

RAFAEL JOVITO SOUZA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS COMPLEXOS
MODELOS PARA O SÍTIO ATIVO DAS FOSFATASES ÁCIDAS
PÚRPURAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Química, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Ademir Neves

Florianópolis

2005

RAFAEL JOVITO SOUZA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS COMPLEXOS
MODELOS PARA O SÍTIO ATIVO DAS FOSFATASES ÁCIDAS
PÚRPURAS**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2005.

Prof. Dr. Faruk Nome
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ademir Neves
Orientador

Prof^a. Dra. Iolanda da Cruz Vieira
(UFSC – SC)

Prof. Dr. Cesar Zucco
(UFSC – SC)

Prof. Dr. Adailton João Bortoluzzi
(UFSC – SC)

À minha família pelo apoio constante, que mesmo distante fêz-se presente.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Ademir Neves, pela amizade, orientação, apoio e estímulo a mim despendidos no decorrer da elaboração deste trabalho.

Ao professor Dr. Wolfgang Haase (Institut für Physikalische Chemie, Technische Universität Darmstadt), pela fundamental colaboração nas medidas magnéticas.

Aos Prof. Dr. Adailton J. Bortoluzzi, Dr. Bruno Szpoganicz e Dr. Valderes Drago pelas colaborações e discussões pertinentes a este trabalho.

Aos amigos do LABINC pelos anos de trabalho, conversas, brincadeiras e amizade, fazendo do ambiente de trabalho um local agradável e propício a discussões e trocas de experiências.

A todos os colegas graduandos e pós-graduandos do Departamento de Química pelo coleguismo.

Ao Departamento de Química e à Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, pela acolhida e oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq e demais órgãos de fomento por viabilizarem a execução deste trabalho.

A todos que estiveram presentes neste período de convívio.

“Não existem erros, apenas lições. O crescimento é um processo de tentativa e erro: experimentação. As experiências que não deram certo fazem parte do processo, assim como as bem-sucedidas”

Albert Einstein

RESUMO

Complexos de metais de transição com ligantes binucleantes têm sido descritos como modelos para o sítio ativo de inúmeras metaloenzimas. No entanto, algumas delas apresentam sítios bastante difíceis de modelar, devido à sua alta complexidade, tais como as fosfatases ácidas púrpuras (PAP's), que, *in vitro*, catalisam a hidrólise de ésteres e anidridos fosfóricos. Estas apresentam um sítio ativo binuclear, com conteúdo metálico variável, contendo um átomo de Fe^{III} e um outro metal M^{II} = Fe, Zn ou Mn. Neste trabalho esta descrita a síntese e caracterização de 3 complexos com o ligante N, O doador 2-[N-(2-piridilmetil)(carboxiamidometil) aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol (H₂L), que contem um grupamento amida visando mimetizar o resíduo de asparagina presente no sítio ativo da enzima.

Todos os complexos foram caracterizados por análise elementar de CHNS, espectroscopia no infravermelho e espectroscopia eletrônica e eletroquímica. O complexo [Fe₂Zn₂L₂(μ-OH)₂(ClO₄)₂(H₂O)₂] (**1**) teve sua estrutura cristalina determinada por difração de raios X, suas constantes de protonação determinadas potenciométricamente, além da realização de estudos magnéticos, de espectroscopia Mössbauer e cinéticos.

Os complexos Fe^{III}Zn^{II}L(μ-OAc)₂ (**2**) e Fe^{III}Fe^{II}L(μ-OAc)₂ (**3**) apresentaram propriedades espectroscópicas semelhantes aos complexos similares sintetizados com o ligante H₂BPBPMP, mantendo as propriedades alcançadas com um dos melhores sistemas de modelagem para PAP's já descritos.

O complexo (**1**), obtido na tentativa de sintetizar o composto Fe^{III}Zn^{II}L(μ-OH). A reação foi realizada na ausência de NaOAc.3H₂O, em condições levemente básicas. Um composto tetranuclear Fe₂Zn₂ sem precedentes, contendo o motivo estrutural Fe^{III}(μ-OH)Fe^{III}, foi formado, caracterizado estruturalmente e é estabilizado por ligações de hidrogênio relativamente fortes. Sendo assim, o ligante pode oferecer oportunidades de estudos completamente diferentes, através da estabilização de espécies tetranucleares como a aqui descrita.

ABSTRACT

Purple acid phosphatases (PAP`s) constitute a class of metalloenzymes that contain a dinuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$ ($\text{M} = \text{Fe}, \text{Mn}$ or Zn) in their active sites, which are able to catalyze the hydrolysis of phosphoric acid esters and anhydrides within a pH range 4-7. From the preceding information, it seems clear that the use of dinucleating N,O-donor ligands, that can induce unsymmetrical metal ligation environments, is a convenient strategy in the search for structural and functional models for PAP`s. Herein, three new complexes are reported with the unsymmetrical ligand 2-[(2-pyridylmethyl)(carboxyamidomethyl) aminomethyl]-6-[(2-hydroxybenzyl)(2-pyridylmethyl)aminomethyl]-4-methyl phenol (H_2L) as model for the PAP`s.

All the complexes were characterized by CHNS elemental analysis, infrared and electronic spectroscopies and electrochemistry. The complex $[\text{Fe}_2\text{Zn}_2\text{L}_2(\mu\text{-OH})_2(\text{ClO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**1**) had its crystal structure solved by X-Ray analysis and its equilibrium constants determined. Furthermore, magnetic studies, Mössbauer spectroscopy and kinetics tests were done.

The complexes $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}(\mu\text{-OAc})_2$ (**2**) and $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}(\mu\text{-OAc})_2$ (**3**) showed spectroscopic properties similar to those synthesized with H_2BPBPMP ligand, keeping the properties reached with one of the best described systems of modeling for PAP's already.

Complex (**1**), was obtained in an attempt to synthesize the dinuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}(\mu\text{-OH})$ complex. The reaction is carried out in the absence of $\text{NaOAc}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, under mild basic conditions. An unprecedented tetranuclear $\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{Zn}^{\text{II}}_2$ complex containing the $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})_2\text{Fe}^{\text{III}}$ structural unit is formed, which has been structurally characterized and is stabilized by relatively strong intramolecular H-bonds. In view of this, the ligand can offer chances of completely different studies, through of stabilization the tetranuclear species as the described here.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 – INTRODUÇÃO	17
1.1 – A Química Bioinorgânica	17
1.2 – Metaloenzimas	20
1.3 – Hidrolases	23
1.4 – Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAP's)	23
1.5 – Complexos Modelos	31
2 – OBJETIVOS	35
2.1 – Objetivos gerais	35
2.2 – Objetivos Específicos	35
3 – PARTE EXPERIMENTAL	36
3.1 – Materiais, Métodos e Instrumentação	36
3.1.1 – Materiais	36
3.1.2 – Análise Elementar de CHN	37
3.1.3 – Espectroscopia no Infravermelho	37
3.1.4 – Espectroscopia de RMN	37
3.1.5 – Difração de Raios X	37
3.1.6 – Espectroscopia Mössbauer	38
3.1.7 – Potenciometria	38
3.1.8 – Espectroscopia Eletrônica	39
3.1.9 – Eletroquímica	40
3.1.10 – Medidas Magnéticas	40
3.1.11 – Reatividade	41
3.2 – Síntese do Ligante H ₂ L	42

3.3 – Síntese dos Complexos	43
3.3.1 – Síntese do complexo $[\text{Fe}_2\text{Zn}_2\text{L}_2(\mu\text{-OH})_2(\text{ClO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2][\text{ClO}_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ – Complexo (1)	43
3.3.2 – Síntese do complexo $[\text{FeZn}(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ – Complexo (2)	44
3.3.3 – Síntese do complexo $[\text{Fe}_2(\text{L})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ – Complexo (3)	46
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. Caracterização dos Ligantes	48
4.1.1 - Espectroscopia no Infravermelho	48
4.1.2 - Espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C	49
4.2. Caracterização dos Complexos	52
4.2.1 – Espectroscopia no Infravermelho	52
4.2.2 – Estrutura Cristalina por Difração de Raios X	54
4.2.3 – Espectroscopia Mössbauer	58
4.2.4 – Potenciometria	59
4.2.5 – Espectroscopia Eletrônica	61
4.2.6 – Eletroquímica	65
4.2.7 – Medidas Magnéticas	68
4.2.8 – Reatividade	70
5 – CONCLUSÕES	75
6 – PERSPECTIVAS E CONTINUIDADE	76
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
APÊNDICES	88
APÊNDICE A	89
APÊNDICE B	94
APÊNDICE C	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma representado a sistemática utilizada para a síntese de complexos modelos.	20
Figura 2 – Representação para os sítios ativos de hidrolases binucleares contendo ponte hidróxido: A – Arginase; B – Fosfatase ácida púrpura; C - Metionina aminopeptidase; D - Calcineurina; E - Urease; F - Leucina aminopeptidase.	25
Figura 3 – Estruturas cristalinas dos sítios ativos das PAP's: (a) kbPAP, (b) rbTRAP e (c) ufPAP.	27
Figura 4 – Mecanismo proposto por Lindqvist e colaboradores para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAP's.	29
Figura 5 – Ataque nucleofílico proposto por Lindqvist e colaboradores (A) e por Que e colaboradores (B) para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAP's.	31
Figura 6 – Estrutura geral para ligantes binucleantes, onde R corresponde aos braços pendentes contendo os grupos doadores coordenantes.	32
Figura 7 – Representação esquemática de alguns dos principais ligantes utilizados na modelagem das PAP's, onde: (A) = H ₂ BTPPNOL, (B) = H ₂ BPBPMP.	33
Figura 8 – Representação esquemática do ligantes H ₂ BPBPMP (A) e do ligante utilizado neste trabalho – H ₂ L (B). Assinaladas com contorno vermelho estão as diferenças entre os dois ligantes.	34
Figura 9 – Espectro no infravermelho do complexo (1) em pastilha de KBr.	44
Figura 10 – Espectro no infravermelho do complexo (2) em pastilha de KBr.	45
Figura 11 – Espectro no infravermelho do complexo (3) em pastilha de KBr.	46
Figura 12 – Espectro no infravermelho do ligante H ₂ L em pastilha de KBr.	49
Figura 13 – Espectro de RMN ¹ H do ligante H ₂ L.	51

- Figura 14** – Espectro de RMN13C e desenho com as atribuições referentes a cada carbono (inserido) do ligante H2L. 51
- Figura 15** – Espectros no infravermelho do ligante H2L, e dos complexos (1) = $[\text{Fe}_2\text{Zn}_2\text{L}_2(\mu\text{-OH})_2(\text{ClO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2][\text{ClO}_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$, (2) = $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ e (3) = $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$, dispersos em pastilha de KBr. 53
- Figura 16** – Desenho ORTEP da metade assimétrica do cátion complexo(1). 54
- Figura 17** – Espectros Mössbauer no estado sólido do complexo (1) a 298 K (A) e a 115 K (B). 59
- Figura 18** – Curvas de distribuição das espécies vs pH para o complexo (1), em etanol/água 70:30 % V/V. 59
- Figura 19** – Espectros eletrônicos qualitativos em solução de acetonitrila e com a amostra sólida (em pastilha de KBr) para os complexos: complexo (1) = (A); complexo (2) = (B); complexo (3) = (C). 62
- Figura 20** – Espectros eletrônicos qualitativos em solução de acetonitrila e com a amostra sólida (em pastilha de KBr) para os complexos: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}(\mu\text{-OAc})_2](\text{ClO}_4)_2$ (2) = (A); $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}(\mu\text{-OAc})_2](\text{ClO}_4)_2$ (3) = (B). 63
- Figura 21** – Espectros eletrônicos do complexo (1), em etanol/água 70:30 % V/V (preto) e acetonitrila/água 50:50 % V/V (vermelho) em vários pH(s): pH = 2,0 (A); pH = 6,4 (B); pH = 8,0 (C); pH = 10,0 (D). 65
- Figura 22** – Voltamogramas cíclicos (50, 100 e 200 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) em acetonitrila dos complexos (2) (A) e (3) (B). Eletrólito: 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de TBAPF₆; eletrodo trabalho: platina; referência: Ag/Ag⁺; contra-eletrodo: fio de platina; padrão interno: ferroceno. 66
- Figura 23** – Voltamogramas cíclicos do complexo (1) em EtOH/H₂O 70:30 % V/V. Eletrólito: 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaClO₄; eletrodo trabalho: Carbono vítreo; referência: Ag/Ag⁺; contra-eletrodo: fio de platina; padrão interno: Hexacianoferrato de potássio. 68
- Figura 24** – Gráficos de momento magnético ($\mu_{\text{eff}}/\mu_{\text{B}}$) e de suscetibilidade magnética molar - χ_{mol} - (inserido) versus temperatura para o complexo (1). (○ calculado; ● experimental). 69

Figura 25 – Gráfico de V_0 em função do pH para a reação de hidrólise do 2,4 - BDNPP catalisada pelo complexo (1) a 25°C sob as seguintes condições: solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1; [complexo] = $4,0 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹; [2,4 - BDNPP] = $5,0 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹; [tampões] = 0,05 mol.L⁻¹ (MES, HEPES, CHES); I = 0,05 mol.L⁻¹ (LiClO_4). 71

Figura 26 – Curva de saturação e gráfico de Lineweaver-Burk (inserido) para a reação de hidrólise do 2,4 - BDNPP catalisada pelo complexo (1) a 25°C sob as seguintes condições: solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1; [complexo] = $2,0 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹; [2,4 - BDNPP] = $3,0$ a $19,0 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹; [tampão] = 0,05 mol.L⁻¹ (MES e HEPES); I = 0,05 mol.L⁻¹ (LiClO_4). 72

Figura 27 – Gráfico de V_0 em função da concentração de 2,2'-Bipiridina para a reação de hidrólise do 2,4 - BDNPP catalisada pelo complexo (1) a 25°C sob as seguintes condições: solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1; [complexo] = $4,0 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹; [2,4 - BDNPP] = $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹; [2,2'-Bipiridina] = $2,0 \cdot 10^{-5}$ a $40,0 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹; [tampão] = 0,05 mol.L⁻¹ (MES); I = 0,05 mol.L⁻¹ (LiClO_4). 73

Figura 28 – Substratos propostos para os estudos cinéticos de hidrólise de fosfoésteres. 76

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Síntese do complexo (1).	43
Esquema 2 – Síntese do complexo (2).	44
Esquema 3 – Síntese do complexo (3).	46
Esquema 4 – Representação das espécies em equilíbrio observadas no estudo potenciométrico.	60
Esquema 5 – Esquema ilustrativo para a reação de hidrólise do substrato 2,4 - BDNPP.	70
Esquema 6 – Provável inibição do complexo (1) por 2,2'-Bipiridina.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais bandas observadas nos espectros no infravermelho dos ligantes precursores e do ligante H ₂ L, em número de onda (cm ⁻¹).	49
Tabela 2 – Deslocamentos químicos (ppm) observados nos espectros de RMN ¹ H para os ligantes precursores e para o ligante final H ₂ L.	50
Tabela 3 – Desenho esquemático, ORTEP e dados cristalográficos selecionados para o complexo (1).	55
Tabela 4 – Tabela de distâncias interatômicas (Å) e ângulos (°) de ligação selecionados para o complexo (1).	56
Tabela 5 – Parâmetros obtidos na espectroscopia Mössbauer do complexo (1).	58
Tabela 6 – Percentuais máximos das espécies em equilíbrio e respectivos pH(s).	60
Tabela 7 – Máximos de absorção e coeficiente de absorção molar para os complexos no estado sólido e em acetonitrila.	61
Tabela 8 – Coeficientes de absorção molar (ε) e distâncias de ligação Fe-O (fenolato terminal) para os espectros obtidos em acetonitrila.	63
Tabela 9 – Espectros eletrônicos qualitativos do complexo [Fe ₂ Zn ₂ L ₂ (μ-OH) ₂ (ClO ₄) ₂ (H ₂ O) ₂] [ClO ₄] ₂ .4H ₂ O.2(CH ₃) ₂ CHOH (1) em várias condições.	64
Tabela 10 – Potenciais redox determinados através de voltametria cíclica (VC) para os processos Fe ^{III} /Fe ^{II} em etanol/água 70:30 % V/V para o complexo (1) e em acetonitrila, para os complexos (2) e (3) e seu similares sintetizados com o ligante H ₂ BPBPMP.	67
Tabela 11 – Parâmetros cinéticos obtidos nas reações de hidrólise do 2,4 - BDNPP a 25°C, catalisadas pelo complexo (1) e por complexos FeZn com o ligante H ₂ BPBPMP.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

- ϵ – coeficiente de absorvidade molar
 δ – deformação angular (IV)
 ν – estiramento (IV)
 δ_H – deslocamento químico do hidrogênio (RMN)
 $\lambda_{\text{máx}}$ – comprimento de onda, no máximo de absorção
2,4-BDNPP – bis(2,4-dinitrofenil)fosfato
Asn - Asparagina
Asp – Aspartato
ATP – Adenosina Trifosfato
BDNPP – bis(2,4-dinitrofenil)fosfato
bsPAP – Fosfatase Ácida Púrpura de Baço de Bovinos
CHES – (2-[N-Cyclohexylamino]ethanesulfonic acid) – ácido 2-[N-Cicloexilamino]etanossulfônico
CMFF - 2-clorometil-4-metil-6-formil-fenol
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucléico (deoxiribonucleic acid)
ENDOR – Eletron – Nuclear Double Resonance Spectroscopy
EtOH – etanol
EXAFS – Estrutura fina de absorção de raios X estendida (Extended X-ray Absorption Fine Structure)
f – fator catalítico
H₂BPBPMP - 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol
H₂BTPPNOL - *N*-(2-hidroxibenzil)-*N,N',N'*-tris-(2-metilpiridil)-2-ol-1,3-diaminopropano
H₂L - 2-[N-(2-piridilmetil)(carboxiamidometil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol
HBPA - (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina
HBPAMFF - 2-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formil-fenol
HBPAMPAF - 2-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil]-fenol
HBPMP – 2,6-Bis[*bis*(2-piridilmetil)amino]metil]-4-metoxifenol
HEPES – (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid) – ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazino]-etanossulfônico
His – Histidina
HMB - 2-hidroxi-5-metilbenzaldeído
I – força iônica
IUBMB – Internation Union of Biochemistry and Molecular Biology - União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
IV – espectroscopia vibracional na região do infravermelho
J – constante de acoplamento magnético
K_{ass} – constante de associação
kbPAP – Fosfatase Ácida Púrpura de Feijões do Tipo “Red Kidney Bean”

k_{cat} – constante catalítica
K_M – constante de Michaelis-Menten
MES – (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid – ácido 2-[N-Morfolino]etanossulfônico
MM – massa molar
NaBPh₄ – tetrafenilborato de sódio
NaOAc – Acetato de Sódio
NHE – normal hydrogen electrode – eletrodo normal de hidrogênio
P.F – ponto de fusão
PAP's – Fosfatases Ácidas Púrpuras
pH – potencial hidrogeniônico
ratTRAP - Fosfatase Ácida Púrpura Resistente ao Tartarato de Ratos
rbPAP - Fosfatase Ácida Púrpura de Ossos de Ratos
RMN¹³C - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN¹H – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RNA – Ácido Ribonucléico
RPE – Ressonância Paramagnética Eletrônica
sbPAP – Fosfatase Ácida Púrpura de Grãos de Soja
spPAP – Fosfatase Ácida Púrpura da Batata Doce
TBAPF₆ – hexafluorofosfato de tetrabutilamônio
THF – tetrahidrofurano
TMS – Tetrametilsilano
Tyr – Tirosina
ufPAP – Fosfatase Ácida Púrpura de Útero de Suínos
V₀ – velocidade inicial
V_{máx} – velocidade máxima
χ_{mol} – Suscetibilidade Magnética Molar
μ_{eff} – Momento Magnético efetivo

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – A Química Bioinorgânica

A visão de que um campo de estudo denominado bioinorgânica é conflitante reflete conceitos do início da química moderna. No início do século XIX, havia a divisão entre os produtos isolados de organismos vivos, os orgânicos, e compostos advindos de “natureza morta”, os inorgânicos. De lá para cá este conceito foi gradativamente se alterando, passando pela síntese da uréia a partir de “matéria não viva”, realizada por Wöller, até o maior desenvolvimento das técnicas e aparelhos analíticos, que permitiram a detecção de substâncias, mesmo que em quantidade de traço, nos organismos vivos.¹

Sabe-se há muito da presença e importância do ferro, cálcio e potássio, bem como de outros elementos para os sistemas vivos. Cada vez mais se reconhece que a presença de outros elementos inorgânicos é essencial a vida. Parece óbvio que organismos que habitam um meio essencialmente inorgânico desenvolvam mecanismos para utilização destes compostos. Porém, também é lógico pensar que estes organismos elaborem mecanismos de rejeição para certas substâncias inorgânicas. A evolução geral da ciência, em especial da bioquímica, tentando explicar os fenômenos biológicos através de efeitos moleculares e eletrônicos, e dos métodos analíticos, possibilitou o surgimento da química bioinorgânica. A química bioinorgânica, com base no seu objetivo, é uma extensa disciplina que se ocupa com as relações entre elementos e compostos inorgânicos e os sistemas biológicos.² Ela desmistifica a química inorgânica como sendo a química dos seres não vivos, colocando-a muito próximo da biologia, que é por excelência a ciência que estuda os seres vivos. A despeito do seu título, química bioinorgânica é uma área da ciência altamente interdisciplinar, que promove a interação de diversas áreas da ciência como química, bioquímica, física, biologia, medicina, toxicologia e ciências ambientais.³ O desenvolvimento dos métodos de análise, a elucidação de

mecanismos de reações orgânicas, inorgânicas e bioquímicas têm contribuído muito para o seu desenvolvimento.

O papel de um íon metálico em um sistema biológico pode ser limitado a uma função estrutural, tal como a sustentação de certas biomoléculas (ou parte delas) juntamente em uma estrutura mais ou menos estável. Exemplos bem conhecidos são cálcio(II) na termolisina (uma proteína com zinco no sítio ativo) e zinco na superóxido dismutase, álcool desidrogenase (sítio não catalítico) e em estruturas sólidas tais como ossos e dentes.

Nos sistemas vivos que utilizam íons metálicos, processos eficientes de transporte dos mesmos são importantes. Exemplos bem conhecidos são a transferrina para o transporte de ferro em humanos, albumina para o transporte de cobre e ferritina para a estocagem de ferro.^{3,4}

Os íons metálicos e a coordenação de ligantes exercem um importante papel catalítico. O papel da catálise pode se restringir, por exemplo, a uma transferência de elétrons, a uma complexa reação redox ou a uma simples reação de ácido-base. A presença do metal, em um sítio particular, usualmente resulta em reações de ativação de substratos pelo metal e ligantes que o rodeiam. Exemplos bem conhecidos de tais enzimas são a citocromo c oxidase, ferredoxinas, anidrase carbônica e álcool desidrogenase.^{3,4}

Nas últimas décadas, a química bioinorgânica tem propiciado o desenvolvimento de uma área multidisciplinar, cujo objetivo principal é a busca constante por compostos de baixa massa molar, que sejam capazes de modelar características estruturais e/ou funcionais de inúmeros sistemas biológicos. Na verdade, o maior desafio da química bioinorgânica moderna é a compreensão do modo de ação dos metais nos sistemas vivos e de suas interações moleculares, com a finalidade de aplicar esses conhecimentos na medicina, biologia, ciências ambientais, catálise e tecnologia.^{3,4}

Tendo em vista este objetivo, a química bioinorgânica tem crescido com a contribuição de cientistas de várias áreas e, como conseqüência, dividida em seis subáreas de pesquisa que se baseiam nos seguintes estudos:³

- 1 - ambiente de coordenação em metaloproteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e membranas;
- 2 - mecanismos de reações nos centros metálicos das enzimas;
- 3 - análogos sintéticos para os sítios ativos das metaloenzimas (projeção, síntese, estrutura, espectroscopia e reações catalíticas);
- 4 - drogas contendo metais para a cura e a prevenção de doenças (síntese e mecanismo de ação);
- 5 - remoção e transporte de íons e compostos metálicos para/e dos sistemas vivos (desintoxicação);
- 6 - processos de biomineralização.

Em todas estas subáreas, tanto o metal quanto o ambiente de coordenação que o envolve são de extrema importância para a estrutura, a estabilidade e os processos regulados e catalisados por espécies metálicas.

Neste contexto, destaca-se a partir daqui a subárea que engloba o projeto, obtenção e estudo de análogos sintéticos para metaloproteínas, as quais podem ser vistas, de modo simplificado, como grandes compostos de coordenação. Desta forma, a química de coordenação pode desenvolver pequenas moléculas designadas modelos ou análogos sintéticos, com base nas informações disponíveis a respeito da estrutura do sítio ativo da enzima a ser modelada. Inicia-se então um processo de projeção e síntese de moléculas orgânicas, com funções químicas similares aos resíduos de aminoácidos identificados ou sugeridos no sítio ativo da enzima, capazes de formar compostos de coordenação. Uma vez obtidos e caracterizados os ligantes de interesse, parte-se para a obtenção, caracterização e reatividade dos compostos de coordenação. A comparação das propriedades espectroscópicas, estruturais e catalíticas dos compostos de coordenação sintéticos com as da metaloenzima de interesse permite considerá-lo (ou não) um bom modelo sintético para tal enzima.^{1,5} Diante desta metodologia (Figura 1), o trabalho do químico bioinorgânico consiste em uma sistematização na síntese de ligantes que possuam grupos doadores análogos aos aminoácidos presentes no sítio catalítico da enzima, a fim de que os complexos sintetizados a partir desses ligantes exibam as propriedades estruturais e funcionais almejadas.

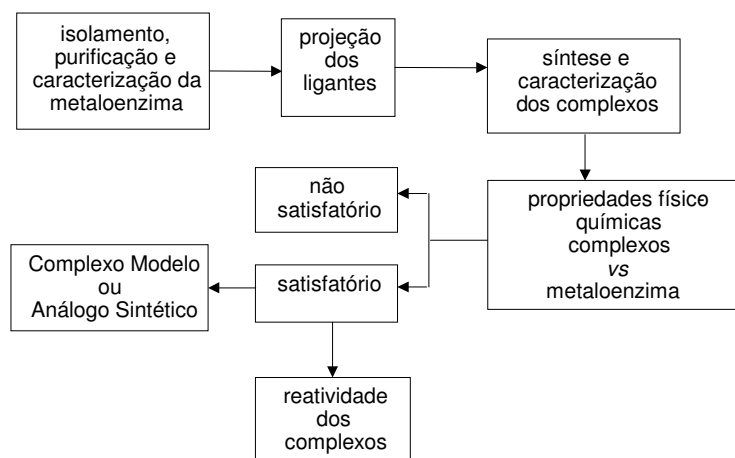


Figura 1. Fluxograma representado a sistemática utilizada para a síntese de complexos modelos.

Dados estruturais precisos, juntamente com informações espectroscópicas, são extremamente úteis na elucidação de aspectos estruturais de enzimas ainda não bem caracterizadas. De posse de um modelo estrutural, inicia-se a investigação de reatividade química do composto modelo frente a substratos adequados contribuindo para a elucidação de mecanismos de reações enzimáticas. Caso o complexo não apresente características satisfatórias como um bom modelo biomimético, uma nova investigação sistemática deve ser iniciada. Sendo assim, a primeira etapa para o desenvolvimento de um projeto em química bioinorgânica deve ser a seleção do sistema biológico (metaloenzima) a ser mimetizado. Para tanto, são de extrema importância alguns conhecimentos básicos sobre esses elaborados compostos de coordenação denominados metaloenzimas.

1.2 - Metaloenzimas

As enzimas são as biomoléculas mais notáveis e especializadas dos sistemas vivos e apresentam como característica principal uma extraordinária eficiência catalítica, sendo então chamadas de catalisadores naturais. Vale

salientar que o ponto que as diferenciam de outros tipos de catalisadores é o alto grau de especificidade com relação aos seus substratos. Elas aceleram reações químicas específicas em meio aquoso sob condições suaves de temperatura e pH.^{6,7}

Durante décadas acreditou-se que todas as enzimas fossem proteínas, até que em meados dos anos 80 descobriu-se que moléculas de ácido desoxirribonucléico são capazes de catalisar especificamente a clivagem e a união de substratos oligonucleotídicos, podendo ser classificadas tanto como uma ribonuclease, quanto como uma RNA polimerase.⁶

Para desempenhar suas atividades, algumas enzimas não requerem nenhum outro grupo químico além de seus resíduos de aminoácidos, enquanto que outras necessitam de componentes químicos adicionais conhecidos como cofatores, os quais podem ser íons inorgânicos e/ou moléculas orgânicas (coenzima). Quando o cofator liga-se covalentemente à parte protéica da enzima, este recebe a denominação de grupo prostético.⁷

Desta forma, as metaloenzimas são aquelas que apresentam como grupo prostético um ou mais íons metálicos. São biopolímeros constituídos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, organizadas de maneira a formarem um envoltório protéico (sítio ativo) que aloja o íon metálico. Portanto, o sítio ativo de uma metaloenzima consiste de um ou mais íons metálicos, a cadeia lateral da proteína, pontes exógenas e ligantes terminais que compõem a primeira esfera de coordenação de cada íon metálico. Esta composição faz com que as metaloenzimas sejam consideradas como complexos metálicos altamente elaborados.⁸

Segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) as enzimas são classificadas em seis grandes grupos, de acordo com o tipo de reação envolvida. São elas:^{7,9}

- 1 - Oxido-redutases: catalisam reações de oxidação-redução. O substrato oxidado é considerado como um doador de hidrogênio ou elétrons;
- 2 - Transferases: catalisam a transferência de grupos como metil, amino, acetil, de uma molécula a outra;

- 3 - Hidrolases: catalisam a clivagem hidrolítica de ligações C-O, C-N, C-C e algumas outras ligações incluindo ligações anidrido fosfórico;
- 4 - Liases: catalisam clivagem de ligações C-O, C-N, C-C e outras ligações por eliminação, clivagem de duplas ligações ou anéis, e adição de grupos a duplas ligações;
- 5 - Isomerases: catalisam a transferência de grupos dentro de uma molécula produzindo formas isoméricas;
- 6 - Ligases: catalisam a formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à clivagem de ATP.

Acredita-se que a alta especificidade apresentada pelas enzimas esteja relacionada a um arranjo tridimensional único para cada enzima. Conceitualmente, as proteínas podem se organizar em quatro níveis:⁷

- 1 - Estrutura primária: consiste da seqüência de aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas covalentes e pela localização de pontes dissulfeto,
- 2 - Estrutura secundária: refere-se à conformação local de resíduos de aminoácidos adjacentes em uma cadeia polipeptídica (α -hélice e folha- β) e são estabilizadas por ligações de hidrogênio.
- 3 - Estrutura terciária: refere-se ao relacionamento espacial entre todos os aminoácidos da cadeia polipeptídica, ou seja, é a estrutura tridimensional completa do polipeptídio.
- 4 - Estrutura quaternária: ocorre em proteínas com mais de uma cadeia polipeptídica e especifica a relação espacial dos polipeptídios, ou subunidades no interior de uma dada proteína.

Diante desta complexa organização estrutural, o químico bioinorgânico planeja a obtenção e caracterização detalhada de compostos que mimetizem propriedades estruturais, espectrais e funcionais, tendo em mente que estes compostos não reproduzirão rigorosamente a funcionalidade e a especificidade dos sistemas naturais, pois não se pode subestimar a contribuição de todos os componentes da metaloenzima, mas que irá contribuir para a elucidação do mecanismo de ação destes sistemas.

A partir destes conhecimentos básicos sobre a bioquímica das metaloenzimas, destacam-se a seguir as que apresentam atividades catalíticas de hidrólise, as chamadas hidrolases e, dentre estas, as que possuem dois íons metálicos no seu sítio ativo.

1.3 - Hidrolases

As hidrolases são enzimas capazes de clivar hidroliticamente ligações químicas diversas, tais como amidas, ésteres, éteres e nitrilas. Muitas hidrolases contêm um sítio ativo similar, contendo dois íons metálicos com separação de 3 a 5 Å que participam do mecanismo de catálise. Porém, somente nos últimos anos têm sido detalhadas informações estruturais para algumas dessas enzimas.¹⁰ Neste trabalho, as metaloenzimas de interesse são as fosfatases ácidas púrpuras, enzimas de sítio ativo binuclear classificadas como fosfohidrolases.

1.4 – Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAP's)

Várias são as fontes das quais têm se isolado fosfatases ácidas púrpuras, tais como leveduras, fluido uterino de suínos (uteroferrina-ufPAP), baço de bovinos (bovine spleen-bsPAP), macrófagos, lisossomos humanos, ossos de ratos, plantas e bactérias.¹⁰⁻¹⁵ As PAP's são metalohidrolases que catalisam a clivagem de ésteres de fosfato em condições ácidas ou próximas da neutralidade (faixa de pH 4-7). Elas possuem em seus sítios ativos um centro binuclear $Fe^{III}-M^{II}$ (onde $M^{II} = Fe^{II}, Mn^{II}$ ou Zn^{II}),¹¹ sendo que as PAP's isoladas de plantas são as que apresentam sítios heterobimetálicos, como FeMn e FeZn, presentes, respectivamente, na batata doce (spPAP) e em feijões (kbPAP e sbPAP).¹² Entretanto, as enzimas de origem animal, ufPAP e bsPAP, são as que têm sido melhor estudadas.¹³

O sítio ativo das PAP's de mamíferos já isoladas, como a ufPAP e a bsPAP, consiste de um centro binuclear de ferro com dois estados de oxidação acessíveis: um cataliticamente inativo, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$, conhecido como forma púrpura e caracterizado por uma típica banda de absorção ($\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$ com $\epsilon = 4000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) – que foi a primeira forma isolada para essas enzimas e então originou o nome da classe – e outro, enzimaticamente ativo, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$, conhecido como forma rosa ($\lambda_{\text{max}} = 505 \text{ nm}$ com $\epsilon = 4000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).¹⁴⁻¹⁶ Essas bandas foram atribuídas a processos de transferência de carga do tipo tirosinato $\rightarrow\text{Fe}^{\text{III}}$, com o auxílio da espectroscopia Raman ressonante (excitação na região visível) das formas púrpura e rosa, que confirmou a presença de anéis fenolato, provenientes de resíduos de cadeias laterais de aminoácidos tirosina.¹⁶ O fato de serem observados coeficientes de extinção molares similares para ambas as formas da enzima e da interconversão das formas púrpura e rosa ser possível pelo uso de agentes químicos (redutores ascorbato e ditioeritritol; oxidantes ferricianeto e peróxido de hidrogênio), sugeriu que o resíduo tirosinato encontrava-se coordenado a somente ao centro de ferro não redutível.^{10,14,15}

As formas reduzida e oxidada das PAP's têm sido investigadas por vários métodos físicos e espectroscópicos, como eletroquímica,¹⁷ espectroscopia Raman ressonante,¹⁸ RPE,^{18,19} suscetibilidade magnética,^{18,20} Mössbauer,^{18,21} RMN¹H,²² EXAFS²³ e estudos cinéticos.²⁴

As evidências iniciais da presença de um sítio ativo bimetálico para as PAP's vieram das medidas de RPE e de suscetibilidade magnética realizadas com a enzima extraída de baço de bovinos. Foi mostrado um acoplamento antiferromagnético para ambas as formas oxidada $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ (estado fundamental $S = 0$) e reduzida $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ (estado fundamental $S = 1/2$) desta enzima.²⁵ Através de experimentos de suscetibilidade magnética,¹⁸ foi possível aferir acoplamentos fracos, com valores de J na faixa de -5 a -11 cm^{-1} entre os centros Fe^{III} e Fe^{II} constantes da forma reduzida da proteína. Já a forma oxidada $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ mostrou um forte acoplamento antiferromagnético ($J = -150 \text{ cm}^{-1}$), dados estes sugeriram que os dois centros de Fe^{III} estivessem ligados por pontes do tipo μ -oxo.¹⁷ Porém, novos experimentos²⁰ foram realizados com as formas reduzida e oxidada da

kbPAP e da bsPAP, obtendo-se valores de acoplamentos baixos para todas as formas (kbPAP reduzida - [pH = 6 / $J = -8 \text{ cm}^{-1}$]; bsPAP reduzida [pH / $J(\text{cm}^{-1}) = 3,9/-10$; $4,9/-9$ e $5,6/-13$]; kbPAP oxidada e bsPAP oxidada [$J = -9 \text{ cm}^{-1}$]). Assim sendo, foi excluída a presença de pontes do tipo μ -oxo e se propôs a semelhança estrutural entre essas duas enzimas.²⁰ Vale ressaltar que o motivo estrutural M1(μ -OH)M2 é proposto como a unidade catalítica de muitas hidrolases, incluindo arginase, urease, aminopeptidase e inúmeras fosfatases (Figura 2). A arquitetura para muitos destes sítios é conservada mesmo em enzimas não relacionadas filogeneticamente, sugerindo uma evolução convergente destas proteínas para promover um mecanismo de ação comum, porém, ainda não estabelecido.^{26a}

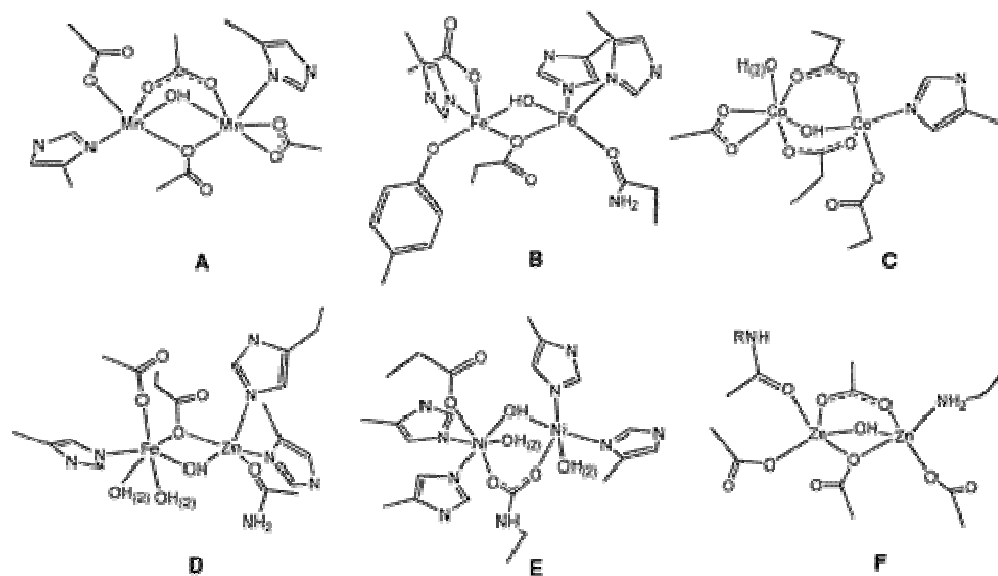


Figura 2. Representação para os sítios ativos de hidrolases binucleares contendo ponte hidróxido: A – Arginase; B – Fosfatase ácida púrpura; C - Metionina aminopeptidase; D - Calcineurina; E - Urease; F - Leucina aminopeptidase.^{26a}

Dados de RPE, obtidos para a ufPAP e para a bsPAP, mostraram que a forma oxidada é silenciosa – não apresenta sinal – enquanto a forma reduzida mostra um sinal rômboico, com valores de g iguais a 1,93, 1,74 e 1,59, a temperaturas menores que 30K. Estes sinais são característicos de acoplamento antiferromagnético em compostos de valência mista $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ ($S = 1/2$).²²

Estudos Mössbauer realizados com a forma oxidada da ufPAP evidenciaram a presença de dois centros distintos de Fe^{III}, spin alto, hexacoordenados e em baixa simetria, enquanto que, para a forma reduzida, foi identificado um sítio de valência mista Fe^{III}Fe^{II}, sendo os dois íons spin alto, com forte distorção da simetria octaédrica.²¹

Utilizando a técnica de microcoulometria, o comportamento redox da ufPAP foi investigado em função do pH, onde foram observados os seguintes valores: $E_{1/2} = 0,367$ V vs NHE em pH ~ 5 e $E_{1/2} = 0,306$ V vs NHE em pH ~ 6.¹⁷

Baseado nos estudos realizados com as PAP's e em complexos modelos, muito tem sido inferido a respeito do ambiente de coordenação do íon metálico no sítio ativo e de suas implicações na atividade catalítica dessa classe de metaloenzimas.^{11,27,28}

Recentemente, foram determinadas por difração de raios X as estruturas cristalinas das enzimas do feijão (kidney bean – kbPAP),²⁹ da PAP resistente ao tartarato isolada de ratos (rat TRAP),³¹ da PAP de ossos de ratos (rbTRAP)³⁰ e do úteros de bovinos (ufPAP).³² A principal diferença entre as PAP's de mamíferos e a kbPAP é que a enzima extraída de plantas é uma metaloenzima homodimérica, Fe^{III}Zn^{II}, com subunidades de ~55 kDa, enquanto que a de mamíferos na sua forma ativa é uma enzima monomérica Fe^{III}Fe^{II} com ~35 kDa.

Na kbPAP (resolução 2,65 Å),²⁹ os centros metálicos estão separados por 3,26 Å, sendo que o íon Fe^{III} encontra-se em uma geometria octaédrica (Figura 3a), coordenado aos seguintes resíduos de aminoácidos das cadeias laterais: His325, Tyr167, Asp135 de modo monodentado e um grupo carboxilato monodentado ponte do Asp164. Completando a esfera de coordenação do metal, dois ligantes exógenos foram modelados: um ligante hidroxó terminal (Fe-O: 1,9 Å) e um ligante μ -hidróxido ponte (Fe-O: 1,9 Å e Zn-O: 2,1 Å).²⁹ Para o íon Zn^{II} foi observada uma geometria octaédrica distorcida que é composta pelos resíduos de aminoácidos His286, His323, um oxigênio amida da Asn201 e uma molécula de água terminal modelada (Zn-O: 2,1 Å), além dos grupos ponte mencionados na descrição do ambiente de coordenação do íon Fe^{III}.²⁹ A kbPAP apresenta um máximo de absorção em 560 nm ($\epsilon = 3360$ M⁻¹.cm⁻¹), similar ao observado para as

enzimas de mamíferos e para a forma oxidada da enzima modificada $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ -kbPAP.^{13,30} Entretanto, a redução da enzima substituída $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ -kbPAP para a forma $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ -kbPAP não causou o deslocamento da banda de transferência de carga para 510 nm, como ocorre para as PAPs isoladas de mamíferos.^{13,18}

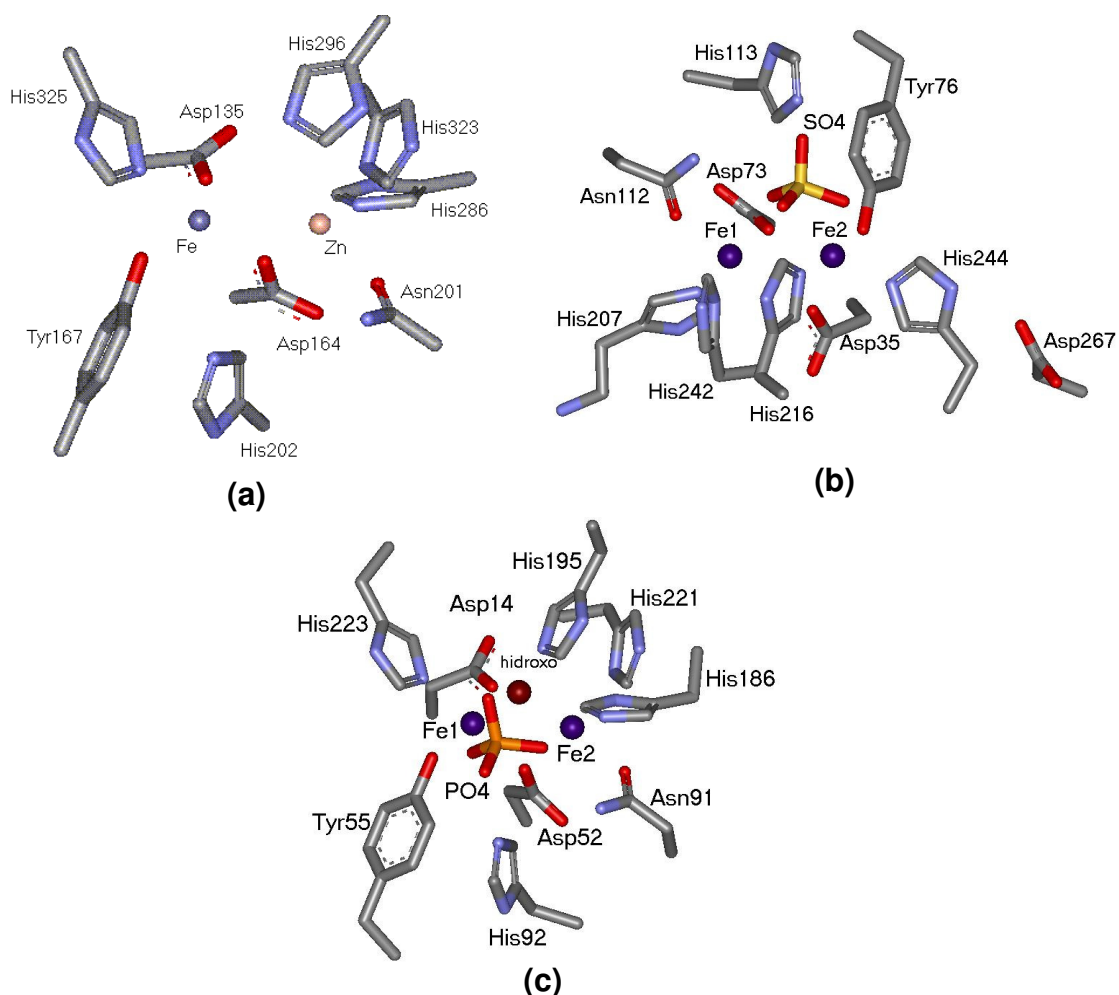


Figura 3. Estruturas cristalinas dos sítios ativos das PAP's: (a) kbPAP,²⁹ (b) rbTRAP³² e (c) ufPAP.³³

Evidenciando a similaridade com a kbPAP, a estrutura cristalina (Figura 3b) da forma oxidada da enzima extraída de ossos de ratos (rbTRAP - resolução 2,2 Å)³² apresenta seus dois centros de Fe^{III} com geometria octaédrica distorcida, separados por uma distância de 3,5 Å. Um dos dois centros de Fe^{III} está coordenado aos aminoácidos da cadeia lateral Asp35, Tyr76, His244 e uma

molécula de solvente exógena modelada, enquanto que o outro está coordenado aos aminoácidos Asn112, His207, His242 e um átomo de oxigênio proveniente de um íon sulfato de cristalização. Ambos os centros de Fe^{III} estão ponteados por um dos átomos de oxigênio carboxilato do Asp73 e um átomo de oxigênio que, pelos resultados dos estudos realizados com a enzima, deve ser advindo de um grupo μ -hidróxido.^{20, 32}

De maneira similar, as esferas de coordenação para ambos os centros de Fe^{III} na ufPAP (resolução 1,55 Å)³³ são próximas de octaédricas, porém, com um grupo fosfato ponteadando os dois íons metálicos, que apresentam uma distância $\text{Fe}^{\text{III}}\cdots\text{Fe}^{\text{III}}$ de 3,31 Å (Figura 3c).

A função *in vivo* das PAP's é objeto de muitos trabalhos. Propõe-se que devem agir na degradação de eritrócitos e da matriz óssea, bem como na reabsorção e mineralização destes últimos. Acredita-se também que estejam envolvidos no transporte de ferro em fetos de suínos e na degradação dependente de oxigênio de material fagocitado³¹⁻³⁴, pois são fontes catalíticas de radicais hidroxila, que parecem atuar neste sentido.^{13,35,36} Sugere-se que fosfatases oriundas de plantas participem na homeostase de fosfato, como liberadoras do fosfato de organofosforados.^{12,13,26} A partir da resolução das estruturas pôde-se observar uma grande similaridade entre os sítios ativos das PAP's, o que sugere que toda a classe trabalhe através de um mecanismo comum.^{10,26,35}

Em 1996, Klabunde e colaboradores^{29a} propuseram um mecanismo de catálise assistida por metal, do tipo $\text{S}_{\text{N}}2$, baseado na estrutura cristalina da kbPAP. Com a resolução da estrutura da rbPAP em 1999, Lindqvist e colaboradores³² propuseram um mecanismo similar ao proposto por Klabunde e colaboradores^{29a}, o qual encontra-se descrito a seguir e está representado na Figura 4.

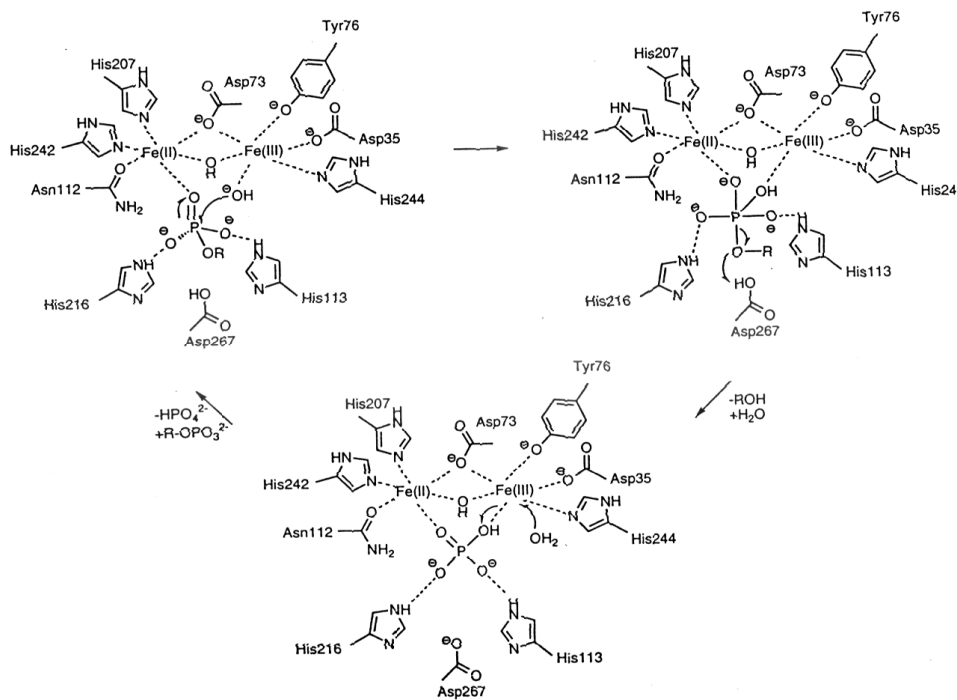


Figura 4. Mecanismo proposto por Lindqvist e colaboradores³² para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAP's.

Na primeira etapa da reação, o grupo fosfato do substrato liga-se à forma reduzida da enzima (forma ativa), por deslocamento de uma molécula de água e subsequente coordenação ao centro de Fe^{II} . Uma vez coordenado o substrato, o átomo de fósforo assume um caráter positivo, o que facilita um ataque nucleofílico do íon hidroxila presente na esfera de coordenação do íon Fe^{III} , o qual está em posição adequada para um ataque “em linha” sobre o átomo de fósforo. Devido ao ataque ocorrer do lado oposto ao grupo álcool do substrato, este acarreta uma inversão de configuração no átomo de fósforo. O ataque nucleofílico resulta em um estado de transição pentacoordenado que deve ser estabilizado pelos resíduos de histidina, His113 e His216, conservados no sítio ativo. A hidrólise propriamente dita deve ocorrer a partir da protonação do grupo álcool abandonador pelo resíduo de ácido aspártico, Asp267, e subsequente clivagem da ligação P-OR. Ao final da etapa catalítica, o grupo fosfato encontra-se coordenado

aos dois centros de ferro na forma bidentada e pode ser deslocado do centro de Fe^{III} por uma molécula de água, em uma reação de substituição.³²

Vale a pena ressaltar que algumas evidências suportam o mecanismo descrito acima e também foram propostas por Klabunde e colaboradores,^{28a} tal como o ataque nucleofílico ser facilitado devido:³²

- 1 - ao íon Fe^{III} ser um forte ácido de Lewis podendo gerar um grupo hidróxido nucleofílico a partir de uma molécula de água coordenada em sua primeira esfera de coordenação;
- 2 - ao íon Fe^{II} também agir como retirador de densidade eletrônica do átomo de fósforo através de sua coordenação a um átomo de oxigênio do fosfato, e
- 3 - aos resíduos de histidina, His113 e His216, conservados no sítio ativo, aumentarem a retirada de elétrons do átomo de fósforo através da estabilização da carga negativa sobre os dois átomos de oxigênio do fosfato através de ligações de hidrogênio.

De acordo com o mecanismo proposto por Klabunde e colaboradores^{29a} para a ação da kbPAP, o resíduo His296 da enzima de plantas (correspondente à His216 na rbPAP) é sugerido agir como um ácido geral que protona o grupo de saída. Porém, na rbPAP, a existência de um resíduo de ácido aspártico (Asp267) na vizinhança de seu resíduo de histidina conservado sugere que este esteja agindo como um ácido geral. Esta suposição deve-se ao fato de que no pH ótimo para a reação, parece mais provável que o resíduo de ácido aspártico atue como doador de elétrons na protonação do produto a ser liberado. Esta proposição tem sido observada no mecanismo das fosfatases ácidas de alta massa molar, que também usam um grupo ácido (resíduo aspartato conservado) na protonação do grupo de saída.

Um segundo mecanismo, que difere do anterior na origem do nucleófilo (Figura 5), foi proposto por Que e colaboradores, baseado em estudos de ENDOR (elétron – nuclear double resonance spectroscopy).²⁶ Neste mecanismo o íon Fe^{III} encontra-se pentacoordenado (sem a molécula de água exógena) e assim o

nucleófilo deve ser a ponte OH, a qual estaria mais próxima do centro metálico Fe^{II} , e o substrato estaria coordenado como ponte. Sendo assim, nos mecanismos descritos acima a principal função proposta para os íons metálicos é agir como ácido de Lewis em um processo catalítico onde não há o envolvimento de nenhum radical químico. Isso tem sugerido que as PAP's desempenham dupla atividade: como fosfatase e como uma fonte de radicais hidroxila.³² No entanto, a verdadeira função fisiológica das PAP's ainda permanece não estabelecida.

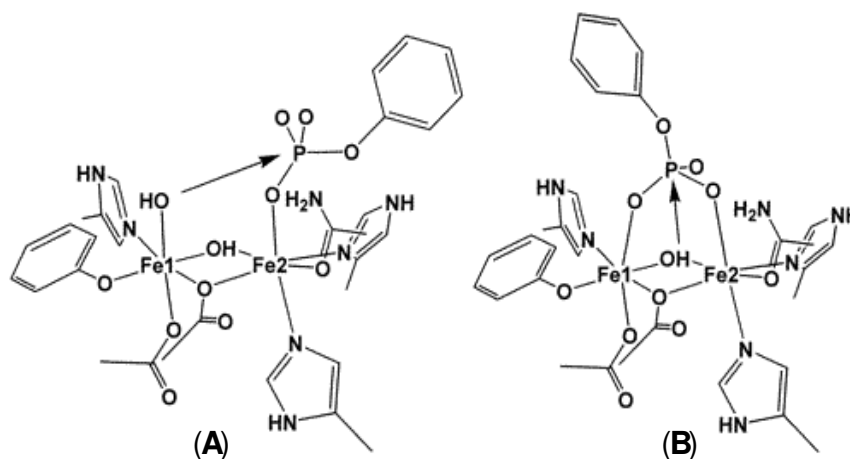


Figura 5. Ataque nucleofílico proposto por Lindqvist e colaboradores (A)³² e por Que e colaboradores (B)²⁶ para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAP's.

1.5 – Complexos Modelos

Como mostrado nas seções anteriores, antes mesmo da resolução da primeira estrutura cristalina das PAP's, já se conhecia muito sobre a composição do seu sítio ativo. Para tanto, foram essenciais as comparações entre as propriedades físico-químicas obtidas diretamente da enzima com as obtidas para complexos modelos. Com esse objetivo, dezenas de complexos com ligantes contendo átomos de oxigênio e de nitrogênio doadores encontram-se descritos na literatura.³⁷⁻⁵³ Assim, quando as estruturas de raios X foram determinadas, muitas

das informações obtidas foram apenas comprovação das propriedades previamente reportadas.

Atualmente são buscadas, através do estudo de compostos modelos, maiores informações sobre a reatividade das PAP's, procurando auxiliar na comprovação de seu mecanismo de ação bem como na busca de seu papel nos sistemas vivos. O primeiro complexo descrito como modelo funcional para as PAP's foi publicado em 1995.⁵⁴ Esse complexo foi gerado em solução pela adição de nitrato de ferro (III) ao ligante H₂EDDA, e sua atividade catalítica foi então avaliada frente à reação de hidrólise do 4-nitrofenilfosfato. Observou-se uma aceleração de 160 vezes em relação a reação não catalisada, a 25 °C e pH = 6,0. Em 1997 Ménage e colaboradores publicaram o complexo Fe₂O(Phen)₄(OH)₂(NO₃)₂, cuja atividade catalítica na hidrólise do éster de fosfato BNDPP – Substrato Modelo - foi avaliada, apresentando uma aceleração de 100 vezes em relação a reação não catalisada, a 50°C e pH = 6,0.⁵⁵

A elucidação das estruturas cristalinas dessas metaloenzimas, que permitiu desvendar o sítio ativo e descobrir um ambiente de coordenação comum entre as diversas PAP's forneceu subsídios para o desenvolvimento de ligantes mais elaborados para a mimetização desse sítio ativo e conseqüentemente das suas propriedades. Nesse sentido, uma das estratégias mais promissoras para o desenvolvimento desses ligantes é a utilização de um esqueleto binucleante como mostrado na Figura 6, que proporciona a formação de pontes do tipo μ -alcóxido ou μ -fenóxido e de braços pendentes contendo grupos doadores que mimetizam os resíduos de aminoácidos coordenados aos centros metálicos no sítio catalítico.¹⁰

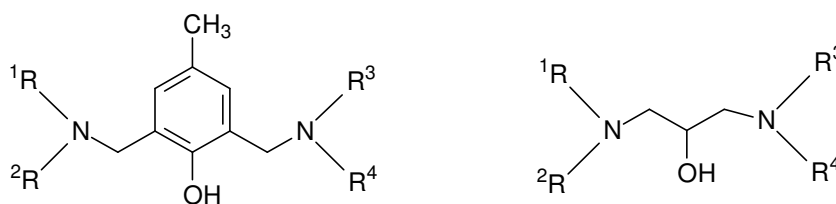


Figura 6. Estrutura geral para ligantes binucleantes, onde R corresponde aos braços pendentes contendo os grupos doadores coordenantes.

Alguns dos principais ligantes utilizados na síntese de modelos para as PAP's são o H₂BTPPNOL⁴² e o H₂BPBPMP^{39,56} (Figura 7), que além de proporcionarem um caráter não-simétrico ao complexo, contém apenas um grupo fenol, aproximando-se bastante do ambiente de coordenação presente no sítio ativo das PAP's, quando comparados aos demais ligantes descritos até o momento.

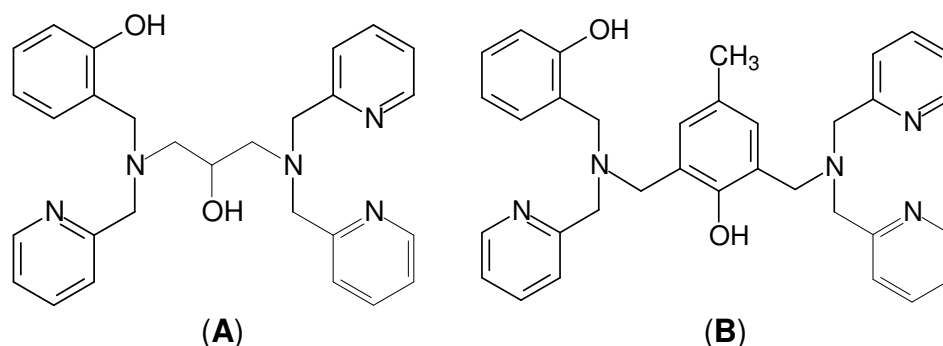


Figura 7. Representação esquemática de alguns dos principais ligantes utilizados na modelagem das PAP's, onde: **(A)** = H₂BTPPNOL^{40b, 40c}, **(B)** = H₂BPBPMP^{39,40a,56}

O complexo [Fe^{III}Fe^{II}(BPBPMP)(OAc)₂][ClO₄] (onde BPBPMP é a forma desprotonada do ligante H₂BPBPMP)^{39,40a56}, apresenta um potencial redox de +380 mV vs NHE, similar ao observado na UfPAP.¹⁷ Entretanto, suas propriedades cromofóricas são diferentes das encontradas na enzima.^{12,18} Já os complexos [Fe₂^{III}(BTPPNOL)(μ-OAc)₂]²⁺ e [Fe^{III}Fe^{II}(BTPPNOL)(μ-OAc)₂]⁺ (onde BTPPNOL é a forma desprotonada do ligante H₂BTPPNOL)⁴² podem ser considerados análogos para as propriedades cromofóricas das PAP's nas formas oxidada e reduzida, respectivamente. Porém, o potencial redox desses complexos difere em 300 mV do potencial determinado para a ufPAP. Em comparação a outros sistemas, são relativamente poucos os trabalhos na literatura que descrevam atividade catalítica de complexos binucleares FeFe e FeZn frente a ésteres de fosfato.^{55,57,58} Podem ser citados os complexos [Zn^{II}Fe^{III}(BPMOP)]⁴⁺ e [Fe^{II}Fe^{III}(BPMOP)]⁴⁺, gerados em solução pela adição dos sais dos metais ao ligante HBPMOP. A atividade catalítica desses complexos na reação de hidrólise do éster de fosfato 2-hidroxi-propil-*p*-nitrofenilfosfato, a 25°C e pH = 8,5, promoveu

uma aceleração de 112 e 54 vezes em relação a reação não catalisada, para os complexos de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$, respectivamente.⁵⁹

Esses exemplos demonstram a necessidade de aprimoramento dos ligantes, buscando uma maior similaridade com o ambiente de coordenação da metaloenzima para que se possa chegar a análogos sintéticos das PAP's e assim avançar na compreensão de sua reatividade.

Sendo assim, apresenta-se neste trabalho o desenvolvimento de novos complexos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ com o ligante binucleante 2-[N-(2-piridilmetil) (carboxiamidometil) aminometil] - 4 - metil - 6- [N - (2 - hidroxibenzil) (2-piridilmetil) aminometil]fenol - H_2L ^{56,58} que, comparado ao ligante H_2BPBPMP ^{39,40a,56}, deve ser vantajoso por substituir uma das piridinas por um grupo amida como braço pendente (Figura 8), buscando mimetizar o resíduos de aminoácido asparagina presente no sítio ativo das fosfatases ácidas púrpuras.^{13,14,29,32,33}

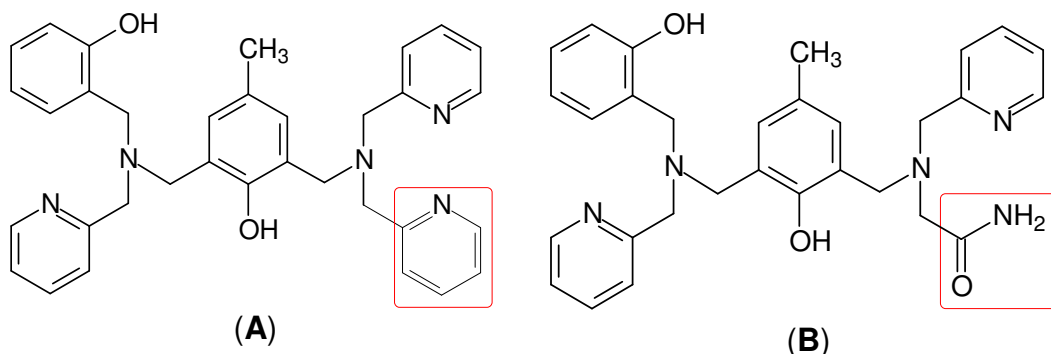


Figura 8. Representação esquemática do ligantes H_2BPBPMP ^{39,40a,56} (A) e do ligante utilizado neste trabalho - H_2L (B). Assinaladas com contorno estão as diferenças entre os dois ligantes.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivos Gerais

- ❑ Síntese e caracterização de complexos metálicos de relevância para a obtenção de análogos sintéticos para o sítio ativo das PAP's.
- ❑ Avaliação das mudanças ocorridas devido à inclusão do grupo amida como braço ligante em complexos modelos

2.1 – Objetivos Específicos

- ❑ Reprodução da síntese e caracterização do ligante 2-[(2-piridilmetil)(carboxiamido-metil)aminometil]-4-metil-6-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol (H_2L), já descrito por Lanznaster em sua Tese de Doutorado.⁵⁸
- ❑ Obtenção de novos complexos binucleares de valência mista $Fe^{III}M^{II}L$ (onde $M = Fe, Zn$) com pontes μ -acetato e μ -hidróxido.
- ❑ Estudo das propriedades espectroscópicas, eletroquímicas e estruturais dos complexos obtidos, buscando correlacioná-las com as propriedades das PAP's.
- ❑ Estudos de equilíbrio das espécies em solução através de titulação potenciométrica.
- ❑ Avaliação da reatividade dos complexos obtidos frente à hidrólise de ésteres de fosfato.

3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1 – Materiais, Métodos e Instrumentação

3.1.1 – Materiais

Os seguintes reagentes, materiais, gases e solventes, utilizados nas sínteses e análises, foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia: *p*-cresol (Aldrich), 2-aminometilpiridina (Aldrich), aldeído salicílico (Vetec), 2-bromoacetamida (Acros), trietilamina (Merck), hidróxido de sódio (Nuclear), hidróxido de potássio (Merck, Nuclear), formaldeído 37 % (Vetec), bicarbonato de sódio (Nuclear, Vetec), ácido clorídrico 37 % (Nuclear), sulfato de sódio anidro (Nuclear, Vetec), argônio 5.0 (White Martins), borohidreto de sódio (Aldrich), hidróxido de lítio (Aldrich), clorofórmio deuterado (Acros), oxocloreto de fósforo (Merck), 2,2'-bipiridina (Vetec), perclorato de ferro(III) hidratado (Aldrich), perclorato de zinco(II) hexahidratado (Aldrich), tampões biológicos MES, HEPES, CHES (Acros), perclorato de lítio hexahidratado (Aldrich), cloreto de sódio (Nuclear), perclorato de sódio (Aldrich, Acros), acetato de sódio trihidratado (Merck), ferroceno (Acros), ferricianeto de potássio (indeterminado), acetonitrila PA (Nuclear) acetonitrila UV/HPLC (Tedia, Mallinckrodt), metanol PA (Nuclear), acetona PA (Nuclear), diclorometano PA (Nuclear), diclorometano UV/HPLC (Tedia, Mallinckrodt), clorofórmio PA (Nuclear), isopropanol PA (Nuclear), etanol absoluto (Carlo Erba, Merck), THF PA (Merck) acetato de etila UV/HPLC (Vetec), éter etílico PA (Nuclear). Purificado para utilização: hexafluorofosfato de tetrabutílamônio (Aldrich, recristalizado em etanol/água).

3.1.2 – Análise Elementar de CHN

Os percentuais de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio foram obtidos na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, em um analisador elementar de CHNS Carlo Erba - modelo EA-1110.

3.1.3 – Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram realizados em um espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR – 2000, na região de 4000 a 450 cm^{-1} . As amostras foram preparadas por dispersão em KBr de grau espectroscópico, com o qual se trabalha sob uma lâmpada de 200 W em ambiente com umidade controlada, e prensadas (10 toneladas) formando pastilhas com cerca de 1 cm de diâmetro e 0,5 mm de espessura. Estas pastilhas são postas diretamente no caminho óptico do equipamento, analisando-se então o percentual de transmitância (%T) da luz.

3.1.4 – Espectroscopia de RMN

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram realizados em um espectrofotômetro Bruker – FT 200 MHz, na Central de Análises do Departamento de Química. As amostras foram acondicionadas em tubo de quartzo de 5 mm e solubilizadas em 0,5 mL de solvente deuterado contendo TMS como padrão interno (CDCl_3).

3.1.5 – Difração de Raios X

A análise por difração de raios X de monocristal do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{Zn}^{\text{II}}_2(\text{L})_2(\mu\text{-OH})_2(\text{ClO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2][\text{ClO}_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ (**1**) foi realizada no difratômetro automático ENRAF-NONIUS CAD-4 na Central de Análises Departamento de

Química da UFSC, equipado com um tubo de molibdênio ($\text{MoK}\alpha = 0,71073 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite. A solução da estrutura cristalina foi obtida através dos métodos diretos com a utilização do programa SHELXS97.^{60a} O refinamento da estrutura foi realizado pelo método dos mínimos quadrados com matriz completa, com a utilização do programa SHELXL97^{60b} e a representação gráfica foi elaborada com os programas ZORTEP⁶¹ e ORTEP⁶².

3.1.6 – Espectroscopia Mössbauer

Os espectros Mössbauer para o complexo (1) foram obtidos nas temperaturas de 298 K e 115 K, a partir de uma fonte móvel ^{57}Co (Rh) em um modo de aceleração constante. As linhas de ressonância do ferro metálico foram utilizadas para a calibração da fonte e os deslocamentos isoméricos foram dados relativos ao ferro metálico, à temperatura medida. Esses experimentos foram realizados pelo Prof. Dr. Valderes Drago, do Departamento de Física da UFSC.

3.1.7 – Potenciometria

Os estudos potenciométricos foram realizados em solução de etanol/água (70:30 % V/V) devido à baixa solubilidade dos complexos em água, utilizando um pHmetro Corning 350 acoplado a um eletrodo de vidro combinado (Ag/AgCl). As soluções foram preparadas com água bidestilada na presença de KMnO_4 e etanol absoluto. Os eletrodos foram calibrados com uma solução diluída de HCl em etanol/água 70:30 % V/V para leitura direta de $-\log[\text{H}^+]$ (pH) e a inclinação foi fixada utilizando dados obtidos a partir da titulação potenciométrica de uma solução com volume conhecido de HCl $10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ com solução padrão de KOH $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ livre de CO_2 , ambos em etanol/água 70:30 V/V %. Os experimentos foram realizados com 0,05 mmol do complexo solubilizado em 20,0 mL de solução com força iônica $I = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (KCl), em uma célula

termostatizada (25,0°C), sob atmosfera de argônio. Essas soluções tiveram o pH ajustado para pH ~ 3,0 pela adição de HCl 0,1 mol.L⁻¹ e foram tituladas com uma solução padrão de KOH 0,100 mol.L⁻¹ até pH = 12,0. O pK_w da solução etanol/água 70:30 V/V % contendo 0,1 mol.L⁻¹ de KCl (força iônica) utilizado para os cálculos foi 14,71(±2)⁶³. A adição de alíquotas de 0,05 mL de solução de KOH (titulante) foi realizada com auxílio de uma bureta Schott, modelo T80/20, com adições sucessivas de base, realizadas de 5 em 5 minutos ou após a estabilização do pH. As titulações foram repetidas por três vezes e os valores foram obtidos como a média dos três experimentos. As constantes de equilíbrio foram calculadas com programa BEST7, sendo variadas para a realização do melhor ajuste entre os valores observados e calculados de pH para cada ponto de acordo com o parâmetro estequiométrico fornecido. Os diagramas de distribuição de espécies foram obtidos com os programas SPE e SPEPLOT.⁶⁴

3.1.8 – Espectroscopia Eletrônica

Os espectros de absorção da região de 300 a 900 nm foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo Lambda 19, em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm. As soluções dos complexos foram preparadas em etanol absoluto/água desionizada 70:30 % V/V ou em acetonitrila de grau espectroscópico, com concentrações entre 6,0.10⁻⁴ mol.L⁻¹ e 3,0.10⁻⁵ mol.L⁻¹, aproximadamente. Os espectros no estado sólido foram obtidos através da preparação de pastilhas contendo as amostras dispersas em KBr de grau espectroscópico e prensadas (6 toneladas) formando pastilhas com cerca de 1 cm de diâmetro e 1 mm de espessura.

3.1.9 – Eletroquímica

O estudo do comportamento redox dos complexos foi realizado através de voltametria cíclica em um potenciostato-galvanostato PAR modelo 273, sob atmosfera de argônio 5.0 (H_2O , $\text{O}_2 < 3$ ppm).

O complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{Zn}^{\text{II}}_2(\text{L})_2(\mu\text{-OH})_2(\text{ClO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2][\text{ClO}_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ (**1**) teve seu comportamento redox estudado em solução de etanol absoluto/água desionizada 70:30 % V/V, com concentração de aproximadamente $2,0 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹, contendo 0,1 mol.L⁻¹ de LiClO_4 , utilizando-se eletrodo de carbono vítreo, como eletrodo de trabalho, Ag/Ag^+ como referência e fio de platina como contra-eletrodo. Hexacianoferrato de potássio foi utilizado como padrão interno.

Para os complexos $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ (**2**) e $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ (**3**) os experimentos foram realizados em solução de acetonitrila de grau espectroscópico, com concentração de aproximadamente $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹, contendo 0,1 mol.L⁻¹ de hexafluorofosfato de tetrabutilamônio. Utilizou-se eletrodo de disco de platina (área ~ 3 mm²), como eletrodo de trabalho, Ag/Ag^+ como referência, fio de platina como contra-eletrodo e ferroceno como padrão interno.

3.1.10 – Medidas Magnéticas

As medidas de suscetibilidade magnética em função da temperatura foram realizadas na Technische Universität Darmstadt – Institut für Physikalische Chemie – Darmstadt / Alemanha, através de uma cooperação com o Prof. Dr. Wolfgang Haase. Utilizou-se uma balança do tipo Faraday que consiste de uma microbalança eletromagnética CAHN D200 com um erro máximo de 1µg. Um controlador de temperatura Leybold LTC 60 foi usado, sendo que as temperaturas baixas foram medidas com resistência de carbono vítreo e as temperaturas maiores de 60 K com um diodo de silicone. A corrente máxima aplicada (60 Amperes) produz um campo magnético de 1,5 Tesla entre os pólos do magneto. A diferença entre as massas com e sem a aplicação do campo

magnético, numa faixa de 4 a 300 K, é usada para a determinação da suscetibilidade magnética.

3.1.11 – Reatividade

A atividade catalítica do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{Zn}^{\text{II}}_2(\text{L})_2(\mu\text{-OH})_2(\text{ClO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2][\text{ClO}_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ (**1**) foi avaliada através da reação de hidrólise do éster de fosfato bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato, sal de piridínio, [2,4 - BDNPP][HPy]⁺, sob condições de excesso de substrato. Os ensaios foram realizados em cubetas de quartzo e/ou vidro óptico com capacidade para 4 mL e caminho óptico de 1 cm, seladas com tampa de teflon, nas quais foram adicionados 1,5 mL de solução tampão (0,1 mol.L⁻¹ em água) e quantidades adequadas de soluções do complexo e do substrato, bem como acetonitrila espectroscópica, para complementar o volume final de 3,0 mL.

As soluções tampão foram preparadas a partir dos tampões comerciais MES, HEPES e CHES, solubilizados em água desionizada e com o pH ajustado pela adição de solução aquosa de hidróxido de sódio e/ou ácido perclórico. Utilizou-se um pHmetro (precisão de 2 dígitos) com eletrodo de vidro combinado Ag/AgCl e manteve-se a força iônica da reação em $I = 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ pela adição de perclorato de lítio à solução tampão.

Os dados sobre as reações foram obtidos pelo acompanhamento das reações, realizado em um espectrofotômetro Varian modelo Cary Bio 50, utilizando o software Cary Win UV para aquisição dos dados. Estes dados foram tratados no software Microcal ORIGIN 5.0 para a obtenção dos parâmetros cinéticos. A influência do pH sobre a velocidade da reação de hidrólise foi investigada numa faixa de pH entre 4,0 e 10,0, onde $[\text{complexo}] = 4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{substrato}] = 5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e $I = 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$.

O gráfico das velocidades iniciais (v_0) em função do pH permitiu a obtenção do valor *pH ótimo* (atividade catalítica máxima). A determinação das velocidades iniciais em função da concentração do substrato foi realizada sob as condições

descritas para o estudo da influência do pH, no pH ótimo, resultando em cinéticas de saturação com comportamento de Michaelis-Menten.

O tratamento dos dados através do método de Lineweaver-Burk permitiu a obtenção dos parâmetros cinéticos, a saber: *constante catalítica* (k_{cat}), *velocidade máxima* ($V_{m\acute{a}x}$), *constante de Michaelis-Menten* (K_m), *fator catalítico* ($f = k_{cat} / k_{n\grave{a}o\ catalisada}$), *eficiência catalítica* ($E = k_{cat} / K_m$) e *constante de associação* ($K_{ass} = 1 / K_m$).

Os experimentos cinéticos na presença de 2,2'-bipiridina foram realizados a 25 °C, no pH ótimo determinado, obtido através dos experimentos de variação de pH e ajustado com uma das soluções de tampão com força iônica já descritos, tendo-se: [complexo] = $4,0 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹; [2,4 - BDNPP] = $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹; [2,2'-Bipiridina] = $2,0 \cdot 10^{-5}$ à $40,0 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹.

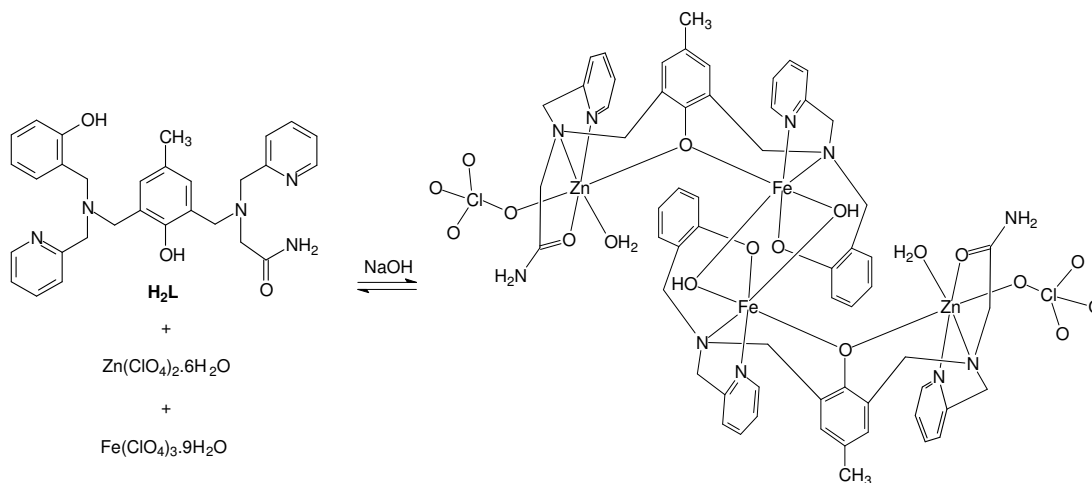
Em todos os experimentos cinéticos a correção da hidrólise espontânea do substrato foi realizada através da diferença direta, ou seja, experimentos em condições idênticas, exceto pela ausência do complexo, foram acompanhados em paralelo, e a constante da reação não catalisada descontada da constante total da reação.

3.2 – Síntese do Ligante H₂L

A reprodução da síntese e da caracterização do ligante 2-[(2-piridilmetil) (carboxiamido - metil) aminometil]- 4 - metil - 6 - [(2 - hidroxibenzil) (2-piridilmetil) aminometil] fenol (H₂L) foram realizados, obtendo-se os resultados esperados e já descritos na Tese de Doutorado de Maurício Lanznaster.⁵⁸ A reprodução da descrição das etapas de síntese pode ser encontrada no Apêndice A.

3.3 – Síntese dos Complexos

3.3.1 – Síntese do complexo $[\text{Fe}_2\text{Zn}_2\text{L}_2(\mu\text{-OH})_2(\text{ClO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2][\text{ClO}_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ – Complexo (1)



Esquema 4. Síntese do complexo (1).

A uma solução do ligante H_2L (0,51 g, 1 mmol) em 20 mL de metanol, sob agitação e leve aquecimento, adicionou-se uma solução metanólica de $\text{Zn}^{\text{II}}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,38 g, 1 mmol). Adicionou-se então, gota a gota, uma solução de $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0,52 g, 1 mmol). À solução roxa resultante foram adicionados lentamente 3 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. A solução púrpura formada foi deixada sob refluxo por aproximadamente 20 minutos. A seguir filtrou-se e deixou-se em repouso. Após dois dias à temperatura ambiente, houve a formação de um precipitado vermelho microscristalino o qual foi filtrado e lavado com água, isopropanol e éter etílico gelados. Rendimento: 64% (0,62 g 0,32 mmol) baseado no ligante H_2L . Monocristais adequados à resolução da estrutura cristalina por difração de raios X foram obtidos a partir de uma solução acetonitrila/isopropanol (3:1).

Análise elementar de CHN calculada para $C_{66}H_{92}Cl_4Fe_2N_{10}O_{32}Zn_2$, $MM = 1921,77 \text{ g.mol}^{-1}$, C = 41,25; H = 4,83; N = 7,29 %. Encontrada: C = 40,66; H = 4,78; N = 7,34 %.

O composto perde lentamente solvente de cristalização. Sendo assim, este foi deixado em estufa, sob temperatura de aproximadamente 50°C , por uma semana e então se realizou nova análise elementar de CHN.

Calculada para $C_{60}H_{76}Cl_4Fe_2N_{10}O_{30}Zn_2$, $MM = 1801,58 \text{ g.mol}^{-1}$, C = 40,00; H = 4,25; N = 7,77 %. Encontrada: C = 38,66; H = 4,10; N = 7,69 %.

IV (KBr) em cm^{-1} (Figura 9): ν (OH) 3500-3300; ν ($\text{C}=\text{O}_{\text{amida}}$)1675; ν ($\text{C}=\text{N}$ e $\text{C}=\text{C}$) 1600-1400; ν ($\text{C}-\text{O}_{\text{fenol}}$) 1272; ν ($\text{Cl}-\text{O}$) 1099; δ ($\text{C}-\text{H}_{\text{ar}}$) 762.

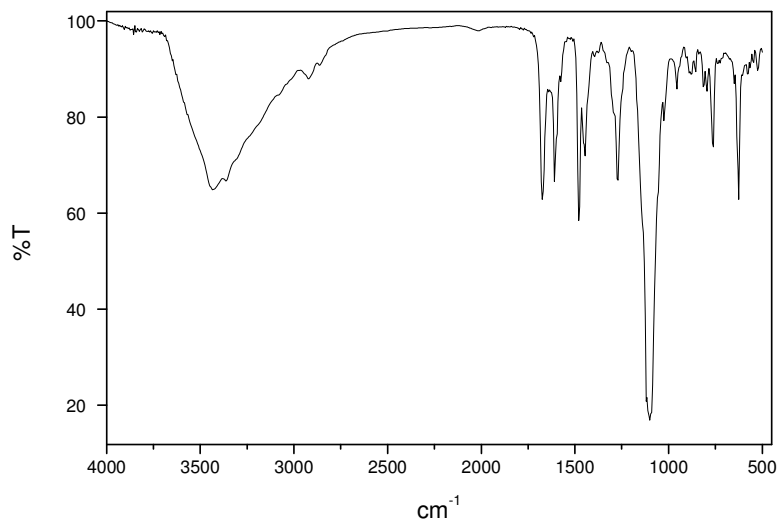
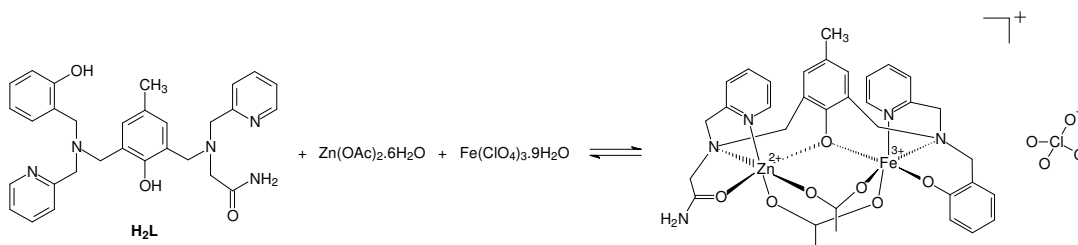


Figura 9. Espectro no infravermelho do complexo (1) em pastilha de KBr.

3.3.2 – Síntese do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L})(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ – Complexo (2)



Esquema 5. Síntese do complexo (2).

A uma solução contendo o ligante H_2L (0,26 g, 0,5 mmol) e $Na(OAc).3H_2O$ (0,14 g, 1 mmol) em 30 mL de metanol, sob agitação e leve aquecimento, adicionou-se uma solução metanólica de $Zn^{II}(OAc)_2.6H_2O$ (0,11 g, 0,5 mmol). Adicionou-se então, gota a gota, uma solução de $Fe^{III}(ClO_4)_3.9H_2O$ (0,26 g, 0,5 mmol). A solução formada foi concentrada e dissolvida em isopropanol/água 1:1. Obteve-se então microcristais púrpura.

Análise elementar de CHN, calculada para $C_{34}H_{37}ClFeN_5O_{11}Zn \cdot 4H_2O$, MM = 920,44 $g \cdot mol^{-1}$, C = 44,37; H = 4,93; N = 7,61 %. Encontrada: C = 44,23; H = 4,74; N = 7,60 %.

Com base na análise elementar, no espectro de infravermelho (Figura 10) e em outros complexos com ligantes semelhantes e estrutura resolvida sintetizados no grupo por Neves e colaboradores^{28,40,42,56,57,58}, foi proposta para o complexo (2) a estrutura mostrada no Esquema 5.

IV (KBr) em cm^{-1} : ν (OH) 3500-3300; ν ($C=O_{amida}$) 1674; ν ($C=N$, $C=C$, $C-O_{acetato}$) 1600-1400; ν ($C-O_{fenol}$) 1269; ν ($Cl-O$) 1097; δ ($C-H_{ar}$) 763.

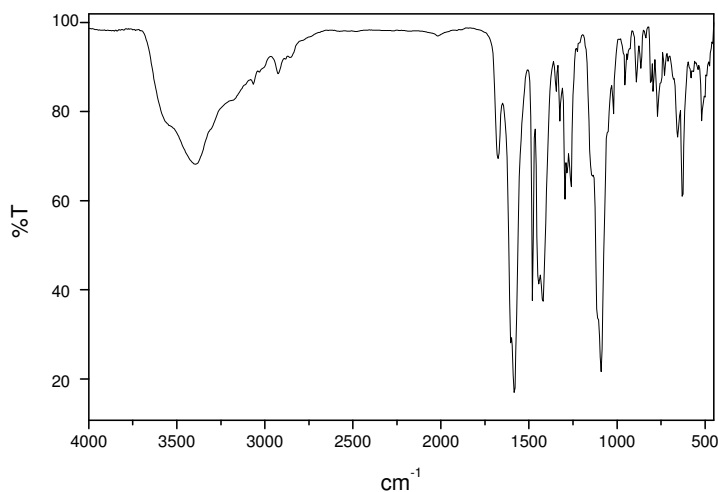
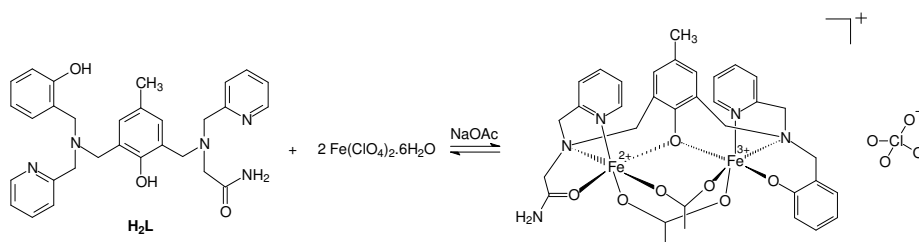


Figura 10. Espectro no infravermelho do complexo (2) em pastilha de KBr.

3.3.3 – Síntese do complexo $[\text{Fe}_2(\text{L})(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ – Complexo (3)



Esquema 6. Síntese do complexo (3)

O complexo foi obtido a partir de uma solução contendo 0,5 mmol do ligante H_2L dissolvidos em 15 mL isopropanol, sobre à qual adicionou-se 1,0 mmol de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dissolvidos em 10 mL de acetonitrila, formando-se uma solução púrpura. Foram acrescentados então 2,0 mmol de $\text{Na}(\text{OAc}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, obtendo-se um pó púrpura que foi lavado com água, isopropanol gelado e éter.

Análise elementar de CHN, calculada para $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{ClFe}_2\text{N}_5\text{O}_{11} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MM} = 910,90 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, C = 44,83; H = 4,98; N = 7,69 %. Encontrada: C = 44,86; H = 4,41; N = 7,69 %.

Com base na análise elementar, no espectro de infravermelho (Figura 11) e em outros complexos com ligantes semelhantes e estrutura resolvida sintetizados no grupo por Neves e colaboradores^{28,40,42,56,57,58}, foi proposta para o complexo **3** a estrutura mostrada na Esquema 6.

IV (KBr) em cm^{-1} : ν (OH) 3500-3300; ν ($\text{C}=\text{O}_{\text{amida}}$) 1672; ν ($\text{C}=\text{N}$, $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}-\text{O}_{\text{acetato}}$) 1600-1400; ν ($\text{C}-\text{O}_{\text{fenol}}$) 1263; ν (Cl-O) 1089; δ ($\text{C}-\text{H}_{\text{ar}}$) 764.

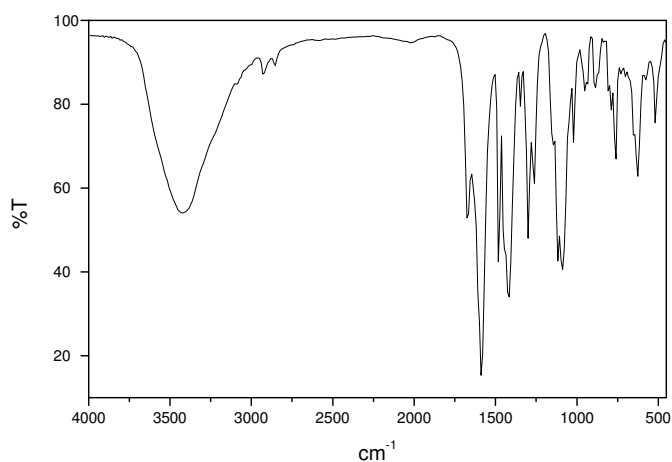


Figura 11. Espectro no infravermelho do complexo (3) em pastilha de KBr.

ATENÇÃO: Embora nenhum problema tenha sido encontrado nas sínteses e purificações dos complexos, sempre devem ser tomadas precauções no manuseio de sais de perclorato, por serem potencialmente explosivos.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos Ligantes

Os ligantes utilizados neste trabalho foram caracterizados através de espectroscopia no infravermelho (IR), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e análise elementar de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre (CHNS). O ligante final H₂L foi caracterizado também por ressonância magnética nuclear de carbono (RMN¹³C). Os resultados da análise elementar podem ser encontrados no Apêndice A, juntamente com o procedimento experimental de síntese de cada etapa do ligante.

4.1.1 - Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros no infravermelho dos ligantes precursores são apresentados no Apêndice B. As bandas que melhor caracterizam os ligantes são apresentadas na Tabela 1. As bandas referentes às ligações C=C, C=N e C-H dos fenóis e piridinas, e C-O dos fenóis, como esperado, aparecem na mesma região do espectro de infravermelho para todos os ligantes. No espectro do ligante H₂L, mostrado na Figura 12, vale ressaltar a presença de uma banda intensa em 1683 cm⁻¹, característica do grupo funcional amida.

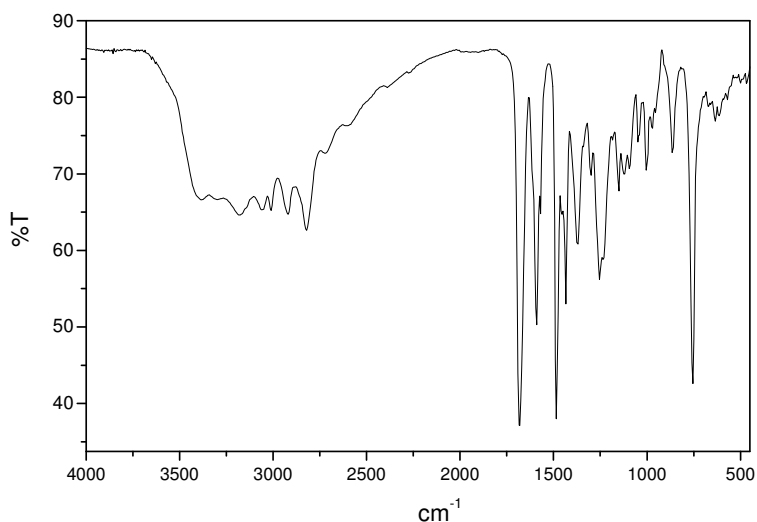


Figura 12. Espectro no infravermelho do ligante H₂L em pastilha de KBr.

Tabela 1. Principais bandas observadas nos espectros no infravermelho dos ligantes precursores e do ligante H₂L, em número de onda (cm⁻¹).

Atribuição	HMB	CMFF	HBPA	HBPAMFF	HBPAMPAF	H ₂ L
v(C=O) aldeído	1658	1664	-	1664	-	-
v(C=O) amida	-	-	-	-	-	1683
						1590
v(C=C), (C=N)	1590	1600	1612	1600	1600	1571
piridina, fenol	1484	1470	1468	1470	1470	1485
						1434
v(C-O)						1233
fenol	1282	1257		1257	1300	1254
δ(C-H)						
piridina, fenol	742	703	725	716	760	755

4.1.2 - Espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C

Os espectros referentes ao ligante final são mostrados nas Figuras 13 e 14, enquanto os espectros dos precursores podem ser encontrados no Apêndice C. A integração dos sinais registrados nos espectros de RMN¹H e seus deslocamentos

químicos permitiram a distinção entre os átomos de hidrogênio metílicos, metilênicos e aromáticos e, conseqüentemente, determinar o número de hidrogênios presentes em cada ligante. Estas informações permitiram confirmar a obtenção e a pureza dos ligantes sintetizados. As principais atribuições podem ser vistas na Tabela 2.

Tabela 2. Deslocamentos químicos (ppm) observados nos espectros de RMN¹H para os ligantes precursores e para o ligante final H₂L.

Atribuição	HMB	CMFF	HBPA	HBPAMFF	HBPAMPAF	H ₂ L
¹ H (CH ₃)	2,34 (s, 3H)	2,35 (s, 3H)	-----	2,28 (s, 3H)	2,21 (s, 3H)	2,20 (s, 1H)
					3,73 (s, 2H)	3,20 (s, 2H)
					3,81 (s, 2H)	3,66 (s, 2H)
¹ H (CH ₂)	-----	4,67 (s, 2H)	3,92 (s, 2H)	3,78-3,86 (3s, 6H)	3,85 (s, 2H)	3,80 (s, 2H)
			4,00 (s, 2H)		3,90 (s, 2H)	3,83 (s, 2H)
					3,93 (s, 2H)	3,87 (s, 2H)
						3,89 (s, 2H)
¹ H (aldeído)	9,85 (s, 1H)	9,86 (s, 1H)	-----	9,98 (s, 1H)	-----	-----
¹ H (fenol)	10,84 (s, 1H)	11,25 (s, 1H)	não atribuído	11,04 (s, 1H)	não atribuído	não atribuído
					6,70-6,85 (m, 4H)	6,69-6,88 (m, 4H)
	6,90 (d, 1H)	7,35 (s, 1H)	6,74-7,25 (m, 7H)	6,78-7,30 (m, 9H)	7,00-7,38 (m, 6H)	7,04-7,36 (m, 6H)
¹ H (aromático)	7,34 (dd, 2H)	7,46 (s, 1H)	8,58(d, 1H)		7,65 (t, 2H)	7,56-7,74 (m, 2H)
					8,52 (d, 2H)	8,58 (dd, 2H)

O espectro de RMN¹³C do ligante H₂L (Figura 14) confirma a caracterização obtida a partir do espectro de ¹H através do número de sinais correspondentes aos átomos de carbono não equivalentes presentes no ligante.

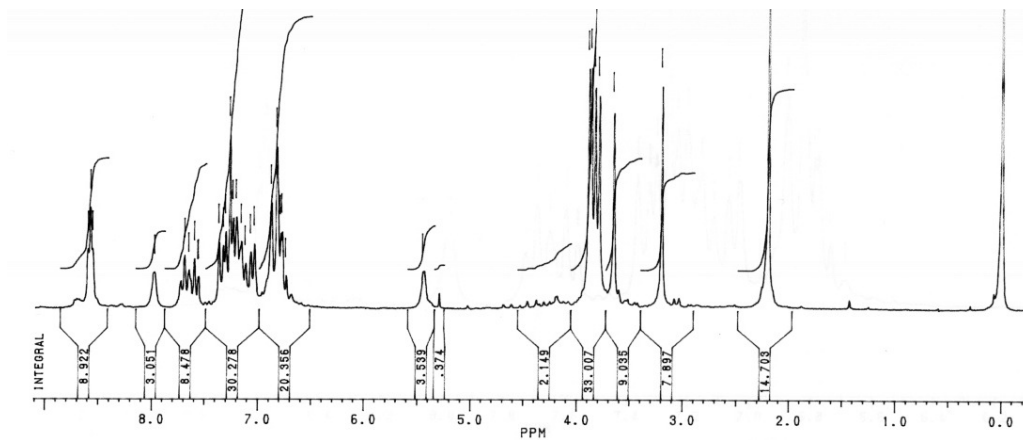


Figura 13. Espectro de RMN¹H do ligante H₂L

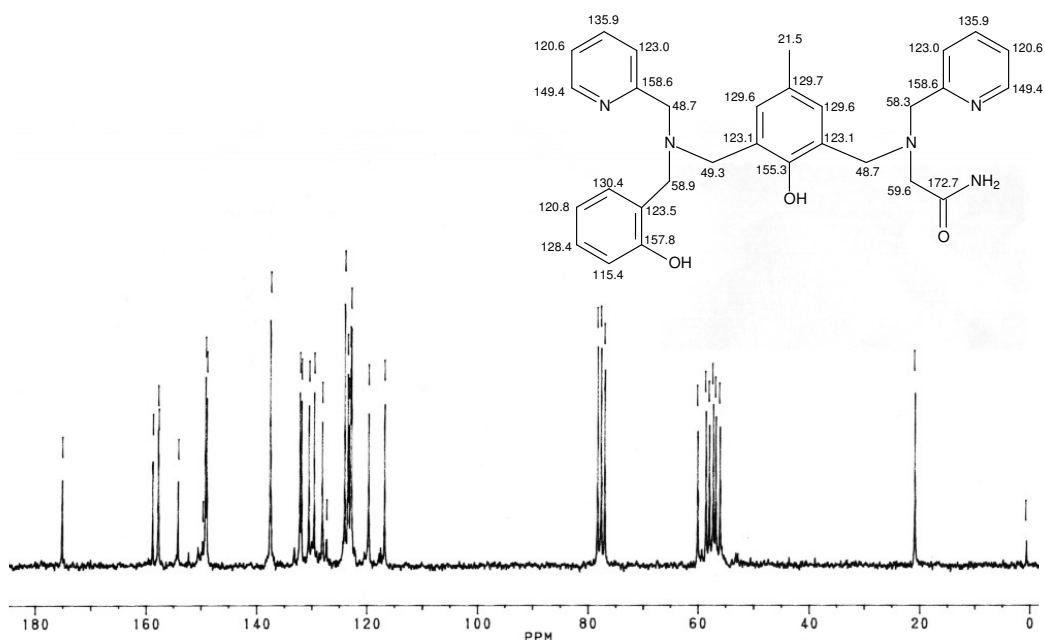


Figura 14. Espectro de RMN¹³C e desenho com as atribuições referentes a cada carbono (inserido) do ligante H₂L.

4.2. Caracterização dos Complexos

Todos os complexos foram caracterizados por análise elementar de CHNS, espectroscopia no infravermelho e espectroscopia eletrônica e eletroquímica. Para o complexo (1) obteve-se ainda a estrutura cristalina por difração de raios X, as constantes de protonação determinadas potenciométricamente, além da realização de estudos magnéticos e de espectroscopia Mössbauer. Os resultados dessas análises são descritos e discutidos a seguir, com exceção da análise elementar que está incluída na descrição do procedimento experimental.

4.2.1. Espectroscopia no Infravermelho

As bandas constantes dos espectros no infravermelho dos complexos são bastante similares as encontradas no espectro do ligante H₂L, indicando sua presença nos compostos isolados. Surgem bandas adicionais referentes ao contra-íon, moléculas de água coordenadas ou ligantes ponte. Esses espectros podem ser encontrados na seção 3.3 – Síntese dos Complexos.

A Figura 15 mostra uma sobreposição dos espectros do ligante H₂L e dos complexos [Fe^{III}₂Zn^{II}₂L₂(μ-OH)₂(ClO₄)₂(H₂O)₂][ClO₄]₂.4H₂O.2(CH₃)₂CHOH (1), [Fe^{III}Zn^{II}L(μ-OAc)₂]ClO₄ (2) e [Fe^{III}Fe^{II}L(μ-OAc)₂]ClO₄ (3), na faixa de 1800 à 450 cm⁻¹. Nesta figura podem ser observadas as similaridades e diferenças entre esses compostos. O ligante H₂L apresenta uma banda intensa em 1683 cm⁻¹, referente a carbonila do grupamento amida, uma banda de intensidade um pouco menor em 1590 cm⁻¹ e outra de menor intensidade em 1571 cm⁻¹, devidas ao estiramento das ligações C=C e C=N dos anéis aromáticos, e uma banda atribuída a deformação fora do plano do O-H de fenol. Nos complexos, a banda do grupo amida aparece levemente deslocada e com intensidade diminuída, evidenciando a sua coordenação.

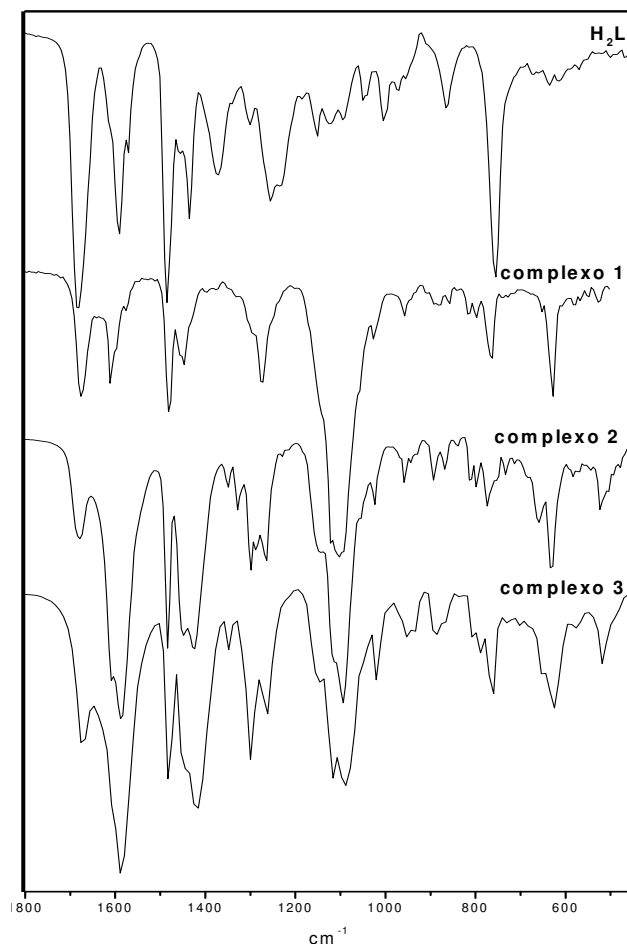


Figura 15. Espectros no infravermelho do ligante H_2L , e dos complexos **(1)** = $[Fe_2Zn_2L_2(\mu-OH)_2(ClO_4)_2(H_2O)_2] [ClO_4]_2 \cdot 4H_2O \cdot 2(CH_3)_2CHOH$, **(2)** = $[Fe^{III}Zn^{II}L(\mu-OAc)_2]ClO_4$ e **(3)** = $[Fe^{III}Fe^{II}L(\mu-OAc)_2]ClO_4$, dispersos em pastilha de KBr.

Para os complexos $[Fe^{III}Zn^{II}L(\mu-OAc)_2]ClO_4$ **(2)** e $[Fe^{III}Fe^{II}L(\mu-OAc)_2]ClO_4$ **(3)** observa-se um alargamento das bandas na região entre 1400 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} devido à absorção dos estiramentos simétrico e assimétrico das ligações $O-C=O$. Pode-se observar também o surgimento de bandas intensas na região próxima a 1100 cm^{-1} em todos os complexos, devido a presença do ânion perclorato. Estas são mais pronunciadas no complexo **(1)**, que apresenta maior número de grupos perclorato.

4.2.2. Estrutura Cristalina por Difração de Raios X

A resolução da estrutura cristalina para o complexo (**1**) se deu através da análise de um monocristal do complexo pelo método de difração de raios X. Na Figura 16 pode ser encontrada a representação ORTEP da metade assimétrica do cátion complexo. A representação gráfica completa da estrutura é apresentada, juntamente com um desenho esquemático elaborado para facilitar a visualização e alguns dados cristalográficos, na Tabela 3. Na Tabela 4 podem ser encontrados alguns comprimentos e ângulos de ligação selecionados, apresentados de maneira que o complexo em estudo possa ser diretamente comparado com alguns complexos descritos na literatura.

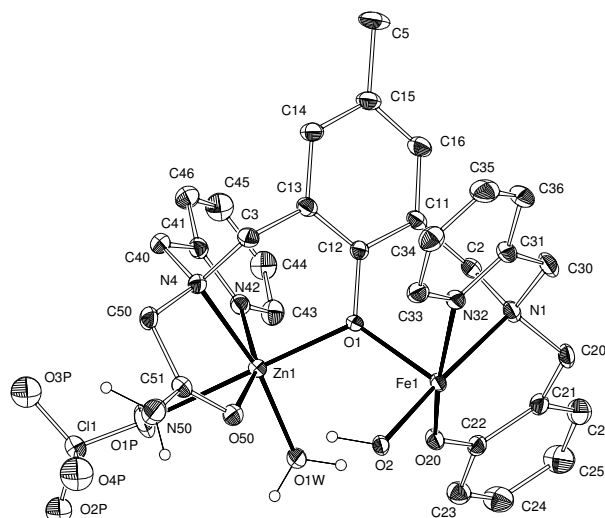


Figura 16. Desenho ORTEP da metade assimétrica do cátion complexo (**1**).

O complexo se apresenta como um dímero de uma espécie heterobinuclear, onde cada íon metálico encontra-se coordenado, com geometria octaédrica distorcida, meridionalmente por uma das metades do ligante heptadentado, ponteados pelo grupo fenolato 2,4,6-substituído. Cada átomo de Zn^{II} está coordenado por um nitrogênio piridínico *trans* ao oxigênio da amida e um nitrogênio de amina terciária. As duas posições restantes são ocupadas por uma molécula de água *trans* a amina e por uma molécula do íon perclorato *trans* a ponte fenolato endógena. Já os átomos de Fe^{III} apresentam-se coordenados a um nitrogênio piridínico *trans* a um fenolato terminal e a um átomo de nitrogênio da

É importante salientar que a coordenação meridional dos braços do ligante binucleante aos metais não permite a formação de um complexo heterobinuclear ponte hidróxido, que seria desejável como modelo para o sítio ativo das PAP's e seria um dos poucos exemplos deste tipo de composto já descritos na literatura.^{58,66} Ainda, analisando a unidade heterobinuclear, esta apresenta distância Fe – Zn de 3,583 Å, próxima da encontrada para outros complexos modelos descritos na literatura para PAP's, bem como a descrita para a enzima kbPAP (3,26 Å).²⁹ As distâncias dos metais ao oxigênio do fenolato ponte também mostraram ser semelhantes às de outros modelos já descritos.^{57,58}

Tabela 4. Tabela de distâncias interatômicas (Å) e ângulos (°) de ligação selecionados para o complexo (1).

Fe1-O20	1,922 Å (3)	O20-Fe1-O2	98,01°(15)	N42-Zn1-O1	95,12° (14)
Fe1-O2	1,964 Å (3)	O20-Fe1-O2i	95,65° (15)	O1W-Zn1-O50	95,00° (16)
Fe1-O2i	1,998 Å (3)	O2-Fe1-O2i	77,54° (14)	N42-Zn1-O50	155,92° (16)
Fe1-O1	2,010 Å (3)	O20-Fe1-O1	92,05° (14)	O1-Zn1-O50	99,44° (14)
Fe1-N32	2,146 Å (4)	O2-Fe1-O1	93,68° (13)	O1W-Zn1-N4	168,97° (15)
Fe1-N1	2,180 Å (4)	O2i -Fe1-O1	169,03° (14)	N42-Zn1-N4	81,05° (16)
		O20-Fe1-N32	165,23° (15)	O1-Zn1-N4	94,30° (14)
Zn1-O1W	1,998 Å (4)	O2-Fe1-N32	96,69° (16)	O50-Zn1-N4	78,84° (15)
Zn1-N42	2,072 Å (4)	O2i -Fe1-N32	88,88° (15)	O1W-Zn1-O1P	82,02° (16)
Zn1-O1	2,076 Å (3)	O1-Fe1-N32	85,61° (14)	N42-Zn1-O1P	81,16° (18)
Zn1-O50	2,100 Å (4)	O20-Fe1-N1	87,73° (15)	O1-Zn1-O1P	175,08° (16)
Zn1-N4	2,149 Å (4)	O2-Fe1-N1	171,95° (15)	O50-Zn1-O1P	85,15° (17)
Zn1-O1P	2,471 Å (4)	O2i -Fe1-N1	96,36° (14)	N4-Zn1-O1P	88,31° (17)
		O1-Fe1-N1	91,74° (14)	Fe1-O1-Zn1	122,52° (15)
Fe1-Zn1	3,5827 Å (11)	N32-Fe1-N1	77,78° (16)	Fe1-O2-Fe1i	102,46° (14)
Fe1-Fe1i	3,089 Å (2)	O1W-Zn1-N42	102,54° (17)	C22-O20-Fe1	133,9° (3)
		O1W-Zn1-O1	95,74° (14)		

Poucos complexos contendo o motivo estrutural $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})_2\text{Fe}^{\text{III}}$ foram descritos desde o trabalho pioneiro de Schugar *et al.*^{66,67} O complexo (1) é o primeiro composto tetranuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ contendo este arranjo estrutural da literatura. Na unidade $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})_2\text{Fe}^{\text{III}}$ os átomos de ferro formam uma estrutura planar perfeita, na qual a soma dos ângulos internos do anel de 4 membros formado é de 360° , sendo esta estrutura extremamente rígida.^{55,68} A distância Fe–Fe é de 3,089 Å e as distâncias Fe–OH são ligeiramente diferentes (Fe1–O2 = 1,963 Å e Fe1–O2ⁱ = 1,998 Å). Isto se deve provavelmente às diferentes distâncias Fe – L na posição *trans* as ligações Fe–OH (Fe1–N1 = 2,180 *trans* a Fe1–O2 e Fe1–O1 = 2,010 *trans* a Fe1–O2ⁱ). A distância Fe–OH no complexo (1) está dentro da faixa encontrada para outros complexos Fe^{III}_2 ponteados por dois hidróxidos ou alcóxidos descritos (1,937-2,055 Å).^{55,66,68} Na estrutura da forma oxidada rbPAP, encontrou-se uma distância de 2,0 Å que teve como atribuição mais provável uma ligação $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OH}$ terminal.⁶⁶ O ângulo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-(}\mu\text{-OH)-Fe}^{\text{III}}$ de $102,46^\circ$ em (1) também é comparável aos correspondentes ângulos observados para outros complexos contendo o motivo estrutural $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})_2\text{Fe}^{\text{III}}$.^{55,66,68} Todas as ligações adicionais Fe–O,N e Zn–O,N presentes na estrutura são semelhantes às encontradas em complexos heterobinucleares $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$.^{57,58}

Finalmente, o mapa de densidade eletrônica do complexo (1) mostra uma forte ligação de hidrogênio intramolecular entre os grupos hidróxido ponte e o oxigênio do grupo ligante amida, tendo uma distância $\text{H}\cdots\text{O}$ de 1,97Å e o ângulo $\text{O}_{\text{hidróxido}}\text{-H}\cdots\text{O}_{\text{amida}}$ de $159,3^\circ$. Esta interação confere, provavelmente, grande estabilidade a espécie tetranuclear com coordenação meridional, dificultando a obtenção do complexo binuclear semelhante ao obtido com o ligante H_2BPBPMP .⁵⁸

4.2.3. Espectroscopia Mössbauer

Os valores de desdobramento quadrupolar (QS) e deslocamento isomérico (IS) são encontrados na Tabela 5 e os espectros são mostrados na Figura 17.

Tabela 5. Parâmetros obtidos na espectroscopia Mössbauer do complexo (1)

Parâmetros	Temperatura	
	298 K	115 K
IS(α -Fe) (mm/s)	0,33	0,44
QS (mm/s)	0,68	0,69

O deslocamento isomérico reflete a natureza do ambiente químico ao redor do núcleo Mössbauer. Os valores de IS mostram que se trata de um único tipo de Fe^{III} de alto spin, não se detectando a presença de Fe^{II} ou de diferenças nos ambientes de coordenação dos cátions Fe^{III}, como visto na estrutura cristalina. O espectro apresenta um dubleto bastante assimétrico onde os picos têm intensidades e larguras de linha diferentes, mas áreas de absorção iguais. Esta assimetria é típica de efeito Goldanskii-Karyagin. Com a diminuição da temperatura, as larguras de linha diminuem e o IS aumenta 0,11 mm/s, como esperado, devido à diferença de temperatura entre a fonte (que permanece a 298 K) e o absorvedor que está a 115 K. O desdobramento quadrupolar aumenta apenas 0,01 mm/s, como se espera de um Fe⁺³ alto spin. A assimetria permanece com as mesmas características daquela presente a 298 K. Normalmente a assimetria devida ao efeito Goldanskii-Karyagin deveria ir suavizando com a diminuição da temperatura, o que não ocorre neste caso. Isto indica que as diferenças nas ligações que originaram o efeito Goldanskii-Karyagin são de vínculos estruturais. De fato, analisando a Tabela 4, Seção 4.2.2, vê-se que as distâncias Fe1–N32 e Fe1–N1 são bem maiores do que as demais ligações do ferro. Estas distâncias permanecem longas em 115 K por se tratarem de nitrogênios de anéis vinculados à estrutura.

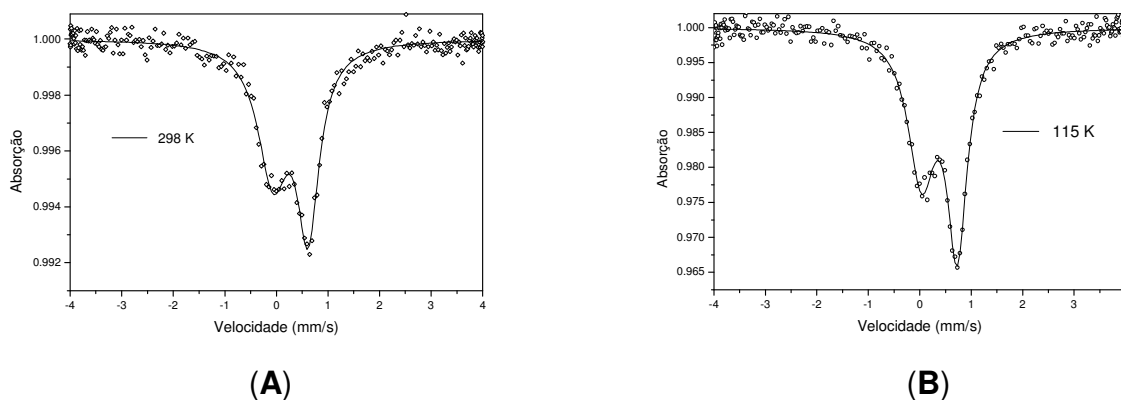


Figura 17. Espectros Mössbauer no estado sólido do complexo (1) a 298 K (A) e a 115 K (B)

4.2.4. Potenciometria

O estudo de titulação potenciométrica do complexo (1) foi realizado em etanol/água (70:30 % V/V) devido à baixa solubilidade desse complexo em água. A curva de distribuição das espécies é apresentada na Figura 18. Os percentuais máximos de cada espécie em equilíbrio e os respectivos pH(s) estão apresentados na Tabela 6.

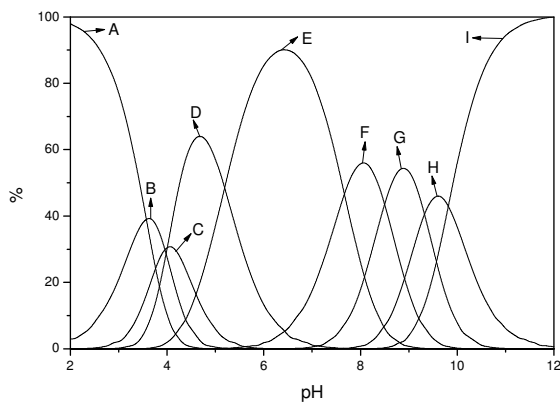


Figura 18. Curvas de distribuição das espécies vs pH para o complexo (1), em etanol/água 70:30 % V/V.

Tabela 6. Percentuais máximos das espécies em equilíbrio e respectivos pH(s).

Espécie	pH _{%Máxima} / _{%Máxima}	Espécie	pH _{%Máxima} / _{%Máxima}
A	2,0 / 97,9	F	8,1 / 56,1
B	3,6 / 39,5	G	8,9 / 54,6
C	4,1 / 30,9	H	9,6 / 46,3
D	4,7 / 64,2	I	12,0 / 100
E	6,4 / 90,2		

Nota-se a grande quantidade de espécies em todas as faixas de pH, salvos os extremos e a região próxima a pH = 6,4, que apresentam claramente uma espécie predominante.

Os valores das constantes de protonação e pH para os percentuais máximos das espécies em equilíbrio são mostrados no Esquema 7 e na Tabela 6.



Esquema 7. Representação das espécies em equilíbrio observadas no estudo potenciométrico.

Propõe-se que a espécie com concentração máxima em pH 6,4 – espécie **E** – seja um composto tetranuclear, similar ao cátion complexo determinado por difração de raios X para o complexo (**1**). Essa hipótese é suportada pelos dados de espectroscopia eletrônica no estado sólido e em solução. As diferenças encontradas entre esses espectros são muito discretas, o que leva a crer que não ocorrem mudanças significativas no ambiente de coordenação dos átomos de ferro. O pH de dissolução dos cristais obtidos é próximo de 6,5, o que concorda com a proposição de uma espécie **E** tetranuclear, e que mantém o arranjo estrutural $Fe^{III}(\mu-OH)_2Fe^{III}$. Portanto, pode-se prever que em pH(s) mais altos ocorra a desprotonação das moléculas de água ligadas aos átomos de Zn, o que explicaria o surgimento de outras espécies (**F – I**).

4.2.5. Espectroscopia Eletrônica

Os espectros de absorção dos complexos no estado sólido e em acetonitrila foram investigados na região entre 300 e 800 nm. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7. Máximos de absorção e coeficiente de absorção molar para os complexos no estado sólido e em acetonitrila.

COMPLEXOS	$\lambda_{\text{máx}} \text{ (nm)} / \epsilon \text{ (mol}^{-1}\text{.L.cm}^{-1}\text{)}$	
	Sólido	acetonitrila
$[\text{Fe}_2\text{Zn}_2\text{L}_2(\mu\text{-OH})_2(\text{ClO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	492	520 / 5600
$[\text{ClO}_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ (1)	336(ombro)	332(ombro)
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}(\text{OAc})_2](\text{ClO}_4)_2$ (2)	576	540 / 2990
	345(ombro)	332(ombro)
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}(\text{OAc})_2](\text{ClO}_4)_2$ (3)	566	547 / 3150
	347(ombro)	347(ombro)

Espectros eletrônicos para os três complexos são encontrados na Figura 19. Em todos os complexos, foi possível a observação de uma banda intensa na região de 500 nm, atribuída a um processo de transferência de carga do tipo ligante \rightarrow metal (TCLM) proveniente dos orbitais $p\pi$ do fenolato para os orbitais $d\pi^*$ do íon Fe^{III} .³ Um segundo processo de TCLM ocorre na região de 330 nm, envolvendo os orbitais $p\pi$ do fenolato e $d\sigma^*$ do Fe^{III} , e aparece na forma de um ombro parcialmente encoberto pelas bandas referentes as transições dos anéis fenólicos e piridínicos do ligante.^{69,70} Quando se compara os valores obtidos para (**2**) e (**3**) com os complexos similares sintetizados com o ligante H_2BPBPMP ,^{39,40a,57} pode-se concluir que a substituição de uma piridina por uma amida no ligante não alterou as propriedades cromofóricas dos complexo, o que já era esperado, pois não houve modificação significativa na esfera de coordenação do íon Fe^{III} .

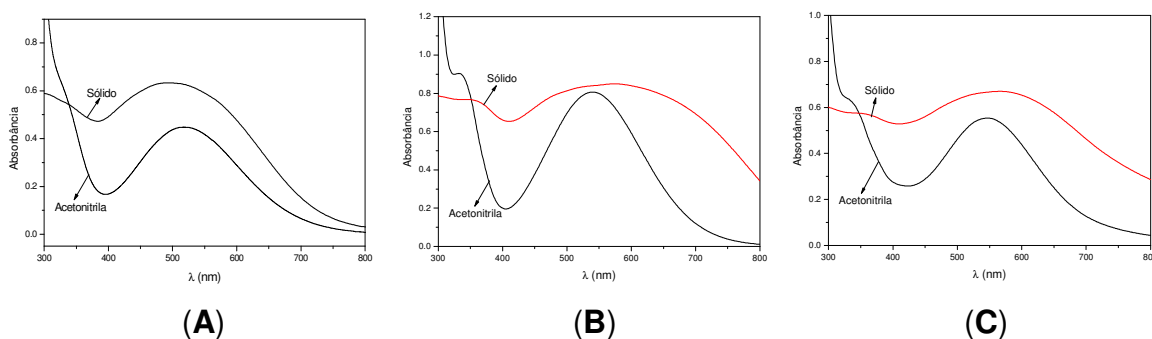


Figura 19. Espectros eletrônicos em solução de acetonitrila e amostra sólida (suportada em pastilha de KBr) para os complexos: complexo **(1)** = **(A)**; complexo **(2)** = **(B)**; complexo **(3)** = **(C)**.

Os coeficientes de absorvidade molar observados para a espécie tetranuclear **(1)** na região de 500 nm são aproximadamente o dobro dos encontrados para o complexo **(2)**, sendo assim condizentes com o número de cromóforos presentes. O mesmo tipo de comparação pode ser feito em relação ao complexo descrito na literatura $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{BPBPMP}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$.⁵⁸ Lanznaster, em sua tese de doutorado⁵⁸, encontrou uma correlação entre o comprimento da ligação Fe–O de fenolato terminal presente em complexos binucleares $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ com o ligante H_2BPBPMP e o seu ϵ .⁵⁸ Na comparação destes compostos com o complexo **(1)**, apresentada na Tabela 8, observa-se que apesar do ligante utilizado ser outro, o valor de absorvidade molar encontrado é concordante com a correlação proposta, mostrando que, quanto maior for o comprimento da ligação Fe–O de fenolato terminal, menor é o ϵ da banda TCLM $p\pi \rightarrow d\pi^*$. Extrapolando esta afirmação para os complexos **(2)** e **(3)**, pode se dizer que seus coeficientes de absorvidade molar têm valor concordante com os compostos semelhantes descritos.⁵⁸

Tabela 8. Coeficientes de absorção molar (ϵ) e distâncias de ligação Fe-O (fenolato terminal) para os espectros obtidos em acetonitrila

COMPLEXOS	ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)	Fe-O (\AA)
	Acetonitrila	
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{BPBPMP}(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ ^{57,58}	3800	1,890
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{BPBPMP}(\text{OAc})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_2$ ⁵⁸	3500	1,915
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{BPBPMP}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ ⁵⁸	2800	1,923
Complexo (1)	2800 *	1,922

* $\epsilon / 2$ devido ao número de cromóforos por mol de composto

Os espectros eletrônicos no estado sólido dos complexos **2** e **3**, mostrados na Figura 20, não diferem significativamente dos espectros em acetonitrila, propondo-se assim que as espécies obtidas sejam semelhantes, ocorrendo apenas a substituição dos ligantes lábeis por solvente.

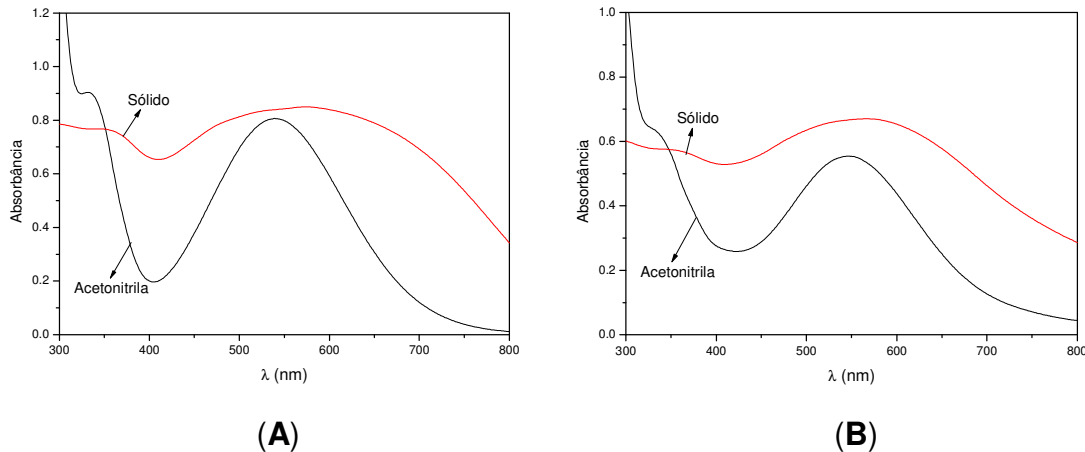
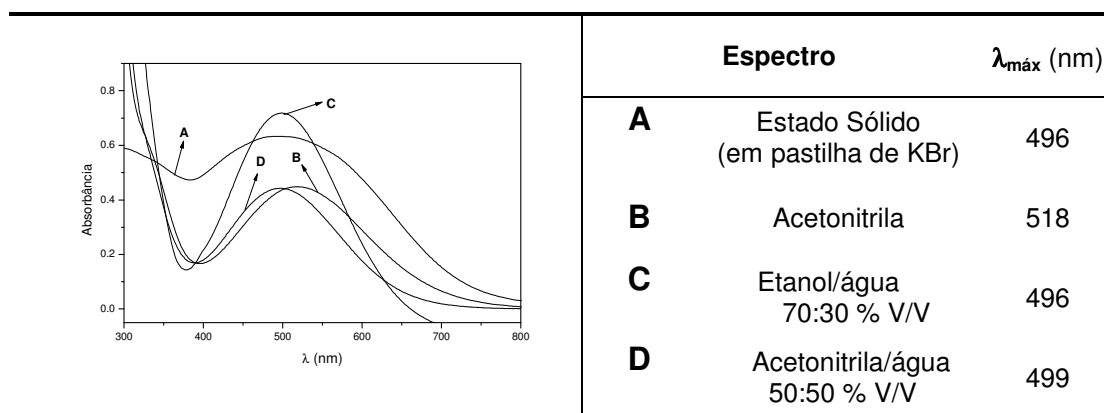


Figura 20. Espectros eletrônicos em solução de acetonitrila e da amostra sólida (suportada em pastilha de KBr) para os complexos: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}(\mu\text{-OAc})_2](\text{ClO}_4)_2$ (**2**) = (A); $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}(\mu\text{-OAc})_2](\text{ClO}_4)_2$ (**3**) = (B).

Na Tabela 9 estão apresentados os espectros eletrônicos do complexo (**1**) no estado sólido, em acetonitrila, nas condições em que foram realizados os experimentos potenciométricos (etanol/água 70:30 % V/V) e nas condições

utilizadas para estudos cinéticos (acetonitrila/água 50:50). Pode-se dizer que em todos os espectros mantém-se a espécie tetranuclear. As pequenas diferenças no máximo de absorção podem ser atribuídas às mudanças do meio e, conseqüentemente, na segunda esfera de coordenação, que afetam a TCLM.

Tabela 9. Espectros eletrônicos do complexo $[\text{Fe}_2\text{Zn}_2\text{L}_2(\mu\text{-OH})_2(\text{ClO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2[\text{ClO}_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O} \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ (**1**) em várias condições



Tentando esclarecer os resultados obtidos na titulação potenciométrica do complexo (**1**), foram medidos espectros em vários pH(s), nas condições potenciométricas e nas condições cinéticas. Estes estão mostrados na Figura 21. Quando se compara os espectros no pH 6,4 com os medidos em pH 2,0, é observado um deslocamento batocrômico de aproximadamente 35 nm. Isto pode ser atribuído a protonação das pontes hidróxido, que aumentaria a acidez de Lewis do Fe^{III} , facilitando a transferência de carga. No mesmo sentido, verifica-se deslocamento hipsocrômico nos espectros em pH(s) mais altos, onde a desprotonação de ligantes coordenados ao Fe^{III} pode estar diminuindo a acidez de Lewis do mesmo. Sendo assim, ocorrem mudanças espectrais em toda a faixa de pH(s), ficando extremamente dificultada qualquer tipo de afirmação quanto às espécies formadas em solução.

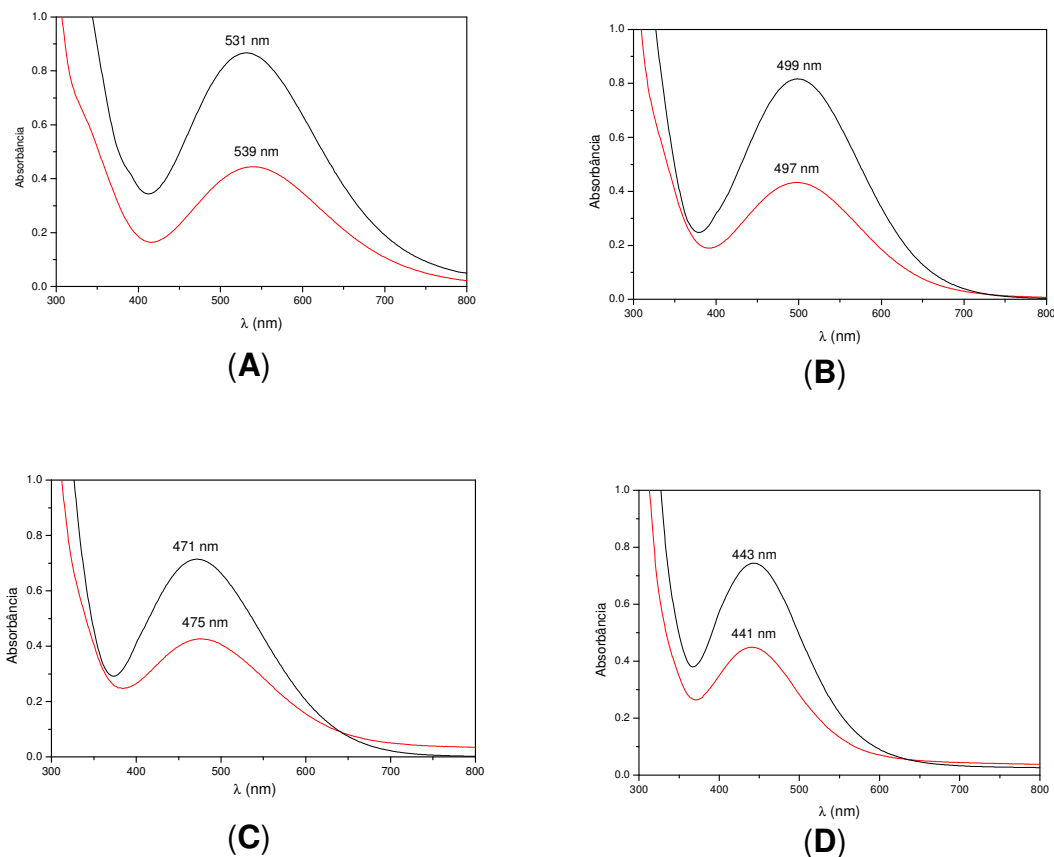


Figura 21. Espectros eletrônicos do complexo **(1)**, em etanol/água 70:30 % V/V (superior) e acetonitrila/água 50:50 (inferior) em vários pH(s): pH = 2,0 **(A)**; pH = 6,4 **(B)**; pH = 8,0 **(C)**; pH = 10,0 **(D)**

4.2.6. Eletroquímica

O comportamento redox dos complexos foi avaliado através de voltametria cíclica em acetonitrila, para os complexos com pontes acetato – complexos **(2)** e **(3)**, e em etanol/água 70:30 % V/V para o complexo tetranuclear $[\text{Fe}_2\text{Zn}_2\text{L}_2(\mu\text{-OH})_2(\text{ClO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2] [\text{ClO}_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ **(1)** (Figuras 22 e 23 respectivamente). Os voltamogramas desses complexos são apresentados na Figura 22, e os potenciais redox estão resumidos na Tabela 10. Todos os potenciais redox foram referenciados ao eletrodo normal de hidrogênio (NHE)

através dos padrões internos ferroceno ($E_{1/2} = 0,400$ V vs NHE) e $K_3[Fe(CN)_6]$ ($E_{1/2} = 0,358$ V vs NHE) para permitir a comparação entre os potenciais determinados.

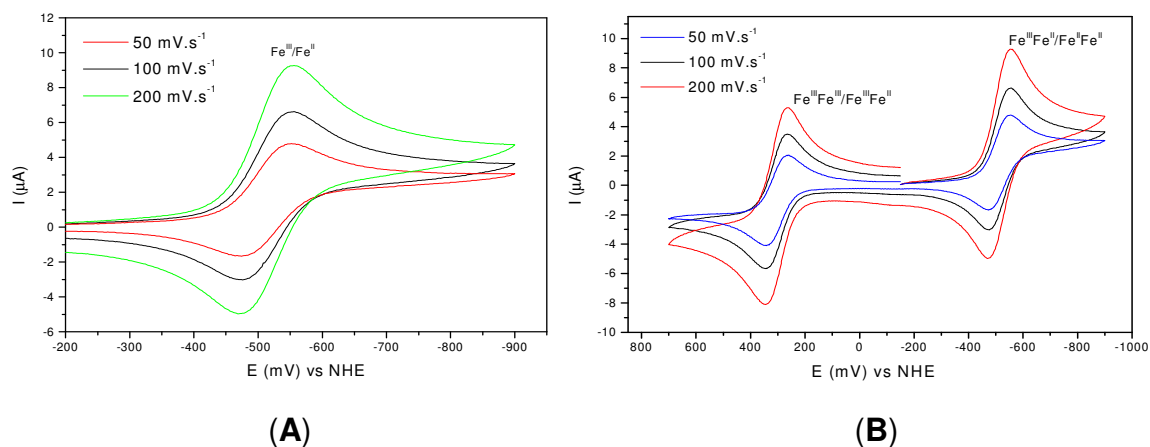


Figura 22. Voltamogramas cíclicos (50, 100 e 200 $mV.s^{-1}$) em acetonitrila dos complexos **(2)** **(A)** e **(3)** **(B)**. Eletrólito: 0,1 mol.L⁻¹ de TBAPF₆; eletrodo trabalho: platina; referência: Ag/Ag⁺; contra-eletrodo: fio de platina; padrão interno: ferroceno.

O voltamograma cíclico de **(3)** revelou dois processos *quasi*-reversíveis com $E_{1/2} = 0,31$ V e -0,52 V vs NHE, atribuídos respectivamente aos pares redox $Fe^{III}_2/Fe^{III}Fe^{II}$ e $Fe^{III}Fe^{II}/Fe^{II}_2$. O valor encontrado para a redução do Fe^{III} presente no complexo **(2)** é igual ao encontrado no complexo **(3)**, demonstrando que este sítio deve ter a mesma geometria nos dois complexos. Estes voltamogramas podem ser vistos na Figura 22. Da mesma forma, como os potenciais encontrados são semelhantes aos relatados para os complexos contendo piridina como grupo mimético da asparagina - $[Fe^{III}Fe^{II}BPBPMP(OAc)_2]ClO_4$.^{39,40a} e $[Fe^{III}Zn^{II}BPBPMP(OAc)_2]ClO_4$, as geometrias e os ambientes de coordenação são semelhantes.^{57,58}

Tabela 10. Potenciais redox determinados através de voltametria cíclica para os processos $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ em etanol/água 70:30 % V/V para o complexo (1) e em acetonitrila, para os complexos (2) e (3) e seu similares sintetizados com o ligante H_2BPBPMP .^{39,40a,57,58}

COMPLEXOS	$E_{1/2}$ (V) versus NHE
$[\text{Fe}_2\text{Zn}_2\text{L}_2(\mu\text{-OH})_2(\text{ClO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	-0,61 / -0,41
$[\text{ClO}_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ (1)	(valores aproximados)
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}1(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ (2)	-0,52
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}\text{L}1(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ (3)	-0,52 / 0,31
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{BPBPMP}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ ^{57,58}	-0,51
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}\text{BPBPMP}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ ^{39,40a}	-0,49 / -0,38

Esses resultados mostram que os complexos com o ligante contendo o grupo amida modelam as propriedades redox das PAP(s) tão bem quanto os complexos contendo piridina, podendo esses serem úteis na modelagem de outras propriedades, já que o grupo amida, é o encontrado no sítio ativo da enzima (resíduo do aminoácido asparagina).^{17,39,40a,57,58}

O complexo (1) quando analisado em acetonitrila apresenta apenas sinais de intensidade muito baixa, não podendo ser definidos os processos redox. Entretanto, quando analisado no sistema etanol/água (Figura 23) o complexo apresenta dois processos *quasi* - reversíveis, porém de difícil atribuição, devido à sua proximidade. Isto vai ao encontro do observado no gráfico de distribuição de espécies de complexo, que mostra que, apesar das várias espécies encontradas, há praticamente uma única espécie na região do pH de dissolução do complexo neste meio (pH \approx 6,5). Não há uma separação nítida entre os processos, o que demonstra que a redução de um dos centros de Fe^{III} pouco afeta a densidade eletrônica do outro. Isto concorda com as análises magnéticas (Seção 4.2.7), que encontraram um baixo acoplamento antiferromagnético entre os átomos de ferro.

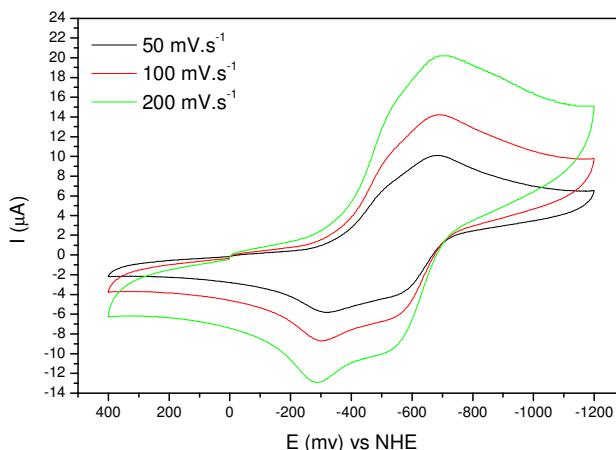


Figura 23. Voltamogramas cíclicos (50 , 100 e 200 mV.s^{-1}) do complexo (1) em EtOH/H₂O 70:30 % V/V. Eletrólito: $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaClO₄; eletrodo trabalho: carbono vítreo; referência: Ag/Ag⁺; contra-eleto: fio de platina; padrão interno: hexacianoferrato de potássio.

4.2.7. Medidas Magnéticas

Os gráficos de suscetibilidade magnética molar (χ_{mol}) e momento magnético ($\mu_{\text{eff}}/\mu_{\text{B}}$) *versus* temperatura (T) podem ser encontrados na Figura 24. A curva de $\mu_{\text{eff}}/\mu_{\text{B}}$ mostra, à temperatura ambiente ($295,8\text{K}$), um valor de $7,48\mu_{\text{B}}$, o que indica Fe^{III} alto spin, como visto na espectroscopia Mössbauer (Seção 4.2.3). Este valor cai para $1,50 \mu_{\text{B}}$ à $4,3\text{K}$, o que é esperado para acoplamento antiferromagnético. Nota-se, também, no gráfico inserido, que, a temperatura ambiente, há evidência de comunicação magnética entre os centros metálicos pela diminuição da suscetibilidade magnética molar. Esta diminuição é bem descrita pela equação derivada de Heisenberg, Dirac, Van Vleck.⁷¹ Existe um ponto máximo nesse gráfico (ponto de Neel), que caracteriza acoplamento antiferromagnético.^{39,71} O baixo valor encontrado para o acoplamento antiferromagnético ($J = -7,67 \text{ cm}^{-1}$) é próximo aos valores encontrados para complexos do tipo Fe^{III}(μ -OH)₂Fe^{III} descritos ($-5,5$ à $-11,7\text{cm}^{-1}$), e está de acordo com os resultados obtidos nos estudos

eletroquímicos, que apresentam dois processos muito próximos, mostrando-se praticamente independentes.^{66,67} O valor é comparável também às formas oxidadas da metano monooxigenase ($J = -7\text{cm}^{-1}$) e de fosfatases (-6 à -15cm^{-1}).^{20,72}

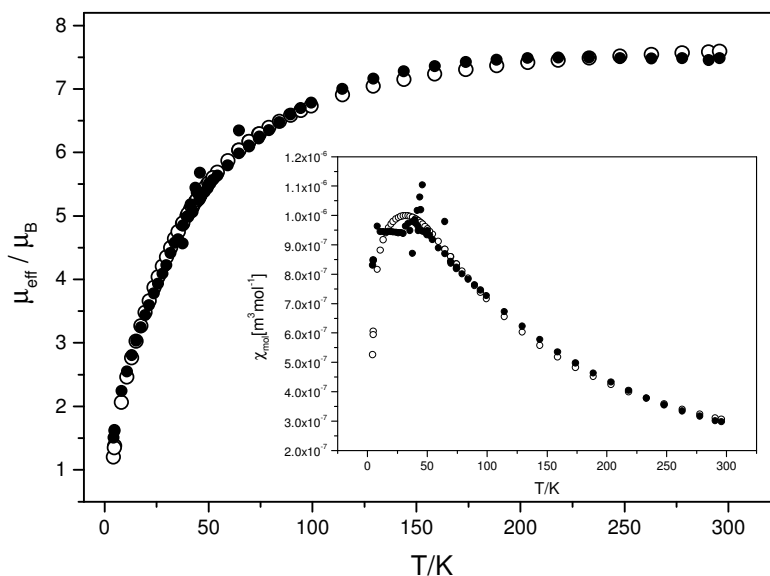


Figura 24. Gráficos de momento magnético ($\mu_{\text{eff}}/\mu_{\text{B}}$) e de suscetibilidade magnética molar - χ_{mol} - (inserido) *versus* temperatura para o complexo (1). (○ calculado; ● experimental)

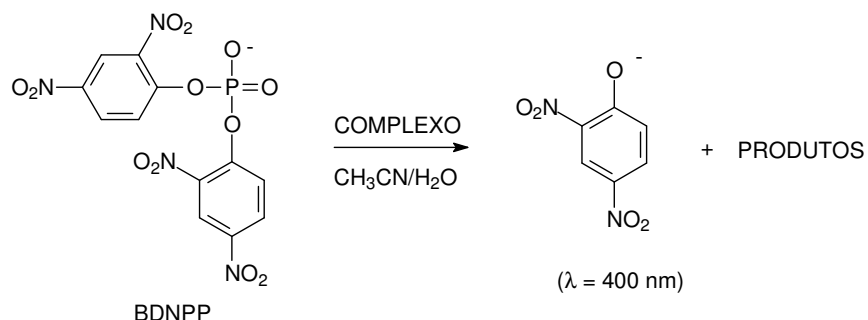
Além disso o valor experimental têm boa concordância com o calculado pela relação empírica de Gorum e Lippard⁷³ ($J = -10,5\text{cm}^{-1}$), na qual:

$$-J = A e^{(BP)}$$

Onde A e B são constantes ($A = 8,763 \cdot 10^{11}$; $B = -12,663$) e P é um parâmetro estrutural definido como a metade do menor caminho que os elétrons devem percorrer entre os átomos de Fe^{III} (em ângstrons).⁷³

4.2.8. Reatividade

O complexo (1) teve sua atividade catalítica avaliada na hidrólise de ésteres de fosfato através da reação com o substrato modelo bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4 - BDNPP), sob condições de excesso de substrato ($0,5 \cdot 10^{-3}$ a $7,0 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ – 12,5 a 175 vezes de excesso em relação a concentração do complexo) a 25 °C, conforme ilustrado no Esquema 8. Para obtenção dos dados cinéticos utilizou-se o método das velocidades iniciais. As reações foram monitoradas espectrofotometricamente durante 3 a 5 % do tempo necessário para a conversão total do substrato a produto, através do incremento da absorvância em 400 nm devido à liberação de 2,4-dinitrofenolato como produto.



Esquema 8. Esquema ilustrativo para a reação de hidrólise do substrato 2,4 - BDNPP.

A concentração de 2,4-dinitrofenolato produzido foi averiguada a partir de acompanhamento espectrofotométrico, com base nos valores de absorvância obtidos e do coeficiente de extinção molar $\epsilon = 12100$ mol⁻¹.L.cm⁻¹, determinado para as condições nas quais foram realizados os experimentos.⁷⁴ A contribuição devido à hidrólise não catalisada do substrato foi eliminada através da diferença direta da reação sob condições idênticas na ausência do catalisador (complexo).

Primeiramente avaliou-se o efeito do pH sobre a atividade catalítica do complexo (1) na reação de hidrólise do substrato modelo, buscando correlacionar a variação do pH com a velocidade da reação. O gráfico de velocidade inicial (V_0) versus pH forneceu uma curva onde a velocidade da reação é praticamente nula em pH < 3,5, aumenta gradativamente, atingindo valor máximo em pH próximo da

neutralidade e possui grande variação de comportamento em pH(s) alcalinos, como mostra a Figura 25. A grande quantidade de espécies que podem ser geradas nestes pH(s), sendo todas, em maior ou menor grau, catalíticas frente ao substrato estudado, torna extremamente complicado o estudo desta reação em meio alcalino. Assim sendo, tomou-se como “pH ótimo” o valor de 6,5, e neste foram realizados os estudos de variação do excesso de substrato, a fim de determinar os parâmetros cinéticos para a reação.

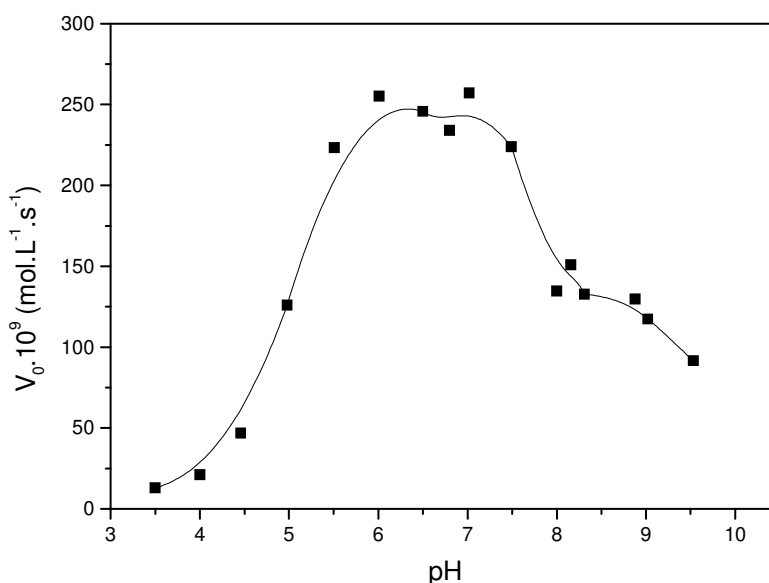


Figura 25. Gráfico de V_0 em função do pH para a reação de hidrólise do 2,4 - BDNPP catalisada pelo complexo (1), a 25°C, sob as seguintes condições: solução CH₃CN/H₂O, 1:1; [complexo] = $4,0 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹; [2,4 - BDNPP] = $5,0 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹; [tampões] = 0,05 mol.L⁻¹ (MES, HEPES, CHES); I = 0,05 mol.L⁻¹ (LiClO₄).

A condição de pH escolhida se mostra a mais adequada também para a interpretação dos dados, já que foi visto nos estudos potenciométricos uma significativa predominância da espécie **E**. Propõe-se nessas condições uma espécie tetranuclear muito semelhante à estrutura cristalina resolvida, na qual se espera apenas a troca dos ligantes lábeis por solvente.

Os gráficos mostrados na Figura 26 ilustram os estudos cinéticos em função do excesso de substrato e os valores referentes aos parâmetros cinéticos estão

sumarizados na Tabela 11. Os parâmetros cinéticos obtidos no presente trabalho estão na mesma ordem de grandeza dos parâmetros encontrados para outros complexos modelos desenvolvidos pelo grupo.⁵⁸

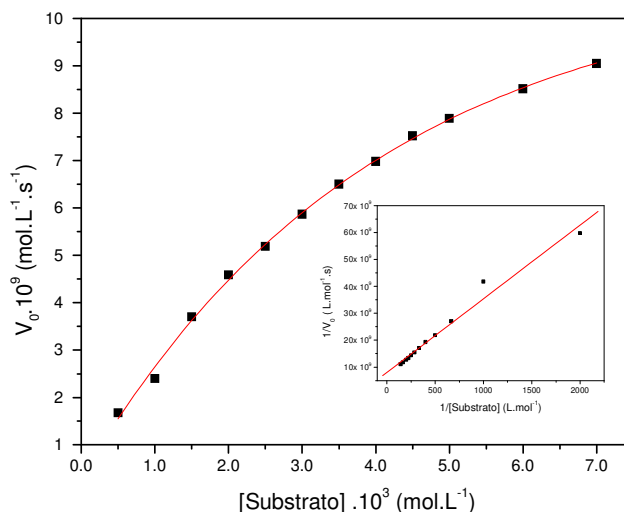
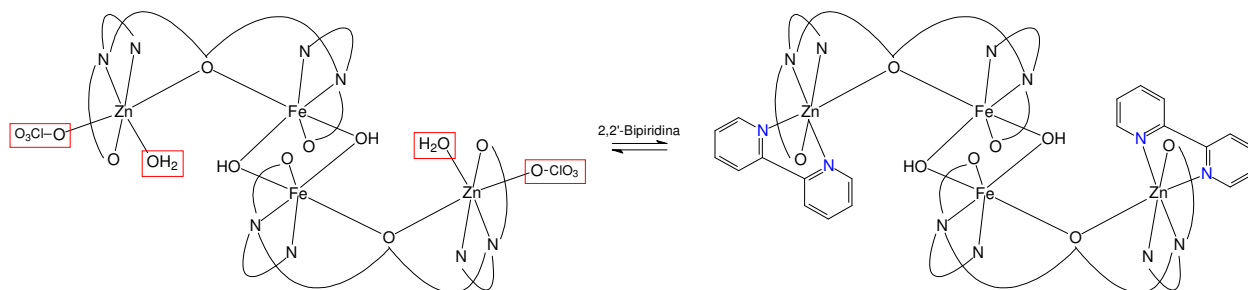


Figura 26. Curva de saturação e gráfico de Lineweaver-Burk (inserido) para a reação de hidrólise do 2,4 - BDNPP catalisada pelo complexo (1) a 25°C sob as seguintes condições: solução CH₃CN/H₂O 1:1; [complexo] = 2,0.10⁻⁵ mol.L⁻¹; [2,4 - BDNPP] = 3,0 a 19,0.10⁻⁴ mol.L⁻¹; [tampão] = 0,05 mol.L⁻¹ (MES e HEPES); I = 0,05 mol.L⁻¹ (LiClO₄).

Tabela 11. Parâmetros cinéticos obtidos nas reações de hidrólise do 2,4 - BDNPP a 25°C, catalisadas pelo complexo (1) e por complexos FeZn com o ligante H₂BPBPMP^{57,58}

Complexos	$V_{\text{máx}}$ (mol.L ⁻¹ .s ⁻¹)	K_m (mol.L ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	$E (k_{\text{cat}} / K_m)$ (mol ⁻¹ .L.s ⁻¹)	K_{ass} (mol ⁻¹ .L)	f ($k_{\text{cat}}/k_{\text{nc}}$)
Complexo (1)	1,2 . 10 ⁻⁸	3,4 . 10 ⁻³	6,2 . 10 ⁻⁴	18,0 . 10 ⁻²	293	3,5 . 10 ³
[Fe ^{III} Zn ^{II} BPBPMP(μ-OAc) ₂] ⁺ ^{57,58}	2,9.10 ⁻⁸	8,1.10 ⁻³	7,3.10 ⁻⁴	9,0.10 ⁻²	120	4,1.10 ³
[Fe ^{III} Zn ^{II} BPBPMP(μ-OAc)(H ₂ O) ₂] ²⁺ ⁵⁸	4,7.10 ⁻⁸	9,8.10 ⁻³	11,8.10 ⁻⁴	12,0.10 ⁻²	102	6,6.10 ³
[Fe ^{III} Zn ^{II} BPBPMP (μ-OH)(H ₂ O)] ²⁺ ⁵⁸	6,5.10 ⁻⁸	16,0.10 ⁻³	16,3.10 ⁻⁴	10,2.10 ⁻²	63	9,1.10 ³

Procurando obter mais informações sobre o mecanismo pelo qual o complexo (1) atua na hidrólise do substrato, foram realizados testes cinéticos na presença de um suposto inibidor. Foi escolhida a 2,2'-Bipiridina, imaginando bloquear o acesso aos átomos de zinco, como mostrado no Esquema 9. O gráfico de velocidades iniciais *versus* concentração de 2,2'-Bipiridina é mostrado na Figura 27.



Esquema 9. Provável inibição do complexo (1) por 2,2'-Bipiridina

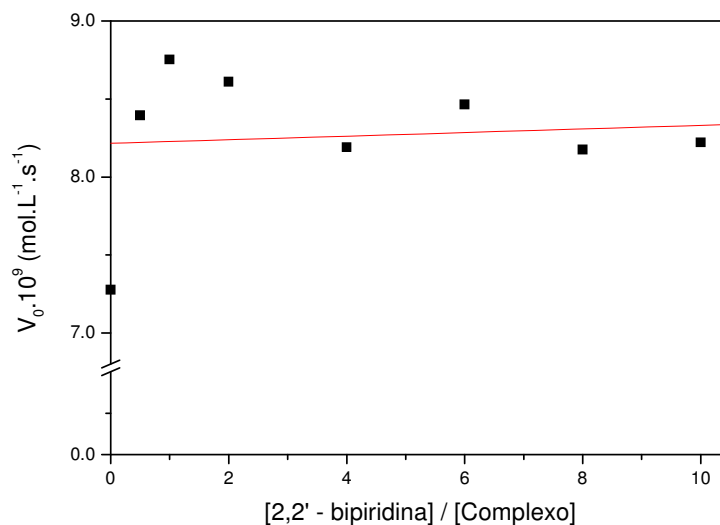


Figura 27. Gráfico de V_0 em função da concentração de 2,2'-Bipiridina para a reação de hidrólise do 2,4 - BDNPP catalisada pelo complexo (1), a 25°C, sob as seguintes condições: solução CH₃CN/H₂O 1:1; [complexo] = $4,0 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹; [2,4 - BDNPP] = $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹; [2,2'-Bipiridina] = $2,0 \cdot 10^{-5}$ a $40,0 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹; [tampão] = 0,05 mol.L⁻¹ (MES); I = 0,05 mol.L⁻¹ (LiClO₄).

As velocidades iniciais alcançadas na presença e na ausência de bipyridina foram praticamente iguais, não havendo assim inibição. Isto sugere que a reação ocorre exclusivamente nos átomos de ferro, com a saída de uma das pontes hidróxido. Para comprovar esta hipótese outros experimentos, como o estudo com outros ligantes potencialmente inibidores e reatividade de complexos binucleares $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})_2\text{Fe}^{\text{III}}$, são necessários.

5 – CONCLUSÕES

- ❑ Foram sintetizados três novos complexos que apresentam propriedades relevantes, quando comparados aos sítios ativos das PAP's.
- ❑ Os complexos $M^{III}M^{II}L(\mu-OAc)_2$ (**2**) e (**3**) foram caracterizados, mostrando propriedades espectroscópicas semelhantes aos complexos similares sintetizados com o ligante $H_2BPBPMP$. Isto mostra que o ligante utilizado é promissor, já que mantém propriedades alcançadas com um dos melhores sistemas de modelagem para PAP's já descritos.
- ❑ Já o complexo (**1**), obtido na tentativa de sintetizar o composto $Fe^{III}Zn^{II}L(\mu-OH)$, devido a sua estrutura não usual, faz crer que, apesar das propriedades dos complexos com pontes acetato, o ligante utilizado pode oferecer oportunidades de estudos completamente diferentes e novas, através da estabilização de espécies tetranucleares como a descrita neste trabalho.
- ❑ Os estudos de reatividade do complexo (**1**) podem ser de grande ajuda para o esclarecimento do mecanismo pelo qual enzimas contendo o motivo estrutural $M1(\mu-OH)M2$ atuam. O fato do suposto impedimento dos centros de Zn^{II} não afetar a sua reatividade implica em imaginar que a reação ocorra nesse "sítio" do cátion complexo. Sendo assim, o esclarecimento de como esta reação caminha pode informar muito sobre a reatividade destas enzimas.

6 – PERSPECTIVAS E CONTINUIDADE

O substrato 2,4 - BDNPP foi escolhido pela sua disponibilidade e facilidade no acompanhamento cinético da reação, dentre outros fatores. Entretanto, não foram realizados estudos de hidrólise desse substrato pela enzima, o que não permite assim uma comparação com a atividade catalítica dos complexos. Portanto, existe a necessidade de se estudar a cinética de hidrólise de outros substratos (Figura 28), como o *p*-nitrofenilfosfato, amplamente utilizado nos estudos enzimáticos e o triéster dietil – 2,4 - dinitrofenilfosfato. Estudos cinéticos com este triéster podem ser de grande valia no esclarecimento do mecanismo de reação, já que este não pode coordenar-se como ponte ao complexo.

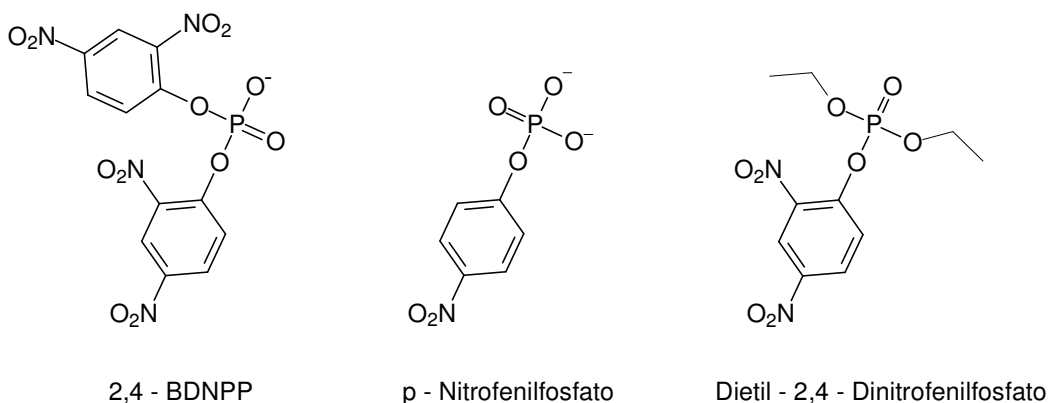


Figura 28. Substratos propostos para os estudos cinéticos de hidrólise de fosfoésteres.

A caracterização das espécies formadas em solução para o complexo (1) estará sendo realizada, em colaboração com o prof. Dr Cláudio N. Verani (Wayne State University, Detroit, MI), via LC esi MS/MS. O entendimento dos equilíbrios envolvidos pode ser extremamente útil, não só para a espécie em pH = 6,5, mas principalmente para as espécies em pH básico, que se mostraram também ativas e podem ser modelos funcionais para outras hidrolases, como as fosfatases alcalinas.

Muitos complexos metálicos têm sido usados na clivagem hidrolítica do RNA, porém, poucos clivam o DNA dupla fita. Fotoclivagem e clivagem oxidativa têm sido utilizadas com sucesso, porém a falta dos grupos terminais 3'-OH e 5'-OPO₃ tornam a utilização no campo da biologia molecular e biotecnologia limitada. A clivagem hidrolítica não sofre essas desvantagens, podendo os fragmentos de DNA clivados hidroliticamente serem ligados enzimaticamente. Complexos metálicos eficientes na hidrólise do DNA podem ser usados não só para mimetizar e elucidar o papel de íons metálicos nas catálises promovidas por metaloenzimas, mas, também, na manipulação gênica.⁷⁵ Estudos preliminares mostram que o complexo (1) cliva DNA, nos pH(s) 6,5 e 8,0, comportamento semelhante ao visto frente ao 2,4 - BDNPP. Novamente, conhecer quais as espécies das quais se está tratando torna-se essencial.

A determinação dos produtos formados durante a hidrólise também pode fornecer valiosas informações a respeito do mecanismo envolvido nessas reações. Os produtos serão caracterizados através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em colunas de fase reversa (C18), onde alíquotas de uma reação serão injetadas em intervalos de tempo determinados. A observação da proporção do 2,4-dinitrofenol e do 2,4-dinitrofenolato, por exemplo, deve indicar se existe a hidrólise de um ou dois fenolatos nessas reações. O uso do triéster ou do *p*-nitrofenilfosfato como substrato eliminam a possibilidade de reações em paralelo.

Os produtos também poderão ser caracterizados por ressonância magnética nuclear de ³¹P. O acompanhamento das cinéticas de hidrólise poderia indicar a formação de intermediários de reação e também se existe a formação de um produto onde o fosfato estaria diretamente coordenado ao complexo.

Todas as análises realizadas e propostas para o complexo (1) devem ser realizadas para os complexos (2) e (3).

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KAIM, Wolfgang; SCHWEDERSKI, Brigitte. Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in The Chemistry of Life – An Introduction and Guide. New York: John Wiley & Sons. p. 1-5, 1994.
2. BACON, Allyn. Química Bioinorganica – una introducion. Barcelona: Editorial Reverté S.A., 1985.
3. REEDIJK, J. Introduction to bioinorganic chemistry. In REEDIJK, J. Bioinorganic Catalysis, New York: Marcel Dekker, Inc., 1993. p. 1-11.
4. WILKINS, P. C., WILKINS, R. G., Inorganic chemistry in biology, New York, Oxford Chemistry Primers, 1997.
5. LIPPARD, S. J. and BERG, J. M. Principles of bioinorganic chemistry. Mill Valley: University Science Books. 1994. p. 1-20.
6. STRYER L. Bioquímica. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 4ª edição. 1996. p. 171-194.
7. NELSON, D. L. and COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry, New York: Worth Publishers, 3th ed. 2000. p. 243-272.
8. HOLM, R. H., KENNEPOHL, P. and SOLOMON, E. I. Structural and functional aspects of metal sites in biology. Chemical Reviews, v. 96, p. 2239 - 2314, 1996.
9. VOET, D. and VOET, J. G. Biochemistry. Somerset: John Wiley & Sons. Inc. 1995. p. 332-344.
10. STRÄTER, N., LIPSCOMB, W. N., KLABUNDE, T. *et al.* Two-metal ion catalysis in enzymatic acyl- and phosphoryl-transfer reactions. Angewandte Chemie International Edition in English, v. 35, p. 2024 – 2055, 1996.
11. THAN, R., FELDMANN, A. A. and KREBS, B. Structural and functional studies on model compounds of purple acid phosphatases and catechol oxidases. Coordination Chemistry Reviews, v. 182, p. 211-241, 1999.
12. SCHENK, G., GE, Y., CARRINGTON, L. E. *et al.* Binuclear metal centers in plant purple acid phosphatases: Fe-Mn in sweet potato and Fe-Zn in soybean. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 370, n. 2, p. 183-189, 1999.
13. KLABUNDE, T. and KREBS, B. The dimetal center in purple acid phosphatases. Structure and Bonding, v. 89, p. 177-198, 1997.

14. DOI, K., ANTANAITIS, B. C. and AISEN, P. The binuclear iron centers of uteroferrin and the purple acid phosphatases. Structure and Bonding, v. 70, p. 1-26, 1988.
15. GANI, D. and WILKIE, J. Metal ions in the mechanism of enzyme-catalyzed phosphate monoester hydrolyses. Structure and Bonding, v. 89, p. 133-175, 1997.
16. ANTANAITIS, B. C., STREKAS, T. and AISEN P. J. Journal of Biological Chemistry, v. 257, p. 3766-3770, 1982.
17. WANG, D. L., HOLZ, R. C., DAVID, S. S. *et al.* Electrochemical properties of the diiron core of uteroferrin and its anion complexes. Biochemistry, v. 30, p. 8187-8194, 1991.
18. AVERILL, B. A., DAVIS, J. C., BURMAN, S. *et al.* G. Spectroscopic and magnetic studies of the purple acid phosphatases from bovine spleen. Journal American Chemical Society, v. 109, p. 3760-3767, 1987.
19. CROWDER, M. W., VINCENT, J. B. and AVERILL, B. A. Electron paramagnetic resonance studies on the high-salt form of bovine spleen purple acid phosphatases. Biochemistry, v. 31, p. 9603-9608, 1992.
20. GEHRING, S., FLEISCHHAUER, P., BEHLENDORF, M. *et al.* Magnetic susceptibility studies on the diiron forms of the metalloprotein purple acid phosphatase from bovine spleen and kidney bean. Inorganica Chimica Acta, v. 252, p. 13-17, 1996.
21. (a) DEBRUNNER, P. G., HENDRICH, M. P., JERSEY, J. *et al.* Mössbauer and EPR study of the binuclear iron centre in purple acid phosphatase. Biochimica et Biophysica Acta, v. 745, p. 103-106, 1983. (b) RODRIGUEZ, J. H., OK, H. N., XIA, Y.-M. *et al.* Mössbauer spectroscopy of the spin-coupled Fe^{3+} - Fe^{2+} center of reduced uteroferrin. Journal of Physical Chemistry, v. 100, p. 6849-6862, 1996.
22. (a) LAUFFER, R. B., ANTANAITIS, B. C., AISEN, P. *et al.* ^1H NMR studies of porcine uteroferrin. Magnetic interactions and active site structure. The Journal of Biological Chemistry, v. 258, n. 23, p. 14212-14218, 1983. (b) SCARROW, R. C., PYRZ, J. W. and QUE, Jr. L. NMR studies of the dinuclear iron site in reduced uteroferrin and its oxoanion complexes. Journal of the American Chemical Society, v. 112, p.657-665, 1990.
23. (a) TRUE, A. E., SCARROW, R. C., RANDALL, C. R. *et al.* EXAFS studies of uteroferrin and its anion complexes. Journal of the American Chemical Society, v. 115, p.4246-4255, 1993. (b) PRIGGEMEYER, S., BORKENSTEIN, P. E., AHLERS, F. *et al.* XAS investigations on the iron-

- zinc center of purple acid phosphatase from red kidney beans. Inorganic Chemistry, v. 34, p. 1445-1454, 1995.
24. (a) AQUINO, M. A. S., LIM, J. -S. and SYKES, G. Mechanism of the reaction of phosphate with purple acid phosphatase. Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, p. 2135-2136, 1992. (b) MUELLER, E. G., CROWDER, M. W., AVERILL, B. A. *et al.* Purple acid phosphatase: a diiron enzyme that catalyzes a direct phospho group transfer to water. Journal of the American Chemical Society, v. 115, p. 2974-2975, 1993. (c) AQUINO, M. A. S., LIM, J. -S. and SYKES, G. Mechanism of the reaction of different phosphatases with iron(II)iron(III) form of purple acid phosphatase from porcine uteri (Uteroferrin). Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, p. 429-436, 1994. (d) AQUINO, M. A. S. and SYKES G. Redox reactivity of the binuclear iron active site of porcine purple acid phosphatase (Uteroferrin). Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, p. 683-687, 1994.
 25. DAVIS, J. C., AVERILL, B. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 32, p. 1445-1454, 1982.
 26. (a) SMOUKOV, S. K.; QUARONI, L.; WANG, X; DOAN, P. E.; HOFFMAN, B. M.; QUE Jr., L. Electron - Nuclear Double Resonance Spectroscopic Evidence for a Hydroxo-Bridge Nucleophile Involved in Catalysis by a Dinuclear Hydrolase. Journal of the American Chemical Society, v. 124, n. 11, p. 2595 - 2603, 2002. (b) WANG, X.; RAYMOND, Y. N. H.; WHITING, A. K.; QUE Jr., L. Spectroscopic Characterization of a Ternary Phosphate-Substrate-Fluoride Complex. Mechanistic Implications for Dinuclear Hydrolases. Journal of the American Chemical Society, v. 121, p. 9235 - 9236, 1999.
 27. (a) NORDLANDER, E. and WHALEN, A. M. Iron 1992. Coordination Chemistry Reviews, v. 142, p. 43-99, 1995. (b) NORDLANDER, E., WHALEN, A. M. and PRESTOPINO, F. Iron 1993. Coordination Chemistry Reviews, v. 146, p. 225-306, 1995. (c) NORDLANDER, E., NAIRN, J. G. M., THAPPER, A. *et al.* Iron 1994. Coordination Chemistry Reviews, v. 162, p. 345-415, 1997. (d) NORDLANDER, E., THAPPER, A., KING, J. *et al.* Iron 1995. Coordination Chemistry Reviews, v. 172, p. 3-97, 1998.
 28. BRITO, M. A. Models for the active site structure of purple acid phosphatases. Southern Brazilian Journal of Chemistry, v. 4, n. 4, p.19-26, 1996.
 29. (a) KLABUNDE, T., STRÄTER, N., FRÖHLICH, R. *et al.* Mechanism of Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase based on crystal structures. Journal of Molecular Biology, v. 259, p. 737-748, 1996. (b) STRÄTER, N., KLABUNDE, T., TUCKER, P. *et al.* Crystal-structure of a purple acid-

- phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active-site. Science, v. 268, p. 1489 – 1492, 1995.
30. VINCENT, J. B.; OLIVER-LILLEY, G. L., AVERILL, B. A. Proteins containing oxo-bridge dinuclear iron centers: a bioinorganic perspective. Chemical Reviews, v. 90, n. 8, p. 1447-1467, 1990.
 31. UPPENBERG, J., LINDQVIST, F., SVENSSON, C. *et al.* Crystal structure of a mammalian purple acid phosphatase. Journal of Molecular Biology, v. 290, p. 201-211, 1999.
 32. LINDQVIST, Y., JOHANSSON, E., KAIJA, H. *et al.* Three-dimensional structure of a mammalian purple acid phosphatase at 2.2 Å resolution with a μ -(hydroxo) bridged di-iron center. Journal of Molecular Biology, v. 291, p. 135-147, 1999.
 33. GUDDAT, L. W., McALPINE, A. S., HUME, D. *et al.* Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase. Structure, v. 7, n. 7, p. 757-767, 1999.
 34. KLABUNDE, T., STRÄTER, N., KREBS, B. *et al.* Structural relationship between the mammalian Fe(III)-Fe(II) and the Fe(III)-Zn(II) plant purple acid phosphatases. FEBS Letters, v. 367, p. 56-60, 1995.
 35. (a) BECK, J. L.; KEOUGH, D. T.; DE JERSEY, J.; ZERNER, B. Enzymatically Active Zinc, Copper and Mercury Derivatives of the One-Iron Form of Pig Allantoic Fluid Acid Phosphatase. Biochimica et Biophysica Acta, v. 791, p. 357-363, 1984. (b) BECK, J. L.; McARTHUR, M. J.; DE JERSEY, J.; ZERNER, B. Derivatives of the Purple Phosphatase from Red Kidney Bean: Replacement of Zinc with other Divalent Metal Ions. Inorganica Chimica Acta, v. 153, p. 39-44, 1988.
 36. MERKX, M.; AVERILL, B. A. Ga^{3+} as a functional substitute for Fe^{3+} : preparation and characterization of the $\text{Ga}^{3+}\text{Fe}^{2+}$ and $\text{Ga}^{3+}\text{Zn}^{2+}$ forms of Bovine Spleen Purple Acid Phosphatase. Biochemistry, v. 37, n. 23, p. 8490 – 8497, 1998.
 37. SUZUKI, M.; UEHARA, A.; OSHIO, H.; ENDO, K.; YANAGA, M.; KIDA, S. and SAITO, K. Syntheses and characterization of dinuclear iron(II, II) and iron(II, III) complexes with a dinucleating ligand, 2,6-bis[bis(2-pyridylmethyl)-aminomethyl]-4-methylphenolate(1-). Bulletin of Chemical Society of Japan, v. 60, n. 10, p. 3547-3555, 1987.
 38. BELLE, C.; GAUTIER-LUNEAU, I.; PIERRE, JEAN-LOUIS; SCHEER, C. and SAINTAMAN, E. A phenoxo-bridged diferric complex with two different coordination numbers in two distinct coordination sites. Inorganic Chemistry, v. 35, n.12, p.3706-3708, 1996.

39. BRITO, M. A. Análogos sintéticos para a estrutura do sítio ativo das fosfatases ácidas púrpuras. Florianópolis, 1994. Tese de doutorado em Química – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
40. (a) NEVES, A.; BRITO, M. A.; VENCATO, I.; DRAGO, V.; GRIESAR, K.; HAASE, W. and MASCARENHAS, Y.P. Synthesis, crystal structure and properties of a new binuclear iron (III) complex as a model for the purple acid phosphatase. Inorganica Chimica Acta, v. 214, p. 5-8, 1993. (b) NEVES, A.; ERTHAL, S. M. D.; DRAGO, V.; GRIESAR, K. and HAASE, W. A new N,O-donor binucleating ligand and its first iron(III) complex as a model for the purple acid phosphatase. Inorganica Chimica Acta, v. 197, p. 121-124, 1992. (c) NEVES, A.; ROSSI, L. M.; HORN Jr., A.; VENCATO, I.; BORTOLUZZI, A. J.; ZUCCO, C. and MANGRICH, A. S. Synthesis, structure and properties of the first dinuclear copper (II) complex as a structural model for the phenolic intermediate in tyrosinase-cresolase activity. Inorganic Chemistry Communications, v. 2, p. 334-337, 1999. (d) BRITO, M. A. Models for the active site structure of purple acid phosphatases. Southern Brazilian Journal of Chemistry, v. 4, n. 4, p.19-26, 1996. (e) NEVES, A.; BRITO, M. A.; DRAGO, V.; GRIESAR, K. and HAASE, W. A new asymmetric N₅O₂-donor binucleating ligand and its first Fe^{II}Fe^{III} complex as a model for the redox properties of uteroferrin. Inorganica Chimica Acta, v. 237, p. 131-135 1995. (f) NEVES, A.; ROSSI, L. M.; VENCATO, I.; HAASE, W. and WERNER, R. A new bis(μ-alkoxo) diiron (III) complex and its implications regarding the number of Fe(III)-phenolate bonds and redox potential in Uteroferrin. Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, p. 707-712, 2000.
41. ERTHAL, S. M. D. Síntese e caracterização de compostos de coordenação de ferro e manganês como modelos bioinorgânicos. Florianópolis, 1994. Tese de doutorado em Química – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
42. HORN Jr., A. Síntese e caracterização de novos complexos de ferro com ligantes não simétricos N,O-doadores como modelos para o sítio ativo das fosfatases ácidas púrpuras. Florianópolis, 2000. Tese de doutorado em Química – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
43. LAMBERT, E.; CHABUT, B.; CHARDON-NOBLAT, S.; DERONZIER, A.; CHOTTARD, G.; BOUSSEKSOU, A.; TUCHAGUES, J. P.; LAUGIER, J.; BARDET, M, and LATOUR J. M. Synthesis, structural, magnetic and redox properties of asymmetric diiron complex with a single terminally bound phenolate ligand. Relevance to the purple acid phosphatase enzymes. Journal of American Chemical Society, v. 119, n.40, p. 9424-9437, 1997.

44. BOROVIK, A. S.; PAPAETHYMIU, V.; TAYLOR, L.; ANDERSON, O. P. and QUE, L. Models for iron-oxo proteins. Structure and properties of $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$, $\text{Zn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$, and $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Ga}^{\text{III}}$ complexes with $(\mu\text{-phenoxo})\text{bis}(\mu\text{-carboxylato})\text{dimetal}$ cores. Journal of American Chemical Society, v. 111, n.16, p. 6183 – 6195, 1989.
45. DUTTA, S. K.; WERNER, R.; FLÖRKE, U.; MOHANTA, S.; NANDA, K. K.; HAASE, W. and NAG, K. Model compounds for iron proteins. Structure and magnetic, spectroscopic, and redox properties of $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$ and $[\text{Co}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}]_2\text{O}$ complexes with a $(\mu\text{-carboxylato})\text{bis}(\mu\text{-phenoxo})\text{dimetalate}$ and $(\mu\text{-oxo})\text{diiron(III)}$ cores. Inorganic Chemistry, v. 35, p. 2292-2300, 1996.
46. YAN, S.; QUE Jr., L.; TAYLOR, L. F. and ANDERSON, O. P. A model for the chromophoric site of purple acid phosphatases. Journal of American Chemical Society, v. 110, p. 5222-5224, 1988.
47. HOLMAN, T. R.; WANG, Z.; HENDRICH, M. P. and QUE Jr., L. Structural and spectroscopic properties of antiferromagnetically coupled $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}$ and $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$ complexes. Inorganic Chemistry, v. 34, p. 134-139, 1995.
48. JANG, H. G.; HENDRICH, M. P. and QUE Jr. L. Insight into $g \sim 16$ EPR signals of reduced diiron-oxo proteins. Structure and properties of $[\text{Fe}^{\text{II}}_2\text{BPMP}\{\text{O}_2\text{P}(\text{OC}_6\text{H}_5)_2\}_2]\text{Cl}$. Inorganic Chemistry, v. 32, p. 911-918, 1993.
49. HARTMAN, J. R.; RARDIN, R. L.; CHAUDHURI, P.; POHL, K.; WIEGHARDT, K.; NUBER, B.; WEISS, J.; PAPAETHYMIU, G. C.; FRANKEL, R. B. and LIPPARD, S. J. Synthesis and characterization of $(\mu\text{-hydroxo})\text{bis}(\mu\text{-acetato})\text{diiron(II)}$ and $(\mu\text{-oxo})\text{bis}(\mu\text{-acetate})\text{diiron(III)}$ 1,4,7-trimethyl-1,4,7-triazacyclononane complexes as models for binuclear iron centers in biology; properties of the mixed valence diiron(II,III) species. Journal of American Chemical Society, v. 109, p. 7387-7396, 1987.
50. DRÜEKE, S.; WIEGHARDT, K.; NUBER, B.; WEISS, J.; BOMINAAR, E. L.; SAWARYN, A.; WINKLER, H. and TRAUTWEIN, A. X. A new tetranuclear oxohydroxoiron(III) cluster: crystal structure, magnetic properties, and EXAFS investigation of $[\text{L}_4\text{Fe}_4(\mu\text{-O})_2(\mu\text{-OH})_4]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($\text{L} = 1,4,7\text{-triazacyclononane}$). Inorganic Chemistry, v. 28, p. 4477-4483, 1989.
51. EULERING, B.; AHLERS, F.; ZIPPEL, F.; SCHMIDT, M.; NOLTING, H. F. and KREBS, B. The first diferric model compound for the Uteroferrin-arsenato complex. Journal of American Chemical Society, Chemical Communication, p. 1305-1307, 1995.
52. BERNARD, E.; CHARDON-NOBLAT, S.; DERONZIER, A. and LATOUR, J. M. Carboxylate/diphenylphosphate exchanges in asymmetric diiron

- complexes modeling the purple acid phosphatases enzymes: associated redox processes. Inorganic Chemistry, v. 38, p. 190-193, 1999.
53. (a) POWELL, A. K. Iron. Coordination Chemistry Reviews, v. 134, p. 91-169, 1994. (b) NORDLANDER, E. and WHALEN, A. M. Iron 1992. Coordination Chemistry Reviews, v. 142, p. 43-99, 1995. (c) NORDLANDER, E.; WHALEN, A. M. and PRESTOPINO, F. Iron 1993. Coordination Chemistry Reviews, v. 146, p. 225-306, 1995. (d) NORDLANDER, E.; NAIRN, J. G. M.; THAPPER, A.; LORBER, C. and MLODNICKA, T. Iron 1994. Coordination Chemistry Reviews, v. 162, p. 345-415, 1997. (e) NORDLANDER, E.; THAPPER, A.; KING, J.; LORBER, C.; CARLSSON, H.; PRESTOPINO, F. and FOCCI, N. Iron 1995. Coordination Chemistry Reviews, v. 146, p. 225-306, 1998.
54. SADLER, N. P.; CHUANG, C.; MILBURN, R. M. Iron (III)-promoted hydrolysis of 4-nitrofenil phosphate. Inorganic Chemistry, v. 34, p. 402-404, 1995.
55. DUBOC-TOIA, C.; MÉNAGE, S.; VINCENT, J.; AVERBUCH-POUCHOT, M. T. and FONTECAVE, M. Structure of a (μ -Oxo)dihydroxo)diiron(III) complex and its reactivity towards phosphodiesteres. Inorganic Chemistry, v. 36, p. 6148-6149, 1997.
56. KARSTEN, P.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A.; DRAGO, V.; LANZMASTER, M. Synthesis, Structure, Properties, and Phosphatase-Like Activity of the First Heterodinuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}$ Complex with the Unsymmetry Ligand H_2BPBPMP as a Model for the PAP in Sweet Potato. Inorganic Chemistry, vol. 41, p. 4624-4625, 2002.
57. LANZMASTER, M.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J. *et al.* New $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ complex containing terminal $\text{Fe}-\text{O}_{\text{phenolate}}$ bond as a structural and functional model for the active site of red bean phosphatase. Inorganic Chemistry, v. 41, p. 5641-5643, 2002.
58. LANZMASTER, M.. Desenvolvimento de Novos Modelos Estruturais e Funcionais para as Fosfatases Ácidas Púrpuras. Florianópolis, 2003 Tese de doutorado em Química – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
59. ALBEDYHL, S.; AVERBUCH-POUCHOT, M. T.; BELLE, C.; KREBS, B.; PIERRE, J. L.; SAINT-AMAN, E. and TORELLI, S. Dinuclear zinc(II)-iron(III) and iron(II)-iron(III) complexes as models for Purple Acid Phosphatase. European Journal of Inorganic Chemistry, p. 1457-1464, 2001.
60. (a) SHELDRIK, G. M. SHELXS-97: program for the solution of crystal structures. University of Göttingen, Germany, 1990. (b) SHELDRIK, G. M.

- SHELXL-97: program for the refinement of crystal structures. University of Göttingen, Germany, 1997.
61. ZSOLNAI, L. ZORTEP: an interactive ORTEP program. University of Heidelberg, Germany, 1997.
 62. FARRUGIA, L. J. ORTEP3 for Windows. Journal of Applied Crystallography, v. 30, p. 565, 1997.
 63. SCHWINGEL, E.W.; AREND, K.; ZARLING, J.; NEVES, A. and SZPOGANICZ, B. Protonation equilibrium studies of H₂BBPEN, H₂BBPPN and H₂BBPBN. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 7, p. 31-37, 1996.
 64. MARTELL, A. E. and MOTOKAITIS, R. J. Determination and use of stability constants. VCH, New York, 2nd ed, 1992.
 65. THOER, A.; DENIS, M.; DELMAS, M.; GASET, A. The Reimer-Tiemann reaction in slightly hydrated solid-liquid medium: a new method for the synthesis of formyl and diformyl phenols. Synthetic Communications, v. 18, p. 2095-2101, 1988.
 66. (a) NANDA, K. K.; DUTTA, S. K.; BAITALIK, S.; VENKATSUBRAMANIAN, K.; NAK, K. Hydroxide-bridged diiron(III) complexes of tetraaminodiphenol macrocyclic ligands: structure and properties. Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions. p. 1239-1244, 1995. (b) BORER, L. L.; THALKEN, L.; CECCARELLI, C.; GLICK, M.; ZHANG, J. H.; REIFF, W.M., Synthesis and Characterization of a Hydroxyl-Bridged Iron(III) Dimer of N,N'-Ethylenebis(salicylamine), Inorganic Chemistry, V. 22, p. 1719-1724, 1983. (c) OU, C. C.; LALANCETTE, R. A.; POTENZA, J. A.; SCHUGAR, H. J., Molecular Structure and Magnetic Properties of p-Dihydroxo-bis[4-dimethylamino-2,6-pyridine-dicarboxylatoaquoiron(III)] Dihydrate, [(CH₃)₂NC₇H₂N₀₄(H₂O)FeOH]₂.2H₂O Journal of the American Chemical Society, V. 100, p. 2053-2057, 1978. (d) KURASAKI, H.; YOSHIDA, H.; ITO, M.; KOIKE, H.; HIGUCHI, E. GOTO, M., Synthesis and Characterization of Bis(μ-hydroxo)diiron(III) Complex of N-(4-Nitro-2-hydroxy)phenylmethyl-N-(2-pyridylethyl)-N-(2-pyridylmethyl)amine and Hydroxylation Reaction of Alkane, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, V.11, p.785-788, 2001 (e) LEE, D.; LIPPARD, S. J., Oxidative N-Dealkylation of a Carboxylate-Bridged Diiron(II) Precursor Complex by Reaction with O₂ Affords the Elusive {Fe₂(μ-OH)₂(μ-O₂CR)}³⁺ Core of Soluble Methane Monooxygenase Hydroxylase, Journal of the American Chemical Society, V. 123, p. 4611-4612, 2001 (f) DUTTA, S. K.; NANDA, K. K.; FLORKE, U.; BHADBHABE, M.; NAG, K., Model Compounds for Iron Proteins. Structures and Magnetic, Spectroscopic, and Redox Properties of Fe(III) and [Co^{III}Fe^{III}]₂O Complexes with (μ-Carboxylato)bis(μ-phenoxo)dimetalate

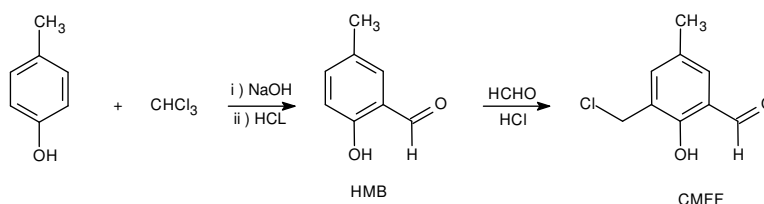
- and (μ -Oxo)diiron(III) Cores, Inorganic Chemistry, V. 35, p. 2292-2300, 1996.
67. THICH, J. A.; OU, C. C.; POWERS, D.; VASILIOU, B.; MASTROPAOLO, D.; POTENZA, J. A.; SCHUGAR, H. J., Molecular Structure and Magnetic Properties of μ - Dihydroxo-bis[2,6-pyridinedicarboxylatoaquoiron(III)] and μ -Dihydroxo - bis [4-hydroxo-2,6-pyridinedicarboxylato - aquoiron(III)] Tetrahydrate Journal of the American Chemical Society, V. 98, p. 1425-1433, 1976.
68. HAZELL, A.; JENSEN, K. B.; MCKENZIE, C. J.; et al. Synthesis and reactivity of (μ -oxo)diiron(III) complexes of tris(2-pyridylmethyl)amine. X-ray crystal structure of [tpa(OH)FeOFe(H₂O)tpa](ClO₄)₃ and [tpa(Cl)FeOFe(Cl)tpa](ClO₄)₂. Inorganic Chemistry, V.33 , p.3217 – 3134, 1994
69. KREBS, B.; SCHEPERS, K.; HENKEL, G.; HENKEL, G.; ALTHAUS, E.; MULLERWARMUTH, W.; GRIESAR, K., HAASE, W. Model compounds for the oxidized Uteroferrin-phosphate complex with novel dinucleating ligands containing phenolate and pyridine donors. Inorganic Chemistry, v. 33, n. 9, p. 1907-1914, 1994.
70. GAGNÉ, R. R.; KOVAL, C. A., LISENSKY, G. C. Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements. Inorganic Chemistry, V. 19, p. 2854-2855, 1980.
71. O'CONNOR, C.J. Magnetochemistry: Advances in Theory and Experimentation. Progress in Inorganic. Chemistry, V.29, p.203-283, 1982.
72. WHITTINGTON, D. A., LIPPARD, S. J. Crystal Structures of the Soluble Methane Monooxygenase Hydroxylase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) Demonstrating Geometrical Variability at the Dinuclear Iron Active Site Journal of the American Chemical Society, V. 123, p. 827-838, 2001.
73. GORUN, S. M., LIPPARD, S. J. Magnetostructural correlations in magnetically coupled (μ -oxo)diiron(III) complexes Inorganic Chemistry, V. 30, p. 1625-1630, 1991.
74. GREATTI, A. Síntese, Caracterização e Reatividade de Novos Complexos Binucleares de Níquel (II) Modelos para Hidrolases. Florianópolis, 2004 Tese de doutorado em Química – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
75. LIU, C.; YU, S.; LI, D.; LIAO, Z.; SUN, X.; XU, H. DNA Hydrolytic Cleavage by the Diiron(III) Complex Fe₂(DTPB)(μ -O)(μ -Ac)Cl(BF₄)₂: Comparison with

Other Binuclear Transition Metal Complexes. Inorganic Chemistry, vol. 41, p. 913-922, 2002.

APÊNDICES

Apendice A – Síntese do Ligante H₂L

Síntese do pré-ligante 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol – CMFF



Esquema . Síntese do núcleo básico CMFF.

O núcleo básico CMFF foi preparado em duas etapas.

Etapa i: Em uma primeira etapa preparou-se o 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído (HMB) através de uma reação de formilação do *p*-cresol baseada no procedimento descrito na literatura para a reação de Reimer-Tiemann.⁶⁵ Em um balão de 3 bocas com capacidade para 5000 mL, equipado com condensador e agitador mecânico, adicionaram-se 1500 mL de clorofórmio e *p*-cresol (21,6 g, 200 mmol). O balão foi colocado em um banho com temperatura controlada entre 56 - 60 °C e, sob agitação, iniciou-se a adição de NaOH (60 g, 150 mmol), solubilizado em 100 mL de água destilada, em pequenas porções durante as 3 primeiras horas de reação. A reação foi mantida por mais 1 hora e após este período deixou-se resfriar até a temperatura ambiente. A seguir, adicionou-se então cerca de 500 mL de água destilada e, sob agitação, iniciou-se a acidificação com HCl concentrado, até pH = 2. A fase orgânica foi então separada, lavada com água destilada, seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente evaporado à pressão reduzida. O material restante (óleo preto viscoso) foi destilado à pressão reduzida com auxílio de uma coluna de vigreux de 40 cm (55 – 65 °C a 0,1 mm Hg). Obteve-se o 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído (HMB) como um sólido branco cristalino P.F.: 56 °C com rendimento de 46% (13 g, 92 mmol) em relação ao *p*-cresol. O HMB foi caracterizado por IV e RMN ¹H.

IV (KBr), em cm^{-1} : ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3024-2864; ν (C-H_{ald}) 2738; ν (C=O) 1658; ν (C=C) 1590-1484; δ (O-H) 1372; ν (C-O_{fenol}) 1282; δ (C-H_{ar}) 742.

RMN ^1H - δ_{H} (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,34 (s, 3 H, CH_3); 6,90 (d, 1 H, CH_{ar}); 7,34 (dd, 2 H, CH_{ar}); 9,85 (s, 1 H, CH_{ald}); 10,84 (s, 1 H, OH_{fenol}).

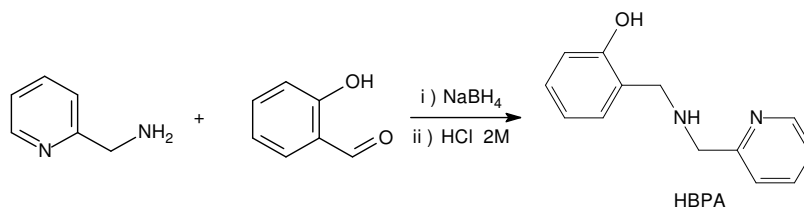
Etapa ii: O CMFF foi obtido pela reação de clorometilação do HMB com formaldeído e ácido clorídrico como descrito a seguir: Em um balão de 250 mL adicionou-se 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído (6,4 g, 47 mmol), formaldeído 37% (3,81 g, 94 mmol) e ácido clorídrico concentrado (25 mL). Esta mistura foi refluxada durante 15 minutos sob agitação magnética e na seqüência resfriada até 0 °C, formando um precipitado compacto no fundo do balão, que foi triturado, filtrado sob vácuo e recristalizado em etanol absoluto a quente. O sólido obtido foi deixado secar em dessecador com sílica sob vácuo por 12 horas e estocado sob argônio a temperatura inferior a -10 °C. O produto, 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol (CMFF), foi obtido como sólido amarelo claro P.F.: 95-96 °C com rendimento de 57% (5 g, 27 mmol) em relação ao HMB e caracterizado por IV e RMN ^1H

IV (KBr) em cm^{-1} : ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3048-2852; ν (C-H_{ald}) 2749; ν (C=O) 1664; ν (C=C) 1600-1470; δ (O-H) 1378; ν ($\text{C-O}_{\text{fenol}}$) 1257; δ (C-H_{ar}) 703.

RMN ^1H - δ_{H} (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,35 (s, 3 H, CH_3); 4,67 (s, 2 H, CH_2); 7,35 (s, 1 H, CH_{ar}); 7,46 (s, 1 H, CH_{ar}); 9,86 (s, 1 H, CH_{ald}); 11,25 (s, 1 H, OH_{fenol}).

ATENÇÃO: *Durante essa reação pode ser formado o composto bis-(clorometil) éter, altamente tóxico e comprovadamente um potente agente carcinogênico. Portanto, essa reação deve ser realizada em capela com boa exaustão, utilizando-se máscara e luvas, e todo o material utilizado deve ser lavado com solução alcalina (por exemplo, etanol/água/KOH: 60 mL/40 mL/5 g, na capela), pois o bis-(clorometil)éter é rapidamente hidrolisado a formaldeído na presença de base. A solução reacional e todos os resíduos devem ser descartados somente após correção do pH ($\text{pH} > 9,0$) por adição de hidróxido de sódio ou potássio*

Síntese do pré-ligante (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina – HBPA



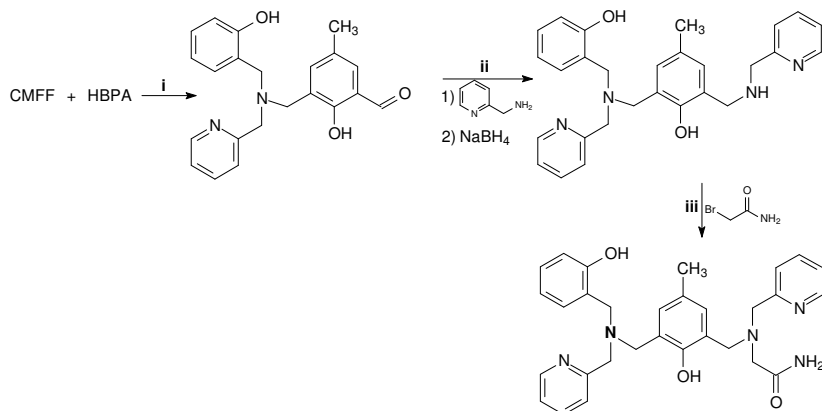
Esquema 2. Síntese do ligante precursor HBPA

O ligante HBPA foi preparado através da modificação do procedimento experimental descrito na literatura.¹⁶ Em um béquer contendo 100 mL de metanol em um banho de gelo adicionou-se 15 mL (122,12 g.mol⁻¹, 1,05 g.mL⁻¹, 0,15 mol) de 2-(aminometil)piridina, seguido por 16 mL (108,14 g.mol⁻¹, 1,16g.mL⁻¹, 0,15 mol) de aldeído salicílico, sob agitação magnética. Após 30 minutos iniciou-se a adição de 5,7 g (37,83 g.mol⁻¹, 0,15 mol) de borohidreto de sódio em pequenas porções durante 1 hora. Deixou-se reagir por mais 1 hora e ajustou-se o pH entre 6 e 7 pela adição de HCl 2 mol.L⁻¹. Evaporou-se o solvente sob vácuo a 40 °C e adicionou-se diclorometano ao óleo restante, que foi lavado com uma solução de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. O óleo amarelo-claro restante foi transferido para um béquer e deixado num dessecador com sílica sob vácuo para precipitação do produto. O precipitado foi lavado com isopropanol e filtrado sob vácuo. A solução de filtragem foi deixada em um béquer sobre a bancada para completar a precipitação do produto, obtendo-se no total 25 g (214,27 g.mol⁻¹, 0,12 mol) de HBPA com rendimento de 78 %.

P.F.: 62-63 °C.

RMN ¹H - δ_H (200 MHz; CDCl₃), em ppm: 3,92 (s, 2H); 4,00 (s, 2H); 6,74-6,88 (m, 2H); 6,97 (d, 1H); 7,14-7,26 (m, 6H); 7,81 (dt, 1H); 8,58 (d, 1H).

Síntese do Ligante 2-[N-(2-piridilmetil)(carboxiamidometil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol – H₂L⁵⁶



Esquema. Síntese do ligante H₂L.

A síntese do ligante final foi realizada em três etapas.

Etapa i: 4,6 g (25 mmol, 184,62 g.mol⁻¹) de CMFF foram solubilizados em 80 mL de diclorometano num balão de 250 mL em um banho de gelo. Sobre essa solução adicionou-se 5,35 g (25 mmol, 214,17 g.mol⁻¹) de HBPA seguido por 3,5 mL de trietilamina (25 mmol, 101,19 g.mol⁻¹, 0,727 g.mL⁻¹), sob agitação magnética. Após a adição dos reagentes o banho de gelo foi removido e a mistura foi deixada reagir por mais 12 horas a temperatura ambiente. Então lavou-se exaustivamente a solução reacional com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio a 10 %; a fase orgânica foi separada, seca e o solvente evaporado, restando um óleo amarelo-claro. A adição de acetonitrila provocou a precipitação de 6,7 g (19 mmol, 348,42 g.mol⁻¹) do produto 2-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formil-fenol (HBPAMFF) com 77% de rendimento.

P.F.: 105 °C.

RMN ¹H - δ_H (200 MHz; CDCl₃), em ppm: 2,28 (s, 3 H); 3,78-3,86 (3 s, 6 H); 6,78-7,30 (m, 9 H); 7,65 (t, 1 H); 8,61 (d, 1 H); 8,56 (d, 1 H).

Etapa ii: 6,7 g (19 mmol, 348,42 g.mol⁻¹) de HBPAMFF foram solubilizados em 80 mL de uma mistura THF/metanol 50 % formando uma solução sobre a qual adicionou-se 2,0 mL (19 mmol, 108,14 g.mol⁻¹, 1,05 g.mL⁻¹) de 2-aminometilpiridina sob agitação magnética. Após 30 minutos, adicionou-se 0,7 g (19 mmol, 37,83 g.mol⁻¹) de borohidreto de sódio em pequenas porções. Deixou-

se reagir por mais 30 minutos e ajustou-se o pH entre 6 e 7 pela adição de HCl 4 M. Evaporou-se o solvente sob vácuo a 40 °C e adicionou-se diclorometano ao óleo restante, que foi lavado com uma solução de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida, restando um óleo amarelo-claro que foi seco sob vácuo (0,1 mmHg, 40 °C). Obteve-se 8,2 g (18 mmol, 454,57 g.mol⁻¹) do produto 2-[2-hidroxibenzil](2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[(2-piridilmetil)aminometil]-fenol (HBPAMPAF) com 95 % de rendimento.

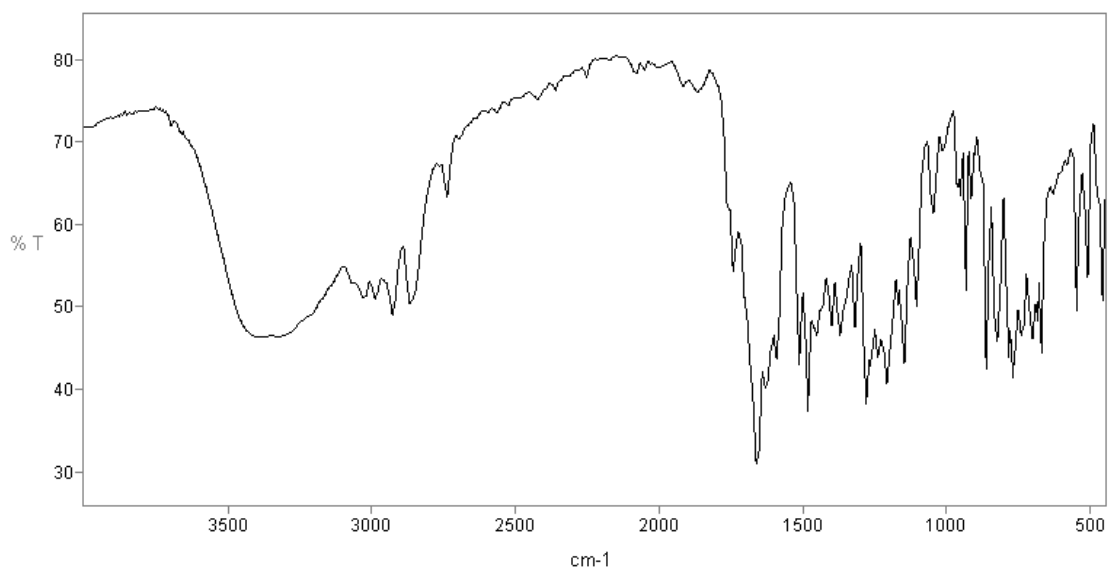
RMN ¹H - δ_H (200 MHz; CDCl₃), em ppm: 2,21 (s, 3 H); 3,73 (s, 2 H); 3,81 (s, 2 H); 3,85 (s, 2 H); 3,90 (s, 2 H); 3,93 (s, 2 H); 6,70-6,85 (m, 4 H); 7,00-7,38 (m, 6 H); 7,65 (t, 2 H); 8,52 (d, 2 H)

Etapa iii: 8,2 g (18 mmol, 454,57 g.mol⁻¹) de HBPAMPAF e 2,5 g (18 mmol, 137,96 g.mol⁻¹) de 2-bromoacetamida foram adicionados a um balão contendo 100 mL de diclorometano, sob agitação magnética. Sobre essa solução adicionou-se 2,5 mL de trietilamina (18 mmol, 101,2 g.mol⁻¹, 0,727 g.mL⁻¹) e após 48 horas sob refluxo a solução reacional foi lavada com solução aquosa de bicarbonato de sódio saturada. A fase orgânica foi separada, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida e T = 40°C. O óleo amarelo-claro restante foi seco sob vácuo (0,1 mmHg, 40°C), formando uma espuma branca. Obteve-se 8,9 g (17 mmol, 511,62 g.mol⁻¹) do ligante H₂L, com rendimento de 97 %. Em relação ao produto da etapa ii.

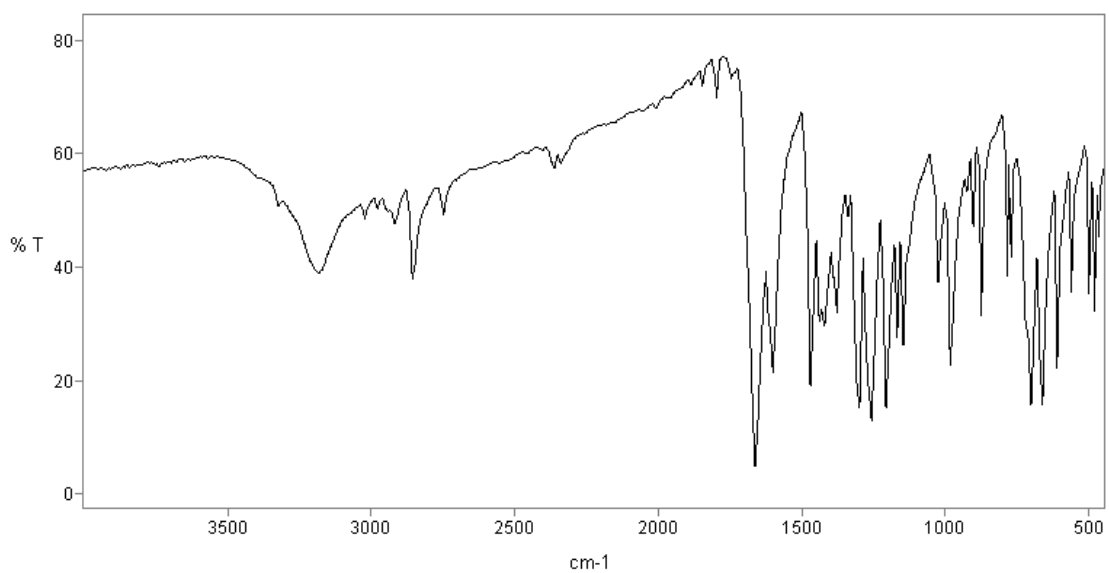
P.F.: 82-85 °C.

RMN ¹H - δ_H (200 MHz; CDCl₃), em ppm: 2,20 (s, 3 H); 3,20 (s, 2 H); 3,66 (s, 2 H); 3,80 (s, 2 H); 3,83 (s, 2 H); 3,87 (s, 2 H); 3,89(s, 2 H); 6,69-6,88 (m, 4 H); 7,04-7,36 (m, 6 H); 7,56-7,74 (m, 2 H); 8,58 (dd, 2 H).

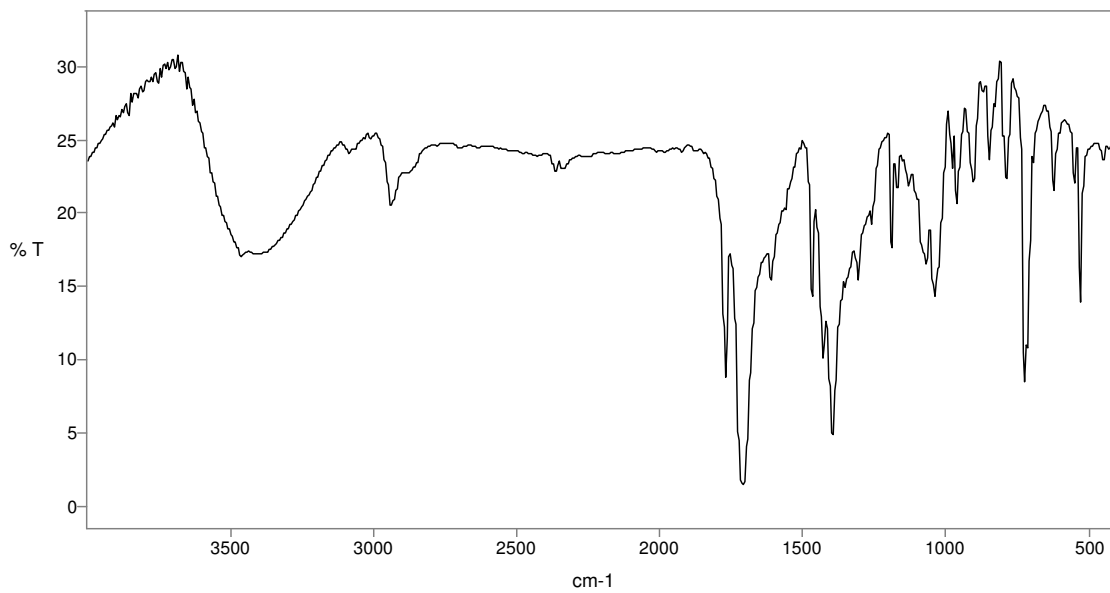
Análise elementar de CHN calculada para C₃₀H₃₃N₅O₃.H₂O, MM = 529,64 g.mol⁻¹, C = 68,03; H = 6,66; N = 13,22 %. Encontrada: C = 67,81; H = 6,46; N = 13,07 %.

Apendice B – Espectros no infravermelho dos ligantes precursores

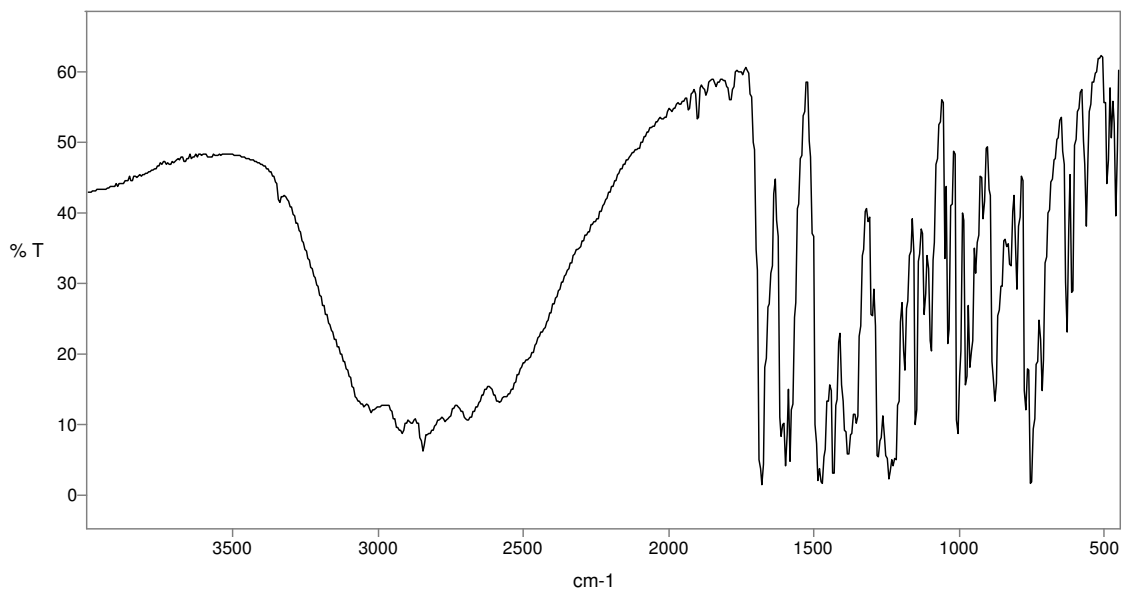
Espectro no IV do HMB em pastilha de KBr.



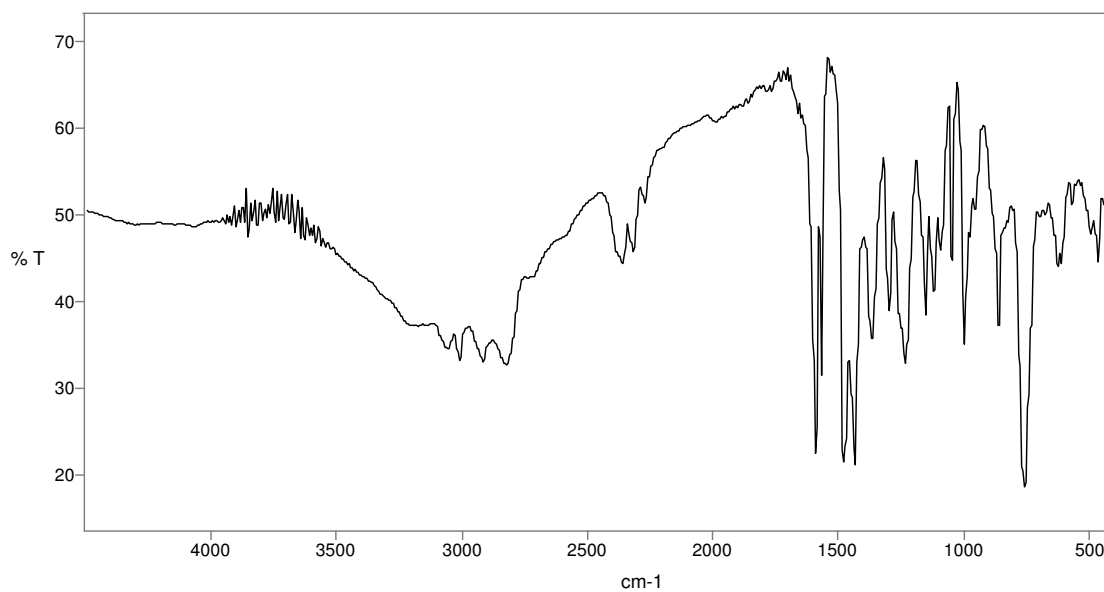
Espectro no IV do CMFF em pastilha de KBr.



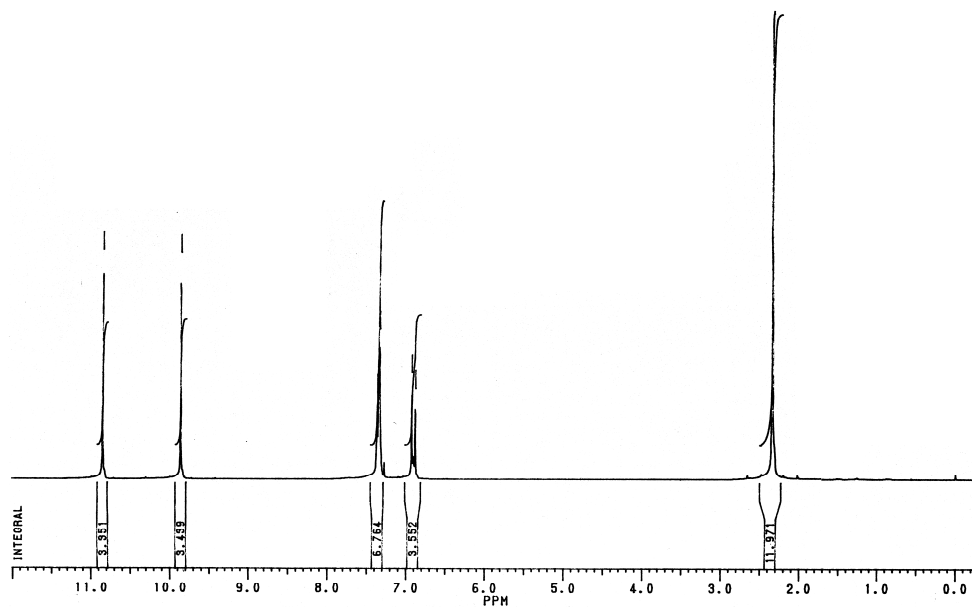
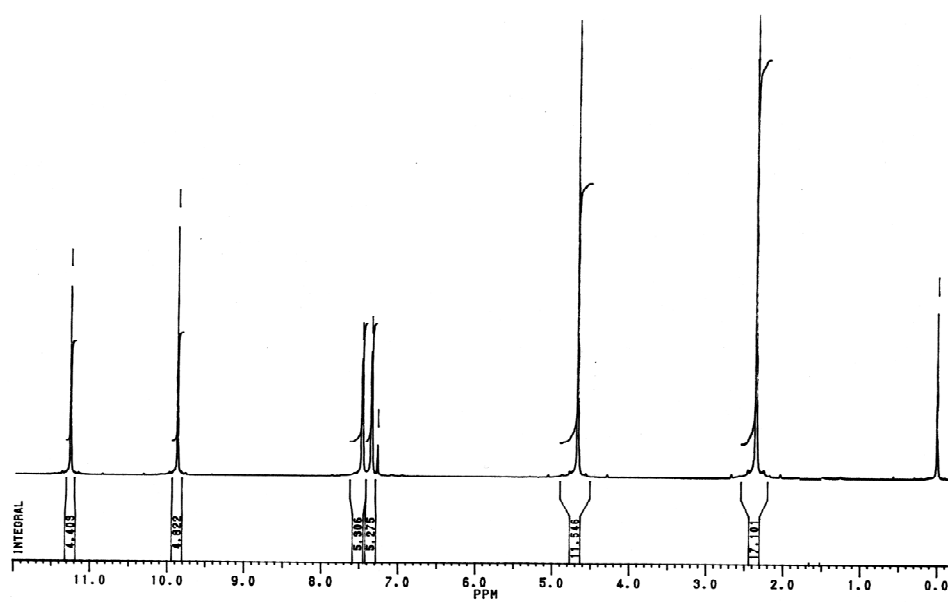
Espectro no IV do HBPA em pastilha de KBr.

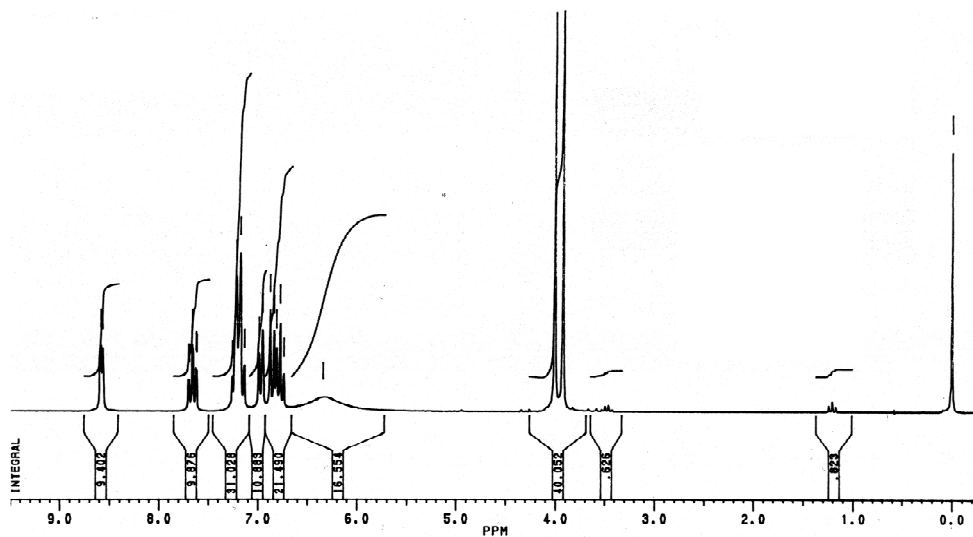
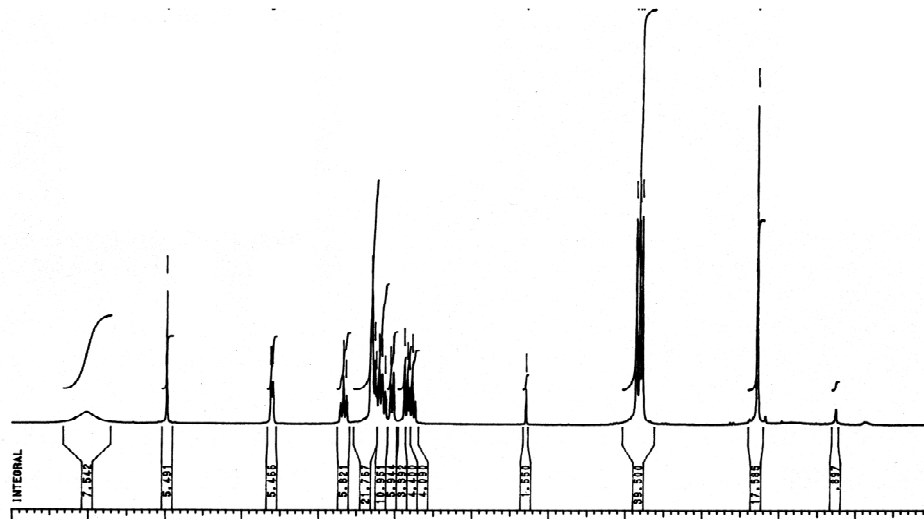


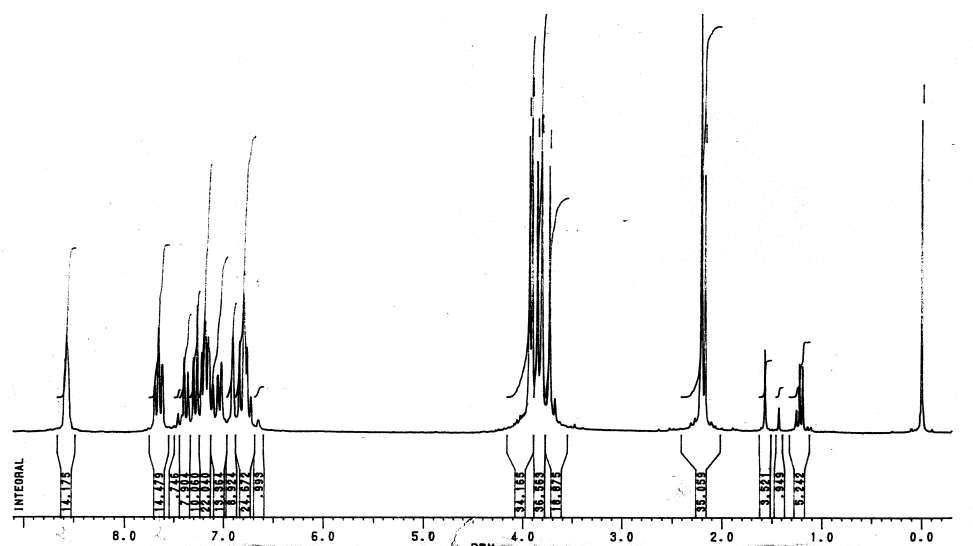
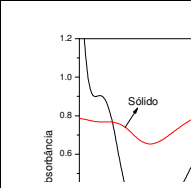
Espectro no IV do HBPAMFF em pastilha de KBr.



Espectro no IV do HBPAMPAF em pastilha de KBr.

Apendice C – Espectros de RMN¹H dos ligantes precursoresEspectro de RMN¹H do HMB em CDCl₃.Espectro de RMN¹H do CMFF em CDCl₃

Espectro de RMN¹H do HBPA em CDCl₃Espectro de RMN¹H do HBPAMFF em CDCl₃



Espectro de RMN^1H do HBPAMPAF em CDCl_3