

6 Resultados e discussão dos Ligantes

6.1 Potenciometria dos Ligantes

Os dados das titulações potenciométricas de todos os sistemas estudados se encontram no apêndice 1. As curvas de titulação potenciométricas de todos os ligantes puros estudados encontram-se na figura 8. Nas titulações das poliaminas e da PCr foram adicionados 1 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹.

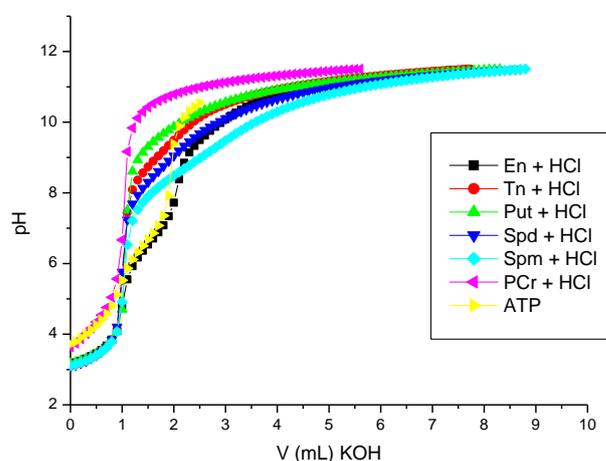


Figura 8 – Curvas de titulação potenciométricas da poliaminas (en,tn, Put, Spd, Spm) e PCr (com adição de 1 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹) e ATP

Os ligantes en, tn, Spd, PCr e ATP, já foram estudados e suas constantes de formação foram calculados em nossos laboratórios e publicados por Silva J. *et al* [3] e Silva A. *et al* [47]. Os resultados foram utilizados no presente trabalho. Os ligantes Put e Spm foram estudados no presente trabalho e suas constantes de formação calculadas embora dados já existissem na literatura. O estudo tornou-se necessário para obter-se todos os valores determinados sob as mesmas condições experimentais. Os valores encontrados estão de acordo com os dados encontrados na literatura. Todos os cálculos para a obtenção dos logaritmos das constantes de formação dos ligantes realizados nos trabalhos foram feitos a partir do programa de computador HYPERQUAD [85] e as curvas de validação e de distribuição de espécies em função do pH a partir do programa HYSS [88]. Na Tabela 3, são apresentados os logaritmos das constantes de

formação ($\log \beta$) dos ligantes en, tn, Put, Spd, Spm, fosfocreatina e ATP, assim como os dados de referência encontrados na literatura.

Tabela 3 - Logaritmos das constantes de formação ($\log \beta$) dos ligantes (en, tn, Spd, PCr e ATP)

Espécies	$\log \beta$	Referência
Hen		10,03*
H ₂ en		17,22*
Htn		10,77*
H ₂ tn		19,62*
HPut	9,47 ± 0,02	9,35***
H ₂ Put	16,32 ± 0,06	16,35***
HSpd		10,99*
H ₂ Spd		21,05*
H ₃ Spd		29,52*
HSpm	11,18 ± 0,08	10,91****
H ₂ Spm	21,14±0,05	21,22****
H ₃ Spm	30,33±0,01	30,39****
H ₄ Spm	38,35±0,01	38,67****
HPCr		11,04**
H ₂ PCr		15,28**
HATP		6,61*
H ₂ ATP		10,79*

* calculados por Silva J. *et al* [3]

** calculados por Silva A. *et al* [47]

*** calculado por Lomozik L. *et al* [97]

**** calculado por Lomozik L. *et al* [58]

Os valores das tabelas 3 foram transformados em constantes de dissociação e encontram-se na tabela 4. As equações (17) a (20), na página 45, foram utilizadas para o cálculo.

Tabela 4 – Constantes das dissociações dos ligantes (pK)

	pK ₁	pK ₂	pK ₃	pK ₄
en	7,19	10,03		
tn	8,85	10,77		
Put	6,85	9,47		
Spd	8,47	10,06	10,99	
Spm	8,02	9,19	9,96	11,18
PCr		2,12	4,24	11,04
ATP	4,18	6,61		

A partir dos valores de pKs, observa-se que as poliaminas começam a desprotonar em pHs altos, em torno do pH fisiológico, ou em pH mais altos. Assim, observa-se que as poliaminas de fato encontram-se protonadas em pH biológico.

As diaminas en, tn e Put possuem 2 hidrogênios ionizáveis nas extremidades das cadeias. Cada um desprotona em determinado pH diferente.

As poliaminas tn e Spd têm valores de pK_1 e pK_2 bem próximos, indicando que, no caso da Spd, os dois grupos amino separados pela cadeia de 3 carbonos, desprotonam-se primeiro. Para a confirmação foi feito estudo de 1H RMN para determinar a seqüência de desprotonação da poliamina Spd [3].

A fórmula estrutural da PCr revela a presença de quatro grupos ácidos. Em ordem decrescente de força ácida, os grupos ácidos podem ser identificados, na PCr, como a primeira hidroxila do ácido fosfórico, a carboxila, a segunda hidroxila do ácido fosfórico e o hidrogênio do grupo guanidino. A primeira hidroxila do grupo ácido da PCr possui acidez muito maior que o ácido fosfórico ($=2,12$), sendo o pK_a menor que 1,96. Isto se deve ao forte efeito indutivo da carga positiva do nitrogênio do grupo guanidino e ao efeito de solvatação. Se a extensão da solvatação é maior para o ácido que para o íon, o efeito é o enfraquecimento da força ácida. Quando um hidrogênio em um ácido contendo dois ou mais equivalentes de átomos de hidrogênios ácidos é substituído por um grupo alquil, o número de átomos de hidrogênio que podem ser solvatados e diminuído. O decréscimo na energia de solvatação resulta em um aumento da força do ácido. Este efeito é de grande importância nos ácidos fosfóricos alquilados [47].

O grupo carboxila na PCr apresenta uma força ácida comparável ao grupo carboxila da creatina com pK_a de 2,7.

Em concordância com o valor encontrado para o ácido arginofosfórico, a segunda hidroxila do ácido fosfórico é a responsável pela terceira desprotonação em torno de pH 4,24 (pK_3). O próton responsável pela quarta desprotonação da PCr é o hidrogênio do grupo guanidino. A desprotonação desse grupo ocorre em torno de pH 11,04 (pK_4) [47].

O ATP possui vários hidrogênios ionizáveis sendo os 2 valores de pK apresentados na Tabela 4 referentes à desprotonação do nitrogênio N-1 da adenina (pK_1) e o pK_2 à desprotonação do átomo de oxigênio γ do grupamento fosfato terminal [50,98].

6.1.1

Interação entre as Poliaminas e os ligantes PCr e ATP

A partir do cálculo das constantes de formação dos adutos moleculares foram estudadas as interações entre as poliaminas e os ligantes PCr e ATP.

Algumas constantes de formação dos adutos moleculares entre as poliaminas e o ATP já existem na literatura e foram publicados por Silva J. *et al* [3] e Gasowska [12]. O cálculo de algumas destas constantes tornou-se

necessário para obter-se todos os valores determinados sob as mesmas condições experimentais. O valores encontrados por Silva J. *et al* [3] não foram recalculados por estarem sob mesmas condições experimentais do estudo.

Na Tabela 5, são apresentados os logaritmos das constantes de formação dos adutos moleculares entre as poliaminas e a fosfocreatina e o ATP e os valores de referência existentes na literatura.

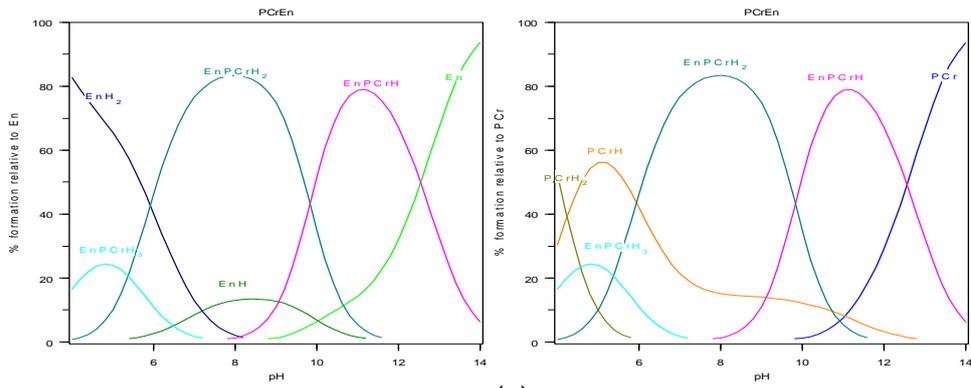
Tabela 5 - Logaritmos das constantes de formação ($\log \beta$) dos adutos moleculares entre as poliaminas e a PCr e ATP

Especies	$\log \beta$	Referência
enPcrH	15,95 \pm 0,08	
enPcrH ₂	25,78 \pm 0,06	
enPcrH ₃	31,16 \pm 0,05	
tnPcrH	16,98 \pm 0,06	
tnPcrH ₂	27,69 \pm 0,09	
tnPcrH ₃	35,02 \pm 0,07	
PutPcrH	19,58 \pm 0,11	
PutPcrH ₂	25,15 \pm 0,03	
PutPcrH ₃	30,82 \pm 0,12	
SpdPCrH	24,43 \pm 0,03	
SpdPCrH ₂	33,12 \pm 0,03	
SpdPCrH ₃	39,43 \pm 0,04	
SpmPCrH	26,17 \pm 0,02	
SpmPCrH ₂	33,16 \pm 0,03	
SpmPCrH ₃	39,84 \pm 0,05	
SpmPCrH ₄	47,74 \pm 0,03	
enATPH ₂	22,12 \pm 0,06	
tnATPH ₂		22,69*
PutATPH ₂	23,13 \pm 0,05	
PutATPH ₃	31,93 \pm 0,04	
PutATPH ₄	35,92 \pm 0,05	
SpdATPH ₃	34,32 \pm 0,05	
SpmATPH ₃	34,46 \pm 0,04	35,04**
SpmATPH ₄	42,34 \pm 0,05	43,65**

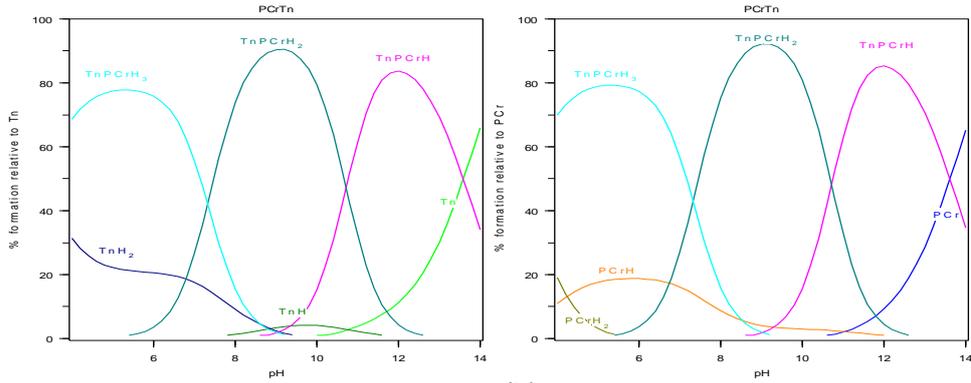
* calculado por Silva J. *et al* [3]

** calculado por Gasowska [12]

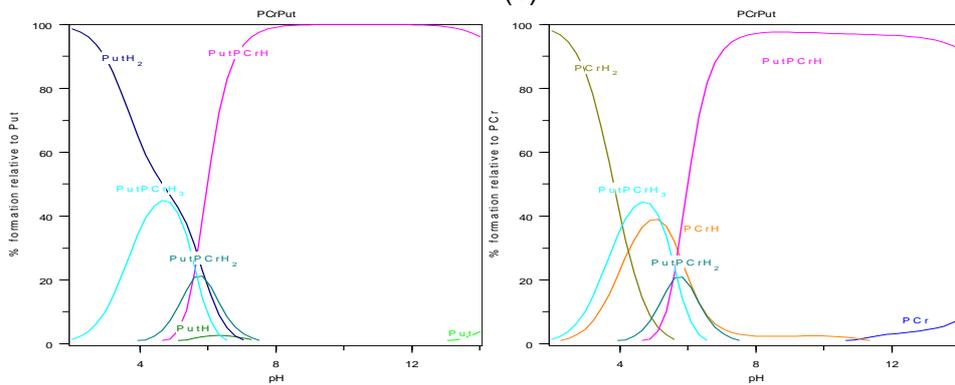
Os gráficos de distribuição de espécies em função do pH são apresentados na figura 9 (a-j). Foram realizadas distribuições de espécies em função das poliaminas e em função do composto fosfatado do sistema (PCr ou o ATP).



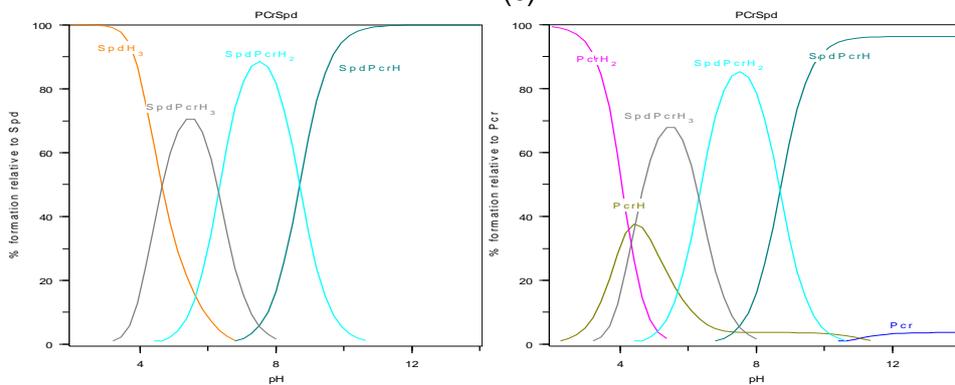
(a)



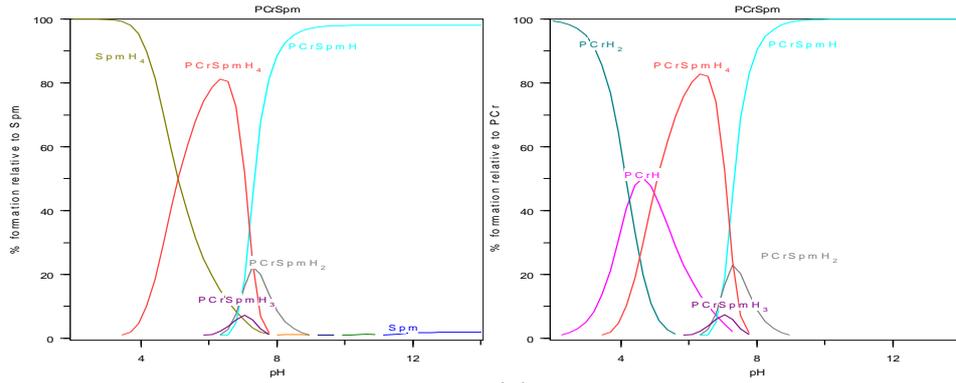
(b)



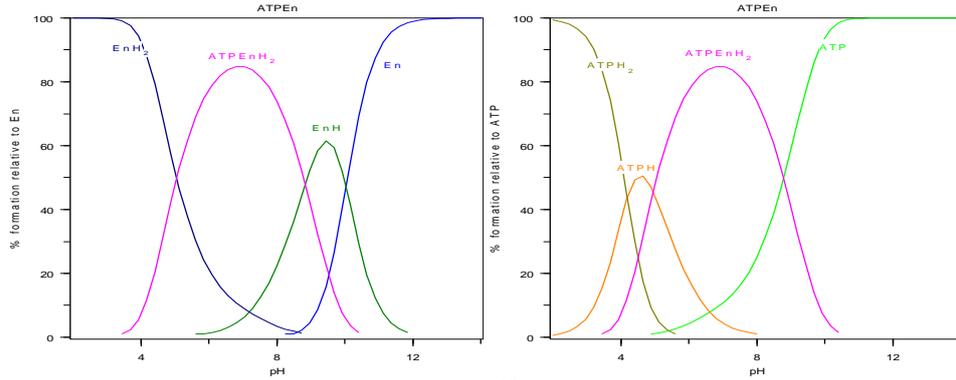
(c)



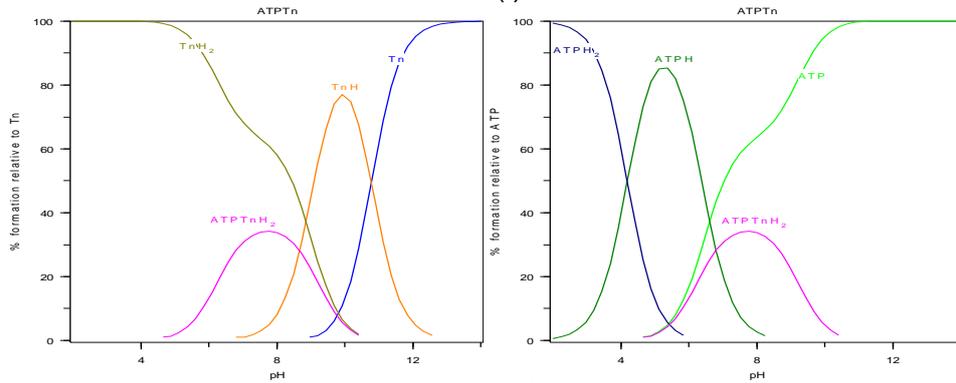
(d)



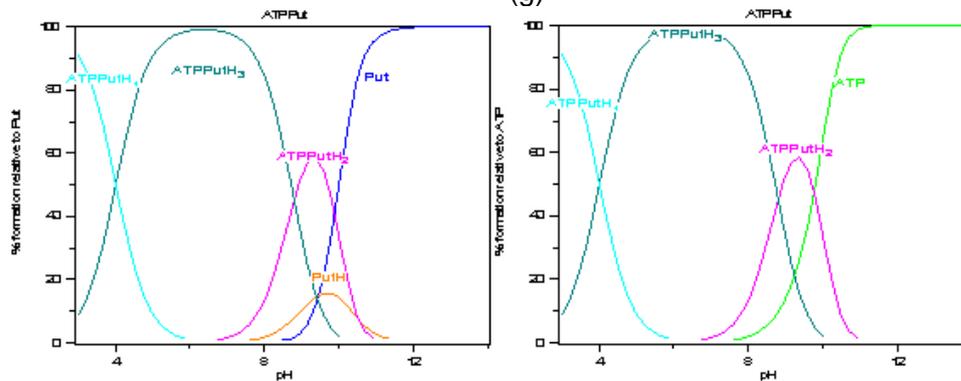
(e)



(f)



(g)



(h)

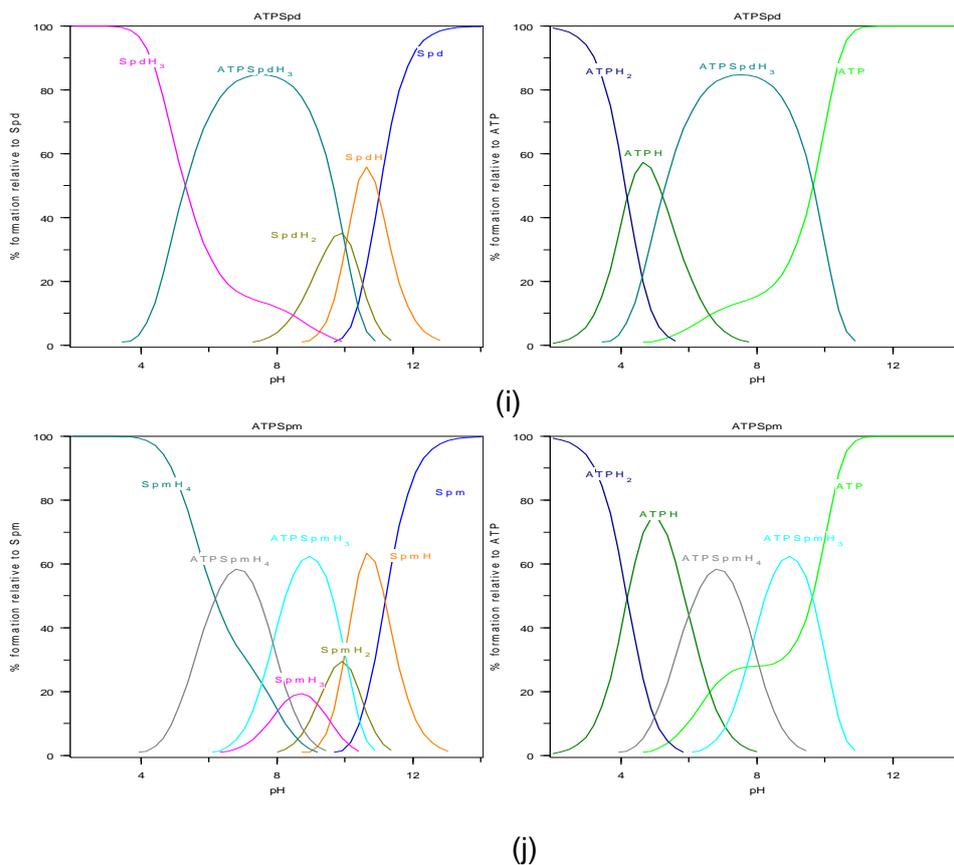


Figura 9– Distribuição de espécies das interações entre os ligantes: (a) PCren, (b) PCrtn, (c) PCrPut, (d) PCrSpd, (e) PCrSpm, (f) ATPen, (g) ATPtn, (h) ATPPut, (i) ATPSpd e (j) ATPSpm

É possível observar pela figura 9 (a-j) que em pH fisiológico são as espécies protonadas dos adutos que predominam. Também é possível observar que neste pH, de fato, as poliaminas se encontram protonadas e os compostos fosfatados se encontram desprotonados. A interação entre esses ligantes, na ausência de íon metálico, deve ser portanto uma interação eletrostática entre os grupamentos com carga positiva das poliaminas e os grupamentos com carga negativa dos compostos fosfatados.

A tabela 6 mostra uma comparação da intensidade das interações que ocorrem entre as poliaminas e os ligantes PCr e ATP na ausência de íon metálico. A comparação é feita a partir do cálculo das constantes de equilíbrio ($\log K_e = \log H_nPAL - \log H_nPA$) [97] para a formação dos adutos calculada a partir da constante de equilíbrio global e a constante de protonação de cada poliamina.

Tabela 6–Comparação da intensidade das interações entre as poliaminas e os ligantes PCr e ATP (Log Ke)

Espécies	Log Ke
Log Ke (H ₂ enPCr) - (H ₂ en)	8,56
Log Ke (H ₂ enATP) - (H ₂ en)	5,06
Log Ke (H ₂ tnPCr) - (H ₂ tn)	8,07
LogKe (H ₂ tnATP) - (H ₂ tn)	3,07
Log Ke (H ₂ PutPCr) - (H ₂ Put)	8,83
Log Ke (H ₂ PutATP) - (H ₂ Put)	6,81
Log Ke (H ₃ SpdPCr) - (H ₃ Spd)	9,91
Log Ke (H ₃ SpdATP) - (H ₃ Spd)	4,69
Log Ke (H ₄ SpmPCr) - (H ₄ Spm)	9,39
Log Ke (H ₄ SpmATP) - (H ₄ Spm)	3,99

O estudo parece indicar que as interações entre as poliaminas e a PCr são mais intensas do que as interações entre as poliaminas e o ATP. De fato, Kazuei Igarashi *et al*, em estudo de 2010, observou que as poliaminas interagem fracamente com o ATP [26].

Avaliando os valores de Ke pode-se sugerir que a molécula formada pela interação da Spd com a PCr é a molécula com maior intensidade de interação dentre os sistemas estudados. É possível que ocorra interação entre os 3 átomos de nitrogênio da Spd e os 3 átomos doadores da PCr. Na mesma ordem de grandeza, porém um pouco menos intensa observamos a intensidade de interação entre a Spm com a PCr. Deve ocorrer interação entre 3 átomos de nitrogênio da Spm e os 3 átomos doadores da PCr, porém o quarto átomo de nitrogênio da Spm que não está participando da interação deve provocar a leve desestabilização da molécula. A comparação entre os Ke também pode ser feita na formação das moléculas pelas interações entre essas poliaminas e o ATP. Nesse caso a molécula formada pela Spd e o ATP também tem uma interação um pouco mais intensa do que a molécula formada pela Spm e o ATP.

Na caso das diaminas en, tn e Put, podemos observar a seguinte ordem de intensidade de interação das moléculas PCrPut > PCren > PCrtn. A mesma ordem de intensidade é observada quando o composto fosfatado é o ATP.