruturais, devidas a hidrólise provocada pelo meio em reacção, capazes de conduzir à formação de outros complexos, provavelmente neutros ou mesmo positivos. Ambos os complexos possuem uma estrutura octaédrica distorcida, com os dois ligandos na forma tridentada,

coordenados por três átomos dadores diferentes (N, O e S), tendo cada um deles duas ligações Cr-S em posição *trans* [78,148]. Estas ligações têm-se mostrado extremamente lábeis, quando comparadas com qualquer outra ligação Cr-X, sofrendo hidrólise rápida em solução aquosa a pH próximo de 7, por abertura da ligação Cr-S (Ver Capítulo 4, Secção 4.3.4.3). Na interacção daqueles compostos com os núcleos pode então haver possibilidade de se estabelecerem ligações entre estes complexos e constituintes da membrana celular, por reacções que não cheguem a atingir o equilíbrio (termodinamicamente instáveis, portanto). Os valores de taxa muito mais elevados nos tempos iniciais (sem incubação), os quais, aliás, também já foram observados, embora em menor escala, na interacção de eritrócitos com complexos que seguem diversos "modelos" de comportamento, ao longo do tempo [55], podem, de algum modo, ser interpretados à luz da hipótese posta na discussão anterior, de haver interacção daqueles compostos com a membrana. Equilíbrios de competição, de formação de outras ligações com o crómio, por exemplo, com átomos dadores das proteínas da membrana (que constituem 75% das mesmas) podem ser estabelecidos rapidamente, e, devido à labilidade da ligação Cr-S, voltar a "libertar" os complexos, já não necessariamente sob a forma inicial, após se ter atingido o equilíbrio (a abertura de anel Cr-S é uma reacção praticamente reversível, nas condições de pH estudadas [78,79,151]). Os resíduos de cisteína coordenada também poderão estar envolvidas na formação de ligações S-S, por ponte, que são estabelecidas e desfeitas com facilidade em processos redox, em sistemas biológicos [106].

O comportamento invulgar do bis(cisteinato)cromato(III) e do penicilaminato, em termos de taxa em função do tempo de incubação, já tinha sido observado para o primeiro num estudo efectuado com eritrócitos [55], onde foi explicado por uma ligação preferencial do complexo à membrana daquelas células, o que interferiria na quantidade do composto entrada nas mesmas. Todavia, se se representarem, graficamente, as quantidades daquele complexo que se ligaram aos eritrócitos em função do tempo de incubação (segundo os resultados de uma tabela, no referido trabalho), obtém-se, curiosamente, um "perfil" idêntico ao que resultou da interacção deste mesmo

composto, com os núcleos isolados (Figura 6.5).

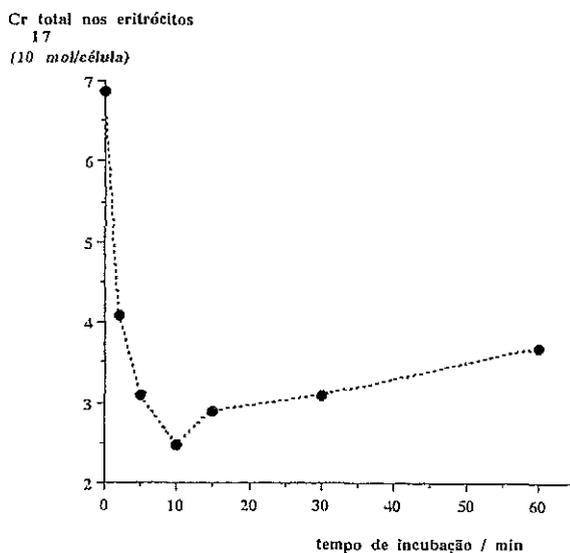


Figura 6.5 - Ligação do ião complexo  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$  a eritrócitos, em função do tempo de incubação; representação gráfica a partir dos dados da Tabela I [55]

É necessário referir que, muito recentemente [238], foi estudada a interação de alguns complexos de Cr(III), incluindo o  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$ , com núcleos de esperma de salmão, não tendo sido obtido o "padrão" de comportamento que foi observado no nosso trabalho. No entanto, também aí não se conseguiu estabelecer qualquer relação aparente entre a carga e a toma dos diferentes complexos, parecendo apenas que, a ligação aos núcleos, depende fundamentalmente da labilidade dos ligandos coordenados ao crómio, em determinados complexos de Cr(III).

#### 6.4 - Resumo e considerações finais

i) - Apesar de os complexos com carga positiva, em geral, se ligarem aos núcleos de um modo dependente da concentração inicial e do tempo de incubação, não se verificou uma relação directa entre a carga do complexo e aqueles dois factores.

ii) - Os complexos com carga negativa não se ligam aos núcleos de modo significativo, excepto os que possuem ligações Cr-S, as quais, eventualmente, por serem muito lábeis lhes podem conferir capacidade de participar em reacções de substituição, rápidas, que poderão envolver mecanismos complexos, e ainda desconhecidos.

iii) - O factor cinético não pode ser o único responsável pelo comportamento comentado em ii), pois também se sabe que o complexo neutro  $[\text{Cr}(\text{Hedta})(\text{H}_2\text{O})]$  pode sofrer reacções de substituição rápidas em face de ligandos aniónicos [205] e não apresenta o mesmo tipo de comportamento que os complexos com cisteína e com penicilamina.

iv) - Os compostos com a ligação Cr-S parecem apresentar uma certa especificidade de reacção, a qual pode ter grande importância a nível da química bioinorgânica, tanto mais que foram detectadas quantidades elevadas de  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$  em sistemas *in vitro*, após redução de cromato com cisteína [61,113,114,276].

As hipóteses que se apresentaram até agora são, na sua maioria, especulativas. Será, pois, necessário efectuar muito mais trabalho experimental, no âmbito e na continuação do já realizado, no sentido de determinar a quantidade de crómio ligado ao ADN após a toma pelos núcleos, por isolamento do ADN desses núcleos incubados e, nomeadamente, identificar os locais de ligação preferenciais de qualquer um destes complexos, à semelhança de alguns trabalhos que recentemente têm vindo a ser publicados [238,248,252,254,259,264].

## **7. Parte experimental**

Neste capítulo faz-se a descrição, tão detalhada quanto a julgada necessária, das operações de índole experimental levadas a cabo ao longo do trabalho que conduziu à escrita desta tese. O Capítulo está dividido em Secções (A, B, C e D), que correspondem a cada um dos Capítulos da tese que incluem trabalho experimental (Capítulo 3 - A; Capítulo 4 - B; Capítulo 5 - C e Capítulo 6 - D).

### **7.A - Parte experimental correspondente ao Capítulo 3**

#### **7.A.1 - Estudos cinéticos de reacções de redução de Cr(VI) por tióis**

##### **7.A.1.1 - Estudos cinéticos por espectrofotometria de UV/Vis: redução de Cr(VI) pela glutathiona**

###### **7.A.1.1.1 - Reagentes e equipamento**

As experiências foram efectuadas usando como reagentes de partida  $K_2Cr_2O_7$  (Merck) e GSH reduzida (Sigma). Utilizou-se um espectrofotómetro de UV/Vis

VARIAN DMS 600, tendo os espectros sido adquiridos à velocidade de 500 nm/min, com correção de linha de base (células de quartzo com percurso óptico de 1 cm). Sempre que as reacções foram seguidas com o tempo, utilizaram-se os programas Cycle e/ou Multi- $\lambda$  (do "software" daquele espectrofotómetro), que permitem registar uma tabela de espectros em intervalos de tempo determinados, ciclos de 1 minuto neste caso, além de valores de absorvância, a diversos comprimentos de onda fixos, previamente escolhidos.

#### **7.A.1.1.2 - Método experimental**

As soluções foram preparadas com concentrações duplas das requeridas, de modo a manterem estas concentrações ao serem adicionadas na proporção de 1Cr(VI):1 GSH. Concentrações típicas após a mistura:  $[\text{Cr(VI)}] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $[\text{GSH}] = 10 \times 10^{-3} - 80 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ , ou seja, em proporções de 1 Cr(VI) : 10 - 80 GSH. O pH de cada uma das soluções foi inicialmente ajustado a 7.0 ( $\pm 0.1$ ) com soluções aquosas de KOH. As experiências foram realizadas à temperatura ambiente. Numa 2ª série de experiências, usou-se o mesmo método da alínea anterior, mas as soluções foram previamente termostalizadas (assim como as células), à temperatura de  $25^\circ \pm 0.5^\circ\text{C}$ . As reacções de redução de Cr(VI) foram seguidas pela variação de absorvância, com o tempo, a  $\lambda=372 \text{ nm}$ .

#### **7.A.1.1.3 - Tratamento de dados**

##### **i) - Método das velocidades iniciais**

A velocidade de reacção é medida no início da reacção, quando se sabe, com rigor, a concentração das espécies reagentes. As velocidades iniciais são estimadas a partir das tangentes das representações gráficas das absorvâncias iniciais em função do tempo. Este método evita interferências de equilíbrios, normalmente pouco importantes no início das reacções, ou de reacções laterais. No entanto, é necessário um método de aquisição de dados preciso durante o primeiro 1% da reacção e que a reacção seja monitorizada numa região em que haja grande variação espectral das absorvâncias [137].

##### **ii) - Determinação de $k_{\text{obs}}$ em condições de pseudo-primeira ordem**

As constantes de velocidade observadas de pseudo-primeira ordem foram obtidas das representações gráficas de  $\ln(A_{\text{obs}} - A_{\infty})$  em função do tempo.

##### **iii) - Outros métodos**

O cálculo dos parâmetros **a** e **b** (Ver Capítulo 3, Secção 3.2), foi feito com o

programa SIGMA PLOT, que utiliza um método iterativo de ajuste a uma dada função.

#### 7.A.1.1.4 - Tratamento cinético de um sistema de duas reacções consecutivas de 1ª ordem (sistema bifásico)

Os dados referentes à variação de absorvância com o tempo, a 372 nm, para as reacções de redução de Cr(VI) pela GSH, foram tratados matematicamente com um programa que permitiu um ajuste, por um processo iterativo, a uma dada equação pré-definida [136], admitindo que o sistema consistia num sistema bifásico de duas reacções consecutivas. Considerando as duas reacções de 1ª ordem, as concentrações das espécies A, B e C, [A], [B] e [C], no instante t (equação 7.A.1), são dadas pelas expressões seguintes (7.A.2), (7.A.3) e (7.A.4):



$$[A] / [A_0] = \exp(-k_1 t) \quad (7.A.2)$$

$$[B] / [B_0] = k_1 [\exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 t)] / (k_1 - k_2) \quad (7.A.3)$$

$$[C] / [A_0] = 1 + \{k_2 \exp(-k_1 t) - k_1 \exp(-k_2 t)\} / (k_1 - k_2) \quad (7.A.4)$$

em que  $[A_0]$  = concentração inicial de A, assumindo  $[B] = [C] = 0$  quando  $t = 0$ .

A densidade óptica (absorvância) da solução, D, no instante de tempo t (percurso óptico de 1 cm) é então:

$$D = \epsilon_A A + \epsilon_B B + \epsilon_C C \quad (7.A.5)$$

( $\epsilon_A$ ,  $\epsilon_B$  e  $\epsilon_C$ , coeficientes de absorvidade molar das espécies A, B, e C).

Considerando  $[A_0] = 1$ , pode definir-se a equação não-linear seguinte (7.A.6), que relaciona entre si todos os parâmetros atrás referidos:

$$D = (\epsilon_A - \epsilon_C) \exp(-k_1 t) + k_1 (\epsilon_B - \epsilon_C) [\exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 t)] / (k_1 - k_2) + \epsilon_C \quad (7.A.6)$$

Os valores de  $k_1$ ,  $k_2$  e  $\epsilon_B$  podem ser calculados por um ajuste de mínimos quadrados a um conjunto de valores de D, obtidos a tempos diferentes, durante a reacção de redução. Como a equação (7.A.6) é uma equação não linear é necessário usar um processo iterativo em que  $k_1$ ,  $k_2$  e  $\epsilon_B$  são parâmetros desconhecidos, que vão sendo ajustados após se fornecerem estimativas desses parâmetros. São sempre possíveis dois conjuntos de soluções de  $k_1$ ,  $k_2$  e  $\epsilon_B$ , que se ajustam igualmente à referida equação, os quais correspondem a uma troca entre  $k_1$  e  $k_2$ . Como importa ter em linha de conta que

"uma absorvância que aumenta rapidamente e decresce de modo mais lento não implica, necessariamente, uma primeira reacção rápida seguida de uma 2ª mais lenta", dependendo, além disso, dos coeficientes de absorvidade das duas espécies A e B,  $\epsilon_A$  e  $\epsilon_B$ , é necessário analisar com lógica os dois conjuntos de resultados, para se poder escolher criteriosamente um deles. No nosso caso, os valores determinados para  $\epsilon_B$  permitiram escolher o conjunto de resultados "adequado", com base no conhecimento do valor do valor deste coeficiente de absorvidade molar, obtido (da literatura) em circunstâncias semelhantes [73].

### 7.A.1.2 - Estudos cinéticos por "stopped-flow"

#### 7.A.1.2.1 - Reagentes e equipamento

- Redutores utilizados nestas reacções: L-cisteína e L-penicilamina (Fluka), dicromato de potássio  $K_2Cr_2O_7$  (Merck), Tris .HCl (tris(hidroximetil)-aminometano) (Panreac) e HEPES (ácido *N*-2-hidroxietil)-piperazina-*N'*-(2-etanossulfónico) (Merck), todos utilizadas sem qualquer purificação posterior.

- Equipamento, de "stopped-flow", Photophysics, ligado a um espectrofotómetro, por sua vez, ligado a um osciloscópio. O registo da evolução da reacção é seguido no ecrã do osciloscópio, do qual se obtêm fotografias, a partir das quais se calcula a variação de absorvância com o tempo.

- As experiências foram efectuadas no Departamento de Química, do Q.M.W.College (Universidade de Londres).

#### 7.A.1.2.2 - Método experimental

Na técnica de "stopped-flow" as duas soluções a reagir são misturadas, muito rapidamente, numa câmara de mistura projectada para que o fluxo de enchimento seja turbulento e ocorra mistura completa. À câmara de reacção segue-se uma célula de ob-

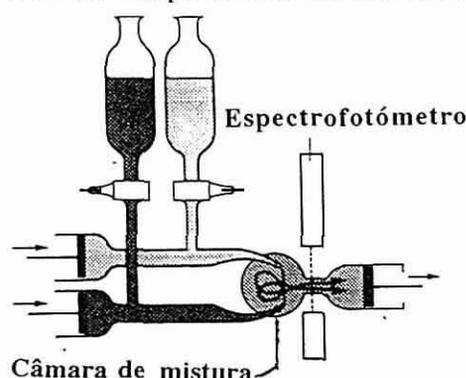


Figura 7.A.1 - Esquema de um equipamento de "stopped-flow": [282], Fig.26.2, pg780]

servação, ajustada a um êmbolo que se move com a entrada das soluções, disparando um interruptor, quando cheia. A reacção decorre na solução perfeitamente misturada e é monitorizada por leitura de uma grandeza proporcional à absorvância (diferença de potencial). Esta técnica necessita de pequenas quantidades de solução (Fig. 7.A.1).

- Concentrações das soluções, após mistura, preparadas em soluções-tampão Tris.HCl ou HEPES  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$ , com pH ajustado a  $7.0 \pm 0.1$ .

- As concentrações usadas foram optimizadas de modo a estarem adequadas à sensibilidade do equipamento disponível.

- Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente.

- As experiências foram repetidas pelo menos duas vezes, tendo-se ainda obtido, para cada experiência, vários conjuntos de dados em escalas de tempo diferentes.

### 7.A.1.2.3 - Método de tratamento de dados

As fotografias obtidas em cada "run" representam a variação, com o tempo, de uma diferença de potencial (proporcional à transmitância da mistura em reacção). Os dados são convertidos para valores absolutos de absorvância, de acordo com:

$$A_{\text{obs}} = \log_{10} (V_0 / V_{\text{obs}}) \quad (V_0 = \text{diferença de potencial correspondente a 100\% de transmitância})$$

e tratados aplicando-lhes métodos usuais de tratamento de dados cinéticos (integração de leis de velocidade) [283].

### 7.A.1.3 - Estudos de formação e de decomposição de intermediários tioéster em reacções de redução de Cr(VI) com tióis

#### 7.A.1.3.1 - Estudo, por espectroscopia de Raman, de aspectos estruturais do intermediário tioéster, na reacção de redução de Cr(VI) pela glutathiona

- Foram obtidos espectros de Raman das soluções de Cr(VI) e de GSH, em diversas condições experimentais, com o objectivo de identificar as bandas características de cada uma destas substâncias e escolher as adequadas para seguir estas reacções de redução, por esta técnica. A evolução das reacções foi seguida com o tempo, registando a intensidade daquelas bandas a um dado comprimento de onda, ou obtendo espectros sucessivos em intervalos de tempo determinados.

- Em todas as experiências foram utilizadas soluções aquosas de dicromato de

potássio, com concentração fixa de  $0.10 \text{ mol dm}^{-3}$ , e de glutatona, com concentrações variáveis entre  $0.050$  e  $0.20 \text{ mol dm}^{-3}$ , sendo o pH ajustado a  $7.0$  com solução aquosa de KOH.

• Outras especificações experimentais estão descritas nas legendas das figuras no Capítulo 3, Secção 3.4.2.

• Os espectros de Raman foram obtidos no Departamento de Química da Universidade de Coimbra, com a ajuda do Professor Doutor J. Teixeira-Dias.

### 7.A.1.3.2 - Estudo cinético de formação e decomposição de intermediários tioéster em reacções de redução de Cr(VI) com tíóis

#### 7.A.1.3.2.1 - Redução Cr(VI) com GSH (UV/Vis)

As reacções de formação e decomposição destes intermediários foram seguidas com o tempo, registando a variação de absorvância ao comprimento de onda fixo de  $433 \text{ nm}$ .

#### 7.A.1.3.2.2 - Estudos por "stopped-flow"

• Usou-se, basicamente, o mesmo método descrito em 7.A.1.2. As reacções foram seguidas ao comprimento de onda fixo de  $460 \text{ nm}$ .

• As concentrações das soluções de Cr(VI) e de L-cisteína estão especificadas nas legendas das tabelas e figuras do Capítulo 3, Secção 3.4.3.1.

## 7.A.2 - Produtos finais em reacções de redução de Cr(VI)

### 7.A.2.1 - Reagentes, equipamento e método experimental

Os reagentes usados neste estudo foram:  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (Merck),  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (Fluka), L-cisteína (Fluka) e L- ou D-penicilamina (Sigma), GSH e GSSG (Sigma).

| Condições      | UV/Vis                                  | DC                                  | IV                                  |
|----------------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|
| solução aquosa | células $1 \text{ cm}$ (quartzo)        | células $1 \text{ cm}$ (quartzo)    | ---                                 |
| estado sólido  | sólidos liofilizados, em pasta de Nujol | pastilhas do sólido ( $1\%$ em KBr) | pastilhas do sólido ( $1\%$ em KBr) |
| Equipamento    | VARIAN DMS 600                          | Dicrógrafo Jobin-Yvon, Mark IV      | Mattson Polaris ou Perkin-Elmer 683 |

Tabela 7.A.1 - Equipamento e métodos de obtenção de espectros de UV/Vis, DC e IV

## 7.A.2.2 - Identificação de produtos finais

### 7.A.2.2.1 - Reacções com cisteína e penicilamina

Os produtos finais das reacções de redução de Cr(VI) com L-cisteína e L- ou D-penicilamina foram identificados pelos respectivos espectros de UV/Vis e DC, em solução.

### 7.A.2.2.2 - Reacções com glutathiona

Os compostos sólidos usados neste trabalho (Capítulo 3 - Secção 3.5.2.2) foram preparados de acordo com a literatura, excepto no caso do composto de Cr(III) com GSSG, que foi obtido, em solução, segundo a descrição seguinte:

- Misturaram-se  $2 \times 10^{-3}$  mol (0.8 g) de  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  com  $4 \times 10^{-3}$  mol (2.45 g) de GSSG, em 25 ml de etanol / água 1:1. A solução resultante foi aquecida durante 15 minutos num banho de água fervente, ao fim do qual foi adicionado 1g de  $\text{KHCO}_3$ . A mistura refluxou cerca de 4 horas, deixando-se, então, evaporar até cerca de metade do volume inicial. A solução foi deixada arrefecer à temperatura ambiente, deixando-se depois no frigorífico até ao dia seguinte. Não se obteve qualquer sólido a partir da solução obtida, de cor vermelha.

Um outro conjunto de sólidos foi preparado fazendo reagir diversas misturas Cr(VI)/GSH, nas proporções de 1 Cr(VI) : 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 GSH, durante 1 hora. Ao fim deste intervalo de tempo todas as soluções foram congeladas rapidamente em azoto líquido, sendo posteriormente liofilizadas. Os sólidos obtidos foram caracterizados por UV/Vis (em pasta de Nujol) e por DC e IV (em pastilhas de KBr).

Nas reacções de redução de Cr(VI) por GSH, em solução aquosa, os produtos finais foram identificados, ou apenas tentativamente discutidos, principalmente com base nos respectivos espectros de DC.

## 7.A.2.3 - Cinética de formação de produtos finais

### 7.A.2.3.1 - Com cisteína e penicilamina

As reacções de formação dos produtos finais destas reacções foram seguidas por DC, a 612 nm (cisteína) e 610 nm (penicilamina).

$$[\text{Cr}(\text{VI})] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$$

$$[\text{L-cisteína}] = [\text{L-penicilamina}] = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$$

### 7.A.2.3.2 - Com glutationa

A formação dos produtos finais destas reacções foi seguida por DC, a 500 nm.

## 7 - B (parte experimental correspondente ao Capítulo 4)

### 7.B.1 - Compostos de coordenação contendo a ligação Cr-S

#### 7.B.1.1 - Reagentes e equipamento

a) - As especificações dos reagentes utilizados na síntese dos complexos estudados no Capítulo 4, foram as seguintes: cisteína (Fluka, puríssimo), D- e L-penicilamina e ácido tiomálico (Sigma),  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (Fluka, puro), NaOH e KOH (Merck),  $\text{KHCO}_3$  e  $\text{NaHCO}_3$  (Carlo Erba). Qualquer destes reagentes foi usado sem nenhuma purificação posterior. Nos estudos de equilíbrio e cinética utilizou-se DMF (Merck),  $\text{NaClO}_4$  (Fluka) e  $\text{HClO}_4$  (Merck p.a). Todos os outros reagentes utilizados, solventes incluídos, foram de qualidade p.a.

b) - As medições de pH foram feitas com um medidor de pH Metrom E 520.

As análises termogravimétricas foram obtidas numa termobalança Mettler M3.

As análises elementares dos complexos foram efectuadas no Complexo I, do Instituto Superior Técnico, Lisboa, ( $\text{K}[\text{Cr}(\text{pen})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e nos Serviços de apoio afectos ao Departamento de Química do Queen Mary e Westfield College, da Universidade de Londres, ( $\text{Na}_3[\text{Cr}(\text{tiomalato})_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). As quantidades de Na, K e Cr foram determinadas por A. A. de chama, num espectrofotómetro de Absorção Atómica Perkin-Elmer 400, no Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

As experiências de "stopped-flow" foram efectuadas com um sistema Applied Photophysics, no Departamento de Química do Q. M.W. College (Univ. de Londres).

#### 7.B.1.2 - Método de síntese de compostos de coordenação contendo ligações Cr-S

Os complexos de Cr(III) estudados no Capítulo 4, foram sintetizados usando os métodos experimentais a seguir descritos.

##### 7.B.1.2.1 - Síntese de $\text{M}[\text{Cr}(\text{cys})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (M=Na ou K)

Os sais de sódio e de potássio do anião complexo  $[\text{Cr}(\text{cys})_2]^-$  foram preparados seguindo os métodos publicados na literatura [126,148], com ligeiras modificações.

Assim, foi utilizado  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  como reagente inicial de crómio e  $\text{KHCO}_3$  (ou  $\text{NaHCO}_3$ ) para alcalinizar a mistura em reacção, em substituição de  $\text{KOH}$  (ou de  $\text{NaOH}$ ). Os sólidos cristalinos obtidos foram sempre recristalizados mais do que uma vez, por adição, muito lenta, de soluções aquosas muito concentradas dos complexos obtido a pequenas quantidades de etanol, em gelo. Os cristais, formados ao fim de algumas horas, foram lavados com misturas arrefecidas de água-etanol e acetona e finalmente secos num exsiccador, em vácuo.

#### **7.B.1.2.2 - Síntese de $\text{K}[\text{Cr}(\text{pen})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pen=D- e L-penicilamina )**

Este complexo foi sintetizado por um método análogo ao usado para preparar o composto anterior. Uma solução aquosa de  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (0.40g,  $1 \times 10^{-3}$  mol,  $5\text{cm}^3$ ) foi adicionada gota a gota, com agitação, a outra solução, também aquosa ( $5\text{cm}^3$ , 0.45g;  $3 \times 10^{-3}$  mol) de D- ou L- penicilamina (com o aminoácido racémico não se conseguiu obter qualquer tipo de sólido puro). A mistura foi aquecida, num banho de água, durante 5 minutos. Após ter arrefecido à temperatura ambiente, adicionou-se-lhe  $\text{KOH}$  (cerca de  $40\text{cm}^3$ ;  $0.1\text{mol dm}^{-3}$ ), gota a gota, com agitação vigorosa, até a mistura tomar uma cor azul escura intensa (pH cerca de 8.2). Esta mistura foi evaporada à secura num evaporador rotativo (sob vazio). O sólido obtido foi então dissolvido em etanol fervente e levado novamente a evaporar no evaporador rotativo, até ao ponto exacto de começar a precipitar. A solução foi imediatamente filtrada e o filtrado posto em gelo. Ao fim de 5 minutos, aproximadamente, começaram a formar-se pequenos cristais, de cor azul, em forma de agulha, que foram filtrados por vácuo. Como os cristais apareciam sistematicamente contaminados com um sólido branco, este foi posteriormente identificado, por espectroscopia de infravermelho, como  $\text{KNO}_3$ . Efectuaram-se tantas recristalizações quantas as necessárias para purificar os cristais do nitrato de potássio formado, seguindo o método anterior (em etanol fervente). O rendimento desta síntese foi de cerca de 37%.

#### **7.B.1.2.3 - Síntese de $\text{Na}_3[\text{Cr}(\text{tiomalato})_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$**

O método de síntese do sal de sódio deste complexo foi o seguinte: adicionaram-se duas soluções aquosas de  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (1.60 g;  $4 \times 10^{-3}$  mol;  $5\text{cm}^3$ ) e de ácido tiomálico (1.20 g;  $8 \times 10^{-3}$  mol;  $5\text{cm}^3$ ), deixando-se ferver a mistura durante 10 minutos, seguindo-se outros 10 minutos num banho de água fervente. O pH da solução obtida (verde), que era de 0.6-1.0, foi, após arrefecimento à temperatura ambiente, ajustado com  $\text{NaHCO}_3$  a cerca de 6.8-7.0. Em seguida, a mistura foi mantida em refluxo durante 3 horas. Depois de se adicionar à solução resultante uma pequena quantidade de etanol, gota a gota, esta foi deixada em repouso por um período mínimo de 2 dias, ao fim dos quais se filtrou um sólido, de aparência cristalina, de cor verde

escura, que foi lavado com etanol, acetona e éter etílico. O sólido inicial, apesar das várias tentativas de recristalização a partir de soluções de água/etanol, em proporções variadas, apenas deu origem a pós com um aspecto menos cristalinos que o sólido inicial.

### 7.B.2 - Estudos de equilíbrio e estudos cinéticos

Os complexos usados nos estudos seguintes foram os sintetizados neste trabalho (7.B.1.2).

#### 7.B.2.1 - Condições experimentais típicas

As concentrações das soluções utilizadas para a obtenção dos espectros, foram, de um modo geral (a não ser que tenham sido especificamente referidas outras condições experimentais, no texto ou nas legendas das figuras):

**Vis:**  $1.0 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> (soluções dos complexos)  
 $1.0 \times 10^{-2}$  mol dm<sup>-3</sup> (soluções de HClO<sub>4</sub> e de KOH)

**UV:** soluções cerca de 100 vezes menos concentradas que para o Vis

**DC:**  $1.0 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> (soluções dos complexos)  
 $5.5 \times 10^{-2}$  mol dm<sup>-3</sup> (soluções de CF<sub>3</sub>COOH)

**Temperatura:** As experiências foram efectuadas à temperatura ambiente (22°C)

#### 7.B.2.2 - Titulação de soluções dos complexos com CF<sub>3</sub>COOH, em DMF

As titulações, em DMF, efectuadas ou pelo método normal ou por pontos, foram seguidas por UV/Vis ou por DC, nos comprimentos de onda dos máximos das bandas de menor energia, para cada um dos compostos. Em particular, uma das titulações por pontos com o complexo de penicilamina, seguida por dicroísmo circular: adicionaram-se a volumes iguais de solução do complexo (25 ml), volumes diferentes e crescentes de solução de ácido. Após se terem deixado as soluções a equilibrar por alguns minutos (10-30 min) foram obtidos os respectivos espectros de DC. Concentrações iniciais das soluções: [Cr(L-pen)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> =  $9.8 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>; [CF<sub>3</sub>COOH] =  $5.73 \times 10^{-2}$  mol dm<sup>-3</sup>.

### 7.B.3 - Estudos cinéticos por "stopped-flow"

#### 7.B.3.1 - Método experimental

O método experimental seguido em experiências deste tipo foi já descrito na Secção A deste Capítulo

Numa experiência típica, efectuada à temperatura ambiente (cerca de 20°C), misturaram-se volumes iguais de soluções aquosas dos complexo, com força iónica constante, preparadas em NaClO<sub>4</sub> 0.1 moldm<sup>-3</sup> e soluções de HClO<sub>4</sub> com as concentrações requeridas. A variação de absorvância, lida de modo indirecto, foi seguida no comprimento de onda máximo da banda mais intensa do complexo, a menor energia:

608 nm para [Cr(L-cys)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>

606 nm para [Cr(L-pen)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> e [Cr(D-pen)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>

As concentrações das soluções dos complexos e de ácido utilizadas foram ajustadas de modo a otimizar os decréscimos de absorvância, em consonância quer com a sensibilidade quer com os tempos de reacção máximos e mínimos possíveis de ser medidos com o equipamento disponível (Applied Photophysics).

### 7.B.3.2 - Tratamento de dados

#### 7.B.3.2.1 - Determinação das constantes de velocidade de 1ª ordem

Em função dos resultados obtidos, aplicou-se o tratamento cinético "tradicional" para reacções de 1ª ordem, representando-se graficamente  $\ln(A_{\text{obs}} - A_{\infty})$  em função do tempo. As representações lineares obtidas foram tratadas pelo método dos mínimos quadrados, ou seja foi-lhes aplicada uma regressão linear, tendo as respectivas constantes de velocidade,  $k_{\text{obs}}$ , sido calculadas a partir dos declives das rectas obtidas.

No caso do penicilaminato de Cr(III), usaram-se três métodos de tratamento de dados: representação de 1ª ordem, método das velocidades iniciais e ajuste a condições de 1ª ordem com o programa CONINFIN. Este programa, conjuntamente com uma análise de dados pelo método dos mínimos quadrados atribui um valor infinito a uma propriedade física medida no decorrer da reacção (neste caso, a absorvância) como parâmetro ajustável [78].

#### 7.B.3.2.2 - Determinação das constantes de velocidade de 2ª ordem

As constantes de velocidade de 2ª ordem referentes a cada experiência foram determinadas a partir da representação gráfica de  $k_{\text{obs}}$ , em função das concentrações de ácido utilizadas. No caso dos complexos de penicilamina, como aquela representação gráfica se afastava da linearidade para as concentrações de ácido mais elevadas, as concentrações molares foram convertidas nas respectivas actividades [183].

## 7 - C (parte experimental correspondente ao Capítulo 5)

### 7.C.1 - [Cr(L-ala)<sub>3</sub>]

#### 7.C.1.1 - Síntese de [Cr(L-ala)<sub>3</sub>]

a) - Este composto foi preparado pelo método geral descrito no Capítulo 5, Secção 5.2. Efectuaram-se várias tentativas utilizando diversas proporções de reagentes, 1 Cr(III) : 3, 5, 6,10 L-alanina, até otimizar a obtenção do composto no estado sólido. O método experimental seguido pode ser resumido do seguinte modo:

**Proporções de reacção: 1 Cr(III) : 10 L-alanina**

- |   |   |
|---|---|
| i) adição das soluções  | pH = 2-3  |
| ii) aquecimento em banho de água, durante 0.5 h (solução de cor roxa) | pH = 1.8  |
| iii) neutralização com NaOH 1M  | pH = 6-7  |
| iv) refluxo ≈ 6-8 horas   | pH ≈ 5  |
| v) filtração do <b>Produto sólido</b> :                               | lavado com várias porções de água quente, etanol, acetona e éter etílico; seco num exsiccador, em vazio   |
| vi) <b>características</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• cor rosa;</li> <li>• textura acetinada; sólido microcristalino;</li> <li>• em algumas das amostras notou-se contaminação (sólido branco), provavelmente L-alanina, usada em excesso</li> </ul> |

b) - Segundo Gillard *et al* [157] foram obtidas várias "colheitas" de sólido: a 1<sup>a</sup> "colheita", logo após a neutralização da solução; a 2<sup>a</sup>, depois de arrefecimento prolongado da solução filtrada (alínea anterior).

#### 7.C.1.2 - Caracterização elementar

Os diversos sólidos obtidos foram caracterizados por análise elementar (% C, %N e %H) segundo os resultados de dois laboratórios: (a)- Serviços do Departamento de Química do Queen Mary and Westfield College, Universidade de Londres e (b)- Serviços do Complexo I, Instituto Superior Técnico. A % em Cr foi determinada por A. A. e a quantidade de água calculada a partir de análises termogravimétricas.

#### 7.C.1.3 - Preparação de soluções saturadas de [Cr(L-ala)<sub>3</sub>]

Uma pequena quantidade de sólido (≈ 30 mg) foi posta a agitar em 50 ml de água, à temperatura ambiente, durante 30 minutos, ao fim dos quais a solução foi filtrada. Esta operação foi repetida sucessivamente, utilizando, nas vezes seguintes, o

sólido filtrado na operação anterior.

#### 7.C.1.4 - Determinação de $\epsilon$ e de $\Delta\epsilon$ de $[\text{Cr}(\text{L-ala})_3]$ , em solução aquosa

Para determinar os coeficientes de absorvidade molar, relativos aos espectros electrónicos e de dicroísmo circular, utilizou-se o seguinte método: pequenas quantidades de sólido foram postas a agitar por 1-2 minutos, as soluções resultantes filtradas rapidamente e os espectros de UV/Vis e de DC obtidos de imediato. A quantidade de crómio em cada solução foi posteriormente determinada por A. Atómica.

#### 7.C.2 - Síntese e separação dos isómeros ópticos do complexo $[\text{Co}(\text{L-ala})_3]$

##### 7.C.2.1 - Introdução

A síntese e separação dos isómeros ópticos deste composto foi efectuada segundo as duas principais referências citadas na literatura [173,201], as quais, usando métodos basicamente idênticos, descrevem a obtenção e a separação dos isómeros de  $[\text{Co}(\text{L-ala})_3]$ .

Na síntese de  $[\text{Co}(\text{L-ala})_3]$  podem ser usados, como reagentes de partida, diferentes compostos de Co(III), a partir de cada um dos quais, por métodos distintos, é possível obter e isolar todos os isómeros deste composto, embora por alguns dos métodos se obtenham, preferencialmente, um ou outro isómero [173,191,192,198]:

i) - a partir de  $\text{Co}(\text{OH})_3$ : método "mais" recomendado para a obtenção dos isómeros  $\alpha$  (trans(+)) e trans(-)) [191].

ii) - a partir de  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ : método que permite obter essencialmente o isómero  $\beta$ (+) (= cis(+)). Mori *et al* [191] referem, sem especificar, que se obtém "o isómero  $\beta$ ".

iii) - a partir de  $\text{K}_3[\text{Co}(\text{CO}_3)_3]$ : por este método é possível obter e isolar isómeros quer do tipo  $\alpha$  quer do  $\beta$ , em proporções de 50% de cada [192] (Mori *et al* [191] não especificam, mais uma vez, quais as formas de cada tipo).

##### 7.C.2.2 - Síntese e separação dos isómeros de $[\text{Co}(\text{L-ala})_3]$

###### a) - Isómeros trans(+), trans(-) e cis(-)

Para preparar estes três isómeros seguiu-se a primeira das referências anteriores [173], introduzindo-lhe ligeiras alterações, pois, além de ser um pouco mais recente, pareceu-nos mais facilmente exequível:

1º) - Começou por se preparar o composto de partida,  $\text{Co(OH)}_3$ , a partir da mistura de  $\text{Co(NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (5.1 g; 0.02 mol) com uma solução aquosa, quente, de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (11 g; 0.003 mol) e com uma pequena quantidade de solução aquosa de NaOH (até se começou a notar a formação de um precipitado), seguida de oxidação por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , com arejamento vigoroso simultâneo (cerca de 1.5 horas). Obteve-se, após filtração, um precipitado castanho, de  $\text{Co(OH)}_3$ .

2º) - Misturou-se o hidróxido de cobalto(III),  $\text{Co(OH)}_3$ , com uma solução aquosa de L-alanina, na proporção de **1:3**. A solução resultante foi mantida em refluxo durante cerca de 8 horas.

3º) - Os sólidos correspondentes aos isómeros trans(+), trans(-) e cis(-) foram obtidos do seguinte modo:

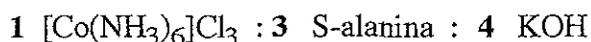
i)- **trans(+)**: isómero mais insolúvel, obtido directamente por filtração da mistura reaccional anterior, após concentração da solução (cristais violeta, em forma de agulha)

ii)- **trans(-)**: obtido por separação cromatográfica, numa coluna de alumina, com etanol : água (1:1) como eluente (banda violeta)

iii)- **cis (-)**: obtido por precipitação lenta, após adição de etanol. Tal como referido na literatura [173,199], este isómero foi obtido em muito pequena quantidade.

#### **b) - Isómero cis(+)**

Este isómero foi sintetizado segundo o método de Mori *et al* [191], usando como composto de cobalto de partida, o  $[\text{Co(NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ , o qual, por sua vez, foi preparado segundo Bjerrum *et al* [284]. Foram utilizadas as proporções de:



tendo sido obtido um sólido, de cor rosa, com aparência não cristalina.

As tentativas de recristalização deste isómero não foram bem sucedidas. Como ele é praticamente insolúvel em água, foi dissolvido em ácido, adicionando-se-lhe em seguida um pouco de água, ou uma mistura de água e etanol, mas foi-nos impossível voltar a obter o composto no estado sólido. Pelos mesmos motivos, foi-nos também impossível efectuar qualquer tipo de purificação cromatográfica deste isómero.

#### **7.C.2.3 - Determinação da solubilidade, em água, do isómero $\beta$ -cis(+)- $[\text{Co(L-ala)}_3]$**

Admitia-se que este isómero só era solúvel em soluções de ácido forte. No

entanto, foi possível determinar a solubilidade deste isómero em água, "dissolvendo" pequenas porções de sólido neste solvente, usando ou não aquecimento moderado, com agitação vigorosa e contínua durante intervalos de tempo variáveis (nalguns casos até vários dias), filtrando as soluções e determinando a quantidade de composto dissolvido (por átomo de cobalto) por A. A. de chama (admitindo que o referido isómero era a única espécie de cobalto presente na solução). Apesar destas experiências terem sido repetidas diversas vezes, variando a temperatura e(ou) o tempo de agitação, não se verificaram variações significativas nos valores encontrados. O valor calculado para a solubilidade deste isómero, em água, resultante da média de pelo menos dez ensaios, foi de  $2.5 \times 10^{-3}$  g dm<sup>-3</sup>, ou seja,  $7.7 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>.

#### 7.C.2.4 - Determinação de $\epsilon$ e de $\Delta\epsilon$ de [Co(L-ala)<sub>3</sub>], em solução aquosa

O cálculo de  $\epsilon$  e  $\Delta\epsilon$  do isómero  $\beta$ -cis(+)-[Co(L-ala)<sub>3</sub>], em solução aquosa, (espectros de UV/Vis e de DC), resultou da preparação de soluções saturadas deste composto, do registo dos referidos espectros e da determinação da quantidade de cobalto, em cada solução, por A. A. (dissolvendo pequenas quantidades de sólido em volumes iguais de solvente, mantendo a agitação durante intervalos de tempo iguais, de modo a não se verificarem alterações visíveis nos espectros obtidos). No entanto, devido à quase insolubilidade deste isómero em água, à pequena intensidade das bandas (em especial nos espectros de UV/Vis) e às "condições limite" de sensibilidade e de resposta do espectrofotómetro de DC, apenas foi possível determinar, com alguma precisão, a absorvidade molar do máximo da banda de sinal positivo observada no espectro de DC ( $\Delta\epsilon$  (550 nm)  $\approx 3.6 \pm 0.8$  mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>).

#### 7.C.3 - Síntese de complexos de Cr(III) com L-leucina, L-iso-leucina e L-valina

Todos os aminoácidos utilizados eram de qualidade Merck.

Os compostos foram sintetizados segundo os métodos a seguir descritos. A respectiva caracterização elementar (% C, %N e %H) foi efectuada no Complexo I, Instituto Superior Técnico, excepto o complexo de L-valina, [Cr(L-valO-)<sub>2</sub>(L-valOH)<sub>2</sub>]NO<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, que foi também analisado no Queen Mary and Westfield College (Univ. de Londres). A percentagem em Cr foi determinada por A. A. e a quantidade de água calculada a partir de análises termogravimétricas.

##### 7.C.3.1 - Cr(III) / L-leucina: método em solução [184]

Uma mistura de 0.35 g ( $1 \times 10^{-3}$  moles) do complexo [Cr(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>].(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> e de 0.39g de L-leucina ( $3 \times 10^{-3}$  moles) foi dissolvida em 60 ml de água quente. A solução resultante foi aquecida em banho de água fervente durante cerca de 3 horas, até se

obterem cristais de cor rosa, que foram lavados com água e com etanol. O sólido foi deixado a secar num exsiccador com sílica-gel.

### 7.C.3.2 - Cr(III) / L-iso-leucina

#### i) - Segundo o método geral descrito no Capítulo 5, Secção 5.2

Foi seguido praticamente o mesmo procedimento experimental usado para a preparação do composto com L-leucina, excepto no tempo de refluxo, após a neutralização da mistura em reacção, que neste caso foi de 3 horas. Obtiveram-se cristais de cor rosa-vermelho.

#### ii) - Segundo [184], método em solução

Preparação efectuada de modo análogo à do composto com L-leucina, excepto no volume inicial de solução que foi de 10 ml. Obtiveram-se cristais de cor rosa.

### 7.C.3.3 - Cr(III) / L-valina: síntese de $[\text{Cr}(\text{L-valO-})_2(\text{L-valOH})_2]\text{NO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ por um método análogo ao descrito no Cap. 5, Secção 5.2

Este complexo foi preparado por reacção de uma solução aquosa de  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  ( $5 \times 10^{-3}$  mol em 5 ml de água) com uma solução aquosa de L-valina ( $20 \times 10^{-3}$  moles em 40 ml de água). A mistura refluxou durante 1 hora, sendo o pH ajustado a 7.0 com solução concentrada de KOH, após ter sido deixada arrefecer à temperatura ambiente. A mistura foi novamente aquecida com refluxo por mais 1.5 horas, deixada evaporar até o volume inicial se reduzir a cerca de metade e finalmente deixada em repouso até ao dia seguinte. Depois de filtrar a mistura e de lavar o sólido com etanol e acetona, isolaram-se cristais do composto, de cor rosa avermelhada.

### 7.C.3.4 - Determinação da estrutura cristalina do complexo de Cr(III) com L-valina $[\text{Cr}(\text{L-valO-})_2(\text{L-valOH})_2]\text{NO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [214]

Este complexo de Cr(III) com L-valina, tem como fórmula empírica  $\text{CrC}_{20}\text{H}_{54}\text{N}_5\text{O}_{17}$ , correspondente a  $[\text{Cr}(\text{L-valO-})_2(\text{L-valOH})_2]\text{NO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  de  $M_r=688.69$  e  $D_c = 1.178 \text{ g cm}^{-3}$ .

Alguns dados referentes à estrutura cristalina:

Sistema trigonal; dimensões da célula unitária:  $a = b = 17.012(2)$ ,  $c = 11.516(1) \text{ \AA}$ ;  $a=b=90^\circ$ ,  $t = 120^\circ$ ;  $V = 2886.3(5) \text{ \AA}^3$ ; grupo espacial  $P_{321}$ ,  $Z = 3$ ;  $M_o\text{-K}_\alpha = 0.71069$ ;  $m=0.363 \text{ mm}^{-1}$

Os dados de difracção de Raios-X foram obtidos num difractómetro CAD4, em

"w/2 $\theta$  scan mode"; o número de reflexões medidas foi de 5635, 3401 únicas e 1807 observadas, com  $[F > 4sF_0]$ . A estrutura foi resolvida por métodos directos e o refinamento efectuado por mínimos quadrados de matriz complementar, com base em valores de  $F^2$ , com a inclusão de átomos de hidrogénio;  $R = 0.0682$  (195 parâmetros).

### **7.C.3.5 - Aplicação da Espectrometria de Massa a estudos estruturais de complexos de Cr(III) com L-alanina, L-leucina, L-isoleucina e L-valina**

Os Espectros de Massa foram adquiridos num equipamento VG AutoSpec Q (VG Analytical, Manchester, UK), equipado com um canhão de céσιο. A intensidade do feixe de céσιο foi de 2 mA, com 15 KV, sendo de 8KV a voltagem de aceleração. Os espectros de CID foram adquiridos usando He como gás de colisão. Utilizou-se uma redução de 40% no estudo do "ião-pai". As amostras foram preparadas de modo a que cada substância se encontrasse numa solução de DMSO / glicerol a 1:1 (v/v).

## **7 - D (parte experimental correspondente ao Capítulo 6)**

### **7.D.1 - Interação de compostos de coordenação de crómio(III) com material biológico (núcleos do timo de vitelo)**

#### **7.D.1.1 - Obtenção de núcleos do timo de vitelo**

Basicamente, foi utilizado o procedimento experimental proposto por Beyersmann *et al* [235], com algumas modificações.

##### **7.D.1.1.1 - Preparação da solução "tampão-padrão"**

A composição do tampão utilizado na extracção e isolamento dos núcleos de timo foi a seguinte:

10 mM em Tris.HCl (= trishidroximetil(metilamina) = TRIZMA®)  
 10 mM em MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O      50 mM em NaHSO<sub>3</sub>      0.5 M em sacarose

- Como a solução resultante era um pouco mais ácida do que o pretendido (pH  $\approx$  5.6), ajustou-se o pH ao valor requerido (6.5), com solução aquosa de NaOH.
- A solução de sacarose foi sempre preparada imediatamente antes de ser utilizada na preparação do "tampão-padrão", pois é sujeita ao desenvolvimento de bactérias.
- A solução "tampão-padrão", embora preparada à temperatura ambiente, foi mantida, para uso posterior, a 4 °C.

#### **7.D.1.1.2 - Extracção dos núcleos de células de timo**

Cortaram-se em pequenos pedaços, cerca de 10 gramas de timo de vitelo, congelado, ao abrigo da luz, os quais foram mergulhados em 10 ml de solução "tampão-padrão", previamente arrefecida em gelo. Moeu-se a mistura num moinho Omnimix Sorvall (posição 1; três vezes, cerca de 10 segundos cada), com o respectivo contentor colocado em gelo para evitar aquecimento durante a trituração.

A mistura resultante foi filtrada por uma camada de lã de vidro, ou de tecido, de modo a ficarem retidos no filtro os pedaços não suficientemente bem triturados. De seguida, procedeu-se à lavagem da suspensão de núcleos assim obtida. Para esse efeito, a suspensão foi centrifugada, a 4°C, durante 10 minutos, a 1 000 g ( $\approx$  2 000 rotações / minuto) e depois decantada, voltando a ser "ressuspensa" em 10 ml de "tampão-padrão". O processo foi repetido três vezes. Após a última lavagem, o líquido sobrenadante foi aspirado com trompa de vácuo.

#### **7.D.1.1.3 - Contagem dos núcleos**

Mantendo em gelo os núcleos obtidos depois da última lavagem, foram-lhe adicionados 10 ml de solução "tampão-padrão". A suspensão resultante foi, então, vigorosamente agitada (vórtex). Em seguida, foi diluída 100 vezes.

Os núcleos foram contados estatisticamente, por média de várias contagens, numa célula de contagem (placa Neubauer) adaptada a um microscópio óptico.

A suspensão de núcleos foi então diluída, de modo a obter uma concentração de cerca de  $6 \times 10^7$  núcleos/ml, operação que implicou, na quase totalidade das experiências efectuadas, uma diluição, da suspensão inicial, de cerca de 100 vezes.

#### **7.D.1.2 - Incubação dos núcleos isolados com complexos de crómio(III)**

Os núcleos de timo, na proporção, em volume, de 1 de núcleos : 1 dos outros componentes da mistura (concentração final de  $3 \times 10^7$  núcleos/ml), previamente isolados e contados, foram incubados, a 37°C, durante intervalos de tempo variáveis (0, 10, 30 e 60 minutos), com soluções dos vários compostos de coordenação de crómio(III) usados neste estudo, em concentrações de 0.5, 1 e 2 mM, preparadas na mesma solução "tampão-padrão" utilizada no manuseamento dos núcleos. Em cada experiência, foram ainda efectuados, em paralelo, um ensaio em branco e um ensaio com  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (cloreto de crómio(III) comercial, Merck), como composto de controle. Foram efectuadas três réplicas de qualquer dos ensaios.

Após a incubação, todas as amostras foram centrifugadas, durante 10 minutos, a

20 000 rotações / minuto, a solução sobrenadante decantada e as "pellets" resultantes (suspensões "sólidas") lavadas com 1 ml de solução "tampão-padrão" (agitação manual). O processo foi repetido três vezes.

Este procedimento experimental foi repetido num outro conjunto de experiências, apenas com o factor adicional de, durante a incubação, os núcleos terem sido agitados continuamente por um processo mecânico.

#### **7.D.1.3 - Mineralização dos núcleos, após incubação**

Aos tubos ependorf contendo as "pellets" obtidas após a última lavagem foram adicionados 0.1 ml de HNO<sub>3</sub> 65% (Merck, p.a.) e 0.1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Merck, qualidade suprapura, de modo a evitar contaminação com crómio proveniente destes reagentes). As amostras assim preparadas foram levadas à secura (cerca de 95°C), durante uma noite.

#### **7.D.1.4 - Determinação da quantidade de crómio (crómio total) nos núcleos incubados, por Absorção Atómica com Atomização Electrotérmica e plataforma de L'vov**

As amostras, mineralizadas, foram analisadas por Espectrofotometria de A. A. com Atomização Electrotérmica e plataforma de L'vov. Para tal, o conteúdo dos tubos ependorf (alínea anterior) foi dissolvido em cerca de 1 ml de HNO<sub>3</sub> 0.2 %.

A determinação da composição em crómio de cada amostra (crómio total), foi feita com base numa recta de calibração. A referida recta foi constituída com 10 pontos, correspondentes a 10 soluções-padrão com concentrações de crómio diferentes, numa gama de 0.02 a 0.5 mM, incluindo um "branco" correspondente a uma concentração 0.0 em crómio (solução de HNO<sub>3</sub> 0.2%, supra-puro, usada também como solvente para preparar as outras soluções-padrão). Sempre que necessário, as amostras foram diluídas com HNO<sub>3</sub> 0.2 %, de modo a que os valores de absorvância lidos caíssem "dentro" da recta de calibração, isto é, estivessem na zona linear da referida recta. Usaram-se duas réplicas de cada solução.

Para verificar a fiabilidade do método de determinação de crómio neste tipo de amostras, isto é, testar a influência da matriz nos resultados obtidos, além das amostras preparadas pelo procedimento experimental descrito, foram também usadas amostras de núcleos na solução "tampão-padrão" (brancos), às quais se adicionaram quantidades bem definidas de soluções padrão de crómio ("spikes"). A concentração de crómio total nestas últimas amostras foi determinada pelo método anterior e comparada com as quantidades de crómio que lhes tinham sido previamente adicionadas, tendo os

resultados obtidos sido satisfatoriamente concordantes com os esperados.

| Composto                              | Conc. compl.. |    | Toma (mol Cr/núcleo) x 10 <sup>17</sup> |            |            | Controlo ("CrCl <sub>3</sub> ") | Cond. exp.   |
|---------------------------------------|---------------|----|---|------------|------------|---------------------------------|--------------|
|                                       |               |    | 0.5 mM                                  | 1.0 mM     | 2.0 mM     | 2.0 mM                          |              |
| [Cr(cys) <sub>2</sub> ]-              | T. inc.       | 0  | 9.95±0.66                               | 19.77±2.36 | 35.57±0.23 | 3.22±1.02                       | Sem agitação |
|                                       |               | 10 | 3.94±0.39                               | 10.64±0.85 | 17.31±0.23 | 4.43±0.03                       |              |
|                                       |               | 30 | 3.68±0.04                               | 7.59±0.33  | 15.70±2.27 | 6.86±0.52                       |              |
|                                       |               | 60 | 3.74±0.26                               | 6.27±0.30  | 14.55±0.98 | 12.81±1.51                      |              |
| [Cr(cys) <sub>2</sub> ]-              |               | 0  | 4.64±0.80                               | 9.45±3.05  | 21.27±1.90 | 1.36±0.43                       |              |
|                                       |               | 10 | 2.82±0.35                               | 7.37±1.87  | 10.30±0.11 | 3.68±0.24                       |              |
|                                       |               | 30 | 2.93±0.08                               | 5.58±0.60  | 9.60±1.35  | 5.20±0.03                       |              |
|                                       |               | 60 | 2.56±0.16                               | 4.16±0.30  | 7.64±0.03  | 8.98±0.54                       |              |
| [Cr(cys) <sub>2</sub> ]-              |               | 0  | 6.18±1.07                               | 12.60±4.06 | 28.36±2.53 | 1.81±0.57                       |              |
|                                       |               | 10 | 3.76±0.46                               | 9.83±2.50  | 13.74±0.15 | 4.91±0.32                       |              |
|                                       |               | 30 | 3.91±0.11                               | 7.57±0.79  | 12.80±1.80 | 6.93±0.004                      |              |
|                                       |               | 60 | 3.42±0.21                               | 5.55±0.40  | 10.19±0.03 | 11.98±0.72                      |              |
| [Cr(pen) <sub>2</sub> ]-              |               | 0  | 17.19±1.10                              | 34.24±2.31 | 67.78±1.98 | 1.81±0.57                       |              |
|                                       |               | 10 | 14.52±0.27                              | 27.06±0.26 | 52.43±6.54 | 4.91±0.32                       |              |
|                                       |               | 30 | 14.53±0.13                              | 26.70±2.09 | 52.73±1.47 | 6.93±0.004                      |              |
|                                       |               | 60 | 9.51±3.47                               | 17.93±1.62 | 35.61±1.08 | 11.98±0.72                      |              |
| [Cr(pen) <sub>2</sub> ]-              |               | 0  | 26.38±0.89                              | 56.71±0.52 | 39.94±4.35 | 2.55±0.52                       |              |
|                                       |               | 10 | 25.82±1.73                              | 48.03±3.49 | 52.43±3.85 | 2.85±0.19                       |              |
|                                       |               | 30 | 19.38±0.29                              | 32.87±2.95 | 68.73±0.42 | 4.21±0.46                       |              |
|                                       |               | 60 | 15.50±0.28                              | 26.96±1.21 | 65.63±4.57 | 7.63±0.23                       |              |
| [Cr(Hedra)(H <sub>2</sub> O)]-        |               | 0  | 0.22±0.03                               | 0.36±0.08  | 0.58±0.23  | 3.22±1.02                       |              |
|                                       |               | 10 | 0.46±0.34                               | 0.42±0.08  | 0.25±0.14  | 4.43±0.03                       |              |
|                                       |               | 30 | 0.24±0.05                               | 0.32±0.01  | 0.65±0.06  | 6.86±0.52                       |              |
|                                       |               | 60 | 0.44±0.01                               | 0.50±0.14  | 0.23±0.06  | 12.81±1.51                      |              |
| [Cr(en) <sub>3</sub> ] <sup>3+</sup>  |               | 0  | 0.96±0.03                               | 1.91±0.19  | 1.93±0.21  | 2.55±0.52                       |              |
|                                       |               | 10 | 0.84±0.06                               | 0.66±0.11  | 2.21±0.37  | 2.85±0.19                       |              |
|                                       |               | 30 | 1.20±0.57                               | 2.74±0.33  | 2.09±0.023 | 4.21±0.46                       |              |
|                                       |               | 60 | 1.83±0.22                               | 1.87±0.26  | 2.93±0.34  | 7.63±0.23                       |              |
| [Cr(hist) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> |               | 0  | 0.77±0.05                               | 1.34±0.02  | 3.59±0.82  | 2.55±0.52                       |              |
|                                       |               | 10 | 0.95±0.001                              | 2.28±0.23  | 3.14±0.95  | 2.85±0.19                       |              |
|                                       |               | 30 | 1.21±0.51                               | 3.71±0.86  | 4.05±0.24  | 4.21±0.46                       |              |
|                                       |               | 60 | 1.22±0.004                              | 4.20±1.05  | 10.00±6.11 | 7.63±0.23                       |              |

|  |    |               |               |               |              |                      |
|--|----|---------------|---------------|---------------|--------------|----------------------|
| [Cr(cys) <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>               | 0  | 2.08±0.52     | 2.40          | 4.19±0.17     | 0.89±0.12    | Com<br>agita-<br>ção |
|  | 10 | 0.99±0.07     | 1.38±0.01     | 2.38±0.07     | 0.88±0.13    |                      |
|  | 30 | 1.21±0.05     | 1.84±0.08     | 2.26±0.07     | 1.36±0.06    |                      |
|  | 60 | 1.03±0.03     | 1.43±0.13     | 2.26±0.42     | 1.90±0.17    |                      |
| [Cr(pen) <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>               | 0  | 3.60±0.33     | 7.10±0.34     | 14.75±0.28    | 0.89±0.12    |                      |
|  | 10 | 3.84±0.01     | 7.52±0.07     | 15.80±0.18    | 0.88±0.13    |                      |
|  | 30 | 3.94±0.14     | 7.18±0.24     | 14.54±0.49    | 1.36±0.06    |                      |
|  | 60 | 3.27±0.40     | 7.10±1.16     | 13.51±0.19    | 1.90±0.17    |                      |
| [Cr(ox) <sub>3</sub> ] <sup>3-</sup>               | 0  | 0.0116±0.007  | 0.0253±0.0104 | 0.0311±0.0111 | 0.89±0.12    |                      |
|  | 10 | 0.0159±0.0002 | 0.0582±0.0432 | 0.0955±0.072  | 0.88±0.13    |                      |
|  | 30 | 0.0054±0.0002 | 0.0174±0.0050 | 0.0259±0.0011 | 1.36±0.06    |                      |
|  | 60 | 0.0452±0.0336 | 0.0050±0.0052 | 0.060±0.022   | 1.90±0.17    |                      |
| [Cr(en) <sub>3</sub> ] <sup>3+</sup>               | 0  | 0.0989±0.0095 | 0.1936±0.0356 | 0.3433±0.0330 | 0.489±0.147  |                      |
|  | 10 | 0.2050±0.064  | 0.3329±0.0426 | 0.6503±0.1196 | 0.240±0.008  |                      |
|  | 30 | 0.1093±0.0085 | 0.2761±0.0167 | 0.5698±0.1038 | 0.8020±0.073 |                      |
|  | 60 | 0.1727±0.0137 | 0.2761±0.0498 | 1.125±0.6134  | 1.029±0.256  |                      |
| [Cr(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ] <sup>3+</sup> | 0  | 0.309±0.000   | 0.219±0.004   | 1.255±0.035   | 0.489±0.147  |                      |
|  | 10 | 0.299±0.054   | 0.292±0.054   | 0.324±0.182   | 0.240±0.008  |                      |
|  | 30 | 0.372±0.001   | 0.562±0.069   | 0.987±0.015   | 0.802±0.073  |                      |
|  | 60 | 0.506±0.093   | 0.711±0.081   | 1.855±0.014   | 1.029±0.256  |                      |

Tabela 7.D.1 - Toma de complexos de Cr(III) por núcleos isolados de timo de vitelo, considerando os desvios padrão do conjunto de ensaios efectuados (t. inc=tempo de incubação; conc. comp.=concentração inicial dos complexos)

### 7.D.2 - Tentativa de estudo da toma de [Cr(cys)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> com a variação de pH

Após a verificação de que os resultados obtidos na toma de [Cr(cys)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (e de [Cr(pen)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>) eram distintos dos obtidos com os outros compostos de coordenação testados (Ver Capítulo 6, Secção 6.3) e, com o objectivo de tentar relacionar a referida toma com a especiação daqueles complexos em solução, fez-se a tentativa de estudar a toma de [Cr(cys)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, a diferentes valores de pH.

#### 7.D.2.1 - Método experimental

Foi utilizada uma solução tampão, modificada da originalmente utilizada, por substituição de Tris.HCl por KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, a dois valores de pH diferentes (5.6 e 6.6), mantendo uma força iónica semelhante à do outro tampão.

### 7.D.2.2 - Isolamento dos núcleos

Fizeram-se algumas tentativas, que não resultaram para nenhum dos valores de pH experimentados. As "pellets" preparadas àqueles valores de pH apresentaram uma consistência de cola. Analisando-as ao microscópio, verificou-se que apenas alguns núcleos se tinham mantido intactos. A quase totalidade tinha sofrido rotura de membrana e todo o material nuclear se encontrava disperso. Foi, portanto, impossível preparar a suspensão de núcleos e tratá-la de modo semelhante ao procedimento experimental descrito em 7.D.1.1.

### 7.D.3 - Características do equipamento de Absorção Atômica utilizado e condições experimentais

**Equipamento:** Espectrofotómetro Perkin-Elmer 2380 HGA-400

Câmara de grafite, com plataforma de L'vov

Fenda: 0.7

Lâmpada: de Crómio, de Cátodo Ôco

Comprimento de onda: 357.9 nm

Leitura: Absorvância

Correcção da linha de base

Pico (área de integração): 10 s

Gás de arrasto: Árgon

Volume de cada amostra : 20 ml

|                             |      |
|-----------------------------|------|
| Temperatura / °C            | 2650 |
| Rampa / s                   | 80   |
| "Hold" / s                  | 2    |
| Fluxo interno de gás ml/min | 0    |

Tabela 7.D.2 - Programa de temperaturas (um único passo), destinado a um tubo de grafite novo

| Passo                       | 1  | 2   | 3    | 4    | 5    | 6  |
|-----------------------------|----|-----|------|------|------|----|
| Temperatura / °C            | 90 | 130 | 1000 | 2500 | 2600 | 20 |
| Rampa/s                     | 5  | 15  | 10   | 0    | 1    | 1  |
| "Hold" / s                  | 20 | 10  | 20   | 10   | 5    | 10 |
| Leitura                     |    |     |      | x    |      |    |
| Fluxo interno de gás ml/min | 50 | 50  | 50   | 0    | 50   | 50 |

Tabela 7.D.3 - Programa de Temperaturas (\*fornecido pela Perkin-Elmer ao Grupo de Bioquímica da Universidade de Bremen)

#### 7.D.4 - Algumas considerações acerca da determinação de crómio em amostras biológicas

Segundo C. Veillon [285], "a determinação de crómio em materiais biológicos é uma das análises mais difíceis que alguém se pode propôr efectuar".

A determinação de crómio é extremamente dificultada devido às quantidades, muitíssimo pequenas, deste elemento presentes em materiais biológicos, as quais, em geral, têm concentrações ultravestigiais,  $<1\mu\text{g} / \text{g}$ . A Activação de Neutrões, a Espectrometria de Massa e a Absorção Atómica com Atomização Electrotérmica (com câmara de grafite e plataforma de L'vov) são os métodos analíticos cuja sensibilidade é adequada à determinações de quantidades de crómio daquela ordem de grandeza, embora o último destes métodos seja o mais frequentemente utilizado, por ser mais económico e necessitar de quantidades de amostra da ordem de  $5-50\ \mu\text{l}$ . No entanto, os primeiros resultados referidos na literatura, obtidos por esse método, são, provavelmente, errados (demasiado elevados), devido às limitações da sensibilidade da instrumentação disponível nessa época. Quando se verificou que as quantidades de crómio excretadas, provenientes de qualquer dieta comum, eram muito superiores às que podiam ser absorvidas, gerou-se grande controvérsia quanto à validade daqueles resultados. O dilema foi resolvido, em 1978, quando Guthrie *et al* [286] demonstraram claramente que aqueles valores elevados se deviam a uma correcção inadequada do "background", entretanto melhorada na instrumentação posterior. Actualmente, com os limites de detecção permitidos pelos instrumentos modernos disponíveis, em especial após o avanço obtido com o revestimento pirolítico dos tubos de grafite, e com um rigoroso controle de possíveis contaminações (meio ambiente, métodos de amostragem, reagentes, armazenamento), é possível determinar directamente, em algumas amostras, concentrações de crómio da ordem dos  $0.1\text{ppb}$  [286].

Apesar das vantagens referidas, a absorção atómica é a técnica mais susceptível a efeitos de interferência de matriz (nomeadamente matrizes biológicas muito complexas), o que a torna sujeita às mais diversas fontes de erro. Durante a digestão, ou processo análogo, podem verificar-se perdas de "crómio volátil" (interferência negativa) e efeitos de absorção-não específicos (interferências positivas) causados por dispersão de luz e/ou por espécies moleculares (as quais podem ser eliminadas por correcção de "background" com lâmpada de deutério). Além disso, como a camada de material no tubo de grafite é consideravelmente mais espessa que nos outros casos, a velocidade de atomização pode sofrer alterações, significativas.

Apesar de terem sido efectuados muitos e variados estudos sobre os diversos factores que podem afectar a determinação de crómio por absorção atómica em

amostras biológicas, não existe ainda nenhum tratamento que possa ser aceite como "padrão" para qualquer material biológico [287]. Em caso de dúvida, será sensato ter em atenção que:

*"Unless the complete history of any sample is known with certainty, the analyst is well advised not to spend his time analysing it"*

**BIBLIOGRAFIA**

- [1] IARC, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Chromium, Nickel and Welding*, "International Agency for Research on Cancer", Lyon, 1990, Vol. **49**, Cap. 3
- [2] Cieslak-Golonka, M., *Coord. Chem. Reviews*, 1991, **109**, 223
- [3] "Environment Inorganic Chemistry", Irgolic, K. J., Martell, A. E., eds., VCH Publishers, 1985
- [4] Outridge, P. M. e Scheuhammer, A. M., *Bioaccumulation and Toxicology of Chromium: Implications for Wildlife*, in "Reviews of Environmental Contamination and Toxicology", 1993, **130**, 31
- [5] Nieboer, E. e Jusys, A. A., *Biological Chemistry of Chromium*, in "Chromium in the Natural and Human Environments", (Advances in Environmental Science and Technology), ed. Nriagu, J., Wiley Interscience, London, 1988, Vol. **20**, Cap.2
- [6] Nieboer, E. e Shaw, S. L., *Mutagenic and other Genotoxic Effects of Chromium Compounds*, in "Chromium in the Natural and Human Environments", (Advances in Environmental Science and Technology), ed. Nriagu, J. e Nieboer, E., Wiley Interscience, London, 1988, Vol. **20**, Cap.16
- [7] Hayes, R. B., *Carcinogenic Effects of Chromium*, in "Biological and Environmental Aspects of Chromium", (Topics in Environmental Health), ed. Langard, S., Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982, 221-247
- [8] Tandon, S. K., *Organ Toxicity of Chromium in Animals*, in "Biological and Environmental Aspects of Chromium", (Topics in Environmental Health), ed. Langard, S., Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982, 209-220
- [9] Aaseth, J., Alexander, J. e Norseth, T., *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 1982, **50**, 310
- [10] Wetterhahn, K. E. e Hamilton, J. W., *Science Total Environm.*, 1989, **86**, 113
- [11] Snow, E. T., *Pharm. Ter.*, 1992, **53**, 31
- [12] Fabre, R. e Truhaut, R., "Toxicologia", Fundação Calouste Gulbenkian, 1971, 826-834
- [13] Petrilli, F. L. e DeFlora, S., *Mut. Res.*, 1978, **58**, 167
- [14] Rollinson, C., "Comprehensive Inorganic Chemistry", Bailar, J. C. Jr., Emeléus, H. J., Nyholm, R. S. e Trotman-Dickenson, A. F., eds., Pergamon Press, Oxford, 1975, Vol. **3**, Cap. 36, 623-700

- [15] Fraústo da Silva, J. J. R. e Williams, R. J. P., "The Biological Chemistry of the Elements" (The Inorganic Chemistry of Life), Clarendon Press, Oxford, 1991
- [16] Cotton, F. A. e Wilkinson, G., "Advanced Inorganic Chemistry", Wiley-Interscience, N. York, 5th ed., 1988, pg. 679-697
- [17] Deutsch, E., Root, M. J. Nosco, M. J., *Mechanistic Aspects of Transition Metal Complexes Containing Coordinated Sulphur*, in "Advances in Inorganic and Bioinorganic Mechanisms", Academic Press, London, 1982, Vol. 1, 270-389
- [18] Larkworthy, L. F., Nolan, K. B. e O'Brien, P., *Chromium*, in "Comprehensive Coordination Chemistry", Ed. Gillard, R. D. e McCleverty, J. A., Pergamon Press, Oxford, 1986, Cap. 35, 699-969
- [19] Beattie, J. K. e Haight, G. P., Jr., *Chromium(VI) oxidation of Inorganic Substrates*, in "Progress in Inorganic Chemistry", 1972, Vol. 17(2), pg.93
- [20] Ip, D. e Rocek, J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 6311
- [21] McCaan, J. P. e McAuley, A., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1975, 783
- [22] Brauer, S. L. e Wetterhahn, K. E., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 3001
- [23] O'Brien, P., Barrett, J. e Swanson, F., *Inorg. Chim. Acta*, 1985, **108**, L19
- [24] Bose, R. N., Moghaddas, S. e Gelerinter, E., *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 1987
- [25] Signorella, S., Rizzotto, M., Mulero, M., Garcia, S., Frascaroli M. e Sala, L. F., *J. Chem. Educ.*, 1992, **69**(7), 578
- [26] Shi, X., Dalal, N. S. e Vallyathan, V., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991, **290**, 2, 381
- [27] Aiyar, J., Borges, K. M., Floyd, R. A. e Wetterhahn, K. E., *Toxicol. Environ. Chem.*, 1989, **22**, 135
- [28] O'Brien, P., Pratt, J., Swanson, F., Thornton, P. e Wang, G., *Inorg. Chim. Acta*, 1990, **169**, 265
- [29] Purcell, K. F. e Kotz, J. C., "Inorganic Chemistry", Holt-Saunders International Edition, London, 1985
- [30] Nichols, D., "Complexes and First-Row Transition Elements", MacMillan Press Ltd, 1ª ed., London, 1974

- [31] Gillard, R. D. e Mitchell, P. R., *J. Chem. Soc. (A)*, 1968, **9**, 2129
- [32] Stünzi, H., Spiccia, L., Rotzinger, F. P. e Marty, W., *Inorg. Chem.*, 1989, **28**, 66
- [33] Stünzi, H. e Marty, W., *Inorg. Chem.*, 1983, **22**, 2145
- [34] Rotzinger, F. P., Stünzi, H. e Marty, W., *Inorg. Chem.*, 1986, **25**, 489
- [35] Frieden, E., *J. Chem. Educ.*, 1985, **62**, 917
- [36] Mertz, W., *Science*, 1981, **213**, 1332
- [37] Fabre, R. e Truhaut, R., "Toxicologia", Fundação Calouste Gulbenkian, 1971, 45-64
- [38] Amado, F. M. L., *Separação cromatográfica de As(III) e As(IV) e avaliação da sua toxicidade em presença de Hg(II) sobre o crustáceo branqueópode Artemia franciscana*, "Provas de Aptidão Científica e Pedagógica" (Relatório de uma Aula Prática), Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 1991
- [39] Mertz, W. e Schwartz, K., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1955, **58**, 504
- [40] Mertz, W., *Chemica Scripta*, 1983, **21**, 145
- [41] Anderson, R. A., *Science Tot. Environ.*, 1989, **86**, 75
- [42] Mertz, W., *Physiological Reviews*, 1969, **49(2)**, 163
- [43] Barrett, J., O'Brien, P. e Pedrosa de Jesus, J., *Polyhedron*, 1985, **4(1)**, 1
- [44] Chang, J. C., Gerdorn, L. E., Baezinger, N. C. e Goff, H., *Inorg. Chem.*, 1983, **22**, 1739
- [45] Broderick, W. E. e Legg, J. I., *Inorg. Chem.*, 1985, **24**, 3724
- [46] Mertz, W., Toepfer, E. W., Roginsky, E. E. e Polansky, M. M., *Fed. Proc.*, 1974, **33**, 2275
- [47] Cooper, J. A., Anderson, B. F., Buckley, P. e Blackwell, L. F., *Inorg. Chim. Acta*, 1984, **91**, 1
- [48] Haylock, S. J., Buckley, P. D. e Blackwell, L. F., *J. Inorg. Biochem.*, 1983, **18**, 195
- [49] Haylock, S. J., Buckley, P. D., Blackwell, L. F., *J. Inorg. Biochem.*, 1983, **19**, 105
- [50] Toepfer, E. W., Mertz, W., Polansky, M. M., Roginsky, E. E. e Wolf, R., *J. Agric. Food Chem.*, 1977, **25**, 162
- [51] Mirsky, N., *J. Inorg. Biochem.*, 1993, **49**, 123

- [52] Connett, P. H. e Wetterhahn, K. E., *Structure and Bonding (Berlin)*, 1983, **54**, 93
- [53] Jennette, K. W., *Environ. Health Perspect.*, 1981, **40**, 233
- [54] Beyersmann, D., *Toxicol. Environ. Chem.*, 1989, **22**, 61
- [55] Kortenkamp, A. e Beyersmann, D., *Toxicol. Environ. Chem.*, 1987, **14**, 23
- [56] Debetto, P., Arslan, P., Antolini, M. e Luciani, S., *Xenobiotica*, 1988, **18(6)**, 657
- [57] Bianchi, V. e Levis, A. G., *J. Toxicol. Environm. Chemistry*, 1984, **9**, 1
- [58] Goodgame, D. L. e Joy, A. M., *Inorg. Chim. Acta*, 1987, **135**, 115
- [59] Goodgame, D. L. e Joy, A. M., *J. Inorg. Biochem.*, 1986, **26**, 219
- [60] Kwong, D. W. J. e Pennington, D. E., *Inorg. Chem.*, 1984, **23**, 2528
- [61] Borges, K. M., Boswell, J. S., Liebross, R. e Wetterhahn, K. E., *Carcinogenesis*, 1991, **12(4)**, 551
- [62] Wetterhahn, K. E., Hamilton, J. W., Aiyar, J., Borges, K. M. e Floyd, R., *Biol. Trace Elem. Res.*, 1989, **21**, 405
- [63] Standeven, A. M. e Wetterhahn, K. E., *J. Amer. College Toxicol.*, 1989, **8(7)**, 1275
- [64] Tsapakos, M. J., Hampton, T. H. e Wetterhahn, K. E., *Cancer Res.*, 1983, **43**, 5662
- [65] Tsapakos, M. J., Hampton, T. H., Sinclair, P. R., Sinclair, J. F., Bemont, W. J. e Wetterhahn, K. E., *Carcinogenesis*, 1983, **4**, 959
- [66] Floro, N. A. e Wetterhahn, K. E., *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1984, **124(1)**, 106
- [67] Kortenkamp, A., O'Brien, P. e Beyersmann, D., *Carcinogenesis*, 1991, **12(6)**, 1143
- [68] Tsapakos, M. J. e Wetterhahn, K. E., *Chem. Biol. Interact.*, 1983, **46**, 265
- [69] Tamino, G., Peretta, L. e Levis, A. G., *Chem. Biol. Interact.*, 1981, **37**, 309
- [70] Tsapakos, M. J., Hampton, T. H. e Jennette, K. W., *J. Biol. Chem.*, 1981, **256(8)**, 3623
- [71] Snow, E. T., *Environm. Health Perspect.*, 1991, **92**, 75
- [72] DeFlora, S. e Wetterhahn, K. E., *Life Chem. Reports*, 1989, **7**, 169
- [73] McAuley, A. e Olatunji, M. A., *Can. J. Chem.*, 1977, **55**, 3328

- [74] McAufey, A. e Olatunji, M. A., *Can. J. Chem.*, 1977, **55**, 3335
- [75] Bocarsly, J. R., Chiang, M. Y., Bryant, L. e Barton, J. K., *Inorg. Chem.*, 1990, **29**, 4898
- [76] Speckhard, D. e Cleland, W., *J. Inorg. Biochem.*, 1991, **41**, 105
- [77] a) Calafat, A. M., Fiol, J. J., Terron, A., Moreno, V., Goodgame, D. M. L. e Hussain, I., *Inorg. Chim. Acta*, 1990, **169**, 133; b) Vicens, M., Prats, M., Fiol, J. J. e Terron, A., *Inorg. Chim. Acta*, 1989, **158**, 59; c) Vicens, M., Fiol, J. J., Terron, A. e Moreno, V., *Inorg. Chim. Acta*, 1989, , 131; d) Vicens, M., Fiol, J. J., Terron, A., Moreno, V. e Goodgame, D. M. L., *Inorg. Chim. Acta*, 1989, **157**, 127
- [78] Santos, T. M., Pedrosa de Jesus, J. D. e O'Brien, P., *Polyhedron*, 1992, **11(13)**, 1687
- [79] O'Brien, P., Pedrosa de Jesus, J. D. e Santos, T. M., *Inorg. Chim. Acta*, 1987, **131**, 5
- [80] Tandon, R. K., Crisp, P. T. e Ellis, J., *Talanta*, 1984, **3**, 227
- [81] Michel, G. e Machiroux, R., *J. Raman Spectrosc.*, 1983, **14**, 22
- [82] Michel, G. e Cahay, R., *J. Raman Spectrosc.*, 1986, **17**, 79
- [83] Vogel, A., "A Textbook of Quantitative Inorganic Analysis", 3ª ed., Longmans, London, 1961
- [84] Morrison, R. e Boyd, R., "Química Orgânica", 3ª ed., Fund. Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1983
- [85] Haight, G. P., Jursich, G. M., Kelso, M. T. e Merrill, P. J., *Inorg. Chem.*, 1985, **24**, 2740
- [86] Ramesh, A., Mahapatro, S. N., Liu, J. H. e Rocek, J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 5172
- [87] Srinivasan, V. e Rocek, J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 127
- [88] Hasan, F. e Rocek, J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97(6)**, 1444
- [89] Krumpolc, M. e Rocek, J., *Inorg. Chem.*, 1985, **24**, 617
- [90] Gordon, G. e Taube, H., *Inorg. Chem.*, 1962, **1(1)**, 69
- [91] Lin, Chin-tung e Beattie, J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **94(9)**, 3011
- [92] Muirhead, K. A. e Haight, G. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **94(9)**, 3006
- [93] Edmonds, M., Howlett, K. e Wedzicha, B., *J. Chem. Soc. (A)*, 1970, 2860
- [94] Krumpolc, M. e Rocek, J., *Inorg. Synth.*, 1980, **20**, 63

- [95] Krumpolc, M. e Rocek, J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 137
- [96] Mahapatro, S. N., Krumpolc, J. e Rocek, J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 3799
- [97] Cooper, J. N., Staudt, G. E., Smalser, M. L., Setzko, L. M. e Haight, G. P., *Inorg. Chem.*, 1973, **12(9)**, 2075
- [98] Olatunji, M. A. e McAuley, A., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1975, 682
- [99] Connett, P. H. e Wetterhahn, K. E., *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 4282
- [100] O'Brien, P., Wang, G. e Wyatt, P. B., *Polyhedron*, 1992, **11(24)**, 3211
- [101] Meister, A., *Cancer Res. (Suppl.)*, 1994, **54**, 1669s
- [102] Jennette, K. W., *Biol. Trace Element Res.*, 1979, **1**, 55
- [103] Langard, S., *Biol. Trace Element Res.*, 1979, **1**, 45
- [104] DeFlora, S., *Cancer Research*, 1985, **45**, 3188
- [105] Gergely, A. e Sóvágó, I., *The coordination Chemistry of L-cysteine and D-penicillamine*, in "Metal Ions in Biological Systems," Ed. Siegel, H., Marcel Dekker, New York, 1979, Vol **9**, Cap 3
- [106] Burger, K., "Biocoordination chemistry" (Coordination equilibria in biological active systems), in "Ellis-Horwood Series in Inorganic Chemistry", Ellis Horwood Ltd., 1990
- [107] Wiegand, H. J., Ottenwälder, H. e Bolt, H. M., *Toxicology*, 1984, **33**, 341
- [108] Laurie, S. H., **Aminoacids, peptides and proteins**, in "Comprehensive Coordination Chemistry", Ed. Gillard, R. D. e McCleverty, J. A., Pergamon Press, Oxford, 1986, Vol. **2**, Cap. 20.2, 739-776
- [109] Rabenstein, D. L., Guevremont, R. e Evans, C. A., *Glutathione and its metal complexes*, in "Metal Ions in Biological Systems", Ed. Siegel, H., Marcel Dekker, New York and Basel, 1979, Vol **9**, Cap.4
- [110] Meister, A., *Science*, 1983, **220**, 472
- [111] Meister, A. e Anderson, M. E., *Glutathione: Annu. Rev. Biochem.*, 1983, **52**, 711
- [112] Cupo, D. Y. e Wetterhahn, K. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (Biochemistry)*, 1985, **82**, 6755
- [113] Kortenkamp, A., Ozolins, Z., Beyersmann, D. e O'Brien, P., *Mut. Res.*, 1989, **216**, 19

- [114] Borges, K.M. e Wetterhahn, K. E., *Carcinogenesis*, 1989, 1989, **10(11)**, 2165
- [115] O'Brien, P. e Ozolins, Z., *Inorg. Chimica Acta*, 1989, **155**, 25
- [116] Sugiura, Y., Hojo, Y. e Tanaka, H., *Chem. Pharm. Bull.*, 1972, **20**, 1362
- [117] Davies, M. B., *Polyhedron*, 1992, **11(3)**, 285
- [118] Lefebvre, Y. e Pézarat H., *Chem. Res. in Toxicology*, 1992, **5**, 461
- [119] Standeven, A. M. e Wetterhahn, K. E., *Carcinogenesis*, 1991, 1733
- [120] Suzuki, Y. e Fukuda, K., *Arch. Toxicol.*, 1990, **64**, 169
- [121] Suzuki, Y., *Industrial Health*, 1990, **28**, 9
- [122] Kosower, E. M., in "Glutathione: Metabolism and Functions", eds. Arias, I. M. e Jakoby, W. B., Raven Press, New York, 1976
- [123] Heimann, W. , "Fundamentals of Food Chemistry", Ellis Horwood Pub., 1980, 223
- [124] O'Brien, P., Ozolins, Z. e Wang, G., *Inorg. Chim. Acta*, 1989, **166**, 301
- [125] Wiegand, H. J., Ottenwälder, H. e Bolt, H. M., *Arch. Toxicol.*, 1985, Suppl.8, 319
- [126] Abdullah, M., Barrett, J. e O'Brien, P., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1985, 2085
- [127] Hojo, Y., Sugiura, Y. e Tanaka, H., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1977, **39**, 1859
- [128] Maslowska, J. ,Chruscinski, L., *J. Inorg. Nuclear Chem.*, 1981, **43(12)**, 3398
- [129] Hollis, L. S., Amundson, A. R. e Stern, E. W., *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 274
- [130] Connett, P. H. e Wetterhahn, K. E., *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 1842
- [131] O'Brien, P. e Wang, G., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1992, 690
- [132] Perez-Benito, J., Arias, C., Lamhari, D. e Anhari, A., *Int. J. Chemical Kinet.*, 1994, **26**, 587
- [133] Perez-Benito, J. e Arias, C., *Can. J. Chem.*, 1993, **71**, 649
- [134] Shi, X. e Dalal, N. S., *Biochem. Biophys., Res. Commun.*, 1988, **156(1)**, 137
- [135] Branca., M., Dessi, A., Kozłowski, H., Micera, G. e Swiatek, J., *J. Inorg. Biochemistry*, 1990, **39**, 217

- [136] Alcock, N. W., Benton, D. J. e Moore, P., *Trans. Faraday Soc.*, 1970, **60**, 2210
- [137] Wilkins, R. G., "The study of Kinetics and Mechanisms of Reactions of Transition Metal Complexes", Allyn and Bacon, Inc., Boston, 2ª ed., 1974
- [138] Muirhead, K., Haight Jr., G. P., *Inorg. Chem.*, 1973, **12**, 1116
- [139] Baldea, I. e Niac, G., *Inorg. Chem.*, 1968, **7**, 1232
- [140] Mazureck, W., Nichols, P. J., West, B. O., *Polyhedron*, 1991, **10(7)**, 753
- [141] Hill, J. e MacAuley, A., *J. Chem. Soc.(A)*, 1968, 2405
- [142] Ellis, K.J. e McAuley, A., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1973, 1533
- [143] Nakamoto, K., "Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds", 4ª ed., Wiley-Interscience, New York, 1986, pg. 242, Tab 5
- [144] Tu, A. T., "Raman Spectroscopy in Biology (Principles and Applications)", John Wiley and Sons, Inc., New York, 1982
- [145] Meloni, P. A. e Czernuszewicz, R. S., *Vibrat. Spect.*, 1993, **5**, 205
- [146] Santos, T. M., Pedrosa de Jesus, J. D. e O'Brien, P., *Cinética de formação e de decomposição de intermediários tioéster em reacções de redução de Cr(VI) por tióis*, M6, XIV Encontro da Sociedade Portuguesa de Química, Aveiro, 1994, 5/8 Abril
- [147] Santos, T. M., Pedrosa de Jesus, J. D. e O'Brien, P., *Kinetic studies of Cr(VI)/Thiol reduction reactions*, EUROBIC II (Metal Ions in Biological Systems), Florença, Itália, 1994, 30 Agosto / 3 Setembro
- [148] Meester, P. de, Hodgson, D., Freeman, H. C. e Moore, C. J., *Inorg. Chem.*, 1977, **16(6)**, 1494
- [149] O'Brien, P., Ozolins, Z., *Inorg. Chim. Acta*, 1989, 161, 261
- [150] Adzamli, I. K. e Deutsch, E., *Inorg. Chem.*, 1985, **24**, 4086
- [151] Cooper, J. A., Blackwell, L. F. e Buckley, P. D., *Inorg. Chim. Acta*, 1984, **92**, 23
- [152] Kortenkamp, A., Oetken, G. e Beyersmann, D., *Mut. Res.*, 1990, **232**, 155
- [153] O'Brien, P. e Wang, G., *Environm. Geochem. (and Health)*, 1989, **11**, 77
- [154] Cieslak-Golonka, M., Raczko, M. e Staszak, Z., *Polyhedron*, 1992, **11(19)**, 2549

- [155] O'Brien, P. e Ozolins, Z., *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 1987, **106(6/7)**, 423
- [156] Abdullah, B. e O'Brien, P., *Chromium(III) complexes of glutathione*, Abstracts of Papers, Tha42-7, XXIII ICPC, 1984, Boulder, Colorado
- [157] Gillard, R. D., Laurie, S. H., Price, D. C., Phipps, D. A. e Weick, C. F., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1974, 1385
- [158] Oki, H. e Otsuka, K., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1976, **49(7)**, 1841
- [159] Santos, T. M. e Pedrosa de Jesus, J. D., *Cr(III) complexes formed in the reduction of Cr(VI) by thio-aminoacids*, P203, XXIX International Conference on Coordination Chemistry, Lausanne, Suíça, 1992, 19 / 24 Julho
- [160] Wechler, C. J. e Deutsch, E., *Inorg. Chem.*, 1973, **12**, 2682
- [161] O'Brien, P., Pedrosa de Jesus, J. D. e Santos, T. M., *A study of the equilibria and kinetics of the hydrolysis of the bis(cysteinato)chromate(III) anion in moderately acidic solutions*, IX Encontro da Sociedade Portuguesa de Química, Coimbra, 1986, 2/4 Junho
- [162] deMeester, P. e Hodgson, D. J., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1977, 1604
- [163] Madafiglio, K., Manning, T. M., Murdoch, C. M., Tulip, W. R., Cooper, M. K., Hambley, T. W. e Freeman, H. C., *Acta Cryst.* 1990, **C46**, 554
- [164] Freni, M., Gervasini, A., Romiti, P., Beringheli, T. e Morazonni, F., *Spectrochimica Acta*, 1983, **39A(1)**, 85
- [165] Huhey, J. E., "Inorganic Chemistry", Harper and Row, New York, 1983, 3ª ed., Cap. 9, pg. 359
- [166] Hoggard, P.E., *Inorg. Chem.*, 1981, **20**, 415
- [167] Ramasami, T. e Sykes, A. G., *Inorg. Chem.*, 1976, **15**, 1010
- [168] Asher, D. e Deutsch, E., *Inorg. Chem.*, 1972, **11**, 2927
- [169] Adzamlı, I. K., Nosco, D. e Deutsch, E., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1980, **42**, 1364
- [170] Santos, Teresa M., *Reacções com compostos de coordenação contendo a ligação Cr-S: cinética e mecanismos*, Síntese Bibliográfica, Provas de Aptidão Científico-Pedagógica, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 1987
- [171] Abdullah, B., "Tese de doutoramento", Queen Mary and Westfield College, Universidade de Londres, 1985

- [172] Mason, S.F., *Molecular optical activity and chiral discriminations*, Cambridge University Press, Cambridge, 1982
- [173] Denning, R.G. e Piper, T.S., *Inorg. Chem.*, 1966, **5(6)**, 1056
- [174] Ref.<sup>a</sup> [18], pg.902
- [175] Minor, S.S, Witte, G. e Everett, Jr., G.W., *Inorg. Chem.*, 1976, **15(9)**, 2052
- [176] Lane, R. A. e Bennett, L. E., *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92(4)**, 1089
- [177] Bellamy, L. I., "The Infrared Spectra of Complex Molecules", Chapman and Hall, London, 1975
- [178] Patil, P. R. e Krishnan, V., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1978, **40**, 1255
- [179] Heaster, H. e Hoggard, P. E., *Polyhedron*, 1994, **13(3)**, 333
- [180] Asher, L. E. e Deutsch, E., *Inorg. Chem.*, 1973, **12**, 1774
- [181] Lane, R. H. e Bennett, L. E., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1971, 491
- [182] Burgess, J., "Metal Ions in Solution", Ellis Horwood, New York, 1978, pg. 263-265
- [183] "Handbook of Chemistry and Physics", CRC Press, 1980, 61<sup>a</sup> ed., pg. D-169
- [184] Oki, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1977, **50(3)**, 680
- [185] Oki, H., *J. Sci. Hiroshima Univ.*, 1982, Ser. A, **45(3)**, 447
- [186] Mizuochi, H., Uehara, A., Kyuno, E. e Tsuchiya, R., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1971, **44(6)**, 1555
- [187] Green, R. W. e Ang, K. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 5482
- [188] Ley, H. e Winkler, H. , *Ber.*, 1909, **42**, 3894
- [189] Tsubomura, T., Ohkouchi, I. e Morita, M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1991, **64**, 2341
- [190] Pedrosa de Jesus, J. D., Santos, T. M. e O'Brien, P., *Polyhedron*, 1991, **10(6)**, 575
- [191] Mori, M., Shibata, M., Kyuno, E. e Kanaya, M., *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1961, **34(12)**, 1837
- [192] Dunlop, J. H. e Gillard, R. D., *J. Chem. Soc.*, 1965, 6531
- [193] Drew, M. G. B., Dunlop, J. H., Gillard, R. D. e Rogers, D., *Chem. Comm.*, 1966, 42

- [194] McCaffery, A. J., Mason, S. F. e Ballard, R. E., *J. Chem. Soc.*, 1965, 2883-2892
- [195] Douglas, B. E., Haines, R. H. e Brushmiller, J., *Inorg. Chem.*, 1963, 2(3), 1194
- [196] Mason, S. F., *Quart. Rev.*, 1963, 17, 20
- [197] Gillard, R. D., Sheperd, D. J. e Tarr, D. A., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1976, 594
- [198] Gillard, R. D. e Payne, N. C., *J. Chem. Soc.(A)*, 1969, 1197
- [199] Larsen, E. e Mason, S. F., *J. Chem. Soc.(A)*, 1966, 313
- [200]-Sano, M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1991, 64, 1684
- [201] Douglas, B. E. e Yamada, S., *Inorg. Chem.*, 1965, 4(11), 1561
- [202] Bosnich, B. e Harrowfield, J. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, 94(10), 3425
- [203] Israily, N., *C. R. Acad. Sci., Ser. C.*, 1966, 266, 1462
- [204] Wallace, H. M. e Hoggard, P. E., *Inorg. Chim. Acta*, 1982, 65, L3
- [205] Ref<sup>a</sup> [18], pg. 870
- [206] Butler, K. R. e Snow, M. R., *Chem. Comm.*, 1971, 550
- [207] Pedrosa de Jesus, J. D. e Santos, T. M., *Stereochemical and hydrolytic studies of Cr(III) complexes with bidentate aminoacids*, XXVIII International Conference on Coordination Chemistry, Agosto 1990, Gera, Alemanha
- [208] O'Brien, P. Motevalli, M., Quick, A., Santos, T. M. e Pedrosa de Jesus, J. D., submetido para publicação
- [209] Bryan, R. F., Greene, P. T., Stokely, P. F. e Wilson, Jr., E. W., *Inorg. Chem.*, 1972, 10, 1468
- [210] Murdoch, C. M., Cooper, M. K., Hambley, T. W., Hunter, W. N. e Freeman, H. C., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1986, 1329
- [211] Santos, T. M., Pedrosa de Jesus, J. D., O'Brien, P. e Motevalli, M., *Synthesis, spectroscopic and structural characterization of a new complex of S-valine with Cr(III)*, Latin American Inorganic Meeting, LAICM 1399P, Santiago de Compostela, Espanha, 13/17 Setembro, 1993
- [212] Litzow, M. R. e Spalding, T. R., *Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds*, in "Physical Inorganic Chemistry", Monographs ed. Lappert, M. (Monograph 2), Elsevier Scientific Publ. Comp., 1973

- [213] Everett, G. W., Jr., Finney, K. S., Brushmiller, J. G., Seematter, D. J. e Wingert, L. A., *Inorg. Chem.*, 1974, **13**(3), 536
- [214] Santos, T. M., Pedrosa de Jesus, J. D., Amado, F. L., Domingues, P. M., Santana-Marques, M. G. e Ferrer-Correia, A. J., *Inorg. Chim. Acta*, submetido para publicação
- [215] DeFlora, S., Bagnasco, M., Serra, D. e Zanicchi, P., *Mut. Res.*, 1990, **238**, 99
- [216] Bianchi, V., Celotti, G., Lanfranchi, G., Majone, F., Marin, G., Montaldi, A., Sponza, G., Tamino, G., Venier, P., Zantedeschi, A. e Levis, A. G., 1983, *Mut. Res.*, **117**, 279
- [217] Levis, A. G. e Bianchi, V., *Mutagenic and cytogenic effects of chromium compounds*, in "Topics in Environmental Health, Biological and Environmental aspects of Chromium", in Langård, S. (Ed.), Elsevier Biomedical, North Holland, 1983, Cap. 8, 171-208
- [218] Léonard, A. e Lauwerys, R. R., *Mut. Res.*, 1980, **76**, 227
- [219] Bianchi, V. e Levis, A. G., *Toxicol. and Environ. Chem.*, 1987, **15**, 1
- [220] Cupo, D. Y. e Wetterhahn, K. E., *Cancer Res.*, 1985, **45**, 1146
- [221] Jennette, K. W., *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 874
- [222] Sugiyama, M., Tsuzuki, K. e Ogura, R., *J. Biol. Chem.*, 1991, 3383
- [223] Sugiyama, M., Ando, A. e Ogura, R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, **159**(3), 1080
- [224] Aiyar, J., DeFlora, S. e Wetterhahn, K. E., *Carcinogenesis*, 1992, **13**(7), 1159
- [225] O'Brien, P. e Wang, G., *Polyhedron*, 1993, **12**(11), 1409
- [226] Sugiyama, M. e Tsuzuki, K., *FEBS Letters*, 1994, **341**, 273
- [227] Liebross, R. H. e Wetterhahn, K. W., *Chem. Res. in Toxicol.*, 1990, **3**(5), 401
- [228] Liebross, R. H. e Wetterhahn, K. W., *Carcinogenesis*, 1992, **13**(11), 2113
- [229] Liu, K. J., Jiang, J., Swartz, H. M. e Shi, X., *Archiv. Biochem. and Biophys.*, 1994, **313**(2), 248
- [230] Aiyar, J., Berkovitz, H. J., Floyd, R. e Wetterhahn, K. E., *Environ. Health Perspect.*, 1991, **92**, 53
- [231] Dillon, C. T., Lay, P. A., Bonin, A. M., Dixon, N. E., Collins, T. J. e Kostka, K. L., *Carcinogenesis*, 1993, **14**(9), 1875

- [232] Jones, P., Kortenkamp, A., O'Brien, P., Wang, G. e Yang, G., *Archives Biochem. Biophys.*, 1991, **286**, 2, 652
- [233] Bose, R. N., Moghaddas, S. e Li, D., *Mendeleev Comm.*, 1991, 108
- [234] Perez-Benito, J., Arias, C. e Lamrhari, D., *New J. Chem.*, 1994, **18**, 663
- [235] Köster, A. e Beyersmann, D., *Toxicol. Environ. Chem.*, 1985, **10**, 307
- [236] Kortenkamp, A., Curran, B. e O'Brien, P., *Carcinogenesis*, 1992, **13**(2), 301
- [237] Salnikov, K., Zhitkovich, A. e Costa, M., *Carcinogenesis*, 1992, **13**(12), 2341
- [238] Hneihen, A. S., Standeven, A. M. e Wetterhahn, K. E., *Carcinogenesis*, 1993, **14**(9), 1795
- [239] Kitagawa, S., Seki, H., Kametani, F. e Sakurai, H., 1982, *Chem.-Biol. Interactions*, **40**, 265
- [240] Buttner, B. e Beyersmann, D., *Xenobiotica*, 1985, **15**(8/9), 735
- [241] Gava, C., Perazzolo, M., Zentilin, L., Levis, A. G., Corain, B., Bombi, G. G., Palumbo, M. e Zatta, P., *Toxicol. and Environ. Chem.*, 1989, **22**, 149
- [242] Warren, G., Schultz, P., Brancroft, D., Bennett, K., Abbott, E. H. e Rogers, S., *Mut. Res.* 1981, **90**, 111
- [243] Wise, J. P., Orenstein, J. M. e Patierno, S. R., *Carcinogenesis*, 1993, **14**(3), 429
- [244] Beyersmann, D. e Köster, A., *Toxicol. Environ. Chem.*, 1987, **14**, 11
- [245] Sehlmeier, U., Hechtenberg, S., Klyszcz, H. e Beyersmann, D., *Arch. Toxicol.*, 1990, **64**, 506
- [246] Wiegand, H. J., Ottenwälder, H. e Bolt, H. M., *Toxicol. Env. Chem.*, 1987, **14**, 263
- [247] Biederman, K. A. e Landolph, J. R., *Cancer Res.*, 1990, **50**, 7835
- [248] Hamilton, J. W. e Wetterhan, K. E., *Molecular Carcinogenesis*, 1989, 2, 274
- [249] Mikalsen, A., Alexander, J., Andersen, R. A. e Ingelman-Sundberg, M., *Pharm. Toxicol.*, 1991, **68**, 456
- [250] Mikalsen, A., Alexander, J., Wallin, H., Ingelman-Sundberg, M. e Andersen, R. A., 1991, *Carcinogenesis*, **12**, 825
- [251] Garcia, J. D. e Jennette, K. E. W., *J. Inorg. Biochem.*, 1981, **14**, 281
- [252] O'Brien, P. e Kortenkamp, A., *Environm. Health Persp.*, 1994, **102** (Suppl. 3), 3

- [253] Standeven, A. M. e Wetterhahn, K. E., *Carcinogenesis*, 1992, **13(8)**, 1319
- [254] Kortenkamp, A. e O'Brien, P., *Environm. Health Persp.*, 1994, **102** (Suppl. 3), 237
- [255] Sugiyama, M., *Free Radical Biology and Medicine*, 1992, **12**, 397
- [256] Barrett, J., O'Brien, P. e Swanson, F., *Inorg. Chim. Acta*, 1985, **108**, L19
- [257] Farrell, R. P., Judd, R. J., Lay, P. A., Dixon, N. E., Baker, R. S. U. e Bonin, A. M., *Chem. Res. Toxicol.*, 1984, **2(4)**, 227
- [258] Shi, X., Dalal, N. S. e Kasprzak, K. S., *Archives Biochem. Biophys.*, 1993, **302(1)**, 294
- [259] Wedrychowski, A., Ward, W., Schmidt, W. N. e Hnilica, L., *J. Biol. Chem.*, 1985, **260(11)**, 7150
- [260] Branca, M., Dessi, A., Kozlowski, H., Micera, G. e Serra, M. V., *FEBS Letters*, 1989, **257(1)**, 52
- [261] Shi, X. e Dalal, N. S., *J. Inorg. Biochem.*, 1990, **40**, 1
- [262] Fornace Jr., A., Seres, D. S., Lechner, J. F. e Harris, C. C., *Chem.-Biol. Interact.*, 1981, **36**, 345
- [263] Lewalter, J. e Korallus, U., *Toxicol. and Environ. Chem.*, 1989, **24**, 25
- [264] Lin, X., Zhuang, Z. e Costa, M., *Carcinogenesis*, 1992, **13(10)**, 1763
- [265] Sugiyama, M., Wang, X.-W. e Costa, M., *Cancer Res.*, 1986, **46**, 4547
- [266] Chen, Y., Cohen, M. D., Snow, E. T. e Costa, M., *Carcinogenesis*, 1991, **12(9)**, 1575
- [267] Weil, J. H., "Bioquímica Geral", 4ª ed., Fund. Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1983
- [268] Borges, K. M. e Wetterhahn, K. E., *Chem. Res. Toxicol.*, 1991, **4**, 638
- [269] Krumpolc, M. e Rocek, J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 3206
- [270] Kitagawa, S., Seki, H., Kametani, F. e Sakurai, H., *Inorg. Chimica Acta*, 1988, **152**, 251
- [271] Buttner, B. e Beyersmann, D., *Toxicol. Environ. Chem.*, 1989, **22**, 39
- [272] Wolf, Th., Kasemann, R. e Ottenwälder, H., *Carcinogenesis*, 1989, **10**, 655
- [273] Okada, S., Suzuki, M. e Ohba, H., *J. Inorg. Biochem.*, 1983, **19**, 95

- [274] Österberg, R. e Persson, D., *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 1989, **2**, 221
- [275] Wolf, Th., Wiegand, H. J. e Ottenwälder, H., *Toxicol. Env. Chem.*, 1989, **23**, 1
- [276] Kortenkamp, A. e O'Brien, P., *Carcinogenesis*, 1991, **12(5)**, 921
- [277] Manning, G. S., *Quarterly Reviews of Biophysics*, *II*, 1978, **2**, 179
- [278] Widom, J., Baldwin, R. L., *J. Mol. Biol.*, 1980, **144**, 431
- [279] Long, E. C., e Barton, J. K., *Acc. Chem. Res.*, 1990, **23(9)**, 271
- [280] Gulanowski, B., Świątek, J. e Kosłowski, H., *J. Inorg. Biochem.*, 1992, **48**, 289
- [281] Kortenkamp, A., O'Brien, P. e Beyersmann, D., *Toxicol. Environm. Chem.*, 1992, **35**, 149
- [282] Atkins, P. W., "Physical Chemistry", Oxford University Press, 4<sup>a</sup> ed., 1990
- [283] "Stopped-flow spectrophotometer" (Model 1705), Instruction Manual, Applied Photophysics Ltd., England, 1980
- [284] Bjerrum, N., *Inorg. Synth*, Vol. **II**, 218
- [285] Veillon, C., *Science Tot. Environm.*, 1989, **86**, 65
- [286] Guthrie, B. E., Wolf, W. R. e Veillon, C., *Anal. Chem.*, 1978, **50**, 1900
- [287] Hubert, J., *Techniques for measurement of chromium in biological materials*, in "Chromium in Nutrition and Metabolism", ed. Shapcott, D. e Hubert, J., Elsevier / North-Holland Biomedical Press, 1979, Vol. **2**, 15