

ROSANE CLAUMANN RIGHEZ

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS COMPLEXOS
BINUCLEARES COM O LIGANTE H₂BPBPMP NITRO
SUBSTITUÍDO - 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

ROSANE CLAUMANN RIGHEZ

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS COMPLEXOS
BINUCLEARES COM O LIGANTE H₂BPBPMP NITRO
SUBSTITUÍDO - MODELOS PARA O SÍTIO ATIVO DAS
FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS**

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

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2005.

Prof. Dr. Faruk J. Nome Aguilera

Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ademir Neves

Orientador

Prof. Dr. Augusto Suzin Ceccato

Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro

Prof. Dr. Bruno Szpoganicz

À minha família pelo apoio, amor, carinho e
compreensão que sempre se fizeram presentes.

à minha mãe Ivone que, mesmo já tendo partido,
tenho certeza, sempre esteve ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao Profs. Dr. Ademir Neves, pela receptividade, compreensão e orientação durante os anos em que estive no LABINC.

Aos Profs. Dr. Adailton Bortoluzzi, Dr. Bruno Szpoganicz, Dr. Augusto Susin Ceccato e Dr. Valderes Drago pelas contribuições e discussões relativas a este trabalho.

Aos professores do departamento, pela amizade e formação.

Aos colegas e amigos do LABINC, pelo auxílio e pelas discussões e sugestões que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos Adriana, Nicolás, Wanderlene, Jane, Michelle, Lucio, Rafael, Sandro e Deived, pela força, carinho e compreensão, dentro e fora do laboratório.

Aos meus irmãos Adriana e Juliano pelo apoio, carinho, compreensão e dedicação a mim prestados.

A meu pai, por seu amor incondicional, pelo apoio, carinho, dedicação, compreensão e, principalmente pelo incentivo e segurança a mim passados nestes anos e sem os quais eu não teria conseguido chegar até aqui.

Aos funcionários, colegas e amigos do curso pela colaboração e amizade.

Ao Departamento de Química e à Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade a mim concedida.

À CAPES e demais órgãos de fomento, por viabilizarem financeiramente a elaboração deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

A Deus.

“Nós, geralmente, descobrimos o que fazer percebendo aquilo que não devemos fazer. E, provavelmente, aquele que nunca cometeu um erro, nunca fez uma descoberta.”

Samuel Smiles (1812-1904 – Escritor Escocês)

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	16
1 – INTRODUÇÃO	18
1.1 - Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAP's)	19
1.1.1 - Estruturas Cristalinas por Difração de Raios X	21
1.1.2 - Espectroscopia UV-Vis e Raman.....	24
1.1.3 - RPE e Magnetroquímica	26
1.1.4 - Espectroscopia Mössbauer.....	28
1.1.5 - Eletroquímica	30
1.1.6 - Mecanismo	30
1.2 - Complexos Modelos	33
2 - OBJETIVOS	35
2.1 - Objetivo geral....	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 de RMN	37
3.1.4 - Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)	37
3.1.5 - Condutimetria.....	37
3.1.6 - Espectroscopia Eletrônica	38
3.1.7 - Eletroquímica	38
3.1.8 - Mössbauer	38

3.1.9 - Difractometria de Raios X	38
3.1.10 - Potenciometria	39
3.1.11 - Reatividade	40
3.2 - Síntese do Ligante	41
3.2.1 - Síntese do 2-hidroxi-5-metilbenzaldeído - HMB.....	41
3.2.2 - Síntese do 2-clorometil-4-metil-6-formil-fenol - CMFF.....	43
3.2.3 - Síntese da bis-(2-piridilmetil)amina – BPMA	45
3.2.4 - Síntese do (2-hidróxi-5-nitrobenzil)(2-piridilmetil)amina - HBPA-NO ₂ ...	47
3.2.5 - Síntese do 2-[bis-(piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formil-fenol – BPMAMFF	49
3.2.6 - Síntese do 2-[bis-(piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-hidroximetil fenol – BPMAMHF	51
3.2.7 - Síntese do cloridrato de 2-[bis(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6- clorometilfenol hidrocloreto – BPMAMCF.HCl	52
3.2.8 - Síntese do ligante 2-N-bis{(2-piridilmetil)-aminometil}-6-{(2-piridilmetil)(2- hidróxi-5-nitro-benzil)aminometil}-4-metilfenol - (H ₂ BPBPMP-NO ₂)	54
3.3 – Síntese dos Complexos.....	56
3.3.1 - Síntese do Complexo [(Fe ^{III}) ₂ (BPBPMP-NO ₂) (μ-OAc) ₂](ClO ₄) ₂ Complexo (1)	56
3.3.2 - Síntese do complexo [Fe ^{III} Fe ^{II} (BPBPMP-NO ₂) (μ-OAc) ₂]ClO ₄ Complexo (2).....	57
3.3.3 - Síntese do complexo [Fe ^{III} Mn ^{II} (BPBPMP-NO ₂) (μ-OAc) ₂]ClO ₄ Complexo (3)	59
3.3.4 - Síntese do complexo [Fe ^{III} Cu ^{II} (BPBPMP-NO ₂) (μ-OAc) ₂]ClO ₄ Complexo (4)	61

3.4.5 – Síntese do complexo $[(Fe^{III})_4 (BPBPMP-NO_2) (\mu-OH)_2 (\mu-O)_2](ClO_4)_2$ Complexo (5)	62
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1- Síntese e Caracterização dos Ligantes	65
4.1.1 - Espectroscopia na Região do Infravermelho	65
4.1.2 - Espectroscopia de RMN 1H	67
4.2. Síntese Caracterização dos Complexos	68
4.2.1 – Análise Elementar de C, H e N	69
4.2.2 - Condutimetria	70
4.2.3 - Espectroscopia na Região do Infravermelho – IV	71
4.2.4 - Espectroscopia Eletrônica	72
4.2.5 - Eletroquímica	76
4.2.6 - Titulação Potenciométrica	79
4.2.7 - Reatividade	83
4.2.8 - Espectroscopia Mössbauer	87
4.2.9 – Difratomia de Raios X	91
5 - CONCLUSÕES	94
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas cristalinas dos sítios ativos das PAP's: (A) kbPAP, (B) rbTRAP e (C) ufPAP..	22
Figura 2 - Representação esquemática para o sítio ativo das PAP's.....	23
Figura 3 - Espectros mostrando a interconversão da forma púrpura (Fe_2^{III} , 550 nm) na forma rosa ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$, 505 nm) da ufPAP.....	25
Figura 4 - Espectro Raman Ressonante das formas púrpura e rosa da bsPAP	26
Figura 5 - Espectros de RPE em vários valores de pH e gráfico do % da espécie em baixo pH versus pH para a forma de valência mista da bsPAP	27
Figura 6 - Espectros Mössbauer da forma ativa a 185 K (A) e inativa a 10 K(B) da UFPAP.....	29
Figura 7 - Mecanismo proposto por Lindqvist e colaboradores para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAP's	31
Figura 8 - Representação esquemática de alguns dos principais ligantes utilizados na modelagem das PAP's, onde: (A) = H_3BPBBMP , (B) = H_3BBPMP , (C) = HBPMP , (D) = $\text{H}_3\text{BBPPNOL}$ (E) = $\text{H}_2\text{BTPPNOL}$, (F) = H_2BPBPMP	34
Figura 9 - Espectro no IV do HMB em pastilha de KBr.....	42
Figura 10 - Espectro de RMN ^1H do HMB em CDCl_3	42
Figura 11 – Espectro no IV do CMFF em pastilha de KBr.....	43
Figura 12 – Espectro de RMN ^1H do CMFF em CDCl_3	44
Figura 13 – Espectro no IV do BPMA em filme.....	46
Figura 14 – Espectro de RMN ^1H do BPMA em CDCl_3	46
Figura 15 – Espectro no IV do HBPA- NO_2 em pastilha de KBr.....	48
Figura 16 – Espectro de RMN ^1H do HBPA- NO_2 em CDCl_3	48
Figura 17 – Espectro no IV do intermediário BPMAMFF em pastilha de KBr..	50

Figura 18 – Espectro de RMN ¹ H do intermediário BPMAMFF em CDCl ₃	50
Figura 19 – Espectro no IV do intermediário BPMAMHF em pastilha de KBr..	51
Figura 20 – Espectro de RMN do intermediário BPMAMHF em CDCl ₃	52
Figura 21 – Espectro de RMN ¹ H do intermediário BPMAMCF.HCl.....	53
Figura 22 – Espectro no IV do ligante H ₂ BPBPMP-NO ₂ em pastilha de KB.....	55
Figura 23 – Espectro de RMN ¹ H do ligante H ₂ BPBPMP-NO ₂ em CDCl ₃	55
Figura 24 – Espectro no IV do complexo [Fe ^{III} Fe ^{III} (BPBPMP-NO ₂) (μ-OAc) ₂](ClO ₄) em pastilha de KBr.....	57
Figura 25 – Espectro no IV do complexo [Fe ^{III} Fe ^{II} (BPBPMP-NO ₂) (μ-OAc) ₂](ClO ₄) em pastilha de KBr.....	59
Figura 26 – Espectro no IV do complexo [Fe ^{III} Mn ^{II} (BPBPMP-NO ₂) (μ-OAc) ₂](ClO ₄) em pastilha de KBr.....	60
Figura 27 – Espectro no IV do complexo [Fe ^{III} Cu ^{II} (BPBPMP-NO ₂) (μ-OAc) ₂](ClO ₄) em pastilha de KBr.....	62
Figura 28 – Representações dos compostos ligantes.....	63
Figura 29 – Representações dos complexos.....	64
Figura 30 – Espectros no infravermelho do ligante H ₂ BPBPMP-NO ₂ livre (espectro em vermelho) e do complexos 2 (espectro em preto).....	72
Figura 31 – Espectros eletrônicos: (A) complexo 1 , (B) complexo 2 , (C) complexo 3 , (D) complexo 4 .e (E) sobreposição dos complexos 2 , 3 e 4	74
Figura 32 – Voltamogramas cíclicos (à esquerda) e de onda quadrada (à direita) para os complexos 2 (A) , 3 (B) e 4 (C)	78
Figura 33 – Proposta para os equilíbrios observados nos complexos [Fe ^{III} M ^{II} (BPBPMP-NO ₂) (μ-OAc) ₂](ClO ₄) em solução, onde M = Fe ^{II} , Mn ^{II}	80
Figura 34 – Diagrama de distribuição das espécies presentes em função do pH para (A) para o complexo 2 e (B) para o complexo 3 , onde H ₃ C é a espécie completamente protonada, C é a espécie completamente desprotonada e H ₂ C e HC são as espécies di e monoprotionadas.....	81
Figura 35 – Esquema ilustrativo para a reação de hidrólise do substrato BDNPP.....	83

Figura 36 – Gráfico de V_0 em função do pH para a reação de hidrólise do BDNPP catalisada pelo complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$	84
Figura 37 – Curva de saturação (esquerda) e gráfico de Lineweaver-Burk (direita) para a reações de hidrólise do BDNPP catalisadas pelo complexo 3 a 25°C sob as seguintes condições: solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1; $[\text{complexo}] = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{BDNPP}] = 5,1 \times 10^{-4}$ a $4,1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{tampão}] = 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ (MES e HEPES); $I = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (LiClO_4).....	86
Figura 38 – Espectros Mössbauer do complexo (2) no estado sólido: (A) à 298K e (B) à 115K.....	88
Figura 39 – Espectro Mössbauer da solução congelada do complexo (2) em pH 6,5.....	90
Figura 40 – Espectro de Mössbauer da solução resultante da tentativa de síntese e recristalização do complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}} \mu\text{-hidróxido}$	91
Figura 41 – Representação gráfica da estrutura parcial obtida para o complexo: $[(\text{Fe}^{\text{III}})_4(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OH})_3(\mu\text{-O})](\text{ClO}_4)_2$	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais bandas e atribuições, em cm^{-1} , dos espectros no infravermelho para os compostos HMB (I) , CMFF (II) , BPMA (III) , HBPA- NO_2 (IV) , BPMAMFF (V) , BPMAMHF (VI) , BPMAMCF.HCl (VII) $\text{H}_2\text{BPBPMP-NO}_2$ (VIII)	66
Tabela 2 – Deslocamentos químicos em ppm e atribuições, observados nos espectros de RMN ^1H para os compostos HMB (I) , CMFF (II) , BPMA (III) , HBPA- NO_2 (IV) , BPMAMFF (V) , BPMAMHF (VI) , BPMAMCF.HCl (VII) e $\text{H}_2\text{BPBPMP-NO}_2$ (VIII)	68
Tabela 3 – Resultados das análises elementares de C,H e N para os complexos 2 e 3	70
Tabela 4 – Resultados da condutimetria para os complexos 1 , 2 , 3 e 4	70

Tabela 5 – Principais bandas e atribuições em cm^{-1} dos espectros no infravermelho para os complexos 1 , 2 , 3 e 4	71
Tabela 6 – Dados de espectroscopia eletrônica para os complexos 1 , 2 , 3 e 4	73
Tabela 7 – Dados comparativos de espectroscopia eletrônica para as enzimas rbTRAP, kbPAP e ufPAP e seus análogos sintéticos com os ligantes H_2BPBPMP e $\text{H}_2\text{BPBPMP-NO}_2$	75
Tabela 8 – Potenciais redox determinados através de voltametria cíclica (VC) e voltametria de onda quadrada (OQ) para os complexos 2 , 3 e 4	76
Tabela 9 – Dados comparativos de voltametria cíclica (VC) para os complexos 2 , 3 e 4 com seus respectivos análogos não-substituídos $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ ($\text{M} = \text{Fe}, \text{Mn}$ e Cu).....	77
Tabela 10 – Valores de pKa e pH para os percentuais máximos das espécies B = $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$ e C = $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$ determinados para os complexos 2 e 3	79
Tabela 11 – Comparação entre os valores de pKa para os complexos $(\mu\text{-acetato})_2$ já estudados potenciométricamente.....	82
Tabela 12 - Valores de deslocamento isomérico, para Fe^{II} e Fe^{III} alto e baixo spin.....	87
Tabela 13 - Resultados obtidos pela espectroscopia Mössbauer.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

- PAP's** – Fosfatases ácidas púrpuras
bsPAP – Fosfatase Ácida Púrpura de Baço de Bovinos
kbPAP – Fosfatase Ácida Púrpura de Feijões do Tipo “Red Kidney Bean”
ratTRAP - Fosfatase Ácida Púrpura Resistente ao Tartarato de Ratos
sbPAP – Fosfatase Ácida Púrpura de Grãos de Soja
spPAP – Fosfatase Ácida Púrpura da Batata Doce
rbPAP - Fosfatase Ácida Púrpura de Ossos de Ratos
ufPAP – Fosfatase Ácida Púrpura de Útero de Suínos
afPAP – Fosfatase Ácida do *Aspergillus ficuum*
ncPAP – Fosfatase Ácida do *Neurospora crassa*
Asn - Asparagina
Tyr – Tirosina
Asp – Aspartato
His – Histidina
ATP – Adenosina Trifosfato
2,4-BDNPP – bis(2,4-dinitrofenil)fosfato
MES – (2-[n-morpholino]ethanesulfonic acid – ácido 2-[n-morfolino]etanossulfônico
HEPES – (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid) – ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazino]-etanossulfônico
CHES – (2-[N-Cyclohexylamino]ethanesulfonic acid] – ácido 2-[N-Cicloexilamino]etanossulfônico
HMB - 2-hidroxi-5-metilbenzaldeído
CMFF - 2-clorometil-4-metil-6-formil-fenol
HBPA - (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina
HBPA-NO₂ - (2-hidróxi-5-nitrobenzil)(2-piridilmetil)amina
BMPAMFF - 2-[bis-(piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formil-fenol
BMPAMHF - 2-[bis-(piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-hidroximetil fenol
BMPAMCF.HCl - Síntese do cloridrato de 2-[bis(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-clorometilfenol hidrocloreto
H₂BPBPMP-NO₂ - 2-N-bis{(2-piridilmetil)-aminometil}-6-((2-piridilmetil)(2-hidróxi-5-nitro-benzil)aminometil)-4-metilfenol
H₂BPBPMP - 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol
DNA – deoxiribonucleic acid – ácido desoxirribonucléico
RNA – Ácido Ribonucléico
DMSO – Dimetilsulfóxido
EtOH – etanol
MetOH - metanol
NaBPh₄ – Tetrafenilborato de sódio
NaOAc – Acetato de Sódio
TBAPF₆ – Hexafluorofosfato de tetrabutilamônio
THF – tetrahidrofurano
TMS – Tetrametilsilano

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
f – Fator catalítico
I – Força iônica
J – Constante de acoplamento magnético
K_{ass} – Constante de associação
k_{cat} – Constante catalítica
K_M – Constante de Michaelis-Menten
V₀ – Velocidade inicial
V_{máx} – Velocidade máxima
E – Eficiência catalítica
MM – Massa molar
ENH –Eletrôdo normal de hidrogênio
P.F. – Ponto de fusão
pH – Potencial hidrogeniônico
RMN¹H – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPE – Ressonância Paramagnética Eletrônica
UV – Espectroscopia eletrônica de ultra violeta
IV – Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

RESUMO

Por exercerem papéis de fundamental importância na manutenção da vida, por seu alto poder catalítico, e por sua alta especificidade e seletividade, a obtenção de informações sobre as propriedades e o modo de ação das enzimas, tem sido de grande interesse para químicos e bioquímicos de todo o mundo.

As Fosfatases Ácidas Púrpuras constituem uma classe de metaloenzimas hidrolíticas que contém um sítio ativo dinuclear do tipo $Fe^{III}M^{II}$ ($M^{II} = Fe, Mn$ ou Zn) capaz de promover a hidrólise de uma variedade de ésteres de fosfato e anidridos numa faixa de pH de 4-7. Essas enzimas são isoladas a partir de plantas, animais e fungos. Recentemente, as estruturas cristalinas da kbPAP, ratTRA, rbPAP e ufPAP foram determinadas, indicando grandes similaridades entre elas e um mecanismo comum para a hidrólise de ésteres de fosfato.

A síntese de novos complexos com ligantes cada vez mais elaborados, tem levado os químicos a obter modelos sintéticos que mimetizam cada vez melhor as propriedades verificadas no sítio ativo das PAP's. Além de procurar a mimetização das propriedades e reatividade da enzima, vale destacar o grande avanço que o estudo de modelos sintéticos com diferentes ligantes proporciona do ponto de vista do entendimento da química de coordenação. Assim sendo, é muito interessante o estudo dos efeitos eletrônicos provocados por grupos substituintes, doadores e/ou retiradores de elétrons, como por exemplo o $-NO_2$, que influenciam na basicidade dos complexos e conseqüentemente nas suas propriedades físico-químicas e de reatividade, podendo desta forma contribuir no esclarecimento do mecanismo de ação das metaloenzimas.

Neste trabalho, foi sintetizado um novo ligante não simétrico baseado no ligante $H_2BPBPMP$, com o grupo substituinte $-NO_2$ na posição cinco do anel fenólico e, a partir do ligante, os complexos binucleares di- μ -acetato: $(Fe^{III})_2$ (complexo **1**), $Fe^{III}Fe^{II}$ (complexo **2**), $Fe^{III}Mn^{II}$ (complexo **3**) e $Fe^{III}Cu^{II}$ (complexo **4**). Estes complexos foram caracterizados por várias técnicas, incluindo eletroquímica e espectroscopia eletrônica, e os dados obtidos foram comparados aos seus análogos não substituídos. Observou-se, tanto na espectroscopia eletrônica

quanto na eletroquímica, uma significativa influência do efeito retirador de elétrons do grupo $-\text{NO}_2$ sobre os centros metálicos destes complexos. Para os complexos **2** e **3**, foram realizados ainda estudos cinéticos e de equilíbrio em solução. A partir dos dados da titulação potenciométrica, cinéticos e de Mössbauer foi possível propor que, apesar da influência do grupo substituinte- NO_2 , em valores de pH acima de 6,0 o complexo **2** forma várias outras espécies, além da μ -hidroxo, inclusive com a oxidação do centro de Fe^{II} . O complexo **3** possui capacidade catalítica frente à hidrólise básica do 2,4-BDNPP, com fator catalítico de quase 3 mil vezes em relação à reação não catalisada. De acordo com os experimentos realizados, sugere-se que o processo catalítico promovido por este complexo ocorre por um mecanismo similar ao proposto para as PAPs, reforçando a proposta de Lindqvist e colaboradores.

Os estudos de Mössbauer da solução resultante da tentativa de síntese e recristalização do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_2$ demonstra a presença de um composto do tipo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ estável em solução, que provavelmente é a espécie $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$, a qual é de especial interesse, por tratar-se da espécie similar à proposta como cataliticamente ativa nas PAP's de mamíferos. Obtiveram-se ainda desta solução pequenos cristais de um complexo tetranuclear de Fe^{III} (complexo **5**), que teve sua estrutura parcial resolvida por difratometria de raios X.

ABSTRACT

By the fact of playing roles of fundamental importance in the maintenance of life and by their high catalytic power, specificity and selectivity, the obtention of information about properties and mode of action of enzymes has been object of great interest for chemists and biochemists around the world.

Purple acid phosphatases constitute a class of hydrolytic metalloenzymes that contain a dinuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$ ($\text{M}^{\text{II}} = \text{Fe}, \text{Mn}$ or Cu) active site able to promote the hydrolysis of several phosphate esters and anhydrides in the pH range of 4-7. These enzymes are isolated from plants, animals and fungi. Recently, the structures of kbPAP, ratTRAP, rbPAP and ufPAP were determined, indicating great similarities between them and a common mechanism for the hydrolysis of phosphate esters.

The synthesis of new complexes with more elaborated ligands have leaved the chemists to obtain synthetic models that mimic better and better the properties of the PAP's active site. It is worth to notice that, in addition to the discovery of new mimetic agents for the properties and reativity of the enzyme, the study of synthetic models with different ligands brings great advances in our knowledge about Coordination Chemistry. In this point of view, the study of the electronic effects produced by substituents, electron-donors or electron-withdrawing (as $-\text{NO}_2$) groups, that have a great influence in the basicity of the complexes and, consequently, in their physical-chemical properties and reactivity is very interesting and may contribute to the elucidation of the mode of action of the PAP's.

In this work, we report the synthesis of a new unsymmetric ligand based on the H_2BPBPMP molecule, but with the substituting-group $-\text{NO}_2$ in the position 5 of the phenolic ring. From the ligand, dinuclear complexes di- μ -acetato were prepared: $(\text{Fe}^{\text{III}})_2$ (complex **1**), $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ (complex **2**), $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}$ (complex **3**) and $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ (complex **4**). These complexes were characterized by several techniques, including electrochemistry and electronic spectroscopy, and the obtained data were compared with those for their non-substituted analogues. It was observed a significant influence of the electron-withdrawing effect of $-\text{NO}_2$ on the metallic centers of these complexes. For the complexes **2** and **3**, were performed

additionally kinetic and solution equilibrium studies. From the potentiometric titration, kinetic and Mössbauer data, it was possible to propose that, in despite of the influence of the $-\text{NO}_2$ group, above pH 6.0 the complex **2** generates several other species in addition to the μ -hydroxo one, including complexes in which there is oxidation of the Fe^{III} center. Complex **3** possesses catalytic capacity towards the basic hydrolysis of 2,4-BDNPP, showing catalytic factor of almost 3000 times in relation to the non-catalysed reaction. According to the performed experiments, it was possible to suggest that the catalytic process promoted by this complex follows a similar mechanism to that proposed for the PAP's confirming the proposition of Lindqvist et al.

The Mössbauer studies of a solution resultant from a tentative of recrystallization of $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_2$ show the presence of an $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ complex that presents good solution stability. This corresponds probably to the species $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$, which is of special interest because of its structural similarity with the proposed catalytic active form for the PAP's of mammals. Were obtained additionally from that solution small crystals of a tetranuclear Fe^{III} complex (complex **5**), whose partial structure was solved by X-ray diffractometry.

1. INTRODUÇÃO

A química bioinorgânica é uma subdivisão mais recente da química inorgânica e representa uma área de pesquisas que vem crescendo rapidamente nas últimas décadas. Trata-se de uma área da ciência altamente interdisciplinar que promove a interação de diversas áreas da química e bioquímica e procura investigar a reatividade dos íons metálicos em sistemas biológicos.¹ Como resultado, cada vez mais se encontram metais desenvolvendo papéis vitais na manutenção e regulação de muitos processos biológicos. Embora se saiba que muitos elementos da tabela periódica são essenciais a vida, o papel molecular destes está apenas começando a ser compreendido.

Outros elementos, não essenciais, também influenciam na qualidade de vida, seja como um poluente tóxico, ou como um fármaco na cura de certas doenças. Exemplos desses fatos são amplamente conhecidos na literatura, porém pouco se sabe a respeito de seu modo de ação em nível molecular. O maior desafio da química bioinorgânica moderna é a compreensão da base molecular de todas essas interações e a aplicação desses conhecimentos na medicina, biologia, ciências ambientais, catálise e tecnologia, entre outras.

Cientistas de várias áreas têm contribuído para esse campo de pesquisa e em todos os casos, o papel dos metais, em relação aos sistemas vivos é assunto de interesse comum. A subdivisão deste campo não é fácil devido à sobreposição de seus sub-campos, porém as áreas mais comuns de pesquisa são: o ambiente de coordenação do metal em metaloproteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e membranas; o mecanismo de reações ocorridas no centro metálico de uma enzima; os análogos sintéticos para um sítio ativo em metaloenzimas (planejamento, síntese, estrutura, espectroscopia e reações catalíticas); os fármacos contendo metais para a cura ou prevenção de doenças (síntese e mecanismos de ação); a remoção e transporte de íons e compostos metálicos “para” e “de” sistemas vivos (desintoxicação); os processos de biomineralização.²

Dentro deste contexto fica claro que, por exercerem papéis de fundamental importância na manutenção da vida, por seu alto poder catalítico, e por sua alta especificidade e seletividade, a obtenção de informações sobre as propriedades e

o modo de ação das enzimas, têm sido de grande interesse de químicos e bioquímicos de todo o mundo.

Dentre as várias classes de enzimas conhecidas, as hidrolases têm despertado grande interesse de pesquisadores.³ Estas enzimas são responsáveis pela hidrólise de uma série de ligações químicas, como por exemplo, as ligações peptídicas, presentes nas proteínas, e as ligações nucleotídicas, presentes no DNA e no RNA.⁴ Certos tipos de hidrolases (fosfatases) parecem atuar no reparo das fitas do DNA, ajudando desta forma a manter a integridade do código genético.⁴ Além disso, as hidrolases artificiais podem ser úteis no mapeamento genético desde que elas apresentem uma certa especificidade para uma dada seqüência de bases.⁴

Outra função de relevante importância atribuída às hidrolases, especificamente às fosfatases, é atuar no controle do equilíbrio de fosforilação/desfosforilação de uma vasta gama de compostos químicos presentes nos seres vivos, como por exemplo nas proteínas fosforiladas.³

1.1 FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS

As fosfatases ácidas púrpuras representam um grupo de metaloenzimas pertencentes à classe das hidrolases, que atuam na clivagem de ésteres de fosfato *in vitro* com atividade catalítica ótima em pH ácido. Podem ser encontradas em plantas, animais, fungos e bactérias.⁵ Além de promoverem a hidrólise de ésteres de fosfato em pH ácido, apresentam uma coloração púrpura bem característica, o que fez com que elas fossem conhecidas genericamente como fosfatases ácidas púrpuras (PAP).^{3,5,6}

Uma classe de fosfatases ácidas contendo ferro, de coloração púrpura, foi primeiramente isolada de baço bovino (bsPAP) e fluido de útero suíno (ufPAP).⁵ Simultaneamente, pesquisas médicas caracterizaram uma fosfatase ácida de tecidos humanos, resistente à inibição por tartarato, que foi denominada fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) humana do tipo 5 (baseado na mobilidade eletroforética). Apesar dos diferentes nomes atribuídos a estas enzimas, elas

apresentam uma significativa homologia seqüencial. Estudos imunológicos também revelam que as PAP's de fontes animais e a TRAP humana são de fato idênticas.^{5,7} Essas metaloenzimas são glicoproteínas monoméricas com massa molar em torno de 35 kDa, que apresentam uma estrutura monomérica peptídica 90 % similaridade. Seu sítio ativo consiste de um centro binuclear de ferro com dois estados de oxidação possíveis: um $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ cataliticamente ativo, conhecido como “forma rosa” e outro $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ inativo, conhecido como “forma púrpura”.⁵

Além da bsPAP, ufPAP e TRAP, outras PAP's de mamíferos vêm sendo caracterizadas a partir de diferentes tecidos humanos (baço, placenta, ossos, pulmão), ossos de bovinos, baço de ratos e epidermes.^{5,8,9,10,11} Apesar de algumas das PAP's estarem bem caracterizadas do ponto de vista físico-químico e estrutural, ainda não se sabe ao certo sua real atividade fisiológica. Por apresentarem atividade catalítica frente à hidrólise de ésteres de fosfato, acredita-se que essas enzimas possam atuar na degradação das células velhas de eritrócitos.⁵ Observou-se também que as PAP's são fontes catalíticas de radicais hidroxila, sendo que os mesmos parecem atuar sobre a matriz óssea.^{12,13,14} Já as PAP's encontradas em vegetais parecem ter importância na liberação de fosfato oriundo de compostos organofosforados.⁵ A classe das PAP's oriundas de plantas inclui glicoenzimas diméricas com massa molar em torno de 110 kDa, obtidas de sementes de um tipo de feijão conhecido como “kidney bean” (kbPAP), grãos de soja (sbPAP), batata-doce (spPAP), folhas de espinafre, células de cultura de arroz e *Arabidopsis thaliana*.⁵ A mais estudada é a kbPAP, que contém um sítio heterobimetálico do tipo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ e foi a primeira PAP a ter a estrutura cristalina de raios X resolvida.⁵ É interessante ressaltar que a $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ -kbPAP pode ser convertida para uma forma FeFe ativa, enquanto que as PAP's de útero suíno e de baço bovino (FeFe) podem ser transformadas para a forma $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ ativa.^{5,8,9,10,11,}

A substituição do Fe^{II} nas PAP's de mamíferos por Mn^{II} , Co^{II} , Ni^{II} , Cu^{II} , Zn^{II} , Hg^{II} ou Cd^{II} bem como o Fe^{III} pelos metais Ga^{III} , In^{III} ou Al^{III} tem sido descrita na literatura.^{15,16,17,18,19} Estes estudos tem sido de grande relevância na determinação

do papel dos íons metálicos no processo catalítico e do mecanismo envolvido nesse processo.

Uma fosfatase contendo FeMn em seu sítio ativo, descoberta na batata-doce, é similar à kbPAP em tamanho, estrutura de subunidades e espectro visível.¹⁰

Fosfatases púrpuras de bactérias, com pH ótimo em torno de pH = 6,0, foram isoladas de *Aspergillus ficuum* (afPAP) e *Neurospora crassa* (ncPAP). O máximo de absorção em 580 nm descrito para a afPAP mostra que esta enzima apresenta uma coloração azul ao invés da cor púrpura. Infelizmente, o conteúdo metálico das PAP's de bactérias ainda é desconhecido. A fosfatase púrpura de *Micrococcus sodenensis* apresenta atividade máxima na região alcalina, porém muito pouco é conhecido sobre as propriedades dessa enzima.⁵

1.1.1 Estruturas cristalinas por difração de raios X

As PAP's que foram caracterizadas estruturalmente por difração de raios X foram: da enzima do feijão (kbPAP), da PAP resistente ao tartarato de ratos (ratTRAP e rbPAP), da ufPAP e da batata doce spPAP (Figura 1).^{12,13,14, 20,21,22}

A estrutura cristalina determinada para a kbPAP, com uma resolução de 2,65 Å, revela um sítio ativo formado por um íon férrico coordenado aos resíduos de aminoácidos Tyr167, His325 e de maneira monodentada ao grupo carboxilato do aminoácido Asp135.^{20,21} O íon zinco encontra-se ligado aos resíduos His286, His323 e ao átomo de oxigênio da amida do aminoácido Asn201. Os dois íons metálicos são ponteados pelo grupo carboxilato do resíduo Asp164 de maneira monodentada. Completando a esfera de coordenação encontram-se três ligantes exógenos inseridos na estrutura cristalina com base em dados espectroscópicos e de reatividade: um íon hidróxido coordenado ao ferro, uma molécula de água ligada ao zinco e uma ponte μ -hidroxo entre os centros metálicos. O átomo de Fe^{III} encontra-se em um ambiente octaédrico, a uma distância de 3,26 Å do átomo de Zn^{II}, que apresenta uma geometria octaédrica distorcida.

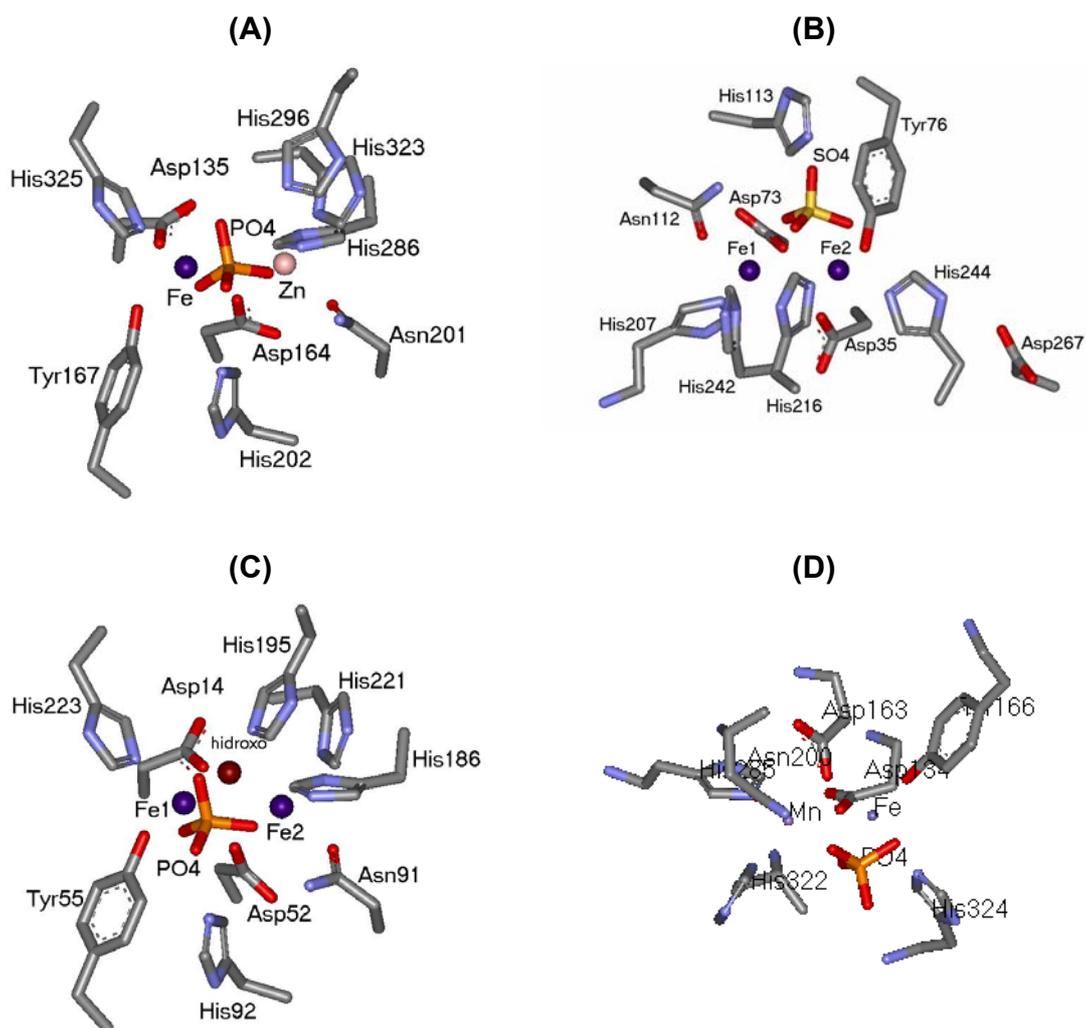


Figura 1: Estruturas cristalinas dos sítios ativos das PAP's: (A) kbPAP, (B) rbTRAP , (C) ufPAP e (D) spPAP.

A estrutura cristalina da kbPAP, contendo fosfato coordenado ao sítio ativo foi, também determinada. Sua coordenação ocorre através de dois átomos de oxigênio ligados de forma bidentada como ponte entre os íons metálicos, presumivelmente no lugar das moléculas de água presentes no sítio ativo da enzima sem fosfato. Os dois átomos de oxigênio não coordenados interagem com os resíduos de His202 e His296 através de ligações de hidrogênio; estes aminoácidos sofrem um deslocamento de cerca de 1 Å relativo às suas posições na enzima sem fosfato. A geometria de coordenação octaédrica para o Fe^{III} pode

ser completada pela presença de uma ponte hidroxilo. Embora a presença de uma ponte μ -hidroxilo não tenha sido determinada com certeza no mapa de densidade eletrônica, sua presença pode ser indicada pelo acoplamento antiferromagnético observado para o derivado $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ com fosfato.^{20,21}

A substituição do íon Zn^{II} por Fe^{II} na kbPAP revela que as propriedades espectroscópicas e de reatividade assemelham-se às observadas para as fosfatases de mamíferos.¹¹ Apesar da pequena homologia seqüencial total, significativas similaridades seqüenciais podem ser identificadas especialmente nas regiões onde se encontram os resíduos do sítio ativo, o que sugere que enzimas de mamíferos e a kbPAP são evolutivamente relacionadas e apresentam uma estrutura tridimensional similar do sítio ativo.¹⁰

A elucidação das estruturas cristalinas da ufPAP (1,55 Å) e da TRAP de ratos (ratTRAP (2,7 Å) e rbPAP (2,2 Å) permitiram constatar a similaridade dos sítios ativos das PAP's de mamíferos e da kbPAP, sugerindo que a catálise da reação de hidrólise de fosfatos deva ocorrer através de um mecanismo similar.^{12,13,14,20,21} Um desenho esquemático representando a composição de um sítio ativo comum para a forma ativa das PAP's de mamíferos e de vegetais é mostrado na Figura 2.

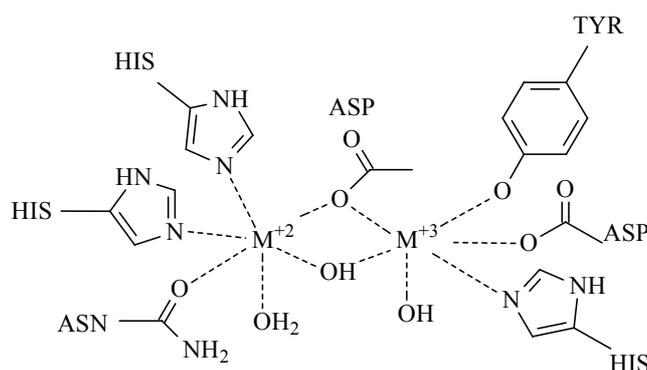


Figura 2: Representação esquemática para o sítio ativo das PAP's.

As PAP's de mamíferos são estruturas monoméricas de aproximadamente 35 kDa, contendo dois átomos de ferro em seu sítio ativo. A estrutura da ufPAP

refere-se à enzima na forma oxidada, com fosfato coordenado simetricamente aos dois átomos metálicos.¹⁴ A distância Fe-Fe observada foi de 3,31 Å, similar à observada na kbPAP. A ponte μ -hidroxo encontra-se a 2,08 Å dos átomos de Fe^{III} e forma um ângulo de 105,7° com os mesmos. O mesmo conjunto de aminoácidos que compõem o sítio ativo da kbPAP foi observado na ufPAP.^{14,20,21}

A estrutura cristalina determinada para TRAP de ratos, na forma oxidada da enzima, revela também a homologia dos resíduos de aminoácidos encontrados nos sítios ativos ufPAP e kbPAP.^{12,13,14,20,21} Na estrutura da rbPAP, com resolução de 2,2 Å, observou-se a presença de uma molécula de SO₄²⁻ e de um átomo de Zn^{II} na estrutura da enzima, proveniente da solução utilizada no processo de cristalização.¹³ Um dos átomos de oxigênio do grupo SO₄²⁻ encontra-se coordenado a um dos átomos de Fe^{III}. Através do mapa de densidade eletrônica pode-se observar a presença da ponte μ -hidroxo e de uma molécula de H₂O ou OH⁻ coordenada a um dos centros de Fe^{III}.¹³ A estrutura cristalina da ratTRAP (2,7 Å) mostra a presença de um fosfato inorgânico coordenado de forma bidentada aos dois átomos de ferro.¹² A orientação do grupo fosfato é similar à observada na estrutura da kbPAP.^{12,20,21}

Mais recentemente, em janeiro de 2005, Gerhard Schenk e colaboradores determinaram, com uma resolução de 2,5 Å, a estrutura de um complexo tripodal formado pela coordenação do ânion fosfato ao centro de Fe-Mn da spPAP. A molécula de fosfato encontra-se ligada de uma maneira não usual aos dois íons metálicos, com dois dos átomos de oxigênio do fosfato ligados ao Fe^{III} e ao Mn^{II} e um terceiro átomo de oxigênio ponteando os dois íons metálicos.²² A resolução desta estrutura juntamente com os dados cinéticos obtidos suportam a hipótese de que o átomo de oxigênio ponte inicia a hidrólise.

1.1.2 Espectroscopia UV- Vis e Raman

O sítio ativo das PAP's de mamíferos consiste de um centro binuclear de ferro, como determinado através das estruturas cristalinas, com dois estados de oxidação acessíveis. A forma oxidada da enzima, Fe^{III}Fe^{III}, é cataliticamente

inativa e apresenta um máximo de absorção entre 550-570 nm ($\epsilon = 4000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), sendo denominada como “forma púrpura”. Na forma reduzida, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$, a enzima conhecida como “forma rosa” apresenta atividade catalítica e absorve em 505-510 nm ($\epsilon = 4000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).^{10,23,24} Os espectros para a interconversão entre as duas espécies estão mostrados na Figura 3.

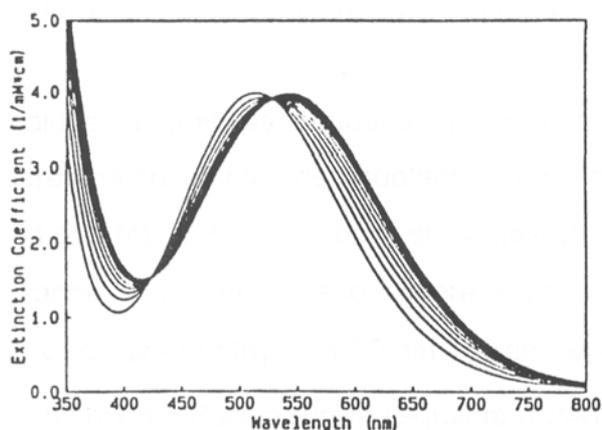


Figura 3: Espectros mostrando a interconversão da forma púrpura (Fe_2^{III} , 550 nm) na forma rosa ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$, 505 nm) da ufPAP.⁶

A banda de absorção observada em ambas as formas da enzima foi atribuída como sendo um processo de transferência de carga do tipo tirosinato $\rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$.¹⁰ Os mesmos valores observados para o coeficiente de absorvidade molar nas formas oxidada e reduzida indicam que o sítio passivo de redução é aquele que não se encontra ligado ao resíduo tirosinato.

A kbPAP apresenta um máximo de absorção em 560 nm ($\epsilon = 3360 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), similar ao observado para as enzimas de mamíferos e para a forma oxidada da $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ -kbPAP modificada.^{5,25} Entretanto, a banda de transferência de carga da $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ -kbPAP não sofre deslocamento para 510 nm após redução, como é observado para as PAP's de mamíferos.^{5,24}

Através da espectroscopia Raman, enzimas contendo resíduos tirosinato como ligantes são facilmente identificadas pela presença de quatro modos do anel tirosina, entre 1600 e 1164 cm^{-1} , que tem sua intensidade aumentada sob

excitação na região do visível. A observação desses modos de vibração nos espectros das PAP's de mamíferos (Figura 4) indicam que a forte coloração púrpura observada nessas proteínas deve-se a transições de transferência de carga tirosinato \rightarrow Fe^{III}.

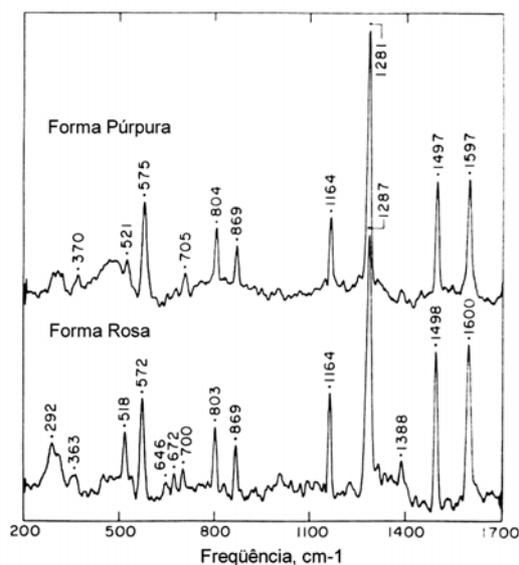


Figura 4: Espectro Raman Ressonante das formas púrpura e rosa da bsPAP.²⁴

A preservação do quarteto da tirosina em alta frequência (1600 a 1150 cm⁻¹) na forma rosa indica que a coordenação do resíduo tirosina ao ferro cromofórico (Fe^{III}) é mantida após a redução da enzima.^{10,23,24} O espectro Raman Ressonante da bsPAP é muito similar ao obtido para a ufPAP. Apesar das posições exatas dos picos não serem idênticas nas duas proteínas, as características gerais do espectro, bem como o pequeno deslocamento da banda em 1281 cm⁻¹ para 1287 cm⁻¹ após redução, corresponde exatamente aos dados reportados para a ufPAP.²⁴

1.1.3 RPE e magnetoquímica

O comportamento magnético das fosfatases ácidas púrpuras de mamíferos (ufPAP e bsPAP)^{10,23,24,26,27} foi amplamente estudado por susceptibilidade

magnética e espectroscopia de RPE. A forma completamente oxidada destas enzimas não apresenta sinal no RPE (RPE-silencioso) e é aproximadamente diamagnética, com um estado fundamental de spin $S = 0$.^{24,26} Na forma $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$, essas metaloenzimas apresentam um espectro com sinal rômbo em $g_{\text{médio}} = 1,75$, correspondendo a um estado fundamental de spin $S = \frac{1}{2}$.

Estudos da dependência do pH no espectro de RPE para a espécie de valência mista da bsPAP (Figura 5) revelaram a presença de duas espécies.²⁴ Em $\text{pH} < 3,5$, observou-se um espectro atribuído a uma espécie rômbo com valores de $g = 1,94, 1,78$ e $1,65$. Em $\text{pH} > 5$, o componente principal do espectro apresenta um novo sinal rômbo com valores de $g = 1,85, 1,73$ e $1,58$. A forma rosa da bsPAP é instável em $\text{pH} > 5,5$; em $\text{pH} = 5,42$ o espectro apresenta aproximadamente 10 % da espécie observada em baixos valores de pH. Os espectros mostrados na Figura 5 sugerem a presença de um grupo contendo um hidrogênio ionizável ($\text{pKa} \sim 4,4$), com um forte efeito sobre o espectro de RPE.

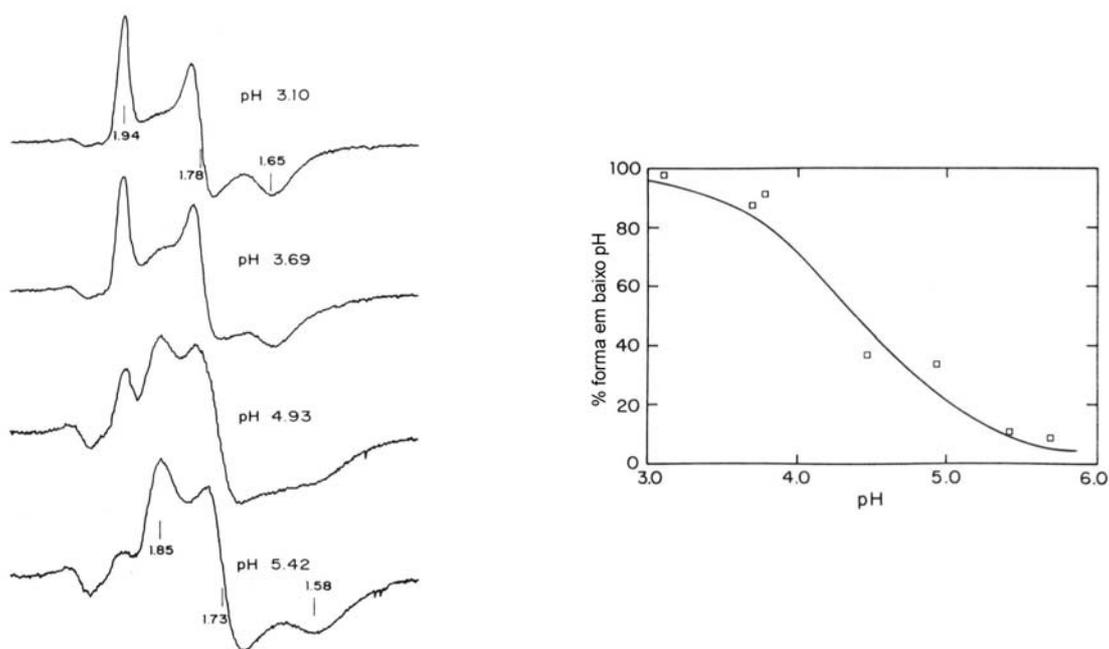


Figura 5: Espectros de RPE em vários valores de pH e gráfico do % da espécie em baixo pH versus pH para a forma de valência mista da bsPAP.

Recentes estudos de susceptibilidade magnética realizados para a bsPAP revelam um fraco acoplamento antiferromagnético entre os centros de ferro do sítio ativo.²⁶ Os valores das constantes de acoplamento determinadas tanto para a forma reduzida quanto para a forma oxidada dessa metaloenzima não sofreram influência significativa com a variação do pH na faixa de pH = 3,9 a 5,6. Para a forma reduzida da bsPAP, obteve-se um valor de $J = -13 \text{ cm}^{-1}$ a pH = 5,6, enquanto que para a forma oxidada $J = -9 \text{ cm}^{-1}$ a pH = 5,1. Valores similares foram relatados para a ufPAP, com $J = -15 \text{ cm}^{-1}$ para a forma oxidada e $J = -9 \text{ cm}^{-1}$ para a forma reduzida.²⁷ O espectro de RPE da $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ -kbPAP modificada é similar ao observado para a forma de valência mista das PAP's de mamíferos.²⁸ A kbPAP nativa não apresenta sinal na faixa de $g = 1,7$, porém apresenta um sinal em $g = 4,3$ característico de Fe^{III} spin alto com grande rombicidade. Os estudos de susceptibilidade magnética realizados para a $(\text{Fe}^{\text{III}})_2$ -kbPAP revelam um comportamento magnético semelhante ao observado para a bsPAP e ufPAP.²⁷ A constante de acoplamento determinada para a formas reduzida e oxidada da kbPAP modificada foi de $J = -8$ e $J = -9 \text{ cm}^{-1}$ em pH = 6. Esses resultados, juntamente com os dados cristalográficos dessas metaloenzimas, concordam com a presença de uma ponte do tipo μ -hidroxo entre os sítios metálicos, tanto nas PAP's de mamíferos como na kbPAP.^{12,13,14,21,23,26,27,28}

1.1.4 Espectroscopia Mössbauer

Estudos de espectroscopia Mössbauer de ^{57}Fe da ufPAP e bsPAP enriquecidas com ^{57}Fe , bem como da $^{57}\text{FeFe}$ e $^{57}\text{Fe}^{57}\text{Fe}$ kbPAP modificada demonstram que estas enzimas contêm dois átomos de ferro spin alto distintos acoplados antiferromagneticamente ($S = \frac{1}{2}$ para a enzima rosa e diamagnético para a enzima púrpura).^{5,24,29,30} Os espectros Mössbauer, tanto da forma ativa ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$) como da forma inativa (Fe_2^{III}) da UFPAP (Figura 6), revelaram a presença de dois sítios de ferro spin-alto com diferentes ambientes de coordenação.³⁰ Para a forma ativa, observaram-se valores de deslocamento

isomérico (δ) de 1,22 mm/s e desdobramento quadrupolar (ΔE_q) de 2,66 mm/s para o centro de Fe^{II} a 100 K, enquanto o centro de Fe^{III} apresentou valores de deslocamento isomérico de 0,52 mm/s e desdobramento quadrupolar de 1,83 mm/s.³⁰ Na forma oxidada, observou-se um centro de ferro com deslocamento isomérico de 0,46 mm/s e desdobramento quadrupolar de 2,12 mm/s a 10 K. O segundo centro de Fe^{III} apresentou valores de deslocamento isomérico de 0,55 mm/s com desdobramento quadrupolar de 1,65 mm/s.³⁰ Os valores obtidos para os parâmetros Mössbauer concordam com um ambiente de coordenação bastante distorcido e rico em oxigênio e nitrogênio.³⁰

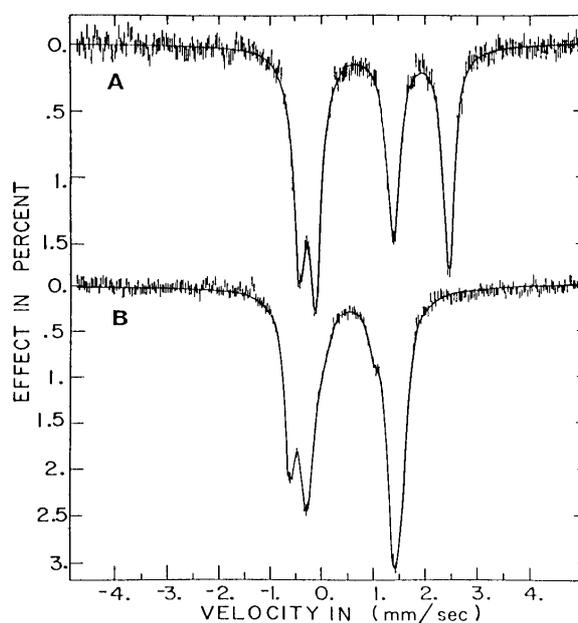


Figura 6: Espectros Mössbauer da forma ativa a 185 K (A) e inativa a 10 K(B) da UFPAP.³⁰

Os desdobramentos quadrupolares dos sítios de ferro são excepcionalmente grandes para um íon com estado S nominal, porém não tão grandes quanto os encontrados para centros binucleares de ferro das enzimas heme-trina ou ribonucleotídeo redutase oxidadas e compostos modelo relacionados, o que implica numa forte distorção da simetria octaédrica imposta pela estrutura do

ligante em um complexo binuclear. O desdobramento quadrupolar visto para o sítio cromofórico na enzima rosa é similar ao observado para a forma oxidada, o que sugere que a geometria de coordenação deste sítio não é influenciada pela redução da enzima.

1.1.5 Eletroquímica

O comportamento redox da ufPAP foi investigado através de microcoulometria, onde se observou uma variação do potencial de redução em função do pH.³¹ O potencial redox obtido no pH de máxima atividade da enzima (pH = 5,0) foi de + 367 mV vs ENH, e a pH = 6,0 E = + 306 mV vs ENH. A influência do pH nos potenciais de redução (60 mV / unidade pH) e o fato da velocidade de transferência de elétrons aumentar com o decréscimo do pH indicam a participação de um próton durante o processo de óxido-redução.

1.1.6 Mecanismo

Com base nas estruturas cristalinas e nas propriedades espectroscópicas, magnéticas e eletroquímicas, pode-se constatar uma grande similaridade entre os sítios ativos das diferentes fosfatases ácidas púrpuras, o que sugere que a catálise da reação de hidrólise de ésteres de fosfato ocorra através de um mecanismo similar. Sendo assim, duas propostas similares para o mecanismo de ação das PAP's encontram-se descritas na literatura, uma por Klabunde e colaboradores em 1996 (baseada na estrutura da kbPAP)²⁰ e a mais recente descrita por Lindqvist e colaboradores em 1999,¹³ a qual apresenta-se descrita a seguir.

Na primeira etapa da reação, o grupo fosfato do substrato liga-se à forma reduzida (ativa) da enzima por deslocamento de uma molécula de água e subsequente coordenação ao centro de Fe^{II} (Figura 7). Uma vez coordenado, o átomo de fósforo assume um caráter positivo, o que facilita um ataque nucleofílico do íon

hidróxido presente na esfera de coordenação do íon Fe^{III} , que se encontra em posição adequada para um ataque “em linha” sobre o átomo de fósforo. Devido ao fato desse ataque ocorrer do lado oposto ao grupo álcool do substrato, ocorre 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 de saída pelo resíduo 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 de forma bidentada e pode ser deslocado do centro de Fe^{III} por uma molécula de água, em uma reação de substituição.

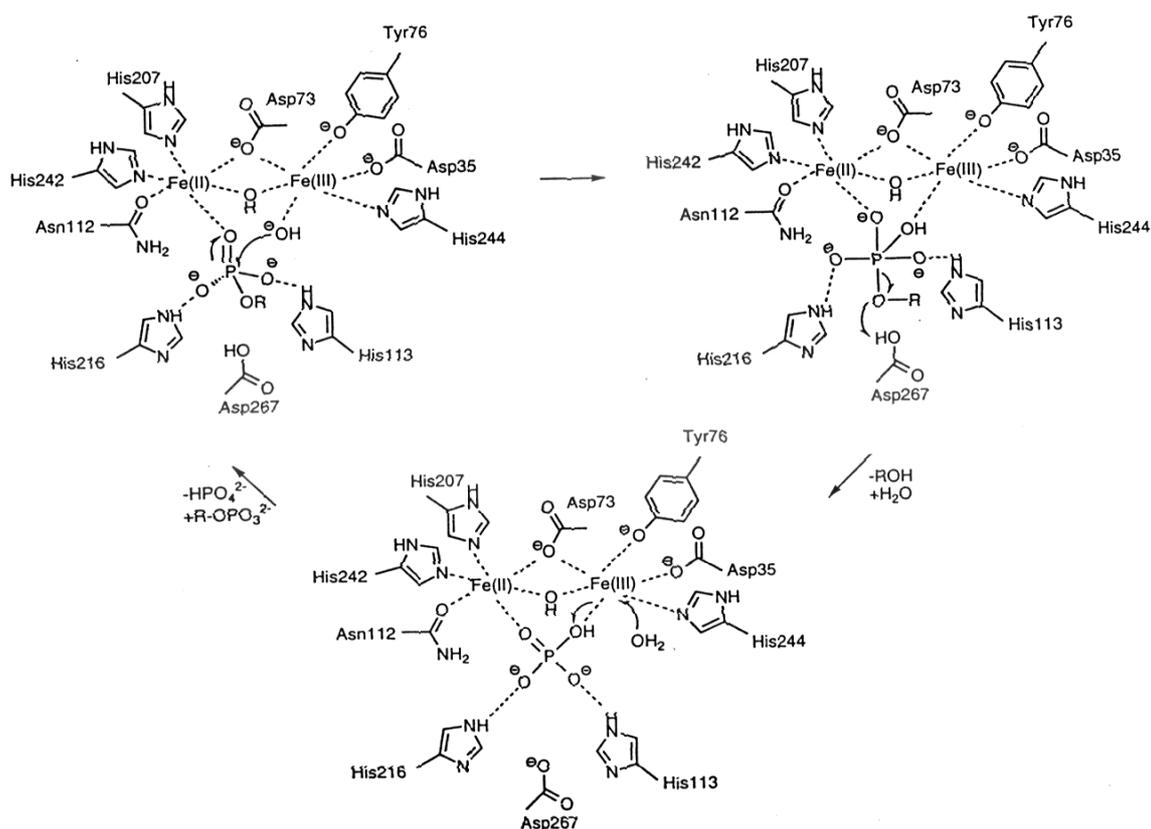


Figura 7: Mecanismo proposto por Lindqvist e colaboradores para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAP's.¹³

O ataque nucleofílico é facilitado por alguns fatores, de acordo com a proposta de Klabunde e colaboradores,²⁰ suportando o mecanismo descrito acima.

i) O íon Fe^{III} é um forte ácido de Lewis, capaz de gerar facilmente um grupo hidróxido nucleofílico a partir de uma molécula de água coordenada em sua primeira esfera de coordenação; ii) o íon Fe^{II} também age como um ácido de Lewis retirando densidade eletrônica do átomo de fósforo através de sua coordenação a um dos átomos de oxigênio do fosfato; iii) os resíduos de histidina His113 e His216, conservados no sítio ativo, aumentam a retirada da densidade eletrônica do átomo de fósforo por estabilização da carga negativa sobre os dois átomos de oxigênio do fosfato através de ligações de hidrogênio.

Estudos de RMN¹H realizados com uma PAP humana, denominada rechPAP, utilizando inibidores fosfato e fluoreto com variação do pH, reforçam a proposta de que o hidróxido nucleofílico seja responsável pelo ataque ao éster de fosfato.⁷

De acordo com o mecanismo proposto por Klabunde e colaboradores para a ação da kbPAP,²⁰ sugere-se que o resíduo His296 da enzima de plantas (correspondente à His216 na rbPAP) atue como um ácido geral que protona o grupo abandonador. Porém, na rbPAP a existência de um resíduo de ácido aspártico (Asp267) próximo ao resíduo de histidina sugere que o Asp267 esteja agindo como um ácido geral. Esta suposição deve-se ao fato de que no pH ácido ótimo para a reação, parece mais provável que o resíduo de ácido aspártico, preferencialmente ao resíduo de histidina, atue como doador na protonação do grupo abandonador.

Esta proposição tem sido observada no mecanismo das fosfatases ácidas de alta massa molecular, que também usam um grupo ácido (resíduo aspartato conservado) para a protonação do grupo abandonador.

Sendo assim, com base no mecanismo descrito acima, acredita-se que a principal função dos íons metálicos é agir como um ácido de Lewis em um processo catalítico onde não há o envolvimento de nenhum radical químico. Isto tem sugerido que as PAP's desempenham dupla atividade: como fosfatase e

como uma fonte de radicais hidroxila.¹³ No entanto, a verdadeira função fisiológica das PAP's ainda permanece não estabelecida.

1.2 COMPLEXOS MODELO

O somatório de informações obtidas por diversas técnicas de investigação, aliado a um trabalho de comparação dos resultados com modelos sintéticos, geram informações sobre o sítio ativo da enzima, possibilitando, assim, a proposta de modelos para o complicado “quebra-cabeças” que é o sítio ativo de uma metaloenzima.

Estas propostas de sítio ativo levam os pesquisadores a sintetizarem modelos que possam apresentar propriedades similares às da enzima estudada, culminando, às vezes, em modelos que apresentam inclusive propriedades de catálise, o que auxilia na compreensão do mecanismo de ação da enzima. Desta forma, à medida que as propriedades físico-químicas das PAP's foram sendo obtidas, diversos grupos de pesquisa têm colaborado com propostas para o seu sítio ativo, tentando assim, aproximar as propriedades e reatividade dos complexos modelo com as da enzima nativa.

Alguns dos principais ligantes utilizados na síntese de modelos para as PAP's são mostrados na Figura 8. Dentre estes, destaca-se o H₂BPBPMP,³² que além de proporcionar um caráter não-simétrico ao complexo, contém apenas dois grupos fenólicos, aproximando-se bastante do ambiente de coordenação presente no sítio ativo das PAP's, quando comparado a outros ligantes descritos até o momento.

A síntese de novos complexos com ligantes cada vez mais elaborados, têm levado os químicos a obter modelos sintéticos que mimetizam cada vez melhor as propriedades verificadas no sítio ativo das PAP's. Além de procurar a mimetização das propriedades e reatividade da enzima, vale destacar o grande avanço que o estudo de modelos sintéticos com diferentes ligantes proporciona do ponto de vista do entendimento da química de coordenação. Assim sendo, é muito interessante o estudo dos efeitos eletrônicos provocados por grupos substituintes,

doadores e/ou retiradores de elétrons, como por exemplo o $-\text{NO}_2$, que influenciam na basicidade dos complexos e conseqüentemente nas suas propriedades físico-químicas e de reatividade podendo desta forma contribuir no esclarecimento do mecanismo de ação das metaloenzimas.

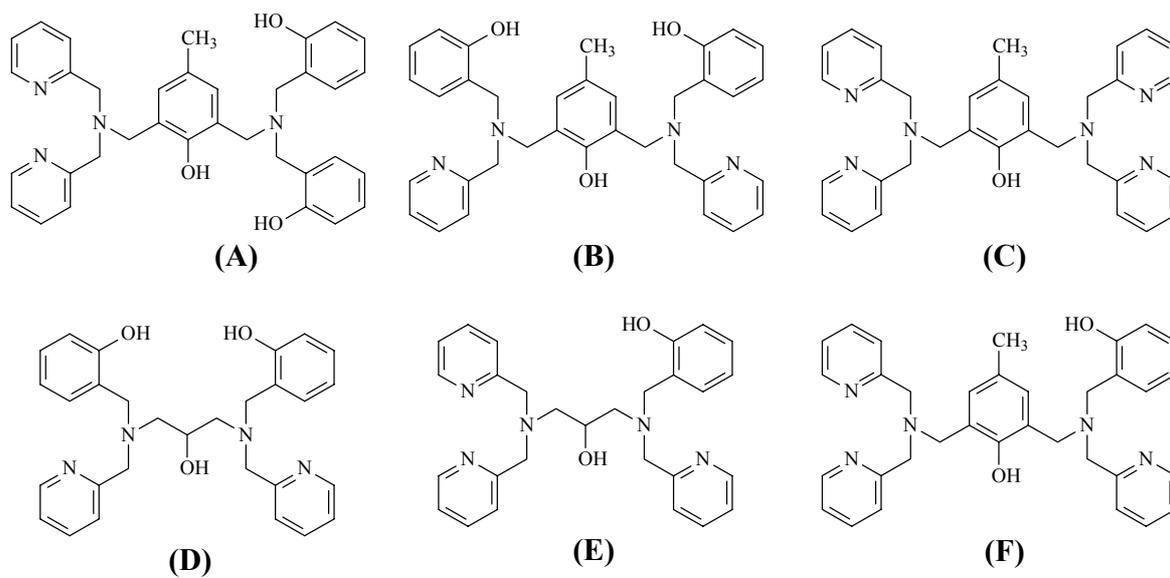


Figura 8: Representação esquemática de alguns dos principais ligantes utilizados na modelagem das PAP's, onde: **(A)** = H_3BPBBMP ,³³ **(B)** = H_3BBPMP ,^{34,35} **(C)** = HBPMP ,³⁶ **(D)** = $\text{H}_3\text{BBPPNOL}$,^{37,38} **(E)** = $\text{H}_2\text{BTPPNOL}$,^{38,39} **(F)** = H_2BPBPMP .^{32,35}

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção de novos compostos binucleares do tipo Fe(III) M(II), onde M = Fe, Mn e Cu, como modelos para fosfatases ácidas púrpuras.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese de um novo ligante não simétrico baseado no ligante H₂BPBPMP, com o grupo substituinte – NO₂ na posição cinco do anel fenólico;
- Caracterização deste ligante, através de análise elementar de CHN e técnicas espectroscópicas;
- Síntese dos complexos do tipo Fe^{III} M^{II} (onde M = Fe, Mn e Cu) com o respectivo ligante;
- Caracterização dos complexos por análise elementar, espectroscópicas e estruturais;
- Estudo de equilíbrio dos complexos em solução através de titulação potenciométrica;
- Estudo da reatividade dos complexos obtidos frente à hidrólise do diéster de fosfato bis (2,4-dinitrofenil) fosfato;
- Comparação entre as propriedades e reatividade destes compostos com seus análogos não substituídos, buscando correlacioná-las com os efeitos eletrônicos do grupo substituinte –NO₂;

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), 2-hidróxi-5-nitro-benzaldeído (Aldrich), trietilamina (Merck), hidróxido de sódio (Nuclear), formaldeído 37% (Vetec), cloreto de tionila (Merck), bicarbonato de sódio (Nuclear, Vetec), paládio/carbono 5% (Aldrich), ácido clorídrico 37% (Nuclear), sulfato de sódio anidro (Nuclear, Vetec), argônio 5.0 (White Martins), hidrogênio (White Martins), borohidreto de sódio (Aldrich), clorofórmio deuterado (Acros), água deuterada (Acros), acetato de manganês(II) tetrahidratado (Vetec), perclorato de ferro(III) nonahidratado (Aldrich), perclorato de ferro(II) hexahidratado (Aldrich), ácido L(+)-ascórbico (Merck), brometo de potássio espectroscópico (Acros), 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), acetonitrila UV/HPLC (Tedia, Mallinckrodt), acetonitrila PA (Nuclear), metanol PA (Nuclear), acetona PA (Nuclear), diclorometano PA (Nuclear), diclorometano UV/HPLC (Tedia, Mallinckrodt), clorofórmio PA (Nuclear), isopropanol PA (Nuclear), etanol absoluto (Carlo Erba), acetato de etila UV/HPLC (Vetec), éter etílico PA (Nuclear). Foram purificados antes de utilizados os seguintes reagentes: hexafluorofosfato de tetrabutilamônio TBAPF₆ (Aldrich, recristalizado em etanol/água) e carboxialdeído (Aldrich, destilado a 0,1 mm Hg).

3.1.2 Análise Elementar de CHN

A determinação dos percentuais de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio foi realizada em um analisador elementar de CHNS Carlo Erba modelo E-1110, na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC.

3.1.3 Espectroscopia de RMN

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker – AC 200F, na Central de Análises do Departamento de Química. As amostras foram solubilizadas em 0,5 mL de solvente deuterado (CDCl_3) contendo TMS como padrão interno e acondicionadas em tubo de 5 mm.

3.1.4 Espectroscopia na região do infravermelho - IV

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR – 2000, na região de 4000 a 450 cm^{-1} . As amostras foram preparadas por dispersão em KBr em grau espectroscópico e prensadas (10 toneladas) formando pastilhas com cerca de 1 cm de diâmetro e 0,5 mm de espessura. Estas pastilhas foram introduzidas diretamente no caminho óptico do equipamento para leitura do percentual de transmitância (%T).

3.1.5 Condutimetria

As análises de condutividade molar foram efetuadas em um condutivímetro Digimed CD-21, utilizando-se acetonitrila (grau espectroscópico) e concentrações de $1,0 \times 10^{-3}\text{ mol.L}^{-1}$ das espécies a serem analisadas. As análises foram realizadas após a calibração do equipamento com solução padrão de KCl ($0,01\text{ mol.L}^{-1}$ - $\Lambda_M = 1408\ \Omega^{-1}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$)⁴⁰ a temperatura de $25,00 \pm 0,05\text{ }^\circ\text{C}$ estabilizada com auxílio de um banho termostaticado.

3.1.6 Espectroscopia Eletrônica

Os espectros de absorção da região de 250 a 1200 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 acetonitrila de grau espectroscópico, com concentrações na ordem de 10^{-4} mol.L⁻¹.

3.1.7 Eletroquímica

O estudo do comportamento redox dos complexos foi realizado através de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada em um pontenciostato-galvanostato PAR modelo 273. Os experimentos foram realizados em soluções de acetonitrila contendo 0,1 mol.L⁻¹ de hexafluorofosfato de tetrabutilamônio, sob atmosfera de argônio, utilizando reagentes de grau espectroscópico e argônio 5.0 (H₂O, O₂ < 3 ppm). Os eletrodos de trabalho, referência e contra-eletrodo utilizados foram, respectivamente, disco de platina (área ~3 mm²), Ag/Ag⁺ e fio de platina. Ferroceno foi utilizado como padrão interno.⁴¹

3.1.8 Mössbauer

Os espectros Mössbauer dos complexos foram obtidos nas temperaturas de 298 K e 115 K, a partir de uma fonte móvel⁴¹ 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. Os experimentos foram realizados pelo Prof. Dr. Valderes Drago, do Departamento de Física da UFSC.

3.1.9 Difratometria de raios X

A análise de difração de raios X de monocristal foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC. Os dados foram coletados em um difratômetro Enraf-Nonius CAD-4 equipado com um tubo de molibdênio

(MoK α λ = 0,71073 Å) e monocromador de grafite à temperatura ambiente. A estrutura cristalina foi parcialmente resolvida através de métodos diretos com a utilização do programa SHELXS97.⁴³ A representação gráfica da estrutura parcial molecular foi gerada utilizando o programa ZORTEP.⁴⁴ A coleta de dados e a resolução parcial da estrutura foram realizadas pelo Prof. Dr. Adailton João Bortoluzzi.

3.1.10 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 KMnO₄ e etanol de grau espectroscópico. 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 fixado utilizando dados obtidos a partir da titulação potenciométrica de uma solução com volume conhecido de HCl $10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ com solução padrão de KOH $0,10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ livre de CO₂, 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 $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (KCl), em uma célula termostatizada (25,0°C), sob atmosfera de argônio. Essas soluções tiveram o pH ajustado para aproximadamente pH = 3,0 pela adição de HCl $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e foram tituladas com uma solução padrão de KOH $0,100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ até pH = 12,5, fornecendo cerca de 50 pontos. O pK_w da solução etanol/água (70/30 % V/V) contendo $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de KCl (força iônica) utilizado para os cálculos foi 14,71(2).⁴⁵ 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 após a obtenção de valores constantes de 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 e os diagramas de distribuição de espécies foram obtidas com os programas SPE e SPEPLOT.⁴⁵

As constantes de estabilidade foram 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.

3.1.11 Reatividade

A atividade catalítica dos complexos foi avaliada através da reação de hidrólise do substrato bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato [2,4-BDNPP]. Os experimentos cinéticos foram realizados em triplicata sob condições de excesso de substrato monitorando-se espectrofotometricamente, em um espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostaticado, a reação foi acompanhada pela variação de absorvância ocorrida em 400 nm ($\epsilon = 12100 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) relacionada à liberação do ânion 2,4-dinitrofenolato, como produto da reação de hidrólise. As reações foram realizadas 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 ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em água), 0,050 mL do complexo ($2,0\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em acetonitrila), quantidades adequadas de substrato, de 0,085 a 0,680 mL ($1,8\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em acetonitrila), e acetonitrila para complementar o volume final de 3,0 mL da mistura reacional.

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

A influência do pH sobre a velocidade da reação de hidrólise foi investigada numa faixa de pH entre 3,6 e 10,0, onde $[\text{complexo}] = 4,0\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $[\text{substrato}] = 5,0\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

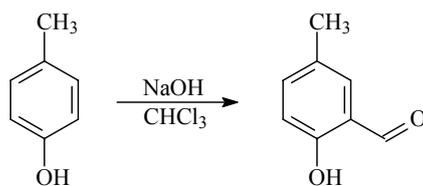
O gráfico das velocidades iniciais (V_o) em função do pH permitiu a obtenção dos valores de pK para as espécies em equilíbrio e pH ótimo (valor de pH onde a atividade catalítica é máxima). A determinação das velocidades iniciais em função da concentração do substrato foi realizada sob as mesmas condições

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-Burke permitiu a obtenção da constante catalítica (k_{cat}), velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) e constante de Michaelis-Menten (K_m), além do fator catalítico, definido pela razão entre a constante catalítica e a constante da reação não catalisada ($f = k_{\text{cat}} / k_{\text{não catalisada}}$), eficiência catalítica ($E = k_{\text{cat}} / K_m$) e constante de associação ($K_{\text{ass}} = 1 / K_m$).

3.2 SÍNTESE DO LIGANTE

3.2.1 Síntese do 2-hidroxi-5-metilbenzaldeído - HMB



O HMB foi preparado através de uma reação de formilação do p-cresol, baseada no procedimento descrito na literatura para a reação de Reimer-Tiemann.⁴⁶ Em um balão de 3 bocas com capacidade para 1000 mL, equipado com condensador e agitador mecânico, adicionou-se 500 mL de clorofórmio e 8,4 mL de p-cresol (0,08 mol, 108,14 g.mol⁻¹, 1,034 g.mL⁻¹). O balão foi colocado em um banho com temperatura controlada entre 56 - 60 °C e, sob agitação, iniciou-se a adição de 24 g de NaOH (0,6 mol, 40 g.mol⁻¹) solubilizados em 20 mL de água destilada, em pequenas porções durante as 3 primeiras horas de reação. A reação foi mantida por mais 1 hora e então se deixou resfriar até a temperatura ambiente. Adicionou-se então cerca de 100 mL de água destilada e, sob agitação, iniciou-se a neutralização com HCl concentrado, até pH = 2. A fase orgânica foi então separada, lavada com água destilada, seca com MgSO₄ anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. O material restante (óleo preto viscoso) foi destilado a pressão reduzida com auxílio de uma coluna de vigreux de 40 cm

(55 – 65 °C a 0,1 mm Hg). Obteve-se 57 g de 2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (0,08 mol, 36,15 g.mol⁻¹) com rendimento de 46 %.

P.F.: 56 °C.

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.

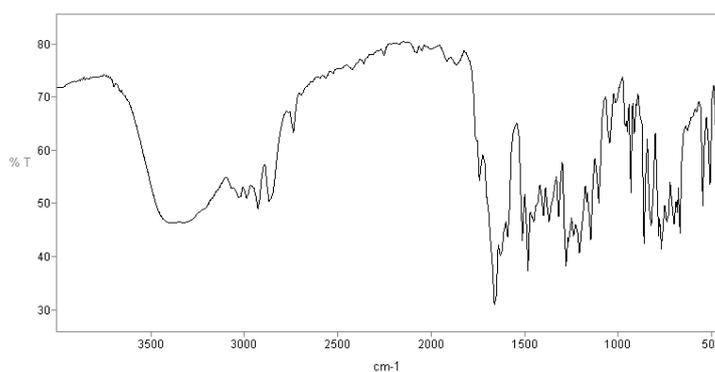


Figura 9: Espectro no IV do HMB em pastilha de KBr.

RMN¹H, ppm (CDCl₃): 2,34 (s, 3 H, CH₃); 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}).

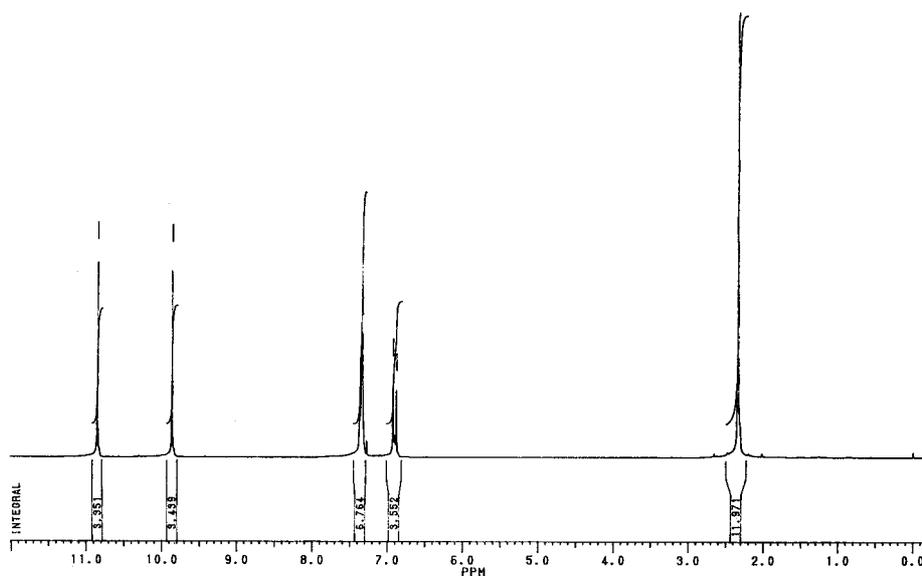
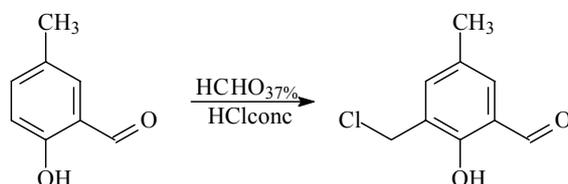


Figura 10: Espectro de RMN ¹H do HMB em CDCl₃.

3.2.2 Síntese do 2-clorometil-4-metil-6-formil-fenol - CMFF



Em um balão de 500 mL foram acondicionados 12,8 g de 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído (9,4 mmol, 136,15 g.mol⁻¹), 3,8 mL de formaldeído 37% e 50 mL de ácido clorídrico concentrado. 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. Obtiveram-se 10g do produto 2-clorometil-4-metil-6-formil-fenol (CMFF) (184,62 g.mol⁻¹) com 70 % de rendimento.

P.F.: 95-96 °C.

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 (C-O_{fenol}) 1257; δ (C-H_{ar}) 703; ν (C-Cl) 613.

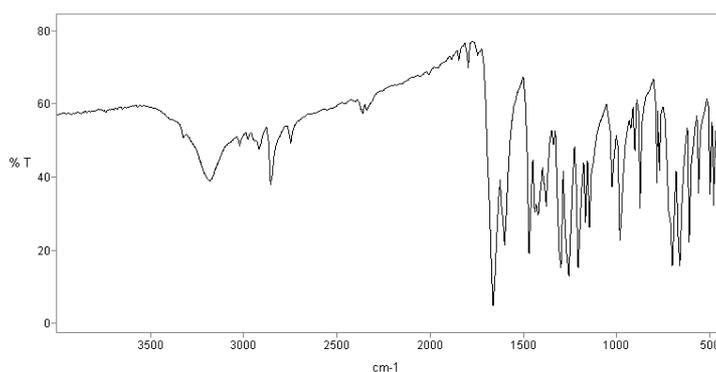


Figura 11: Espectro no IV do CMFF em pastilha de KBr.

RMN¹H, ppm (CDCl₃): 2,35 (s, 3 H, CH₃); 4,67 (s, 2 H, CH₂); 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}).

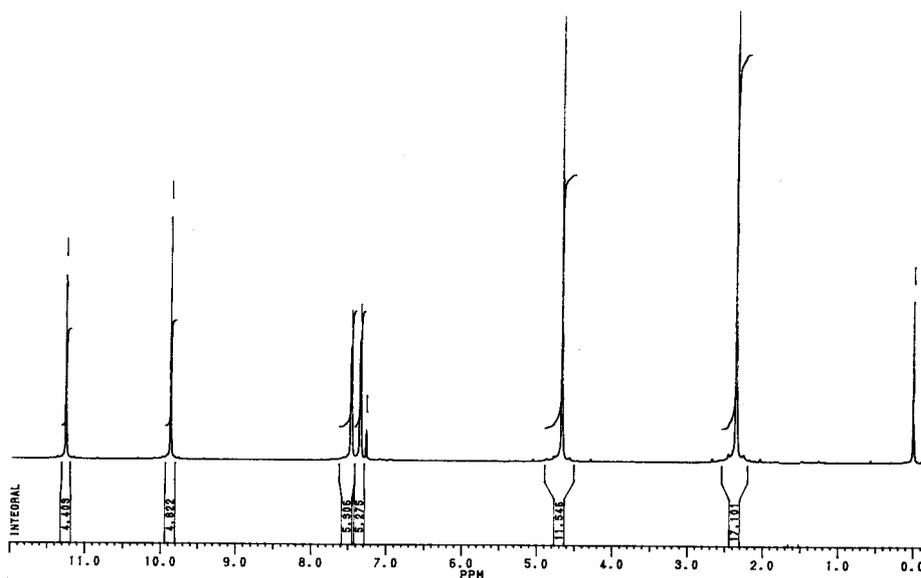
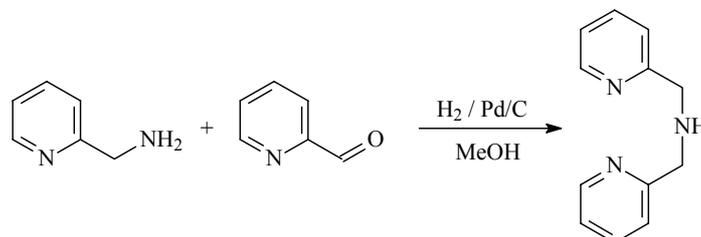


Figura 12: Espectro de RMN ¹H do CMFF em CDCl₃.

CUIDADO: Durante essa reação forma-se 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 na presença de base. A solução reacional e todos os resíduos devem ser descartados somente após correção do pH (pH>9,0) por adição hidróxido de sódio ou potássio.

3.2.3 Síntese da bis-(2-piridilmetil)amina - BPMA



O ligante BPMA foi sintetizado através de modificação do procedimento descrito na literatura.³⁸ Em um béquer de 400 mL foram adicionados 100 mL de metanol e 51,5 mL (108,14 g.mol⁻¹, 0,5 mol, 1,05 g.mL⁻¹) de 2-aminometilpiridina, sob agitação magnética e resfriados em um banho de gelo. Em seguida adicionaram-se 47,56 mL (107,11 g.mol⁻¹, 0,5 mol, 1,126 g.mL⁻¹) de 2-piridinacarboxialdeído e deixou-se a mistura reagir por uma hora. Então essa solução foi transferida para um frasco apropriado contendo 1,0 g de paládio/carbono 5% (previamente ativado em 50 mL de metanol por 1 hora), sob atmosfera de hidrogênio a 60 psi e agitada durante 15 horas. A solução foi então separada do catalisador por filtração e o solvente evaporado a pressão reduzida a 40 °C. Para eliminação completa do solvente, deixou-se o balão sob vácuo (0,1 mm Hg) por 12 horas aquecido a 40 °C. O produto foi então acondicionado em um frasco escuro e estocado em temperatura inferior a 0 °C. Rendimento quantitativo.

IV (KBr) em cm⁻¹: ν (N-H_{amina}) 3300; ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3062-2828; ν (C=N e C=C) 1592-1434; ν (C-N) 1148; δ (C-H_{ar}) 758.

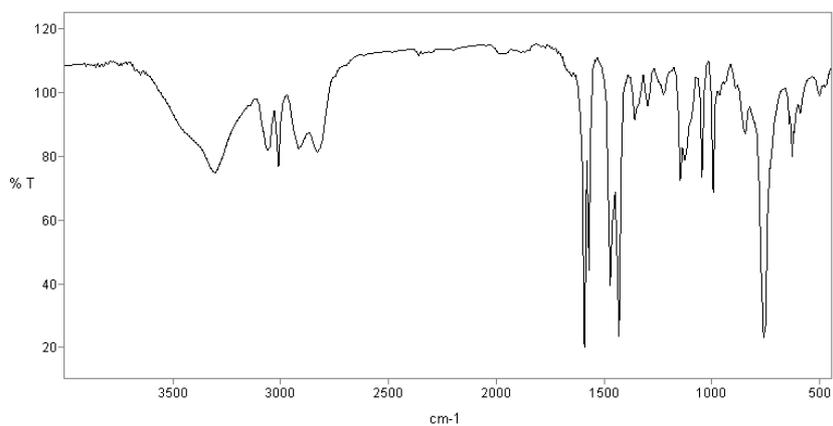


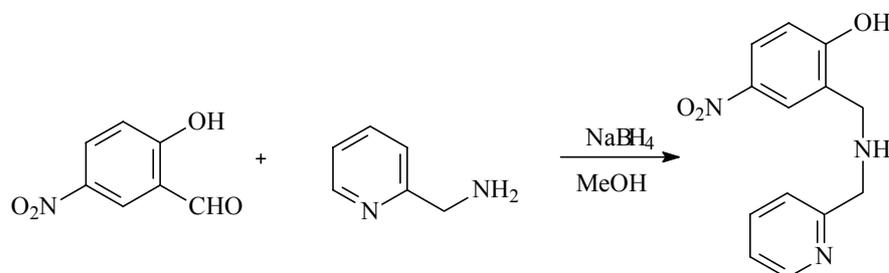
Figura 13. Espectro no IV do BPMA em filme.

RMN¹H, ppm (CDCl₃): 2,90 (s, 1 H, NH); 3,99 (s, 4 H, CH₂); 7,15 (dd, 2 H, CH_{ar}); 7,35 (d, 2H, CH_{ar}); 7,63 (dt, 2H, CH_{ar}); 8,56 (d, 2 H, CH_{ar}).



Figura 14: Espectro de RMN ¹H do BPMA em CDCl₃.

3.2.4 Síntese do precursor (2-hidróxi-5-nitrobenzil)(2-piridilmetil)amina - HBPA-NO₂



O HBPA-NO₂ foi preparado através de modificações do procedimento experimental descrito na literatura.²⁹ Em um béquer contendo 500 mL de metanol em um banho de gelo adicionou-se 10,3 mL (108,14 g.mol⁻¹; 1,049 g.mL⁻¹; 100 mmol) de 2-(aminometil)piridina, seguido por 16,7 g (167,12 g.mol⁻¹; 100 mmol) de 2-hidróxi-5-nitrobenzaldeído, sob agitação magnética. Após cerca de 5 minutos observou-se à formação de um precipitado amarelo e manteve-se a agitação magnética por mais 30 minutos e em seguida iniciou-se a adição de 3,8g (37,54g.mol⁻¹; 100 mmol) de borohidreto de sódio em pequenas porções durante 1 hora. Deixou-se reagir por mais uma hora e ajustou-se o pH entre 6 e 7 pela adição de HCl 2 mol.L⁻¹. O solvente foi evaporado sob vácuo a 40 °C e adicionou-se metanol a espuma restante, que foi levada ao freezer, onde permaneceu por alguns dias para precipitação do ligante. O precipitado foi filtrado sob vácuo e lavado com água gelada e posteriormente com metanol gelado. Deste modo obtiveram-se 19,5 g de HBPA-NO₂ (259 g.mol⁻¹) como um sólido de cor intensa amarela com um rendimento de 75 %.

P.F.: 158 - 160 °C.

IV (KBr), em cm⁻¹: ν (C-H_{Ar}) 3019; ν (C=N e C=C) 1591-1437; δ (O-H_{fenol}) 1379; ν (N=O)₂ 1336-1325; ν (C-O_{fenol}) 1279; δ (C-H_{Ar}) 768.

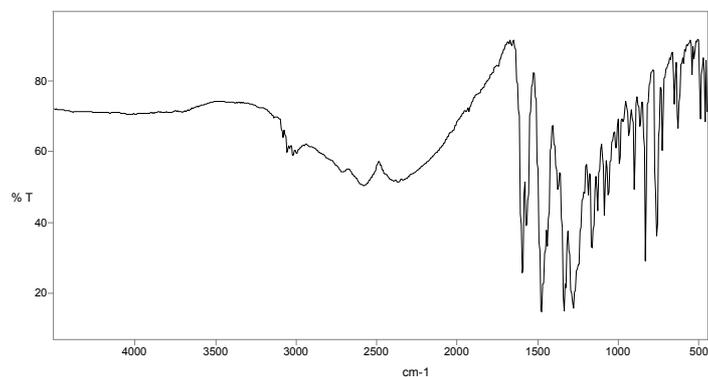


Figura 15: Espectro no IV do HbPA-NO₂ em pastilha de KBr.

RMN¹H, ppm (CDCl₃): 3,10 (1H, N-H); 3,95 (s, 2 H, CH₂); 4,07 (s, 2 H, CH₂); 6,86-8,13 (6 H); 8.59 (s, 1 H).

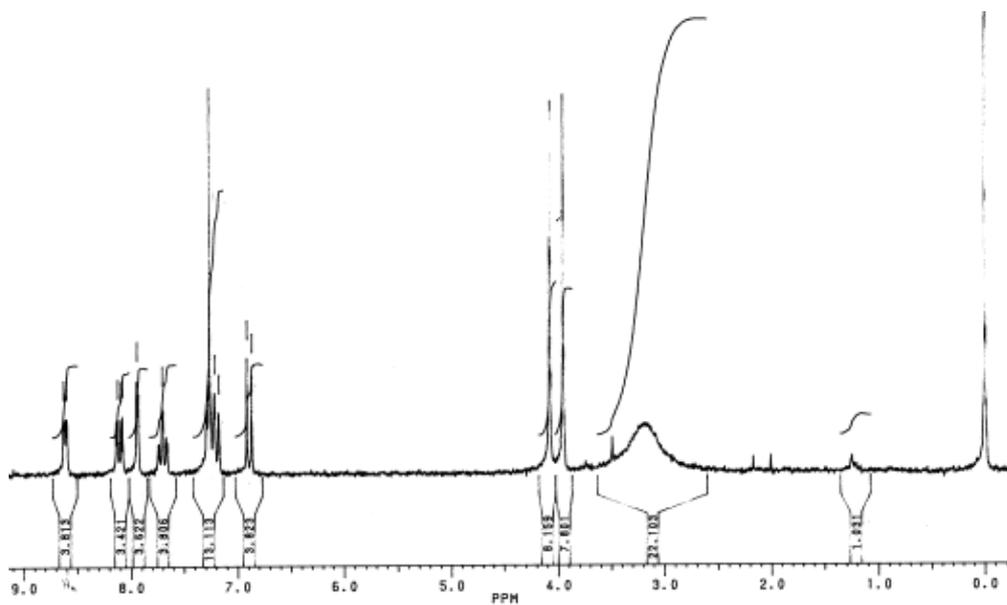
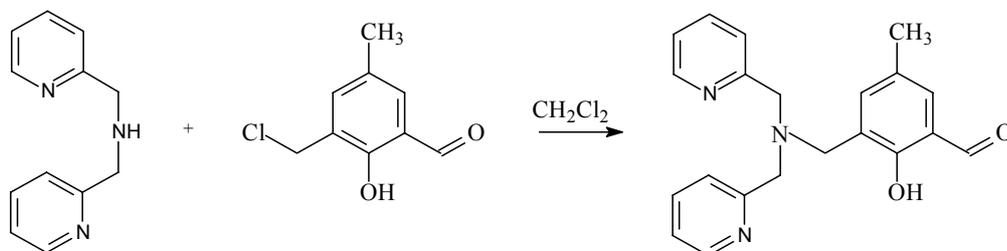


Figura 16: Espectro de RMN¹H do HbPA-NO₂ em CDCl₃.

3.2.5 Síntese do 2-[bis-(piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formil-fenol BPMAMFF



Realizou-se uma reação de substituição nucleofílica do cloreto no CMFF pela amina secundária do BPMA, formando 2-[bis-(piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formil-fenol (BPMAMFF). Em um balão de 250 mL, adicionou-se 5,6 g de CMFF (184,62 g.mol⁻¹, 0,03 mol), dissolvido em 80 mL de diclorometano e colocado em um banho de gelo. Uma solução de 6,0 g de BPMA (199,26 g.mol⁻¹; 0,03 mol) e 4,2 mL de trietilamina (101,19 g.mol⁻¹; 0,727 g.mL⁻¹; 0,03 mol) em 80 mL de diclorometano foi adicionada lentamente sobre o CMFF, realizando uma reação de substituição nucleofílica do cloreto no CMFF pela amina secundária do BPMA. Depois de completada a adição, o banho de gelo foi removido e a mistura reacional deixada sob agitação por 3 horas a temperatura ambiente. Terminada a reação, a solução resultante foi transferida para um funil de separação e lavada por 5 vezes com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado sob vácuo a 40 °C, restando um óleo amarelado que foi dissolvido em 40 mL de isopropanol a quente e transferido para um béquer. Após algumas horas, forma-se um precipitado cristalino que foi filtrado e lavado com isopropanol gelado. Obtiveram-se 8,0 g do BPMAMFF (347,42 g.mol⁻¹; 0,03 mol) com rendimento de 77%.

P.F.: 127-130 °C.

IV (KBr), em cm^{-1} : ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}) 3038-2849; ν (C=O) 1680; ν (C=N e C=C) 1591-1437; δ (O-H_{fenol}) 1378; ν (C-O_{fenol}) 1276; ν (C-N) 1114; δ (C-H_{Ar}) 773.

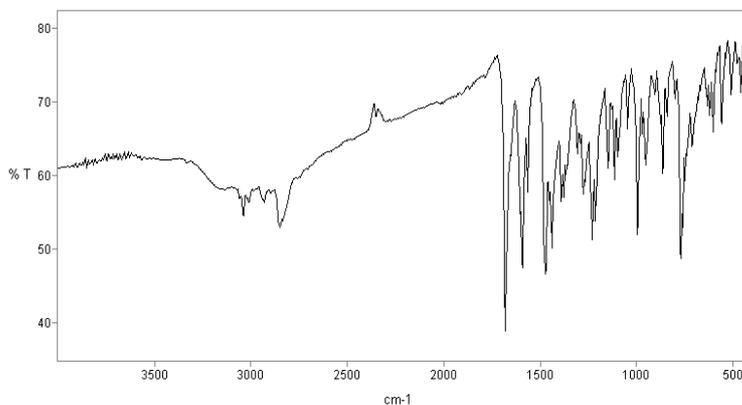


Figura 17: Espectro no IV do intermediário BPMAMFF em pastilha de KBr.

RMN¹H, ppm (CDCl₃): 2,30 (s, 3 H, CH₃); 3,74 (s, 2 H, ArCH₂N); 3,94 (s, 4 H, ArCH₂N); 7,18-7,30 (m, 3 H, CH_{ar}); 7,40-7,47 (m, 3 H, CH_{ar}); 7,64-7,72 (m, 2 H, CH_{ar}); 8,60 (d, 2 H, CH_{ar}); 10,45 (s, 1H, C-H_{ald}).

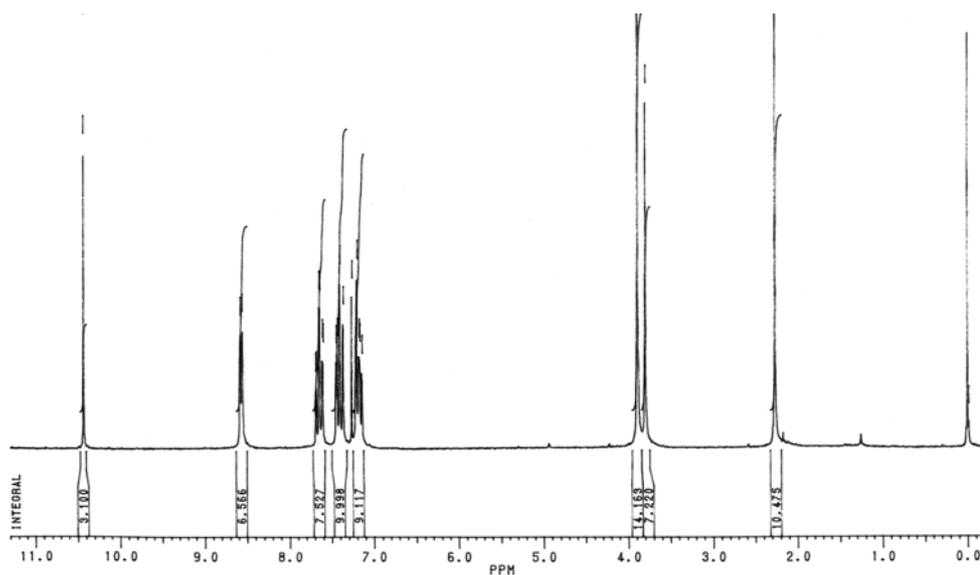
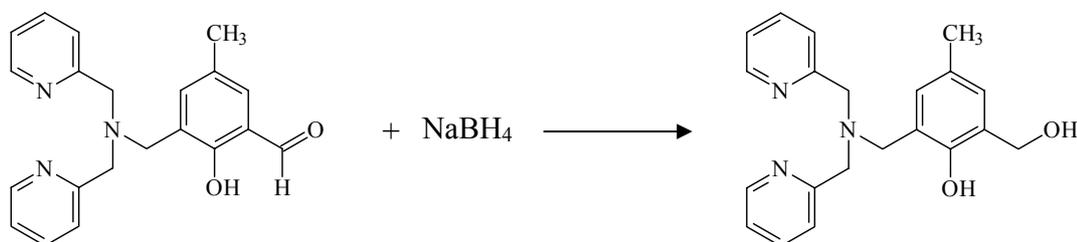


Figura 18: Espectro de RMN ¹H do intermediário BPMAMFF em CDCl₃.

3.2.6 Síntese do 2-[bis-(piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-hidroximetil fenol – BPMAMHF



Foram adicionados, em um balão de 125mL 6,30g (18,30mmol) de BPMAMFF dissolvidos em 40mL de THF e 40mL de metanol. Sob agitação magnética adicionou-se lentamente 0,68g (18,30mmol) de NaBH₄. Ajustou-se o pH entre 6-7 pela adição de HCl 2mol.L⁻¹. Evaporou-se o solvente a pressão reduzida e adicionou-se ao óleo restante 60mL de diclorometano e 30mL de água destilada. Transferiu-se a solução para um funil de separação e lavou-se a fase orgânica com solução de bicarbonato de sódio a 10%. A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. Obteve-se 6,20g do produto. O rendimento é quantitativo.

IV (KBr), em cm⁻¹: ν (O-H) 3461; ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}) 3043-2845; ν (C=N e C=C) 1592-1480; δ (O-H_{fenol}) 1379; ν (C-O_{fenol}) 1228; ν (C-N) 1116; δ (C-H_{Ar}) 771.

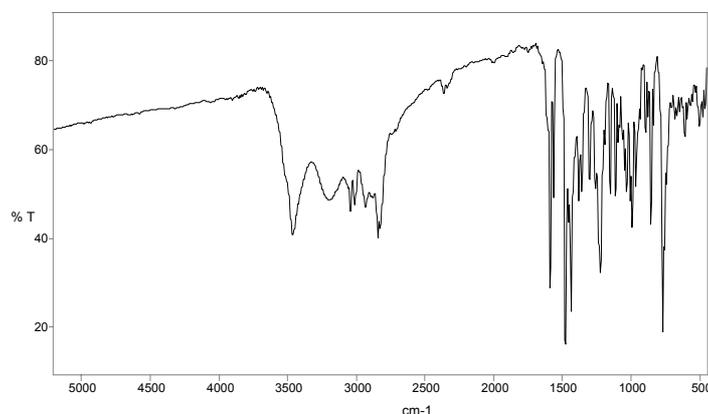


Figura 19: Espectro no IV do intermediário BPMAMHF em pastilha de KBr.

RMN¹H, ppm (CDCl₃): 2,23 (s, 3 H, CH₃); 3,76 (s, 2 H, ArCH₂N); 3,88 (s, 4 H, ArCH₂N); 4,73 (s, 2 H, ArCH₂OH); 6,82 (s, 1 H, CH_{Ar}); 6,95 (s, 1 H, CH_{Ar}); 7,17 (t, 2 H, CH_{Ar}); 7,32 (d, 2 H, CH_{Ar}); 7,63 (m, 2 H, CH_{Ar}); 8,56 (d, 2 H, CH_{Ar}).

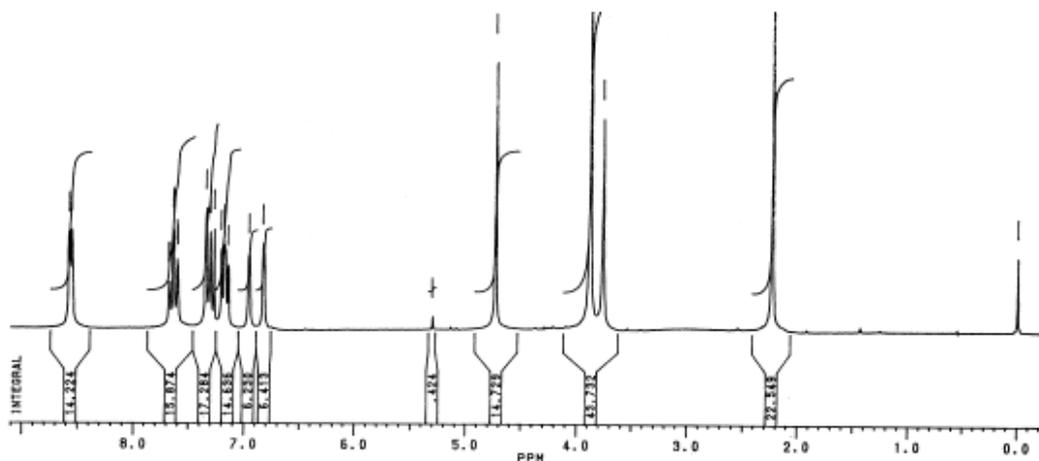
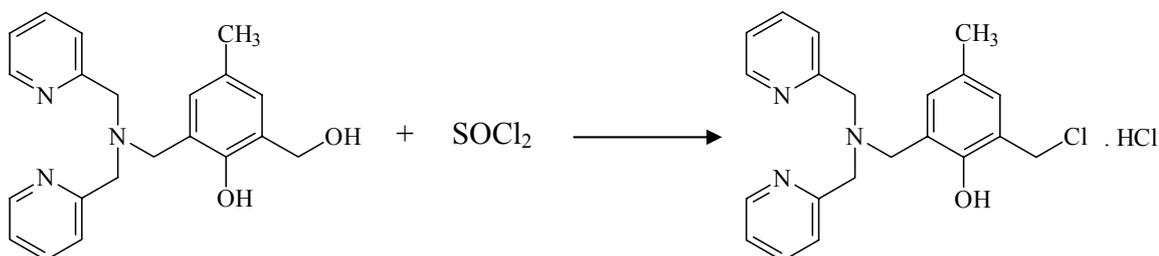


Figura 20: Espectro de RMN do intermediário BPMAMHF em CDCl₃.

3.2.7 Síntese do cloridrato de 2-[bis(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-clorometilfenol hidrocloreto – BPMAMCF.HCl



O BPMAMHF seco, 6,20g (17,8mmol), foi solubilizado em 60mL de diclorometano sob agitação magnética, formando uma solução sobre a qual adicionou-se, gota a gota, 1,50mL (17,8mmol) de cloreto de tionila. Formou-se

uma solução amarelo-clara que foi deixada reagir por 30 minutos. Evaporou-se o solvente até a secura em um evaporador rotatório sob vácuo a 40 °C. Adicionaram-se mais 50mL de diclorometano, que foi novamente evaporado, e repetiu-se este procedimento por mais duas vezes. A espuma amarelada restante foi seca sob alto-vácuo (0,1 mm Hg) a 40 °C por 24 horas, obtendo-se assim 7,00g do produto, com rendimento quantitativo.

IV (KBr), em cm^{-1} : ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}) 3056-2921; ν (C=N e C=C) 1616-1465; δ (O-H_{fenol}) 1380; ν (C-O_{fenol}) 1213; ν (C-N) 1164; δ (C-H_{Ar}) 765; ν (C-Cl) 623.

RMN¹H, ppm (D₂O): 2,07 (s, 3 H, CH₃); 3,71 (s, 4 H, ArCH₂N); 4,41 (s, 2H, ArCH₂Cl); 4,80 (s, 2H, ArCH₂Cl); 6,73 (s, 1 H, CH_{Ar}); 6,87 (s, 1 H, CH_{Ar}); 7,87 (m, 4 H, CH_{Ar}); 8,42 (t, 2 H, CH_{Ar}); 8,64 (d, 2 H, CH_{Ar}).

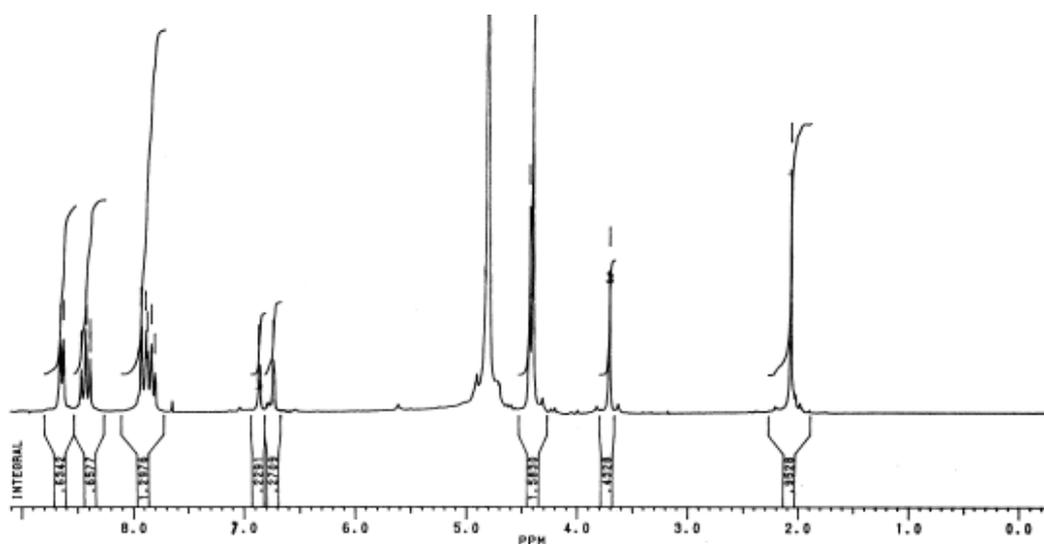
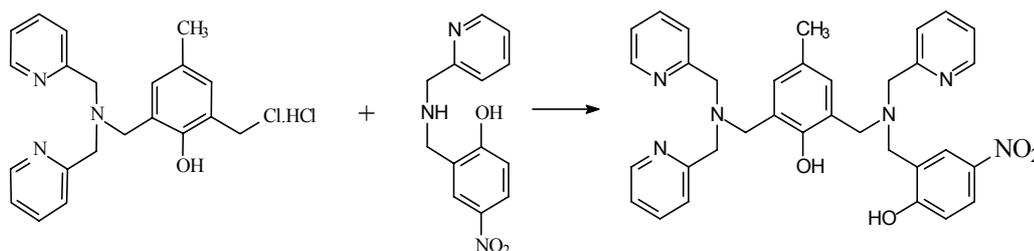


Figura 21: Espectro de RMN¹H do intermediário BPMAMCF.HCl.

3.2.8 Síntese do ligante 2-N-bis{(2-piridilmetil)-aminometil}-6-{(2-piridilmetil)(2-hidróxi-5-nitro-benzil)aminometil}-4-metilfenol (H₂BPBPMP-NO₂)



O ligante H₂BPBPMP-NO₂ foi preparado através de uma modificação do procedimento experimental descrito na literatura.²⁹ Em um balão contendo 100 mL de diclorometano, realizou-se a reação de 6,07 g de BPMAMCF.HCl (15 mmol; 404,34 g.mol⁻¹) com 3,89 g de HBPA-NO₂ (259 g.mol⁻¹; 15 mmol), na presença de 5,2 mL de trietilamina (37 mmol; 101,19 g.mol⁻¹; 0,727 g.mL⁻¹), sob refluxo e agitação magnética durante 30 horas. Após este período, a solução foi lavada 8 vezes com uma solução saturada de bicarbonato de sódio e a fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e o óleo amarelo resultante foi solubilizado em metanol. Esta solução foi mantida sob refrigeração (freezer) durante 24 horas, o que provocou a precipitação do produto, que foi filtrado e seco sob vácuo. Obtiveram-se 6,35 g do ligante H₂BPBPMP-NO₂ (590,68 g.mol⁻¹) com rendimento de 72 %.

P.F.: 80-81 °C

IV (KBr), em cm⁻¹: ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}) 3060-2824; ν (C=N e C=C) 1571-1434; ν (N=O)₂ 1335; δ (O-H_{fenol}) 1362; ν (C-O_{fenol}) 1290; ν (C-N) 1090; δ (C-H_{Ar}) 754.

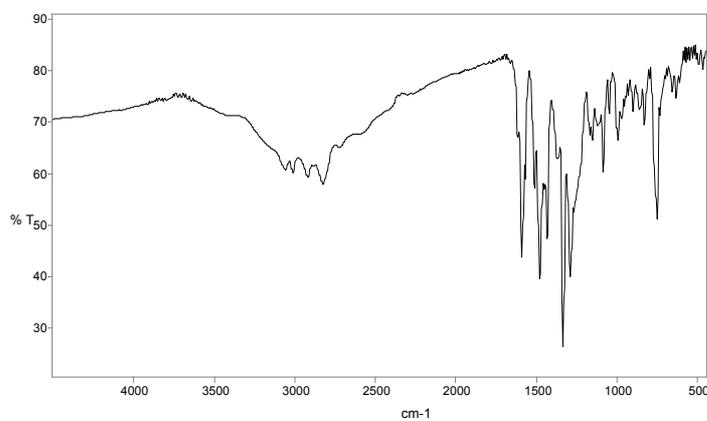


Figura 22: Espectro no IV do ligante H₂BPBPMP-NO₂ em pastilha de KB.

RMN¹H, ppm (CDCl₃): 2,19 (s, 3 H, CH₃); 3,92 (m, 12 H, CH₂-Ar); 6,81-8,07 (14 H, CH_{ar}); 8,56 (m, 3 H, CH_{ar})

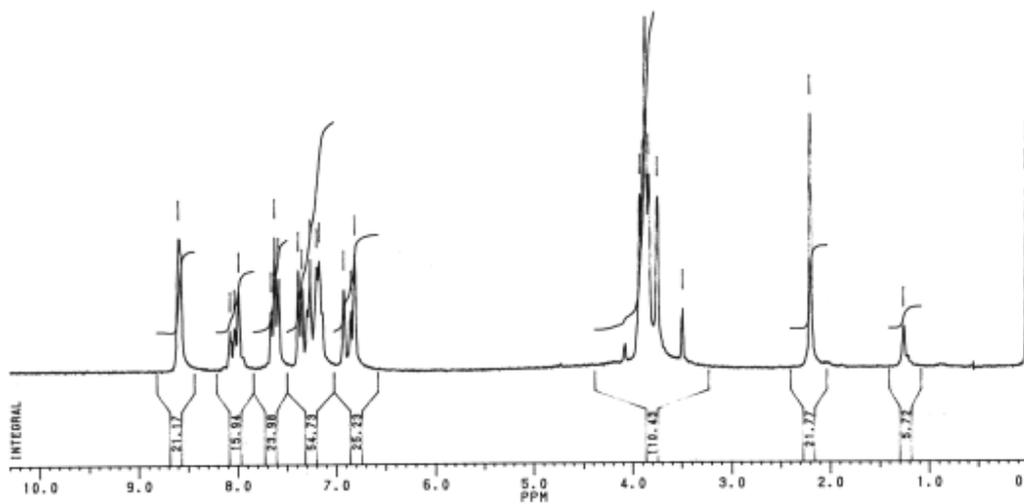
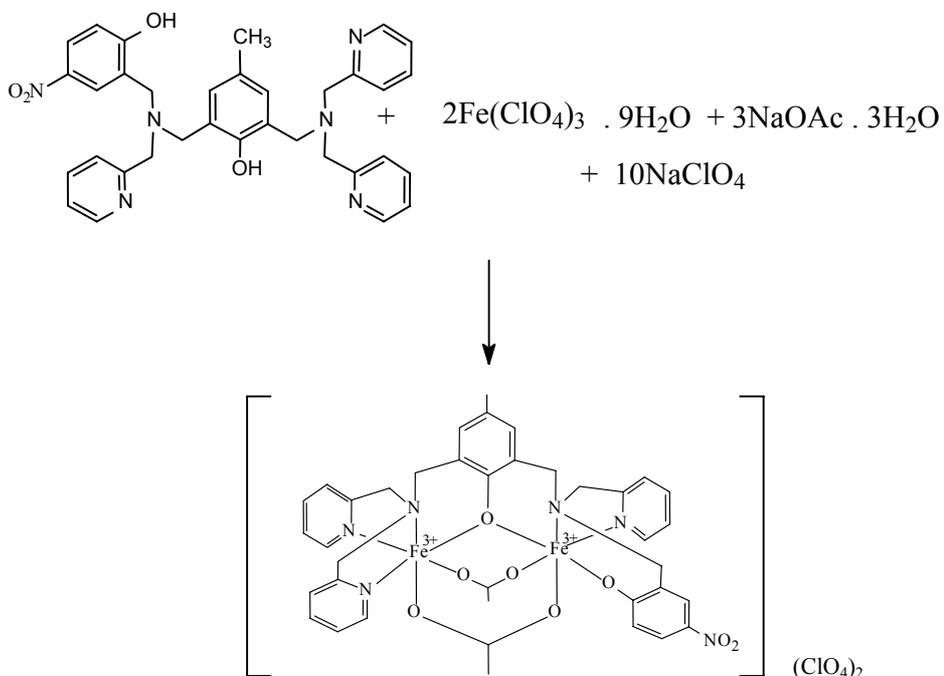


Figura 23: Espectro de RMN¹H do ligante H₂BPBPMP-NO₂ em CDCl₃.

3.3 SÍNTESE DOS COMPLEXOS

3.3.1 Síntese do complexo $[(\text{Fe}^{\text{III}})_2(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OAc})_2](\text{ClO}_4)_2$



A uma solução do ligante $\text{H}_2\text{BPBPMP-NO}_2$, 0,30g (0,50 mmol) em 15mL de metanol, foram adicionados sob agitação 0,51g (1,00 mmol) de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. A solução foi aquecida brandamente por 5 minutos. Adicionou-se então 0,18g (1,50 mmol) de $\text{NaOAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Manteve-se a mistura sob agitação e aquecimento por mais 10 minutos e adicionou-se em seguida 0,62g (5,00 mmol) de NaClO_4 . O solvente foi evaporado até aproximadamente 10mL. Adicionou-se 20mL de água destilada e o precipitado de cor azul intensa foi filtrado e lavado com água destilada, isopropanol e éter. Obteve-se 0,35g do complexo, com rendimento de 68%.

A estrutura acima mostrada, foi proposta, com base na estrutura já resolvida para o complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BPBPMP})(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4^{29}$, o qual apresenta o ligante com estrutura similar, mas sem o grupo $-\text{NO}_2$ na posição para ao fenol e nas análises realizadas.

$$\Lambda_M: 138 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$$

IV (KBr), em cm^{-1} : ν (O-H) 3431; ν (C=N e C=C) 1609-1448; ν_{ass} (OAc) 1557; ν_{sim} (OAc) 1448; ν (N=O)₂ 1306; ν (Cl-O) 1096; δ (C-H_{Ar}) 759.

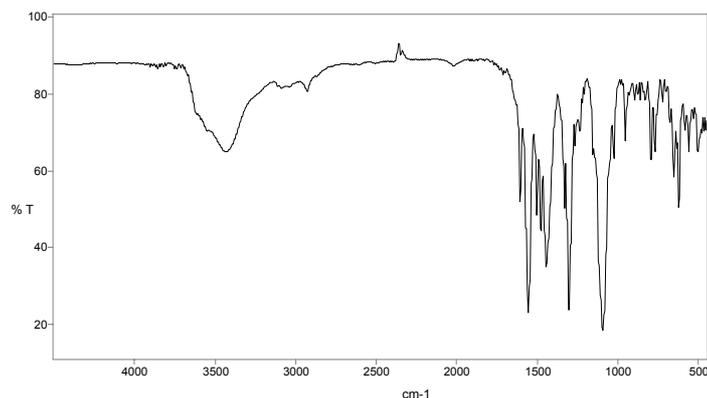
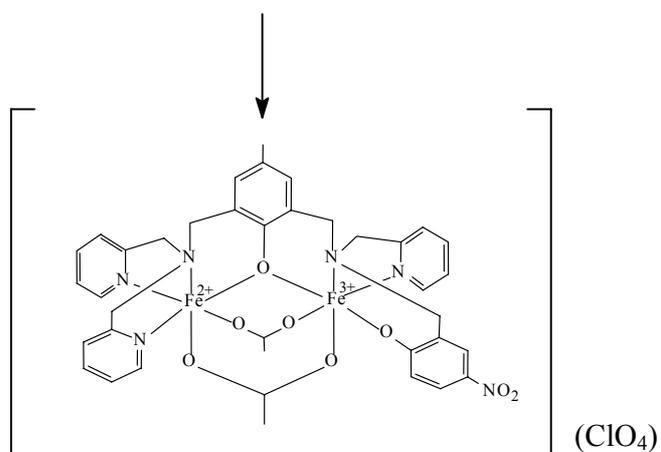
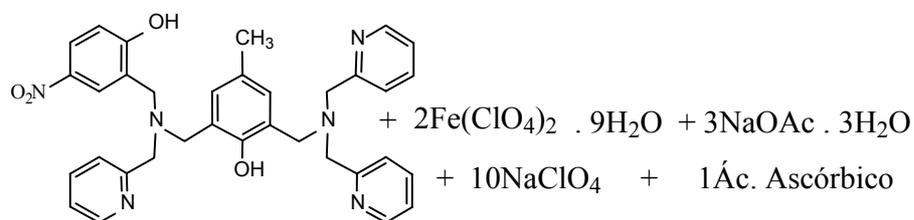


Figura 24: Espectro no IV do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BPBMP-NO}_2)(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ em pastilha de KBr.

3.3.2 Síntese do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BPBMP-NO}_2)(\mu\text{-OAc})_2](\text{ClO}_4)$



Em um balão de três bocas, com volume de 25mL, solubilizou-se 0,30g (0,5mmol) do ligante H₂BPBPMP-NO₂ em 15mL de metanol. Purgou-se argônio à solução por 5 minutos. Sob atmosfera de argônio e agitação adicionou-se então 0,36g (1mmol) de Fe(ClO₄)₂ · 6H₂O . A solução foi aquecida brandamente por aproximadamente 10 minutos em seguida adicionou-se 0,18g (1,5mmol) de NaOAc·3H₂O. Deixou-se a mistura reagir sob agitação por 10 minutos e acrescentou-se então 0,09g (0,5mmol) de ácido ascórbico e 0,61g (5mmol) de NaClO₄. Nesta etapa o argônio foi então removido e o solvente evaporado até o início da precipitação. Adicionou-se 20mL de água destilada e filtrou-se o precipitado de cor marrom escuro, lavando-se o mesmo com água destilada, isopropanol gelado e éter. Obteve-se desta forma 0,32g do complexo, com rendimento de 76%. O complexo foi recristalizado em metanol à quente, mas os cristais obtidos não foram adequados para resolução da estrutura de raios X.

Assim a estrutura acima mostrada, foi proposta, com base na estrutura já resolvida do complexo [Fe^{III}Fe^{II}(BPBPMP)(μ-OAc)₂]ClO₄²⁹,o qual apresenta o ligante com estrutura similar, mas sem o grupo –NO₂ na posição para ao fenol e nas análises realizadas.

$$\Lambda_M: 138 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$$

IV (KBr), em cm⁻¹: ν (O-H) 3442; ν (C-H_{Ar} e C-H_{alif}) 2917; ν (C=N e C=C) 1593-1433; ν_{ass} (OAc) 1571; ν (C-O) 1258; ν_{ass} (Cl-O) 1096; δ (C-H_{Ar}) 759.

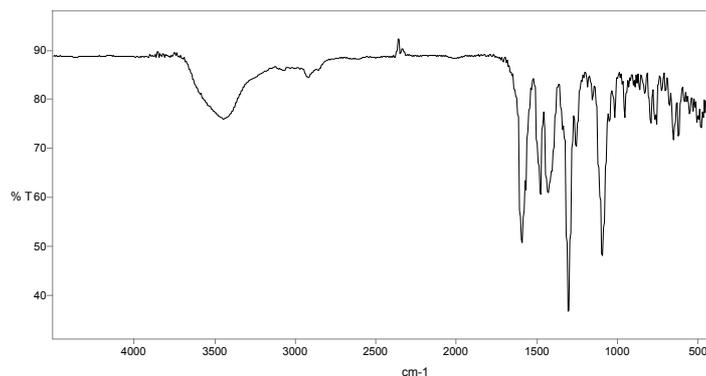
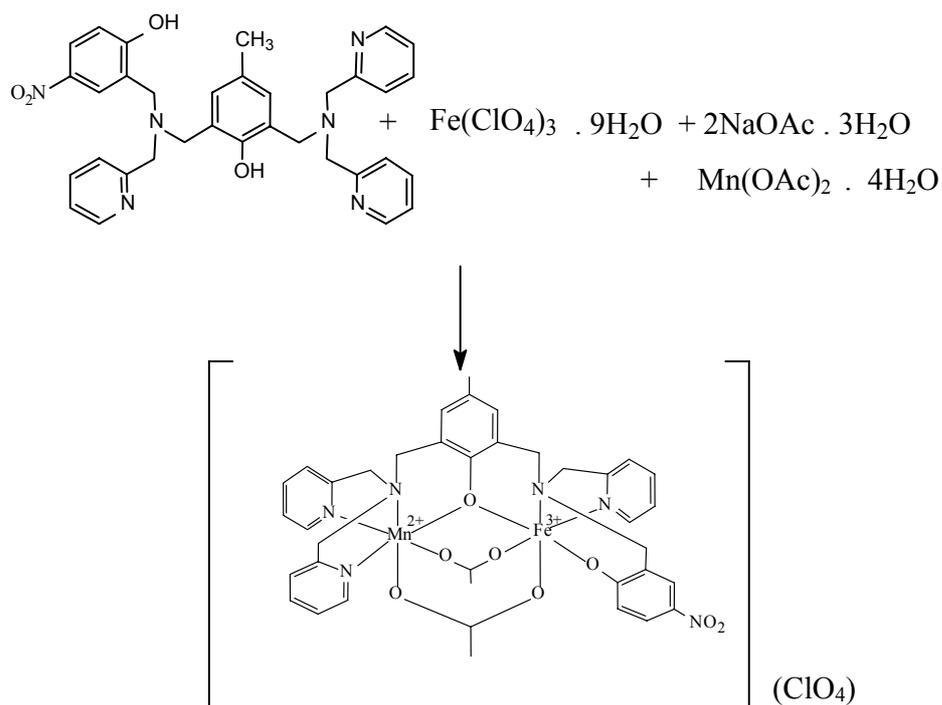


Figura 25: Espectro no IV do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}} \text{Fe}^{\text{II}}(\text{BPBMP-NO}_2) (\mu\text{-OAc})_2](\text{ClO}_4)$ em pastilha de KBr.

3.3.3 Síntese do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}} \text{Mn}^{\text{II}}(\text{BPBMP-NO}_2) (\mu\text{-OAc})_2](\text{ClO}_4)$



Em 40 mL de metanol dissolveu-se 0,30g (0,50 mmol) do ligante $\text{H}_2\text{BPBMP-NO}_2$ juntamente com 0,14g (1,00 mmol) de $\text{NaOAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, sob agitação e aquecimento moderados. Sobre esta solução foram adicionadas,

simultaneamente, soluções também metanólicas de $\text{Mn}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,12g , 0,50 mmol) e de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0,26g , 0,50 mmol) . A solução foi então mantida sobre aquecimento e agitação por 30 minutos. Em seguida filtrou-se a solução de cor marrom avermelhada e deixou-se a mesma em repouso por 24 horas. O precipitado microcristalino obtido foi filtrado e lavado com água destilada, isopropanol gelado e éter. O rendimento da reação foi de 70%.

O complexo foi recristalizado em uma mistura acetonitrila/metanol 1:1 e cristais foram obtidos, mas não eram adequados para resolução da estrutura.

$$\Lambda_M: 148 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$$

IV (KBr), em cm^{-1} : $\nu(\text{O-H})$ 3430; $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ e $\text{C-H}_{\text{alif}})$ 2922; $\nu(\text{C=N}$ e $\text{C=C})$ 1590-1430; $\nu(\text{N=O})_2$ 1302; $\nu(\text{ClO}_4)$ 1092; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 760.

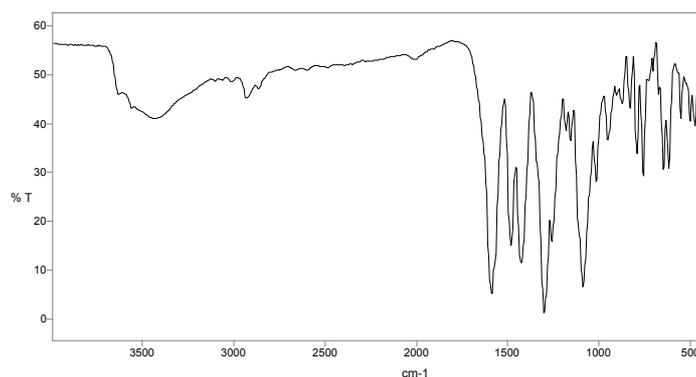
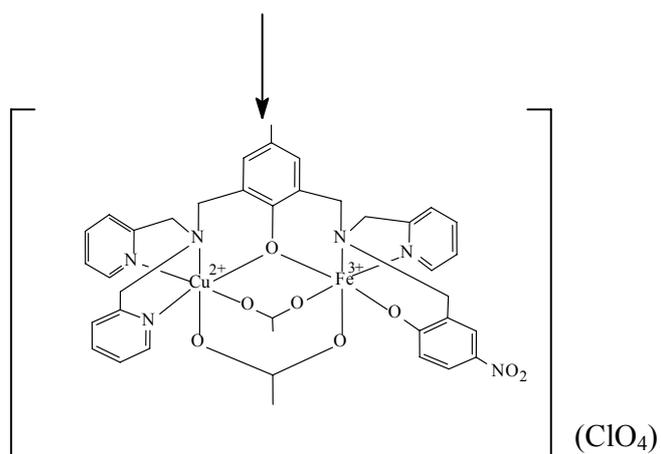
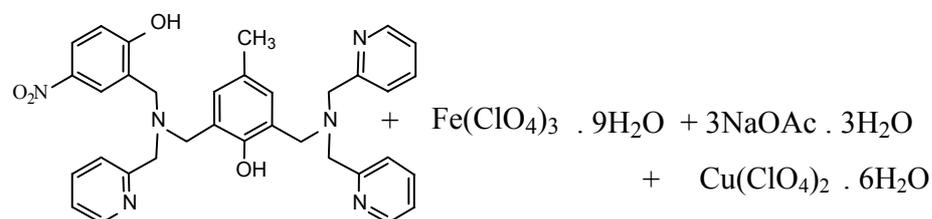


Figura 26: Espectro no IV do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}} \text{Mn}^{\text{II}}(\text{BPBPNP-NO}_2)(\mu\text{-OAc})_2](\text{ClO}_4)$ em pastilha de KBr.

3.3.4 Síntese do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OAc})_2](\text{ClO}_4)$



O complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OAc})_2](\text{ClO}_4)$ foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito na seção 3.3.3, para o complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OAc})_2](\text{ClO}_4)$. Obteve-se um sólido marrom avermelhado, com rendimento de 75%.

$$\Lambda_{\text{M}}: 145 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$$

IV (KBr), em cm^{-1} : $\nu(\text{O-H})$ 3424; $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ e $\text{C-H}_{\text{alif}})$ 2920; $\nu(\text{C=N}$ e $\text{C=C})$ 1609-1431; $\nu(\text{N=O})_2$ 1305; $\nu(\text{ClO}_4)$ 1090; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 766.

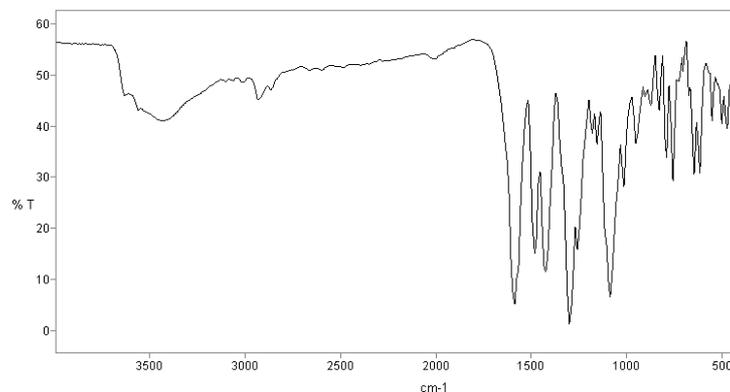


Figura 27: Espectro no IV do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}} \text{Cu}^{\text{II}}(\text{BPBPMP-NO}_2)_\mu(\text{OAc})_2](\text{ClO}_4)$ em pastilha de KBr.

3.3.5 Síntese do complexo $[(\text{Fe}^{\text{III}})_4(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OH})_3(\mu\text{-O})](\text{ClO}_4)_2$

Em 40 mL de metanol, dissolveu-se 0,30g (0,50 mmol) do ligante $\text{H}_2\text{BPBPMP-NO}_2$. Juntou-se a esta solução 0,18g (0,50 mmol) de $\text{Mn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e adicionou-se gota a gota uma solução metanólica contendo 0,26g (0,50 mmol) de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ sob agitação magnética e leve aquecimento. 1,5mL de solução de NaOH $0,1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi então gotejado lentamente sobre a solução. O aquecimento e agitação foram mantidos por mais 10 minutos. A solução foi filtrada e deixada em repouso por 48 horas. Obteve-se assim um precipitado de cor marrom escura, que foi filtrado e lavado com isopropanol gelado e éter e em seguida solubilizado em metanol à quente. Após vários dias de repouso em um frasco fechado obtiveram-se pequenos cristais de cor azul intensa, cuja estrutura foi parcialmente resolvida por difratometria de raio X.

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentadas as caracterizações e as respectivas discussões relativas às sínteses do ligante e dos complexos. Para que se possa visualizar melhor os compostos orgânicos e complexos sintetizados apresentamos nas Figura 28 e 29 as representações destes.

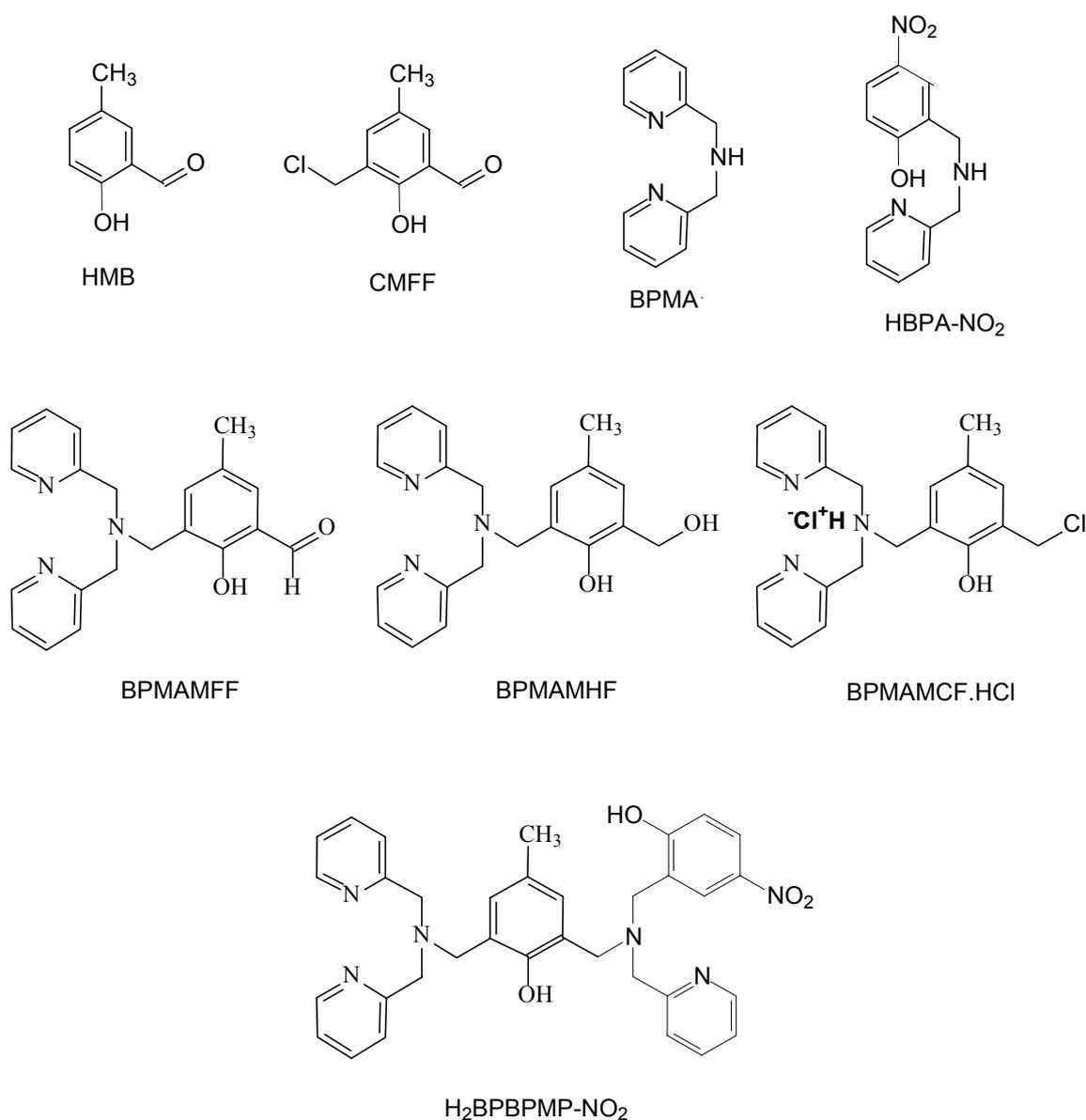
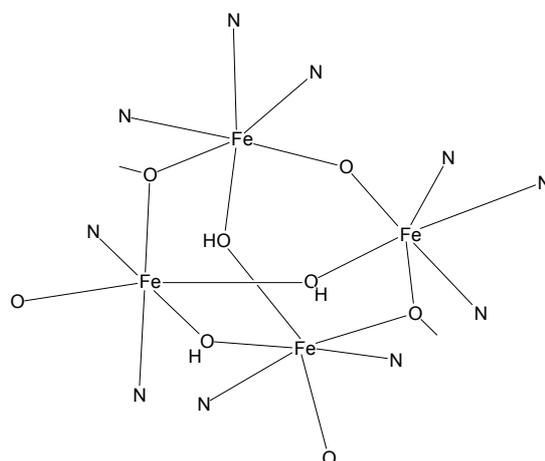
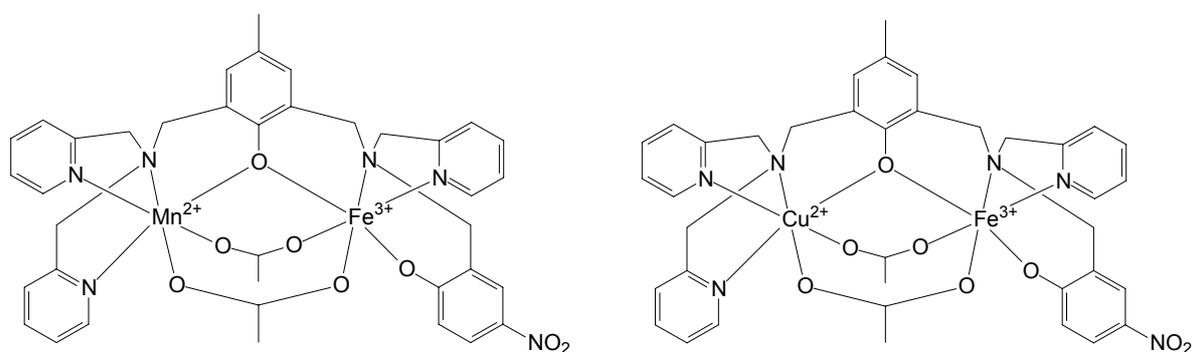
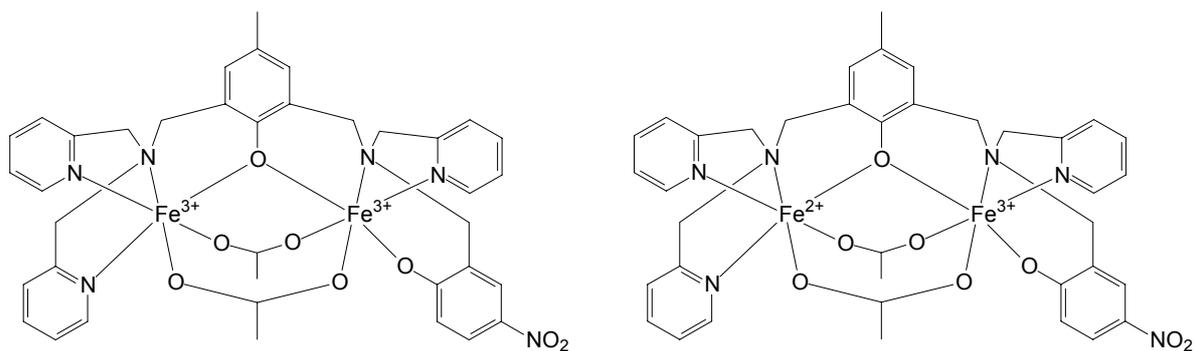


Figura 28: Representações dos compostos ligantes.



Representação do centro do complexo $[(\text{Fe}^{\text{III}})_4(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OH})_3(\mu\text{-O})](\text{ClO}_4)$

Figura 29: Representações dos complexos.

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES

Buscando-se aproximar ainda mais as propriedades físico-químicas dos complexos binucleares modelo para o sítio ativo das PAP's de $Fe^{III}M^{II}$ onde $M = Fe, Mn, Cu$ com as da metaloenzima, inseriu-se no ligante $H_2BPBPMP$ ³⁴ o grupo retirador de elétrons $-NO_2$ na posição 5 em relação ao fenol. Assim o ligante $H_2BPBPMP-NO_2$ foi sintetizado por modificações da rota sintética descrita por Neves e colaboradores³², como apresentado na seção experimental 3.2.

O ligante foi obtido com bom rendimento e elevado grau de pureza, estando adequado para a utilização nas sínteses dos complexos e teve todas suas etapas de síntese caracterizadas por espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

4.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho - IV

Como mencionado acima, o ligante, bem como todos os precursores foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho e as principais bandas foram atribuídas⁴⁷ com base em semelhança, de modo a serem utilizadas para acompanhar a formação dos compostos em cada etapa da reação. Os espectros são apresentados na seção 3.1. A Tabela 1 apresenta as principais bandas e atribuições para os compostos orgânicos sintetizados.

Tabela 1. Principais bandas e atribuições⁴⁷, em cm^{-1} , dos espectros no infravermelho para os compostos HMB (I), CMFF (II), BPMA (III), HBPA-NO₂ (IV), BPMAMFF (V), BPMAMHF (VI), BPMAMCF.HCl (VII) H₂BPBPMP-NO₂ (VIII).

Atribuições	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
$\nu(\text{N-H}_{\text{sec}})$	-	-	3300	-	-	-	-	-
$\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$	3024	3048	3062	3089	3038	3043	3056	3060
e	a	a	a	a	a	a	a	a
$\nu(\text{C-H}_{\text{alif}})$	2864	2852	2828	2992	2849	2845	2921	2824
$\nu(\text{C-H}_{\text{ald}})$	2738	2749	-	-	2849	-	-	-
$\nu(\text{C=O})$	1658	1664	-	-	1680	-	-	-
$\nu(\text{C=N})$	1590	1600	1592	1591	1591	1592	1616	1571
e	a	a	a	a	a	a	a	a
$\nu(\text{C=C})$	1484	1470	1434	1437	1437	1480	1465	1434
$\delta(\text{O-H}_{\text{fenol}})$	1372	1378	-	1379	1378	1379	1380	1362
$\nu(\text{N=O})_2$	-	-	-	1336 e 1325	-	-	-	1335
$\nu(\text{C-O}_{\text{fenol}})$	1282	1257	-	1279	1276	1228	1213	1290
$\nu(\text{C-N})$	-	-	1148	1092	1114	1116	1164	1090
$\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$	742	703	758	768	773	771	765	754
$\nu(\text{C-Cl})$	-	613	-	-	-	-	623	-

Os precursores HMB, CMFF e BPAMFF apresentam uma banda intensa em torno de 1660 cm^{-1} atribuída à vibração de deformação axial da ligação C=O, característica de aldeídos. Geralmente esta banda aparece em torno de $1740\text{-}1720 \text{ cm}^{-1}$, porém nestes compostos a frequência de absorção foi reduzida devido à conjugação do aldeído com o anel aromático.

O aparecimento das bandas típicas de estiramento da ligação C-Cl em 613 cm^{-1} no espectro do CMFF e 623 cm^{-1} no espectro do BPMAMFF, quando estes são comparados aos espectros de seus precursores é mais uma evidência de sua formação.

O espectro na região do infravermelho do BPA é característico de uma amina secundária, que apresenta uma banda larga e de fraca intensidade na

região de 3300-3350 cm^{-1} . Já para o HBPA- NO_2 não foi possível a observação desta banda, visto que ela apresenta forte dependência com relação à formação de ligações de hidrogênio, dificultando, portanto sua atribuição. Este efeito pode ser provocado por ligações inter ou intramoleculares, ou pela presença de solvente, podendo apresentar um alargamento, um deslocamento e até mesmo o não aparecimento da banda no espectro.

A redução do aldeído BPMAMFF para o respectivo álcool BPMAMHF foi confirmada pelo surgimento da banda em 3461 cm^{-1} , característica de vibrações de deformação axial de O-H, e também pelo desaparecimento da banda em 1680 cm^{-1} referente ao estiramento C=O do aldeído.

A substituição do cloreto pela amina HBPA- NO_2 para a formação do ligante final $\text{H}_2\text{BPBPMP-NO}_2$ foi acompanhada pelo desaparecimento da banda em 623 cm^{-1} , típica de deformação axial C-Cl.

4.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio - RMN ^1H

A espectroscopia de RMN ^1H também foi uma ferramenta bastante útil para a caracterização de cada composto orgânico sintetizado. Os espectros são apresentados na seção 3.2. Os deslocamentos químicos (δ_{H} em ppm) e a integração dos sinais observados nos espectros de RMN ^1H permitiram determinar o número de prótons presentes em cada composto orgânico e distinguir entre os átomos de hidrogênio metílicos, metilênicos e aromáticos e ainda os prótons de álcoois, aldeídos e aminas e são mostrados na Tabela 2. A relação entre o número dos diferentes átomos de hidrogênio permitiu confirmar a obtenção do ligante e de seus precursores sintetizados com pureza adequada.

Tabela 2. Deslocamentos químicos em ppm e atribuições, observados nos espectros de RMN ^1H para os compostos HMB (I), CMFF (II), BPMA (III), HBPA-NO₂ (IV), BPMAMFF (V), BPMAMHF (VI), BPMAMCF.HCl (VII) e H₂BPBPMP-NO₂ (VIII).

Atribuições	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
CH ₃	2,34/3H	2,35/3H	-	-	2,30/3H	2,23/3H	2,07/3H	2,19/3H
Ar-CH ₂ -Cl	-	4,67/2H	-	-	-	-	4,41/2H 4,80/2H	-
Ar-CH ₂ -N	-	-	3,99/4H	3,95/2H 4,07/2H	3,74/2H 3,94/4H	3,76/2H 3,88/4H	3,71/4H	-
Ar(CH ₂)OH	-	-	-	-	-	4,73/2H	-	-
NH	-	-	2,90/1H	3,10/1H	-	-	-	-
CH _{ar}	6,90/1H 7,34/2H	7,35/1H 7,46/1H	7,15/2H 7,35/2H 7,63/2H 8,56/2H	6,86- 6,91/1H 7,17- 7,26/2H 7,70/1H 7,94/1H 8,09/1H 8,59/1H	7,18- 7,30/3H 7,40- 7,47/3H 7,64- 7,72/2H 8,60/2H	6,82/1H 6,95/1H 7,17/2H 7,32/2H 7,63/2H 8,56/2H	6,73/1H 6,87/1H 7,87/4H 8,42/2H 8,64/2H	6,81- 8,07/14H 8,56/3H
CH _{ald}	9,85/1H	9,86/1H	-	-	-	-	10,15/1H	-
OH _{fenol}	10,84/1H	11,25/1H	-	-	-	-	-	-

4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

Os complexos binucleares $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OAc})_2](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$, $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$, $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ e o complexo tetranuclear $[(\text{Fe}^{\text{III}})_4(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OH})_2(\mu\text{-O})_2](\text{ClO}_4)_2$ agora serão chamados de complexos **1**, **2**, **3**, **4** e **5** respectivamente.

Todos os complexos foram sintetizados partindo-se da estequiometria metal/ligante 2:1. Acetato de sódio triidratado também foi adicionado, por conter

grupos formadores de pontes exógenas, exceto para o complexo **5**, cujo objetivo de síntese era a obtenção de um complexo de valência mista do tipo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ com pontes $\mu\text{-OH}$. Para garantir a precipitação do complexo **2** na forma mista ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$), utilizou-se além do perclorato de $\text{Fe}(\text{II})$, atmosfera de argônio e ácido ascórbico como redutor.

Todos complexos foram recristalizados em várias condições e diferentes meios, sendo em alguns casos obtidos cristais, porém com exceção do complexo **5**, que teve sua estrutura parcialmente resolvida, nenhum dos outros cristais obtidos apresentou-se adequado para resolução da estrutura cristalina por difratometria de raio X.

Para o complexo **5** ainda não foi realizada nenhuma outra análise, além da difratometria de raio X.

Os complexos são pouco solúveis em água, no entanto apresentam boa solubilidade em solventes orgânicos como: acetonitrila, acetona, diclorometano e metanol.

4.2.1 Análise elementar de C,H e N

Os complexos **2 e 3** foram caracterizados por análise elementar de CHN e apresentaram resultados concordantes com as fórmulas moleculares propostas. A Tabela 3 mostra a fórmula molecular, massa molar e as porcentagens de C, H, e N (calculada/encontrada) para os complexos estes compostos.

Tabela 3. Resultados das análises elementares de C,H e N para os complexos **2** e **3**.

Complexo	Fórmula Molecular	Massa Molar (g.mol ⁻¹)	%C	%H	%N
			calc/enc	calc/enc	calc/enc
2	Fe ₂ C ₃₈ H ₃₈ N ₆ O ₁₂ Cl .4H ₂ O	989,96	46,10/46,21	4,68/4,45	8,49/8,46
3	FeMnC ₃₈ H ₃₈ N ₆ O ₁₂ Cl .5H ₂ O	1007,07	45,32/45,25	4,80/4,37	8,35/8,33

4.2.2 Condutimetria

As medidas de condutividade molar foram efetuadas em soluções recém preparadas dos complexos **1**, **2**, **3** e **4** em acetonitrila com concentrações 1,0 x 10⁻³ mol.L⁻¹ a 25 °C. Os resultados de condutividade molar (Λ_M) e as atribuições⁴⁸ dos tipos de eletrólitos para os complexos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados da condutimetria para os complexos **1**, **2**, **3** e **4**.

Complexo	Λ_M ($\Omega^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$)	Tipo de eletrólito
1	288	1:2
2	138	1:1
3	148	1:1
4	145	1:1

Segundo Geary,⁴⁸ valores de condutividade molar na faixa de 120-160 $\Omega^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ e 220-300 $\Omega^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ são típicos de soluções de eletrólito 1:1 e 2:1 respectivamente, em acetonitrila a 25 °C e concentração

$1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Portanto pode-se afirmar que o composto **1** apresenta cátion de carga +2 enquanto que os compostos **2**, **3** e **4** possuem cátion de carga +1.

4.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho - IV

A espectroscopia no IV é geralmente utilizada como uma análise preliminar e mostrou-se muito útil na caracterização inicial dos complexos, uma vez que a formação dos mesmos pôde ser acompanhada pela presença das bandas características do ligante. Sendo assim, os espectros no infravermelho dos complexos **1**, **2**, **3** e **4** são bastante similares aos espectros do respectivo ligante, indicando a presença do mesmo nos compostos isolados. Bandas adicionais, referentes ao contra-íon, ligantes ponte e moléculas de água também são observadas. Na Tabela 5 estão apresentadas as principais bandas e atribuições^{47,49} para os complexos **1**, **2**, **3** e **4**.

Tabela 5. Principais bandas e atribuições^{47,49} em cm^{-1} dos espectros no infravermelho para os complexos **1**, **2**, **3** e **4**.

Atribuições	Complexo 1	Complexo 2	Complexo 3	Complexo 4
ν (O–H)	3431	3442	3430	3424
ν (C–H _{ar} e C–H _{alif})	-	2919	2992	2920
ν (C=N e C=C)	1609-1448	1593-1433	1587-1426	1609-1431
ν_{ass} (OAc)	1557	1571	-	1546
ν_{sim} (OAc)	1448	-	-	-
ν (C–O)	-	1258	1259	1252
ν (Cl–O)	1094	1096	1089	1090
δ (C–H _{ar})	771	759	764	766

A Figura 30 ilustra uma sobreposição dos espectros do ligante livre e do complexo **2** onde podem ser observadas as similaridades e diferenças para o ligante livre e complexado.

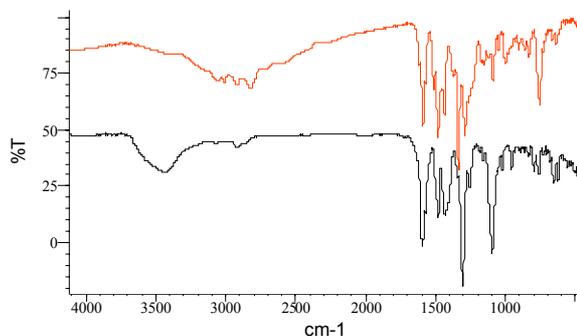


Figura 30: Espectros no infravermelho do ligante $H_2BPBMP-NO_2$ livre (espectro em vermelho) e do complexo **2** (espectro em preto).

O ligante $H_2BPBMP-NO_2$ apresenta bandas intensas entre 1600 e 1400 cm^{-1} referentes aos estiramentos das ligações $C=N$ e $C=C$ dos anéis aromáticos. Nos complexos estas bandas também são observadas com intensidades relativas similares. No entanto observa-se um alargamento dessas bandas devido à presença de grupos acetato coordenados de forma bidentada entre os centros metálicos, cujos estiramentos assimétrico e simétrico da ligação $O-C=O$ absorvem entre 1600 e 1400 cm^{-1} . A ausência da banda de média intensidade em aproximadamente 1360 cm^{-1} nos espectros dos complexos, observada no ligante livre, devido à deformação angular fora do plano da ligação $O-H_{\text{fenol}}$, indica a desprotonação do fenol e assim a formação da ponte fenóxido. A presença do contra-íon perclorato é facilmente detectada pela banda intensa em torno 1090 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação $Cl-O$.

4.2.4 Espectroscopia Eletrônica

Os dados de espectroscopia eletrônica para os complexos **1**, **2**, **3** e **4** são apresentados na Tabela 6 e os espectros são mostrados na Figura 31.

Tabela 6: Dados de espectroscopia eletrônica para os complexos **1**, **2**, **3** e **4**.

complexo	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ε ($M^{-1} \cdot L \cdot cm^{-1}$)
1 ($Fe^{III}Fe^{III}$)	333	14480
	-	-
	581	4800
2 ($Fe^{III}Fe^{II}$)	356	16030
	~410	-
	519	4480
3 ($Fe^{III}Mn^{II}$)	358	16080
	~420	-
	521	4470
4 ($Fe^{III}Cu^{II}$)	357	20100
	~412	-
	513	5460

Os espectros eletrônicos de todos os complexos são muito similares. As bandas observadas são características de compostos de Fe^{III} que apresentam grupos fenolato coordenados. Em todos os espectros observa-se uma banda intensa na região entre 500 e 600 nm, atribuída a um processo de transferência de carga do tipo ligante \rightarrow metal (TCLM) envolvendo a transferência de elétrons dos orbitais $p\pi$ do oxigênio fenólico para os orbitais $d\pi^*$ do íon Fe^{III} .⁵⁰ Um segundo processo de TCLM ocorre na região de 400 a 350 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 devido às transições dos anéis fenólicos e piridínicos do ligante.⁵⁰ No complexo **1**, o ombro em torno dos 400 nm não foi observado, pois deve estar totalmente encoberto pelas bandas do ligante. O espectro do ligante foi realizado qualitativamente e mostrou a presença de duas bandas: uma em 306 nm e outra em 325 nm que são atribuídas às transições dos anéis fenólicos e piridínicos e à presença do grupo nitro, que está em ressonância com o anel fenólico. Para o complexo **2** realizou-se ainda o espectro no estado sólido por refletância difusa (Figura 31(B) inserido e a similaridade entre os valores máximos de absorção em solução e no estado sólido, indicam que o complexo não sofre influência do solvente e sua integridade estrutural é mantida em solução.

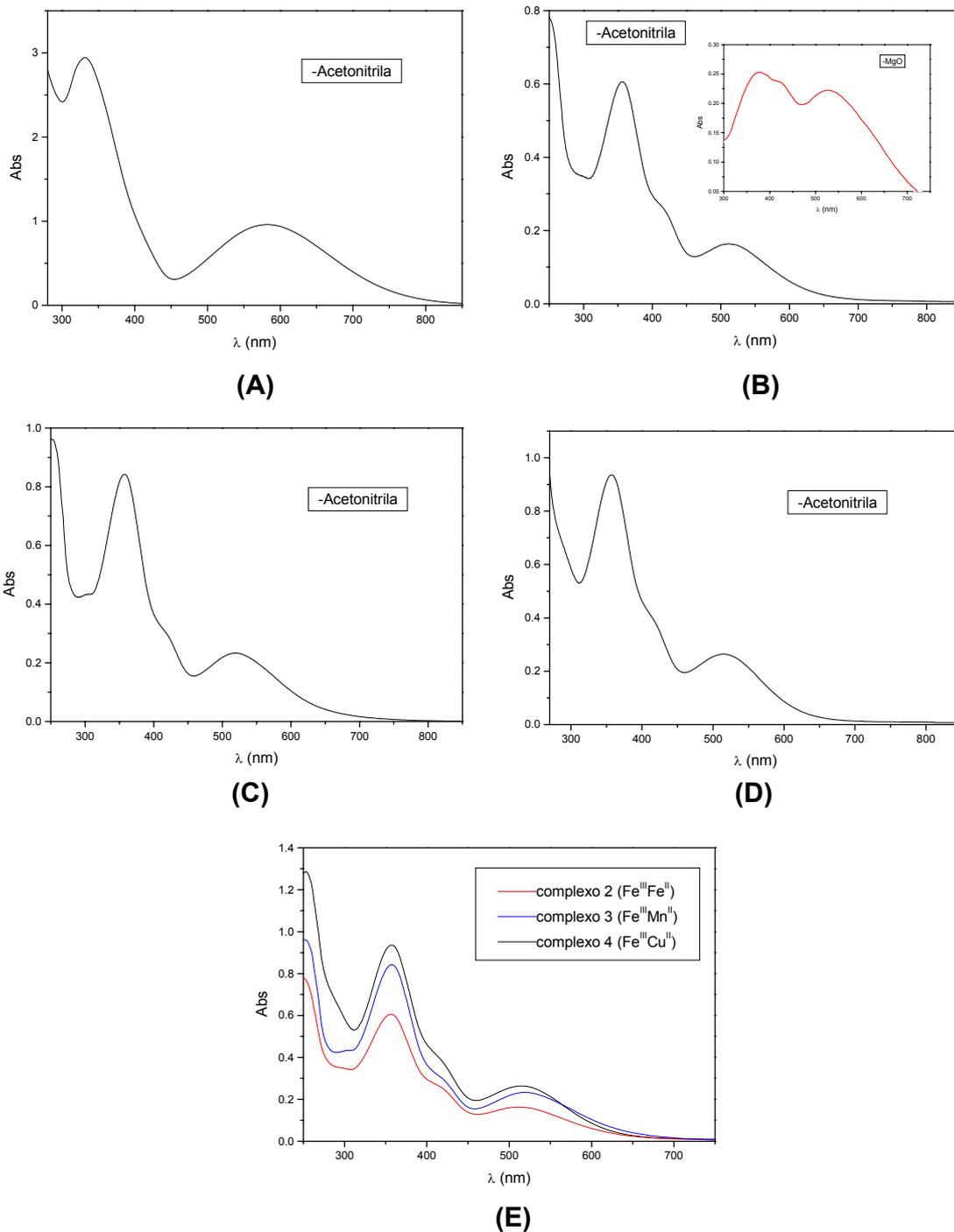


Figura 31: Espectros eletrônicos: (A) complexo 1 , (B) complexo 2, (C) complexo 3, (D) complexo 4.e (E) sobreposição dos complexos 2, 3 e 4.

Ao compararmos os espectros dos análogos não substituídos^{32,51,52} aos espectros dos novos complexos sintetizados, observa-se que a banda em menor energia sofre um deslocamento hipsocrômico de 37 nm para **1**, 38 nm para **2**, 23

nm para **3** e 33 nm para **4**. Isto se deve ao efeito retirador de elétrons do grupo $-\text{NO}_2$ que compete com o centro de Fe^{III} pela densidade eletrônica do anel fenólico, dificultando o processo de TCLM. Este efeito aproxima as propriedades cromofóricas dos complexos aos observados para a forma reduzida das PAP's de mamíferos, com $\lambda_{\text{máx}}$ entre 505 e 510 nm e $\epsilon = 4000 \text{ mol.L}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$, para o processo TCLM $\text{O}_{\text{tirosinato}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$.

Na kbPAP este processo aparece em 560 nm com $\epsilon = 3360 \text{ M}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$ ^{20,21} e é ligeiramente superior ao encontrado para o complexo **3**. O mesmo é observado para o complexo **4**, quando este é comparado com a $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ ufPAP modificada que apresenta $\lambda_{\text{máx}}$ em 545 nm e $\epsilon = 3400 \text{ M}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$.¹⁷

A Tabela 7 mostra os dados comparativos de $\lambda_{\text{máx}}$ encontrados para a enzima e seus respectivos análogos com os ligantes H_2BPBPMP e $\text{H}_2\text{BPBPMP-NO}_2$.

Tabela 7: Dados comparativos de espectroscopia eletrônica para as enzimas rbTRAP, kbPAP e ufPAP e seus análogos sintéticos com os ligantes H_2BPBPMP e $\text{H}_2\text{BPBPMP-NO}_2$.

Enzima	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) enzima	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) complexo não- substituído	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) complexo nitro- substituído
rbTRAP $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$	550-570	618	581
rbTRAP $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$	505-510	556	519
kbPAP $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}$	560	544	521
ufPAP $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$	545	546	513

4.2.5 Eletroquímica

O comportamento redox dos complexos **2**, **3** e **4** foi avaliado através de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada, em acetonitrila. Os voltamogramas destes complexos são apresentados na Figura 32, e os potenciais redox, que foram referenciados ao eletrodo normal de hidrogênio (ENH) através do padrão interno ferroceno ($E_{1/2} = 0,400 \text{ V vs NHE}$),⁴¹ estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8: Potenciais redox determinados através de voltametria cíclica (VC) e voltametria de onda quadrada (OQ) para os complexos **2**, **3** e **4**.

COMPLEXOS	$E_{1/2}$ (mV) versus NHE	
	VC	OQ
2	425	427
	-345	-340
3	851	842
	-328	-307
4	-363	-352
	-	-748

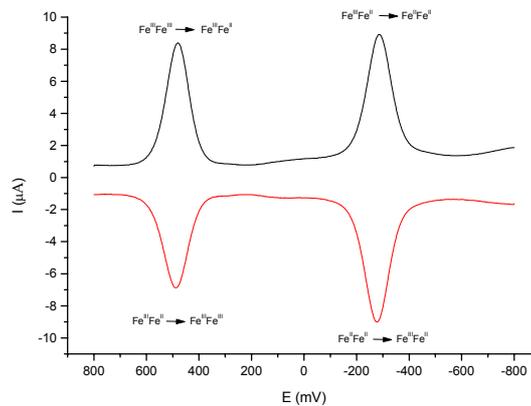
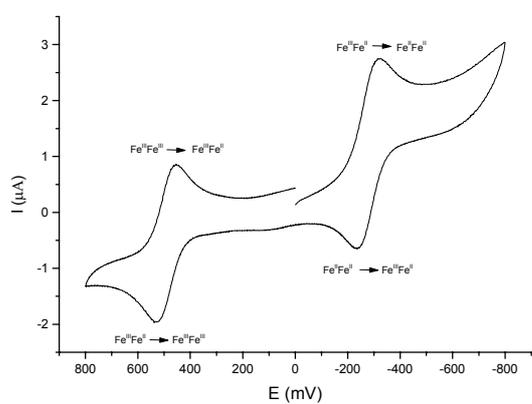
O complexo **2** apresenta dois processos redox em seus voltamogramas. O primeiro, localizado em 425 mV, representa o potencial redox do acoplamento $\text{Fe}_2^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ e o segundo, em -345 mV, representa o acoplamento $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}_2^{\text{II}}$. Esses potenciais revelam um deslocamento anódico de 45 mV para o primeiro processo e 145 mV para o segundo processo em relação ao complexo não substituído $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$.³² Estes deslocamentos refletem a capacidade retiradora de elétrons do grupo substituinte $-\text{NO}_2$ que provoca a diminuição da basicidade e conseqüentemente da capacidade doadora π dos grupos fenólicos. Os complexos **3** e **4** também apresentaram um processo na região entre -300 e -400 mV atribuídos ao processo $\text{Fe}^{\text{III}} + e \rightleftharpoons \text{Fe}^{\text{II}}$ que, da mesma maneira como discutido para o complexo **2** revelam um deslocamento anódico de 142 mV para **3** e 247 mV para **4** neste processo, em relação aos complexos não substituídos $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ ⁵¹ e

$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ ⁵² respectivamente. O processo referente a oxiredução do manganês $\text{Mn}^{\text{III}} + \text{e}^- \rightleftharpoons \text{Mn}^{\text{II}}$ foi observado para o complexo **3** com $E_{1/2} = 842$ mV e deslocamento anódico de 11 mV em relação ao seu análogo não substituído. Na voltametria cíclica do complexo **4** observa-se apenas uma onda irreversível $E_{pc} = -876$ mV, porém na voltametria de onda quadrada foi possível a observação do processo $\text{Cu}^{\text{II}} + \text{e}^- \rightleftharpoons \text{Cu}^{\text{I}}$ com $E_{1/2} = -748$ mV e deslocamento anódico de 152 mV em relação ao complexo não substituído $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ ⁵². Na Tabela 9 estão apresentados os dados comparativos entre os potenciais redox, encontrados para os complexos não-substituídos e nitro-substituídos.

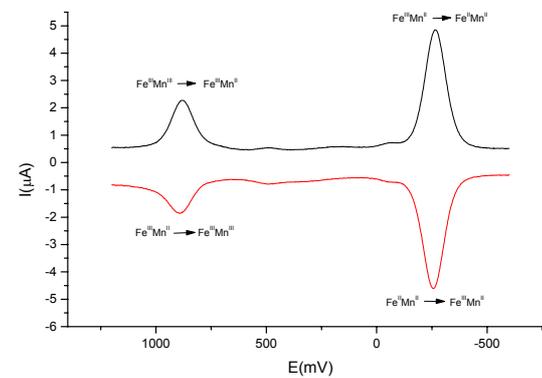
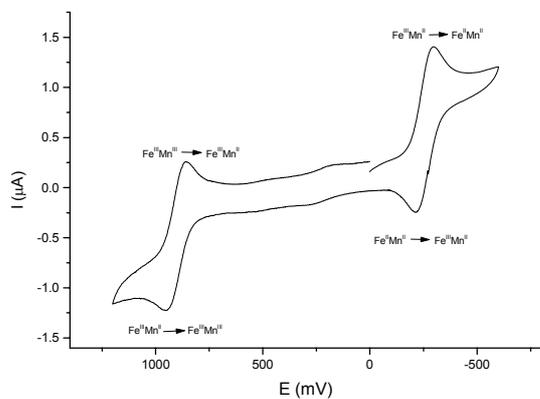
Tabela 9: Dados comparativos de voltametria cíclica (**VC**) para os complexos **2**, **3** e **4** com seus respectivos análogos não-substituídos $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ (M = Fe, Mn e Cu)^{32,51,52}

COMPLEXOS	$E_{1/2}$ (mV) versus NHE		$\Delta E_{1/2}$
	Substituído (presente trabalho)	Não substituído	
$\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$	425	380	45
	-345	-490	145
$\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}$	851	840	11
	-328	-470	142
$\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$	-363	-610	247
	-748	-900	152

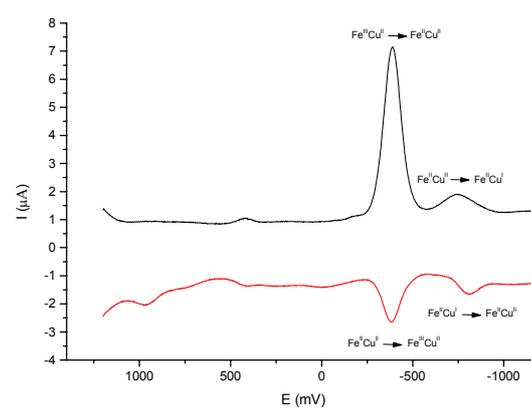
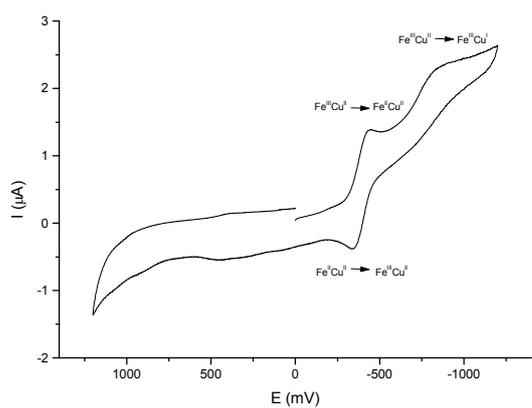
A investigação eletroquímica dos complexos demonstrou então que o grupo substituinte $-\text{NO}_2$ influenciou de maneira significativa os potenciais redox do centro de Fe^{III} , pois o para-nitro fenolato está ligado diretamente neste, e embora com, menor intensidade teve efeito também no metal M^{II} (M = Fe, Mn e Cu) provavelmente devido a um acoplamento entre os dois centros. Este efeito ajuda na estabilização do estado de oxidação 2+ e é muito importante, principalmente nos complexos do tipo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ visto que o ferro é mais suscetível à oxidação.



(A)



(B)



(C)

Figura 32: Voltamogramas cíclicos (à esquerda) e de onda quadrada (à direita) para os complexos **2 (A)**, **3 (B)** e **4 (C)**.

4.2.6 Titulação Potenciométrica

Os estudos de titulação potenciométrica dos complexos **2** e **3** foram realizados em solução etanol/água (70:30 % V/V) devido à baixa solubilidade dos mesmos em água. Estes experimentos foram realizados para avaliar a presença de moléculas de água coordenadas aos centros metálicos, quando os complexos se encontram em solução e a possível formação da espécie $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$, que segundo os mecanismos propostos por Klabunde e colaboradores em 1996²⁰ e mais recentemente por Lindqvist e colaboradores¹³ é a espécie ativa das fosfatases ácidas púrpuras. Isto é possível devido à labilidade^{52,53} dos grupos acetato ponte, a qual é aumentada pela elevação do pH do meio, os quais podem ser hidrolisados gerando aquo-complexos.

As curvas de equilíbrio potenciométrico obtidas para os complexos $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ (**2**) e $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ (**3**) apresentam uma região tampão entre pH 4 e 9, que corresponde à neutralização de três prótons, como já observado anteriormente para compostos similares.^{52,54,55} Esse fato indica a hidrólise dos complexos em meio aquoso, onde as duas pontes μ -acetato são substituídas por moléculas de água, as quais foram tituladas fornecendo três constantes de protonação, apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10: Valores de pKa e pH para os percentuais máximos das espécies **B** = $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$ e **C** = $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$ determinados para os complexos **2** e **3**.

Complexos	pKa1	pH (% _{máx} B)	pKa2	pH (% _{máx} C)	pKa3
2 ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$)	4,70	5,30	5,95	6,50	7,03
3 ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}$)	5,04	5,53	6,04	7,32	8,61

Uma proposta para os equilíbrios observados em solução para esses complexos é ilustrada na Figura 33.

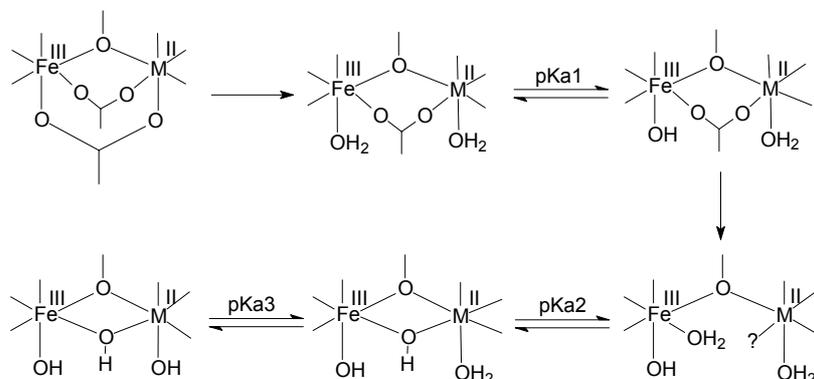
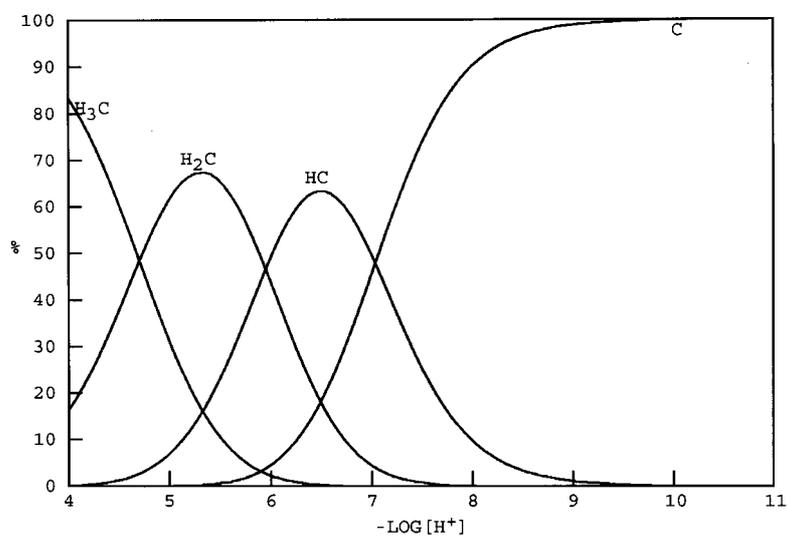
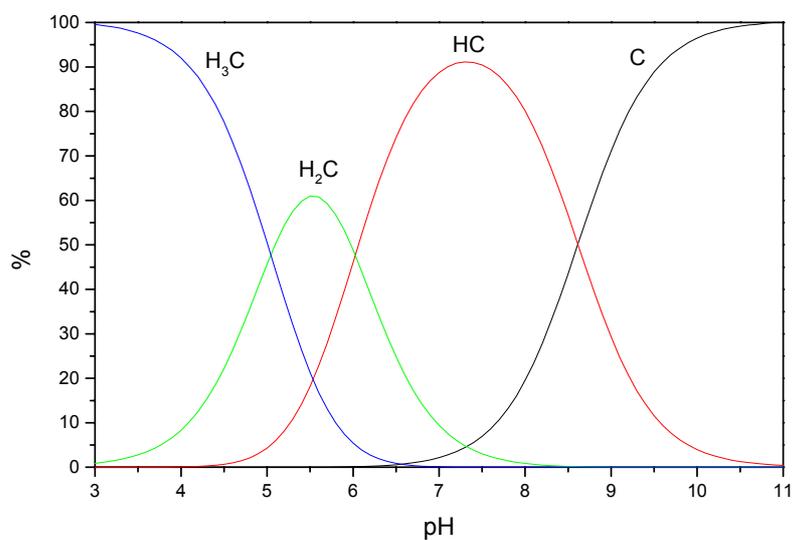


Figura 33: Proposta para os equilíbrios observados nos complexos $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}(\text{BPBPMP-NO}_2)_2\mu(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ em solução, onde $\text{M} = \text{Fe}^{\text{II}}, \text{Mn}^{\text{II}}$.

O esquema apresentado na Figura acima, sugere que, inicialmente, apenas uma das pontes μ -acetato é hidrolisada, formando a espécie $(\text{H}_2\text{O})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$. Em $\text{pH} \sim 5$ observa-se o primeiro pKa , correspondente a desprotonação da molécula de água ligada ao íon Fe^{III} com a formação da espécie $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$. Em $\text{pH} \sim 6$ é observado o segundo pKa , atribuído à desprotonação de uma molécula de água para a formação da ponte μ -hidroxo, imediatamente após a saída da segunda ponte acetato. Finalmente, o terceiro pKa corresponde à desprotonação da molécula de água ligada ao M^{II} e é determinado em $\text{pH} > 7$, onde a espécie $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH})$ é formada. A presença de cada uma das espécies formadas em solução e seu percentual em função do pH são ilustrados nas curvas de distribuição de espécies, na Figura 34.



(A)



(B)

Figura 34: Diagrama de distribuição das espécies presentes em função do pH para (A) para o complexo **2** e (B) para o complexo **3**, onde H_3C é a espécie completamente protonada, C é a espécie completamente desprotonada e H_2C e HC são as espécies di e mono-protonadas.

Os complexos **2** e **3** apresentaram então, comportamento similar ao observado para outros complexos di-(μ -acetato) já descritos e apresentados na Tabela 11.^{52,54,55} Porém ao compararmos o complexo **2** a seu análogo não substituído⁵⁶ observa-se um decaimento nos valores dos pKa(s). Este fato deve estar relacionado com os efeitos provocados pelo grupo $-\text{NO}_2$, que atrai densidade eletrônica para si, aumentando assim a acidez dos prótons tanto das moléculas de água ligadas aos centros metálicos, quanto da ponte μ -hidroxo.

Tabela 11: Comparação entre os valores de pKa para os complexos (μ -acetato)₂ já estudados potenciométricamente.

complexos	pKa ₁	pKa ₂	PKa ₃
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})\mu(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ ⁵⁵	5,15	6,60	8,28
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BPBPMP}-\text{NO}_2)\mu(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ (2)	4,70	5,95	7,03
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})\mu(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ ⁵⁰	5,80 cinético		7,76 cinético
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}(\text{BPBPMP}-\text{NO}_2)\mu(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ (3)	5,04	6,04	8,61
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})\mu(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ ⁵⁷	4,84	5,99	7,97
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\text{BPBPMP}-\text{NO}_2)\mu(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ ⁵⁷	4,55	6,56	8,26
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})\mu(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ ²	5,25	6,20	7,82

É curioso no entanto, que esse decréscimo tenha sido mais acentuado no terceiro pKa, referente à desprotonação da molécula de água ligado no centro de Fe^{II} , visto que o *para*-nitro fenolato está coordenado diretamente no centro de Fe^{III} . Outras análises realizadas para o complexo **2**, como a reatividade seção 4.2.7 e o Mössbauer seção 4.2.8, nos levam a crer, que este decréscimo acentuado no valor de seu terceiro pKa não esteja apenas relacionado com a presença do grupo $-\text{NO}_2$ no ligante, mas também à possível formação de outras espécies em valores de pH mais altos. É provável que em valores de pH acima de 6,0 onde deveríamos estar formando a espécie μ -hidroxo, comece a ocorrer formação também de outras espécies, inclusive com a oxidação do Fe^{II} , como pôde ser observado nas análises de Mössbauer da solução congelada deste complexo em pH 6,5 e

reforçada pela resolução da estrutura parcial de um composto tetranuclear de Fe^{III} obtido da tentativa de síntese e recristalização da espécie μ -hidroxo.

O complexo **3** não pôde ter seus valores de pKa(s) potenciométricos comparados com os de seu análogo não substituído⁵¹ pois este ainda não teve sua titulação potenciométrica realizada. Contudo, como pode ser observado na Tabela 11, seus valores para as constantes de desprotonação (pKa(s)) estão bem próximos aos encontrados para outros complexos (μ -acetato)₂ similares^{2,51,52,55,56}.

4.2.7 Reatividade

A atividade catalítica dos complexos [Fe^{III}Mn^{II}(BPBPMP-NO₂)(μ -OAc)₂]ClO₄ (**3**) frente à hidrólise de ésteres de fosfato foi avaliada através da reação com bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (BDNPP), sob condições de excesso de substrato a 25 °C, conforme ilustrado na Figura 35.

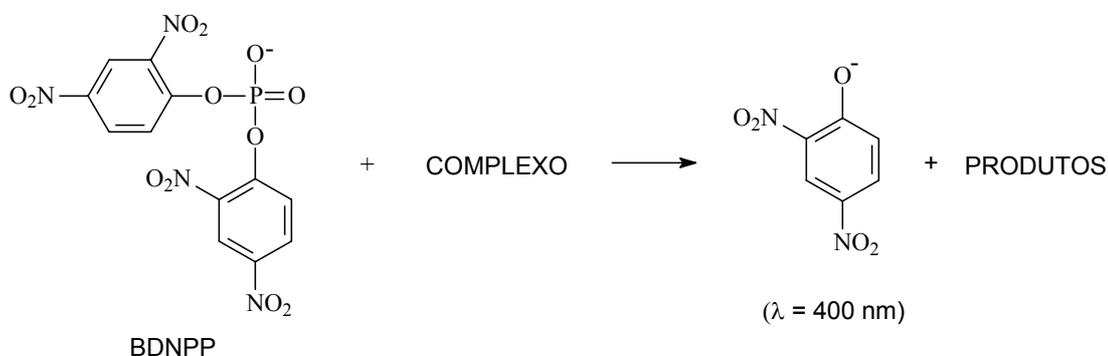


Figura 35: Esquema ilustrativo para a reação de hidrólise do substrato BDNPP.

Este substrato foi escolhido para esses estudos por tratar-se de um fosfato bastante reativo, devido à presença de grupos substituintes -NO₂ nas posições 2 e 4 dos anéis fenilas. Substratos ativados têm sido empregados pelo fato de que diésteres de fosfato não ativados, em geral, são muito pouco reativos devido às

reações de hidrólise serem altamente sensíveis a basicidade do grupo abandonador.⁵⁷

Inicialmente realizou-se uma avaliação do efeito do pH sobre a atividade catalítica do complexo, buscando-se a determinação dos valores dos seus pKa(s) cinéticos e a comparação destes, com os valores encontrados no estudo de equilíbrio químico em solução, além da determinação do pH ótimo, ou seja, o pH onde a concentração da espécie cataliticamente ativa é maior. O gráfico de velocidade inicial (V_0) versus pH forneceu uma curva em forma de sino, onde a velocidade da reação é praticamente nula em $\text{pH} < 3,5$, aumenta gradativamente, atingido valor máximo em $\text{pH} 6,9$ (pH ótimo) e diminui novamente quando o pH se torna alcalino, como mostra a Figura 36.

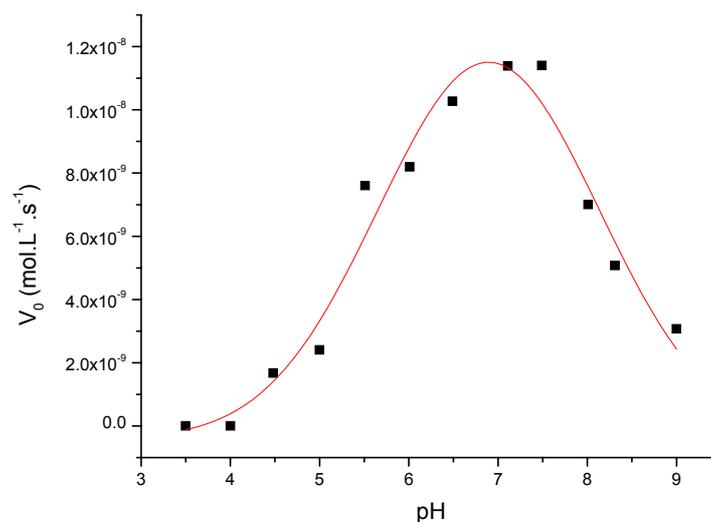


Figura 36: Gráfico de V_0 em função do pH para a reação de hidrólise do BDNPP catalisada pelo complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}(\text{BPBPMP-NO}_2)(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$.

Por apresentarem um perfil sigmoidal, as duas metades do sino foram tratadas pelo método de Boltzmann, de maneira que os pontos de inflexão das curvas, forneceram dois valores de pKa(s): 5,17 e 8,03. Estes valores, denominados pKa(s) cinéticos, estão em boa concordância com os valores das constantes de dissociação (pKa) determinados por titulação potenciométrica seção

4.2.6 para as moléculas de água ligadas aos metais, o que reforça a proposta de que a espécie ativa contém, em solução, uma molécula de água ligada ao sítio de M^{II} , que atuaria como sítio lábil, permitindo a coordenação do substrato através da substituição da molécula de água e um íon hidróxido ligado ao Fe^{III} , o qual seria responsável pelo ataque nucleofílico ao substrato. Desta forma, a velocidade da reação é máxima no pH onde existe a maior concentração da espécie $(HO)Fe^{III}(\mu-OH)Mn^{II}(H_2O)$. Assim a baixa reatividade observada em valores de pH ácido, estaria relacionada com a protonação do íon hidróxido responsável pelo ataque nucleofílico e em valores de pH básicos, com a desprotonação da molécula de água do sítio lábil gerando a espécie completamente desprotonada $(HO)Fe^{III}(\mu-OH)Mn^{II}(OH)$. Isto dificulta a coordenação do substrato já que o hidróxido é um ligante de campo mais forte e têm menor tendência de saída em relação à água.

Os dados observados também se aproximam bastante aos valores encontrados para o complexo $[Fe^{III}Mn^{II}(BPBPMP)\mu(OAc)_2]ClO_4^{57}$ que apresenta pH de atividade máxima em 6,7 e valores de $pK_a(s)$ cinéticos iguais a 5,80 e 7,76.

O estudo das reações de hidrólise no pH ótimo, variando-se a concentração de substrato, mostra que o complexo **3** apresenta um comportamento de Michaelis-Menten, como pode ser observado para a curva apresentadas na Figura 37.

O tratamento desses dados, através do método de Lineweaver-Burke,^{58,59} forneceu os seguintes valores: $K_m = 9,394 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $V_{m\acute{a}x} = 2,164 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, constante catalítica $k_{cat} = V_{m\acute{a}x}/[3] = 5,41 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Nessas condições, o complexo mostrou uma aceleração de $2,86 \times 10^3$ vezes em relação à reação não catalisada ($K_{nc} = 1,8 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ a 25°C).⁶⁰

De acordo com estes dados, o complexo **3** apresentou-se eficiente na conversão do substrato a produtos. Devido ao efeito retirador de elétrons do grupo $-NO_2$ o complexo **3** possui menor capacidade nucleofílica do $Fe^{III}-OH$ ($pK_a = 5,2$), quando comparado ao seu análogo não substituído⁵⁷ ($pK_a = 5,6$). Isto está em concordância com o menor valor da constante catalítica encontrada para o

complexo **3** ($K_{\text{cat}} = 5,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) quando comparado ao seu análogo não substituído⁵¹ ($K_{\text{cat}} = 7,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) e reflete-se ainda nos valores das constantes de associação ($K_{\text{ass}} = 1/K_m$) que são: 1006 L.mol^{-1} para **3** e 476 L.mol^{-1} para o complexo não substituído.

O complexo **2** não pôde ter seus dados de reatividade estudados, pois na tentativa de realizar estes estudos, ocorreram alguns problemas, principalmente em valores de pH acima de 6,0. Isto reforça a hipótese discutida na titulação potenciométrica seção 4.1.6 de haver a formação de várias espécies nestas condições, inclusive com a oxidação do centro de Fe^{II} . Uma possível alternativa para solucionar este problema, seria a tentativa de realizar os estudos cinéticos deste complexo, sob atmosfera inerte.

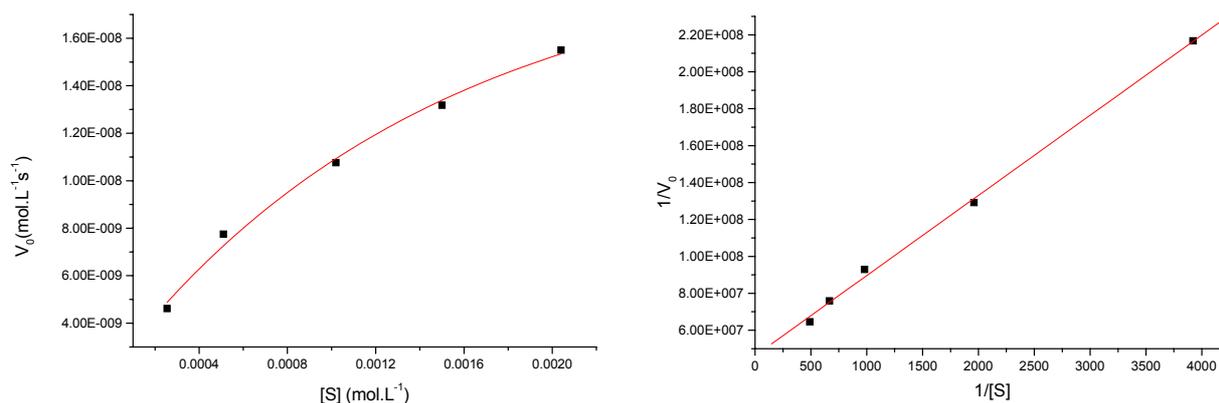


Figura 37: Curva de saturação (esquerda) e gráfico de Lineweaver-Burk (direita) para as reações de hidrólise do BDNPP catalisadas pelo complexo **3** a 25°C sob as seguintes condições: solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1; [complexo] = $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; [BDNPP] = $5,1 \times 10^{-4}$ a $4,1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; [tampão] = $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ (MES e HEPES); $I = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (LiClO_4).

4.2.8 - Espectroscopia Mössbauer

Os espectros Mössbauer do complexo **2** foram realizados no estado sólido, a 298 e 115K e ainda, em solução congelada acetonitrila/água (70:30 % V/V) em pH 6,5 (tampão: MES 0,1 mol.L⁻¹, LiClO₄ 0,1 mol.L⁻¹).

Os valores de deslocamento isomérico (δ) obtidos, refletem a natureza do ambiente químico ao redor do núcleo Mössbauer e o desdobramento quadrupolar (Δ_{EQ}), indica a distorção em relação à microssimetria cúbica de cada sítio de ferro.

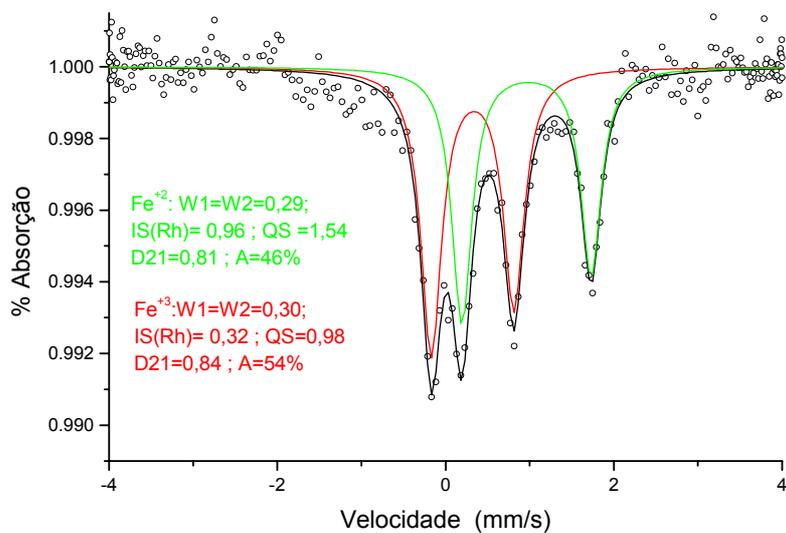
As atribuições sobre o número de oxidação dos sítios de ferro, foram feitas com base nos valores de deslocamento isomérico, para Fe^{II} e Fe^{III} alto e baixo spin apresentados na Tabela 12.⁶¹

Tabela 12: Valores de deslocamento isomérico, para Fe^{II} e Fe^{III} alto e baixo spin.

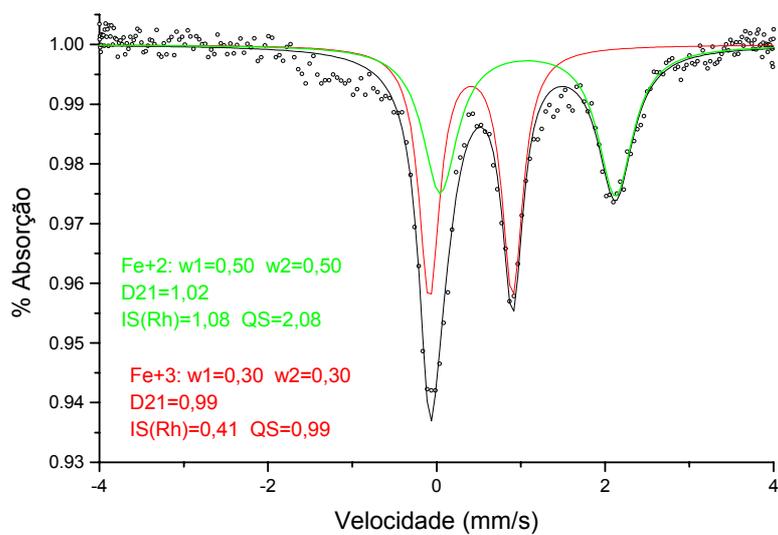
δ (mm/s)	Alto-spin	Baixo-spin
Fe ³⁺	+0,1 - +0,5	-0,1 - +0,5
Fe ²⁺	+0,6 - +1,7	-0,2 - +0,5

O espectro Mössbauer de (**2**) no estado sólido (Figura 38) apresenta um perfil que pode ser decomposto em dois dubletos, sendo um deles atribuído a presença de Fe^{II} ($\delta = 1,14$ e $\Delta_{EQ} = 2,08$ mm/s a 115 K) e o segundo ao Fe^{III} ($\delta = 0,47$, $\Delta_{EQ} = 0,99$ mm/s a 115 K). A equivalência das área dos dois dubletos comprova que os dois íons estão presentes na proporção de 1:1. Como se pode observar à temperatura de 115K (nitrogênio líquido) o espectro torna-se simétrico, o que sugere efeito Goldanskii.⁶¹ Este comportamento é equiparável ao do seu análogo não substituído.³²

Os dados obtidos são apresentados na Tabela 13, juntamente com os valores encontrados para o análogo do complexo **2**, não substituído [Fe^{III}Fe^{II}(BPBPMP) (μ -OAc)₂]ClO₄.³²



(A)



(B)

Figura 38: Espectros Mössbauer do complexo **(2)** no estado sólido: **(A)** à 298K e **(B)** à 115K.

Tabela13. Resultados obtidos pela espectroscopia Mössbauer

Complexo	T (K)	δ (mm/s)	Δ_{EQ}	Atribuições	% abs/Fe
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})\mu(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ ³¹	298	0,45	1,14	Fe^{3+} Alto-spin	50
		1,08	1,75	Fe^{2+} Alto-spin	50
	115	0,41	1,22	Fe^{3+} Alto-spin	50
		1,13	2,43	Fe^{2+} Alto-spin	50
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BPBPMP}-\text{NO}_2)\mu(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ (2)	298	0,38	0,98	Fe^{3+} Alto-spin	54
		1,02	1,54	Fe^{2+} Alto-spin	46
	115	0,47	0,99	Fe^{3+} Alto-spin	54
		1,14	2,08	Fe^{2+} Alto-spin	46
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BPBPMP}-\text{NO}_2)\mu(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ (2) solução congelada pH = 6,5	115	0,49	1,55	Fe^{3+} Alto-spin	25
		0,97	2,74	Fe^{2+} Alto-spin	25
		0,45	0,83	Fe^{3+} Alto-spin	50

Já, na tentativa de realizar os estudos de Mössbauer do complexo em pH 6,5 no qual poderíamos observar a formação da espécie μ -hidroxo, obtivemos um espectro com três dubletos (Figura 39). O primeiro, atribuído a um Fe^{II} ($\delta = 0,97$ e $\Delta_{EQ} = 2,74$ mm/s a 115 K), possui área de 25% do espectro, o segundo dubleto é característico de Fe^{III} ($\delta = 0,49$, $\Delta_{EQ} = 1,55$ mm/s a 115 K) e ocupa outros 25% da área total do espectro. Um terceiro dubleto observado, possui área de 50% e valores de deslocamento isomérico também característico de Fe^{III} . Este fato, nos leva a conclusão, de que metade da amostra apresenta-se como um complexo de valência mista do tipo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$, que provavelmente seja a espécie μ -hidroxo. A outra metade, sofreu oxidação e apresenta-se como um complexo do tipo $(\text{Fe}^{\text{III}})_2$. Esta informação confirma a hipótese discutida na titulação potenciométrica, seção 4.2.6 e também nos testes de reatividade, seção 4.2.7, na

qual sugerimos que para o complexo **2**, em valores de pH acima de 6,0 esteja ocorrendo a formação de várias espécies além da μ -hidroxo, inclusive com a oxidação do centro de Fe^{II} .

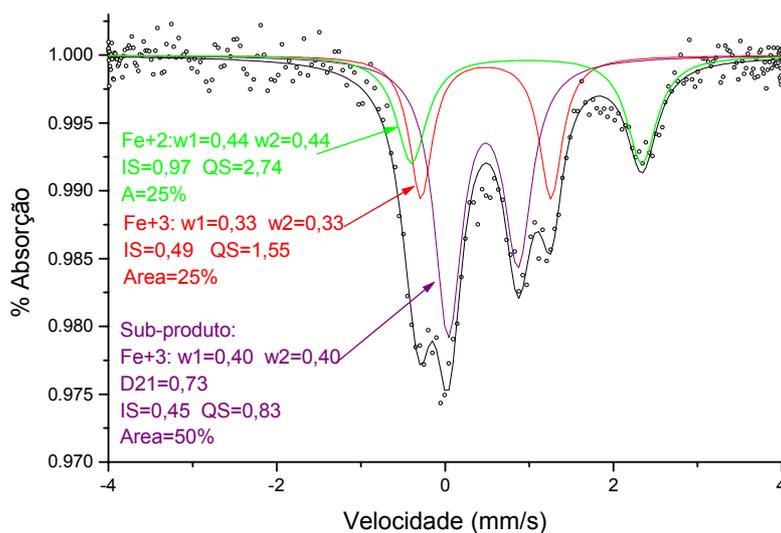


Figura 39: Espectro Mössbauer da solução congelada do complexo **(2)** em pH 6,5.

Realizou-se ainda os estudos de Mössbauer, para a solução de recristalização do complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ μ -hidroxo. Desta solução, foram obtidos após alguns meses de repouso em um frasco fechado, cristais adequados para resolução parcial da estrutura por difratometria de raio X. Para nossa surpresa o resultado foi, um complexo de Fe^{III} tetranuclear.

A Figura 40 apresenta o espectro obtido da solução restante desta recristalização, na qual ainda estava presente a maior parte da amostra. Este, apresentou um dubleto atribuído a um Fe^{II} ($\delta = 1,33$ e $\Delta_{\text{EQ}} = 3,36$ mm/s a 115 K) e outro atribuído a um Fe^{III} ($\delta = 0,31$ e $\Delta_{\text{EQ}} = 0,37$ mm/s a 115 K), que possuem áreas equivalentes e ocupam 62% da área total do espectro. Os outros 38%, são ocupados por vários dubletos, que parecem tratar-se de dubletos de intervalência do complexo. Estes dados nos mostram que mesmo após alguns meses, o

complexo de valência mista se mantém em solução, embora uma pequena parte da amostra tenha precipitado na forma de um tetrâmero de Fe^{III} .

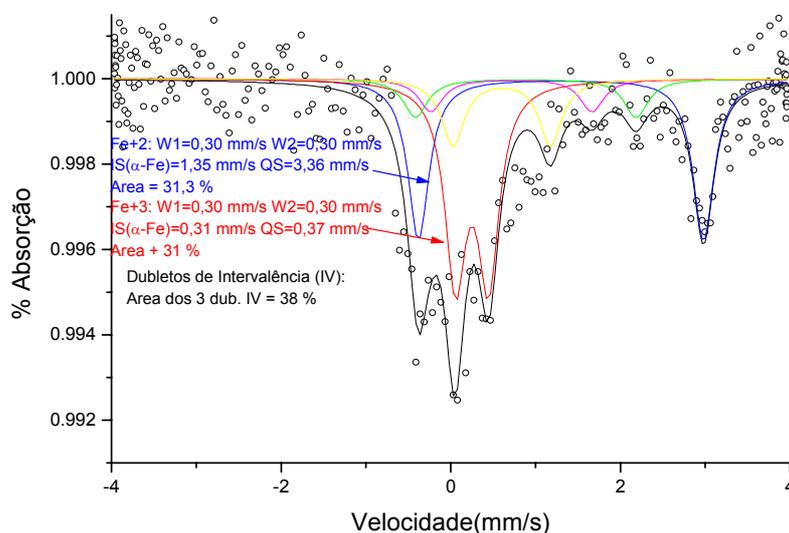


Figura 40: Espectro de Mössbauer da solução resultante da tentativa de síntese e recristalização do complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}\mu\text{-hidroxo}$.

Isto é de fundamental importância, do ponto de vista de que o que se observa no Mössbauer desta solução deve tratar-se da espécie $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$, similar a forma proposta como cataliticamente ativa para as fosfatases ácidas púrpuras e de grande interesse para a elucidação do mecanismo de ação destas metaloenzimas.

4.2.9 Difractometria de raios X

Na tentativa de sintetizar e recristalizar o complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ foram obtidos, pequenos cristais, os quais apresentaram-se adequados apenas para a resolução parcial de sua estrutura cristalina/molecular, devido a má qualidade de difração destes.

A representação gráfica da estrutura obtida está apresentada na figura 41.

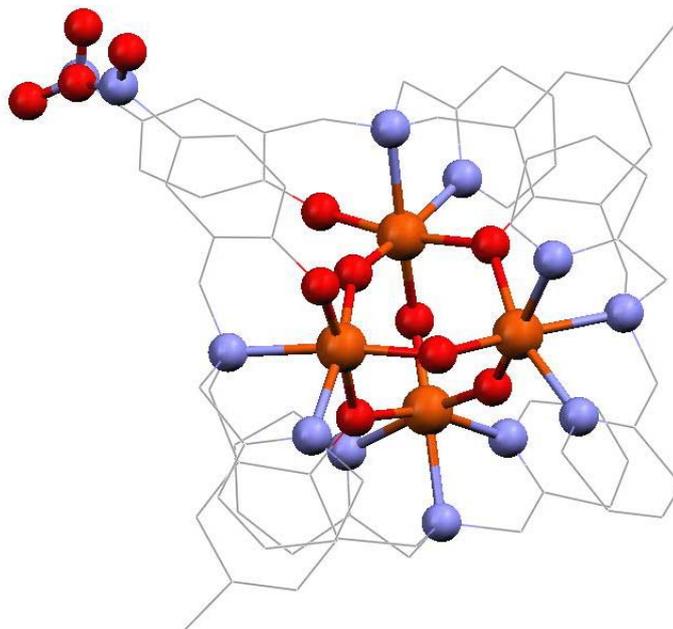
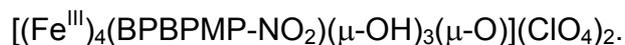


Figura 41: Representação gráfica da estrutura parcial obtida para o complexo:



Para nossa surpresa a estrutura resolvida revelou um complexo tetranuclear com os quatro sítios de Fe^{III} .

Em virtude da baixa qualidade dos dados difratométricos não foi possível fazer o balanço final das cargas, porém com os dados obtidos, pode-se discutir o arranjo do ligante ao redor dos centros metálicos e, a presença das pontes μ -oxo e μ -hidroxo, relacionadas ao comprimento de ligação oxigênio-metal obtidos no refinamento parcial da estrutura.

O ligante encontra-se coordenado facialmente em todos os centros metálicos. Cada unidade do ligante, forma uma unidade binuclear, na qual, do lado mais duro encontra-se um átomo de ferro com ambiente de coordenação N_2O_4 no qual estão coordenados um fenol ponte de maneira trans ao fenol terminal, dois átomos de nitrogênio, sendo um amínico e outro piridínico e duas pontes μ -hidroxo. O ferro da parte mole do ligante apresenta coordenados em uma das faces do octaedro, dois átomos de nitrogênio piridínicos e um átomo de nitrogênio

amínico, na outra face encontram-se coordenados três átomos de oxigênio, sendo: um da ponte fenóxo, outro de uma das pontes μ -hidroxo e o terceiro da ponte μ -oxo, resultando assim em um ambiente de coordenação N_3O_3 .

5. CONCLUSÕES

O novo ligante H₂BPBPMP-NO₂ foi obtido a partir de modificações do método descrito para o ligante H₂BPBPMP³² com ótimo rendimento e pureza adequada para síntese de compostos de coordenação.

A partir do ligante H₂BPBPMP-NO₂ foram preparados os complexos [Fe^{III}Fe^{III}(BPBPMP-NO₂)(μ-OAc)₂](ClO₄)₂, [Fe^{III}Fe^{II}(BPBPMP-NO₂)(μ-OAc)₂]ClO₄, [Fe^{III}Mn^{II}(BPBPMP-NO₂)(μ-OAc)₂]ClO₄, [Fe^{III}Cu^{II}(BPBPMP-NO₂)(μ-OAc)₂]ClO₄, além do complexo tetranuclear [(Fe^{III})₄(BPBPMP-NO₂)(μ-OH)₂(μ-O)₂](ClO₄)₂ e outros não descritos aqui. Todos, com exceção do complexo [(Fe^{III})₄(BPBPMP-NO₂)(μ-OH)₂(μ-O)₂](ClO₄)₂ foram caracterizados por análises espectroscópicas e eletroquímicas.

Observou-se tanto na espectroscopia eletrônica, quanto na eletroquímica, uma significativa influência do efeito retirador de elétrons do grupo -NO₂ sobre os centros metálicos de todos os complexos estudados, especialmente no centro Fe^{III}, como era de se esperar pelo fato do grupo p-nitrofenolato estar ligado diretamente neste. No entanto, o centro M^{II} também sofreu um deslocamento anódico em relação aos seus análogos não substituídos. Portanto, o grupo -NO₂ promoveu a elevação dos potenciais redox estabilizando os complexos de valência mista frente à oxidação. Este efeito também promove a aproximação das propriedades espectroscópicas dos complexos, quando estes são comparados aos seus análogos não substituídos, as observadas para a forma reduzida das PAP's de mamíferos.

Estudos de reatividade do complexo [Fe^{III}Mn^{II}(BPBPMP-NO₂)μ(OAc)₂]ClO₄ revelaram que este possui capacidade catalítica frente à hidrólise básica do 2,4-BDNPP, com fator catalítico de quase 3 mil vezes, em relação à reação não catalisada.

A partir dos dados termodinâmicos (titulação potenciométrica), cinéticos e de Mössbauer foi possível propor que apesar da influência do grupo substituinte-NO₂, em valores de pH acima de 6,0 o complexo [Fe^{III}Fe^{II}(BPBPMP-NO₂)(μ-OAc)₂]ClO₄ forma várias outras espécies, além da μ-hidroxo inclusive com a oxidação do centro de Fe^{II}.

O estudo de Mössbauer da solução resultante da tentativa de síntese e recristalização do complexo [Fe^{III}Fe^{II}(BPBPMP-NO₂)(μ-OH)(H₂O)](ClO₄)₂ demonstra a presença de um composto do tipo Fe^{III}Fe^{II} estável em solução, que provavelmente é a espécie (HO)Fe^{III}(μ-OH)Fe^{II}(OH₂), a qual é de especial interesse, por tratar-se da espécie similar à proposta como cataliticamente ativa nas PAP's de mamíferos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - REEDIJK, J. **Introduction to bioinorganic chemistry.** In: Bioinorganic Catalysis. New York: Marcel Dekker,. p. 1-11, Inc., 1993.

2 - 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.

3 - GANI, D. and WILKIE, J. **Metal ions in the mechanism of enzyme-catalysed phosphate monoester hydrolyses.** In . Structure and Bonding. v. 89, p. 133 – 175, 1997.

4 - HEGG, E. L.; BURSTIN, J. N. **Toward the development of metal-based synthetic nucleases and peptidases: a rationale and progress report in applying the principles of coordination chemistry.** Coordination Chemistry Reviews. v.173, p.133 – 165, 1998.

5 - KLABUNDE, T. and KREBS, B. **The dimetal center in purple acid phosphatases.** Structure and Bonding, v. 89, p. 177-198, 1997.

6 - DOI, K.; ANTANAITIS, B. C.; AISEN, P. **The binuclear iron center of uteroferrin and the purple acid phosphatases.** In: CLARK, Michael J. et al. Structure and Bonding. v.70, p. 1 – 26, Berlin : Springer-Verlag, 1988.

7 - DIKIY, A.; FUNHOFF, E. G.; AVERILL, B. A. and CIURLI, S. **New Insights into the mechanism of Purple Acid Phosphatase through ¹H RMN Spectroscopy of the recombinant human enzyme.** Journal of the American Chemical Society, v. 124, p. 13974-13975, 2002.

8 - WILCOX, D. E. **Binuclear metallohydrolases.** Chemical Reviews, v. 96, p. 2435-458, 1996.

9 - THAN, R.; FELDMANN, A. A. and KREBS, B. **Structural and functional studies on model compounds of purple acid phosphates and catechol oxidases.** Coordination Chemistry Reviews, v. 182, p. 211-241, 1999.

10 - SCHENK, G.; GE, Y.; CARRINGTON, L. E.; WYNNE, C.J.; SEARLE, I.R.; CARROLL, B.J.; HAMILTON, S. and De JERSEY, J. **Binuclear metal centers in 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.

11 - STRÄTER, N.; LIPSCOMB, W. N.; KLABUNDE, T. and Krebs B. **Two-metal ion catalysis in enzymatic acyl- and phosphoril-transfer reactions.** Angewandte Chemie International Edition in English, v. 35, p. 2024-2055, 1996.

12 - UPPENBERG, J.; LINDQVIST, F.; SVENSSON, C.; EK-RYLANDER, B. and ANDERSSON, G. **Crystal structure of a mammalian purple acid phosphatase.** Journal of Molecular Biology, v. 290, p. 201-211, 1999.

13 - LINDQVIST, Y., JOHANSSON, E.; KAIJA, H.; VIHKO, P. and SCHNEIDER, G. **Three-dimensional structure of a mammalian purple acid phosphatase at 2.2 Å resolution with a μ -(hydr)oxo bridged di-iron center.** Journal Molecular Biology, v. 291, p. 135-147, 1999.

14 - GUDDAT, L. W.; McALPINE, A. S.; HUME, D.; HAMILTON, S.; De JERSEY, J. and MARTIN, J.L. **Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase.** Structure, v. 7, n. 7, p. 757-767, 1999.

15 - BECK, J. L.; McCONAGHIE, L. A.; SUMMORS, A. C.; ARNOLD, W. N.; de JERSEY, J. and ZERNER, B. **Properties of a purple phosphatase from red kidney bean – a zinc-iron metalloenzyme.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 869, 61-68, 1986.

16 - 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.

17 - BECK, J. L.; KEOUGH, D. T.; DE JERSEY, J. and ZERNER, B. **Enzymatically active zinc, copper and mercury derivatives of the one-iron form of pig allantoinic acid phosphatase.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 791, p. 357-363, 1984.

18 - MERKX, M. and AVERILL, B. A. **Ga^{III} as a functional substitute for Fe^{III}: preparation and characterization of the Ga^{III}Fe^{II} and Ga^{III}Zn^{II} forms of Bovine Spleen Purple Acid Phosphatase.** Biochemistry, v. 37, n. 23, p. 8490-8497, 1998.

19 - MERKX, M. and AVERILL, B. A. **Probing the role of the trivalent metal in phosphate ester hydrolysis: preparation and characterization of Purple Acid Phosphatases containing Al^{III}Zn^{II} and In^{III}Zn^{II} active sites, including the first example of an active aluminum enzyme.** Journal of the American Chemical Society, v. 121, n. 28, p. 6683-6689, 1999.

20 - KLABUNDE, T.; STRÄTER, N.; FRÖHLICH, R.; WITZEL, H. and KREBS, B. **Mechanism of Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase based on crystal structures.** Journal of Molecular Biology, v. 259, p. 737-748, 1996.

21 - STRÄTER, N., KLABUNDE, T., TUCKER, P.; WITZEL, H. and KREBS, B. **Crystal structure of a purple acid-phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active-site.** Science, v. 268, p. 1489-1492, 1995.

22 – SCHENK, G.; GAHAN, L. R.; CARRINGTON, L. E.; MITIC, N.; VALIZADEH, M.; HAMILTON, S. E.; JERSEY, J. and GUDDAT, L. W. **Phosphate forms an unusual tripodal complex with the Fe-Mn center of sweet potato purple acid phosphatase.** PNAS, v. 102, p. 273-278, 2005.

23 - ANTANAITS, B. C.; STREKAS, T. and AISEN P. **Characterization of pink and purple uteroferrin by resonance raman and CD spectroscopy.** Journal of Biological Chemistry, v. 257, p. 3766-3770, 1982.

24 - AVERILL, B. A.; DAVIS, J. C.; BURMAN, S.; ZIRINO, T.; SANDERSLOEHR, J.; LOEHR, T.M.; SAGE, J.T.; DEBRUNNER, P.G. **Spectroscopic and magnetic studies of the purple acid phosphatase from bovine spleen.** Journal of American Chemical Society. v. 109, n. 12, p. 3760-3767, 1987.

25 - VINCENT, J. B.; OLIVER-LILLEY, G. L. and AVERILL, B. A. **Proteins containing oxo-bridge dinuclear iron centers: a bioinorganic perspective.** Chemical Reviews, v. 90, n. 8, p. 1447-1467, 1990.

26 - GEHRING, S.; FLEISCHHAUER, P.; BEHLENDORF, M.; HUBER, M.; LOROSCH, J.; HAASE, W.; DIETRICH, M.; WITZEL, H.; LOCKE, R. and KREBS, B. **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.

27 - GEHRING, S.; FLEISCHHAUER, P.; HAASE, W.; DIETRICH, M. and WITZEL, H. **Magnetic susceptibility studies for structural investigation on 2 Fe-enzyme**

purple acid phosphatase (PAP). Biology Chemistry Hoppe Seyler, v 371, p. 786-786, 1990.

28 - BECK, J. L.; JERSEY, J.; ZERNER, B.; HENDRICH, M.P. and DEBRUNNER, P.G. **Properties of the Fe(II)-Fe(III) derivative of Red Kidney Bean Purple Acid Phosphatase. Evidence for a binuclear Zn-Fe center in native enzyme.** Journal of American Chemical Society, v. 110, p. 3317-3318, 1988.

29 - RODRIGUEZ, J.H.; XIA, Y.M.; DEBRUNNER, P.G.; CHAUDHURI, P. and WIEGHARDT, K. **Mössbauer spectroscopy of the spin-coupled Fe^{III}-Fe^{II} center of reduced uteroferrin.** Journal Physical Chemistry, v. 100, p. 6849-6862, 1996.

30 - DEBRUNNER, P. G.; HENDRICH, M. P.; JERSEY, J.; KEOUGH, D.T.; SAGE, J.T. and ZERNER, B. **Mössbauer and EPR study of the binuclear iron center in purple acid phosphatase.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 745, p. 103-106, 1983.

31 - WANG, D. L.; HOLZ, R. C.; DAVID, S. S.; QUE, L. and STANKOVICH, M.T. **Electrochemical properties of the diiron core of uteroferrin and its anion complexes.** Biochemistry, v. 30, p. 8187-8194, 1991.

32 - 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.

33 - 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.

34 - 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.

35 - 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.

36 - 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.

37 - 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.

38 – 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.

39 - 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.

- 40 - LIDE, D. R. **Handbook of Chemistry and Physics**. CRC Press, 81 edition, 2000.
- 41 - GAGNÉ, R. R.; KOVAL, C. A. and LISENSKY, G. C. **Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements**. Inorganic Chemistry, v. 19, p. 2854-2855, 1980.
- 42 - IBRAHIM, M. M., SHIMOMURA, N., ICHIKAWA, K. et al. **Phosphoester hydrolysis using structural phosphatase models of tren based zinc(II) complexes and X-ray crystal structures of [Zn(tren)(H₂O)(ClO₄)₂ and [Zn(tren)(BNPP)]ClO₄**. Inorganica Chimica Acta, v.313, p.125 – 136, 2001.
- 43 - SHELDRIK, G. M. **SHELXL-97: program for the refinement of crystal structures**. University of Göttingen, Germany, 1997.
- 44 - ZSOLNAI, L. **ZORTEP: an interactive ORTEP program**. University of Heidelberg, Germany, 1997.
- 45 - MARTELL, A. E. and MOTEKAITIS, R. J. **Determination and use of stability constants**. VCH, New York, 2nd ed, 1992.
- 46 - THOER, A.; DENIS, M., DELMAS, M. and 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.
- 47 - SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRIL, T. C. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 5^a Ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1991, p. 292.

48 - GEARY, W. J. **The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds.** Coordination Chemistry Reviews, v. 7, p. 81-122, 1971.

49 - NAKAMOTO K., Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. 3^a Ed. New York. John Wiley & Sons, Inc. 1977, part III, p. 231-232, 242.

50 - GABER, B. P.; MISKOWSKI, V. and SPIRO, T. G. **Ressonance raman scattering from iron(III)- and copper(II)- transferrin and an iron (III) model compound. A spectroscopic interpretation of transferrin binding site.** Journal of American Chemical Society. v. 96, n. 22, p. 6868-6873, 1974.

51 - KARSTEN, P.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A.; DRAGO, V. and LANZMASTER, M. **Synthesis, structure, properties, and phosphatase-like activity of the first heterodinuclear Fe^{III}Mn^{II} complex with the unsymmetry ligand H₂BPBPMP as a model for the PAP in Sweet Potato.** Inorganic Chemistry, vol. 41, p. 4624-4625, 2002.

52 - LANZMASTER, M.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICZ, B. and SCHWINGEL, E. **New Fe^{III}Zn^{II} complex containing a single terminal Fe-O_{phenolate} bond as a structural and functional model for the active site of Red Kidney Bean Purple Acid Phosphatase.** Inorganic Chemistry, 41, 5641-5642, 2002.

53 - BATISTA, S. C.; NEVES, A.; TEREZI, H. *et al.* **Highly efficient phosphatase diéster hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical Fe^{III}Ni^{II} model complex.** Inorganic Chemistry Communications, v. 6, p. 1161-1165, 2003.

54 - BATISTA, C. S. **Novos compostos de coordenação heteronucleares de Fe^{III}Ni^{II} e Ga^{III}Ni^{II} como modelo para as fosfatases ácidas púrpuras substituídas.** Florianópolis, 2003. Tese de doutorado em Química – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

55 – NEVES, A. and PERALTA, R. A. Dados ainda não publicados.

56 – NEVES, A.; LANZMASTER, M. and ENGER AIRES, V. V.; Dados ainda não publicados.

57 - GOLD, V. Advances in Physical Organic Chemistry. Academic Press, New York, 1967.

58 - VOET, D. and VOET, J. G. **Biochemistry.** Wiley, New Jersey, 2nd edition, 1995.

59 - WILKINGS, R. G. **Kinetics and mechanism of reactions of transition metal complexes.** VCH, New York, 2nd edition, 1991.

60 - BUNTON, C. A. and FARBER, S. J. **The hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenil)phosphate.** The Journal of Organic Chemistry, v. 34, p. 767-772, 1969.

61 – DICKSON, D. P. E. and BERRY F. J. **Mössbauer spectroscopy.** Cambridge: Ed. Cambridge University Press, 1986.

62 - SATCHER J.; JOE H.; OLMSTEAD, M. M.; DROEGE, M. W.; et. al. **Novel Square Arrangements in tetranuclear and octanuclear iron(III) complexes with asymmetric iron environments created by the unsymmetric bridging ligand N,N,N'- tris((N-methyl)-2-benzimidazolymethyl)-N'- methyl-1,3-diamino-2-propanol.** Inorganic Chemistry, v. 37, n. 26, p. 6751 – 6758, 1998.