

Renata da Silva Heying

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DIESTERASE  
DE NOVOS MODELOS BIOMIMÉTICOS COM EFEITOS DE  
SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO PARA  
FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS**

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.

Heying, Renata da Silva

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DIESTERASE DE NOVOS  
MODELOS BIOMIMÉTICOS COM EFEITOS DE SEGUNDA ESFERA DE  
COORDENAÇÃO PARA FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS / Renata da  
Silva Heying ; orientador, Ademir Neves - Florianópolis,  
SC, 2014.

111 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. fosfatases ácidas púrpuras. 3. compostos  
biomiméticos. 4. segunda esfera de coordenação. I. Neves,  
Ademir . II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Renata da Silva Heying

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DIESTERASE  
DE NOVOS MODELOS BIOMIMÉTICOS COM EFEITOS DE  
SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO PARA  
FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS**

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, 12 de dezembro de 2014.

---

Prof. Hugo Gallardo Olmedo, Dr.  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

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

---

Prof.<sup>a</sup>Renata El-Hage Meyer de Barros Osório, Dr.<sup>a</sup>  
Instituto Federal de Santa Catarina

---

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

---

Prof. Vanderlei Gageiro Machado, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina



Este trabalho é dedicado à  
minha família, em especial aos  
meus pais, e aos meus amigos.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais Walter (*in memoriam*) e Mary Stela que sempre foram a minha base, pelo amor, educação e apoio nos momentos difíceis, ensinando-me a persistir nos meus objetivos e ajudando a alcançá-los.

Às minhas irmãs Stephany e Caroline pelo carinho e amizade, pelos abraços e por compartilharem cada momento da minha vida.

Ao prof. Ademir Neves agradeço pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho em seu grupo de pesquisa.

Agradeço ao povo do LABINC, pela companhia em todas as loucuras, por ajudar a superar todas as dificuldades do trabalho experimental e por tornar feliz cada dia de trabalho. Em especial ao Marcos, Sheilinha e Valdeco, companheiros na vida de atleta. Ao André, meu querido ex-IC, atual mestrando no Labinc. A Graci, que nos largou e foi para a Suécia e a Thaisy que nos trocou pela indústria. E um agradecimento mais do que especial a Claudinha Chaves, que foi companheira cada dia desses dois anos de trabalho, nas matérias, no RMN e nas risadas.

Agradeço aos demais professores do LABINC, Rosely e Bernardo, por toda ajuda e atenção e em especial ao professor Adailton pela paciência no estágio de docência e agora na Central de Análises.

Ao professor Vanderlei, que me ensinou como fazer pesquisa e deu todo suporte para que eu defendesse com qualidade meu TCC.

Agradeço também ao pessoal do Volei EFC, que foram um refúgio nos dias mais estressantes.

Por fim, agradeço à UFSC, ao CNPq pela bolsa concedida, à CAPES e ao INCT-catálise pelo apoio financeiro.



As pessoas costumam dizer que a motivação não dura sempre. Bem, nem o efeito do banho, por isso recomenda-se diariamente.

(Zig Ziglar)



## RESUMO

O desenvolvimento de complexos modelos para centros ativos de enzimas é um dos focos da química bioinorgânica. Atualmente, objetiva-se o desenvolvimento de ligantes e subsequentemente, de complexos que representem não apenas a primeira esfera de coordenação do centro ativo da enzima, mas que efeitos de segunda esfera de coordenação também possam contribuir para aumentar a eficiência catalítica do modelo mimético. Assim, neste trabalho fez-se uma modificação estrutural de um ligante dinucleante já descrito na literatura, desenvolvido por Neves e colaboradores, seguido da síntese dos seus complexos dinucleares  $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{-Zn}^{\text{II}}$  (**1**) e  $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{-Cu}^{\text{II}}$  (**2**). O ligante  $\text{H}_2\text{LHex}$  foi preparado através de uma aminação redutiva do ligante  $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$  desenvolvido por Neves com a 1,6-hexanodiamina e o mesmo foi caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$ , infravermelho e ESI-MS, enquanto os complexos foram caracterizados via infravermelho, ESI-MS, condutimetria, espectrofotometria de UV-vis e eletroquímica. Estudos cinéticos da hidrólise do diéster bis(2,4-dinitrofenil)fosfato na presença de **1** ou **2** mostraram que, com a adição do modelo de segunda esfera de coordenação, a constante catalítica  $k_{\text{cat}}$  é diminuída, porém a associação substrato-complexo é significativamente favorecida frente a complexos que abordem apenas a primeira esfera de coordenação em tais processos. Por fim, conclui-se que o papel da segunda esfera de coordenação é bastante complexo, e que, com o aprofundamento de tais estudos, deverá ser possível se obter consideráveis avanços no entendimento de tais efeitos em processos de catálise através de compostos biomiméticos.

Palavras-chave: fosfatases ácidas purpuras (PAPs), ligantes polidentados, segunda esfera de coordenação.



## ABSTRACT

The development of model complexes mimicking the active site of metalloenzymes is one of the main focus of research in Bioinorganic Chemistry. Currently, the development of new ligands and their complexes which besides the first-coordination-sphere of the active site, also takes into account the effects of the second-coordination-sphere to enhance catalysis, has increased significantly. This work consists on the structural modification of the dinucleating  $H_2L$  ligand already described in the literature, followed by the synthesis of its dinuclear  $Fe^{III}(\mu-OH)-Zn^{II}$  (**1**) and  $Fe^{III}(\mu-OH)Cu^{II}$  (**2**) complexes. The ligand  $H_2LHex$  was prepared by a reductive amination of  $H_2L$  and 1,6-hexanediamine and was characterized by  $^1H$  NMR, IR and ESI-MS while the complexes were characterized by IR, ESI-MS, conductometry, UV-vis spectrophotometry and electrochemistry. Kinetic studies on the hydrolysis of the diester substrate bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate in presence of **1** or **2** revealed that, while the catalytic constant  $k_{cat}$  is decreased, the association constant of the substrate-complex intermediate is significantly favored when compared to the complexes without the second-coordination-sphere effects. Finally, it is concluded that the role of the second-coordination-sphere seems to be quite complex and that such studies should significantly contribute to the understanding of these effects in biomimetic catalysts.

Keywords: Purple Acid Phosphatases (PAPs), polydentate ligands, second-coordination-sphere.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de energia para uma reação não catalisada (linha preta) em comparação ao de uma reação catalisada (linha vermelha).....	<b>30</b>
Figura 2. Representação do sítio ativo da enzima <i>Catecol oxidase</i> (esquerda) e do modelo biomimético (direita) desenvolvido por Koval (KOVAL, 2006).....	<b>31</b>
Figura 3. Ilustração do sítio ativo da enzima <i>Staphylococcal nuclease</i> . Preto: cofator metálico; Azul: segunda esfera de coordenação; Vermelho: substrato (ZHAO, et. al. 2013).....	<b>33</b>
Figura 4. Representação esquemática dos sítios 3'-5' na estrutura do DNA.....	<b>33</b>
Figura 5. Estrutura do sítio ativo da enzima binuclear de Zn(II) Allantoato amidohidrolase evidenciando alguns resíduos da segunda esfera de coordenação do sítio (AGARWAI, 2007).....	<b>34</b>
Figura 6. Estrutura dos complexos metálicos conjugados com antraquinona (1 - 3) e o composto de referência 4 (BOSEGGIA, et al. 2004).....	<b>35</b>
Figura 7. Complexos de zinco modelos para RNase contendo funcionalidades amina.....	<b>36</b>
Figura 8. Esquema do sítio ativo das PAPs.....	<b>37</b>
Figura 9. Visão estérica da PAP existente em ratos com centro Fe(III)/Fe(II) (LINDQVIST, 1999).....	<b>38</b>
Figura 10. Mecanismo proposto por Klabunde e colaboradores para o funcionamento de PAP na catálise de hidrólise de ésteres de fosfato (KLABUNDE, 1996).....	<b>39</b>
Figura 11. Modelo biomimético para PAPs desenvolvido por Neves e colaboradores (2007) (M = Cu, Zn).....	<b>40</b>
Figura 12. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (200 MHz) em CDCl <sub>3</sub> do BPMA.....	<b>48</b>
Figura 13. Espectro de IV em KBr do BPMA.....	<b>48</b>
Figura 14. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (200 MHz) em CDCl <sub>3</sub> do CMFF.....	<b>50</b>

Figura 15. Espectro de IV em KBr do CMFF.....	<b>50</b>
Figura 16. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz) em $\text{CDCl}_3$ do bpmamff.....	<b>52</b>
Figura 17. Espectro de IV em KBr do bpmamff.....	<b>52</b>
Figura 18. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz) em $\text{CDCl}_3$ do Hpy <sub>3</sub> .....	<b>54</b>
Figura 19. Espectro de IV em KBr do Hpy <sub>3</sub> .....	<b>54</b>
Figura 20. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz) em $\text{CDCl}_3$ do H <sub>2</sub> py <sub>3</sub> mff.....	<b>56</b>
Figura 21. Espectro de IV em KBr do H <sub>2</sub> py <sub>3</sub> mff.....	<b>56</b>
Figura 22. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz) em $\text{CDCl}_3$ do H <sub>2</sub> LHex.....	<b>58</b>
Figura 23. Espectro de IV em KBr do H <sub>2</sub> LHex.....	<b>59</b>
Figura 24. Espectro de IV em KBr do complexo <b>1</b> .....	<b>60</b>
Figura 25. Espectro de IV em KBr do complexo <b>2</b> .....	<b>62</b>
Figura 26. Rota sintética do ligante H <sub>2</sub> LHex.....	<b>63</b>
Figura 27. Espectro de ESI-MS do ligante H <sub>2</sub> LHex e respectiva simulação da distribuição isotópica.....	<b>64</b>
Figura 28. Estruturas propostas para os complexos FeZnH <sub>2</sub> LHex (esquerda) e FeCuH <sub>2</sub> LHex (direita) de acordo com os espectros de massas e estruturas já apresentadas na literatura para compostos semelhantes (CAMARGO, 2013; SOUZA, 2013).....	<b>66</b>
Figura 29. Sobreposição dos espectros na região do IV do ligante H <sub>2</sub> LHex (preto) e do complexo <b>1</b> (vermelho).....	<b>67</b>
Figura 30. Sobreposição dos espectros na região do IV do ligante H <sub>2</sub> LHex (preto) e do complexo <b>2</b> (vermelho).....	<b>68</b>
Figura 31. Espectro de ESI-MS do complexo <b>1</b> e respectiva simulação da distribuição isotópica.....	<b>69</b>
Figura 32. Estrutura proposta para o complexo <b>1</b> de acordo com o espectro de ESI-MS.....	<b>70</b>
Figura 33. Espectro de ESI-MS do complexo <b>2</b> e respectiva simulação da distribuição isotópica.....	<b>71</b>

Figura 34. Estrutura proposta para o complexo <b>2</b> de acordo com o espectro de ESI-MS.....	<b>72</b>
Figura 35. Espectros eletrônicos dos complexos <b>1</b> (A) e <b>2</b> (B). Solução – $[C] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e no estado sólido.....	<b>74</b>
Figura 36. Diagrama de distribuição de espécies para o complexo <b>1</b> em acetonitrila/água (50:50, % v/v).....	<b>76</b>
Figura 37. Diagrama de distribuição de espécies para o complexo <b>2</b> em acetonitrila/água (50:50, % v/v).....	<b>77</b>
Figura 38. Estruturas dos complexos FeZnLAB (acima) (CAMARGO, 2013) e 1-PEI (abaixo) (SOUZA, 2013).....	<b>78</b>
Figura 39. Titulação espectrofotométrica do complexo <b>1</b> feita em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50, % v/v) a 25 °C, 0,1 mol L <sup>-1</sup> em KCl; $[C] = 6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .....	<b>81</b>
Figura 40. Titulação espectrofotométrica do complexo <b>2</b> feita em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50, %v/v) a 25 °C, 0,1 mol L <sup>-1</sup> em KCl; $[C] = 6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .....	<b>82</b>
Figura 41. Voltamogramas cíclicos do complexo <b>1</b> em EtOH/H <sub>2</sub> O (70:30, % v/v) (KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> ) a 25 °C, com velocidades de varredura de 25, 50, 100, 150 e 200 mVs <sup>-1</sup> em pH 4,11. Os potenciais estão representados versus NHE. $[C] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .....	<b>85</b>
Figura 42. Voltamogramas cíclicos do complexo <b>1</b> em EtOH/H <sub>2</sub> O (70:30, % v/v) (KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> ) a 25 °C, com velocidades de varredura de 25, 50, 100 e 200 mVs <sup>-1</sup> em pH 7,95. Os potenciais estão representados versus NHE. $[C] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .....	<b>85</b>
Figura 43. Voltamogramas de onda quadrada do complexo <b>1</b> em EtOH/H <sub>2</sub> O (70:30, % v/v) (KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> ) a 25 °C em pH 4,11. Os potenciais estão representados versus NHE. $[C] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .....	<b>86</b>
Figura 44. Voltamogramas de onda quadrada do complexo <b>1</b> em EtOH/H <sub>2</sub> O (70:30, % v/v) (KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> ) a 25 °C em pH 7,95. Os potenciais estão representados versus NHE. $[C] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .....	<b>86</b>

Figura 45. Voltamogramas de onda quadrada para o complexo **1** variando-se o pH de 3,2 a 5,6 em EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30, % v/v) (KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 25 °C. Os potenciais estão representados versus NHE. [C] = 5 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.....**88**

Figura 46. Gráfico da razão entre as correntes dos processos de oxidação do Fe(III) em 177 mV e 70 mV obtidos dos voltamogramas da Figura 45 em função o pH para o complexo **1**.....**88**

Figura 47. Voltamogramas cíclicos do complexo **2** em EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30, % v/v) (KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 25 °C, com velocidades de varredura de 25, 50, 100, 200 e 300 mV s<sup>-1</sup> em pH 2,45. Os potenciais estão representados versus NHE. [C] = 5 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.....**90**

Figura 48. Voltamogramas cíclicos do complexo **2** em EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30, %v/v) (KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 25 °C, com velocidades de varredura de 25, 50 e 100 mV s<sup>-1</sup> em pH 5,56. Os potenciais estão representados versus NHE. [C] = 5 x 10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>.....**91**

Figura 49. Voltamogramas de onda quadrada do complexo **2** em EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30, % v/v) (KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 25 °C em pH 2,45. Os potenciais estão representados versus NHE. [C] = 5 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.....**91**

Figura 50. Voltamogramas de onda quadrada do complexo **2** em EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30, % v/v) (KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 25 °C em pH 5,56. Os potenciais estão representados versus NHE. [C] = 5 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.....**92**

Figura 51. Voltamogramas de onda quadrada para o complexo **2** variando-se o pH de 2,9 a 5,0 em EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30, % v/v) (KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 25 °C. Os potenciais estão representados versus NHE. [C] = 5 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.....**93**

Figura 52. Reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP.....**93**

Figura 53. Dependência da velocidade inicial do complexo **1** com o pH para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP. Condições: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (50:50, % v/v); [Complexo] = 4 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>; [Substrato] = 2,5 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>; [tampão] = 5 x 10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>; I = 5 x 10<sup>-2</sup> LiClO<sub>4</sub> mol L<sup>-1</sup>.....**95**

Figura 54. Dependência da velocidade inicial do complexo **2** com o pH para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP. Condições: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (50:50, % v/v); [Complexo] =  $4 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>; [Substrato] =  $2,5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>; [tampão] =  $5 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>; I =  $5 \times 10^{-2}$  LiClO<sub>4</sub> mol L<sup>-1</sup> .....**96**

Figura 55. Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP com a concentração do substrato para o complexo **1**. Condições: [Complexo] =  $4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>; [Tampão] = 0,05 mol L<sup>-1</sup> (MES, pH = 6,5); I = 0,05 mol L<sup>-1</sup> (LiClO<sub>4</sub>) em solução H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (50 %, v/v) a 25 °C.....**97**

Figura 56. Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP com a concentração do substrato para o complexo **2**. Condições: [Complexo] =  $4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>; [Tampão] = 0,05 mol L<sup>-1</sup> (HEPES, pH = 7,0); I = 0,05 mol L<sup>-1</sup> (LiClO<sub>4</sub>) em solução H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (50 %, v/v) a 25 °C.....**97**

Figura 57. Mecanismo proposto para a hidrólise do 2,4-BDNPP pelos complexos **1** e **2**.....**101**



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de onda das bandas referentes aos movimentos vibracionais dos principais grupos funcionais do ligante H <sub>2</sub> LHex e dos complexos <b>1</b> e <b>2</b> .....	<b>65</b>
Tabela 2. Dados dos espectros eletrônicos para os complexos <b>1</b> e <b>2</b> .....	<b>71</b>
Tabela 3. Comparativo entre os valores de pK <sub>a</sub> potenciométricos para os complexo <b>1</b> , <b>1<sup>a</sup></b> e <b>FeZnLAB<sup>b</sup></b> .....	<b>74</b>
Tabela 4. Comparativo entre os valores de pK <sub>a</sub> potenciométricos para os complexo <b>2</b> , <b>2<sup>a</sup></b> e espectrofotométrico para o complexo <b>1-PEI<sup>b</sup></b> .....	<b>74</b>
Tabela 5. Comparativo entre os valores de pK <sub>a</sub> potenciométricos e espectrofotométricos para os complexo <b>1</b> e <b>2</b> .....	<b>81</b>
Tabela 6. Potenciais de redução e oxidação do par Fe <sup>III</sup> /Fe <sup>II</sup> obtidos através de voltametria de onda quadrada para o complexo <b>1</b> nas condições já descritas.....	<b>85</b>
Tabela 7. Potenciais de redução e oxidação do par Fe <sup>III</sup> /Fe <sup>II</sup> e Cu <sup>II</sup> /Cu <sup>I</sup> obtidos através de voltametria de onda quadrada para o complexo <b>2</b> nas condições já descritas.....	<b>90</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-BDNPP	2,4-(dinitrofenil)fosfato
[C]	Concentração do catalisador
[S]	Concentração do substrato
$\delta$	Deslocamento químico (RMN)
$\bar{\delta}$	Deformação angular simétrica ou assimétrica (IV)
$\epsilon$	Coefficiente de absorvidade molar
$\lambda$	Comprimento de onda
$\nu$	Estiramento de ligação
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
dt	Duplo tripleto
m	Multiplete
s	Simpleto
t	Triplete
td	Triplo dupleto
ACN	Acetonitrila
bpma	Bis(piridilmetil)amina
Bpmamff	2-[ <i>N</i> -bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formilfenol
CHES	Ácido <i>N</i> -ciclohexil-2-aminoetanosulfônico
Cmff	2-clorometil-4-metil-6-formilfenol
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
$E_{1/2}$	Potencial de meia onda
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
Et <sub>3</sub> N	Trietilamina
H <sub>2</sub> LHex	2-({(3-{{(6-aminohexil)amino}metil}-2-hidroxi-5-metilfenil)metil})(piridin-2-ilmetil)amino}metil)-6-{{bis(piridin-2-ilmetil)amino}metil}-4-metilfenol

H2py3mff	2-[ <i>N</i> -bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[ <i>N</i> -(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinoetanosulfônico
Hpy3	2-[ <i>N</i> -bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[ <i>N</i> -(2-piridilmetil)aminometil]fenol
I	Força iônica no meio
IV	Infravermelho
$k_{cat}$	Constante catalítica
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
$k_{nc}$	Constante da reação não catalisada
MeOH	Metanol
MES	Ácido 2-( <i>N</i> -morfolino)etanossulfônico
NHE	Eletrodo normal de hidrogênio
PAP	Fosfatase ácida púrpura
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TCLM	Transferência de carga ligante → metal
THF	Tetrahidrofurano
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>27</b>
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>29</b>
1.1. SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO	31
1.2. FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS	36
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
2.1. OBJETIVO GERAL	41
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
<b>3 EXPERIMENTAL</b>	<b>42</b>
3.1. MATERIAIS	42
3.2. MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO	42
<b>3.2.1. Espectrofotometria na região do Infravermelho (IV)</b>	<b>42</b>
<b>3.2.2. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b>	<b>42</b>
<b>3.2.3. Espectrofotometria na região do Ultravioleta-visível (UV-Vis)</b>	<b>43</b>
<b>3.2.4. Espectrometria de massas</b>	<b>43</b>
<b>3.2.5. Eletroquímica</b>	<b>43</b>
<b>3.2.6. Condutimetria</b>	<b>44</b>
<b>3.2.7. Titulação Potenciométrica e Espectrofotométrica</b>	<b>44</b>
<b>3.2.8. Medidas de reatividade na hidrólise de fosfatos</b>	<b>45</b>
3.3. SÍNTESES	47
<b>3.3.1. Síntese do ligante</b>	<b>47</b>
3.3.1.1. Síntese do pró-ligante BPMA – bis(piridilmetil)amina	47
3.3.1.2. Síntese do pró-ligante CMFF – 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol	49
3.3.1.3. Síntese do pró-ligante bpmamff – 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formilfenol	51
3.3.1.4. Síntese do pró-ligante Hpy <sub>3</sub> – 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil]fenol	53
3.3.1.5. Síntese do ligante H <sub>2</sub> py <sub>3</sub> mff – 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol	55
3.3.1.6. Síntese do ligante H <sub>2</sub> LHex – 2-(((3-((6-aminohexil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilfenil)metil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol	57
<b>3.3.2. Síntese dos complexos</b>	<b>59</b>
3.3.2.1. Síntese do perclorato de μ-hidroxo-2-(((3-((6-aminohexil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilfenil)metil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol Ferro(III) Zinco(II) – FeZnH <sub>2</sub> LHex – Complexo 1	59
3.3.2.2. Síntese do perclorato de μ-hidroxo-2-(((3-((6-aminohexil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilfenil)metil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol Ferro(III) Cobre(II) – FeCuH <sub>2</sub> LHex – Complexo 2	60

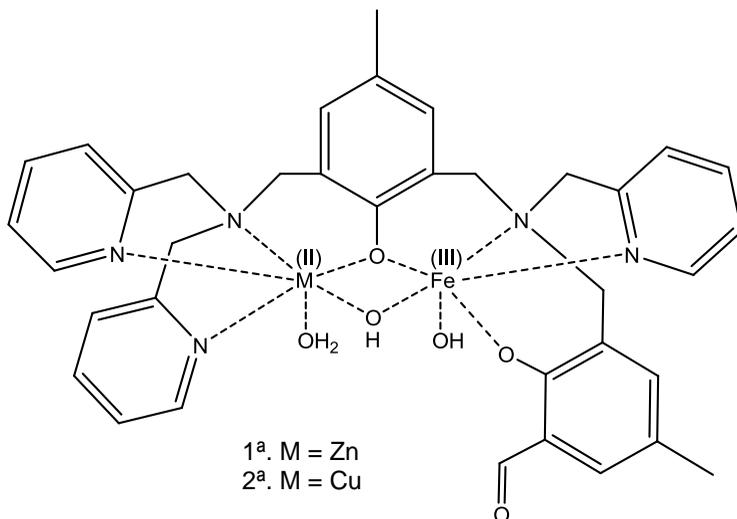
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>63</b>
4.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES	63
4.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS	66
4.2.1. Espectrofotometria na região do IV	66
4.2.2. Espectrometria de massas	68
4.2.3. Condutimetria	72
4.2.4. Espectrofotometria eletrônica na região do UV-vis	72
4.2.5. Estudos de equilíbrio químico por titulação potenciométrica e espectrofotométrica	75
4.2.6. Eletroquímica	83
4.3. ESTUDOS DE REATIVIDADE	93
4.3.1. Efeito de pH na hidrólise do 2,4-BDNPP	94
4.3.2. Efeito da concentração do substrato na hidrólise do 2,4-BDNPP	96
<b>3 CONCLUSÃO</b>	<b>103</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>105</b>

## INTRODUÇÃO

O grupo de pesquisa LABINC (Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia), vem ao longo de seu histórico, desenvolvendo complexos biomiméticos para as Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs), uma classe de enzimas que atuam na hidrólise de ésteres de fosfato. O grande interesse em se trabalhar com essas enzimas está no grupo funcional sobre o qual elas atuam (diésteres e monoésteres de fosfato), uma vez que diéster de fosfato é o grupo funcional encontrado no ácido desoxirribonucleico (DNA). A capacidade de clivar o DNA é uma característica bem interessante quando se procuram novas drogas que possam atuar como anti-tumorais e o nosso grupo de pesquisas vem desenvolvendo compostos que tenham essa capacidade. O desenvolvimento dessa linha de pesquisa se deu sempre pela tentativa de melhorar os modelos anteriormente já estudados nos trabalhos de pesquisa realizados pelo grupo. Atualmente, em se tratando de compostos biomiméticos, o maior interesse está na simulação da segunda esfera de coordenação de enzimas, e não mais apenas na modelagem do sítio ativo das mesmas.

Então, hoje, já de posse de modelos bem caracterizados para as PAPs que simulem bem as propriedades estruturais e eletrônicas do sítio ativo da enzima, a elaboração de compostos de segunda geração que possuam uma modelagem para segunda esfera de coordenação está facilitada e diversos artifícios estão disponíveis para a realização desses estudos, sendo um campo promissor para quem trabalha nessa linha de pesquisa.

Os modelos desenvolvidos mais recentemente que tratam apenas da primeira esfera de coordenação da enzima, são os compostos **1<sup>a</sup>** e **2<sup>a</sup>**, desenvolvidos por JOVITO (2010) em seu trabalho de doutoramento, e é o ponto de partida para estudos de segunda esfera de coordenação já que o grupo aldeído presente no ligante é passível de modificações.



Assim, sabendo-se que os modelos biomiméticos para as PAPs apresentados acima são capazes de clivar ligações diéster de fosfato em substratos modelos como o 2,4-(dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP) e também no DNA, decidiu-se introduzir modificações adicionais na carbonila do fenol terminal, através da adição de cadeias laterais de diferentes tamanhos contendo um grupamento amina terminal, passível de sofrer modificações para, futuramente, fazer adições de grupos intercalantes como o pireno (CAMARGO, 2013). Neste trabalho será estudado o efeito de uma cadeia contendo seis carbonos para se mensurar o efeito da amina frente à atividade catalítica desse complexo modelo e compará-la ao complexo estudado por CAMARGO (2013), que possui uma cadeia contendo quatro carbonos. A seguir, segue uma revisão bibliográfica a cerca dos assuntos envolvidos nesse trabalho para melhor entendimento do mesmo.

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Durante o desenvolvimento da ciência, associou-se a química orgânica aos sistemas vivos e a inorgânica à matéria morta, então não se podia pensar na associação entre a biologia e a inorgânica. Hoje, sabe-se que substâncias inorgânicas possuem diversas funções em organismos vivos, incluindo transporte, especiação, mineralização de materiais inorgânicos e, inclusive o uso em terapias medicinais e diagnósticos. E assim introduz-se a Química Bioinorgânica, uma área multidisciplinar que visa estudar o papel dos metais nos organismos vivos (KAIM, 2013; REHDER, 2008; BERTINI, 1994).

A dificuldade de descobrir a relação dos metais com os processos biológicos se deu principalmente por limitações instrumentais uma vez que os metais se encontram em concentrações muito baixas nos organismos vivos em comparação à matéria orgânica e, até pouco tempo atrás não se dispunha de equipamentos analíticos capazes de detectar a presença desses elementos nos sistemas biológicos (KAIM, 2013).

Para este trabalho, a subárea da química bioinorgânica de interesse situa-se dentro do campo das metaloenzimas, que se caracterizam por biopolímeros formados por cadeias de aminoácidos e possuem em seu sítio ativo metais que desempenham papel fundamental na atividade catalítica das mesmas. As enzimas são catalisadores naturais extremamente eficientes e seletivos e assim, são de grande interesse dentro da indústria e da medicina.

O conceito de catalisador passou a existir a partir de 1835 com Jöns Jacobs Berzelius que o definiu como “substância capaz de promover uma reação sem ser afetada por ela” e o processo de catálise, que inicialmente parecia ser função de alguns metais e ácidos simples se mostrou um processo bem mais complexo e nada macroscópico. Os catalisadores são capazes de promover um novo caminho de reação, com mais de uma etapa, com energia de ativação inferior a da reação não catalisada, respeitando as estabilidades termodinâmicas dos reagentes e produtos (Figura 1). No que diz respeito às enzimas, não poderia ser diferente, já que as mesmas atuam de forma bastante complexa e sinérgica para promoverem reações que em

condições normais jamais aconteceriam ou que ocorreriam muito lentamente (LINDSTRÖM, PETERSON, 2003).

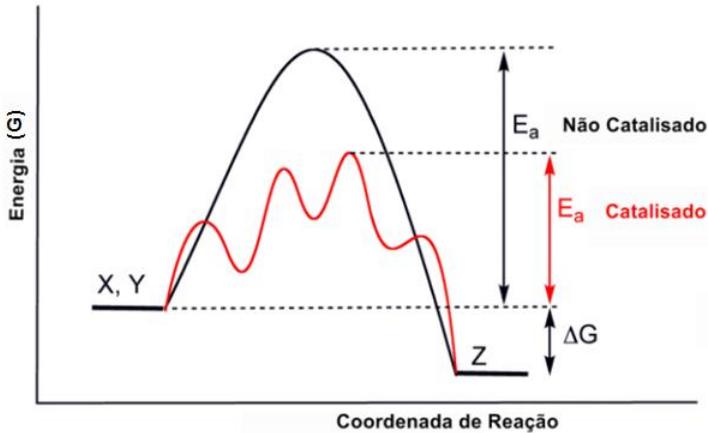


Figura 1. Diagrama de energia para uma reação não catalisada (linha preta) em comparação ao de uma reação catalisada (linha vermelha).

O isolamento e purificação de enzimas é um processo custoso financeiramente e experimentalmente, o que torna atrativo o desenvolvimento de compostos de pequena massa molecular capazes de exercer a mesma função em catálise. Atualmente, para várias enzimas, o processo de desenvolvimento de complexos biomiméticos que reproduzam propriedades eletrônicas, estruturais e até a capacidade de atuar como catalisadores através de mecanismos semelhantes e até mesmo iguais às enzimas análogas, já é bastante conhecido. No entanto, estes compostos ainda possuem uma grande limitação quanto à atividade catalítica, uma vez que a eficiência de tais sistemas ainda é muito baixa quando comparada àquela dos biopolímeros naturais. Como exemplo, pode-se citar a *Catecol Oxidase*—uma metaloenzima contendo um sítio ativo binuclear de cobre que catalisa a reação de oxidação de catecóis às suas respectivas quinonas (Figura 2). Embora existam diversos complexos modelos que representem estruturalmente e eletronicamente o seu centro ativo, como o desenvolvido por Koval e colaboradores, atualmente só conseguem catalisar

reações com substratos ativados, como o 3,5-di-terc-butil catecol, com constantes catalíticas ( $k_{cat}$ ) na faixa de  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$   $s^{-1}$  (HAMMES, BENKOVIC, HAMMES-SCHIFFER, 2011), enquanto a enzima é capaz de converter catecóis não ativados com constantes na faixa de 100-200  $s^{-1}$  (KOVAL, 2006).

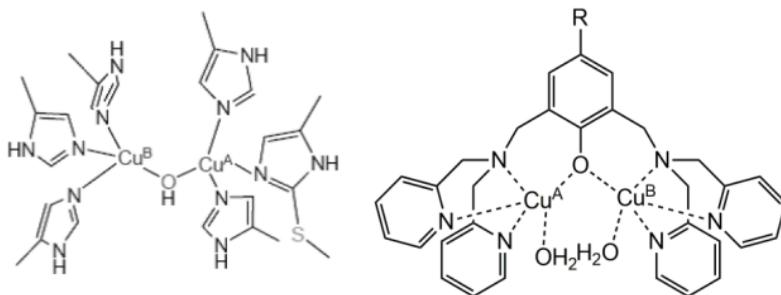


Figura 2. Representação do sítio ativo da enzima *Catecol oxidase* (esquerda) e do modelo biomimético (direita) desenvolvido por Koval (KOVAL, 2006).

## 1.1. SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO

O maior desafio no desenvolvimento de modelos biomiméticos nos dias atuais está em alcançar a atividade catalítica e seletividade de enzimas uma vez que a simulação do centro ativo das mesmas já é um processo bem descrito na literatura. Na verdade, são questões estruturais que distanciam os modelos de suas enzimas. As enzimas são compostas de uma cadeia de aminoácidos com uma estrutura bem definida no espaço, consequência de uma rede de interações existentes ao longo desta cadeia. Além disso, todas essas interações provenientes de fragmentos 'secundários' são capazes de contribuir em diversas etapas ao longo do processo catalítico. Esses resíduos de aminoácidos que, embora não estejam diretamente coordenados aos metais responsáveis por catalisar determinadas reações, ou seja, que não façam parte do sítio ativo da enzima, mas que possuem função indispensável na

eficiência e seletividade das enzimas, recebem a denominação de “Segunda Esfera de Coordenação”.

A descoberta da contribuição desses resíduos de aminoácidos ao longo da cadeia proteica na atividade catalítica se deve ao desenvolvimento da engenharia enzimática, através de estudos do efeito causado por mutações desses resíduos de aminoácidos na eficiência de diversas enzimas (BORNSCHEUER, 2012).

O papel da segunda esfera de coordenação é bastante variável – a mesma pode ser responsável por uma melhor afinidade e reconhecimento quanto ao substrato a partir de construções que podem interagir de forma seletiva com o substrato desejado; pode também estabilizar o estado de transição, ser responsável pela geração da espécie ativa na catálise assim como também pode atuar na estabilização do grupo de saída. Essas contribuições para a atividade catalítica se dão através de interações intermoleculares como: ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, efeitos hidrofóbicos e forças de van der Waals (LINDSTRÖM; PETERSON, 2003).

A enzima Staphylococcal nuclease (Figura 3) é responsável por catalisar a hidrólise do DNA e RNA no sítio 3' (Figura 4). A aceleração da velocidade da reação de hidrólise do DNA é aumentada em  $10^{16}$  vezes com a enzima. A hidrólise se dá por um mecanismo catalítico ácido base envolvendo os resíduos Arg35, Glu43 e Arg87. O grupo guanidínio da Arg35 interage através de ligações de hidrogênio com o diéster de fosfato no estado fundamental, auxiliando na entrada do substrato no sítio ativo, ou seja, aumentando a afinidade do substrato com a enzima. O carboxilato do Glu43 é responsável por gerar o nucleófilo, abstraindo um próton da água coordenada ao centro metálico da enzima. E por fim, a Arg87 é responsável por estabilizar o estado de transição e também promover a liberação do grupo de saída ao final da reação. Todos esses fatores juntos são capazes de reduzir significativamente a energia de ativação do sistema, conduzindo a aceleração da reação de hidrólise de ácidos nucleicos (COTTON, et al. 1979).

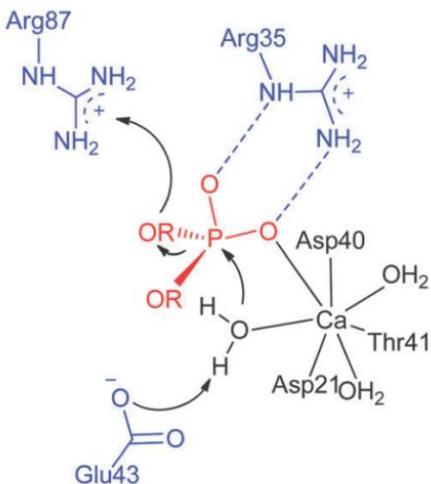


Figura 3. Ilustração do sítio ativo da enzima *Staphylococcal nuclease*. Preto: cofator metálico; Azul: segunda esfera de coordenação; Vermelho: substrato (ZHAO, et. al. 2013).

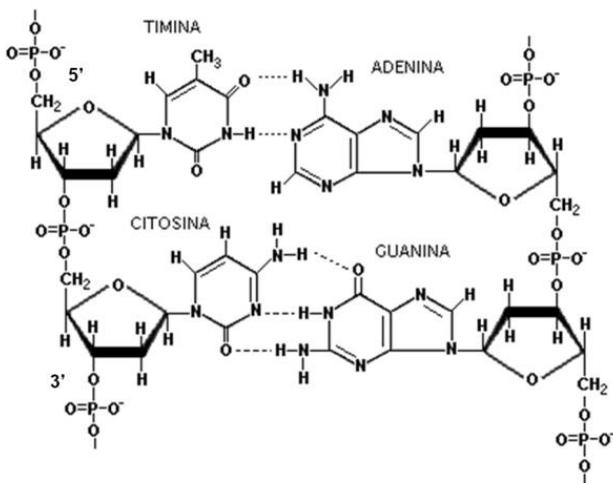


Figura 4. Representação esquemática dos sítios 3'-5' na estrutura do DNA.

Outro exemplo de contribuição da segunda esfera de coordenação para a catálise enzimática é a enzima Allantoato amidohidrolase que converte o peptídeo allantoato a ureidoglicina, amônia e dióxido de carbono. Para que se dê o reconhecimento do substrato pelo catalisador é necessário que resíduos de aminoácidos sejam capazes de interagir preferencialmente com o substrato frente a outras moléculas. Esse efeito é observado na Figura 5, em que o peptídeo Allantoato se apresenta coordenado ao sítio binuclear de zinco(II) do centro ativo da enzima, ligação essa que é fortemente estabilizada por interações ao seu entorno. Essa estabilização é promovida pelo aumento da constante de formação do complexo enzima-substrato e limita a entrada de substratos similares pela influência na energia de interação específica com esse peptídeo (AGARWAI, 2007).

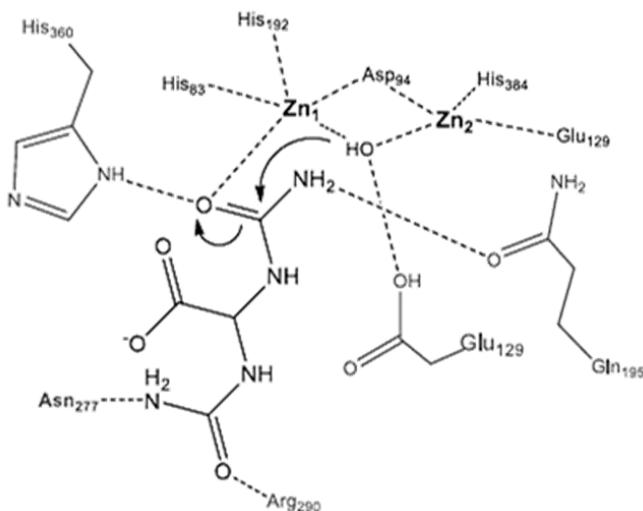


Figura 5. Estrutura do sítio ativo da enzima binuclear de Zn(II) Allantoato amidohidrolase evidenciando alguns resíduos da segunda esfera de coordenação do sítio (AGARWAI, 2007).

Baseado nos estudos acerca do mecanismo de atuação das enzimas, notou-se a necessidade de expandir os estudos de segunda esfera de coordenação para os modelos biomiméticos visando melhorar a atividade catalítica e a seletividade dos mesmos. As estratégias mais utilizadas atualmente para simular

a segunda esfera de coordenação são: a utilização de polímeros, dendrímeros, grupos laterais funcionais como aminas e ácidos carboxílicos, dispositivos supramoleculares, como ciclodextrinas, calix[n]arenos, nanoestruturas, cadeias proteicas, como grupos laterais e, para nucleases, agentes intercaladores ligados covalentemente à cadeia lateral (LINDSTRÖM, PETERSON, 2003; NEVES, 2007; ZHAO, et. al. 2013; CHEN, et al. 2008).

Um modelo para nuclease, estudado na clivagem de DNA plasmídico, contendo como grupo intercalante a antraquinona, foi reportado na literatura por Bologgino e colaboradores (2004). A estrutura do ligante consiste de uma plataforma triaminociclohexano ligada por meio de espaçadores alquílicos de diferentes tamanhos a um grupo antraquinona que é capaz de intercalar o DNA (Figura 6). No complexo **3**, a presença do grupo antraquinona acarreta num aumento da eficiência de clivagem de 15 vezes quando comparado com o complexo **4**. O tamanho do espaçador também foi fator determinante na atividade dos complexos – inclusive, para espaçadores muito curtos, a atividade foi inibida em comparação ao complexo **4** – indicando que a intercalação é fundamental na eficiência catalítica do modelo.

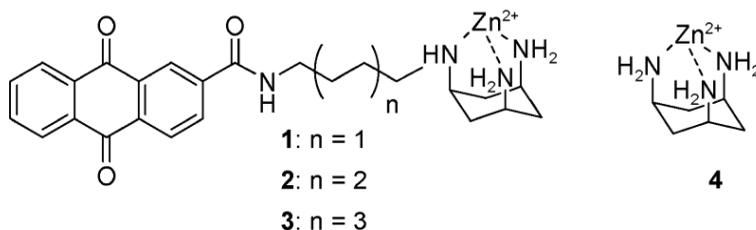


Figura6. Estrutura dos complexos metálicos conjugados com antraquinona (1 - 3) e o composto de referência 4 (BOSEGGINA, et al. 2004).

Mareque-Rivas e colaboradores sintetizaram um complexo mononuclear de zinco(II) modelo de RNase contendo aminas aromáticas (**5**) com o objetivo de compará-lo ao análogo sem as aminas e o mesmo apresentou uma atividade catalítica 80 vezes mais alta na clivagem do substrato 2-hidroxiopropil-4-nitrofenilfosfato (HPNP) do que o complexo sem os grupos amina (FENG, et al. 2005). O efeito dessas aminas é equivalente ao

ganho obtido com a introdução de um segundo centro metálico de zinco, isso pela interação entre as aminas e o estado de transição da reação de clivagem do substrato (FENG, et al. 2006). Por fim, o mesmo grupo de pesquisas introduziu as aminas no complexo binuclear de zinco (6) e essa combinação resultou no modelo mais ativo para clivagem do HPNP (FENG, et al. 2006b). Esse ganho é justificado por ligações de hidrogênio com os oxigênios fosforil ligados aos núcleos de zinco (Figura 7) resultando numa maior afinidade do substrato pelo complexo através do efeito da segunda esfera de coordenação do mesmo.

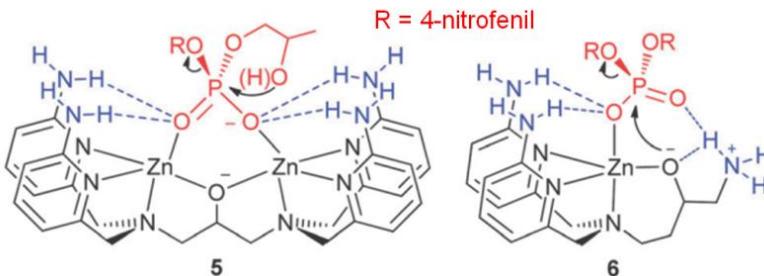


Figura 7. Complexos de zinco modelos para RNase contendo funcionalidades amina.

## 1.2. FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS

Dentre a infinidade de enzimas existentes, o foco deste trabalho reside nas fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) que são metaloenzimas contendo um sítio ativo binuclear de valência mista (Figura 8) capazes de catalisar a hidrólise de ésteres de fosfato e anidridos em pH ácido (faixa de pH entre 4 e 7) e são caracterizada pela intensa coloração púrpura de sua forma inativa (KLABUNDE, 1997). As fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) são enzimas pertencentes à família das metalohidrolases dinucleares que também incluem as fosfatases de proteínas Ser/Thr, a 3-5-exonuclease de DNA polimerases, arginase, aminopeptidases e ureases. Essa família de enzimas possui dois íons metálicos bastante próximos, necessários para a condução das reações hidrolíticas e, conseqüentemente, as

enzimas possuem mecanismos de reação bastante similares entre si (SHENK, et al. 2013). As PAPs contêm o centro ativo com a combinação Fe(III)/M(II) (M = Fe, Mn ou Zn) (Figura 8) e são encontradas numa variedade de seres vivos, indo de bactérias a fungos, sendo encontradas também em plantas e animais, incluindo lisossomos humanos (KLABUNDE, 1997; THAN, 1999; SCHENK, 1999).

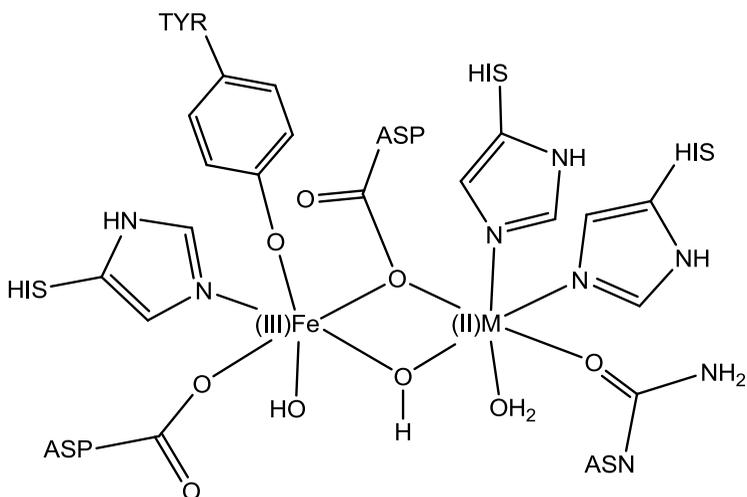


Figura 8. Esquema do sítio ativo das PAPs.

A enzima do feijão vermelho (kidney bean – *kbPAP*) foi a primeira que teve sua estrutura resolvida por difração de raios X (KLABUNDE, 1996; STRÄTER, 1995) e, em sequência, determinaram-se também as estruturas das PAPs existentes nos ratos (*tarPAP*) – resistente ao tartarato -, nos ossos dos ratos (*rbTRAP*) (Figura 9), da *ufPAP* (fluido uterino de suínos), e de mamíferos, dentre outras (UPPENBERG, 1999; LINDQVIST, 1999; GUDDAT, 1999).

Com as estruturas das PAPs resolvidas, tornou-se possível fazer maiores considerações acerca do mecanismo pelo qual essas enzimas hidrolisam ésteres de fosfato em condições ácidas. Esse mecanismo foi inicialmente proposto por Klabunde e colaboradores (KLABUNDE, 1996) que o descreve como uma catálise assistida por metal através de um mecanismo  $S_N2$ ,

considerando a estrutura cristalina da *kbPAP* (Figura 9). Como há similaridade estrutural entre a *kbPAP* e a *rbPAP*, Lindqvist e colaboradores (LINDQVIST,1999) propuseram um mecanismo similar ao proposto para a *kbPAP*.

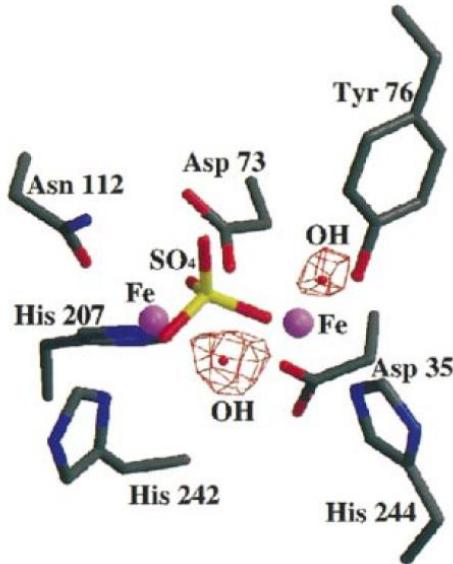


Figura 9. Visão estérica da PAP existente em ratos com centro Fe(III)/Fe(II) (LINDQVIST,1999).

O funcionamento das PAPs se dá pela acidez do metal trivalente que, com a entrada de uma água em sua esfera de coordenação, gera a espécie nucleofílica (grupo hidroxila) que irá atacar o substrato, sendo que o mesmo estará coordenado ao metal bivalente em uma posição lábil de sua esfera de coordenação (substitui a água coordenada).

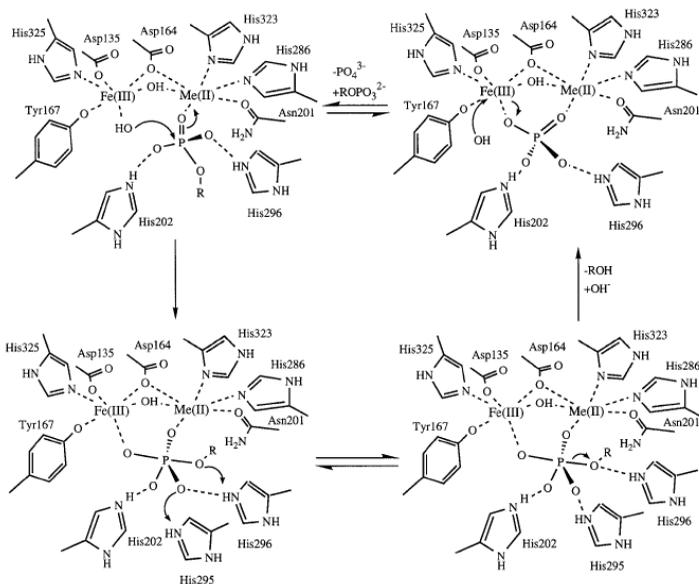


Figura 10. Mecanismo proposto por Klabunde e colaboradores para o funcionamento de PAP na catálise de hidrólise de ésteres de fosfato (KLABUNDE, 1996).

O papel das PAPs em organismos vivos ainda é uma incógnita, entende-se apenas que a mesma esteja envolvida em uma diversidade de processos, que vão desde a geração de ROS em macrófagos até doenças metabólicas dos ossos como osteoporose e câncer com metástases (McGEARY, 2014). Desta forma, a elaboração de complexos modelos se mostra bastante útil, uma vez que se consiga simular todo o ambiente enzimático envolvido no processo de catálise.

Acerca das PAPs, Neves e colaboradores(2007) desenvolveram o primeiro modelo sintético de valência mista contendo a unidade  $\text{Fe(III)}(\mu\text{-OH})\text{M(II)}$ , tendo bons resultados quando comparados a enzima em relação a propriedades estruturais e eletrônicas. Partindo desses bons resultados, o mesmo grupo acrescentou um grupo carbonila na posição orto em relação ao fenol terminal (Figura 11) para estudar efeitos de segunda esfera de coordenação nas propriedades catalíticas (SOUZA, 2013; PIOVEZAN, 2010; CAMARGO, 2014). Com base nos resultados já obtidos no estudo de efeito de segunda esfera

de coordenação pelo grupo, permanece o interesse em seguir nessa linha em se tratando de modelos biomiméticos para que melhores resultados e conclusões possam ser obtidos.

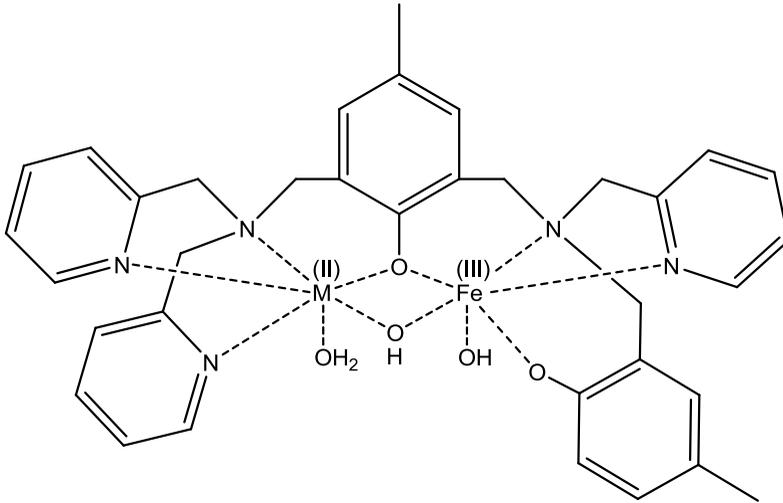
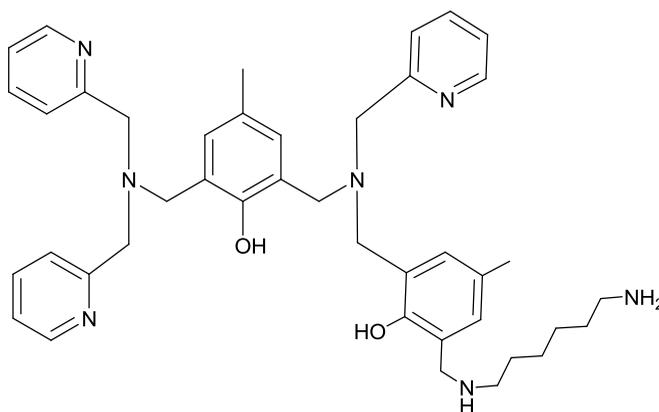


Figura 11. Modelo biomimético para PAPs desenvolvido por Neves e colaboradores (2007) ( $M = Cu, Zn$ ).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho visam sintetizar complexos heterobinucleares de Fe(III)/M(II) (M = Zn ou Cu) com novo ligante dinucleante contendo grupos fenólicos e piridínicos ligados covalentemente a uma cadeia lateral contendo o grupo 1,6-hexanodiamina para estudos de segunda esfera de coordenação.



### H<sub>2</sub>LHex

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Sintetizar, purificar e caracterizar por técnicas espectrométricas o ligante H<sub>2</sub>LHex.

2) Sintetizar e caracterizar os complexos de Fe(III)/M(II) com o ligante citado acima por análises espectroscópicas (IV e UV-vis), espectrometria de massa e eletroquímicas (voltmetrias cíclica, condutivimetria e potenciometria).

3) Investigar a reatividade dos complexos obtidos frente à hidrólise do substrato 2,4-BDNPP.

4) Analisar os resultados obtidos para a proposição dos novos complexos como modelos estruturais e funcionais para as hidrolases investigadas.

### 3 EXPERIMENTAL

#### 3.1. MATERIAIS

Os seguintes reagentes, materiais, gases e solventes, empregados nas sínteses e análises, foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia: hidróxido de sódio, ácido clorídrico 37 %, sulfato de sódio anidro, hidróxido de potássio, trietilamina, 1,6-hexanodiamina, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, boro-hidreto de sódio, hidróxido de lítio, brometo de potássio grau espectroscópico, cloreto de potássio, tampões biológicos MES, HEPES, CHES, perclorato de lítio, carvão ativo, sílica gel azul, perclorato de ferro (III) nona-hidratado, perclorato de zinco (II) hexa-hidratado, perclorato de cobre (II), hexacianoferrato(III) de potássio, perclorato de lítio, argônio 5.0, hidrogênio, nitrogênio 2.0, clorofórmio deuterado, água deuterada, clorofórmio PA, acetonitrila PA, diclorometano PA, isopropanol PA, metanol PA, tetra-hidrofurano PA, etanol absoluto, éter etílico PA, acetona PA, acetonitrila grau espectroscópico.

Foram purificados antes de utilizados os seguintes reagentes: 2-piridilcarboxialdeído (destilado à pressão reduzida), 2-(aminometil)piridina (destilada à pressão reduzida), piridina (destilada), 2,4-dinitrofenol (recristalizado em clorofórmio). O composto bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP) foi sintetizado, purificado e caracterizado de acordo com procedimento descrito na literatura (BUNTON & FARBER 1969).

#### 3.2. MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

##### 3.2.1. Espectrofotometria na região do Infravermelho (IV)

Os espectros na região do IV foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR Spectrofotometer Spectrum 100, na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . As amostras sólidas foram analisadas em pastilha de KBr e óleos foram analisados na forma de filme sobre a pastilha de KBr.

##### 3.2.2. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker AC 200, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC, em 200 MHz. Os deslocamentos químicos de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS,  $\delta = 0,00$  ppm) e  $\text{CDCl}_3$  como solvente.

### **3.2.3. Espectrofotometria na região do Ultravioleta-visível (UV-Vis)**

Os espectros eletrônicos da região do UV-vis foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo Lambda 750 no Laboratório de Química Bioinorgânica e Cristalografia, no Departamento de Química da UFSC. As análises foram realizadas utilizando-se cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm. As análises foram realizadas utilizando soluções do solvente em grau espectroscópico e cubetas de quartzo, com capacidade para 1,5 mL e 1 cm de caminho óptico. Os complexos foram dissolvidos em  $\text{CH}_3\text{CN}$  e  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (50:50, %v/v) com concentrações de  $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

### **3.2.4. Espectrometria de massas**

Os compostos sintetizados (ligantes e complexos) foram analisados via espectrometria de massa com ionização via eletrospray (ESI-MS). Os espectros foram medidos pela técnica Martina Blank, obtidos no equipamento Amazon – Ions Trap MS do Centro de Biologia Molecular Estrutural – UFSC. As análises foram realizadas a partir das soluções doligante em MeOH e dos complexos em  $\text{CH}_3\text{CN}$  grau MS com concentração de aproximadamente 500 ppb e fluxo de  $180 \mu\text{L min}^{-1}$ . A temperatura do capilar foi mantida entre 180 e 200 °C e a voltagem do capilar entre -400 e -500 V.

### **3.2.5. Eletroquímica**

O comportamento redox dos complexos foi investigado por voltametria cíclica em um potenciostato/galvanostato modelo Epsilon. Os experimentos foram feitos em  $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$  (70:30,

%v/v), com  $[C] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Foi utilizado como eletrólito de suporte KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e uma célula eletrolítica contendo um eletrodo de pseudo-referência Ag/Ag<sup>+</sup>, um eletrodo de trabalho de carbono vítreo e um eletrodo auxiliar de platina. Foi utilizado como padrão interno o hexacianoferrato de potássio (par Fe(III)/Fe(II)) para correção do eletrodo de referência.

### 3.2.6. 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<sub>3</sub>CN, 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  $100 \mu\text{Scm}^{-1}$  em água a 25 °C.

### 3.2.7. Titulação Potenciométrica e Espectrofotométrica

As constantes de protonação foram determinadas por titulação potenciométrica no Laboratório de Química Bioinorgânica e Cristalografia – UFSC. Os experimentos foram realizados em CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (50:50, %v/v),  $pK_w = -15,19$  (MITRA; PETERS; SCOTT, 2007). Cada titulação foi realizada em uma cela termoequilibrada a  $25,00 \pm 0,01$  °C, controlada por um banho da Visomes Plus. Foi utilizado um titulador automatizado Metrohm modelo Titrino Plus 848 acoplado a um eletrodo combinado com referência de Ag/AgCl, calibrado com soluções diluídas de HCl. As medidas foram feitas em volume de solução final de 50 mL, com aproximadamente  $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol}$  do composto presente. A força iônica foi ajustada com KCl à  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e o sistema foi titulado com KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e fervida sob atmosfera de argônio pré-purgado em solução de KOH. As titulações foram realizadas em duplicata e os valores apresentados referem-se à média dos dois experimentos. As constantes de equilíbrio foram calculadas com o programa BEST7 (MARTELL, 1992) e os diagramas de espécies presentes em solução em funções do pH foram obtidos com os programas SPECIES.

As titulações espectrofotométricas foram feitas sob as mesmas condições das potenciométricas. As medidas de pH

foram feitas utilizando o mesmo eletrodo, porém a adição de base foi feita de forma manual. Alíquotas de aproximadamente 1 mL foram removidas a cada ponto e o espectro de UV/Vis obtido em um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo Lambda 750. Após cada medida a alíquota era devolvida para a solução que estava sendo titulada. As curvas foram ajustadas com uma curva sigmoidal e os valores de  $pK_a$  obtidos do ponto de inflexão.

### 3.2.8. Medidas de reatividade na hidrólise de fosfatos

A atividade catalítica dos complexos foi avaliada através da reação de hidrólise do substrato bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP), o qual foi sintetizado de acordo com o método descrito por Bunton e Farber (1969). Os experimentos cinéticos foram realizados em duplicata sob condições de excesso de substrato monitorando-se espectrofotometricamente, em um espectrofotômetro UV-vis Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostatizado, a variação de absorvância ocorrida em 400 nm ( $pH/\epsilon \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1} = 3,5/2125; 4,0/3408; 4,5/7182; 5,0/10078; 5,5/11405; 6,0/12004; 6,5-10,0/12100$ ) referente a liberação do ânion 2,4-dinitrofenolato (BATISTA et al., 2003; CASELLATO, 2003), como produto da reação de hidrólise. As reações foram monitoradas até 5% de conversão de substrato a produto e os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais.

O gráfico das velocidades iniciais ( $V_0$ ) em função do pH permitiu a obtenção dos valores de  $pK_a$  para as espécies em equilíbrio e pH ótimo (valor de pH onde a atividade catalítica é máxima). A determinação das velocidades iniciais em função da concentração do substrato foi realizada no pH ótimo sob mesmas condições descritas para o estudo de influência do pH, resultando em cinéticas de saturação com comportamento de Michaelis-Menten. Através deste experimento determinou-se a velocidade máxima ( $V_{MAX}$ ) e a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ). Através de cálculos simples, determinou-se a constante catalítica ( $k_{cat} = V_{MAX}/[C]$ ), o fator catalítico, pré-definido somente para a reação de hidrólise, definido pela razão entre a constante catalítica e a constante da reação não catalisada, além da eficiência catalítica ( $E = k_{cat}/K_M$ ).

Os estudos em função do pH para atividade de hidrólise foram realizados em uma faixa de pH entre 3,5 e 10,0 a 25 °C.

Utilizaram-se cubetas de vidro com capacidade para 4,0 mL e caminho óptico de 1 cm, nas quais foram adicionados 750  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de tampão 0,1 mol L<sup>-1</sup> MES (pH 3,5 a 6,5), HEPES (pH 7,0 a 8,0) e CHES (9,0 a 9,5) com força iônica mantida constante ( $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , LiClO<sub>4</sub>), 100  $\mu\text{L}$  de uma solução em acetonitrila do complexo ( $[\text{C}]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), e 400  $\mu\text{L}$  de acetonitrila. A reação foi iniciada com a adição de 250  $\mu\text{L}$  de uma solução em acetonitrila do substrato ( $[\text{S}]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). Os experimentos cinéticos em condições de excesso de substrato, para determinação dos parâmetros de ativação, foram realizados nas mesmas condições, porém alterando o volume de acetonitrila e de solução de substrato mantendo a proporção CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (50:50, %v/v), para que a concentração de substrato variasse de  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  a  $5,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Correções de hidrólise espontânea do substrato 2,4-BDNPP foram realizadas sob condições idênticas, sem a adição do complexo.

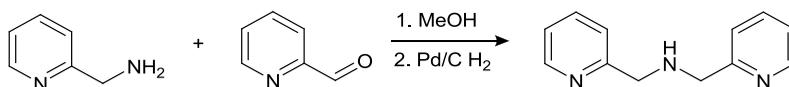
A determinação do número de moléculas de substrato hidrolisadas por molécula de complexo foi realizada pelo acompanhamento espectrofotométrico em 445 nm ( $\epsilon = 3600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) na condição de 50 vezes de excesso do substrato ( $[\text{S}]_{\text{final}} = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) em relação ao complexo ( $[\text{C}]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Realizou-se também o acompanhamento da reação estequiométrica em 400 nm entre os complexos e o substrato ( $[\text{C}]_{\text{final}} = [\text{S}]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) durante 55 horas a 50°C. Em todos os experimentos cinéticos a correção da hidrólise espontânea do substrato foi realizada.

O estudo do efeito isotópico de deutério na hidrólise do 2,4-BDNPP pelos complexos foi realizado pelo acompanhamento de duas reações paralelas onde as soluções tampões HEPES pH e pD = 6,5 (corrigido) para o complexo 1 e pH, pD = 7,0 (corrigido) para o complexo 2 foram previamente preparadas em H<sub>2</sub>O e D<sub>2</sub>O. As reações foram monitoradas sob condições de 100 vezes de excesso do substrato em 400 nm a 25 °C para ambos os complexos.

### 3.3. SÍNTESES

#### 3.3.1. Síntese do ligante

##### 3.3.1.1. Síntese do pró-ligante BPMA – bis(piridilmetil)amina



O procedimento descrito foi realizado de acordo com Neves et al. (1996). Em um balão de 250 mL contendo uma solução metanólica de 2-(aminometil)piridina (10,8 g, 100 mmol,  $108,14 \text{ g mol}^{-1}$ ) em banho de gelo, foi adicionado lentamente através de um funil de adição o 2-piridilcarboxialdeído (10,7 g, 100 mmol,  $107,11 \text{ g mol}^{-1}$ ). Após a adição, retirou-se o banho de gelo e a reação permaneceu sob agitação por 1 hora. A solução foi então transferida para um recipiente adequado e 1 g de paládio/carbono 5% foi adicionado lentamente a essa solução e a mesma foi mantida sob atmosfera de hidrogênio 40 psi e agitação por 15 horas. A mistura foi filtrada para separar o catalisador e o solvente foi evaporado a pressão reduzida a  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . O produto obtido apresentou-se como um óleo amarelo com rendimento de 85% (16,93 g, 85 mmol,  $199,26 \text{ g mol}^{-1}$ ).

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ ,ppm: 2,53 (s, 1H, NH); 3,99 (s, 4 H,  $\text{CH}_2$ ); 7,15 (dd, 2H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ); 7,35 (d, 2H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ); 7,63 (dt, 2H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ); 8,56 (d, 2H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ).

IV (KBr) em  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu$  (N-H) 3300;  $\nu$  ( $\text{C-H}_{\text{ar}}$  e  $\text{C-H}_{\text{alif}}$ ) 3062-2828;  $\nu$  ( $\text{C=N}$  e  $\text{C=C}$ ) 1592-1434;  $\nu$  (C-N) 1148;  $\delta$  ( $\text{C-H}_{\text{ar}}$ ) 758.

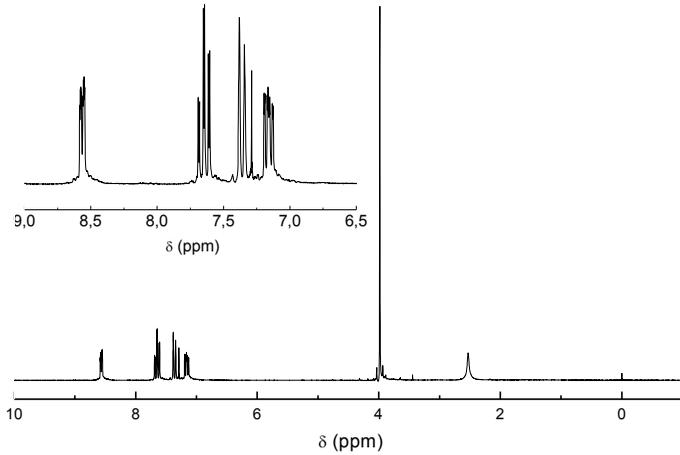


Figura 12. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do BPMA.

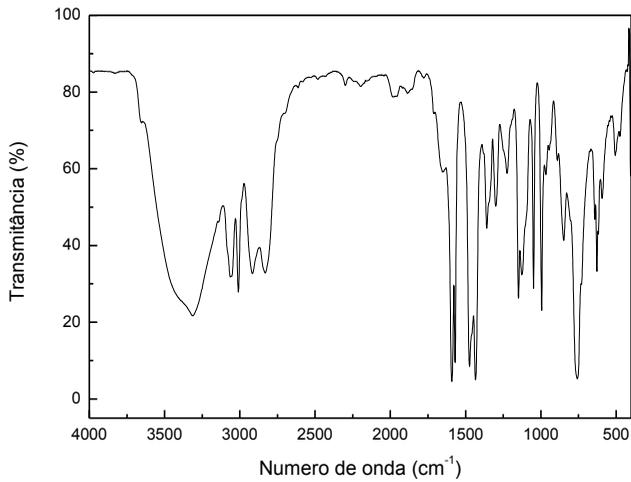
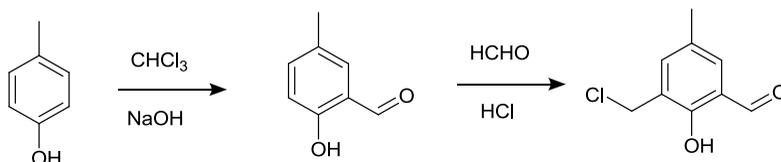


Figura 13. Espectro de IV em KBr do BPMA.

### 3.3.1.2. Síntese do pró-ligante CMFF – 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol



Inicialmente preparou-se o 2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (HMB) através de uma reação de formilação do *p*-cresol (THOER, 1988). Em um balão de 3 bocas de 5000 mL, equipado com um agitador mecânico e um condensador, adicionou-se o *p*-cresol (21,6 g, 200 mmol, 108,14 g mol<sup>-1</sup>) em 1,5 L de clorofórmio. A solução foi mantida sob agitação com temperatura controlada entre 56 – 60 °C com um banho. Iniciou-se então a adição de NaOH (60 g, 1,5 mmol, 40,00 g mol<sup>-1</sup>), solubilizado em 100 mL de água destilada, em pequenas porções durante 3 horas. A reação foi mantida por mais uma hora e então deixou-se o sistema resfriar a temperatura ambiente. Adicionou-se aproximadamente 500 mL de água destilada e, sob agitação, acidificou-se com HCl concentrado até pH = 2. A fase orgânica foi separada, lavada com água destilada, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e o solvente foi retirado à pressão reduzida. O produto foi então destilado à pressão reduzida. Obteve-se o HMB como um sólido branco. O sólido foi solubilizado em um mínimo de diclorometano e purificado com coluna cromatográfica em sílica, utilizando diclorometano como eluente. O solvente foi retirado à pressão reduzida e obteve-se um sólido cristalino.

Em um balão de 500 mL adicionou-se o HMB (6,4 g, 47 mmol, 136,15 g mol<sup>-1</sup>), formaldeído 37% (3,81 g, 94 mmol) e ácido clorídrico concentrado (25 mL). O sistema foi mantido sob refluxo e agitação por 30 minutos e, na sequência, resfriado a 0 °C, formando um precipitado compacto no fundo do balão, que foi triturado, filtrado sob vácuo e recristalizado a quente em diclorometano. Obteve-se um sólido branco, que foi deixado no dessecador com sílica sob vácuo para secar. P.F.: 94-96 °C com rendimento de 85% (7,4 g, 40 mmol, 184,62 g mol<sup>-1</sup>) em relação ao HMB.

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ ,ppm: 2,35 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 4,67 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 7,35 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ); 7,46 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ); 9,86 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{ald}}$ ); 11,25 (s, 1H,  $\text{OH}_{\text{fenol}}$ ).

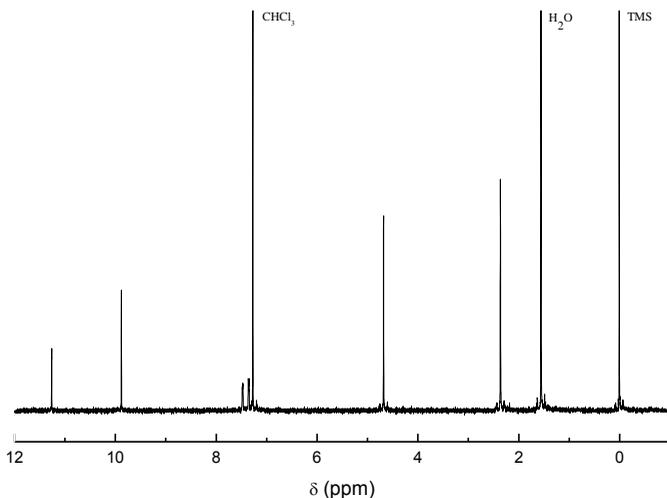


Figura 14. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do CMFF.

IV (KBr) em  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu$  (C-Har e C-Halif) 3028-2850;  $\nu$  (C-Hald) 2746;  $\nu$  (C=O) 1663;  $\nu$  (C=C) 1600-1470;  $\delta$  (O-Hfenol) 1372;  $\nu$  (C-Ofenol) 1256;  $\delta$  (C-Har) 703;  $\nu$  (C-Cl) 612.

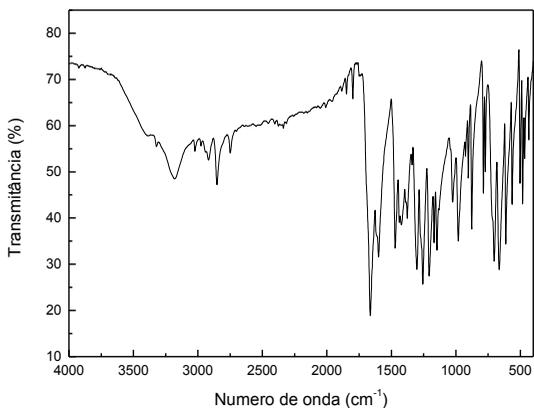
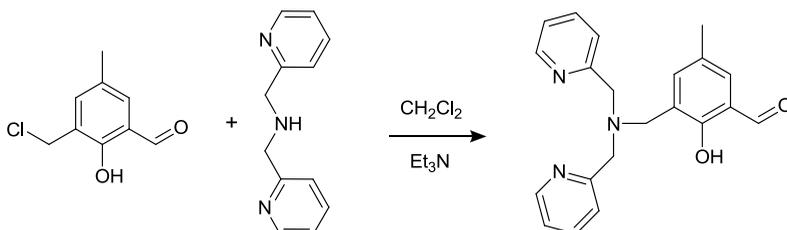


Figura 15. Espectro de IV em KBr do CMFF.

### 3.3.1.3. Síntese do pró-ligante bpmamff – 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formilfenol



O procedimento experimental foi realizado de acordo com a rota descrita por Karsten e colaboradores (KARSTEN, 2002). Em um balão de 250 mL, foi adicionado cmff (5,6 g, 30 mmol,  $184,62 \text{ g mol}^{-1}$ ) dissolvido em diclorometano (80 mL). Sob agitação e a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ , foram adicionados lentamente, 80 mL de uma solução de bpma (6,0 g, 30 mmol,  $199,26 \text{ g mol}^{-1}$ ) em diclorometano. Após completa adição, o banho de gelo foi removido e o sistema permaneceu sob agitação por 3 horas à temperatura ambiente. A solução foi então transferida para um funil de separação e foi lavada com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi separada e seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado sob vácuo a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  e o óleo resultante foi dissolvido em 40 mL de propan-2-ol a quente em um béquer. Após algumas horas formou-se um precipitado cristalino que foi filtrado em funil de placa porosa, lavado com éter gelado e deixado secar. O produto foi obtido na forma de um sólido amarelo com um rendimento de 78 % (8,1 g, 23,4 mmol,  $347,42 \text{ g mol}^{-1}$ ).

RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ ,ppm: 2,27 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 3,80 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 3,89 (s, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 7,21 (m, 3H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ); 7,44 (m, 3H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ); 7,65 (dt, 2H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ); 8,58 (d, 2H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ); 10,43 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{ald}}$ ).

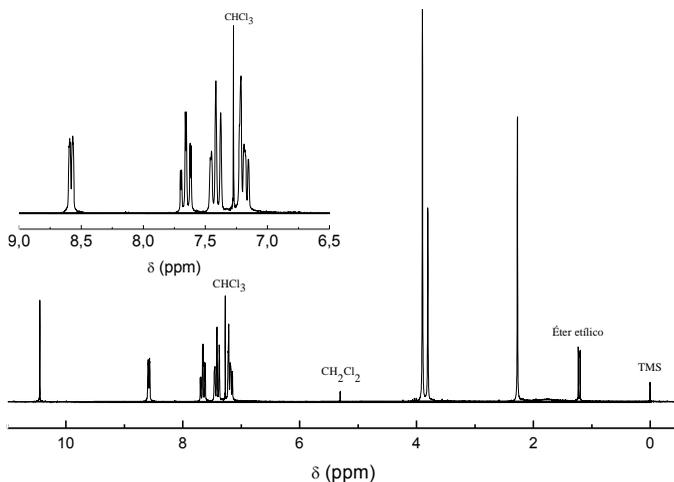


Figura 16. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do bpmamff.

IV (KBr), em  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu$  ( $\text{C-H}_{\text{Ar}}$  e  $\text{C-H}_{\text{Alif}}$ ) 3038-2849;  $\nu$  ( $\text{C=O}$ ) 1680;  $\nu$  ( $\text{C=N}$  e  $\text{C=C}$ ) 1591-1437;  $\delta$  ( $\text{O-H}_{\text{fenol}}$ ) 1378;  $\nu$  ( $\text{C-O}_{\text{fenol}}$ ) 1276;  $\nu$  ( $\text{C-N}$ ) 1114;  $\delta$  ( $\text{C-H}_{\text{Ar}}$ ) 773.

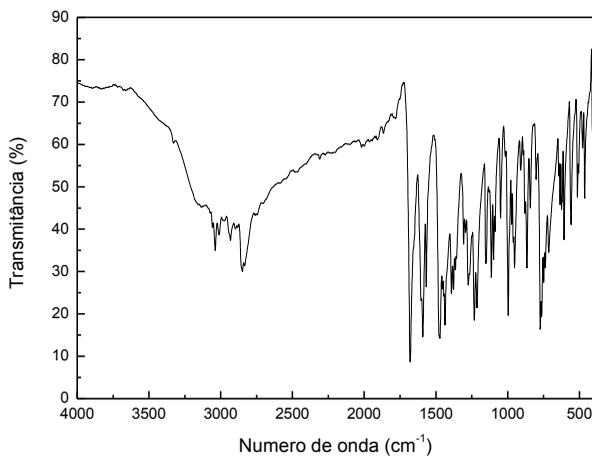
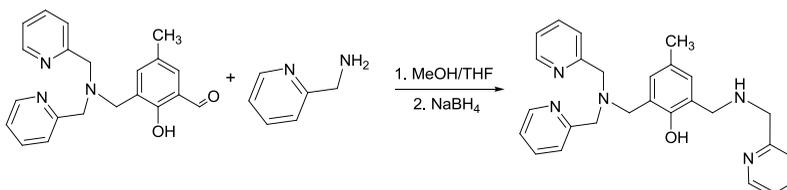


Figura 17. Espectro de IV em KBr do bpmamff.

### 3.3.1.4. Síntese do pró-ligante Hpy<sub>3</sub> – 2-[*N*-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[*N*-(2-piridilmetil)aminometil]fenol



A reação de aminação redutiva seguiu procedimento descrito na literatura (GREATTI, 2008). Em um balão de 250 mL dissolveram-se 3,07 g (8,8 mmol, 347,42 g mol<sup>-1</sup>) em 80 mL de CH<sub>3</sub>OH/THF 50% v/v. A esta solução adicionou-se 2-(aminometil)piridina (0,97g, 9,0 mmol, 108,14 g mol<sup>-1</sup>). Essa solução, de coloração amarela intensa, permaneceu sob agitação por 1 hora. Após esse período iniciou-se a redução da imina a partir da adição lenta de boro-hidreto de sódio (0,38 g, 10 mmol). Ao final da adição a solução apresentava uma coloração amarela pálida. A mistura reacional permaneceu sob agitação por mais 1 hora e então o solvente foi evaporado à pressão reduzida a 40°C. O óleo resultante foi dissolvido em 60 mL de diclorometano e permaneceu por agitação por 15 minutos na presença de uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi lavada com a mesma solução aquosa (5x50 mL) em um funil de separação, foi então separada, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi retirado a vácuo. O óleo resultante foi deixado à pressão reduzida por 6 horas. Rendimento 95 % (3,7 g, 8,4 mmol, 439,56 g mol<sup>-1</sup>).

RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ,ppm: 2,22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,73 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,86 (s, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,86 (s, 4H, CH<sub>2</sub>); 3,94 (s, 4H, CH<sub>2</sub>); 6,88 (s, 1H, CH<sub>ar</sub>); 6,94 (s, 1H, CH<sub>ar</sub>); 7,16 (dd, 3H, CH<sub>ar</sub>); 7,36 (d, 3H, CH<sub>ar</sub>); 7,60 (td, 2H, CH<sub>ar</sub>); 8,55 (d, 2H, CH<sub>ar</sub>).

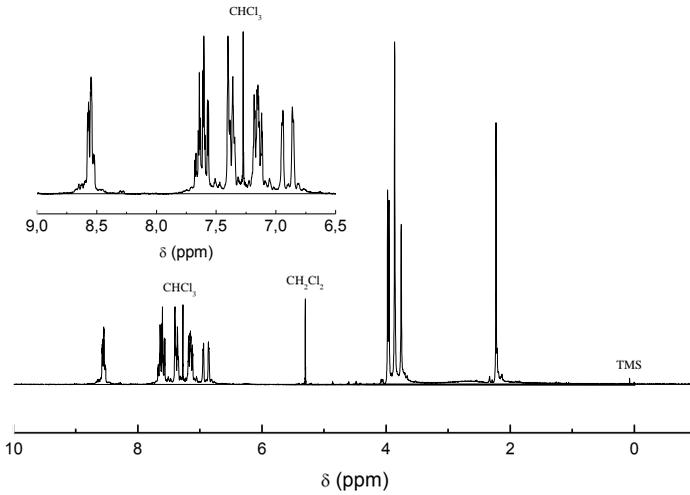


Figura 18. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do  $\text{Hpy}_3$ .

IV (filme sobre KBr), em  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu$  ( $\text{C-H}_{\text{Ar}}$  e  $\text{C-H}_{\text{Alif}}$ ) 3061-2824;  $\nu$  ( $\text{C=N}$  e  $\text{C=C}$ ) 1592-1434;  $\delta$  ( $\text{O-H}_{\text{fenol}}$ ) 1364;  $\nu$  ( $\text{C-O}_{\text{fenol}}$ ) 1233;  $\nu$  ( $\text{C-N}$ ) 1149;  $\delta$  ( $\text{C-H}_{\text{Ar}}$ ) 761.

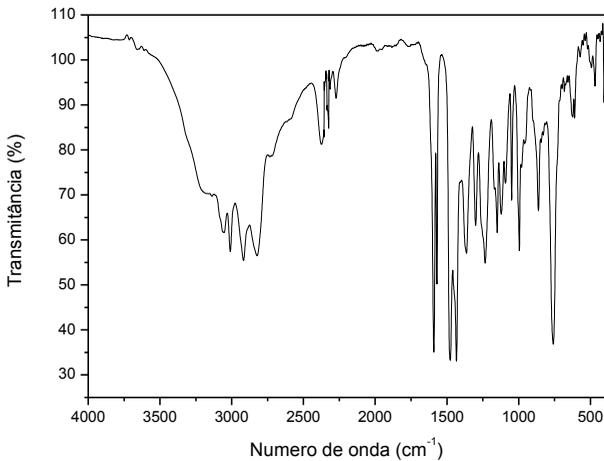
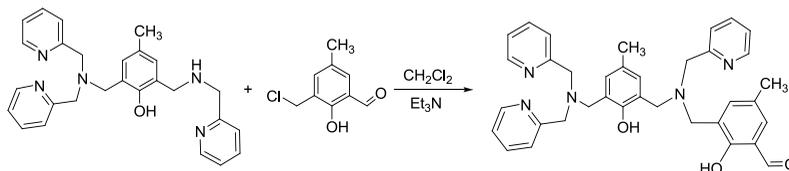


Figura 19. Espectro de IV em KBr do  $\text{Hpy}_3$ .

### 3.3.1.5. Síntese do ligante H<sub>2</sub>py<sub>3</sub>mff – 2-[*N*-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[*N*-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol



O ligante H<sub>2</sub>py<sub>3</sub>mff foi sintetizado segundo Piovezan et al. (PIOVEZAN, JOVITO, et al. 2010).

Em um balão de 250 mL adicionaram-se 3,7 g (8,4 mmol, 439,56 g mol<sup>-1</sup>) de Hpy<sub>3</sub>, trietilamina (1,4 mL, 10 mmol) e 60 mL de diclorometano. A esta solução adicionou-se cmff (1,7 g, 9,2 mmol, 184,62 g mol<sup>-1</sup>) e o sistema permaneceu sob agitação e refluxo por cinco dias. Após esse período a solução foi lavada em um funil de separação com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (7x50 mL). A fase orgânica foi separada, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado a pressão reduzida e 40 °C. Rendimento 82 % (3,0 g, 6,9 mmol, 587,72 g mol<sup>-1</sup>).

RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ,ppm: 2,21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,75-3,90 (m, 12H, CH<sub>2</sub>); 6,86-7,59 (m, 13H, CH<sub>ar</sub>); 8,53 (d, 1H, CH<sub>ar</sub>); 8,55 (dd, 2H, CH<sub>ar</sub>); 10,29 (s, 1H, CH<sub>ald</sub>).

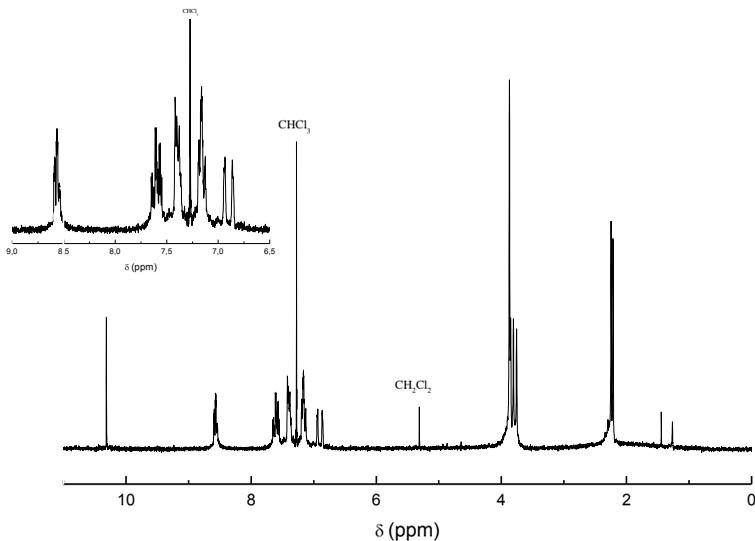


Figura 20. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do  $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ .

IV (KBr), em  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu$  (C-H<sub>ar</sub> e C-H<sub>alif</sub>) 3060-2854;  $\nu$  (C=O) 1678,  $\nu$  (C=N e C=C) 1590-1439;  $\nu$  (C-O) 1265;  $\delta$  (C-H<sub>ar</sub>) 749.

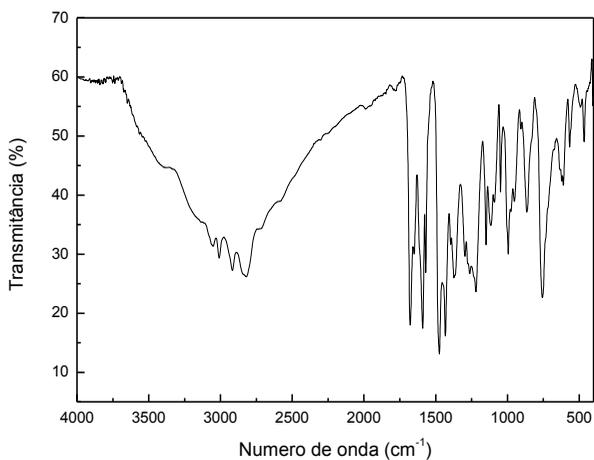
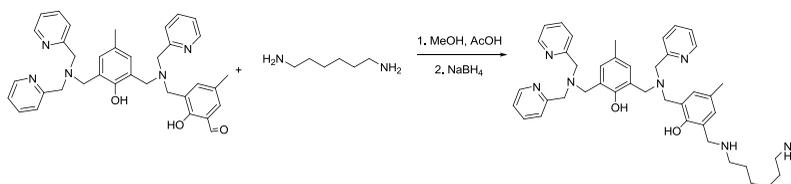


Figura 21. Espectro de IV em KBr do  $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ .

### 3.3.1.6. Síntese do ligante H<sub>2</sub>LHex – 2-({(3-((6-amino-hexil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilfenil)metil}(piridin-2-ilmetil)amino)metil}-6-{{bis(piridin-2-ilmetil)amino}metil}-4-metilfenol



Em um balão de 250 mL, adicionaram-se uma solução de 1,6-hexanodiamina (0,6 g, 5,1 mmol, 116,20 g mol<sup>-1</sup>) em metanol (80 mL) e 3 gotas de ácido acético. Com um funil de adição, acrescentaram-se lentamente 60 mL de uma solução metanólica de H<sub>2</sub>py<sub>3</sub>mff (0,59 g, 1 mmol, 587,72 g mol<sup>-1</sup>). O sistema permaneceu sob agitação por 14 horas e então adicionou-se, em banho de gelo, boro-hidreto de sódio (0,11g, 3 mmol, 37,83 g mol<sup>-1</sup>). A mistura reacional permaneceu por mais duas horas sob agitação e o solvente foi retirado sob vácuo a 40 °C. O produto resultante foi dissolvido em 60 mL de diclorometano e permaneceu por agitação por 15 minutos na presença de uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi lavada com a mesma solução aquosa (6x80 mL) em um funil de separação, foi então separada, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi retirado a vácuo. Rendimento 84 % (0,58 g, 0,84 mmol, 687,92 g mol<sup>-1</sup>).

RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 1,29 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 1,60 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 2,20 (s, 6H, CH<sub>3</sub>); 2,69 (t, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,82 (t, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,73-3,83 (m, 12H, CH<sub>2</sub>); 4,01 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6,83-7,61 (m, 13H, CH<sub>ar</sub>); 8,55 (dt, 3H, CH<sub>ar</sub>).

IV (KBr), em cm<sup>-1</sup>: ν (O-H) 3400; ν (N-H) 3200; ν (C-H<sub>ar</sub> e C-H<sub>alif</sub>) 3060-2830; ν (C=N e C=C) 1610-1425; δ (O-H<sub>fenol</sub>) 1370; ν (C-O<sub>fenol</sub>) 1231; δ (C-H<sub>ar</sub>) 751.

ESI-MS: m/z = 688,60; [M+H] – Massa molar do ligante H<sub>2</sub>Lhex pelo ESI-MS: 687,60 g mol<sup>-1</sup>.

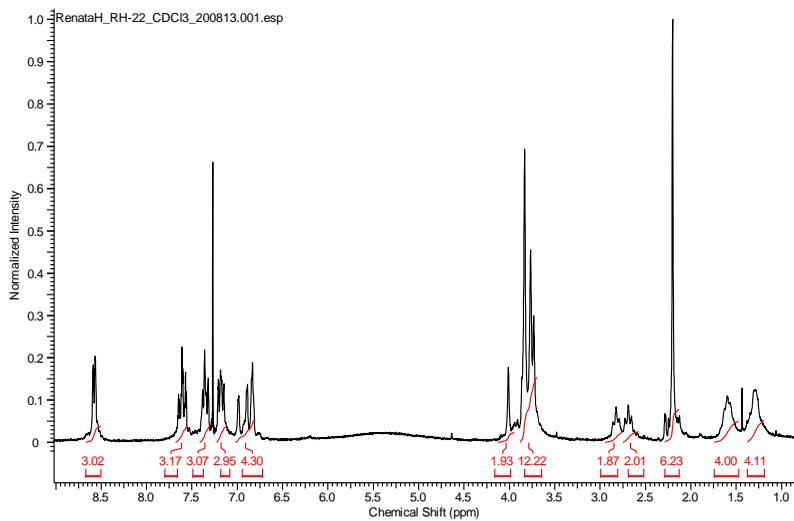
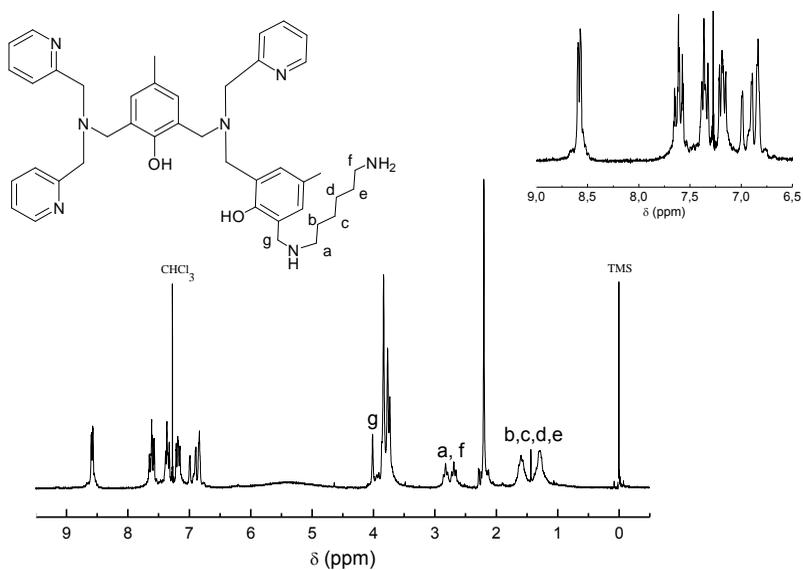


Figura 22. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do  $\text{H}_2\text{LHex}$ .

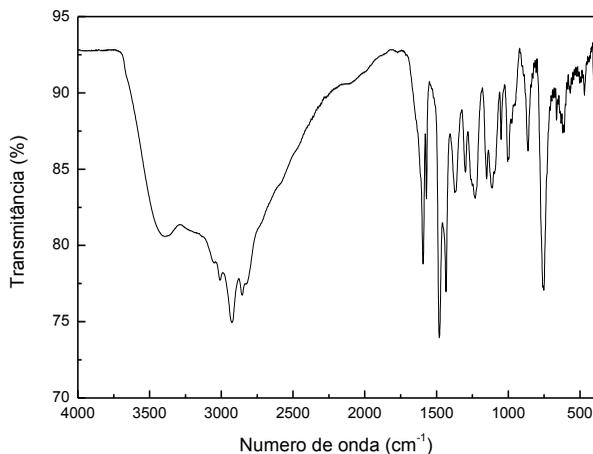
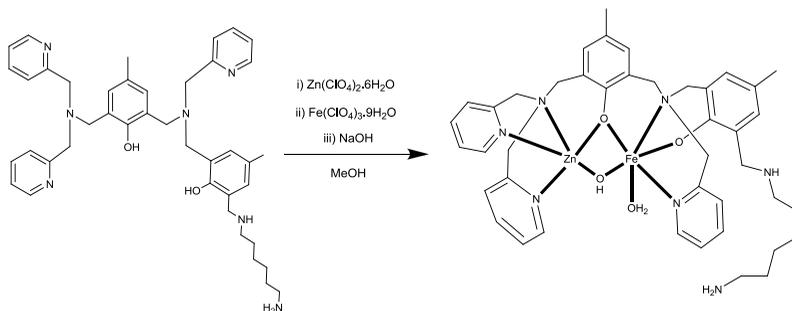


Figura 23. Espectro de IV em KBr do H<sub>2</sub>LHex.

### 3.3.2. Síntese dos complexos

#### 3.3.2.1. Síntese do perclorato de $\mu$ -hidroxo-2-({[(3-{{[(6-amino-hexil)amino]metil}-2-hidroxi-5-metilfenil)metil]}(piridin-2-ilmetil)amino]metil)-6-{{[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil}-4-metilfenol} Ferro(III) Zinco(II) – FeZnH<sub>2</sub>LHex – Complexo 1



Em um béquer de 600 mL adicionou-se uma solução do ligante H<sub>2</sub>LHex (687,9 mg, 1 mmol, 687,92 g mol<sup>-1</sup>) em 200 mL de metanol. Em seguida adicionou-se o perclorato de zinco hexahidratado (372,4 mg, 1 mmol, 372,36 g mol<sup>-1</sup>). A essa mistura

reacional foi adicionada muito lentamente uma solução metanólica de perclorato de ferro(III) nona-hidratado (516,2 mg, 1 mmol,  $516,2 \text{ g mol}^{-1}$ ) (200mL). Após a adição da solução de ferro(III), a solução que inicialmente era amarela pálida, tornou-se roxa intensa. Adicionou-se então três equivalentes de hidróxido de sódio (3 mL de uma solução  $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e a solução tornou-se vermelha intensa. O volume de solvente foi reduzido a 40 mL e a solução foi filtrada em um bquer de 100 mL e deixada cristalizar. Rendimento 62 % (656,70 mg,  $1059,10 \text{ g mol}^{-1}$ ). O produto se apresentou como um pó de coloração púrpura.

IV (KBr), em  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu$  (O-H) 3433;  $\nu$  (N-H) 3255;  $\nu$  (C-H<sub>ar</sub> e C-H<sub>alif</sub>) 3055-2855;  $\nu$  (C=N e C=C) 1605-1425;  $\nu$  (C-N) 1144;  $\nu$  (C-O) 1088;  $\delta$  (C-H<sub>ar</sub>) 628.

ESI-MS:  $m/z = 274,54$ ;  $[M+H]^{3+}$  – Massa molar do complexo catiônico 1:  $822,62 \text{ g mol}^{-1}$ .

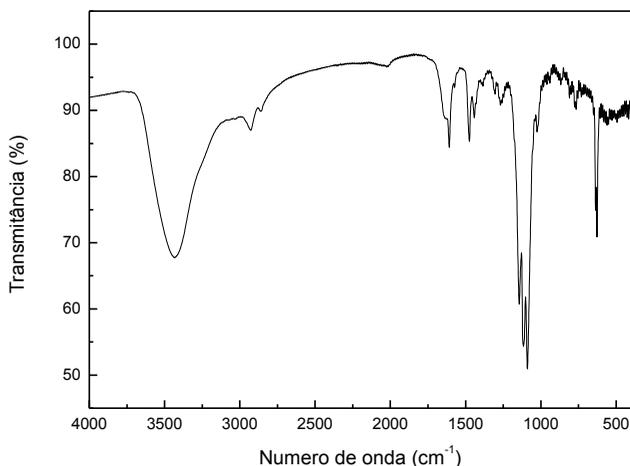
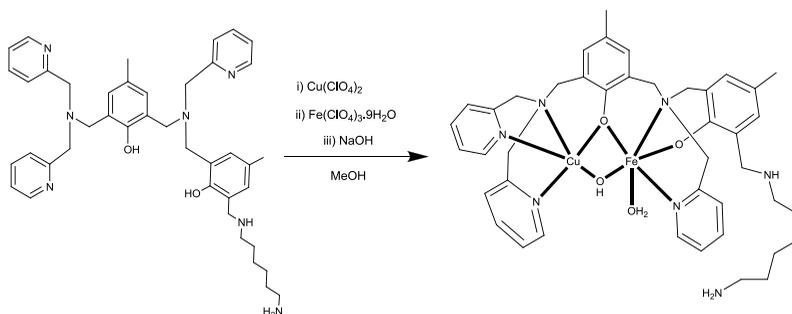


Figura 24. Espectro de IV em KBr do complexo 1.

3.3.2.2. Síntese do perclorato de  $\mu$ -hidroxo-2-((3-((6-aminohexil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilfenil)metil(piridin-2-

ilmetil)amino}metil)-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol Ferro(III) Cobre(II) – FeCuH<sub>2</sub>LHex – Complexo 2



Em um béquer de 600 mL adicionou-se uma solução do ligante H<sub>2</sub>LHex (687,9 mg, 1 mmol, 687,92 g mol<sup>-1</sup>) em 200 mL de metanol. Em seguida adicionou-se o perclorato de cobre(II) (370,5 mg, 1 mmol, 370,54 g mol<sup>-1</sup>). A essa mistura reacional foi adicionada muito lentamente uma solução metanólica de perclorato de ferro(III) nona-hidratado (516,2 mg, 1 mmol, 516,2 g mol<sup>-1</sup>) (200mL). Após a adição da solução de ferro(III), a solução que inicialmente era amarela pálida, tornou-se roxa intensa. Adicionou-se então três equivalentes de hidróxido de sódio (3 mL de uma solução 1 mol L<sup>-1</sup>) e a solução tornou-se vermelha intensa. O volume de solvente foi reduzido a 40 mL e a solução foi filtrada em um béquer de 100 mL e deixada cristalizar. Rendimento 74 % (782,28 mg, 1057,10 g mol<sup>-1</sup>). O produto se apresentou como um pó de coloração vermelha.

IV (KBr), em cm<sup>-1</sup>: v (O-H) 3415; v (N-H) 3228; v (C-H<sub>ar</sub> e C-H<sub>alif</sub>) 3042-2851; v (C=N e C=C) 1607-1443; v (C-N) 1141; v (Cl-O) 1088; δ (C-H<sub>ar</sub>) 625.

ESI-MS: m/z = 441,60; [M]<sup>2+</sup> – Massa molar do complexo catiônico **2**: 893,20 g mol<sup>-1</sup>.

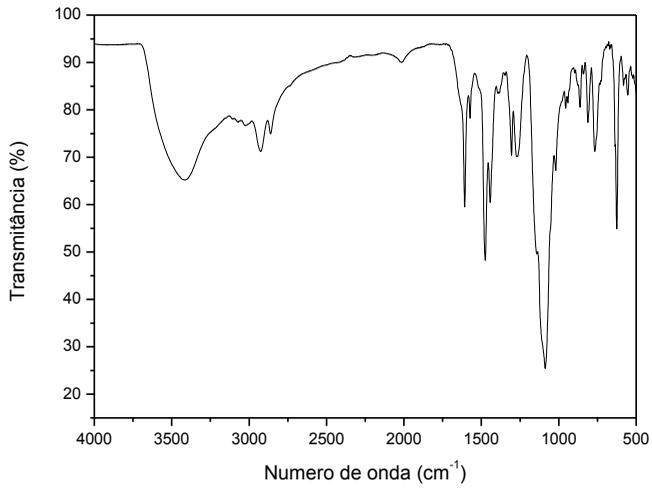


Figura 25. Espectro de IV em KBr do complexo **2**.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES

Os precursores bpma, bpmamff, Hpy<sub>3</sub> e os ligantes H<sub>2</sub>py<sub>3</sub>mff e H<sub>2</sub>LHex (Figura 26) foram obtidos com bons rendimentos e grau de pureza adequado de acordo com os procedimentos descritos na seção experimental. Os precursores e o ligante H<sub>2</sub>py<sub>3</sub>mff foram caracterizados por RMN de <sup>1</sup>H e espectrofotometria de IV e o ligante H<sub>2</sub>LHex foi também caracterizado por espectrometria de massas (ESI-MS).

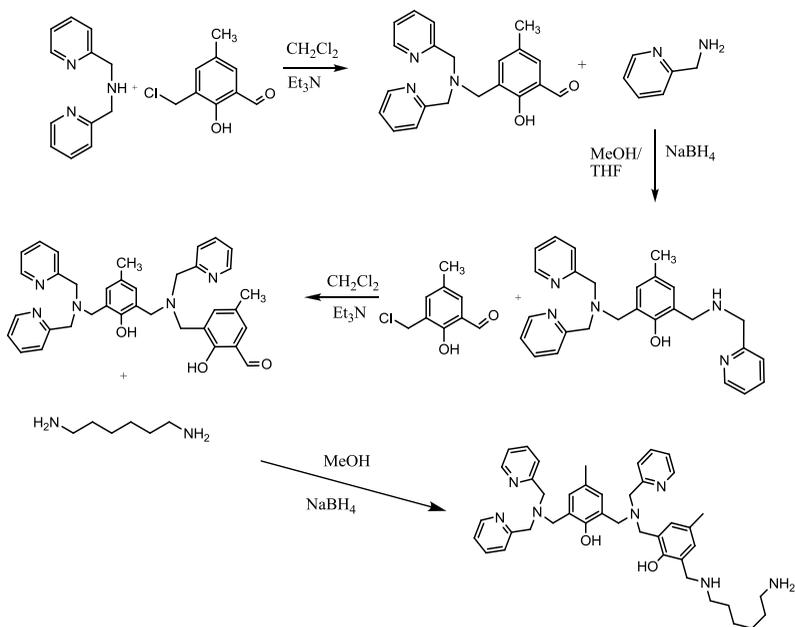


Figura 26. Rota sintética do ligante H<sub>2</sub>LHex.

O ligante H<sub>2</sub>LHex foi sintetizado a partir de uma aaminação redutiva entre o ligante H<sub>2</sub>py<sub>3</sub>mff e a 1,6-hexanodiamina em um sistema bastante diluído a partir da adição lenta do ligante contendo o grupo funcional aldeído sobre a diamina para obtenção do produto desejado e o ácido acético foi adicionado à solução contendo a amina para atuar como um catalisador ácido

e também como uma forma de proteção para a amina e garantir a entrada de apenas um ligante  $H_2py_3mff$  sobre a diamina. O espectro de RMN de  $^1H$ , IV e ESI-MS comprovam a obtenção do ligante  $H_2LHex$  e atestam sua pureza para uso na síntese dos complexos.

A espectrometria de massas com ionização por eletrospray aplica-se com sucesso na caracterização de ligantes e complexos em solução, produzindo íons em fase gasosa diretamente da solução contendo o composto a ser analisado, fornecendo informações qualitativas acerca das espécies carregadas existentes em solução. A espectrometria de massas do ligante  $H_2LHex$  mostrou a presença do íon molecular do ligante ( $m/z = 688,60$ ) referente à espécie  $(M+H)$  (Figura 27).

O ligante  $H_2LHex$  é heptadentado, com um braço tridentado macio para coordenação preferencial do  $M(II)$  contendo nitrogênios de duas piridinas e de uma amina alifática como átomos doadores, e um outro braço mais duro, ideal para coordenação do  $M(III)$  contendo um oxigênio de um fenol terminal e nitrogênios de uma piridina e uma amina alifática como átomos coordenantes. O fenol central tem como função atuar como ponte entre os dois metais, mantendo a distância necessária para a atividade catalítica dos complexos. A amina terminal (1,6-hexanodiamina) da cadeia lateral não tem potencial para atuar como coordenante pois em pH de síntese dos complexos a mesma encontra-se protonada ( $pK_a \sim 10$ ).

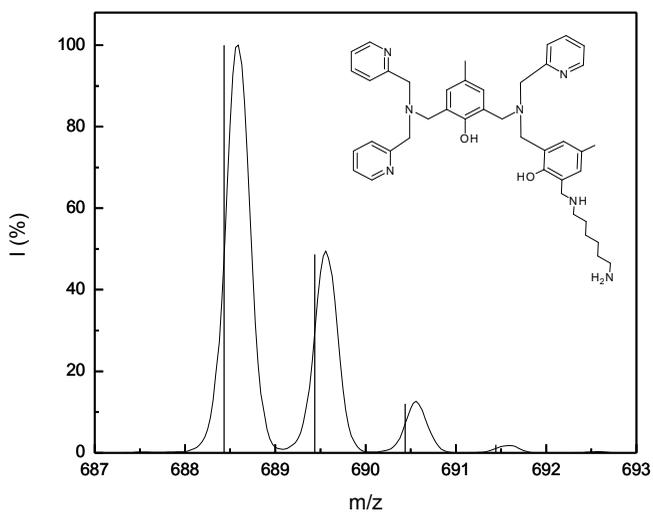
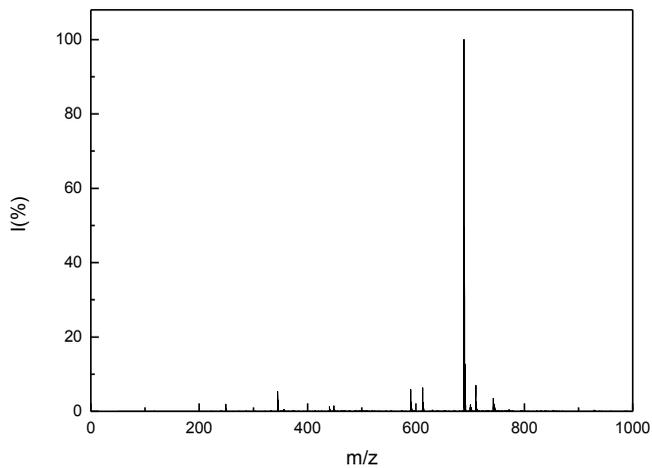


Figura 27. Espectro de ESI-MS do ligante H<sub>2</sub>LHex e respectiva simulação da distribuição isotópica.

## 4.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

Os complexos FeZnH<sub>2</sub>Lhex (**1**) (Figura 28 - esquerda) e FeCuH<sub>2</sub>LHex (**2**) (Figura 28 - direita) foram sintetizados a partir do ligante H<sub>2</sub>LHex e dos sais de perclorato de Fe(III) e Zn(II) e perclorato de Fe(III) e Cu(II), respectivamente, ambos na proporção 1:1:1 (H<sub>2</sub>LHex/Fe(III)/M(II)). Ambos os complexos foram caracterizados através de IV, espectrometria de massas com ionização por eletrospray, espectrofotometria na região do UV-Vis, condutimetria, eletroquímica e titulação potenciométrica e espectrofotométrica.

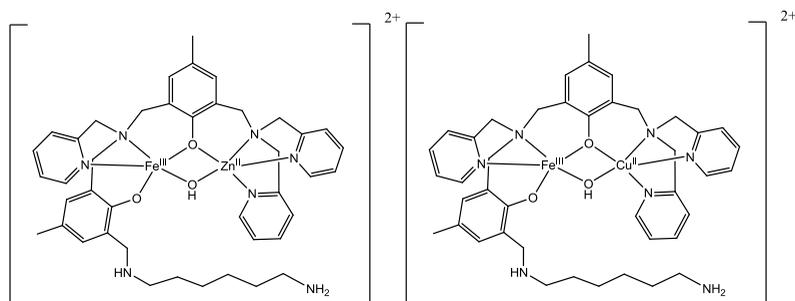


Figura 28. Estruturas propostas para os complexos FeZnH<sub>2</sub>LHex (esquerda) e FeCuH<sub>2</sub>LHex (direita) de acordo com os espectros de massas e estruturas já apresentadas na literatura para compostos semelhantes (CAMARGO, 2013; SOUZA, 2013).

### 4.2.1. Espectrofotometria na região do IV

A análise do espectro de IV traz informações preliminares importantes acerca da formação do complexo uma vez que o mesmo apresenta as bandas referentes ao ligante – algum deslocamento pode ser observado – acrescido das bandas do contra-íon (quando dentro da região estudada) (SILVERSTEIN et al., 1994; NAKAMOTO, 1978). Nos espectros de IV dos complexos **1** e **2** observa-se claramente a existência da banda em 1090 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento axial  $\nu(\text{Cl-O})$  do contra-íon perclorato (NAKAMOTO, 1978) e também as bandas características do ligante H<sub>2</sub>LHex com alguns deslocamentos e mudanças de intensidade, principalmente a redução da intensidade relativa das bandas referentes ao estiramento da ligação C=N da piridina, e ausência da banda em 1231 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>devido ao estiramento C-O<sub>fenol</sub>, indicativo da coordenação desses grupos doadores com o íon metálico. As Figuras 29 e 30 apresentam os espectros dos complexos **1** e **2** e seu ligante, respectivamente. A Tabela 1 traz um comparativo entre as principais bandas do ligante e dos dois complexos.

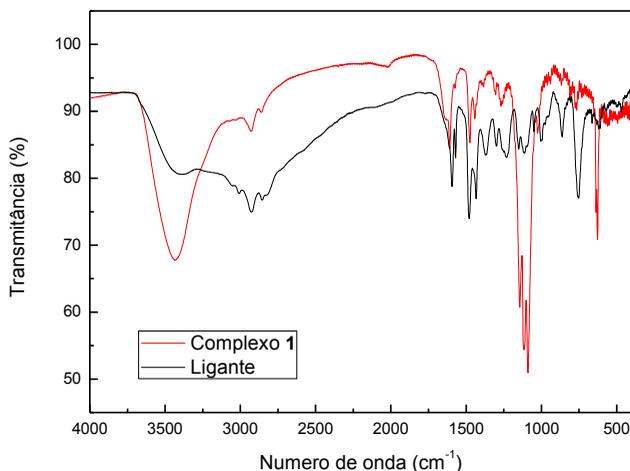


Figura 29. Sobreposição dos espectros na região do IV do ligante H<sub>2</sub>LHex (preto) e do complexo **1** (vermelho).

Tabela 1. Número de onda das bandas referentes aos movimentos vibracionais dos principais grupos funcionais do ligante H<sub>2</sub>LHex e dos complexos **1** e **2**.

Banda	H <sub>2</sub> LHex (cm <sup>-1</sup> )	<b>1</b> (cm <sup>-1</sup> )	<b>2</b> (cm <sup>-1</sup> )
v (O-H)	3400	3433	3415
v (N-H)	3200	3255	3228
v (C-H <sub>Ar</sub> e C-H <sub>Alif</sub> )	3060-2830	3055-2855	3042-2851
v (C=N e C=C)	1610-1425	1605-1425	1607-1443
δ (O-H <sub>fenol</sub> )	1370	-	-
v (C-O <sub>fenol</sub> )	1231	-	-
v (C-N)	1150	1144	1141
v (Cl-O)	-	1088	1088

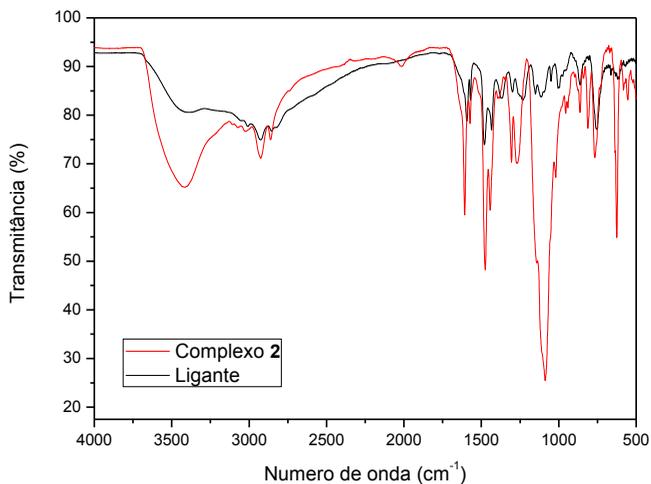


Figura 30. Sobreposição dos espectros na região do IV do ligante H<sub>2</sub>LHex (preto) e do complexo 2 (vermelho).

#### 4.2.2. Espectrometria de massas

Os espectros de massas estão de acordo com a composição esperada para os complexos 1 e 2 em solução. Para o complexo 1 observou-se um conjunto de sinais referente a um cátion trivalente contendo ferro e zinco em sua composição, de acordo com a distribuição isotópica destes elementos químicos (Figura 31). O espectro de 1 apresentou como pico base um conjunto de sinais em  $m/z = 274,54$  com distanciamento entre os picos de 0,33, referente a uma espécie trivalente, estando em concordância com a espécie sugerida na Figura 32.

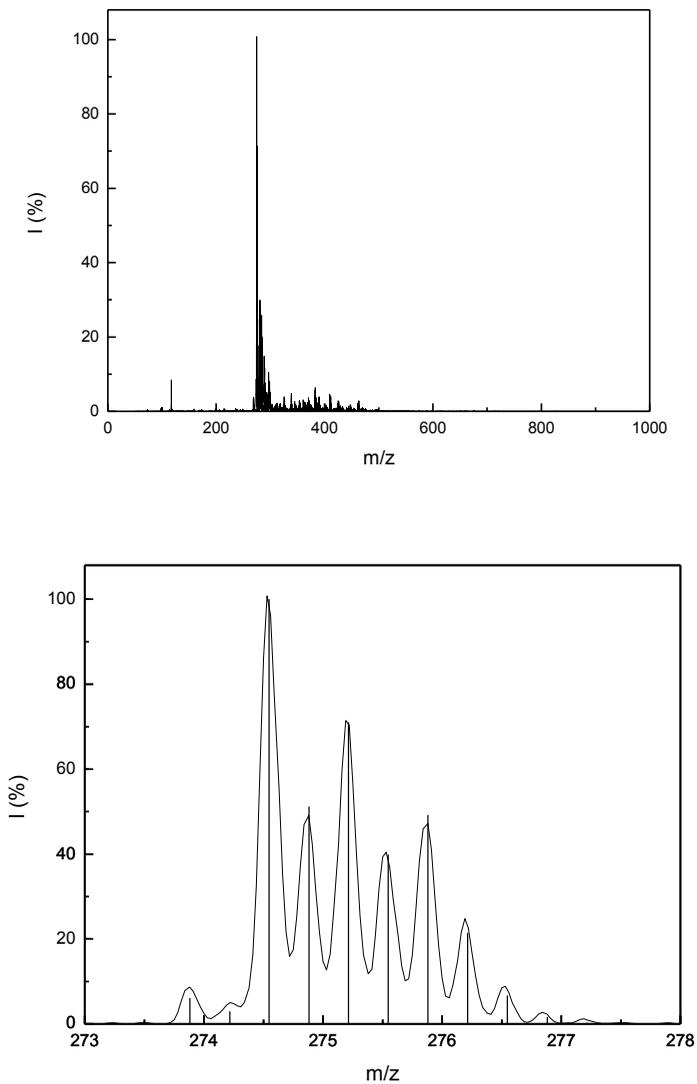


Figura 31. Espectro de ESI-MS do complexo 1 e respectiva simulação da distribuição isotópica.

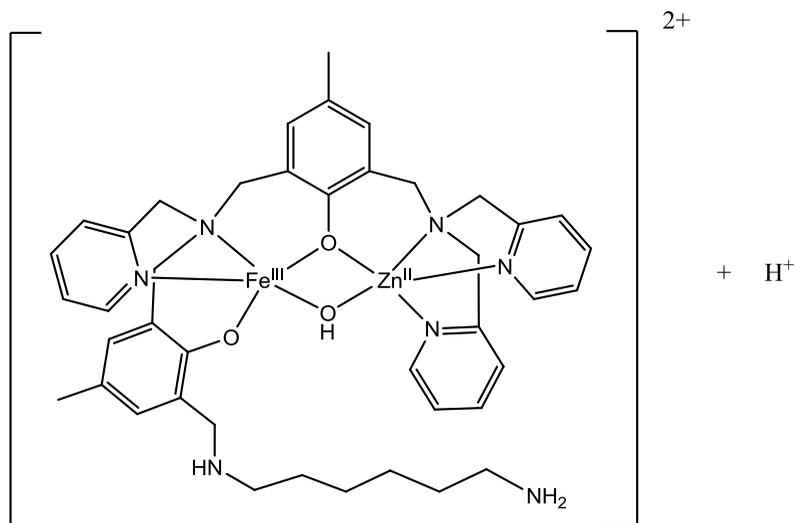


Figura 32. Estrutura proposta para o complexo **1** de acordo com o espectro de ESI-MS.

Para o complexo **2**, o espectro de massas apresentou dois conjuntos de sinais com intensidade significativa em relação aos demais sinais do espectro (Figura 33). O pico base aparece em  $m/z = 446,60$ , atribuído à espécie sugerida na Figura 34. A presença de metanol é justificada pelo uso do mesmo no processo de cristalização do composto e o íon sódio pode ser proveniente da vidraria utilizada na síntese dos compostos bem como de algum procedimento de síntese, tanto do ligante como do próprio complexo (HOFFMANN, 2007). Outro pico bastante intenso situa-se em  $m/z = 441,60$  que foi atribuído a uma espécie contendo os metais em sua forma reduzida (ou seja, Fe<sup>I</sup> e Cu<sup>I</sup>), que pode ser explicado por um processo de redução dos mesmos no próprio processo de ionização por eletrospray (RALPH, 1996), além de um íon Li<sup>+</sup> possivelmente proveniente de vidrarias bem como um Cl<sup>-</sup>, justificado pelo processo de purificação do complexo que foi lavado com clorofórmio, solvente que pode gerar Cl<sup>-</sup> em meio básico (HINE, 1950).

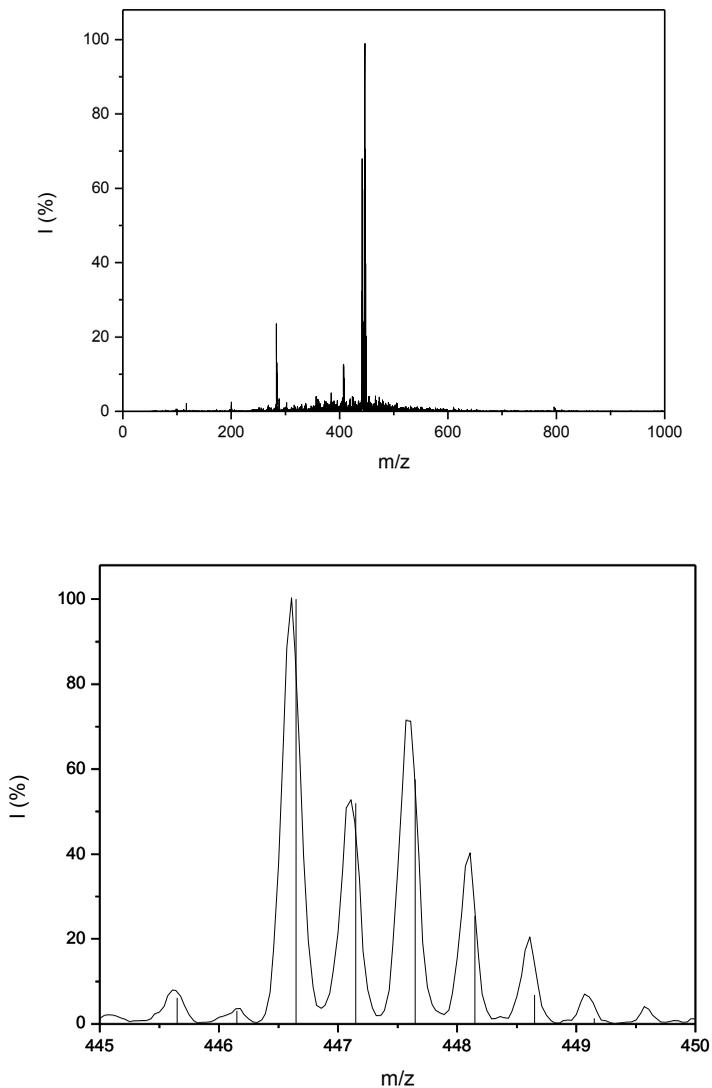


Figura 33. Espectro de ESI-MS do complexo **2** e respectiva simulação da distribuição isotópica.

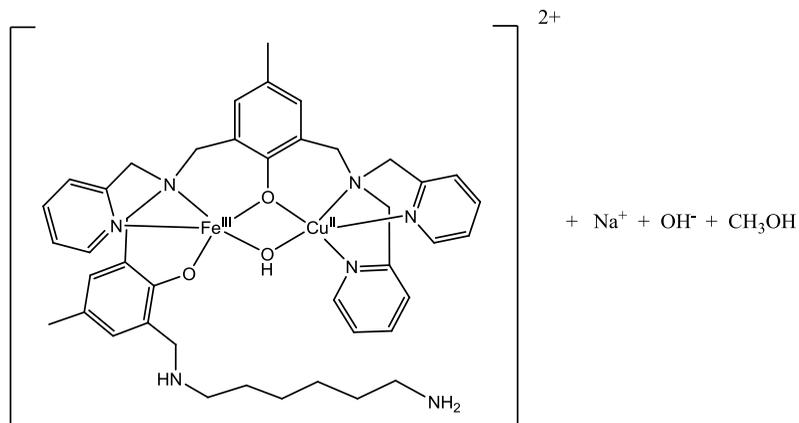


Figura 34. Estrutura proposta para o complexo **2** de acordo com o espectro de ESI-MS.

#### 4.2.3. Condutimetria

A condutimetria dos dois complexos foi realizada em solução dos mesmos em acetonitrila com concentração de  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . O complexo **1** mostrou uma condutividade molar de  $210,46 \text{ } \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  que, quando comparada com a literatura (GEARY, 1971), indica a presença de dois equivalentes de íons positivos por molécula de complexo, inferindo a presença de 2 contra-íons perclorato. O complexo **2** apresentou uma condutividade molar de  $215,94 \text{ } \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ , atestando a proporção 1:2 complexo/contra-íon perclorato. Estes dados estão de acordo com as propostas de estrutura para ambos os complexos (Figura 28).

#### 4.2.4. Espectrofotometria eletrônica na região do UV-vis

Os espectros de absorção na região do UV-vis para os complexos **1** e **2** foram obtidos na região entre 300 e 800 nm, utilizando-se acetonitrila e água como solventes (Figura 35). Em ambos os complexos observa-se uma banda intensa na região

de 500 nm que é atribuída ao processo de transferência de carga ligante  $\rightarrow$  metal (TCLM) proveniente dos orbitais p $\pi$  do fenolato para os orbitais d $\pi^*$  do íon Fe<sup>III</sup>(GABER, MISKOWSKI et al. 1974). Para o complexo **1**(FeZnH<sub>2</sub>LHex), esta banda se apresentou em 520 nm ( $\epsilon = 2282 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) e para o complexo **2**(FeCuH<sub>2</sub>LHex), em 485 nm ( $\epsilon = 2023 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Outra banda TCLM fenolato  $\rightarrow$  ferro(III) é observada na forma de um ombro em 345 e 350 nm para os complexos **1** e **2** respectivamente(NEVES, LANZMASTER et al. 2007). As bandas de transição d-d para os complexos **1** e **2** não puderam ser observadas pois ficaram encobertas pela TCLM próxima a 500 nm. Os espectros de UV-vis no estado sólido apresentaram também a banda de transferência de carga por volta de 500 nm(Tabela 2), o que nos permite concluir que a esfera de coordenação do ligante dinucleante é mantida quando os complexos se encontram em solução de CH<sub>3</sub>CN e CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O. Outra banda de TCLM fenolato  $\rightarrow$  ferro(III) é observada no espectro de UV-vis no estado sólido por volta de 350 nm para os complexos **1** e **2**(NEVES, LANZMASTER et al. 2007).

Tabela 2. Dados dos espectros eletrônicos para os complexos **1** e **2**.

Complexo	$\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)} / \epsilon \text{ (Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)}$		
	ACN	ACN/H <sub>2</sub> O 1:1	Sólido
<b>1</b>	520 / 2282	511 / 2249	510
<b>2</b>	485 / 2023	471 / 1984	500

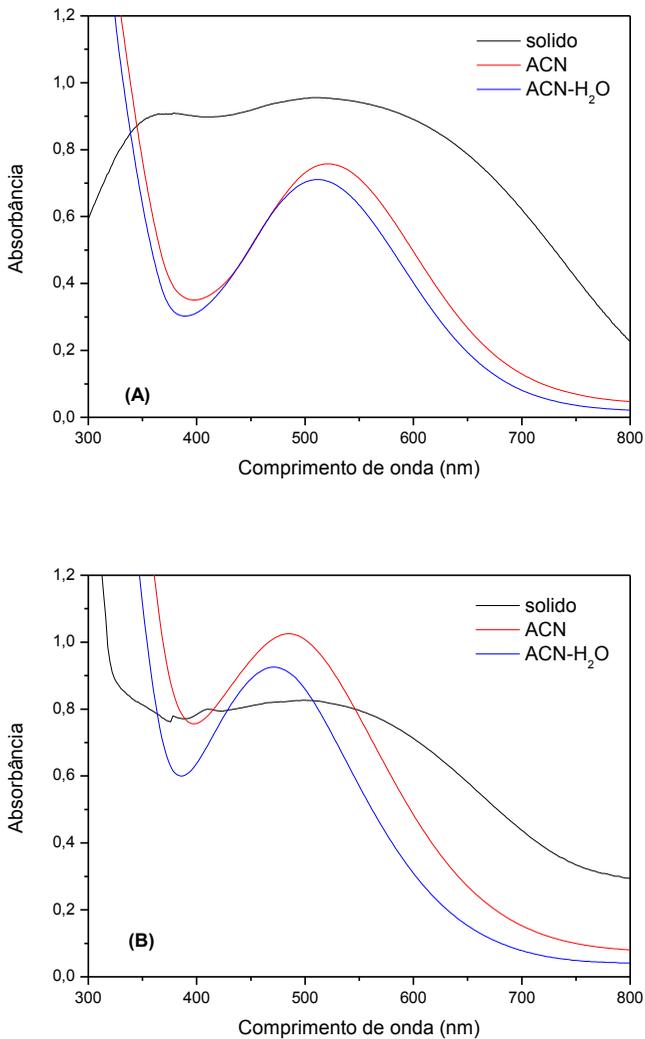


Figura 35. Espectros eletrônicos dos complexos **1**(A) e **2**(B). Solução –  $[C] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e no estado sólido.

Os dados encontrados na espectroscopia eletrônica na região de UV-vis para o complexo **1** estão de acordo com os

valores típicos de comprimento de onda e absorvidade molar para esses sistemas bem como da própria enzima (SCHENK, 2013; CAMARGO, 2013; PIOVEZAN, JOVITO, et al. 2010; GAHAN, SMITH, et al. 2009; JOVITO, 2010).

O grande deslocamento para comprimento de onda mais baixo da banda em 485 nm para o complexo **2** pode ser explicado por condições de síntese, na qual foi usado um excesso de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> e portanto o pH de solução do complexo foi mais alto do que o comum (~8,5), portanto maior parte das espécies em solução estão na forma de (OH)Fe<sup>III</sup>(μ-OH)Cu<sup>II</sup>(OH), justificando a posição da banda (NEVES, et al., 2007, SOUZA, 2013; JOVITO, 2010).

#### 4.2.5. Estudos de equilíbrio químico por titulação potenciométrica e espectrofotométrica

Os equilíbrios químicos em solução aquosa para os complexos **1** e **2** foram determinados via titulação potenciométrica em CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (50:50, %v/v). Nesse experimento objetivou-se a determinação dos valores de pK<sub>a</sub> para as águas coordenadas aos centros metálicos e das aminas da cadeia lateral a fim de compará-los ao valores obtidos para o complexo FeZnLAB (CAMARGO, 2013), para os complexos **1**<sup>a</sup> e **2**<sup>a</sup> (Introdução – p. 28) (JOVITO, 2010) e aos valores obtidos através das medidas cinéticas. Ambos os complexos apresentaram quatro pK<sub>a</sub>s através da titulação potenciométrica, sendo os dois primeiros pK<sub>a</sub>s atribuídos às moléculas de água coordenadas aos centros metálicos (para **1**, Fe<sup>III</sup> e Zn<sup>II</sup> e, para **2**, Fe<sup>III</sup> e Cu<sup>II</sup>) e os dois mais altos atribuídos às aminas da cadeia lateral do ligante H<sub>2</sub>LHex (Tabelas 3 e 4). Os diagramas de espécies e algumas atribuições para os complexos estão apresentados nas Figuras 36 e 37.

Tabela 3. Comparativo entre os valores de pK<sub>a</sub> potenciométricos para os complexo **1**, **1**<sup>a</sup> e FeZnLAB<sup>b</sup>.

	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$	$pK_{a4}$	$pK_{a5}$
<b>1</b>	-	4,40 ± 0,01	6,99 ± 0,07	9,60 ± 0,15	10,56 ± 0,09
<b>1<sup>a</sup></b>	3,33	5,26	8,45	-	-
<b>FeZnLAB<sup>b</sup></b>	-	4,08	7,61	10,32	11,68

<sup>a</sup> (JOVITO, 2010); <sup>b</sup> (CAMARGO, 2013)

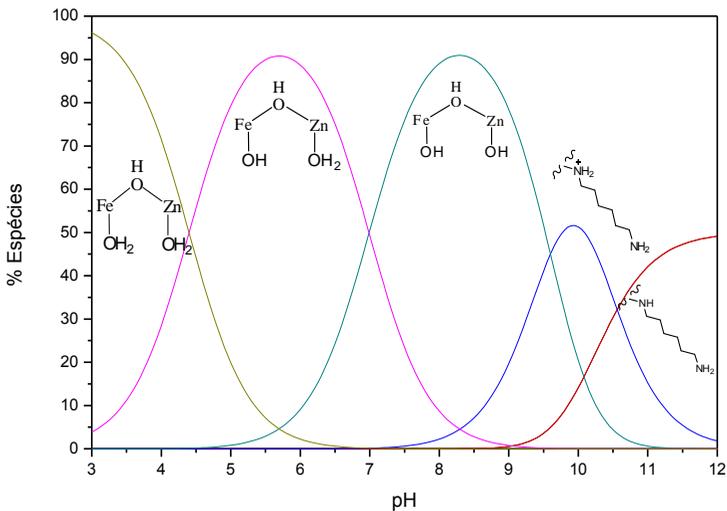


Figura 36. Diagrama de distribuição de espécies para o complexo **1** em acetonitrila/água (50:50, %v/v).

Tabela 4. Comparativo entre os valores de  $pK_a$  potenciométricos para os complexo **2**, **2<sup>a</sup>** e espectrofotométrico para o complexo **1-PEI<sup>b</sup>**.

	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$	$pK_{a4}$	$pK_{a5}$
<b>2</b>	-	5,01 ± 0,01	7,75 ± 0,04	10,18 ± 0,06	11,49 ± 0,02
<b>2<sup>a</sup></b>	3,12	5,07	8,21	-	-
<b>1-PEI<sup>b</sup></b>	-	5,09	7,35	-	-

<sup>a</sup> (JOVITO, 2010); <sup>b</sup> (SOUZA, 2013)

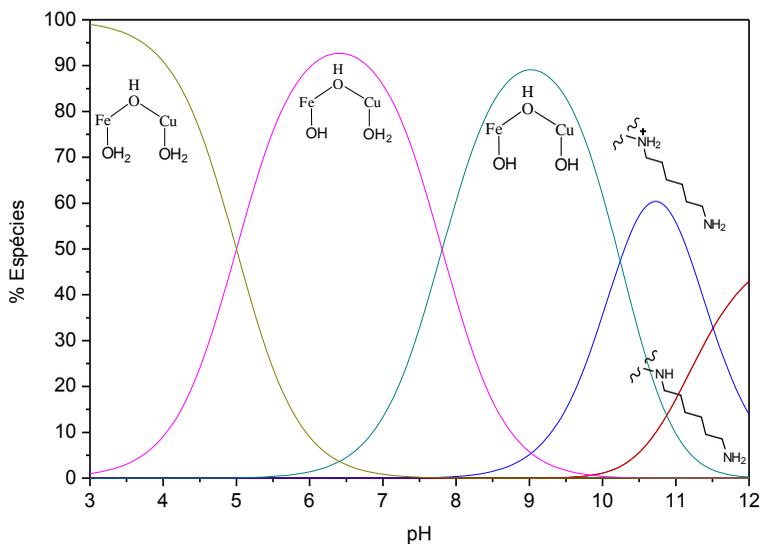


Figura 37. Diagrama de distribuição de espécies para o complexo **2** em acetonitrila/água (50:50, %v/v).

Para melhor visualização, abaixo encontram-se as estruturas dos complexos FeZnLAB e 1-PEI (Figura 38).

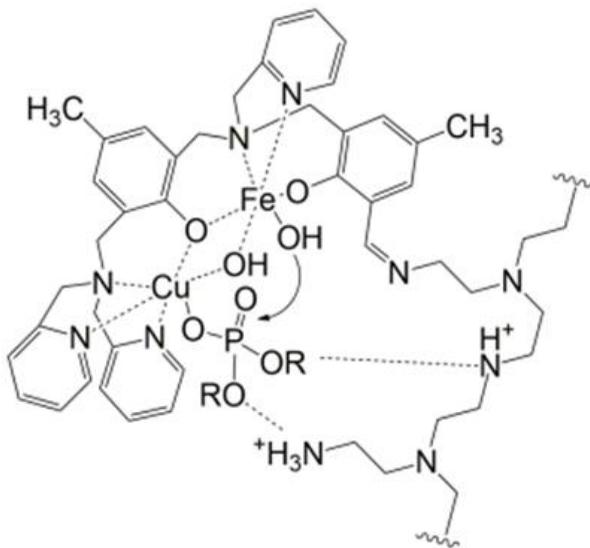
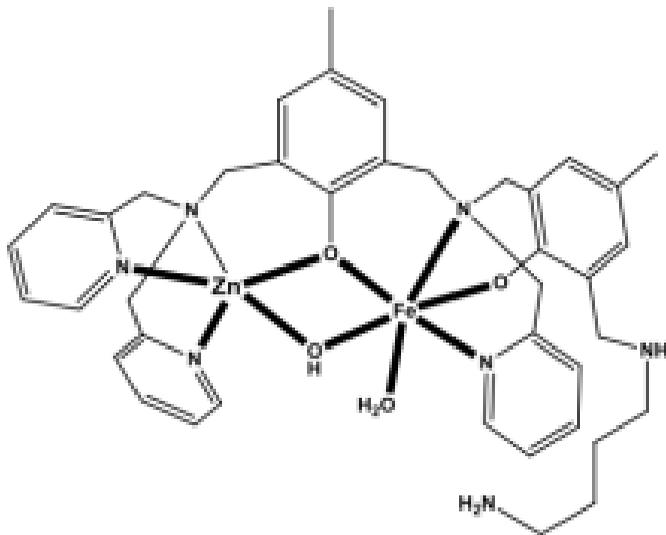
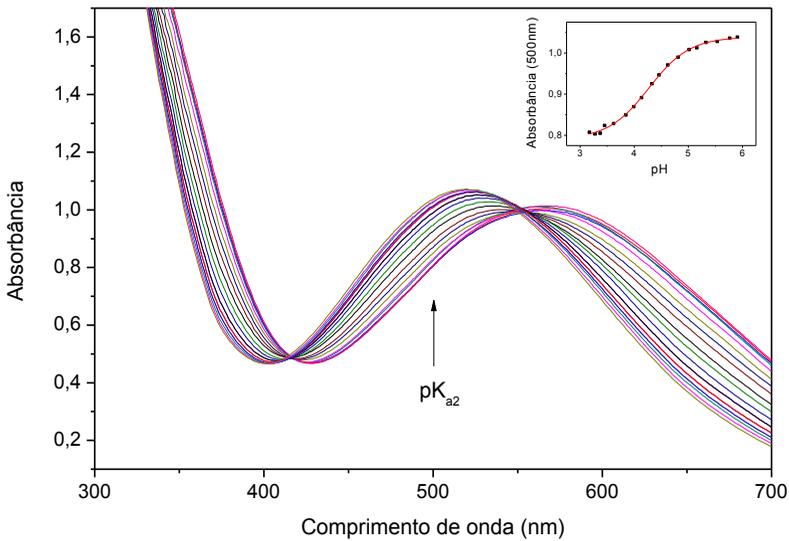
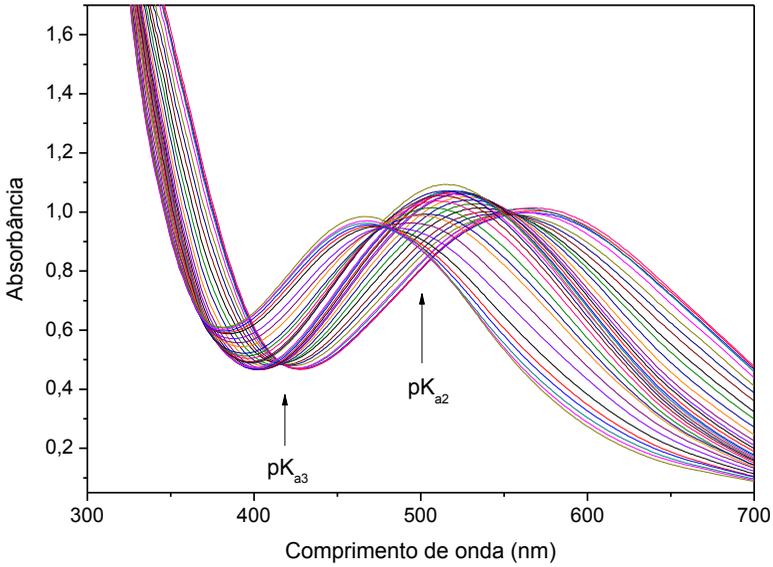


Figura 38. Estruturas dos complexos FeZnLAB (acima) (CAMARGO, 2013) e 1-PEI (abaixo) (SOUZA, 2013).

O  $pK_{a1}$  apresentado para os complexos **1<sup>a</sup>** e **2<sup>a</sup>** é atribuído à formação da ponte  $\mu$ -OH através da desprotonação de uma molécula de água e não foi determinado para os complexos **1** e **2**. O valor de  $pK_{a2}$  para o complexo **1** está cerca de uma unidade abaixo dos valores apresentados para este tipo de complexo sem substituintes amínicos (JOVITO, 2010; PERALTA, 2010), porém é bastante próximo ao valor determinado para o complexo contendo a 1,4-butanodiamina como grupo substituinte no fenolato terminal (FeZnLAB) (CAMARGO, 2013), composto bastante similar ao complexo **1** e foco comparativo para os estudos cinéticos do mesmo. Essa diferença de  $pK_a$  em relação à literatura implica em uma diferente distribuição de espécies com a variação do pH, o que reflete na atividade catalítica desse complexo, que tem atividade máxima em pH menor, como de fato acontece na enzima (TWITCHETT et al., 2002). Para o complexo **2**, essa diferença não é observada e está em concordância com Souza (2013), em que o complexo 1-PEI também apresenta esse comportamento, indicando que a presença dos grupos amino (protonados) na PEI (polietilenoimina) afeta apenas o metal divalente, facilitando a formação do íon hidróxido ligado ao cobre (SOUZA, KREFT, 2013). Para o  $pK_{a3}$  se observa o comportamento de redução em comparação com outros complexos da literatura (JOVITO, 2010; PERALTA 2005; LANZMASTER, 2003), dessa vez para ambos os complexos, com mais significância para o complexo **1**. Essas diferenças de  $pK_a$  mostram que a cadeia da 1,6-hexanodiamina interfere na densidade eletrônica dos metais divalentes nos complexos **1** e **2** e também do Fe(III) no complexo **1** e, conseqüentemente, na acidez dos mesmos (CAMARGO, 2013; SOUZA, 2013). Os  $pK_a$ s 4 e 5 foram atribuídos as aminas da cadeia lateral por estarem dentro da faixa de  $pK_a$  de aminas alifáticas.

A titulação espectrofotométrica (Figura 39 e 40) trouxe valores em concordância com os valores obtidos na titulação potenciométrica (Tabela 5). O deslocamento hipsocrômico do comprimento de onda máximo da banda de transferência de carga fenolato  $\rightarrow$  Fe(III) com o aumento do pH é explicado pelo aumento da densidade eletrônica sobre o átomo de Fe(III) com a mudança do ligante aquo para hidróxido, através da desprotonação dessa água coordenada, levando a um aumento

da diferença de energia entre o orbital  $\pi\pi^*$  do fenolato e do  $d\pi^*$  do metal (HORN, et al. 2010).



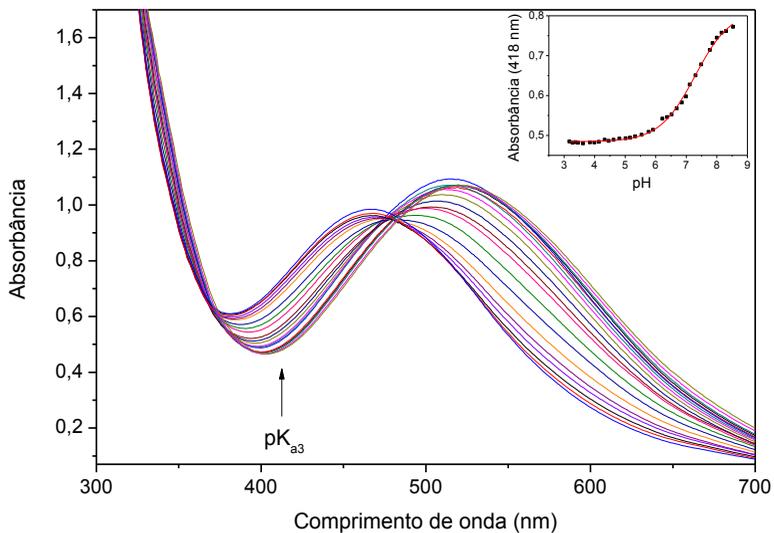
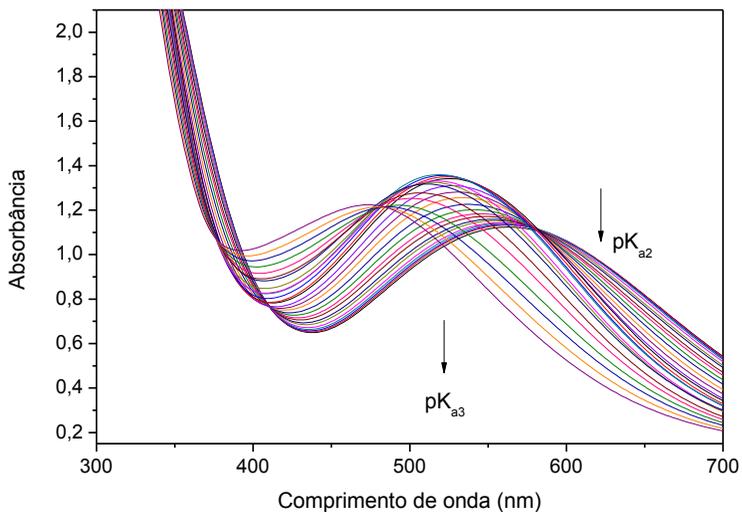


Figura 39. Titulação espectrofotométrica do complexo 1 feita em  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (50:50, %v/v) a 25 °C, 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  em KCl;  $[\text{C}] = 6 \times 10^{-4}$  mol  $\text{L}^{-1}$ .



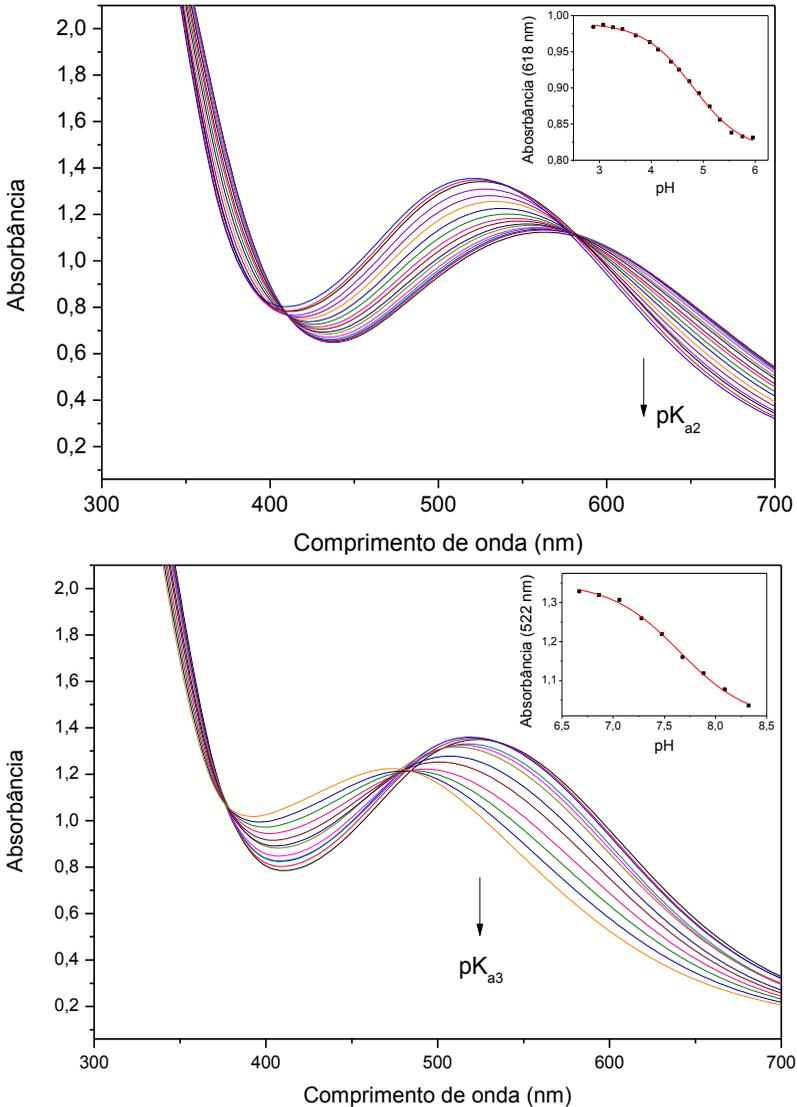


Figura 40. Titulação espectrofotométrica do complexo 2 feita em  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (50:50, %v/v) a  $25^\circ\text{C}$ ,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em KCl;  $[\text{C}] = 6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

Tabela 5. Comparativo entre os valores de  $pK_a$  potenciométricos e espectrofotométricos para os complexo **1** e **2**.

		$pK_{a2}$	$pK_{a3}$
<b>1</b>	<b>Potenciométrico</b>	4,40 ± 0,01	6,99 ± 0,07
	<b>Espectrofotométrico</b>	4,27 ± 0,02	7,29 ± 0,04
<b>2</b>	<b>Potenciométrico</b>	5,01 ± 0,01	7,75 ± 0,04
	<b>Espectrofotométrico</b>	4,80 ± 0,03	7,65 ± 0,04

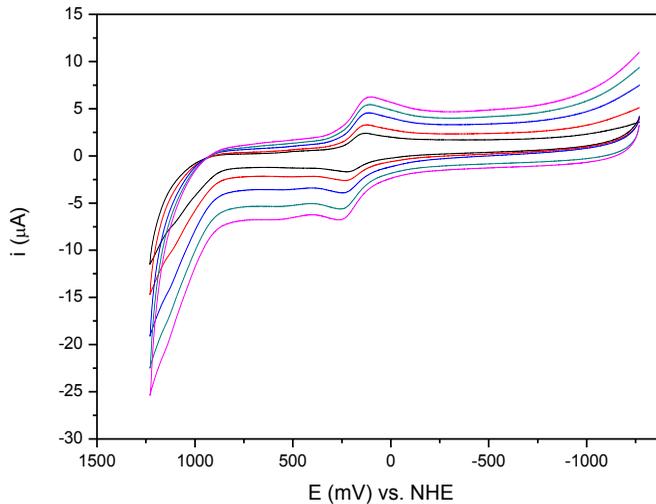
#### 4.2.6. Eletroquímica

Os estudos eletroquímicos revelaram dados importantes dos sistemas em análise e que também estão em concordância com os demais experimentos realizados. Foram realizados estudos em diferentes pHs para ver a influência do mesmo sobre o potencial redox do átomo de ferro nos complexos **1** e **2**.

Os potenciais determinados para o complexo **1** e **2** (contendo a unidade estrutural  $\{Fe^{III}(\mu-OH)M^{II}\}$ ) na região de 200 a -200 mV vs NHE, são atribuídos ao processo *quasi*-reversível de redução do tipo  $Fe^{III} + e^- \rightarrow Fe^{II}$  e possui valores próximos aos determinados para os complexos de mesmo arranjo estrutural já reportados na literatura em meio EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30, %v/v) (PERALTA, 2005; LANZMASTER, 2003). O processo redox observado para o complexo **2**, em -845 mV, é atribuído ao processo  $Cu^{II} + e^- \rightarrow Cu^I$ .

Para o complexo **1** foram realizados experimentos de voltametria cíclica nos pHs 4,11 e 7,95, variando-se a velocidade de varredura (Figura 41 e 42). Os processos referentes ao ferro se mostraram *quasi*-reversíveis e, para pH 4,11 apresenta um  $E_{1/2}$  de 177 mV e para o pH 7,95, um  $E_{1/2}$  de -230 mV. Essa diferença é facilmente explicada pela diferença entre as espécies existentes nesses pHs. Para o pH 4,11, tem-se essencialmente a espécie  $(OH_2)Fe^{III}(\mu-OH)Zn^{II}(OH_2)$  enquanto em pH 7,95,  $(OH)Fe^{III}(\mu-OH)Zn^{II}(OH)$  é a espécie predominante, em concordância com os dados de titulação potenciométrica. Essa

variação na esfera de coordenação do átomo de ferro afeta o seu potencial redox devido à variação de densidade eletrônica do mesmo uma vez que um ligante hidroxilo tem a capacidade de prover maior densidade de carga negativa ao átomo de ferro, estabilizando a espécie Fe(III) em comparação com a espécie  $(\text{OH}_2)\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$ . O átomo de zinco não é redox ativo na faixa de potencial estudada (PERALTA, BORTOLUZZI et al. 2010). O estudo de voltametria de onda quadrada (Figura 43 e 44) está em concordância com os de voltametria cíclica, tanto no pH 4,11 quanto no pH 7,95. Na Tabela 6 estão apresentados os potenciais dos processos de oxidação e redução do par  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ .



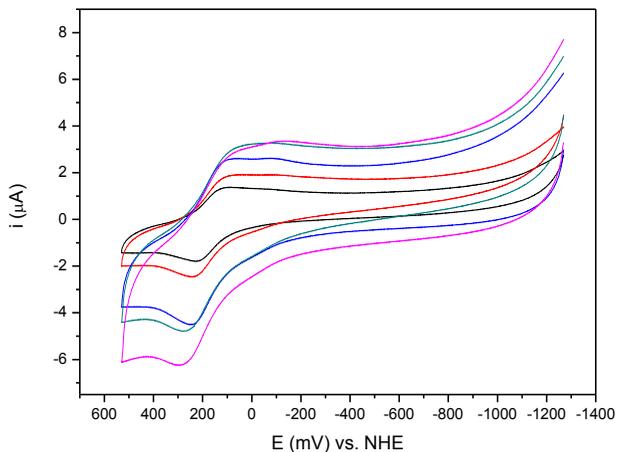


Figura 41. Voltamogramas cíclicos do complexo 1 em EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30, %v/v) (KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 25 °C, com velocidades de varredura de 25, 50, 100, 150 e 200 mV s<sup>-1</sup> em pH 4,11. Os potenciais estão representados versus NHE. [C] = 5 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.

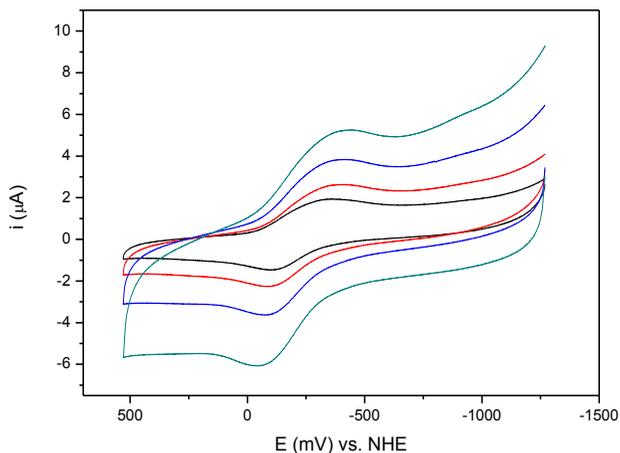


Figura 42. Voltamogramas cíclicos do complexo 1 em EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30, %v/v) (KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 25 °C, com velocidades de varredura de 25, 50, 100 e 200 mV s<sup>-1</sup> em pH 7,95. Os potenciais estão representados versus NHE. [C] = 5 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.

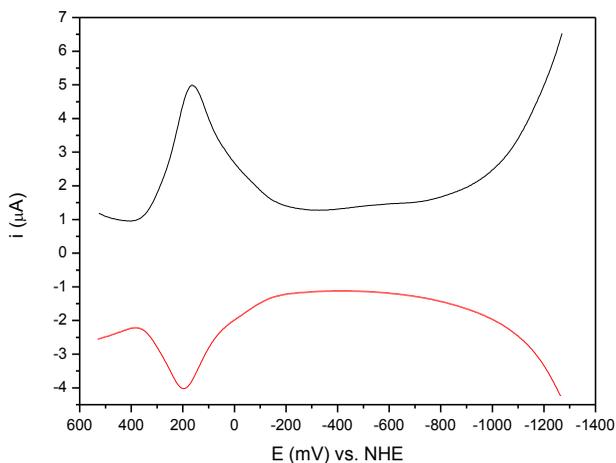


Figura 43. Voltamogramas de onda quadrada do complexo **1** em EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30, %v/v) (KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 25 °C em pH 4,11. Os potenciais estão representados versus NHE. [C] = 5 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.

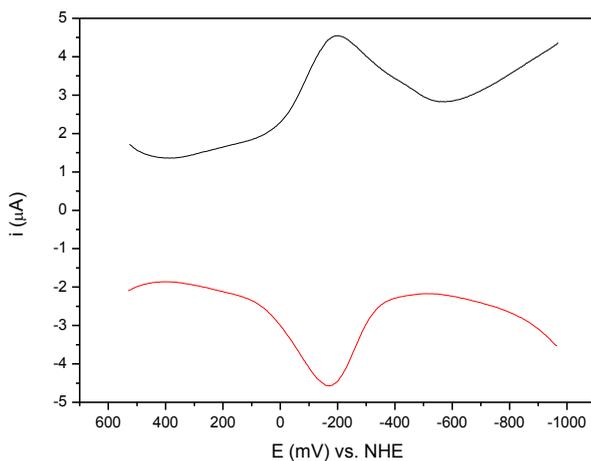


Figura 44. Voltamogramas de onda quadrada do complexo **1** em EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30, %v/v) (KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 25 °C em pH 7,95. Os potenciais estão representados versus NHE. [C] = 5 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.

Tabela 6. Potenciais de redução e oxidação do par  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$  obtidos através de voltametria de onda quadrada para o complexo **1** nas condições já descritas.

	<b>pH 4,11</b>	<b>pH 7,95</b>
<b>Redução</b>	162 mV	-202 mV
<b>Oxidação</b>	195 mV	-168 mV

Para o complexo **1** foi realizada uma titulação eletroquímica (VOQ) variando-se o pH entre 3,2 e 5,6 (Figura 45) utilizando voltametria de onda quadrada com o objetivo de se determinar o  $\text{p}K_a$  da água coordenada ao centro de ferro. Observou-se que, com o aumento do pH, a corrente da onda referente ao processo de redução do  $\text{Fe}(\text{III})$  da espécie  $(\text{OH}_2)\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$  em 177 mV, diminui gradativamente com aumento simultâneo da corrente em 70 mV referente ao processo de redução do  $\text{Fe}(\text{III})$  da espécie  $(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$ . A determinação do  $\text{p}K_a$  foi obtida através de uma relação entre a razão das correntes dos processos em 177 mV e 70 mV para eliminar variações de corrente em cada medida (Figura 46). O  $\text{p}K_a$  encontrado, que é equivalente ao  $\text{p}K_{a2}$ , foi de  $4,00 \pm 0,03$ , o qual está em boa concordância com os demais estudos de equilíbrio em solução, com uma pequena diferença que pode ser justificada pela diferente mistura de solventes utilizada nos experimentos de voltametria e titulação potenciométrica.

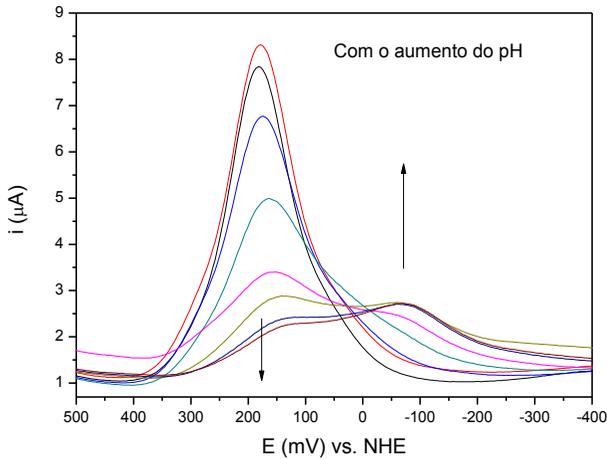


Figura 45. Voltamogramas de onda quadrada para o complexo **1** variando-se o pH de 3,2 a 5,6 em EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30, %v/v) (KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 25 °C. Os potenciais estão representados versus NHE. [C] = 5 x 10<sup>-4</sup> molL<sup>-1</sup>.

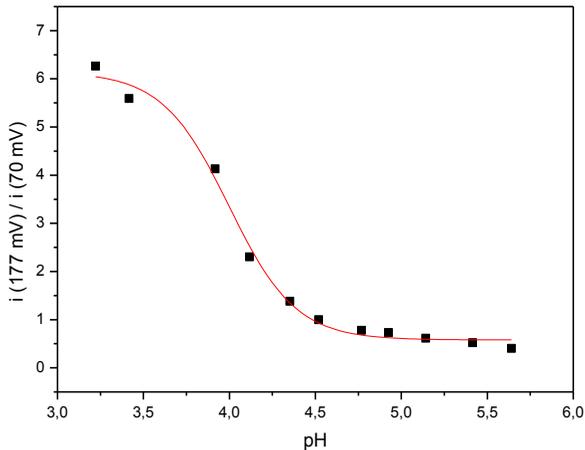


Figura 46. Gráfico da razão entre as correntes dos processos de oxidação do Fe(III) em 177 mV e 70 mV obtidos dos voltamogramas da Figura 45 em função do pH para o complexo **1**.

O complexo **2** também foi estudado em diferentes pHs e apresentou voltamogramas mais complexos do que o complexo **1** por possuir dois centros redox ativos (Fe(III) e Cu(II)). Apenas em pH bastante ácido (~2,5), foi possível observar a onda referente ao processo de redução do centro cobre(II) ( $E_{1/2} = -865$  mV) pois nesse pH ainda não se observa a ponte  $\mu$ -hidroxo entre os átomos de Fe(III) e Cu(II), sendo que nesse caso o que se observa é o processo redox do centro de cobre sem acoplamento antiferromagnético com o átomo de ferro. É interessante observar que, após a formação da ponte  $\mu$ -OH, tal processo não é mais observado. É bem provável que tal fenômeno esteja associado ao grau de acoplamento antiferromagnético entre os íons de Fe(III) e Cu(II) nesse complexo. A constante de acoplamento antiferromagnética  $J$  para o complexo  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{bpbmp})]$  é de  $-23 \text{ cm}^{-1}$ , indicativo de um acoplamento relativamente forte através da ponte  $\mu$ -OH, afetando o processo redox de ambos os centros metálicos (NEVES, 2010). Conforme estrutura proposta para **2** (*vide supra*), nesse caso, assume-se que ambos os complexos possuam a mesma unidade estrutural,  $\{\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Cu}^{\text{II}}\}$ .

Como pode ser observado nos experimentos de voltametria, os potenciais redox do ferro nas espécies  $(\text{OH}_2)\text{Fe}(\mu\text{-OH})\text{Cu}(\text{OH}_2)$  e  $(\text{OH})\text{Fe}(\mu\text{-OH})\text{Cu}(\text{OH}_2)$  são mais negativos se comparados com as mesmas espécies para o complexo **1**. Esta observação também pode ser justificada pelo acoplamento antiferromagnético que interfere na acidez de Lewis dos metais e no caso do átomo de ferro, o torna menos ácido, deslocando seu potencial redox para potenciais mais negativos (JOVITO, 2010). Em pH 2,45, o potencial de meia onda para o ferro se encontra em 30 mV e, em pH 5,56, pH em que se observa um equilíbrio entre as espécies  $(\text{OH}_2)\text{Fe}(\mu\text{-OH})\text{Cu}(\text{OH}_2)$  e  $(\text{OH})\text{Fe}(\mu\text{-OH})\text{Cu}(\text{OH}_2)$ , duas ondas são observadas, uma em 30 mV e outra em -125 mV, referente as espécies citadas acima, respectivamente. Um processo, que se acredita estar associado a algum processo de oxidação do cobre, é observado na voltametria de onda quadrada por volta de 500 mV. Esse processo não é referente a nenhum processo do complexo **2** e isso pôde ser comprovado na voltametria cíclica, pois, fazendo uma varredura iniciando em 530 mV no sentido de oxidação (Figura 47), esse processo não é observado, comprovando que

esta onda é referente a algum processo sofrido por uma espécie gerada em outro processo redox existente na faixa analisada. O estudo de voltametria de onda quadrada (Figura 49 e50) está em concordância com os de voltametria cíclica, tanto no pH 2,45 quanto no pH 5,56. Na Tabela 7 estão apresentados os potenciais dos processos de oxidação e redução dos pares  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$  e  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ .

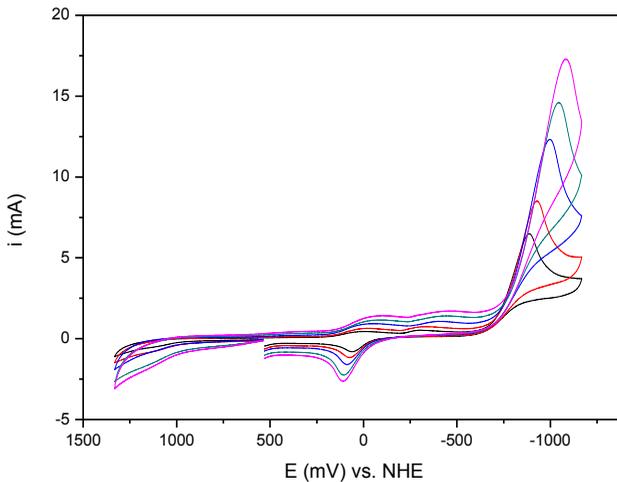


Figura 47. Voltamogramas cíclicos do complexo **2** em EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (70:30, %v/v) ( $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , com velocidades de varredura de 25, 50, 100, 200 e  $300 \text{ mV s}^{-1}$  em pH 2,45. Os potenciais estão representados versus NHE.  $[\text{C}] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

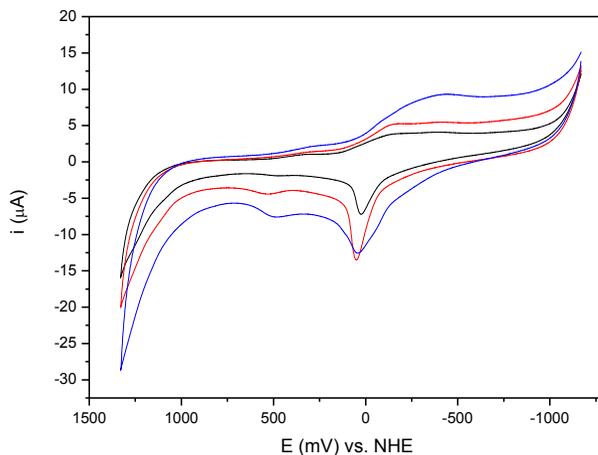


Figura 48. Voltamogramas cíclicos do complexo **2** em EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30, %v/v) (KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 25 °C, com velocidades de varredura de 25, 50 e 100 mV s<sup>-1</sup> em pH 5,56. Os potenciais estão representados versus NHE. [C] = 5 x 10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>.

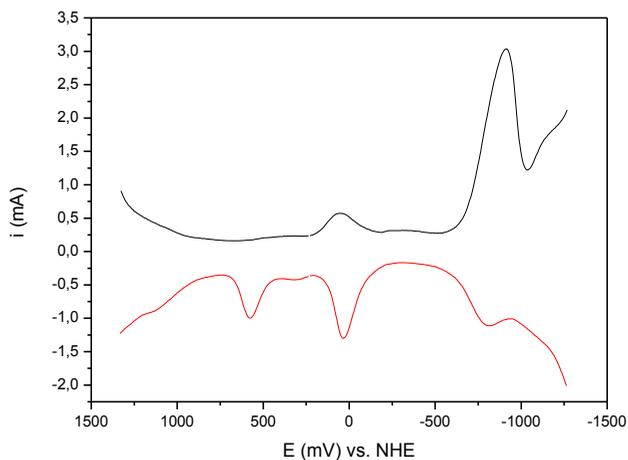


Figura 49. Voltamogramas de onda quadrada do complexo **2** em EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30, %v/v) (KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 25 °C em pH 2,45. Os potenciais estão representados versus NHE. [C] = 5 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.

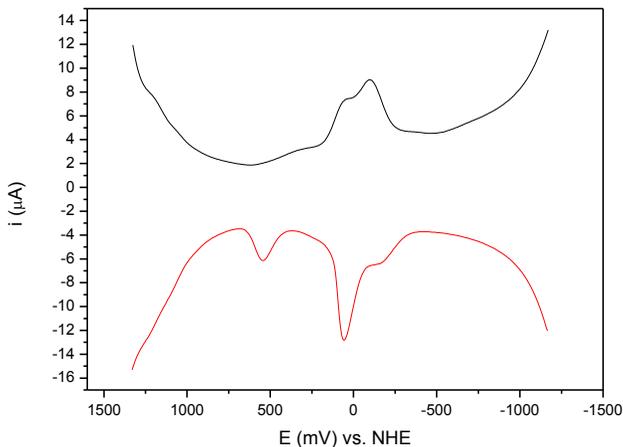


Figura 50. Voltamogramas de onda quadrada do complexo **2** em EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30, %v/v) (KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 25 °C em pH 5,56. Os potenciais estão representados versus NHE. [C] = 5 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.

Tabela 7. Potenciais de redução e oxidação do par Fe<sup>III</sup>/Fe<sup>II</sup> e Cu<sup>II</sup>/Cu<sup>I</sup> obtidos através de voltametria de onda quadrada para o complexo **2** nas condições já descritas.

		pH 2,45	pH 5,56
Ferro	Redução	46 mV	40 mV e -100 mV
	Oxidação	32 mV	50 mV e -150 mV
Cobre	Redução	-915 mV	-
	Oxidação	-815 mV	-

Com a titulação do complexo **2** de pH 2,9 a 5,0 (Figura 51) utilizando-se voltametria de onda quadrada se observou que, assim como para o complexo **1**, com o aumento do pH, há a diminuição da corrente da onda referente ao processo de redução do Fe(III) da espécie (OH<sub>2</sub>)Fe<sup>III</sup>(μ-OH)Cu<sup>II</sup>(OH<sub>2</sub>), em 70 mV e o aumento da corrente em -80 mV referente ao processo de redução do Fe(III) da espécie (OH)Fe<sup>III</sup>(μ-OH)Cu<sup>II</sup>(OH<sub>2</sub>). Nesse caso, a determinação do pK<sub>a</sub> não foi possível pois não se obteve um bom ajuste dos dados com uma curva sigmoidal e isso pode ser justificado pela complexidade eletrônica desse sistema.

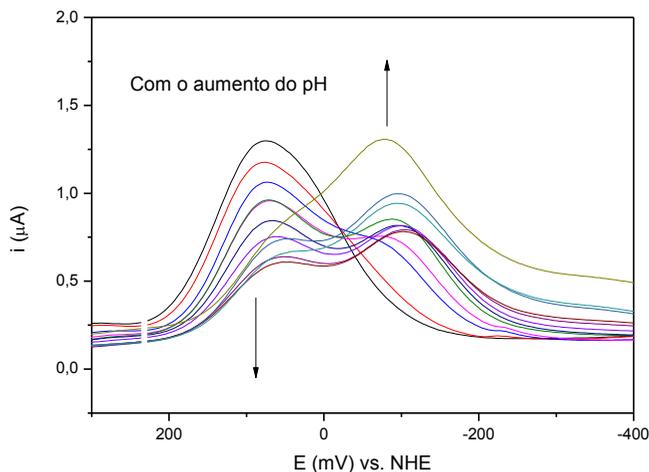


Figura 51. Voltamogramas de onda quadrada para o complexo **2** variando-se o pH de 2,9 a 5,0 em EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30, %v/v) (KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 25 °C. Os potenciais estão representados versus NHE. [C] = 5 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.

### 4.3. ESTUDOS DE REATIVIDADE

Uma das estratégias empregadas para o estudo da atividade catalítica de complexos modelos na hidrólise de ésteres de fosfato como, por exemplo, ácidos nucleicos, é o uso de substratos modelos ativados que possuam ligações fosfodiéster que simulem o grupo funcional presente na cadeia de RNA e DNA. Para análise da capacidade catalítica dos complexos deste trabalho, os mesmos foram submetidos a estudos com o substrato modelo bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP). A atividade catalítica para os complexos frente à hidrólise do substrato (Figura 52) foi avaliada a 25 °C, com excesso de substrato, seguindo uma cinética de pseudo-primeira ordem.

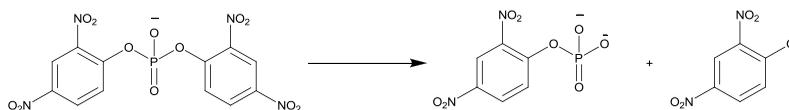


Figura 52. Reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP.

### 4.3.1. Efeito de pH na hidrólise do 2,4-BDNPP

Inicialmente, realizaram-se experimentos para determinar o efeito do pH na atividade catalítica dos complexos **1** e **2** para determinar o pH de atividade máxima na reação de hidrólise do substrato, pH esse no qual seriam realizados a seguir os experimentos de efeito da concentração do substrato na atividade catalítica. Através deste experimento determinou-se o  $pK_a$  cinético para o sistema, o qual se pode comparar com os  $pK_a$ s obtidos no estudo de equilíbrio químico e conseqüentemente determinar a espécie responsável pela atividade catalítica.

A faixa de pH estudada foi de 3,5 a 9,5 e o efeito do pH apresentou um perfil de sino para ambos os complexos (Figura 53 e 54). Para o complexo **1**, o pH ótimo foi de 6,5 enquanto para o complexo **2** foi de 7,0. Estes resultados estão de acordo com os experimentos de equilíbrio de espécies, no qual o  $pK_a$  da água coordenada ao Fe(III) apresenta um valor maior para o complexo **2** em cerca de meia unidade em relação ao complexo **1**. A Tabela 8 apresenta os valores de  $pK_a$ s cinéticos encontrados para ambos os complexos. De acordo com os valores de  $pK_a$ , conclui-se que a espécie ativa na catálise é a  $(OH)Fe^{III}(\mu-OH)M^{II}(OH_2)$  para os dois complexos. O perfil de sino citado anteriormente é explicado também pela distribuição de espécies ao longo da faixa de pH. Na faixa de 3,5 a 6,5-7,0, observa-se um aumento na atividade catalítica devido ao aumento da concentração da espécie  $(OH)Fe^{III}(\mu-OH)M^{II}(OH_2)$  em relação a  $(OH_2)Fe^{III}(\mu-OH)M^{II}(OH_2)$  que não possui atividade catalítica pela ausência do nucleófilo proposto, que seria o ligante hidróxido coordenado ao átomo de Fe(III). A partir do pH ótimo, observa-se uma queda da atividade catalítica pela formação da espécie  $(OH)Fe^{III}(\mu-OH)M^{II}(OH)$ , que, não possui atividade significativa pois o grupo hidróxido coordenado ao metal divalente não é tão lábil quanto uma água coordenada, dificultando sua substituição pelo substrato, o que também limita a atividade catalítica (MITIĆ, SMITH et al. 2006).

Tabela 8. Comparação dos valores de  $pK_a$  potenciométrico e cinético na hidrólise do 2,4-BDNPP.

	Potenciométrico		Cinético	
	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$
<b>1</b>	$4,40 \pm 0,01$	$6,99 \pm 0,07$	$5,15 \pm 0,07$	$7,26 \pm 0,25$
<b>2</b>	$5,01 \pm 0,01$	$7,75 \pm 0,04$	$4,89 \pm 0,13$	-

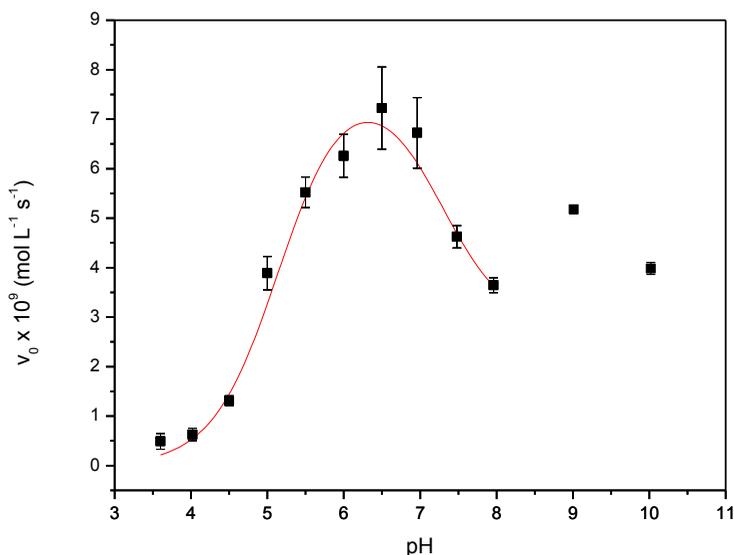


Figura 53. Dependência da velocidade inicial do complexo **1** com o pH para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP. Condições:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (50:50, %v/v);  $[\text{Complexo}] = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[\text{Substrato}] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[\text{tampão}] = 5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $I = 5 \times 10^{-2} \text{ LiClO}_4 \text{ mol L}^{-1}$ .

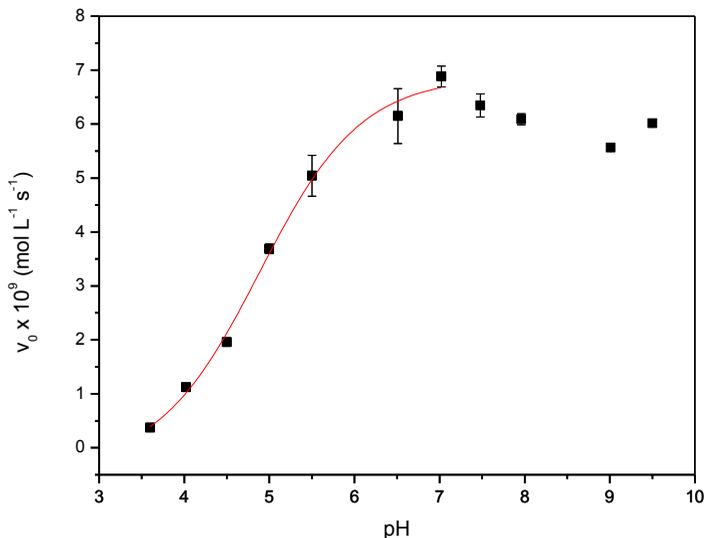


Figura 54. Dependência da velocidade inicial do complexo **2** com o pH para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP. Condições:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (50:50, %v/v);  $[\text{Complexo}] = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[\text{Substrato}] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[\text{tampão}] = 5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $I = 5 \times 10^{-2} \text{ LiClO}_4 \text{ mol L}^{-1}$ .

#### 4.3.2. Efeito da concentração do substrato na hidrólise do 2,4-BDNPP

O efeito da concentração do substrato na hidrólise do mesmo foi estudado, para os complexos **1** e **2**, no pH de atividade máxima (6,5 para **1** e 7,0 para **2**). Observou-se que a dependência da velocidade de reação com a concentração de substrato apresentou um perfil de saturação (Figuras 55 e 56) e os dados foram tratados com a equação não linear de Michaelis-Menten, obtendo-se assim, os fatores cinéticos para cada complexo. Embora na Tabela 9 sejam apresentados dados para os complexos FeZnLAB (CAMARGO, 2013) e 1-PEI (SOUZA), os mesmos foram realizados em uma mistura de solventes diferentes das utilizadas para os experimentos realizados neste trabalho.

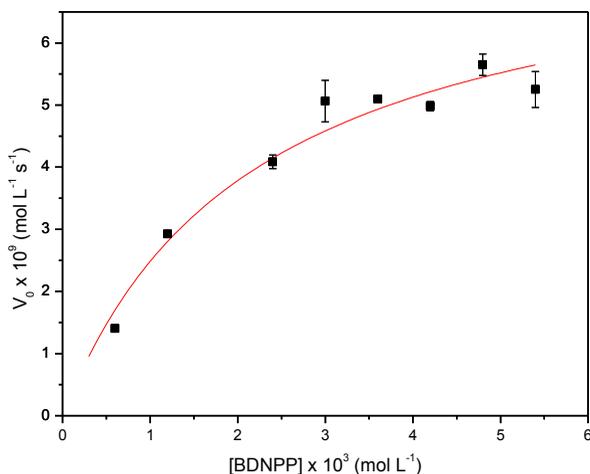


Figura 55. Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP com a concentração do substrato para o complexo **1**. Condições: [Complexo] =  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; [Tampão] =  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (MES, pH = 6,5); I =  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{LiClO}_4$ ) em solução  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  (50%, v/v) a  $25^\circ \text{C}$ .

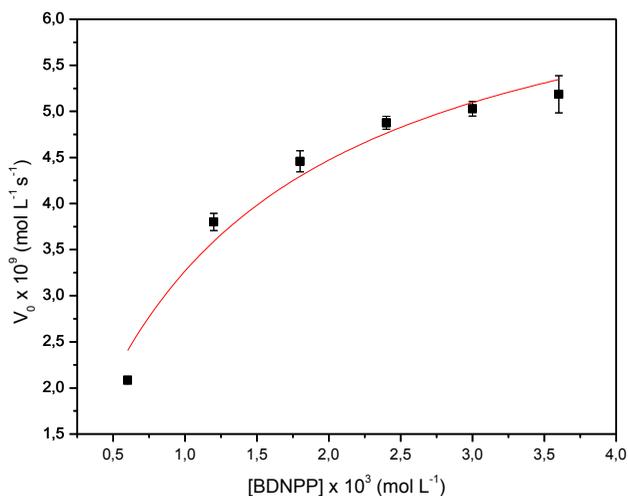


Figura 56. Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP com a concentração do substrato para o complexo **2**. Condições: [Complexo] =  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; [Tampão] =  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (HEPES, pH = 7,0); I =  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{LiClO}_4$ ) em solução  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  (50%, v/v) a  $25^\circ \text{C}$ .

Tabela 9. Parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelos complexos 1 e 2 em pH 6,5 e 7,0, respectivamente, a 25°C.

	$k_{\text{cat}}$ ( $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ )	$K_M$ ( $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_M$ ( $\text{Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/k_{\text{nc}}$
<b>1</b>	2,02	2,22	0,09	1050
<b>2</b>	1,92	1,21	0,16	1000
<b>1<sup>a</sup></b>	9,02	3,55	0,25	5040
<b>2<sup>a</sup></b>	20,6	12,4	0,17	11000
<b>FeZnLAB</b>	1,6	0,82	0,18	850
<b>1-PEI</b>	4,0	0,4	1,00	2100

Os complexos **1** e **2** apresentaram valores de  $k_{\text{cat}}$  bastante próximos e isso é reflexo da proximidade dos valores de pKas cinéticos encontrados referente à desprotonação da molécula de água ligada ao Fe(III), ou seja, a formação da espécie ativa. Peralta e colaboradores argumentam que, se a força do nuceófilo nos complexos é similar, espera-se então que apresentem uma atividade catalítica semelhante (PERALTA, 2010). Os valores se encontram inferiores aos complexos **1<sup>a</sup>** e **2<sup>a</sup>**, e acredita-se que possa ser resultado de um fator organizacional do sistema pela mobilidade da cadeia lateral (SOUZA, 2013), suposição que teria que ser confirmada através de estudos de parâmetros de ativação do sistema.

A constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) é indicativo da afinidade do substrato pelo catalisador, quanto menor o seu valor, maior a afinidade. Os valores apresentados para os complexos **1** e **2** mostram que o efeito da cadeia lateral contendo a amina terminal como modelo para segunda esfera de coordenação contribui basicamente na melhora da afinidade do substrato pelo complexo em comparação com demais modelos que abordem apenas a primeira esfera de coordenação da enzima (PERALTA, 2005; LANZMASTER, 2003; JOVITO, 2010). Muito provavelmente esse fator é explicado por interações eletrostáticas uma vez que os grupos amino protonados possuem uma carga positiva, conduzindo uma aproximação do substrato mais facilitada já que o mesmo é um ânion.

A maior eficiência catalítica do complexo **2** quando comparada ao complexo **1** se dá basicamente como resultado do valor de  $K_M$ , diferentemente dos demais complexos existentes na literatura em se tratando de comparativos entre as unidades  $(OH)Fe^{III}(\mu-OH)Zn^{II}(OH_2)$  e  $(OH)Fe^{III}(\mu-OH)Cu^{II}(OH_2)$  nos quais, a eficiência catalítica do  $\{Fe^{III}(\mu-OH)Cu^{II}\}$  se sobressai devido a superior constante catalítica do mesmo frente a hidrólise do substrato (LANZMASTER, 2003; NEVES, 2007; JOVITO, 2010).

Com o objetivo de avaliar se o monoéster também poderia ser hidrolisado, realizou-se uma reação estequiométrica entre os complexos e o substrato 2,4-BDNPP. Após um período de 55 horas a 50 °C, observou-se que os complexos foram capazes de gerar apenas um equivalente do 2,4-dinitrofenolato, atuando portanto, apenas como diesterases.

Um dos pré-requisitos para a modelagem enzimática é que as reações promovidas pelos complexos biomiméticos sejam catalíticas, ou seja, capazes de regenerar o catalisador a cada ciclo catalítico, repetindo o processo. Para verificar essa característica, os complexos foram submetidos a um estudo em que a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP em pH 6,5 para o complexo **1** e 7,0 para o complexo **2**, foi acompanhada espectrofotometricamente em 445 nm ( $\epsilon = 3600 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  do produto 2,4-dinitrofenolato) durante 24 horas a 25 °C. Nesse período, observou-se que o complexo **1** foi capaz de hidrolisar 2 equivalentes de substrato e o complexo **2** hidrolisou 3,2 equivalentes de substrato.

A partir do conjunto de informações obtidas ao longo dos experimentos realizados neste trabalho, é importante avaliar o mecanismo pelo qual o processo catalítico ocorre, e se esse mecanismo é similar ao proposto para a enzima alvo. Estudos mecanísticos detalhados não foram realizados, porém, através de algumas evidências experimentais, é possível especular o caminho pelo qual a reação ocorre. De acordo com Klabunde (1996) e Lindqvist (1999), o mecanismo proposto para a enzima é o ilustrado na Figura 10 e o mesmo sugere que o substrato se liga a enzima pela substituição da molécula de água coordenada ao sítio de  $M^{II}$ , posicionando-se para o ataque nucleofílico realizado pelo hidróxido presente na esfera de coordenação do  $Fe^{III}$ .

Com os estudos eletroquímicos, espectrofotométricos, potenciométricos e avaliação da influência do pH sobre a reação

de hidrólise do 2,4-BDNPP, sugere-se que a espécie ativa desse complexo é similar à forma ativa proposta para as PAPs, com uma molécula de água coordenada ao centro metálico  $M^{II}$  e um íon hidróxido coordenado ao  $Fe^{III}$ . Os dois centros metálicos estariam unidos através de uma ponte  $\mu$ -hidróxido, como sugerido para complexos similares (LANZMASTER, 2003; PERALTA, 2005; CAMARGO, 2013; SOUZA, 2013).

Para avaliar se o ataque nucleofílico ao átomo de fósforo do substrato seria intramolecular ou realizada pelo meio (catálise básica), realizou-se um experimento de efeito isotópico de deutério na velocidade de hidrólise do 2,4-BDNPP nos pHs de atividade máxima para os complexos **1** e **2**. O complexo **1** apresentou uma razão  $k_H/k_D$  de 1,15 e para o complexo **2**, essa razão foi de 0,94. Em um processo que há transferência de próton em seu mecanismo, dependendo da posição desse próton em relação ao átomo doador e o átomo acceptor no estado de transição, o efeito isotópico na velocidade da reação global será diferente (CAREY, 2007), mas, segundo Deal e colaboradores (1996) e estudos computacionais envolvendo complexos similares à **1** e **2**, os valores obtidos podem sugerir que não há transferência de próton envolvida na etapa determinante da reação, sugerindo um ataque intramolecular.

Com base nos dados apresentados, a proposta do mecanismo de hidrólise de substrato pelos complexos estudados neste trabalho é apresentada na Figura 57. Inicialmente há a entrada do substrato no sítio de coordenação do  $M(II)$ , substituindo a água anteriormente coordenada ao metal. Após entrada do substrato, sugere-se que a amina terminal passe a interagir com o substrato, havendo duas opções para essa interação: protonação do oxigênio da  $P=O$ , tornando o fósforo mais eletrofílico; ou protonação do oxigênio do grupo de saída, ajudando na sua liberação. Há então o ataque do nucleófilo (hidroxo coordenado ao  $Fe^{III}$ ) ao átomo de fósforo e a liberação do grupo de saída, que pode se dar de forma concertada ou em etapas. O monoéster fica então coordenado de forma bidentada aos dois centros metálicos e é deslocado então pelo excesso de água e substrato no meio, regenerando o complexo biomimético.

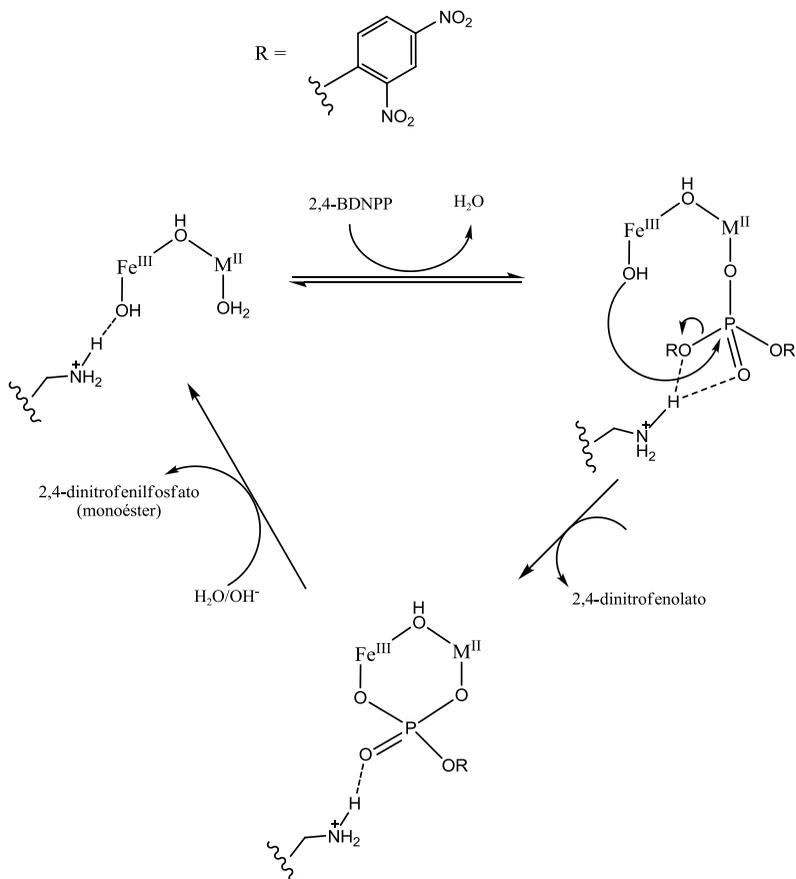


Figura 57. Mecanismo proposto para a hidrólise do 2,4-BDNPP pelos complexos **1** e **2**.



### 3 CONCLUSÃO

O ligante  $H_2LHex$  foi obtido com rendimento satisfatório e pureza adequada para dar sequência à síntese dos complexos **1** e **2**. Não foi possível obter cristais dos complexos e portanto não foi determinada estrutura por difração de raios X, porém, através da caracterização por outras técnicas observou-se concordância com estruturas similares já reportadas na literatura. Os dados de espectrofotometria de IV trouxeram indícios de coordenação do ligante aos metais, os espectros de massas apresentaram picos coerentes com as estruturas propostas e a análise pela técnica de espectrofotometria na região de UV-vis, para ambos os complexos, mostrou a banda característica do sistema  $Fe^{III}(\mu-OH)M^{II}$  próximo a 500 nm, referente à transferência de carga fenolato  $\rightarrow$  ferro(III).

Através de titulação potenciométrica e espectrofotométrica, determinaram-se os valores de  $pK_a$ s para os complexos, que estão de acordo com os já reportados na literatura. Pelos estudos eletroquímicos foi possível observar as ondas referentes ao processo redox do centro de ferro dos complexos e para o complexo **2**, em pH ácido, foi possível também observar a onda referente ao processo redox do par  $Cu^{II}/Cu^I$ .

Estudos cinéticos frente à hidrólise do substrato 2,4-BDNPP mostraram que a presença de grupos amino reduz o pH de atividade máxima para os complexos **1** e **2**. Embora a atividade catalítica seja inferior quando comparada com os demais complexos já reportados na literatura contendo um sítio ativo similar, observou-se que a presença dos grupos amino aumenta significativamente a afinidade do substrato pelos compostos biomiméticos mostrando que, apesar da diminuição da constante catalítica, a modelagem de segunda esfera utilizando esse grupo funcional é viável.

Mais estudos se fazem necessários, sendo o estudo dos parâmetros de ativação os de maior prioridade como perspectiva para esse trabalho para que se possa entender de que forma a presença da cadeia lateral interfere na energia de ativação do sistema a fim de propor modificações na mesma.



## REFERÊNCIAS

AGAWVAL, R.; BURLEY, S. K.; SWAMINATHAN, S., Structural Analysis of a Ternary Complex of Allantoate Amidohydrolase from *Escherichia coli* Reveals its Mechanics, Journal of Molecular Biology, v. 368, p. 450-463, **2007**.

BATISTA, S., C., NEVES, A., BORTOLUZZI, A. J., VENCATO, I., PERALTA, R. A., SZPOGANICZ, B., AIRES, V. E., SEVERINO, P. C., Highly efficient phosphate diester hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical Fe<sup>III</sup> Ni<sup>II</sup> model complex, Inorganic Chemistry Communications, v. 6, p. 1161-1165, **2003**.

BERTINI, I.; GRAY, H. B.; LIPPARD, S. J.; VALENTINE, J. S., Bioinorganic Chemistry. University Science Books. Mill Valley, 1sted, **1994**.

BORNSCHEUER, U. T. et al. Engineering the third wave of biocatalysis. Nature, v. 485, p. 185–194, **2012**.

BOSEGGIA, E.; GATOS, M., et al. Toward Efficient Zn(II)-Based Artificial Nucleases, Journal of the American Chemical Society, v.126, p. 4543-4549, **2004**.

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

CAMARGO, T. P. Desenvolvimento de complexos heterobinucleares de Fe “Zn” a partir de ligantes contendo o grupo pireno para estudo de interação com ésteres de fosfato e ácidos nucleicos. Tese de Doutorado em Química. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, **2013**.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J., Advanced Organic Chemistry, Springer, New York, 5<sup>th</sup>ed, **2007**.

CASELLATO, A. Síntese, Caracterização e Reatividade de Complexos Modelos para as Fosfatases Ácidas Gálio-

Substituídas, Dissertação de mestrado em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 75 p., **2003**.

CHEN,, X. Q.; WANG, J. Y., et. al., Synthesis and DNA cleavage activity of diiron(III) complex bearing pyrene group, Chinese Chemical Letters, v.19, p. 342-344, **2008**.

COTTON, F. A.; HAZEN, E. E.; LEGG, M. J., Staphylococcal nuclease: Proposed mechanism of action based on structure of enzyme-thymidine 3',5'-biphosphate-calcium ion complex as 1.5-Å resolution, Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, v. 76, p. 2551-2555, **1979**.

FENG, G.; MAREQUE-RIVAS, J. C.; ROSALES, T. M.; WILLIAMS, N. H., A Highly Reactive Mononuclear Zn(II) Complex for Phosphodiester Cleavage. Journal of the American Chemical Society, v. 127, p. 13470-13471, **2005**.

FENG, G.; MAREQUE-RIVAS, J. C.; WILLIAMS, N. H., Comparing a mononuclear Zn(II) complex with hydrogen bond donors with a dinuclear Zn(II) complex for catalyzing phosphate ester cleavage. Chemical Communications, v. 2006, p. 1845-1847, **2006**.

FENG, G.; NATALE, D.; PRABAHARAN, R.; MAREQUE-RIVAS, J. C.; WILLIAMS, N. H., Efficient Phosphodiester Binding and Cleavage by a Zn<sup>II</sup> Complex Combining Hydrogen-Bonding Interactions and Double Lewis Acid Activation. Angewandte Chemie International Edition, v. 45, p. 7056-7059, **2006b**.

GABER, B. P., V. MISKOWSKI, et al. (1974). Resonance Raman scattering from iron(III)- and copper(II)-transferrin and an iron(III) model compound. Spectroscopic interpretation of the transferrin binding site. Journal of the American Chemical Society v. 96, p. 6868-6873, **1974**.

GAHAN, L. R., S. J. SMITH, et al. Phosphate Ester Hydrolysis: Metal Complexes As Purple Acid Phosphatase and Phosphotriesterase Analogues. European Journal of Inorganic Chemistry v. 2009, p. 2745-2758, **2009**.

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

GREATTI, A.; SCARPELLINI, M.; PERALTA, R.A.; CASELLATO, A.; BORTOLUZZI, A. J.; XAVIER, F. R.; JOVITO, R.; de BRITO, M. A.; SZPOGANICZ, B.; TOMKOWICZ, Z.; RAMS, M.; HAASE, W.; NEVES, A. Synthesis, Structure, and Physicochemical Properties of Dinuclear Ni<sup>II</sup> Complexes as Highly Efficient Functional Models of Phosphohydrolases, Inorganic Chemistry, v. 47, p. 1107, **2008**.

GUDDAT, L. W.; McALPINE, A. S. et. al, Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase, Structure, v. 7, p. 757-767, **1999**.

HAMMES, G. G.; BENKOVIC, S. J.; HAMMES-SCHIFFER, S. Flexibility, Diversity, and Cooperativity: Pillars of Enzyme Catalysis. Biochemistry, v. 50, p. 10422–10430, **2011**.

HINE, J., Carbon Dichloride as an Intermediate in the Basic Hydrolysis of Chloroform. A Mechanism for Substitution Reactions at Saturated Carbon Atom, Journal of the American Chemical Society, v. 72, p. 2438-2445, **1950**.

HOFFMANN, E. Mass Spectrometry: Principles and Applications. John Wiley & Sons, New York, **2007**.

HORN, A.; VENCATO, I.; BORTOLUZZI, A. J., et al., Synthesis, crystal structure and properties of dinuclear iron(III) complexes containing terminally coordinated phenolate/H<sub>2</sub>O/OH<sup>-</sup> groups as models for purple acid phosphatases: efficient hydrolytic DNA cleavage, Inorganica Chimica Acta, v. 358, p. 339-351, **2010**.

JOVITO, R. Síntese, Caracterização e avaliação da promiscuidade catalítica de complexos binucleares bioinspirados. Tese de Doutorado em Química. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, **2010**.

KAIM, W.; SCHWEDERSKI, B.; KLEIN, A., Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry Life, John Wiley & Sons, New York, 2nd ed., **2013**.

KARSTEN, P.; NEVES, A; BORTOLUZZI, A.; DRAGO, V. LANZNASTER, M. Synthesis, Structure, Properties, and Phosphatase-Like Activity of the First Heterodinuclear FeIIIMnII Complex with the Unsimmetric ligand H2BPBPMP as a model for the PAP in Sweet Potato, Inorganic Chemistry, v.41, p. 4624, **2002**.

KLABUNDE, T.; KREBS, B. The Dimetal Center in Purple Acid Phosphatases, Structure and Bonding, v. 89, p. 177-198, **1997**.

KLABUNDE, T.; STRÄTER, N.; FRÖHLICH, R.; WITZEL, H. KREBS, B., Mechanism of Fe(III)-Zn(II) Purple Acid Phosphatase Based on Crystal Structure, Journal of Molecular Biology, v. 259, p. 737-748, **1996**.

KOVAL, I. A. et al. Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies. Chemical Society Reviews, v. 35, p.814–840, **2006**.

LANZNASTER, M. Desenvolvimento de novos modelos estruturais e funcionais para as fosfatases ácidas púrpuras. Tese de Doutorado em Química. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, **2003**.

LINDSTRÖM, B.; PETTERSSON, L. J.A Brief History of Catalysis. CATTECH, v. 7, p. 130–138, **2003**.

LINDQVIST, Y.; JOHANSSON, E.; KAIJA, H.; VIHKO, P.; SCHNEIDER, G., Three-dimensional Structure of a Mammalian Purple Acid Phosphatase as 2.2 Å Resolution with a  $\mu$ -(Hydr)oxo Bridged Di-iron Center, Journal of Molecular Biology, v. 291, p. 135-147, **1999**.

REHDER, D. Introduction to Bioinorganic Chemistry. University of Lund. Lecture Notes, **2008**.

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

MCGEARY, R. P.; SCHENK, G.; GUDDAT, L. W., The applications of binuclear metallohydrolases in medicine: Recent advances in the design and development of novel drug leads for purple acid phosphatases, metallo- $\beta$ -lactamases and arginases. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 76, p. 132-144, **2014**.

MITIĆ, N., S. J. SMITH, et al. The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases. Chemical Reviews, v.106,p. 3338-3363, **2006**.

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

NEVES, A., BRITO, M. A., VENCATO, I., et al., Fe<sup>III</sup> Fe<sup>III</sup> and Fe<sup>II</sup> Fe<sup>III</sup> complexes as synthetic analogues for the oxidized and reduced forms of purple acid phosphatases. Inorganic Chemistry, v. 35, p. 2360, **1996**.

NEVES, A., M. LANZMASTER, et al. An Unprecedented Fe<sup>III</sup>( $\mu$ -OH)Zn<sup>II</sup> Complex that Mimics the Structural and Functional Properties of Purple Acid Phosphatases. Journal of the American Chemical Society, v. 129, p. 7486-7487, **2007**.

NEVES, A.; HAASE, W.; LANZMASTER, M.; TOMKOWICZ, Z. Dados não publicados, **2010**.

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**.

PERALTA, R. A., A. J. BORTOLUZZI, et al. Electronic Structure and Spectro-Structural Correlations of Fe<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup> Biomimetics for Purple Acid Phosphatases: Relevance to DNA Cleavage and

Cytotoxic Activity. Inorganic Chemistry v. 49, p. 11421-11438, **2010**.

PIOVEZAN, C. et al. Heterodinuclear FeIIIZnII-Bioinspired Complex Supported on 3-Aminopropyl Silica. Efficient Hydrolysis of Phosphate Diester Bonds. Inorganic Chemistry, v. 49, n. 6, p. 2580–2582, **2010**.

RALPH, S. F.; SHEIL, M. M.; HICK, L. A.; GEUE, R. J., SARGESON, A. M., An electrospray mass spectrometry study of some metal-ion cage complexes. Dalton Transactions, v. 1996, p. 4417-4424, **1996**.

SCHENK, G.; GE, Y., et al., Binuclear Metal Centers in Plant Purple Acid Phosphatases: Fe-Mn in Sweet Potato and Fe-Zn in Soybean. Biochemistry and Biophysics, v. 370, p. 183-189, **1999**.

SCHENK, G.; MITIĆ, N.; HANSON, G. R., COMBA, P., Purple acid phosphatase: A journey into the function and mechanism of colorful enzyme. Coordination Chemistry Reviews, v. 257, p. 473-482, **2013**.

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.

SOUZA, B., G. L. KREFT, et al. Second-Coordination-Sphere Effects Increase the Catalytic Efficiency of an Extended Model for FeIIIMII Purple Acid Phosphatases. Inorganic Chemistry v. 52, p. 3594-3596, **2013**.

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**.

STRÄTER, N.; KLABUNDE, T.; TUCKER, P.; WITZEL, H.; KREBS, B., Crystal Structure of a Purple Acid Phosphatase

Containing a Dinuclear Fe(III)-Zn(II) Active Site. SCIENCE, v. 268, p. 1489-1492, **1995**.

THOER, A.; DENIS, M., DELMAS, M. and GASET, A. The Reimer-Tiemann reaction in slightly hydrated solid-liquid medium: a new method for the synthesis of formyl and diformyl phenols. Synthetic Communications, v. 18, p. 2095-2101, **1988**.

TWITCHETT, M. B. et al. Reactivity of  $M^{II}$  Metal-Substituted Derivatives of Pig Purple Acid Phosphatase (Uteroferrin) with Phosphate. Inorganic Chemistry, v. 41, p. 5787-5794, **2002**.

UPPENBERG, J.; LINDQVIST, F.; SVENSSON, C.; EK-RYLANDER, B.; ANDERSSON, G., Crystal Structure of a Mammalian Purple Acid Phosphatase. Journal of Molecular Biology, v. 290, p. 201-211, **1999**.

ZHAO, M.; WANG, H.; JI, L.; MAO, Z., Insights into metalloenzyme microenvironments: biomimetic metal complexes with a functional second coordination sphere. Chemical Society Reviews, v. 42, p. 8360-8375, **2013**.