

Marcos Paulo da Silva

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS
CINÉTICOS DE COMPLEXOS DE COBRE(II) COM
LIGANTES TRIAZÍNICOS COMO MODELOS
BIOMIMÉTICOS DA METALOENZIMA CATECOL
OXIDASE**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-graduação em
Química da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção
do Grau de Mestre em Química.
Orientador: Prof. Dr. Ademir Neves

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

da Silva, Marcos Paulo

Síntese, caracterização e estudos cinéticos de complexos de cobre(II) com ligantes triazínicos como modelos biomiméticos da metaloenzima catecol oxidase / Marcos Paulo da Silva ; orientador, Ademir Neves – Florianópolis, SC, 2014.

109 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui Referências

1. Química. 2. Catecol oxidase. 3. Complexos de Cu(II). 4. Pireno. 5. DNA I. Neves, Ademir. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título

Marcos Paulo da Silva

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS
CINÉTICOS DE COMPLEXOS DE COBRE(II) COMO
MODELOS BIOMIMÉTICOS DA METALOEENZIMA
CATECOL OXIDASE**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Química.

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2014.

Prof. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

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

Prof.^a Hérica Aparecida Magosso, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Maria da Graça Nascimento, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Clóvis Piovezan, Dr.
Universidade Federal da Fronteira Sul

Este trabalho é dedicado à Deus, à minha família e aos meus queridos amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço a Deus por ter me dado muita força para concluir não só este trabalho, mas como uma etapa da minha vida.

Quero aqui agradecer a todos, sem exceção, que tiveram tamanha paciência comigo, até porque neste período nem eu me aguentei direito.

Começarei citando aqueles que amo profundamente: meu pai Sr. Messias e minha mãe Dona Jô. Vocês me acalmaram e me ajudaram a passar por tudo isso. Obrigado! Também agradeço meus irmãos Bruno e Sandro pela torcida (e pela chatice eterna também) conjuntamente com as cunhadas Carin e Fabi. E a todos da minha família, incluindo primos, primas, tios, tias e adjacentes. Mica, Almir, Kiko, Meire, Tia Dalva, Tia Elza, olha vocês aqui! Todos os outros estão aqui com vocês ok? Não cabem todos!

A todos os meus amigos que, mesmo próximos, ficaram tão distantes... Me desculpem... Haverá um tempo para recuperarmos a saudade.

A Renata Guaita que compartilhou da loucura do mestrado comigo. Por também me oferecer momentos de descontração (pra não dizer bizarros). Aos inesquecíveis Aluísio, Florencia, Larissa Motta, Paty e muitos outros.

Aos queridos “labinquianos” de plantão! Ao Prof. Dr. Ademir Neves pelas palavras de consolo, pela compreensão, pelas ideias e por continuar me aceitando como aluno. Ao meu grande amigo, Prof. Dr. Bernardo de Souza que me ajudou em muitas análises realizadas neste trabalho. O seu jovem pupilo está caminhando também! Ao Prof. Dr. Adailton J.B., pela paciência com meus pseudocristais e a Prof^a. Dra. Rosely P. pelo incentivo.

A Pós-doc tão querida que me suportou não só no lab, mas também como “estagiário nota 10”, Dra. Renata Osório. Não sei como agradecer por tudo!

Aos meus amigos muito queridos: Graci de PG, Renatinha H., Cacau (tirou quase todas as minhas titulações), Alexandra, Sandro Mireski, Luiza H. Bruna,

Beatriz P., André, Alfredo, Tiago P., Kauê, Carol e Thaisy. Ao pessoal do LABIOS, especialmente a Prof^a. Dra. Iolanda C.V., ao Eduardo Zapp e a Dra. Daniela Brondani pela ajuda nas eletroquímicas.

Aos amigos que fiz durante o mestrado e que eu prometi um parágrafo especial: a IC mais legal que já tive, Sheila Meller. Você foi e é muito importante viu? Ao rapaz “precisamente” mais pirado que conheço Thiago Valdares. A pessoa que bem lá no fundo é muito meiga, Beatriz Comelli. Este quarteto promete (me incluí nele) !!!

Aos irmãos da IECODEC, por entenderem este momento. Obrigado pelas orações e pelos momentos de paz e alegria. Deus sempre será conosco.

A Coordenação do PPGQMC, por serem sempre solícitos. Ao Departamento de Química e a UFSC pela estrutura oferecida.

A CAPES pela bolsa concedida. Ao CNPq e INCT-Catálise pelo apoio financeiro.

E novamente a todos que incentivaram (ou não). E a muitos que não foram citados, mas nunca esquecidos. Cheguei de novo! E mais uma vez digo: isto é só o começo!

O temor do Senhor é
o princípio do conhecimento;
os loucos desprezam
a sabedoria e a instrução.
(Pv. 1:7)

RESUMO

A influência da segunda esfera de coordenação principalmente na eficiência catalítica de sistemas biológicos, tem sido um importante tema de estudos no contexto da química bioinorgânica. Através de novas estratégias sintéticas, a inserção de agentes intercalantes em ligantes pode ser uma alternativa para potencializar a eficiência de catálise de um complexo. Este trabalho aborda a síntese de dois novos complexos de Cu(II) com ligantes polidentados derivados do núcleo triazínico, utilizando 1,4-diaminobutano como unidade espaçadora e um destes com a unidade pireno como possível agente intercalante do DNA. Ambos foram devidamente caracterizados por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas, e estudos cinéticos envolvendo atividade de catecolase dos dois complexos também foram realizados. Os parâmetros cinéticos dos compostos frente à oxidação do substrato modelo 3,5-di-*tert*-butilcatecol (3,5-DTBC) mostraram que a inserção do espaçador 1,4-diaminobutano e do grupo pireno contribuiu de forma significativa para o aumento da eficiência catalítica desses sistemas. Na verdade, esses grupos influenciam no aumento de K_{ass} , fazendo com que as interações entre o catalisador e o substrato sejam mais efetivas quando comparadas com o sistema no qual esses grupos estão ausentes.

Testes preliminares em DNA plasmidial revelaram que ambos complexos, em baixas concentrações, são capazes de clivar a dupla fita em suas formas II (circular) e III (linear), ou seja, sua forma totalmente linear. Sendo assim, estes complexos podem ser considerados não só como bons modelos miméticos para a enzima catecol oxidase, mas também como agentes de clivagem do DNA plasmidial.

Palavras-chave: catecol oxidase. complexos de Cu(II). pireno. DNA.

ABSTRACT

The influence of the second coordination sphere on the catalytic efficiency of biological systems has been an important subject of studies in bioinorganic chemistry. By means of new synthetic strategies, the insertion of intercalating agents linked to polydentate ligands represents an interesting alternative to enhance the catalytic efficiency of a biomimetic complex. The work presented here focuses on the synthesis of two new Cu(II) complexes with polydentate ligands derived from a triazine core containing 1,4-diaminobutane as a spacer and a pyrene group as a possible DNA intercalating agent. The complexes were characterized by spectroscopic and electrochemical techniques, and catecholase-like activity of both were also carried out. The kinetic parameters of the complexes in the oxidation of the model substrate 3,5-DTBC revealed that insertion of the spacer 1,4-diaminobutane and the pyrene group, strongly contributed to increase the catalytic efficiency of these systems. In fact K_{ass} becomes significantly increased, indicating that these groups influence the interactions between the complex and the substrate, which are much more effective when compared do the catalyst without such groups.

Preliminary studies showed that both complexes, at very low concentrations, are capable of cleaving double-stranded plasmid DNA into its form II (circular) and form III (linear). Thus, these complexes can be considered good biomimetic models for catechol oxidase, and also as plasmid DNA cleavage agents.

Keywords: Catechol oxidase. Cu(II) complexes. Pyrene. DNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da enzima catecol oxidase, encontrada na batata doce <i>Ipomoeas batatas</i> (PROTEIN DATA BANK, 2014).	29
Figura 2. Representação esquemática do sítio ativo da enzima catecol oxidase em seu estado oxidado (KLABUNDE <i>et al.</i> , 1998). As esferas azuis claro representam os átomos de cobre, a esfera vermelha representa o átomo de oxigênio da ponte exógena μ -hidroxo modelada e os anéis aos resíduos de histidina presentes neste sítio ativo.....	29
Figura 3. Mecanismo de atividade da catecol oxidase proposto por Solomon (1996).	30
Figura 4. Estrutura tridimensional do DNA, e seus respectivos pares de bases nitrogenadas (WHEELER, 2011).	32
Figura 5. Estrutura da dupla fita do DNA com íons Ag^+ em azul, os pares de base em estado natural na cor verde e com os pares de base mediados por íons Ag^+ em amarelo (JOHANNSEN, 2010).	32
Figura 6. Exemplo de interação de sulco exercida pela esperamicina com o DNA (ADTBIO, 2014).	33
Figura 7. Interação eletrostática da polietilenoimina com o DNA (MCBAIN; YIU, EL HAJ, DOBSONA, 2007)	33
Figura 8. Interação covalente da cisplatina com o DNA (ADTBIO, 2014).	34
Figura 9. Intercalação do Bromopireno entre os pares de base do DNA (ADTBIO, 2014).	34
Figura 10. Reações de substituição nucleofílica aromática do cloreto cianúrico com aminas primárias.	37
Figura 11. Ligantes L_{Cl} e L_{en}	38
Figura 12. Exemplos de ligantes contendo agentes intercalantes descritos na literatura.	38
Figura 13. Alguns complexos que possuem a unidade pireno como agente intercalante.	39
Figura 14. Ligantes sintetizados neste trabalho.	40
Figura 15. Representação esquemática das sínteses dos ligantes realizadas neste trabalho.	51
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H do pró-ligante bpma em CDCl_3	57
Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C do precursor bpma em CDCl_3	58
Figura 18. Espectro do pró-ligante bpma na Região do IV em pastilha de KBr.	58
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H do ligante L_{Cl} em CDCl_3	59
Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C do ligante L_{Cl} em CDCl_3	60
Figura 21. Espectro do ligante L_{Cl} na Região do IV em pastilha de KBr.	60
Figura 22. Espectro de RMN de ^1H do ligante $\text{L}_{4\text{S}}$ em CDCl_3	62
Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C do ligante $\text{L}_{4\text{S}}$ em CDCl_3	63

Figura 24. Espectro na região do IV do ligante L4S em pastilha de KBr.	63
Figura 25. Espectro de RMN de ^1H do ligante L4P em CDCl_3	65
Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C do ligante L4P em CDCl_3	67
Figura 27. Espectro na região do IV do ligante L4P em pastilha de KBr.	68
Figura 28. Sobreposição dos espectros na região do IV dos ligantes L4S e L4P.	72
Figura 29. Espectro de massa do ligante L4S e respectiva simulação da espécie isotópica (M+1).	73
Figura 30. Espectro de massa do ligante L4P e respectiva simulação da espécie isotópica (M+1).	74
Figura 31. Espectro na região do IV do complexo C_{Cl} em pastilha de KBr.	75
Figura 32. Sobreposição dos espectros na região do IV do ligante L4S e do complexo C4S.	77
Figura 33. Sobreposição dos espectros na região do IV do ligante L4P e do complexo C4P.	78
Figura 34. Espectros na região do UV-Vis do complexo C4S em MeOH, nas concentrações de A) $1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ B) $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$	80
Figura 35. Espectros na região do UV-Vis do complexo C4P em MeOH, nas concentrações de A) $1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ B) $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$	81
Figura 36. Espectros na região do UV-Vis em estado sólido dos complexos C4P e C4S em pastilha de KBr.	82
Figura 37. Espectros na região do UV-Vis para o complexo C4S em CH_3CN /tampão aquoso (50/50% v/v) em pHs de 3,50 a 10,02 a 25°C	83
Figura 38. Espectro de massas do complexo C4S em MeOH e seus principais fragmentos.	84
Figura 39. Espectro de massas do complexo C4P em MeOH e seus principais fragmentos.	85
Figura 40. Estrutura parcialmente obtida do complexo C4P A) com B) sem os átomos de hidrogênio, para fins de clareza.	87
Figura 41. Voltamogramas cíclicos do complexo C4S em MeOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em NaClO_4) a 25°C , com velocidades de varredura de 25 a 300 mV.s^{-1} no pH de dissolução (pH $\sim 5,0$). Os potenciais estão representados <i>versus</i> ENH. $[\text{C4S}] = 2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$	88
Figura 42. Voltamogramas cíclicos do complexo C4P em MeOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em NaClO_4) a 25°C , com velocidades de varredura de 50 a 200 mV.s^{-1} no pH de dissolução (pH $\sim 5,0$). Os potenciais estão representados <i>versus</i> ENH. $[\text{C4P}] = 2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$	89
Figura 43. Espectros de fluorescência do complexo C4P em diferentes concentrações. $\lambda_{\text{exc.}} = 426 \text{ nm}$ e Janela = 10 nm	90
Figura 44. Espectros de fluorescência do ligante L4P e dos complexos C4S e C4P, em concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	91

Figura 45. Gráfico de distribuição de espécies para o ligante L4S em função do pH com força iônica de 0,1 mol.L ⁻¹ KCl à 25°C.	92
Figura 46. Gráfico de distribuição de espécies para o complexo C4S em função do pH com força iônica de 0,1 mol.L ⁻¹ KCl à 25°C.	93
Figura 47. Reação de oxidação do 3,5-DTBC na presença de O ₂ , formando 3,5-DTBQ e H ₂ O.....	94
Figura 48. Gráfico de k_{obs} em função do pH para a reação de oxidação do substrato 3,5-DTBC catalisada pelos complexos A) C4S B) C4P em MeOH/H ₂ O (1:1) à 25°C nas seguintes condições: $[C]_{final} = 5 \times 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ ; $[3,5-DTBC]_{final} = 8 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹ ; $[tampões]_{final} = 0,1$ mol.L ⁻¹ sem força iônica.	96
Figura 49. Gráfico de k_{obs} em função da concentração do substrato para a reação de hidrólise do 3,5-DTBC em pH = 6,49, catalisada pelo complexos A) C4S B) C4P em MeOH/H ₂ O (1:1) à 25°C nas seguintes condições: $[C]_{final} = 5 \times 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ ; $[3,5-DTBC]_{final} = 6 \times 10^{-5}$ a $1,8 \times 10^{-3}$ mol.L ⁻¹ ; $[tampões] = 0,1$ mol.L ⁻¹ sem força iônica.....	97
Figura 50. Proposta de mecanismo de oxidação do 3,5-DTBC pelos complexos C4S e C4P.	99
Figura 51. Eletroforese em gel de agarose para clivagem do DNA plasmidial pelos complexos C _{Cl} , C4S e C4P em diferentes concentrações, em tampão [10 mmol.L ⁻¹] HEPES (pH 7). DNA (330ng) + Complexos nas concentrações de 0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0 e 50 μmol.L ⁻¹ . Incubação: 24h a 37 °C.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de enzimas e proteínas que contêm ou necessitam de elementos inorgânicos.....	27
Tabela 2. Solventes e reagentes utilizados.....	43
Tabela 3. Deslocamentos químicos (ppm), observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C atribuídos ao ligante L^{Cl} (OLIVEIRA, 2013).	61
Tabela 4. Deslocamentos químicos (ppm), observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C atribuídos ao ligante L4S.....	64
Tabela 5. Deslocamentos químicos (ppm), observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C atribuídos ao ligante L4P.....	69
Tabela 6. Picos de RMN de ^1H e ^{13}C do ligante L^{Cl} descrito pela literatura e dos ligantes sintetizados neste trabalho.....	70
Tabela 7. Principais bandas e atribuições (SILVERSTEIN, 1994), em cm^{-1} , dos espectros no infravermelho para os ligantes L4S e L4P.	72
Tabela 8. Principais bandas e atribuições, em cm^{-1} dos espectros na região do IV para o ligante L4S e o complexo C4S.....	77
Tabela 9. Principais bandas e atribuições, em cm^{-1} dos espectros na região do IV para o ligante L4P e o complexo C4P.....	78
Tabela 10. $\text{Log}\beta$ determinado para o ligante L4S <i>in situ</i> determinados utilizando 0,1 M KCl em DMSO/ H_2O 50:50 v/v à 25 $^\circ\text{C}$	92
Tabela 11. Valores de pKas potenciométricos para o complexo C4S.....	94
Tabela 12. $\text{Log}\beta$ determinado para o complexo C4S <i>in situ</i> determinados utilizando 0,1 M KCl em DMSO/ H_2O 50:50 v/v à 25 $^\circ\text{C}$	94
Tabela 13. Valores dos pKas2 e 3 encontrados para os complexos C4S e C4P pelas análises potenciométricas e cinéticas.....	96
Tabela 14. Comparação dos parâmetros cinéticos de alguns complexos selecionados e da catecol oxidase da <i>Ipomoea batatas</i> . Ref.: ^a (EICKEN, ZIPPEL, <i>et al.</i> , 1998); ^b (OSÓRIO, 2007); ^c (OLIVEIRA, 2013).	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ϵ	Coeficiente de absorvidade molar
ν	Banda de deformação angular na região do infravermelho
3,5-DTBC	3,5-di- <i>terc</i> -butilcatecol
3,5-DTBQ	3,5-di- <i>terc</i> -butilquinona
A	Absorbância
Å	Ângstrom
bpma	<i>N</i> -Bis(2-piridilmetil)amina
C4P	Perclorato de (<i>N</i> ² -(4-(metilpirenil)aminobutil)- <i>N</i> ⁴ , <i>N</i> ⁴ , <i>N</i> ⁶ , <i>N</i> ⁶ - tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina)cobre(II)
C4S	Perclorato de (<i>N</i> ² -(4-aminobutil)- <i>N</i> ⁴ , <i>N</i> ⁴ , <i>N</i> ⁶ , <i>N</i> ⁶ - tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina)cobre(II)
C_{Cl}	Perclorato de (<i>N</i> ² -cloro- <i>N</i> ⁴ , <i>N</i> ⁴ , <i>N</i> ⁶ , <i>N</i> ⁶ - tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina)cobre(II)
CHES	Ácido 2-(ciclohexilamino)etanossulfônico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ENH	Eletrodo normal de Hidrogênio
p.e.	Ponto de ebulição
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazino]etanossulfônico
IV	Infravermelho
K_{ass}	Constante de associação
k_{cat.}	Constante catalítica
K_M	Constante de Michaelis-Menten
L4P	<i>N</i> ² -(4-(metilpirenil)aminobutil)- <i>N</i> ⁴ , <i>N</i> ⁴ , <i>N</i> ⁶ , <i>N</i> ⁶ - tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina
L4S	<i>N</i> ² -(4-aminobutil)- <i>N</i> ⁴ , <i>N</i> ⁴ , <i>N</i> ⁶ , <i>N</i> ⁶ - tetraquis(piridin-

	2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina
L_{Cl}	<i>N</i> ² -cloro- <i>N</i> ⁴ , <i>N</i> ⁴ , <i>N</i> ⁶ , <i>N</i> ⁶ - tetraquis(2-piridilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina
Logβ	Constante de dissociação cumulativa logarítmica
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
RMN de ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
T	Transmitância
UV-Vis	Espectroscopia na região do Ultravioleta visível
δ	Banda de estiramento axial na região do infravermelho
δ_C	Deslocamento químico de carbono
δ_H	Deslocamento químico de hidrogênio
Λ_m	Condutância molar

SUMÁRIO

1.REVISÃO DA LITERATURA	
1.1. INTRODUÇÃO	
1.2. O ELEMENTO COBRE E SUA IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA.....	
1.3. O DNA E OS TIPOS DE INTERAÇÃO	
1.4. ESTRATÉGIAS DE MODELAGEM BIOMIMÉTICA EM ESFERAS DE COORDENAÇÃO.	
2.OBJETIVOS	
2.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	
3.MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. MATERIAIS	
3.2. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO.....	
3.2.1. Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)	
3.2.2. Espectroscopia na região do Ultravioleta-visível (UV-Vis)	
3.2.3. Ressonância Magnética Nuclear	
3.2.4. Espectrometria de massas	
3.2.5. Difratometria de raios X	
3.2.6. Eletroquímica	
3.2.7. Condutimetria	
3.2.8. Espectroscopia de Fluorescência	
3.2.9. Titulação Potenciométrica	
3.2.10. Cinética de oxidação	

3.2.11. Testes oxidativos em DNA plasmidial.....

3.3. SÍNTESES.....

3.3.1. Sínteses dos ligantes

3.3.1.1. Síntese do pró-ligante bpma-bis(piridilmetil)amina

3.3.1.2. Síntese do ligante L_{Cl} - N^2 -cloro- N^4, N^4, N^6, N^6 -tetraquis(2-piridilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina

3.3.1.3. Síntese do ligante $L4S$ - N^2 -(4-aminobutil)- N^4, N^4, N^6, N^6 - tetraquis(2-piridilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina

3.3.1.4. Síntese do ligante $L4P$ - N^2 -(4-(metilpirenil)aminobutil)- N^4, N^4, N^6, N^6 - tetraquis(2-piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina

3.3.2. Sínteses dos complexos

3.3.2.1. Síntese do complexo C_{Cl} - Perclorato de (N^2 -cloro- N^4, N^4, N^6, N^6 - tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina)cobre(II)

3.3.2.2. Síntese do complexo $C4S$ - Perclorato de (N^2 -(4-aminobutil)- N^4, N^4, N^6, N^6 - tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina)cobre(II)

3.3.2.3. Síntese do complexo $C4P$ - Perclorato de (N^2 -(4-(metilpirenil)aminobutil)- N^4, N^4, N^6, N^6 - tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina)cobre(II)

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....

4.1. CARACTERIZAÇÕES DOS LIGANTES.....

4.2. CARACTERIZAÇÕES DOS COMPLEXOS.....

4.2.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho

4.2.2. Espectroscopia Eletrônica na Região do UV-Vis

4.2.3. Espectrometria de massas

4.2.4. Difração de Raios X

4.2.5. Eletroquímica.....

4.2.6. Condutimetria

4.2.7. Fluorescência

4.2.8. Titulação Potenciométrica

4.2.9. Cinética de Oxidação do 3,5-DTBC

4.2.10. Testes de clivagem de DNA plasmidial

5.CONCLUSÕES

6.REFERÊNCIAS

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. INTRODUÇÃO

A Química se mantém em constante expansão no que envolve objetos de pesquisa, interagindo com diversas outras áreas da ciência, que por sua vez, adquirem cada vez mais um caráter multidisciplinar, à medida que os problemas a serem resolvidos tendem a ter respostas mais amplas. A Química Bioinorgânica atua justamente nesta interface, estudando diversos tópicos, com foco no papel dos íons metálicos em inúmeros processos biológicos (COWAN, 1993).

Sabemos que tais processos são acelerados por biopolímeros formados por sequências de aminoácidos, conhecidos como enzimas. Elas se organizam de modo a formar um ambiente químico favorável às reações e são extremamente eficientes no que diz respeito à velocidade das reações realizadas. Além disto, atuam como catalisador, ou seja, catalisam a mesma reação diversas vezes se regenerando ao final de cada reação, compondo o que chamamos de ciclo catalítico. Cerca de 30% das enzimas possuem ou necessitam de um íon metálico para realizar sua função, o que são por definição, as metaloenzimas. São descritos na literatura, trabalhos que comparam velocidades de reações na presença de enzimas e reações não catalisadas, comprovando assim, o excelente potencial catalítico enzimático (WOLFENDEN, 2011). A Tabela 1 cita algumas metaloenzimas e metaloproteínas, bem como os metais presentes em seus sítios ativos.

Tabela 1. Exemplos de enzimas e proteínas que contêm ou necessitam de elementos inorgânicos

METAL	ENZIMAS E PROTEÍNAS
Fe^{2+} ou Fe^{3+}	Citocromo oxidase, catalase, peroxidase
Cu^{2+}	Citocromo oxidase, tirosinase, catecol oxidase
Zn^{2+}	Anidrase carbônica, álcool desidrogenase
Ni^{2+}	Urease

O motivo de tais estudos se deu justamente pela necessidade de saber como as enzimas aceleram diversas reações em meio biológico e qual a influência destes íons metálicos nas catálises, propondo mecanismos de atuação para as mesmas.

1.2. O ELEMENTO COBRE E SUA IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

Por serem excelentes ácidos de Lewis, a natureza adquiriu como mecanismo de potencialização, a inserção de metais como cofatores enzimáticos. O cobre, assim como diversos elementos de transição, é de extrema importância para o ser humano. Está biodisponível há cerca de 1,7 bilhões de anos (KAIM, 1996) e cerca de 5 mg de cobre ao dia são necessários na dieta de uma pessoa adulta. Sabe-se que a falta de cobre em humanos pode causar enfraquecimento das artérias, desordem no fígado e anemia secundária (KUMAR, 2006).

Dentre diversos tipos de enzimas, podem-se destacar as oxirredutases, que auxiliam em mecanismos de catálise de transferência de elétrons. Segundo Koval e colaboradores (2006), existem diversos tipos de enzimas de cobre, sendo as do tipo III as que englobam os complexos de cobre(II) binucleares e que se caracterizam por catalisar reações de oxirredução (KOVAL, GAMEZ, BELLE, SELMECZI, REEDJIK; 2006). Enzimas e proteínas importantes em vários ciclos biológicos como tirosinase, hemocianina e catecol oxidase apresentam em seu sítio ativo um centro binuclear de cobre.

A catecol oxidase é uma enzima que catalisa reações de oxidação de catecóis a suas respectivas quinonas. A enzima tem uma massa molar que varia de 38 a 45 kDa e uma forma elipsoidal com dimensões de 55 x 45 x 45 Å. A estrutura secundária é dominada por regiões de α -hélices (GERDEMANN; EICKEN; KREBS, 2002), como mostra a Figura 1.

A estrutura tridimensional da catecol oxidase, extraída da batata doce *Ipomoeas batatas*, foi resolvida, nas formas oxidada Cu(II)-Cu(II) e reduzida Cu(I)-Cu(I). Na Figura 2 (EICKEN; ZIPPEL; BÜLDT-KARENTZOPOULOS; KREBS, 1998; KLABUNDE *et al.*, 1998) está representada a forma oxidada do sítio ativo da enzima catecol oxidase.

Figura 1. Representação esquemática da enzima catecol oxidase, encontrada na batata doce *Ipomoeas batatas* (PROTEIN DATA BANK, 2014).

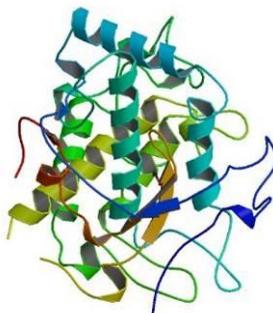
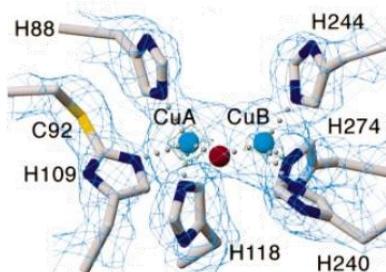


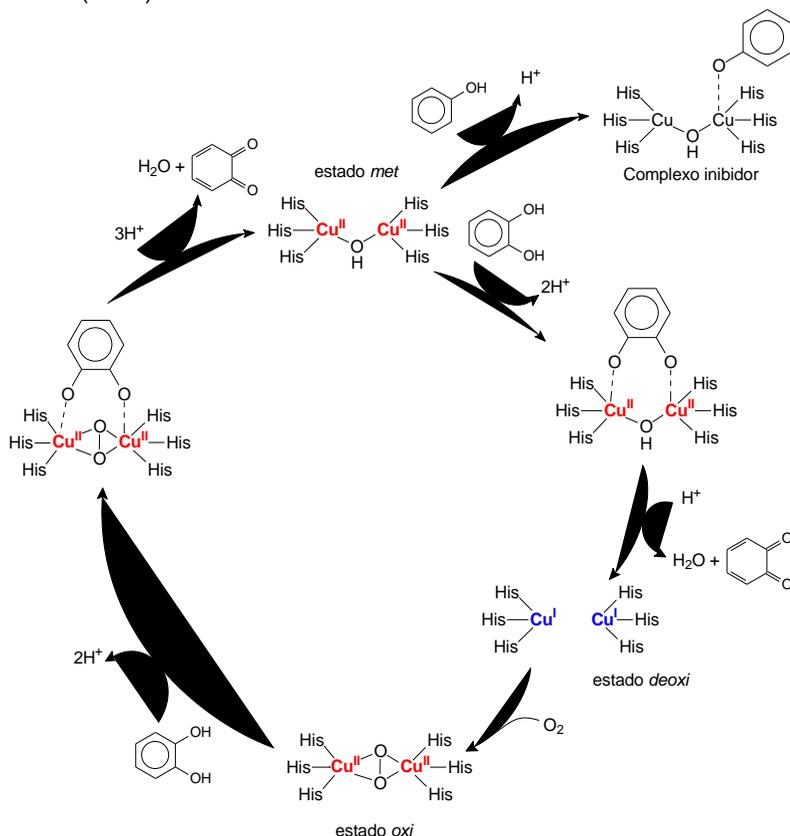
Figura 2. Representação esquemática do sítio ativo da enzima catecol oxidase em seu estado oxidado (KLABUNDE *et al.*, 1998). As esferas azuis claro representam os átomos de cobre, a esfera vermelha representa o átomo de oxigênio da ponte exógena μ -hidroxo modelada e os anéis aos resíduos de histidina presentes neste sítio ativo.



Em sua forma oxidada (met), os átomos de cobre estão separados por uma distância de 2,9 Å. Já na forma reduzida (deoxi) esta distância passa a ser 4,4 Å. Como na forma reduzida, os átomos de cobre tem seus orbitais d totalmente preenchidos, a interação entre os dois cobres passa a ser menor, fato comprovado pela existência da espécie deoxi, que não possui pontes entre os dois sítios de Cu(I) (PERALTA, 2005).

O ciclo catalítico da catecol oxidase ainda não está totalmente elucidado. O mecanismo mais aceito atualmente foi proposto por Solomon (1996) e indica que o substrato coordena-se à enzima de forma bidentada, tanto na forma met, quanto na forma deoxi, para formar, durante o ciclo catalítico, duas moléculas da respectiva quinona e água (Figura 3).

Figura 3. Mecanismo de atividade da catecol oxidase proposto por Solomon (1996).



Os estudos envolvendo algumas enzimas isoladas, principalmente no caso das oxirredutases, tem pouca viabilidade, tanto pelo custo quanto pela acessibilidade das mesmas. Por estes e outros motivos, sintetizam-se compostos que possam simular a ação das enzimas, inclusive em meio biológico. A reatividade de complexos binucleares de cobre, modelos para catecol oxidase, tem sido objeto de estudos de diversos grupos de pesquisa. Estes estudos têm fornecido subsídios para um melhor entendimento do mecanismo de ação dos complexos modelos na catálise da oxidação de catecóis a quinonas, o que

reforça ainda mais a importância da síntese destes compostos. Além destes complexos poderem atuar como modelos estruturais de enzimas, estima-se que pela semelhança do composto biomimético com a sua enzima correspondente, ele pode ser utilizado também como modelo funcional no desenvolvimento de fármacos ou de novos materiais.

1.3. O DNA E OS TIPOS DE INTERAÇÃO

A partir de estudos prévios realizados por Mieschen (1868) e Chargaff (1950), Watson e Crick (1953) idealizaram de forma brilhante a estrutura do DNA e propuseram que duas fitas de DNA estão ligadas através da interação de quatro bases nitrogenadas em pares purina-pirimidina: adenina (A) e timina (T), e guanina (G) e citosina (C), formando respectivamente 2 e 3 ligações de hidrogênio entre elas (Figura 4). Estas, por sua vez, se organizam numa estrutura tridimensional de forma helicoidal, e criam cavidades, maiores e menores. Cada base nucleotídica está pareada no mesmo plano com a base da outra fita (NELSON; COX, 2013). Através destas investigações, posteriormente, o estudo genômico se tornou algo de grande interesse no contexto científico. Íons e complexos metálicos em geral, podem ser capazes de clivar as ligações entre os pares de bases do DNA, assim como mostra a figura 5, onde íons Ag^+ se mantêm dentro da dupla fita, como propõe Johannsen et al. (2010).

Figura 4. Estrutura tridimensional do DNA, e seus respectivos pares de bases nitrogenadas (WHEELER, 2011).

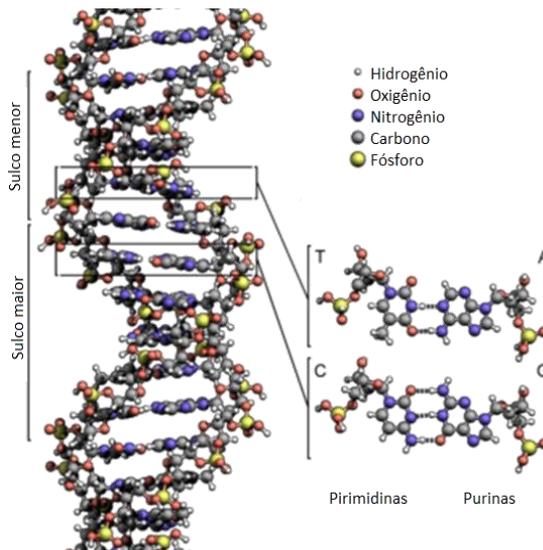
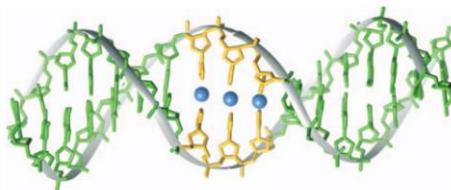


Figura 5. Estrutura da dupla fita do DNA com íons Ag^+ em azul, os pares de base em estado natural na cor verde e com os pares de base mediados por íons Ag^+ em amarelo (JOHANNSEN, 2010).

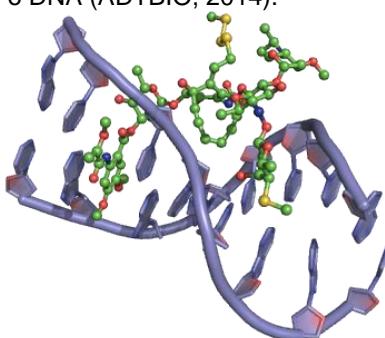


Complexos metálicos, de forma geral, podem interagir com o DNA por diferentes formas, dentre elas: as interações de sulco ou cavidade (maiores e menores), as interações externas, as interações covalentes e as intercalações.

As interações de sulco geralmente são as de menor efetividade. É comum que proteínas prefiram interagir com o DNA pelo sulco maior, visto que há uma melhor adequação

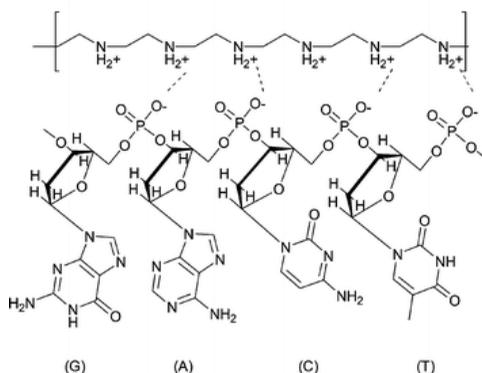
espacial ao DNA, onde dos 36Å do comprimento unitário, aproximadamente 23Å se referem ao sulco maior e os 13Å restantes, ao sulco menor. A Figura 6 traz o exemplo da esperamicina, um fármaco antitumoral que interage com o DNA pelo sulco menor.

Figura 6. Exemplo de interação de sulco exercida pela esperamicina com o DNA (ADTBIO, 2014).



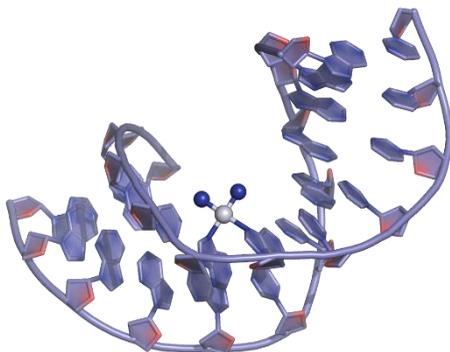
As interações externas são puramente eletrostáticas e são constituídas por compostos carregados positivamente, assim como a polietilenoimina, e pelos sítios de fosfato carregados negativamente presentes na estrutura do DNA (Figura 7).

Figura 7. Interação eletrostática da polietilenoimina com o DNA (MCBAIN; YIU, EL HAJ, DOBSONA, 2007)



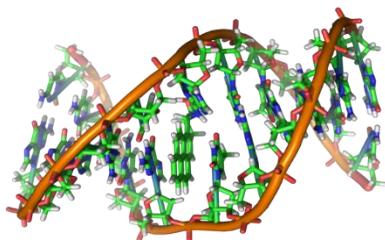
As interações covalentes se caracterizam pela ligação covalente do composto às duplas fitas do DNA, como são os casos dos compostos derivados da cisplatina (Figura 8).

Figura 8. Interação covalente da cisplatina com o DNA (ADTBIO, 2014).



Os intercaladores são grupos que se caracterizam por interagir e se incluir entre dois pares de bases e de certa forma, interferir em alguma função exercida por elas. São geralmente constituídos de anéis policíclicos, aromáticos e planares. Bons exemplos de intercaladores são os capazes de realizar ligações π -stacking, como os anéis benzênicos dos ligantes pireno. Como exemplo, na Figura 9 pode-se visualizar a intercalação do Bromopireno entre os pares de bases do DNA. Além disto, a unidade pireno possui propriedades fluorescentes, o que pode levar ao acompanhamento de um possível medicamento contendo esta unidade, em sistema biológico (YAMANA et al., 2001).

Figura 9. Intercalação do bromopireno entre os pares de base do DNA (ADTBIO, 2014).



Acerca da quebra de ligações da dupla fita do DNA, tem-se a preferência por estudos hidrolíticos ao invés de oxidativos pois, sabe-se que os fragmentos gerados oxidativamente não são regenerados pela ação das enzimas ligases (GONZÁLEZ-ÁLVAREZ et al., 2008). Contudo, com o avanço de novas tecnologias, a clivagem oxidativa poderá vir a ser monitorada e possivelmente controlada. Portanto, somado a sua efetividade nas quebras deste tipo de ligação, vem a ser uma vantagem estudar este mecanismo de clivagem.

Existem duas proposições mecanísticas para a clivagem oxidativa: uma delas propõe a oxidação da deoxirribose, através da perda de um átomo de hidrogênio; outra indica a oxidação das bases nucleotídicas por absorção de elétrons (JIANG et al., 2007; METCALFE; THOMAS, 2007; DeROSA; CRUTCHLEY, 2002).

1.4. ESTRATÉGIAS DE MODELAGEM BIOMIMÉTICA EM ESFERAS DE COORDENAÇÃO.

Desde a descoberta de compostos como a cisplatina, a síntese de complexos metálicos com possível atividade biológica tem tido destaque. Muitas modificações sintéticas à cisplatina já foram reportadas, visando uma maior especificidade a tumores malignos. Pela imensa especificidade de atuação, busca-se sintetizar compostos que se assemelham às enzimas, os denominados compostos biomiméticos. Para tal, deve-se conhecer o ambiente de coordenação da enzima a qual se quer mimetizar. Apesar do avanço crescente da síntese de catalisadores artificiais, a diferença de atividade destes e dos naturais ainda é bastante discrepante, em média centenas de milhões de vezes.

O foco no desenvolvimento da catálise esteve na busca de compostos que fossem os mais ativos possíveis para diversas reações, com esta atividade sendo avaliada pelo número de ciclos que estes poderiam fazer num determinado tempo (o número de *turnovers*) ou no fator de aumento da velocidade da reação (k_{cat}/k_{uncat}). Baseados nesses estudos, diversos catalisadores que atuam com grande eficiência foram sintetizados e o conhecimento geral sobre “como desenvolver um catalisador para determinada reação” ficou relativamente bem estabelecido. Por isso,

atualmente, o alvo do desenvolvimento de novos catalisadores vem mudando para uma catálise cada vez mais refinada, onde é desejável obter seletividade e controle sobre a formação dos produtos, evitando reações paralelas e subprodutos indesejados como misturas racêmicas, polimerizações e etc., à semelhança das enzimas (FARRAUTO; HECK, 2000; TORELLI et al., 2000, SOUZA, 2013).

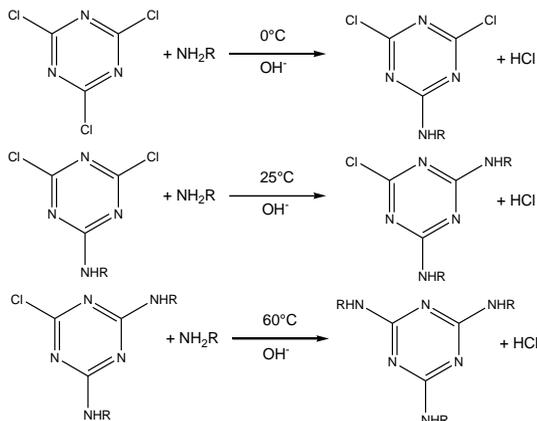
Em geral, ligantes contendo grupos doadores de elétrons, como piridinas, imidazóis e álcoois, por exemplo, que possuem átomos de oxigênio e nitrogênio disponíveis para coordenação, são ligantes potenciais para a síntese de compostos biomiméticos porque podem formar ligações semelhantes aos resíduos de aminoácidos presentes no ambiente enzimático.

Através de ligantes multidentados podem ser sintetizados complexos mono e binucleares de diversos metais, incluindo Cu, Fe, Zn, Mn, dentre outros, que são reportados, em grande maioria, como ativos na hidrólise e/ou oxidação de alguns substratos modelos para estes tipos de reações.

No caso de um modelo para catecol oxidase, preferencialmente opta-se por ligantes simétricos, visto que a primeira esfera desta enzima é composta apenas de resíduos de histidina, salvo a ponte entre os dois sítios de cobre, composta de uma molécula de H_2O/OH^- , e a cisteína que não participa diretamente da catálise na primeira esfera de coordenação. Além disto, sítios nitrogenados, de forma geral, possuem um caráter mais macio, segundo teoria de Pearson e, portanto, podem se coordenar mais facilmente à sítios de cobre(II), haja vista que trata-se de um metal de fronteira na escala de maciez e dureza.

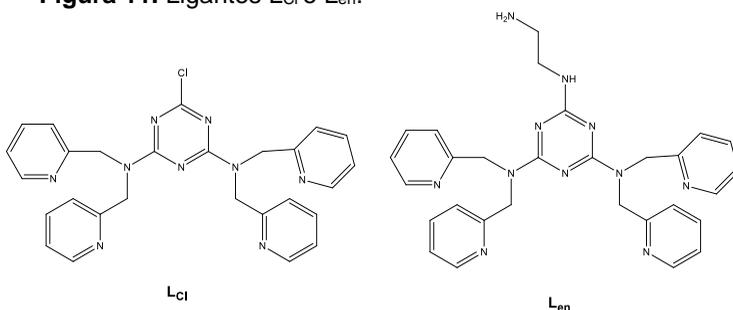
O cloreto cianúrico é um ótimo reagente para a síntese destes ligantes, pois além de ser de fácil obtenção, seu custo é baixo, sendo muito utilizado em tratamento de águas. Outro ponto de interesse é que a labilidade dos cloretos deste composto é controlada pela temperatura, o que pode oferecer um amplo número de rotas sintéticas para diferentes precursores e ligantes (BLOTNY, 2006) (Figura 10).

Figura 10. Reações de substituição nucleofílica aromática do cloreto cianúrico com aminas primárias.

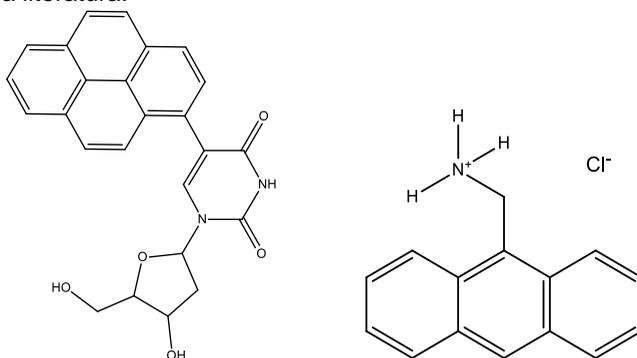


Através de substituições nucleofílicas aromáticas na triazina, podem ser criados novos ligantes que, por sua vez, possibilitam a origem de diferentes complexos metálicos, visando uma atividade catalítica na hidrólise e/ou oxidação de determinados substratos ou até mesmo na clivagem de regiões específicas do DNA. Isto vem a ser útil para o desenvolvimento de fármacos e compostos antitumorais, que tem como característica uma específica interação que faz com que novas células defeituosas deixem de ser produzidas.

São reportados na literatura, a síntese de alguns ligantes triazínicos com foco na obtenção de complexos capazes de atuar na clivagem oxidativa da dupla fita do DNA, tais como o L_{Cl} e L_{en} , cujas estruturas seguem na Figura 11 (MASSOUD et al., 2012; OLIVEIRA, 2013).

Figura 11. Ligantes L_{Cl} e L_{en} .

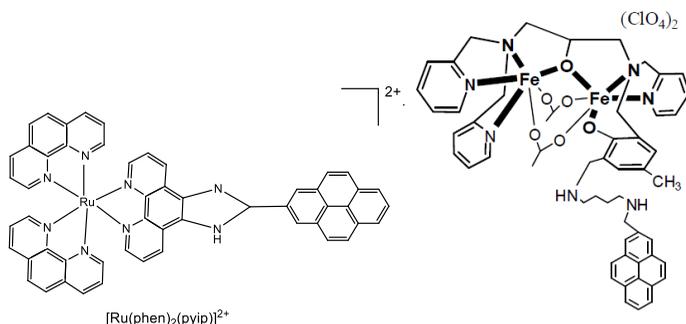
A respeito da inserção de intercalantes, diversos ligantes já foram descritos na literatura (Figura 12), não só contendo pireno, mas também outras unidades planares e aromáticas (OSTASZEWSKI et al., 1998; AMANN et al., 2002).

Figura 12. Exemplos de ligantes contendo agentes intercalantes descritos na literatura.

Estudos recentes envolvem o efeito da segunda esfera de coordenação com melhoras significativas em catálises. Sabe-se que além do sítio ativo, o qual envolve a primeira esfera de coordenação, os complexos metálicos e as metaloenzimas, possuem outras esferas de coordenação, as quais podem realizar importantes interações com os ligantes e/ou substratos coordenados ao metal, como por exemplo ligações de hidrogênio. Estruturas maiores tendem a ter um número maior de interações com seu substrato diminuindo a entropia do sistema e,

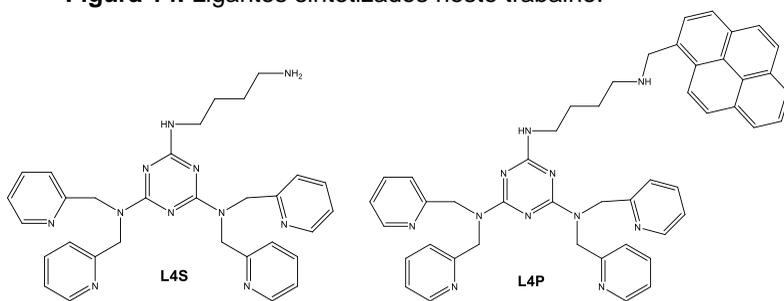
por conseguinte aumentando a constante de origem termodinâmica, potencializando a eficiência catalítica. Além disto, os resíduos de aminoácidos formam núcleos hidrofóbicos que auxiliam na interação do substrato com a enzima. Alguns complexos reportados na literatura possuem sítios intercalantes (Figura 13), tais como pireno, antraceno, justamente sintetizados com estes intuitos (OSÓRIO, 2012; MARIAPPAN, 2005). São reportados nestes trabalhos o efeito sinérgico entre sítio ativo e segunda esfera, que juntos atingem um potencial catalítico maior que ambos separados.

Figura 13. Alguns complexos que possuem a unidade do pireno como agente intercalante.



Portanto, a estratégia de sintetizar compostos não apenas visando o seu sítio ativo, mas também suas interações secundárias pode contribuir para aumentar a atividade destes, se comparado apenas com seu sítio de primeira esfera.

Em resumo, através destas justificativas este trabalho visa à síntese de complexos com ligantes formados a partir de precursores piridínicos, juntamente com uma unidade do cloreto cianúrico (Figura 14), visando sua possível atividade catalítica como catecolases, além de averiguar o efeito da unidade pireno nas catálises de oxidação do substrato modelo 3,5-DTBC e de clivagem do DNA plasmidial.

Figura 14. Ligantes sintetizados neste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

- Sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade oxidativa de novos complexos de cobre(II) com os ligantes L4S e L4P.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar, purificar e caracterizar por técnicas espectroscópicas os ligantes L4S e L4P via IV, -RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e espectrometria de massa;
- Sintetizar e caracterizar os complexos de cobre(II) com os ligantes L4S e L4P por análises espectroscópicas (IV, UV-Vis, raios X, fluorescência), eletroquímicas (voltametria cíclica, titulação potenciométrica e condutivimetria) e também por espectrometria de massa;
- Realizar estudos cinéticos dos complexos citados frente ao substrato modelo para reações de oxidação de catecóis 3,5-di-*terc*-butilcatecol (3,5-DTBC);
- Avaliar o potencial dos complexos sintetizados frente à clivagem do DNA plasmidial;
- Avaliar a importância da inserção da unidade pireno tanto na oxidação do substrato modelo 3,5-DTBC quanto na clivagem do DNA plasmidial.
- Comparar os dados obtidos com compostos semelhantes descritos pela literatura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

As sínteses e caracterizações dos ligantes e dos complexos, além dos estudos cinéticos envolveram a utilização dos solventes e reagentes descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Solventes e reagentes utilizados.

Reagentes e solventes	Marca	Pureza
3,5-DTBC	Sigma-Aldrich	Recristalizado para uso em hexano
2-aminometilpiridina	Aldrich	Destilado para uso sob pressão reduzida; p.e.= 82-85 °C
2-piridilcarboxaldeído	Aldrich	Destilado para uso sob pressão reduzida; p.e.= 181°C
Acetona	Vetec	99,5%
Acetonitrila UV/HPLC e LC/MS	Tedia	99,9%
Metanol UV/HPLC e LC/MS	Tedia	99,9%
Dimetilformamida UV/HPLC e LC/MS	Merck	99,7%
DMSO UV/HPLC e LC/MS	Tedia	99,8%
Bicarbonato de sódio	Vetec	99,7%-100,3%
CHES	Sigma-Aldrich	99,0%
Cloreto cianúrico	Sigma-Aldrich	99%
Perclorato de cobre(II)	Aldrich	98%
Perclorato hidratado de sódio	Vetec	99%

Borohidreto de sódio	Aldrich	99%
Diclorometano	Vetec	99,5%
HEPES	Sigma-Aldrich	99,5%
Hidrogênio	White-Martins	5,0 Analítico
MÊS	Sigma-Aldrich	99,0%
Metanol	Vetec	99,8%
Piridina	Nuclear	Destilado para uso sob pressão reduzida; p.e.= 115 °C
Raney-Nickel	Aldrich	99,5%
Sulfato de sódio anidro	Vetec	99%
1,4-butanodiamina	Aldrich	Destilado para uso sob pressão reduzida; p.e.=158-160 °C
Ácido Clorídrico	Aldrich	Mínimo 37%
Hidróxido de sódio	Química Fina	97%
Cloreto de Potássio	Vetec	99%
Tolueno	Vetec	99,5%
Brometo de Potássio – grau FT-IR	Sigma-Aldrich	>99%
Clorofórmio deuterado	Sigma-Aldrich	99,8%

Os tampões HEPES, CHES e MES foram utilizados nas devidas faixa de tamponamento (pH entre 4,0 e 10,0), adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia.

3.2. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

3.2.1. Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR Spectrofotometer Spectrum 100, na região de 4000 a 400 cm^{-1} . As amostras foram preparadas pela dispersão da amostra em KBr de grau

espectroscópico e prensadas, formando pastilhas com cerca de 1 cm de diâmetro e 0,5 mm de espessura. Estas pastilhas foram introduzidas diretamente no caminho óptico do equipamento e desta forma, foram lidas as porcentagens de transmitância (%T).

3.2.2. Espectroscopia na região do Ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os espectros eletrônicos na região do Ultravioleta, visível e infravermelho próximo foram obtidos em um espectrofotômetro Varian modelo Cary 50-Bios, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química-UFSC, na região entre 200 e 1000nm. As análises foram realizadas utilizando soluções do complexo em solvente de grau espectroscópico e cubetas de vidro, com capacidade para 3,5 mL e 1 cm de caminho óptico. Os complexos foram dissolvidos em CH₃CN com concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹.

3.2.3. Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker – AC 200, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC, em 200MHz. Os deslocamentos químicos de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ ppm) e CDCl₃ como solvente.

3.2.4. Espectrometria de massas

Os compostos sintetizados (ligantes e complexos) foram estudados via espectrometria de massa com ionização via eletrospray (ESI-MS). Os espectros foram medidos pela técnica Elis Rosa, obtidos no equipamento Amazon - Ions Trap MS do Centro de Biologia Molecular Estrutural – UFSC.

A análise foi realizada a partir das soluções dos ligantes e complexos em MeOH grau MS com concentração de aproximadamente 500 ppb e fluxo de 180 μ L.min⁻¹. A temperatura do capilar foi mantida entre 180 e 200 °C e a voltagem do capilar entre -400 e -500 V.

3.2.5. Difractometria de raios X

A análise por difração de raios X em monocristal do complexo C4P foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC. Os dados foram coletados em um difratômetro Bruker APEX II DUO usando radiação gerada por um tubo de molibdênio ($\text{MoK}\alpha$ $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite, em temperatura de 190,01K. A estrutura cristalina foi resolvida através dos métodos diretos e parcialmente refinada pelo método dos mínimos quadrados com matriz completa, utilizando-se os programas SIR97 (AL TOMARE *et al.*, 1999) e SHELXL-97 (SHELDRICK, 1997) respectivamente. A representação gráfica da estrutura molecular foi gerada utilizando o programa Mercury (MACRAE, *et al.*, 2006).

3.2.6. Eletroquímica

O comportamento redox dos complexos foi investigado por voltametria cíclica em um potenciostato/galvanostato modelo Epsilon. Os experimentos foram feitos em MeOH/ DMF (99:1; %v/v), com $[C] = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, sob atmosfera de argônio. Foi utilizado como eletrólito suporte, NaClO_4 ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) e uma célula eletrolítica contendo um eletrodo de pseudo-referência de Ag/Ag^+ , um eletrodo de trabalho de carbono vítreo e um eletrodo auxiliar de platina. Foi utilizado como padrão interno o composto ferroceno (par Fc^+/Fc) para correção do eletrodo de referência (GAGNÉ, KOVAL, LISENSKY, 1980).

3.2.7. Condutimetria

As medidas condutimétricas dos complexos foram realizadas no aparelho Metrohm 856, do Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia – UFSC. Os compostos de coordenação foram dissolvidos em CH_3CN , com concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. O aparelho foi calibrado com uma solução padrão de KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ cuja condutividade é de $100 \mu\text{S/cm}$ em água a 25°C .

3.2.8. Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofotômetro Cary Eclipse, através das medidas espectrais de emissão de fluorescência, usando soluções em MeOH, cujas concentrações variaram de $1,0 \times 10^{-3}$ a $5,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, a 25 °C.

3.2.9. Titulação Potenciométrica

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

O sistema foi calibrado utilizando dados obtidos de uma titulação potenciométrica de um volume conhecido a partir de uma solução padrão de HCl $0,0107$ mol.L⁻¹, solução padrão de KOH $0,0963$ mol.L⁻¹ e força iônica ajustada com KCl $0,1$ mol.L⁻¹ em DMSO/H₂O 50:50 v/v. O pK_w da solução DMSO/H₂O 50:50 v/v contendo $0,1$ mol.L⁻¹ de KCl utilizado para os cálculos foi $-15,48$ (previamente refinado). As medidas foram efetuadas em uma célula termostatizada a $25,00 \pm 0,05$ °C. Os ligantes L4S e L4P foram titulados em duplicata, na concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ em 50 mL de MeOH/H₂O 50:50 v/v. O complexo C4S foi titulado *in situ* a partir de $5,0 \times 10^{-5}$ mol do ligante L4S e $5,0 \times 10^{-5}$ mol de cobre (1:1) e também partindo de $5,0 \times 10^{-5}$ mol do ligante L4S e $1,0 \times 10^{-4}$ mol (2:1) de cobre oriundo de uma solução de perclorato de cobre(II), previamente padronizada por Absorção Atômica com Atomização por Chama ([Cu]= $0,0896$ mol.L⁻¹). As concentrações finais do complexo em cada experimento foram de $1,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (1:1) e $2,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (2:1) em 50,0 mL de DMSO/H₂O 50:50 v/v, utilizando KCl $0,1$ mol.L⁻¹ como força iônica, sob atmosfera de argônio. Os dados da titulação foram tratados pelo Prof. Dr. Bernardo de Souza, com o programa BEST7 (MARTELL, 1992) e o diagrama de espécies obtido com o auxílio do programa SPECIES.

3.2.10. Cinética de oxidação

A atividade dos complexos C4S e C4P frente à oxidação do substrato modelo 3,5-DTBC foi averiguada em diferentes valores de pH, afim de avaliar o pH ótimo da reação. A velocidade inicial da reação foi obtida e utilizada como critério de comparação de atividade nos diferentes valores de pH. O acompanhamento das reações foi realizado mediante o monitoramento da variação espectral em 400 nm, considerando-se a absorvidade do produto 3,5-DTBQ neste comprimento de onda e nos diferentes valores de pH (TORELLI, *et al.*, 2002; KAIZER *et al.*, 2002; NEVES *et al.*, 2002). O equipamento utilizado para cinéticas de alto desempenho foi o espectrofotômetro de parada de fluxo da Hi-Tech KinetAsyst, modelo SF-61DX2, caminho óptico de 1,0 cm e utilizando-se o arranjo de diodo (Hi-Tech Knetascan Diode Array) como detector principal acoplado a um banho termostatizado.

Utilizou-se 100 μL de cada solução reacional (complexo/tampão e substrato/tampão, ambos em MeOH/H₂O 50:50 v/v) em cada disparo. A pressão dos disparos foi ajustada em 0,5 MPa. Para cada corrida cinética foram processadas de 200 a 300 leituras de absorbância entre 1,5 e 60 s, dependendo da concentração do substrato.

As velocidades iniciais foram obtidas diretamente do gráfico da concentração do produto da oxidação em função do tempo. A dependência da velocidade de oxidação em função do pH para o substrato 3,5-DTBC foi realizada em uma faixa de pH entre 3,5 e 9, obtendo-se, conseqüentemente, o pH ótimo para a reação, medido a 25°C.

A metodologia descrita a seguir foi realizada em triplicata para os complexos C4S e C4P. Em dois frascos separados foram preparadas soluções do complexo e do substrato, antes da injeção na seringa no equipamento da seguinte forma: em um dos frascos, 500 μL de uma solução do complexo $[\text{C}] = 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em MeOH foram misturados a 500 μL de uma solução do tampão, $[\text{T}] = 0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, dessa forma a concentração do complexo caiu pela metade. Em outro frasco, 200 μL da solução do substrato foi também misturado com 500 μL de solução do tampão $[\text{T}] = 0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e 300 μL de MeOH.

Para o efeito da variação do pH as concentrações de substrato foram mantidas constantes, $[\text{S}]_{\text{estoque}} = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

1. A próxima etapa foi transferir essas soluções para duas seringas principais acima do injetor principal.

O sistema foi ajustado previamente para misturar volumes iguais de 100 μL das soluções de complexo e substrato, de cada uma das seringas injetoras, de modo que o volume da solução resultante após a injeção fosse de 200 μL , portanto as concentrações de ambos, substrato e complexo, foram diluídas por dois novamente.

As concentrações finais de complexo, substrato e tampão foram de $[\text{C}]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{S}]_{\text{final}} = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[\text{T}]_{\text{final}} = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 50:50 v/v. Os tampões utilizados para o efeito de pH foram MES (pH 3,5 a 6,5), HEPES (7,0 e 7,5) e CHES (pH 8 e 9).

O efeito da concentração do substrato foi realizado em pH 6,5 para ambos complexos. O efeito de substrato foi realizado de forma semelhante ao efeito de pH, mantendo-se a concentração do complexo e tampão constantes na cela reacional iguais a $[\text{C}]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[\text{T}]_{\text{final}} = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e variando-se a concentração do substrato de $[\text{S}]_{\text{final}} = 6,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ a $1,8 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. O tratamento matemático utilizado para a obtenção dos parâmetros cinéticos foi o ajuste não-linear da equação de Michaelis-Menten. (LEHNINGER; NELSON; COX, 2013).

A formação de peróxido de hidrogênio nas reações de oxidação do 3,5-DTBC catalisadas pelos complexos binucleares de cobre(II) foi detectada por uma modificação do método da iodometria (MEYER; ACKERMANN; KAIFER; PRITZKOW, 2002). Uma mistura reacional foi preparada da seguinte maneira: concentração de complexo $[\text{C}]_{\text{final}} = 2,4 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, concentração de tampão $[\text{T}]_{\text{final}} = 3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, pH = 6,50, e concentração de substrato $[\text{S}]_{\text{final}} = 5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Após uma hora de reação, igual volume de água foi adicionado e a quinona foi extraída com diclorometano. A camada aquosa foi acidificada com ácido sulfúrico ($[\text{ácido}] = 5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) a $\text{pH} \approx 2$, para interromper a reação de oxidação e 1 mL de solução aquosa de iodeto de potássio ($[\text{iodeto}] = 0,3 \text{ mol.L}^{-1}$) e 3 gotas de solução de molibdato de amônio ($[\text{molibdato}] = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) foram adicionados. Na presença de peróxido de hidrogênio ocorre a seguinte reação: $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{I}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{I}_2$, e em excesso de iodeto ocorre à formação do íon tri-iodeto, $\text{I}_2(\text{aq}) + \text{I}^- \rightarrow \text{I}_3^-$. Esta

reação geralmente é lenta, mas em meio ácido e com a adição do molibdato de amônio torna-se praticamente instantânea. A formação do I_3^- pode ser monitorada espectrofotometricamente devido ao surgimento de uma banda característica em 353 nm ($\epsilon = 26000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

3.2.11. Testes oxidativos em DNA plasmidial

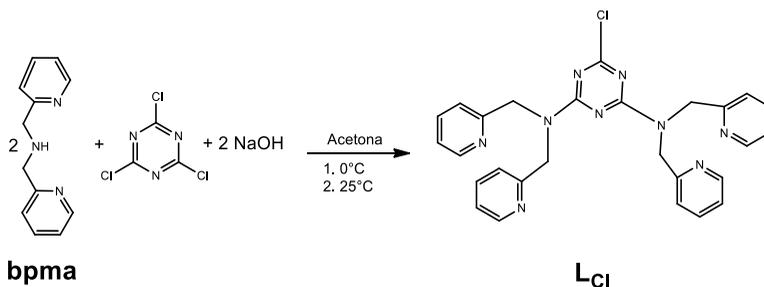
Os testes oxidativos em plasmídeos de DNA foram realizados em colaboração com o Centro de Biologia Molecular Estrutural – UFSC pela mestrandia Cristine Saibert, sob orientação do Prof. Dr. Hernán Terenzi.

A determinação da concentração para atividade ótima dos complexos foi realizada a partir do tratamento de 330 ng do plasmídeo pBSK II de DNA superenovelado ($\sim 25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em pb) com os complexos em diferentes concentrações na faixa de 0 a $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). A reação foi realizada a temperatura de 37°C em tampão HEPES, pH= 7,0 e o tempo reacional foi de 1h (C4S e C4P) e 2h (C_{ci}).

O término da reação foi feito por adição de $5 \mu\text{L}$ de tampão de corrida 6X concentrado (EDTA $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01% - pH 8,0) às misturas reacionais ($20 \mu\text{L}$) – o EDTA presente no tampão quela os complexos em solução, impedindo sua reação com o DNA. Após, as amostras foram armazenadas a 4°C até serem submetidas à eletroforese em gel de agarose (1 %) contendo brometo de etídio ($0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 1h e 40min a 90V em tampão TBE 0,5X (Tris $44,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, ácido bórico $44,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, EDTA $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ - pH 8,0). Os géis resultantes foram fotografados pelo sistema de fotodocumentação DigiDoc-It (UVP, USA) e as frações de cada forma de DNA plasmidial foram quantificadas por densitometria, utilizando o software KODAK Molecular Imaging Software 5.0 (Carestream Health, USA).

MM = 108,14 g mol⁻¹) de 2-(aminometil)piridina foram solubilizados em 100 mL de tolueno e mantidos sob agitação em banho de gelo por 1h. A esta solução foram adicionados 10,71 g (100 mol, MM = 107,11 g.mol⁻¹) de 2-piridilcarboxialdeído. Após a adição, retirou-se a reação do banho de gelo, permanecendo sob agitação por mais 2 horas. O tolueno foi retirado sob vácuo à temperatura de 15 °C. O óleo resultante foi solubilizado em MeOH, e a esta mistura foram adicionados aproximadamente 30 mg de Pd/C 5% em um recipiente apropriado para a hidrogenação catalítica. Após 15 horas de agitação sob atmosfera de hidrogênio (60 psi), a solução foi retirada filtrada e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto foi obtido com rendimento quantitativo >99%.

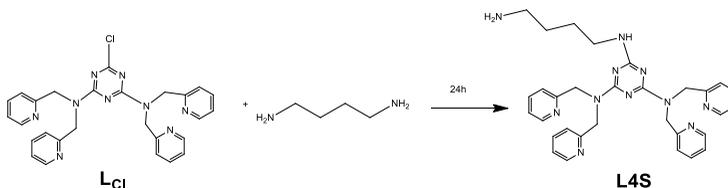
3.3.1.2. Síntese do ligante L_{Cl} - N²-cloro-N⁴,N⁴,N⁶,N⁶- tetraquis(2-piridilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina



A síntese foi realizada conforme descrito por Oliveira (2013): Em um béquer de 150 mL contendo 40,0mL de acetona, foram adicionados 9,65 g de bis(2-piridilmetil)amina (bpma) (48,5 mmol; MM = 199,0 g.mol⁻¹) e 40 mL de NaOH 1mol.L⁻¹. A esta solução foram adicionados, lentamente, 4,48 g de 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (24,3 mmol; MM = 184,41 g.mol⁻¹). A suspensão de coloração avermelhada foi deixada sob agitação em banho de gelo e em seguida por mais uma hora em temperatura ambiente. O precipitado resultante foi filtrado em funil de placa porosa e lavado com acetona (2x de 30 mL) e éter (2x de 20 mL). O sólido lavado, de coloração levemente amarelada, foi então recristalizado em isopropanol a quente (60 mL) e resfriado a -5,0 °C por 12 horas, produzindo cristais brancos. O sólido

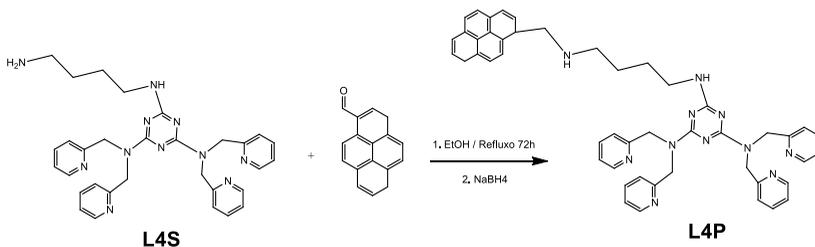
branco cristalino foi novamente recristalizado sob estas condições, seco sob vácuo e posteriormente caracterizado. Rendimento: 6,48 g, 52,5 % em relação ao reagente 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina.

3.3.1.3. Síntese do ligante L4S - *N*²-(4-aminobutil)-*N*⁴,*N*⁴,*N*⁶,*N*⁶- tetraquis(2-piridilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina



Em um balão de fundo redondo de 125 mL, foram adicionados 3 mL de 1,4-butanodiamina (29,8 mmol; $d=0,877 \text{ g.mL}^{-1}$; $MM = 88,15 \text{ g.mol}^{-1}$). Em seguida, foram adicionados 10 mL de CHCl_3 , e por fim, 1,77g do ligante L_{Cl} (3,5 mmol; $MM= 509,18 \text{ g.mol}^{-1}$). A mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente e agitação magnética por 24h. Após esse período, o solvente foi retirado sob pressão reduzida e o sólido foi redissolvido em CH_2Cl_2 . Foram realizadas extrações sucessivas com solução de NaCl saturado (3x de 20 mL) e NaHCO_3 (3x de 20 mL). À fase orgânica, foi adicionado o agente dessecante Na_2SO_4 e o solvente foi removido por evaporação rotatória, obtendo-se um sólido espumoso, com 84,7% de rendimento (1,66g; 2,96 mmol; $MM= 561,31 \text{ g.mol}^{-1}$).

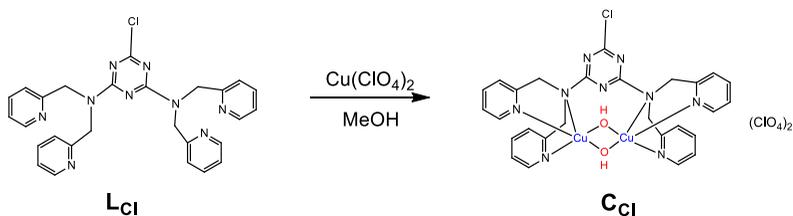
3.3.1.4. Síntese do ligante L4P - *N*²-(4-(metilpirenil)aminobutil)-*N*⁴,*N*⁶,*N*⁶,*N*⁶- tetraquis(2-piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina



Em um balão de 250 mL foram dissolvidos em 50 mL de EtOH, 1,66g do ligante L4S (2,96 mmol; MM = 561,31 g.mol⁻¹) e 0,74g de 1-pirenocarboxaldeído (2,96 mmol; MM = 230,26 g.mol⁻¹). A mistura foi mantida sob refluxo. Após 72h, foram adicionados 0,12g de NaBH₄ (2,96 mmols; MM = 37,83 g.mol⁻¹) e o sistema reacional permaneceu sob agitação magnética, a temperatura ambiente, durante 2 horas, observando-se uma diminuição na intensidade da coloração. O solvente foi retirado por pressão reduzida e o sólido foi suspenso em H₂O. A suspensão sob agitação magnética teve seu pH ajustado lentamente para aproximadamente 2 com solução de HCl 3,0 mol.L⁻¹. A solução alaranjada foi extraída com CH₂Cl₂ (6x de 20mL). A fase aquosa restante teve seu pH reajustado para 7 com solução de NaOH 1M. A esta suspensão, foram adicionados 30 mL de CH₂Cl₂. A fase orgânica foi extraída com H₂O (3x de 20 mL) e NaHCO₃ (3x de 30 mL). Em seguida foi adicionado o agente dessecante Na₂SO₄. A solução foi filtrada e o solvente foi retirado em pressão reduzida. O sólido espumoso amarelado foi obtido com 61% de rendimento (1,41g; 1,81 mmol; MM = 777,40 g.mol⁻¹).

3.3.2. Sínteses dos complexos

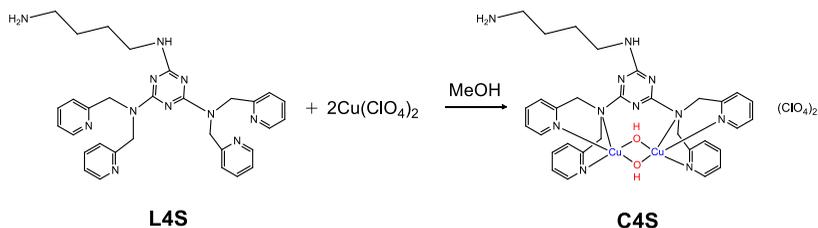
3.3.2.1. Síntese do complexo C_{Cl} - Perclorato de (*N*²-cloro-*N*⁴,*N*⁴,*N*⁶,*N*⁶- tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina)cobre(II)



A síntese do complexo foi realizada segundo modificações no procedimento descrito por Massoud e colaboradores (MASSOUD *et al.*, 2011). Em um béquer contendo 0,51 g (1,0 mmol; MM = 509,99 g.mol⁻¹) do ligante L_{Cl} dissolvido em 20,0 mL de MeOH foram adicionados sob agitação magnética 0,74 g de Cu(ClO₄)₂·5H₂O (2,0 mmol; MM = 370,54 g.mol⁻¹). A esta solução, foram adicionados 1,0 mL de NaOH (1,0 mol.L⁻¹).

Em poucos minutos houve formação de precipitado de coloração azul escura. O precipitado foi filtrado e recristalizado em acetona/isopropanol 2:1 (v/v), com rendimento quantitativo.

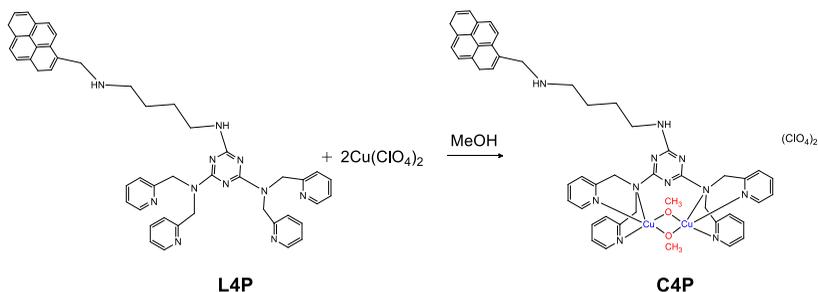
3.3.2.2. Síntese do complexo C_{4S} - Perclorato de (*N*²-(4-aminobutil)-*N*⁴,*N*⁴,*N*⁶,*N*⁶- tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina)cobre(II)



Em um béquer de 50 mL com 10 mL de MeOH, foram dissolvidos 0,15 g do ligante L_{4S} (0,28 mmol; MM = 561,31 g.mol⁻¹). Sob agitação, em temperatura ambiente,

foram adicionados 0,21 g de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,56 mmol; $\text{MM} = 370,54 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). Após 3 dias, houve a formação de um filme no fundo do béquer. Este filme foi dissolvido em 10 mL de acetona e após, foram adicionados 10 mL de isopropanol. Em mais 3 dias, microcristais azuis do complexo C4S ($\text{MM} = 990,90 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) em rendimento quantitativo foram formados. Os espectros e a caracterização deste complexo seguem discutidos na Seção 4.2. deste trabalho.

3.3.2.3. Síntese do complexo C4P - Perclorato de (*N*²-(4-(metilpirenil)aminobutil)-*N*⁴,*N*⁴,*N*⁶,*N*⁶-tetraquis(piridin-2-ilmetil)-1,3,5-triazina-2,4,6-triamina)cobre(II)



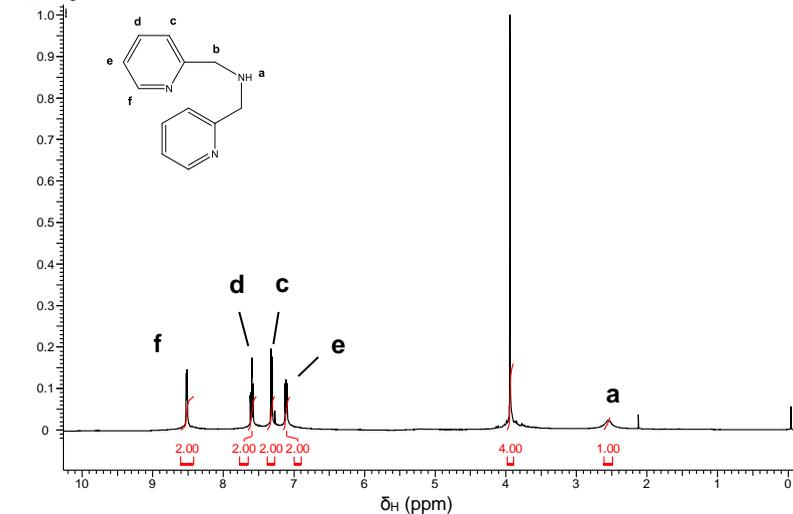
Em um béquer de 50 mL com 10 mL de MeOH, foram dissolvidos 0,38 g do ligante L4P (0,5 mmol; $\text{MM} = 777,40 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). Sob agitação, em temperatura ambiente, foram adicionados 0,37 g de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ (1 mmol; $\text{MM} = 370,54 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). Após 3 dias, houve a formação de um filme no fundo do béquer, além de microcristais adequados apenas para resolução parcial da estrutura de Raios X. A este filme, foram adicionados 10 mL de CHCl_3 . O filme foi mantido no solvente, sob agitação ultrassônica por 30 min, em seguida, precipitou um pó cristalino verde do complexo C4P ($\text{MM} = 1249,13 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), o qual foi filtrado em funil de placa porosa, com rendimento quantitativo. Os espectros e a caracterização deste complexo seguem discutidos na Seção 4.2. deste trabalho.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÕES DOS LIGANTES

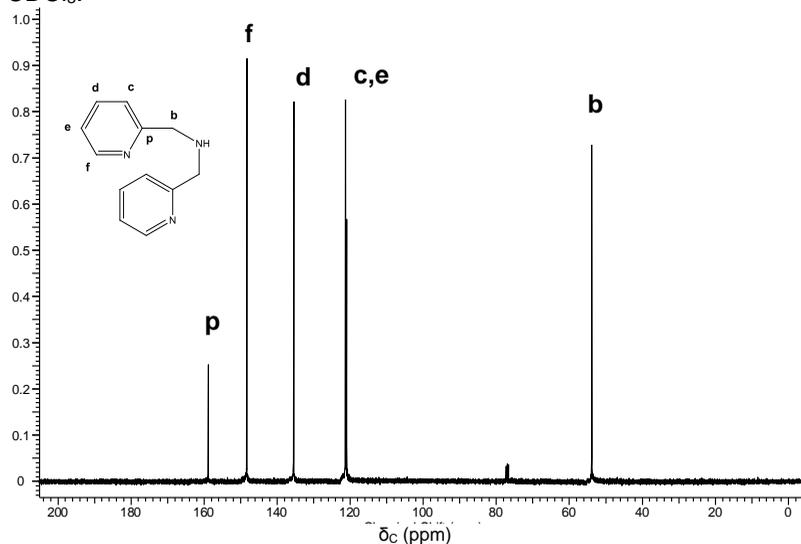
O precursor bpma e os ligantes L_{Cl}, L_{4S} e L_{4P} foram obtidos com bons rendimentos de acordo com as rotas sintéticas descritas na seção experimental. Os ligantes foram obtidos com graus de pureza adequados para a utilização nas sínteses dos complexos e foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas. As caracterizações do precursor bpma de RMN de ¹H e de ¹³C, bem como o espectro na região do IV seguem nas Figuras 16 a 18.

Figura 16. Espectro de RMN de ¹H do pró-ligante bpma em CDCl₃.



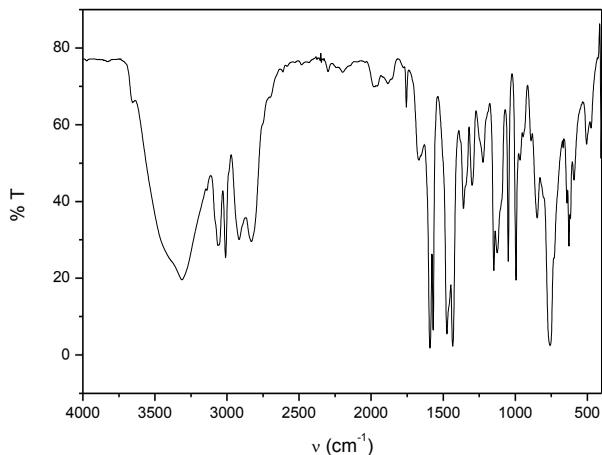
RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ_H ppm: 2,55 (s, 1 H); 3,94 (s, 4 H); 7,11 t, 2 H); 7,31 (d, 2 H); 7,60 (dt, 2 H); 8,53 (d, 2 H).

Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C do precursor bpma em CDCl_3 .



RMN de ^{13}C (200 MHz; CDCl_3) δ ppm: 53,83; 120,96; 121,27; 135,45; 148,31; 158,86.

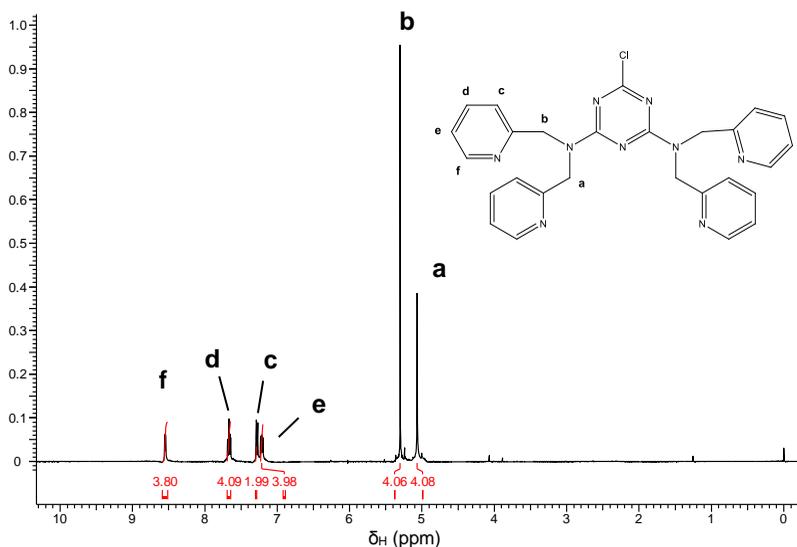
Figura 18. Espectro do pró-ligante bpma na Região do IV em pastilha de KBr.



IV (KBr) em cm^{-1} : $\nu(\text{N-H})$ 3291; $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ e C-H_{alif}) 3073-2823; $\nu(\text{C=N}$ e $\text{C=C})$ 1583-1441; $\nu(\text{C-N})$ 1223; $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$ 745.

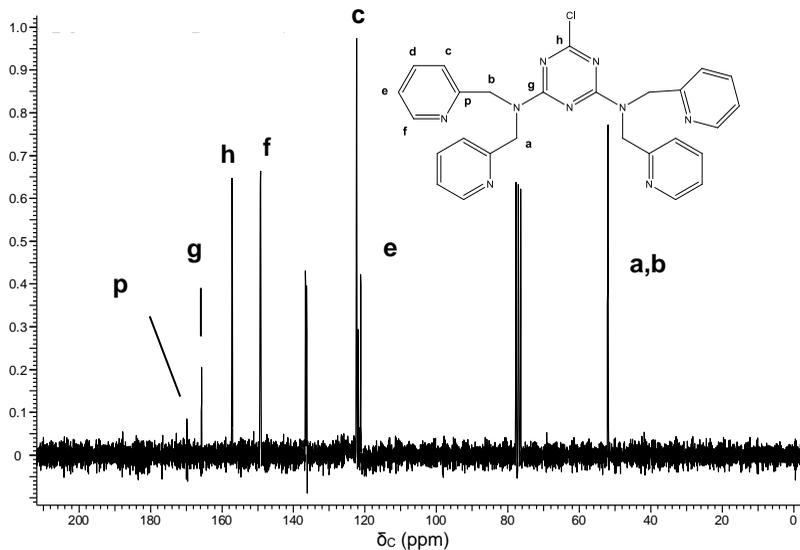
Para a síntese do ligante L_{Cl} , foram necessárias quatro etapas, partindo inicialmente dos reagentes 2-piridilcarboxaldeído e 2-aminometilpiridina. Conhecida de forma geral como aminação reductiva, mais especificamente para esta reação como de formação de Bases de Schiff, esta reação tem como produto uma imina, que se reduzida, pode resultar numa amina (bpma), que por sua vez, pode ser utilizada para a síntese de ligantes com mais sítios coordenantes. Após, duas reações sucessivas de S_NAr foi realizada a adição de cloreto cianúrico a este produto em temperatura controlada, gerando assim, o ligante L_{Cl} , derivado de uma unidade triazínica, possuindo duas unidades tridentadas e dois possíveis sítios coordenantes. Os espectros de RMN de 1H e ^{13}C e IV seguem nas Figuras 19 a 21. A Tabela 3 traz as atribuições de cada átomo de hidrogênio e carbono do ligante L_{Cl} pelas análises de RMN.

Figura 19. Espectro de RMN de 1H do ligante L_{Cl} em $CDCl_3$.



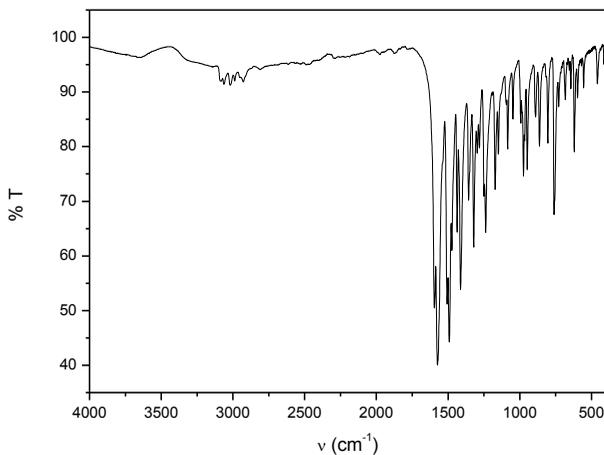
RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 5,06 (s, 4 H); 5,30 (s, 4 H); 7,22 (d, 4 H); 7,27-7,29 (s, 4 H); 7,66 (t, 4 H); 8,55 (d, 4 H).

Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C do ligante L_{Cl} em CDCl_3 .



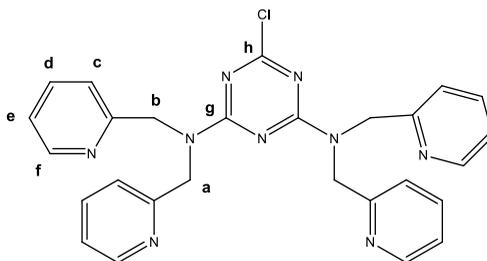
RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 52,00; 121,21; 121,59; 121,90; 122,35; 136,33; 136,65; 149,24; 157,19; 165,70; 170,02.

Figura 21. Espectro do ligante L_{Cl} na Região do IV em pastilha de KBr.



IV (KBr) em cm^{-1} : $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ e C-H_{alif}) 3088-2924; $\nu(\text{C}=\text{C})$ 1572; $\nu(\text{C}=\text{N})$ 1485; $\nu(\text{C}-\text{N})$ 1321; $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$ 767.

Tabela 3. Deslocamentos químicos (ppm), observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C atribuídos ao ligante L_{Cl} (OLIVEIRA, 2013).



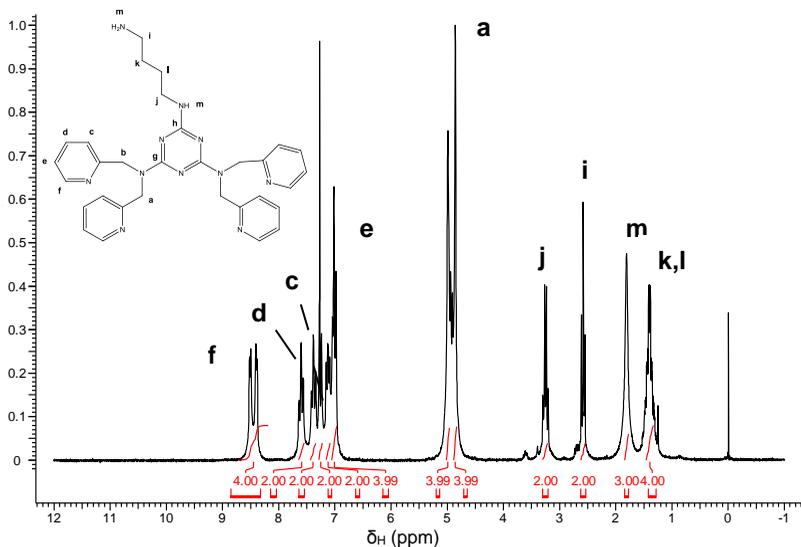
Atribuição	δ_{H} observado (ppm)	Multiplicidade	Número de Prótons	δ_{C} observado (ppm)
a	5,06	Singlete	4	52,00
b	5,30	Singlete	4	52,00
c	7,22	Dubleto	4	121,90 122,35
d	7,66	Tripleto	4	136,33 136,65
e	7,27-7,29	Tripleto	4	121,21 121,59
f	8,55	Duplo Tripleto	4	149,24
g	-	-	-	165,70
h	-	-	-	170,02
p	-	-	-	157,19

Reagindo o ligante L_{Cl} com butanodiamina em 10x de excesso, sintetizou-se o ligante L4S . A sequência da adição do ligante à amina é primordial para esta reação, evitando assim, o acoplamento entre dois ligantes L_{Cl} através da diamina.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C seguem nas Figuras 22 e 23, enquanto que o espectro na região do IV é mostrado na Figura 24. A tabela de picos das análises de RMN de ^1H e ^{13}C a seguir (Tabela 4), mostra que, o ligante L4S apresenta os mesmos picos presentes no espectro do reagente de partida (ligante L_{Cl}), já descrito na literatura (MASSOUD, 2012),

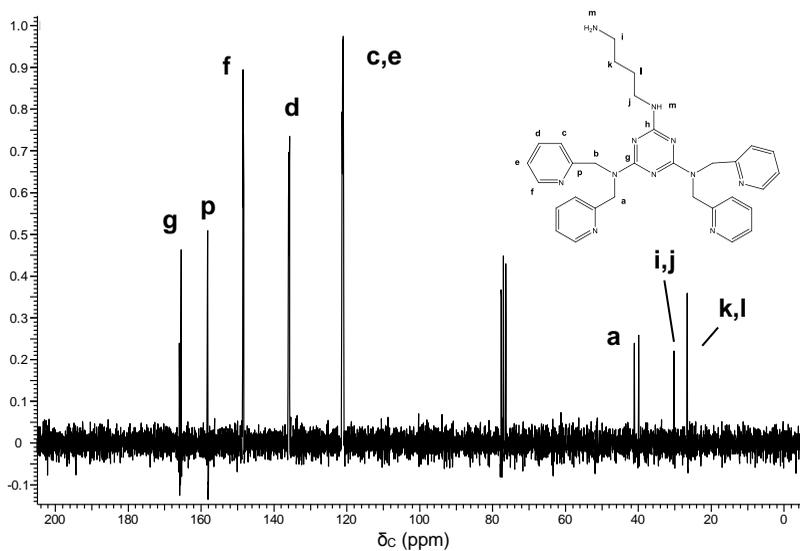
acrescidos dos picos da butanodiamina, localizados na região de 1,33 - 1,46, 2,58 e 3,21 - 3,30 ppm para o espectro de RMN de ^1H , assim como na região entre 26,58 e 41,12 ppm para o espectro de RMN de ^{13}C .

Figura 22. Espectro de RMN de ^1H do ligante L4S em CDCl_3 .



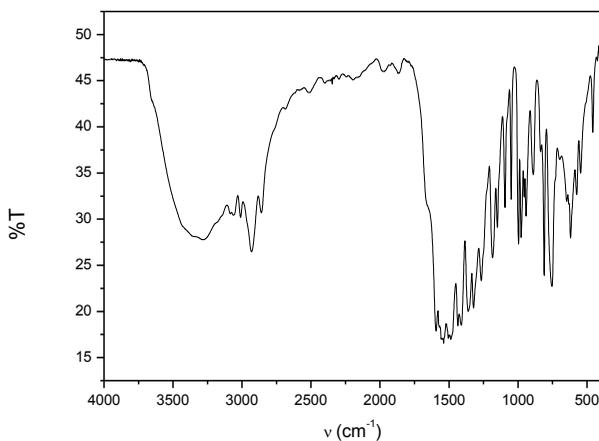
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 1,33 – 1,46 (m, 4 H); 1,81 (br. s., 3 H); 2,58 (t, 2 H); 3,21 – 3,30 (m, 2 H); 4,86 (s, 4 H); 4,99 (br. s., 4 H); 6,96 – 7,06 (m, 4 H); 7,08 – 7,16 (m, 2 H); 7,26 (d, 2 H); 7,38 (t, 2 H); 7,54 – 7,65 (m, 2 H); 8,18 – 8,71 (m, 4 H).

Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C do ligante L4S em CDCl_3 .



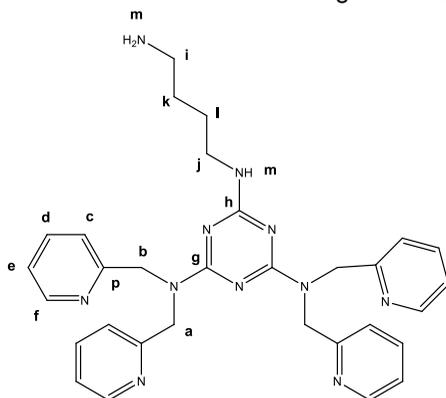
RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 26,58; 30,18; 39,95; 41,12; 121,01; 121,14; 121,30; 135,75; 135,95; 148,36; 148,51; 158,22; 165,47; 165,99.

Figura 24. Espectro na região do IV do ligante L4S em pastilha de KBr.



IV (KBr) em cm^{-1} : $\nu(\text{O-H})$ 3313; $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ e $\text{C-H}_{\text{alif}})$ 3079-2850; $\nu(\text{C=C})$ 1591; $\nu(\text{C=N})$ 1495; $\nu(\text{C-N})$ 1319; $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$ 753.

Tabela 4. Deslocamentos químicos (ppm), observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C atribuídos ao ligante L4S.

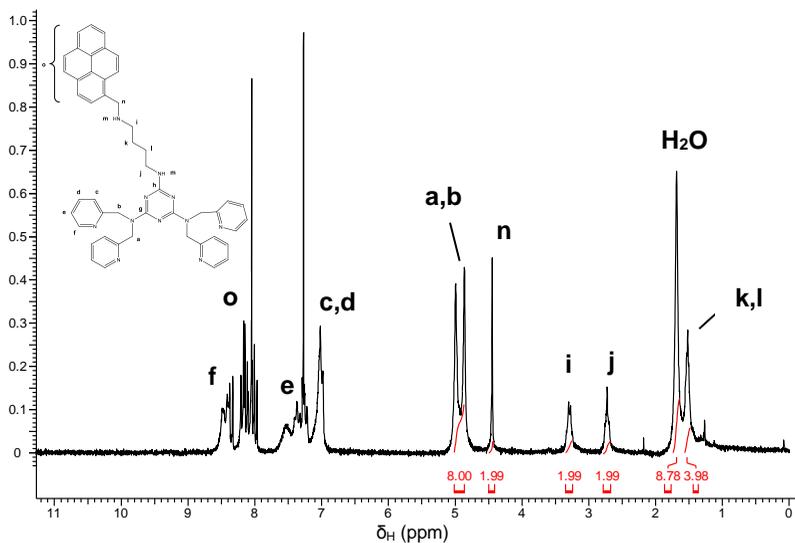


Atribuição	δ_{H} observado (ppm)	Multiplicidade	Número de Prótons	δ_{C} observado (ppm)
a	4,86	Singleto	4	41,12
b	4,99	Singleto	4	39,95
c	6,96 - 7,06	Dubleto	4	121,30
d	7,38; 7,54 - 7,65	Tripletos	4	135,75 135,95
e	7,08 - 7,16; 7,26	Tripletos	4	121,01 121,14
f	8,18 - 8,71	Dubleto	4	148,36 148,51
g	-	-	-	165,47 165,99
p	-	-	-	158,22
h	-	-	-	*
i	2,58	Tripleto	2	30,18
j	3,21 - 3,30	Quarteto	2	30,18
k, l	1,33 - 1,46;	Multipleto	4	26,58
m	1,81	Singleto	3	-

* O carbono h não foi verificado devido a necessidade de um maior tempo de coleta no RMN de ^{13}C , característico neste tipo de ligante triazínico.

Já o ligante L4P, além dos picos do ligante L4S, também possui picos relativos aos hidrogênios do pireno, que por sua vez, não são claramente quantificados devido à sobreposição com picos oriundos de outros sistemas aromáticos já existentes no ligante, tais como o das piridinas, sendo no espectro de RMN de ^{13}C um pouco mais fácil visualizar a presença dos carbonos referentes ao pireno na região entre 122 e 134 ppm. Por fim, a aminação redutiva que forma o produto L4P acrescenta um carbono a molécula, localizado em 4,42 ppm no RMN de ^1H , confirmando então a síntese e obtenção do produto desejado. As Figuras 25 a 27 mostram os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e IV, respectivamente. A tabela 5 traz as atribuições aos picos nas análises de RMN de ^1H e ^{13}C .

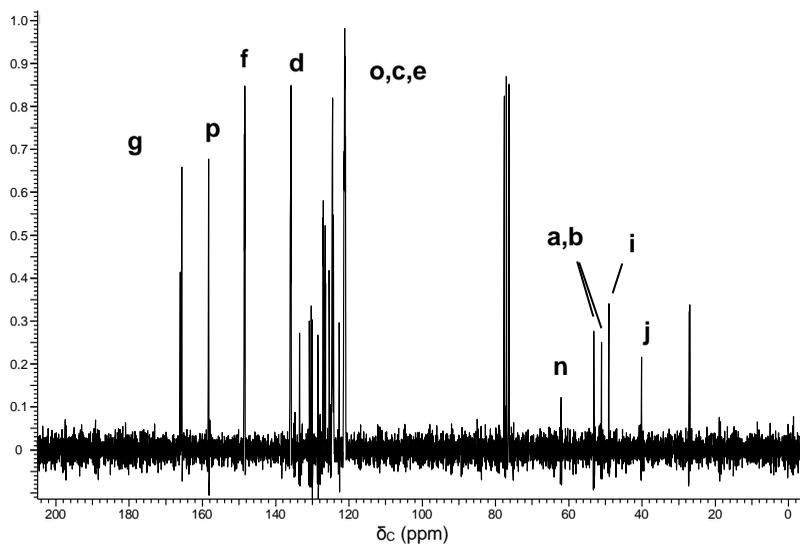
Figura 25. Espectro de RMN de ^1H do ligante L4P em CDCl_3 .



RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 1,52 (m, 4 H); 1,69 (s, OH); 2,59 - 2,82 (t, 2 H); 3,14 - 3,38 (t, 2 H); 4,42 (s, 2 H); 4,85 (s, 4

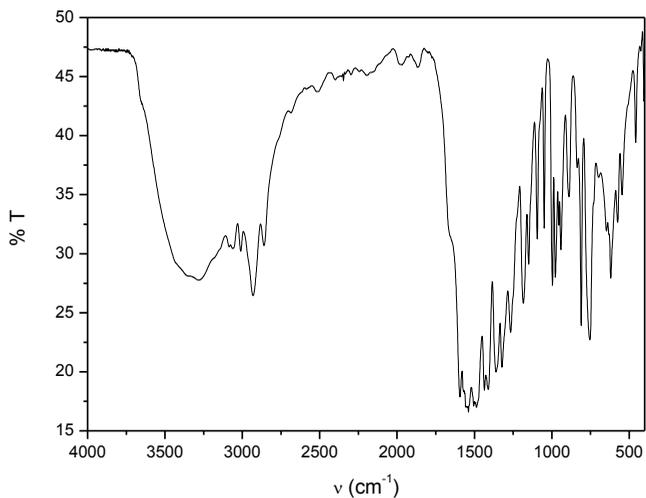
H); 4,99 (s, 8 H); 6,84 - 7,15 (m); 7,15 - 7,40 (m); 7,52 (m); 7,90 - 8,21 (m) 8,28 - 8,53 (m),

Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C do ligante L4P em CDCl_3 .



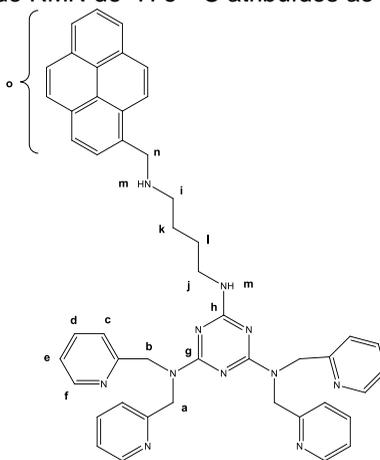
RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 27,21; 27,36; 40,34; 49,30; 51,42; 51,64; 61,10; 121,10; 121,33; 21,51; 122,89; 124,40; 124,71; 125,61; 126,66; 126,75; 127,18; 127,30; 130,30; 130,53; 131,02; 133,70; 135,98; 136,17; 148,64; 148,79; 158,52; 165,81; 166,29.

Figura 27. Espectro na região do IV do ligante L4P em pastilha de KBr.



IV (KBr) em cm^{-1} : $\nu(\text{O-H})$ 3402; $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ e $\text{C-H}_{\text{alif}})$ 3045-2855; $\nu(\text{C=C})$ 1595- 1542; $\nu(\text{C=N})$ 1485; $\nu(\text{C-N})$ 1322; $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$ 748.

Tabela 5. Deslocamentos químicos (ppm), observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C atribuídos ao ligante L4P.



Atribuição	δ_{H} observado (ppm)	Multiplicidade	Número de Prótons	δ_{C} observado (ppm)
o	7,52; 7,90 - 8,21; 8,28 - 8,53	Multipletos	-	122,89
				124,40
				124,71
				125,61
				126,66
				126,75
				127,18
				127,30
				130,30
				130,53
a, b	4,99	Singletos	8	51,42
				51,64
c	6,96 - 7,06	Dubletos	-	121,51
d	7,38; 7,54 - 7,65	Tripletos	-	135,98; 136,17

Continua na pág. 69

e	7,08 - 7,16; 7,26	Tripletos	-	121,10; 121,33;
f	8,18 - 8,71	Dubletos	-	148,64; 148,79
g	-	-	-	165,81; 166,29
p	-	-	-	158,52
h	-	-	-	*
H ₂ O	1,69	Singleto	-	-
i	2,59 - 2,82	Tripleto	2	40,34
j	3,14 - 3,38	Tripleto	2	49,30
k, l	1,52	Singleto	4	27,21; 27,36
m	-	-	-	-
n	4,42	Singleto	2	61,10

* O carbono h não foi verificado devido a necessidade de um maior tempo de coleta no RMN de ¹³C, característico neste tipo de ligante triazínico.

Tabela 6. Picos de RMN de ¹H e ¹³C do ligante L^{Cl} descrito pela literatura e dos ligantes sintetizados neste trabalho.

Picos	
RMN de ¹ H	L ^{Cl} *
	L ^{AS}

4,83 (s, 4 H, CH₂); 5,04 (s, 4 H, CH₂); 6,88-6,92 (d, 2 H); 7,03 (t, 2 H); 7,16 (t, 2 H); 7,29-7,37 (m, 4 H); 7,60-7,63 (t, 2 H); 8,40 (d, 2 H); 8,50 (d, 2 H)

1,33 - 1,46; (m, 4 H); 1,81 (br, s., 3 Hamin,); 2,58 (t, 2 H) 3,21 - 3,30 (m, 2 H); 4,86 (s, 4 H); 4,99 (br, s., 4 H); 6,96 - 7,06 (m, 4 H); 7,08 - 7,16 (m, 2 H) 7,26 (d, 2 H); 7,38 (t, 2 H) 7,54 - 7,65 (m, 2 H); 8,18 - 8,71 (m, 4 H)

*Continua na página 70

RMN de ¹³C	L4P	1,98 (br, s., 4 H); 2,59 - 2,82 (m, 2 H); 3,14 - 3,38 (m, 2 H); 4,42 (s, 2 H) 4,85 (br, s., 4 H) 4,99 (br, s., 4 H); 6,78 - 7,12 (m, 6 H); 7,12 - 7,46 (m, 6 H); 7,52 (br, s., 2 H); 7,87 - 8,25 (m, 8 H); 8,25 - 8,61 (m, 5 H)
	LcI*	51,92; 121,11; 121,81; 122,26; 136,25; 136,55; 149,15; 157,10; 165,61; 169,72
	L4S	26,58; 30,18; 39,95; 41,12; 51,31; 121,01; 121,14; 121,30; 135,75; 135,95; 148,36; 148,51; 158,22; 165,47; 165,99
	L4P	27,21; 27,36; 40,34; 49,30; 51,42; 51,64; 61,10; 121,10; 121,33; 21,51; 122,89; 124,40; 124,71; 125,61; 126,66; 126,75; 127,18; 127,30; 130,30; 130,53; 131,02; 133,70; 135,98; 136,17; 148,64; 148,79; 158,52; 165,81; 166,29

* (OLIVEIRA, 2013)

Os espectros na região do IV se analisados comparativamente entre os ligantes L4P e L4S, não fornecem informações adicionais, haja vista a semelhança entre ambos. Contudo, pode-se observar as bandas relativas à estiramentos característicos de ligações presentes nos anéis triazínicos e piridínicos, como C-H, C=N e N-H, esta que não pode ser devidamente atribuída devido a sobreposição com as bandas de O-H provenientes da água. As bandas na região próxima de 1550 cm⁻¹ são mais pronunciadas e podem ser atribuídas as ligações C=C do pireno e bandas fracas de deformação axial em 750 cm⁻¹ das ligações C-H (SILVERSTEIN, 1994). Os espectros dos ligantes L4S e L4P, sobrepostos para fins de comparação, seguem na Figura 28 e a Tabela 7 traz alguns valores de números de onda em cm⁻¹ respectivos a bandas características destes compostos na região do IV.

Vale ressaltar aqui, o caráter higroscópico de todos os ligantes, que apresentaram bandas na região entre 3400 e 3300 cm⁻¹, referentes a estiramentos O-H de moléculas de água.

Figura 28. Sobreposição dos espectros na região do IV dos ligantes L4S e L4P.

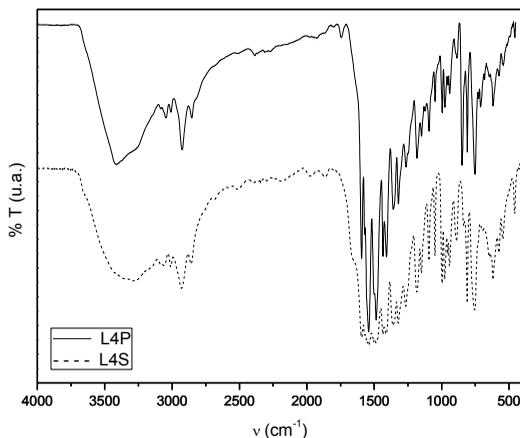


Tabela 7. Principais bandas e atribuições (SILVERSTEIN, 1994), em cm^{-1} , dos espectros no infravermelho para os ligantes L4S e L4P.

Banda	L4S	L4P
ν (O-H)	3313	3402
ν (C-H_{ar} e C-H_{alif})	3079-2850	3045-2855
ν (C=C)	1591	1595- 1542
ν (C=N)	1540; 1495	1542; 1485
ν (C-N)	1319	1322
δ(C-H_{ar})	753	748

A espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) apresenta-se como uma técnica de análise aplicada com sucesso na caracterização de ligantes e complexos em solução, 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 em solução.

As espectrometrias de massa dos ligantes L4S (Figura 29) e L4P (Figura 30) revelaram a presença do íon molecular de

ambos, além de outros fragmentos característicos destes ligantes, como a quebra do grupo butanodiamina no ligante L4S ($m/z=491$, 471 e 454) e grupo pirênico ($m/z=215$) no ligante L4P. Também foi detectado o fragmento do ligante L4S no ligante L4P ($m/z=561$).

Figura 29. Espectro de massa do ligante L4S e respectiva simulação da espécie isotópica (M+1).

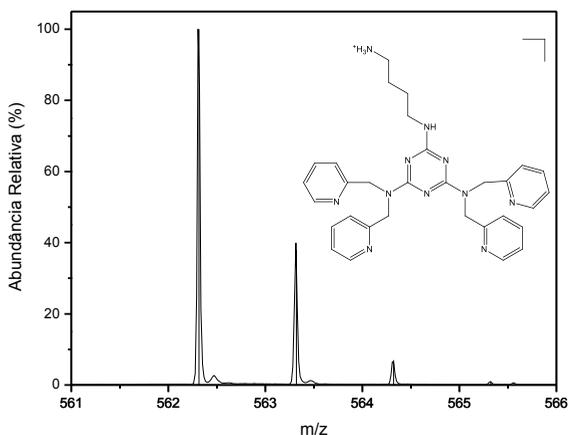
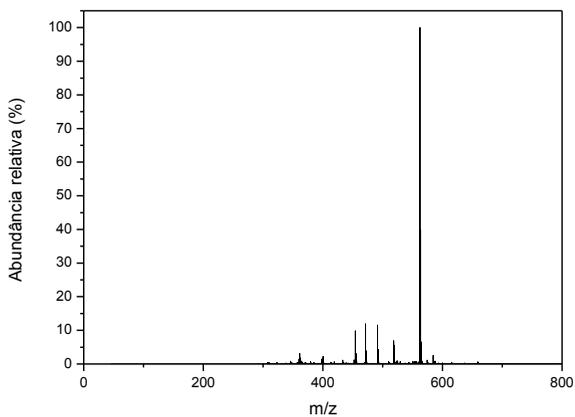
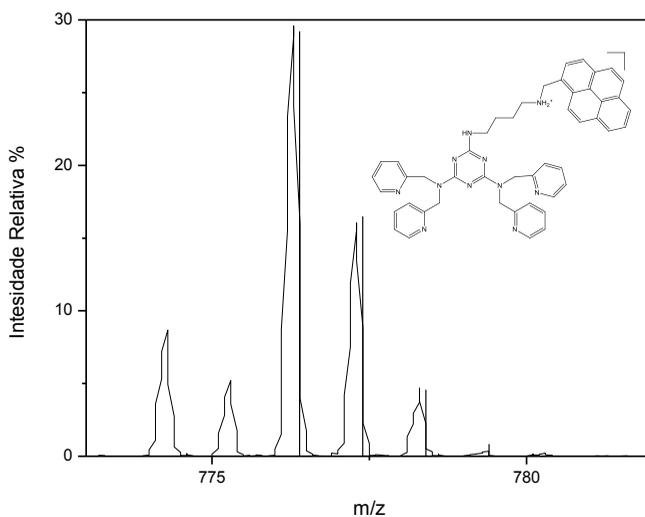
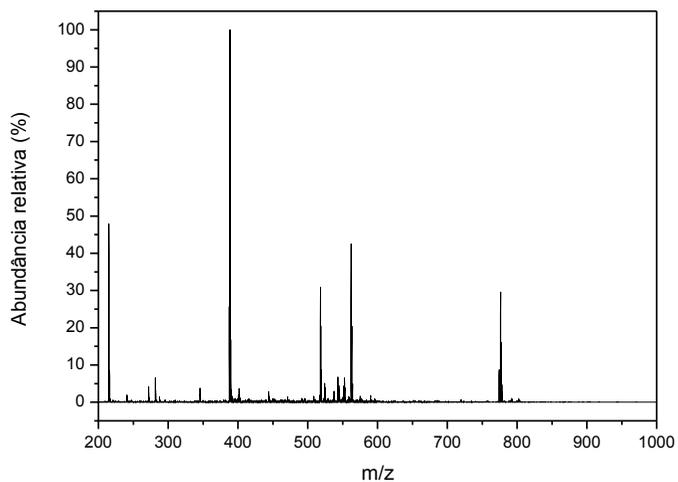


Figura 30. Espectro de massa do ligante L4P e respectiva simulação da espécie isotópica (M+1).



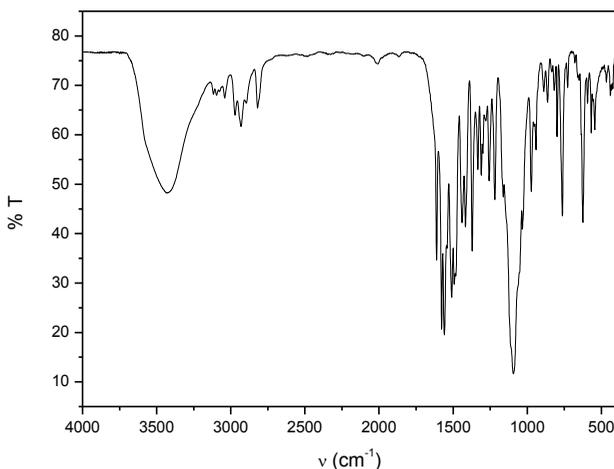
4.2. SÍNTESES E CARACTERIZAÇÕES DOS COMPLEXOS

Os complexos binucleares de cobre(II) foram preparados a partir dos ligantes L4S e L4P e perclorato de cobre(II) em estequiometria 1:2, utilizando metanol como solvente e sob leve aquecimento. Os complexos obtidos foram isolados como cátions, contendo ânions (ClO_4)⁻ como contra-íons.

Em três dias, o solvente evapora, formando um óleo e/ou sólido no fundo do béquer. Redissolvendo este sólido em CH_3CN e secando sob pressão reduzida ou mantendo 10 minutos sob ultrassom em CHCl_3 , forma-se um pó cristalino de ambos, em rendimento quantitativo.

O complexo C_{Cl} foi sintetizado com o intuito de realizar algumas análises complementares, pois este composto já foi devidamente sintetizado e caracterizado por Massoud (2012) e Oliveira (2013). Este foi devidamente caracterizado por espectroscopia na região do IV (Figura 31).

Figura 31. Espectro na região do IV do complexo C_{Cl} em pastilha de KBr.



IV (KBr) em cm^{-1} : $\nu(\text{O-H})$ 3431; $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ e $\text{C-H}_{\text{alif}})$ 3119-2818; $\nu(\text{C=C})$ 1577-1559; $\nu(\text{C=N})$ 1512-1492; $\nu(\text{C-N})$ 1367; $\nu(\text{Cl-O})$ 1093; $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$ 759.

4.2.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho

A espectroscopia no IV é geralmente utilizada como uma análise preliminar e mostrou-se muito útil na caracterização inicial dos complexos (Silverstein *et al.*, 1994; Nakamoto, 1978), uma vez que a formação dos mesmos pode ser acompanhada pela presença das bandas características de cada ligante, indicando a presença do mesmo nos compostos isolados. Bandas adicionais, referentes ao contra-íon, bem como deslocamentos químicos em relação aos ligantes livres, também são observadas.

Além da banda característica em 1090 cm^{-1} referente ao estiramento axial $\nu(\text{Cl-O})$ de percloratos coordenados (NAKAMOTO, 1978), algumas bandas tiveram sua intensidade reduzida principalmente as de estiramento axial $\nu(\text{C=N})$, o que indica a formação de novas ligações, neste caso, as de coordenação. As figuras 32 e 33 mostram os espectros dos ligantes e seus respectivos complexos sintetizados neste trabalho. As Tabelas 8 e 9 trazem uma comparação entre as principais bandas contidas nos espectros dos ligantes e dos seus respectivos complexos.

Figura 32. Sobreposição dos espectros na região do IV do ligante L4S e do complexo C4S.

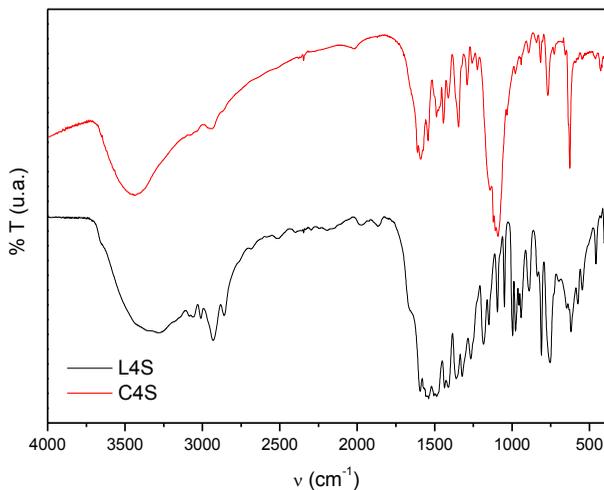


Tabela 8. Principais bandas e atribuições, em cm^{-1} dos espectros na região do IV para o ligante L4S e o complexo C4S.

Banda	L4S	C4S
ν (O-H)	3313	3441
ν (C-H _{ar} e C-H _{alif})	3079-2850	3074-2939
ν (C=C)	1591	1592
ν (C=N)	1495	1491
ν (C-N)	1319	1286
ν (Cl-O)	-	1089
δ (C-H _{ar})	753	767

Figura 33. Sobreposição dos espectros na região do IV do ligante L4P e do complexo C4P.

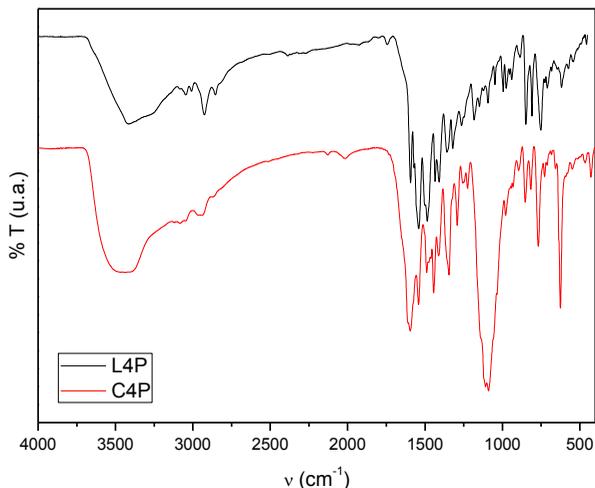


Tabela 9. Principais bandas e atribuições, em cm^{-1} dos espectros na região do IV para o ligante L4P e o complexo C4P.

Banda	L4P	C4P
$\nu(\text{O-H})$	3402	3444
$\nu(\text{C-H}_{\text{ar}} \text{ e } \text{C-H}_{\text{alif}})$	3045-2855	3122-2865
$\nu(\text{C=C})$	1595- 1542	1600 - 1539
$\nu(\text{C=N})$	1542; 1485	1540; 1482
$\nu(\text{C-N})$	1322	1286
$\nu(\text{Cl-O})$	-	1089
$\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$	748	766

4.2.2. Espectroscopia Eletrônica na Região do UV-Vis

A espectroscopia na região do UV-Vis elucidou questões referentes aos tipos de transições eletrônicas apresentadas pelos complexos nesta região.

O íon cobre(II) possui configuração eletrônica d^9 , que o faz ser paramagnético e possuir bandas características de transições eletrônicas de transferência de carga ligante-metal (TCLM) permitidas por simetria, em comprimentos de onda menores que 400 nm e transições d-d proibidas por simetria, geralmente entre 700 a 600 nm, motivo que explica a coloração azul ou verde escuro de muitos complexos deste tipo (ROMANOWSKI; MANGRICH; NEVES, 2001).

Os complexos de cobre(II) em particular possuem uma característica geométrica importante que é a distorção Jahn-Teller. A geometria deste íon varia de acordo com o ambiente de coordenação. Comumente são descritos complexos octaédricos distorcidos, devido à alta energia dos orbitais que possuem mais contribuição energética nos eixos x e y, por possuírem mais elétrons. Assim, os orbitais dependentes do eixo z reduzem sua energia, o que faz com que as coordenações com estes orbitais sejam mais fracas, alongando desta forma, os comprimentos de ligação ao longo deste eixo (COMBA, ZIMMER; 1994).

O complexo C4S apresentou duas bandas principais (Figura 34); uma de caráter interno d-d, que é característica de complexos de Cu(II) e que é proibida por simetria de orbitais, situada em 632 nm, com $\epsilon = 134 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; e outra em 365nm, com $\epsilon = 1470 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e que pode ser atribuída a transferência de carga da(s) ponte(s) μ -metoxo/ μ -OH ao centro metálico, já que este ligante não possui bandas de transferência de carga nesta região (OLIVEIRA, 2013).

Por sua vez, o complexo C4P, além de apresentar a banda de transição interna d-d em 625 nm ($\epsilon = 168 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), também mostrou um conjunto de três bandas que são atribuídas a unidade pireno, localizadas em 342, 325 e 311 nm, que possuem coeficientes de absorção molar respectivamente de 70760, 47770 e 21480 $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Figura 35). Este resultado é mais um indicativo de que, além do ligante já ter sido devidamente caracterizado, o complexo contém a unidade pirênica e mantém sua estrutura em solução. Já as pontes μ -hidroxo não são claramente observadas no complexo C4P justamente pela sobreposição das bandas do pireno na mesma região, além de seus coeficientes de absorção molar serem muito distintos.

Pela rigidez da própria estrutura idealizada e pelos valores de ϵ obtidos no UV-Vis, podemos inferir que ambos complexos

tendem a ter sua geometria de pirâmide de base quadrada mantida em solução, o que concorda com a estrutura de Raios X, que será posteriormente discutida.

Figura 34. Espectros na região do UV-Vis do complexo C4S em MeOH, nas concentrações de A) 1×10^{-2} mol.L⁻¹ B) 1×10^{-3} mol.L⁻¹.

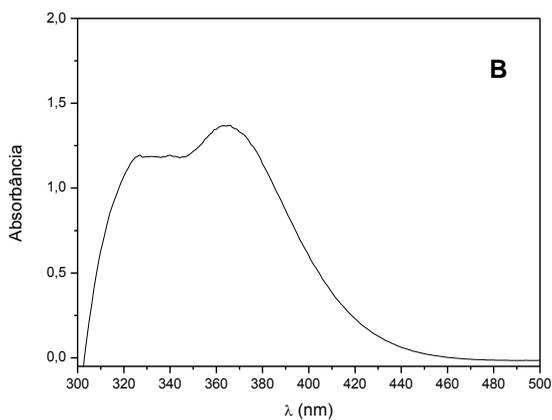
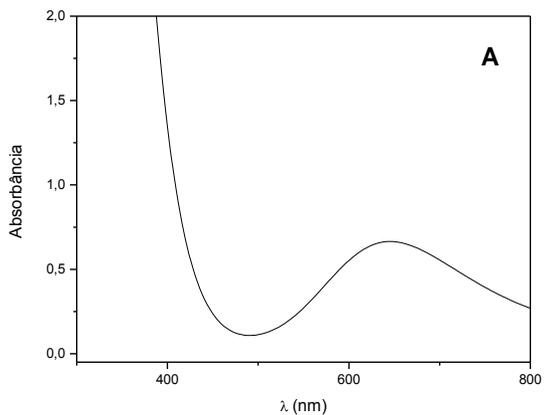
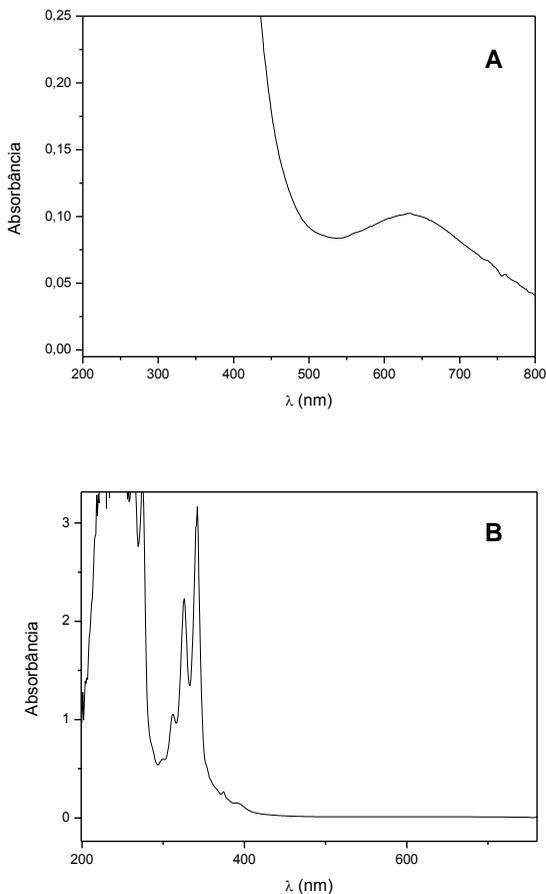


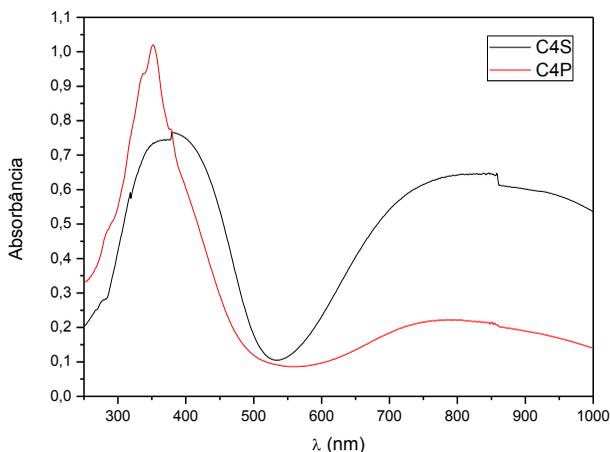
Figura 35. Espectros na região do UV-Vis do complexo C4P em MeOH, nas concentrações de A) 1×10^{-2} mol.L⁻¹ B) 1×10^{-3} mol.L⁻¹.



A espectroscopia na região do UV-Visível também foi realizada em estado sólido para os complexos C4S e C4P (Figura 36). De forma qualitativa, pode-se observar que ambos complexos apresentaram um deslocamento batocrômico significativo em suas bandas de transição d-d, sugerindo que em estado sólido, os sítios de cobre não estão coordenados em uma

de suas posições axiais. Porém, no complexo C4S, mesmo em estado sólido, observa-se a presença da banda relativa às pontes, que indicam ser μ -metoxo.

Figura 36. Espectros na região do UV-Vis em estado sólido dos complexos C4P e C4S em pastilha de KBr.

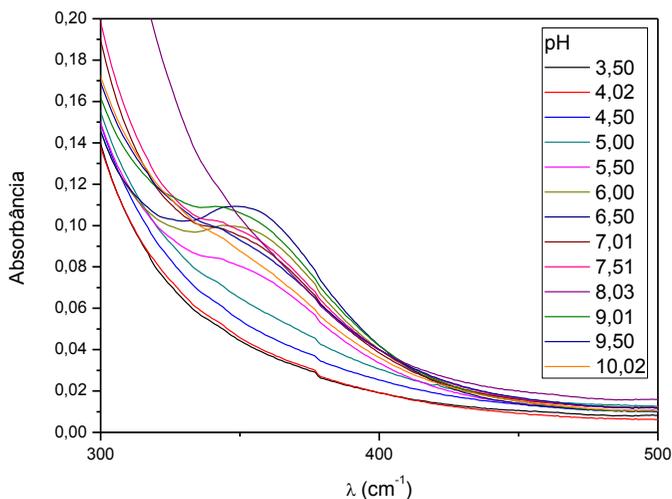


A titulação espectrofotométrica do complexo C4S confirmou a natureza da banda de transferência de carga em 365nm (Figura 32): em pHs mais baixos, não há a presença desta banda. Com o aumento progressivo do pH em meio tamponado, verifica-se o surgimento desta banda até pH 6,5, onde atinge seu valor máximo de absorvância. Após, há um decaimento desta banda, que pode ser explicado conjuntamente com a titulação potenciométrica, onde a partir deste pH, a porcentagem da espécie mono μ -hidroxo no meio começa a diminuir, dando lugar a espécie bis μ -hidroxo, que por envolver transferências de carga de maior energia, pode se situar numa região próxima ao Ultravioleta, cuja bandas não conseguiram ser detectadas.

Esta banda se desloca ligeiramente se comparada ao espectro em CH_3CN pura, pelo fato da presença do tampão em meio aquoso, que por sua vez, auxilia na formação da(s) ponte(s) μ -hidroxo e, conseqüentemente, em sua detecção. A Figura 37 mostra os espectros obtidos do complexo C4S em diferentes

pHs. Como o experimento foi realizado em meio aquoso, esta banda passa a ser relativa a pontes μ -hidroxo, pelo fato da força do campo ligante ser maior para um hidróxido que para um metóxido.

Figura 37. Espectros na região do UV-Vis para o complexo C4S em CH_3CN /tampão aquoso (50/50% v/v) em pHs de 3,50 a 10,02 a 25 °C.



4.2.3. Espectrometria de massas

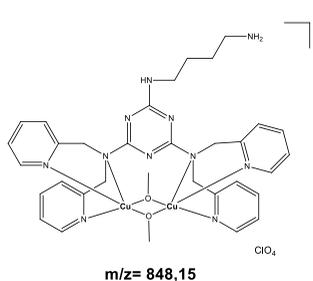
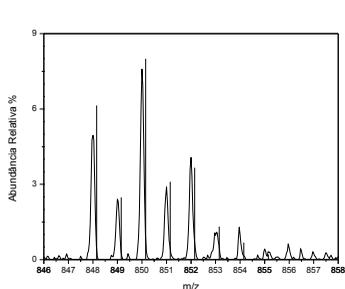
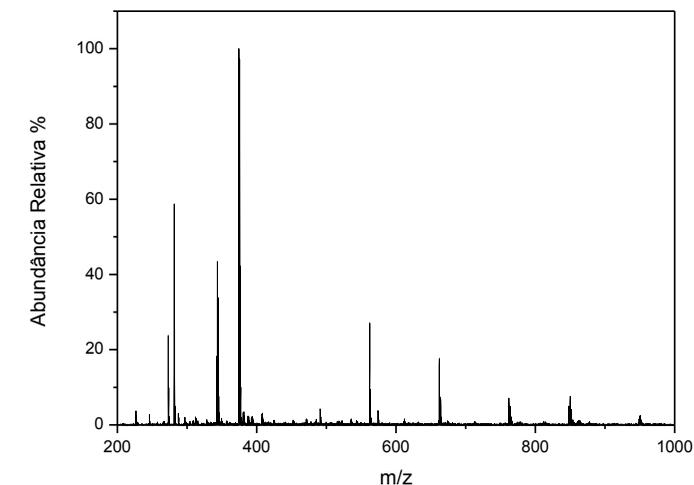
Os espectros de massa dos complexos revelaram que ambos complexos C4S e C4P não se mantêm em sua estrutura original e acabam se fragmentando com o bombardeamento dos elétrons, impossibilitando a existência de seus íons moleculares. Pela complexidade estrutural e estabilidade dos compostos nas condições de análises, muitos fragmentos não foram caracterizados.

No espectro do complexo C4S tem-se a presença de espécies com pontes μ -metoxo, formadas pela presença do MeOH na análise ($m/z= 848$ e 379). Também foram detectados fragmentos do ligante L4S protonado sem nenhum perclorato ($M+1$, $m/z=562$), com carga $2+$ e com um ânion perclorato e com carga $3+$ com dois ânions percloratos.

Para o complexo C4P, foram detectados alguns fragmentos semelhantes aos encontrados para o complexo C4S, com e sem ânion perclorato. Um dos fragmentos importantes encontrados é o da unidade pirenocarbonil ($m/z=215$), que mais uma vez corrobora com o sucesso da síntese deste complexo.

As Figuras 38 e 39 mostram os espectros de massa dos complexos sintetizados, bem como propostas estruturais para alguns fragmentos encontrados, com seus perfis isotópicos simulados.

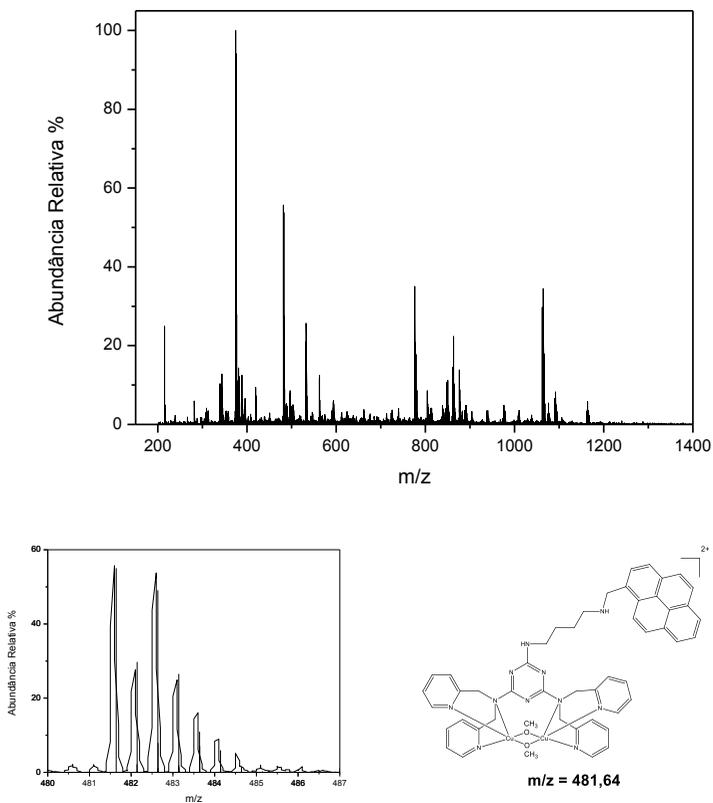
Figura 38. Espectro de massas do complexo C4S em MeOH e seus principais fragmentos.



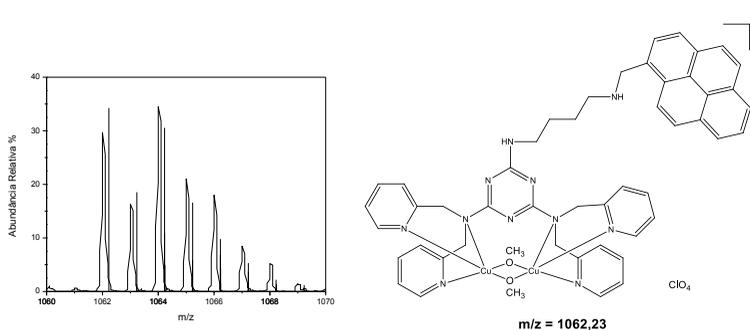
Continua na pág. 84



Figura 39. Espectro de massas do complexo C4P em MeOH e seus principais fragmentos.



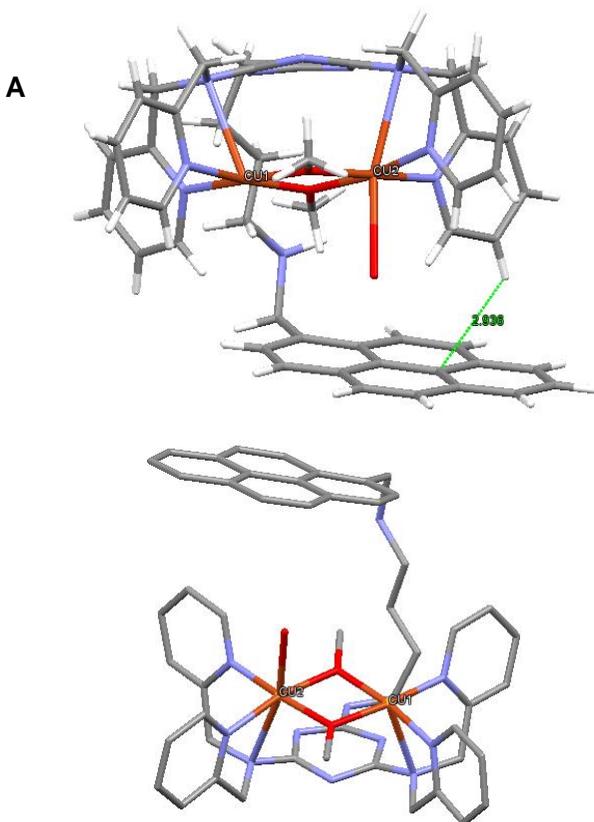
Continua na pág. 85



4.2.4. Difração de Raios X

A difração de Raios X não revelou dados suficientes para discussão em relação a comprimentos e ângulos de ligação, pelo motivo do cristal do complexo C4P não ser totalmente adequado para a coleta dos dados. Mas, pela estrutura parcial, demonstrada pela Figura 40, pode-se perceber que existe uma interação da unidade pirênica com apenas uma das piridinas localizadas em um dos lados do complexo. As distâncias médias do pireno aos sítios de cobre simuladas pelo programa Mercury revelam uma disparidade, mostrando que, possivelmente, um dos sítios é mais afetado por esta interação. Supõe-se a partir de então, que um dos cobres possui uma densidade eletrônica maior devido à presença do pireno. Esta suposição será reforçada na discussão dos resultados eletroquímicos. Pela estrutura, pelos valores obtidos na espectroscopia de UV-Vis e por diversos complexos binucleares de cobre(II) com primeira esfera de coordenação semelhante aos dos compostos sintetizados, pode-se também inferir que ambos os cobres(II) possuem uma geometria de pirâmide de base quadrada ou octaédrica, dependendo da presença e da coordenação de moléculas do solvente.

Figura 40. Estrutura parcialmente obtida do complexo C4P A) com B) sem os átomos de hidrogênio, para fins de clareza.



4.2.5. Eletroquímica

Os estudos eletroquímicos envolvendo os complexos C4S e C4P revelaram dados importante acerca dos centros metálicos de cobre(II) (Figuras 41 e 42).

Pela voltametria cíclica, no complexo C4S, há a presença de dois processos *quasi-reversíveis* relativos à oxi-reduções do par $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$, com potenciais de $E_{1/2} = -729$ mV e $E_{1/2} = +128$ mV vs. ENH, revelando desde já, a diferença entre os dois centros de cobre. Isto pode ser devido ao fato da inserção do ligante

butanodiamina, que pode influenciar interagindo com um destes núcleos metálicos. Se comparado com o complexo reportado por Massoud (2011), a presença de dois processos ao invés de apenas um, e o grande aumento da diferença entre os potenciais dos cobres também reforça esta hipótese.

No complexo C4P, esta diferença é ainda mais marcante, com processos reversíveis em $E_{1/2} = -711$ mV e $E'_{1/2} = +198$ mV vs. ENH. Pode-se perceber que a reversibilidade dos processos anódicos é favorecida indicando que a presença da unidade pireno retira elétrons de um dos sítios nitrogenados piridínicos, diminuindo a densidade eletrônica sobre um dos centros de Cu(II) e dessa forma aumentando o potencial de redução Cu^{II}/Cu^I.

Figura 41. Voltamogramas cíclicos do complexo C4S em MeOH (0,1 mol L⁻¹ em NaClO₄) a 25°C, com velocidades de varredura de 25 a 300 mV.s⁻¹ no pH de dissolução (pH ~ 5,0). Os potenciais estão representados *versus* ENH. [C4S] = 2 x 10⁻³ mol.L⁻¹.

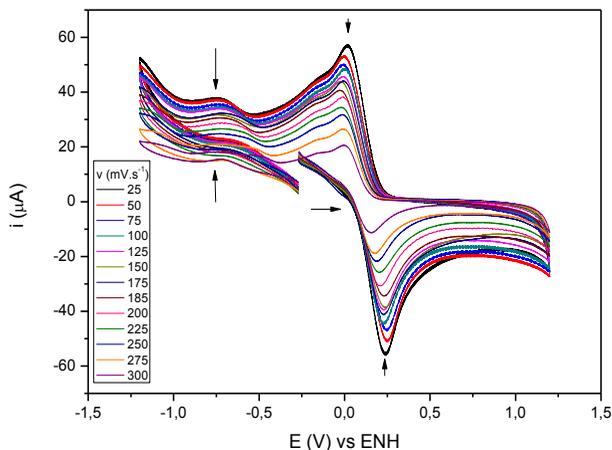
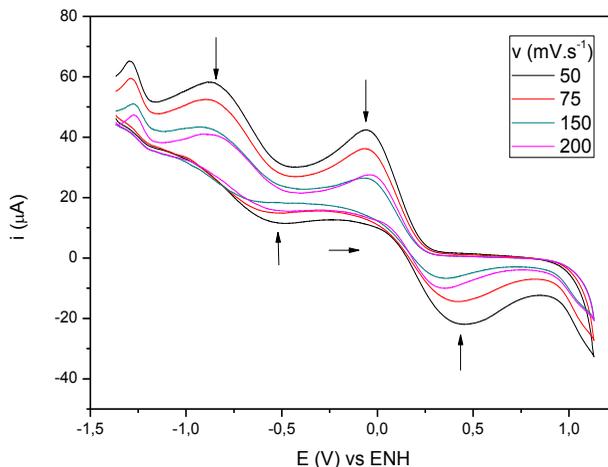


Figura 42. Voltamogramas cíclicos do complexo C4P em MeOH (0,1 mol L⁻¹ em NaClO₄) a 25°C, com velocidades de varredura de 50 a 200 mV.s⁻¹ no pH de dissolução (pH ~ 5,0). Os potenciais estão representados *versus* ENH. [C4P] = 2 x 10⁻³ mol.L⁻¹.



4.2.6. Condutimetria

A condutimetria em solução dos dois complexos foi realizada em solução de CH₃CN, em concentração de 1x10⁻³ mol.L⁻¹, por questões de solubilidade. Comparando os dados obtidos com a literatura (GEARY, 1971), conclui-se que o complexo C4P neste solvente, apresenta 2 equivalentes de íons positivos por molécula de complexo, inferindo a presença de 2 contra-íons perclorato, com um valor de $\Lambda_m = 178 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. O complexo C4S apresentou um valor intermediário de $\Lambda_m = 314 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, possibilitando a presença de 2 ou 3 contra-íons. Para averiguação, a mesma medida foi realizada em mistura MeOH/DMF (99:1). Comparando o valor de $\Lambda_m = 194 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ com a faixa teórica para MeOH puro, sugere-se a presença de apenas 2 contra-íons perclorato, assim como no complexo C4P.

Vale ressaltar que devido à protonação e/ou desprotonação dos ligantes presentes nos complexos, é

esperado que o valor da condutância seja variável entre 2 e 3 equivalentes de contra-íons por molécula de complexo.

4.2.7. Fluorescência

Os espectros de fluorescência do complexo C4P em diferentes concentrações mostraram uma banda de emissão em 516 nm referente ao excímero da unidade pireno (Figura 43) e um conjunto de bandas em 350 nm atribuídas ao monômero (Figura 44) (LEE *et al.*, 2010). É reportada na literatura a existência destas espécies, devido a sua capacidade de formar interações π -stacking entre si e/ou entre diferentes moléculas. Em solução, a diminuição da concentração do complexo diminuiu a intensidade fluorescente, o que indica que a formação deste excímero é intermolecular, ou seja, existe a dependência de um número maior de moléculas com a unidade pireno para a formação desta espécie, diferentemente como ocorrem em outros complexos já sintetizados pelo grupo (OSÓRIO, 2012). O ligante L4P possui intensidade fluorescente maior que a do complexo C4P, e o complexo C4S, não apresenta fluorescência nestes comprimentos de onda.

Figura 43. Espectros de fluorescência do complexo C4P em diferentes concentrações. $\lambda_{exc.} = 426$ nm e Janela = 10 nm.

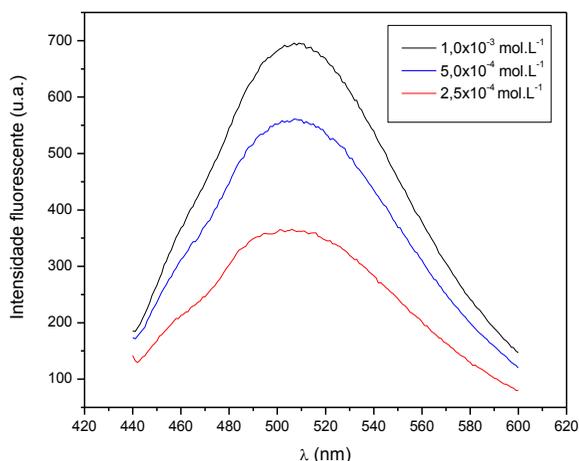
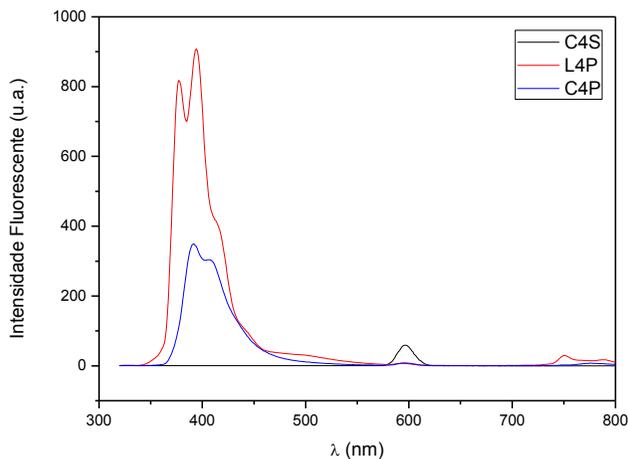


Figura 44. Espectros de fluorescência do ligante L4P e dos complexos C4S e C4P, em concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.



4.2.8. Titulação Potenciométrica

Os estudos potenciométricos foram realizados apenas para o ligante L4S e o complexo C4S *in situ*, em meio DMSO/H₂O (50/50% v/v), pois em outras tentativas de solventes, algumas espécies, principalmente em pHs mais altos, precipitavam, impossibilitando o tratamento adequado dos dados obtidos.

O ligante L4S apresentou 3 pKas: dois relativos a desprotonações de hidrogênios piridínicos, ($pK_{a1} = 3,59$ e $pK_{a2} = 4,82$) e outro relacionado a desprotonação do grupo $-NH_2$ externo ao grupo butanodiamina substituído no anel triazínico ($pK_{a3} = 10,12$). Estes valores estão condizentes com valores obtidos para complexos muito similares já descritos na literatura (OLIVEIRA, 2013; BARANYAI et al., 2012). O gráfico de distribuição de espécies para o ligante L4S segue descrito pela Figura 45 e seus valores de $\log\beta$ seguem na Tabela 10.

Figura 45. Gráfico de distribuição de espécies para o ligante L4S em função do pH com força iônica de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ KCl à 25°C .

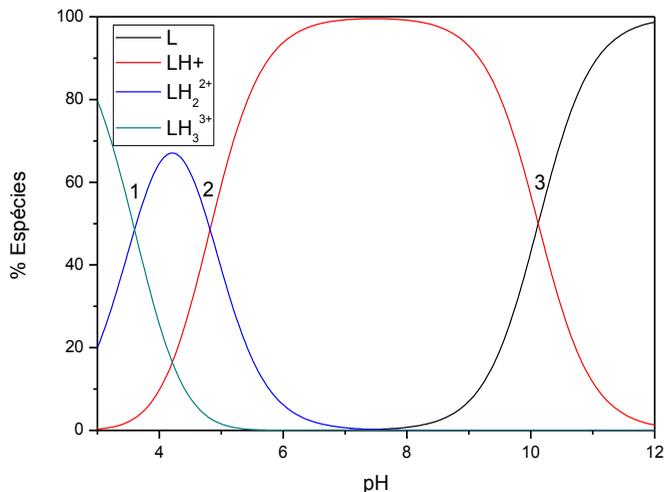


Tabela 10. $\text{Log}\beta$ determinado para o ligante L4S *in situ* determinados utilizando $0,1 \text{ M}$ KCl em DMSO/ H_2O 50:50 v/v à 25°C .

Equilíbrio	$\text{Log}\beta$
$\text{L} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{HL}^+$	10,12
$\text{HL}^+ + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{H}_2\text{L}^{2+}$	14,94
$\text{H}_2\text{L}^{2+} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{H}_3\text{L}^{3+}$	18,54

Para um tratamento mais adequado dos dados, o complexo C4S foi titulado *in situ*, através das medidas potenciométricas do ligante L4S na presença de 1 e também 2 equivalentes de cobre(II), com o intuito de averiguar a presença de metal livre em solução e também espécies mononucleares, diferentes das propostas até então. Através destes experimentos, verificou-se 5 valores de pKas, mostrados pela tabela 11. O gráfico com a distribuição de todas as espécies contidas neste sistema segue na Figura 46. Destaca-se, dentre estes, os dois pKas referentes às pontes μ -hidroxo (pKa2 e pKa3) já caracterizadas pela titulação espectrofotométrica (Seção 4.2.2.), que estão acima da faixa proposta por Motekaitis (1983) para

complexos de cobre(II), cuja proposição se dá pela presença da amina que pode, de certa forma, contribuir de forma eletrostática na acidez do sistema. Mesmo tendo valores de $\log\beta$ semelhantes a complexos mononucleares de cobre(II) já estudados, não foi verificada a presença significativa destas espécies em solução, confirmando a hipótese do complexo realmente ser binuclear (YANG; ZOMPA, 1973; ROMBA, 2006). A semelhança entre as constantes pode ser devida à baixas constantes de formação apresentadas por complexos triazínicos, adicionado ao efeito Jahn-Teller pronunciado, assim descrito por Oliveira (2013). Comparando os resultados obtidos neste trabalho, podemos verificar que a espécie $[\text{LCu}_2\text{H}_{-1}]^{3+}$, com uma ponte, possui porcentagens maiores que as obtidas por Oliveira e isto será um dado importante na discussão dos resultados cinéticos obtidos. Os valores de $\log\beta$ obtidos para o complexo C4S seguem descritos pela Tabela 12.

Figura 46. Gráfico de distribuição de espécies para o complexo C4S em função do pH com força iônica de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ KCl à 25°C .

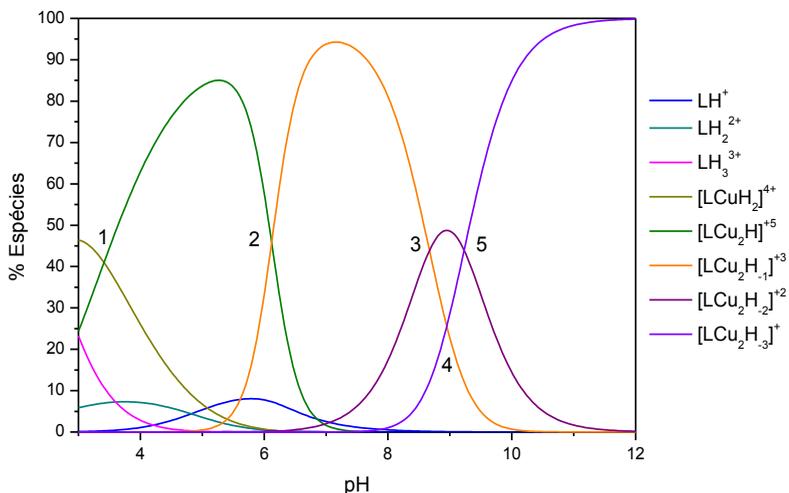


Tabela 11. Valores de pKas potenciométricos para o complexo C4S.

pKa	1	2	3	4	5
	3,41	6,12	8,67	8,95	9,23

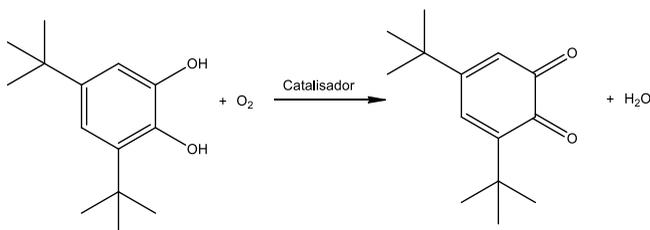
Tabela 12. $\text{Log}\beta$ determinado para o complexo C4S *in situ* determinados utilizando 0,1 M KCl em DMSO/H₂O 50:50 v/v à 25 °C.

Equilíbrio	$\text{Log}\beta$
$\text{L} + 2\text{Cu}^{2+} + \text{H}^+ \leftrightarrow [\text{LCu}_2\text{H}]^{5+}$	18,83
$\text{L} + \text{Cu}^{2+} + 2\text{H}^+ \leftrightarrow [\text{LCuH}_2]^{4+}$	18,82
$\text{L} + 2\text{Cu}^{2+} \leftrightarrow [\text{LCu}_2]^{4+}$	10,60
$\text{L} + \text{Cu}^{2+} + \text{H}^+ \leftrightarrow [\text{LCuH}]^{3+}$	9,87
$\text{L} + 2\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow [\text{LCu}_2\text{H}_{-1}]^{3+} + \text{H}^+$	6,68
$\text{L} + \text{Cu}^{2+} \leftrightarrow [\text{LCu}]^{2+} + \text{H}^+$	4,71
$\text{L} + 2\text{Cu}^{2+} + 2\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow [\text{LCu}_2\text{H}_{-2}]^{2+} + 2\text{H}^+$	-1,79
$\text{L} + \text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow [\text{LCuH}_{-1}]^+$	-4,60
$\text{L} + 2\text{Cu}^{2+} + 3\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow [\text{LCu}_2\text{H}_{-3}]^{2+} + 3\text{H}^+$	-11,05

4.2.9. Cinética de Oxidação do 3,5-DTBC

Como possíveis modelos da enzima catecol oxidase, avaliou-se o potencial oxidativo dos complexos C4S e C4P, utilizando o substrato modelo 3,5-di-*terc*-butilcatecol (3,5-DTBC), que tem como produto a 3,5-di-*terc*-butilquinona (3,5-DTBQ), segundo a reação da Figura 47, e que em 400nm, possui um $\epsilon = 1570 \text{ L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Figura 47. Reação de oxidação do 3,5-DTBC na presença de O₂, formando 3,5-DTBQ e H₂O.



Primeiramente foram realizados estudos de otimização do pH, para averiguar em qual pH a reação acontecia de maneira mais favorável. Inicialmente, utilizando um espectrofotômetro convencional, foi detectado que não seria possível coletar as velocidades iniciais, visto que a reação acontecia de forma muito rápida. A partir de então, todos os estudos cinéticos foram feitos em um espectrômetro de parada de fluxo (*stopped-flow*), que permitiu a avaliação imediata e rápida dos produtos formados.

Todos os valores obtidos para V_o , e conseqüentemente para k_{obs} foram obtidos descontando o valor encontrado para a reação com catalisador da reação sem catalisador (auto-oxidação). Estes resultados indicam que no pH ótimo existe uma espécie que possui a atividade catalítica mais alta entre todas e, portanto, será o pH utilizado para os demais estudos.

As curvas de efeitos de pH, em forma de sino para os complexos C4S e C4P, indicaram o valor de pH ótimo igual a 6,5, onde se espera que ambos complexos tenham uma ponte μ -hidroxo e uma água terminal, assim como diversos complexos já publicados e que possuem este mesmo perfil de atividade catalítica *versus* pH frente a este mesmo substrato (OLIVEIRA, 2013) (Figura 48). Infelizmente, não foi possível ajustar de forma adequada os valores de pH *versus* k_{obs} e, dessa forma, apenas valores de pKas aproximados para o complexo C4S de 5,71 e 6,84, e de 5,73 e 6,86 para o complexo C4P foram obtidos. Na verdade, tais pKas são muito similares quando comparados entre si, mas diferem significativamente com os valores de pKa obtidos na potenciometria para o pKa3, como mostra a tabela 13. Isto inicialmente sugere que as substituições sintéticas realizadas para os complexos C4S e C4P não afetaram no sítio ativo no que diz respeito à cinética da reação.

Relacionando com a potenciometria, podemos inferir a espécie mais ativa como sendo a que contém dois centros de cobre e apenas uma ponte μ -hidroxo. Espera-se que esta seja a espécie mais ativa, pois o pKa da segunda ponte é mais alto, o que favorece a formação de uma água terminal em seu lugar, fazendo com que um dos cobres esteja disponível para coordenar-se a um dos oxigênios do substrato catecol e sendo assim, iniciar o ciclo catalítico. Não se despreza aqui, a atividade do complexo com duas pontes do tipo μ -OH, haja vista que a atividade catalítica não tende a zero com o aumento do pH.

Figura 48. Gráfico de k_{obs} em função do pH para a reação de oxidação do substrato 3,5-DTBC catalisada pelos complexos A) C4S B) C4P em MeOH/H₂O (1:1) à 25°C nas seguintes condições: $[C]_{\text{final}} = 5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; $[3,5\text{-DTBC}]_{\text{final}} = 8 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{tampões}]_{\text{final}} = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ sem força iônica.

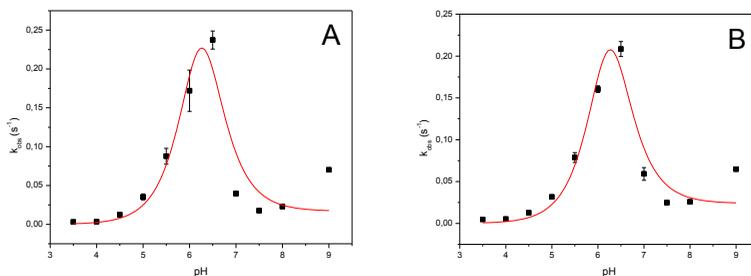


Tabela 13. Valores dos pKas2 e 3 encontrados para os complexos C4S e C4P pelas análises potenciométricas e cinéticas.

Complexo	Método	pKa2	pKa3
		(1ª ponte)	(2ª ponte)
C4S	Potenciométrico	6,12	8,67
	Cinético	5,71	6,84
C4P	Cinético	5,73	6,86

Os resultados do efeito da concentração do substrato neste pH ótimo, mostraram que o complexo C4S tem eficiência catalítica maior que o seu análogo já publicado (C_{Cl}) (Figura 49). E o complexo C4P se mostrou ainda melhor. Um fato importante é o da constante cinética se manter praticamente intacta, demonstrando que não há mudanças significativas no sítio ativo dos modelos estudados, o que já era esperado, visto que o ambiente de primeira esfera não foi modificado até então. Já a constante de Michaelis-Menten, de caráter termodinâmico, foi diminuída, com o acréscimo primeiramente do grupo butanodiamina, e em seguida com a inserção do grupo pireno. Isto reforça a ideia inicial de aumentar o número de interações para que a entropia do sistema diminua, aumentando a eficiência catalítica para este tipo de reação. O complexo C4P chega a

atuar 0,18% como a sua enzima de interesse, a catecol oxidase, um valor excelente para um composto sintético, o que faz com que este complexo tenha um interesse maior sob o ponto de vista catalítico na oxidação de catecóis. A Tabela 14 mostra os valores das constantes catalíticas observadas para os complexos C_{Cl}, C_{4S}, C_{4P} e outros complexos semelhantes já estudados.

Figura 49. Gráfico de k_{obs} em função da concentração do substrato para a reação de hidrólise do 3,5-DTBC em pH = 6,49, catalisada pelo complexos A) C_{4S} B) C_{4P} em MeOH/H₂O (1:1) à 25°C nas seguintes condições: $[C]_{final} = 5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; $[3,5\text{-DTBC}]_{final} = 6 \times 10^{-5}$ a $1,8 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{tampões}] = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ sem força iônica.

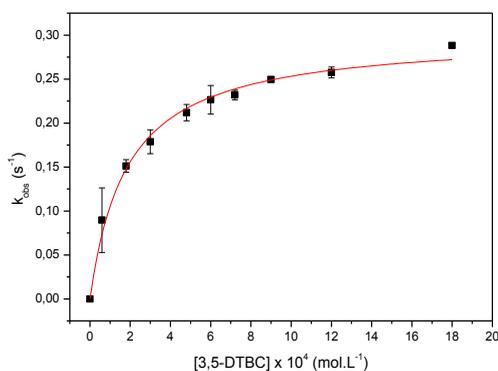
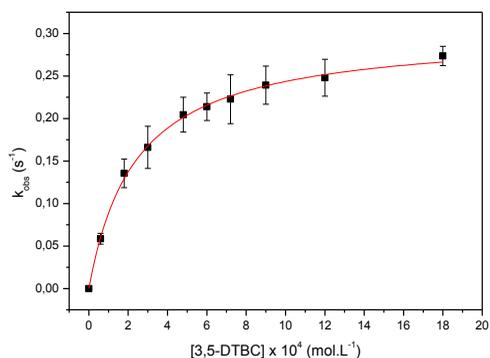
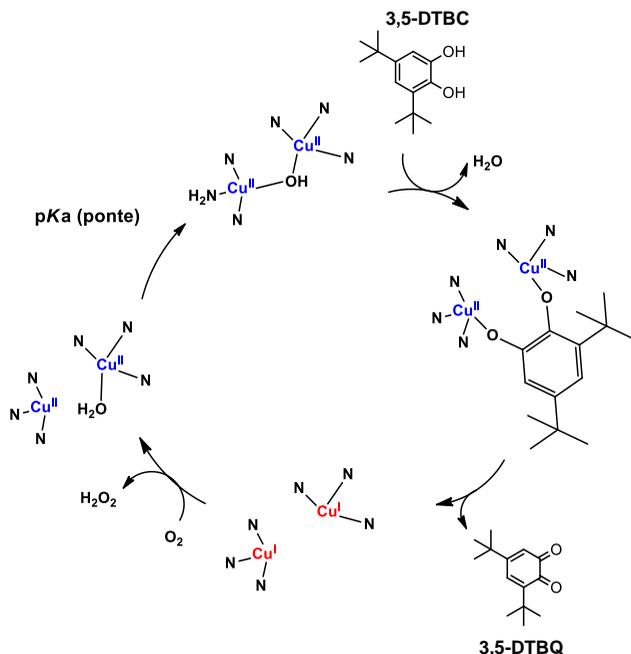


Tabela 14. Comparação dos parâmetros cinéticos de alguns complexos selecionados e da catecol oxidase da *Pomroea batatas*. Ref.: ^a(EICKEN, ZIPPEL, *et al.*, 1998); ^b(OSÓRIO, 2007); ^c(OLIVEIRA, 2013).

	$V_o \text{ max}$ ($\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	K_{cat} (s^{-1})	K_m (mol.L^{-1})	K_{ass} (L.mol^{-1})	$E = K_{\text{cat}}/K_m$ ($\text{L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
Catecol Oxidase^a	-	2293,0	$2,5 \times 10^{-3}$	400	$9,17 \times 10^5$
1^b	$5,58 \times 10^{-7}$	0,023	$2,66 \times 10^{-3}$	375,23	8,75
2^b	$9,89 \times 10^{-7}$	0,041	$6,38 \times 10^{-3}$	156,74	6,45
CcI^c	$2,55 \times 10^{-5}$	0,51	$1,6 \times 10^{-3}$	625	312,5
C4S	$(1,51 \pm 0,02) \times 10^{-5}$	$0,302 \pm 0,004$	$(2,045 \pm 0,127) \times 10^{-4}$	4890 ± 303	1255 ± 326
C4P	$(1,50 \pm 0,02) \times 10^{-5}$	$0,300 \pm 0,004$	$(1,849 \pm 0,211) \times 10^{-4}$	5408 ± 617	1622 ± 583

Para fins de esclarecimento do mecanismo desempenhado pelo complexo na oxidação do substrato 3,5-DTBC, foi realizado um teste de detecção de peróxido. Diferentemente do mecanismo proposto por Solomon (1996) para a enzima catecol oxidase, não há liberação de H_2O mas sim de H_2O_2 , (Figura 50). O teste foi positivo para a presença de H_2O_2 , que foi confirmado pela reação com iodeto gerando I_3^- (Neves, Rossi *et al.*, 2002), de forma que a oxidação dos complexos ocorra seguindo a estequiometria $3,5\text{-DTBC} + \text{O}_2 \rightarrow 3,5\text{-DTBQ} + \text{H}_2\text{O}_2$ e o mecanismo proposto segue conforme Figura 41, onde uma molécula de quinona é gerada com 1 equivalente de O_2 . Dessa forma, a formação de um peroxo-complexo como possível intermediário deve ser excluída, sendo que a presença de O_2 se restringe a um agente oxidante no processo $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{I}} \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$ e formação de H_2O_2 .

Figura 50. Proposta de mecanismo de oxidação do 3,5-DTBC pelos complexos C4S e C4P.



A cinética das reações de ambos os complexos sob atmosfera de argônio não tiveram seus dados apropriadamente

refinados, mas apresentaram valores muito menores de absorbância no mesmo tempo medido, mais uma vez provando a importância do oxigênio no ciclo catalítico. E a mesma reação, sem a presença de água, apenas em meio metanólico, apresentou valores semelhantes aos obtidos em meio aquoso, indicando dessa forma que a ponte $\mu\text{-OH}$ ou $\mu\text{-OCH}_3$ entre os centros de Cu^{II} não influenciam na atividade catalítica do sistema.

Portanto, estes complexos podem ser considerados ótimos modelos funcionais e estruturais para a enzima catecol oxidase, considerando principalmente que, os valores das constantes catalíticas obtidas, estão entre os mais efetivos já reportadas na literatura. Também analisando os valores de $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (eficiência catalítica), observou-se que existe uma melhora significativa na catálise quando se inserem novos grupos funcionais no complexo (1,4-butanodiamina e pireno) com este intuito. Vale ressaltar que estas inserções diminuem significativamente os valores da constante de Michaelis, favorecendo portanto, a associação do substrato ao catalisador. Na verdade, estes experimentos comprovam o efeito e a importância da segunda esfera de coordenação para este tipo de reação. Aparentemente, o grupamento 1,4-butanodiamina ancorado na triazina é o principal responsável pelo significativo aumento na associação do substrato ao catalisador, uma vez que o valor de K_{ass} é apenas um pouco maior para o complexo C4P quando comparado com C4S. Uma explicação plausível para tal observação pode estar associada ao efeito eletrostático exercido pela grupamento -NH_3^+ no 1,4-butanodiamina, o qual estaria contribuindo com a interação do substrato 3,5-DTBC e assim facilitando a coordenação do mesmo aos dois centros de $\text{Cu}(\text{II})$.

4.2.10. Testes de clivagem de DNA plasmidial

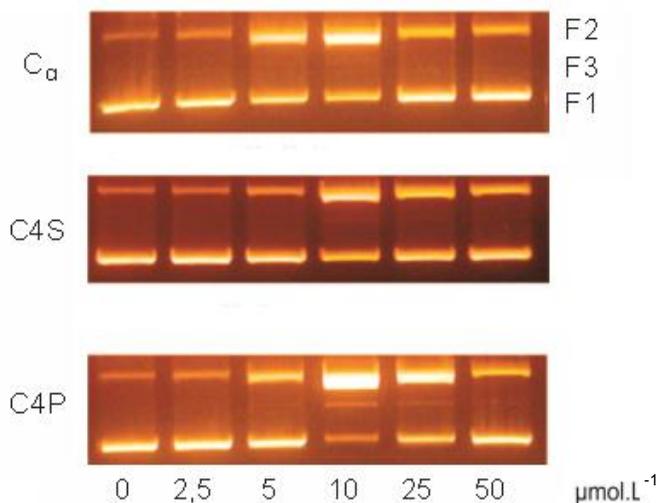
Sendo ativos na oxidação do substrato modelo 3,5-DTBC e obtendo valores altos das constantes catalíticas, decidiu-se testar a atividade dos complexos C_{Cl} , C4S e C4P frente a clivagem do DNA de plasmídeos superenovelados. Foram capturadas fotos em gel de agarose, dos fragmentos clivados pelos complexos e separados por eletroforese.

Segundo as fotos dos géis de agarose apresentadas na Figura 51, podemos observar que o complexo C_{Cl} cliva o DNA plasmidial até sua forma desenovelada (F2), enquanto que o

complexo C4S é um pouco menos ativo nesta clivagem, necessitando de concentração um pouco maior do complexo para que tal processo ocorra. Por outro lado, o complexo C4P chega a clivar até a forma linear do DNA (forma F3), mostrando que a inserção do intercalante pireno tem uma função muito importante no mecanismo de clivagem, além de apresentar propriedades fluorescentes as quais poderão ser utilizadas em trabalhos futuros como sondas de detecção.

Estudos mais detalhados envolvendo outras técnicas tais como fluorescência, ESI-MS e dicroísmo circular na clivagem do DNA através dos complexos C4S e C4P estão sendo realizados no CEBIME em colaboração com o Prof. Dr. Hernán Terenzi e serão objeto de publicações futuras.

Figura 51. Eletroforese em gel de agarose para clivagem do DNA plasmidial pelos complexos C_{Cl} , C4S e C4P em diferentes concentrações, em tampão $[10 \text{ mmol.L}^{-1}]$ HEPES (pH 7). DNA (330ng) + Complexos nas concentrações de 0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Incubação: 24h a 37 °C.



5. CONCLUSÕES

O pró-ligante bpma, e os ligantes L_{Cl}, L4S e L4P foram sintetizados com rendimentos satisfatórios e caracterizados por técnicas espectroscópicas de IV, RMN de ¹H e de ¹³C, as quais demonstraram bandas e picos condizentes com as estruturas propostas, além da obtenção dos mesmos com graus de pureza adequados para suas utilizações nas etapas seguintes bem como para as reações de complexação. A espectrometria de massa forneceu sinais de íons moleculares dos ligantes L4S e L4P protonados.

Foram sintetizados dois novos complexos de cobre(II) com os ligantes L4S e L4P. Estes foram caracterizados por análises espectroscópicas e eletroquímicas. Os complexos binucleares obtidos, apresentaram dois íons cobre coordenados a uma unidade dos ligantes, além de duas pontes μ -hidroxo ou μ -metoxo, dependendo do meio de solvatação, em geometria de pirâmide de base quadrada, conforme a difração parcial de raios X. As técnicas de IV e de espectrometria de massa demonstraram a pureza das amostras;

A espectroscopia na região do UV-Vis demonstrou a presença de duas bandas características para ambos complexos: uma d-d (na região de 625 nm) e outra de transferência de carga (na região de 365nm para o complexo C4S), que segundo a titulação espectrofotométrica, foi caracterizada como relativa a presença das pontes exógenas μ -hidroxo ou μ -metoxo. Já a eletroquímica confirmou que os centros de cobre(II) em ambos os complexos (C4S e C4P), são muito semelhantes eletronicamente, fato comprovado pelos valores de $E_{1/2}$ obtidos.

Os complexos se mostraram muito ativos frente a oxidação do substrato modelo 3,5-DTBC, obtendo valores de eficiência catalítica de $1255 \pm 326 \text{ L.mol.s}^{-1}$ para o complexo C4S e de $1622 \pm 583 \text{ L.mol.s}^{-1}$ para o complexo C4P. A inserção das unidades de 1,4-butanodiamina e do pireno potencializaram a eficiência catalítica do sistema, se comparados com complexos semelhantes já descritos pela literatura.

Estudos preliminares mostraram que ambos os complexos também foram ativos na clivagem do DNA plasmidial, em baixas concentrações de complexo, dando destaque para o

complexo C4P que possui maior potencial de clivagem que os outros complexos.

Verificou-se a relevância da presença do intercalante pireno tanto na oxidação do modelo 3,5-DTBC quanto na clivagem do DNA plasmidial, onde observou-se um acréscimo nas eficiências em ambos os casos, devido à esta inserção.

6. REFERÊNCIAS

ALTOMARE, A., et al. SIR97: a new tool for crystal structure determination and refinement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 32, p. 115-119, 1999.

AMANN, N.; PANDURSKI, E.; FIEBIG, T.; WAGENKNECHT, H. A Model Nucleoside for Electron Injection into DNA: 5-Pyrenyl-2'-Deoxyribose. **Angewandte Chemie International Edition**, v.41, 2978-2980, 2002.

ATDBIO. Nucleic acid-drug interactions. Disponível em <http://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions>. Acesso em 24 fev. 2014.

BARANYAI, Z. et al. Equilibrium and NMR Relaxometric Studies on the s-Triazine-Based Heptadentate Ligand PTDITA Showing High Selectivity for Gd³⁺. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 2597-2607, 2012.

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

COMBA, P.; ZIMMER, M. Molecular Mechanics and the Jahn-Teller Effect. **Inorganic Chemistry**, New York, p. 5368-5369. 23 jun. 1994.

COWAN, J. A. **Inorganic Biochemistry – an introduction**. 2a Ed. New York: Ed. Wiley-VCH, 1993.

DeROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemical Reviews**, v.233–234, 351-371, 2002.

EICKEN, C., ZIPPEL, F., BÜLDT-KARENTZOPOULOS, K., KREBS, B. Biochemical and spectroscopic characterization of catechol oxidase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) containing a type-3 dicopper center, **FEBS Letters**, v. 436, p. 293-299, 1998.

FARRAUTO, R. J.; HECK, R. M. Environmental catalysis into the 21st century. **Catalysis Today**, v.55, n. 1-2, p. 179-187, 2000.

GAGNÉ, R. A.; KOVAL, CARL A.; LISENSKY, G. C. Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements. *Journal of the American Chemical Society*, New York, v. 19, p.2854-2855, 1980.

GEARY, W.J. Characterization of coordination compounds. **Coordination Chemical Reviews**, v.7, p. 81-122, 1971.

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

GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M.; et al. Copper-mediated DNA photocleavage by a tetrapyridoacridine (tpac) ligand. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 3286-3290, 2008.

JIANG, Q.; XIAO, N.; SHI, P.; ZHU, Y.; GUO, Z. Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. **Coordination Chemical Reviews**, v. 251, p.1951-1972; 2007.

JOHANNSEN, S.; et al. Solution structure of a DNA double helix with consecutive metal-mediated base pairs. **Nature Chemistry**, v.2, 229-234, 2010.

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

KAIZER, J., et al. Synthesis, structure and catecholase activity of dinuclear copper and zinc complexes with na N3-ligand. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 91, p. 190-198, 2002.

KLABUNDE, T.; EICKEN, C.; SACCHETTINI, J. C.; KREBS, B. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center, **Nature Structural Biology**, v. 5, p. 1084-1090, 1998.

KOVAL, I. A., GAMEZ, P., BELLE, C., SELMECZI, K., REEDJIK, J. Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies. **Chemical Society Reviews**, v.32, p.814-840, 2006.

KUMAR, N. Copper Deficiency Myelopathy (Human Swayback). **Mayo Clinic Proceedings**, v.81(10), p.1371-1384, 2006.

LEE, S.; NOH, Y.; SON, K.; NOH, D. Chromotropic ferrocenyl chalcone with two pyrenyl groups: Solvatochromism and molecular chemosensor for Fe(III)/Fe(II) ions. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 13, p.1343-1346, 2010.

MACRAE, C. F.; EDGINGTON, P. R.; MCCABE, P.; PIDCOCK, E.; SHIELDS, G. P.; TAYLOR, R.; TOWLER, M.; VAN DE STREEK, J. Mercury: visualization and analysis of crystal structures. **Journal of Applied Crystallography**, v.39, p.453-457, 2006.

MARLAPPAN, M.; MAIYA, B. G. Effects of Anthracene and Pyrene Units on the Interactions of Novel Polypyridylruthenium(II) Mixed-Ligand Complexes with DNA. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v.2005, p.2164-2173, 2005.

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

MASSOUD, S. S.; et al. DNA Cleavage by structurally characterized dinuclear copper(II) complexes based on triazine. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v.2011, p.3469-3479, 2011.

MCBAIN, S. C.; YIU, H. H. P.; EL HAJ, A.; DOBSON, J. Polyethyleneimine functionalized iron oxide nanoparticles as agents for DNA delivery and transfection. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, p. 2561-2565, 2007.

METCALFE, C.; THOMAS, J. A. Kinetically inert transition metal complexes that reversibly bind to DNA. **Coordination Chemical Reviews**, v. 32, p.215-224, 2003.

MEYER, F., ACKERMANN, J., KAIFER, E. and PRITZKOW, H. Tuning the Activity of Catechol Oxidase Model Complexes by Geometric Changes of the Dicopper Core, **Chemistry – A European Journal**, v. 8, nº 1, p. 247-258, 2002.

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

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

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and coordination compounds**. 3rd. ed. New York: Wiley-Interscience, p.317, 1977.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª. ed. New York: W. H. Freeman, p.134, 144, 162, 192, 2004.

NEVES, A., ROSSI, L.M., BORTOLUZZI, A.J., SZPOGANICZ, B., WIEZBICKI, C., SCHWINGEL, E., Catecholase Activity of a Series of Dicopper(II) Complexes with Variable Cu-OH(phenol) Moieties. **Inorganic Chemistry**, v. 41, p. 1788-1794, 2002.

OLIVEIRA, J. A. F. Oxidação de catecóis promovida por complexos binucleares de cobre(II): catálise homogênea e heterogênea. **Dissertação de Mestrado em Química**, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

OSÓRIO, R. M. Novos ligantes e Complexos Binucleares de cobre(II) promíscuos: modelos miméticos para as enzimas catecol oxidase hidrolases/nucleases sintéticas. **Dissertação de Mestrado em Química**, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

OSÓRIO, R. M. Síntese e caracterização de novos ligantes macrocíclicos ou intercalantes e seus respectivos complexos trinucleares de cobre(II) e/ou binucleares de ferro(III) como modelos miméticos para as hidrolases/nucleases sintéticas. **Tese de Doutorado em Química**, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

OSTASZEWSKI, R.; WILCZYŃSKA, E.; WOLSZCZAK, M. The Synthesis of a New Type of Anthracene DNA Intercalator. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.8, p. 2995-2996, 1998.

PERALTA, R. A. Novos complexos binucleares de cobre(II) e de ferro(III) zinco(II): Biomiméticos sintéticos para Catecol Oxidase e para Fosfatases Ácidas Púrpuras. **Tese de Doutorado em Química**, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

Protein Data Bank. Disponível em <
<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1BT1>>.
Acesso em 20 jan. 2014.

ROMANOWSKI, S. M. M.; MANGRICH, A. S.; NEVES, A.. Síntese e caracterização de novos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes não-simétricos N,O-doadores: contribuições para o sítio ativo da galactose oxidase. **Química Nova**, São Paulo, p. 592-598, v.4, n.5. 05 fev. 2001.

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

SHELDRICK, G. M. **SHELXL-97: program for the refinement of crystal structures**. University of Göttingen, Germany, 1997.

SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRILL, T. C., **Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos**, Editora LTC, Traduzido por ALENCASTRO, R. B., WIRCKER, L., GIL, R. A. S., 5ª ed, 1994. 387 p.

SOLOMON, E. I., SUNDARAM, U. M., MACHONKIN, T. E. Multicopper oxidases and oxygenases, **Chemical Reviews**, v. 96, p. 2563-2605, 1996.

SOUZA, B. Estudo de novos catalisadores biomiméticos com efeitos de segunda esfera de coordenação: síntese, caracterização e catálise. **Tese de Doutorado em Química**, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

TORELLI, S. et al. pH-Controlled Change of the Metal Coordination in a Dicopper(II) Complex of the Ligand H-BPMP: Crystal Structures, Magnetic Properties, and Catecholase Activity. **Inorganic Chemistry**, v. 39, n.16, p.3526-3536, 2000.

TORELLI, S., BELLE, C., HAMMAN, S., PIERRE, J.-L., SAINT-AMAN, E.. Substrate Binding in Catechol Oxidase Activity: Biomimetic Approach. **Inorganic Chemistry**, v. 41, p. 3983-3989, 2002.

WHEELER, R.J. DNA Structure Key Labelled. Disponível em http://no.wikipedia.org/wiki/Fil:DNA_Structure%2BKey%2BLabelled.png. Acesso em 25 fev. 2014.

WOLFENDEN, R. Benchmark Reaction Rates, the Stability of Biological Molecules in Water, and the Evolution of Catalytic Power in Enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, p. 645-667, 2011.

YAMANA, K.; ZAKO, H.; ASAZUMA, K.; IWASE, R.; NAKANO, H.; MURAKAMI, A. Fluorescence Detection of Specific RNA Sequences Using 2'-Pyrene-Modified Oligoribonucleotides. **Angewandte Chemie International Edition**, v.40, p.1104-1106, 2001.

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