

Tiago Pacheco de Camargo

**DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXOS HETEROBINUCLEARES DE Fe^{III}Zn^{II}
A PARTIR DE LIGANTES CONTENDO O GRUPO PIRENO PARA ESTUDO
DE INTERAÇÃO COM ÉSTERES DE FOSFATO E ÁCIDOS NUCLÉICOS**

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Química.
Orientador: Prof. Dr. Ademir Neves

Florianópolis
2013

Camargo, Tiago Pacheco de

Desenvolvimento De Complexos Heterobinucleares De $Fe^{III}Zn^{II}$ A Partir De Ligantes Contendo O Grupo Pireno Para Estudo De Interação Com Ésteres De Fosfato E Ácidos Nucléicos. Tiago Pacheco de Camargo – Florianópolis: UFSC / Programa de Pós-Graduação em Química, 2013. xxv, 113p.

Orientador: Ademir Neves

Tese (Doutorado): - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Programa de Pós-graduação em Química, 2013.

Referências Bibliográficas: p. 107-112.

1. Química Bioinorgânica. 2. Metalohidrolases binucleares. 3. Complexos Modelos – Tese, Neves, Ademir, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Programa de Pós-graduação em Química.

Tiago Pacheco de Camargo

**DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXOS HETEROBINUCLEARES DE Fe^{III}-Zn^{II}
A PARTIR DE LIGANTES CONTENDO O GRUPO PIRENO PARA ESTUDO
DE INTERAÇÃO COM ÉSTERES DE FOSFATO E ÁCIDOS NUCLÉICOS**

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

Florianópolis, 16 de outubro de 2013.

Prof. Dr. Hugo Gallardo

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ademir Neves
Orientador
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof. Dr. Fernando R. Xavier
Universidade do Estado de Santa
Catarina

Prof. Dr. Roberto Santana
USP - Ribeirão Preto

Prof.^a, Dr.^a Rosely A. Peralta
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof. Dr. Ricardo José Nunes
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof. Dr. Antônio Luiz Braga
Universidade Federal de Santa
Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais
Janir e Alba.

AGRADECIMENTOS

Como cristão que sou, acredito que cheguei até aqui pois as mãos de Deus me guiaram e me guardaram sempre nos momentos em que mais precisei de sua proteção. Desta forma te agradeço ó Deus por tudo que tu És.

Aos meus pais Janir e Alba, a minha irmã Tati, meu cunhado Jonas e ao Vitor e o Bernardo (mais novo membro da família), por sempre me apoiarem nestes longos anos que estou aqui em Floripa, e por sempre serem um exemplo de vida pra mim. Vocês são a melhor família que eu poderia ter.

Ao Professor Dr. Ademir Neves pela amizade, pelo exemplo e entusiasmo de sua orientação e constante presença durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Professora Dra. Rosely A. Peralta pela amizade, carinho e paciência comigo. Nestes longos anos que convivemos no Labinc você tem sido uma pessoa muito especial e um exemplo como profissional e como pessoa.

Aos Prof. Drs. Adailton J. Bortoluzzi, Bruno Szpoganicz, Hernán Terenzi pelas inestimáveis colaborações e discussões pertinentes a este trabalho.

Aos Prof. Dr. Fernando R. Xavier, Roberto Santana, Rosely A. Peralta, Ricardo J. Nunes e Antônio L. Braga por aceitarem participar desta banca examinadora e pelas valiosas contribuições para o enriquecimento do trabalho.

Aos amigos do LABINC: Bernardo, Fernando Xavier, Rafa, Clóvis, Renata, Geovana, Vítor, Sara, Joseph, Alfredo, Sandro pelas conversas, brincadeiras e amizade, fazendo do ambiente de trabalho um local agradável e propício a discussões e fóruns depois do RU.

Aos amigos da graduação: Eduard, Michelle, Dai, Ismael, Juliana pelo companheirismo e festas durante esses anos de estudo. Aos amigos da Banda e Orquestra da Assembléia de Deus pela amizade, apoio, e pelas orações.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina; Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e a todos que torceram por mim e estiveram presentes em cada conquista nestes anos de UFSC.

“The best way to get a good idea is to get a lot of ideas.”

(Linus Pauling)

RESUMO

Agentes que possam interagir e/ou clivar a molécula de DNA possuem uma grande importância devido a sua potencial aplicação antitumoral ou ainda como antibióticos. Vários compostos de coordenação clivam o DNA de forma oxidativa. Porém este mecanismo de clivagem possui uma grande desvantagem por afetar as biomoléculas de forma indiscriminada e aleatória, o que é indesejável em aplicações bioquímicas ou mesmo em estudos de interação com DNA.

Desta forma é absolutamente necessário nestes estudos o desenvolvimento de compostos que possam clivar o DNA através de um mecanismo hidrolítico. Algumas metalonucleases naturais fazem uso de íons metálicos em seus sítios ativos de modo a se beneficiar das características desses metais. Dentre elas podem-se destacar a acidez de Lewis que pode ser usada na ativação do átomo de fósforo bem como na formação de um nucleófilo em condições de pH fisiológico. No caso de nucleases binucleares os centros metálicos podem atuar na orientação do nucleófilo em relação ao substrato de modo a facilitar a hidrólise da ligação fósforo-diéster.

Inspirados nestas metalonucleases vários complexos modelo foram desenvolvidos visando a clivagem hidrolítica do DNA, porém em sua maioria não possuem seletividade quanto ao sítio de clivagem, sendo o grande desafio atual o aumento da seletividade de interação complexo-DNA. Uma estratégia que vem sendo utilizada é a inserção de grupos intercalantes, que interagem com o sulco maior ou menor do DNA. Estes grupos serviriam então como direcionadores, o que pode gerar um grande aumento da atividade de clivagem, bem como na seletividade.

Considerando o exposto, o objetivo principal deste trabalho é sintetizar e caracterizar novos ligantes contendo grupos intercalantes e seus complexos metálicos (sistemas conjugados) que apresentem as características requeridas para o estudo de interação e clivagem eficiente de ácidos nucléicos.

Palavras-chave: Química Bioinorgânica, Compostos de coordenação, Interação com DNA.

ABSTRACT

Agents that can interact and / or cleave the DNA molecule have a great importance due to their potential application as antibiotics or antitumor drugs. Several coordination compounds cleave DNA oxidatively. However, this cleaving mechanism has a great disadvantage because it affects the biomolecules indiscriminately and random, which is undesirable in applications or even biochemical studies of interaction with DNA.

Thus, it is necessary in these studies to develop compounds that can cleave DNA by a hydrolytic mechanism. Some natural metallonucleases make use of metal ions in their active sites in order to benefit from the characteristics of these metals. Among them we can emphasize the Lewis acidity which can be used in activating the phosphorus atom as well as the formation of a nucleophile under conditions of physiological pH. In the case of the binuclear metal centers nucleases can act in nucleophile orientation relative to the substrate in order to facilitate hydrolysis of the phosphorus-diester.

Inspired in these metallonucleases, various biomimetic models were developed to hydrolytic cleavage of DNA, but mostly lack selectivity regarding cleavage site, and the current challenge increased selectivity complex-DNA interaction. One strategy that has been used is the insertion of intercalating groups that interact with the major or minor groove of DNA. These groups then serve as drivers, which can generate a large increase in cleavage activity and selectivity.

Considering the above, the main objective of this work is to synthesize and characterize new ligands containing intercalating groups and their metal complexes (conjugated systems) having the characteristics required for the study of interaction and efficient cleavage of nucleic acids.

Keywords: Bioinorganic Chemistry, Coordination compounds, DNA Interaction.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – SÍTIO ATIVO DA ENZIMA FOSFATASE ÁCIDA PÚRPURA EXTRAÍDA DO FEIJÃO VERMELHO (RED KIDNEY BEAN PAP) (SCHENK, ELLIOTT ET AL. 2008).....	28
FIGURA 2 – DIAGRAMA HIPOTÉTICO DE ENERGIA PARA UM SISTEMA CATALISADO POR UMA ENZIMA.....	29
FIGURA 3 – ESQUEMA DEMONSTRATIVO DO SÍTIO ATIVO E SEUS SUBSTRATOS PARA DIFERENTES METALOENZIMAS BINUCLEARES: (A) FOSFATASE ÁCIDA PÚRPURA, (B) UREASE, (C) LEUCINA AMINO-PEPTIDASE, (D) FOSFATASE ALCALINA, (E) ENDONUCLEASE, (F), INOSITOL MONOFOSFATASE (G) FOSFOTRIESTERASE E (H) ECORV ENDONUCLEASE.	30
FIGURA 4 – ESQUEMA DO SÍTIO ATIVO DAS PAPS.	31
FIGURA 5 – ESTRURA DOS ÁCIDOS RIBONUCLEÍCO E DESOXIRIBONUCLEÍCO. (KOOLMANN & ROEHM 2005).....	33
FIGURA 6 – ESTRUTURA BÁSICA DE UM NUCLEOTÍDEO. (STRYER, BERG ET AL. 2002)	33
FIGURA 7 – ESQUEMA DEMONSTRATIVO DO PAREAMENTO DAS BASES NITROGENADAS NA CADEIA DO DNA E RNA.....	34
FIGURA 8 – ESTRUTURAS NÃO-DUPLEX ENCONTRADAS NA CADEIA DO DNA (DESTACADAS EM VERDE). (KEENE, SMITH ET AL. 2009)	35
FIGURA 9 – ESTRUTURA DE RAIOS X DO DNA LIGADO COVALENTEMENTE AO COMPLEXO CISPLATINA. (KEENE, SMITH ET AL. 2009).....	36
FIGURA 10 – ESTRUTURA DE RAIOS X DO DNA LIGADO AO AGENTE INTERCALANTE ELIPTICINA. (BOER, CANALS ET AL. 2009)	37
FIGURA 11 – ESTRUTURA DE RAIOS X DO DNA COM A DISTAMICINA LIGADA NO SULCO MENOR. (BOER, CANALS ET AL. 2009)	38
FIGURA 12 – ILUSTRAÇÃO DO SÍTIO ATICO DA CARBOXIPEPTIDASE A.....	40
FIGURA 13 – ILUSTRAÇÃO DA ESTRUTURA DO COMPLEXO $[Fe^{III}Fe^{II}(L^3)(OH)(OH_2)_2]$ QUE APRESENTA EFEITOS DE SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO.	41
FIGURA 14 –NUCLEASES SINTÉTICAS: Cu(HISMIMA) E Zn(TRIAMINOHEXANO).	42
FIGURA 15 – NUCLEASES SINTÉTICAS: $[Rh_2(BPY)]$ -PEPTÍDEO (A) E $[Fe^{III}Fe^{III}(L$ -ACRIDINA)] (B).....	43
FIGURA 17 – ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO PIR-DAB-BOC EM PASTILHA DE KBr. ..	52
FIGURA 18 – ESPECTRO DE RMN- ¹ H DO PIR-DAB-BOC EM CDCl ₃	52
FIGURA 19 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO PIR-DAB EM PASTILHA DE KBr.	54
FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN- ¹ H DO PIR-DAB EM CDCl ₃	54
FIGURA 21 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO PIR2-DAB-BOC EM PASTILHA DE KBr..	56
FIGURA 22 - ESPECTRO DE ¹ H-RMN DO PIR2-DAB-BOC EM CDCl ₃	56
FIGURA 23 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO PIR2-DAB EM PASTILHA DE KBr.	58
FIGURA 24 – ESPECTRO DE RMN- ¹ H DO PIR2-DAB EM CDCl ₃	58
FIGURA 25 – ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO H ₂ LAB EM PASTILHA DE KBr.....	60

FIGURA 26 – ESPECTRO DE ^1H -RMN DO H_2LAB EM CDCl_3	61
FIGURA 27 – ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO $\text{H}_2\text{LP1}$ EM PASTILHA DE KBr	62
FIGURA 28 – ESPECTRO DE ^1H -RMN DO $\text{H}_2\text{LP1}$ EM CDCl_3	62
FIGURA 29 – ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO $\text{H}_2\text{LP2}$ EM PASTILHA DE KBr	64
FIGURA 30 – ESPECTRO DE ^1H -RMN DO $\text{H}_2\text{LP2}$ EM CDCl_3	64
FIGURA 31 – ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO FeZnLAB EM PASTILHA DE KBr	66
FIGURA 32 – ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO FeZnLP1 EM PASTILHA DE KBr	67
FIGURA 33 – ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO FeZnLP2 EM PASTILHA DE KBr	69
FIGURA 34 – REPRESENTAÇÃO DOS LIGANTES PREPARADOS NO PRESENTE TRABALHO.	70
FIGURA 35 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS NO IV DO PIR-DAB-BOC E PI-DAB	71
FIGURA 36 – COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS NO INFRAVERMELHO DOS LIGANTES H_2LAB , $\text{H}_2\text{LP1}$ E $\text{H}_2\text{LP2}$	72
FIGURA 37 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE ^1H -RMN DO PIR-DAB-BOC E PIR-DAB	74
FIGURA 38 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE ^1H -RMN PARA OS TRÊS LIGANTES FINAIS NA REGIÃO ENTRE 5 E 11 PPM.	75
FIGURA 39 – ESPECTROS DE MASSA NO MODO POSITIVO DOS LIGANTES H_2LAB (ACIMA), $\text{H}_2\text{LP1}$ (ESQUERDA) E $\text{H}_2\text{LP2}$ (DIREITA) EM ACETONITRILA. EM DESTAQUE AS SIMULAÇÕES DAS DISTRIBUIÇÕES ISOTÓPICAS.	76
FIGURA 40 – REPRESENTAÇÃO DOS COMPLEXOS SINTETIZADOS E UTILIZADOS PARA COMPARAÇÃO NESTE TRABALHO.	77
FIGURA 41 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS NO INFRAVERMELHO ENTRE CADA COMPLEXO E SEU RESPECTIVO LIGANTE.	78
FIGURA 42 – ESPECTRO ELETRÔNICO DOS COMPLEXOS FeZnLAB (ACIMA), FeZnLP1 (ESQUERDA) E FeZnLP2 (DIREITA): SOLUÇÃO - $[\text{C}] = 3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ E NO ESTADO SÓLIDO.	81
FIGURA 43 – ESPECTRO DE MASSA NO MODO POSITIVO PARA O COMPLEXO FeZnLAB EM SOLUÇÃO DE ACETONITRILA $500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. SIMULAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO ISOTÓPICA EM DESTAQUE.	83
FIGURA 44 – ESPECTRO DE MASSA NO MODO POSITIVO PARA O COMPLEXO FeZnLP1 EM SOLUÇÃO DE ACETONITRILA $500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. SIMULAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO ISOTÓPICA EM DESTAQUE.	84
FIGURA 45 – ESPECTRO DE MASSA NO MODO POSITIVO PARA O COMPLEXO FeZnLP1 EM SOLUÇÃO DE ACETONITRILA $500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. SIMULAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO ISOTÓPICA EM DESTAQUE.	84
FIGURA 46 – VOTAMOGRAMA DE ONDA QUADRADA PARA OS COMPLEXOS FeZnLAB (VERDE), FeZnLP1 (PRETO) E FeZnLP2 (AZUL) EM SOLUÇÃO DE ACETONITRILA/ÁGUA (2:1). ELETRODO DE TRABALHO: CARBONO VITREO; ELETRODO AUXILIAR: PLATINA; ELETRODO DE REFERÊNCIA: Ag/Ag^+ ; ELETROLITO SUPORTE TBAPF_6 $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; PADRÃO INTERNO: FERROCENO.	86

FIGURA 47 – TITULAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO COMPLEXO FeZnLP2 EM ACETONITRILA/ÁGUA (1:1). CONDIÇÕES [COMPLEXO] = 2×10^{-4} MOL.L ⁻¹ ; I = 0,1 MOL.L ⁻¹ NaClO ₄ ; FAIXA DE PH 3,5-6,0.	88
FIGURA 48 – DIAGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES EM FUNÇÃO DO PH PARA OS COMPLEXOS FeZnLAB E FeZnLP1.	89
FIGURA 49 – PROPOSTA GERAL PARA OS EQUILÍBRIOS DE PROTONAÇÃO OBSERVADOS NOS COMPLEXOS FeZnLAB, FeZnLP1 E FeZnLP2.	90
FIGURA 50 – PROPOSTA DE ESTRUTURA PARA OS COMPLEXOS FeZnLAB, FeZnLP1 E FeZnLP2.	91
FIGURA 51 – REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO SUBSTRATO MODELO BIS(2,4-DINITROFENIL)FOSFATO.	92
FIGURA 52 – DEPENDÊNCIA DA EFICIÊNCIA CATALÍTICA COM O PH PARA A REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP. CONDIÇÕES: [COMPLEXO] = $6,5 \times 10^{-5}$; [SUBSTRATO] = $1,0-6,5 \times 10^{-3}$ MOL.L ⁻¹ ; [TAMPÃO] = $3,3 \times 10^{-2}$ MOL.L ⁻¹ ; I = 0,1 LiClO ₄ MOL.L ⁻¹	93
FIGURA 53 – ESQUEMA DEMONSTRATIVO DA APROXIMAÇÃO DO SUBSTRATO AO SÍTIO ATIVO DO COMPLEXO.	94
FIGURA 54 – DEPENDÊNCIA DA EFICIÊNCIA CATALÍTICA COM O PH PARA O COMPLEXO FeZnLP1.	95
FIGURA 55 – DEPENDÊNCIA DA VELOCIDADE DE REAÇÃO COM A CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO PARA A REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP. CONDIÇÕES: [COMPLEXO] = $6,5 \times 10^{-5}$; [SUBSTRATO] = $1,0-6,5 \times 10^{-3}$ MOL.L ⁻¹ ; [TAMPÃO] = $3,3 \times 10^{-2}$ MOL.L ⁻¹ ; I = 0,1 LiClO ₄ MOL.L ⁻¹	97
FIGURA 56 – PROPOSTA DE MECANISMO PARA OS COMPLEXOS FeZnLAB, FeZnLP1 E FeZnLP2. ILUSTRADO APENAS PARA O FeZnLP1.	100
FIGURA 57 – TITULAÇÃO DOS COMPLEXOS FeZnLP1 E FeZnLP2 VIA ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA COM ADIÇÕES DE CT-DNA.	102
FIGURA 58 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE EXCÍMERO FORMADA PELO PIRENO.	102
FIGURA 59 - TITULAÇÃO VIA FLUORESCÊNCIA DO COMPLEXO FeZnLP1 COM CT-DNA.	103
FIGURA 60 - ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DE DNA NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE COMPLEXO. CONDIÇÕES REACIONAIS: [CT-DNA] = 100 mM; [TAMPÃO] = 10 mM DE TRIS-HCL PH 7,0; [COMPLEXO] = 0 A 50 mM; TEMPERATURA = 37 °C.	104
FIGURA 61 – REPRESENTAÇÃO DAS CONFORMAÇÕES B E C DO DNA.	105

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE RMN- ¹ H PARA OS LIGANTES H ₂ LAB, H ₂ LP1 E H ₂ LP2.....	73
TABELA 2 – ESPÉCIES DETERMINADAS NA ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	76
TABELA 3 – RESULTADOS DA ANÁLISE ELEMENTAR DE C, H E N PARA OS COMPLEXOS FZLAB E FZLP1 (CALCULADO/EXPERIMENTAL).....	79
TABELA 4 – DADOS DE CONDUTIMETRIA.....	80
TABELA 5 – DADOS DO ESPECTRO ELETRÔNICO PARA OS COMPLEXOS FZLAB, FZLP1 E FZLP2.....	81
TABELA 6 – ESPÉCIES ENCONTRADAS NA ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	85
TABELA 7 – DADOS ELETROQUÍMICOS DE ONDA QUADRADA PARA OS COMPLEXOS.....	86
TABELA 8 – VALORES DAS CONSTANTES DE PROTONAÇÃO PARA OS COMPLEXOS FZLAB, FZLP1 E FZLP2.....	89
TABELA 9 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE pK _a POTÊNCIOMÉTRICO E CINÉTICO NA HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP.....	94
TABELA 10 – DEPENDÊNCIA DOS VALORES DE K _{cat} E K _M COM O PH PARA O COMPLEXO FZLP1.....	96
TABELA 11 – PARÂMETROS CINÉTICOS PARA A REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP PARA PS COMPLEXOS FZLAB, FZLP1 E FZLP2.....	97
TABELA 12 - CONSTANTES DE INTERAÇÃO CALCULADAS A PARTIR DAS TITULAÇÕES COM DNA-CT PARA OS COMPLEXOS FZLP1 E FZLP2.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2,4-bdnpp – bis(2,4-dinitrofenil)fosfato
2,4-dnpp – 2,4-dinitrofenilfosfato
2,4-dnp – 2,4-dinitrofenolato
 δ – deslocamento químico (RMN)
 δ – deformação angular simétrica ou assimétrica (IV)
 ϵ – coeficiente de absorvidade molar
 λ – comprimento de onda (nm)
 ΔE_p – diferença de potencial de pico
 ν – estiramento de ligação
cmff – 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol
DNA – deoxiribonucleic acid – ácido desoxirribonucléico
 $E_{1/2}$ – potencial de meia onda
ENH – eletrodo normal de hidrogênio
 E_{pa} – potencial de pico anódico
 E_{pc} – potencial de pico catódico
ERO's – Espécies Reativas de Oxigênio
 Et_3N – trietilamina
 Et_2O – éter etílico
EtOH – etanol
Fc/Fc⁺ – par redox ferroceno/ferrocínio
H₂LAB - Síntese do 2-{{{3-[[4-aminobutil]amino]metil}-2-hidroxi-5-metilfenil]metil}(piridin-2-ilmetil)amino}metil}-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol
H₂LP1 – Síntese do 2-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-6-[[{2-hidroxi-5-metil-3-[[4-[[piren-1-ilmetil]amino]butil]amino]metil]fenil}metil}(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol
H₂LP2 – Síntese do 2-{{{3-[[4-[[bis(piren-1-ilmetil)amino]butil]amino]metil]-2-hidroxi-5-metilfenil}metil] (piridin-2-ilmetil)amino}metil}-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol
 k – constante de velocidade
 k_{cat} – constante catalítica
 K_M – constante de Michaelis-Menten
H₂bpbpm – 2-*N*-bis[(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-*N'*-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol
Hpnp – 2-hidroxi-propil-4-nitrofenilfosfato
 I – força iônica
 i_{pa} – corrente de pico anódica
 i_{pc} – corrente de pico catódica
MeOH – metanol
pH – potencial hidrogeniônico

Pi – fosfato inorgânico

pKa – constante de dissociação ácida em escala logarítmica

pKw – constante de autoprotólise da água em escala logarítmica

PAPs – Fosfatases Ácidas Púrpuras

RNA – ribonucleic acid – ácido ribonucleico

RMN-¹H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio

S_{N2} – mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular

THF – tetrahidrofurano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1. A QUÍMICA BIOINORGÂNICA – O INÍCIO	27
1.2. METALENZIMAS: GRANDES COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO	28
1.3. METALOHIDROLASES BINUCLEARES.....	29
1.4. ÁCIDOS NUCLÉICOS	32
1.5. MODOS DE INTERAÇÃO COM ÁCIDOS NUCLÉICOS	35
1.6. COMPOSTOS MODELO EM QUÍMICA BIOINORGÂNICA	38
1.6.1. <i>Modelagem da Segunda Esfera de Coordenação.....</i>	<i>39</i>
1.6.2. <i>Complexos Modelos Como Nucleases Sintéticas.....</i>	<i>41</i>
2. OBJETIVOS	44
2.1. OBJETIVOS GERAIS	44
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
3. PARTE EXPERIMENTAL	45
3.1. MATERIAIS MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO	45
3.1.1. <i>Materiais</i>	<i>45</i>
3.1.2. <i>Métodos e Instrumentação.....</i>	<i>45</i>
3.1.2.1. <i>Análise Elementar de CHN.....</i>	<i>45</i>
3.1.2.2. <i>Espectroscopia no Infravermelho – FT-IR.....</i>	<i>46</i>
3.1.2.3. <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio RMN-¹H</i>	<i>46</i>
3.1.2.4. <i>Condutometria</i>	<i>46</i>
3.1.2.5. <i>Espectrometria de massa – ESI-MS.....</i>	<i>47</i>
3.1.2.6. <i>Espectroscopia Eletrônica</i>	<i>47</i>
3.1.2.7. <i>Eletroquímica</i>	<i>47</i>
3.1.2.8. <i>Titulação Potenciométrica</i>	<i>48</i>
3.1.2.9. <i>Reatividade</i>	<i>49</i>
3.1.2.10. <i>Estudos de interação com DNA</i>	<i>50</i>
3.2. SÍNTESE DOS LIGANTES	51
3.2.1. <i>Síntese do terc-butil-N-[4-(1-pirenilmetil)amino-butil]-carbamato (Pir-dab-Boc).....</i>	<i>51</i>
3.2.2. <i>Síntese do 4-aminometil-1-pirenilmetil-amina (Pir-dab)</i>	<i>53</i>
3.2.3. <i>Síntese do terc-butil-N-[4-bis-(1-pirenilmetil)amino-butil]-carbamato (Pir2-dab-Boc).....</i>	<i>55</i>
3.2.4. <i>Síntese do (4-aminobutil)-bis-(1-pirenil-metil)-amina (Pir2-Dab)</i>	<i>57</i>

3.2.5.	<i>Síntese do 2-(((3-((4-aminobutil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilfenil)metil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil}-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol – H₂LAB.....</i>	59
3.2.6.	<i>Síntese do 2-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-((4-((piren-1-ilmetil)amino)butil)amino)metil)fenil)metil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil]-4-metilfenol – H₂LP1</i>	61
3.2.7.	<i>Síntese do 2-(((3-((4-[[bis(piren-1-ilmetil)amino]butil)amino)metil]-2-hidroxi-5-metilfenil)metil) (piridin-2-ilmetil)amino)metil}-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino] metil]-4-metilfenol – H₂LP2.....</i>	63
3.3.	SÍNTESE DOS COMPLEXOS	65
3.3.1.	<i>Síntese do Perclorato de μ-hidroxo-2-(((3-((4-aminobutil amino)metil) -2-hidroxi-5-metilfenil)metil)(piridin-2-ilmetil) amino)metil}-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol Ferro(III) Zinco(II) – FeZnLAB.....</i>	65
3.3.2.	<i>Síntese do Perclorato de μ-hidroxo-2-[[bis(piridin-2-ilmetil) amino]metil] -6-(((2-hidroxi-5-metil-3-((4-((piren-1-ilmetil) amino)butil)amino)metil)fenil)metil) (piridin-2-ilmetil)amino) metil]-4-metilfenol Ferro(III) Zinco(II) – FeZnLP1.....</i>	66
3.3.3.	<i>Síntese do Perclorato de μ-hidroxo-2-(((3-(((4-[[bis(piren-1-ilmetil)amino]butil)amino)metil] -2-hidroxi-5-metilfenil)metil) (piridin-2-ilmetil)amino)metil} -6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino] metil]-4-metilfenol Ferro(III) Zinco(II) – FeZnLP2.....</i>	68
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES.....	70
4.1.1.	<i>Espectroscopia no Infravermelho – IV.....</i>	71
4.1.2.	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN-¹H.....</i>	72
4.1.3.	<i>Espectrometria de Massa com Ionização por Eletrospray – ESI-MS</i>	75
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS.....	77
4.2.1.	<i>Espectroscopia no Infravermelho – IV.....</i>	78
4.2.2.	<i>Análise Elementar de CHN.....</i>	79
4.2.3.	<i>Condutometria.....</i>	80
4.2.4.	<i>Espectroscopia Eletrônica – UV-vis.....</i>	80
4.2.5.	<i>Espectrometria de massa – ESI-MS.....</i>	82
4.2.6.	<i>Eletroquímica.....</i>	85
4.2.7.	<i>Titulação Potenciométrica.....</i>	87
4.2.8.	<i>Proposta de estrutura</i>	90

4.3.	ESTUDOS DE REATIVIDADE.....	91
4.3.1.	<i>Efeito do pH na Hidrólise do 2,4-bdnpp.....</i>	92
4.3.2.	<i>Efeito da Concentração do Substrato na Hidrólise do 2,4-bdnpp</i>	96
4.3.3.	<i>Proposta mecanística para a Hidrólise do 2,4-bdnpp.....</i>	99
4.4.	ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM DNA.....	101
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
6.	REFERÊNCIAS	107

1. INTRODUÇÃO

Há muito se conhece sobre a presença de íons metálicos em sistemas biológicos e também de sua importância para a manutenção da vida. De fato, alguns íons como Na^+ , K^+ e Ca^{2+} podem ser facilmente encontrados em seres vivos. Entretanto, o papel de alguns metais e o impacto destes sobre organismos vivos permaneceram cheios de incertezas; até que a química inorgânica e principalmente a química de coordenação liderassem uma intensa busca nesta área a partir dos anos 50. (ROAT-MALONE 2002)

Métodos teóricos e experimentais criados neste período e suas aplicações em problemas bioquímicos levaram ao surgimento de um novo campo do conhecimento conhecido hoje como *química bioinorgânica* ou *química inorgânica biológica*. (KAIM & SCHWEDERSKI 1994)

1.1. A Química Bioinorgânica – O Início

Com o aparecimento de publicações na década de 50 envolvendo íons metálicos em sistemas biológicos, começou-se a discutir sobre a necessidade da criação de uma nova disciplina que residisse na interface entre estas duas áreas do conhecimento. Somente em 1962 foi realizado o primeiro congresso científico com esta motivação, o *Gordon Research Conference on Metals in Biology*. (GRAY 2003)

Em 1983, liderado pelo Prof. Ivano Bertini em Florença, foi realizado o primeiro *“International Conference on Biological Inorganic Chemistry”* (ICBIC), que hoje está na sua 16ª edição (ICBIC-2013), e é o principal evento internacional dedicado a esta área. Desde então o número de publicações e eventos envolvendo o tema vem crescendo de modo significativo até os dias de hoje. (GRAY 2003)

De um modo geral, o próprio termo *Química Bioinorgânica* já demonstra a motivação interdisciplinar desta área. Ela está posicionada entre a química e as ciências biológicas e abrange uma série de tópicos que vão desde o estudo da ocorrência de íons metálicos em sistemas biológicos, o uso de íons metálicos como fármacos e ainda a utilização destes metais em compostos modelo para a compreensão de sistemas biológicos. (LIPPARD & BERG 1994; DRENNAN & TOLMAN 2007)

Um dos sistemas biológicos de maior interesse tanto farmacológico como industrial são as enzimas. Estas são as biomoléculas mais notáveis e especializadas dos sistemas vivos e apresentam como característica principal uma extraordinária eficiência catalítica. Ainda, algumas destas são alvos no desenvolvimento de fármacos para uma série de doenças como osteoporose, câncer, depressão entre outras. Desta forma existe um grande interesse no

estudo e conhecimento da função e atividades de enzimas em sistemas biológicos.(ROAT-MALONE 2002; MITIĆ, SMITH et al. 2006)

1.2. Metaloenzimas: Grandes compostos de coordenação

Metaloenzimas podem ser definidas como biopolímeros constituídos de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas, organizados de maneira a formarem uma estrutura tridimensional (sítio ativo) que possui um ou mais íons metálicos. Portanto, o sítio ativo de uma metaloenzima consiste de uma cadeia de proteínas, pontes exógenas e ligantes terminais que compõem a primeira esfera de coordenação de cada íon metálico. Esta composição faz com que as metaloenzimas sejam consideradas como complexos metálicos altamente elaborados, conforme exemplificado na Figura 1: (LIPPARD & BERG 1994; LINDQVIST, JOHANSSON et al. 1999; ROAT-MALONE 2002; SCHENK, ELLIOTT et al. 2008)

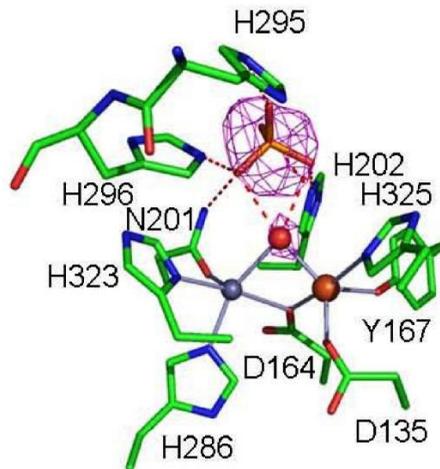


Figura 1 – Sítio Ativo da Enzima Fosfatase Ácida Púrpura extraída do Feijão Vermelho (Red kidney bean PAP) (SCHENK, ELLIOTT et al. 2008).

As enzimas são biocatalisadores altamente especializados em relação às reações que catalisam. A maior parte do seu poder catalítico vem da capacidade de aproximar os substratos em orientações favoráveis que promovam a formação dos estados de transição. Assim, a enzima muda o caminho de reação de modo a diminuir a energia livre de formação do estado

de transição, fazendo com que a energia livre de ativação da reação (ΔG^\ddagger) também diminua. Este efeito aumenta estatisticamente o número de moléculas com essa energia a uma mesma temperatura e, portanto, aumenta a constante catalítica e a velocidade da reação. (WILCOX 1996; ROAT-MALONE 2002)

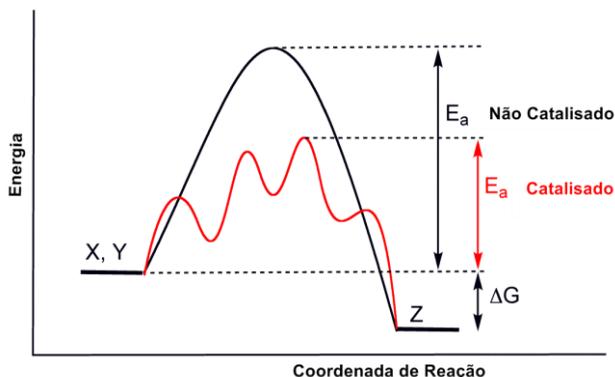


Figura 2 – Diagrama hipotético de Energia para um sistema catalisado por uma enzima.

Inicialmente as enzimas recebiam nomes arbitrários. Por exemplo, primeira enzima descoberta, em 1833, recebeu na época o nome "diastase" (hoje chamada amilase). Com o número crescente de enzimas descobertas houve a necessidade de sistematizar os nomes das mesmas e a partir de então foi decidido atribuir nomes relativos aos substratos que catalisam e contendo a terminação "-ase". Por exemplo, a amilase catalisa a hidrólise do amido e as proteases quebram ligações peptídicas. Embora esta terminologia tenha simplificado a nomenclatura, a quantidade de enzimas conhecidas (milhares) levou à criação de um sistema de divisão de diferentes tipos de enzimas. Assim, a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) classifica as enzimas de acordo com as reações que catalisam. Dentro das seis classes destaca-se a das hidrolases (enzimas que catalisam reações de hidrólise), que são relacionadas com o presente trabalho. (LIPPARD & BERG 1994)

1.3. Metalhidrolases Binucleares

Metalhidrolases binucleares constituem um grande e estruturalmente diverso grupo de enzimas que possuem sítios ativos

binucleares para catalisar a hidrólise de amidas, ésteres de fosfato e de ácidos carboxílicos. (CRICHTON 2008) A Figura 3 mostra o sítio ativo de algumas enzimas desta classe, juntamente com seu conteúdo metálico e suas propostas mecanísticas de acordo com as reações que catalisam. (WILCOX 1996)

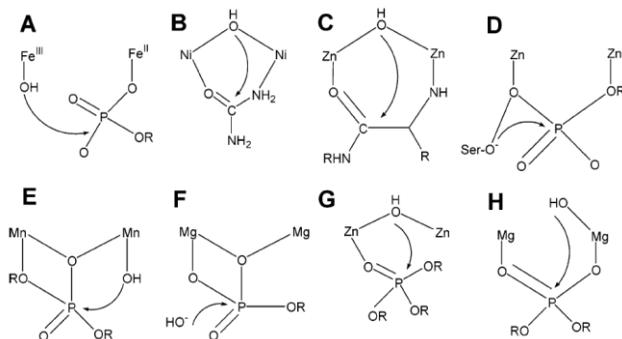


Figura 3 – Esquema demonstrativo do sítio ativo e seus substratos para diferentes metaloenzimas binucleares: (a) fosfatase ácida púrpura, (b) urease, (c) leucina amino-peptidase, (d) fosfatase alcalina, (e) endonuclease, (f), inositol monofosfatase (g) fosfotriesterase e (h) EcoRV endonuclease.

Os íons metálicos encontrados nestas enzimas têm efeitos cooperativos atuando de três maneiras distintas em mecanismos enzimáticos. Primeiramente, podem agir diminuindo o valor do pKa de moléculas de água ligadas ao metal, podendo gerar nucleófilos em condições de pH fisiológico. No segundo caso, o metal pode agir como sítio de ligação da enzima com o substrato. Finalmente, o centro metálico pode atuar no mecanismo hidrolítico por sua interação com o grupo de saída, desde que este possua uma carga negativa durante o estado de transição. (MITIĆ, SMITH et al. 2006; HAAS & FRANZ 2009)

Entretanto um fato curioso é que várias enzimas que possuem atividades similares, ou atuam sobre substratos semelhantes, possuem metais totalmente diferentes (conforme Figura 3). Isto demonstra a importância dos íons metálicos nestes sítios ativos e como a natureza se beneficia das propriedades destes íons metálicos para execução de diversos processos bioquímicos. (KAIM & SCHWEDERSKI 1994; HAAS & FRANZ 2009)

Várias destas enzimas foram investigadas e tiveram suas estruturas resolvidas por difratometria de raios X e técnicas espectroscópicas, bem como seus mecanismos de atividade foram amplamente estudados. (COLEMAN 1992; BARON, STEVENS et al. 1994; KLABUNDE, STRÄTER et al. 1996)

Como exemplo pode-se citar a fosfatase ácida púrpura (PAPs), uma enzima que catalisa a hidrólise de ésteres de fosfato em condições de pH ótimo entre 4 e 6 (Figura 4). As PAPs possuem um sítio ativo binuclear de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$ ($\text{M}^{\text{II}} = \text{Fe}, \text{Zn}, \text{Mn}$) onde a molécula de éster de fosfato se liga no centro de M^{II} , o que ativa o átomo de fósforo facilitando o ataque de um hidróxido ligado ao átomo de ferro. Vale destacar que as PAPs são as únicas metalohidrolases binucleares onde um sítio heterovalente ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$) se faz necessário para catálise. (DAVIS, LIN et al. 1981; KLABUNDE, STRÄTER et al. 1996; THAN, FELDMANN et al. 1999; SCHENK, GAHAN et al. 2005)

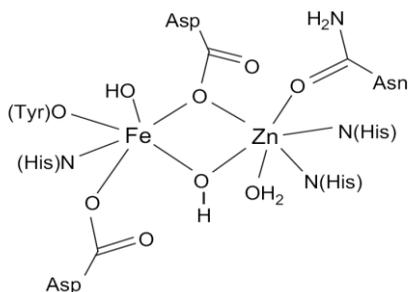


Figura 4 – Esquema do Sítio Ativo das PAPs.

Uma outra classe de enzimas com papéis fundamentais nos seres vivos são as nucleases. Elas são responsáveis pela quebra da ligação fosfodiéster presente entre pentoses no esqueleto do DNA. São comumente encontrados nos sítios ativos destas enzimas cátions divalentes, como Mg^{II} , Ca^{II} ou Zn^{II} como cofatores. De modo geral estes metais tem a função de estabilização dos intermediários formados, facilitando o mecanismo de hidrólise da cadeia de fosfatos. (NISHINO & MORIKAWA 2002)

Um exemplo de nuclease é a estafilococos nuclease (nuclease 3'-oligonucleotidohidrolase, EC 3.1.4.7) que é uma enzima extracelular, com uma dependência de Ca^{II} quanto a sua atividade, e é produzida por certos grupos de *Staphylococcus aureus*. Esta enzima é composta por 149 aminoácidos e apresenta uma massa molar de aproximadamente 17 kDa. (COTTON, HAZEN et al. 1979)

A estafilococos nuclease catalisa a hidrólise de DNA e RNA na posição 5' da ligação fosfodiéster, resultando na liberação de um grupo 5'-hidroxil e um grupo 3'-fosfato. Recentemente foi demonstrada a dependência dos íons Ca^{II} , sendo que a substituição por outros íons metálicos acaba por tornar a enzima inativa. Além da hidrólise de ácidos nucleicos, estafilococos nuclease também apresenta a habilidade de hidrolisar ésteres de fosfato do tipo p-nitrofenil-fosfato. Desta forma, para uma melhor compreensão de como estas enzimas interagem com estes ácidos nucleicos, é necessário o conhecimento da estrutura dessas moléculas, de vital importância a vida. (COTTON, HAZEN et al. 1979)

1.4. Ácidos Nucléicos

Ácidos Nucléicos são moléculas de elevada massa molecular que possuem um grupo fosfato, açúcares e bases purínicas e pirimidínicas, e são, portanto macromoléculas formadas por nucleotídeos. Dois ácidos nucleicos conhecidos são responsáveis por inúmeras funções indispensáveis à vida, o DNA e o RNA. (STRYER, BERG et al. 2002)

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é um composto orgânico cujas moléculas contêm as instruções genéticas que coordenam o desenvolvimento e funcionamento de todos os seres vivos. O seu principal papel é armazenar as informações necessárias para a construção de proteínas. Os segmentos de DNA que contêm a informação genética são denominados genes. O ácido ribonucleico (RNA) é o responsável pela síntese de proteínas da célula. O RNA é um polímero de nucleotídeos, geralmente em cadeia simples, que pode por vezes ser dobrado. As moléculas formadas por RNA possuem dimensões muito inferiores às formadas por DNA. A estrutura destes dois ácidos nucleicos está demonstrada abaixo na Figura 5 . (LIPPARD & BERG 1994; STRYER, BERG et al. 2002)

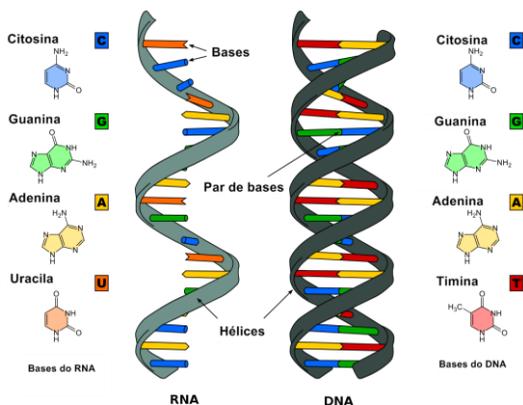


Figura 5 – Estrutura dos Ácidos Ribonucleico e Desoxiribonucleico. (KOOLMANN & ROEHM 2005)

Eles ocorrem naturalmente, como biopolímeros constituídos de nucleotídeos. Os nucleotídeos (Figura 6) são grupos compostos por uma base nitrogenada, uma pentose e um grupo fosfato. A base nitrogenada está ligada ao carbono 3 da pentose e o fosfato está esterificado ao carbono 5 da mesma. O DNA é composto por quatro diferentes bases nitrogenadas: adenina, citosina, timina e guanina (Figura 5). O RNA é composto pelas mesmas bases exceto pela uracila que substitui a timina. (STRYER, BERG et al. 2002)

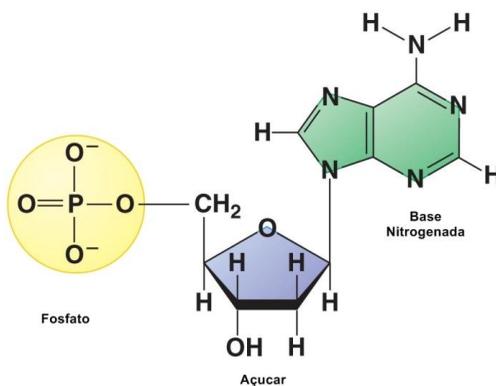


Figura 6 – Estrutura básica de um Nucleotídeo. (STRYER, BERG et al. 2002)

Ácidos nucléicos adotam geralmente um arranjo de dupla fita como estrutura secundária. O DNA é quase que exclusivamente encontrado na forma de dupla fita quando na forma negativa, enquanto que o RNA ocorre nesta conformação apenas sob certas condições. (NELSON & COX 2004)

A dupla fita do DNA permanece ligada por meio de ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas opostas de cada fita. O pareamento das bases mais comuns (chamado de Pareamento de Watson-Crick - Figura 7) envolve um pareamento entre purinas e pirimidinas C-G e A-T. (WATSON & CRICK 1953) Em raros exemplos podem ocorrer outros tipos de pareamento, denominados como mutações e geralmente são corrigidos por mecanismos de reparos dos genes. Uma característica muito importante que ajuda na manutenção da estrutura do DNA é o empilhamento através de interações π - π entre as bases nitrogenadas aromáticas da cadeia de nucleotídeos. (STRYER, BERG et al. 2002; KEENE, SMITH et al. 2009)

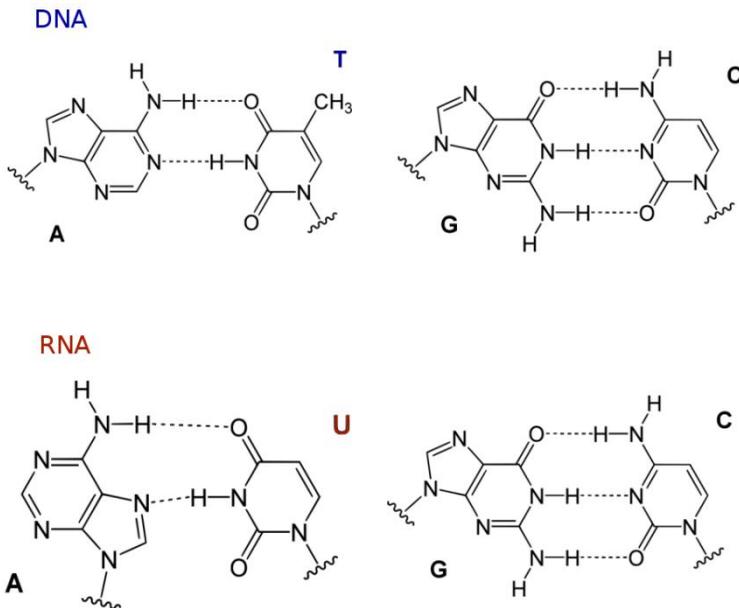


Figura 7 – Esquema demonstrativo do pareamento das bases nitrogenadas na cadeia do DNA e RNA.

Existem ainda estruturas no DNA que são denominadas *não-duplex*, por se tratar de regiões onde a dupla fita não é formada por alguma alteração na cadeia de nucleotídeos. As formas mais comuns são as regiões de bases não pareadas, os loops internos ou ainda as estruturas de *hairpin loops* demonstrados na Figura 8. (NEIDLE 2008; KEENE, SMITH et al. 2009)

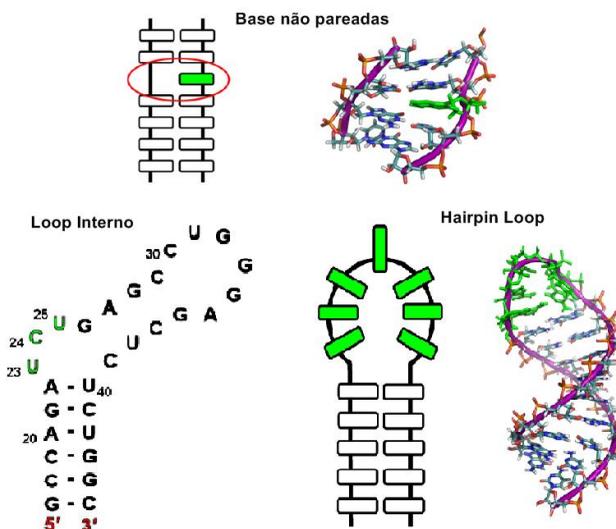


Figura 8 – Estruturas não-duplex encontradas na cadeia do DNA (destacadas em verde). (KEENE, SMITH et al. 2009)

1.5. Modos De Interação Com Ácidos Nucléicos

Dada a importância do conhecimento da estrutura terciária do DNA, existe um grande interesse no desenvolvimento de moléculas que reconheçam de alguma maneira estas estruturas. Compostos que possam tanto reconhecer sequências de pares de bases ou estruturas do tipo não-duplex envolvidas no controle da expressão de genes são considerados como potenciais agentes quimioterápicos para uma variedade de doenças. (KEENE, SMITH et al. 2009) Complexos metálicos podem interagir com diferentes regiões do DNA de diversas formas tanto no DNA quanto no RNA.

Uma das formas de interação conhecida hoje é a chamada ligação covalente. Como o DNA e o RNA são poliânions, sua associação é particularmente significativa desde que o metal ou a forma ativa do complexo esteja na forma catiônica. A cisplatina ($cis\text{-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$), por exemplo, é um complexo neutro que em meio fisiológico libera um de seus cloretos formando um complexo carregado positivamente. Isto o torna altamente citotóxico, uma vez que ele adquire a habilidade de se ligar covalentemente ao DNA (Figura 9). (KEENE, SMITH et al. 2009)

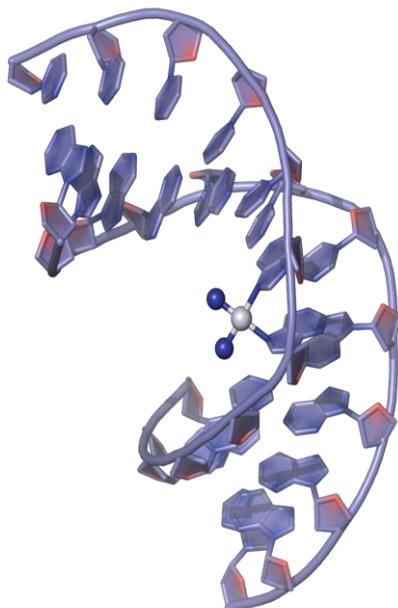


Figura 9 – Estrutura de Raios X do DNA ligado covalentemente ao complexo cisplatina. (KEENE, SMITH et al. 2009)

Outra forma conhecida é a intercalação. Os grupos intercaladores se ligam ao DNA através de uma inserção de grupos planares poli aromáticos entre as bases nitrogenadas (interações $\pi\text{-}\pi$). São conhecidos inúmeros complexos que possuem essa habilidade, geralmente compostos com a 1,10-fenantrolina (Phen) ou outros grupos poli aromáticos como a acridina ou o pireno. (SHELL & MOHLER 2007) Estes grupos apresentam certa especificidade para pares do tipo C-G, mas não apresentam seletividade em estruturas do tipo não-duplex. (HOWE-GRANT & LIPPARD 1979; YANG, METERA et al. 2010)

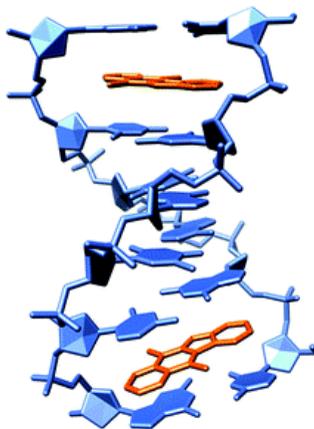


Figura 10 – Estrutura de Raios X do DNA ligado ao agente intercalante Elipticina. (BOER, CANALS et al. 2009)

Sabe-se hoje que a maioria dos compostos contendo metais inertes ligam-se ao DNA por meio do sulco menor e possuem uma afinidade por regiões ricas em sequências A-T (LIANG, EASON et al. 1995). Foram demonstrados vários exemplos de complexos com ligantes não intercalantes como peptídeos e a 2,2'-bipiridina que possuem esta mesma tendência. Isto provavelmente ocorre devido a interações hidrofóbicas e eletrostáticas juntamente com grupos que possam compartilhar ligações de hidrogênio nestas regiões como apresentado na Figura 11 onde a distamicina aparece ligada na região do sulco menor (KEENE, SMITH et al. 2009).

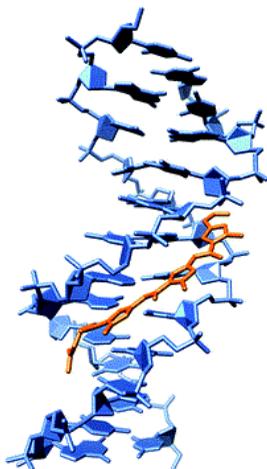


Figura 11 – Estrutura de raios X do DNA com a distamicina ligada no sulco menor. (BOER, CANALS et al. 2009)

1.6. Compostos Modelo em Química Bioinorgânica

Íons metálicos tem sido usados na formação de compostos de baixa massa molecular, de modo a assumir conformações específicas para o estudo de interações com biomoléculas. A facilidade com que se projetam ligantes (se comparado a biomoléculas) para que assumam uma certa conformação tridimensional em torno do metal é uma grande estratégia na utilização destes compostos para a interação com ácidos nucleicos (LIPPARD & BERG 1994).

Diversos grupos de pesquisa tem trabalhado com compostos modelo para o estudo comparativo de algumas metaloenzimas binucleares. Neves e colaboradores (NEVES, LANZMASTER et al. 2007) publicaram o primeiro exemplo de um complexo binuclear de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ que mimetiza propriedades estruturais e físico-químicas das fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) por possuir a mesma unidade estrutural presente no sítio ativo da enzima ($\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}$). Isto foi conseguido justamente pela estrutura não simétrica do ligante H_2bpbmp . Devido à presença do grupo fenolato terminal coordenado ao centro de Fe^{III} o complexo reproduz várias propriedades espectroscópicas (TCLM fenolato-Fe = 486 nm) e eletroquímicas da enzima ($E_{1/2} = -0,2$ V). O ligante não simétrico ainda consegue orientar seletivamente os íons metálicos

para os centros duro e macio. (LANZMASTER, NEVES et al. 2002; XAVIER, NEVES et al. 2009; JARENMARK, HAUKKA et al. 2011; SMITH, PERALTA et al. 2012)

A atividade de fosfatase deste complexo também foi estudada com o substrato bis(2,4-dinitrofenil)-fosfato (2,4-bdnpp) segundo o modelo de Michaelis-Menten. (STRYER, BERG et al. 2002) O composto apresentou um $k_{cat} = 9,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e um fator de aceleração de aproximadamente 4800 vezes em comparação a reação não catalisada. (NEVES, LANZMASTER et al. 2007) Vários outros complexos binucleares de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$ foram publicados visando a modelagem biomimética dessas metalohidrolases e tiveram suas atividades de hidrólise de ésteres de fosfato estudadas. (GAHAN, SMITH et al. 2009) Além da atividade de hidrólise do substrato modelo 2,4-bdnpp os complexos foram testados na atividade de clivagem da ligação fosfodiéster, presentes nos ácidos nucléicos.

1.6.1. Modelagem da Segunda Esfera de Coordenação

Outra preocupação recente, e que ainda não dispões de muitos exemplos na literatura é a tentativa de modelar a segunda esfera de coordenação em complexos metálicos. Na primeira esfera de coordenação são modelados diretamente as ligações entre os centros metálicos e seus átomos doadores. Já na segunda esfera estão presentes ligações (interações) não covalentes que estariam associadas a um aumento na interação entre o catalisador e seu substrato.(FUNHOFF, WANG et al. 2005; SHOOK & BOROVIK 2010) Uma das principais razões para haver poucos exemplos na modelagem da segunda esfera de coordenação, se encontra na inabilidade de utilizar interações não covalentes de uma forma planejada ou premeditada.

Em muitas enzimas esses efeitos já são bem conhecidos, e são responsáveis diretamente pela alta eficiência catalítica. Como exemplo pode-se citar a carboxipeptidase A (CPA), que é uma enzima que catalisa a hidrólise de ligações peptídicas. Acredita-se que o mecanismo de hidrólise da CPA passa por uma etapa de catálise ácido-base geral. A Tyr248 (Figura 12) atua como um direcionador do substrato via interações hidrofóbicas, enquanto a Arg145 realiza ligações de hidrogênio com o grupo carboxilato do substrato, atuando como uma âncora, fixando o substrato. O Glu270 age como um acceptor/doador de prótons, ajudando na desprotonação da água ligada ao íon Zn^{II} gerando o nucleófilo que fará o ataque nuceofílico da carbonila.(ZHAO, WANG et al. 2013)

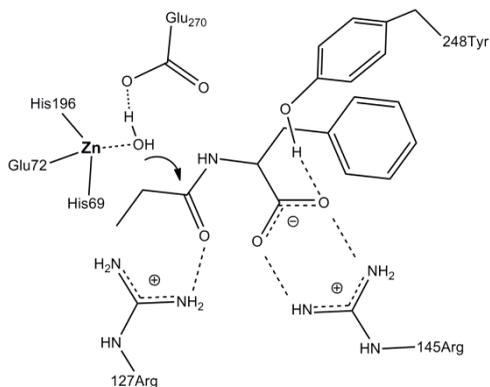


Figura 12 – Ilustração do sítio ativo da Carboxipeptidase A.

Outro sistema enzimático que apresenta uma influência significativa da segunda esfera de coordenação são as fosfatases ácidas púrpuras. Averill e colaboradores demonstraram a importância da Histidina-92 nas reações de hidrólise de ésteres de fosfato. Ao sintetizar uma enzima mutante e substituindo a Histidina-92 por uma Alanina houve uma diminuição de 10 vezes na atividade catalítica. Entretanto, ao substituir a Histidina-92 por uma Asparagina, que não pode agir como um aceptor/doador de prótons e sim apenas por ligações de hidrogênio, resulta num aumento da atividade de 3 vezes maior. (FUNHOFF, WANG et al. 2005)

Dentre os poucos exemplos existentes na literatura, Comba e colaboradores reportaram a síntese e a atividade de hidrolase para o complexo binuclear $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{L}^3)(\text{OH})(\text{OH}_2)_2]$ (Figura 13), onde os autores sugerem que uma amina aromática proveniente do ligante é capaz de estabilizar a ligação monodentada do ester de fosfato ao complexo, o que facilitaria o ataque do grupo hidroxila terminal ligado ao átomo de Fe^{III} . Esta interação possibilita ao complexo hidrolisar o substrato dnpp, sendo o primeiro exemplo descrito de complexo binuclear de valência mista capaz de hidrolisar o monoéster dnpp. Isto por si só demonstra como estas interações na segunda esfera de coordenação podem auxiliar no aumento da eficiência de novos catalisadores. (COMBA, GAHAN et al. 2012)

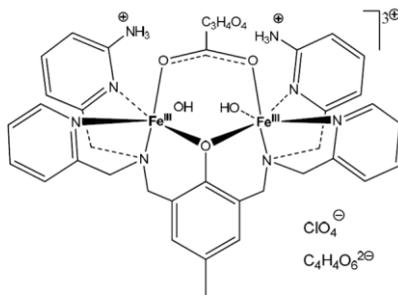


Figura 13 – Ilustração da estrutura do complexo $[Fe^{III}Fe^{II}(L^3)(OH)(OH_2)_2]$ que apresenta efeitos de segunda esfera de coordenação.

1.6.2. Complexos Modelos Como Nucleases Sintéticas

Atualmente, a hidrólise biomimética de ácidos nucleicos tem sido alvo de intensa pesquisa em muitos segmentos da biotecnologia e medicina. A habilidade de clivar essas macromoléculas eficientemente, de maneira não degradativa e com alto grau de seletividade para sítios e/ou estruturas específicas, pode oferecer muitas aplicações para a manipulação de genes, desenvolvimento de sondas moleculares e ainda novos compostos com finalidades terapêuticas. (MANCIN, SCRIMIN et al. 2012)

No início dos anos 2000 Scarpelini e colaboradores publicaram o complexo $[Cu(Hismima)(OH_2)(OH)]^{1+}$ (Figura 14 A) que foi ativo na hidrólise do 2,4-bdnp. O mesmo complexo mostrou-se ativo na clivagem do DNA na ausência de O_2 , o que sugere que o processo ocorra através de um mecanismo hidrolítico, o que segundo os autores concorda com o mecanismo de hidrólise do substrato modelo. (SCARPELLINI, NEVES et al. 2003)

Boseggia e colaboradores reportaram um exemplo de complexo mononuclear de Zinco(II) (Figura 14 B) com um ligante cis-cis-triaminociclohexano contendo um grupo antraquinona. Eles demonstraram que o grupo antraquinona devido a sua capacidade de se intercalar ao DNA gerou num aumento da atividade hidrolítica de 15 vezes em relação ao mesmo complexo sem o grupo intercalante. Outra informação extremamente importante reside no tamanho do grupo espaçador. Eles demonstraram que cadeias muito curtas acabam por diminuir ou até inibir a atividade de hidrólise do DNA. (BOSEGGIA, GATOS et al. 2004)

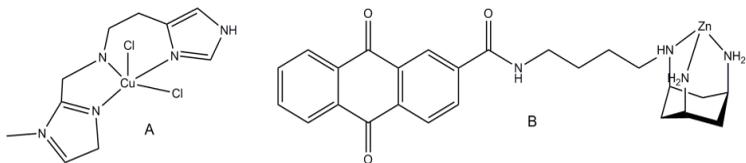


Figura 14 –Nucleases sintéticas: Cu(Hismima) e Zn(TriaminoHexano).

Barton e colaboradores apresentaram um complexo de Rh conjugado com um peptídeo. O $[Rh2(bpy')]_2$ -peptídeo denominado Rh-P. Um peptídeo de cadeia curta foi tratado com o complexo de Rh através de um grupo espaçador (Figura 15 A) ligado ao grupo biperidina. A adição de duas histidinas localizadas nas posições 7 e 11 do peptídeo criaram um ambiente de coordenação para um átomo de Zn^{II} orientado na parte externa da α -hélice. Testes com apenas o complexo de Rh ou o peptídeo com Zn^{II} não possuem atividades significativas, porém quando os dois complexos atuam em conjunto a atividade é aumentada significativamente com uma taxa de aceleração na ordem de 10^{11} vezes. (FITZSIMONS & BARTON 1997; ERKKILA, ODOM et al. 1999; SREEDHARA & COWAN 2001)

Finalmente, como exemplo de uma nuclease sintética contendo íons Fe^{III} podemos citar o trabalho de Chen e colaboradores, onde eles publicaram a síntese e a atividade de um complexo binuclear de Fe^{III} contendo dois grupos acridina (Figura 15 B) (CHEN, FAN et al. 2009). O complexo apresentou uma grande afinidade pelo DNA demonstrado pelo alto valor na constante de ligação ($K_b = 7,6 \times 10^5 M^{-1}$). Um resultado muito importante neste sistema foi aumento de 300 vezes em relação ao complexo que não possui os grupos acridina. Além disso experimentos na ausência de oxigênio apontam para um mecanismo hidrolítico o que é altamente desejável para futuras aplicações bioquímicas deste sistema.

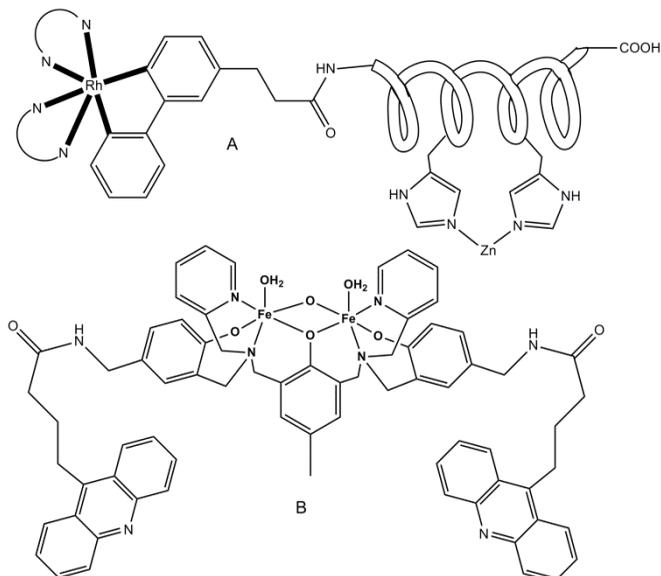


Figura 15 – Nucleases Sintéticas: $[\text{Rh}_2(\text{bpy})]$ -peptídeo (A) e $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{L-Acridina})]$ (B).

Um fato bastante importante demonstrado nos últimos anos entre nucleases sintéticas, é que a adição de grupos que possam apresentar maior interação com a cadeia do DNA fornecem atividade hidrolítica significativamente maior na hidrólise destas biomoléculas. Chen e colaboradores reportaram um trabalho com um complexo binuclear de Fe^{III} semelhante ao da **Figura 15 B**. (CHEN, WANG et al. 2008) Este complexo possui um grupo pireno ligado por um grupo espaçador na posição 6 do fenol central. A adição deste grupo pireno apresentou um aumento significativo na atividade hidrolítica do DNA em relação ao complexo sem o grupo pireno.

Neste sentido, apresenta-se neste trabalho o desenvolvimento de novos complexos heterobimetálicos de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ com novos ligantes não simétricos que possuem grupos intercalantes que possam aumentar a afinidade e a atividade de clivagem do DNA. Além disso, serão utilizadas diaminas secundárias como espaçadores entre o centro catalítico e o intercalador, as quais poderão estar protonadas sob condições de pH fisiológico podendo dessa forma, exercer atividades secundárias na estabilização das cargas negativas do substrato no estado de transição (efeitos de segunda esfera).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Desenvolvimento de novos ligantes contendo grupos fenólicos e piridínicos capazes de gerar complexos heterobinucleares de valência mista e que simultaneamente contenham grupos intercalantes para o estudo de interação com ácidos nucléicos.

2.2. Objetivos Específicos

- Projetar, sintetizar e caracterizar novos ligantes não simétricos baseados no ligante já existente H₂bpbpmp, contendo grupos espaçadores (diaminobutano) e grupos pireno como intercalantes.
- Sintetizar novos compostos de coordenação heterobinucleares de Fe^{III}Zn^{II}, e caracterizar os mesmos por meio de análises elementares, espectroscópicas.
- Estudar comparativamente as propriedades físico-químicas dos novos compostos sintetizados com metalohidrolases e nucleases sintéticas descritas na literatura.
- Avaliar a reatividade destes complexos frente à esteres de fosfato, buscando compreender o efeito de segunda esfera de coordenação gerado pelos grupo diaminobutano e pireno no mecanismo de atividade dos mesmos e comparar com outros modelos já descritos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais Métodos e Instrumentação

3.1.1. Materiais

Os seguintes reagentes, materiais, gases e solventes empregados nas sínteses e análises, foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia: hidróxido de sódio, ácido clorídrico 37%, sulfato de sódio anidro, ácido trifluoroacético, hidróxido de potássio, 1-hidroximetil-pireno, pireno-carboxialdeído, 2-(2-aminometil)piridina, salicilaldeído, trietilamina, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, borohidreto de sódio, hidróxido de lítio, ácido sulfúrico 98%, brometo de potássio grau espectroscópico, cloreto de potássio, piridina, tampões biológicos MES, HEPES, CHES, perclorato de lítio, carvão ativo, celite, sílica gel azul, perclorato de ferro(III) nonahidratado, perclorato de zinco(II) hexahidratado, acetato de sódio trihidratado, perclorato de cobre(II), perclorato de sódio, ferroceno, argônio 5.0, hidrogênio, nitrogênio 2.0, clorofórmio deuterado, água deuterada, clorofórmio PA, acetonitrila PA, diclorometano PA, isopropanol PA, metanol PA, tetrahidrofurano PA, etanol absoluto, éter etílico PA, acetona PA, etanol, acetonitrila grau espectroscópico.

Foram purificados antes de utilizados os seguintes reagentes: hexafluorofosfato de tetrabutilamônio recristalizado em etanol, 2-piridinacarboxialdeído (destilado à pressão reduzida), 2,4-dinitrofenol (recristalizado em clorofórmio). Os compostos bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-bdnp)(BUNTON & FARBER 1969), 1-bromometil-pireno (XU, SINGH et al. 2009), *N*-Boc-1,4-diaminobutano (KRAPCHO & KUELL 1990) e o ligante binucleante H₂py₃mff (PIOVEZAN, JOVITO et al. 2010) foram sintetizados, purificados e caracterizados de acordo com seus respectivos procedimentos descritos na literatura.

3.1.2. Métodos e Instrumentação

3.1.2.1. Análise Elementar de CHN

As medidas para a determinação dos percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio para os complexos sintetizados foram realizadas em

um analisador elementar de C, H, N e S – Perkin-Elmer 2400 usando uma balança Perkin-Elmer AD-4 Autobalance e capsula de estanho, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo – USP.

3.1.2.2. Espectroscopia no Infravermelho – FT-IR

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum 100, na região de 4000 a 450 cm^{-1} no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. As amostras sólidas foram analisadas em pastilha de KBr (grau espectroscópico) e as amostras líquidas em filme.

3.1.2.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio RMN-¹H

Os espectros de RMN-¹H dos dos ligantes foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker FT-NMR 200 MHz, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC. Os deslocamentos químicos de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ ppm) e água, acetonitrila e clorofórmio deuterados como solvente.

3.1.2.4. Condutometria

As análises de condutividade molar para todos os complexos foram efetuadas em um condutivímetro Metrohm 900 Touch Control, utilizando-se acetonitrila (grau espectroscópico) e concentrações de $1,0 \times 10^{-3}$ mol.L^{-1} das espécies a serem analisadas, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. As análises foram realizadas após a calibração do equipamento com solução padrão de KCl ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ - $\Lambda M = 1408 \text{ } \Omega^{-1}.\text{cm}^2.\text{mol}^{-1}$) a temperatura de $25,00 \pm 0,05$ °C estabilizada com auxílio de um banho termostatzado. Os valores para sistemas nao aquosos foram ajustados segundo Geary e colaboradores. (GEARY 1971)

3.1.2.5. Espectrometria de massa – ESI-MS

As análises de espectrometria de massa com ionização via eletrospray (ESI-MS) dos ligantes e complexos foram realizadas em um equipamento Amazon - Ions Trap MS, em soluções de Acetonitrila, Acetonitrila/Água (1:1) em concentrações de 1-5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e fluxo de 180 $\mu\text{L.min}^{-1}$. A temperatura do capilar foi mantida entre 180 e 200°C e a voltagem do capilar entre -400 e -500 V.

3.1.2.6. Espectroscopia Eletrônica

Os espectros eletrônicos nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho próximo foram obtidos para todos os complexos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo Lambda-750, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. As análises foram realizadas utilizando-se solventes de grau espectroscópico e cubetas de quartzo com capacidade para 4 mL e 1,00 cm de caminho óptico. Os valores de ϵ são dados em $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

3.1.2.7. Eletroquímica

O comportamento redox dos complexos foi investigado por voltametria de onda quadrada potenciostato-galvanostato BAS (Bioanalytical Systems, Inc.) modelo Epsilon, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. Nos experimentos realizados para os compostos foram utilizadas soluções de acetonitrila/água (2:1), sob atmosfera de argônio com hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (0,1 mol.L^{-1}) como eletrólito suporte e a cela eletroquímica composta por três eletrodos: eletrodo de trabalho – carbono vítreo; eletrodo auxiliar – fio de platina; eletrodo de referência – Ag/Ag⁺. Para correção do eletrodo de referência utilizou-se o ferroceno ($E_{1/2}$ vs ENH = 400 mV) como padrão interno (GAGNE, KOVAL et al. 1980).

A reversibilidade dos processos eletroquímicos foi analisada considerando os seguintes pontos:

Processos reversíveis

O módulo da diferença entre os potenciais de pico catódico e anódico ($\Delta E_p = |E_{pc} - E_{pa}|$) deve ser de 58 mV para processos reversíveis que transferem apenas 1 e⁻. A razão I_{pc} e I_{pa} deve ser aproximadamente igual a 1, sendo I_{pc} a corrente máxima catódica e I_{pa} a corrente máxima anódica.

Processos quasi-reversíveis

Os potenciais de pico (E_p) aumentam com o aumento da velocidade de varredura. Os valores de ΔE_p variam de maneira pronunciada de acordo com a velocidade de varredura de potenciais.

Processos irreversíveis

Ao efetuar varreduras em diferentes velocidades os potenciais deslocam-se sempre para sentidos anódicos (E_{pa}) ou catódicos (E_{pc}) não se observando, geralmente, o pico de retorno.

3.1.2.8. Titulação Potenciométrica

As constantes de protonação para os complexos FeZnLP1, FeZnLAB foram determinadas por titulação potenciométrica no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. Estes experimentos foram realizados em solução de acetonitrila/água (50:50% v/v) devido à baixa solubilidade dos complexos em água. Utilizou-se titulador automático Metrohm 848 Titrino Plus acoplado a um eletrodo de vidro combinado (Ag/AgCl), calibrado com uma solução de HCl (0,010 mol.L⁻¹) e uma solução padrão de KOH (0,100 mol.L⁻¹) em acetonitrila/água 50:50% v/v, em uma célula termostaticada a 25,00 ± 0,05 °C para leitura direta de pH ($p[H] = -\log[H^+]$). As soluções foram preparadas com água bidestilada na presença de KMnO₄ e fervida e acetonitrila espectroscópica. As medidas foram realizadas em uma célula termostaticada a 25,00 ± 0,05 °C contendo uma solução do complexo (0,025 mmol) em 50 mL de solução acetonitrila/água 50:50% v/v e a força iônica ajustada para 0,100 mol.L⁻¹ com KCl, sob fluxo de argônio para eliminar a presença de CO₂ atmosférico. As soluções de complexos tiveram o pH ajustado para próximo de 3,0 pela adição de 0,100 mL de HCl 1,0 mol.L⁻¹ resultando em um volume final de 50,1 mL e foram tituladas com uma solução padrão de KOH 0,100 mol.L⁻¹ até pH ≈ 11,5. O pK_w da solução acetonitrila/água 50:50% v/v contendo 0,100 mol.L⁻¹ de KCl utilizado para os cálculos, foi 15,40. (HERRADOR & GONZÁLEZ 2002) As titulações foram realizadas em duplicata e os valores apresentados referem-se à média dos dois experimentos. As constantes de equilíbrio foram calculadas com o programa BEST7 (MARTELL &

MOTEKAITIS 1992) os diagramas de distribuição das espécies presentes em solução em função do pH foram obtidos com os programas SPE e SPEPLOT (MARTELL & MOTEKAITIS 1992), através de uma colaboração com o Prof. Dr. Bruno Szpoganicz .

3.1.2.9. Reatividade

Os complexos tiveram sua atividade catalítica avaliada através da reação de hidrólise do substrato bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-bdnp) (BUNTON & FARBER 1969). Os experimentos cinéticos foram realizados em triplicata sob condições de excesso de substrato monitorando-se espectrofotometricamente, em um espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostático. A variação de absorvância ocorrida em 400 nm ($\epsilon = 12100 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), está relacionada à liberação do ânion 2,4-dinitrofenolato, como produto da reação de hidrólise, respectivamente (BATISTA, NEVES et al. 2003). As reações foram monitoradas até 5% de conversão de substrato a produto e os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais (PISZKIEWICZ 1977). As velocidades iniciais foram obtidas diretamente do gráfico da concentração de substrato as velocidades iniciais foram obtidas da concentração do 2,4-dnp liberado versus o tempo.

Os estudos em função do pH para a atividade de hidrólise dos complexos, os quais visam a obtenção do pH ótimo de atividade frente a hidrólise do substrato bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-bdnp) e os valores de pKa cinéticos para cada complexo. Foram realizados estudos de variação da concentração de substratos em diferentes pH's (entre 5,0 e 9,0) a 25 °C. Utilizaram-se cubetas de quartzo e/ou vidro óptico com capacidade para 4000 μL e caminho óptico de 1 cm, fechadas com tampa de teflon, nas quais foram adicionados 500 μL de solução aquosa do tampão ($[\text{T}]_{\text{final}} = 3,3 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (MES pH 4,0, a 6,5; HEPES pH 7,0 a 8,5; CHES pH 9,00) com força iônica mantida constante ($I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, LiClO_4), 940-500 μL de acetonitrila e 60-500 μL de uma solução em acetonitrila do substrato ($[\text{S}]_{\text{final}} = 0,7\text{-}6,4 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). A reação foi iniciada com a adição 60 μL de uma solução em acetonitrila do complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 6,5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). As velocidades iniciais foram obtidas da inclinação da curva da absorvância versus tempo nos primeiros 15 minutos de reação. O tratamento matemático utilizado para a obtenção dos parâmetros cinéticos foi o método não-linear de Michaelis-Menten (PISZKIEWICZ 1977).

O estudo do efeito isotópico de deutério na hidrólise do 2,4-bdnp pelos complexos foi realizado pelo acompanhamento de duas reações paralelas onde as soluções tampões HEPES pH e pD = 6,5 (corrigido) foram

previamente preparadas em H₂O e D₂O. As reações foram monitoradas, sob condições de 300 vezes de excesso do substrato, em 400 nm a 25 °C. para todos os complexos que tiveram sua reatividade avaliada.

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

3.1.2.10. Estudos de interação com DNA

Foram realizados três tipos de experimentos para avaliar a interação dos complexos com o DNA. Inicialmente foi feita uma titulação via espectroscopia eletrônica dos complexos. Foi usado uma solução 200 μmol L⁻¹ de DNA-CT, 50 mmol L⁻¹ de tampão Tris-HCl (pH 7,2), sendo a proporção de acetonitrila/água de 25/75 (v/v). A concentração final da solução de DNA-CT foi obtida através da absorbância em 260 nm ($\epsilon = 6.600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os complexos foram titulados com diferentes alíquotas de DNA-CT e o espectro obtido em cada ponto. Os valores de absorbância foram corrigidos para a diluição e a constante de equilíbrio K_b foi obtida por ajustar os valores à equação:

$$\frac{[DNA]}{(\epsilon a - \epsilon f)} = \frac{[DNA]}{(\epsilon b - \epsilon f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon b - \epsilon f)}$$

Onde ϵf e ϵb são as absorvidades molares do complexo livre e completamente ligado, respectivamente, e ϵa absorvidade após cada adição. (WOLFE, SHIMER et al. 1987)

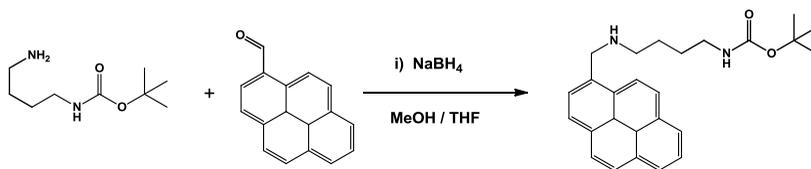
Outro experimento visando conhecer o modo de interação dos complexos com DNA, foi utilizando uma titulação via espectroscopia de fluorescência. O complexo FeZnLP1 foi estudado através das medidas espectrais de emissão de fluorescência da forma de excímero, usando solução do complexo CH₃CN/H₂O (25/75) Tris-HCl/NaCl (pH = 7,0) a 25° C. As intensidades de emissão em seus máximos foram captadas por volta de 452 nm com pequenos desvios. A excitação foi fixada em 396 nm. Os espectros foram gerados a partir de adições de CT-DNA (200 μmol.L⁻¹).

Os ensaios de dicroísmo circular (CD) foram realizados com o espectropolarímetro de CD modelo J-815 (Jasco, USA). Uma amostra de 100

μM de CT-DNA em 5 mM de Tris-HCl (pH 7,4) foi titulada com concentrações crescentes dos complexos (10 a 50 μM). As varreduras foram realizadas na faixa de 220 a 450 nm, a 37 °C, imediatamente após a adição dos complexos. Para servir de controle, o mesmo procedimento foi realizado com uma amostra contendo somente os complexos tamponados, não sendo observado nenhum sinal de CD. Os espectros de CD correspondem a no mínimo 3 varreduras acumuladas.

3.2. Síntese dos Ligantes

3.2.1. Síntese do terc-butil-*N*-[4-(1-pirenilmetil)amino-butil]-carbamato (Pir-dab-Boc)



Em um balão de fundo redondo de uma boca e 125 mL contendo 0,46g (2,0 mmol; $230,26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) de pirenocarboxialdeído em uma solução metanol/THF (1:1), foram adicionados lentamente 0,38 g (2,0 mmol; $188,27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) em pequenas porções a 1,4-diaminobutano-Boc previamente dissolvida em metanol/THF (1:1). O sistema permaneceu sob agitação por 3 h. (Acompanhado por CCD – Sílica – diclorometano).

A solução foi então resfriada a 0°C e o Borohidreto de sódio (0,075 g; 2,0 mmol; $37,83 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) foi adicionado lentamente em pequenas porções sólidas em intervalos de 5 min. O sistema permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por 12 h. Em seguida o pH foi ajustado para aproximadamente 5 com a adição de HCl 4 mol.L⁻¹ e permaneceu em agitação por 30 min. O pH foi novamente ajustado para 9 (com NaHCO_3) e o solvente foi removido. Foi então resolubilizado em CH_2Cl_2 e foi extraído (3 x 30 mL) com solução saturada de NaHCO_3 . A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e o solvente removido em rota evaporador restando um óleo amarelo claro. Este foi então seco em bomba de vácuo, obtendo-se 0,68 g (75 %) de uma espuma amarela clara. O composto foi caracterizado por IV e RMN⁻¹H.

IV em KBr (cm^{-1})- $\nu(\text{N-H})$ 3371,3294; $\nu(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 3046; $\nu(\text{C-H}_{\text{Alif}})$ 2927,2815; $\nu(\text{C=O})$ 1705; $\nu(\text{C=C})$ 1515; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 848; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 716.

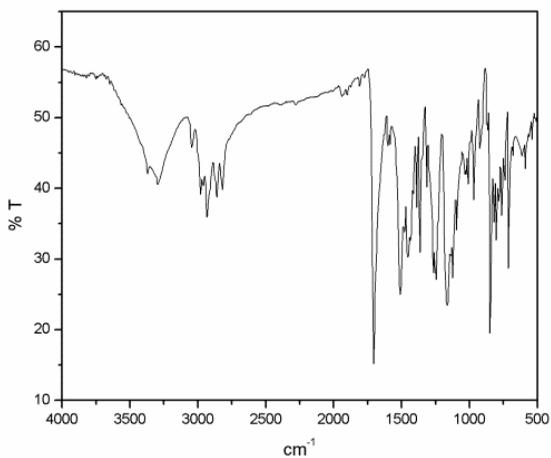


Figura 16 – Espectro no Infravermelho do Pir-dab-boc em pastilha de KBr.

RMN-¹H (CDCl₃) δ ppm – 1,44 (9 H, s); 1,56 (4 H, s); 2,77 (2 H, m); 3,13 (2 H, m); 4,45 (2 H, d); 8,01 (4 H, m); 8,15 (4 H, m); 8,33 (1 H, d).

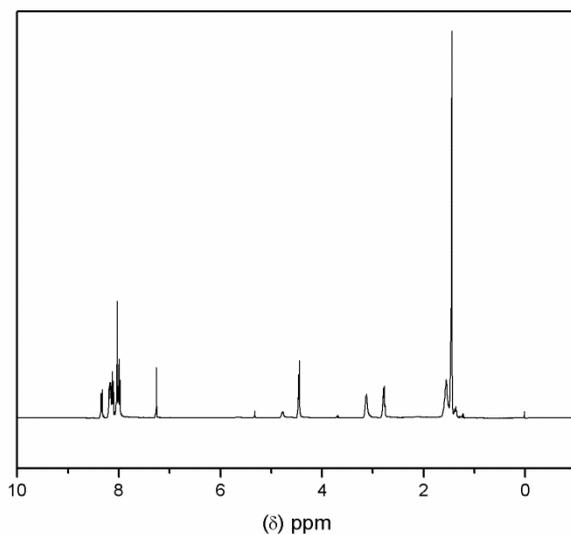
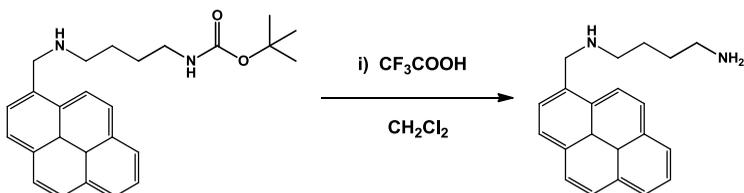


Figura 17 – Espectro de RMN-¹H do Pir-dab-boc em CDCl₃.

3.2.2. Síntese do 4-aminometil-1-pirenilmetil-amina (Pir-dab)



Em um balão de fundo redondo de uma boca de 125 mL foram dissolvidos 0,68 g (1,7 mmol; $230,26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) do Pir-dab-Boc em diclorometano. O sistema foi resfriado a 0°C com um banho de gelo. Em seguida foram adicionados lentamente 0,7 mL (cerca de 1 mL/mmol) do ácido trifluoracético (com a adição o sistema adquiriu uma coloração esverdeada). Após a adição o sistema permaneceu sob agitação e temperatura ambiente por 3 h.

O solvente foi removido em rotaevaporador e lavado por 2x com diclorometano. Com o auxílio de um funil de extração uma solução do composto em diclorometano foi lavada com uma solução de $\text{NaOH } 2,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (3x 20 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e o solvente removido em rotaevaporador e também em bomba de vácuo. O composto foi caracterizado por IV e RMN^{-1}H .

IV em $\text{KBr } (\text{cm}^{-1})$ - $\nu(\text{N-H})$ 3367,3290; $\nu(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 3043; $\nu(\text{C-H}_{\text{Alif}})$ 2934,2810; $\nu(\text{C=C})$ 1594; $\nu(\text{CH}_2)$ 1443; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 843,801, $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 708.

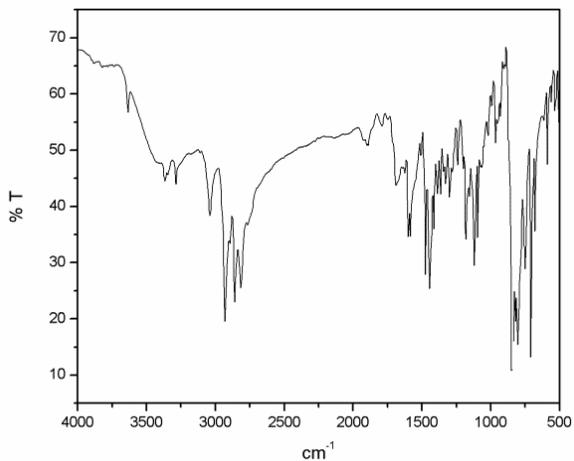


Figura 18 - Espectro no Infravermelho do Pir-dab em pastilha de KBr.

RMN-¹H (CDCl₃) δ ppm – 1,53 (4 H, m); 2,73 (4 H, m); 4,46 (2 H, s); 5,76 (1 H, s)
8,05 (8 H, m); 8,35 (1 H, d).

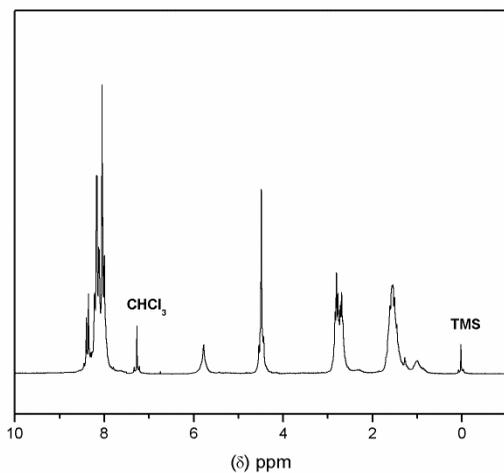
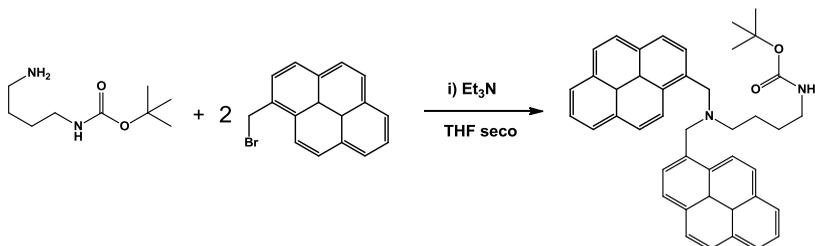


Figura 19 - Espectro de RMN-¹H do Pir-dab em CDCl₃.

3.2.3. Síntese do terc-butil-*N*-[4-bis-(1-pirenilmetil)amino-butil]-carbamato (Pir2-dab-Boc)



Em um balão de fundo redondo de uma boca de 125 mL (com torneira acoplada) contendo 0,56g (3,0 mmol; $188,26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) de 1,4-diaminobutano-Boc em uma solução de THF (seco), foram adicionados lentamente 1,77 g (6,0 mmol; $295,17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) em pequenas porções do 1-bromometil-pireno sob fluxo positivo de argônio e também uma quantidade estequiométrica de trietilamina. O sistema permaneceu sob agitação 12 h sob atmosfera saturada de argônio. (Houve a formação de um sólido branco)

O precipitado foi removido por filtração, e o filtrado foi levado ao rotaevaporador, obtendo-se um sólido amarelado. Este foi então resolubilizado em diclorometano e lavado com pequenas porções de $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ (3x20 mL) e com brine (2x20 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e o solvente removido em rotaevaporador restando uma espuma amarelo claro. Foram obtidos 1,32 g (71 %) do produto bruto. O composto foi caracterizado por IV e RMN⁻¹H.

IV em KBr (cm^{-1}) - $\nu(\text{N-H})$ 3430; $\nu(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 3043; $\nu(\text{C-H}_{\text{Alif}})$ 2922-2794; $\nu(\text{C=O})$ 1697; $\nu(\text{C=C})$ 1505; $\nu(\text{CH}_2)$ 1362; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 843, $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 708.

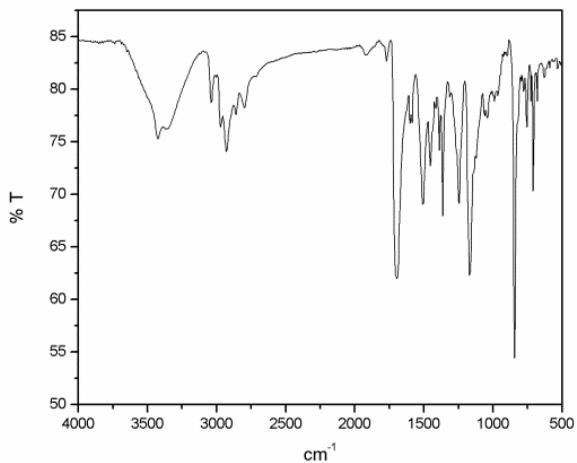


Figura 20 - Espectro no Infravermelho do Pir2-dab-boc em pastilha de KBr.

RMN-¹H (CDCl₃) δ ppm – 1,39 (9 H, s); 1,46 (2 H, m); 1,68 (2 H, t); 2,61 (2 H, t); 2,86 (2 H, m); 4,31 (4 H, s); 8,05 (16 H, m); 8,34 (2 H, d).

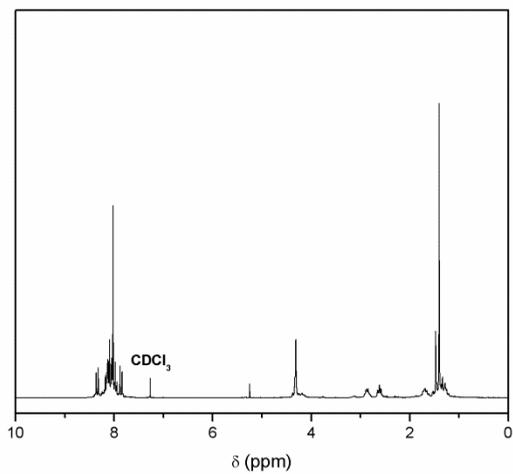
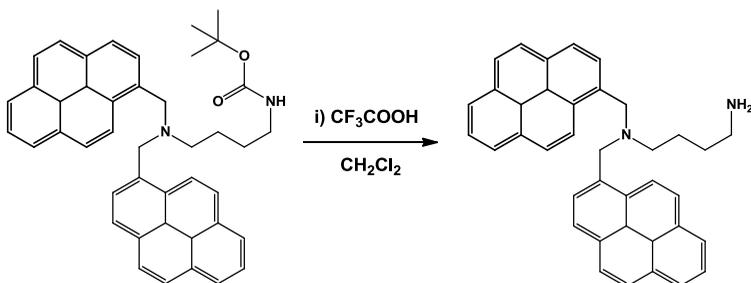


Figura 21 - Espectro de ¹H-RMN do Pir2-dab-boc em CDCl₃.

3.2.4. Síntese do (4-aminobutil)-bis-(1-pirenil-metil)-amina (Pir2-Dab)



Em um balão de fundo redondo de uma boca de 125 mL foram dissolvidos 1,24 g (2,0 mmol; 620,82 g.mol⁻¹) do Pir2-dab-Boc em diclorometano. O sistema foi resfriado a 0 °C com um banho de gelo. Em seguida foram adicionados lentamente 2,0 mL (cerca de 1 mL/mmol) do ácido trifluoracético (com a adição o sistema adquiriu uma coloração esverdeada). Após a adição o sistema permaneceu sob agitação e temperatura ambiente por 3 h.

O solvente foi removido em rotaevaporador e lavado por 2x com diclorometano. Com o auxílio de um funil de extração uma solução do composto em diclorometano foi lavada com uma solução de NaOH 2,0 mol.L⁻¹ (3x 20 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente removido em rotaevaporador e também em bomba de vácuo. O composto foi caracterizado por IV e RMN⁻¹H.

IV em KBr (cm⁻¹) - ν(N-H) 3423,3360; ν(C-H_{Ar}) 3093; ν(C-H_{Alif}) 2928,2798; ν(C=C) 1590; ν(CH₂) 1366; δ(C-H_{Ar}) 838; δ(C-H_{Ar}) 708.

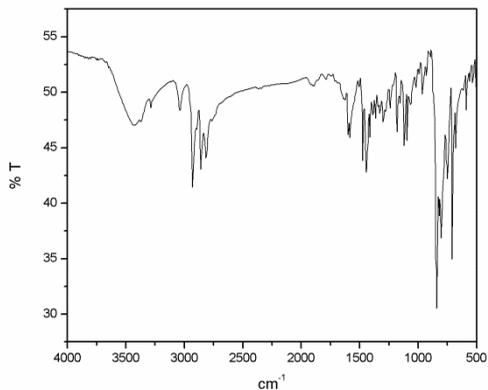


Figura 22 - Espectro no Infravermelho do Pir2-dab em pastilha de KBr.
RMN¹H (CDCl₃) δ ppm – 1,03 (2 H, m); 1,12 (1 H, s largo); 1,39 (2 H, m) 2,39 (2 H, t), 2,61 (2 H, t); 4,32 (4 H, s); 7,99 (16 H, m); 8,37 (2 H, d).

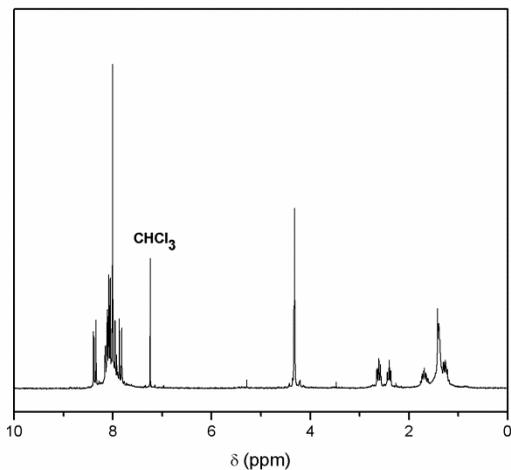
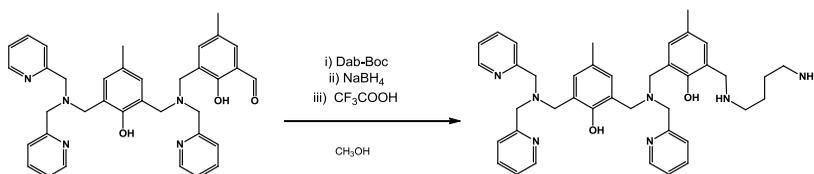


Figura 23 – Espectro de RMN-¹H do Pir2-dab em CDCl₃.

3.2.5. Síntese do 2-(((3-(((4-aminobutil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilfenil)metil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol – H₂LAB



Em um balão de fundo redondo de uma boca de 125 mL foram dissolvidos 1,32 g (2,25 mmol; 587,71 g.mol⁻¹) do H₂py3mff em metanol. (PIOVEZAN, JOVITO et al. 2010) Em seguida foram adicionados lentamente pequenas porções de uma solução metanólica contendo 0,42 g do Dab-Boc (2,25 mmol; 187,27 g.mol⁻¹). Após a adição o sistema permaneceu sob agitação e temperatura ambiente por 3 h. O sistema foi resfriado a 0 °C com banho de gelo, e em seguida pequenas porções de NaBH₄ foram adicionadas diretamente (0,08 g; 2,25 mmol; 37,83 g.mol⁻¹). Com o passar do tempo a solução foi perdendo a coloração amarelada e permaneceu sob agitação por 14 h.

O pH foi ajustado para 5 com adição de HCl 4 mol.L⁻¹ e permaneceu sob agitação por 30 minutos. O solvente foi removido em rotaevaporador restando um óleo marrom. Este foi solubilizado em 40 mL uma solução aquosa de HCl 0,01 mol.L⁻¹ e esta solução foi extraída com CH₂Cl₂ (3x30 mL). O pH da fase aquosa foi ajustado para 10 e foi novamente extraída com CH₂Cl₂ (3x30 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente removido a pressão reduzida. Foram obtidos 1,56 g de um sólido esponjoso marrom claro.

Este sólido foi então dissolvido em 30 mL de CH₂Cl₂ e resfriado com um banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL (aprox. 1mL/mmol) de ácido trifluoroacético (CF₃COOH) em pequenas porções. Após a adição a solução se tornou verde escura e permaneceu sob agitação e banho de gelo por 3 h.

Em seguida o sistema foi lavado com H₂O (1x20 mL) e NaOH 2,0 mol.L⁻¹ (3x20 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente removido em rotaevaporador. Foram obtidos 1,32 g (90%) de uma espuma amarelo claro. O composto foi caracterizado por IV e RMN⁻¹H.

IV em KBr (cm^{-1}) - $\nu(\text{N-H})$ 3368; $\nu(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 3011; $\nu(\text{C-H}_{\text{Alif}})$ 2927-2854; $\nu(\text{C=C})$ 1592; $\nu(\text{C=N})$ 1562; $\nu(\text{C=C})$ 1478; $\delta(\text{O-H})$ 1362; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 859; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 768.

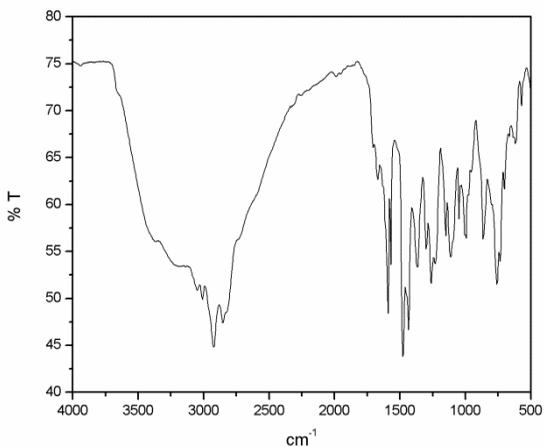


Figura 24 – Espectro no Infravermelho do H₂LAB em pastilha de KBr.

RMN-¹H (CDCl₃) δ ppm – 1,44 (2 H, m); 1,85 (2 H, m); 2,22 (6 H, s); 2,69 (2 H, m); 3,08 (2 H, m); 3,72-3,85 (14 H, s); 6,86-7,52 (13 H, m), 8,56 (3 H, d).

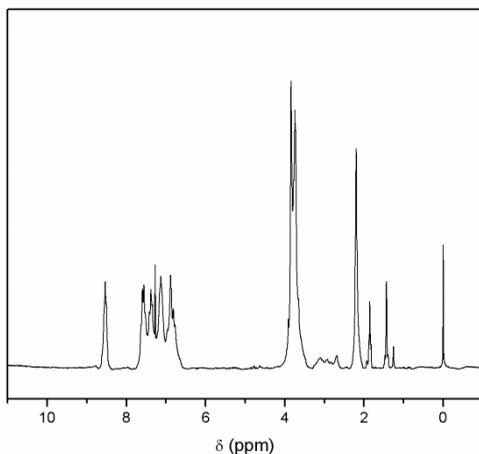
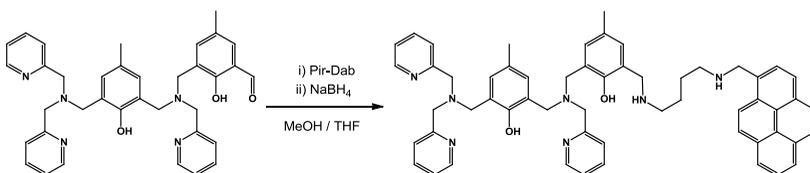


Figura 25 – Espectro de ^1H -RMN do H_2LAB em CDCl_3 .

3.2.6. Síntese do 2-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-6-[[{(2-hidroxi-5-metil-3-[[4-[(piren-1-ilmetil)amino]butil]amino]metil]fenil}metil)(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol – $\text{H}_2\text{LP1}$



Em um balão de fundo redondo de uma boca de 125 mL foram dissolvidos 1,32 g (2,20 mmol; $587,71 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) do $\text{H}_2\text{py3mff}$ em 40 mL de uma mistura metanol/THF (1:1). Em seguida foram adicionados lentamente pequenas porções de uma solução em THF contendo 0,66 g do Pir-Dab-Boc (2,20 mmol; $302,41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Após a adição o sistema permaneceu sob agitação e temperatura ambiente por 3 h. O sistema foi resfriado a 0°C com banho de gelo, e em seguida pequenas porções de NaBH_4 foram adicionadas diretamente (0,08 g; 2,20 mmol; $37,83 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Com o passar do tempo a solução foi perdendo a coloração amarelada e permaneceu sob agitação por 3 h.

Em seguida foi adicionado HCl $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em pequenas porções para ajustar o pH entre 5-6, e o solvente foi então removido em rotaevaporador. O óleo resultante foi então solubilizado em CH_2Cl_2 e extraído com NaHCO_3 (3X20 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e o solvente removido a pressão reduzida. Foram obtidos 1,48 g (77 %) de um sólido esponjoso amarelo palha. O composto foi caracterizado por IV e RMN^{-1}H .

IV em KBr (cm^{-1}) - $\nu(\text{O-H})$ 3430; $\nu(\text{N-H})$ 3186; $\nu(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 3043,3007; $\nu(\text{C-H}_{\text{Alif}})$ 2922,2810; $\nu(\text{C=C})$ 1586; $\nu(\text{C=N})$ 1568; $\delta(\text{O-H})$ 1365; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 843; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 768.

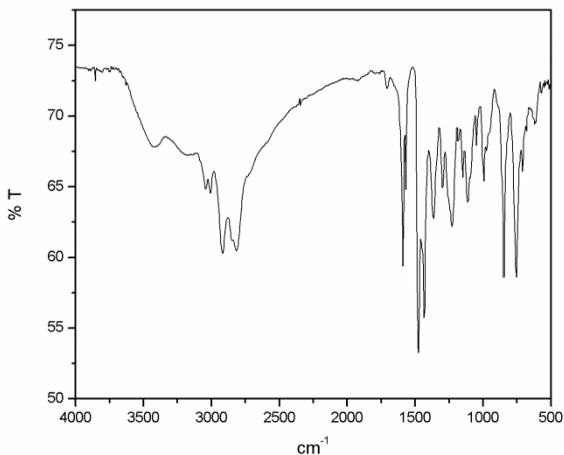


Figura 26 – Espectro no Infravermelho do H₂LP1 em pastilha de KBr.

RMN-¹H (CDCl₃) δ ppm – 1,52 (4 H, m); 2,16 (6 H, s); 2,63 (2 H, m); 2,75 (2 H, m); 3,66-3,80 (14 H, s); 4,43 (2 H, s) 6,76 (4 H, q); 7,09 (3 H, m) 7,34 (3 H, d); 7,55 (3 H, t); 8,03 (8 H, m); 8,29 (1 H, d); 8,50 (3 H, d).

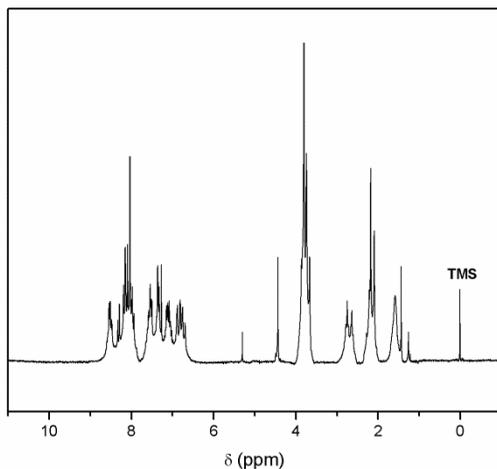
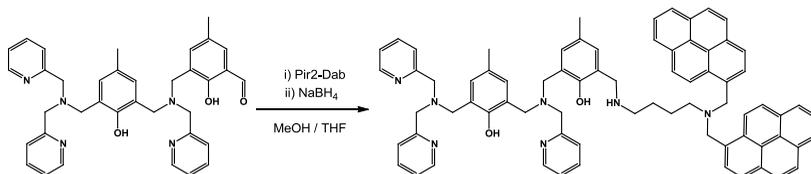


Figura 27 – Espectro de ¹H-RMN do H₂LP1 em CDCl₃.

3.2.7. Síntese do 2-[[[3-[[[4-bis(piren-1-ilmetil)amino]butil]amino]metil]-2-hidroxi-5-metilfenil]metil] (piridin-2-ilmetil)amino]metil]-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol – H₂LP2



Em um balão fundo redondo de uma boca de 125 mL foram dissolvidos 1,17 g (2,0 mmol; 587,71 g.mol⁻¹) do H₂py3mff em uma mistura metanol/THF (1:1). Em seguida foram adicionados lentamente pequenas porções de uma solução metanólica contendo 1,03 g do Pir2-Dab (2,0 mmol; 516,67 g.mol⁻¹). Após a adição houve a formação de uma suspensão que foi solubilizando aos poucos e o sistema permaneceu sob agitação e temperatura ambiente por 2 h.

O sistema foi resfriado a 0 °C com banho de gelo, e em seguida pequenas porções de NaBH₄ foram adicionadas diretamente (0,07 g; 2,00 mmol; 37,83 g.mol⁻¹) Com o passar do tempo a solução foi perdendo a coloração amarelada e permaneceu sob agitação por 1 h. Após este intervalo de tempo HCl foi adicionado para ajustar o pH entre 5-6 e o solvente foi removido. O óleo restante foi dissolvido em CH₂Cl₂ e extraído com HCl 1 mol.L⁻¹ (3x10 mL) e com NaHCO₃(sat) (3x30 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente removido em rotaevaporador. Foram obtidos 1,52 g (69 %) de um sólido esponjoso marrom claro. O composto foi caracterizado por IV e RMN⁻¹H.

IV em KBr (cm⁻¹) - ν(O-H) 3423; ν(C-H_{Ar}) 3041,3004; ν(C-H_{Alif}) 2919,2804; ν(C=C) 1591; ν(C=N) 1569; ν(C=C) 1472; δ(O-H) 1362; δ(C-H_{Ar}) 843; δ(C-H_{Ar}) 754; δ(C=C_{Ar}) 708.

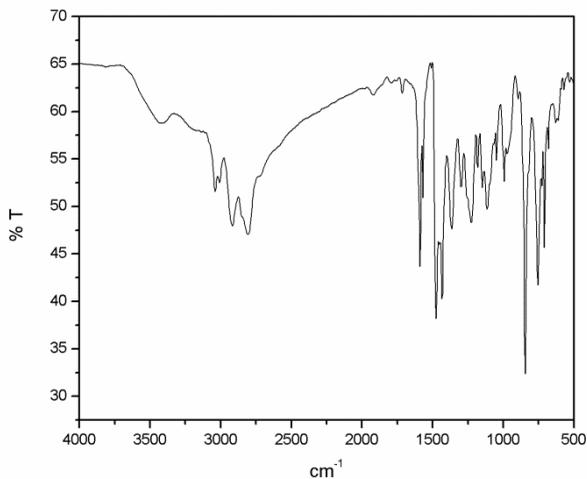


Figura 28 – Espectro no Infravermelho do H₂LP2 em pastilha de KBr.

RMN-¹H (CDCl₃) δ ppm – 1,32 (2 H, q); 1,68 (2 H, q); 2,17 (6 H, s); 2,22 (2 H, m); 2,58 (2 H, m); 3,44 (2 H, s); 3,69-3,82 (12 H, s); 4,29 (4 H, s); 6,84 (4 H, q); 7,07 (3 H, m) 7,37 (3 H, d); 7,51 (3 H, q); 7,82-8,11 (16 H, m); 8,35 (2 H, d); 8,53 (3 H, d).

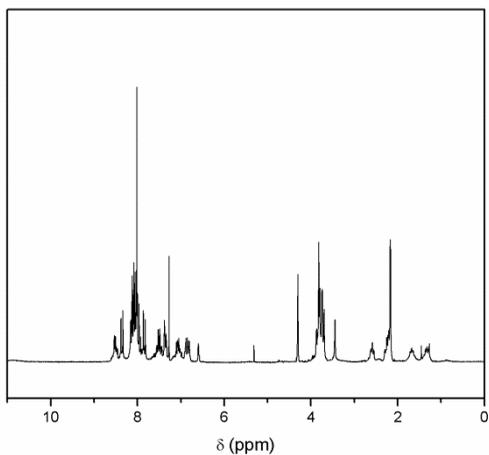
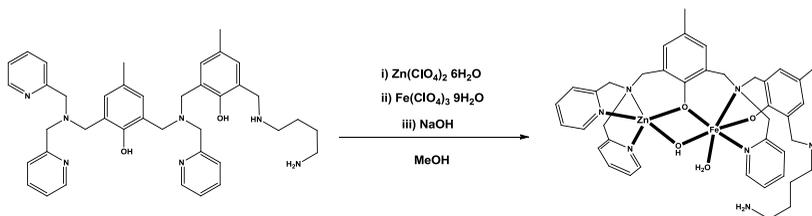


Figura 29 – Espectro de ¹H-RMN do H₂LP2 em CDCl₃.

3.3. Síntese dos Complexos

3.3.1. Síntese do Perclorato de μ -hidroxo-2-(((3-(((4-aminobutil amino)metil) -2-hidroxi-5-metilfenil)metil)(piridin-2-ilmetil) amino)metil)-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol Ferro(III) Zinco(II) – FeZnLAB



Em um balão de fundo redondo de 250 mL contendo 20 mL de uma solução metanólica do ligante H_2LAB (0,39 g, 0,60 mmol, $659,86 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), foram adicionados 20 mL de uma solução metanólica contendo 0,22 g de $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,6 mmol, $372,36 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) diretamente ao meio reacional. Após a adição deixou-se o sistema sob agitação por 15 minutos. Então 80 mL de uma solução metanólica contendo 0,31 g de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0,6 mmol, $516,29 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) foram adicionados lentamente por um período de 7 horas com o auxílio de um funil de adição com equalizador de pressão.

Na sequência, foram adicionados lentamente 1,8 mL de uma solução aquosa $1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaOH ao sistema ocorrendo uma mudança na coloração de azul para púrpura. O sistema foi deixado sob repouso por 3 dias havendo a precipitação de um sólido púrpura que foi recristalizado em CH_3CN . Foram obtidos 0,38 g (63 %) de um sólido púrpura cristalino.

IV em KBr (cm^{-1}) - $\nu(\text{O-H})$ 3553,3403; $\nu(\text{N-H})$ 3241; $\nu(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 3031; $\nu(\text{C-H}_{\text{Alif}})$ 2922,2861; $\nu(\text{C=C})$ 1638; $\nu(\text{C=N})$ 1610; $\nu(\text{C=C})$ 1478 ; $\nu(\text{Cl-O})$ 1098,1087; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 618.

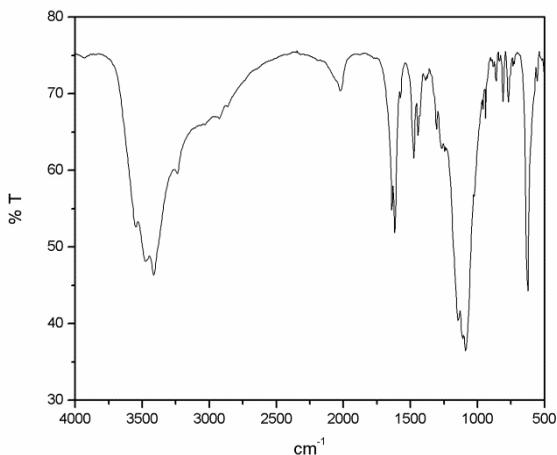
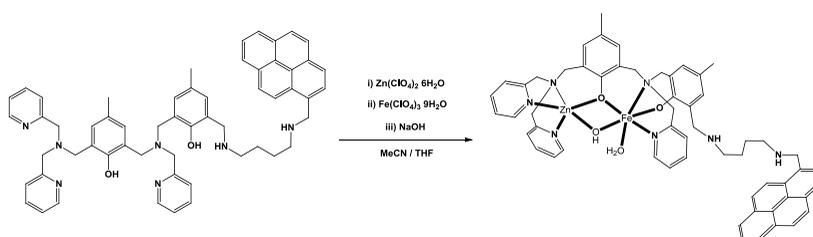


Figura 30 – Espectro no Infravermelho do FeZnLAB em pastilha de KBr.

3.3.2. Síntese do Perclorato de μ -hidroxo-2-[[bis(piridin-2-ilmetil) amino]metil] -6-[[[2-hidroxi-5-metil-3-[[4-[(piren-1-ilmetil) amino]butil]amino]metil]fenil]metil] (piridin-2-ilmetil)amino] metil]-4-metilfenol Ferro(III) Zinco(II) – FeZnLP1



O ligante H_2LP1 foi solubilizado em 40 mL de uma mistura 1:1 de acetonitrila/THF (0,48 g, 0,55 mmol, $874,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) em um balão de fundo redondo de 500 mL. Logo em seguida 20 mL de uma solução em acetonitrila contendo 0,20 g de $Zn(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ (0,55 mmol, $372,36 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) foram adicionados diretamente. Após a adição deixou-se o sistema sob agitação por 20 minutos. Então 80 mL de uma solução em acetonitrila contendo 0,28 g de

$\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0,55 mmol, 516,29 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) foram adicionados lentamente por um período de 8 horas, com o auxílio de uma coluna de adição.

Em seguida, 1,7 mL de uma solução aquosa 1,0 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaOH foram adicionados lentamente ao sistema ocorrendo uma mudança na coloração de azul para púrpura. O sistema foi deixado sob repouso por uma semana, havendo a precipitação de um sólido púrpura que foi recristalizado em CH_3CN . Foram obtidos 0,36 g (53 %) de um sólido púrpura microcristalino.

IV em KBr (cm^{-1}) - $\nu(\text{O-H})$ 3437; $\nu(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 3037; $\nu(\text{C-H}_{\text{Alif}})$ 2922,2861; $\nu(\text{C=C})$ 1607; $\nu(\text{C=N})$ 1571; $\nu(\text{C=C})$ 1470; $\nu(\text{Cl-O})$ 1090; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 843; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 758; $\delta(\text{C=C}_{\text{Ar}})$ 622.

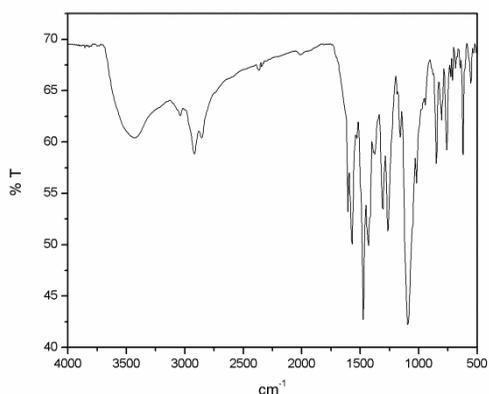
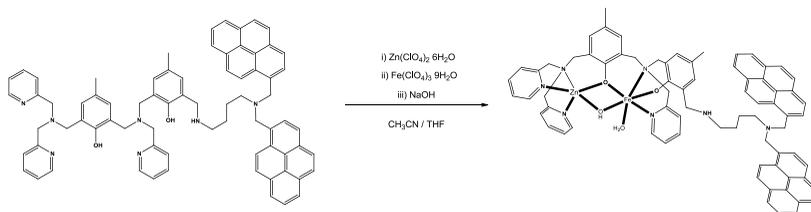


Figura 31 – Espectro no Infravermelho do FeZnLP1 em pastilha de KBr.

3.3.3. Síntese do Perclorato de μ -hidroxo-2-[[{3-[[{4-[bis(piren-1-ilmetil)amino]butil}amino)metil] -2-hidroxi-5-metilfenil}metil] (piridin-2-ilmetil)amino]metil} -6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol Ferro(III) Zinco(II) – FeZnLP2



O ligante H₂LP2 foi solubilizado em 60 mL de uma mistura 1:1 de acetonitrila/THF (0,54 g, 0,50 mmol, 1088,39 g.mol⁻¹) em um balão de 500 mL. Logo em seguida 20 mL de uma solução em acetonitrila contendo 0,19 g de Zn(ClO₄)₂·6H₂O (0,50 mmol, 372,36 g.mol⁻¹) foram adicionados diretamente. Após a adição deixou-se o sistema sob agitação por 20 minutos. Então 100 mL de uma solução em acetonitrila contendo 0,26 g de Fe(ClO₄)₃·9H₂O (0,50 mmol, 516,29 g.mol⁻¹) foram adicionados lentamente por um período de 8 horas.

Então 1,5 mL de uma solução 1,0 mol.L⁻¹ de NaOH foram adicionados lentamente ao sistema ocorrendo uma mudança na coloração de azul para púrpura. O sistema foi deixado sob repouso por uma semana, havendo a precipitação de um sólido púrpura que foi recristalizado em CH₃CN. Foram obtidos 0,40 g (56 %) de um sólido púrpura microcristalino.

IV em KBr (cm⁻¹) - ν (O-H) 3443; ν (C-H_{Ar}) 3043; ν (C-H_{Alif}) 2919,2857; ν (C=C) 1610; ν (C=C) 1474; ν (Cl-O) 1112,1090; δ (C-H_{Ar}) 847; δ (C-H_{Ar}) 762; δ (C=C_{Ar}) 620.

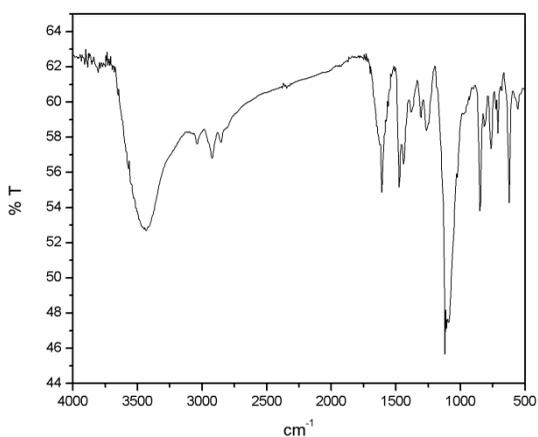


Figura 32 – Espectro no Infravermelho do FeZnLP2 em pastilha de KBr.

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão tratados os resultados obtidos na caracterização dos ligantes e dos compostos de coordenação desenvolvidos neste trabalho. Desta forma também serão aqui apresentados os estudos de reatividade com ésteres de fosfato e de interação com ácidos nucleicos. Na Figura 33 estão apresentados os ligantes não simétricos utilizados neste trabalho.

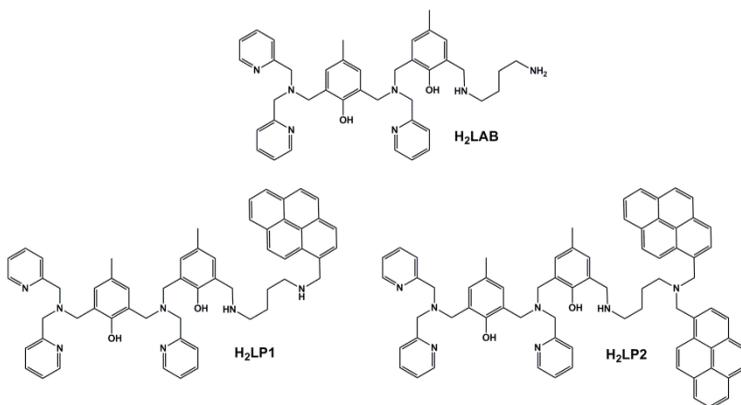


Figura 33 – Representação dos ligantes preparados no presente trabalho.

4.1. Caracterização dos ligantes

Os ligantes binucleantes H₂LAB, H₂LP1 e H₂LP2 foram obtidos com rendimentos adequados, de acordo com as rotas sintéticas descritas na seção experimental, para a síntese dos complexos. Esses compostos apresentaram grau de pureza aceitável, possibilitando o seu uso nas sínteses dos compostos de coordenação propostos e foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e espectrometria de massa.

4.1.1. Espectroscopia no Infravermelho – IV

Como mencionado anteriormente, todos os compostos orgânicos, (ligantes e precursores), foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho e suas principais bandas foram atribuídas com base em semelhança, de modo a serem utilizadas para acompanhar a formação dos compostos em cada etapa da reação. (SILVERSTEIN, BASSLER et al. 1991)

No espectro de IV do precursor Pir-dab-boc nota-se a presença da banda intensa em 1704 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O do grupamento carbonila (Boc). Esta banda foi usada como referência para verificar a desproteção do grupo Boc na síntese do precursor Pir-Dab conforme demonstrado na figura abaixo.

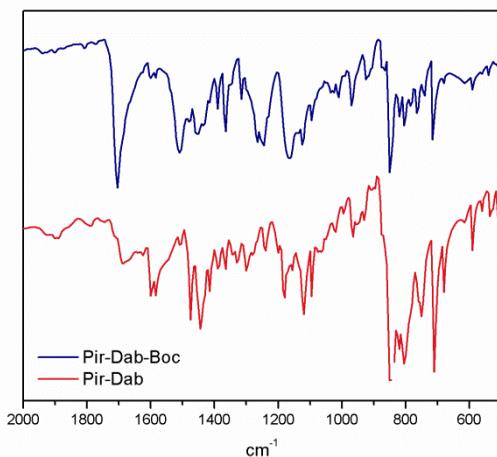


Figura 34 – Comparação dos Espectros no IV do Pir-dab-boc e Pi-Dab.

Os ligantes H_2LAB , $\text{H}_2\text{LP1}$ e $\text{H}_2\text{LP2}$ apresentaram bandas de absorção características e similares às apresentadas pelos seus precursores. Na região de 3060 e 3030 cm^{-1} são encontradas bandas de estiramento das ligações C-H dos anéis aromáticos. Entre 2980 e 2800 cm^{-1} aproximadamente, nota-se bandas relativas aos estiramentos das ligações C-H das cadeias alifáticas. Em 1589 cm^{-1} tem-se bem pronunciada a absorção dos anéis aromáticos (C=C e C=N) e em 1223 cm^{-1} o estiramento da ligação C-O, indicando a presença dos grupos fenólicos. De forma pronunciada também são encontradas as bandas nas regiões de 843 e 750 cm^{-1} referentes a deformação angular fora do plano da ligação C-H dos anéis aromáticos. A ocorrência de várias bandas

pronunciadas nesta região é característica de grupos aromáticos polinucleares, o que reforça a indicação da ocorrência dos grupos pireno nos ligantes. No ligante H₂LAB a a faixa entre 850 e 750 cm⁻¹ aparece com bandas mais alargadas, uma vez que nessa região também aparecem bandas referentes a torção da ligação N-H, conforme demonstrado na figura a seguir.

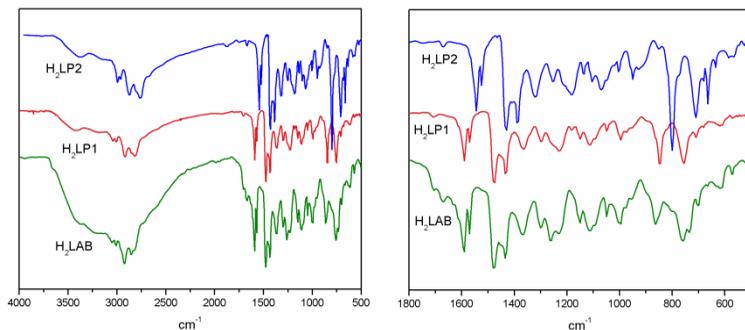


Figura 35 – Comparação entre os espectros no infravermelho dos ligantes H₂LAB, H₂LP1 e H₂LP2.

4.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN-¹H

A espectroscopia de RMN-¹H também foi uma ferramenta bastante útil para a caracterização de cada composto sintetizado. Os deslocamentos químicos e a integração dos sinais observados nos espectros permitiram determinar o número de hidrogênios presentes em cada composto. Desta forma foi possível distingui-los entre os átomos de hidrogênio metílicos, metilênicos e aromáticos.

Os valores de deslocamento químico (δ em ppm), número de hidrogênios correspondentes e as atribuições dos sinais estão sumarizados na Tabela 1. (SILVERSTEIN, BASSLER et al. 1991)

Tabela 1 – Deslocamentos químicos (ppm) observados nos espectros de RMN-¹H para os ligantes H₂LAB, H₂LP1 e H₂LP2.

Atribuição	H ₂ LAB	H ₂ LP1	H ₂ LP2
¹ H Metila	2,22 (6H)	2,16 (6H)	2,17 (6H)
			1,32 (2H)
	1,44 (2H)	1,52 (4H)	1,68(2H)
¹ H Metileno	1,85 (2H)	2,63 (2H)	2,22(2H)
	2,69 (2H)	2,75 (2H)	2,58 (2H)
	3,08 (2H)	3,66-3,80 (14H)	3,44 (2H)
	3,72-3,85 (14H)	4,43 (2H)	3,69-3,82 (12H)
			4,29 (4H)
	6,86 (4H)	6,79 (4H)	6,84 (4H)
	7,12 (3H)	7,09 (3H)	7,07 (3H)
¹ H Aromáticos	7,39 (3H)	7,34 (3H)	7,37 (3H)
	7,58 (3H)	7,55 (3H)	7,51 (3H)
	8,56 (3H)	8,09 (8H)	7,79-8,11 (16H)
		8,29 (1H)	8,35 (2H)
		8,50 (3H)	8,53 (3H)

Os precursores Dab-Boc (KRAPCHO & KUELL 1990), e 1-bromometil-pireno (XU, SINGH et al. 2009) apresentaram espectros característicos com deslocamentos, multiplicidades e integração compatíveis com seus procedimentos já descritos na literatura.

Durante a preparação dos precursores, a integração dos picos referentes aos átomos de hidrogênio pertencentes aos anéis aromáticos dos grupos pireno foram bastante úteis, podendo-se observar a entrada de um grupo pireno no Pir-dab-boc ou dois grupos pireno do Pir2-dab-boc.

Nas etapas de desproteção do grupo Boc (Pir-dab-boc e Pir2-dab-boc), pode-se observar claramente o desaparecimento dos sinais referentes as metilas do grupo Boc na região de 1,45 ppm. Este comportamento é apresentado na Figura 36, onde fica evidente a mudança no espectro de ¹H-RMN.

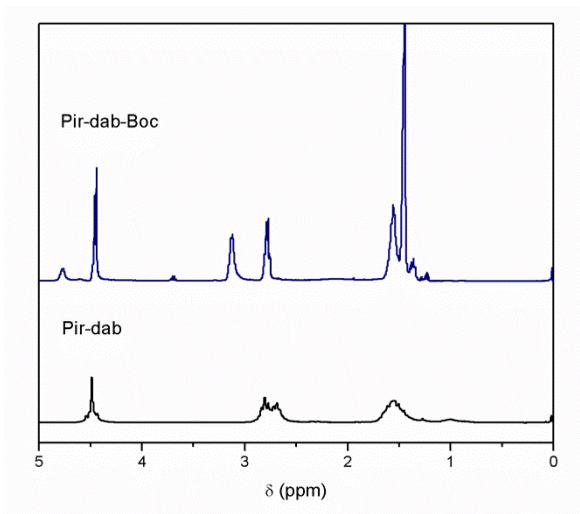


Figura 36 – Comparação dos espectros de ¹H-RMN do Pir-dab-boc e Pir-Dab

Os ligantes finais por serem moléculas com elevada massa molar apresentam um espectro de ¹H-RMN complexo, com regiões onde não se é possível atribuir adequadamente uma multiplicidade de sinal para cada hidrogênio. Entre as principais diferenças podem-se destacar na região dos hidrogênios aromáticos, onde a presença ou o aumento de grupos pireno acaba por intensificar a população de sinais na região entre 6-9 ppm. Um gráfico comparativo desta região é apresentado na Figura 37.

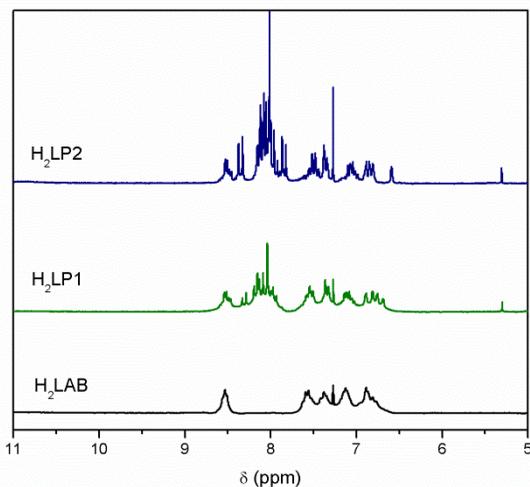


Figura 37 – Comparação dos espectros de ^1H -RMN para os três ligantes finais na região entre 5 e 11 ppm.

4.1.3. Espectrometria de Massa com Ionização por Eletrospray – ESI-MS

A espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS) apresentou-se como uma técnica de análise aplicada com sucesso na caracterização dos ligantes, ao produzir íons em fase gasosa diretamente da solução contendo o composto a ser analisado, obtendo-se assim informações qualitativas acerca das espécies carregadas existentes neste sistema. Desta forma foi possível determinar a presença dos íons moleculares para todos os ligantes indicando a obtenção dos mesmos.

A e Figura 38 apresentam os espectros de massa e a Tabela 2 demonstram as espécies identificadas para os ligantes H_2LAB , $\text{H}_2\text{LP1}$ e $\text{H}_2\text{LP2}$:

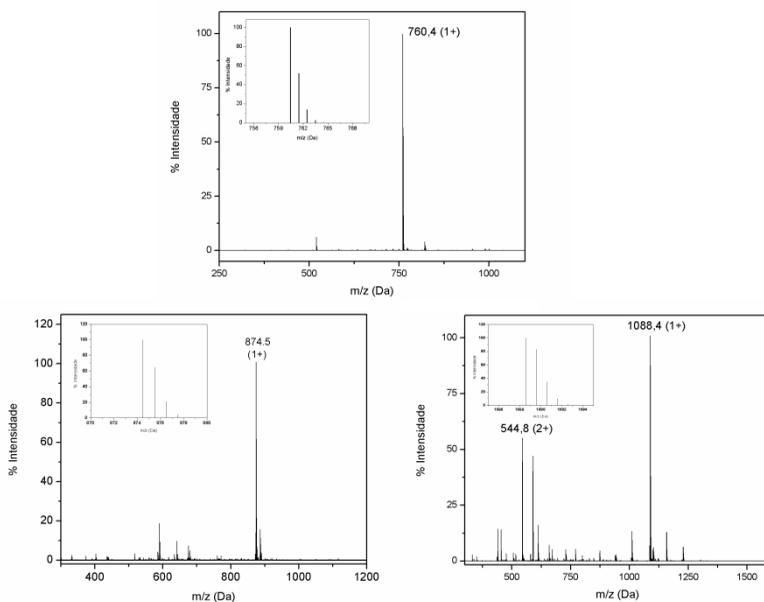


Figura 38 – Espectros de massa no modo positivo dos ligantes H₂LAB (acima), H₂LP1 (esquerda) e H₂LP2 (direita) em acetoneitrila. Em destaque as simulações das distribuições isotópicas.

Tabela 2 – Espécies determinadas na espectrometria de massa.

	Espécie	m/z	Representação
H ₂ LAB	C ₄₄ H ₅₈ N ₉ O ₃ (1+)	760,4	H ₂ LAB + H ⁺ + H ₂ O + 2CH ₃ CN
H ₂ LP1	C ₅₇ H ₆₀ N ₇ O ₂ (1+)	874,5	H ₂ LP1 + H
H ₂ LP2	C ₇₄ H ₇₀ N ₇ O ₂ (1+)	1088,4	H ₂ LP2 + H
	C ₇₄ H ₇₁ N ₇ O ₂ (2+)	544,8	H ₂ LP2 + 2H

4.2. Caracterização dos Complexos

Os complexos descritos neste presente trabalho foram caracterizados por diferentes métodos físicos e químicos tanto em estado sólido (análise elementar de CHN, medidas espectroscópicas), quanto em solução (eletroquímica, potenciometria, espectrometria de massa e espectroscopia eletrônica). Tais estudos tem por objetivo elucidar a composição química, arranjo estrutural e propriedades ácido-base destes complexos, bem como compará-los com outros compostos semelhantes descritos na literatura .

O conhecimento dessas propriedades é fundamental para a identificação da espécie ativa nos processos de clivagem hidrolítica de ésteres de fosfato (substratos modelo), bem como para obtenção de informações mais completas nos estudos de interação com ácidos nucleicos. A Figura 39 apresenta os complexos sintetizados neste (FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2) trabalho e também dois complexos que foram usados como comparação (FeZnbpbpmp e FeZnLald) por suas semelhanças estruturais. (NEVES, LANZMASTER et al. 2007; PIOVEZAN, JOVITO et al. 2010)

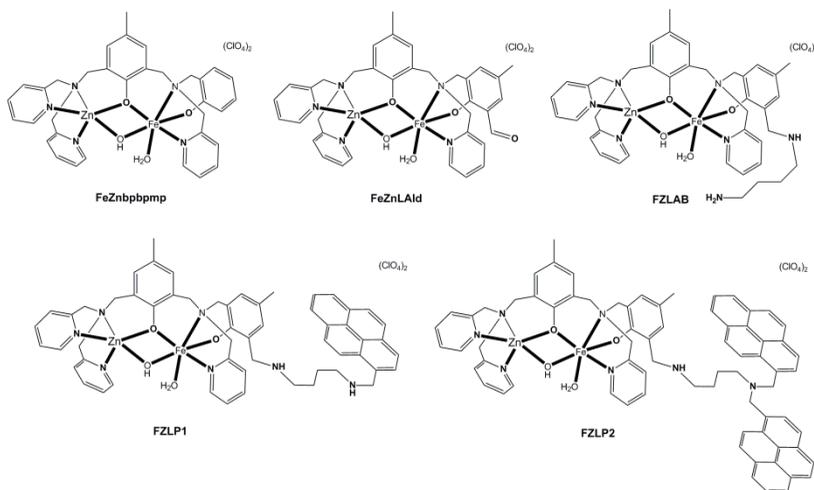


Figura 39 – Representação dos complexos sintetizados e utilizados para comparação neste trabalho.

4.2.1. Espectroscopia no Infravermelho – IV

A espectroscopia no IV é geralmente utilizada como uma análise preliminar e mostrou-se muito útil na caracterização inicial dos complexos, uma vez que a formação dos mesmos pôde ser acompanhada pela presença das bandas características de cada ligante. Sendo assim, os espectros no infravermelho dos complexos são bastante similares aos espectros dos respectivos ligantes, indicando a presença dos mesmos nos compostos isolados. Bandas adicionais, referentes ao contra-íon, e moléculas de água, bem como deslocamentos dos números de onda (para maior energia) em relação aos ligantes livres, também são observados. Abaixo estão apresentadas figuras com comparações entre as bandas para os complexos e seus respectivos ligantes.

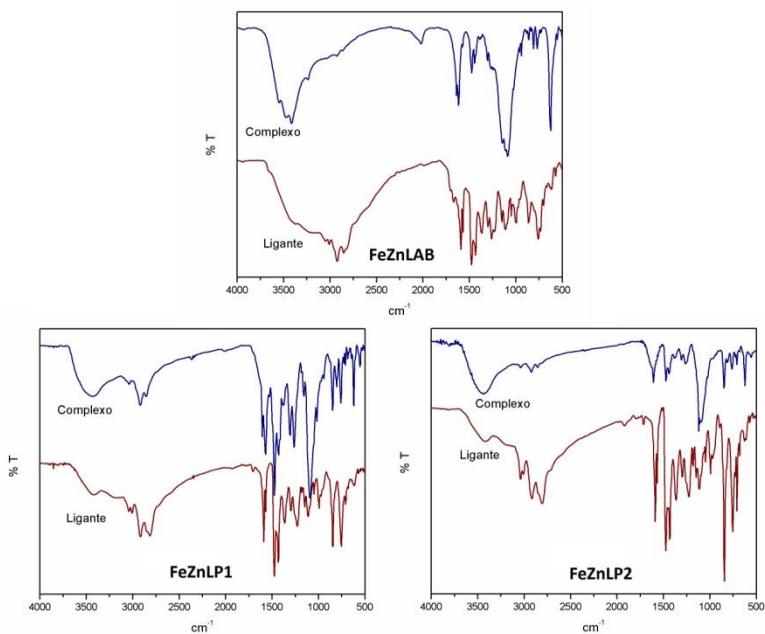


Figura 40 – Comparação dos espectros no infravermelho entre cada complexo e seu respectivo ligante.

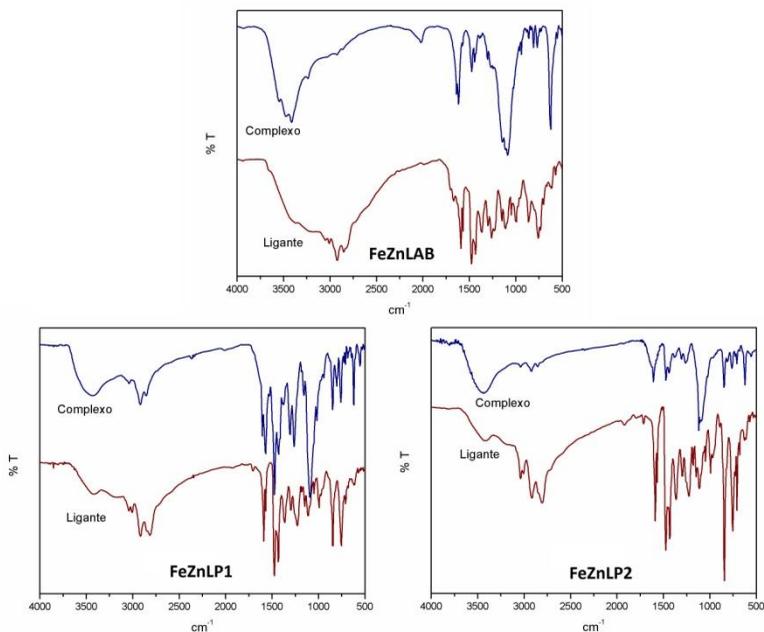


Figura 40 ilustra uma sobreposição dos ligantes livres com os respectivos complexos onde podem ser observadas as similaridades e diferenças entre estes compostos. Os ligantes H₂LAB, H₂LP1 e H₂LP2 apresentam bandas intensas entre 1600 e 1500 cm⁻¹, referentes aos estiramentos das ligações C=N e C=C dos anéis aromáticos. Nos complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 estas bandas também são observadas com intensidades relativas similares. A ausência da banda de média intensidade em aproximadamente 1370 cm⁻¹ δ (O-H_{fenol}) nos espectros dos complexos, indica a coordenação dos grupos fenolato ao centro de Fe^{III} em todos os complexos.

Outra característica interessante refere-se à presença do ânion perclorato. Em todos os complexos a absorção referente ao contra-íon é visualizada o que indica a presença do mesmo na molécula, o qual é facilmente detectado pela banda intensa em 1091 cm⁻¹ referente ao estiramento da ligação Cl-O.

4.2.2. Análise Elementar de CHN

Os complexos sintetizados foram caracterizados por análise elementar de CHN e apresentaram resultados concordantes com as fórmulas moleculares propostas. As amostras foram deixadas sob atmosfera inerte e pressão reduzida antes de serem acondicionadas em frascos apropriados para posterior análise.

Os resultados obtidos apresentaram uma boa correlação entre os valores calculados e teóricos. Para os complexos FeZnLP1 e FeZnLAB foram observados a presença de água, moléculas de solvente adsorvidas na amostra ou proveniente dos ligantes. A Tabela 3 apresenta a fórmula molecular e as porcentagens de C, H, e N (calculada/experimental) para os complexos sintetizados.

Tabela 3 – Resultados da análise elementar de C, H e N para os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 (Calculado/Experimental).

	Fórmula Molecular	%C	%H	%N
FeZnLAB	FeZnC ₄₂ H ₆₂ N ₇ Cl ₂ O ₁₆	45,32 / 44,83	5,61 / 5,54	8,81 / 8,75
FeZnLP1	FeZnC ₆₂ H ₇₄ N ₇ Cl ₄ O ₁₅	52,43 / 52,58	5,25 / 5,26	6,90 / 6,91
FeZnLP2	FeZnC ₇₆ H ₈₂ N ₇ Cl ₆ O ₁₆	54, 22 / 55,03	4,91 / 4,98	5,82/ 5,85
Composições Químicas Propostas				
FeZnLAB	[FeZn(μOH)(H ₂ O)](ClO ₄) ₂ .(CH ₃ OH) ₂ .(H ₂ O) ₂			
FeZnLP1	[FeZn(LP1)(μOH)(H ₂ O)](ClO ₄) ₂ .(THF).(CH ₂ Cl ₂). (H ₂ O) ₂			
FeZnLP2	[FeZn(LP2)(OH)(H ₂ O) ₂](ClO ₄) ₂ .(CH ₂ Cl ₂) ₂ .(H ₂ O) ₃			

4.2.3. Condutimetria

As medidas de condutividade molar para os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 foram efetuadas em soluções recém preparadas em acetonitrila com concentrações $1,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ a 25 °C. Os resultados de condutividade molar (Λ_M) e as atribuições dos tipos de eletrólitos para todos os complexos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Dados de Condutimetria.

	Λ_M ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Atribuição do Eletrólito
FeZnLAB	191,39	2:1
FeZnLP1	219,72	2:1
FeZnLP2	232,29	2:1

Segundo Geary, valores de condutividade molar na faixa de 120-160 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ são típicos de soluções de eletrólito 2:1 em acetonitrila a 25 °C e valores de condutividade entre 220-260 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ são encontrados em eletrólitos divalentes em concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. (GEARY 1971) Portanto pode-se constatar que os compostos FeZnLP1 e FeZnLP2 apresentam cátion de carga +2.

4.2.4. Espectroscopia Eletrônica – UV-vis

Os espectros de absorção UV-Vis de todos os complexos foram investigados na região entre 300 e 900 nm, utilizando-se acetonitrila e água como solventes. Os resultados obtidos estão apresentados sumarizados na Tabela 5 e os espectros de cada complexo nos diferentes solventes encontram-se na Figura 41. Em todos os complexos, foi possível a observação de uma banda intensa na região de 500 nm, atribuída a um processo de transferência de carga do tipo ligante \rightarrow metal (TCLM) proveniente dos orbitais $p\pi$ do fenolato para os orbitais $d\pi^*$ do íon Fe^{III} . (GABER, MISKOWSKI et al. 1974) Um segundo processo de TCLM ocorre na região de 330 nm, envolvendo os orbitais $p\pi$ do fenolato e $d\sigma^*$ do Fe^{III} , e aparece na forma de um ombro parcialmente encoberto pelas bandas devido as transições dos anéis fenólicos e piridínicos do ligante. (NEVES, LANZMASTER et al. 2007)

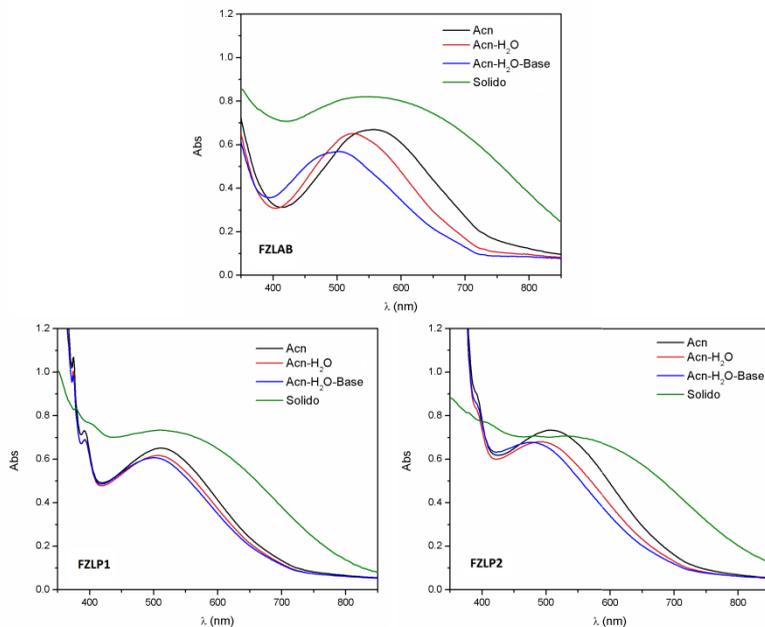


Figura 41 – Espectro eletrônico dos complexos FeZnLAB (acima), FeZnLP1 (esquerda) e FeZnLP2 (direita): Solução - $[c] = 3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e no estado sólido.

Tabela 5 – Dados do espectro eletrônico para os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2.

Complexo	$\lambda_{\text{máx.}} \text{ (nm)} / \epsilon \text{ (L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)}$			
	CH_3CN	$\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$	Base	Sólido
FeZnLAB	553 (2180)	524	496	548
FeZnLP1	512 (2100)	506	500	514
FeZnLP2	510 (2300)	491	476	528

Recentemente Smith e colaboradores reportaram uma série de compostos heterobinucleares de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ com os ligantes similares ao H_2bpbmp que possuem a mesma estrutura base dos ligantes usados neste trabalho. Os valores de comprimento de onda por eles apresentados para a banda de TCM Fenolato $\rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$ estão na faixa de 550 nm em acetonitrila pura. (PERALTA, BORTOLUZZI et al. 2010) É importante mencionar que os valores de

absortividade molar (ϵ) para os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 apresentaram valores coerentes para a banda de transferência de carga Fenolato \rightarrow Fe^{III} quando comparado a complexos heterobinucleares de Fe^{III}Zn^{II}. Este fato indica fortemente a coordenação de um fenolato terminal e o fenolato ponte ao centro de Fe^{III}, assim como determinado nas estruturas de raios X para os complexos FeZnbpmp e FeZnLald. (NEVES, LANZMASTER et al. 2007; GAHAN, SMITH et al. 2009; XAVIER, NEVES et al. 2009; PERALTA, BORTOLUZZI et al. 2010; PIOVEZAN, JOVITO et al. 2010)

Quando comparados aos complexos FeZnbpmp e FeZnLald os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 apresentam valores de $\lambda_{\text{máx}}$ deslocados para valores de menor comprimento de onda. (NEVES, LANZMASTER et al. 2007; PERALTA, BORTOLUZZI et al. 2010; SMITH, PERALTA et al. 2012) Esta diferença pode ser justificadas uma vez que eles possuem grupamentos amina lateral que podem realizar uma ligação de hidrogênio com a molécula de água terminal ou com o íon hidróxido ponte. Isto pode fazer com que o hidrogênio da água terminal no átomo de Fe^{III} fique comprometido com essa ligação de hidrogênio, desta forma a densidade eletrônica sob o átomo de ferro seria alterada significativamente. Outra possibilidade seria a formação da espécie Fe-OH com a amina do grupo diaminobutano estando protonado. (DE SOUZA, KREFT et al. 2013)

Foram feitos estudos variando o solvente (Acetonitrila, Acetonitrila/água) e com a adição de um esquivante de NaOH para verificar o efeito na banda de transferência de carga. Observou-se que os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 apresentam uma menor deslocamento hipsocrômico com a adição de água se comparado ao complexo FeZnLAB. Os espectros eletrônicos medidos em pastilha de KBr apresentam um perfil semelhante ao apresentado em solução. Esta é uma forte indicação que os complexos mantêm a mesma estrutura tanto no estado sólido como em solução.

4.2.5. Espectrometria de massa – ESI-MS

A espectrometria de massa foi de grande importância no estudo dos complexos em solução. Através desta técnica pôde-se determinar de maneira precisa as espécies geradas em solução e seus respectivos íons moleculares. É de extrema importância comentar que alguns íons com carga elevada (3+, 4+), devido ao seus potenciais redox podem sofrer processos de redução durante a ionização. Ions metálicos como Fe^{III}, Mn^{IV} e Cu^{II} são exemplos de sistemas que apresentam este comportamento nos experimentos de ESI-MS. (HENDERSON & MCINDOE 2005)

O complexo FeZnLAB foi estudado em uma solução de acetonitrila pura (grau MS) a 500 nmol.L^{-1} . Ele apresentou um grupo de picos com o máximo (100%) em um relação de massa/carga 433,6 com carga 2+. Este sinal foi atribuído ao sistema $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Zn}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})\text{LAB}(\text{OH}_2)_2]+(\text{OH}_2)_2+\text{H}^+$, que corresponde ao íon molecular do complexo possuindo duas águas terminais ligadas aos centros metálicos, duas águas de hidratação e com um dos grupos amino protonados. A Figura 42 apresenta o espectro de massa para o complexo FeZnLAB.

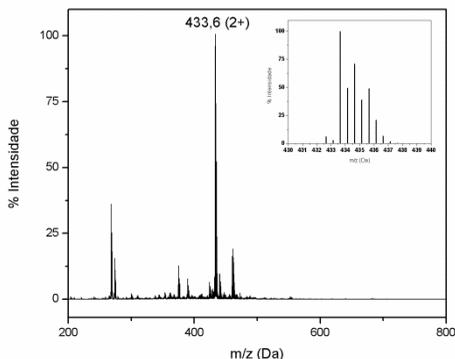


Figura 42 – Espectro de massa no modo positivo para o complexo FeZnLAB em solução de acetonitrila 500 nmol.L^{-1} . Simulação da distribuição isotópica em destaque.

O complexo FeZnLP1 foi estudado em uma solução de acetonitrila pura (grau MS) a 500 nmol.L^{-1} . Ele também apresentou um grupo de picos com o máximo (100%) em um relação de massa/carga 517,1 com carga 2+. Este sinal foi atribuído ao sistema $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Zn}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})\text{LP1}(\text{OH}_2)]+(\text{OH}_2)+\text{Li}^+$, que corresponde ao íon molecular do complexo possuindo uma molécula de água terminal ligada a um dos centros metálicos, uma água de hidratação e um íon Lítio. O aduto formado com alguns íons como Na^+ , K^+ , Li^+ e NH_4^+ ocorre comumente em experimentos de espectrometria de massa. Ele provavelmente oriundo de recipientes de vidro usados no preparo das amostras ou da própria linha da injeção da amostra. (HOFFMANN 2007) A Figura 43 apresenta o espectro de massa para o complexo FeZnLP1.

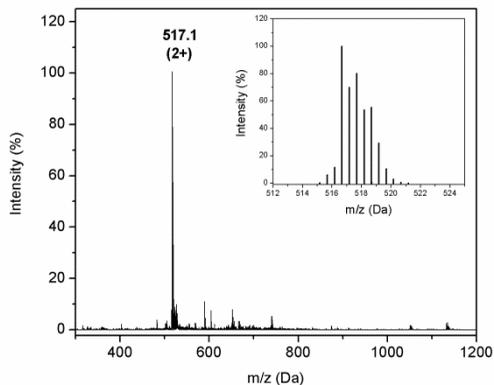


Figura 43 – Espectro de massa no modo positivo para o complexo FeZnLP1 em solução de acetonitrila 500 nmol.L⁻¹. Simulação da distribuição isotópica em destaque.

O complexo FeZnLP2 foi estudado, da mesma forma, em uma solução de acetonitrila (grau MS) a 500 nmol.L⁻¹. Ele apresentou um grupo de picos com o máximo (100%) em um relação de massa/carga 649,2 com carga 2+. Este sinal foi atribuído ao sistema $[(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}\text{LP1}(\text{OH}_2)]+(\text{OH}_2)+\text{Na}^+$, que corresponde ao íon molecular do complexo possuindo uma molécula de água e um íon hidróxido terminal ligados aos centros metálicos, uma água de hidratação e um íon Sódio.

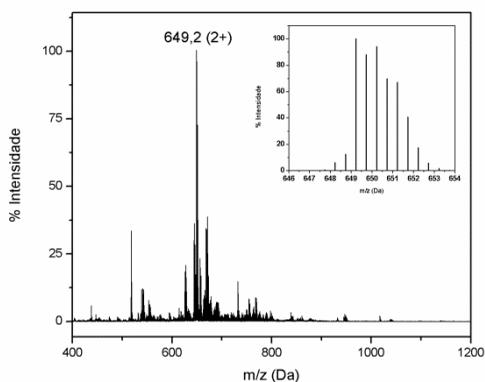


Figura 44 – Espectro de massa no modo positivo para o complexo FeZnLP1 em solução de acetonitrila 500 nmol.L⁻¹. Simulação da distribuição isotópica em destaque.

Os resultados obtidos nos espectros de massa para os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 estão resumidos na tabela abaixo:

Tabela 6 – Espécies encontradas na espectrometria de massa.

	Espécie	m/z (Da)	Representação
FeZnLAB	FeZnC ₄₀ H ₅₀ N ₇ O ₂ (2+)	433,6	FeZnLAB + 2H ₂ O
FeZnLP1	FeZnC ₅₇ H ₆₀ N ₇ O ₄ Li (2+)	517,1	FeZnLP1 + H ₂ O + Li
FeZnLP2	FeZnC ₇₄ H ₇₁ N ₇ O ₆ Na (2+)	648,2	FeZnH ₂ LP2 + 2OH + Na

4.2.6. Eletroquímica

O comportamento redox dos complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 foi avaliado através da voltametria de onda quadrada em acetonitrila. Os voltamogramas desses complexos são apresentados na Figura 45, e os potenciais redox estão resumidos na Tabela 7. Todos os potenciais redox foram referenciados ao eletrodo normal de hidrogênio (NHE) através dos padrões internos ferroceno ($E_{1/2} = 0,400$ V vs NHE) para permitir a comparação entre os potenciais determinados em meio orgânico e aquoso. (GAGNE, KOVAL et al. 1980)

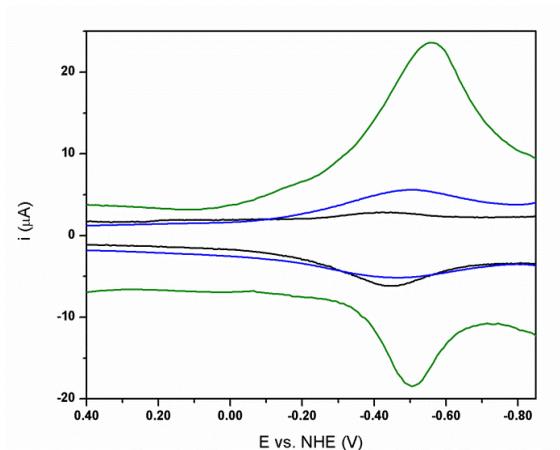


Figura 45 – Voltamograma de onda quadrada para os complexos FeZnLAB (verde), FeZnLP1 (preto) e FeZnLP2 (azul) Em solução de acetonitrila/água (2:1). Eletrodo de trabalho: Carbono Vitreo; Eletrodo Auxiliar: Platina; Eletrodo de Referência: Ag/Ag⁺; Eletrólito suporte TBAPF₆ 0,1 mol.L⁻¹; padrão interno: Ferroceno.

Tabela 7 – Dados eletroquímicos de Onda Quadrada para os complexos.

Complexo	E _{1/2} V vs. ENH
FeZnLAB	-0,532
FeZnLP1	-0,438
FeZnLP2	-0,482

Sabe-se que íons Zn^{II} não apresentam processos eletroquímicos na região de potencial estudados. Desta forma os potenciais aqui apresentados referem-se apenas a redução dos íons Fe^{III}. (PERALTA, BORTOLUZZI et al. 2010) Os potenciais determinados para todos os complexos (contendo a unidade estrutural Fe^{III}(μ-OH)M^{II}) na região de -0,40 a -0,80 V vs ENH, são atribuídos a processos *quasi-reversíveis* de redução do tipo Fe^{III} + e⁻ → Fe^{II} e possuem valores próximos aos determinados para os complexos de mesmo arranjo estrutural já reportados na literatura. (NEVES, LANZMASTER et al. 2007)

Surpreendentemente os potenciais para a redução do par Fe^{III}/Fe^{II} encontrados diferem entre si significativamente. Ainda que os ambientes de

coordenação sejam idênticos, em cada complexo existe um ambiente de segunda esfera diferenciado. Para o FeZnLAB existe uma amina primária (-NH₂), no FeZnLP1 uma amina secundária (-NH-Pir) e para o FeZnLP2 uma amina terciária (-Npir₂). Isto deve mudar consideravelmente a maneira como essas aminas interagem com a molécula de água terminal ligada ao íon Fe^{III}, o que muda a densidade eletrônica em cada complexo de modo a diferenciar os potenciais eletroquímicos.

Lanznaster demonstrou no complexo FeZnbpmp que este processo redox Fe^{III}/Fe^{II} é fortemente dependente do pH. O potencial redox na espécie Fe-OH₂ é de $\sim -0,06$ V vs. NHE. Com o aumento do pH e consequente formação da espécie Fe-OH o potencial é deslocado para $\sim -0,20$ V vs. NHE. Este deslocamento é atribuído à desprotonação da molécula de água coordenada ao centro de Fe^{III} e consequente aumento da densidade eletrônica sobre o centro metálico, o que concorda com os valores encontrados para os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2.

Um outro fator curioso se encontra no ganho de corrente observado. O complexo FeZnLAB tem um ganho de corrente muito maior do que o FeZnLP1 e o FeZnLP2. Isto ocorre provavelmente pela dificuldade maior destes complexos entrarem em contato com a superfície do eletrodo o que diminui a concentração de espécies reduzidas e também o ganho de corrente.

4.2.7. Titulação Potenciométrica

Os estudos de titulação potenciométrica dos complexos foram realizados em solução acetonitrila/água (1:1 V/V) devido à baixa solubilidade dos mesmos em água. Esses experimentos foram realizados para avaliar a presença de moléculas de água coordenadas aos centros metálicos, quando se encontram em solução. Isto é possível devido à influência da acidez de Lewis dos metais, que diminuem os valores de pK_a destas moléculas de água possibilitando que estes possam ser titulados em meio aquoso. (MARTELL & RANCOCK 1996)

Os resultados obtidos para os compostos FeZnLAB e FeZnLP1 mostraram a neutralização de 4 mol de KOH por mol de complexo na região de pH entre 3,00 e 12,00. O tratamento destes dados levou à obtenção de quatro constantes de protonação. Para o complexo FeZnLP2 não foi possível obter os dados de constante via titulação potenciométrica, uma vez que ele precipita durante a titulação. Como alternativa foi utilizada titulação espectrofotométrica para determinar os valores de constante de desprotonação deste complexo (Figura 46). Os valores são apresentados na Tabela 8 e os gráficos de distribuição das espécies podem ser vistos na Figura 47.

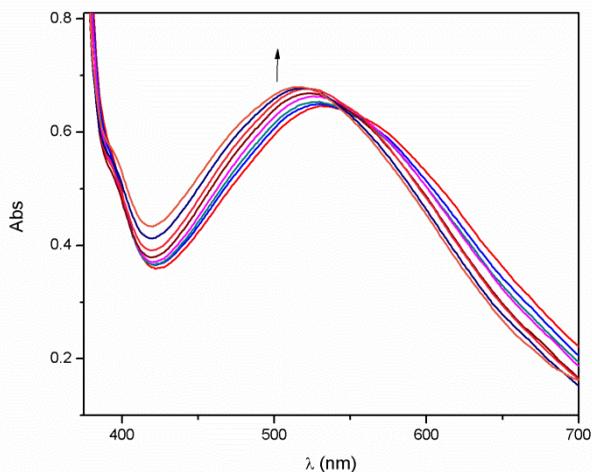


Figura 46 – Titulação espectrofotométrica do complexo FeZnLP2 em acetonitrila/água (1:1). Condições $[\text{complexo}] = 2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $I = 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaClO}_4$; Faixa de pH 3,5-6,0.

A primeira constante de protonação pode ser atribuída a molécula de água ligada ao átomo de Fe^{III} . Esta observação é consistente uma vez que valores de pK_a para moléculas de água ligadas a um átomo de Fe^{III} possuem valores próximo a 4,0. (SMITH, MARTELL et al. 1995) A segunda constante foi atribuída a desprotonação da molécula de água ligada ao átomo de Zn^{II} . A terceira e quarta constantes foram atribuídas as duas aminas do grupo butanodiamino, sendo que a amina ligada ao fenolato sempre se mantém como amina secundária em todas as estruturas, e a amina ligada ao pireno muda em cada complexo (aminas primárias, secundárias e terciárias). Isto reflete diretamente nos valores de pK_a encontrados.

Tabela 8 – Valores das constantes de protonação para os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2.

	pKa1	pKa2	pKa3	pKa4
FeZnLAB	4,08 ± 0,02	7,61 ± 0,03	10,32 ± 0,03	11,68 ± 0,05
FeZnLP1	4,21 ± 0,03	6,85 ± 0,02	9,09 ± 0,02	11,39 ± 0,04
FeZnLP2	4,27 ± 0,08	-	-	-

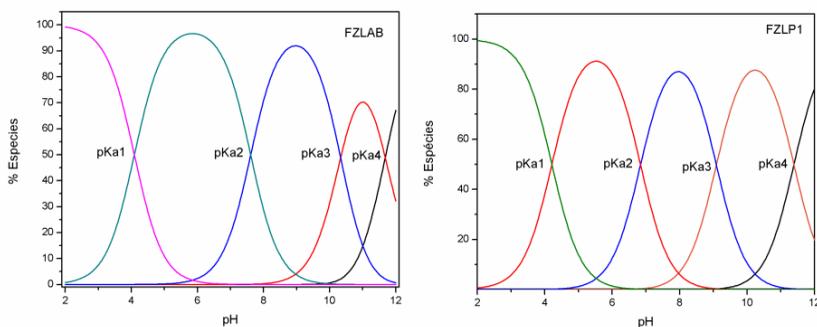


Figura 47 – Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para os complexos FeZnLAB e FeZnLP1.

Os valores para o primeiro pKa encontram-se dentro do esperado para complexos similares já descritos na literatura, onde a variação de grupos substituintes ligados ao fenolato terminal alteram de forma considerável o valor da constante. O valor do segundo pKa apresenta-se consideravelmente mais ácido. (BATISTA, NEVES et al. 2003; XAVIER, NEVES et al. 2009; SMITH, PERALTA et al. 2012) Recentemente Souza e colaboradores reportaram um estudo envolvendo o complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}\text{Py3mff}$ ligados a um grupo poliamina (PEI). Neste estudo foi observado também este comportamento onde o pKa da água ligada ao metal divalente é menor do que o esperado. Neste caso os autores justificam que a presença dos grupos amino carregados (protonados) afetam a constante de protonação do íon Cu^{II} facilitando a formação do íon hidróxido ligado ao átomo de cobre. (DE SOUZA, KREFT et al. 2013)

Os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 também apresentam grupos amino próximos a molécula de água do íon Zn^{II} . Este efeito de segunda

esfera de coordenação faz com que o pKa desta molécula de água seja diminuído pela presença dos grupos amino carregados positivamente ($-\text{NH}_3^+$). Uma proposta para os equilíbrios observados nos complexos está apresentada na figura abaixo.

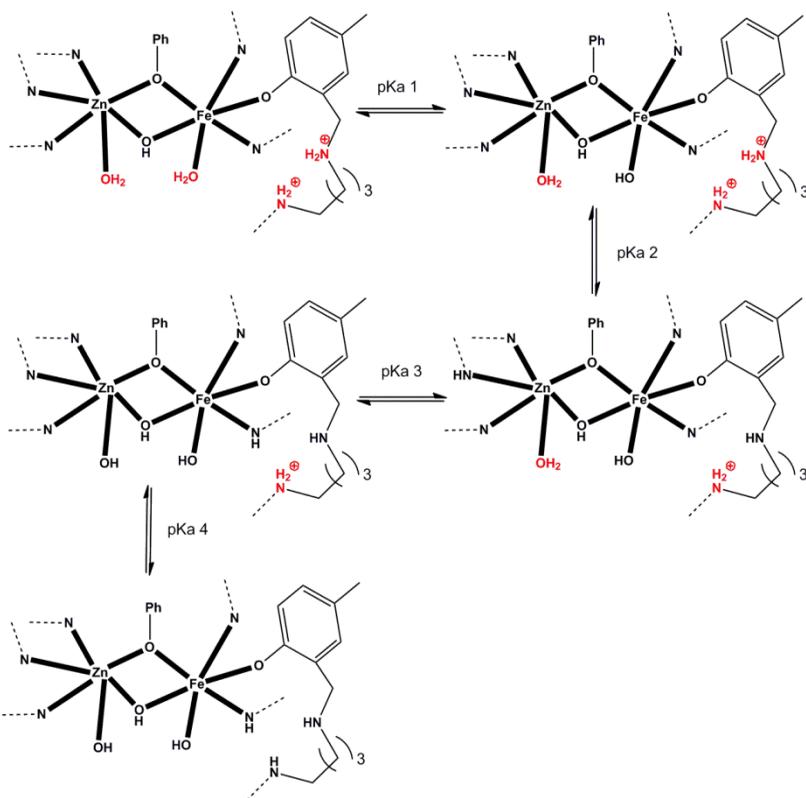


Figura 48 – Proposta geral para os equilíbrios de protonação observados nos complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2.

4.2.8. Proposta de estrutura

Baseando-se nas caracterizações apresentadas anteriormente e bem como pela comparação com os complexos FeZnbpmp (NEVES, LANZMASTER et al. 2007) e FeZnLald (PIOVEZAN, JOVITO et al. 2010) que possuem ligantes com uma configuração semelhante ao H_2LAB , $\text{H}_2\text{LP1}$ e $\text{H}_2\text{LP2}$. Desta forma

pôde-se propor uma estrutura para os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2, onde os complexos possuem o átomo de Zn^{II} ligado ao lado macio do ligante e o átomo de Fe^{III} ligado ao lado duro (fenolato). Os dois centros metálicos estão interligados por uma ponte fenoxo e uma ponte hidroxô, conforme a figura abaixo.

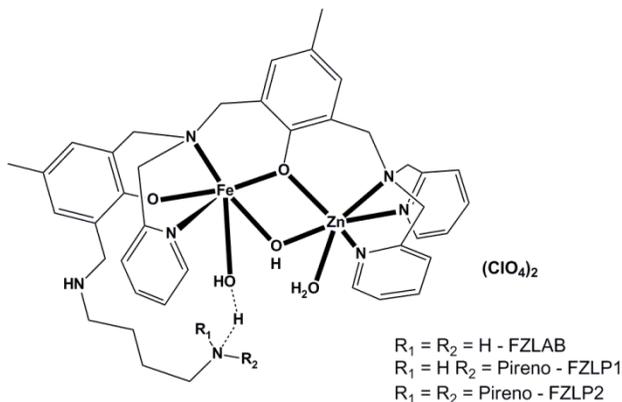


Figura 49 – Proposta de estrutura para os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2.

4.3. Estudos de Reatividade

Uma estratégia comum em compostos onde se visa o estudo de interação e clivagem de ácidos nucléicos, é o emprego de substratos modelo que possuam ligações fosfodiéster que mimetizem a ligação de éster de fosfato presente na cadeia do RNA e DNA. Para conhecer a capacidade catalítica dos complexos aqui apresentados na hidrólise da ligação fosfodiéster, os complexos foram submetidos a estudos cinéticos envolvendo o substrato modelo bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-bdnpp). (BUNTON & FARBER 1969)

A atividade catalítica dos complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 frente à hidrólise de ésteres de fosfato ativados foi avaliada através da reação com o substrato modelo, sob condições de excesso de substrato a 25 °C, conforme ilustrado na Figura 50. Para obtenção dos parâmetros cinéticos utilizou-se o método das velocidades iniciais (PISZKIEWICZ 1977), onde as reações foram monitoradas por método espectrofotométrico durante 3 a 5 % da conversão de substrato modelo a produtos, através do incremento da

absorvância em 400 nm devido à liberação do íon 2,4-dinitrofenolato (2,4-dnp) como produto. (BATISTA, NEVES et al. 2003)

A concentração de 2,4-dnp (2,4-dinitrofenolato) foi calculada com base nos valores de absorvância obtidos e do coeficiente de absorvidade molar $\epsilon = 12100 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. A contribuição devido à hidrólise não catalisada do substrato foi compensada através da diferença direta de uma reação sob condições idênticas na ausência do catalisador. A Figura 50 ilustra a reação de hidrólise do 2,4-bdnpp. (BUNTON & FARBER 1969)

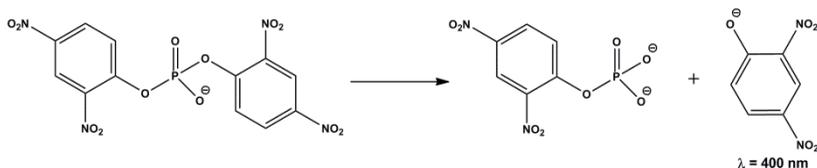


Figura 50 – Reação de hidrólise do substrato modelo bis(2,4-dinitrofenil)fosfato.

4.3.1. Efeito do pH na Hidrólise do 2,4-bdnpp

O estudo do efeito do pH sobre a velocidade da reação de hidrólise do substrato 2,4-bdnpp catalisada pelos complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 foi realizado com o intuito de analisar a influência do pH para cada sistema, encontrando o valor de pH ótimo para a reação. De forma semelhante é de grande interesse determinar o pKa cinético para cada reação, onde pode-se comparar com o estudo de equilíbrio químico em solução e determinar a espécie responsável pela atividade hidrolítica.

A atividade de hidrólise desse substrato foi investigada em uma faixa de pH entre 4,0 a 9,0 e mostrou-se ser fortemente influenciada pelo pH. Os complexos FeZnLAB e FeZnLP1 apresentaram um comportamento de sino, onde foi possível extrair os valores de pKa cinéticos para cada sistema. O complexo FeZnLP2 inesperadamente apresentou um comportamento diferente com duas regiões de máximo de atividade, conforme apresentado na Figura 51.

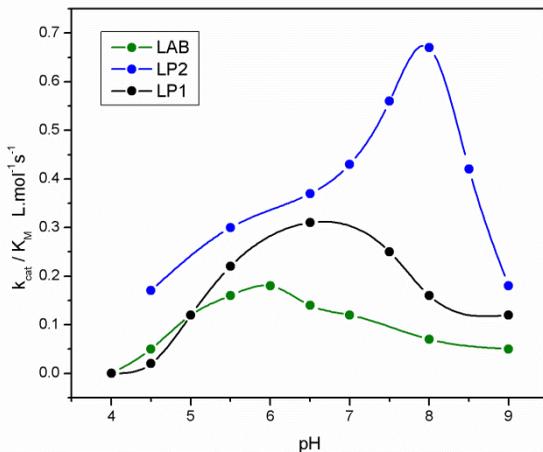


Figura 51 – Dependência da eficiência catalítica com o pH para a reação de hidrólise do 2,4-bdnpp. Condições: [Complexo] = $6,5 \times 10^{-5}$; [Substrato] = $1,0-6,5 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; [tampão] = $3,3 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹; I = 0,1 LiClO₄ mol.L⁻¹.

Recentemente Mitic e colaboradores reportaram estudos cinéticos com uma série de complexos heterobinucleares de Fe^{III}M^{II} (M^{II} = Zn, Cu, Ni, Mn) frente a hidrólise do substrato modelo 2,4-bdnpp. (MITIĆ, SMITH et al. 2006) Para esta série de compostos o primeiro pKa cinético é atribuído a desprotonação da molécula de água ligada ao íon Fe^{III}, o que geraria o nucleófilo responsável pelo ataque ao átomo de fósforo do fosfato. O segundo pKa se refere a desprotonação da molécula de água ligada ao M^{II}. Neste caso com a formação do íon hidróxido ligado ao M^{II} dificultaria a ligação ao substrato com o complexo o que diminuiria drasticamente a atividade catalítica. Estes dois valores de pKa cinético coincidem com os valores de pKa potenciométrico o que sugere que a espécie ativa seja (OH)Fe(μOH)M(OH₂).

Já os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 também possuem as mesmas atribuições dos pKas 1 e 2, entretanto estes valores não coincidem com os valores de pKa potenciométrico. Uma vez que o substrato se ligue aos complexos, ele poderia afastar os grupos amino próximos a molécula de água. Desta forma se retiraria a influência de uma carga positiva sob a molécula de água ligada ao íon Fe^{III}, justificando o aumento no valor do pKa cinético em comparação ao valor de pKa potenciométrico, conforme ilustrado na figura abaixo.

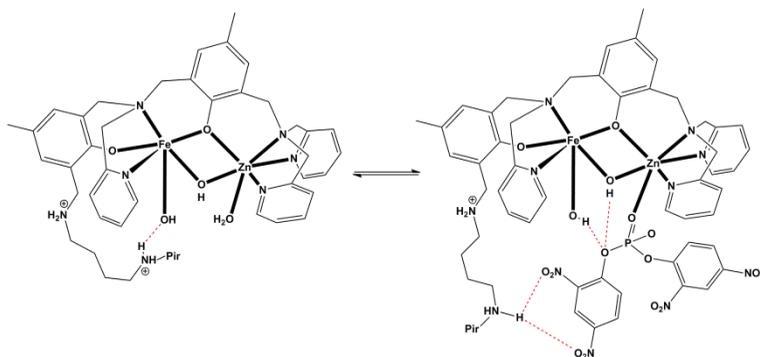


Figura 52 – Esquema demonstrativo da aproximação do substrado ao sítio ativo do complexo.

Tabela 9 – Comparação dos valores de pK_a potênciométrico e cinético na hidrólise do 2,4-bdnpp.

	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a1}	pK_{a2}
	Potenciométrico		Cinético	
FeZnLAB	4,08	7,61	4,94	6,89
FeZnLP1	4,21	6,85	5,34	7,54
FeZnLP2	4,27	7,76	5,49	-
FeZnLald*	5,07	8,21	4,90	7,90

*(PIOVEZAN, JOVITO et al. 2010)

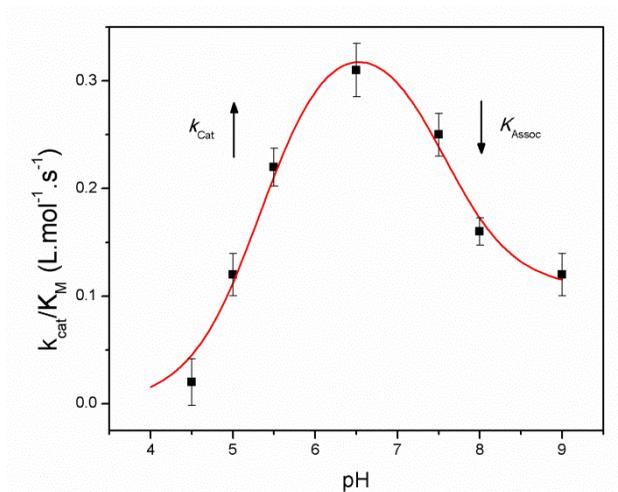


Figura 53 – Dependência da eficiência catalítica com o pH para o complexo FeZnLP1.

O efeito da formação de íons hidróxido nos centros de Fe^{III} e Zn^{II} influencia de forma distinta nos valores da eficiência catalítica. Inicialmente nas regiões de pH entre 4 e 6,5 ocorre a formação do íon hidróxido ligado ao centro de Fe^{III} (nucleófilo) o que se reflete no aumento do valor de k_{cat} . Quando é gerado o íon hidróxido na molécula de água do Zn^{II} o efeito gerado reflete nos valores de K_M (Figura 53). Este íon hidróxido dificulta a entrada do substrato refletindo diretamente nos valores de K_{Assoc} . Estes valores estão demonstrados na tabela abaixo apenas para o complexo FeZnLP1:

Tabela 10 – Dependência dos valores de k_{cat} e K_M com o pH para o complexo FeZnLP1.

<i>pH</i>	$k_{cat} (s^{-1})$	$K_M (mol.L^{-1})$
4,5	$1,3 \times 10^{-5}$	$6,05 \times 10^{-4}$
5,0	$8,2 \times 10^{-5}$	$5,8 \times 10^{-4}$
5,5	$1,1 \times 10^{-4}$	$4,7 \times 10^{-4}$
6,5	$2,1 \times 10^{-4}$	$6,6 \times 10^{-4}$
7,5	$3,1 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-3}$
8,0	$2,5 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-3}$
9,0	$2,2 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-3}$

4.3.2. Efeito da Concentração do Substrato na Hidrólise do 2,4-bdnpp

A avaliação do efeito da concentração do substrato 2,4-bdnpp, sobre a velocidade na reação de hidrólise, promovida pelos complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 foi investigada nos valores de pH onde cada um teve seu máximo de atividade (ver Tabela 11). Pode-se observar uma dependência da velocidade da reação com a concentração do 2,4-bdnpp apresentando um perfil de saturação. Desta forma foi aplicado o modelo de Michaelis-Menten de maneira a se obter os parâmetros cinéticos para este sistema (Figura 54).

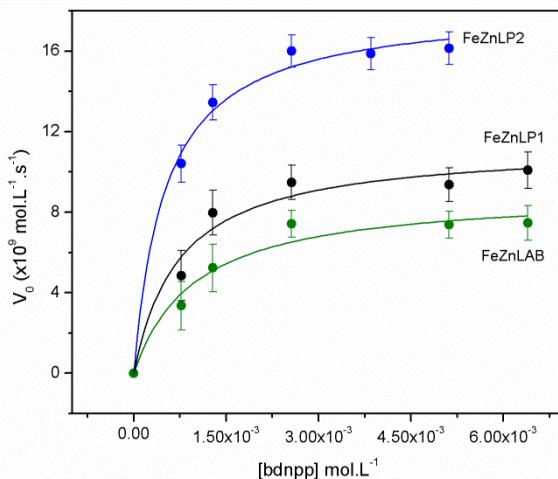


Figura 54 – Dependência da velocidade de reação com a concentração de substrato para a reação de hidrólise do 2,4-bdnpp. Condições: [Complexo] = $6,5 \times 10^{-5}$; [Substrato] = $1,0-6,5 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; [tampão] = $3,3 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹; I = 0,1 LiClO₄ mol.L⁻¹.

Tabela 11 – Parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do 2,4-bdnpp para ps complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2.

	k_{cat} S ⁻¹	K_M mol.L ⁻¹	K_{assoc} mol.L ⁻¹	k_{cat}/K_M L.mol ⁻¹ .s ⁻¹	k_{cat} / k_{nc}	pH ótimo
FeZnLAB	$1,6 \times 10^{-4}$	$8,2 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^3$	0,18	-	6,0
FeZnLP1	$2,1 \times 10^{-4}$	$6,6 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^3$	0,31	-	6,5
FeZnLP2	$2,8 \times 10^{-4}$	$5,1 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^3$	0,54	-	6,5
FeZnLald*	$9,0 \times 10^{-4}$	$3,5 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^2$	0,25	$5,0 \times 10^3$	7,0

*(PIOVEZAN, JOVITO et al. 2010)

Os valores encontrados de k_{cat} mostram que os três compostos possuem uma constante catalítica semelhante. Isso já seria esperado uma vez que os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 possuem um pKa de desprotonação da molécula de água ligada ao Fe^{III} semelhante (formação da

espécie ativa). Conforme demonstrado por Peralta e colaboradores, se a força do nucleófilo nos três complexos é similar espera-se então que apresentem uma atividade catalítica semelhante. (PERALTA, BORTOLUZZI et al. 2010)

A constante de associação demonstra a afinidade do substrato pelo catalizador. Os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 apresentaram valores de K_{assoc} aproximadamente dez vezes maior se comparado a serie de complexos $Fe^{III}Zn^{II}(\mu-OH)bbpbmp-R$. A presença dos grupos amino protonados gera uma carga positiva que faz com que o substrato se aproxime mais facilmente, uma vez que o substrato é um ânion. (SMITH, PERALTA et al. 2012)

Porém quando se avalia a eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) dos complexos é que se observa uma diferença significativa em suas propriedades catalíticas. O complexo FeZnLP2 mostrou ser o mais eficiente, apresentando um valor de eficiência 3 vezes maior que o FeZnLAB e quase duas vezes maior que o FeZnLP1. Isto pode ser tentativamente atribuído a presença dos dois grupos pirenos neste sistema. A presença destes grupos estaria gerando uma região hidrofóbica onde o nucleófilo teria uma liberdade maior para fazer o ataque ao átomo de fosforo, o que reflete nos valores de eficiência catalítica. Este comportamento também é encontrado em diversas hidrolases onde a presença de aminoácidos no sítio ativo destas enzimas contribui significativamente para o aumento da atividade catalítica. (COOK & CLELAND 2012)

Afim de avaliar se um ou os dois grupos 2,4-dinitrofenolato do substrato estariam sendo hidrolisados, realizou-se uma reação em proporção estequiométrica entre os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 e o substrato 2,4-bdnpp. Após um período de 24 horas a 25 °C os complexos foram capazes de hidrolisar apenas um fenolato, agindo apenas como uma diesterase.

A partir deste resultado foi possível calcular o número de ciclos catalíticos. Para tanto, realizou-se um experimento onde a reação de hidrólise do substrato ($[2,4-BDNPP] = 3,3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), catalisada pelos complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 ($[\text{complexo}] = 6,0 \times 10^{-5}$), foi acompanhada espectrofotometricamente em 445 nm ($\epsilon = 3600 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Após um período de 24 horas a 25 °C verificou-se que o complexo FeZnLAB catalisou a hidrólise de sete moléculas de substrato, o complexo FeZnLP1 catalisou a hidrólise de 10 moléculas o por fim o complexo FeZnLP2 catalisou a hidrólise de treze moléculas de substrato. Este valores estão em plena concordância com os encontrados por Piovezan e colaboradores, onde o complexo $Fe^{III}Zn^{II}(\mu-OH)Lald$ foi capaz de hidrolisar dez moléculas de substrato em 24 h. (PIOVEZAN, JOVITO et al. 2010)

Com o intuito de avaliar se o ataque nucleofílico ao átomo de fósforo do substrato estaria sendo realizado pelo meio (catálise básica geral) realizou-se um experimento de efeito isotópico de deutério sobre a velocidade de

hidrólise do 2,4-BDNPP pelos complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 em pH = 6,5. De acordo com Deal e colaboradores (DEAL, HENNGE et al. 1996), caso a razão entre as constantes de velocidades de duas reações de hidrólise do 2,4-bdnpp, sob as mesmas condições realizadas em H₂O e D₂O (k_H/k_D), estiver entre 0,80 e 1,50 indica que não há transferência de próton envolvida na etapa determinante da reação, sugerindo um ataque nucleofílico intramolecular. Os valores encontrados para a razão k_H/k_D para os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 foram 1,53, 1,24 e 1,12 respectivamente. Isto indica que a reação de hidrólise, catalisadas pelos complexos ocorre através de um mecanismo intramolecular no qual um íon hidróxido presente no complexo promove o ataque nucleofílico ao átomo de fósforo. (LANZMASTER 2003)

4.3.3. Proposta mecanística para a Hidrólise do 2,4-bdnpp

Levando-se em conta todos os resultados obtidos e discutidos nas seções anteriores, propõe-se que os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 atuem na hidrólise do substrato 2,4-bdnpp via um mecanismo comum. Com base em estudos nos estudos cinéticos e técnicas em solução tais como medidas de, espectroscopia eletrônica UV-Vis e titulação potenciométrica, propõe-se que os três complexos possuam a espécie $[(OH)Fe^{III}(\mu-OH)Zn^{II}(L)(OH_2)]$ como espécie responsável pela hidrólise do substrato 2,4-bdnpp nas condições de concentração e pH estudados.

Nos estudos de reatividade realizados manteve-se o controle da concentração dos complexos, do pH do meio, da força iônica, e grande excesso de substrato. Ambos os sistemas apresentaram uma cinética de saturação do tipo Michaelis-Menten. Portanto, propõe-se que a coordenação do substrato deva ocorrer por deslocamento da molécula de água, de modo que o substrato se oriente em posição *cis* ao íon hidróxido para que ocorra o ataque nucleofílico do mesmo sobre o átomo de fósforo.

No mecanismo proposto, apresentado na Figura 55, inicialmente o substrato coordena-se ao Zn^{II} pelo deslocamento de uma molécula de água, em uma etapa rápida. A seguir, o íon hidróxido presente no centro de Fe(III) atua como nucleófilo, atacando o átomo de fósforo do substrato, ocorrendo então a clivagem da ligação fosfodiéster e a conseqüente liberação do 2,4-dinitrofenolato. O monoéster, 2,4-dinitrofenilfosfato, permanece coordenado ao complexo, podendo ser deslocado pela presença de excesso do substrato 2,4-bdnpp, reiniciando o processo catalítico.

Considerando os elevados valores de K_{assoc} é provável que o grupo amino protonado tenha alguma interação com o substrato na formação do

intermediário de Michaélis complexo-substrato e que tal interação favoreça a estabilização do estado de transição. Medidas dos parâmetros de ativação poderão ajudar a esclarecer essa hipótese. (DE SOUZA, KREFT et al. 2013)

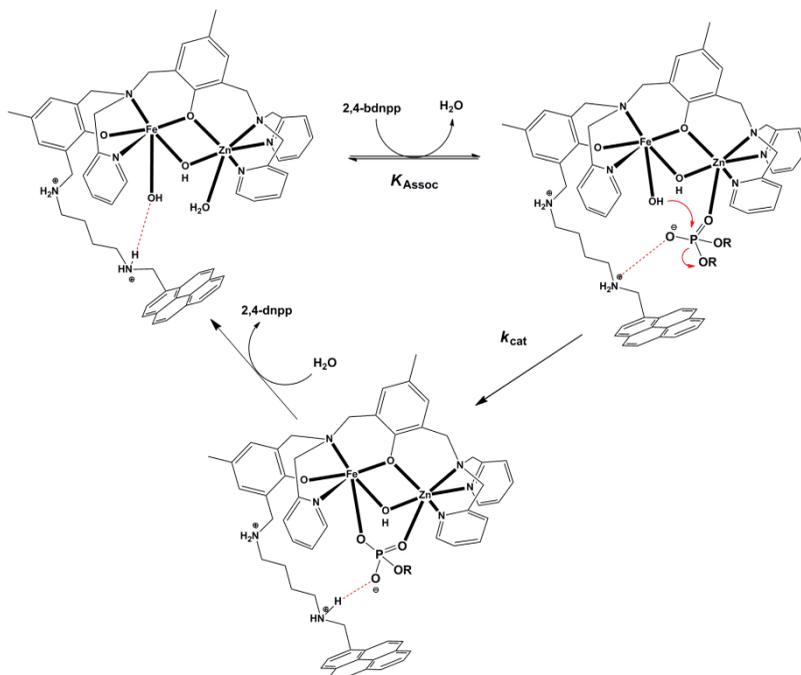


Figura 55 – Proposta de mecanismo para os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2. Ilustrado apenas para o FeZnLP1.

4.4. Estudos de Interação com DNA

A interação de compostos de coordenação com DNA, via espectroscopia eletrônica, geralmente resultam num hipocromismo com deslocamento batocromico das bandas de transferência de carga. Este comportamento é atribuído a interação π -stacking resultante entre os anéis aromáticos da molécula ligante e os pares de base. A variação do hipocromismo dá uma estimativa da extensão da interação, que pode ser medido através de uma constante de ligação K_b . Os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 apresentaram um comportamento semelhante porém com grandezas diferentes. O complexo FeZnLP2 apresentou uma maior hipocromismo nas bandas em 343 nm e 327 nm quando comparado ao complexo FeZnLP1.

Estes complexos apresentaram interações que podem ser interpretadas como mistas, sendo parte de interações com sulcos do DNA e parte intercalativas devido ao valor de K_b e também pelo pequeno desvio para o vermelho associado ao hipocromismo. Em casos onde se sabe que há intercalação como em alguns complexos de rutênio, os desvios para o vermelho observados apresentam mudanças muito mais significativas (BARTON, DANISHEFSKY et al. 1984; FRIEDMAN, CHAMBRON et al. 1990).

O complexo FeZnLP2 apresentou um valor de K_b cinco vezes maior que o complexo FeZnLP1. Isto sugere claramente o aumento da interação do complexo com o DNA pela presença do segundo grupo pireno. Visando obter informações acerca da especificidade desses sistemas foi realizada também uma titulação com diferentes oligonucleotídeo: poli-AT (rico em sítios A-T), poli-GC (rico em sítios G-C) e poli-AT50 (com aproximadamente 50% de sítios A-T). Os valores de K_b para o oligonucleotídeo pAT é quatro vezes maior que o valor da constante para o pGC. Este experimento mostra que o complexo FeZnLP1 tem uma maior afinidade por regiões ricas em A-T conforme resultados na Tabela 12. O valor de K_b para o pAT é duas vezes maior que o pAT50, o que demonstra claramente que o aumento de pares A-T na estrutura do oligonucleotídeo favorece a interação do complexo.

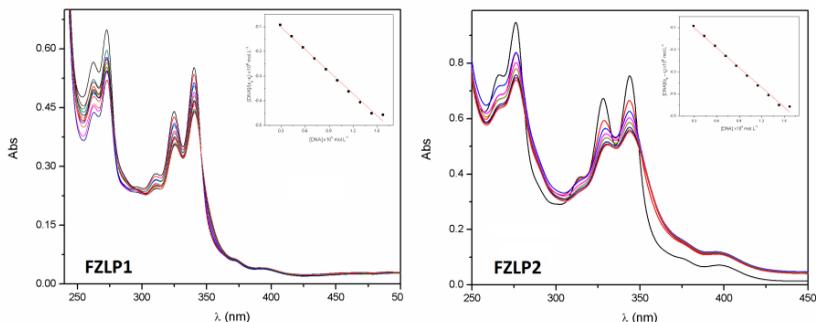


Figura 56 – Titulação dos complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 via espectroscopia eletrônica com adições de CT-DNA.

Tabela 12 - Constantes de interação calculadas a partir das titulações com DNA-CT para os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2.

	K_b (mol.L^{-1})	K_b pAT (mol.L^{-1})	K_b pGC (mol.L^{-1})	K_b p50AT (mol.L^{-1})
FeZnLP1	2.4×10^5	2.78×10^5	$6,83 \times 10^4$	1.26×10^5
FeZnLP2	$1,2 \times 10^6$	-	-	-

Os grupos pireno possuem propriedades espectrocópicas bem conhecidas. A fluorescência do grupo pireno é aumentada consideravelmente com a formação de uma estrutura de excímero (Figura 57). Esta estrutura de excímero apresenta uma forte emissão na região de 450 nm. (WINNIK 1993)

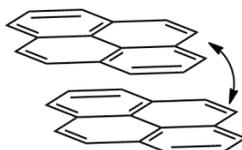


Figura 57 – Representação da estrutura de excímero formada pelo pireno.

Foi realizada uma titulação via fluorescência do complexo FeZnLP1 baseada na emissão do estado de excímero formado em 453 nm. Sucessivas adições de uma solução de CT-DNA foram feitas, onde pode-se observar claramente a diminuição da banda de emissão do excímero. Este comportamento já foi reportado por Groger e colaboradores, onde foram estudados diferentes compostos orgânicos com grupos pireno e diferentes tipos de DNA e oligonucleotídeos via fluorescência. (GROGER, BARETIC et al. 2011) Sugere-se então que o DNA esteja quebrando essa estrutura de excímero pela interação dos anéis aromáticos do grupo pireno com as bases nitrogenadas do DNA (π -stacking), porém não se pode afirmar o tipo de interação (intercalação ou via sulco) o complexo está realizando.

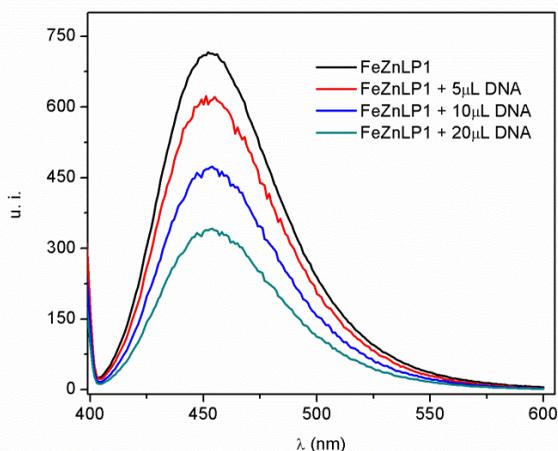


Figura 58 - Titulação via Fluorescência do complexo FeZnLP1 com CT-DNA.

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD), permite se observar alterações na estrutura secundária do DNA pelos complexos em estudo, como o empilhamento de bases e a helicidade direita da dupla-fita. A inserção de uma molécula plana no DNA, causa uma extensão local do desenrolamento polinucleído da dupla hélice (Helicidade). Assim, na região afetada, as posições relativas das bases são substancialmente alteradas. A estrutura modificada contendo o ligante planar, além de afetar as propriedades hidrodinâmicas do DNA dramaticamente, altera a resposta chiral e optica do polinucleótido. (GRAY, HUNG et al. 1995) Os resultados dos ensaios ao abrigo de luz encontra-se na Figura 59 para os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2, respectivamente.

A adição de concentrações crescentes de FeZnLP1 à amostra de CT-DNA (100 μM) resultou no hipocromismo da banda de 275 nm com um moderado deslocamento batocrômico de 275 para 283 nm. A banda em 245 nm também sofreu um deslocamento hipocrômico e batocrômico de 245 para 252 nm. A titulação do complexo FeZnLP2 e DNA, de forma semelhante resultou no hipocromismo da banda de 275 nm com um pequeno deslocamento batocrômico de 275 para 280 nm, e a banda em 245 nm sofreu deslocamentos hipocrômicos e batocrômicos de 245 para 250 nm. Constata-se inicialmente que os dois complexos são capazes de alterar a estrutura secundária do DNA (Figura 59).

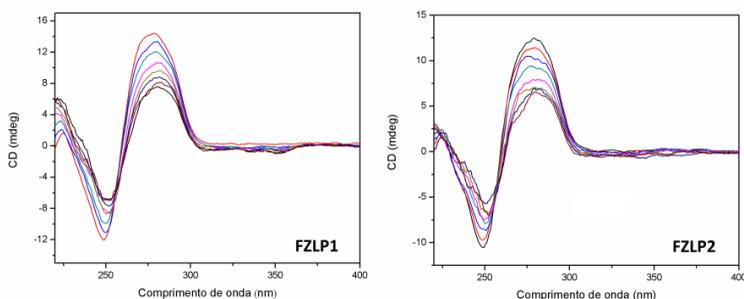


Figura 59 - Espectro de dicroísmo circular de DNA na ausência e presença de complexo. Condições reacionais: [CT-DNA] = 100 μM ; [Tampão] = 10 mM de Tris-HCl pH 7,0; [complexo] = 0 a 50 μM ; Temperatura = 37 $^{\circ}\text{C}$.

A análise do espectro CD para o DNA não é trivial devido a alta complexidade da estrutura dos ácidos nucleicos. Agentes intercalantes, como o brometo de etídio induzem o hiperromismo da banda em 275 nm do DNA e o hipocromismo da banda de 245 nm, já agentes ligadores de sulco tendem a provocar exatamente o contrário. (GRAY, HUNG et al. 1995; TJIOE, MEININGER et al. 2011)

O comportamento apresentado pelos complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 sugerem uma interação mista, acarretando em mudanças na conformação do DNA, como por exemplo a conversão de uma forma do tipo B para uma estrutura mais parecida com tipo C (Figura 60). Interações com cátions podem dissipar a carga negativa sobre as bases nitrogenadas, átomos de oxigênios dos grupos fosfato simultaneamente, bem como na região do sulco da para promover estas mudanças conformacionais. (BARTON, DANISHEFSKY et al. 1984)

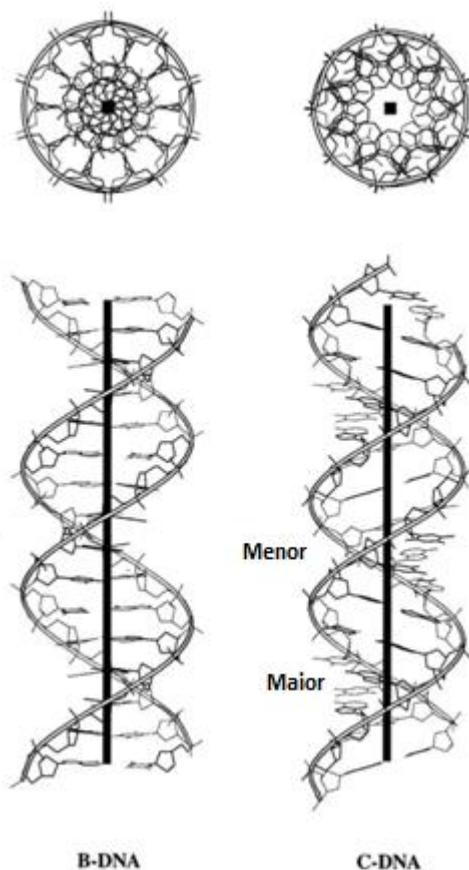


Figura 60 – Representação das conformações B e C do DNA.

Desta forma os anéis dos grupos pireno devem estar se inserindo parcialmente entre as pares de base do DNA, e o complexo deve estar se ligando aos grupos fosfato numa interação direta pelo sulco maior. Na faixa de pH estudado as amins dos grupos espaçador estão protonadas (carga 2+), o que deve também contribuir nesta interação com o sulco do DNA. (FISH, CHEN et al. 1983)

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma nova metodologia sintética desenvolvida para a obtenção de ligantes não simétricos foi aplicada com sucesso na obtenção de ligantes inspirados no H₂bpbmp. Através desta metodologia, foram sintetizados os ligantes H₂LAB, H₂LP1 e H₂LP2. Todos foram obtidos com bons rendimentos e pureza adequada para síntese de compostos de coordenação e caracterizados por RMN-¹H, FT-IR e Espectrometria ESI-MS.

A partir dos ligantes H₂LAB, H₂LP1 e H₂LP2 foram preparados os complexos FeZnLAB = [Fe^{III}Zn^{II}LAB(μOH)(OH₂)](ClO₄)₂, FeZnLP1 = [Fe^{III}Zn^{II}LP1(μOH)(OH₂)](ClO₄)₂, FeZnLP2 = [Fe^{III}Zn^{II}LP2(μOH)(OH₂)](ClO₄)₂ além de outros complexos não descritos aqui. Todos foram caracterizados por análises espectroscópicas, eletroquímicas e titulados potenciometricamente.

Através da comparação de propriedades físico-químicas destes complexos com o complexo [Fe^{III}Zn^{II}(bpbmp)(μOH)(H₂O)](ClO₄)₂ que quando em solução aquosa, geram espécies do tipo (HO)Fe^{III}(μ-OH)M^{II}(H₂O), (demonstrada ser a forma ativa na catálise de hidrólise de esteres de fosfato) eles foram testados frente a hidrólise de ésteres de fosfato. Desta forma, todos os compostos estudados neste trabalho foram capazes de catalisar a hidrólise do diéster de fosfato 2,4-bdnpp. Os complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2 apresentaram um valor de constante catalítica menor que o compostos FeZnbpbmp, porém apresentaram uma alta eficiência catalítica, decorrente das interações de segunda esfera de coordenação que aumentaram a afinidade pelo substrato.

A partir dos dados espectroscópicos, eletroquímicos, cinéticos e de titulação potenciométrica foi possível propor um ciclo catalítico para a hidrólise do 2,4-bdnpp mediada pelos complexos FeZnLAB, FeZnLP1 e FeZnLP2. Onde o mecanismo proposto inclui ataques nucleofílicos intramoleculares, envolvendo um ataque do grupo hidróxido terminal coordenado ao centro de Fe^{III} ao átomo de fósforo do substrato ligado ao centro de Zn^{II}.

Estudos de interação dos complexos frente a molécula de DNA via titulação espectrofotométrica, fluorescência e dicroísmo circular apontam um aumento significativo dos complexos na interação com a cadeia do DNA quando comparado aos complexos sem o grupo pireno. Dados de clivagem do DNA e de identificação dos produtos da clivagem via espectrometria de massas estão em andamento e serão alvo de futuras publicações. Estudos do complexo FeZnLP1 com diferentes oligonucleotídeos mostraram claramente uma afinidade maior do composto por regiões ricas em pares de base A-T.

6. REFERÊNCIAS

- BARON, A. J., C. STEVENS, et al. (1994). "Structure and mechanism of galactose oxidase. The free radical site." Journal of Biological Chemistry **269**(40): 25095-25105.
- BARTON, J. K., A. DANISHEFSKY, et al. (1984). "Tris(phenanthroline)ruthenium(II): stereoselectivity in binding to DNA." Journal of the American Chemical Society **106**(7): 2172-2176.
- BATISTA, S. C., A. NEVES, et al. (2003). "Highly efficient phosphate diester hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical FeIIINiII model complex." Inorganic Chemistry Communications **6**(8): 1161-1165.
- BOER, D. R., A. CANALS, et al. (2009). "DNA-binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes." Dalton Transactions(3): 399-414.
- BOSEGGIA, E., M. GATOS, et al. (2004). "Toward Efficient Zn(II)-Based Artificial Nucleases." Journal of the American Chemical Society **126**(14): 4543-4549.
- BUNTON, C. A. & S. J. FARBER (1969). "Hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate." Journal of Organic Chemistry **34**(4): 767-772.
- BUNTON, C. A. & S. J. FARBER (1969). "Hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate." The Journal of Organic Chemistry **34**(4): 767-772.
- CHEN, X., J. FAN, et al. (2009). "Bisintercalator-containing dinuclear iron(III) complex: An efficient artificial nuclease." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **19**(15): 4139-4142.
- CHEN, X. Q., J. Y. WANG, et al. (2008). "Synthesis and DNA cleavage activity of diiron(III) complex bearing pyrene group." Chinese Chemical Letters **19**(3): 342-344.
- COLEMAN, J. E. (1992). "Structure and Mechanism of Alkaline Phosphatase." Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure **21**(1): 441-483.
- COMBA, P., L. R. GAHAN, et al. (2012). "Spectroscopic Characterization of the Active FeIIIFeIII and FeIIIFeII Forms of a Purple Acid Phosphatase Model System." Inorganic Chemistry **51**(22): 12195-12209.
- COOK, P. F. & W. W. CLELAND (2012). Enzyme Kinetics and Mechanism, Garland Science.
- COTTON, F. A., E. E. HAZEN, et al. (1979). "Staphylococcal nuclease: Proposed mechanism of action based on structure of enzyme—thymidine 3',5'-bisphosphate—calcium ion complex at 1.5-Å resolution." Proceedings of the National Academy of Sciences **76**(6): 2551-2555.
- CRICHTON, R. R. (2008). Biological Inorganic Chemistry - An Introduction. Amsterdam, Elsevier.
- DAVIS, J. C., S. S. LIN, et al. (1981). "Kinetic and optical spectroscopic studies on the purple acid phosphatase from beef spleen." Biochemistry **20**(14): 4062-4067.

- DE SOUZA, B., G. L. KREFT, et al. (2013). "Second-Coordination-Sphere Effects Increase the Catalytic Efficiency of an Extended Model for FeIIIMII Purple Acid Phosphatases." Inorganic Chemistry **52**(7): 3594-3596.
- DEAL, K. A., A. C. HENGGE, et al. (1996). "Characterization of Transition States in Dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-Catalyzed Activated Phosphate Diester Hydrolysis." Journal of the American Chemical Society **118**(7): 1713-1718.
- DRENNAN, C. L. & W. B. TOLMAN (2007). "Bioinorganic chemistry: New vistas in bioinorganic chemistry." Current Opinion in Chemical Biology **11**(2): 113-114.
- ERKKILA, K. E., D. T. ODOM, et al. (1999). "Recognition and Reaction of Metallointercalators with DNA." Chemical Reviews (Washington, DC, United States) **99**(9): 2777-2796.
- FISH, S. R., C. Y. CHEN, et al. (1983). "Conformational characteristics of deoxyribonucleic acid butylamine complexes with C-type circular dichroism spectra. 2. A Raman spectroscopic study." Biochemistry **22**(20): 4751-4756.
- FITZSIMONS, M. P. & J. K. BARTON (1997). "Design of a Synthetic Nuclease: DNA Hydrolysis by a Zinc-Binding Peptide Tethered to a Rhodium Intercalator." Journal of the American Chemical Society **119**(14): 3379-3380.
- FRIEDMAN, A. E., J. C. CHAMBRON, et al. (1990). "A molecular light switch for DNA: Ru(bpy)₂(dppz)₂⁺." Journal of the American Chemical Society **112**(12): 4960-4962.
- FUNHOFF, E. G., Y. WANG, et al. (2005). "Substrate positioning by His92 is important in catalysis by purple acid phosphatase." FEBS Journal **272**(12): 2968-2977.
- GABER, B. P., V. MISKOWSKI, et al. (1974). "Resonance Raman scattering from iron(III)- and copper(II)-transferrin and an iron(III) model compound. Spectroscopic interpretation of the transferrin binding site." Journal of the American Chemical Society **96**(22): 6868-6873.
- GAGNE, R. R., C. A. KOVAL, et al. (1980). "Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements." Inorganic Chemistry **19**(9): 2854-2855.
- GAHAN, L. R., S. J. SMITH, et al. (2009). "Phosphate Ester Hydrolysis: Metal Complexes As Purple Acid Phosphatase and Phosphotriesterase Analogues." European Journal of Inorganic Chemistry **2009**(19): 2745-2758.
- GEARY, W. J. (1971). "The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds." Coordination Chemistry Reviews **7**(1): 81-122.
- GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M., G. ALZUET, et al. (2003). "Oxidative Cleavage of DNA by a New Ferromagnetic Linear Trinuclear Copper(II) Complex in the Presence of H₂O₂/Sodium Ascorbate." Inorganic Chemistry **42**(9): 2992-2998.
- GRAY, D. M., S.-H. HUNG, et al. (1995). [3] Absorption and circular dichroism spectroscopy of nucleic acid duplexes and triplexes. Methods in Enzymology. S. Kenneth, Academic Press. **Volume 246**: 19-34.

- GRAY, H. B. (2003). "Biological inorganic chemistry at the beginning of the 21st century." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(7): 3563-3568.
- GROGER, K., D. BARETIC, et al. (2011). "Guanidiniocarbonyl-pyrrole-aryl conjugates as nucleic acid sensors: switch of binding mode and spectroscopic responses by introducing additional binding sites into the linker." Organic & Biomolecular Chemistry **9**(1): 198-209.
- HAAS, K. L. & K. J. FRANZ (2009). "Application of Metal Coordination Chemistry To Explore and Manipulate Cell Biology." Chemical Reviews **109**(10): 4921-4960.
- HENDERSON, W. & J. S. MCINDOE (2005). *Mass Spectrometry of Inorganic, Coordination and Organometallic Compounds*. New York, John Wiley & Sons.
- HERRADOR, M. Á. & A. G. GONZÁLEZ (2002). "Potentiometric titrations in acetonitrile–water mixtures: evaluation of aqueous ionisation constant of ketoprofen." Talanta **56**(4): 769-775.
- HOFFMANN, E. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. New York, John Wiley & Sons.
- HOWE-GRANT, M. & S. J. LIPPARD (1979). "Binding of platinum(II) intercalation reagents to deoxyribonucleic acid. Dependence on base-pair composition, nature of the intercalator, and ionic strength." Biochemistry **18**(26): 5762-5769.
- JARENMARK, M., M. HAUKKA, et al. (2011). "Synthesis, Characterization, and Reactivity Studies of Heterodinuclear Complexes Modeling Active Sites in Purple Acid Phosphatases." Inorganic Chemistry **50**(9): 3866-3887.
- KAIM, W. & B. SCHWEDERSKI (1994). Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life. New York, John Wiley & Sons.
- KEENE, F. R., J. A. SMITH, et al. (2009). "Metal complexes as structure-selective binding agents for nucleic acids." Coordination Chemistry Reviews **253**(15–16): 2021-2035.
- KLABUNDE, T., N. STRÄTER, et al. (1996). "Mechanism of Fe(III) – Zn(II) Purple Acid Phosphatase Based on Crystal Structures." Journal of Molecular Biology **259**(4): 737-748.
- KOOLMANN, J. & K. H. ROEHM (2005). *Color Atlas of Biochemistry*. New York, Thieme.
- KRAPCHO, A. P. & C. S. KUELL (1990). "Mono-Protected Diamines. N-tert-Butoxycarbonyl- α,ω -Alkanediamines from α,ω -Alkanediamines." Synthetic Communications **20**(16): 2559-2564.
- LANZMASTER, M. (2003). *Desenvolvimento de novos modelos estruturais e funcionais para as fosfatases ácidas púrpuras*. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina. **Doutorado**.
- LANZMASTER, M., A. NEVES, et al. (2002). "New FeIIIzNII Complex Containing a Single Terminal Fe–Ophenolate Bond as a Structural and Functional Model for the Active Site of Red Kidney Bean Purple Acid Phosphatase." Inorganic Chemistry **41**(22): 5641-5643.

- LIANG, Q., P. D. EASON, et al. (1995). "Metallopeptide-DNA Interactions: Site-Selectivity Based on Amino Acid Composition and Chirality." Journal of the American Chemical Society **117**(38): 9625-9631.
- LINDQVIST, Y., E. JOHANSSON, et al. (1999). "Three-dimensional structure of a mammalian purple acid phosphatase at 2.2 Å resolution with a μ -(hydr)oxo bridged di-iron center." Journal of Molecular Biology **291**(1): 135-147.
- LIPPARD, S. J. & J. M. BERG (1994). Principles of Bioinorganic Chemistry. Mill Valley, University Science Books.
- MANCINI, F., P. SCRIMIN, et al. (2012). "Progress in artificial metallonucleases." Chemical Communications **48**(45): 5545-5559.
- MARTELL, A. E. & R. J. MOTEKAITIS (1992). Determination and Use of Stability Constants, VHC Publishers, Inc.: Weinheim, Germany.
- MARTELL, A. E. & R. D. RANCOCK (1996). Metal Complexes in Aqueous Solutions. London, Springer.
- MITIĆ, N., S. J. SMITH, et al. (2006). "The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases." Chemical Reviews **106**(8): 3338-3363.
- MITIĆ, N., S. J. SMITH, et al. (2006). "The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases." Chemical Reviews (Washington, DC, United States) **106**(8): 3338-3363.
- NEIDLE, S. (2008). Principles of Nucleic Acid Structure. New York, Academic Press.
- NELSON, D. L. & M. M. COX (2004). Lehninger Principles of Biochemistry. New York, W. H. Freeman.
- NEVES, A., M. LANZMASTER, et al. (2007). "An Unprecedented FeIII(μ -OH)ZnII Complex that Mimics the Structural and Functional Properties of Purple Acid Phosphatases." Journal of the American Chemical Society **129**(24): 7486-7487.
- NISHINO, T. & K. MORIKAWA (2002). "Structure and function of nucleases in DNA repair: shape, grip and blade of the DNA scissor." Oncogene **21**: 9022-9032.
- PERALTA, R. A., A. J. BORTOLUZZI, et al. (2010). "Electronic Structure and Spectro-Structural Correlations of FeIII ZnII Biomimetics for Purple Acid Phosphatases: Relevance to DNA Cleavage and Cytotoxic Activity." Inorganic Chemistry **49**(24): 11421-11438.
- PIOVEZAN, C., R. JOVITO, et al. (2010). "Heterodinuclear FeIII ZnII-Bioinspired Complex Supported on 3-Aminopropyl Silica. Efficient Hydrolysis of Phosphate Diester Bonds." Inorganic Chemistry **49**(6): 2580-2582.
- PISZKIEWICZ, D. (1977). Kinetics of chemical and enzyme-catalyzed reactions. New York, Oxford University Press.
- ROAT-MALONE, R. M. (2002). Bioinorganic Chemistry : A Short Course. New Jersey, Jon Wiley & Sons, Inc. .
- SCARPELLINI, M., A. NEVES, et al. (2003). "Phosphate Diester Hydrolysis and DNA Damage Promoted by New cis-Aqua/Hydroxy Copper(II) Complexes Containing Tridentate Imidazole-rich Ligands." Inorganic Chemistry **42**(25): 8353-8365.

- SCHENK, G., T. ELLIOTT, et al. (2008). "Crystal structures of a purple acid phosphatase, representing different steps of this enzyme's catalytic cycle." BMC Structural Biology **8**(1): 6.
- SCHENK, G., L. R. GAHAN, et al. (2005). "Phosphate forms an unusual tripodal complex with the Fe–Mn center of sweet potato purple acid phosphatase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(2): 273-278.
- SHELL, A. T. & L. D. MOHLER (2007). "Hydrolytic DNA Cleavage by Non-Lanthanide Metal Complexes." Current Organic Chemistry **11**: 1525-1542.
- SHOOK, R. L. & A. S. BOROVNIK (2010). "Role of the Secondary Coordination Sphere in Metal-Mediated Dioxxygen Activation." Inorganic Chemistry **49**(8): 3646-3660.
- SIGMAN, D. S. (1990). "Chemical nucleases." Biochemistry **29**(39): 9097-9105.
- SILVERSTEIN, R. M., G. C. BASSLER, et al. (1991). Spectrometric Identification of Organic Compounds. New York, Jon Wiley & Sons, Inc.
- SMITH, R. M., A. E. MARTELL, et al. (1995). NIST Critical Stabilityconstant of Metal Complexes. Gaithersburg, NIST Standart Reference Database.
- SMITH, S. J., R. A. PERALTA, et al. (2012). "Spectroscopic and Catalytic Characterization of a Functional FeIII/FeII Biomimetic for the Active Site of Uteroferrin and Protein Cleavage." Inorganic Chemistry **51**(4): 2065-2078.
- SREEDHARA, A. & J. A. COWAN (2001). "Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes." JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry **6**(4): 337-347.
- STRYER, L., J. M. BERG, et al. (2002). Biochemistry, New York: W H Freeman.
- THAN, R., A. A. FELDMANN, et al. (1999). "Structural and functional studies on model compounds of purple acid phosphatases and catechol oxidases." Coordination Chemistry Reviews **182**(1): 211-241.
- TJIOE, L., A. MEININGER, et al. (2011). "Efficient Plasmid DNA Cleavage by Copper(II) Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane Ligands Featuring Xylyl-Linked Guanidinium Groups." Inorganic Chemistry **50**(10): 4327-4339.
- WATSON, J. D. & F. H. C. CRICK (1953). "Molecular Structure of Deoxyntopentose Nucleic Acids." Nature: 4356.
- WILCOX, D. E. (1996). "Binuclear Metallohydrolases." Chemical Reviews **96**(7): 2435-2458.
- WINNIK, F. M. (1993). "Photophysics of preassociated pyrenes in aqueous polymer solutions and in other organized media." Chemical Reviews (Washington, DC, United States) **93**(2): 587-614.
- WOLFE, A., G. H. SHIMER, et al. (1987). "Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA." Biochemistry **26**(20): 6392-6396.
- XAVIER, F. R., A. NEVES, et al. (2009). "Unsymmetrical FeIII/CoII and GaIII/CoII Complexes as Chemical Hydrolases: Biomimetic Models for Purple Acid Phosphatases (PAPs)." Inorganic Chemistry **48**(16): 7905-7921.
- XU, Z., N. J. SINGH, et al. (2009). "Unique Sandwich Stacking of Pyrene-Adenine-Pyrene for Selective and Ratiometric Fluorescent Sensing of ATP at

- Physiological pH." Journal of the American Chemical Society **131**(42): 15528-15533.
- YANG, H., K. L. METERA, et al. (2010). "DNA modified with metal complexes: Applications in the construction of higher order metal–DNA nanostructures." Coordination Chemistry Reviews **254**(19–20): 2403-2415.
- ZHAO, M., H.-B. WANG, et al. (2013). "Insights into metalloenzyme microenvironments: biomimetic metal complexes with a functional second coordination sphere." Chemical Society Reviews **42**(21): 8360-8375.



Contents lists available at ScienceDirect

Inorganic Chemistry Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/inoche



New mononuclear copper(II) complex based on a salen derivative ligand with an unusual coordination and its catecholase activity

Tiago Pacheco Camargo^a, Rosely A. Peralta^{a,*}, Raphael Moreira^b, Eduardo E. Castellano^b, Adailton J. Bortoluzzi^a, Ademir Neves^{a,b}^a Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Química, Laboratório de Eletroquímica e Cristalografia – LABEQ, Campus Universitário, Ilha do Fundão, 04660-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ^b Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 368, CEP 13506-970, São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 May 2013
Accepted 22 September 2013
Available online 29 September 2013Keywords:
Salen derivative ligand
Copper(II) complex
 π -Stacking
Catecholase

ABSTRACT

The new mononuclear copper(II) complex $[\text{Cu}^{2+}(\text{H}_2\text{LDA})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$ ($\text{H}_2\text{LDA} = \text{N,N}'\text{-bis}[(2\text{-hydroxy-3-formyl-5-methylphenyl})(\text{dimethyl})\text{-ethylammonium}]$) with an unusual coordination mode of a salen derivative ligand is reported. The most interesting feature of 1 is that the ligand is doubly protonated and presents a significant intermolecular π -stacking interaction, contributing to the dimer structure stabilization in the solid state and in CH_3CN and methanolic solutions. The complex was characterized by X-ray crystallography and shows catecholase-like activity in the oxidation of the substrate 3,5-di-*tert*-butylcatechol (3,5-dtbc) with the formation of H_2O_2 , which kinetic parameters are similar to those observed in conventional dinuclear bridged Cu^2 complexes.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction. Active copper(II) ions centers dominate the field of biological oxygen chemistry and play a vital role in catalysis [1]. The oxidation of organic substrates with molecular oxygen under mild conditions is of great interest for industrial and synthetic processes, and the ability of copper complexes to oxidize phenols and catechols has been known for at least 40 years [2].

Since the first reports of complexes using salen (salen = di(salicylidene)ethylenediamine) as ligand [3,4], the area of metal-salen catalysis has expanded greatly. A significant number of metal-salen like complexes have been reported in the literature (more than 4000 entries were found on the ISI Web of knowledge under the topic salen) and many of them have been used as catalysts in different oxidation reactions [5,6]. The easy synthesis and modification of the salen ligand skeleton contribute to making it a good option for the design of new catalysts. Salen-type ligands generally coordinate to the metal with N_2O_2 atom donors. Herein, we report the synthesis and characterization of a new salen derivative ligand containing a carbonyl group attached to the phenyl group, the X-ray structure of the Cu^{2+} complex (Fig. 1) and the catecholase activity of the oxidation of the substrate 3,5-di-*tert*-butylcatechol (3,5-dtbc). Interestingly, in the present structure of 1, the Cu^{2+} center is coordinated by the oxygen atoms of the ligand H_2LDA while the amine nitrogens are protonated. It is important to emphasize here that only one other example of this sort of ligand and its Cu^{2+} complex has been reported in the literature [7].

Experimental. The ligand $\text{N,N}'\text{-bis}[(2\text{-hydroxy-3-formyl-5-methylphenyl})(\text{dimethyl})\text{-ethylammonium}]$ (H_2LDA) was obtained by nucleophilic substitution of 2-hydroxy-3-chloro-methyl-5-methylbenzaldehyde and $\text{N,N}'\text{-dimethyl-ethylene diamine}$ in dichloro-methane [8]. The product was recrystallized from ethanol to give light yellow crystals, yield 78%. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 2.26 (s, 6H, CH_3); 2.20 (s, 4H, CH_2); 2.69 (s, 6H, CH_2 amine); 3.68 (s, 4H, CH_2); 7.22 (s, 2H, CH_6); 7.26 (s, 2H, CH_6); 7.38 (s, 2H, OH_{amide}); 10.18 (s, 2H, $\text{CH}_{\text{aldehyde}}$). $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4$ calcd: C 68.73; H 7.34; N 7.93. Found: C 68.17; H 7.84; N 7.26. MP: 131–132 °C.

The complex 1 was prepared according to the following procedure: To a 20 mL acetonitrile solution containing 0.192 g (0.5 mmol) of the ligand, it was added, 15 mL of a acetonitrile solution of copper(II) perchlorate (0.187 g, 0.5 mmol) was slowly added. After 20 min, a few drops of an aqueous solution of perchloric acid (2 M) were added and the solution was allowed to stand. After 3 days, green crystals were obtained with 67% yield. $\text{CuC}_{22}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_{12}$ calcd: C 40.85; H 4.36; N 4.33. Found: C 40.70; H 4.31; N 4.29.

Elemental analysis (CHN) was performed on a Carlo Erba 5-1110 analyzer. Electronic absorption spectra in the 200–1200 nm range were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 19 spectrophotometer. Electrochemical measurements were obtained using a Bio Analytical potentiostat/galvanostat. Square-wave voltammograms were obtained for the complex in acetonitrile solution containing 0.1 M tetrabutylammonium hexafluorophosphate as the supporting electrolyte under argon atmosphere. The electrochemical cell employed was of a standard three-electrode configuration: glassy carbon electrode (working), platinum wire (counter), Ag/AgCl (reference). The Fc^+/Fc couple ($E_{1/2} = 400$ mV vs NHE) was used as the internal standard [9]. The X-band (9.76 GHz)

* Corresponding author. Tel: +55 41 3722 6046; fax: +55 48 310 10850.
E-mail address: rosely.peralta@ufscar.br (R.A. Peralta), ademir.neves@ufscar.br (A. Neves).

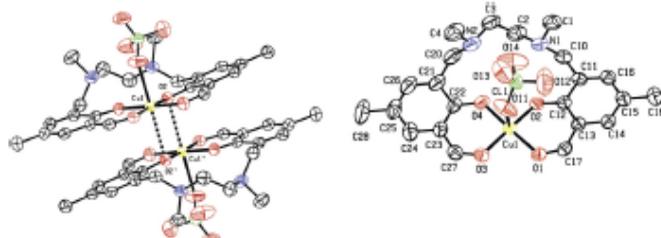


Fig. 1. ORTEP view of the dimeric structure (left, symmetry code: $-x + 0.5, -y + 0.5, -z + 1$) and cation complex (right). Ellipsoid are drawn at 50% probability level and hydrogen atoms were omitted for clarity. Selected bond distances (Å): Cu1–O4 1.80(2); Cu1–O2 1.60(2); Cu1–O3 1.53(2); Cu1–O1 1.65(2); Cu1–O11 2.47(14); Cu2–O2 2.82(2); Cu1–Cu2 3.474(9).

measurement was performed on a BRUKER Elixys ESR0 spectrometer at 5 K using continuous flow liquid-helium cryostats (Oxford Instruments ESR 900).

Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) of **1** dissolved in an ultrapur acetonitrile solution (500 nM) was performed using an amaZon X ion Trap MS instrument (Bruker Daltonics) with an ion spray source using electrospray ionization in positive-ion mode. The ion source condition was an ion spray voltage of 4500 V. Nitrogen was used as the nebulizing gas (20 psi) and curtain gas (10 psi). The samples were directly infused into the mass spectrometer at a flow rate of 180 $\mu\text{L}/\text{h}$. The scan range was m/z 200–3000. The simulated spectrum was calculated using the Mova software [10, 11].

Potentiometric studies of **1** were carried out in a acetonitrile/water mixture (1:1, v/v) with a Corning-350 research pH meter fitted with blue-glass and Ag/AgCl reference electrodes, calibrated to read $-\log[\text{H}^+]$ directly, designated as the pH. Equilibrium measurements were performed in a thermostated cell purged with argon, containing 50.00 mL of the acetonitrile/water (1:1) solution and 0.03 mmol of the complex. The temperature was maintained at 25.00 ± 0.05 °C, and the experimental solutions were adjusted to an ionic strength of 0.100 M through the addition of NaCl. Computations of the triplicate results were carried out with the BEST7 program, and species diagrams were obtained with the SPE and SPEPLOT programs [12].

The catecholase-like activity of the complex was determined by measuring the oxidation of the substrate 3,5-di-*tert*-butylcatechol (3,5-dtbc) in a UV-Vis Varian Cary 50 BFD fitted with a thermostated water-jacketed cell holder. The reactions were accompanied by formation of 3,5-di-*tert*-butylquinone (3,5-dtbq) at 400 nm ($\epsilon = 1900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and 250 °C, less than 5% of conversion of substrate to product were monitored and the data were treated by the initial rate method.

Initially, pH-dependent studies were carried out to determine the pH value at which catalase-like activities reached a maximum. The influence of pH on the reaction rate in the oxidation of 3,5-dtbc catalyzed by **1** was determined over the pH range of 5.0–10 at 25 °C. The following reagents were placed in a 1-cm-path quartz cell: 100 μL of an aqueous solution ($[\text{B}_2\text{H}_2]_{\text{total}} = 100 \text{ mM}$) of buffer [MES (pH 5.0–6.5) and TRIS (pH 7.0–9.0)], 30 μL of a methanolic complex solution ($[\text{1}]_{\text{total}} = 58 \mu\text{M}$), and 1500 μL of *tert*-butanol and methanol. The reaction was initiated with the addition of 50 μL of a methanolic substrate solution ($[\text{3,5-dtbc}]_{\text{total}} = 500 \text{ mM}$) and monitored for 20 min. The kinetic experiments under conditions of excess substrate were performed as follows: a total of 100 μL of aqueous buffer/TRIS at pH 8.5 ($[\text{B}_2\text{H}_2]_{\text{total}} = 100 \text{ mM}$), 30 μL of a methanolic complex solution ($[\text{1}]_{\text{total}} = 58 \mu\text{M}$), and oxygen-saturated methanol (to complete 1500 μL) were added to a 1-cm path-length cell at 25 °C. The reaction was initiated with the addition of known volumes (from 50 to

500 μL) of a 3,5-dtbc solution ($[\text{3,5-dtbc}]_{\text{total}} = 0.9\text{--}0 \text{ mM}$). All experiments were carried out in an air-saturated methanolic/water (32:1) solution. To take into account the spontaneous oxidation of the substrate, an oxidation was carried out using a reference cell under identical conditions but without the addition of the catalyst. The initial rate was obtained from the slope of the absorbance versus time plot over the first 20 min of the reaction. The Michaelis-Menten model was applied and the kinetic parameters were obtained from nonlinear least squares fit.

Results and discussion. The synthesized complex **1** afforded suitable crystals for the structure determination by X-ray analysis (See Supplementary Material - Table S1 and Table S2). The structure of **1** (Fig. 1, right) reveals that the Cu^2+ center is $4 + 2$ coordinated, exhibiting a highly distorted tetragonal geometry in which the basal plane is occupied by two oxygen atoms from the phenolates and two oxygen atoms from the carbonyl group of the H_2LDA ligand. One perchlorate group and one phenolate oxygen from another $[\text{Cu}^2+(\text{H}_2\text{LDA})(\text{ClO}_4)]_2(\text{ClO}_4)_2$ molecule, in axial positions, complete the $4 + 2$ pseudo-octahedral geometry. The Cu–O distances in the basal plane are between 1.900 and 1.955 Å, and the Cu–O_{perchlorate} in the apical position is of 2.471(4) Å. The trans O–Cu–O angles in the basal plane are of 176.13(12) and 178.41(13)°, showing a very small distortion in the geometry ($\tau = 0.01$) [13]. The bond lengths around the Cu^2+ in the basal plane (O₄-donor site; average 1.918 Å) of complex **1** are similar to the corresponding distances (average 1.918 Å) observed around the Cu2 center in the dinuclear $[\text{Cu}_2(\text{dntf})_2]^{2+}$ cation containing a similar coordination environment, in which 1,3-propanediamine forms the backbone of the ligand **1** [7]. For the ligand described in this work, the addition of perchlorate due to the reaction mixture as well as steric crowding around the tetrayne anions probably prevents a second Cu^2+ from being accommodated.

In fact, the packing analysis in the unit cell shows that two molecules of the $[\text{Cu}^2+(\text{H}_2\text{LDA})(\text{ClO}_4)]_2(\text{ClO}_4)_2$ complex are very close with respect to each other and thus, a dimeric structure (face to face) is formed considering the weak inter-dimer electrostatic Cu–O_{perchlorate} interactions in this centrosymmetric arrangement (Fig. 1 left). In the dimer, the Cu1–O2⁺ and Cu1–Cu1⁺ distances are of 2.822(3) Å and 3.474(4) Å, respectively, which are significantly shorter than those distances found in the bis(salicylaldehyde)Cu²⁺ complex (3.13 and 4.05 Å, respectively), most probably due to the electrostatic interactions between the Cu–O phenolates and the protonated amine of neighboring molecules in **1** [14, 15]. Indeed this Cu–Cu distance is comparable to those distances found in many dinuclear Cu²⁺ oxygen bridged complexes [16–19]. Thus, in the solid state the complex is a dimer, where each Cu^2+ ion is surrounded by six oxygen atoms. In addition, intermolecular neighboring perchlorate rings are coplanar to each other, with a dihedral angle

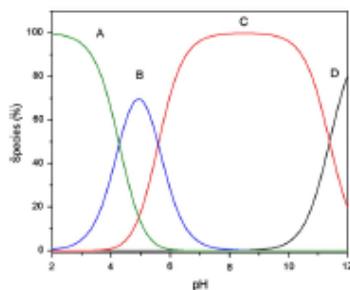


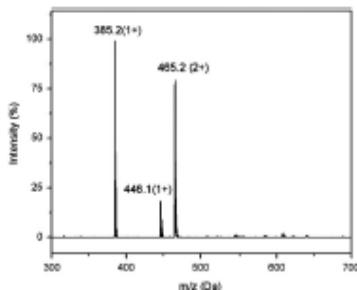
Fig. 2. Distribution of species for complex 1 according to Scheme 1.

between the planes and a mean distance between them of $3.62(18)^{\circ}$ and 3.520 \AA , respectively, suggesting the occurrence of intermolecular π -stacking, which also contribute to stabilize the dimer. Unlike other salen-derivative-metal complexes, the two nitrogen atoms, from the amines, are not coordinated to the metal center and are protonated.

The cyclic voltammograms of the complex in CH_3CN solution show an irreversible oxidation $E_{\text{onset}} = -0.55 \text{ V vs. NHE}$ which can be attributed to the $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ couple (Fig. S 11). This value is in good agreement with other mononuclear Cu^{II} complexes with two phenolates coordinated to the metal center [20,21].

The electronic spectrum of the complex in CH_3OH solution (Fig. S 2) shows an intense band centered at 380 nm ($\epsilon = 3200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) attributed to a ligand-to-metal charge transfer (LMCT) transition between the two phenolates and the Cu^{II} ion and a broad band at $\sim 640 \text{ nm}$ ($\epsilon = 65 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), which is typical of Cu^{II} d-d transitions.

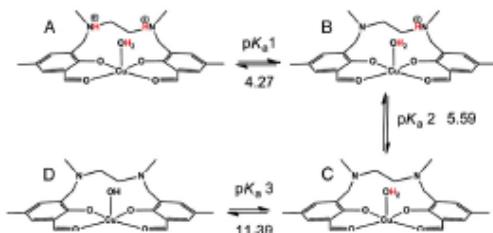
The X-band EPR spectrum recorded in a frozen methanolic solution of **1** shows four lines, typical of Cu^{II} ions, as a result of the hyperfine interaction between the unpaired electron ($S = 1/2$) and the Cu^{II} nucleus ($I = 3/2$) (Fig. S 3). The parameters $A_{\parallel} = 240 \times 10^{-4} \text{ G}$, $g_{\parallel} = 2.28$ and $g_{\perp} = 2.07$ were obtained from the simulated spectrum and since $g_{\parallel} > g_{\perp}$, a square pyramidal geometry can be proposed for complex **1**, which is consistent with the geometry found from the X-ray analysis and also with the structure proposed in solution from the potentiometric titration, ESI-MS (vide infra) and the electronic spectroscopic results.

Fig. 3. Positive ion ESI mass spectrum for **1** in CH_3CN .

Potentiometric titration studies of **1** in a water/acetonitrile (1:1) solution showed the neutralization of 3 mol of NDH^+ /mol of complex in the pH range 3–12. Three pK_a values were found and speciation plots are shown in the Fig. 2.

The first two constants $\text{pK}_{a1} = 4.27$ and $\text{pK}_{a2} = 5.59$ can be attributed to the deprotonation of the uncoordinated amine nitrogen atoms, which are protonated even in the solid state structure. The pK_{a3} at 11.39 can be tentatively attributed to the deprotonation of a water molecule coordinated to the Cu^{II} center in the *labile*-Teller position as shown in Scheme 1.

In order to establish unequivocally the relevant species in solution, ESI-MS studies were carried out in CH_3CN . Fig. 3 shows the observed and expected isotopic distribution for the assigned species under these experimental conditions. As can be observed in Fig. 3, three main groups of peaks are observed at mass to charge (m/z) ratios of 465.2, 446.1, and 385.2. The peak at $m/z = 465.2$ can be attributed to $[(\text{Cu}^{\text{II}}\text{H}_2\text{LDA})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (reduction of Cu^{II} to Cu^{I} under the conditions of the electrospray ionization), which corresponds to a dimer form of the complex, in agreement with the crystal structure and the four protonated nitrogen atoms from the amines observed in the equilibrium studies (Scheme 1 and Fig. S 5). The peak at $m/z = 446.1$ can be attributed to the $[(\text{Cu}^{\text{II}}\text{H}_2\text{LDA})]^{+}$ species while the peak at 385.2 correspond to the free ligand. Therefore, it can be concluded that the dimer form of

Scheme 1. Proposed equilibria for **1** in water/acetonitrile (1:1) solution.

