

José Antonio Faidiga de Oliveira

**OXIDAÇÃO DE CATECÓIS PROMOVIDA POR COMPLEXOS
BINUCLEARES DE COBRE(II): CATÁLISE HOMOGÊNEA E
HETEROGÊNEA**

Dissertação submetida ao Programa 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.
Orientador: Prof. Dr. Adailton João Bortoluzzi

Florianópolis
2013

Oliveira, José Antonio Faidiga de

Oxidação de Catecois Promovida por Complexos Binucleares de Cobre(II): Catálise Homogênea e Heterogênea / José Antonio Faidiga de Oliveira ó Florianópolis: UFSC / Programa de Pós-Graduação em Química, 2013.

xxv, 140 p.: il. 21 cm.

Orientador: Adailton João Bortoluzzi

Dissertação (Mestrado): Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Programa de Pós-Graduação em Química, 2013.

Referências Bibliográficas: p.120-130.

1.Oxidação de Catecois 2. Catálise 3. Complexos de Cobre(II) ó
Dissertação, Boroluzzi, Adailton João, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Programa de Pós-Graduação em Química.

José Antonio Faidiga de Oliveira

**OXIDAÇÃO DE CATECÓIS PROMOVIDA POR COMPLEXOS
BINUCLEARES DE COBRE(II): CATÁLISE HOMOGÊNEA E
HETEROGÊNEA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 24 de maio de 2013.

Prof., Dr. Almir Espinelli
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Adailton João Bortoluzzi
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ademir Neves
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Fernando Molin
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho à minha família e
aos meus queridos amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente meu pai Aurelio (õLeloö), minha mãe Inez (õNeiseö) e meu irmão Danilo (õNinoö) pelo apoio durante estes longos anos em Florianópolis.

Agradeço também aos meus tios e tias.

A todos os professores que ajudaram no meu crescimento durante o curso de Química. Em especial, gostaria de agradecer o professor Dr. Ademir Neves, o professor Dr. Josiel Domingos, o professor Dr. Bruno Szpoganicz, a professora Dra. Rosely Peralta e o professor Dr. Valfredo Fávere pelo empenho durante a realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos de Florianópolis: Welman, David, Rodolpho, Danilo e Gean pela presença e amizade. Gostaria de agradecer em especial aos meus amigos e afilhados Fernanda e José Ferraz (Neto) pela grande amizade e confiança.

Aos meus queridos amigos de Bauru: Jeanan (õMeninãö), Rafa (õJaponeisö), Tiago Carraro (õPitö), Alexandre (õXö), Érico (õFilhãö), Luizinho, Diehgo, João Gabriel e Natália, e tantos outros que não conseguirei lembrar, o meu muito obrigado!

Aos meus amigos do LABINC, todos os que já se foram e os que estão trabalhando atualmente no grupo. Obrigado pela amizade! Agradeço aos meus amigos Tiago Pacheco, Clóvis, Rafa Jovito, Fernando Xavier, Geovana Terra, Schilling, Vicente e principalmente ao meu amigo Bernardo de Souza pelo grande apoio durante a realização deste projeto.

Quero agradecer também aos professores, estudantes e técnicos que auxiliaram na realização das análises para este trabalho.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade e a Capes pelo apoio financeiro durante o período de minha pós-graduação.

Agradeço também ao meu orientador Adailton Bortoluzzi pelo apoio durante estes longos anos de LABINC.

öLife is about passions
thank you
for sharing mineö

(Michael Schumacher)

RESUMO

Neste trabalho apresenta-se a síntese de dois complexos binucleares de cobre(II), $[L^{Cl}Cu^{II}(\mu-OH)_2Cu^{II}](ClO_4)_2$ (**1**), publicado recentemente (Massoud, Louka *et al.*, 2011) e $[HL^{en}Cu^{II}(\mu-OH)_2Cu^{II}(H_2O)_2](ClO_4)_3$ (**2**), inédito, como modelos estruturais e funcionais da enzima catecol oxidase. Os complexos foram caracterizados por diversas técnicas como: difratometria de raios X, espectroscopia vibracional no IV e UV-Vis, EPR e eletroquímica. O complexo **1** também foi caracterizado por potenciometria e espectrometria de massas (ESI-MS). A capacidade catalítica dos dois complexos foi avaliada frente à oxidação do substrato 3,5-ditercbutil catecol, observando-se uma eficiência catalítica de 312,5 L mol⁻¹ s⁻¹ para **1** e 607,0 L mol⁻¹ s⁻¹ para **2**. Os complexos foram imobilizados em sílica gel fisicamente (**1**-SiO₂) e covalentemente (**2**-SiO₂) e caracterizados por espectroscopia vibracional IV e UV-Vis, EPR e MEV. Os dois catalisadores híbridos, **1**-SiO₂ e **2**-SiO₂, foram submetidos a testes de oxidação do substrato ativado 3,5-dtbc, avaliação de reutilização e lixiviação. O complexo **1** ainda mostrou-se ativo na catálise de polimerização da poli(dopamina), sendo possível a caracterização desta por ESI-MS, IV, TGA e MEV. O complexo **1** também foi testado como catalisador para o recobrimento de nanopartículas de ferro ônuasö com poli(dopamina) *in situ*, nas mesmas condições testadas na oxidação do 3,5-dtbc. As nanopartículas de ferro recobertas com polidopamina, Fe₃O₄@poli(dopamina), foram caracterizadas por MEV e IV.

Palavras-chave: Oxidação de catecois. Catálise. Complexos de cobre(II).

ABSTRACT

This work presents the synthesis of two dinuclear complexes of copper (II), $[L^{Cl}Cu^{II}(\mu-OH)_2Cu^{II}](ClO_4)_2$ (**1**), published recently by Massoud *et al.* (Massoud Louka et al., 2011) and $[HL^{en}Cu^{II}(\mu-OH)_2Cu^{II}(H_2O)_2](ClO_4)_3$ (**2**), unprecedented, as structural and functional models of the catechol oxidase enzyme. The complexes were characterized by various techniques such as X-ray diffraction, vibrational spectroscopy (FTIR) and UV-Vis, EPR and electrochemical measurements. The complex **1** was also characterized by mass spectrometry (ESI-MS) and potentiometry. The ability of the two biomimetic complexes was evaluated in the oxidation of 3,5-*ditert*-butyl catechol (3,5-dtbc), observing a catalytic efficiency of $312,5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for **1** and $607,0 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ to **2**, respectively. The complexes were immobilized physically (**1**-SiO₂) and covalently (**2**-SiO₂) on silica gel and characterized by FTIR, UV-Vis, EPR and SEM. The two hybrid catalysts, **1**-SiO₂ and **2**-SiO₂ were tested for oxidation of 3,5-dtbc and evaluated for their reuse and leaching. The complex **1** also was active to catalyse the polymerization of poly(dopamine), making possible to characterize it by ESI-MS, FTIR, TGA and SEM. The complex **1** was also tested as a catalyst for coating "naked" iron oxide nanoparticles with poly(dopamine) *in situ* under the same conditions tested in the oxidation of 3,5-dtbc. The iron oxide nanoparticles coated with poly(dopamine), Fe₃O₄@poly(dopamine), were characterized by SEM and IV.

Keywords: Catechols oxidation. Catalysis. Copper(II) complexes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A: Relação sinérgica entre estudos envolvendo complexos-modelo e bioquímica de metaloproteínas, proposta por Karlin (Karlin, 1993); B: Observação da relação sinérgica proposta por Karlin utilizando como exemplo a enzima Metano Monooxigenase, MMO, (Himes, 2009) e o modelo mimético Cu-ZSM-5 desenvolvido por Woertink (Julia S. Woertink, 2009).....	30
Figura 2. Classificação dos vários tipos de sítios de cobre.....	32
Figura 3. Transformações químicas realizadas nos substratos pela tirosinase e catecol oxidase.....	33
Figura 4. Estrutura cristalina das proteínas do Tipo 3 exibindo seus sítios ativos. A: hemocianina do caranguejo ferradura <i>Limulus polyphemus</i> (Decker e Tuzcek, 2000); B: catecol oxidase da batata doce <i>Ipamoea batatas</i> (Koval, Selmececi <i>et al.</i> , 2006); e C: tirosinase do cogumelo <i>Agacirus bisporus</i> (Ismaya, Rozeboom <i>et al.</i> , 2011).....	35
Figura 5. Mecanismo de atividade de cresolase e catecolase da tirosinase e/ou da catecol oxidase proposta por Krebs (Gerdemann, Eicken <i>et al.</i> , 2002) com base na proposta desenvolvida por Solomon e colaboradores (Solomon, Sundaram <i>et al.</i> , 1996) e outros resultados recentes da literatura (Eicken C.; Krebs, 1999; Solomon, Chen <i>et al.</i> , 2001).....	37
Figura 6. Sítio ativo da catecol oxidase e alguns complexos-modelo desta enzima. Acima, desenho do sítio ativo da Catecol Oxidase, ibCO (<i>Ipamoea batatas</i>) na forma <i>met</i> e os complexos $[Cu_2L_2(\mu-OH)]^{2+}$ A (Ackermann, 2007), $[Cu_2(\mu-OH)(C_{21}H_{33}ON_6)]^{2+}$ B (Rey, Neves <i>et al.</i> , 2006), C $[Cu(NO_2-XY-H)(O_2)]^{2+}$ (Karlin, Nasir <i>et al.</i> , 1994) e P^{DBED} D (Mirica, 2005).....	39
Figura 7. Catalisadores híbridos utilizados como modelos miméticos para oxidação de 3,5-dtbc.....	41
Figura 8. Esquema da síntese dos ligantes L^{Cl} e L^{en}	52
Figura 9. Espectro na região do IV do bpma em pastilha de KBr.....	53
Figura 10. Espectro na região do IV do ligante L^{Cl} em pastilha de KBr.....	55

Figura 11. Espectro de RMN ^1H do ligante L^{Cl} em CDCl_3	55
Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C do ligante L^{Cl} em CDCl_3	56
Figura 13. Espectro na região do IV do ligante L^{en} em pastilha de KBr.....	57
Figura 14. Espectro de RMN ^1H do ligante L^{en} em CDCl_3	58
Figura 15. Espectro de RMN ^{13}C do ligante L^{en} em CDCl_3	58
Figura 16. Espectro na região do IV do complexo 1 em pastilha de KBr.....	60
Figura 17. Espectro na região do IV do complexo 2 em pastilha de KBr.....	61
Figura 18. Comparativo de espectros de infravermelho em KBr dos ligantes L^{Cl} (vermelho), L^{en} (azul) e bpma (preto). a) ampliação dos espectros de infravermelho 4000 a 500 cm^{-1} ; b) na região compreendida entre 2000 e 500 cm^{-1}	66
Figura 19. Curva de termogravimetria (TGA - preto) e sua respectiva derivada (DrTGA - vermelho) do ligante L^{Cl}	69
Figura 20. Estrutura cristalina parcial do cátion complexo $[\text{HL}^{\text{en}}\text{Cu}(\mu\text{-OH})_2\text{Cu}]^{3+}$ (2). Cor cinza: carbono; azul: nitrogênio; laranja: cobre e vermelho: oxigênio. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.....	71
Figura 21. Comparativo de espectros de infravermelho (KBr, cm^{-1}), em ordem decendente: L^{Cl} , 1, L^{en} e 2.....	73
Figura 22. Espectros eletrônicos registrados para os complexos 1 e 2. Acima, espectros UV-Vis dos dois complexos registrados em CH_3CN . Abaixo, espectros registrados em $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 50:50 v/v, $[\text{T}] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (HOAc/OAc $^-$ pH 3,5; MES pH 4,0 a 6,5, HEPES pH 7,0 e 7,5 e CHES pH 8,0), $[\text{1}] = [\text{2}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	75
Figura 23. Distribuição de espécies para os ligantes L^{Cl} (preto) e L^{en} (azul) em função de $\log[\text{H}^+]$ com 0,1 M NaNO_3 à 25 °C ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 50:50 v/v). Distribuição de espécies para os ligantes L^{Cl} (preto) e L^{en} (azul). $[\text{L}^{\text{Cl}}] = [\text{L}^{\text{en}}] = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. L simboliza os ligantes L^{Cl} ou L^{en}	76
Figura 24. Distribuição de espécies para o complexo 1 em função de $\log[\text{H}^+]$ com 0,1 M NaNO_3 à 25 °C. A: $\text{Cu}_2\text{LH}_2^{6+}$; B: CuLH^{3+} ; C: Cu_2L^{4+} ; D: $\text{Cu}_2\text{H}_1\text{L}(\text{OH})^{3+}$; E:	

$\text{Cu}_2\text{H}_1\text{L}(\text{OH})_2^{2+}$. $[\text{Cu}^{2+}] = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{L}] = 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$. L simboliza o ligante L^{Cl}	78
Figura 25. Voltamogramas cíclicos registrados para os complexos 1 ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e 2 ($1,02 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo; eletrodo auxiliar: fio de platina; eletrodo de referência Ag/AgCl; eletrólito suporte: NaClO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$); Tampão MES ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), solvente MeOH/ H_2O (1:1); pH 6,0 (complexo 1) e 6,5 (complexo 2); velocidade de varredura: 25 mV s^{-1} ; padrão: hexacianoferrato de potássio.....	80
Figura 26. Espectro de massas ESI(+)-MS do complexo 1 em solução metanólica, MeOH/ H_2O 50:50 v/v, em pH 6,0.....	84
Figura 27. ESI(+)-MS do complexo 1 em solução metanólica, MeOH/ H_2O 50:50 v/v, em pH 6,0. Simulação das espécies: A, m/z 335,5 $[(\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{N}_9\text{Cl})\text{Cu}^{\text{II}}_2(\text{OH})_2]^{2+}$, B, m/z 342,5 $[(\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{N}_9\text{Cl})\text{Cu}^{\text{II}}_2(\text{OH})(\text{MeO})]^{2+}$ e C, m/z 349,5 $[(\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{N}_9\text{Cl})\text{Cu}^{\text{II}}_2(\text{MeO})_2]^{2+}$. Espectro em preto é o experimental e em linhas azuis, o simulado.....	85
Figura 28. Espectro UV-Vis da reação de oxidação do catecol (à esquerda) e do 3,5-dtbc (à direita), acompanhada nos primeiros 20 minutos iniciais das reações, utilizando-se um espectrofotômetro convencional.....	87
Figura 29. Dependência da velocidade de reação dos complexos 1 e 2 com o substrato 3,5-dtbc em função do pH. Condições: $[\text{1}] = [\text{2}] = 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{3,5-dtbc}] = 6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{T}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (HOAc/OAc ⁻ pH 3,7; MES pH 4,0 a 6,5, HEPES pH 7,0 e 7,5 e CHES pH 8,5) a $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$, em MeOH/ H_2O 50:50 v/v (saturada com O_2)	88
Figura 30. Dependência da velocidade da reação de oxidação em função da concentração do substrato 3,5-dtbc pelos complexos 1 e 2 nas seguintes condições experientais: solução $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 50:50 v/v, $[\text{1}] = [\text{2}] = 4,98 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{3,5-dtbc}] = (0,15 - 5,0) \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{T}] = 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ (tampão MES pH 6,0 para o complexo 1 e 6,5 para o complexo 2) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$	90
Figura 31. Proposta mecanística para a oxidação do substrato 3,5-dtbc promovida pelos complexos 1 e 2.....	94
Figura 32. Comparativo de espectros de infravermelho (KBr, cm^{-1}), dos complexos imobilizados 1- SiO_2 (em vermelho) e 2- SiO_2 (preto).....	97
Figura 33. Espectros de EPR no estado sólido dos complexos	

suportados 1-SiO ₂ e 2-SiO ₂ a 77 e 298 K.....	99
Figura 34. Isoterma de equilíbrio de adsorção avaliada segundo os modelos de Langmuir, Freundlich e Dubinin-Hadushkevich (D-R). Volume = 10 mL; [1] = 750 ó 9000 mg L ⁻¹ ; m _{adsorvente} = 30 mg; t = 25 °C; frequência de agitação = 50 rpm.....	103
Figura 35. Análises de microscopia (MEV) dos suportes: a) SiO ₂ -gel sem presença de catalisador; b) Sílica ancorada com o complexo, 1-SiO ₂	103
Figura 36. Dependência da velocidade da reação de oxidação em função da concentração do substrato 3,5-dtbc pelo catalisador 2-SiO ₂ nas seguintes condições experimentais: solução H ₂ O/MeOH 50:50 v/v, m = 2,0 mg ± 0,5, [2-SiO ₂] = 1,80 x 10 ⁻⁴ mol g ⁻¹ de SiO ₂ , [3,5-dtbc] = (0,5 - 4,0) x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ , [T] = 0,1 mol L ⁻¹ (MES pH 6,5) à 25 °C.....	104
Figura 37. Acompanhamento espectral da reação de oxidação da dopamina. Condições: meio MeOH/H ₂ O 50:50 v/v, [T] = 0,1 mol L ⁻¹ (MES pH 6,0), [1] = 1,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , [dopamina] = 1,0 x 10 ⁻² à 25 °C por 20 minutos.....	106
Figura 38. Micrografia obtida por MET das nanopartículas de ferro sintetizadas pelo método de co-precipitação. b) Histograma de distribuição de tamanho ajustado a uma função log-normal para as nanopartículas de Fe ₃ O ₄	108
Figura 39. Comparativo de espectros de infravermelho (KBr, cm ⁻¹), de cima para baixo: Fe ₃ O ₄ , poli(dopamina) e Fe ₃ O ₄ @poli(dopamina).....	109
Figura 40. a) Espectro de massas da reação de oxidação da dopamina catalisada (1% mol) pelo complexo 1 em presença de O _{2(g)} , após 15 min de reação em pH 6,0; b) ESI(+)-MS/MS do íon m/z 568,58; c) Espectro de massas do fragmento m/z 415,1 (C ₂₄ H ₁₇ N ₃ O ₆ - CO) ampliado (azul) e seu espectro simulado (vermelho); d) Estrutura do oligômero intacto.....	111
Figura 41. Curva de termogravimetria (TGA - preto) e sua respectiva derivada (DrTGA - vermelho): a) Nanopartículas de ferro sintetizadas por co-precipitação e b) Nanopartículas de ferro recobertas com poli(dopamina), Fe ₃ O ₄ @poli(dopamina)..	134
Figura 42. Análises de microscopia (MEV): c) e d) Formação da Poli(dopamina) após a reação com o complexo 1 em meio homogêneo com magnificação de 550 e 4000 X, respectivamente; e) e f) Nanopartículas de ferro (Fe ₃ O ₄) após o recobrimento com poli(dopamina) em presença do complexo	

1 com magnificação de 650 e 3500 X, respectivamente..... 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais bandas (cm^{-1}) e atribuições dos espectros na região do infravermelho para os ligantes sintetizados e o bpma.....	67
Tabela 2. Deslocamentos químicos, em ppm (multiplicidade e integração), observados nos espectros de RMN de ^1H para os ligantes L^{Cl} e L^{en}	68
Tabela 3. Principais bandas (cm^{-1}) e atribuições dos espectros na região do infravermelho para os ligantes L^{Cl} , L^{en} e os complexos 1 e 2.....	72
Tabela 4. $\text{Log}\beta$ determinado para L^{Cl} , L^{en} e para o complexo 1 determinados utilizando 0,1 M NaNO_3 em $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 50:50 v/v à 25 °C.....	77
Tabela 5. Resultado das voltametrias cíclica e pulso diferencial para os complexos 1 e 2.....	81
Tabela 6. Valores de pK_a cinéticos e potenciométricos encontrados para os complexos 1 e 2.....	89
Tabela 7. Comparação dos parâmetros cinéticos de alguns complexos selecionados e da catecol oxidase da <i>Ipomoea batatas</i>	91
Tabela 8. Valores obtidos a partir das isotermas de Langmuir, Freundlich e Dubinin-Hadushkevich.....	101
Tabela 9. Principais bandas (cm^{-1}) e atribuições dos espectros na região do infravermelho para diferentes melaninas naturais e poli(dopaminas)/melaninas sintéticas....	110

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- 1 ó $[L^{Cl}Cu^{II}(\mu-OH)_2Cu^{II}] \cdot (ClO_4)_2$
1-SiO₂ ó complexo 1 imobilizado em sílica
2 ó $[HL^{en}Cu^{II}(\mu-OH)_2Cu^{II}] \cdot (ClO_4)_3$
2-SiO₂ ó complexo 2 imobilizado em sílica
3,5-dtbc ó 3,5-di-terc-butilcatecol
@ - símbolo que indica recobrimento
ó deslocamento químico (RMN)
ó estiramento axial
ó deformação angular simétrica no plano
ó deformação angular simétrica fora do plano
ó densidade
ó coeficiente de absorvidade molar ou potencial de Polanyi
κ ó constante de Dubinin-Hadushkevich
ó comprimento de onda (nm)
ê m ó variação de massa em porcentagem
ê Ep ó diferença de potencial de pico
ê E_{1,2} - diferença entre os dois picos catódicos do complexo
AAAC ó Absorção Atômica com Atomização por Chama
br ó *broad* (larga)
C ó complexo (quando for citado na parte cinética)
Ce ó concentração do adsorbato em solução
CDCl₃ ó clorofórmio deuterado
CHES ó ácido 2-[N-cicloexilamino]etanossulfônico
Cys - cisteína
DHI - dihidroxiindol
DMSO ó dimetilsulfóxido
daza ó 1,4-diazepan-6-amino
Da - daltons
DIPEA ó *N,N*-diisopropiletil amina
DMF ó dimetilformamida
DNA ó deoxirribonucleic acid ó ácido desoxirribonucléico
D-R ó Dubinin-Hadushkevich
E ó eficiência catalítica
ECS ó eletrodo de calomelano saturado
EPR ó *Electron Paramagnetic Resonance*
E^{1/2} ó potencial de meia onda
ENH ó eletrodo normal de hidrogênio

Epaó potencial de pico anódico
Epcó potencial de pico catódico
EXAFS ó *Extended X-Ray Absorption Fine Structure*
f ó fator de diluição
g ó fator de Landé
His - histidina
HEPES ó ácido 2-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperazino]etanossulfônico
HISMIMA ó [(2-imidazol-4-il)etyl)(1-metilimidazol-2-il)metil]amina
HOAc ó ácido acético
IV ó infravermelho
ibCO ó catecol oxidase da batata doce, *Ipamoea batatas*
i - corrente
ipa ó corrente de pico anódico
ipc ó corrente de pico catódico
K_F ó constante de Freundlich
K_L ó constante de Langmuir
K_{ass} ó constante de associação
k_{cat} ó constante catalítica
K_M ó constante de Michaelis-Menten
L-DOPA ó L-3,4-dihidroxietyl-anlanina
LiOD ó hidróxido de lítio deuterado
L^{Cl} - 6-cloro-N²,N²,N⁴,N⁴-tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina
L^{en} - N²-(2-aminoetyl)-N⁴,N⁴,N⁶,N⁶-tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina
MCD ó Magnetic Circular Dichroism
MES ó ácido 2-[N-morfolino]etanossulfônico
MOF ó *Metal Organic Frameworks*
MEV ó Microscopia Eletrônica de Varredura
MET ó Microscopia Eletrônica de Transmissão
n ó intensidade de adsorção
OAc ou Ac - acetato
P - porosidade
Phe - fenilalanina
PMMA ó poli(metilmetacrilato)
psi - *pound per square inch*
pH ó potencial hidrogeniônico
pK_a ó constante de dissociação ácida em escala logarítmica
pK_w ó constante de autoprotólise da água em escala logarítmica
ppm ó partes por milhão
PTU ó feniltiuréia

qe ó quantidade adsorvida
qm ó quantidade máxima de adsorção
R ó constante dos gases nobres
 R^2 ó coeficiente de determinação
RNA ó ribonucleic acid ó ácido ribonucléico
RMN de ^1H ó ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C ó ressonância magnética nuclear de carbono
Rr ó Raman resonance
S ó substrato (quando for citado na parte cinética)
 SOCl_2 ó cloreto de tionila
t - temperatura
T ó temperatura absoluta ou tampão (quando for citado em cinética)
TACN ó 1,4,7-triazaciclononano
TGA ó *Thermogravimetryc Analysis*
Thr - tirosina
TMS ó tetrametilsilano
TRC ó *Time Resolved Crystallography*
UV-Vis ó ultravioleta-visível
 V_0 ó velocidade inicial
XAS ó *X-ray Absorption Espectroscopy*
XPS ó *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	29
1.1. Introdução	29
1.2. Proteínas de Cobre	31
1.3. Proteínas do Tipo 3: Hemocianina, Catecol Oxidase e Tirosinase	33
1.4. Catecol Oxidase e Tirosinase: Mecanismo e Importância	36
1.5. Complexos Biomiméticos	37
1.6. Complexos Biomiméticos: Reutilização do Catalisador .	40
2. OBJETIVOS	43
3. PARTE EXPERIMENTAL	44
3.1. Materiais	44
3.2. Métodos e Instrumentação	44
3.2.1. Análise Termogravimétrica	44
3.2.2. Espectroscopia Vibracional	44
3.2.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	44
3.2.4. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica	45
3.2.5. Espectrometria de Massas	45
3.2.6. Titulação Potenciométrica	45
3.2.7. Eletroquímica	46
3.2.8. Espectroscopia Eletrônica - UV-Vis	46
3.2.9. Catálise	47
3.2.9.1. Catálise Heterogênea	47
3.2.9.2. Catálise Heterogênea	48
3.2.9.2.1. Catálise Heterogênea ó Reutilização do Catalisador	49
3.2.10. Experimentos de Adsorção	49
3.2.11. Absorção Atômica	51
3.2.12. Microscopia	51

3.2.12.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão	51
3.2.12.2. Microscopia Eletrônica de Varredura	51
3.3. Sínteses	52
3.3.1. Síntese Orgânica	52
3.3.1.1 Síntese da amina precursora bis(piridin-2-ilmetil)amina ó bpma	53
3.3.1.2. Síntese do ligante 6-cloro- N^2,N^2,N^4,N^4 -tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina - L^{Cl} ...	54
3.3.1.3. Síntese do ligante N^2 -(2-aminoetil)- N^4,N^4,N^6,N^6 -tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina - L^{en}	56
3.3.2. Síntese Inorgânica	59
3.3.2.1. Síntese do Complexo $[L^{Cl}Cu^{II}(\mu-OH)_2Cu^{II}](ClO_4)_2$ ó 1	59
3.3.2.2. Síntese do Complexo $[HL^{en}Cu^{II}(\mu-OH)_2Cu^{II}(OH_2)_2](ClO_4)_3$ ó 2	60
3.3.3. Síntese dos Materiais	61
3.3.3.1. Imobilização do Complexos em SiO_2	61
3.3.3.1.1. Imobilização do Complexo 1	61
3.3.3.1.2. Imobilização do Complexo 1	62
3.3.3.2. Síntese da Poli(dopamina)	63
3.3.3.3. Síntese das Nanopartículas	63
3.3.3.3.1. Síntese das Nanopartículas de Óxido de Ferro ó Nuasö ó Fe_3O_4	63
3.3.3.3.2 Síntese das Nanopartículas de Óxido de Ferro Recobertas ó Fe_3O_4 @poli(dopamina)	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1. Síntese e Caracterização dos Ligantes	65
4.1.1. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho	65
4.1.2. Ressonância Magnética Nuclear	67
4.1.3. Análise Termogravimétrica do Ligante L^{Cl}	68
4.2. Síntese e Caracterização dos Complexos	70
4.2.1. Difração de Raios X	70
4.2.2. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho	71

4.2.3. Espectroscopia no UV-Vis	74
4.2.4. Titulação Potenciométrica	75
4.2.5. Eletroquímica	79
4.2.6. Espectrometria de Massas	83
4.2.7. Reatividade	86
4.2.8. Efeito do pH	87
4.2.9. Efeito da Concentração do Substrato	89
4.2.10. Proposta Mecanística	93
4.3. Síntese e caracterização dos Materiais ó Sílica	95
4.3.1. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho ó 1-SiO ₂ e 2-SiO ₂	96
4.3.2. Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	98
4.3.3. Experimentos de Adsorção	100
4.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura	102
4.3.5. Catálise Heterogênea	103
4.4. Síntese e Caracterização dos Materiais ó Fe ₃ O ₄ , Poli(dopamina) e Fe ₃ O ₄ @poli(dopamina)	105
4.4.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão	107
4.4.2. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho	108
4.4.3. Espectrometria de Massas	110
4.4.4. Análise Termogravimétrica	112
4.4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura	114
5. CONCLUSÕES	117
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
7. ANEXOS	131

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

Tem sido estimado que, em pelo menos um terço das proteínas estejam presentes um ou mais íons metálicos (Beinert, 2005). Helmut Beinert, em comemoração ao centenário da Bioquímica e Biologia Estrutural (1905 ó 2005) escreveu: *õthere is no life without transition metalsõ* (Beinert, 2005). Beinert estava referindo-se a atuação dos metais principalmente como requisito para um processo fundamental para a vida, a catálise. De fato os metais estão presentes em todos os seres vivos atuando de maneiras diversas, mesmo que em percentual baixíssimo. A Química Bioinorgânica tem contribuído desde o início do século XX principalmente elucidando aspectos magnéticos e eletrônicos, na reatividade e no mecanismo de atuação dos centros metálicos presentes em proteínas e enzimas (Karlin, 1993; Lippard, 2006).

Hoje em dia a Bioinorgânica e Bioquímica contam com técnicas modernas de caracterização como, por exemplo, XAS, EXAFS, MCD, TRC e métodos computacionais, todas aplicadas na elucidação muito mais completa dos mecanismos de atuação de enzimas, drogas sintéticas e proteínas (Beinert, 2005). Porém, há 50 anos a dificuldade de metodologias de cristalização e purificação adequadas, e mesmo a identificação da estrutura primária de proteínas e enzimas era de extrema dificuldade. A própria espectrometria de massas, amplamente utilizada hoje, teve seu auge apenas em 2002 quando John Fenn, Koichi Tanaka e Kurt Wüthrich foram laureados com o premio Nobel de Química pelo desenvolvimento de métodos para a identificação e análise estrutural de macromoléculas biológicas (Tanaka, 2003).

A síntese de complexos análogos pôde, desta forma, levar à descoberta de informações importantes como, por exemplo, a correlação entre geometria de coordenação e espectroscopia, pela modificação sintética da geometria e basicidade dos ligantes que envolvem os íons metálicos. O fato da síntese e modificação dos ligantes serem alcançadas de maneira simplificada em comparação com enzima de interesse, ainda é uma vantagem atualmente muito utilizada no campo da química bioinorgânica e da química de coordenação (Karlin, 1993).

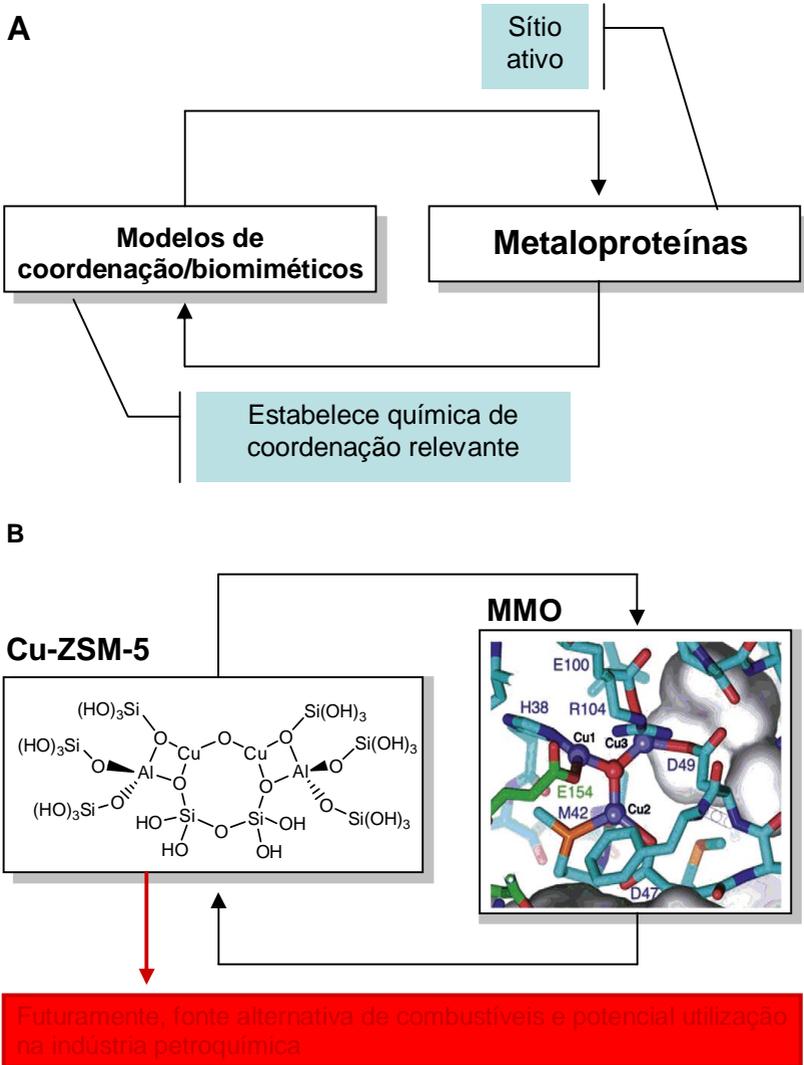


Figura 1. A: Relação sinérgica entre estudos envolvendo complexos-modelo e bioquímica de metaloproteínas, proposta por Karlin (Karlin, 1993); **B:** Observação da relação sinérgica proposta por Karlin utilizando como exemplo a enzima Metano Monooxigenase, MMO, (Himes, 2009) e o modelo mimético Cu-ZSM-5 desenvolvido por Woertink (Julia S. Woertink, 2009).

Um diagrama simplificado da contribuição mútua (relação sinérgica) entre metaloproteínas e modelos miméticos, organizado por Karlin (Karlin, 1993), pode ser observada na Figura 1.

Os complexos biomiméticos auxiliam na proposta de um possível mecanismo para a enzima de interesse e a descoberta de novas enzimas auxilia no desenvolvimento de química de coordenação como um todo. Um dos exemplos mais conhecidos da aplicação desta relação sinérgica é a síntese e caracterização do núcleo Cu_2O_2 , com ponte $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ peroxo, presente na Hemocianina, antes mesmo da determinação da estrutura de raios X da proteína (Lippard, 2006), através de um complexo análogo publicado por Kitajima e colaboradores (Kitajima, Fujisawa *et al.*, 1989). A determinação da estrutura de raios X, as características espectroscópicas, magnéticas e eletrônicas desta proteína, auxiliou de forma significativa na caracterização de enzimas como a Catecol Oxidase (Krebs., 1998).

Exemplos recentes de análogos miméticos de enzimas como, por exemplo, a Metano Monooxigenase (MMO) (Himes, 2009), que converte metano para metanol, vem sendo alvo de pesquisas científicas visando o uso de complexos de forma mais racional e barata para futuramente serem aplicados como catalisadores no desenvolvimento de fontes renováveis de combustíveis e aplicação na indústria petroquímica (Julia S. Woertink, 2009).

1.2. PROTEÍNAS DE COBRE

O cobre é considerado um elemento ômoderno, tendo sido biodisponível há cerca de 1,7 bilhão de anos atrás (Kaim, 1996). Com o aparecimento de organismos fotossintéticos em uma atmosfera rica em oxigênio, houve a necessidade por um metal solúvel, biodisponível e redox-ativo com potenciais entre 0 e 800 mV (Kaim, 1996).

Metaloenzimas contendo pares redox $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ se encaixam na necessidade de muitos organismos como ativador de oxigênio, modificação de peptídeos, produção de melanina, oxidação de catecóis, transporte de oxigênio, entre outros (Rosenzweig, 2006).

Inicialmente todas as proteínas de cobre foram classificadas com base nas suas características espectroscópicas em três classes: Tipo 1, Tipo 2 e Tipo 3. Com o avanço dos métodos espectroscópicos e de cristalização, até o momento, os diversos tipos de enzimas que contem Cu como integrante de seus sítios ativos podem ser classificados em sete tipos de classes: Tipo 1, Tipo 2, Tipo 3, Tipo 4, CuA, CuB e CuZ (Koval, Selmeçzi *et al.*, 2006) (Figura 2).

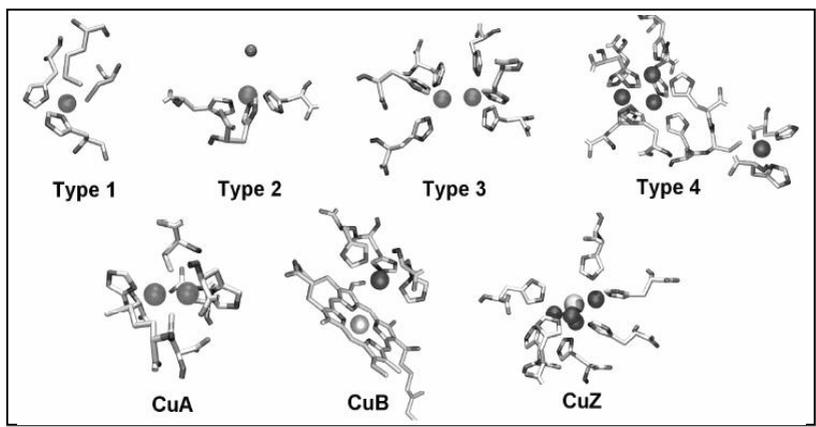


Figura 2. Classificação dos vários tipos de sítios de cobre.

De forma muito simplificada os Tipos 1 e 2 são mononucleares, sendo que, no Tipo 1 a característica marcante é a forte coloração azul devido a transferência de carga Cu^{II} Cys (ex.: Azurina). No Tipo 2, ligantes N,O doadores em geometria tetragonal favorecem a ligação com o substrato em reações de oxidação (ex.: Galactose Oxidase). Essas proteínas são conhecidas como proteínas ãnormaisö de Cu^{II} , por possuírem o EPR característico de complexos mononucleares de cobre Cu^{II} .

Os Tipos 3 e CuA apresentam centros binucleares de cobre, porém as características eletrônicas e espectroscópicas diferem enormemente. No Tipo 3, três resíduos de His coordenam cada átomo de Cu^{II} . Nesta classe, o EPR silencioso é uma característica marcante devido ao acoplamento antiferromagnético entre os dois centros de cobre(II) (ex.: Catecol Oxidase). Na classe CuA, conhecida como sítio de valência mista, ambos os átomos de cobre possuem carga formal de +1,5 e geometria tetraédrica, coordenados por dois resíduos de His e dois tiolatos (da Cys) (ex.: Nitro Óxido Redutase).

Nos Tipos 4 e CuZ há formação de *clusters*. O Tipo 4 normalmente é composto pelos tipos 2 e 3. Em alguns casos é possível existir mais do que um sítio do Tipo 2 e são responsáveis por uma ampla gama de reações de oxidação (ex.: Laccase). O Tipo CuZ é composto por quatro íons dispostos a formar um tetraedro, contendo uma hidroxila e um íon enxofre inorgânico. Por último, o Tipo CuB é característica

pela presença de um sítio mononuclear de cobre próximo a um centro de ferro na Citocromo C Oxidase.

Uma descrição completa de cada um destes tipos pode ser consultada segundo trabalhos publicados recentemente por Koval (Koval, Selmeczi *et al.*, 2006) Rosenzweig (Rosenzweig, 2006) e Solomon (Solomon, Baldwin *et al.*, 1992; Solomon, Sundaram *et al.*, 1996). Dentre as classes mencionadas acima, as proteínas do Tipo 3 serão amplamente discutidas neste trabalho.

1.3. PROTEÍNAS DO TIPO 3: HEMCIANINA, CATECOL OXIDASE E TIROSINASE

Proteínas do Tipo 3 funcionam na ligação e ativação do O_2 (Solomon, Sundaram *et al.*, 1996). Exemplos deste tipo incluem a Hemocianina, responsável pelo transporte de oxigênio em artrópodes e moluscos, a catecol oxidase, que converte *o*-catecois a *o*-quinonas e a tirosinase, responsável pela hidroxilação de monofenóis, como a tirosina, e a conversão de catecois a quinonas (Eicken C.; Krebs, 1999). Os substratos e as transformações realizadas pelas duas enzimas podem ser acompanhados abaixo (Figura 3).

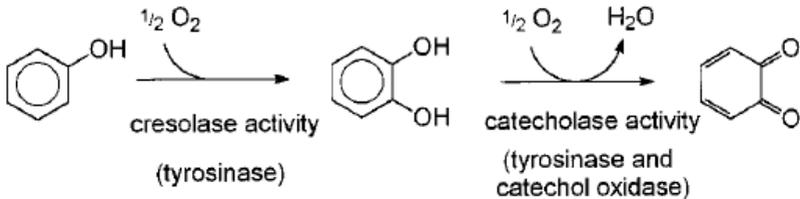


Figura 3. Transformações químicas nos substratos pela tirosinase e catecol oxidase.

Estruturalmente as proteínas do Tipo 3 apresentam dois centros de Cu^{II} , cada um coordenado por três resíduos de histidina (Figura 4). Na forma *oxi* existente nas proteínas do Tipo 3, na qual o oxigênio encontra-se coordenado como ponte $\mu-\eta^2:\eta^2$ entre os centros de Cu^{II} não apresentam sinal no EPR (EPR silencioso), devido ao forte acoplamento antiferromagnético ($-2J > 600\text{ cm}^{-1}$ para a *ibCO*) entre os centros de cobre. Os dois centros de cobre na forma *oxi* da *ibCO* são separados por uma distância aproximada de $3,8\text{ \AA}$ (determinada por EXAFS), embora

esse valor possa variar de proteína para proteína (Solomon, Sundaram *et al.*, 1996; Eicken C.; Krebs, 1999; Koval, Selmeczi *et al.*, 2006).

Mesmo apresentando características estruturais semelhantes, a diferença na função específica de cada enzima deve em grande parte ao papel que a segunda esfera de coordenação exerce sobre cada sítio ativo. No caso da hemocianina, a função específica da proteína é o transporte de oxigênio. Mas como seria possível uma proteína ter função específica de transporte de oxigênio e ser tão parecida estruturalmente com enzimas que realizam um papel tão distinto?

Decker e Krebs mostraram que hemocianinas podem ter papel catalítico atuando como oxidases (Decker e Tuzcek, 2000). Em sua forma nativa, as hemocianinas não apresentam, ou apresentam uma atividade catalítica muito baixa, como monooxigenase ou catecolase (Eicken C.; Krebs, 1999).

Na hemocianina extraída de tarântula, *Eurypelma californicum*, há um resíduo de fenilalanina (Phe-49) que está situado a uma distância de 3,5 Å do sítio ativo, funcionando como um gatilho alostérico, protegendo o sítio ativo de outros substratos (Decker, 1998). Quando o resíduo é removido por proteólise controlada, níveis consideráveis de catálise de oxidação de cateóis são observados. A Figura 4-A mostra em detalhe outro exemplo de hemocianina, extraída do caranguejo-ferradura, *Limulus polyphemus*, onde um resíduo de tirosina (Thr-351) atua protegendo o sítio (distância CuA^{III}-Thr-351 = 3,84 Å) (Decker e Tuzcek, 2000).

Na catecol oxidase, ibCO, as mudanças estruturais em torno do sítio ativo utilizando a feniltiuréia (PTU) como inibidor indicaram que o acesso ao dímero de cobre também é primariamente controlado por uma fenilalanina, Phe-261. Na tirosinase, a presença de uma tirosina ou fenilalanina próxima ao sítio ativo atuam da mesma forma (Figura 4).

Dentre as enzimas citadas acima, apenas a tirosinase desempenha papel fundamental na biosíntese da melanina Pigmento formado por polifenóis presentes em uma enorme variedade de seres vivos, de bactérias a seres humanos (Solomon, Sundaram *et al.*, 1996), a melanina desempenha um papel de fotoproteção em seres humanos, absorvendo a radiação UV que pode causar danos ao DNA por meio da formação de espécies reativas de oxigênio, ROS (Prota, 2000).

A formação da melanila ocorre pela oxidação e polimerização do L-DOPA. Inicialmente, a primeira proposta para o mecanismo de formação da melanina, foi descrita por Raper-Mason, no início do século XX (Prota, 2000). Embora passados quase cem anos, não há um

consenso sobre a estrutura da melanina, tão pouco complexos-modelo publicados para auxiliar no estudo deste biopolímero.

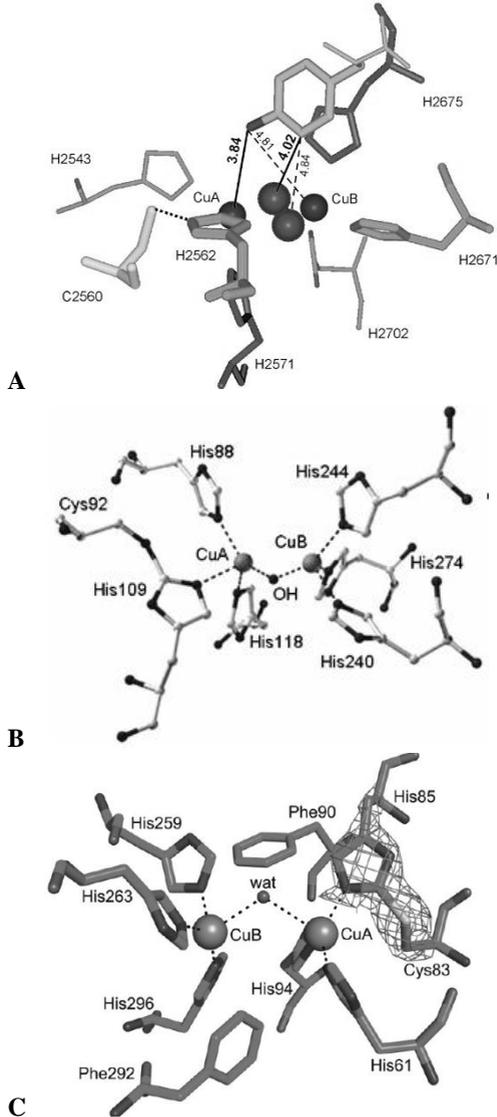


Figura 4. Estrutura cristalina das proteínas do Tipo 3 exibindo seus sítios ativos. **A:** hemocianina (de caranguejo ferradura, *Limulus polyphemus*) (Decker e Tuzcek, 2000); **B:** forma *met* da catecol oxidase (da batata doce,

Ipomoea batatas - ibCO) (Koval, Selmeczi *et al.*, 2006); e C: tirosinase (de cogumelo, *Agacirus bisporus*) (Ismaya, Rozeboom *et al.*, 2011).

1.4. CATECOL OXIDASE E TIROSINASE: MECANISMOS E IMPORTÂNCIA

Com base na estrutura cristalina das proteínas (ex.: ibCO, hemocianina) e com o auxílio de técnicas espectroscópicas (ex.: Rr, UV-Vis e EPR) técnicas de espalhamento (EXAFS) e cálculo teórico (DFT), diversos estudos tem sido realizados desde o início de século XX na tentativa esclarecer o mecanismo de atuação das proteínas do Tipo 3.

Nessa classe de proteínas, o modo de coordenação do oxigênio, a maneira da ligação do substrato ao centro ativo e como ocorre a clivagem da ligação O-O e a formação da ligação C-O (no caso da tirosinase) ainda é muito discutido por diversos grupos de pesquisa (Solomon, Sarangi *et al.*, 2007).

Há um consenso na literatura atual com relação às estruturas eletrônicas e geométricas das proteínas do Tipo 3 na forma *oxi*, $[\text{Cu}_2\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2]^{2+}$, porém há diferenças com relação ao acesso do substrato na catecol oxidase e tirosinase (Solomon, Sundaram *et al.*, 1996; Mirica, 2005). A diferença básica entre a tirosinase e a catecol oxidase é a existência de uma etapa adicional. Na tirosinase, a etapa de oxidação do substrato fenólico ocorre inicialmente, porém após a geração do catecol, este é oxidado a *o*-quinona de maneira semelhante ao que ocorre no ciclo da catecol oxidase (Mirica, 2005).

O mecanismo catalítico da catecol oxidase foi inicialmente proposto por Krebs (Krebs., 1998), mas vem sendo refinado até hoje. O mecanismo propõe a oxidação de duas moléculas de catecol por ciclo catalítico. O ciclo se inicia na forma oxidada *met*, $\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})\text{Cu}^{\text{II}}$ ($d_{\text{Cu-Cu}} = 2,87 \text{ \AA}$) ou *oxi* ($d_{\text{Cu-Cu}} = 3,8 \text{ \AA}$, por EXAFS). O substrato liga-se de forma bidentada aos centros de cobre, o catecol é oxidado a *o*-quinona e os centros de cobre são reduzidos, gerando a forma *deoxi* ($d_{\text{Cu-Cu}} = 4,4 \text{ \AA}$). Os centros de Cu^{I} são oxidados pelo O_2 , reduzindo o O_2 a O_2^{2-} , retornando a forma *oxi* e possibilitando a redução da segunda molécula de O_2 . O mecanismo pode ser observado na Figura 5.

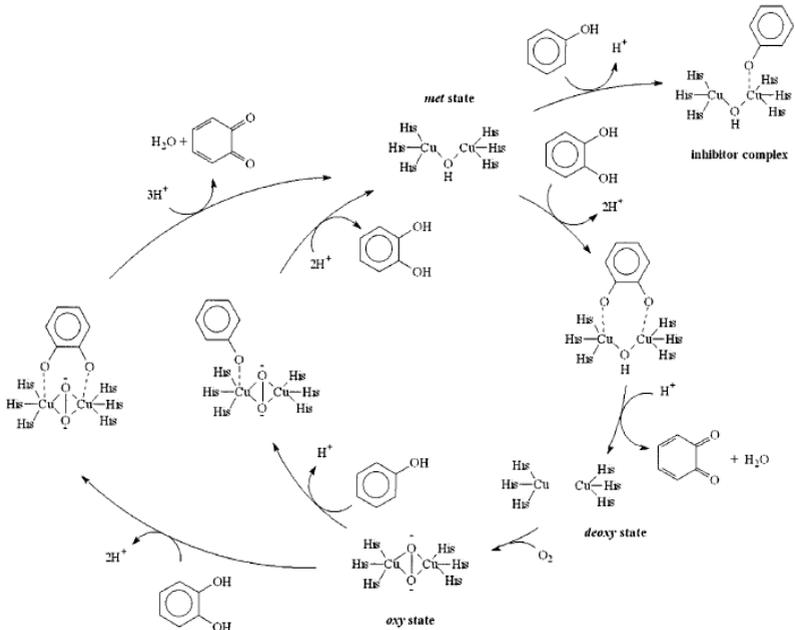


Figura 5. Mecanismo de atividade de cresolase e catecolase da tirosinase e/ou da catecol oxidase proposta por Krebs (Gerdemann, Eicken *et al.*, 2002) com base na proposta desenvolvida por Solomon e colaboradores (Solomon, Sundaram *et al.*, 1996) e outros resultados recentes da literatura (Eicken C.; Krebs, 1999; Solomon, Chen *et al.*, 2001).

Quanto à tirosinase, propõe-se que o fenolato coordena-se inicialmente à forma *oxy* da tirosinase (*oxy state* ó Figura 5). Há então uma mudança de geometria para bipirâmide trigonal e o ataque eletrofílico na posição *orto* à hidroxila do fenol, gerando o catecolato correspondente e, levando o sítio ativo para a forma *deoxy* (*deoxy state* ó Figura 5), possibilitando a ligação com outra molécula de oxigênio seguindo o ciclo catalítico.

1.5. COMPLEXOS BIOMIMÉTICOS

Estudos recentes apontam diferentes perspectivas quanto aos mecanismos propostos, principalmente referente à tirosinase (Solomon, Sarangi *et al.*, 2007). Estes trabalhos levantaram dúvidas com relação à

geometria e principalmente quanto a espécie que faz o ataque ao fenolato. A espécie foi inicialmente atribuída a forma *oxi*, $\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{O}_2)\text{Cu}^{\text{II}}$, ou com ponte *Bis- μ -Oxo*, $\text{Cu}^{\text{III}}(\mu\text{-O})_2\text{Cu}^{\text{III}}$, proposta posteriormente por Mirica *et al.* (Mirica, 2005).

Diversos complexos candidatos a miméticos das enzimas catecol oxidase e tirosinase foram publicados principalmente depois da elucidação da estrutura da catecol oxidase, ibCO. Entretanto, há poucos complexos em que o mecanismo de redução do O_2 para água ou peróxido é foi parcialmente esclarecido.

Outra questão importante é a caracterização dos intermediários. No caso da enzima catecol oxidase da batata doce, ibCO, Krebs e colaboradores conseguiram a resolução da estrutura de raios X na forma *oxi* da enzima, enquanto que a maioria dos complexos em que é possível a caracterização de pontes μ -peroxo só é obtido a temperaturas abaixo de $-70\text{ }^\circ\text{C}$ (Mirica, 2005).

A discrepância das constantes catalíticas, k_{cat} , observadas para os complexos-modelo em comparação com a das enzimas nativas. A catecol oxidase, ibCO, por exemplo, oxida o *o*-catecol com $k_{\text{cat}} = 2293\text{ s}^{-1}$ ($K_{\text{M}} = 2,5\text{ mM}$) (Eicken, Zippel *et al.*, 1998), mais de 1600 vezes maior que o k_{cat} do complexo mais ativo com o substrato ativado 3,5-ditercbutil catecol, $1,4\text{ s}^{-1}$ ($K_{\text{M}} = 1,5\text{ mM}$), (Monzani, Quinti *et al.*, 1998).

A busca por modelos melhores, estruturalmente e cataliticamente, tem auxiliado não apenas no avanço das propostas mecanísticas, mas também na aplicação destes modelos miométicos no desenvolvimento de biosensores, catalisadores aplicados na síntese de polímeros, no desenvolvimento de nanomateriais, entre outros. Alguns exemplos de complexos biomiméticos das enzimas tirosinase e catecol oxidase são apresentados na Figura 6.

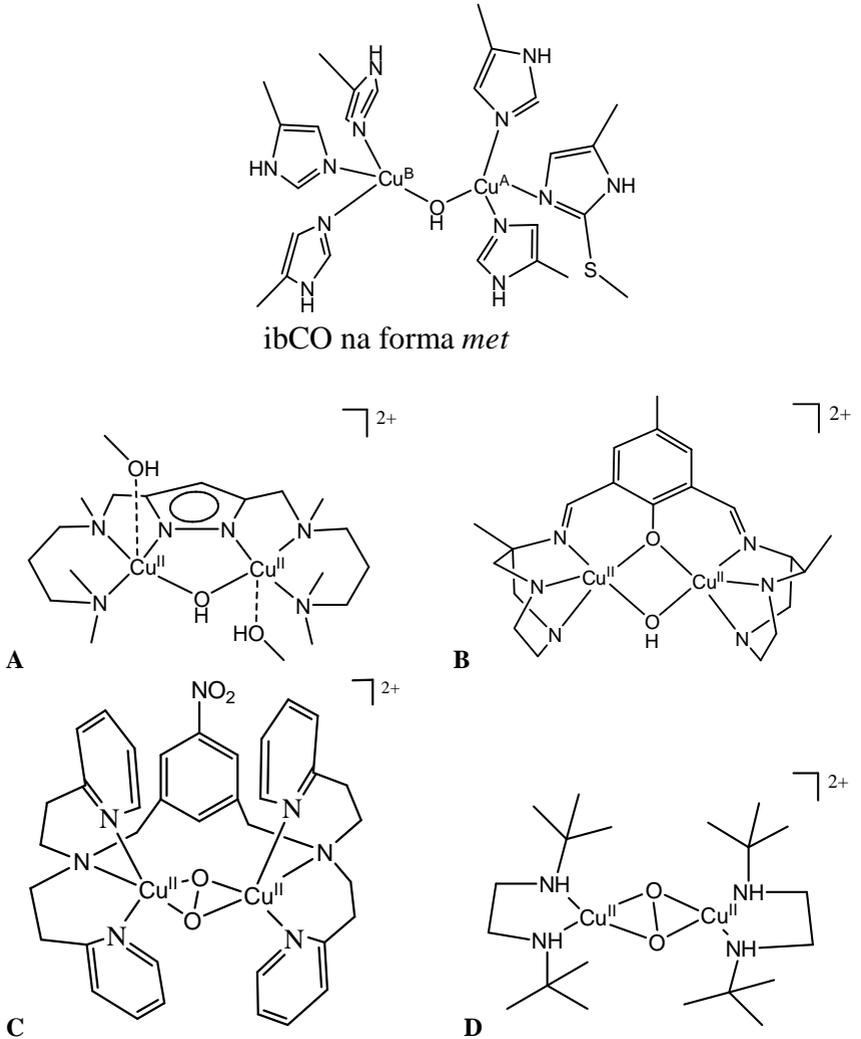


Figura 6. Sítio ativo da catecol oxidase e alguns complexos-modelo desta enzima. Acima, desenho do sítio ativo da Catecol Oxidase da batata doce (*Ipamoea batatas*), ibCO, na forma *met* e os complexos $[Cu_2L_2(\mu-OH)]^{2+}$ **A** (Ackermann, 2007), $[Cu_2(\mu-OH)(C_{21}H_{33}ON_6)]^{2+}$ **B** (Rey, Neves *et al.*, 2006), **C** $[Cu(NO_2-XY-H)(O_2)]^{2+}$ (Karlin, Nasir *et al.*, 1994) e P^{DBED} **D** (Mirica, 2005).

1.6. COMPLEXOS BIOMIMÉTICOS: REUTILIZAÇÃO DO CATALISADOR

Numerosos processos industriais são facilitados pela catálise heterogênea. Processos catalíticos como os desenvolvidos por Fischer-Tropsch e Haber-Bosch, desenvolvidos a partir do início do século XX foram, e ainda são, de grande importância para aplicações na indústria, no desenvolvimento de insumos agrícolas e em nanotecnologia.

Muitos catalisadores heterogêneos são sólidos finamente divididos onde os sítios encontram-se na superfície das partículas (Shriver, 2008), como por exemplo, o catalisador de Adams $\text{PtO}_2\text{-H}_2\text{O}$, utilizado inicialmente para redução de vanilina para álcool vanílico (Voorhees e Adams, 1922). Outros, particularmente da família das zeólitas e materiais mesoporosos, possuem sítios ativos situados na superfície interna, dentro de cristalitos individuais, como na zeólita ZSM-5 (Haag, Lago *et al.*, 1984).

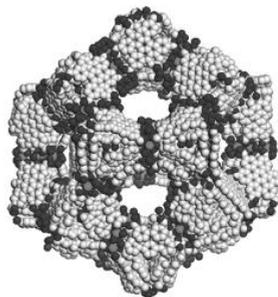
Catalisadores heterogêneos tradicionais possuem limitações quanto à natureza dos seus sítios ativos, restringindo sua diversidade de aplicação. Por outro lado, os catalisadores homogêneos são responsáveis por uma alta gama de reações quando comparados com os catalisadores heterogêneos, porém a dificuldade de reutilização e o alto custo de produção são obstáculos frequentes para a aplicação destes em larga escala (Wight e Davis, 2002; Piovezan, Jovito *et al.*, 2010).

O ancoramento de diversos catalisadores orgânicos e inorgânicos em superfícies sólidas tem sido uma estratégia conveniente para associar o que há de melhor nos dois sistemas: alta seletividade dos catalisadores homogêneos associada à facilidade de remoção e reutilização dos heterogêneos (Wight e Davis, 2002).

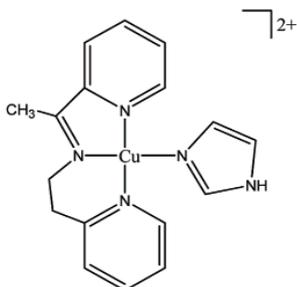
No que diz respeito à utilização de complexos biomiméticos imobilizados em matriz sólida inorgânica, sistemas híbridos orgânico/inorgânicos, existem poucos exemplos de catalisadores que mimetizam o sítio ativo de enzimas como a catecol oxidase ou hidrolases (Leea, 2009; Piovezan, Jovito *et al.*, 2010; Piovezan, Silva *et al.*, 2012). Nos catalisadores híbridos miméticos para a catecol oxidase, a maioria funciona como complexos mononucleares dispersos e longe um do outro no suporte ($d_{\text{Cu-Cu}} > 7,0 \text{ \AA}$) que dificulta muito a conversão do substrato modelo 3,5-dtbc, comumente utilizado (Leea, 2009). A Figura 7 mostra alguns exemplos de catalisadores híbridos miméticos da catecol oxidase, recentemente publicados.

Catalisador

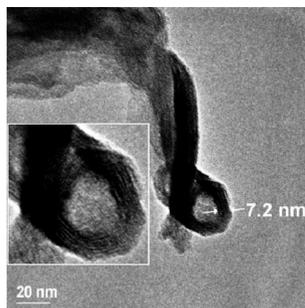
A: Microperoxidase (MP-11)
(Lykourinou, Chen *et al.*, 2011)

Suporte

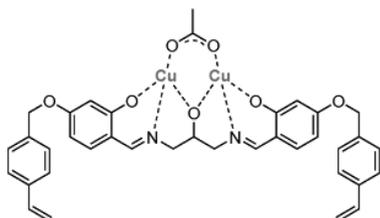
Metal-organic frameworks (MOFs)



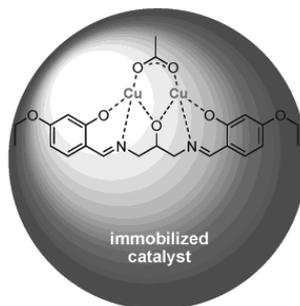
B: $[\text{Cu}(\text{apip})\text{imH}]^{2+}$
(Bizeto, Alves *et al.*, 2006)



Hexaniobate Nanoscrolls



C: $[\text{Cu}_2(\text{bssdpo})(\text{Ac})]$
(Striegler, Gichinga *et al.*, 2007)



Matriz de poli(acrilato)

Figura 7. Catalisadores híbridos e seus respectivos suportes utilizados como modelos miméticos para oxidação do 3,5-dtbc.

Tendo em vista o que foi exposto acima, neste trabalho dois complexos binucleares de cobre(II), contendo ligantes hexadentados, serão avaliados na oxidação do substrato-modelo 3,5-dtbc. Posteriormente, estes complexos serão testados na catálise de oxidação do mesmo substrato, utilizando-se sílica amorfa como matriz para a imobilização destes complexos.

Como podemos observar na Figura 6, ligantes projetados para aplicação em catálise de oxidação são normalmente baseados em ligantes ricos em átomos de nitrogênio, pois oferecem mais afinidade com íons cobre(II) por serem bases macias de Pearson. Neste trabalho, nós utilizaremos dois ligantes sintetizados a partir da 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina por apresentarem um baixo custo e pela vantagem da substituição nucleofílica ser termicamente controlada (Blotny, 2006). No complexo publicado por Massoud e colaboradores (Massoud, Louka *et al.*, 2011) nota-se uma vantagem na utilização do cloreto cinaúrico (triazina), já que o ligante sintetizado pôde coordenar-se aos íons cobre(II) de maneira facial.

2. OBJETIVOS

Neste trabalho dois complexos binucleares de cobre(II) serão testados prioritariamente na oxidação do substrato 3,5-di-*terc*-butilcatecol em meio homogêneo e heterogêneo, sendo assim, são objetivos deste trabalho:

É Síntese e caracterização dos ligantes 6-cloro- N^2, N^2, N^4, N^4 -tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina, L^{Cl} , e N^2 -(2-aminoetil)- N^4, N^4, N^6, N^6 -tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina, L^{en} ;

É Síntese e caracterização de complexos binucleares formados a partir dos ligantes L^{Cl} e L^{en} ;

É Investigação da atividade dos complexos sintetizados na oxidação do substrato 3,5-dtbc;

É Imobilização destes complexos em SiO_2 , caracterização e ensaios de atividade heterogênea de oxidação e reutilização destes catalisadores;

É Análise dos resultados obtidos e sugestão de uma proposta mecanística em acordo com os dados obtidos;

É Aplicação do complexo formado a partir do ligante L^{Cl} na oxidação da dopamina e caracterização do produto formado;

É Aplicação da poli(dopamina), produto de oxidação da dopamina, no recobrimento de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para futuras aplicações biológicas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAIS

Todos os materiais e solventes utilizados nas sínteses foram adquiridos de fontes comerciais. Os reagentes 2-piridinocarboxialdeído, etilenodiamina e piridin-2-ilmetilamina foram purificados por destilação previamente ao uso. O substrato 3,5-ditercbutil catecol foi purificado em hexano quente, filtrado e lavado com éter (3x 25 mL) antes de sua utilização.

3.2. MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

3.2.1. Análise termogravimétrica

As curvas de TGA foram obtidas utilizando um analisador termogravimétrico TGA 50 ó Shimadzu, sob atmosfera de nitrogênio com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min em um intervalo de 20 a 900 °C. Para a determinação da temperatura, na qual a velocidade de perda de massa é máxima (T_m), foi utilizada a primeira derivada do termograma (DrTGA).

3.2.2. Espectroscopia Vibracional

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia no Departamento de Química da UFSC. Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR Spectrofotometer S100, na região compreendida entre 4000 a 500 cm^{-1} . As amostras foram preparadas em pastilha de KBr de grau espectroscópico.

3.2.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (200 MHz) foram obtidos utilizando o aparelho Bruker ó AC 200, na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. Os deslocamentos químicos estão expressos em partes por milhão (ppm) em relação ao padrão interno utilizado, TMS ($\delta = 0,00$ ppm). As amostras dos compostos orgânicos foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3).

3.2.4. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

As análises de EPR foram realizadas no Laboratório Regional Sul de EPR do Departamento de Química - UFPR, em um espectrômetro Bruker Elexsys E500 e Bruker EMX micro operando em banda X (9,5 GHz) pelo Prof. Dr. Ronny Rocha Ribeiro. As medidas foram realizadas no estado sólido (amostra pulverizada) e os parâmetros foram obtidos a partir do próprio equipamento sem tratamento prévio.

3.2.5. Espectrometria de Massas

O complexo $[L^{Cl}Cu^{II}(\mu-OH)_2Cu^{II}](ClO_4)_2$ (**1**) e a reação de polimerização da dopamina, na presença do complexo **1** como catalisador foram estudados via espectrometria de massa com ionização via eletrospray (ESI-MS), utilizando-se o equipamento amaZon Ion Trap MS ó Bruker Daltonics no Centro de Biologia Molecular e Estrutural (CEBIME) ó Departamento de Bioquímica da UFSC. Todos em solução de metanol ou metanol/H₂O 50:50 v/v, com concentrações finais aproximadas de 0,5 mg L⁻¹ com fluxo de 180 µL min⁻¹. Espectros de massa do complexo **1** também foram investigados nos pH 3,5, 6,0, 7,0 e 9,0, MeOH/H₂O 50:50 v/v, diluindo-se o complexo em soluções com os pH previamente ajustados. A reação de polimerização da dopamina foi realizada em presença do catalisador (5,0% mol de **1**), o pH da solução foi posteriormente ajustado para 6,0 na diluição com uma solução de MeOH/H₂O 50:50 v/v, pH 6,0. Todas as amostras foram diluídas utilizando-se MeOH (Sigma-Aldrich padrão LC-MS) e H₂O (Millipore Milli-Q). A temperatura do capilar para todas as amostras foi mantida entre 180 e 200 °C e a voltagem do capilar entre -400 e -500 V.

3.2.6. Titulação Potenciométrica

Os estudos de equilíbrio em solução foram realizados no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química ó UFSC, utilizando um titulador automatizado da Metrohm, modelo Titrino Plus 848, acoplado a um eletrodo combinado de vidro (referência Ag/AgCl) calibrado para leitura direta do pH (pH = ólog [H⁺]).

O sistema foi calibrado utilizando dados obtidos de uma titulação potenciométrica de um volume conhecido a partir de uma solução padrão de HCl 8,44 x 10⁻³ mol L⁻¹, solução padrão de KOH 9,56 x 10⁻² mol L⁻¹ e força iônica ajustada com NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ em MeOH/H₂O

50:50 v/v. O pK_w da solução MeOH/H₂O 50:50 v/v contendo 0,1 mol L⁻¹ de NaNO₃ utilizado para os cálculos foi 14,3 (previamente refinado). As medidas foram efetuadas em uma célula termostatizada a 25,00 ± 0,05 °C. Os ligantes L^{Cl} e L^{en} foram titulados em duplicata, na concentração de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ em 50 mL de MeOH/H₂O 50:50 v/v.

Os complexos [Cu^{II}L^{Cl}(μ-OH)₂Cu^{II}](ClO₄)₂ (**1**) e [Cu^{II}HL^{en}(μ-OH)₂Cu^{II}](ClO₄)₃ (**2**) foram titulados a partir de 5,0 x 10⁻⁵ mol de cada um dos respectivos ligantes e 1,0 x 10⁻⁴ mol de cobre a partir de uma solução de perclorato de cobre(II), previamente padronizada por Absorção Atômica com Atomização por Chama. A concentração final dos complexos e cada experimento foi [1]_{final} = [2]_{final} = 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ em 50,0 mL de MeOH/H₂O 50:50 v/v, utilizando NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ como força iônica, sob atmosfera de argônio. Os dados da titulação foram tratados com o programa *BEST7* (Martell, 1992) e o diagrama de espécies obtido com o auxílio do programa *SPE* (Martell, 1992) em colaboração com o Professor Dr. Bruno Szpoganicz.

3.2.7. Eletroquímica

O comportamento eletroquímico dos complexos foram investigados em um potenciostato/galvanostato PGSTAT 128N AUTOLAB, no Laboratório de Biossensores - Departamento de Química da UFSC. Os voltamogramas dos complexos **1** e **2** foram obtidos a temperatura ambiente em solução MeOH/H₂O 50:50 v/v, pH 6,0 e tampão [MES] = 0,1 mol L⁻¹ para o complexo **1** e pH 6,5 e tampão [HEPES] = 0,1 mol L⁻¹ para o complexo **2**, ambas as soluções contendo 0,1 mol L de NaClO₄ como eletrólito suporte, sob atmosfera de argônio. Os eletrodos utilizados foram: carbono vítreo (trabalho), fio de platina (auxiliar) e Ag/AgCl (referência). Para a correção do eletrodo de referência utilizou-se o hexacianoferrato de potássio ($E^{1/2} = 358,0$ mV vs NHE) como padrão interno (Lide, 2000).

3.2.8. Espectroscopia eletrônica ó UV-VIS

Os espectros eletrônicos e medidas cinéticas foram obtidos em um espectrofotômetro de arranjo de diodos Varian Cary 50Bio UV-Vis acoplado a um banho termostatizado, nas regiões do ultravioleta e visível, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia no Departamento de Química da UFSC. As análises foram realizadas em solventes de grau espectroscópico com cubetas de quartzo ou vidro com um centímetro de caminho ótico.

3.2.9. Catálise

3.2.9.1 Catálise Homogênea

Os complexos **1** e **2** tiveram suas atividades catalíticas avaliadas através da reação de oxidação do substrato 3,5-di-*terc*-butilcatecol (3,5-dtbc). Os experimentos cinéticos foram realizados sempre em duplicatas, sendo cada corrida monitorada sempre em quadruplicata e o produto 3,5-di-*terc*-butil-*o*-benzoquinona foi acompanhado pela variação de absorvância monitorada em 400 nm ($\epsilon = 1570 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em MeOH/H₂O 50:50 v/v). O equipamento, utilizado para cinéticas de alta performance, foi espectrofotômetro de parada de fluxo da Hi-Tech KinetAsyst, modelo SF-61DX2, caminho óptico de 1,0 cm e utilizando-se o arranjo de diodo (Hi-Tech Knetascan Diode Array) como detector principal acoplado a um banho termostatizado. Utilizou-se 50,0 μL de cada solução reacional (complexo/tampão e substrato/tampão, ambos em MeOH/H₂O 50:50 v/v) em cada disparo. A pressão dos disparos foi ajustada em 0,5 MPa. Para cada corrida cinética foram processados de 200 a 300 leituras de absorvância até o tempo máximo de 6,0 segundos de reação para o complexo **1** e de até 15 segundos para o complexo **2**, dependendo da concentração do substrato.

As velocidades iniciais foram obtidas diretamente do gráfico da concentração do produto da oxidação em função do tempo. A dependência da velocidade de oxidação em função do pH para o substrato 3,5-dtbc foi realizada em uma faixa de pH entre 3,70 e 8,5, obtendo-se, conseqüentemente, o pH ótimo para a reação, medido a 25 °C.

Em dois frascos separados foram preparadas soluções do complexo e do substrato, antes da injeção na seringa no equipamento da seguinte forma: em um dos frascos, 500 μL de uma solução do complexo $[C] = 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em metanol foram misturados a 500 μL de uma solução do tampão, $[T] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$, dessa forma a concentração do complexo ficou diluída por dois ($f = 2$). Em outro frasco, 500 mL da solução do substrato foi também misturada com 500 μL de solução do tampão $[T] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$, de forma que a concentração do substrato também fique diluído pela metade nesta primeira etapa.

Para o efeito de pH as concentrações de substrato foram mantidas constantes, $[S]_{\text{estoque}} = 24,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A próxima etapa foi transferir

essas soluções para duas seringas principais acima do injetor principal. O sistema foi ajustado previamente para misturar volumes iguais de 50,0 μL das soluções de complexo e substrato, de cada uma das seringas injetoras, de modo que o volume da solução resultante após a injeção fosse de 100 mL, portanto as concentrações de ambos, substrato e complexo, foram diluídas por dois novamente.

As concentrações finais de complexo, substrato e tampão foram de $[\text{C}]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{S}]_{\text{final}} = 6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{T}]_{\text{final}} = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em MeOH/H₂O 50:50 v/v. Os tampões utilizados para o efeito de pH foram MES (pH 3,7 a 6,5), HEPES (7,0 e 7,5) e CHES em pH 8,5. Para o complexo **1** o efeito de substrato, foi feito em pH 6,0 e para o complexo **2** o efeito de substrato foi feito em pH 6,5, a partir do resultado obtido no efeito de pH. O efeito de substrato foi realizado de forma semelhante ao efeito de pH para ambos complexos **1** e **2**, mantendo-se a concentração do complexo e tampão constantes na cela reacional iguais a $[\text{C}]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{T}]_{\text{final}} = 6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e variando-se a concentração do substrato de $[\text{S}]_{\text{final}} = 0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ até $[\text{S}]_{\text{final}} = 5,0 \text{ mmol L}^{-1}$. O tratamento matemático utilizado para a obtenção dos parâmetros cinéticos foi o juste não-linear da equação de Michaelis-Menten.

3.2.9.2. Catálise Heterogênea

As reações em fase heterogêneas foram realizadas nas seguintes condições: 2,00 \pm 0,05 mg de 2-SiO₂ ($[\text{2-SiO}_2] = 1,80 \times 10^{-4} \text{ mol g}^{-1}$) foram inseridas tubos para centrifugação de 10 mL (Labware Manufacturing Co.) e suspensas em 5,0 mL de tampão MES pH 6,0 ($[\text{T}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$). Em seguida 5,0 mL do substrato 3,5-dtbc nas concentrações de 0,5 ó 4,0 mmol L⁻¹ foram adicionados ao sistema e este foi mantido sob agitação magnética. Em seguida, alíquotas de 300 mL foram retiradas, a cada 5,0 minutos (por 20 minutos), transferidas para uma cubeta de vidro, diluídas ($f = 10x$) com adição de MeOH ($V_{\text{add}} = 1350 \mu\text{L}$) e H₂O ($V_{\text{add}} = 1350 \mu\text{L}$) e o aparecimento do produto 3,5-di-*terc*-butil-*o*-benzoquinona foi acompanhada em 400 nm ($\epsilon = 1570 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em MeOH/H₂O 50:50 v/v) por espectrofotometria UV-Visível. Para cada ponto o processo foi repetido por mais uma vez. O tratamento matemático utilizado para a obtenção dos parâmetros cinéticos foi o mesmo utilizado nas cinéticas homogêneas o ajuste não-linear da equação de Michaelis-Menten.

3.2.9.2.1. *Catálise Heterogênea ó Reutilização do Catalisador*

As reações em fase heterogêneas foram realizadas nas seguintes condições: 10,0 mg de SiO₂-gel contendo os complexos **1**, ([**1**-SiO₂] = 9,35 x 10⁻⁵ mol g⁻¹) e **2**, [**2**-SiO₂] = 1,80 x 10⁻⁴ mol g⁻¹) foram inseridas em tubos para centrifugação de 10 mL (Labware Manufacturing Co.) e suspensas em 5,0 mL de tampão MES pH 6,0 ([T] = 0,2 mol L⁻¹). Em seguida 5,0 mL do substrato 3,5-dtbc ([S] = 4,0 x 10⁻³ mol L⁻¹) foram adicionados ao sistema, e este foi mantido sob agitação por 20 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 2 minutos (5000 r.p.m.) e a solução sobrenadante foi retirada e reservada para análise futura de cobre. O sólido foi lavado e centrifugado da mesma maneira por mais duas vezes utilizando-se solução de MeOH/H₂O 50:50 v/v. A solução total resultante (cinética mais lavagem) foi transferida para um balão de 25,0 mL e analisada por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização por Chama, AAAC. O procedimento acima (adição do substrato, acompanhamento da reação e lavagem) foi repetido mais quatro vezes. O procedimento completo foi realizado em duplicata.

3.2.10. Experimentos de Adsorção

Todos os experimentos de equilíbrio de adsorção foram realizados no Laboratório Biossensores - Departamento de Química da UFSC. Para equilíbrio de adsorção do complexo **1** em SiO₂ gel, o experimento foi utilizado um mini-agitador termostatzado Marconi MA 832, com temperatura constante de 25,0 °C e constante agitação de 50 rpm por 24h.

O experimentos de adsorção foram realizados utilizando-se 20,0 mg de SiO₂ inseridas tubos para centrifugação de 10 mL (Labware Manufacturing Co.), contendo 10,0 mL de CH₃CN com 7,5; 15,0; 22,5; 30,0 e 60,0 mg do complexo **1**. Após 24h de agitação, o excesso de complexo na SiO₂ foi removido e as amostras de **1**-SiO₂ foram lavadas com CH₃CN (3x 10 mL), acetona (2x 10 mL), éter (2x 10 mL) e secas em estufa. Amostras sólidas (~10 mg) de cada uma das amostras de sílica foram pesadas e analisadas por Absorção Atômica com Atomização por Chama para a determinação da quantidade de complexo adsorvida.

A abertura das amostras foi feita utilizando-se 0,5 mL de HF concentrado (%Cu máxima presente no HF < 0,00001%), segundo protocolo de abertura de amostra descrito por Langmyrh e colaboradores

(Langmyhr, 1968). Os dados experimentais de adsorção do complexo **1** em SiO₂ gel foram ajustados segundo três modelos de adsorção: Langmuir (Langmuir, 1918), Freundlich e Dubinin-Radushkevich (Ünlü, 2006).

Isoterma de Langmuir:

$$q_e = \frac{K_L C_e q_m}{1 + K_L C_e}$$

Onde q_e é a quantidade adsorvida (mg g⁻¹) e C_e é a concentração do adsorbato em solução (mg L⁻¹), ambos em equilíbrio. K_L é a constante de Langmuir (L mg⁻¹) e q_m é a capacidade máxima de adsorção da monocamada formada no adsorvente (mg g⁻¹).

Isoterma de Freundlich:

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}}$$

Onde q_e é a quantidade adsorvida (mg g⁻¹) e C_e é a concentração do adsorbato em solução (mg L⁻¹). K_F é a constante de Freundlich (mg g⁻¹) e n é a intensidade de adsorção (adimensional).

Isoterma de Dubinin-Hadushkevich (D-R):

$$q_e = q_m \exp\left(-\kappa \varepsilon^2\right)$$

Onde q_e é a quantidade absorvida (mg g⁻¹) e q_m é a capacidade máxima de adsorção da monocamada formada no adsorvente (mg g⁻¹), κ é a constante de D-R (mol² kJ⁻²) e ε é o potencial de Polanyi (J mol⁻¹), que pode ser calculado como:

$$\varepsilon = R T \ln \left(1 + \frac{1}{C_e} \right)$$

Onde R é a constante dos gases ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$), T é a temperatura absoluta (K) e C_e é a concentração do adsorbato em solução (mg L^{-1}).

3.2.11. Absorção Atômica

As análises de Absorção Atômica foram realizadas no Laboratório de Biossensores - Departamento de Química da UFSC. A concentrações de complexo em cada uma das amostras de SiO_2 -gel foram determinadas por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização por Chama utilizando o espectrômetro Varian SpectrAA 50 equipado com um atomizador de chama ar/acetileno e uma lâmpada de cátodo oco Hitachi ($i_{\text{operação}} = 5,0 \text{ mA}$). A lâmpada foi operada sob condições recomendadas pelo fabricante, bem como o comprimento de onda, largura da fenda e a altura do queimador. A porcentagem de ganho da fotomultiplicadora foi ajustada em 22% e a taxa de aspiração utilizada foi de 10 mL min^{-1} .

3.2.12. Microscopia

3.2.12.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão foram realizadas em colaboração com a Prof^ª. Dr. Liane M. Rossi, Dr. Fernando Effenberger (Instituto de Química - USP) e o Prof. Dr. Pedro Kiyohara (Instituto de Física ó USP). As micrografias foram tiradas utilizando-se um Microscópio Philips CM 200 com filamento de W e operando a 200 kV. As análises foram preparadas pingando uma ou duas gotas da suspensão contendo as nanopartículas em um *grid* de carbono recoberto com Cu. A análise do tamanho das partículas foi conduzida pela análise de 150 partículas e a distribuição do tamanho foi determinada a partir do diâmetro máximo da curva de distribuição de tamanho.

3.2.12.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas pelo aluno de mestrado Deonildo Faggion Junior (Laboratório de Catálise Biomimética ó UFSC) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC - LCME. As amostras foram preparadas de acordo com protocolo pré-estabelecido pelo fabricante. O equipamento utilizado foi o microscópio JEOL JSM-6390LV, com uma

voltagem de aceleração de 15kV, distância de trabalho de 15,0 mm e magnificação entre 120 e 4000 X, dependendo da amostra.

3.3. Sínteses

3.3.1. Síntese Orgânica

O ligante 6-chloro- N^2,N^2,N^4,N^4 -tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina foi sintetizado em duas etapas. A primeira etapa consistiu na síntese da amina bis(piridin-2-ilmetil)amina, bpma, já descrita previamente (Mireski, 2011). A etapa final foi uma adaptação do procedimento descrito por Massoud e colaboradores (Massoud, Louka *et al.*, 2011). O ligante L^{en} foi sintetizado a partir do ligante L^{Cl} com o acréscimo e uma etapa de síntese a mais. O esquema de síntese dos dois ligantes pode ser acompanhado na Figura 8.

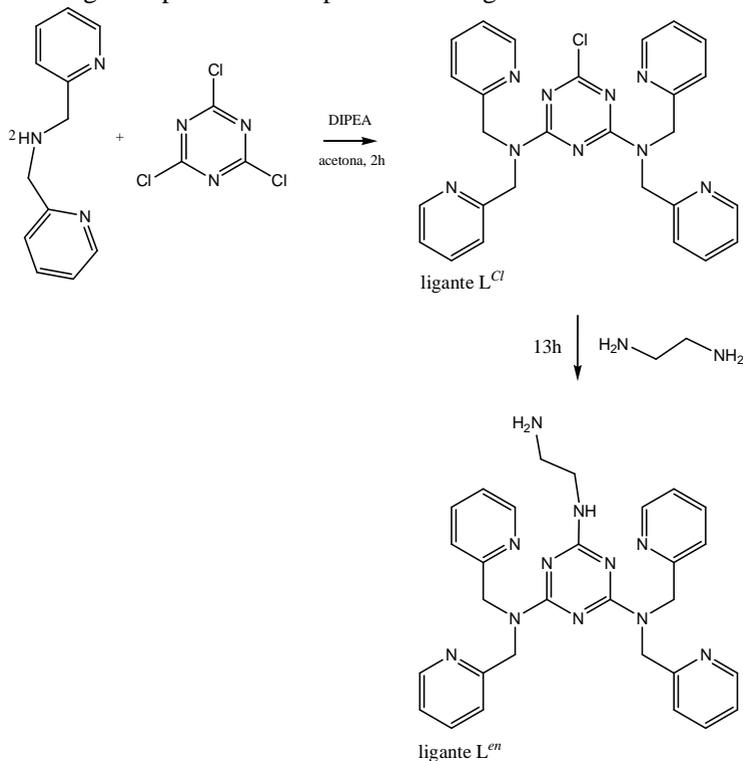


Figura 8. Esquema da síntese dos ligantes L^{Cl} e L^{en} .

3.3.1.1. Síntese da amina precursora bis(piridin-2-ilmetil)amina ó bpma

Em um balão de 500 mL, 10,81 g (100,0 mmol, 108,14 g mol⁻¹) de 2-(aminometil)piridina foram solubilizados em 100 mL de tolueno e mantidos sob agitação em banho de gelo por 1h. A esta solução foram adicionados 10,71 g (100 mol, 107,11 g.mol⁻¹) de piridilcarboxialdeído. Após a adição, retirou-se a reação do banho de gelo, permanecendo sob agitação por mais 2 horas. O tolueno foi retirado sob vácuo à temperatura de 15 °C. O óleo resultante foi solubilizado em MeOH, e a esta mistura foram adicionados aproximadamente 30 mg de Pd/C 5% em um recipiente apropriado para a hidrogenação catalítica. Após 15 horas de agitação sob atmosfera de hidrogênio (60 psi), a solução foi retirada filtrada e o solvente foi retirado em rota-evaporador. O produto foi obtido com rendimento quantitativo >99%. O braço bpma foi caracterizado por espectroscopia no IV (Figura 9).

IV (KBr) em cm⁻¹: $\nu(\text{N-H})$ 3305; $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ e $\text{C-H}_{\text{alif}})$ 3055-2825; $\nu(\text{C=N}$ e $\text{C=C})$ 1590-1435; $\nu(\text{C-N})$ 1220; $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$ 775.

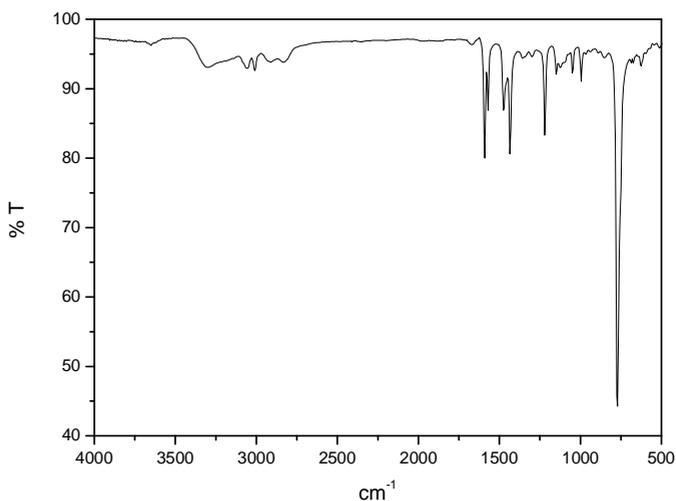
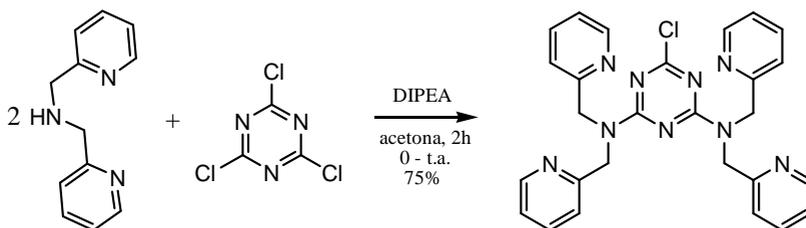


Figura 9. Espectro na região do IV do bpma em pastilha de KBr.

3.3.1.2. Síntese do ligante 6-cloro- N^2,N^2,N^4,N^4 -tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina - L^{Cl}



Em um béquer de 150 mL contendo 40,0 mL de acetona, foram adicionados 7,96 g de bis(piridin-2-ilmetil)amina (40,0 mmol; $199,0 \text{ g mol}^{-1}$) e 6,98 mL de N,N -diisopropiletilamina (DIPEA) (40,0 mmol; $129,24 \text{ g mol}^{-1}$; $\rho = 0,742 \text{ g mL}^{-1}$). A esta solução foram adicionados, lentamente, 3,86 g de 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (20,0 mmol; $184,41 \text{ g mol}^{-1}$). A suspensão de coloração avermelhada foi deixada sob agitação em banho de gelo e em seguida por mais uma hora em temperatura ambiente. O precipitado resultante foi filtrado em funil de placa porosa ($P = 3$) e lavado com acetona (2x de 30 mL) e éter (2x 10 mL).

O sólido lavado, de coloração levemente amarelada, foi então recristalizado em isopropanol quente (60 mL) e resfriado a $5,0 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 horas, produzindo cristais brancos. O sólido branco cristalino foi seco sob vácuo e posteriormente caracterizado por IV (Figura 10) e RMN ^1H e ^{13}C (Figuras 11 e 12, respectivamente). Rendimento: 7,64 g, 74,9 % de rendimento em relação ao reagente 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina. P.F.: $> 200 \text{ }^\circ\text{C}$.

IV (KBr) em cm^{-1} : $\nu(\text{O-H})$ 3437; $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ e $\text{C-H}_{\text{alif}})$ 3097-2940; $\nu(\text{C=C})$ 1577; $\nu(\text{C=N})$ 1488; $\nu(\text{C-N})$ 1354; $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$ 752.

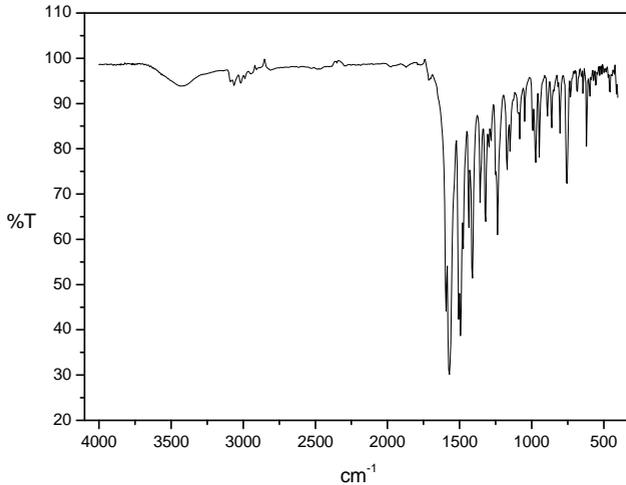


Figura 10. Espectro na região do IV do ligante L^{Cl} em pastilha de KBr.

RMN 1H (200 MHz; $CDCl_3$): = 4.83 (s, 4 H, CH_2), 5.04 (s, 4 H, CH_2), 6.88-6.92 (d, 2 H), 7.03 (t, 2 H), 7.16 (t, 2 H), 7.29-7.37 (m, 4 H), 7.60-7.63 (t, 2 H), 8.40 (d, 2 H), 8.50 (d, 2 H) ppm.

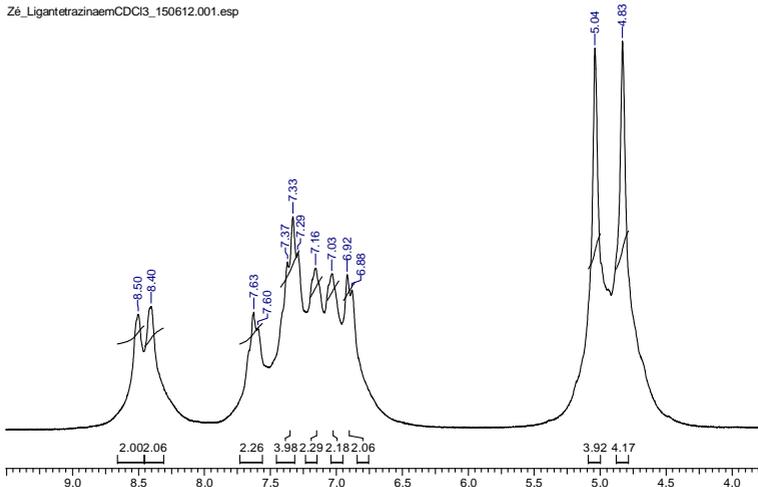


Figura 11. Espectro de RMN 1H do ligante L^{Cl} em $CDCl_3$.

RMN ^{13}C (200 MHz, CDCl_3): = 51.92, 121.11, 121.81, 122.26, 136.25, 136.55, 149.15, 157.10, 165.61, 169.72 ppm.

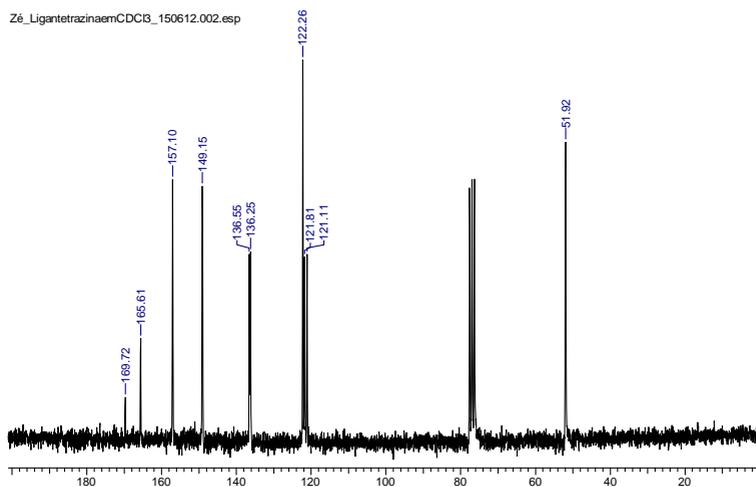
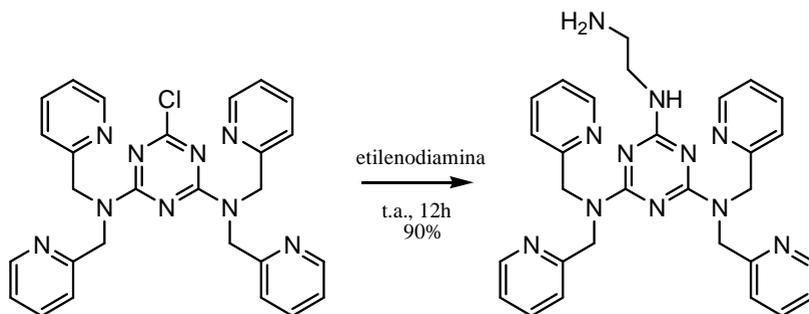


Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C do ligante L^{Cl} em CDCl_3 .

3.3.1.3. Síntese do ligante N^2 -(2-aminoetil)- N^4, N^4, N^6, N^6 -tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina - L^{en}



Em um balão de 125 mL contendo 10,0 mL de etilenodiamina ($147,92 \text{ mmol}$; $60,1 \text{ g mol}^{-1}$; $\rho = 0,889 \text{ g mL}^{-1}$), foram adicionados 1,27 g de 6-cloro- N^2,N^2,N^4,N^4 -tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina ($2,5 \text{ mmol}$; $509,99 \text{ g mol}^{-1}$). A suspensão foi deixada sob agitação em banho de gelo por uma hora e em agitação a temperatura ambiente por mais 12h. O óleo cru foi rotaevaporado para retirar o excesso de etilenodiamina por 3h. A este óleo resultante foi adicionado 25,0 mL de NaOH $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ e extraído exaustivamente com CH_2Cl_2 . A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e o cloreto de metileno foi rotaevaporado. O óleo final foi seco em bomba de alto vácuo e posteriormente caracterizado por IV (Figura 13) RMN ^1H e ^{13}C (Figuras 14 e 15, respectivamente). Rendimento: 1,20 g, 89,94 % de rendimento em relação ao reagente 6-cloro- N^2,N^2,N^4,N^4 -tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina.

IV (KBr) em cm^{-1} : $\nu_{\text{ass}}(\text{N-H})$ 3360; $\nu_{\text{sim}}(\text{N-H})$ 3275; $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ e C-H_{alif}) 3104-2867; $\nu(\text{C=C})$ 1536; $\nu(\text{C=N})$ 1492; $\nu(\text{C-N})$ 1357; $\omega(\text{N-H})$ 808; $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$ 750.

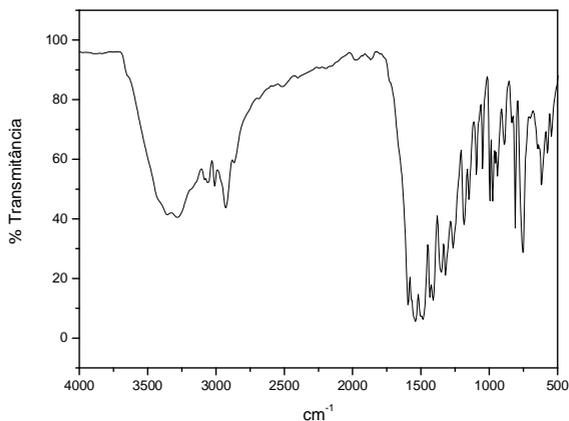


Figura 13. Espectro na região do IV do ligante L^{en} em pastilha de KBr.

RMN ^1H (200 MHz; CDCl_3): δ = 2.05 (br. s., 2 H), 2.34 (m, 2 H), 2.98 (q, 2 H), 4.73 (s, 4 H), 4.64 (s, 4 H), 5.81 (t, 1 H), 6.76 (m, 6 H), 6.99 (d, 2 H), 7.10 (m, 2 H), 7.28 (d, 2 H), 8.21 (d, 2 H), 8.13 (d, 2 H) ppm.

Zé_en-triaz_310812.001.esp

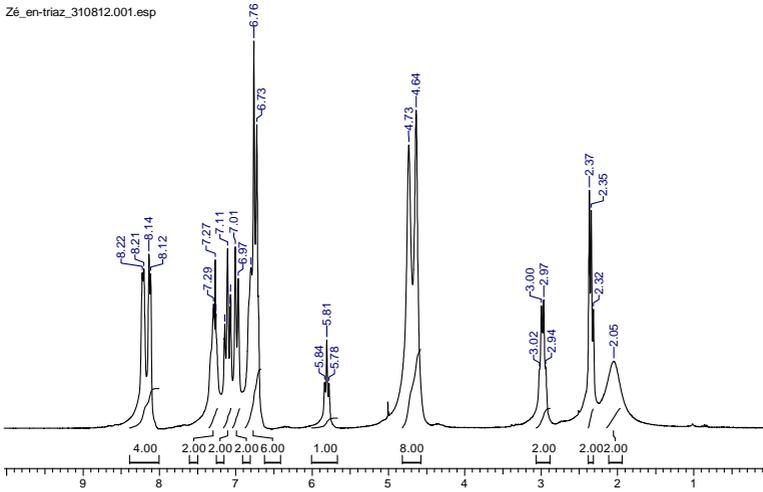


Figura 14. Espectro de RMN ^1H do ligante L^{en} em CDCl_3 .

RMN ^{13}C (200 MHz, CDCl_3): = 41.26, 43.11, 51.54, 120.98, 121.22, 121.41, 135.83, 136.07, 148.44, 148.62, 158.21, 165.49, 166.29 ppm.

Zé_L-en_mc_CDCl3_200912.002.esp

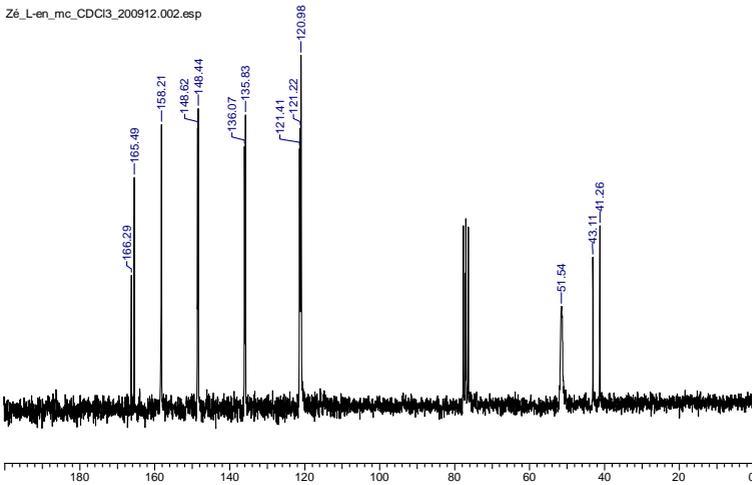
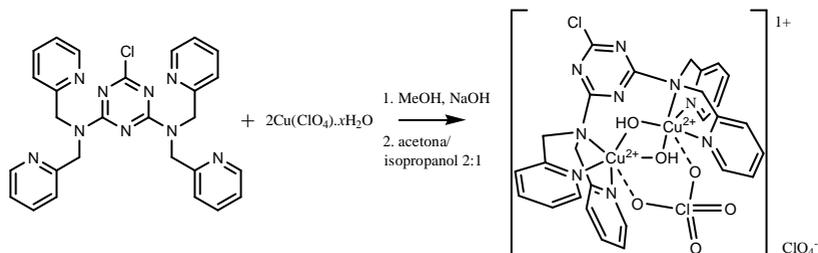


Figura 15. Espectro de RMN ^{13}C do ligante L^{en} em CDCl_3 .

3.3.2. Síntese Inorgânica

3.3.2.1. Síntese do complexo $[L^{Cl}Cu^{II}(\mu-OH)_2Cu^{II}](ClO_4)_2$ - **1**



A síntese do complexo foi realizada segundo modificações no procedimento descrito por Massoud e colaboradores (Massoud, Louka *et al.*, 2011). Em um béquer contendo 0,51 g (1,0 mmol; 509,99 g mol⁻¹) do ligante L^{Cl} dissolvidos em 20,0 mL de MeOH foram adicionados sob agitação magnética 0,74 g de Cu(ClO₄)·x H₂O (2,0 mmol; 370,54 g mol⁻¹). A esta solução, foram adicionados 1,0 mL de NaOH (1,0 mol L⁻¹).

Em poucos minutos houve formação de precipitado de coloração verde escura. O precipitado foi filtrado e recristalizado em acetona/isopropanol 2:1 (v/v). A Figura 16 apresenta o espectro de IV do complexo **1** com as respectivas atribuições de bandas. Rendimento da síntese: 0,45 g, 51,43% em relação ao ligante L^{Cl}.

IV (KBr) em cm⁻¹: $\nu(O-H)_{\text{ponte}}$ 3575; $\nu(C-H_{\text{ar}} \text{ e } C-H_{\text{alif}})$ 3123-2809; $\nu(C=C)$ 1582; $\nu(C=N)$ 1484; $\nu(Cl-O)$ 1088; $\delta(C-H_{\text{ar}})$ 766; $\delta(Cl-O)$ 622.

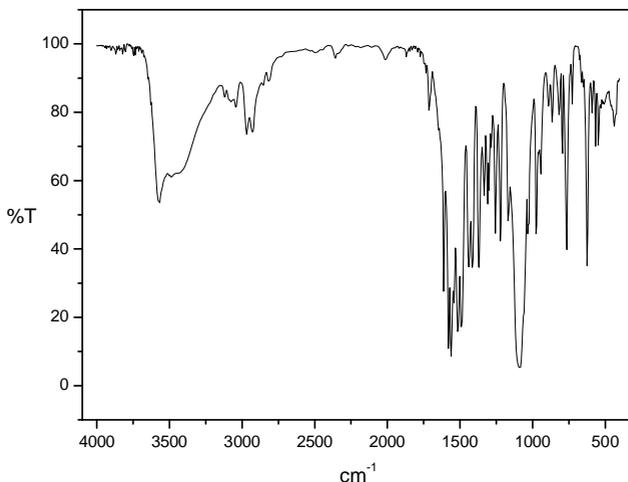
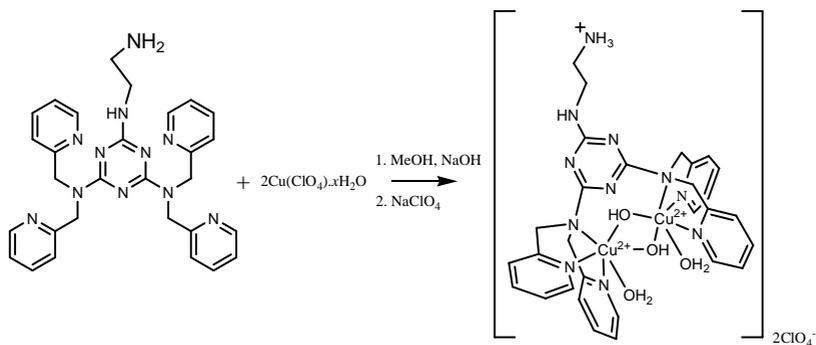


Figura 16. Espectro na região do IV do complexo 1 em pastilha de KBr.

3.3.2.2. Síntese do complexo $[\text{HL}^{\text{en}}\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})_2\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot (\text{ClO}_4)_3 - 2$



Em um béquer contendo 0,53 g (1,0 mmol; 533,63 g mol⁻¹) do ligante L^{Cl} dissolvidos em 20,0 mL de MeOH foram adicionados sob agitação magnética 0,741 g de $\text{Cu}(\text{ClO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,0 mmol; 370,54 g mol⁻¹). Em seguida, uma pequena quantidade de NaClO_4 , solubilizados em 5,0 mL de H_2O , foi adicionada para auxiliar na cristalização. Não houve formação de precipitado e o complexo cristalizou pela evaporação do solvente, duas semanas após o procedimento sintético. A Figura 17 apresenta o espectro de IV do

complexo **2** com as respectivas atribuições de bandas. Rendimento da síntese: 0,88 g, 85,41% em relação ao ligante L^{Cl} .

IV (KBr) em cm^{-1} : $\nu(\text{O-H})_{\text{ponte}}$ 3544; $\nu(\text{O-H})$ 3420; $\nu(\text{N-H})$ 3354 ó 3249; $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ e C-H_{alif}) 3126-2926; $\nu(\text{C=C})$ 1557; $\nu(\text{C=N})$ 1490; $\nu(\text{Cl-O})$ 1082; $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$ 768; $\delta(\text{Cl-O})$ 625.

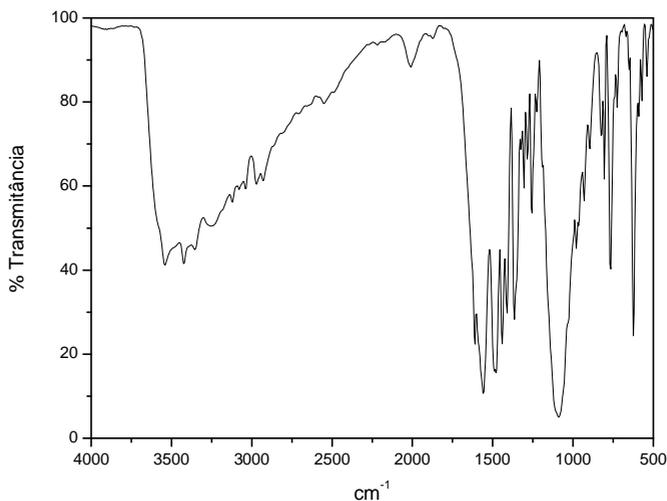


Figura 17. Espectro na região do IV do complexo **2** em pastilha de KBr.

3.3.3. Síntese dos Materiais

3.3.3.1. Imobilização dos Complexos em SiO_2

3.3.3.1.1. Imobilização do Complexo **1**

O complexo **1** foi suportado em sílica amorfa (SiO_2 Gel 60 ó Vetec; tamanho do poro: de 50 até 70 Å e área superficial: de 450 até $550 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) de forma eletrostática, sem tratamento prévio. Inicialmente, em um tubo de centrifugação de 10 mL (Labware Manufacturing Co.), 150 mg de SiO_2 foram suspensas em 10,0 mL de CH_3CN e a esta suspensão foram adicionados 300,0 mg do complexo **1**. O tubo foi vedado adequadamente e a suspensão ficou sob agitação (50 r.p.m) por

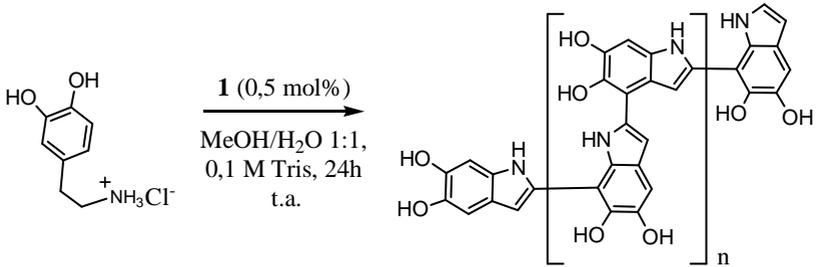
24h a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sólido resultante (1-SiO_2) foi lavado com CH_3CN (3x 10 mL), acetona (2x 10 mL), éter (2x 10 mL) e seco em estufa. Amostra sólida (~10 mg) de sílica contendo o complexo **1** foi pesada e analisada por Absorção Atômica com Atomização por Chama (AAAC) para a determinação da quantidade de complexo adsorvida.

3.3.3.1.2 Imobilização do Complexo 2

Para o complexo **2**, também foi utilizado o mesmo suporte (SiO_2 Gel 60 ó Vetec; tamanho do poro: de 50 até 70 Å; área superficial: de 450 até 550 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) porém, neste caso, a sílica teve sua superfície modificada para que a imobilização do complexo **2** fosse realizada de maneira covalente. A modificação da superfície foi feita utilizando-se SOCl_2 , segundo modificações no procedimento de Kamitori *et al.* (Kamitori, Hojo et al., 1986) Inicialmente, 5,0 g de SiO_2 foram aquecidas até 150 °C (em uma mufla) por 48h para que o excesso de água superficial da sílica fosse removido. O material anidro foi guardado sob atmosfera de N_2 . A modificação da superfície da sílica foi feita da seguinte forma: Em um balão de 50 mL, 4,0 mg de SiO_2 (anidro) foram suspensas em 4,0 mL de CH_2Cl_2 e a esta suspensão foram adicionados lentamente 4,0 mL de SOCl_2 . A suspensão foi refluxada por 3h e o excesso do solvente e SOCl_2 foi retirado em rotaevaporador. A este sólido, foram adicionados 15 mL de CH_2Cl_2 e rotaevaporado novamente. Este último procedimento foi repetido por mais quatro vezes para remoção completa do cloreto de tionila.

Finalmente, o complexo **2** foi imobilizado à sílica modificada de utilizando-se um procedimento similar ao realizado no primeiro sistema. Em um tubo de centrifugação de 10 mL (Labware Manufacturing Co.) 150 mg de $\text{SiO}_2/\text{SOCl}_2$ foram suspensas em 10,0 mL de CH_3CN (seca) e a esta suspensão foram adicionados 300,0 mg do complexo **2** (0,292 mmol; 1029,12 g mol^{-1}) e 55,0 μL de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) (0,316 mmol; 129,24 g mol^{-1} ; $\rho = 0,742 \text{ g mL}^{-1}$). O tubo foi vedado adequadamente e a suspensão ficou sob agitação (50 r.p.m) por 24h a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sólido resultante (2-SiO_2) foi lavado com extrator soxhlet por 18h. Uma alíquota (~10 mg) dos dois sólido foi analisada posteriormente por Absorção Atômica com Atomização por Chama (AAAC) para a determinação da quantidade de cobre presente na amostra e por extrapolação, a concentração de cada complexo (mol de complexo por grama de SiO_2).

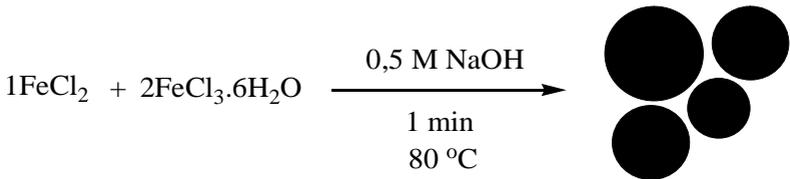
3.3.3.2. Síntese da Poli(dopamina)



Em um tubo de 50 mL para centrifugação, 500,0 mg de dopamina.HCl (2,64 mmol; 189,64 g mol⁻¹) foram solubilizados em 40 mL de uma solução MeOH/H₂O 50:50 (v/v), [TRIS]_{final} = 0,1 mol L⁻¹ pH 6,0. A esta solução foram adicionados 100,0 mg do complexo **1** (0,115 mmol, 870,0 g mol⁻¹). Em seguida borbulhou-se oxigênio (fluxo = 0,5 L min⁻¹) por 10 min, o sistema então foi vedado e permaneceu sob agitação por 24h. Após a agitação o polímero foi dialisado (Spectra/Por, MWCO = 2000 Da) em água por três dias. A solução da diálise foi acompanhada por condutividade, trocando-se o solvente diariamente. Ao final do processo, o polímero foi seco em estufa, obtendo-se 50,0 mg da poli(dopamina).

3.3.3.3. Síntese das Nanopartículas

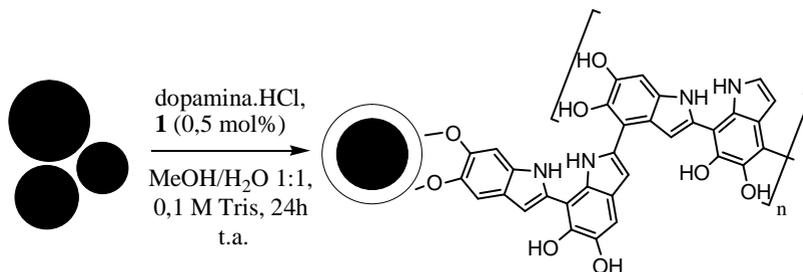
3.3.3.3.1. Síntese de nanopartículas de ferro ãnuasö ó Fe₃O₄



As nanopartículas de ferro foram sintetizadas de acordo com modificações em procedimentos já descritos (Khalafalla, 1980). Em um erlenmeyer de 250 mL, inicialmente 1,2 mg de NaOH foram dissolvidos em 60 mL de H₂O ([NaOH] = 0,5 mol L⁻¹) e essa solução foi borbulhada com N₂(g) por 10 min (o fluxo de gás deve ser de aproximadamente de 0,5 L min⁻¹). O sistema foi fechado e aquecido em banho de glicerina até

a temperatura de 80 °C (precisamente). A solução permaneceu sob intensa agitação. Separadamente, uma solução contendo 250,0 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 58,6 mg de FeCl_2 e 0,5 mL de HCl 1,0 M foi preparada e purgada com $\text{N}_{2(\text{g})}$ por 1 min. Em seguida, a solução de Fe(II) e Fe(III) foi adicionada instantaneamente á solução de base. A coloração escura, característica de nanopartículas de ferro, apareceu instantaneamente. O material magnético permaneceu na solução básica sob agitação por aproximadamente 1 min. Em seguida, rapidamente, com auxílio de um ímã superparamagnético de Neodímio ($\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$), as nanopartículas foram separadas da solução básica e lavadas diversas vezes com água desionizada até $\text{pH} \sim 7,0$. A massa obtida foi de 140 mg de Fe_3O_4 .

3.3.3.3.2. Síntese de nanopartículas de ferro recobertas ó $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ poli(dopamina)



Uma síntese semelhante à descrita acima foi realizada. O material ainda úmido resultante da síntese foi suspenso em água e armazenado em balão de 25,0 mL sob atmosfera inerte de N_2 . O procedimento de determinação da concentração das nanoartículas foi feito da seguinte forma: uma alíquota de 500 μL da suspensão das sementes sintetizadas acima foi transferida para um frasco de vidro de 3,0 mL. O material foi seco em estufa, obtendo-se uma massa resultante de 2,8 mg em 500 μL ($\sim 5,6 \text{ mg mL}^{-1}$).

Em um tudo de centrifugação de 50 mL, 20 mL da suspensão de nanopartículas foram adicionados a uma solução contendo 112,0 mg de dopamina.HCl (0,59 mmol; $189,64 \text{ g mol}^{-1}$), 26,0 mg do complexo **1** (0,03 mmol; 870 g mol^{-1}) e 20,0 mL ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) de tampão TRIS ($[\text{T}]_{\text{final}} = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Em seguida borbulhou-se oxigênio (fluxo = $0,5 \text{ L min}^{-1}$) por 10 min, o sistema foi vedado e permaneceu sob agitação por 24h. As nanopartículas foram separadas magneticamente e lavadas com água (5x 30 mL).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese e caracterização dos Ligantes

Para a realização deste trabalho foram sintetizados dois ligantes, L^{Cl} e L^{en} , sendo este último inédito. As rotas sintéticas estão descritas nas seções 3.3.1.2 e 3.3.1.3, respectivamente. Na síntese do ligante L^{Cl} foram feitas modificações que diminuíram o tempo total da síntese (incluindo *workup*) de 26 horas (Massoud, Louka et al., 2011), para apenas 2h, sem a necessidade da utilização de refluxo e com rendimento similar. A síntese do ligante L^{Cl} ocorre pela substituição nucleofílica de duas aminas secundárias (bpma) sobre dois dos três carbonos aromáticos ligados aos átomos de cloro do anel 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina.

O ligante L^{en} foi preparado a partir de uma modificação do ligante L^{Cl} com acréscimo de uma etapa a mais, a adição de etilenodiamina como reagente. Neste caso, a etilenodiamina foi adicionada em excesso para excluir a possibilidade da formação de dímeros, que podem ser obtidos pelo método descrito por Hoog e colaboradores. (Hoog, 2002).

A caracterização por espectroscopia no IV, ressonância magnética nuclear, equilíbrio em solução (seção 4.4.2) serão apresentadas a seguir.

4.1.1. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho

Todas as etapas referentes à síntese de precursores e dos ligantes finais foram monitoradas por IV. As bandas de absorção dos grupamentos característicos de cada composto orgânico em questão foram observadas e devidamente atribuídas (Silverstein, 2007). A seguir, na Figura 18 podem ser observadas as bandas do precursor (bpma) e dos ligantes L^{Cl} e L^{en} e na Tabela 1 as atribuições das bandas relevantes do precursor bpma e dos ligantes finais.

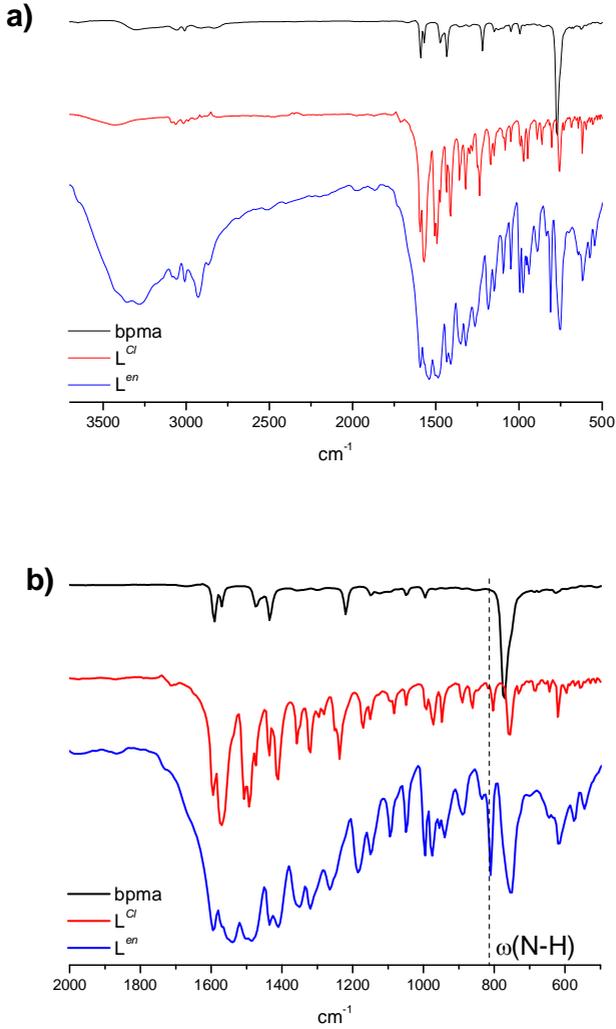


Figura 18. Comparativo de espectros de infravermelho em KBr dos ligantes L^{Cl} (vermelho), L^{en} (azul) e bpma (preto). a) ampliação dos espectros de infravermelho 4000 a 500 cm^{-1} ; b) na região compreendida entre 2000 e 500 cm^{-1} .

No espectro de infravermelho do bpma destacam-se principalmente as bandas de $\nu(\text{N-H})$, referente a amina primária, $\nu(\text{C-N})$ alifático $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$ oriundo dos anéis das piridinas (Tabela 1). No espectro de infravermelho do ligante L^{Cl} podemos observar a ausência do estiramento axial da ligação N-H de amina secundária, indicando que o composto apresenta apenas bandas referentes ao ligante puro. Uma observação interessante foi deslocamento da banda de $\nu(\text{C-N})$ para frequências maiores, nos ligantes L^{Cl} e L^{en} , em relação a amina bpma.

Para aminas primárias, secundárias ou terciárias alifáticas não conjugadas o estiramento axial da ligação C-N é observado entre 1250 e 1020 cm^{-1} (Silverstein, 2007), o que está de acordo com o observado para o bpma, 1220 cm^{-1} .

O ligante L^{en} apresenta algumas diferenças em relação ao ligante L^{Cl} . O aparecimento dos estiramentos axial simétrico e assimétrico das ligações N-H de aminas secundárias, 3360 e 3275 cm^{-1} , respectivamente, e aparecimento da banda $\omega(\text{N-H})$ 808 cm^{-1} também confirmam a substituição etilenodiamina. As bandas de $\nu(\text{C=C})$ e $\nu(\text{C=N})$ dos três compostos aparecem no espectro numa faixa compreendida entre 1600 e 1450 cm^{-1} e não apresentam mudança significativa de intensidade entre elas.

Tabela 1. Principais bandas (cm^{-1}) e atribuições dos espectros na região do infravermelho para os ligantes sintetizados e o bpma.

Atribuições	bpma	L^{Cl}	L^{en}
$\nu(\text{N-H})$	3305	-	3360 - 3275
$\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ e $\text{C-H}_{\text{alif}})$	3055 ó 2825	3097 - 2940	3104-2867
$\nu(\text{C=C}, \text{C=N})$	1590 ó 1435	1577 - 1488	1536 - 1492
$\nu(\text{C-N})$	1220	1354	1357
$\omega(\text{N-H})$	-	-	808
$\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$	775	752	750

4.1.2. Ressonância Magnética Nuclear

As espectroscopias de RMN ^1H e ^{13}C também foram técnicas bastante úteis para a caracterização dos compostos orgânicos sintetizados. Os deslocamentos químicos e a integração dos sinais

observados nos espectros de RMN ^1H permitiram determinar o número de hidrogênios presentes em cada composto, sendo de grande importância para o prosseguimento deste trabalho. Os valores de deslocamento químico (δ_{H} em ppm), o número de hidrogênios correspondentes e as atribuições dos sinais obtidos (Silverstein, 2007) para os ligantes L^{Cl} e L^{en} estão listados a seguir (Tabela 2). Os cálculos referentes às constantes de acoplamento (J) não foram efetuados devido à sobreposição de sinais ao longo do espectro.

Tabela 2. Deslocamentos químicos, em ppm (multiplicidade e integração), observados nos espectros de RMN de ^1H para os ligantes L^{Cl} e L^{en} .

	Ligantes	
	L^{Cl}	L^{en}
RMN ^1H	4,83 (s, 4 H, CH_2); 5,04 (s, 4 H, CH_2); 6,88-6,92 (d, 2 H); 7,03 (t, 2 H); 7,16 (t, 2 H); 7,29-7,37 (m, 4 H)*; 7,60-7,63 (t, 2 H); 8,40 (d, 2 H); 8,50 (d, 2 H)	2,05 (br. s., 2 H); 2,34 (m, 2 H); 2,98 (q, 2 H); 4,73 (s, 4 H); 4,64 (s, 4 H); 5,81 (t, 1 H); 6,76 (m, 6 H); 6,99 (d, 2 H); 7,10 (m, 2 H); 7,28 (d, 2 H)*; 8,21 (d, 2 H); 8,13 (d, 2 H)
RMN ^{13}C	51,92; 121,11; 121,81; 122,26; 136,25; 136,55; 149,15; 157,10; 165,61; 169,72	41,26; 43,11; 51,54; 120,98; 121,22; 121,41; 135,83; 136,07; 148,44; 148,62; 158,21; 165,49; 166,29

* Integração aproximada.

4.1.3. Análise Termogravimétrica do Ligante L^{Cl}

Métodos termogravimétricos são especialmente aplicados na investigação de processos de dessorção, decomposição, desidratação, mecanismos de oxidação de diversos tipos de polímeros, óxidos, sais inorgânicos e materiais híbridos (Skoog D. A. Holler F. J. Nieman,

2002). Em geral, os métodos termogravimétricos são utilizados na Química Inorgânica como uma ferramenta útil para a investigação da estabilidade térmica de ligantes e complexos, na determinação de solventes de cristalização e também como suporte para a análise elementar de CHNS, por exemplo. Somente o ligante L^{Cl} apresentou-se em estado sólido e para ser submetido à análise termogravimétrica.

Compostos sintetizados a partir da 1,3,5-triazinas podem apresentar altas temperaturas de fusão/degradação dependendo dos substituintes, já que em muitos casos essas estruturas podem fazer ligações de hidrogênio intermoleculares (Shu e Valiyaveetil, 2002).

Vomasta e colaboradores (Vomasta, 2007) publicaram a estrutura de raios X do ligante L^{Cl} , 6-cloro- N^2,N^2,N^4,N^4 -tetraquis-piridin-2-ilmetil-[1,3,5]triazine-2,4-diamina (recristalização em $CH_2Cl_2/MeOH$ 5:1 v/v), onde é possível observar a interações do tipo $\pi-\pi$ stacking entre os anéis piridínicos. No termograma do ligante L^{Cl} , observam-se dois estágios de perda de massa. O primeiro de 112 °C até 207 °C ($\Delta m = 2,15\%$) e o segundo de 207 °C até 897 °C, com $\Delta m = 62,6\%$. Embora haja um primeiro estágio de perda de massa, é difícil atribuir esta pequena porcentagem ao solvente de recristalização (isopropanol).

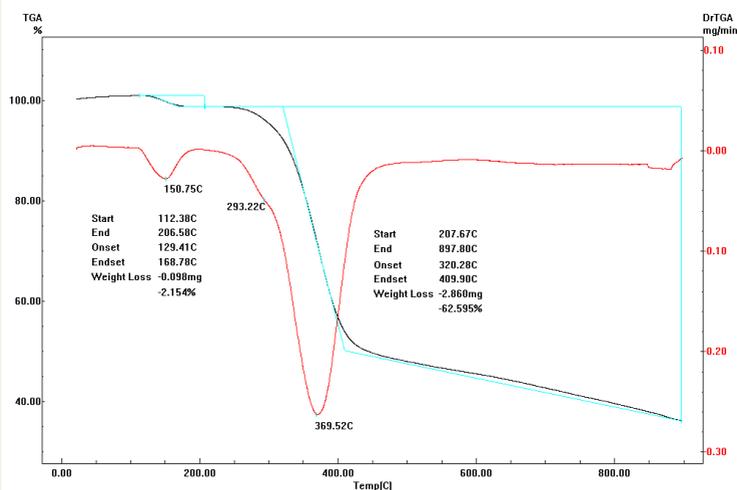


Figura 19. Curva de termogravimetria (TGA - preto) e sua respectiva derivada (DrTGA - vermelho) do ligante L^{Cl} .

4.2. Síntese e caracterização dos Complexos

Os complexos binucleares de cobre(II), $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{L}^{\text{Cl}}(\mu\text{-OH})_2\text{Cu}^{\text{II}}](\text{ClO}_4)_2$ (**1**) e $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{HL}^{\text{en}}(\mu\text{-OH})_2\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_3$ (**2**), foram preparados a partir de soluções metanólicas de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e dos ligantes L^{Cl} e L^{en} , respectivamente, em estequiometria de 2:1. O complexo **1** foi sintetizado com uma metodologia diferente da publicada recentemente (Massoud, Louka *et al.*, 2011). Apenas para o complexo **1** foi usado NaOH ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) para auxiliar na formação das pontes $\mu\text{-OH}$ entre os centros metálicos. Ambos os complexos foram recristalizados na tentativa de obtenção de monocristais para análise de difração de raios X. Os dois complexos sintetizados apresentaram solubilidade em H_2O , CH_3CN , acetona e DMSO e o complexo **1** apresentou baixa solubilidade em MeOH e isopropanol. Em todas as análises realizadas foram utilizadas apenas amostras cristalinas de ambos os complexos.

4.2.1. Difração de Raios X

Os complexos **1** e **2** foram sintetizados e cristalizados, porém ambas as estruturas foram resolvidas parcialmente. A estrutura coletada a partir dos cristais verdes do complexo **1** mostrou-se enorme similaridade com a estrutura publicada recentemente por Massoud e colaboradores (Massoud, Louka *et al.*, 2011). O complexo **1** possui mesmo sistema cristalino (Triclínico), grupo espacial, ângulos e comprimentos de ligação. Como o complexo **1** já possui sua estrutura cristalina publicada, não será explorado com detalhes neste trabalho.

O complexo **1** é formado partindo-se do ligante macio hexadentado, L^{Cl} . Os dois centros de cobre(II) possuem arranjo piramidal quadrático com duas piridinas e uma amina terciária coordenando-se de forma facial e ambos são unidos no plano equatorial por duas pontes $\mu\text{-OH}$ ($d_{\text{Cu-Cu}} = 2,98 \text{ \AA}$).

Os dados cristalográficos do complexo **2** foram coletados, porém devido a baixíssima resolução não foi possível precisar as distâncias e ângulos de ligação. Este complexo exhibe bastante similaridade com o complexo **1**. Da mesma maneira que o ligante L^{Cl} , o ligante L^{en} também força coordenação do tipo facial dos íons Cu^{2+} como no primeiro caso. O complexo **2** também apresenta duas pontes $\mu\text{-OH}$ unindo os centros de cobre(II).

No caso do complexo **1** um íon perclorato interage fracamente de maneira bidentada aos centros de cobre, coordenando-se de maneira *trans* às aminas terciárias. No complexo **2**, em posição *trans* às aminas terciárias coordenaram-se duas moléculas de água, uma molécula para cada íon Cu^{2+} , e a amina primária (do braço contendo a etilenodiamina) encontra-se protonada (ver seção 4.2.4). O arranjo estrutural do complexo **2** pode ser observado na Figura 20.

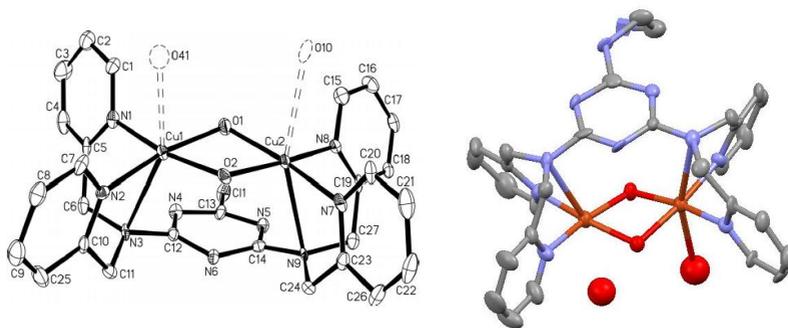


Figura 20. Estrutura cristalina do complexo **1** à esquerda (Massoud, Louka *et al.*, 2011) e a estrutura parcial do cátion complexo $[\text{HL}^{\text{en}}\text{Cu}(\mu\text{-OH})_2\text{Cu}]^{3+}$ (**2**) à direita. Cor cinza: carbono; azul: nitrogênio; laranja: cobre e vermelho: oxigênio. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.

4.2.2. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho

A espectroscopia no IV foi utilizada como uma análise preliminar para a caracterização dos complexos, uma vez que a formação dos mesmos pode ser acompanhada pela presença das bandas características do ligante e de contra-íons. A formação de ponte, como por exemplo μ -hidroxo, μ -acetato ou μ -carbonato, e deslocamentos ou alargamentos nas bandas previamente caracterizadas do ligante também podem ser observadas. Na Tabela 3 estão relacionadas as principais bandas e atribuições (Nakamoto, 1978; Massoud, Louka *et al.*, 2011) e na Figura 21 o espectro de IV dos complexos e respectivos ligantes sintetizados.

Tabela 3. Principais bandas (cm^{-1}) e atribuições dos espectros na região do infravermelho para os ligantes L^{Cl} , L^{en} e os complexos **1** e **2**.

Atribuições	L^{Cl}	1	L^{en}	2
$\nu(\text{O-H})_{\text{ponte}}$	-	3575	-	3544
$\nu(\text{O-H})_{\text{água}}$	-	-	-	3420
$\nu(\text{N-H})$ ou $\nu(\text{N-H}^+)$	-	-	3360 - 3275	3354 - 3249
$\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ e $\text{C-H}_{\text{alif}})$	3097 - 2940	3123-2809	3104- 2867	3126-2926
$\nu(\text{C=C, C=N})$	1577 - 1488	1582 - 1484	1536 - 1492	1557 - 1490
$\nu(\text{Cl-O})$	-	1088	-	1082
$\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$	752	766	750	768
$\delta(\text{Cl-O})$	-	622	-	625

Os dois complexos apresentaram uma banda alargada de intensidade média próxima de 3500 cm^{-1} referente ao estiramento axial da ligação O-H, o que confirma a presença da ponte exógena $\mu\text{-OH}$ em ambos os complexos. Este tipo de banda é característico de outros complexos binucleares principalmente os diméricos do tipo $\text{LCu}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})_2\text{Cu}^{\text{II}}\text{L}$, como por exemplo $[\text{LCu}(\mu_2\text{-OH})_2\text{CuL}]^{2+}$ ($\text{L} = \text{N,N,N''-trimetil-1,4,7-triazacliclononano}$) e $[\text{Cu}_2(\text{HISMIMA})_2(\text{OH})_2]^{2+}$ publicados por Chaudhuri (Chaudhuri, 1985) e Scarpellini (Scarpellini, 2003), respectivamente.

No complexo **2** podemos notar a presença de uma banda adicional em 3420 cm^{-1} que pode ser atribuída pela presença de duas moléculas de água, cada uma coordenada a um dos centros de cobre, como pode ser melhor observado pela estrutura de raios X (seção 4.4.2). Também adicionalmente, no complexo **2**, assim como no ligante L^{en} , podemos observar presença do estiramento da ligação N-H de amina primária

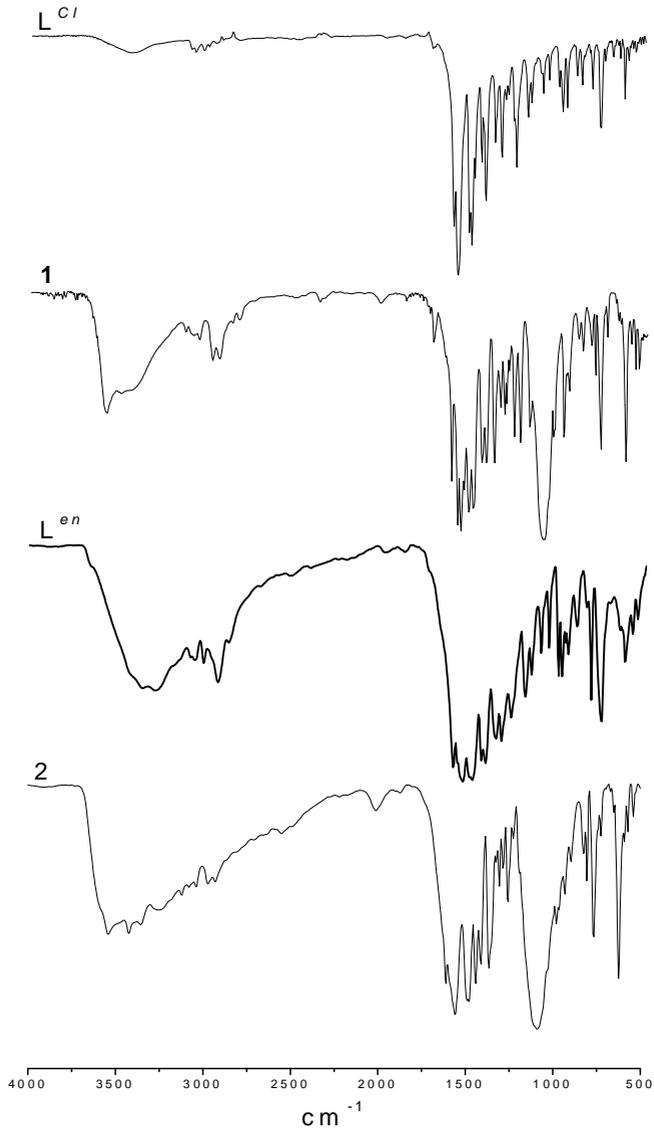


Figura 21. Comparativo de espectros de infravermelho (KBr, cm^{-1}), em ordem descendente: L^{Cl} , 1, L^{en} e 2.

(mais evidente), neste caso N-H⁺ já que a amina encontra-se protonada. Isto também foi confirmado pela presença de um ânion ClO₄⁻ adicional na estrutura cristalina do complexo **2** em relação ao complexo **1**.

Nos dois complexos a presença do perclorato como contra-íon é bastante evidente pela presença das bandas próximas a 1080 cm⁻¹ ν (Cl-O) e 620 cm⁻¹ δ (Cl-O) são características deste contra-íon (Brudenell, 1996). Tanto no complexo **1** quanto no complexo **2** não há mudanças significativas nos estiramentos das ligações C=C e C=N dos anéis aromáticos em relação aos seus respectivos ligantes depois da coordenação.

4.4.3. Espectroscopia UV-Vis

A maioria dos complexos de cobre(II) apresentam coloração verde ou azul, uma vez que no espectro eletrônico UV-Vis nota-se pelo menos uma banda *d-d* na região entre 600 e 900 nm (Cotton, 1988). Complexos *d*⁹ de cobre(II) são conhecidos por apresentarem pronunciadas distorções geométricas (axiais) mais comuns quando estão pentacoordenados ou hexacoordenados, embora essas distorções também apareçam em complexos tetraédricos (Gerloch, 1981), devido ao efeito Jahn-Teller.

O comportamento eletrônico dos complexos **1** e **2** foi estudado em metanol e na condição de cinética, MeOH/H₂O 50:50 v/v, [T] = 0,1 mol L⁻¹. O espectro UV-Vis de ambos os complexos pode ser acompanhado na Figura 22.

Na região do visível (em metanol) há uma banda larga em 590 nm ($\epsilon = 75,0 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) no espectro eletrônico do complexo **1** e em 594 nm ($\epsilon = 57,0 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para o complexo **2**. Essas bandas foram atribuídas como transição *d-d* devido à similaridade dos centros de cobre(II). O espectro eletrônico dos complexos **1** e **2** (metanol) mostram duas bandas bem definidas. Na região do ultravioleta há uma banda simétrica em 353 nm ($\epsilon = 2219,0 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para **1** e em 354 nm ($\epsilon = 1803,0 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para o complexo **2**. Essa absorção pode ser atribuída a transferência de carga da ponte μ -OH (Chaudhuri, 1985; Rey, Neves *et al.*, 2006) para os centros metálicos (TCLM), uma vez que os ligantes L^{Cl} e L^{en} não apresentam banda de transferência de carga na região investigada (800 a 300 nm).

Os espectros eletrônicos dos dois complexos também foram obtidos em diferentes pH. Nos espectros é possível observar o

aparecimentos das respectivas bandas de transferência de carga TCLM, atingindo o máximo no pK_a onde a espécie $\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})\text{Cu}^{\text{II}}$ se forma em ambos os complexos (Figura 21).

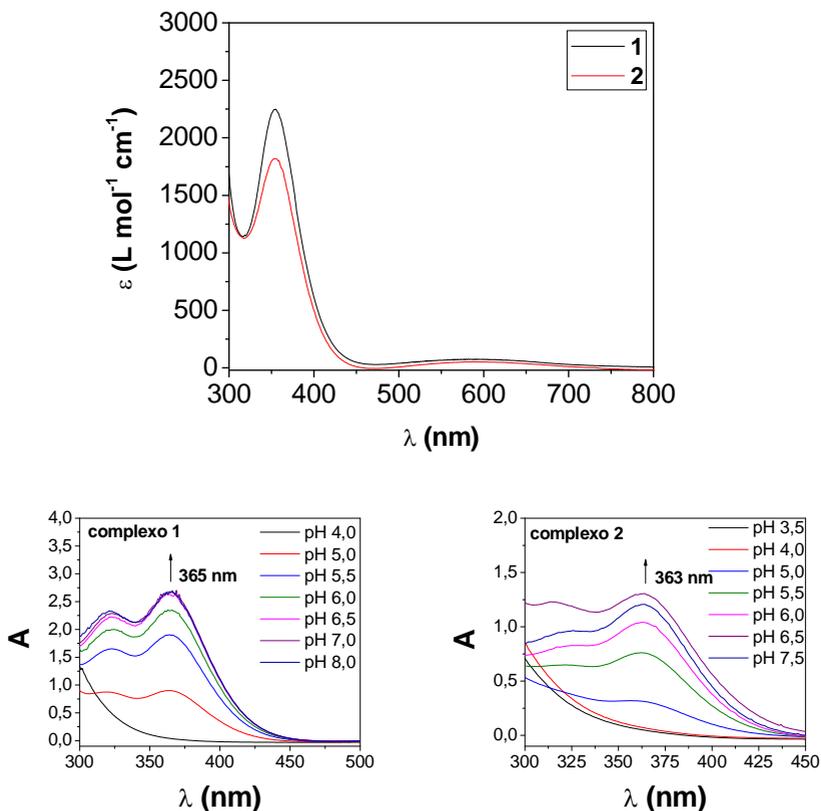


Figura 22. Espectros eletrônicos registrados para os complexos **1** e **2**. Acima, espectros UV-Vis dos dois complexos registrados em CH_3CN . Abaixo, espectros registrados em $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 50:50 v/v, $[\text{T}] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (HOAc/OAc^- pH 3,5; MES pH 4,0 a 6,5, HEPES pH 7,0 e 7,5 e CHES pH 8,0), $[\mathbf{1}] = [\mathbf{2}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

4.2.4. Titulação Potenciométrica

Os estudos potenciométricos foram realizados em $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 50:50 v/v (mesmas condições cinéticas) para os ligantes L^{Cl} e L^{en} e para

o complexo **1**. A titulação do complexo **2** também foi realizada porém não foi possível obter realizar o tratamento dos dados pela dificuldade de ajuste do modelo utilizado para o complexo **1**. A partir da titulação do ligante L^{Cl} obteve-se dois valores de pK_a , 4,15 e 5,29, que foram atribuídos a duas piridinas presentes nos braços do ligante. O ligante L^{en} também apresentou dois valores de pK_a , 3,43 e 5,21, que comparativamente foram atribuídos a duas piridinas da mesma forma.

Para o ligante L^{en} também foi possível obter um terceiro pK_a (9,70) que foi atribuído a desprotonação do íon amônio presente no ligante, originado da substituição com a etilenodiamina na terceira posição do anel da triazina.

Os pK_a das piridinas de ambos os ligantes foram atribuídos com base em outros ligantes similares publicados na literatura contendo aminas terciárias ligadas a triazina e que não são protonadas pelo fato do par de elétrons do nitrogênio da amina estar em ressonância com o anel da triazina (Baranyai *et al.*, 2012). Alguns autores utilizam a formação de sais de piridínio como método de purificação de ligantes similares e nesses casos os nitrogênios terciários ligados a triazina não são proponados (Subat, Woinaroschy *et al.*, 2008). As curvas de equilíbrio das espécies dos ligantes podem ser observadas na Figura 23.

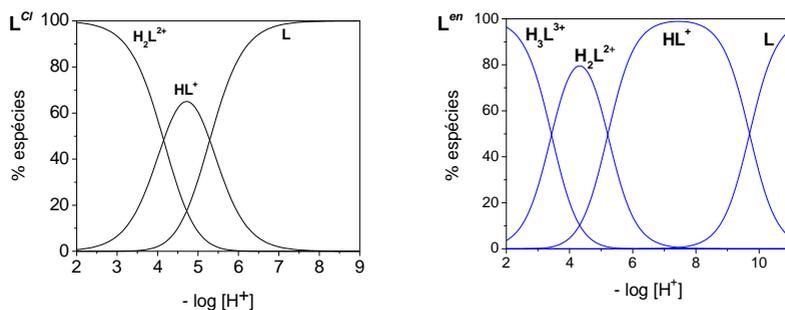


Figura 23. Distribuição de espécies para os ligantes L^{Cl} (preto) e L^{en} (azul) em função de $-\log[H^+]$ com 0,1 M $NaNO_3$ à 25 °C (MeOH/ H_2O 50:50 v/v). Distribuição de espécies para os ligantes L^{Cl} (preto) e L^{en} (azul). $[L^{Cl}] = [L^{en}] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. L simboliza os ligantes L^{Cl} ou L^{en} .

No caso da titulação do complexo **1**, para evitar problemas de precipitação durante a realização do experimento, 0,1 mmol de $Cu(ClO_4)_2$ foram titulados na presença de 0,05 mmol do ligante L^{Cl} em 50,0 mL de solução metanólica (MeOH/ H_2O 50:50 v/v). Observou-se

que o complexo precipita em pH acima de 8,0, portanto o modelo utilizado, os cálculos dos pKa e as constantes de formação foram refinadas na faixa de pH compreendida entre 2,0 e 7,5.

Nas estruturas cristalinas dos complexos **1** e **2** (seção 4.2.1) observa-se a presença de pontes do tipo μ -OH entre os centros de cobre(II). Nesse caso a titulação foi importante para trazer informações a respeito da estrutura do complexo em solução e contribuindo com a proposta mecanística *a posteriori*. O tratamento dos dados levou a obtenção dos LogK apresentados na Tabela 4 e o diagrama de distribuição de espécies na Figura 24.

Tabela 4. Log β determinado para L^{Cl}, L^{en} e para o complexo **1** determinados utilizando 0,1 M NaNO₃ em MeOH/H₂O 50:50 v/v à 25 °C.

	Equilíbrio	Log β
L ^{Cl}	L + H ⁺ HL ⁺	5,29
	HL ⁺ + H ⁺ H ₂ L ²⁺	9,44
L ^{en}	L + H ⁺ HL ⁺	9,70
	HL ⁺ + H ⁺ H ₂ L ²⁺	14,91
	H ₂ L ²⁺ + H ⁺ H ₃ L ³⁺	18,34
1	L + Cu ²⁺ CuL ²⁺	15,25
	CuL ²⁺ + H ⁺ CuLH ³⁺	18,12
	2Cu ²⁺ + L Cu ₂ L ⁴⁺	26,02
	L + 2Cu ²⁺ + H ⁺ Cu ₂ LH ⁵⁺	30,71
	L + 2Cu ²⁺ + 2H ⁺ Cu ₂ LH ₂ ⁶⁺	33,64
	2Cu ²⁺ + L + H ₂ O Cu ₂ H ₁ L ³⁺ + H ⁺	20,99
	Cu ₂ H ₁ L ³⁺ + H ₂ O Cu ₂ H ₂ L ²⁺ + H ⁺	14,96

O complexo **1** apresenta valores de constantes de formação similares a de complexos mononucleares de cobre(II): logK = 15,25 para CuL²⁺ e logK = 10,77 para Cu₂L⁴⁺, como por exemplo [Cu(TACN)]²⁺, logK = 15,5 (Yang e Zompa, 1976) e [Cu(daza)]²⁺ logK = 11,07 (Romba, 2006). O valor para as constantes de formação observadas, tanto para a espécie (1:1) quanto para a espécie 2:1 ([L]/[metal]) reflete a baixa estabilidade que o complexo apresenta para o íon cobre(II). Os braços piridínicos curtos, a rigidez estrutural do ligante e o efeito Jahn-

Teller pronunciado podem contribuir para a diminuição das constantes de formação.

Observando-se a estrutura dos dois complexos, podemos notar um arranjo estrutural similar e a presença de duas pontes μ -OH tanto no complexo **1**, quanto no complexo **2**. Observou-se dois valores de pK_a muito baixos para estarem relacionados a desprotonação de moléculas de água na posições de coordenação equatorial ou axial do íon metálico (Young, Wahnou *et al.*, 1995; Scarpellini, 2003).

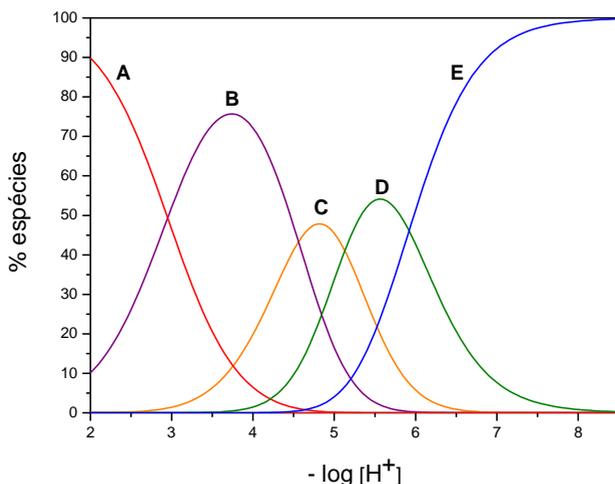


Figura 24. Distribuição de espécies para o complexo **1** em função de $\log[H^+]$ com 0,1 M $NaNO_3$ à 25 °C. **A:** $Cu_2LH_2^{6+}$; **B:** $CuLH^{3+}$; **C:** Cu_2L^{4+} ; **D:** $Cu_2H_1L^{3+}$; **E:** $Cu_2H_2L^{2+}$. $[Cu^{2+}] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[L] = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. L simboliza o ligante L^{Cl} .

A desprotonação de moléculas de água para a formação de pontes do tipo μ -OH em complexos binucleares de cobre(II) em solução são frequentemente relacionadas a presença de forte acoplamento antiferromagnético entre os centros metálicos diminuindo dessa maneira a acidez de Lewis dos centros de Cu(II) e, conseqüentemente, os pK_a das moléculas de água para a formação das pontes μ -hidroxio (Biswas, Das *et al.*, 2012). Em geral, complexos de cobre(II) acoplados antiferromagneticamente apresentam pK_a de pontes μ -OH entre 5,0 e 6,5 (Motekaitis, Martell *et al.*, 1983; Ackermann, 2007; Rey, Neves *et*

al., 2009). Sendo assim, o pK_a da primeira e o da segunda ponte do complexo **1** foram atribuídos como sendo 5,03 e 6,03 respectivamente.

4.2.5. Eletroquímica

É amplamente aceito que para avaliar o comportamento eletroquímico de complexos de Cu(II) um dos fatores que deve-se ter em mente é a geometria que o(s) centro(s) de cobre estabelece(em) com o ligante. Em geral, complexos de Cu(I), d^{10} , preferem geometria tetraédrica, enquanto complexo de Cu(III), d^8 , a rígida geometria quadrado planar, e complexos de Cu(II), d^9 , podem assumir diversas, mas é muito mais comum observar geometrias bipirâmide trigonal ou pirâmide de base quadrada distorcidas (Cotton, 1988; Zanello, 2003; Hammerich, 2008).

Quando ocorre a redução do centro de cobre na superfície do eletrodo Cu^{2+}/Cu^{1+} , se o ligante for suficientemente flexível para permitir reorganização estrutural para geometria tetraédrica, é provável que o processo eletroquímico observado seja reversível (Zanello, 2003). Isto pode ser observado em enzimas de cobre do Tipo 1, como por exemplo, Azurina e Plasmocianina, proteínas contendo apenas um centro de Cu(II) com geometria tetraédrica. Na Plasmocianina, observa-se que o processo Cu^{2+}/Cu^{1+} , $E^0 = + 0,36$ V vs.ENH, está de acordo com a estrutura de raios X da forma reduzida da proteína (Armstrong, Hill *et al.*, 1988), o que demonstra que o sítio de cobre mantém sua geometria tetraédrica. Neste trabalho os complexos **1** e **2** foram estudados por voltametria cíclica (Figura 25) e voltametria de pulso diferencial (Figura S1 - Anexos).

As propriedades redox dos complexos foram estudadas nas condições cinéticas MeOH/H₂O, em presença de tampão MES e NaClO₄ como força iônica (Tabela 5).

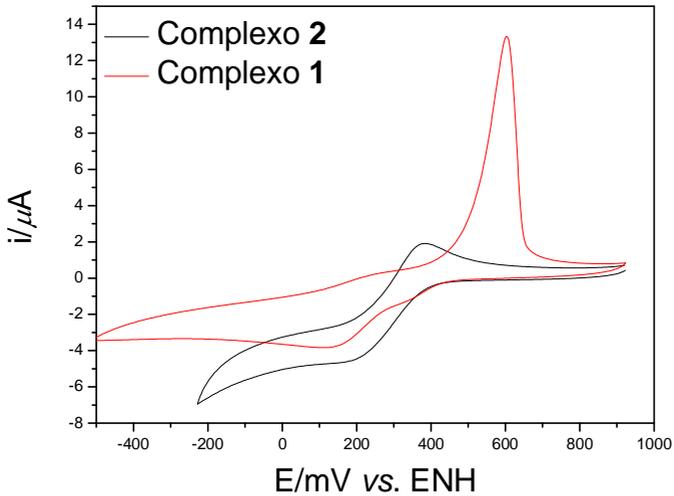


Figura 25. Voltamogramas cíclicos registrados para os complexos, **1** ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e **2** ($1,02 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo; eletrodo auxiliar: fio de platina; eletrodo de referência Ag/AgCl; eletrólito suporte: NaClO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$); Tampão MES ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), solvente MeOH/ H_2O (1:1); pH 6,0 (complexo **1**) e 6,5 (complexo **2**); velocidade de varredura: $25 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$; padrão: hexacianoferrato de potássio.

A Figura 25 apresenta os voltamogramas cíclicos dos complexos **1** e **2** com velocidade de varredura de 25 mV s^{-1} . As voltametrias foram realizadas em pH 6,0 e 6,5 para os complexos **1** e **2**, respectivamente, dessa forma, o complexo **1** foi analisado sob condições similares as descritas para os ensaios cinéticos. O complexo **2** foi analisado em pH 6,5. Essa alteração foi necessária para que a voltametria dos complexos fosse realizada com o mesmo tampão (MES), para evitar diferença na coordenação dos complexos com tampões diferentes.

Tabela 5. Resultado das voltametrias cíclica e pulso diferencial para os complexos **1** e **2**.

Voltametria	Complexo	pH	$E_{pc}(V)$	$E_{pa}(V)$	$E^{1/2}(V)$	Atribuição	$\Delta E_{1,2}(V)$
Cíclica*	1	6,0	+ 0,601	+ 0,343	+ 0,472	$Cu^{II}Cu^{II} / Cu^{II}Cu^I$	+ 0,360
			+ 0,241	+ 0,127	+ 0,184	$Cu^{II}Cu^I / Cu^I Cu^I$	
	2	6,5	+ 0,380	+ 0,189	+ 0,285	$Cu^{II}Cu^{II} / Cu^I Cu^I$	-
Pulso Diferencial**	1	6,0	+ 0,593	+ 0,375	+ 0,484	$Cu^{II}Cu^{II} / Cu^{II}Cu^I$	+ 0,430
			+ 0,163	+ 0,216	+ 0,190	$Cu^{II}Cu^I / Cu^I Cu^I$	
	2	6,5	+ 0,324	+ 0,295	-	-	+ 0,114
			+ 0,210			-	

*Voltamogramas cíclicos registrados para os complexos, **1** ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e **2** ($1,02 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo; eletrodo auxiliar: fio de platina; eletrodo de referência Ag/AgCl; eletrólito suporte: NaClO_4 ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$); Tampão MES ($1,0 \times 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), solvente MeOH/ H_2O (1:1); pH 6,0 (complexo **1**) e 6,5 (complexo **2**); velocidade de varredura: $25 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; padrão: hexacianoferrato de potássio. **A voltametria de pulso diferencial foi realizada nas mesmas condições descritas acima para a voltametria cíclica; amplitude: 25 mV; velocidade de varredura 20 mV s^{-1} .

O voltamograma cíclico do complexo **1** mostra dois processos, ambos irreversíveis ($i_{pa}/i_{pc} \sim 1$), $E^{1/2} = + 0,472$ V vs. ENH e $E^{1/2} = + 0,184$ V vs. ENH, que podem ser atribuídos à transferência de dois elétrons $Cu^{II}Cu^{II} \rightarrow Cu^ICu^{II}$ e $Cu^ICu^{II} \rightarrow Cu^ICu^I$, respectivamente. O voltamograma de pulso diferencial do complexo **1** mostra dois processos, ambos *quasi*-reversíveis próximos aos obtidos pela voltametria cíclica, $E^{1/2} = + 0,484$ V vs. ENH e $E^{1/2} = + 0,190$ V vs. ENH, que também podem ser atribuídos aos processos $Cu^{II}Cu^{II} \rightarrow Cu^ICu^{II}$ e $Cu^ICu^{II} \rightarrow Cu^ICu^I$, respectivamente.

Para o complexo **2**, o voltamograma cíclico apresenta apenas um processo *quasi*-reversível, $E^{1/2} = + 0,285$ V vs. ENH que, neste caso, pode ser atribuído à transferência de dois elétrons simultaneamente, $Cu^{II}Cu^{II} \rightarrow Cu^ICu^I$. O voltamograma de pulso diferencial do complexo **2** mostra dois processos relacionados à redução, $E = + 0,484$ V vs. ENH e $E = + 0,190$ V vs. ENH, que também podem ser atribuídos aos processos $Cu^{II}Cu^{II} \rightarrow Cu^ICu^{II}$ e $Cu^ICu^{II} \rightarrow Cu^ICu^I$, respectivamente. Há somente um processo de oxidação, $E = + 0,295$ V vs. ENH, porém é difícil relacionar esse processo àqueles descritos acima, relacionados à redução.

Em diversos exemplos de complexos binucleares de cobre(II) contendo ponte endógena alcóxido ou fenóxido publicados com atividade de catecolase, observa-se que os centros metálicos apresentam potenciais de redução negativos (Neves, Rossi *et al.*, 2002; Peralta, Neves *et al.*, 2006; Osório, Peralta *et al.*, 2012), devido a forte densidade de carga sobre os íons Cu(II).

Os valores dos potenciais positivos observados para os complexos **1** e **2** nas condições descritas, apontam de forma vantajosa a utilização de ambos complexos para reações de oxidação do substrato 3,5-dtbc. A pequena diferença no valor de $\Delta E_{1,2}$ também é uma característica promissora para o complexo **2**, embora os valores dos potenciais de redução sejam um pouco menos positivos, possivelmente devido a substituição de um grupo retirador (-Cl) por um grupo doador (-NHR) no anel da triazina. Recentemente publicada por Massoud e colaboradores (Massoud, Louka *et al.*, 2011), a eletroquímica do complexo **1**, $Cu^{2+}(\mu-OH)_2Cu^{2+}$ em DMF seco, mostra um processo próximo a $+ 0,34$ V vs. ECS ($+ 0,584$ V vs. ENH, corrigido somando-se $+ 0,244$ V, de acordo com Wing-Yan Ng (Ng, 1988)), mas não foi atribuído pelos autores. Deveria ser esperado para o complexo **1** (DMF seco) que os potenciais fossem menos positivos em relação ao meio estudado neste trabalho, pH 6,0 em MeOH/H₂O 50:50 v/v, uma vez que

nesta condição, segundo os estudos de potenciometria, há apenas a formação de uma única ponte hidróxido entre os dois centros metálicos.

4.2.6. Espectrometria de Massas

A Espectrometria de Massas com Ionização por *Eletrospray* (ESI-MS) tem sido extensivamente aplicada na identificação de espécies em solução. Em geral, a técnica é aplicada a compostos pouco voláteis, de elevado peso molecular (> 10.000 Da) que podem ser orgânicos, inorgânicos, organometálicos, proteínas, entre outros (Moraes, 2003). Em muitos casos é possível relacionar as espécies identificadas pela técnica de ESI-MS com outras técnicas em solução como, por exemplo, potenciometria e eletroquímica.

A espectrometria de massas foi aplicada neste trabalho ao estudo das espécies em solução apenas para o complexo **1**, em soluções de MeOH/H₂O 50:50 v/v, nos pH 3,5, 6,0, 7,0 e 9,0.

O espectro de massa do complexo **1** em pH 3,5 mostra dois picos de maior intensidade (Figura S2 - Anexos), o pico designado como **G** corresponde a espécie $[(C_{27}H_{24}N_9Cl) + H]^+$ (m/z 255,5) e o pico **H** corresponde a espécie $[(C_{27}H_{24}N_9Cl)Cu^{II} + H + ClO_4]^{2+}$ (m/z 337,0).

Em pH 6,0, condição semelhante á utilizada nos ensaios cinéticos (Figuras 26 e 27), podemos observar três picos (**A**, **B** e **C**) com padrão isotópico característico de cobre. Os picos **A**, **B** e **C** foram simulados e identificados como sendo $[(C_{27}H_{24}N_9Cl)Cu^{II}_2(OH)_2]^{2+}$ (m/z 335,5), $[(C_{27}H_{24}N_9Cl)Cu^{II}_2(OH)(MeO)]^{2+}$ (m/z 342,5) e $[(C_{27}H_{24}N_9Cl)Cu^{II}_2(MeO)_2]^{2+}$ (m/z 349,5), respectivamente. A espécie **A** apresenta dois íons hidróxido como adutos e as espécies **B** e **C** contém ao menos um metoxi como aduto. A formação de adutos do tipo metóxido ou etóxido é comum e pode surgir a partir da fragmentação do solvente no *eletrospray* (Lanznaster, Neves *et al.*, 2005; Smith, Peralta *et al.*, 2012). Em pH 7,0 as espécies binucleares **A**, **B**, e **C** também são preponderantes no espectro de massas (Figura S3 ó Anexos). Em pH 9,0 (Figura S4 - Anexos) podemos observar os picos **A**, **B** e **C**, espécies relevantes nos pH 6,0 e 7,0, e presença de outras três espécies **D**, **E** e **F**. Essas três espécies são pouquíssimo intensas nos pH 6,0 e 7,0.

D, **E** e **F** são espécies que foram identificadas como: $[L^{Cl}Cu^{II}_2(OH)_2 + ClO_4]^+$ (m/z 770,0), $[L^{Cl}Cu^{II}_2(OH)(MeO) + ClO_4]^{1+}$ (m/z 783,0) e $[(C_{27}H_{24}N_9Cl)Cu^{II}_2(MeO)_2 + ClO_4]^{1+}$ (m/z 798,0). De acordo com a titulação potenciométrica, a espécie $Cu^{II}(\mu-OH)Cu^{II}$ apresenta maior porcentagem em solução (54%) em pH 6,0 ($pK_{a_{\text{ponte}}} =$

5,03), porém não foi observada por ESI-MS nos pH 6,0 e 7,0. Em adição a este resultado, podemos supor que as espécies binucleares contendo duas pontes são as mais estáveis sob as condições experimentais realizadas.

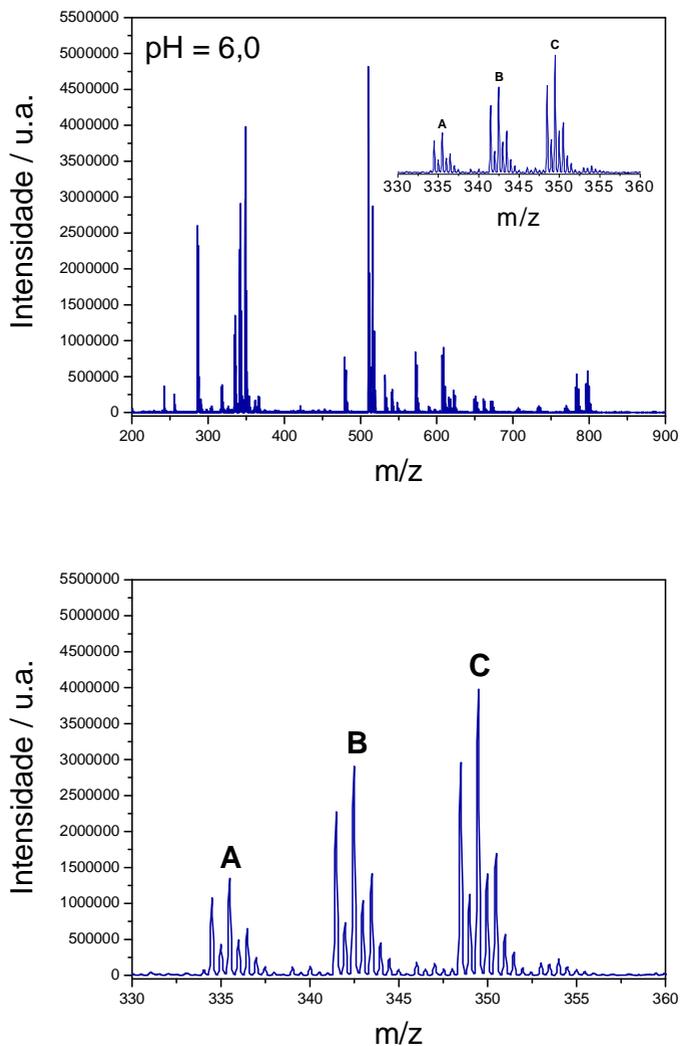


Figura 26. Espectro de massas ESI(+)-MS do complexo **1** em solução metanólica, MeOH/H₂O 50:50 v/v, em pH 6,0.

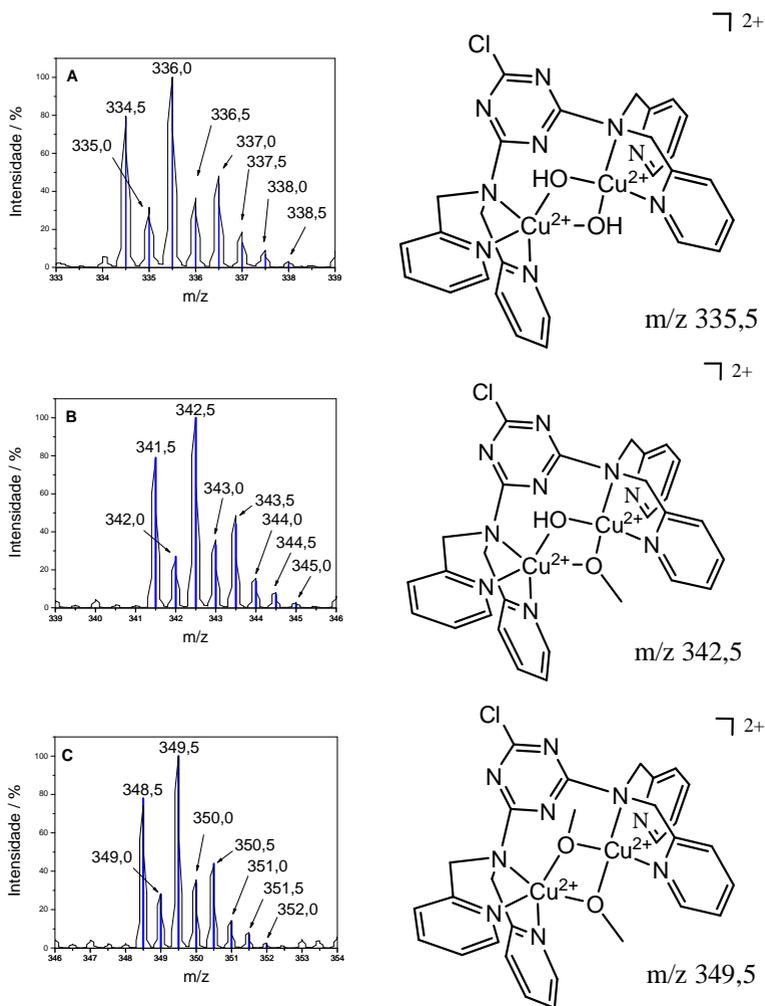


Figura 27. ESI(+)-MS do complexo **1** em solução metanólica, MeOH/H₂O 50:50 v/v, em pH 6,0. Simulação das espécies: **A**, m/z 335,5 [(C₂₇H₂₄N₉Cl)Cu^{II}₂(OH)₂]²⁺, **B**, m/z 342,5 [(C₂₇H₂₄N₉Cl)Cu^{II}₂(OH)(MeO)]²⁺ e **C**, m/z 349,5 [(C₂₇H₂₄N₉Cl)Cu^{II}₂(MeO)₂]²⁺. Espectro em preto é o experimental e em linhas azuis, o simulado.

4.2.7. Reatividade

Recentemente, muitos complexos de cobre(II) tem sido estudados como catalisadores para a reação de oxidação de catecóis para *orto*-quinonas (Osório, Peralta *et al.*, 2012). Em geral grande parte dos esforços aplicados no entendimento do funcionamento da enzima Catecol Oxidase baseia-se no aprimoramento sintético de ligantes que forneçam similaridade com os aminoácidos que compõe o sítio ativo da enzima e propriedades espectroscópicas que ajudem a esclarecer a participação do oxigênio no ciclo catalítico da enzima (Solomon, Sarangi *et al.*, 2007).

Os complexos **1** e **2** apresentam características estruturais e espectroscópicas importantes que justificam a sua utilização como modelos análogos sintéticos da enzima *ibCO*. Estruturalmente os complexos **1** e **2** apresentam dois centros simétricos de cobre(II), coordenados por três nitrogênios em cada centro metálico de maneira facial, com distância intermetálica aproximada de 3,0 Å, separados por pontes do tipo μ -OH. Dessa maneira, os dois complexos podem ser considerados como análogos estruturais da enzima Catecol Oxidase.

A partir destas considerações iniciais os complexos **1** e **2**, tanto em meio homogêneo, quanto suportados em SiO₂, foram submetidos a ensaios cinéticos para avaliar a capacidade catalítica na oxidação do substrato modelo 3,5-di-*terc*-butilcatecol (3,5-dtbc). Este substrato foi escolhido por apresentar baixo potencial redox (+1,19 V *vs.* ESC em CH₃CN) em comparação com o substrato original, o catecol (+1,32 V *vs.* ESC em CH₃CN) (Stallings, Morrison *et al.*, 1981), o que facilita a formação da 3,5-di-*terc*-butil-*o*-benzoquinona (3,5-dtbq) e evita polimerização do substrato.

Os complexos **1** e **2** foram estudados utilizando-se o método das velocidades iniciais e instrumentação para cinéticas alta performance (espectrofotômetro de parada de fluxo). No caso das reações em meio heterogêneo, o estudo foi feito utilizando-se espectrofotômetro convencional. Em todos os experimentos a reação foi acompanhada pelo aparecimento do produto 3,5-dtbc em 400 nm ($\epsilon = 1570 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, MeOH/H₂O 50:50 v/v). A figura abaixo (Figura 28) mostra o perfil do espectro UV-Vis como resultado da oxidação dos substratos catecol (para semiquinona) e 3,5-dtbc para 3,5-dtbq (mostrado apenas para o complexo **1**).

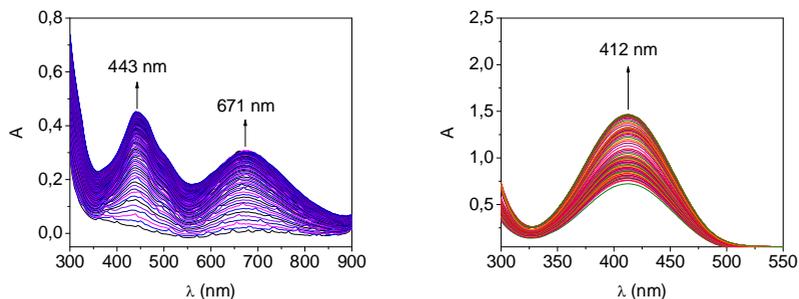


Figura 28. Espectro UV-Vis da reação de oxidação do catecol (à esquerda) e do 3,5-dtbc (à direita), acompanhada nos primeiros 20 minutos iniciais das reações, utilizando-se um espectrofotômetro convencional.

4.2.8. Efeito do pH

Com o objetivo de determinar a relação entre pH e atividade em relação à reação de oxidação do substrato 3,5-dtbc promovida pelos complexos **1** e **2**, a comparação dos pK_a cinéticos (de desprotonação das moléculas de água ligadas aos centros metálicos) com os valores de pK_a obtidos a partir da titulação potenciométrica, realizou-se um estudo da velocidade inicial para cada complexo em função da variação do pH, como pode ser observado na Figura 29.

Para os dois complexos (**1** e **2**) a atividade de oxidação foi investigada em uma faixa de pH correspondida entre 3,7 ó 8,5, dependendo do complexo. Nestes experimentos utilizou-se uma relação de [substrato]/[complexo] igual a cem vezes, ou seja, cem vezes de excesso do substrato em relação ao complexo. Nos dois casos há um aumento de atividade com o aumento de pH até um valor máximo, decrescendo em seguida, perfil característico de sino, também observado para a enzima Catecol Oxidase na oxidação do mesmo substrato, 3,5-dtbc (Eicken, Zippel *et al.*, 1998).

A assimetria no perfil de pH dos dois complexos indica que após o pH máximo da catálise a atividade não diminuiu até zero, ou seja, que a espécie formada a partir do segundo pK_a , pK_{a2} , contribui de forma menos efetiva para a oxidação do substrato 3,5-dtbc. Os perfis de pH apresentam comportamento de sino assimétrico similar a outros complexos modelo da literatura (Smith, Peralta *et al.*, 2012).

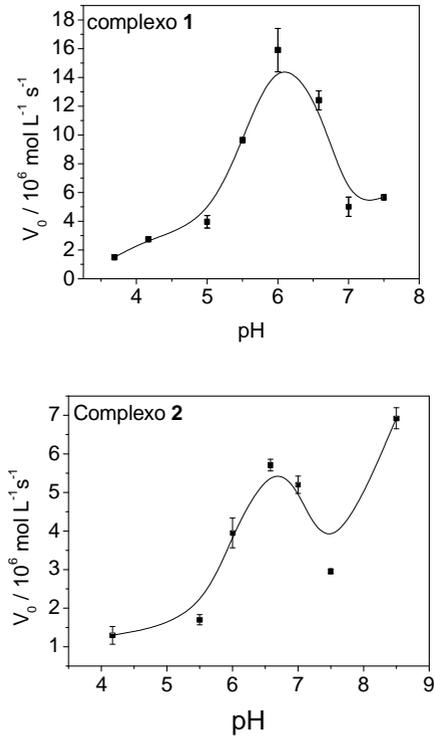


Figura 29. Dependência da velocidade de reação dos complexos **1** e **2** com o substrato 3,5-dtbc em função do pH. Condições: $[1] = [2] = 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[3,5\text{-dtbc}] = 6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[T] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (HOAc/OAc⁻ pH 3,7; MES pH 4,0 a 6,5, HEPES pH 7,0 e 7,5 e CHES pH 8,5) a 25,0 °C, em MeOH/H₂O 50:50 v/v (saturada com O₂).

De acordo com estudos prévios de titulação potenciométrica, seção 4.4.2, o complexo **1** apresenta dois pK_a de interesse, o primeiro, $pK_{a1} = 5,03$ que foi atribuído a formação da espécie binuclear $\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})\text{Cu}^{\text{II}}$ e o segundo, $pK_{a2} = 6,03$, atribuído a formação da espécie binuclear com duas pontes μ -hidróxido $[\text{L}^{\text{Cl}}\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})_2\text{Cu}^{\text{II}}]^{3+}$. O valor do pK_{a1} cinético (5,55,) obtido a partir do perfil de pH do complexo **1** é muito próximo com o valor do pK_{a1} obtido por potênciometria (5,03).

Essa proximidade com a titulação indica que provavelmente a espécie ativa na oxidação do substrato seja a espécie com apenas uma ponte hidróxido entre os dois centros metálicos. Este resultado mostra que a espécie cataliticamente ativa $\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})\text{Cu}^{\text{II}}$ para o complexo **1** é

muito similar à forma *met* observado por difratometria de raios X da enzima nativa ibCO (Krebs., 1998).

Os valor do pKa (cinéticos) encontrados para o complexo **2**, pKa₁ = 5,86 foi um pouco maior em comparação ao complexo **1**, que seria esperado, já que o complexo **2** possui o ligante contendo uma amina secundária como grupo doador. Para o complexo **2** a espécie cataliticamente ativa provavelmente deva ser a espécie [LHCu^{II}(μ-OH)Cu^{II}]³⁺ pela similaridade estrutural ao complexo **1**. A Tabela 6 mostra a comparação entre os pKa cinético e potenciométrico para os complexos **1** e **2**.

Tabela 6. Valores de pKa cinéticos e potenciométricos encontrados para os complexos **1** e **2**.

Complexo	pKa potenciométricos		pKa cinéticos	
	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₁	pKa ₂
1	5,03	6,03	5,55	6,43
2	-	-	5,86	-

4.2.9. Efeito da concentração do substrato

O método das velocidades iniciais foi utilizado para a obtenção dos parâmetros cinéticos. O efeito da concentração do substrato foi realizado no pH de atividade máxima para cada um dos complexos, pH 6,0 para o complexo **1** e pH 6,5 para o complexo **2**. A Figura 26 apresenta os gráficos da velocidade inicial (V₀) em função da concentração do substrato 3,5-dtbc para os complexos **1** e **2** e a Tabela 7 resume seus parâmetros cinéticos. O ajuste da curva foi feito segundo o modelo de Michaelis-Menten (equação abaixo).

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

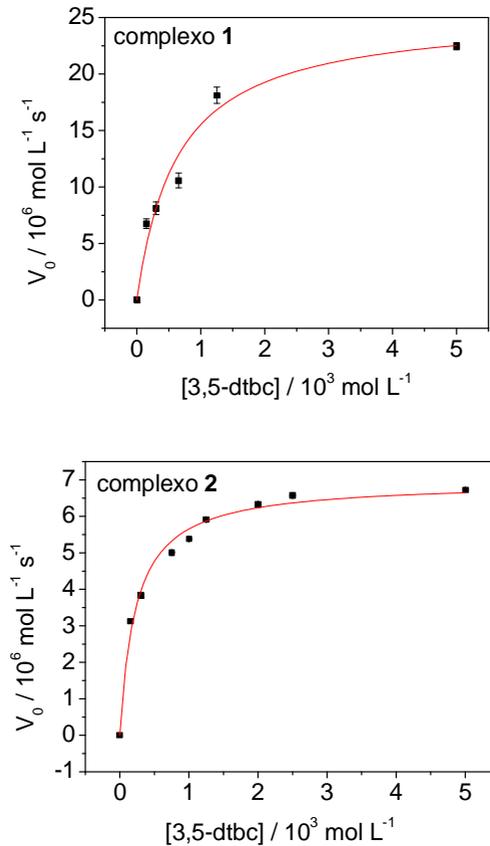


Figura 30. Dependência da velocidade da reação de oxidação em função da concentração do substrato 3,5-dtbc pelos complexos **1** e **2** nas seguintes condições experimentais: solução $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 50:50 v/v, $[\mathbf{1}] = [\mathbf{2}] = 4,98 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[3,5\text{-dtbc}] = (0,15 - 5,0) \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$, $[T] = 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ (tampão MES pH 6,0 para o complexo **1** e 6,5 para o complexo **2**) a 25°C .

Observa-se na Figura 30 que, com o aumento na concentração do substrato as curvas tendem à saturação, característica do mecanismo de Michaelis-Mentem, ou seja, com o aumento na concentração do substrato ocorre saturação no sítio ativo dos catalisadores, levando a uma mudança na ordem de reação da reação (de primeira ordem inicialmente, para ordem zero).

Tabela 7. Comparação dos parâmetros cinéticos de alguns complexos selecionados e da catecol oxidase da *Ipomoea batatas*.

Complexos	K_M (10^{-3} mol L^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	K_{ass} (L $\frac{\text{mol}}{1,^a}$)	E (L s^{-1} mol^{-1}) ^b	$k_{\text{cat}}/k_{\text{non}}$ ^c	meio
i) C.O. de <i>Ipomoea batatas</i>	2,5	2293,0	400,0	$9,17 \times 10^5$	$2,29 \times 10^{11}$	0.1 M fosfato de sódio, pH 6,5 [†]
ii) $[\text{Cu}_2\text{L}_2(\mu\text{-OH})]^{2+}$	0,75	1,81	1333,3	2413,0	$1,08 \times 10^5$	MeOH/TRIS, (29:1), pH 8,0 [#]
iii) $[\text{Cu}_2([\text{22}]pr4pz)(\text{CO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{4+}$	0,176	0,124	5682,0	705,0	$7,43 \times 10^6$	MeOH [#]
iv) $\text{L}^{\text{Cl}}\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})_2\text{Cu}^{\text{II}}]^{2+}$ (1)	1,6	0,51	625,0	312,5	$2,99 \times 10^7$	MeOH/MES (1:1), pH 6,0 [§]
v) $\text{L}^{\text{en}}\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})_2\text{Cu}^{\text{II}}]^{2+}$ (2)	0,23	0,14	4348,0	607,0	$8,38 \times 10^6$	MeOH/MES (1:1), pH 6,0 [§]
vi) $[\text{Cu}_2(\text{Hbtppnol})(\text{OAc})]^{2+}$	0,95	$7,8 \times 10^{-3}$	1053,0	8,10	$4,67 \times 10^5$	MeOH/TRIS (32:1), pH 8,0 [#]
vii) $[\text{Cu}_2\text{L-}_{3\text{H}}(\mu\text{-OAc})]^{2+}$	0,41	$2,67 \times 10^{-3}$	2,44	6,51	$1,6 \times 10^5$	MeOH [#]

^a $K_{\text{ass}} = 1/K_M$; ^b $E = k_{\text{cat}}/K_M$ (eficiência catalítica); ^cOs valores de $k_{\text{cat}}/k_{\text{non}}$ foram aproximados segundo Striegler *et al.*: [§] $k_{\text{non}} = 1,67 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ (MeOH/H₂O 60:40 v/v), [#] $k_{\text{non}} = 1,67 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ (MeOH/H₂O 80:20 v/v) e [†] $k_{\text{non}} = 1,0 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ (H₂O) a 30 °C (Gichinga e Striegler, 2008); Ref.: **i)** (Eicken, Zippel *et al.*, 1998), **ii)** (Ackermann, 2007), **iii)** (Koval, Selmeczi *et al.*, 2006), **iv)** Este trabalho, **v)** Este trabalho, **vi)** (Neves, Rossi *et al.*, 2002), **vii)** (Gichinga e Striegler, 2008).

Os gráficos da velocidade inicial (V_0) em função da concentração do substrato foram tratados com métodos não lineares utilizando o programa *OriginPro 7.5*. A Tabela 6 destaca os parâmetros cinéticos obtidos para os complexos **1** e **2** e de alguns complexos selecionados da literatura.

Os cálculos foram realizados sem a correção da concentração das espécies atribuídas como sendo as responsáveis pela atividade: $[L^{Cl}Cu^{II}(\mu-OH)Cu^{II}]^{3+}$ (**1**) e $[HL^{en}Cu^{II}(\mu-OH)Cu^{II}]^{4+}$ (**2**). Essa medida foi tomada uma vez que as espécies contendo pontes $\mu-OH_2$ também são ativas na oxidação.

De acordo com o perfil de pH de cada complexo, podemos observar que a atividade aumenta com o aumento do pH e atinge um máximo. Em muitos complexos binucleares de cobre(II) é sugerido que pontes do tipo μ -hidroxo ou hidróxido terminal auxiliam na desprotonação do segundo próton do substrato, permitindo assim um acesso do substrato de maneira bidentata aos centros metálicos (Smit e Schenk, 2008).

Como pode ser observado na Tabela 6, o complexo **2** é possui eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), $607,0 \text{ L s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, maior em relação ao complexo **1**, $312,5 \text{ L s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ e uma das maiores dentre os complexos de cobre(II) publicados na literatura. Notadamente o k_{cat} do complexo **2** ($0,14 \text{ s}^{-1}$) é quase quatro vezes menor em relação ao k_{cat} do complexo **1** ($0,51 \text{ s}^{-1}$), porém a constante de associação, $K_{ass} = 4348,0 \text{ L mol}^{-1}$, é oito vezes maior em relação ao complexo **1** ($K_{ass} = 625,0 \text{ L mol}^{-1}$) e mais de dez vezes maior em comparação com a própria enzima ibCO ($400,0 \text{ L mol}^{-1}$).

Existem alguns fatores que podem justificar essa diferença tão expressiva. No caso do complexo **1**, a espécie ativa proposta $[L^{Cl}Cu^{II}(\mu-OH)Cu^{II}]^{3+}$ possui carga formal $3+$, enquanto que no complexo **2** a espécie ativa proposta, $[HL^{en}Cu^{II}(\mu-OH)Cu^{II}]^{4+}$, possui carga formal $4+$. Isso acontece pela presença da amina primária que se encontra protonada em pH 6,5 ($pK_{a\text{amina}} = 9,7$, por potenciometria). A presença dessa amina protonada na segunda esfera de coordenação colabora expressivamente com a constante de associação, K_{ass} , já que o substrato possui carga formal negativa, após a desprotonação das hidroxilas (Neves, Rossi *et al.*, 2002; Smit e Schenk, 2008; Osório, Peralta *et al.*, 2012).

Outro fator é a correlação entre $(\Delta E)_{1,2}$, $[(\Delta E)_{1,2} = E_{pc1} \text{ ó } E_{pc2}]$ diferença entre os dois picos catódicos do complexo, e a eficiência catalítica, k_{cat}/K_M . Os valores de $(\Delta E)_{1,2}$ foram observados por

voltametria de pulso diferencial. O complexo **1** possui $(\Delta E)_{1,2}$ igual a 0,360 V, enquanto que **2**, possui apenas 0,114 V. A diferença entre os picos de redução é um parâmetro importante, pois mostra o quão rapidamente os centros metálicos aceitam o par de elétrons do substrato durante a reação de oxidação do 3,5-dtbc (Osório, Peralta *et al.*, 2012).

Outro aspecto importante pra ser observado é a presença de excesso de oxigênio durante a reação. O oxigênio é fundamental para oxidação do centro binuclear de cobre $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{I}}$ para $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$, regenerando o catalisador. Uma reação de oxidação foi acompanhada para **1** e **2** nas condições cinéticas ideais com excesso de substrato, $[\text{complexo}]/[3,5\text{-dtbc}] \sim 100$ vezes, na presença de oxigênio por 14 horas.

O complexo **1** converteu expressivamente 93,1% da concentração inicial do substrato, o que significa cerca de 98 *turnovers*, enquanto que o complexo **2** converteu cerca de 84,1%, o que representa aproximadamente 84 *turnovers*. A reação não catalisada acompanhada nas mesmas condições dos complexos **1** e **2** converteu cerca de 1,5 e 1,6% da concentração inicial do substrato, respectivamente.

Durante o processo de oxidação dos complexos pelo oxigênio, há formação de H_2O_2 , que foi confirmado pela reação com iodeto gerando I_3^- (Neves, Rossi *et al.*, 2002), de forma que a oxidação dos complexos ocorra seguindo a estequiometria $3,5\text{-dtbc} + \text{O}_2 \rightarrow 3,5\text{-dtbq} + \text{H}_2\text{O}_2$, diferentemente do mecanismo proposto para a enzima nativa ibCO.

4.2.10. Proposta mecanística

Em resumo, as técnicas espectroscópicas e cinéticas realizadas até aqui nos permitiram a elaboração de um mecanismo para a reação de oxidação do substrato 3,5-dtbc na presença dos complexos **1** e **2**. O mecanismo proposto pode ser observado na Figura 27.

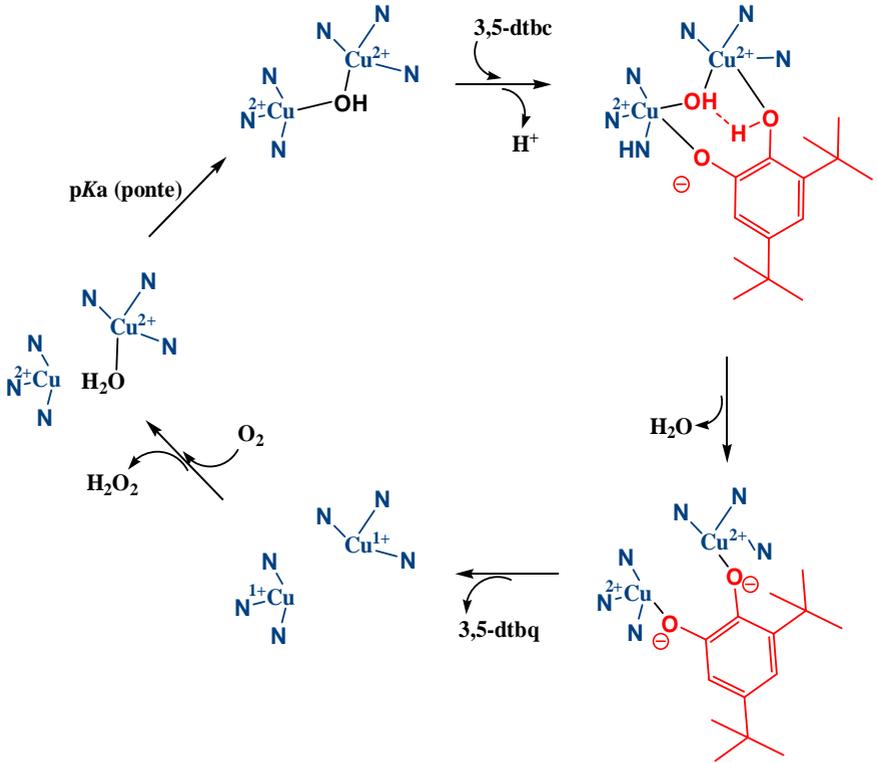


Figura 31. Proposta mecanística para a oxidação do substrato 3,5-dtbc promovida pelos complexos 1 e 2.

Ao elevarmos o pH, observamos que há um acréscimo da atividade até um máximo, ou seja, ocorre um aumento da atividade após a formação da primeira ponte μ -OH nos dois complexos. Postula-se que as pontes auxiliem na desprotonação, principalmente da segunda hidroxila do 3,5-dtbc (Smit e Schenk, 2008). Observa-se na espectroscopia UV-Vis que tanto para o complexo 1, quanto para o complexo 2, ocorre um aumento da banda de transferência de carga TCLM $Cu^{II} - OH$ atingindo um máximo em pH 6,0 para **1** e 6,5 para o **2**. Isto é concordante com os valores de pK_a cinéticos obtidos para os dois complexos.

A espectrometria de massas também indica a presença de espécies binucleares para o complexo **1**, todas coordenadas por pontes μ -OH ou μ -MeO em pH 6,0.

A proposta é que o substrato inicialmente se coordene aos centros binucleares e com o auxílio das pontes μ -OH é desprotonado e a transferência de elétrons ocorra, formando como produto principal o 3,5-dtbq. A etapa de transferência de elétrons é a etapa lenta da reação, portanto a etapa determinante. Após essa etapa, os dois centros de cobre(I) são oxidados pelo oxigênio presente no próprio meio reacional, formando H_2O_2 e completando o ciclo catalítico.

Na literatura propõe-se também a formação de um intermediário no qual o oxigênio encontra-se coordenado como ponte μ - $\eta^2:\eta^2$ entre os centros de cobre em complexos binucleares, porém esta espécie é instável, detectada a baixas temperaturas (Solomon, Sarangi *et al.*, 2007) e não pode ser confirmado neste trabalho.

No caso do complexo **2**, a presença do braço contendo a amina protonada deva auxiliar de alguma forma na aproximação do substrato, devido a diferença no valor da constante de associação (K_{ass}) entre os dois complexos. Porém ainda é necessário uma investigação mais profunda para podermos comprovar algum efeito de estabilização promovido pela segunda esfera de coordenação.

4.3. Síntese e Caracterização dos Materiais ó SiO_2

Após averiguarmos o potencial de catálise dos complexos **1** e **2** em solução, o próximo objetivo será testá-los como possíveis catalisadores heterogêneos suportados em sílica amorfa, SiO_2 . Nesta etapa, o complexo **1** foi então suportado em sílica de maneira eletrostática e o complexo **2**, foi modificado intensionalmente com a etilenodiamina, com o objetivo de suportá-lo de maneira covalente na superfície da sílica.

O complexo **1** foi suportado em sílica gel partindo-se de uma relação 2:1 complexo/ SiO_2 em massa, em meio de CH_3CN (seca) por 24h de agitação à 25 °C. O complexo **2** foi imobilizado em sílica modificada ($SiO_2/SOCl_2$) previamente com $SOCl_2$. A proporção utilizada e as condições foram as mesmas utilizadas para o complexo **1**, apenas uma pequena quantidade de DIPEA foi adicionada para auxiliar na ligação nucleofílica da amina primária à sílica modificada (Si-Cl).

Após 24h de agitação, o excesso de catalisador foi removido com o auxílio de extrator soxhlet. A quantidade de cobre presente na

sílica foi analisada por absorção atômica (AAAC) e este valor foi extrapolado para concentração de complexo. Foram encontrados os seguintes valores de concentração: $[1\text{-SiO}_2] = 1,66 \times 10^{-5} \text{ mol g}^{-1}$ de SiO_2 e $[2\text{-SiO}_2] = 1,80 \times 10^{-4} \text{ mol g}^{-1}$ de SiO_2 .

A diferença entre as concentrações dos dois complexos na sílica, $[2\text{-SiO}_2]/[1\text{-SiO}_2] \sim 11$ vezes, reflete a vantagem de ligar covalentemente do complexo **2** à superfície do suporte. Um estudo de adsorção foi realizado para o complexo **1** para argumentarmos a respeito dessa diferença.

Os novos catalisadores, **1-SiO₂** e **2-SiO₂**, foram caracterizados por espectroscopia no IV, TGA e EPR.

4.3.1. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho ó 1-SiO₂ e 2-SiO₂

Todos os materiais amorfos (SiO_2 , $\text{SiO}_2/\text{SOCl}_2$, **1-SiO₂** e **2-SiO₂**) foram analisados por espectroscopia no IV. No infravermelho da sílica amorfa podemos observar uma banda alargada em 3452 cm^{-1} , atribuída como sendo $\nu(\text{O-H})$ do grupo silanol e da água adsorvida. A presença de água também pode ser confirmada pela deformação angular da ligação O-H, $\delta(\text{O-H})$, em 1658 cm^{-1} . Duas bandas em 1093 e 800 cm^{-1} são referentes ao estiramento $\nu(\text{Si-O-Si})$ da ponte siloxano. O ombro em $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ é referente ao estiramento da ligação Si-OH (Fabio Gorzoni Doro, 2007; Kai Sheng, 2010).

Na Figura 32 são apresentados os espectros de infravermelho dos complexos **1** (adsorvido fisicamente) e do complexo **2** (ancorado covalentemente) à sílica amorfa.

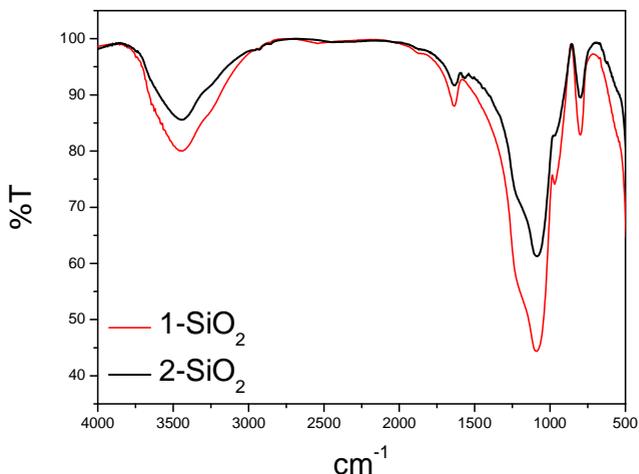


Figura 32. Comparativo de espectros de infravermelho (KBr, cm^{-1}), dos complexos imobilizados **1-SiO₂** (em vermelho) e **2-SiO₂** (preto).

Os espectros de infravermelho são idênticos ao espectro da sílica sem modificação. Mesmo no caso da modificação da sílica gel com SOCl_2 não houve modificação aparente no espectro. Isto pode ser justificado pela pouca quantidade de complexo imobilizada na sílica, tanto de forma covalente ($[\mathbf{2-SiO}_2] = 1,80 \times 10^{-4} \text{ mol g}^{-1}$), quanto eletrostaticamente ($[\mathbf{1-SiO}_2] = 1,66 \times 10^{-5} \text{ mol g}^{-1}$). Grigoropoulou *et al.* (Grigoropoulou, Christoforidis *et al.*, 2007) descreveram recentemente a inserção de um ligante orgânico à aminopropil-SiO₂ pela condensação com tiazol-2-carbaldeído. Os autores utilizaram diferentes concentrações do aldeído, que foi calculado dentro de uma faixa de 0,02 ó 1,44 mmol g^{-1} de SiO₂. A formação do ligante foi confirmada por infravermelho, porem as bandas referentes ao complexo, como $\nu(\text{C}=\text{C})$ e $\nu(\text{C}=\text{N})$, estão sobrepostas com as bandas do suporte e são fracamente distinguíveis.

Neste trabalho, a principal análise utilizada para quantificar o ancoramento de ambos os complexos na sílica foi Absorção Atômica com Atomização por Chama (AAAC). Outras análises como espectroscopia Raman Ressonante e XPS podem ser muito úteis na análise de materiais como a própria sílica amorfa (Kai Hofena, 2011).

4.3.2. Ressonância Paramagnética Eletrônica

A Ressonância Paramagnética Eletrônica é um ramo da espectroscopia na qual a radiação é absorvida por moléculas, íons ou átomos possuindo elétrons desemparelhados. Os complexos de Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{3+} e VO^{2+} são os centros paramagnéticos mais comuns que encontramos na literatura. Complexos de Cu^{2+} normalmente encontram-se coordenados por cinco ou seis ligantes em sistemas distorcidos com uma ou duas ligações mais alongadas (eixo z) que as outras quatro restantes com o elétron desemparelhado no orbital $d_{x^2-y^2}$ (geometria octaédrica distorcida ou pirâmide de base quadrada). Nos casos de simetria axial, obtêm-se os valores de g_{\perp} ($g_x = g_y$) e g_{\parallel} . O valor de g_{\parallel} diminui com a intensidade do campo ligante equatorial e fornece informações a respeito da força de interação e do tipo de átomo coordenado ao centro metálico de cobre(II).

No caso do complexo **1**, publicado por Massoud *et al.* (Massoud, Louka *et al.*, 2011), observa-se que os dois centros de cobre encontram-se acoplados antiferromagneticamente por intermédio das pontes do tipo $\mu\text{-OH}$, portanto esperava-se EPR silencioso ($S = 0$) à 77 K. Os autores obtiveram espectro de EPR como previsto (conforme descrito pelos autores) contendo impurezas paramagnéticas.

Neste trabalho, um espectro similar foi obtido para o complexo **1** (estado sólido à 77 K e 298 K) contendo também impurezas paramagnéticas da mesma forma (Figura S5 ó Anexos). Para o complexo **2**, o espectro de EPR apresentou características um pouco distintas (Figura S5 ó Anexos). Embora os complexos **1** e **2** sejam muito similares estruturalmente, observando-se o mesmo arranjo estrutural (e espectroscopia no UV-Vis compatível) esperava-se que o complexo **2** também fosse silencioso à 77 K, o que não foi verificado. Os valores de g obtidos foram $g_{\parallel} = 2,23$ e $g_{\perp} = 2,06$, comuns para complexos de cobre(II) com geometria octaédrica distorcida, embora o fato desses valores terem sido encontrados em complexos coordenados por pontes do tipo $\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})_2\text{Cu}^{\text{II}}$ seja muito difícil de ser justificado.

Quanto aos complexos imobilizados em SiO_2 , ambos os espectros de EPR apresentam simetria axial com $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2,0$, típicos de complexos de cobre(II) com geometria tetragonalmente distorcida (Mangrich, 1998). Os complexos suportados **1-SiO₂** e **2-SiO₂** apresentam espectro com quatro linhas bem definidas na região de g igual a 2 ($\Delta M_s = \pm 1$) com $g_{\parallel} = 2,26$ e $g_{\perp} = 2,08$ para **1-SiO₂** e $g_{\parallel} = 2,26$ e $g_{\perp} = 2,06$ para **2-SiO₂**. Também não é possível observar transição

proibida, $\Delta Ms = \pm 2$, em nenhum dos sólidos. Isso pode indicar que os complexos estão imobilizados na sílica sem a presença de pontes do tipo $\mu\text{-OH}$ entre os centros de cobre(II). Medidas magnéticas dos dois sólidos, bem como as simulações dos espectros de EPR serão necessárias para maiores esclarecimentos quanto à geometria dos centros de cobre nos suportes sólidos. Mudanças bruscas de geometria geralmente não são observadas em complexos imobilizados (Bizeto, Alves *et al.*, 2006; Piovezan, Jovito *et al.*, 2010; Fang, Lin *et al.*, 2011). Os espectros dos complexos suportados **1**-SiO₂ e **2**-SiO₂ (77 K e a 298 K - Banda X) podem ser observados na Figura 33. Os espectros dos complexos **1** e **2** encontram-se nos Anexos.

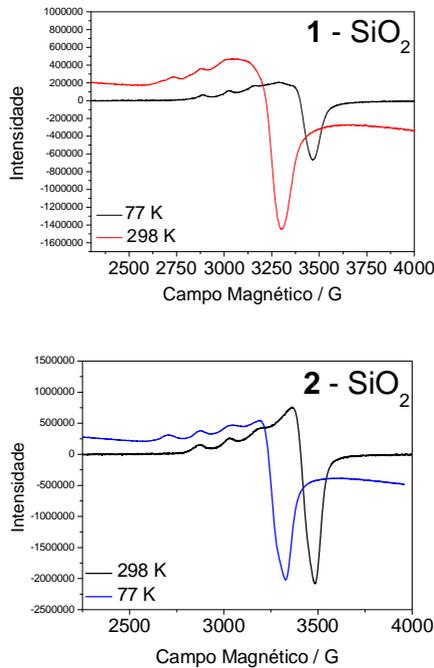


Figura 33. Espectros de EPR no estado sólido dos complexos suportados **1**-SiO₂ e **2**-SiO₂ a 77 e 298 K.

4.3.3. Experimentos de Adsorção

Com o objetivo caracterizar o tipo de processo de adsorção (físico ou químico) do complexo **1** com a sílica gel, a quantidade máxima de complexo na interface do suporte e a constante de equilíbrio de adsorção, uma análise do equilíbrio de adsorção foi realizada utilizando três modelos de isotermas: Langmuir, Freundlich e Dubinin-Hadushkevich.

Na Figura 34 estão apresentados os resultados obtidos do ajuste dos dados segundo os três modelos de isoterma citados acima e na Tabela 8 são apresentadas as constantes obtidas.

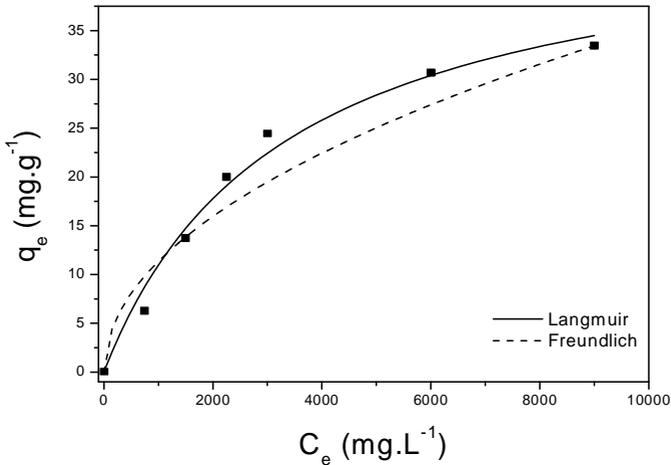


Figura 34. Isoterma de equilíbrio de adsorção avaliada segundo os modelos de Langmuir, Freundlich e Dubinin-Hadushkevich (D-R). Volume = 10 mL; [1] = 750 ó 9000 mg L⁻¹; $m_{\text{adsorvente}} = 30$ mg; $t = 25$ °C; freqüência de agitação = 50 rpm.

Uma variedade de complexos tem sido ancorados à superfície de partículas sólidas, como é o caso da sílica (Fabio Gorzoni Doro, 2007; Grigoropoulou, Christoforidis *et al.*, 2007; Zois, 2007). Catalisadores homogêneos são freqüentemente anexados ao suporte sólido por interação de contra-íons espectadores com o suporte funcionalizado (Wiench, Michon *et al.*, 2009), interação com o suporte por ligações de hidrogênio (Bianchini, Burnaby *et al.*, 1999), formação de imina (Piovezan, Jovito *et al.*, 2010; Piovezan, Silva *et al.*, 2012), entre outros.

A utilização de complexos biomiméticos suportados em sílica gel, sem prévia modificação da superfície, para a hidrólise de ésteres de fosfato (Piovezan, Jovito *et al.*, 2010) ou epoxidação de alcenos (Piovezan, De Castro *et al.*, 2005) foi recentemente demonstrado.

Embora existam diversas publicações de complexos de vários metais de transição ancorados em suportes sólidos, pouquíssimo é explorado com relação ao equilíbrio de adsorção destes sistemas.

Tabela 8. Valores obtidos a partir das isotermas de Langmuir, Freundlich e Dubinin-Hadushkevich (D-R).

Modelo*	Parâmetros	Valores
Langmuir	q_m (mg g ⁻¹)	44,05 ± 3,63
	K_L (L mg ⁻¹)	3,0 x 10 ⁻⁴ ± 0,6 x 10 ⁻⁴
	R^2	0,98
Freundlich	K_F (mg g ⁻¹)	0,38 ± 0,25
	N	2,03
	R^2	0,95
D-R**	q_m (mol g ⁻¹)	9,82 x 10 ⁻⁸ ± 1,18 x 10 ⁻¹⁰
	κ (mol ² kJ ⁻²)	-1,99 x 10 ⁻⁷ ± 6,29 x 10 ⁻⁸
	R^2	0,98

* Todos os modelos foram ajustados com o programa *OriginPro 7.5* a partir de cada uma das respectivas equações de forma não linear.** Os parâmetros da isoterma de D-R foram obtidos a partir do gráfico de mol L⁻¹ vs. mol g⁻¹.

A isoterma de Langmuir assume que a adsorção ocorre de forma homogênea (em sítios homogêneos) e as forças intermoleculares diminuindo rapidamente com a distância da superfície de adsorção. A isoterma de Freundlich é um modelo adequado para superfícies heterogêneas no qual a adsorção ocorre em multicamadas.

De acordo com a Tabela 8, podemos observar que dentre os três modelos utilizados, os dados se ajustam de forma mais adequada nas isotermas de Langmuir e D-R ($R^2 = 0,98$), ou seja, que a adsorção do complexo **1** deva ocorrer em sítios energeticamente idênticos e estruturalmente homogêneos (Ünlü, 2006; Gübbük, 2008).

Embora seja difícil de obtermos uma comparação direta dos valores de K_L e q_m , obtidos para o complexo **1**, em comparação à

adsorção de íons Cu^{2+} em outros suportes heterogêneos, nota-se que estes parâmetros são nitidamente menores (Gübbük, 2008).

Um dos fatores que podem estar relacionados para justificar o baixo valor para constante de equilíbrio K_L pode ser relacionado ao efeito Jahn-Teller. De acordo com os estudos de EPR, tanto para os complexos ancorados **1**- SiO_2 quanto para o **2**- SiO_2 , os dois espectros são axiais, $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2$, o que mostra que os centros de Cu^{II} mantêm a distorção tetragonal após a adsorção, embora devam haver modificações na geometria dos complexos, inclusive a ausência de pontes $\mu\text{-OH}$ entre os complexos

A isoterma de D-R também pode ser útil para descrever o mecanismo de adsorção. A partir da constante de D-R (κ) é possível calcular a energia livre de adsorção E (kJ mol^{-1}). Do valor de κ , podemos obter o valor de E a partir da equação:

$$E = \frac{1}{\sqrt{-2\kappa}}$$

O valor E é utilizado para verificar a natureza do processo de adsorção. Se o valor calculado estiver entre 8 e 16 kJ mol^{-1} , o processo de adsorção pode ser caracterizado como sendo de natureza química. Caso os valores sejam menores do que 8 kJ mol^{-1} o processo pode ser indicado como sendo de natureza física (Ünlü, 2006; Laus, Costa *et al.*, 2010).

No caso da adsorção do complexo **1** em sílica gel amorfa o valor encontrado foi 1,585 kJ mol^{-1} , caracterizando processo de adsorção de natureza física, o que concorda com os outros parâmetros obtidos a partir das isotermas.

4.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica é uma ferramenta importante na avaliação da morfologia de polímeros, micropartículas e nos mais diversos tipos de materiais híbridos.

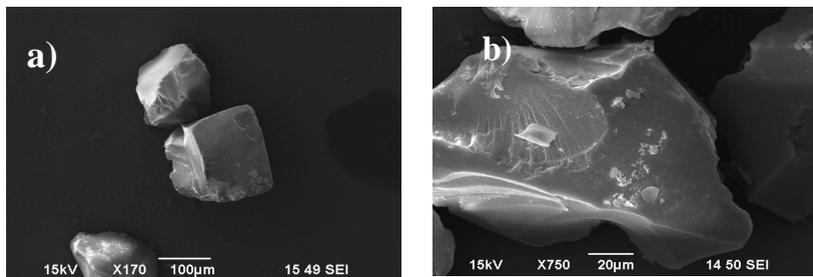


Figura 35. Análises de microscopia (MEV) dos suportes: **a)** SiO_2 -gel sem presença de catalisador; **b)** Sílica ancorada com o complexo, **1**- SiO_2 .

Nas imagens obtidas da sílica gel e da sílica gel após adsorção do complexo **1** (Figura 35) podemos observar grânulos pequenos e lisos, característicos da sílica gel (Idrees, Silva *et al.*, 2012) em ambas amostras, indicando que não houve modificação na superfície da sílica após a imobilização do complexo.

4.3.5. Catálise Heterogênea

Devido a excelente estabilidade térmica e química, e baixa citotoxicidade, e outras características como a boa acessibilidade do substrato à superfície do suporte e grande área superficial, a superfície da sílica tem sido utilizada com grande êxito como suporte de catalisadores biomiméticos para diversos tipos de reações como, por exemplo, reações de hidrólise, clivagem de DNA, oxidação entre outros (Piovezan, Jovito *et al.*, 2010).

Complexos bioinspirados também tem sido utilizados para reações de oxidação, inclusive com o substrato 3,5-dtbc. Uma grande parte dos sistemas catalíticos utilizados para a oxidação deste substrato, utilizam a adição de metais *in situ* no próprio meio reacional, junto com a sílica derivatizada.

O efeito catalítico destes sistemas normalmente é acompanhado em termos de percentual de conversão da concentração do substrato para a sua respectiva quinona. Muito das modificações na superfície da sílica visam apenas à modificação de sua superfície com ligantes monucleantes, que por sua vez não são tão eficazes quanto complexos binucleares, muito mais parecidos com o sítio ativo da catecol oxidase.

Para avaliar o efeito dos catalisadores **1** e **2** imobilizados à superfície da sílica, utilizou-se meio e o pH cinético ótimos de cada complexo, já testados para as reações em meio homogêneo. Os dois

suportes, caracterizados acima, **1-SiO₂** e **2-SiO₂** foram a fim de conseguirmos obter os parâmetros cinéticos para cada catalisador. É bom resaltar aqui, que a obtenção de parâmetros cinéticos são raros para reações de oxidação do 3,5-dtbc em meio heterogêneo.

No caso do **1-SiO₂**, os parâmetros cinéticos não serão apresentados aqui, pois o catalisador apresentou alto grau de lixiviação, sendo assim, a confiabilidade dos dados ficou comprometida. No caso do catalisador **2-SiO₂**, o tratamento cinético foi feito com base no modelo mecanístico de Michaelis-Menten. O gráfico de k_{obs} em função da concentração do substrato (Figura 36) foi tratado também por métodos não lineares utilizando o programa *OriginPro 7.5*. O efeito da concentração do substrato foi acompanhado em pH 6,5, de acordo com o estudo prévio.

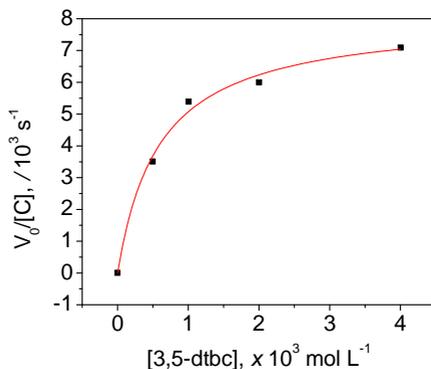


Figura 36. Dependência da velocidade da reação de oxidação em função da concentração do substrato 3,5-dtbc pelo catalisador **2-SiO₂** nas seguintes condições experimentais: solução H₂O/MeOH 50:50 v/v, m = 2,0 mg ± 0,5, [**2-SiO₂**] = 1,80 x 10⁻⁴ mol g⁻¹ de SiO₂, [3,5-dtbc] = (0,5 - 4,0) x 10⁻³ mol L⁻¹, [T] = 0,1 mol L⁻¹ (MES pH 6,5) à 25 °C.

Consideramos presumidamente a espécie $[L^{en}Cu^{II}(\mu-OH)Cu^{II}]^{3+}$ como a espécie ativa, mesmo que o EPR não concorde com a manutenção da ponte $\mu-OH$ quando o complexo é ancorado na sílica.

Os parâmetros cinéticos obtidos como, por exemplo, a constante de associação, suporta a idéia de catálise promovida por complexo binuclear.

Os parâmetros cinéticos obtidos foram os seguintes: $k_{\text{cat}} = 8,09 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $K_M = 6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $K_{\text{ass}} = 2,5 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_M = 13,5 \text{ L s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/k_{\text{non}} = 4,84 \times 10^5$.

O catalisador **2**-SiO₂ apresentou eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) é muito inferior à observada, tanto para **1**, quanto para **2** em meio homogêneo, por apresentar um valor mais baixo de k_{cat} . Um dado interessante foi o valor para constante de associação, K_{ass} . O complexo **2**, ancorado em sílica gel, apresenta uma associação quatro vezes maior em relação ao complexo **1** ($K_{ass} = 625,0 \text{ L mol}^{-1}$).

Em geral não é incomum encontrarmos um valor maior para a constante de associação na comparação direta entre complexos biomiméticos ancorados em suporte e em solução. Modificações existentes na superfície da sílica podem contribuir com a afinidade do substrato, por exemplo, pela presença de ligações de hidrogênio com o objetivo de auxiliar na aproximação e estabilização do substrato (Piovezan, Silva *et al.*, 2012). Porém, mesmo sem modificações é possível haver maior associação com o substrato mesmo utilizando sílica gel convencional (Piovezan, Jovito *et al.*, 2010).

Por fim, em experimentos realizados na presença de excesso de substrato, o catalisador híbrido **2**-SiO₂ converteu para quinona aproximadamente 38% da concentração inicial do substrato em 14 horas, o que representa um total de 35 *turnovers*.

Mesmo apresentando eficiência catalítica inferior à observada em meio homogêneo, a vantagem deste catalisador em relação a outros complexos imobilizados publicados na literatura é a oxidação do 3,5-dtbc sem a necessidade da utilização de base ou peróxido de hidrogênio como aditivos no meio reacional (Bizeto, Alves *et al.*, 2006; Grigoropoulou, Christoforidis *et al.*, 2007; Zois, 2007).

4.4. Síntese e Caracterização dos Materiais ó Fe₃O₄, poli(dopamina) e Fe₃O₄@poli(dopamina)

Tendo em vista as condições e os parâmetros cinéticos para a oxidação do substrato 3,5-dtbc avaliadas para os complexos **1** e **2**. O complexo **1**, que possui a maior constante catalítica (k_{cat}), foi escolhido para testes em reações de oxidação da dopamina com subsequente formação da poli(dopamina).

Recentemente descobriu-se que a poli(dopamina) forma nanoesferas espontaneamente em solução aquosa com pH elevado à 50 °C. Esta síntese publicada por Ju e colaboradores forma estas nanopartículas em 5 horas de agitação (Ju, Lee *et al.*, 2011). Existe um grande interesse na aceleração desta reação por sua ampla aplicação em sensores, nanomateriais para aplicações biomédicas (Xie, Chen *et al.*,

2008), e seu uso no recobrimento de nanopartículas (Postma, Yan *et al.*, 2009).

Na literatura atual são muito raros os complexos publicados com o objetivo de auxiliar no estudo do mecanismo de formação da poli(dopamina). Em uma primeira tentativa, testamos se o complexo **1** seria capaz de oxidar a dopamina para poli(dopamina) em presença de oxigênio nas mesmas condições ótimas de oxidação do 3,5-dtbc.

A figura 37 mostra a evolução da reação de oxidação da dopamina acompanhada durante 20 minutos. A banda em 609 nm é característica de transferência de carga $\pi^* \rightarrow \pi$ de radicais de catecolatos ou semiquinonas (Barreto, 2010).

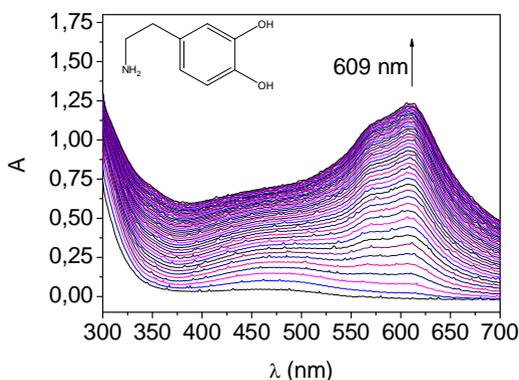


Figura 37. Acompanhamento espectral da reação de oxidação da dopamina. Condições: meio MeOH/H₂O 50:50 v/v, [T] = 0,1 mol L⁻¹ (MES pH 6,0), [1] = 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹, [dopamina] = 1,0 x 10⁻² à 25 °C por 20 minutos.

A síntese da poli(dopamina) quando realizada em meio oxidativo e leva muitos dias para a formação de uma quantidade significativa do produto. A reação acima foi avaliada nas mesmas condições utilizando-se solução de perclorato de cobre e não houve formação do produto.

Um dos poucos exemplos de biomimético capaz de oxidar a dopamina foi publicado recentemente por Natalio e colaboradores, utilizando-se nanofios de V₂O₅ em presença de H₂O₂ e KI (Natalio, Andre *et al.*, 2011).

A reação de oxidação da dopamina foi monitorada inicialmente por espectrofotometria e posteriormente foi realizada uma síntese em maior escala para caracterização do produto.

A seguir serão apresentados detalhes da caracterização por IV, TGA, espectrometria de massas (ESI-MS) e MET do produto da oxidação da dopamina e de que maneira a poli(dopamina) pode ser utilizada para o recobrimento *in situ* de nanopartículas de óxido de ferro, Fe₃O₄.

As nanopartículas de óxido de ferro foram caracterizadas antes e depois do recobrimento com a poli(dopamina). As nanopartículas recobertas foram caracterizadas por IV, TGA e MET e os resultados destas análises serão apresentados a seguir.

A poli(dopamina) é mais frequentemente caracterizada por técnicas em estado sólido, como por exemplo, os diversos tipos de microscopia (Da Silva, 2004), RMN ¹H e RMN ¹³C de estado sólido (Dreyer, Miller *et al.*, 2012; Hong, Na *et al.*, 2012), técnicas de espectrometria de massa (MALDI-MS e ESI-MS) (Hong, Na *et al.*, 2012; Reale, Crucianelli *et al.*, 2012), métodos térmicos (TGA, DSC) (Shanmuganathan, Cho *et al.*, 2011) e espectroscopia no IV (Moses, 2006; Natalio, Andre *et al.*, 2011).

Neste trabalho a poli(dopamina) sintetizada mostrou-se muito pouco solúvel em água, mesmo abaixo de pH 2 ou acima de pH 12. Na tentativa de espectroscopia de RMN ¹H em LiOD da poli(dopamina) recém sintetizada, não foi possível observar nenhum sinal referente ao polímero no espectro obtido.

4.4.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As nanopartículas de ferro ônuasö (sem recobrimento) foram sintetizadas pelo método de co-precipitação para posterior aplicação como suporte para o recobrimento da poli(dopamina) *in situ*, na presença do complexo **1**. Inicialmente as nanopartículas ônuasö foram caracterizadas por microscopia vibracional no IV e por TEM para posterior comparativo com as nanopartículas recobertas, Fe₃O₄. As micrografias obtidas demonstram que o método de síntese utilizado foi adequado para produzir nanopartículas monodispersas. As nanopartículas apresentaram diâmetro médio de $6,67 \pm 1,82$ nm, tamanho adequado para aplicações em catálise e aplicações terapêuticas (Jun, Lee *et al.*, 2008).

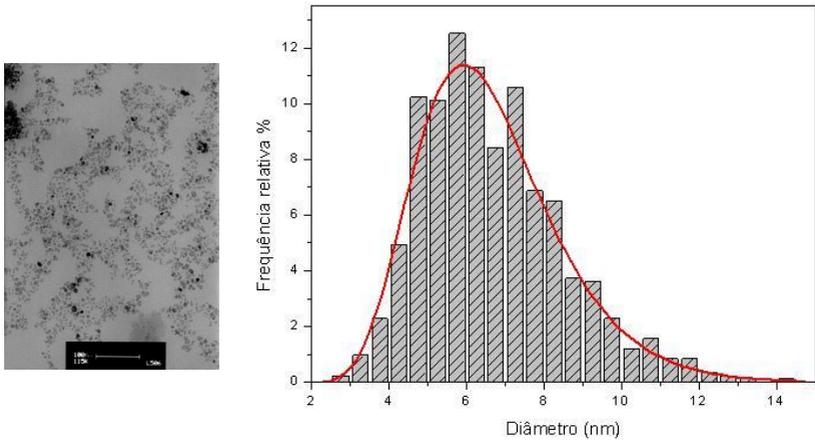


Figura 38. Micrografia obtida por MET das nanopartículas de ferro sintetizadas pelo método de co-precipitação. À direita, o histograma de distribuição de tamanho ajustado a uma função log-normal para as nanopartículas de Fe_3O_4 .

4.4.2. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho

A espectroscopia no IV foi uma das técnicas utilizadas para a caracterização da poli(dopamina), das nanopartículas de ferro ônuasô (Fe_3O_4) e das nanopartículas de ferro recobertas pela polidopamina, Fe_3O_4 @poli(dopamina) podem ser observadas na Figura 39.

O espectro de IV da poli(dopamina) sintetizada é similar aos espectros de outras melaninas sintéticas publicadas recentemente (Natalio, Andre *et al.*, 2011; Dreyer, Miller *et al.*, 2012). A Tabela 9 apresenta as principais e respectivas atribuições.

As bandas entre 3440 a 3381 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento axial da ligação O-H, o que confirma a presença de água e dos fenóis. Bandas referentes à deformação axial de C-H alifáticos 2950 ó 2841 cm^{-1} e à deformação axial da ligação C-O de fenol são comuns nos compostos comparados (Tabela 9), com exceção das nanopartículas recobertas (Fe_3O_4 @poli(dopamina) (Moses, 2006; Natalio, Andre *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos mostram que a poli(dopamina) sintetizada neste trabalho é relativamente similar a outras melaninas sintetizadas recentemente, utilizando-se o método tradicional, sem a presença de catalisador (Ju, Lee *et al.*, 2011).

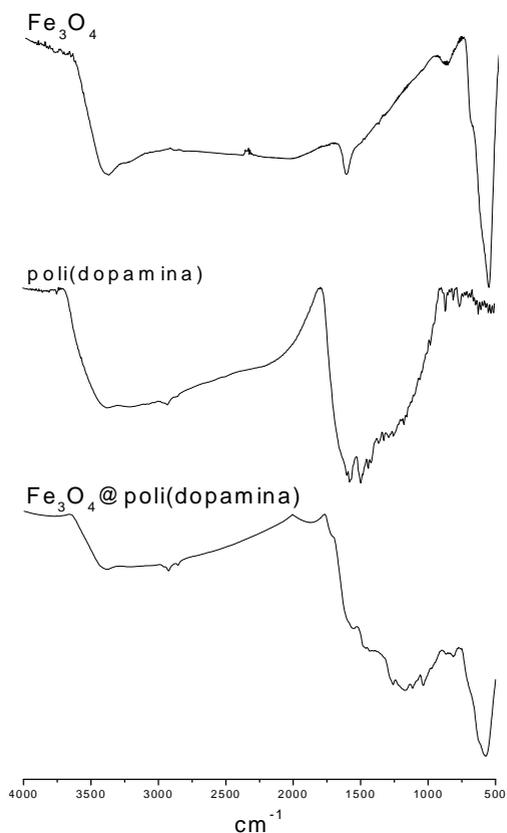


Figura 39. Comparativo de espectros de infravermelho (KBr, cm^{-1}), de cima para baixo: Fe_3O_4 , poli(dopamina) e Fe_3O_4 @poli(dopamina).

As nanopartículas recobertas exibem bandas correspondentes às da melanina sintetizada (utilizando-se o complexo **1** como catalisador) e as bandas também presentes nas nanopartículas $\delta(\text{O-H})_{\text{água}}$ 3410, $\delta(\text{O-H})_{\text{água}}$ 1623 e $\nu(\text{Fe-O})$ 567 cm^{-1} , o que também concorda com o espectro de outras nanopartículas de ferro sintetizadas por métodos distintos (Xu, Qin *et al.*, 2011).

Tabela 9. Principais bandas (cm^{-1}) e atribuições dos espectros na região do infravermelho para diferentes melaninas naturais e poli(dopaminas)/melaninas sintéticas.

Atrib.	poli(dopamina)	Fe_3O_4 @poli (dopamina)	melanina sintética [§]	melanina extraída de <i>Glycera</i> <i>dibranchiata</i> [¶]
$\nu(\text{O-H})$	3391	3414	3440	3400
$\nu(\Lambda\epsilon\epsilon\alpha)$	2941 - 2841	2918 - 2849	2923 - 2853	2950
$\nu(\text{C=C})$	-	-	1610	1600 ó 1650
$\delta(\text{N-H})$	1582	1566	-	-
$\nu(\text{C-O})$	1282	1276	-	1260
$\delta(\text{O-H})$	1361	-	1383	1380 ó 1400
$\nu(\text{C-H}_{\text{Ar}})$	1169	1177	-	-
$\nu(\text{Fe-O})$	-	567	-	-

[§](Natalio, Andre *et al.*, 2011); [¶](Moses, 2006).

4.4.3. Espectrometria de Massas

O experimento de catálise de oxidação da poli(dopamina) mediada pelo complexo **1** foram realizados nas mesmas condições ótimas utilizadas nos experimentos de cinética homogênea para o substrato 3,5-dtbc: meio $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 50:50 (v/v) saturado de $\text{O}_{2(g)}$, pH 6,0 (ajustado com soluções concentradas de LiOH e HCl) e temperatura de 25°C . O complexo foi utilizado em concentrações catalíticas (1% em relação à concentração de dopamina) e a reação foi acompanhada utilizando-se a técnica de espectrometria de massas (ESI-MS) e a versão acoplada ESI(+)-MS/MS, ambas no modo positivo.

O mecanismo de polimerização oxidativo pelo qual a melanina natural é formada é muito complexo e mesmo com as diversas técnicas de caracterizações disponíveis, não há um consenso na comunidade

científica sobre a estrutura exata deste biopolímero (Dreyer, Miller *et al.*, 2012; Hong, Na *et al.*, 2012).

O espectro de massa obtido após 15 minutos do início da reação (Figura 40) apresenta três picos principais: m/z 436,87, m/z 452,88 e m/z 568,58. A relação direta destes picos com o monômero, 5,6-dihidroxiindol (DHI), considerando-se como peso molecular médio 149,15 Da (Reale, Crucianelli *et al.*, 2012), foi muito pouco informativa e de difícil correlação. A técnica de ionização utilizada, *electrospray*, não produziu um padrão de fragmentação como o observado utilizando a técnica de MALDI-TOF como método de caracterização (Reale, Crucianelli *et al.*, 2012).

Uma análise mais detalhada por ESI(+)-MS/MS dos fragmentos do íon m/z 568,58 foi mais elucidativa. A fragmentação deste íon pai produziu três novos íons, m/z 295,1, m/z 397,4 e m/z 415,1.

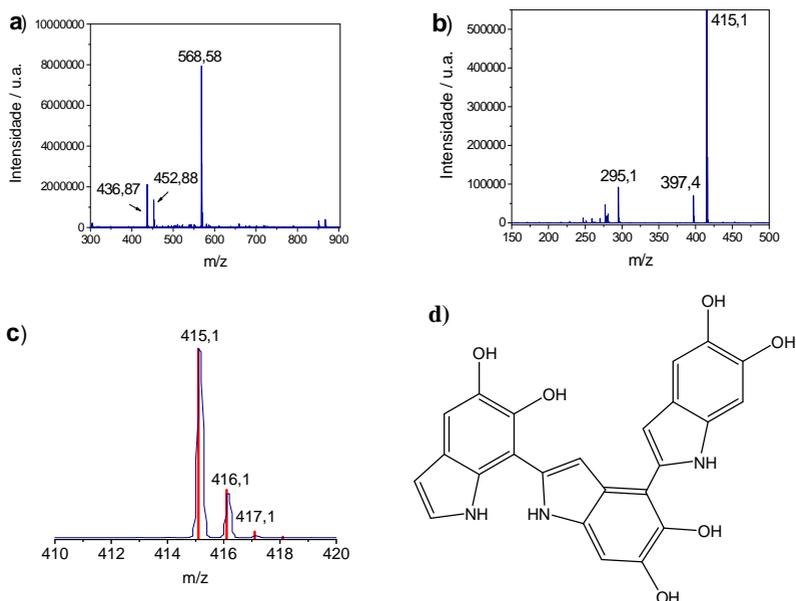


Figura 40. a) Espectro de massas da reação de oxidação da dopamina catalisada (1% mol) pelo complexo **1** em presença de $O_{2(g)}$, após 15 min de reação em pH 6,0; b) ESI(+)-MS/MS do íon m/z 568,58; c) Espectro de massas do fragmento m/z 415,1 ($C_{24}H_{17}N_3O_6 - CO$) ampliado (azul) e seu espectro simulado (vermelho); d) Estrutura do oligômero intacto.

A partir da análise do padrão isotópico do íon m/z 415,1 foi tentativamente atribuído como sendo um pequeno oligômero formado por três unidades de DHI com a perda de 28 Da $[(C_{24}H_{17}N_3O_6) - 28]$, referenete a perda de CO.

4.4.4. Análise Termogravimétrica

Embora muitas aplicações das propriedades físicas e químicas das melaninas naturais e sintéticas vêm sendo difundidas como, por exemplo, suas propriedades ópticas e magnéticas (Meredith, 2006), muito pouco foi acrescentado no que diz respeito às propriedades térmicas ou dos mecanismos de degradação destes polímeros.

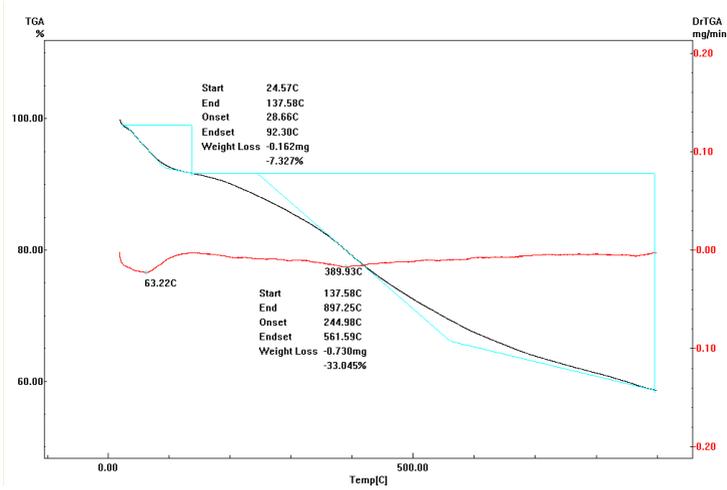
Recentemente Shanmuganathan e colaboradores (Shanmuganathan, Cho *et al.*, 2011) publicaram um estudo onde o acréscimo de pequenas quantidades de melanina (0,5 ó 5,0%, m/m) a blendas de poli(metilmetacrilato), PMMA, aumentaram consideravelmente a estabilidade termooxidativa do polímero em até 90 °C.

A análise térmica da poli(dopamina) sintetizada neste trabalho utilizando-se o complexo $[L^ClCu(\mu-OH)_2Cu](ClO_4)_2$ (**1**) como catalisador (5,0 % mol) e dopamina como substrato assemelha-se de forma significativa a síntese de poli(L-DOPA) produzida pelo método descrito por Deziderio e colaboradores (Dezidério, 2004) (L-DOPA em DMSO e peróxido de benzoila por 28 dias).

Observa-se que mesmo sendo polímeros oriundos e materiais de partida diferentes, 2-(3,4-dihidroxifenil)etilamina (dopamina) e L-3,4-dihidroxifenil-alanina (L-DOPA), a existência de ácidos carboxílicos na estrutura da poli(L-DOPA) não alteram suas propriedades térmicas de forma significativa.

Observa-se no termograma da poli(dopamina), (Figura 41 - a), pequena perda de massa, $\Delta m = 7,33\%$ (de ~25 até ~128 °C), que pode ser atribuída a perda de água, característica tipicamente conhecida destes compostos (Gonçalves, 2006). Um segundo estágio é observado de ~138 até 900 °C, com $\Delta m = 33,0\%$ ($T_m = 390$ °C), referente à degradação do polímero. Tanto a poli(dopamina) quanto a poli(L-DOPA), apresentam perda de massa, até 800 °C, relativamente próxima ($35\% < \Delta m < 40\%$) ao de outras melaninas como, por exemplo, a extraída da tinta de lula (*Sepia officinalis*) (Shanmuganathan, Cho *et al.*, 2011).

a)



b)

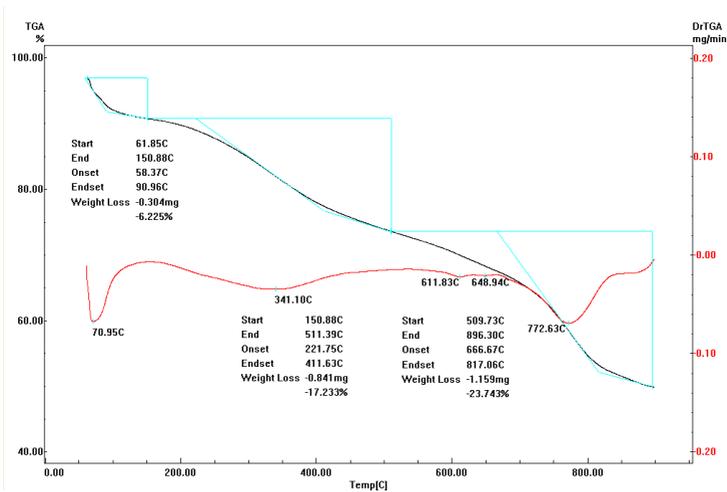


Figura 41. Curva de termogravimetria (TGA - preto) e sua respectiva derivada (DrTGA - vermelho): a) poli(dopamina) b) Nanopartículas de ferro recobertas com poli(dopamina), Fe_3O_4 @poli(dopamina).

O comportamento térmico das nanopartículas de ferro, Fe_3O_4 , sintetizadas a partir do método de co-precipitação, antes de depois da funcionalização com poli(dopamina) também foram avaliadas por métodos termogravimétricos. No termograma das nanopartículas ónuasõ (Figura S6 ó Anexos) observa-se dois pequenos estágios de perda de massa, 25 até 168 °C ($\Delta m = 1,13\%$) e de 168 até 370 °C ($\Delta m = 0,50\%$), que podem ser atribuídos a perda de pequena quantidade de água coordenadas à superfície do óxido de ferro, claramente identificados por infra-vermelho $1627 \text{ cm}^{-1} \delta(\text{O-H})$ (Xu, Qin *et al.*, 2011).

Também se observa que, a partir de 370 °C há um incomum acréscimo de massa. Segundo Hu *et al.* (Hu, Neoh *et al.*, 2006) esse aumento refere-se à mudança de fase cristalina de Fe_3O_4 para Fe_2O_3 .

O termograma das nanopartículas de Fe_3O_4 @poli(dopamina), Figura 41 - b), também apresenta inicialmente pequena porcentagem de perda de água ($\Delta m = 6,23\%$, de 62 °C até 151°C), porém um estágio a mais em comparação com a poli(dopamina) pura.

O segundo estágio apresenta uma temperatura de decomposição média, $T_m = 341 \text{ °C}$ ($\Delta m = 17,23\%$), um pouco distinta da poli(dopamina) pura e um terceiro estágio, de 510 até 893 °C ($\Delta m = 23,7\%$).

A existência de dois estágios distintos de perda de massa pode tentativamente ser atribuído a diferenças de estabilização térmica entre a camada de poli(dopamina) mais interna e próximo ao óxido, e portanto com temperatura de degradação superior (terceiro estágio) e a parte do polímero mais distante da superfície do metal, portanto com temperatura de degradação inferior (segundo estágio).

4.4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica é uma ferramenta importante na avaliação da morfologia de polímeros, micropartículas e nos mais diversos tipos de materiais híbridos. As análises da poli(dopamina) e das nanopartículas recobertas, Fe_3O_4 @poli(dopamina) foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Varredura e podem ser visualizadas na Figura 42.

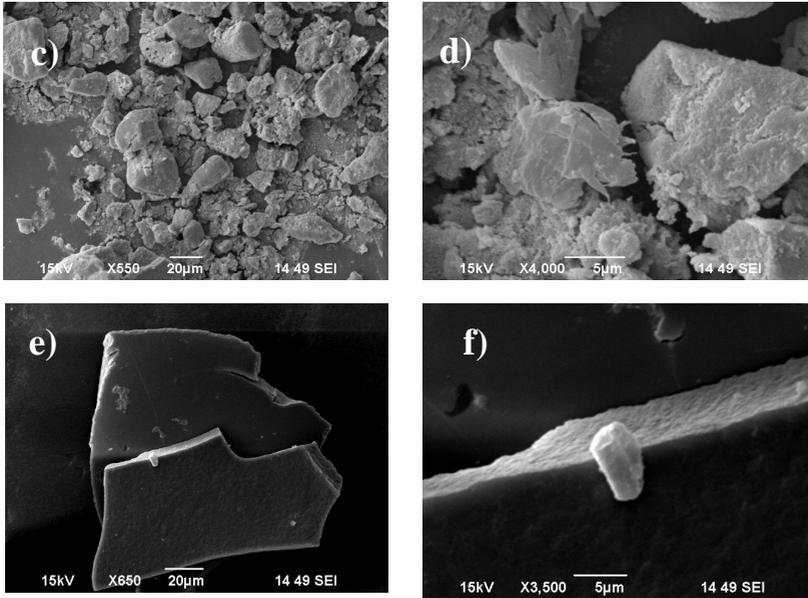


Figura 42. Análises de microscopia (MEV): **c)** e **d)** Formação da Poli(dopamina) após a reação com o complexo **1** em meio homogêneo com magnificação de 550 e 4000 X, respectivamente; **e)** e **f)** Nanopartículas de ferro (Fe_3O_4) após o recobrimento com poli(dopamina) em presença do complexo **1** com magnificação de 650 e 3500 X, respectivamente.

Com relação às imagens obtidas para a poli(dopamina), observamos que o polímero apresenta morfologia granular pouco definida. Os grânulos apresentam tamanho maior, embora irregular, diferente dos polímeros obtidos a partir da dopamina catalisadas por nanofios de V_2O_5 (Natalio, Andre *et al.*, 2011). Tanto na síntese da melanina catalisada com os nanofios, quanto na melanina extraída da tinta de lula (*Sepia officinalis*), observa que ambas são compostas de esferas com diâmetro variando entre 100 e 200 nm.

Há diferenças quanto à morfologia das nanopartículas de ferro recobertas por poli(dopamina), em relação à poli(dopamina) livre. No caso das nanopartículas recobertas, observa-se que o material é organizado em blocos compactos com distribuição relativamente regular. A grande diferença entre as duas sínteses é que, no caso da poli(dopamina) a associação entre os oligômeros pode ser feita a partir de ligações de hidrogênio e interações do tipo $\delta\pi$ - π stacking durante e

após o processo de síntese (Dreyer, Miller *et al.*, 2012). No caso das nanopartículas, o uso de ligantes contendo grupos catecóis e grupos ácidos (carboxilatos) para auxiliar no recobrimento da superfície é bastante conhecido (Shultz, Reveles *et al.*, 2007; Jun, Lee *et al.*, 2008).

É muito difícil de determinar o mecanismo de polimerização e a maneira com que o polímero se comporta com a presença das nanopartículas no meio reacional. Estudos complementares de Microscopia Eletrônica de Transmissão serão necessários para caracterizar a dispersividade dos nanocompósitos.

5. CONCLUSÕES

Ä Os dois ligantes L^{Cl} e L^{en} foram sintetizados e caracterizados obtendo-se bons rendimentos;

Ä A partir dos ligantes L^{Cl} e L^{en} foram sintetizados dois complexos, $[L^{Cl}Cu(\mu-OH)_2Cu^{II}](ClO_4)_2$ e $[HL^{en}Cu(\mu-OH)_2Cu^{II}(OH_2)_2](ClO_4)_3$, sendo inédito o complexo contendo o ligante L^{en} . Os complexos tiveram sua estrutura de raios X resolvida parcialmente e foram caracterizados por diversas técnicas espectroscópicas e eletroquímicas;

Ä Os complexos estudados estão coordenados de maneira similar e duas pontes $\mu-OH$. As caracterizações espectroscópicas suportam o que foi observado em estado sólido;

Ä A presença de pontes foi explorada por potenciometria apenas para o complexo **1**, fornecendo dois valores de pK_a , 5,03 e 6,03, para a desprotonação das moléculas de água;

Ä A espectroscopia de EPR mostrou que o complexo **1** é silencioso, diferente do complexo **2** e dos sólidos **1-SiO₂** e **2-SiO₂**, indicando que para estes catalisadores imobilizados, não há evidência de formação de ponte $\mu-OH$;

Ä Os estudos de adsorção mostraram que o complexo **1** é adsorvido na sílica de maneira física, o que justifica a diferença de concentração dos dois complexos nos suportes sólidos;

Ä A modificação prévia da sílica com $SOCl_2$ aumentou a imobilização do complexo **2** na sílica em aproximadamente onze vezes em relação ao complexo **1**;

Ä A partir dos dados espectroscópicos, eletroquímicos e dos parâmetros cinéticos, foi possível propor um mecanismo para a oxidação do substrato-modelo 3,5-dtbc pelos complexos **1** e **2**;

Ä O catalisador **2-SiO₂** foi testado para a oxidação substrato 3,5-dtbc e os parâmetros cinéticos obtidos são inéditos para um catalisador híbrido com este substrato;

Ä O complexo **1** foi testado também na oxidação da dopamina e esta reação foi acompanhada por espectroscopia UV-Vis e espectrometria de massas;

Ä O produto de oxidação da dopamina, poli(dopamina), foi caracterizado por IV, TGA e MEV e foi utilizado para o recobrimento de nanopartículas de óxido de ferro *in situ*;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, J. B., S.; MEYERA, F. Structure-activity correlations in highly preorganized dicopper catechol oxidase model systems. **Comptes Rendus Chimie**, v. 10, n. 4 - 5, p. 4216432, 2007.

ARMSTRONG, F. A.; HILL, H. A. O.; WALTON, N. J. Direct electrochemistry of redox proteins. **Accounts of Chemical Research**, v. 21, n. 11, p. 407-413, 1988.

BARANYAI, Z. *et al.* Equilibrium and NMR Relaxometric Studies on the s-Triazine-Based Heptadentate Ligand PTDITA Showing High Selectivity for Gd^{3+} . **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 2597-2607, 2012.

BARRETO, W. J. B., S. R. G.; SCARMINIO, I. S.; ISHIKAWA, D. N.; SOARES, M. F.; PROENÇA, M. V. B. Determination of Ni(II) in metal alloys by spectrophotometry UV-Vis using dopasemiquinone **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 109 - 113, 2010.

BEINERT, H. Bioinorganic Chemistry: A New Field or Discipline? Words, Meanings, and Reality. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 41, p. 37967637972, 2005.

BIANCHINI, C. *et al.* Preparation, Characterization, and Performance of Tripodal Polyphosphine Rhodium Catalysts Immobilized on Silica via Hydrogen Bonding. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 25, p. 5961-5971, 1999.

BLOTNY, G. Recent applications of 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine and its derivatives in organic synthesis. **Tetrahedron**, v. 62, n. 770, p. 9507-9522, 2006.

BISWAS, A. *et al.* Insertion of a Hydroxido Bridge into a Diphenoxido Dinuclear Copper(II) Complex: Drastic Change of the Magnetic Property from Strong Antiferromagnetic to Ferromagnetic and Enhancement in the Catecholase Activity. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 19, p. 10111-10121, 2012.

BIZETO, M. A. *et al.* Evaluation of Hexaniobate Nanoscrolls as Support for Immobilization of a Copper Complex Catalyst. **Inorganic Chemistry**, v. 45, n. 16, p. 6214-6221, 2006.

BRUDENELL, S. J., TIEKINK, E. R. T. Binuclear Copper(II) Complexes of Bis(pentadentate) Ligands Derived from Alkyl-Bridged Bis(1,4,7-triazacyclonane) Macrocycles. **Inorganic Chemistry**, v. 35, p. 1974 - 197, 1996.

CHAUDHURI, P. et al. Preparation, Magnetism, and Crystal Structures of the Tautomers $[\text{LCu}(\text{-OH})_2\text{CuL}](\text{C1O}_4)_2$ (Blue) and $[\text{LCu}(\text{-}_2\text{OH}_2)(\text{-}_2\text{O})\text{CuL}](\text{C1O}_4)_2$ (Green): -Aqua- -oxo vs Di- -hydroxo Linkage. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 24, n. 1, 1985.

COTTON, F. A. W., G. **Advanced Inorganic Chemistry**. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, 1988.

DA SILVA, M. I. N. D., S.N.; GONZALEZ, J.C.; GRAEFF, C. F. O.; COTTA, M. A. Synthetic melanin thin films: Structural and electrical properties. **J. Appl. Phys.**, v. 96, n. 10, p. 5803-5807, 2004.

DECKER, H.; TUCZEK, F. Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 8, p. 392-397, 2000.

DECKER, H. R., T. Tarantula Hemocyanin Shows Phenoloxidase Activity. **journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 25889 ó 25892, 1998.

DEZIDÉRIO, S. N., BRUNELLO, C.A., da SILVA, M. I. N., COTTA, M. A., GRAEFF, C. F. O. Thin films of synthetic melanin. **Journal of Non-Crystalline Solids**, p. 634 - 638, 2004.

DREYER, D. R. et al. Elucidating the Structure of Poly(dopamine). **Langmuir**, v. 28, n. 15, p. 6428-6435, 2012.

EICKEN, C. et al. Biochemical and spectroscopic characterization of catechol oxidase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) containing a type-3 dicopper center. **FEBS Letters**, v. 436, n. 2, p. 293-299, 1998.

EICKEN C.; KREBS, B. S., J. C. Catechol oxidase ô structure and activity. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, p. 677ó683, 1999.

DORO, F. G. et al. A regenerable ruthenium tetraammine nitrosyl complex immobilized on a modified silica gel surface: Preparation and studies of nitric oxide release and nitrite-to-NO conversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 307, p. 4056417, 2007.

FANG, Y.-C. et al. Bioinspired Design of a Cu₆Zn₆Imidazolite Mesoporous Silica Catalyst System for Superoxide Dismutation. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 42, p. 20639-20652, 2011.

GERDEMANN, C.; EICKEN, C.; KREBS, B. The Crystal Structure of Catechol Oxidase: New Insight into the Function of Type-3 Copper Proteins. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 3, p. 183-191, 2002.

GERLOCH, M. The sense of Jahn-Teller distortions in octahedral copper(II) and other transition-metal complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 638-640, 1981.

GICHINGA, M. G.; STRIEGLER, S. Effect of Water on the Catalytic Oxidation of Catechols. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 15, p. 5150-5156, 2008.

GONÇALVES, P. J., BAFFA FILHO, O., GRAEFF, C. F. O. Effects of hydrogen on the electronic properties of synthetic melanin. **Journal of Applied Physics**, v. 99, p. 104701 - 104705, 2006.

GRIGOROPOULOU, G. et al. Structure-Catalytic Function Relationship of SiO₂-Immobilized Mononuclear Cu Complexes: An EPR Study. **Langmuir**, v. 23, n. 20, p. 10407-10418, 2007.

GÜBBÜK, I. H. G., R.; ERSÖZ, M. Synthesis, characterization, and sorption properties of silica gel-immobilized Schiff base derivative. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 320, p. 3766382, 2008.

HAAG, W. O.; LAGO, R. M.; WEISZ, P. B. The active site of acidic aluminosilicate catalysts. **Nature**, v. 309, n. 5969, p. 589-591, 1984.

HAMMERICH, O. U., J. **Bioinorganic Electrochemistry**. 1st ed. Dordrecht: Springer, 2008.

HIMES, R. A. K., K. D. Copper-dioxygen complex mediated C-H bond oxygenation: relevance for particulate methane monooxygenase (pMMO). **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 13, p. 119 - 131, 2009.

HONG, S. et al. Non-Covalent Self-Assembly and Covalent Polymerization Co-Contribute to Polydopamine Formation. **Advanced Functional Materials**, v. 22, n. 22, p. 4711 - 4717, 2012.

HOOG, P. D. G., P.; DRIESSEN, W. L.; REEDIJK, J. New polydentate and polynucleating N-donor ligands from amines and 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 6783 ó 6786, 2002.

HU et al. Cellular Response to Magnetic Nanoparticles öPEGylatedö via Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 3, p. 809-816, 2006.

IDREES, M. et al. Interaction of Cr^{3+} with Silica Gel at the Aqueous Interface Using Fluorescence in Sodium Dodecyl Sulfate Micelles and Confocal Fluorescence Microscopy. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 5, p. 3517-3523, 2012.

ISMAYA, W. T. et al. Crystal Structure of Agaricus bisporus Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone. **Biochemistry**, v. 50, n. 24, p. 5477-5486, 2011.

JU, K.-Y. et al. Bioinspired Polymerization of Dopamine to Generate Melanin-Like Nanoparticles Having an Excellent Free-Radical-Scavenging Property. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 3, p. 625-632, 2011.

WOERTINK, J. S. et al. $[\text{Cu}_2\text{O}]^{2+}$ core in Cu-ZSM-5, the active site in the oxidation of methane to methanol. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106 n. 45, p. 18908-18913, 2009.

JUN, Y.-W.; LEE, J.-H.; CHEON, J. Chemical Design of Nanoparticle Probes for High-Performance Magnetic Resonance Imaging. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 28, p. 5122-5135, 2008.

KAI HOFENA, S. W., CHIU PING CANDACE CHANB, PETER MAJEWSKIB. Novel titration method for surface-functionalised silica. **Applied Surface Science**, v. 257, p. 257662580, 2011.

KAI SHENG, B. Y., XIAO FEI QIAO, LEI GUO. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry hybrids: Chemically bonded fabrication and photophysical property. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 210, p. 36643, 2010.

KAIM, W. R., J. Copper - a modern bioelementö **Angewandte Chemie International Edition**, v. 35, p. 43-60, 1996.

KAMITORI, Y. et al. Selective protection of carbonyl compounds. Silica gel treated with thionyl chloride as an effective catalyst for

thioacetalization. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 1427-1431, 1986.

KARLIN, K. D. Metalloenzymes, Structural Motifs, and Inorganic Models. **Science**, v. 261, p. 701 - 708, 1993.

KARLIN, K. D. et al. Reversible Dioxygen Binding and Aromatic Hydroxylation in O₂-Reactions with Substituted Xylyl Dinuclear Copper(I) Complexes: Syntheses and Low-Temperature Kinetic/Thermodynamic and Spectroscopic Investigations of a Copper Monooxygenase Model System. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 4, p. 1324-1336, 1994.

KHALAFALLA, S. E. R., G. W. Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 16, n. 2, p. 178-183, 1980.

KITAJIMA, N. et al. μ - η^2 : η^2 -Peroxo binuclear copper complex, [Cu(HB(3,5-(Me₂CH)₂pz)₃)₂(O₂)]. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 24, p. 8975-8976, 1989.

KOVAL, I. A. et al. Catecholase Activity of a Copper(II) Complex with a Macrocyclic Ligand: Unraveling Catalytic Mechanisms. **Chemistry ó A European Journal**, v. 12, n. 23, p. 6138-6150, 2006.

KREBS., T. K. C. E. J. C. S. B. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. **Nature Structural Biology**, v. 5, n. 12, p. 1084 - 1090, 1998.

LANGMUIR, I. THE ADSORPTION OF GASES ON PLANE SURFACES OF GLASS, MICA AND PLATINUM. **Journal of the American Chemical Society**, v. 40, n. 9, p. 1361-1403, 1918.

LANGMYHR, F. J., PAUS, P. E. The Analysis of Siliceous Materials By Atomic Absorption Spectrophotometry and the Hydrofluoric Acid Decomposition Technique. **Analytica Chimica Acta**, v. 43, p. 397 - 408, 1968.

LANZMASTER, M. et al. A new heterobinuclear Fe^{III}Cu^{II} complex with a single terminal FeIIIóO(phenolate) bond. Relevance to purple acid phosphatases and nucleases. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 319-332, 2005.

LAUS, R. et al. Adsorption and desorption of Cu(II), Cd(II) and Pb(II) ions using chitosan crosslinked with epichlorohydrin-triphosphate as the adsorbent. **Journal of Hazardous Materials**, v. 183, n. 163, p. 233-241, 2010.

LEEA, C.-H. L., T.-S.; MOUA, C.-Y. Mesoporous materials for encapsulating enzymes. **Nano Today**, v. 4, p. 165-179, 2009.

LIDE, D. R., Ed. **Handbook of Inorganic Chemistry and Physics**: CRS Press, v. Seção 5-91, 81st ed ed. 2000.

LIPPARD, S. J. The inorganic side of chemical biology. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 10, p. 504 - 507, 2006.

LYKOURINOU, V. et al. Immobilization of MP-11 into a Mesoporous Metal-Organic Framework, MP-11@mesoMOF: A New Platform for Enzymatic Catalysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 27, p. 10382-10385, 2011.

MANGRICH, A. S. **Cadernos de EPR**. Curitiba: 1998.

MARTELL, A. E., MOTEKAITIS, R. J., Ed. **Determination and use of stability constants**. New York: VCH, 2nd ed ed. 1992.

MASSOUD, S. S. et al. DNA Cleavage by Structurally Characterized Dinuclear Copper(II) Complexes Based on Triazine. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2011, n. 23, p. 3469-3479, 2011.

MEREDITH, P. S., T. The physical and chemical properties of eumelanin. **Pigment Cell Research**, v. 19 p. 572 - 594, 2006.

MIRESKI, S. L. **Estudo sobre o processo pericíclico (eno-imino versus cicloadição 1,3-dipolar) envolvido nas reações de acoplamento de iminas catalisadas por ácidos e síntese de imidazolidinas como potenciais precursores de diaminas vicinais**. 2011. (Doutorado). Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MIRICA, L. M. V., M.; RUDD, D. J.; HEDMAN, B.; HODGSON, K. O.; SOLOMON, E. I.; STACK, D. P. Tyrosinase Reactivity in a Model Complex: An Alternative Hydroxylation Mechanism. **Science**, v. 308, p. 1890 - 1892, 2005.

MONZANI, E. et al. Tyrosinase Models. Synthesis, Structure, Catechol Oxidase Activity, and Phenol Monooxygenase Activity of a Dinuclear Copper Complex Derived from a Triamino Pentabenzimidazole Ligand. **Inorganic Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 553-562, 1998.

MORAES, M. C. B. L., C. L. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 556 - 563, 2003.

MOSES, D. N. H., J.H.; STUCKY, G.D.; WAITE, J.H. . Melanin and Glyceral Jaws - Emerging Dark Side of a Robust Biocomposite Structure **The Journal of the Biological Chemistry**, v. 281, n. 46, p. 34826634832, 2006.

MOTEKAITIS, R. J. et al. Stabilities of mononuclear and dinuclear macrocyclic complexes of 1,4,7,13,16,19-hexaaza-10,22-dioxacyclotetacosane (bisdien). **Inorganic Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 609-614, 1983.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. 3rd ed. . New York: Wiley-Interscience, 1978.

NATALIO, F. et al. V2O5 nanowires with an intrinsic iodination activity leading to the formation of self-assembled melanin-like biopolymers. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 32, p. 11923-11929, 2011.

NEVES, A. et al. Catecholase Activity of a Series of Dicopper(II) Complexes with Variable Cu OH(phenol) Moieties. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 7, p. 1788-1794, 2002.

NG, W.-Y. Conversion of potentials in voltammetry and potentiometry. **J. of Chemical Education**, v. 65, n. 8, p. 727, 1988.

OSÓRIO, R. E. H. M. B. et al. Synthesis, Magnetostructural Correlation, and Catalytic Promiscuity of Unsymmetric Dinuclear Copper(II) Complexes: Models for Catechol Oxidases and Hydrolases. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 1569-1589, 2012

PERALTA, R. A. et al. New unsymmetric dinuclear Cu^{II}Cu^{II} complexes and their relevance to copper(II) containing metalloenzymes and DNA cleavage. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, n. 566, p. 992-1004, 2006.

PIOVEZAN, C. et al. Epoxidation using non-heme iron complexes in solution and immobilized on silica gel as catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 293, n. 0, p. 97-104, 2005.

PIOVEZAN, C. et al. Heterodinuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ -Bioinspired Complex Supported on 3-Aminopropyl Silica. Efficient Hydrolysis of Phosphate Diester Bonds. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2580-2582, 2010

PIOVEZAN, C. et al. Design of a Dinuclear Nickel(II) Bioinspired Hydrolase to Bind Covalently to Silica Surfaces: Synthesis, Magnetism, and Reactivity Studies. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 6104-6115, 2012.

POSTMA, A. et al. Self-Polymerization of Dopamine as a Versatile and Robust Technique to Prepare Polymer Capsules. **Chemistry of Materials**, v. 21, n. 14, p. 3042-3044, 2009.

PROTA, G. Melanins, Melanogenesis and Melanocytes: Looking at Their Functional Significance from the Chemist's Viewpoint. **Pigment Cell Research**, v. 13, n. 4, p. 283-293, 2000.

REALE, S. et al. Exploring the frontiers of synthetic eumelanin polymers by high-resolution matrix-assisted laser/desorption ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 1, p. 49-53, 2012.

REY, N. A. et al. Catalytic Promiscuity in Biomimetic Systems: Catecholase-like Activity, Phosphatase-like Activity, and Hydrolytic DNA Cleavage Promoted by a New Dicopper(II) Hydroxo-Bridged Complex. **Inorganic Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 348-350, 2007.

REY, N. A. et al. A synthetic dinuclear copper(II) hydrolase and its potential as antitumoral: Cytotoxicity, cellular uptake, and DNA cleavage. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 10, p. 1323-1330, 2009.

ROMBA, J. E. A. The Coordination Chemistry of 1,4,7-Diazepan-6-amine. **European Journal of Inorganic Chemistry**, p. 314 - 328, 2006.

ROSENZWEIG, A. C. S., M. H. Structural insights into dioxygen-activating copper enzymes. **Current Opinion in Structural Biology** v. 16, p. 729-735, 2006.

SCARPELLINI, M. et al. Phosphate diester hydrolysis and DNA damage promoted by new cis-aqua/hydroxyl copper(II) complexes containing

tridentate imidazole-rich ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 24, n. 25, p. 8353 - 8365, 2003.

SHANMUGANATHAN, K. et al. Thermooxidative Stabilization of Polymers Using Natural and Synthetic Melanins. **Macromolecules**, v. 44, n. 24, p. 9499-9507, 2011.

SHRIVER, D. F. A., P. W.; OVERTON, T. L.; ROURKE, J. P.; WELLER, M. T.; ARMSTRONG, F. A. **Química Inorgânica**. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.

SHU, W.; VALIYAVEETIL, S. Intramolecular hydrogen bond assisted planarization and self-assembly of simple disc-shaped molecules in mesophases. **Chemical Communications**, n. 13, p. 1350-1351, 2002. 1359-7345.

SHULTZ, M. D. et al. Reactive Nature of Dopamine as a Surface Functionalization Agent in Iron Oxide Nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 9, p. 2482-2487, 2007.

SILVERSTEIN, R. M. F., X. W.; KIEMLE, D. J., Ed. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, v.7 ed.ed. 2007.

SKOOG D. A.; HOLLER F. J.; NIEMAN, T. A., Ed. **Princípios de Análise Instrumental**. Porto Alegre, RS: Bookman, p.836, 5 ed. ed. 2002.

SMIT, S. J. N., C.J; PALMER, R. C.; HANSON, G.R.; SCHENK, G. G., L.R.; RILEY, M. R. Structural and spectroscopic studies of a model for catechol oxidase. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, p. 499 - 510, 2008.

SMITH, S. J. et al. Spectroscopic and Catalytic Characterization of a Functional Fe^{III}Fe^{II} Biomimetic for the Active Site of Uteroferrin and Protein Cleavage. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 2065-2078, 2012.

SOLOMON, E. I.; BALDWIN, M. J.; LOWERY, M. D. Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity. **Chemical Reviews**, v. 92, n. 4, p. 521-542, 1992.

SOLOMON, E. I. et al. Oxygen Binding, Activation, and Reduction to Water by Copper Proteins. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, n. 24, p. 4570-4590, 2001.

SOLOMON, E. I. et al. O₂ and N₂O Activation by Bi-, Tri-, and Tetranuclear Cu Clusters in Biology. **Accounts of Chemical Research**, v. 40, n. 7, p. 581-591, 2007.

SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKIN, T. E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2563-2606, 1996.

STALLINGS, M. D.; MORRISON, M. M.; SAWYER, D. T. Redox chemistry of metal-catechol complexes in aprotic media. 1. Electrochemistry of substituted catechols and their oxidation products. **Inorganic Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 2655-2660, 1981.

STRIEGLER, S.; GICHINGA, M. G.; DITTEL, M. Macromolecular Salen Catalyst with Largely Enhanced Catalytic Activity. **Organic Letters**, v. 10, n. 2, p. 241-244, 2008.

SUBAT, M. et al. 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane Metal Complexes as Potent Promoters of Phosphodiester Hydrolysis under Physiological Conditions. **Inorganic Chemistry**, v. 47, n. 11, p. 4661-4668, 2008.

TANAKA, K. The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 33, p. 3860 - 3870, 2003.

ÜNLÜ, N. E., M. Adsorption characteristics of heavy metal ions onto a low cost biopolymeric sorbent from aqueous solutions **Journal of Hazardous Materials**, v. B136, 2006.

VOMASTA, D., ZABEL, M, KÖNIG, B. Synthesis of 6-Chloro-N,N,N₄N₆-tetrakis-pyridin-2-ylmethyl-[1,3,5]triazine-2,4-diamine. **Molbank**, n. M556, 2003.

VOORHEES, V.; ADAMS, R. The Use of the Oxides of Platinum for the Catalytic Reduction of Organic Compounds. I. **Journal of the American Chemical Society**, v. 44, n. 6, p. 1397-1405, 1922.

WIENCH, J. W. et al. Solid-State NMR Investigations of the Immobilization of a BF₄ Salt of a Palladium(II) Complex on Silica. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 33, p. 11801-11810, 2009.

WIGHT, A. P.; DAVIS, M. E. Design and Preparation of Organic Inorganic Hybrid Catalysts. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 10, p. 3589-3614, 2002.

XIE, J. et al. Ultrasmall c(RGDyK)-Coated Fe₃O₄ Nanoparticles and Their Specific Targeting to Integrin α 3-Rich Tumor Cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 24, p. 7542-7543, 2008.

XU, Y. et al. Water-Soluble Iron Oxide Nanoparticles with High Stability and Selective Surface Functionality. **Langmuir**, v. 27, n. 14, p. 8990-8997, 2011.

YANG, R.; ZOMPA, L. J. Metal complexes of cyclic triamines. 1. Complexes of 1,4,7-triazacyclononane ([9]aneN₃) with nickel(II), copper(II), and zinc(II). **Inorganic Chemistry**, v. 15, n. 7, p. 1499-1502, 1976.

YOUNG, M. J. et al. Reactivity of Copper(II) Hydroxides and Copper(II) Alkoxides for Cleaving an Activated Phosphate Diester. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 37, p. 9441-9447, 1995.

ZANELLO, P. **Inorganic Electrochemistry - Theory, Practice and Application** Cambridge: RSC, 2003.

ZOIS, D. V. et al. Active catalytic centers in silica-supported Cu(II) and Mn(II) biomimetic complex: Correlation between catalytic and EPR data. **Journal Of Molecular Catalysis A: Chemical** v. 261, p. 306-317, 2007.

7. ANEXOS

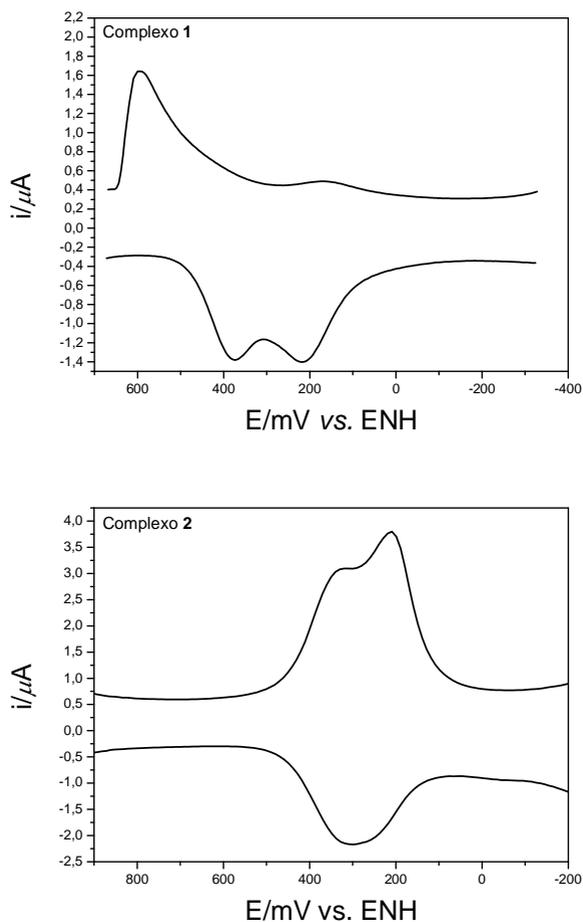


Figura S1. A voltmetria de pulso diferencial registrados para os complexos, **1** ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e **2** ($1,02 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo; eletrodo auxiliar: fio de platina; eletrodo de referência Ag/AgCl; eletrólito suporte: NaClO_4 ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$); Tampão MES ($1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$), solvente MeOH/ H_2O (1:1); pH 6,0 (complexo **1**) e 6,5 (complexo **2**); velocidade de varredura: $25 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$; padrão: hexacianoferato de potássio; amplitude: 25 mV; velocidade de varredura 20 mV s^{-1} .

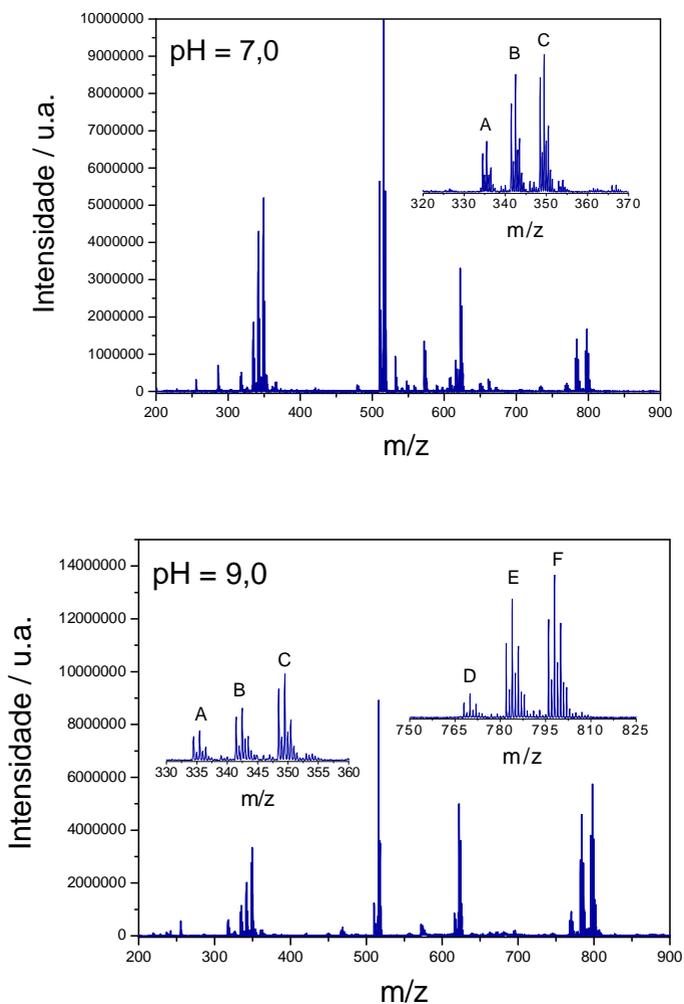


Figura S3. Espectro de massas ESI(+)-MS do complexo **1** em solução metanólica, MeOH/H₂O 50:50 v/v, em pH 7,0 e 9,0.

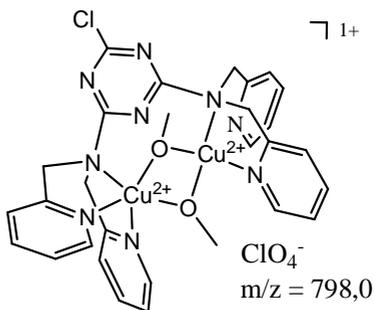
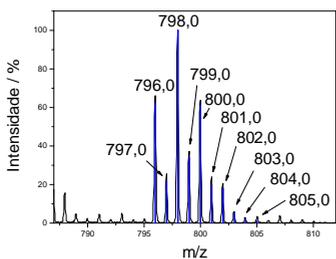
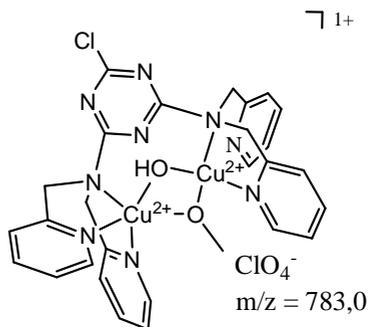
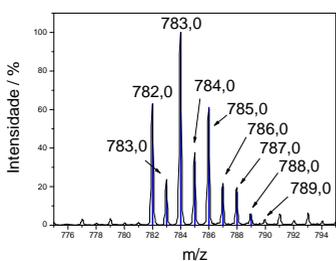
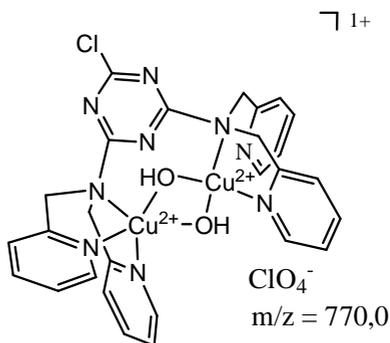
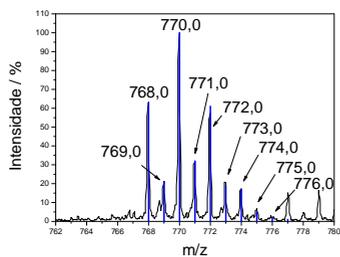


Figura S4. ESI(+)-MS do complexo **1** em solução metanólica, MeOH/H₂O 50:50 v/v, em pH 9,0: Picos proeminentes: **D**, m/z 770,0 [(C₂₇H₂₄N₉Cl)Cu^{II}₂(OH)₂ + (ClO₄)¹⁺, **E** m/z 783,0 [(C₂₇H₂₄N₉Cl)Cu^{II}₂(OH)(MeO) + (ClO₄)¹⁺ e **F** m/z 798,0 [(C₂₇H₂₄N₉Cl)Cu^{II}₂(MeO)₂ + (ClO₄)¹⁺. O espectro em preto é o experimental e o em linhas azuis é o simulado.

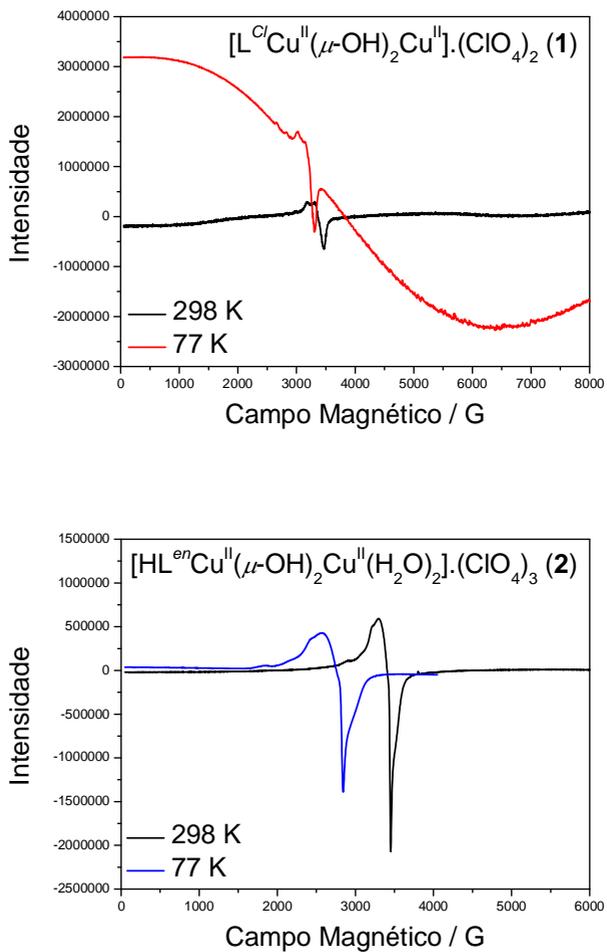


Figura S5. Espectros de EPR no estado sólido dos complexos em estado sólido **1** e **2** à 77 e 298 K.

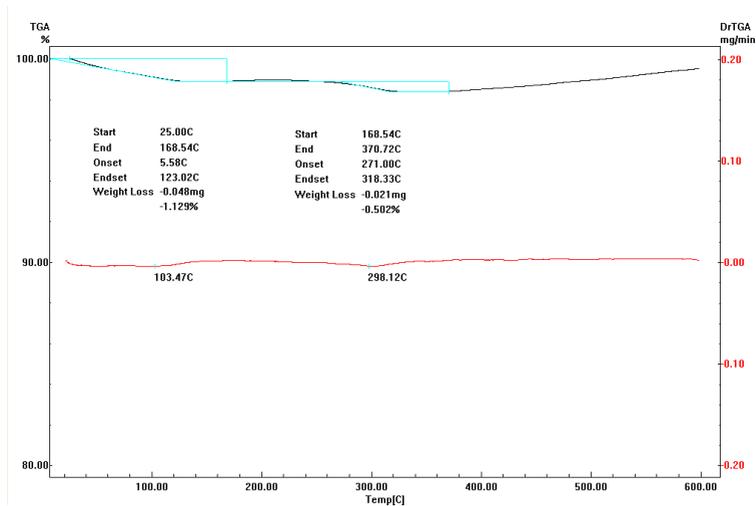


Figura S6. Curva de termogravimetria (TGA - preto) e sua respectiva derivada (DrTGA - vermelho) nanopartículas de óxido de ferro Fe₃O₄, sintetizadas por co-precipitação.

