

Graciela Aparecida dos Santos Silva

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TAMANHO DO ANEL
QUELATO E DA SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO NA
HIDRÓLISE DO FOSFATO DE BIS(2,4-DINITROFENILA) E
ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO CATALISADA POR
COMPOSTOS DE Fe^{III}Zn^{II}**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Química.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosely A. Peralta
Coorientador: Prof. Dr. Ademir Neves

Florianópolis
2017

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

Silva, Graciela Aparecida dos Santos
ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TAMANHO DO ANEL QUELATO
E DA SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO NA HIDRÓLISE DO
FOSFATO DE BIS(2,4-DINITROFENIL) E ÁCIDO
DESOXIRRIBONUCLEICO CATALISADA POR COMPOSTOS DE
Fe^{III}Zn^{II} / Graciela Aparecida dos Santos Silva ;
orientadora, Rosely A. Peralta, coorientador,
Ademir Neves, 2017.
179 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.

1. Química. 2. Química. 3. Fosfatases ácidas
púrpuras. 4. Hidrolase. 5. Compostos biomiméticos.
I. Peralta, Rosely A.. II. Neves, Ademir. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Graciela Aparecida dos Santos Silva

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TAMANHO DO ANEL
QUELATO E DA SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO NA
HIDRÓLISE DO FOSFATO DE BIS(2,4-DINITROFENILA) E
ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO CATALISADA POR
COMPOSTOS DE Fe^{III}Zn^{II}**

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

Florianópolis, 06 de outubro de 2017.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a. Rosely A. Peralta
Orientadora – UFSC

Prof. Dr. Ademir Neves
Coorientador – UFSC

Prof. Dr. Fernando R. Xavier
Relator – UDESC

Prof. Dr. Sergio M.
Tebcherani – UEPG

Prof.^a. Dr.^a. Maria da Graça
Nascimento – UFSC

Este trabalho é dedicado aos meus amados pais Ivone e Lourival, que abdicaram seus sonhos para realizar os meus!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por me proporcionar tantos ensinamentos e amor.

Sou infinitamente grata a meus pais. Passamos por grandes dificuldades, recebemos muitas lições e muito aprendizado - nos momentos difíceis a única opção foi sermos fortes. Não foi fácil, toda vez que eu pensava em desistir vocês diziam um imenso “não” e me faziam ver o mundo além das minhas dificuldades. Agradeço imensamente pela permissão de ser filha de vocês, um casal que é exemplo de superação, dedicação e, principalmente, de amor. Perdoem minhas falhas e minha ausência quando vocês mais precisaram. Amo vocês!

Agradeço também meus familiares que foram essenciais em toda essa trajetória, meu irmão Cristiano por cuidar de meus pais quando eu não podia estar presente, à minha cunhada Paula que está com a Alice na barriga. Aos meus sobrinhos amados Gabriel e Guilherme por toda compreensão e pelo amor puro - vocês foram fundamentais. Às minhas avós Maria (*in memoriam*) e Clara por toda oração e amor. Tia Jande, sempre tão prestativa, agradeço pelas inúmeras vezes em que me socorreu. À família de coração que tanto me ajudou, entendeu meus desabafos e sempre me incentivou, Celina minha “irmã” e amiga de infância e “Tia” Eliane.

Agradeço minha orientadora Prof^a. Dr^a. Rosely Peralta pela confiança e compreensão, pela inspiração e pelo belíssimo trabalho que faz como pesquisadora, professora e orientadora. Agradeço também ao meu coorientador Prof. Dr. Ademir Neves pelas valiosas contribuições e discussões sempre tão pertinentes. Aos Prof. Drs. Adailton Bortoluzzi, Bernardo de Souza e Hernán Terenzi pelo auxílio no desenvolvimento desse trabalho. Ao Prof. Dr. Daniel Borges e ao Juliano Ramos pelas medidas de absorção atômica. Ao André Amorim pela realização dos cálculos teóricos. À banca pelas considerações, aos professores Fernando Xavier, Maria da Graça Nascimento e Sergio Tebcherani.

Aos “labinquianos” e “ex-labinquianos”, muitíssimo obrigada por todos os momentos que compartilhamos, pela colaboração, pelo companheirismo e amizade: Renata Osório, Claudinha, Thaisy, Pacheco, Filipy, Bruna, Rhannanda, Gili, Alana, Dudu, Gico, Giovanna, Tainá, Alfredo, Felipe, Alexandra, Sandro, Luiza, Elvis, Anderson, dentre outros. Em especial à

Cacau, que possui um coração lindo e bom, por dividir suas Trakinas, por ser mais que uma irmã científica e por chorar comigo – me sinto muito abençoada por ter uma amiga tão generosa como você. Ao André, pelos abraços em momentos delicados, tapinhas no ombro em momentos tristes – acredito que esse mundo está ficando pequeno demais para o seu potencial. Obrigada por vocês dois me incentivarem a seguir em frente, não existem palavras para agradecer o que vocês fizeram por mim! À Sari, que deixou essa etapa mais leve com sua companhia e risadas soltas, por me proporcionar tantos momentos mágicos, por toda compreensão e por não medir esforços para me ajudar. À Carol, que me ensinou muito, por abrilhantar a B2 de maneira ímpar, agradeço pela sua amizade e companheirismo. Ao Valdeco, por todos os momentos engraçados e loucos, pela amizade, por me fazer rir sempre. À Sheila, por deixar meus dias mais doces. Ao Marcos, pelas brincadeiras, comidas da Tia Jô e parceria nos congressos. À Rê pela amizade e acolhida no Labinc. Ao “Bródi” Vitinho, pela parceria não só de bancada. Aos agregados dos “labinquianos”, muito obrigada: Dudis, Sandra, Tia Jô, Iliany.

À Tai, que foi vizinha, família, amiga, terapeuta, médica, psicóloga, companheira, parceira, dentre tantas outras coisas. Só nós sabemos o que passamos e essa vitória não seria possível sem você, obrigada por estar comigo nessa caminhada.

Agradeço à Rafa pela acolhida em sua casa, pela amizade e por todos os momentos que passamos juntas, você foi primordial! Aos amigos do departamento de química que conquistei ao longo desses anos de doutorado, em especial à Ana, Ju Dreyer, Gui, Ale, Fer, Ju Ramos, Alex, Leandro, Elder e Janh. Ao pessoal que se tornou tão especial na minha vida através do Cebime (vocês foram incríveis): Philipe, Angela, Nathi, Elis, Cris e Luiz. Às técnicas Elis, Martina e Vane pelas análises. Aos amigos de longa data que mesmo distante sempre estiveram presentes em minha vida: Adri Depa, Cíntia, Gabi, Vivian, Lilian, Milene, Lia, Naya, Ju, Jaci, Talita e Adriano.

Ao Thiago (*in memoriam*) que, infelizmente, não estará fisicamente presente nesse acontecimento tão importante, agradeço por me proporcionar momentos extraordinários, transformando minha caminhada árdua com sua leveza, tranquilidade e sabedoria; por ser exemplo de amor. Agradeço sua mãe Anitinha, pelos momentos inesquecíveis que passamos juntas.

Ao programa CAPES-STINT, pela oportunidade de fazer intercâmbio, e ao Prof. Dr. Ebbe Nordlander pela orientação enquanto estive em Lund - Suécia. Agradeço às pessoas que conheci nessa etapa, especialmente minha *twin* Leoni, Vinny e Anele, por todas as experiências inesquecíveis que compartilhamos.

Agradeço ao Departamento de Química, ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina e órgãos de fomento CAPES (pela bolsa de doutorado), INCT-Catálise e CNPq pela oportunidade para a realização desta pesquisa.

“Se vi mais longe foi por estar de pé
sobre ombros de gigantes”.
(Isaac Newton, 1676)

“Quero conhecer os pensamentos de
Deus, o resto são detalhes”.
(Albert Einstein, 1955)

RESUMO

Nos últimos anos, os efeitos de segunda esfera de coordenação ganharam uma importância notável na pesquisa e no desenvolvimento da química bioinorgânica. Esse estudo se refere a síntese e caracterização de três ligantes e seus respectivos complexos inéditos heterobinucleares $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$, para mimetizar enzimas, tais como fosfatases ácidas púrpuras (PAPs). O ligante 2-hidroxi-3-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((2-(piridin-2-il)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-5-metilbenzaldeído (H_2L^2) foi sintetizado aumentando o número de átomos de carbono de um dos anéis quelato do lado macio (quando comparado ao ligante já descrito H_2L^1), bem como seu complexo, sendo usado como base para a comparação com complexos similares já publicados na literatura. Modificações posteriores foram feitas no grupo aldeído, em que 1,2-etanodiamina e 1,4-diaminobutano foram utilizadas como cadeias laterais para efeitos de segunda esfera de coordenação. Todos os ligantes e seus novos complexos foram completamente caracterizados por meio de métodos espectroscópicos (Infravermelho, UV-Vis e titulação espectrofotométrica), bem como ressonância magnética, CHN, absorção atômica, eletroquímica, condutimetria e espectrometria de massas. Cálculos teóricos foram realizados com o objetivo de se estabelecer a estrutura mais provável dos complexos heterobinucleares as quais mostraram semelhanças com outras estruturas já relatadas. Os compostos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2$ (**1**), $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-et}$ (**2**) e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-but}$ (**3**) foram analisados com o substrato modelo 2,4-BDNPP, os quais mostraram que a espécie responsável pela atividade catalítica é $[(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)(\text{R})]^{2+}$ ($\text{R} = \text{L}^2, \text{L}^2\text{-et}$ e $\text{L}^2\text{-but}$) e com a obtenção de parâmetros cinéticos foi possível verificar a influência da segunda esfera de coordenação em sua atividade catalítica. A hidrólise do substrato 2,4-BDNPP pelos complexos em $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ ajudou também a elucidar os mecanismos envolvidos. Estudos de interação com o DNA, indicam claramente que as modificações introduzidas no ligante influenciam a atividade dos complexos. Análise de como esses complexos interagem com o DNA, ajudaram a compreender o mecanismo de reconhecimento e a clivagem da ligação fosfodiéster desses complexos.

Palavras-chave: Fosfatases ácidas púrpuras. Hidrolase. Compostos biomiméticos. Segunda esfera de coordenação. Clivagem do DNA.

ABSTRACT

In recent years, second coordination sphere effects gained a remarkable importance in the research and development of bioinorganic chemistry. This study refers to the synthesis and characterization of three novel ligands and their respective heterobinuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ complexes, where the goal is to mimic enzymes such as purple acid phosphatases (PAPs). The ligand 2-hydroxy-3-(((2-hydroxy-5-methyl-3-(((2-(pyridine-2-yl)ethyl)(pyridine-2-ylmethyl)amino)methyl)benzyl)(pyridine-2-ylmethyl)amino)methyl)-5-methylbenzaldehyde was synthesized and its complex used as base for comparison with similar complexes already published in the literature. Subsequent derivatizations were done in the aldehyde group, where 1,2-ethanediamine and 1,4-diaminobutane were used as side chains derivatives. The compounds were characterized by spectroscopic methods (Infrared, UV-Vis), as well as magnetic resonance, CHN, atomic absorption, electrochemistry, conductimetry and mass spectrometry. Theoretical calculations were performed to give insight into the complexes structures, which showed similarities with other heterobinuclear structures already reported. The hydrolysis reaction of model substrate 2,4-BDNPP catalyzed by $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2$ (**1**), $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-et}$ (**2**) e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-but}$ (**3**) was investigated. The results showed that the catalytic active species is $[(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)(\text{R})]^{2+}$ ($\text{R} = \text{L}^2, \text{L}^2\text{-et}$ e $\text{L}^2\text{-but}$), moreover, the kinetic parameters highlighted the influence of the second coordination sphere onto the catalytic mechanism. The hydrolysis of the model substrate 2,4-BDNPP by complexes synthesized in $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ also helped to elucidate the mechanisms involved. DNA interaction studies clearly indicate that the modifications introduced in the ligand influence in the activity of the complexes. Analysis of how these complexes interact with DNA helped understand the mechanism of recognition and cleavage of the phosphodiester bond of such complexes.

Keywords: Purple acid phosphatases. Hydrolase. Biomimetic compounds. Second coordination sphere. DNA cleavage.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do complexo cis-diaminodicloroplatina(II) (Graf e Lippard, 2012).....	25
Figura 2. Estrutura tridimensional do DNA. Adaptado de (Horton, 2006).	27
Figura 3. Modelo de ligação fosfodiéster (Nelson e Cox, 2014).	28
Figura 4. Esquema do sítio ativo das PAPs (Klabunde, 1996).	31
Figura 5. Mecanismo proposto por Klabunde e colaboradores para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAPs (Adaptado de (Klabunde, 1996)).....	32
Figura 6. Propostas de ataque nucleofílico por Merx e colaboradores para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAPs (Merx e Averill, 1999; Merx et al., 1999).	33
Figura 7. Propostas de ataque nucleofílico por Wang e colaboradores para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAPs (Wang et al., 1999).	34
Figura 8. Propostas de ataque nucleofílico por Schenk e colaboradores para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAPs (Schenk, 1999).	34
Figura 9. Proposta mecanística da PAP diesterase. (Cox, 2007).	35
Figura 10. Estrutura do ligante H ₂ BPBPMP (Karsten, 2002).	36
Figura 11. ORTEP do cátion do complexo [Fe ^{III} Zn ^{II}](μ-OH)(H ₂ O)(BPBPMP)](ClO ₄) ₂ (Neves et al., 2007).	37
Figura 12. Estrutura do ligante H ₂ L ¹	39
Figura 13. Ligantes não simétricos (a) H ₂ L ¹ (Piovezan et al., 2010) (b) H ₂ L ² e (c) H ₂ L ² -et e H ₂ L ² -but.	40
Figura 14. Reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP.	48
Figura 15. Formas do DNA plasmidial.	51
Figura 16. Representação de um gel de poliacrilamida desnaturante contendo amostras de um ensaio de footprinting de DNA por Fe-EDTA. Adaptado de Urbach e Waring, (Urbach e Waring, 2005).....	55
Figura 17. Espectro no IR do cmff (ATR).	57
Figura 18. Espectro de ¹ H NMR do cmff em CDCl ₃	57
Figura 19. Espectro no IR do pmea em pastilha de KBr.	59
Figura 20. Espectro de ¹ H NMR do pmea em CDCl ₃	59
Figura 21. Espectro de ESI-MS do ligante pmeamff e sua respectiva simulação da distribuição isotópica com m/z = 214,13 + H ⁺	60
Figura 22. Espectro no IR do pmeamff em pastilha de KBr.	61
Figura 23. Espectro de ¹ H NMR do pmeamff em CDCl ₃	62
Figura 24. Espectro de ESI-MS do pmeamff e sua respectiva simulação da distribuição isotópica com m/z = 362,18 + H ⁺	62
Figura 25. Espectro na região do infravermelho do pmeamffpy em pastilha de KBr.	64
Figura 26. Espectro de ¹ H NMR do pmeamffpy em CDCl ₃	64

Figura 27. Espectro de ESI-MS do ligante pmeamffpy e sua respectiva simulação da distribuição isotópica com $m/z = 454,26 + H^+$.	65
Figura 28. Espectro no IR do H_2L^2 (ATR).	66
Figura 29. Espectro de 1H NMR do H_2L^2 em $CDCl_3$.	67
Figura 30. Espectro de ESI-MS do ligante H_2L^2 e sua respectiva simulação da distribuição isotópica com $m/z = 602,31 + H^+$.	67
Figura 31. Espectro no IR do H_2L^2 -et (ATR).	69
Figura 32. Espectro de 1H NMR do H_2L^2 -et em $CDCl_3$.	69
Figura 33. Espectro de ^{13}C NMR do H_2L^2 -et em $CDCl_3$.	70
Figura 34. Espectro de ESI-QTOF do ligante H_2L^2 -et e sua respectiva simulação da distribuição isotópica com $m/z = 646,38 + H^+$.	70
Figura 35. Espectro no IR do H_2L^2 -but (ATR).	72
Figura 36. Espectro de 1H NMR do H_2L^2 -but em $CDCl_3$.	72
Figura 37. Espectro de ^{13}C NMR do H_2L^2 -but em $CDCl_3$.	73
Figura 38. Espectro de ESI-QTOF do ligante H_2L^2 -but e sua respectiva simulação da distribuição isotópica com $m/z = 674,41 + H^+$.	73
Figura 39. Espectros no IR dos precursores pmea (azul claro), pmeamff (azul escuro) e pmeamffpy (preto) (KBr).	77
Figura 40. Espectros no IR dos ligantes finais H_2L^2 (azul claro), H_2L^2 -et (azul escuro) e H_2L^2 -but (preto) (ATR).	78
Figura 41. Espectro de 1H NMR do pmea em $CDCl_3$.	83
Figura 42. Espectro de 1H NMR do pmeamff em $CDCl_3$.	84
Figura 43. Espectro de 1H NMR do pmeamffpy em $CDCl_3$.	85
Figura 44. Espectro de 1H NMR do H_2L^2 em $CDCl_3$.	86
Figura 45. Espectro de 1H NMR do H_2L^2 -et em $CDCl_3$.	87
Figura 46. Espectro de 1H NMR do H_2L^2 -but em $CDCl_3$.	88
Figura 47. Deslocamentos químicos (δ_c) dos espectros de ^{13}C NMR para os ligantes finais H_2L^2 -et (a) e H_2L^2 -but (b) em $CDCl_3$.	89
Figura 48. Espectro no IR do H_2L^2 (vermelho) e complexo 1 (preto) (ATR).	91
Figura 49. Espectro no IR do H_2L^2 -et (vermelho) e complexo 2 (preto) (ATR).	92
Figura 50. Espectro no IR do H_2L^2 -but (vermelho) e complexo 3 (preto) (ATR).	92
Figura 51. Estruturas calculadas para complexos (a) 1a, (b) 2a e (c) 3a, respectivamente. Os átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbono são omitidos para maior clareza.	96
Figura 52. Espectro de IR do complexo 1 (preto) e calculado para o complexo 1 (vermelho).	99
Figura 53. Espectro de IR do complexo 2 (preto) e calculado para o complexo 2 (vermelho).	99
Figura 54. Espectro de IR do complexo 3 (preto) e calculado para o complexo 3 (vermelho).	100
Figura 55. Estruturas dos complexos correspondentes as fórmulas moleculares encontradas nas análises de CHN, (a) 1, (b) 2 e (c) 3....	101

Figura 56. Proposta de estrutura para o complexo 1.....	103
Figura 57. Proposta de estrutura para os complexos 2 e 3.	103
Figura 58. Espectros eletrônicos do complexo 1 com concentração de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	106
Figura 59. Espectros eletrônicos do complexo 2 com concentração de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	106
Figura 60. Espectros eletrônicos do complexo 3 com concentração de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	107
Figura 61. Espectro eletrônico do complexo 1 em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) com concentração de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	107
Figura 62. Espectro eletrônico do complexo 2 em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) com concentração de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	108
Figura 63. Espectro eletrônico do complexo 3 em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) com concentração de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	108
Figura 64. Espectro eletrônico do complexo 1 no estado sólido.....	109
Figura 65. Espectro eletrônico do complexo 2 no estado sólido.....	109
Figura 66. Espectros eletrônicos do complexo 3 no estado sólido.	110
Figura 67. Espectro de ESI-MS do complexo 1 em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) com a respectiva estrutura proposta. $m/z = 809,21$	111
Figura 68. Espectro de ESI-QTOF do complexo 2 em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) com a respectiva estrutura proposta. $m/z = 879,18$	112
Figura 69. Espectro de ESI-QTOF do complexo 3 em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) com a respectiva estrutura proposta. $m/z = 815,28$	113
Figura 70. Titulação espectrofotométrica para o complexo 1. Faixa de pH: 4 – 8. Adição de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50) com $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl).	115
Figura 71. Titulação espectrofotométrica para o complexo 2. Faixa de pH: 4 – 8. Adição de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50) com $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl).	115
Figura 72. Titulação espectrofotométrica para o complexo 3. Faixa de pH: 4 – 8. Adição de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50) com $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl).	116
Figura 73. Voltamogramas de onda quadrada para os complexos 1 (azul), 2 (vermelho) e 3 (preto) em $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (96:4 V/V%). Condições: $I = \text{NaCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, eletrodo auxiliar: platina, referência: Ag/AgCl (Ag/AgCl vs NHE = +197 mV). $[\text{Complexo}] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	119
Figura 74. Reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP.	119
Figura 75. Dependência da velocidade inicial (V_0) nos valores de pH para a reação de hidrólise promovida pelos complexos (a) 1, (b) 2 e (c) 3.	120
Figura 76. Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP com a concentração do substrato para os complexos 1 – 3. Condições: pH = 7, $[\text{tampão HEPES}] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4).	123

Figura 77. Representação dos mínimos de energia calculados para a interação entre conjugados 2b e 3b e o substrato (grande parte do ligante é omitida para maior clareza).	124
Figura 78. (1) Mudança espectral observada devido à adição consecutiva de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 equivalentes do monoéster DNPP ao complexo 2, pH 7,0, concentração de complexo = 3×10^{-4} mol L ⁻¹ , em CH ₃ CN:H ₂ O (50:50%) tampão HEPES. (2) Adição de 4 equivalentes do diéster BDNPP após 7 h de tempo de reação com DNPP.....	125
Figura 79. Mecanismo proposto para a hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo 1.....	126
Figura 80. Mecanismo proposto para a hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelos complexos 2 e 3.	127
Figura 81. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 1 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μM; [tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 1 a 10 μM; temperatura = 50 °C; tempo = 4 horas ao abrigo de luz.....	128
Figura 82. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 2 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μM; [tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 1 a 10 μM; temperatura = 50 °C; tempo = 4 horas ao abrigo de luz.....	128
Figura 83. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 3 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μM; [tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 1 a 10 μM; temperatura = 50 °C; tempo = 4 horas ao abrigo de luz.....	129
Figura 84. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 1 em função de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μmol L ⁻¹ ; [tampão] = HEPES (10 mmol L ⁻¹ , pH 7,0); [complexo] = 5,0 μmol L ⁻¹ ; [NaCl] = 5 – 50 mmol L ⁻¹ ; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.	132
Figura 85. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 2 em função de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μmol L ⁻¹ ; [tampão] = HEPES (10 mmol L ⁻¹ , pH 7,0); [complexo] = 5,0 μmol L ⁻¹ ; [NaCl] = 5 – 50 mmol L ⁻¹ ; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.	133
Figura 86. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 3 em função de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μmol L ⁻¹ ; [tampão] = HEPES (10 mmol L ⁻¹ , pH 7,0); [complexo] = 5,0 μmol L ⁻¹ ; [NaCl] = 5 – 50 mmol L ⁻¹ ; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.	133
Figura 87. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 1 em função de diferentes concentrações de LiClO ₄ . Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μmol L ⁻¹ ; [tampão] = HEPES (10 mmol L ⁻¹ , pH 7,0); [complexo] = 5 μmol L ⁻¹ ; [LiClO ₄] = 5 – 50 mmol L ⁻¹ ; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.	135

Figura 88. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 2 em função de diferentes concentrações de LiClO ₄ . Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μmol L ⁻¹ ; [tampão] = HEPES (10 mmol L ⁻¹ , pH 7,0); [complexo] = 5 μmol L ⁻¹ ; [LiClO ₄] = 5 – 50 mmol L ⁻¹ ; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.....	135
Figura 89. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 3 em função de diferentes concentrações de LiClO ₄ . Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μmol L ⁻¹ ; [tampão] = HEPES (10 mmol L ⁻¹ , pH 7,0); [complexo] = 5 μmol L ⁻¹ ; [LiClO ₄] = 5 – 50 mmol L ⁻¹ ; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.....	136
Figura 90. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 1, na presença dos diferentes ligantes de sulcos do DNA, netropsina (NET) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μmol L ⁻¹ ; [tampão] = HEPES (10 mmol L ⁻¹ , pH 7,0); [complexo] = 5 μmol L ⁻¹ ; [NET] ou [VM] = 50 μmol L ⁻¹ ; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.....	137
Figura 91. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 2, na presença dos diferentes ligantes de sulcos do DNA, netropsina (NET) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μmol L ⁻¹ ; [tampão] = HEPES (10 mmol L ⁻¹ , pH 7,0); [complexo] = 5 μmol L ⁻¹ ; [NET] ou [VM] = 50 μmol L ⁻¹ ; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.....	138
Figura 92. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 3, na presença dos diferentes ligantes de sulcos do DNA, netropsina (NET) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μmol L ⁻¹ ; [tampão] = HEPES (10 mmol L ⁻¹ , pH 7,0); [complexo] = 5 μmol L ⁻¹ ; [NET] ou [VM] = 50 μmol L ⁻¹ ; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.....	138
Figura 93. Representação estrutural da netropsina (esquerda) e estrutura cristalográfica de um DNA de dupla-hélice com uma molécula de ligada ao sulco menor (direita) (Bortolotto, T., 2006).....	139
Figura 94. Espectro de dicroísmo circular de DNA na presença de concentrações crescentes do complexo 1. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 μmol L ⁻¹ ; [tampão] = 10 mmol L ⁻¹ de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 181 μmol L ⁻¹ ; temperatura = 37 °C.....	141
Figura 95. Espectro de dicroísmo circular de DNA na presença de concentrações crescentes do complexo 2. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 μmol L ⁻¹ ; [tampão] = 10 mmol L ⁻¹ de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 181 μmol L ⁻¹ ; temperatura = 37 °C.....	141
Figura 96. Espectro de dicroísmo circular de DNA na presença de concentrações crescentes do complexo 3. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 μmol L ⁻¹ ; [tampão] = 10 mmol L ⁻¹ de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 181 μmol L ⁻¹ ; temperatura = 37 °C.....	142
Figura 97. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 1, na presença dos diferentes sequestradores de ROS. Condições reacionais:	

[DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [DMSO] = 0,4 mol L^{-1} ; [KI] = 0,5 mol L^{-1} ; [NaN_3] = 0,5 mol L^{-1} ; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.....	143
Figura 98. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 2, na presença dos diferentes sequestradores de ROS. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [DMSO] = 0,4 mol L^{-1} ; [KI] = 0,5 mol L^{-1} ; [NaN_3] = 0,5 mol L^{-1} ; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.....	144
Figura 99. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 3, na presença dos diferentes sequestradores de ROS. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [DMSO] = 0,4 mol L^{-1} ; [KI] = 0,5 mol L^{-1} ; [NaN_3] = 0,5 mol L^{-1} ; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.....	144
Figura 100. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos 1 – 3 em aerobiose. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 7,0); [complexos] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [FeEDTA] = 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; temperatura = 50 °C; tempo = 2 h ao abrigo de luz.	146
Figura 101. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos 1 – 3 em anaerobiose. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 7,0); [complexos] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [FeEDTA] = 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; Temperatura = 50 °C; Tempo = 2 h ao abrigo de luz.	146
Figura 102. Gráfico de k_{obs} versus concentração dos complexos 1 – 3. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 7,0); [complexos] = 0,5 – 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; temperatura = 50 °C; tempo = 0 – 4 h ao abrigo de luz.	148
Figura 103. Footprinting por Fe^{II} -EDTA do oligonucleotídeo ATCG titulado com diferentes concentrações dos complexos 1 – 3. Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 pmol; [tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 7,0); [complexos] = 0 – 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$; temperatura = 25 °C; tempo = 90 segundos ao abrigo de luz.	150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Materiais, reagentes e solventes utilizados nas sínteses e análises.	43
Tabela 2. Valores de coeficiente de absorção (ϵ) do fenolato do substrato 2,4-BDNPP em diferentes valores de pH (Peralta <i>et al.</i> , 2010).	49
Tabela 3. Atribuições das bandas do IR para os precursores.	78
Tabela 4. Atribuições das bandas do IR para os ligantes finais.	79
Tabela 5. Deslocamentos químicos (δ_H) dos espectros de 1H NMR para os precursores.	80
Tabela 6. Deslocamentos químicos (δ_H) dos espectros de 1H NMR para os ligantes finais.	81
Tabela 7. Espécies encontradas na espectrometria de massa.	89
Tabela 8. Atribuições de bandas no IR para ligantes e complexos.	93
Tabela 9. Comprimentos de ligação selecionados para os complexos calculados para comparação com alguns valores de dados cristalográficos (os números dos átomos foram reenumerados para se adequarem aos dados teóricos apresentados neste estudo).	95
Tabela 10. Valores de energia calculados para os complexos 2 e 3 e a influência da amina terminal protonada.	98
Tabela 11. Atribuições de bandas no IR para complexos 1 – 3 (experimental e calculado).	98
Tabela 12. Porcentagens obtidas na análise elementar com seus respectivos valores experimentais e teóricos.	102
Tabela 13. Valores de condutividade molar para os complexos 1 – 3.	102
Tabela 14. Valores de absorção atômica em $mg\ mL^{-1}$ para os complexos 1 – 3.	104
Tabela 15. Dados de espectroscopia eletrônica para complexos 1 – 3.	105
Tabela 16. Valores de pKas encontrados para os complexos 1 – 3 através da titulação espectrofotométrica.	114
Tabela 17. Parâmetros de voltametria de onda quadrada para os complexos 1 , 2 e 3 em H_2O/CH_3CN (96:4, % v/v), [Complexo] = 1×10^{-4} mol L^{-1} . Eletrólito de suporte KCl 0,1 mol L^{-1} , célula eletrolítica contendo três eletrodos: um eletrodo de trabalho de carbono vítreo, um eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de referência comercial $Ag/AgCl$ ($Ag/AgCl$ vs. NHE = +197 mV (Inzelt <i>et al.</i> , 2012) e complexos da literatura para comparação. Potencial redox vs NHE.	118
Tabela 18. Valores de pKas cinéticos e espectrofotométricos para os complexos.	121
Tabela 19. Parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelos complexos 1 – 3 em pH 7,0, a 25°C.	123
Tabela 20. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem dos complexos.	148

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2,4-BDNPP** – Fosfato de bis(2,4-dinitrofenila)
2,4-DNPP – Fosfato de 2,4-dinitrofenila
CD – Dicroísmo circular (do inglês, “*circular dichroism*”)
CHES – Ácido 2-[N-cicloexilamino]etanossulfônico
cmff – 3-(clorometil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído
CT-DNA – DNA de timo de bezerro (do inglês, “*Calf thymus DNA*”)
DNA – Ácido desoxirribonucléico (do inglês, “*Deoxyribonucleic acid*”)
DTT – Ditioneitol
E_c – Eficiência catalítica
E_a – Energia de ativação
EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético
ESI-MS – Espectrometria de massas com ionização electrospray (do inglês, “*Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*”)
NHE – Eletrodo normal de hidrogênio (do inglês, “*Normal hydrogen electrode*”)
E_{pa} – Potencial de pico anódico
E_{pc} – Potencial de pico catódico
EROs – Espécies reativas de oxigênio
ε – Coeficiente de absorção
f – Fator catalítico
F I – Forma superenovelada do DNA
F II – Forma circular aberta do DNA
F III – Forma linear do DNA
H₂pmeamff (H₂L²) – 2-hidroxi-3-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((2-(piridin-2-il)etil)(piridin-2-ilmethyl)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-5-metilbenzaldeído
H₂pmeapycbut (H₂L²-but) – 2-(((4-aminobutil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((2-(piridin-2-yl)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol
H₂pmeapycet (H₂L²-et) – 2-(((2-aminoetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((2-(piridin-2-il)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol
HEPES – Ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazino]-etanossulfônico
Hmb – 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído
I – Força iônica
IR – Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

K_{ass} – Constante de associação
kbPAP – Fosfatase ácida púrpura de feijão vermelho (do inglês, “*Kidney bean purple acid phosphatase*”)
 k_{cat} – Constante catalítica
 k_{uncat} – Constante da reação não catalisada
 K_{M} – Constante de Michaelis-Menten
MES – Ácido 2-[N-Morfolino]etanossulfônico
MM – Massa molar
NET – Netropsina
PAPs – Fosfatases ácidas púrpuras (do inglês, “*Purple acid phosphatases*”)
pH – Potencial hidrogeniônico
pmea – 2-(piridin-2-il)-N-(piridin-2-ilmetil)etanamina
pmeamff – 2-hidroxi-5-metil-3-(((2-(piridin-2-il)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)benzaldeído
pmeamffpy – 4-metil-2-(((2-(piridin-2-il)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((piridin-2-ilmetil)amino)metil)fenol
 $^{13}\text{C NMR}$ – Ressonância magnética nuclear de carbono (do inglês, “*carbon-13 nuclear magnetic resonance*”)
 $^1\text{H NMR}$ – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (do inglês, “*hydrogen-1 nuclear magnetic resonance*”)
RNA – Ácido ribonucleico (do inglês, “*Ribonucleic acid*”)
TMS – Tetrametilsilano
TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano
TRIS-HCl – Hidrocloreto de tris(hidroximetil)aminometano
UV-Vis – Espectroscopia na região do ultravioleta-visível
 V_0 – Velocidade inicial
VM – Verde de Metila
 $V_{\text{máx}}$ – Velocidade máxima
 δ – Deformação angular (IR)
 δ_{C} – Deslocamento químico do carbono ($^{13}\text{C NMR}$)
 δ_{H} – Deslocamento químico do hidrogênio ($^1\text{H NMR}$)
 $\lambda_{\text{máx}}$ – Comprimento de onda no máximo de absorção
 ν – Estiramento (IR)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1. QUÍMICA BIONORGÂNICA	25
1.2. ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA).....	27
1.3. METALOENZIMAS	29
1.4. FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS	30
1.5. COMPLEXOS MODELOS PARA AS FOSFATASES ÁCIDAS PURPÚRAS	36
1.6. SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO.....	38
1.7. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	39
2. OBJETIVOS	42
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	42
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3. PARTE EXPERIMENTAL	43
3.1. MATERIAIS	43
3.2. MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO	45
3.2.1. ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IR)	45
3.2.2. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO ¹ H NMR E DE ¹³ C NMR ..	45
3.2.3. ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	46
3.2.4. ANÁLISE ELEMENTAR DE CHN	46
3.2.5. CONDUTIMETRIA	47
3.2.6. ABSORÇÃO ATÔMICA	47
3.2.7. ELETROQUÍMICA	47
3.2.8. TITULAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA	48
3.2.9. MEDIDAS DE REATIVIDADE NA HIDRÓLISE DO SUBSTRATO FOSFATO DE BIS-(2,4-DINITROFENILA) (2,4-BDNPP)	48
3.2.10. CLIVAGEM DE DNA PLASMIDIAL – PROCEDIMENTO GERAL	50
3.2.10.1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPLEXOS EM RELAÇÃO AO DNA	51
3.2.10.2. EFEITO DO PH DOS COMPLEXOS EM RELAÇÃO AO DNA.....	51
3.2.11. ANÁLISE DO MODO DE INTERAÇÃO ENTRE OS COMPLEXOS COM O DNA.....	52
3.2.11.1. EFEITO DA FORÇA IÔNICA	52
3.2.11.2. EFEITO DOS LIGANTES DE SULCO	53
3.2.11.3. DICROÍSMO CIRCULAR	53
3.2.12. AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE CLIVAGEM....	53
3.2.12.1. EFEITO DOS SEQUESTRADORES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	53
3.2.12.2. EFEITO DA AUSÊNCIA DE OXIGÊNIO	54

3.2.13.	CINÉTICA DE CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL..	54
3.2.14.	FOOTPRINTING DE DNA POR FE-EDTA	55
3.3.	SÍNTESE DOS LIGANTES.....	56
3.3.1.	SÍNTESE DO PRÓ-LIGANTE CMFF - 3-(CLOROMETIL)- 2-HIDROXI-5-METILBENZALDEÍDO	56
3.3.2.	SÍNTESE DO PRÓ-LIGANTE PMEA – 2-(PIRIDIN-2-IL)-N- (PIRIDIN-2-ILMETIL)ETANAMINA	58
3.3.3.	SÍNTESE DO PRÓ-LIGANTE PMEAMFF – 2-HIDROXI-5- METIL-3-(((2-(PIRIDIN-2-IL)ETIL)(PIRIDIN-2- ILMETIL)AMINO)METIL)BENZALDEÍDO	60
3.3.4.	SÍNTESE DO PRÓ-LIGANTE PMEAMFFPY – 4-METIL-2-(((2-(PIRIDIN-2-IL)ETIL)(PIRIDIN-2- ILMETIL)AMINO)METIL)-6-(((PIRIDIN-2- ILMETIL)AMINO)METIL)FENOL	63
3.3.5.	SÍNTESE DO LIGANTE H ₂ PMEAMFF (H ₂ L ²) - 2-HIDROXI- 3-(((2-HIDROXI-5-METIL-3-(((2- IL)ETIL)(PIRIDIN-2- ILMETHIL)AMINO)METIL)BENZIL)(PIRIDIN-2- ILMETIL)AMINO)METIL)-5-METILBENZALDEÍDO	65
3.3.6.	SÍNTESE DO LIGANTE H ₂ PMEAPYCET (H ₂ L ² -ET) - 2-(((2-AMINOETIL)AMINO)METIL)-6-(((2- HIDROXI-5-METIL-3-(((2-(PIRIDIN-2-IL)ETIL)(PIRIDIN-2- ILMETIL)AMINO)METIL)BENZIL)(PIRIDIN-2- ILMETIL)AMINO)METIL)-4-METILFENOL	68
3.3.7.	SÍNTESE DO H ₂ PMEAPYCBUT (H ₂ L ² -BUT) – 2-(((4- AMINOBTIL)AMINO)METIL)-6-(((2-HIDROXI- 5-METIL- 3-(((2-(PIRIDIN-2-IL)ETIL)(PIRIDIN-2- ILMETIL)AMINO)METIL)BENZIL)(PIRIDIN- ILMETIL)AMINO)METIL)-4-METILFENOL	71
3.4.	SÍNTESE DOS COMPLEXOS.....	74
3.4.1.	SÍNTESE DO COMPLEXO 1	74
3.4.2.	SÍNTESE DO COMPLEXO 2	75
3.4.3.	SÍNTESE DO COMPLEXO 3	76
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	77
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES	77
4.1.1.	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IR)	77
4.1.2.	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO E CARBONO – NMR (¹ H E ¹³ C)	79
4.1.3.	ESPECTROMETRIA DE MASSA COM IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY (ESI-MS E ESI-QTOF)	89
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS	90
4.2.1.	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IR)	90
4.2.2.	CÁLCULOS DE ESTRUTURA ELETRÔNICA	94
4.2.3.	ANÁLISE ELEMENTAR DE CHN	100

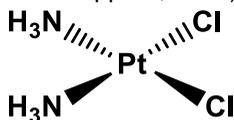
4.2.4. CONDUTIMETRIA	102
4.2.5. ABSORÇÃO ATÔMICA	104
4.2.6. ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA (UV-VIS)	105
4.2.7. ESPECTROMETRIA DE MASSA COM IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY (ESI-MS E ESI-QTOF)	110
4.2.8. TITULAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA	114
4.2.9. ELETROQUÍMICA	116
4.2.10. ESTUDOS DE REATIVIDADE.....	119
4.2.10.1. EFEITO DO PH NA HIDRÓLISE DO 2,4- BDNPP	119
4.2.10.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP ..	122
4.2.10.3. PROPOSTA MECANÍSTICA PARA A HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP	126
4.2.11. CLIVAGEM DE DNA PLASMIDIAL.....	128
4.2.11.1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPLEXOS.....	128
4.2.11.2. EFEITO DO PH	131
4.2.12. A ANÁLISE DOS MODOS DE INTERAÇÃO	131
4.2.12.1. EFEITO DA FORÇA IÔNICA	131
4.2.12.2. EFEITOS DOS LIGANTES DE SULCO .	136
4.2.12.3. DICROÍSMO CIRCULAR	140
4.2.13. AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE CLIVAGEM.....	143
4.2.13.1. EFEITO DOS INIBIDORES DE EROS.....	143
4.2.14. ENSAIO SOB ATMOSFERA DE ARGÔNIO.....	146
4.2.15. ENSAIOS CINÉTICOS.....	148
4.2.16. FOOTPRINTING DE DNA POR FE-EDTA.....	150
5. CONCLUSÕES	152
6. REFERÊNCIAS.....	154

1. INTRODUÇÃO

1.1. Química Bioinorgânica

Com os recentes avanços da ciência moderna, a expectativa de vida da população tem aumentado e conseqüentemente a preocupação com o conforto e saúde do homem. O câncer, por exemplo, é responsável por muitos óbitos por todo mundo, em 2015 de acordo com a Organização Mundial de Saúde foram 8,8 milhões mortes pelo mundo (Saúde, 2017). Por isso, muitos cientistas buscam o entendimento de ação de novos fármacos antitumorais. Desde a descoberta por Rosenberg e colaboradores (Rosenberg e Vancamp, 1969; Rosenberg, 1971) sobre a utilização da cisplatina (*cis*-diaminodichloroplatina(II)), como mostra a Figura 1, como agente antitumoral houve um aumento significativo na utilização de complexos metálicos com propriedades farmacológicas e como nucleases sintéticas.

Figura 1. Representação esquemática do complexo *cis*-diaminodichloroplatina(II) (Graf e Lippard, 2012).



Os medicamentos baseados em platina, utilizados como quimioterapêuticos ganharam atenção significativa ao longo dos anos, na busca de medicamentos mais eficazes do que a *cis*-diaminodichloroplatina(II), porém com menos efeitos adversos (Mitra, 2016; Musumeci *et al.*, 2016; Corinti *et al.*, 2017; Ypsilantis *et al.*, 2017).

Mesmo com toda a evolução quando se trata de fármacos, os mesmos não estão livres de uma série de efeitos colaterais. Dessa maneira, é desejável combinar diferentes características para diminuir a toxicidade dos fármacos e obter especificidade (Ronconi e Sadler, 2007). Essa barreira a ser superada, traz uma perspectiva para os cientistas de estudar compostos de coordenação com outros íons metálicos como por exemplo com Fe e Zn, pois espera-se encontrar compostos com menores toxicidades e com maior especificidade ao ligar-se ao DNA.

Para o planejamento de novos fármacos é necessário identificar os fatores responsáveis pela estabilização e especificidade do fármaco-DNA. Existem algumas maneiras principais em que os compostos de coordenação podem interagir com dupla cadeia de DNA, sendo elas por interações eletrostáticas, intercalação e ligação pelos sulcos (Blackburn, 2006).

Já a importância de usar metais em sistemas biológicos é devido a capacidade dos mesmos em perder facilmente elétrons, formando íons carregados positivamente, e assim como os metais são deficientes em elétrons possuem atração por biomoléculas como o DNA que são ricas em elétrons. Diversos fatores são importantes para a estabilidade termodinâmica do centro metálico em sistemas biológicos, entre eles: o estado de oxidação do metal, o tamanho do anel quelato, a geometria da coordenação com a biomolécula, a estrutura tridimensional e a estequiometria. Além disso, outros fatores, tais como impedimento estérico, a natureza dos ligantes que interagem com o centro metálico e mesmo ligantes que não estão ligados diretamente ao centro metálico, e que podem ou não fazer parte do sítio ativo, também podem aumentar ou diminuir a estabilidade do sistema (Donia, 1998).

Muitas enzimas são conhecidas por estarem relacionadas com pelo menos um íon metálico (Waldron *et al.*, 2009), e compreender a função desses metais é de extrema importância.

Nesse contexto, a Química Bioinorgânica tem como propósito a investigação do comportamento desses íons metálicos em sistemas biológicos, bem como suas reatividades nesses sistemas, despertando dessa maneira novas perspectivas e atraindo muitos pesquisadores de diversos ramos do conhecimento para essa área (Shriver e Atkins, 2008). Este campo multidisciplinar da ciência compreende então o estudo dos íons metálicos e suas influências com ligantes de natureza biológica, bem como o seu comportamento frente a um organismo vivo (Kaim *et al.*, 2013).

Desta forma, busca-se sintetizar compostos que tenham características semelhantes com o sítio ativo das enzimas para que seja possível obter um biomimético sintético e um possível fármaco. Dada a grande complexidade das estruturas das metaloenzimas, é comum a utilização de compostos de baixa massa molar que possuam um sítio catalítico análogo (modelos sintéticos). Faz-se então o uso de comparações com o sistema

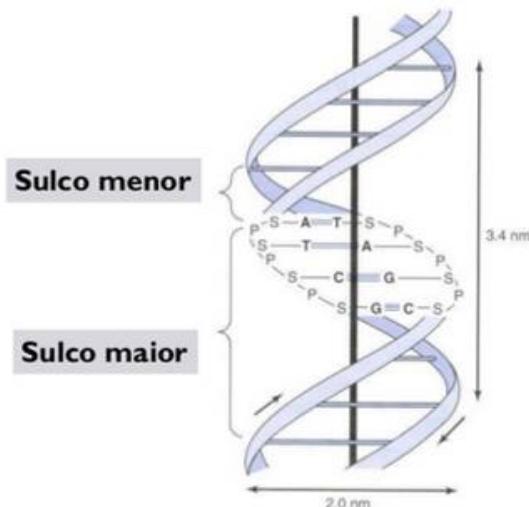
biológico, a fim de se obter informações da função do metal nestes sistemas (Gichinga e Striegler, 2008).

1.2. Ácido desoxirribonucleico (DNA)

A busca por conhecimentos sobre a estrutura genética é alvo de muitos pesquisadores, principalmente depois do impacto que a caracterização da estrutura tridimensional do ácido desoxirribonucleico causou no mundo científico. Compreender e esclarecer essa estrutura incentivou pesquisadores na busca do entendimento dessas moléculas no ambiente biológico (Patra, 2007).

O DNA é o material genético que contém informações extremamente importantes sobre a hereditariedade. Como proposto por Watson e Crick, o DNA é uma macromolécula, ou seja, um grande polímero linear com nucleotídeos (monômeros), sua estrutura apresenta duas cadeias polinucleotídicas em hélice, formando uma dupla-hélice. Além do pareamento específico, entre as bases, Watson e Crick propuseram a possível cópia do material genético. Através desse pareamento, é possível verificar os sulcos do DNA, maior e menor como mostra a Figura 2. (Watson e Crick, 1953).

Figura 2. Estrutura tridimensional do DNA. Adaptado de (Horton, 2006).



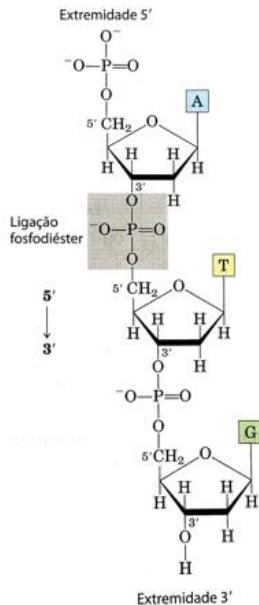
A molécula de DNA é composta por três unidades químicas, sendo elas:

- Bases nitrogenadas: purinas - guanina (G) e adenina (A) e a pirimidinas, citosina (C) e a timina (T) para o DNA e uracila (U) no caso do RNA (que é o responsável pela síntese de proteínas da célula).

- Pentose: esse açúcar formado por cinco átomos de carbono tem a missão de distinguir o RNA e DNA, se a pentose em questão é a D-ribose deverá ser o RNA e no caso DNA será a 2-desóxi-D-ribose.

- Fosfato: um radical de ácido fosfórico. A ligação fosfodiéster é criada com o grupo 5'-fosfato de uma unidade nucleotídica é ligado ao grupo 3'-hidroxil do próximo nucleotídeo (Nelson e Cox, 2014).

Figura 3. Modelo de ligação fosfodiéster (Nelson e Cox, 2014).



Estudos com compostos que possuem íons metálicos como Fe^{III}, Zn^{II} e Cu^{II} demonstram clivar a ligação fosfodiéster de maneira eficaz (Sigman e Chen, 1990; Sigman *et al.*, 1993; Hegg e Burstyn, 1995; Krämer, 1999; Sreedhara *et al.*, 2000; Cowan, 2001; Liu *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2007; Cowan, 2008; Liu e Wang,

2009; Souza, 2010; Souza *et al.*, 2013; Zastrow e Pecoraro, 2014; Camargo, Tiago P. *et al.*, 2015; Chennam, Kishan Prasad *et al.*, 2016; Li, Shuo *et al.*, 2016; Xiao, Ying *et al.*, 2016).

Enzimas podem alterar ou reconhecer uma conformação em lugar específico do DNA, é importante na mimetização dessas enzimas que os compostos de coordenação alterem a estrutura do DNA de maneira específica. A estrutura tridimensional do DNA mais encontrada em sistemas biológicos é a forma B, porém possui outras formações como a forma A e Z (Blackburn, 2006; Nelson e Cox, 2011; 2014; Pages *et al.*, 2015).

O DNA plasmidial é uma molécula circular, covalentemente fechada (forma superenovelada), porém dependendo das condições, ela pode se converter à forma circular relaxada (Nelson e Cox, 2014).

Dada toda a importância do papel do DNA, a busca de compostos biomiméticos que mimetizem enzimas e possam interagir com o DNA tem crescido e já está sendo relatado na literatura compostos que conseguem clivar o DNA e com possível ação antitumoral (González-Álvarez *et al.*, 2005; Peralta, *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011; Shahabadi, 2014; Srishailam *et al.*, 2014; Wang, L. *et al.*, 2014; Wang, Q. *et al.*, 2014; Ragheb *et al.*, 2015).

1.3. Metaloenzimas

Enzimas são proteínas que aceleram reações químicas e são considerados catalisadores biológicos. São de extrema importância, pois a maioria das reações químicas nos sistemas biológicos são lentas e necessitam das enzimas, pois sem elas muitas reações dificilmente aconteceriam. Nesse sentido, têm-se as metaloenzimas que podem ser definidas como biopolímeros constituídos por aminoácidos, unidos através de ligações peptídicas, organizados de maneira que criam um ambiente tridimensional (sítio ativo) que possui um ou mais íons metálicos que favorecem algumas reações químicas (Wilcox, 1996). Dessa forma, complexos metálicos podem mimetizar metaloenzimas, pois são compostos projetados com pontes exógenas, ligantes que imitam os resíduos de aminoácidos e possuem metais.

Para a obtenção dos compostos de coordenação que possam atuar na catálise de substratos biológicos, são projetados ligantes com átomos N,O doadores com grupos funcionais que

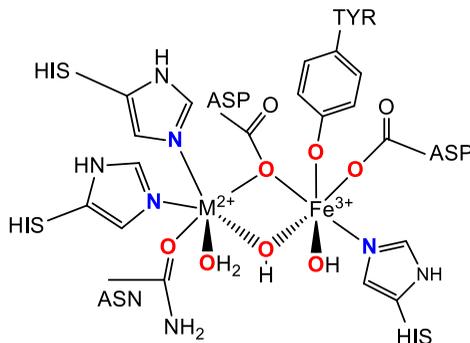
mimetizem os resíduos de aminoácidos existentes na metaloenzima de interesse. A utilização de metais de transição para síntese de compostos metálicos com atividade de nuclease, tanto oxidativa como hidrolítica, tem obtido um grande sucesso, mas ainda existe muito a ser estudado para o melhoramento de suas atividades quando estas são comparadas com as reações mediadas por enzimas.

Dentre as várias metaloenzimas, têm-se as fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) que são enzimas binucleares e serão foco desse estudo.

1.4. Fosfatases Ácidas Púrpuras

Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs) são metaloenzimas que pertencem à classe das hidrolases, catalisando a hidrólise de uma série de substratos fosforilados em valores de pH ácidos. As PAPs contêm em seus sítios ativos um centro binuclear $Fe^{III}-M^{II}$ ($M = Fe, Mn$ ou Zn) (Mitić *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2015a), conforme mostra a Figura 4. As PAPs foram isoladas de diversas fontes, desde leveduras, fluído uterino de suínos (ufPAP) (Chen *et al.*, 1973), baço de bovinos (bsPAP) (Campbell e Zerner, 1973), macrófagos, lisossomos humanos (Lin *et al.*, 1983), ossos de ratos (rbPAP) (Anderson e Toverud, 1986) e até bactérias (Schenk *et al.*, 2000). Algumas PAPs foram isoladas de vegetais, como na batata doce (spPAP) (Hefler e Averill, 1987), arroz (Zhang *et al.*, 2011), feijão vermelho (kbPAP) (Beck, Jennifer L. *et al.*, 1986) e na soja (sbPAP) (Lebansky *et al.*, 1992). As PAPs mais estudadas são as de origem animal de fluído uterino de suínos (ufPAP) e baço de bovinos (bsPAP), e de origem vegetal as derivadas do feijão vermelho (kbPAP) (Sträter, 1995; 1996; Klabunde e Krebs, 1997; Guddat, 1999; Lindqvist, 1999; Schenk, 1999; Than *et al.*, 1999; Uppenberg, 1999).

Figura 4. Esquema do sítio ativo das PAPs (Klabunde, 1996).



Conforme mostrado na Figura 4, o íon de Fe^{III} está coordenado pelos resíduos de aminoácidos de cadeias laterais aspartato (Asp135), tirosina (Tyr167), histidina (His325) e um grupo carboxilato monodentado (Asp164) atuando como ponte entre os centros metálicos, conferindo uma geometria octaédrica distorcida. Já o íon M^{II} está coordenado por duas histidinas (His286 e His323) e pelo oxigênio da amida no caso da asparagina (Asn201). Completando a esfera do M^{II} foi modelada uma molécula de água e uma ponte hidroxila para a estrutura mostrada na Figura 2. Os centros metálicos de Fe^{III} e Zn^{II} na estrutura da kbPAP, por exemplo, possuem uma distância de 3,26 Å entre seus centros (Klabunde, 1996). Complexos $Fe^{III}Zn^{II}$ sintetizados pelo nosso grupo mostram distância muito semelhante entre esses metais (Neves *et al.*, 2007; Peralta *et al.*, 2010).

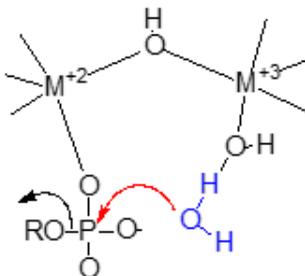
As diferenças mais relevantes entre as PAPs das diversas fontes onde foram encontradas são originárias dos metais que compõem o sítio ativo da enzima, sendo que os resíduos de aminoácidos são conservados. Na kbPAP e sbPAP encontram-se centros heterobinucleares de $Fe^{III}Zn^{II}$ e $Fe^{III}Mn^{II}$, respectivamente e na ufPAP encontra-se um sítio ativo homobinuclear de $Fe^{III}Fe^{II}$ na forma ativa e um centro $Fe^{III}Fe^{III}$ na forma inativa (Klabunde, 1996; Guddat, 1999; Lindqvist, 1999).

A primeira PAP que teve sua estrutura resolvida por difratometria de raios X do grupo das metaloenzimas foi a kbPAP (Klabunde, 1996). Com a resolução de estruturas das PAPs, detalhes acerca do mecanismo em que as metaloenzimas hidrolisam os ésteres de fosfato começaram a ser elucidados.

Sugere-se que a His296 protone o grupo alcóxido abandonador (**3**). O ataque nucleofílico resulta em um estado de transição pentacoordenado, o qual é conservado no sítio ativo pelos resíduos de histidina, His202 e His295. Com a protonação do grupo álcool abandonador pelo resíduo de histidina, His296, a hidrólise começa a ocorrer, e em seguida, ocorre à clivagem da ligação P-OR (Lindqvist, 1999).

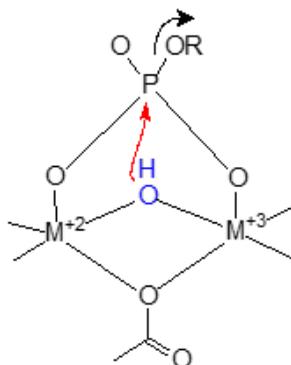
Outro mecanismo foi proposto por Merkx e colaboradores, que sugeriram que o hidróxido terminal que está coordenado ao centro metálico de Fe^{III} , desprotona outra molécula de água da segunda esfera de coordenação do íon Fe^{III} , e esta faria o ataque nucleofílico intramolecular (Merkx e Averill, 1999; Merkx *et al.*, 1999) (Figura 6).

Figura 6. Propostas de ataque nucleofílico por Merkx e colaboradores para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAPs (Merkx e Averill, 1999; Merkx *et al.*, 1999).



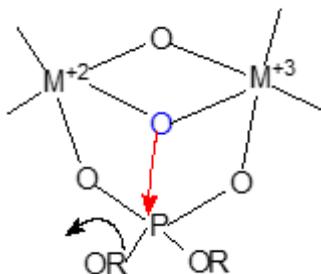
Para a uteroferrina ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$) foi proposto como mostra na Figura 7, que o éster de fosfato está coordenado ao centro metálico de maneira bidentada como ponte (Wang *et al.*, 1999). Dessa maneira, a proposta é que a ponte $\mu\text{-OH}$ faria o ataque ao fosfato, e assim atuaria como nucleófilo.

Figura 7. Propostas de ataque nucleofílico por Wang e colaboradores para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAPs (Wang *et al.*, 1999).



Estudos feitos com a fosfatase extraída de batata doce ($Fe^{III}Mn^{II}$), mostraram na Figura 8 outro mecanismo através da presença de ponte oxo em pH 4,9 (Schenk, 1999).

Figura 8. Propostas de ataque nucleofílico por Schenk e colaboradores para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAPs (Schenk, 1999).



No entanto, ainda não se tem estabelecido de maneira inequívoca se o éster de fosfato se coordena aos dois íons metálicos de forma bidentada ou de forma monodentada no metal bivalente.

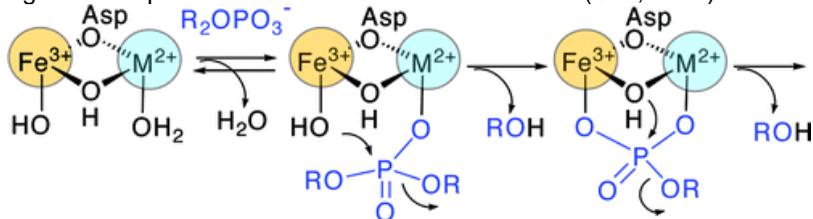
As PAPs foram reportadas como incapazes de hidrolisar diésteres de fosfato baseado na falta de atividade frente à reação de hidrólise do fosfato bis(p-nitrofenil) (BNPP). Porém, os complexos modelos concebidos para o sítio catalítico da PAP

mostraram-se capazes de hidrolisar diésteres, sugerindo que a incapacidade da PAP hidrolisar o BNPP poderia ser resultante de efeitos estéreo (Cox, 2007).

Dessa forma, foram testadas as PAPs de porco (uteroferrinas) e as de feijão vermelho na reação de hidrólise dos diésteres fosfato metil-p-nitrofenil (MpNPP) e fosfato etil-p-nitrofenil (EpNPP). Foi verificado que as PAPs são capazes de hidrolisar diésteres que apresentem um segundo grupo pequeno (Cox, 2007).

Além disso, a reação com o diéster MpNPP mostrou que um grupo hidróxido ligado em posição terminal é o nucleófilo da reação, seguido pelo ataque de um hidróxido ligado em ponte. Foi proposto que as reações da PAP diesterase ocorrerem por um mecanismo através do qual ocorre uma coordenação monodentada do substrato com subsequente hidrólise da primeira ligação éster pelo hidróxido ligado ao Fe^{3+} , e o metilfosfato coordena-se como ponte entre os centros metálicos e prontamente sofreria o ataque pela ponte μ -hidróxido como mostra a Figura 9 (Cox, 2007).

Figura 9. Proposta mecanística da PAP diesterase. (Cox, 2007).



Quanto à função proposta para os íons metálicos propõe-se que estes atuem como ácido de Lewis (Lindqvist, 1999), embora na PAP $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ haja o envolvimento de radicais e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que deve ser uma das causas de osteoporose (Kaija, 2002; Mitic *et al.*, 2006; Schenk *et al.*, 2013).

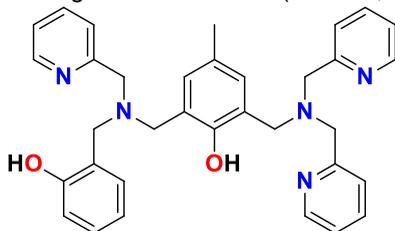
1.5. Complexos modelos para as fosfatases ácidas púrpuras

Um grande número de estudos envolvendo compostos miméticos que funcionam como modelo para as PAPs foram relatados na literatura (Mitic *et al.*, 2006; Jarenmark *et al.*, 2010; Peralta *et al.*, 2010; Piovezan *et al.*, 2010; Jarenmark *et al.*, 2011; Comba, Gahan, Hanson, *et al.*, 2012; Comba, Gahan, Mereacre, *et al.*, 2012; Daumann *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2014; Daumann *et al.*, 2014; Mcgeary *et al.*, 2014; Bernhardt *et al.*, 2015; Roberts *et al.*, 2015b). Porém mesmo com todas as informações e estudos cinéticos, espectroscópicos e cristalográficos das metaloenzimas e compostos com íons metálicos, é de extrema importância o estudo de compostos de coordenação modelos para metaloenzimas como as PAPs (Mcgeary *et al.*, 2014), para estabelecer sua ação fisiológica.

Os químicos bioinorgânicos têm dado enfoque na síntese de ligantes que gerem complexos metálicos com características presentes nas PAPs, como distância dos centros metálicos próximas a 3,5 Å, presença de grupamentos ponte exógenas, assimetria dos centros metálicos devido por diferentes átomos N,O-doadores e presença de sítios lábeis - importantes no processo de catálise (Zhao, M. *et al.*, 2013).

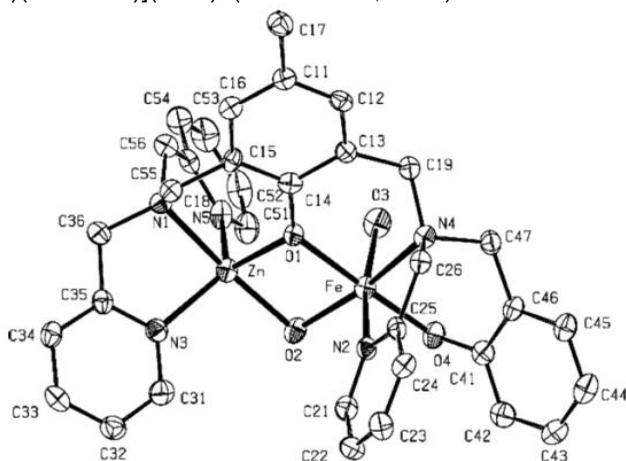
Uma série de complexos com o ligante H₂BPBPMP (Figura 10) já foram sintetizados, os quais envolvem estudos de reatividade frente à hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP, como por exemplo complexos de Fe^{III}Mn^{II} (Karsten, 2002), Fe^{III}Fe^{II} (Neves, 2010; Smith *et al.*, 2012) e Fe^{III}Zn^{II} (Neves *et al.*, 2007; Peralta *et al.*, 2010).

Figura 10. Estrutura do ligante H₂BPBPMP (Karsten, 2002).



Neves e colaboradores preparam o complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})(\text{BPBPMP})](\text{ClO}_4)_2$ (Figura 11), o qual foi caracterizado como sendo o primeiro modelo estrutural para o sítio ativo da kbPAP com um grupo fenolato terminal, uma ponte hidróxio e uma molécula de água ligada ao sítio de Fe^{III} , apresentando um fator de aceleração de 4800 vezes no processo de hidrólise do diéster fosfato de bis(2,4-dinitrofenila) (BDNPP) em relação a reação não-catalisada (Neves *et al.*, 2007).

Figura 11. ORTEP do cátion do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})(\text{BPBPMP})](\text{ClO}_4)_2$ (Neves *et al.*, 2007).



A capacidade de mimetizar a atividade de determinadas proteínas hidrolisando DNA ou RNA de maneira reversível e com seletividade de sequência ou estrutura tem se tornado cada vez mais importante para a química bioinorgânica e ganhou atenção considerável nos últimos anos (Wang *et al.*, 2011; Muxel *et al.*, 2014; Tirel *et al.*, 2014; Camargo, T. P. *et al.*, 2015; De Souza *et al.*, 2015; Chennam, K. P. *et al.*, 2016; Li, S. *et al.*, 2016; Luong *et al.*, 2016; Mukherjee *et al.*, 2016; Naik *et al.*, 2016). Uma vez que a hidrólise de ácidos nucleicos é inibida por grande carga negativa do esqueleto polianiónico dos ácidos nucleicos, a utilização de metais carregados positivamente como co-fatores é uma das estratégias que podem ser utilizadas para efetuar estas reações. O uso de um metal e/ou ligante pode tornar a atividade das nucleases mais eficiente e seletiva. Também pode influenciar o

mecanismo (hidrolítico ou oxidativo) da clivagem de DNA mediada por metal (Cowan, 2001).

Os complexos metálicos de transição foram utilizados com sucesso em estudos sobre os mecanismos hidrolíticos de substratos modelo e/ou DNA (Camargo, T. P. *et al.*, 2015; De Souza *et al.*, 2015). A utilização de metais de transição para síntese de compostos metálicos com atividade hidrolítica, tem tido um grande sucesso, mas ainda existe muito a ser estudado para o melhoramento de suas atividades quando estas são comparadas com as reações mediadas por enzimas (Zhao, M. *et al.*, 2013).

1.6. Segunda esfera de coordenação

Embora os resíduos de aminoácidos da primeira esfera de coordenação desempenhem um papel crucial na catálise enzimática, a compreensão da influência da segunda esfera na catálise não é tão direta.

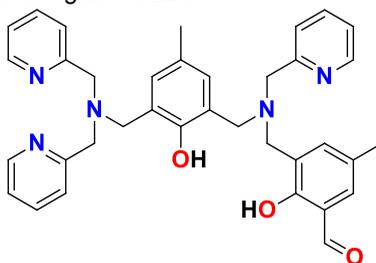
Para superar essa desvantagem, o uso de complexos metálicos, com ligantes contendo grupos não coordenados e que devem ser capazes de interagir de maneira similar aos aminoácidos presentes na segunda esfera de coordenação das metaloenzimas são atualmente foco de estudo.

A segunda esfera de coordenação possui interações que são não-covalentes, como por exemplo, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, efeitos hidrofóbicos e forças de van der Waals, entre outras. Estas interações podem ajudar não só na seletividade com relação ao substrato, mas também na estabilização do estado de transição enzima-substrato, trazendo melhores resultados para a catálise (Tang *et al.*, 2013; Zhao, Meng *et al.*, 2013).

Há muitas maneiras de recriar o ambiente enzimático, modulando o ambiente químico dos ligantes com a adição de cadeias laterais que sejam ativas cataliticamente, como foi o trabalho de Piovezan e colaboradores que sintetizaram um derivado do ligante H₂BPBPMP com um aldeído presente no fenol lateral. A presença deste grupo permite a reação deste com diversos outros compostos e suportes como a sílica 3-aminopropil funcionalizada. Esse sistema apresentou um fator catalítico em torno de 118.500 vezes mais rápido quando comparado à reação não catalisada (Piovezan *et al.*, 2012).

Muxel e colaboradores sintetizaram um complexo mononuclear de La^{III} com o ligante H_2L^1 que possui modificação em sua cadeia lateral como mostra a Figura 12. Foi observado que a eficiência catalítica foi aumentada com o complexo imobilizado em sílica funcionalizada com 3-aminopropil (catálise heterogênea), quando comparado ao complexo livre (catálise homogênea). Este efeito foi atribuído à presença da segunda esfera de coordenação e uma associação mais forte do complexo com o substrato 2,4-BDNPP (Muxel *et al.*, 2014).

Figura 12. Estrutura do ligante H_2L^1 .



Recentemente, o efeito da chamada segunda esfera de coordenação foi relatado para biomiméticos sintéticos das metalohidrolases (Nakamoto, 1977; Piovezan *et al.*, 2010; Shook e Borovik, 2010; De Souza *et al.*, 2013; Bosch *et al.*, 2015; De Souza *et al.*, 2015).

1.7. Justificativa do trabalho

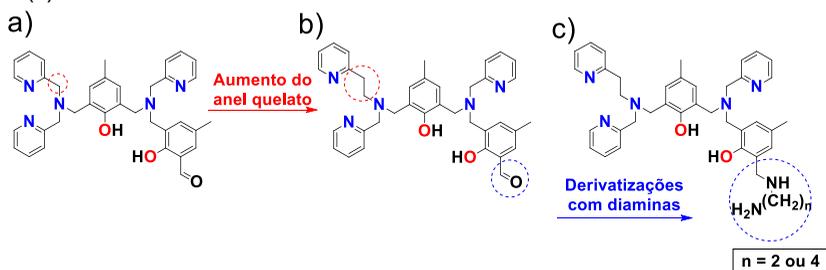
Visto que vários estudos envolvendo a 1ª esfera de coordenação das PAPs têm sido reportados, com vários mecanismos de ação propostos, atualmente busca-se ampliar esses conhecimentos utilizando estratégias de síntese focadas no efeito da 2ª esfera de coordenação, tentando elucidar não somente o sítio ativo das metaloenzimas, mas também a função dos resíduos de aminoácidos presentes ao seu redor.

Uma das estratégias utilizadas no presente trabalho, foi a utilização de anéis quelatos com diferentes tamanhos (de cinco e seis membros) em ligante inéditos. Foi realizada uma modificação estrutural do ligante H_2L^1 (Figura 13a), no qual um grupo aminometilpiridina foi alterado para aminoetilpiridina, permitindo

assim a formação de anéis quelantes de 5 e 6 membros no lado macio do ligante quando comparado a H_2L^1 . A substituição de um grupo metila presente no ligante H_2L^1 por um grupo etila confere grau de liberdade na unidade central 2,6-diaminofenolato e efeitos na estabilidade dos complexos. Alterar o número de membros no anel quelante pode afetar a estabilidade dos complexos, devido a fatores entrópicos e entálpicos (Martell, 1993), e, portanto, a reação catalisada por esses complexos (Mckeown *et al.*, 2013).

Ainda visando os estudos de segunda esfera de coordenação foram realizadas derivatizações do grupo aldeído presente no ligante proposto com a inserção de diaminas alifáticas modificando o lado duro do ligante H_2L^2 com etilenodiamina e butanodiamina gerando os ligantes H_2L^2 -et e H_2L^2 -but (Figura 13c), respectivamente. A amina terminal destas cadeias laterais pode gerar um grupo carregado positivamente a um pH específico, o qual, por sua vez, pode influenciar diretamente a hidrólise catalítica do substrato 2,4-BDNPP (Comba, Gahan, Hanson, *et al.*, 2012; Comba, Gahan, Mereacre, *et al.*, 2012) e na clivagem de DNA.

Figura 13. Ligantes não simétricos (a) H_2L^1 (Piovezan *et al.*, 2010) (b) H_2L^2 e (c) H_2L^2 -et e H_2L^2 -but.



Como já mencionado, existem muitos estudos elucidando a primeira esfera de coordenação. Porém, são necessários estudos da interferência da segunda esfera de coordenação, visando auxiliar no entendimento de suas propriedades para preencher as lacunas ainda existentes e assim avaliar a eficiência catalítica destes complexos. Dessa maneira, esse estudo apresenta a síntese de novos complexos como modelos para as fosfatases ácidas púrpuras, com derivatizações de diaminas, os quais serão tratados nos próximos capítulos.

A partir destas considerações teóricas, a seguir, serão apresentados os objetivos deste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivo a síntese e caracterização de complexos binucleares de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ com propriedades adequadas para o estudo de reatividade de compostos frente a ésteres de fosfato e ácidos nucleicos a partir de três novos ligantes não simétricos binucleantes contendo diferentes grupos funcionais na cadeia lateral para estudos dos efeitos de segunda esfera de coordenação.

2.2. Objetivos Específicos

- Síntese e caracterização de ligantes não simétricos H_2L^2 , $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$ e $\text{H}_2\text{L}^2\text{-but}$ por análises espectroscópicas (^1H NMR, ^{13}C NMR e IR) e espectrometria de massas;
- Síntese de novos compostos de coordenação heterobinucleares $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}$, empregando os ligantes não simétricos;
- Caracterização dos complexos por meio de análises elementares, espectroscópicas e cálculos;
- Estudo de reatividade destes complexos frente ao substrato 2,4-BDNPP, buscando auxiliar no entendimento do mecanismo de hidrólise;
- Análise da capacidade desses complexos na clivagem do DNA plasmidial.
- Estudar o efeito do aumento do anel quelato e da segunda esfera de coordenação.
- Comparação dos resultados com trabalhos da literatura.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

Os seguintes reagentes empregados nas sínteses e análises, foram adquiridos de fontes comerciais e alguns utilizados com purificação prévia com mostra a Tabela 1 a seguir:

Tabela 1. Materiais, reagentes e solventes utilizados nas sínteses e análises.

Materiais Reagentes/Solventes	Pureza	Marca
2-(2-aminoetil)piridina	Destilado sob pressão reduzida (~12 mmHg – 92 °C)	Aldrich
2-(2-aminometil)piridina	Destilado sob pressão reduzida (~12 mmHg – 82 °C)	Aldrich
2-piridilcarboxialdeído	Destilado sob pressão reduzida (~80 mmHg – 105,9 °C)	Aldrich
2,6-lutidina	Destilado sob pressão reduzida (~80 mmHg – 73,4 °C)	Aldrich
1,2-etanodiamina	Destilado sob pressão reduzida (~80 mmHg – 48,1 °C)	Merck
1,4-butanodiamina	Destilado sob pressão reduzida (~80 mmHg – 87 °C)	Aldrich

Acetato de sódio PA	99,8%	AppliChem
Acetona PA	99,5%	Vetec
Acetonitrila PA	99,8%	Vetec
Acetonitrila UV/HPLC	99,9%	Tedia
Ácido clorídrico	37,0%	Vetec
Ácido sulfúrico	98,0%	Vetec
Água deuterada	99,8%	Acros
Argônio	5.0 Analítico	White Martins
Bicarbonato de sódio	99,7%	Aldrich
Borohidreto de sódio	99,0%	Aldrich
Brometo de potássio	99,0%	Aldrich
Sulfato de sódio	99,0%	Vetec
Cloreto de potássio (IR)	99,0%	Aldrich
Clorofórmio deuterado	99,0%	Aldrich
Clorofórmio PA	99,8%	Vetec
Clorofórmio UV/HPLC	99,9%	Vetec
Diclorometano	99,5%	Vetec
Dimetilformamida PA	99,5%	Merck
Dimetilsulfóxido PA	99,9%	Vetec
Etanol PA	98,0%	Vetec
Éter etílico PA	99,0%	Vetec
Glicerina PA	99,5%	Vetec
Hexano PA	95,0%	Lafan
Hidróxido de sódio	99,5%	Vetec
Isopropanol PA	99,5%	Lafan
Metanol PA	99,8%	Neon
Metanol UV/HPLC	99,9%	J.T. Baker
Perclorato de ferro(III) nonahidratado	99,0%	Acros
Perclorato de sódio	99,0%	Acros
Perclorato de zinco(II) hexahidratado	98,0%	Aldrich
Sulfato de sódio anidro	99,0%	Lafan
Tampão biológico CHES	99,0%	Acros
Tampão biológico HEPES	99,5%	Aldrich
Tampão biológico MÉS	99,0%	Acros
Tetrahidrofurano PA	99,0%	Vetec
Tolueno PA	99,5%	Vetec
Trietilamina	Destilado	Vetec

3.2. Métodos e Instrumentação

3.2.1. *Espectrofotometria na região do Infravermelho (IR)*

Os espectros das amostras foram adquiridos na região do IV em um espectrofotômetro de infravermelho com Transformada de Fourier e com acessório de Refletância Total Atenuada Horizontal (FTIR – ATR) da Perkin-Elmer Spectrophotometer Spectrum 100, com cristal de ZnSe (45°) e um detector TGS (“*triglycine sulfate*”). As amostras sólidas foram analisadas em pastilha de KBr ou colocadas diretamente no aparelho sobre o cristal quando por refletância total atenuada, com média de 18 varreduras no intervalo 4000 - 550 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} . As medidas das amostras foram corrigidas pelo espectro do branco que foi registrado somente com a pastilha de KBr e no ATR o background foi feito com ar ambiente, ou seja, sem nada sobre o cristal e posteriormente subtraído do espectro da amostra para ambos os casos. A temperatura da sala encontrava-se em torno de 25 °C. As amostras oleosas foram analisadas na forma de filme sobre a pastilha de KBr (grau espectroscópico), solubilizando as amostras em diclorometano ou clorofórmio e deixadas em dessecador para secarem ou colocadas diretamente no aparelho para o caso da refletância total atenuada.

3.2.2. *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ^1H NMR e de Carbono ^{13}C NMR*

Os espectros de ressonância magnética nuclear (NMR) de ^1H e ^{13}C foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker Avance 200 MHz, que se encontra na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC. As amostras foram dissolvidas em solventes como clorofórmio deuterado (CDCl_3), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) e água deuterada (D_2O), utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em parte por milhão (ppm) em relação ao TMS. Os gráficos de ^1H NMR apresentam número de átomos de hidrogênio deduzidos da integral relativa e na legenda mostra-se também a multiplicidade.

3.2.3. Espectrometria de Massas

Os compostos sintetizados (ligantes e complexos) foram analisados via espectrometria de massas com ionização via electrospray (ESI-MS) e os espectros foram obtidos no equipamento Amazon – Ions Trap MS, ou espectrometria de massas de alta resolução e os espectros obtidos a partir de um aparelho micrOTOF Q-II (Bruker Daltonics), os dois equipamentos encontram-se no Centro de Biologia Molecular Estrutural – UFSC. As análises realizadas no ESI-MS foram feitas a partir das soluções dos ligantes em MeOH e dos complexos em H₂O e CH₃CN 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. Já as análises realizadas no ESI-QTOF equipado com seringa automática (KD Scientific) para injeção das amostras em um espectrômetro de massas ESI-QTOF MS (ElectroSpray Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry), sendo que as amostras foram injetadas em um fluxo constante de 3 $\mu\text{L/min}$, utilizando como solvente uma mistura de acetonitrila grau LC/MS. Os dados foram processados em um software Bruker Data Analysis versão 4.0. Nos dois casos os equipamentos foram operados em modo de íon positivo e os dados são expressos na forma de relação m/z dos fragmentos e apresenta-se a intensidade relativa dos picos frente ao pico base (100%).

3.2.4. Análise Elementar de CHN

As medidas para a determinação dos percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio para os complexos sintetizados foram realizadas em um analisador elementar CHNS/O Analyser PerkinElmer (Modelo – 2400 Series II) acoplado com balança PerkinElmer (Modelo – Autobalance AD 6000). Gás de arraste: hélio grau 5.0 e combustão: oxigênio grau 6.0, que se encontra na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC.

3.2.5. Condutimetria

As medidas condutimétricas dos complexos foram realizadas no aparelho, do Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia – UFSC. Os compostos de coordenação foram dissolvidos em CH₃CN ou MeOH, com concentração de 1×10^{-3} mol L⁻¹, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. O aparelho foi calibrado com uma solução padrão de KCl 0,1 mol L⁻¹ cuja condutividade é de 100 $\mu\text{S cm}^{-1}$ em água a 25 °C. As análises foram realizadas após a calibração do equipamento com solução padrão de KCl (0,01 mol L⁻¹) a temperatura de $25,00 \pm 0,05$ °C. Os valores para sistemas não aquosos foram ajustados segundo a literatura (Geary, 1970).

3.2.6. Absorção atômica

Para verificar a proporção dos íons de metais nos complexos foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, modelo ContrAA 700 (Analytik Jena, Jena, Alemanha), equipado com atomizadores de forno de grafite e chama. Os comprimentos de onda selecionados foram de 231,857 nm para Zn e 248,327 nm para Fe. Os gases utilizados foram mistura de ar (oxidante) e acetileno (combustível) na vazão de 60 L/h. A altura do queimador foi de 16 mm. As soluções dos complexos foram preparadas com 5 mg de complexo em 50 mL acetona:água (10:90% - V/V), acetona grau UV/HPLC.

3.2.7. Eletroquímica

O comportamento redox dos complexos foi investigado por voltametria de onda quadrada em um potenciostato/galvanostato BASi, modelo Epsilon. Os experimentos foram feitos em H₂O/CH₃CN (96:4, % v/v), em valores de pH específicos sob atmosfera de argônio, utilizando com concentração do complexo com 1×10^{-4} mol L⁻¹. Foi utilizado como eletrólito de suporte KCl 0,1 mol L⁻¹ e uma célula eletrolítica contendo três eletrodos: um eletrodo de trabalho de carbono vítreo, um eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de referência comercial Ag/AgCl (Ag/AgCl vs. NHE = +197 mV (Inzelt *et al.*, 2012)).

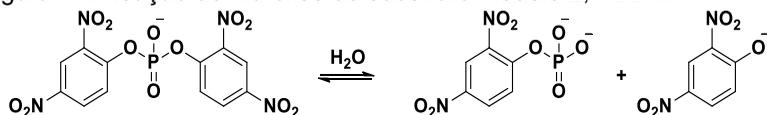
3.2.8. Titulação Espectrofotométrica

As constantes de protonação foram determinadas por titulação espectrofotométrica. Os solventes utilizados foram CH₃CN:H₂O (50:50, %V/V), em uma cela termoestabilizada a 25,00±0,01 °C, controlada por um banho da Visomes Plus. Foi utilizado um eletrodo combinado com referência de Ag/AgCl, calibrado com soluções diluídas de HCl de um titulador automatizado Metrohm modelo Titrino Plus 848. As medidas foram feitas em volume de solução final de 8 mL. A força iônica foi ajustada com KCl para 0,1 mol L⁻¹ e o sistema foi titulado com NaOH 0,1 mol L⁻¹ manualmente. Alíquotas de aproximadamente 1 mL foram removidas a cada ponto e o espectro de UV-Vis obtido em um espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 50 BIO. Após cada medida a alíquota era devolvida para a solução que estava sendo titulada. As curvas foram ajustadas com uma curva sigmoideal e os valores de pK_a obtidos do ponto de inflexão. Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e fervida sob atmosfera de argônio pré-purgado em solução de NaOH.

3.2.9. Medidas de reatividade na hidrólise do substrato fosfato de bis-(2,4-dinitrofenila) (2,4-BDNPP)

A atividade catalítica dos complexos foi avaliada através da reação de hidrólise do substrato fosfato de bis-(2,4-dinitrofenila) (2,4-BDNPP) (Figura 14), que foi sintetizado de acordo com o método descrito na literatura (Bunton e Farber, 1969).

Figura 14. Reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP.



Os experimentos cinéticos foram realizados em triplicata sob condições de excesso de substrato monitorando-se espectrofotometricamente, em um espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostatizado, a variação de absorvância ocorrida em 400 nm (pH/ε), referente a liberação do ânion 2,4-dinitrofenolato, 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.

Tabela 2. Valores de coeficiente de absorção (ϵ) do fenolato do substrato 2,4-BDNPP em diferentes valores de pH (Peralta *et al.*, 2010).

pH	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
5,0	10078
5,5	11405
6,0	12004
6,5 – 9,0	12100

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. Por meio deste experimento determinou-se a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) e a constante de Michaelis-Menten (K_M). Através de cálculos simples, determinou-se a constante catalítica ($k_{\text{cat}} = V_{\text{máx}}/[C]$, [C] = Concentração do complexo na cubeta), 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 ($k_{\text{uncat}} = 1,89 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$) (Bunton e Farber, 1969), além da eficiência catalítica ($E = k_{\text{cat}}/K_M$). Os estudos em função do pH para atividade de hidrólise foram realizados em uma faixa de pH entre 5 e 9 a 25 °C.

Utilizaram-se cubetas de vidro óptico com capacidade para 4,0 mL e caminho óptico de 1 cm, seladas com tampa de teflon, nas quais foram adicionados solução aquosa de tampão 0,1 mol L⁻¹ MES (pH 5 a 6,5), HEPES (pH 7,0 a 8,0) e CHES (9,0) com força iônica mantida constante ($I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, LiClO₄). A dependência do pH foi investigada usando concentrações fixas do substrato ([S] final = $2,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e complexos ([C] final = $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) a $25,0 \pm 0,5 \text{ °C}$. A dependência do substrato foi medida com o pH ideal de 7, para que a concentração de substrato variasse de [S] final = $1,10 \times 10^{-3}$ a $5,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Correções da 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 ($[S]_{\text{final}} = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em relação ao complexo ($[C]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Realizou-se também o acompanhamento da reação estequiométrica em 400 nm entre os complexos e o substrato ($[C]_{\text{final}} = [S]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foi realizada durante 55 horas a 50 °C. Em todos os experimentos cinéticos a correção da hidrólise espontânea do substrato.

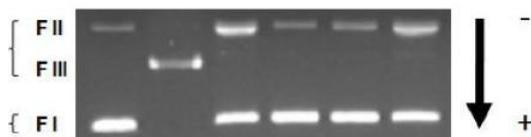
O estudo do efeito isotópico de deutério na hidrólise do 2,4-BDNPP pelos complexos foi realizado pelo acompanhamento de duas reações paralelas onde as soluções tampões HEPES pH, pD = 7,0 (corrigido: pD = leitura do medidor de pH + $(4,29 \times 10^2 / ^\circ T) - 1,04$) (Fife e Bruice, 1961; Beck, J. L. *et al.*, 1986) para os complexos foram previamente preparadas em H₂O e D₂O. As reações foram monitoradas sob condições de 100 vezes de excesso do substrato em 400 nm a 25 °C para os complexos.

3.2.10. Clivagem de DNA plasmidial – Procedimento Geral

O procedimento geral aplicado aos complexos binucleares de Fe^{III}Zn^{II} foi realizado como descrito por Peralta (Peralta, *et al.*, 2010), com adaptações. O procedimento geral de análise da clivagem plasmidial aplicado aos complexos de Fe^{III}Zn^{II} consistiram em uma reação típica de clivagem, contendo 330ng de DNA pBSK-II, que foram tamponados com tampão adequado e tratados com os complexos (em diferentes concentrações). O tempo de reação inicial foi de 4 h a 50 °C. Durante a reação as amostras foram mantidas ao abrigo da luz. Para finalizar as reações de clivagem foram adicionados 5 μL de tampão de corrida 6x concentrado (EDTA 0,25 mol L⁻¹ em pH 8,0, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01%). Em seguida, as amostras foram mantidas em geladeira (4°C) até serem submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%) contendo brometo de etídio (0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 100 min a 90 V em tampão TBE 0,5X (Tris 44,5 mmol L⁻¹, ácido bórico 44,5 mmol L⁻¹, EDTA 1 mmol L⁻¹ em pH 8,0). Os géis foram então fotografados utilizando o sistema de fotodocumentação DigiDoc-It (UVP, USA) e as frações de cada forma do DNA plasmidial foram quantificadas por densitometria, utilizando o software KODAK *Molecular Imaging Software* 5.0 (Carestream Health, USA). Uma vez que o brometo de etídio possui uma maior dificuldade de

intercalar-se com a forma superenovelada do DNA plasmidial, há uma menor emissão de fluorescência por esta forma de DNA em relação às demais. Para corrigir a real quantidade de DNA superenovelado da amostra, o valor encontrado foi multiplicado por 1,47 e corrigido por proporcionalidade os valores obtidos para as demais formas (Jin *et al.*, 2007). A quantidade de DNA clivado (%) foi considerada como a soma das frações de DNA na forma circular aberta (F II) e linear (F III) (Figura 15), enquanto a fração ou quantidade de DNA intacto (%) foi considerada como a fração de DNA na forma superenovelada.

Figura 15. Formas do DNA plasmidial.



3.2.10.1. Efeito da concentração dos complexos em relação ao DNA

Os ensaios de atividade iniciaram a partir da análise das melhores concentrações de complexos que fossem capazes de fornecer uma clivagem eficiente sem que houvesse uma grande degradação espontânea do DNA. Foram realizadas reações controles, na ausência dos complexos, nas mesmas condições reacionais para observar esta possível degradação espontânea. A partir destes resultados foram escolhidos os tempos reacionais e concentrações de complexos, adequados para observação da clivagem do DNA, utilizados nos próximos testes.

3.2.10.2. Efeito do pH dos complexos em relação ao DNA

Para analisar o efeito do pH na clivagem do DNA plasmidial mediada pelos complexos estudados neste trabalho, foram realizados testes de clivagem deste DNA em diferentes tampões (MES, HEPES, CHES), que correspondem a faixa de pH entre 5,5 a 9,0 na presença de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ dos complexos. Os tampões foram selecionados por sua estabilidade e inércia em reação, citados como “*Good buffers*” (Mash *et al.*, 2003).

3.2.11. Análise do modo de interação entre os complexos com o DNA

3.2.11.1. Efeito da força iônica

Para confirmar se a interação destas moléculas com o DNA se dava através de interações eletrostáticas, por diferença de carga, foi adicionado na reação o sal NaCl nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 mmol L⁻¹.

Foram realizados testes de força iônica substituindo o NaCl por LiClO₄, já que o íon ClO₄⁻ se associa mais fracamente ao centro metálico do que o íon Cl⁻, neste ensaio foram utilizadas as mesmas concentrações do teste com NaCl, bem como a mesma concentração dos complexos (5 μmol L⁻¹).

Além dessa coordenação comum do íon cloreto com os centros metálicos, sabe-se que complexos com centro metálico Fe^{III}Zn^{II} apontam uma capacidade de hidrolisar o DNA, logo sua atividade é dependente da formação de um nucleófilo ligado ao metal, sendo ainda mais necessário a exclusão da participação dos íons Cl⁻/ClO₄⁻ na atividade destes complexos frente ao DNA. Todas as concentrações de NaCl e LiClO₄ (5 – 50 μmol L⁻¹) foram testadas em reações com DNA na ausência dos complexos para descartar possível degradação da molécula causada por estes sais.

3.2.11.2. Efeito dos ligantes de sulco

Procurou-se determinar se a interação entre os complexos em estudo e o DNA se dava através do acesso de pelo menos um dos sulcos menor/maior do DNA. Para tal foram realizados ensaios na presença de ligantes conhecidos de ambos os sulcos, sendo estes a netropsina que se liga no sulco menor (Van Dyke *et al.*, 1982) e o verde de metila ligante do sulco maior (Kim e Nordén, 1993). Para isso os ligantes (50 μmol L⁻¹) foram pré-incubados com o DNA tamponado (10 mmol L⁻¹ HEPES, pH 7.0) por 30 min antes da adição dos complexos. Após a adição dos complexos (5 μmol L⁻¹) a reação foi incubada por 8 h a 50 °C. Ambos inibidores foram testados na ausência dos complexos e nenhuma clivagem

de DNA superior ao controle (contendo somente DNA) foi observada.

3.2.11.3. *Dicroísmo Circular*

Os ensaios de CD foram realizados com o espectropolarímetro de CD modelo J-815 (Jasco, USA). Uma amostra de 200 μ M de CT-DNA em 10mM de tampão (HEPES pH 7,0) foi titulada com concentrações crescentes dos complexos na razão de [Complexo]/[DNA] de 0,05 a 1. As varreduras foram realizadas na faixa de 220 a 500 nm, a 37 °C. Espectros contendo somente os complexos foram determinados na ausência de DNA e nenhum sinal significativo foi encontrado.

3.2.12. ***Avaliação do mecanismo de clivagem***

3.2.12.1. *Efeito dos sequestradores de espécies reativas de oxigênio*

Para compreensão do mecanismo de clivagem do DNA (se por via hidrolítica ou oxidativa) pelos complexos analisados neste trabalho, foram adicionados às reações uma série de sequestradores de radicais livres, sendo estes DMSO (dimetil-sulfóxido) (0,4 mol L⁻¹) que é inibidor do radical hidroxila (OH•); KI (iodeto de potássio) (0,5 mmol L⁻¹), que é inibidor da geração de peróxidos (R-O-OH); e NaN₃ (azida de sódio) (0,5 mmol L⁻¹), sequestrador de oxigênio singlete (¹O₂). A concentração dos complexos utilizada nestas reações foi de 5 μ mol L⁻¹. Todos os sequestradores também foram testados na ausência dos complexos.

3.2.12.2. *Efeito da ausência de oxigênio*

As soluções e misturas reacionais foram realizadas em uma “GloveBag”, onde estas foram desgaseificadas à vácuo e borbulhadas com argônio. Foi realizada também uma reação utilizando como agente de clivagem o complexo Fe-EDTA que tem a capacidade de oxidar a molécula do DNA apenas em aerobiose (Netto *et al.*, 1996; Jeff, 2016). Estas mesmas reações, incluindo o controle com Fe-EDTA, também foram realizadas na presença de oxigênio como um modo de comparar a clivagem do DNA pelos

complexos nestas duas condições distintas. A concentração de complexo utilizada neste experimento foi de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$.

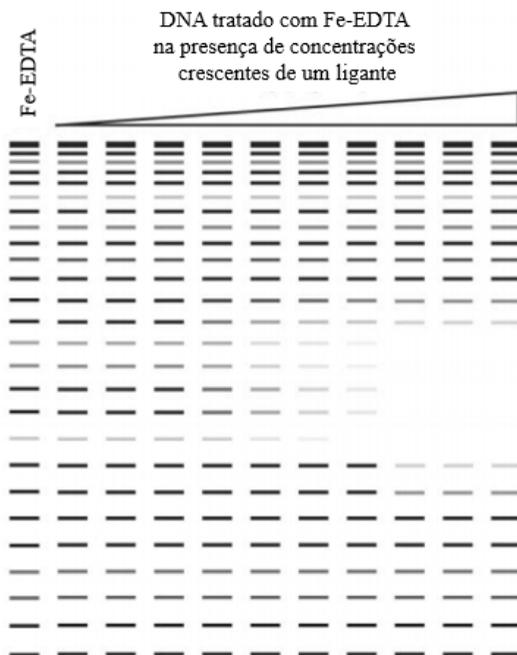
3.2.13. Cinética de clivagem do DNA plasmidial

De modo geral as reações de cinética de clivagem foram realizadas conforme descrito: num volume final de $120 \mu\text{L}$ (em um eppendorf) foram adicionados $2 \mu\text{g}$ de DNA plasmidial em 10 mmol L^{-1} de HEPES pH 7.0, em seguida foram adicionados $30 \mu\text{L}$ dos complexos em diferentes concentrações ($0 - 10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e alíquotas de $20 \mu\text{L}$ foram retiradas em diferentes tempos (0, 0,5, 1, 2, 3, e 4 h) e submetidas a eletroforese em gel de agarose. As reações foram realizadas a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ao abrigo da luz. Controles nas mesmas condições reacionais, mas na ausência dos complexos, foram utilizados para observar a degradação espontânea do DNA. As constantes cinéticas de clivagem (k_{obs}) foram calculadas para cada concentração do complexo, tomando estas reações como de pseudo primeira-ordem, onde há um excesso de catalisador (complexo) em relação do substrato (DNA). O valor de k_{obs} foi obtido diretamente a partir do coeficiente angular das regressões lineares originadas do plote do logaritmo natural da quantidade da forma intacta de DNA em função do tempo de reação.

3.2.14. Footprinting de DNA por Fe-EDTA

Os procedimentos utilizados nestes ensaios seguem o preconizado pela literatura (Kikuta *et al.*, 2002) com modificações.

Figura 16. Representação de um gel de poliacrilamida desnaturante contendo amostras de um ensaio de *footprinting* de DNA por Fe-EDTA. Adaptado de Urbach e Waring, (Urbach e Waring, 2005).



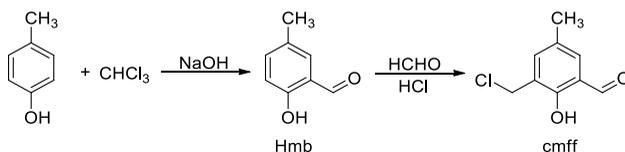
Para este experimento uma amostra de oligonucleotídeo ($2,5 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$) foi tamponada com 10 mmol L^{-1} de HEPES (pH 7,0) e submetida ao aquecimento a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos para a completa desnaturação de possíveis pareamentos inespecíficos de DNA. Em seguida a amostra foi transferida para os tubos de reação e mantida em temperatura ambiente por 1h para permitir o correto anelamento do DNA. Passado o resfriamento das amostras os complexos em diferentes concentrações foram adicionados e mantidos por 30 min a temperatura ambiente para formação do equilíbrio complexo-DNA. A reação de clivagem de DNA se inicia com a adição de $2 \text{ } \mu\text{L}$ de cada uma das seguintes

soluções: Fe-EDTA (40 mmol L⁻¹), ascorbato de sódio (40 mmol L⁻¹) e H₂O₂ (2%) e deixados reagir por 90 segundos. Com a intenção de parar as reações foram adicionados após os 90 segundos 5 µL de Tiuréia (0,5 mol L⁻¹). Em seguida foi adicionado à reação 1 µL de glicogênio (20 mg mL⁻¹), 2,10 µL de acetato de sódio (3 mol L⁻¹, pH 5,2) e 3x o volume corrigido da amostra de etanol 100% com o objetivo de iniciar o processo de precipitação do oligonucleotídeo e finalizando assim a reação. Posteriormente foram realizados procedimentos para precipitação do oligonucleotídeo das amostras, ressuspensão, eletroforese e análise dos géis.

3.3. Síntese dos Ligantes

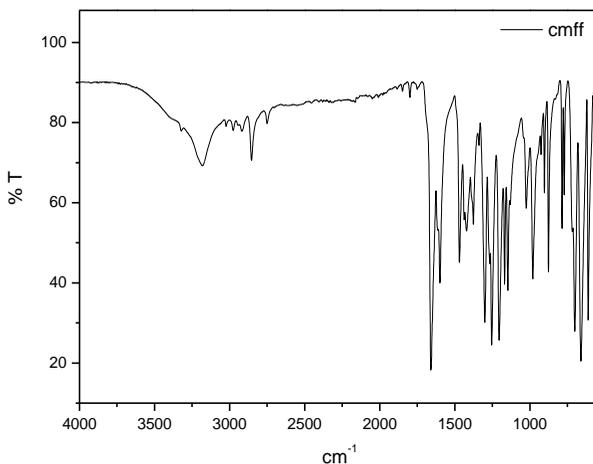
Os ligantes não-simétricos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho (IR), ressonância magnética nuclear (NMR) (¹H e ¹³C) e por espectrometria de massa como está descrito nas rotas sintéticas a seguir.

3.3.1. Síntese do cmff - 3-(clorometil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído



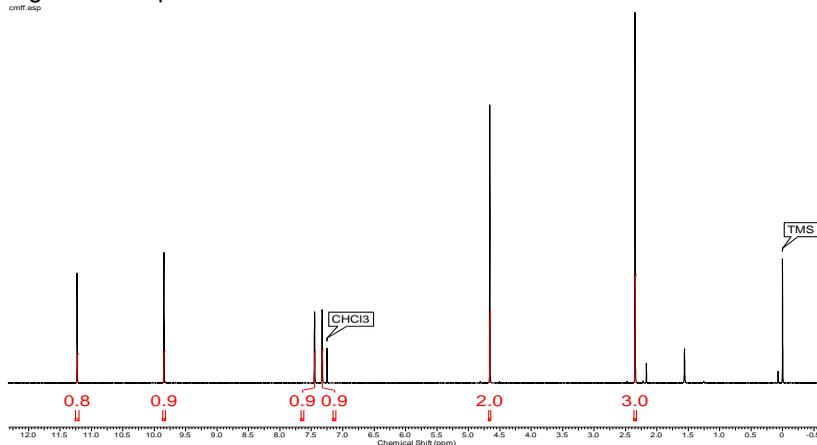
O 3-(clorometil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (cmff) foi preparado em duas etapas. Na primeira etapa, o 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído (Hmb) foi obtido através de uma reação de formilação do *p*-cresol como descrito na literatura (Thoer *et al.*, 1988) e na segunda etapa, o cmff foi obtido pela reação de clorometilação do Hmb com formaldeído e ácido clorídrico. Nas figuras, encontram-se os espectros de IR (Figura 17) e ¹H NMR (Figura 18) e suas atribuições.

Figura 17. Espectro no IR do cmff (ATR).



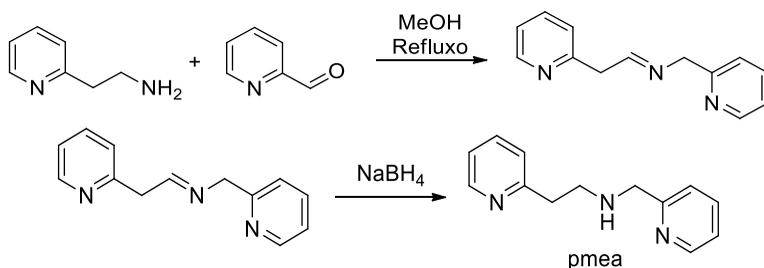
IR (ATR) em cm^{-1} : ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3018-2848; ν (C-H_{ald}) 2748; ν (C=O) 1657; ν (C=C) 1599-1471; δ (O-H) 1378; ν (C-O_{fenol}) 1255; δ (C-H_{ar}) 704; ν (C-Cl) 613.

Figura 18. Espectro de ^1H NMR do cmff em CDCl_3 .



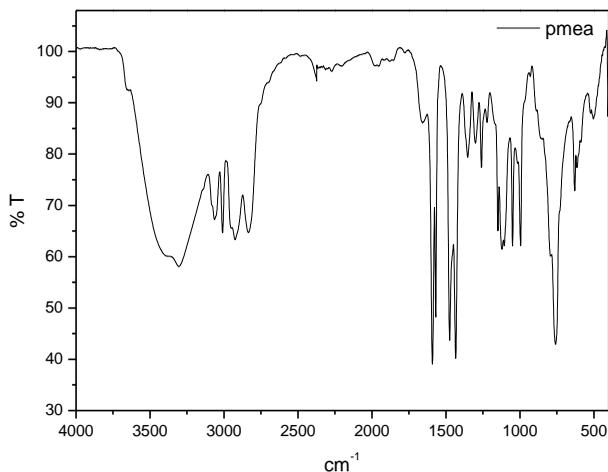
^1H NMR - δ_{H} (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,35 (s, 3H, CH_3); 4,66 (s, 2H, CH_2); 7,33(s, 1H, CH_{ar}); 7,45 (s, 1H, CH_{ar}); 9,85 (s, 1H, CH_{ald}); 11,25 (s, 1H, OH_{fenol}).

3.3.2. Síntese do pmea – 2-(piridin-2-il)-N-(piridin-2-ilmetil)etanamina



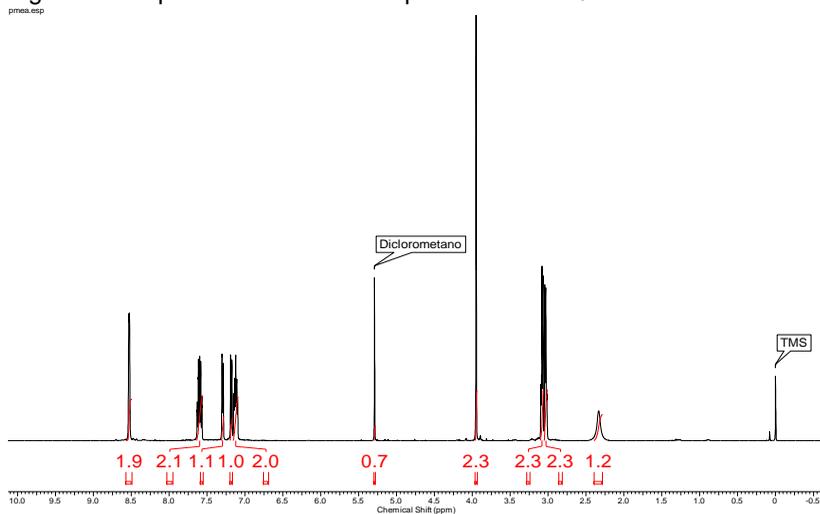
Preparou-se um solução contendo 1,20 mL de 2-(2-aminoetil)piridina (1,22 g, 10 mmol, 108,17 g mol⁻¹, 1,021 g mL⁻¹) em 15 mL de metanol e adicionou-se esta solução, sob agitação, em uma solução contendo 0,95 mL de 2-piridilcarboxialdeído (1,07g, 10 mmol, 107,04 g mol⁻¹) em 45 mL de metanol. A mistura ficou sob agitação por 2 horas em temperatura ambiente. Nesta solução foi adicionado 0,75 g borohidreto de sódio (20 mmol, 37,83 g mol⁻¹) lentamente em intervalos de 10 minutos durante 1 hora. A reação ficou sob agitação “*overnight*” e em seguida refluxada por 1 hora. Após o resfriamento, a solução foi tratada com HCl até pH aproximadamente 5 e agitada vigorosamente por 30 min. Posteriormente o pH da mistura foi ajustado com solução 5 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio para pH 8–9. O borato de sódio precipitado foi filtrado e o solvente rotaevaporado. Posteriormente, adicionou-se 50 mL de diclorometano e lavado com água (6x25 mL de H₂O). A fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro. A evaporação do solvente resultou em um óleo castanho com rendimento de 87,7%. O pmea foi caracterizado por IR (Figura 19), ¹H NMR (Figura 20) e espectrometria de massas (Figura 21).

Figura 19. Espectro no IR do pmea em pastilha de KBr.



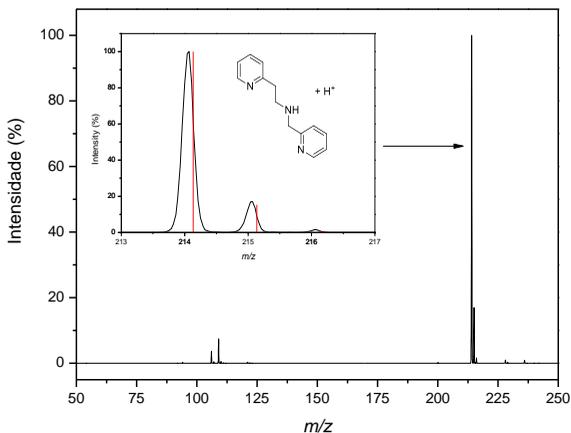
IR (KBr) em cm⁻¹: ν (N-H) 3297; ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3068-2832; ν (C=N e C=C) 1595- 1427; ν (C-N) 1111; δ (C-H_{ar}) 754.

Figura 20. Espectro de ¹H NMR do pmea em CDCl₃.

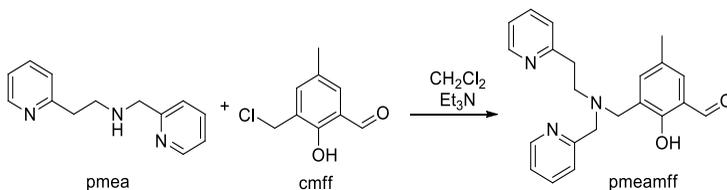


¹H NMR - δ _H (200 MHz; CDCl₃), em ppm: 2,33 (s, 1H, NH); 3,08-3,03 (m, 4H, CH₂); 3,95 (s, 2H, CH₂); 7,15-7,10 (m, 2H, CH_{ar}); 7,19-7,18 (d, 1H, CH_{ar}); 7,30-7,29 (d, 1H, CH_{ar}); 7,63-7,57 (m, 2H, CH_{ar}); 8,53 (d, 2H, CH_{py}).

Figura 21. Espectro de ESI-MS do ligante pmeamff e sua respectiva simulação da distribuição isotópica com $m/z = 214,13 + H^+$.



3.3.3. Síntese do pmeamff – 2-hidroxi-5-metil-3-(((2-(piridin-2-il)etil)etil)piridin-2-ilmetil)amino)metil)benzaldeído

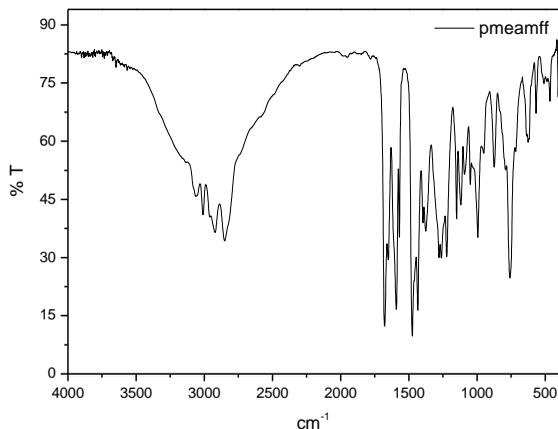


Essa reação é uma reação de substituição nucleofílica, do cloreto de cmff pela amina secundária do pmea formando pmeamff.

Em um balão de 100 mL, foram adicionados 1,86 g de cmff (10 mmol, 184,62 g mol⁻¹) dissolvidos em 50 mL de uma solução de diclorometano. Sob agitação e a 0°C foram adicionados lentamente 80 mL de uma solução de diclorometano contendo 2,13 g de pmea (10 mmol, 213,13 g mol⁻¹). Completada a adição, o banho de gelo foi removido e a mistura reacional foi deixada sob agitação por 3 dias em temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi transferida para um funil de separação e lavada (30x40 mL) com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente

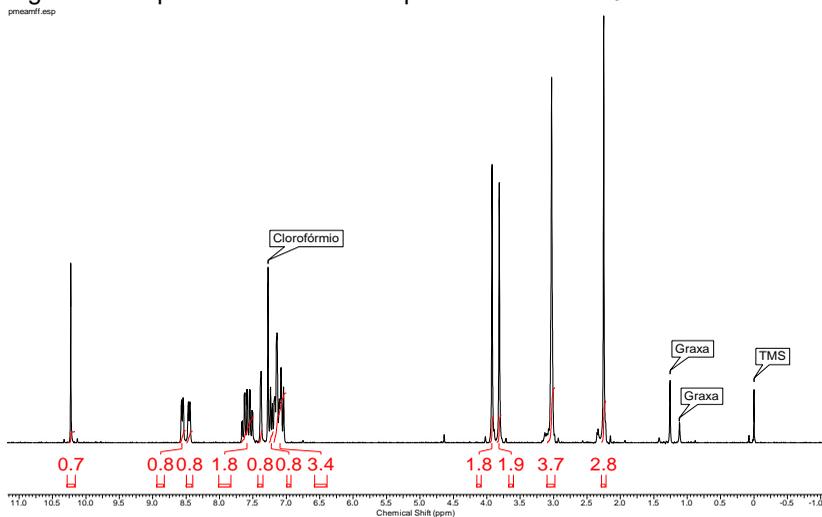
evaporado até a secura sob vácuo a 40 °C, restando um óleo castanho, com rendimento de 70,2% em relação ao pmea. Nas figuras, encontram-se espectros de IR (Figura 22), ¹H NMR (Figura 23) e Massas (Figura 24).

Figura 22. Espectro no IR do pmeamff em pastilha de KBr.



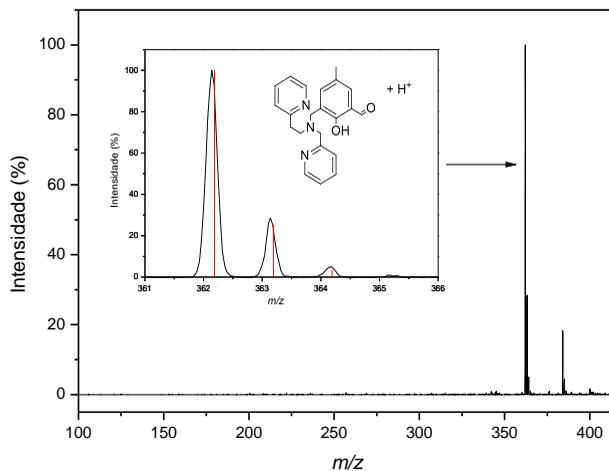
IV (KBr) em cm^{-1} : ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3060-2838; ν (C=O) 1685; ν (C=N e C=C) 1594-1434; δ (O-H_{fenol}) 1372; ν (C-O_{fenol}) 1277; ν (C-N) 1118; δ (C-H_{ar}) 753.

Figura 23. Espectro de ^1H NMR do pmeamff em CDCl_3 .

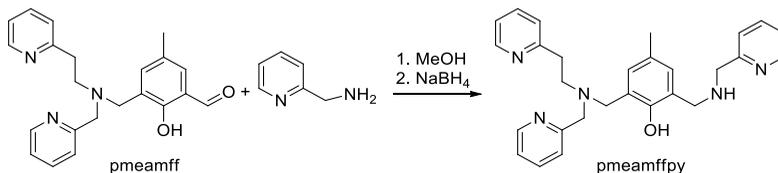


^1H NMR - δ_{H} (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,25 (s, 3H, CH_3); 3,03 (s, 4H, CH_2); 3,81 (s, 2H, CH_2); 3,92 (s, 2H, CH_2); 7,04–7,24 (m, 4H, CH_{ar}); 7,67–7,50 (m, 4H, CH_{ar}); 8,57–8,44 (dd, 2H, CH_{py}); 10,23 (s, 1H, CH_{ald}).

Figura 24. Espectro de ESI-MS do pmeamff e sua respectiva simulação da distribuição isotópica com $m/z = 362,18 + \text{H}^+$.

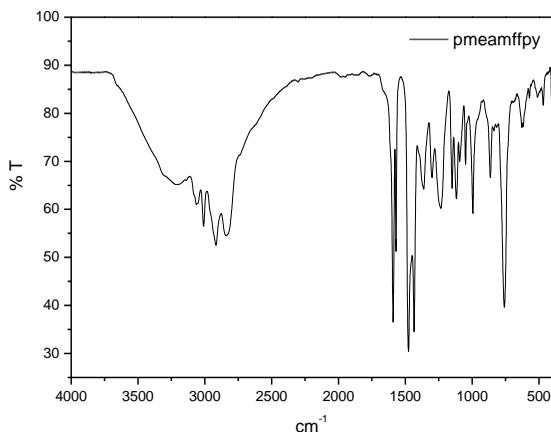


3.3.4. Síntese do pmeamffpy – 4-metil-2-(((2-(piridin-2-il)etil)(piridina-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((piridin-2-ilmetil)amino)metil)fenol



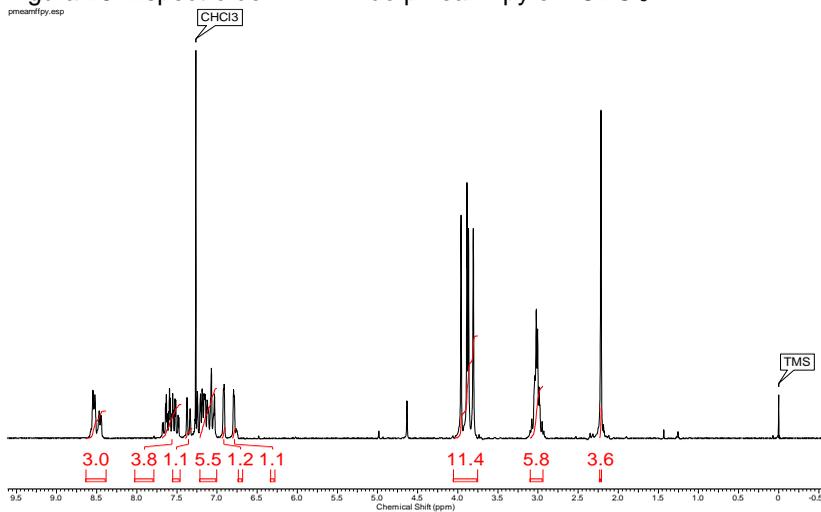
Solubilizaram-se 2-aminometilpiridina (108,14 g mol⁻¹, 1,04 g mL⁻¹, 10 mmol), em 30 mL de metanol. Em seguida, foi solubilizado pmeamff (361,18 g mol⁻¹, 10 mmol) em 20 mL de metanol, colocou-se essa solução em um funil de adição, adicionou-se na solução de 2-aminometilpiridina, gota-a-gota, lentamente. Deixou-se reagir por 5 horas (solução amarelada). Adicionou-se borahidreto de sódio (37,83 g mol⁻¹) em banho de gelo, durante 1 hora, a solução ficou mais clara, deixou-se reagindo por um dia. Após, ajustou-se o pH da reação para 5 – 6 com ácido clorídrico 3,0 mol L⁻¹. Evaporou-se o solvente a pressão reduzida. Adicionou-se diclorometano e lavou-se exaustivamente (12x30 mL) com uma solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente rotaevaporado. O produto é um óleo amarelo escuro, com rendimento de 88,4% em relação ao pmeamff. Nas figuras, encontram-se espectros de IR (Figura 25), ¹H NMR (Figura 26) e Massas (Figura 27).

Figura 25. Espectro na região do infravermelho do pmeamffpy em pastilha de KBr.



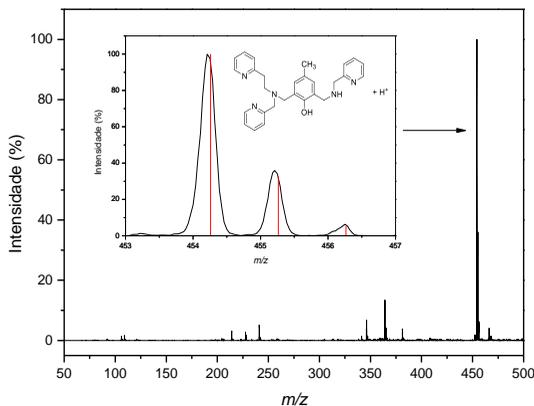
IV (KBr) em cm^{-1} : ν (C-H_{ar} e $\text{C-H}_{\text{aliph}}$) 3066-2835; ν (C=N e C=C) 1597-1431; δ ($\text{O-H}_{\text{fenol}}$) 1370; ν ($\text{C-O}_{\text{fenol}}$) 1235; ν (C-N) 1146; δ (C-H_{ar}) 757.

Figura 26. Espectro de ^1H NMR do pmeamffpy em CDCl_3 .

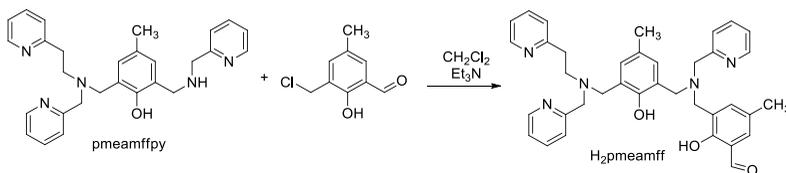


^1H NMR - δ_{H} (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,21 (s, 3H, CH_3); 3,01-3,02 (m, 4H, CH_2); 3,96-3,81 (m, 8H, CH_2); 6,79 (s, 1H, CH_{ar}); 6,91 (s, 1H, CH_{ar}); 7,03-7,16 (m, 3H, CH_{ar}); 7,24-7,38 (m, 3H, CH_{ar}); 7,48-7,68 (m, 3H, CH_{ar}); 8,44-8,55 (m, 3H, CH_{ar}).

Figura 27. Espectro de ESI-MS do ligante pmeamffpy e sua respectiva simulação da distribuição isotópica com $m/z = 454,26 + H^+$.



3.3.5. Síntese do ligante $H_2pmeamff$ (H_2L^2) - 2-hidroxi-3-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((2-(piridin-2-il)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-5-metilbenzaldeído

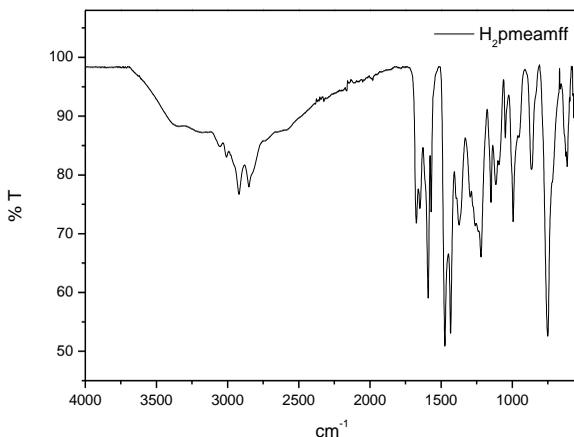


Foi adicionado o grupo cmff para a obtenção do ligante final $H_2pmeamff$. Em um balão de 100 mL foram adicionados 25 mL de diclorometano com Hbpamepy ($453,25 \text{ g mol}^{-1}$, 5 mmol), juntamente com trietilamina (6 mmol, $0,726 \text{ g mL}^{-1}$). Com o auxílio de um funil de adição, foram adicionados 20 mL de diclorometano com cmff ($184,62 \text{ g mol}^{-1}$, 5 mmol).

A mistura reacional permaneceu sob agitação e refluxo por 3 dias. Restando um óleo amarelo escuro. Realizou-se extração ácido-base, adicionando aproximadamente 50 mL de H_2O destilada e adicionou-se HCl 4 mol L^{-1} até pH 2-3. Recolheu-se a fase aquosa, adicionou-se 30 mL de CH_2Cl_2 e adicionou-se $NaOH$ 4 mol L^{-1} até pH 10 (solução amarela esverdeada). A fase orgânica foi separada e com solução de $NaHCO_3$ realizou-se a extração

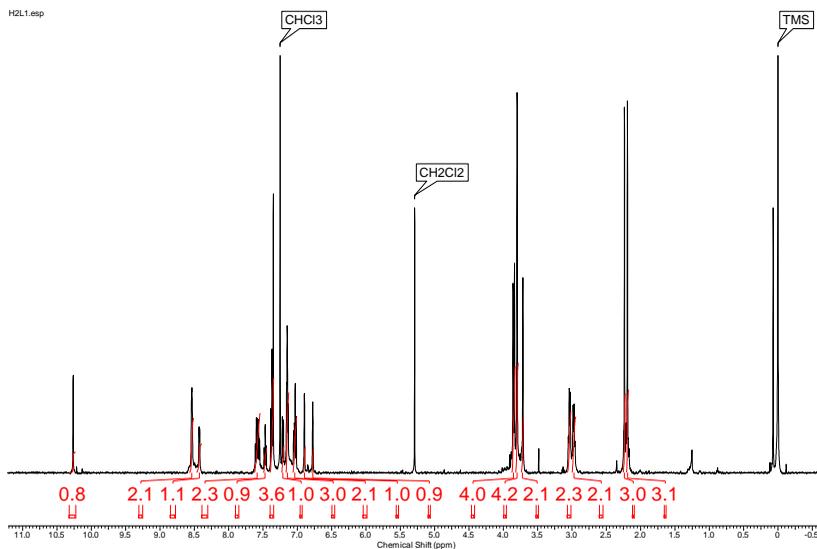
(30x25mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente rotaevaporado. O produto é um óleo amarelo escuro, com rendimento de 62,3% em relação ao pmeamffpy. Nas figuras, encontram-se espectros de IV (Figura 28), ^1H NMR (Figura 29) e Massa (Figura 30).

Figura 28. Espectro no IR do H_2L^2 (ATR).



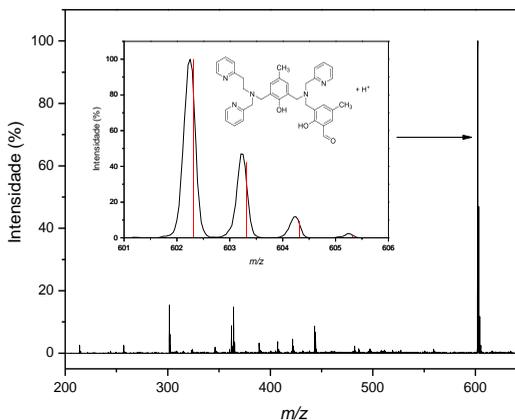
IR (ATR), em cm^{-1} : ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3050-2843; ν (C=O) 1682; ν (C=N e C=C) 1588- 1469; ν (C-O) 1278; δ (C-H_{ar}) 750.

Figura 29. Espectro de ^1H NMR do H_2L^2 em CDCl_3 .

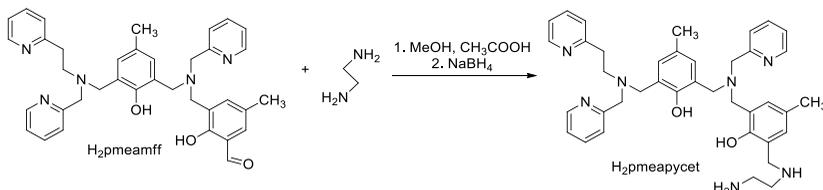


^1H NMR - δ_{H} (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,19 (s, 3H, CH_3); 2,23 (s, 3H, CH_3); 3,05- 2,96 (m, 4H, CH_2); 3,71 (s, 2H, CH_2); 3,80 (s, 4H, CH_2); 3,84 (s, 2H, CH_2); 3,86 (s, 2H, CH_2); 7,61-6,78 (m, 13H, CH_{ar}); 8,43-8,42 (m, 1H, CH_{py}); 8,54 (m, 2H, CH_{py}); 10,26 (s, 1H, CH_{ald}).

Figura 30. Espectro de ESI-MS do ligante H_2L^2 e sua respectiva simulação da distribuição isotópica com $m/z = 602,31 + \text{H}^+$.



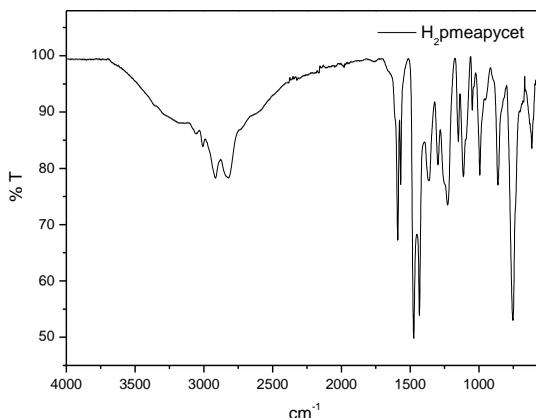
3.3.6. Síntese do ligante H₂pmeapycet (H₂L^{2-*et*}) - 2-(((2-aminoetil)amino)metil)-6-(((2- hidroxi-5-metil-3-(((2-(piridin-2-il)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol



Em um balão de 250 mL, adicionaram-se uma solução de 1,2-etanodiamina (5,1 mmol, 60,06 g mol⁻¹) em metanol (50 mL) e 3 gotas de ácido acético 99,7%. Com um funil de adição, acrescentaram-se lentamente 60 mL de uma solução metanólica de H₂pmeamff (0,60 g, 1 mmol, 601,31 g mol⁻¹). O sistema permaneceu sob agitação por 12 horas e então adicionou-se borohidreto de sódio (0,11 g, 3 mmol, 37,83 g mol⁻¹) em banho de gelo. A mistura reacional permaneceu por mais duas horas sob agitação e o solvente foi retirado sob vácuo a 40 °C.

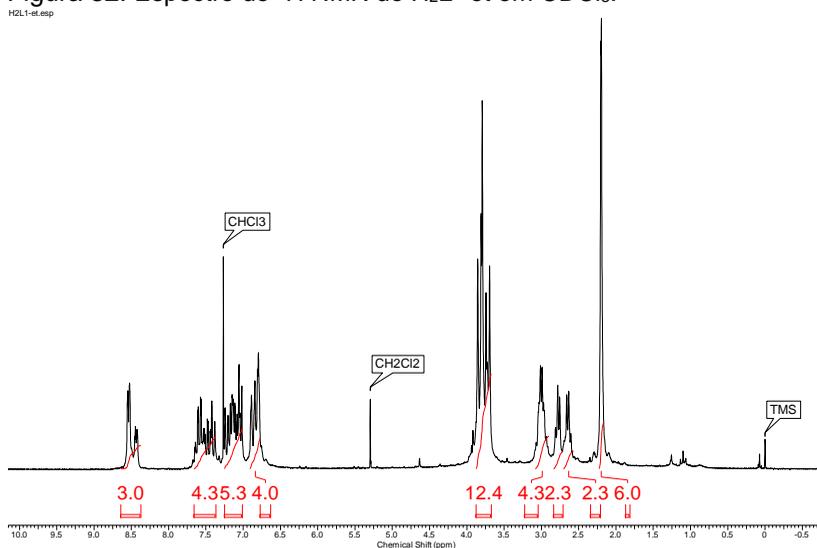
O produto resultante foi dissolvido em 60 mL de diclorometano e permaneceu por agitação por 15 minutos na presença de uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi lavada com a mesma solução aquosa (6x40 mL) em um funil de separação, foi então separada, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi retirado a vácuo. Rendimento 74,6% em relação ao H₂pmeamff. Nas figuras abaixo, encontram-se espectros de IR (Figura 31), ¹H NMR (Figura 32), ¹³C NMR (Figura 33) e Massas (Figura 34).

Figura 31. Espectro no IR do H₂L²-et (ATR).

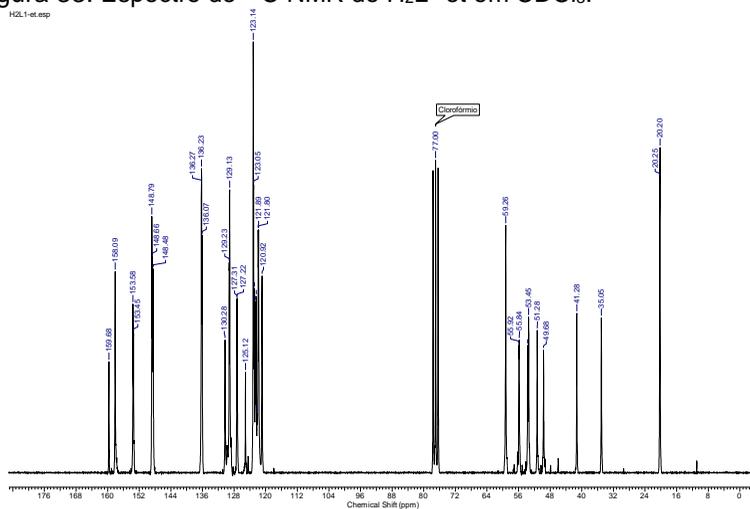


IR (ATR), em cm^{-1} : ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3059-2834; ν (C=N e C=C) 1644-1433; δ (O-H_{fenol}) 1369; ν (C-O_{fenol}) 1231; ν (C-N) 1150; δ (C-H_{ar}) 758.

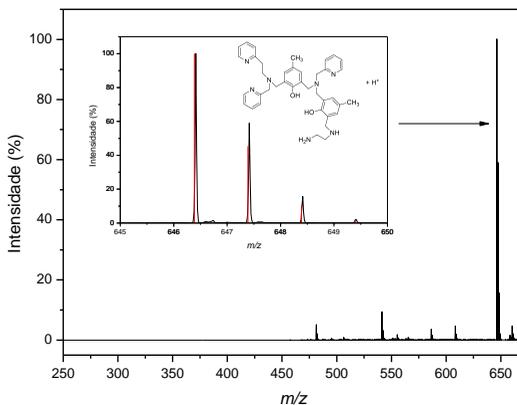
Figura 32. Espectro de ¹H NMR do H₂L²-et em CDCl₃.



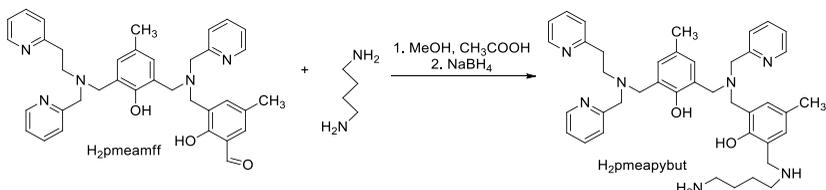
¹H NMR - δ_{H} (200 MHz; CDCl₃), em ppm: 2.20 (s, 6H, CH₃); 2.63 (t, 2H, CH₂); 2.78 (t, 2H, CH₂); 2.96-3.04 (m, 4H, CH₂); 3.69-3.85 (m, 12H, CH₂); 6.80-7.61 (m, 13H, CH_{ar}); 8.42-8.55 (m, 3H, CH_{py}).

Figura 33. Espectro de ^{13}C NMR do $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$ em CDCl_3 .

^{13}C NMR - δ_{C} (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 20,20; 20,25; 35,05; 41,28; 49,68; 51,28; 53,45; 53,69; 55,84; 55,92; 59,62; 59,62; 120,92; 121,80; 121,89; 122,19; 122,40; 122,61; 122,68; 123,05; 123,14; 125,12; 127,22; 127,31; 129,13; 129,23; 130,28; 136,07; 136,23; 136,27; 148,48; 148,66; 148,79; 148,79; 153,45; 153,58; 158,09; 158,09; 159,68.

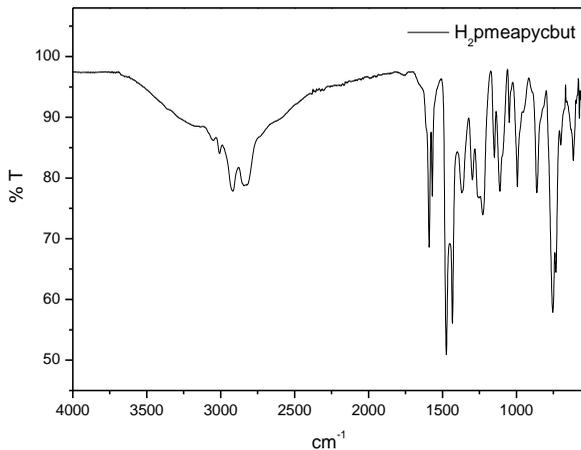
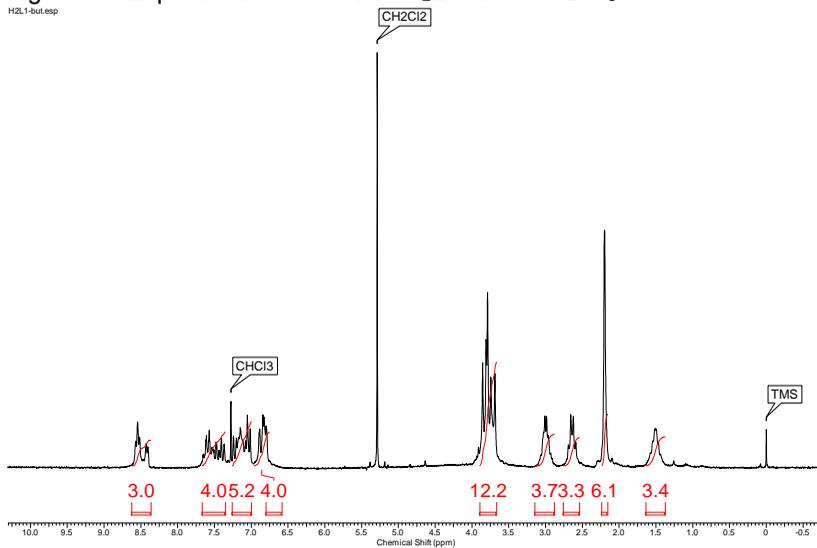
Figura 34. Espectro de ESI-QTOF do ligante $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$ e sua respectiva simulação da distribuição isotópica com $m/z = 646,38 + \text{H}^+$.

3.3.7. Síntese do H₂pmeapybut (H₂L²-but) – 2-(((4-aminobutil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((2-(piridin-2-il)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol



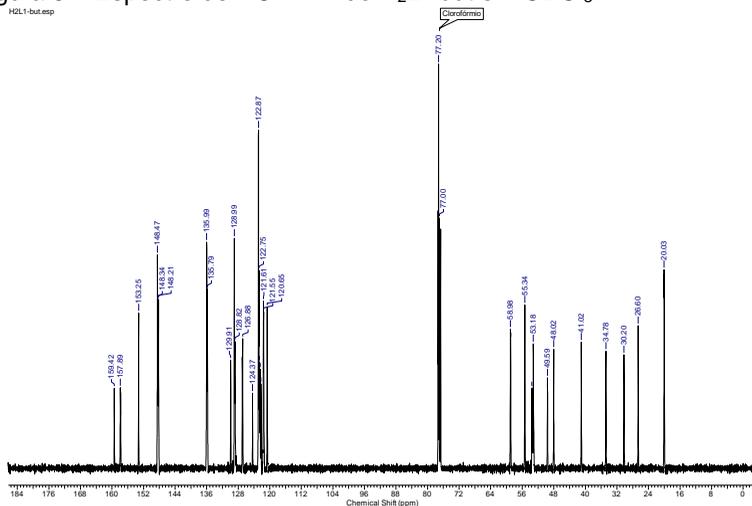
Em um balão de 250 mL, adicionaram-se uma solução de 1,4-butanodiamina (5,1 mmol, 88,10 g mol⁻¹) em metanol (50 mL) e 3 gotas de ácido acético 99,7%. Com um funil de adição, acrescentaram-se lentamente 60 mL de uma solução metanólica de H₂pmeamff (0,60 g, 1 mmol, 601,31 g mol⁻¹). O sistema permaneceu sob agitação por 12 horas e então adicionou-se borohidreto de sódio (0,11g, 3 mmol, 37,83 g mol⁻¹) em banho de gelo. 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 (6x40 mL) em um funil de separação, foi então separada, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi retirado a vácuo. Rendimento 71,7 % em relação ao H₂pmeamff. Nas figuras, encontram-se espectros de IR (Figura 35), ¹H NMR (Figura 36), ¹³C NMR (Figura 37) e Massas (Figura 38).

Figura 35. Espectro no IR do H₂L²-but (ATR).Figura 36. Espectro de ¹H NMR do H₂L²-but em CDCl₃.

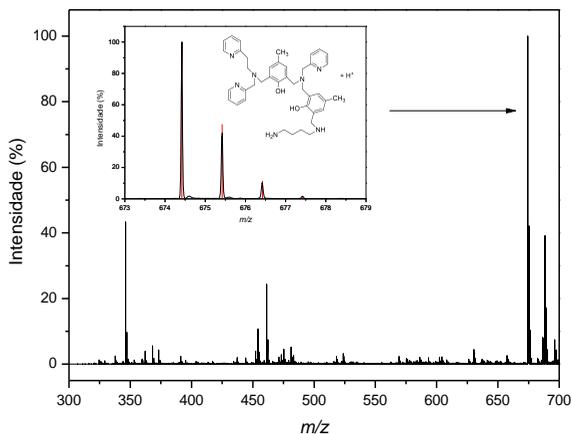
¹H NMR - δ_H (200 MHz; CDCl₃), em ppm: 2,20 (s, 6H, CH₃); 1,47 (m, 2H, CH₂); 2,59-2,69 (m, 4H, CH₂); 2,99-3,01 (m, 4H, CH₂); 3,69-3,85 (m, 12H, CH₂); 6,80-7,61 (m, 13H, CH_{ar}); 8,42-8,52 (m, 3H, CH_{py}).

Figura 37. Espectro de ^{13}C NMR do $\text{H}_2\text{L}^2\text{-but}$ em CDCl_3 .



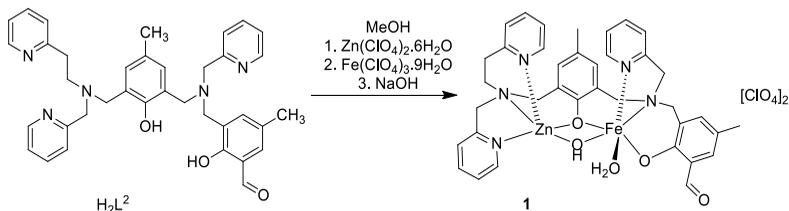
^{13}C NMR - δ_{C} (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 19,97; 20,03; 26,06; 30,20; 34,78; 41,02; 48,02; 49,59; 53,18; 53,55; 55,34; 55,98; 58,64; 77,20; 120,65; 121,55; 121,61; 122,22; 122,45; 122,62; 122,75; 122,87; 124,37; 126,88; 126,96; 128,82; 128,99; 129,91; 135,79; 135,97; 135,99; 135,99; 148,21; 148,34; 148,47; 148,47; 153,25; 153,25; 157,81; 157,89; 159,42.

Figura 38. Espectro de ESI-QTOF do ligante $\text{H}_2\text{L}^2\text{-but}$ e sua respectiva simulação da distribuição isotópica com $m/z = 674,41 + \text{H}^+$.



3.4. Síntese dos Complexos

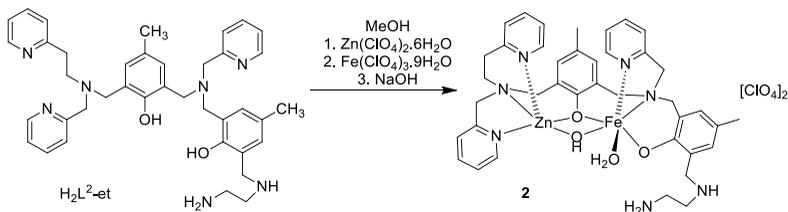
3.4.1. Síntese do complexo 1



Foram solubilizados 0,3006 g de $H_2pmeamff$ (0,5 mmol; $601,3053 \text{ g mol}^{-1}$) em aproximadamente 100 mL de metanol, com agitação e leve aquecimento ($45 \text{ }^\circ\text{C}$), foram adicionados 0,1861 g (0,5 mmol; $372,36 \text{ g mol}^{-1}$) de $Zn(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$. Em seguida adicionaram-se 100 mL com um funil de adição lentamente contendo 0,2581 g (0,5 mmol; $516,20 \text{ g mol}^{-1}$) de $Fe(ClO_4)_3 \cdot 9H_2O$. Manteve-se a agitação e o aquecimento por aproximadamente 15 minutos. Após o término do gotejamento, foram adicionados 0,2448 g (2 mmol; $122,44 \text{ g mol}^{-1}$) de $NaClO_4$ e 1,5 mL de $NaOH$ (1 mol L^{-1}).

Filtrou-se e deixou-se em repouso. Após 1 dia na estufa de cristalização em $25 \text{ }^\circ\text{C}$, houve a formação de um precipitado roxo o qual foi filtrado e lavado com metanol. Rendimento: 65,2%. m/z : 809,21. CHN – Calculado para $FeZnC_{37}H_{42}N_5Cl_2O_{14}$: C: 45,68; H: 4,35; N: 7,20. Encontrado: C: 45,73; H: 4,78; N: 6,74%. Absorção atômica, em mg mL^{-1} : Fe = $2,59 \pm 0,08$ (5,72%), Zn = $3,27 \pm 0,07$ (6,73%); proporção Fe:Zn - 1:1.

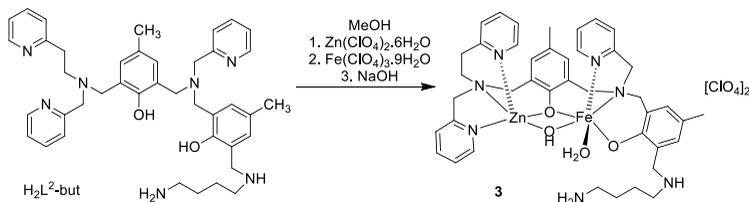
3.4.2. Síntese do Complexo 2



Foram solubilizados 0,3229 g de $\text{H}_2\text{pmeapycet}$ (0,50 mmol; 645,3791 g mol⁻¹) em aproximadamente 80 mL de metanol, com agitação e leve aquecimento (45 °C), foram adicionados 0,1861 g (0,5 mmol; 372,36 g mol⁻¹) de $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Em seguida adicionou-se 80 mL com um funil de extração lentamente contendo 0,2581 g (0,5 mmol; 516,20 g mol⁻¹) de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Manteve-se a agitação e o aquecimento por aproximadamente 15 minutos. Após o término do gotejamento, foram adicionados 0,2448 g (2 mmol; 122,44 g mol⁻¹) de NaClO_4 e 1,5 mL de NaOH (1 mol L⁻¹).

Filtrou-se e deixou-se em repouso. Após 1 dia na estufa de cristalização em 25 °C, houve a formação de um precipitado roxo o qual foi filtrado e lavado com metanol. Rendimento: 63,8%. *m/z*: 879,18. CHN – Calculado para $\text{FeZnC}_{39}\text{H}_{50}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{O}_{13}$: C, 46,11; H, 4,86; N, 9,65; Encontrado: C: 46,06; H: 4,96; N: 9,64%. Absorção atômica, em mg mL⁻¹: Fe = 4,91±0,03 (5,51%), Zn = 5,97±0,13 (6,44%), proporção Fe:Zn - 1:1.

3.4.3. Síntese do Complexo 3



Foram solubilizados 0,3367 g de $\text{H}_2\text{pmeapycbut}$ (0,50 mmol; $673,4104 \text{ g mol}^{-1}$) em aproximadamente 80 mL de metanol, com agitação e leve aquecimento ($45 \text{ }^\circ\text{C}$), foram adicionados 0,1861 g (0,5 mmol; $372,36 \text{ g mol}^{-1}$) de $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Em seguida adicionou-se 80 mL com um funil de extração lentamente contendo 0,2581 g (0,5 mmol; $516,20 \text{ g mol}^{-1}$) de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Manteve-se a agitação e o aquecimento por aproximadamente 15 minutos. Após o término do gotejamento, foram adicionados 0,2448 g (2 mmol; $122,44 \text{ g mol}^{-1}$) de NaClO_4 e 1,5 mL de NaOH (1 mol L^{-1}).

Filtrou-se e deixou-se em repouso. Após 1 dia na estufa de cristalização em $25 \text{ }^\circ\text{C}$, houve a formação de um precipitado roxo o qual foi filtrado e lavado com metanol. Rendimento: 56,6%. m/z : 815,28. CHN – Calculado para $\text{FeZnC}_{41}\text{H}_{54}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{O}_{13}$: C, 47,17; H, 5,12; N, 9,39; Encontrado: C: 47,12; H: 5,21; N: 9,38. Absorção atômica, em mg mL^{-1} : Fe = $4,20 \pm 0,18$ (5,30%), Zn = $4,89 \pm 0,05$ (6,29%), proporção Fe:Zn - 1:1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Caracterização dos Ligantes

4.1.1. Espectroscopia no Infravermelho (IR)

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica utilizada para observar a formação de cada etapa das sínteses dos ligantes finais.

Em todos os precursores e ligantes finais pode-se observar bandas de estiramento C-H_{Ar}, C-H_{Alif}, C=C, C-N e C=N.

Para os precursores, como no pmeamff é possível observar a presença da banda de estiramento C=O (seta vermelha na Figura 35) e C-O_{Fenol}. No pmeamffpy, a banda de estiramento C=O não está presente, porém a banda de estiramento e deformações angulares do fenol central são observadas como mostra a comparação na Figura 39 e na Tabela 3 (Nakamoto, 1977; Silverstein *et al.*, 1994).

Figura 39. Espectros no IR dos precursores pmea (azul claro), pmeamff (azul escuro) e pmeamffpy (preto) (KBr).

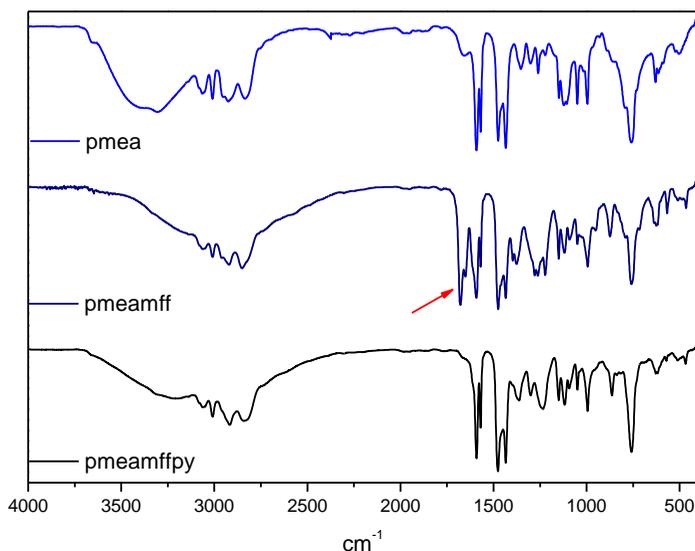


Tabela 3. Atribuições das bandas do IR para os precursores.

Atribuição	pmea	pmeamff	pmeamffpy
ν (O-H)	3386	-	-
ν (C-H _{Ar} e C-H _{Alif})	3066- 2838	3066- 2845	3060- 2832
ν (C=O)	-	1678	-
ν (C=N e C=C)	1590- 1436	1592- 1430	1590- 1433
δ (O-H _{Fenol})	-	1377	1367
ν (C-O _{Fenol})	-	1279	1233
ν (C-N)	1147	1118	1118
δ (C-H _{Ar})	761	758	760

Para os ligantes finais é possível observar que para o ligante H₂L² observa-se a banda de estiramento C=O em 1673 cm⁻¹ (seta vermelha na Figura 36), que está ausente no espectro quando são feitas derivatizações com diaminas formando os ligantes H₂L²-et e H₂L²-but, esses dados sugerem a formação dos compostos sintetizados, como mostra a Figura 40 e a Tabela 4 (Nakamoto, 1977; Silverstein *et al.*, 1994).

Figura 40. Espectros no IR dos ligantes finais H₂L² (azul claro), H₂L²-et (azul escuro) e H₂L²-but (preto) (ATR).

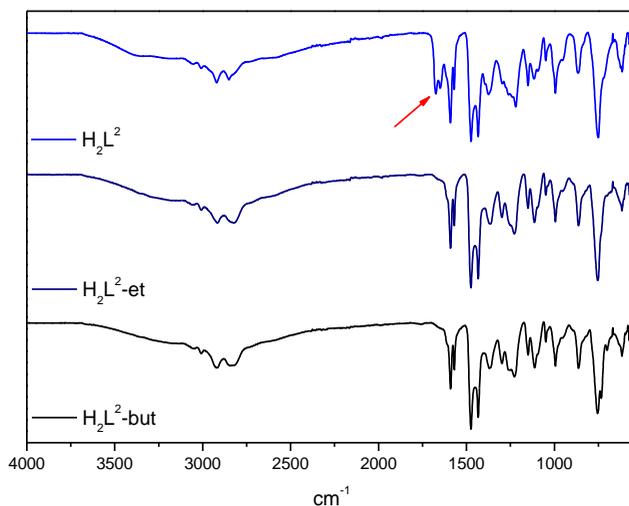


Tabela 4. Atribuições das bandas do IR para os ligantes finais.

Atribuição	H ₂ L ²	H ₂ L ² -et	H ₂ L ² -but
v (O-H)	-	-	3386
v (C-H _{Ar} e C-H _{Alif})	3052- 2852	3059- 2834	3056- 2852
v (C=O)	1673	-	-
v (C=N e C=C)	1588- 1431	1614- 1433	1632- 1435
δ (O-H _{Fenol})	1373	1369	1382
v (C-O _{Fenol})	1224	1231	1238
v (C-N)	1114	1150	1152
δ (C-H _{Ar})	752	758	761

4.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono – NMR (¹H e ¹³C)

Para constatar a pureza adequada para os precursores e ligantes finais foi utilizada a espectroscopia de ¹H NMR. Com as integrações foi possível confirmar o número de hidrogênios presentes na molécula, bem como diferenciá-los em metílicos, metilênicos e aromáticos (Silverstein *et al.*, 1994). Dessa forma, constatou-se que todos os ligantes estavam com pureza adequada. Nas Tabelas 5 e 6 os valores de deslocamento químico (δ em ppm), número de átomos de hidrogênio correspondentes e as atribuições dos sinais.

Tabela 5. Deslocamentos químicos (δ_H) dos espectros de 1H NMR para os precursores.

Atribuição	cmff	pmea	pmeamff	pmeamffpy
CH ₃	2,35 (s, 3H)	-	2,25 (s, 3H)	2,21 (s, 3H)
CH ₂	4,66 (s, 2H)	3,95 (s, 2H) 3,08 – 3,03 (m, 4H)	3,92 (s, 2H) 3,81 (s, 2H) 3,03 (s, 4H)	3,96 – 3,81 (m, 8H) 3,02 – 3,01 (m, 4H)
CH _{Ar}	7,45 (s, 1H) 7,33 (s, 1H)	8,53 (d, 2H _{py}) 7,63 – 7,57 (m, 2H) 7,30 – 7,29 (d, 1H) 7,19 – 7,18 (d, 1H) 7,15 – 7,10 (m, 2H)	8,57 – 8,44 (dd, 2H _{py}) 7,67-7,50 (m, 4H) 7,24–7,04 (m, 4H)	8,55 – 8,44 (m, 3H) 7,68 – 7,48 (m, 3H) 7,38 – 7,24 (m, 3H) 7,16 – 7,03 (m, 3H) 6,91 (s, 1H) 6,79 (s, 1H)
CH _(Aldeído)	9,85 (s, 1H)	-	10,23 (s, 1H)	-
OH	11,25 (s, 1H)	-	-	-
NH	-	2,33 (s, 1H)	-	-

Tabela 6. Deslocamentos químicos (δ_H) dos espectros de 1H NMR para os ligantes finais.

Atribuição	H ₂ L ²	H ₂ L ² -et	H ₂ L ² -but
CH ₃	2,23 (s, 3H) 2,19 (s, 3H)	2,20 (s, 6H)	2,20 (s, 6H)
CH ₂	3,86 (s, 2H) 3,84 (s, 2H) 3,80 (s, 4H) 3,71 (s, 2H) 3,05-2,96 (m, 4H)	3,85 – 3,69 (m, 12H) 3,04 – 2,96 (m, 4H) 2,78 (m, 2H) 2,63 (m, 2H)	3,85 – 3,69 (m, 12H) 3,01 – 2,99 (m, 4H) 2,69 – 2,59 (m, 4H) 1,47 (t, 2H)
CH _{Ar}	8,54 (s, 2H _{py}) 8,43 – 8,42 (s, 1H _{py}) 7,61 – 6,78 (m, 13H)	8,55 – 8,42 (m, 3H _{py}) 7,64 – 6,80 (m, 13H)	8,52 – 8,42 (m, 3H _{py}) 7,61 – 6,80 (m, 13H)
CH(Aldeído)	10,26 (s, 1H)	-	-

É possível observar nas ampliações os valores de deslocamentos de hidrogênio dos singletos, dupletos, tripletos e multipletos, como pode ser observado nos espectros (Figuras 41 – 46) abaixo.

Pró-ligante pmea

Para o pró-ligante pmea pode ser observado um singlete em 2,33 ppm referente ao átomo de hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio central da molécula (hidrogênio em azul). Entre 3,03 a 3,08 ppm (hidrogênios metilênicos em vermelho à esquerda do NH) pode ser observado o efeito do aumento de um átomo de carbono em relação ao pró-ligante bpma (já sintetizado pelo grupo), o qual aparecia com um singlete (Muxel *et al.*, 2014) e para o pmea é possível observar a presença de um sinal multiplete. A resolução do espectro não permite a atribuição dos valores de acoplamentos entre estes átomos de hidrogênio. Seria possível atribuí-los usando a análise de ressonância bidimensional. Os hidrogênios metilênicos aparecem como singlete em 3,95 ppm. Os hidrogênios ligados aos átomos de carbonos próximos aos átomos de nitrogênios da piridina aparecem como duplete em 8,53 ppm. Os demais hidrogênios aromáticos aparecem no intervalo de 7,63 a 7,10 ppm. Considerando que a estrutura não é simétrica, os valores para os hidrogênios na região aromática devem ser ligeiramente diferentes e estes podem cair em regiões muito próximas dificultando a atribuição. Análise por correlação entre hidrogênios e/ou carbono seria uma ferramenta para essa atribuição mais precisa.

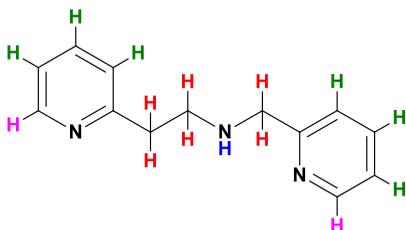
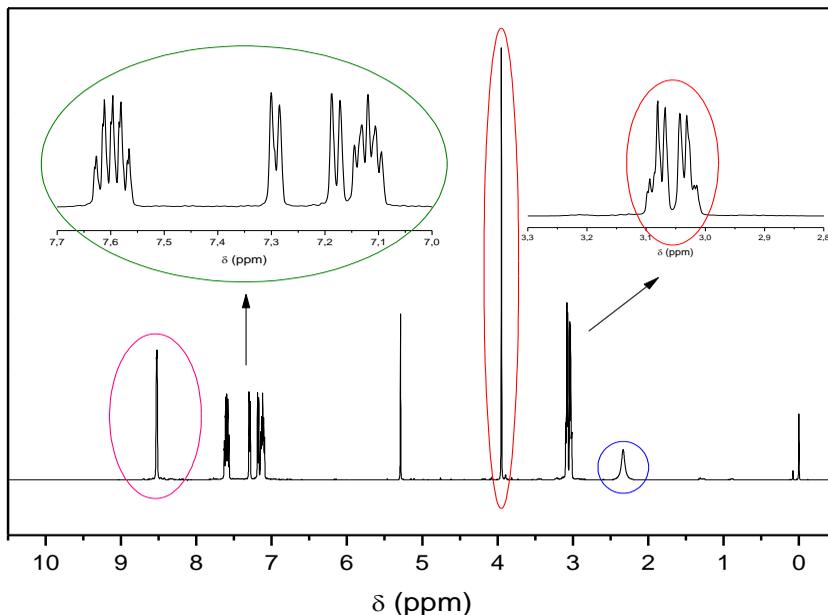


Figura 41. Espectro de ^1H NMR do pmea em CDCl_3 .



^1H NMR - δ_{H} (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,33 (s, 1H, NH); 3,08-3,03 (m, 4H, CH_2); 3,95 (s, 2H, CH_2); 7,15-7,10 (m, 2H, CH_{ar}); 7,19-7,18 (d, 1H, CH_{ar}); 7,30-7,29 (d, 1H, CH_{ar}); 7,63-7,57 (m, 2H, CH_{ar}); 8,53 (d, 2H, CH_{py}).

Pró-ligante pmeamff

Para o pró-ligante pmeamff em relação ao pmea, pode ser observado um singlete em 2,25 ppm referente aos hidrogênios metílicos (hidrogênios em roxo) e um singlete em 10,23 ppm referente ao hidrogênio do aldeído (hidrogênio em laranja).

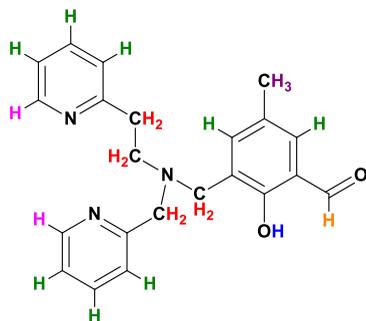
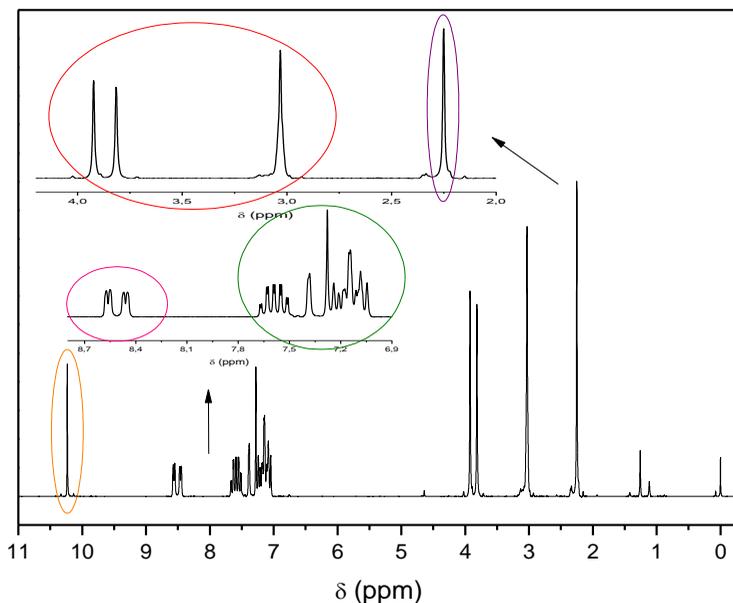


Figura 42. Espectro de ^1H NMR do pmeamff em CDCl_3 .



^1H NMR - δ_{H} (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,25 (s, 3H, CH_3); 3,03 (s, 4H, CH_2); 3,81 (s, 2H, CH_2); 3,92 (s, 2H, CH_2); 7,04–7,24 (m, 4H, CH_{ar}); 7,67–7,50 (m, 4H, CH_{ar}); 8,57–8,44 (dd, 2H, CH_{py}); 10,23 (s, 1H, CH_{ald}).

Pró-ligante pmeamffpy

No caso do pró-ligante pmeamffpy em relação ao pmeamff, pode ser observado que não aparece mais o singlete referente ao hidrogênio do aldeído.

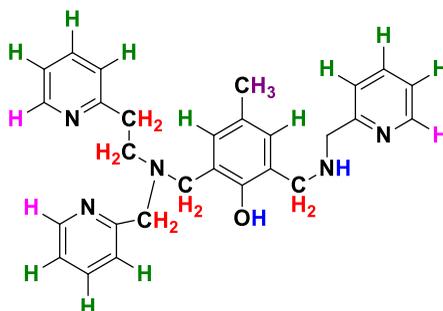
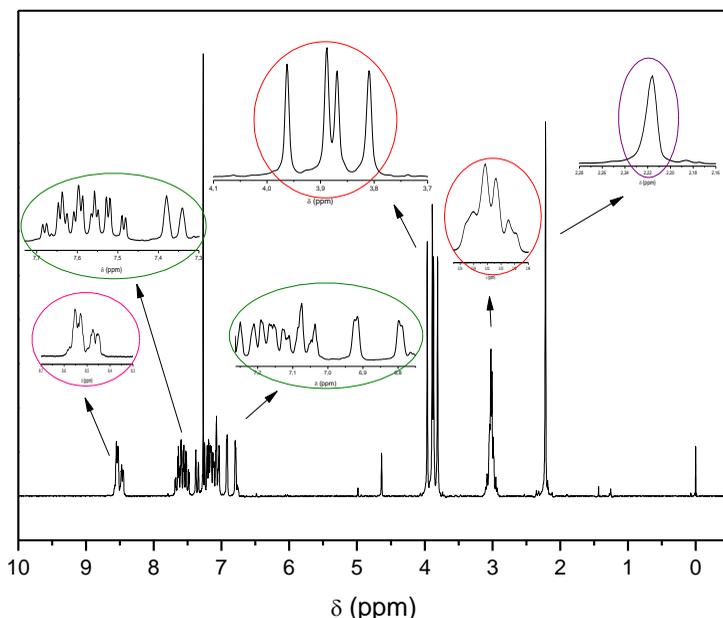


Figura 43. Espectro de ^1H NMR do pmeamffpy em CDCl_3 .



^1H NMR - δ_{H} (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,21 (s, 3H, CH_3); 3,01-3,02 (m, 4H, CH_2); 3,96-3,81 (m, 8H, CH_2); 6,79 (s, 1H, CH_{ar}); 6,91 (s, 1H, CH_{ar}); 7,03-7,16 (m, 3H, CH_{ar}); 7,24-7,38 (m, 3H, CH_{ar}); 7,48-7,68 (m, 3H, CH_{ar}); 8,44-8,55 (m, 3H, CH_{ar}).

Ligante final H_2L^2

Para o ligante final H_2L^2 em relação ao pró-ligante pmeamffy, pode ser observado dois singletos em 2,19 e 2,23 ppm referente aos hidrogênios metílicos (hidrogênios em roxo) e um singlete em 10,26 ppm referente ao hidrogênio do aldeído lateral (hidrogênio em laranja).

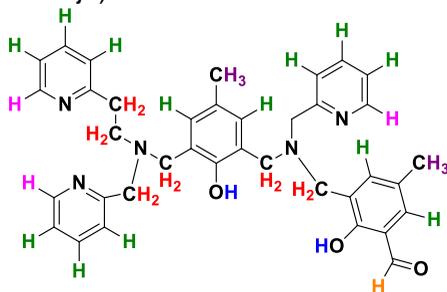
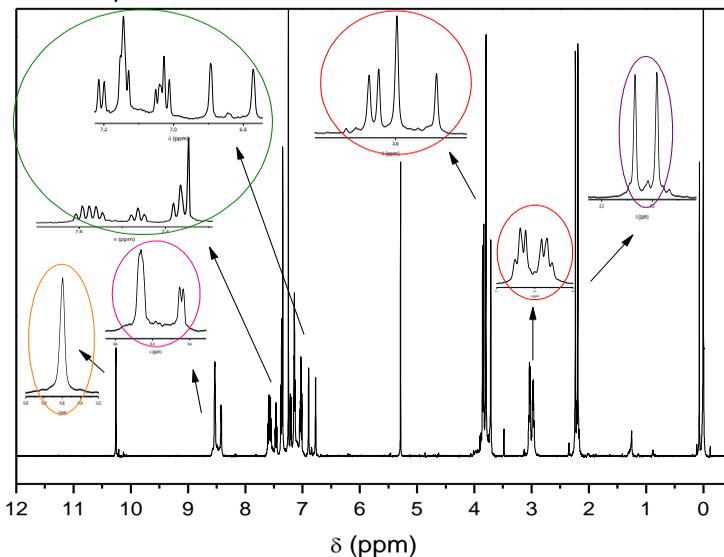


Figura 44. Espectro de 1H NMR do H_2L^2 em $CDCl_3$.



1H NMR - δ_H (200 MHz; $CDCl_3$), em ppm: 2,19 (s, 3H, CH_3); 2,23 (s, 3H, CH_3); 3,05- 2,96 (m, 4H, CH_2); 3,71 (s, 2H, CH_2); 3,80 (s, 4H, CH_2); 3,84 (s, 2H, CH_2); 3,86 (s, 2H, CH_2); 7,61-6,78 (m, 13H, CH_{ar}); 8,43-8,42 (m, 1H, CH_{py}); 8,54 (m, 2H, CH_{py}); 10,26 (s, 1H, CH_{ald}).

Ligante final H₂L²-et

O ligante final H₂L²-et em relação ao ligante final H₂L², pode ser observado que não aparece mais o singlete referente ao hidrogênio do aldeído, ou seja, é possível observar que a derivatização com a diamina alifática 1,2-etilenodiamina.

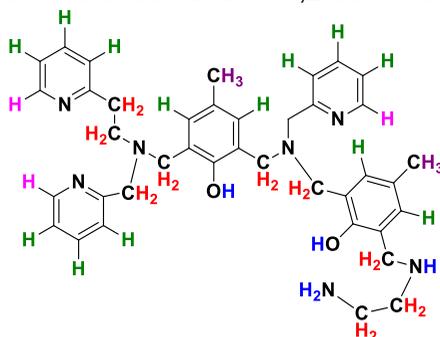
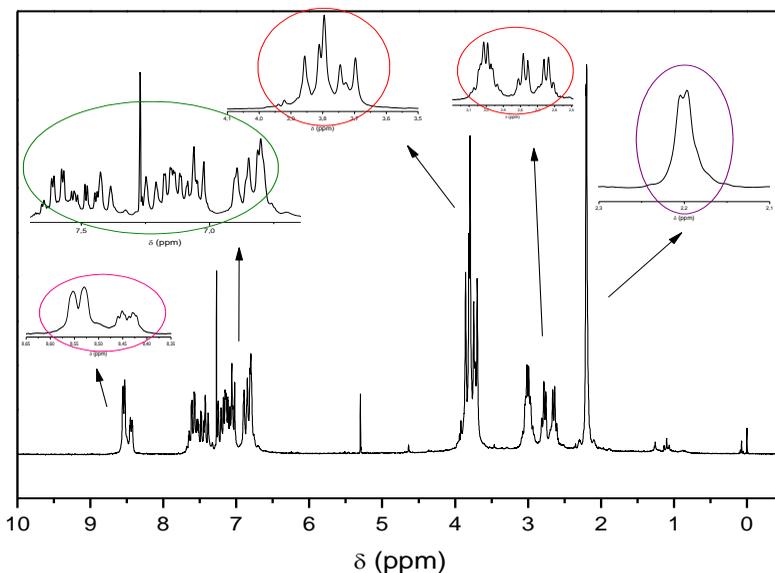


Figura 45. Espectro de ¹H NMR do H₂L²-et em CDCl₃.



¹H NMR - δ_H (200 MHz; CDCl₃), em ppm: 2.20 (s, 6H, CH₃); 2.63 (t, 2H, CH₂); 2.78 (t, 2H, CH₂); 2.96-3.04 (m, 4H, CH₂); 3.69-3.85 (m, 12H, CH₂); 6.80-7.61 (m, 13H, CH_{ar}); 8.42-8.55 (m, 3H, CH_{py}).
Ligante final H₂L²-but

O ligante final H_2L^2 -et em relação ao ligante final H_2L^2 , pode ser observado que não aparece mais o singlete referente ao hidrogênio do aldeído, ou seja, é possível observar que a derivatização com a diamina alifática 1,2-etilendiamina.

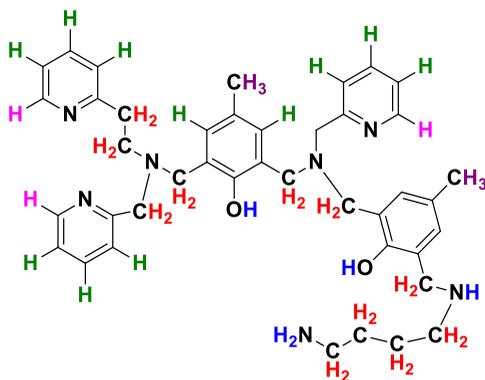
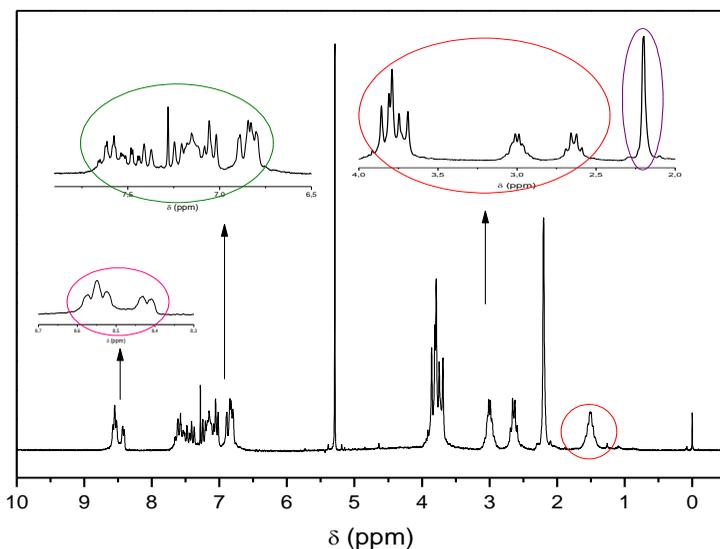


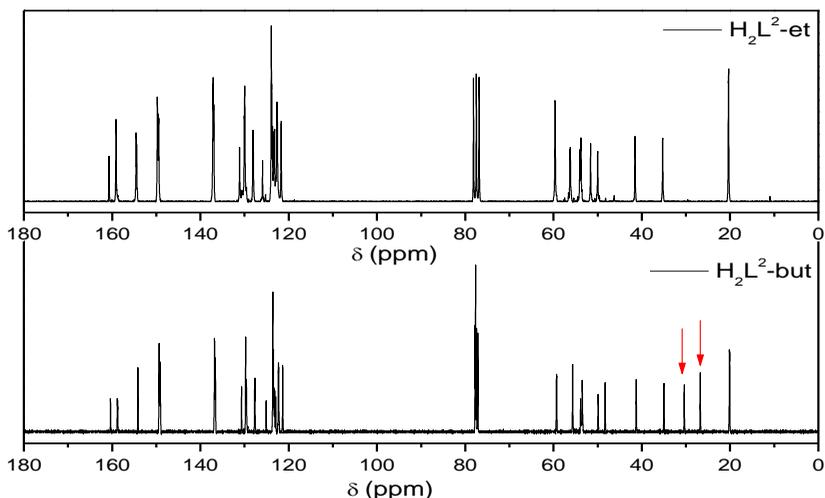
Figura 46. Espectro de 1H NMR do H_2L^2 -but em $CDCl_3$.



1H NMR - δ_H (200 MHz; $CDCl_3$), em ppm: 2,20 (s, 6H, CH_3); 1,47 (m, 2H, CH_2); 2,59-2,69 (m, 4H, CH_2); 2,99-3,01 (m, 4H, CH_2); 3,69-3,85 (m, 12H, CH_2); 6,80-7,61 (m, 13H, CH_{ar}); 8,42-8,52 (m, 3H, CH_{py}).

Através do ^{13}C NMR é possível verificar a formação dos ligantes modificados com diaminas, ficando evidente a diferença de dois carbonos. No caso do ligante $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$ que possui 39 carbonos e encontra-se na Figura 47a, observa-se a diferença de dois carbonos mostrada pelas setas vermelhas na Figura 47b já que o ligante $\text{H}_2\text{L}^2\text{-but}$ possui 41 carbonos.

Figura 47. Deslocamentos químicos (δ_{C}) dos espectros de ^{13}C NMR para os ligantes finais $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$ (a) e $\text{H}_2\text{L}^2\text{-but}$ (b) em CDCl_3 .



4.1.3. Espectrometria de Massa com Ionização por Electro spray (ESI-MS e ESI-QTOF)

A espectrometria de massa com ionização por electro spray (ESI-MS e ESI-QTOF) permite identificar a presença dos íons moleculares e também de fragmentos dos ligantes. Os espectros de massa são sumarizados na Tabela 7 (Distribuição isotópicas encontram-se no procedimento experimental).

Tabela 7. Espécies encontradas na espectrometria de massa.

	Espécie	m/z	Representação
pmea	$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_3 (+1)$	214,1339	pmea + H^+

pmeamff	C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₂ (+1)	362,1863	pmeamff + H ⁺
pmeamffpy	C ₂₈ H ₃₁ N ₅ O (+1)	454,2607	pmeamffpy + H ⁺
H ₂ L ²	C ₃₇ H ₃₉ N ₅ O ₃ (+1)	602,3131	H ₂ L ² + H ⁺
H ₂ L ² -et	C ₃₉ H ₄₇ N ₇ O ₂ (+1)	646,3869	H ₂ L ² -et + H ⁺
H ₂ L ² -but	C ₄₁ H ₅₁ N ₇ O ₂ (+1)	674,4182	H ₂ L ² -but + H ⁺

4.2. Caracterização dos Complexos

4.2.1. Espectroscopia no Infravermelho (IR)

Utilizando a espectroscopia vibracional na região do infravermelho pode-se fazer comparação entre os espectros do complexo com o ligante livre. O surgimento de novas bandas no espectro do complexo, como a presença de bandas referentes ao contra-íon, ligantes ponte e moléculas de água coordenadas, sugerem a formação do complexo, o qual também pode ser avaliado pelos deslocamentos de energia quando comparados ao ligante (Nakamoto, 1977; Silverstein *et al.*, 1994).

Observa-se uma semelhança, comparando o espectro do complexo com o do ligante (**1** – Figura 48, **2** – Figura 49 e **3** – Figura 50 e atribuições na Tabela 8), o que traz como indicação que o ligante se manteve no complexo.

Figura 48. Espectro no IR do H_2L^2 (vermelho) e complexo **1** (preto) (ATR).

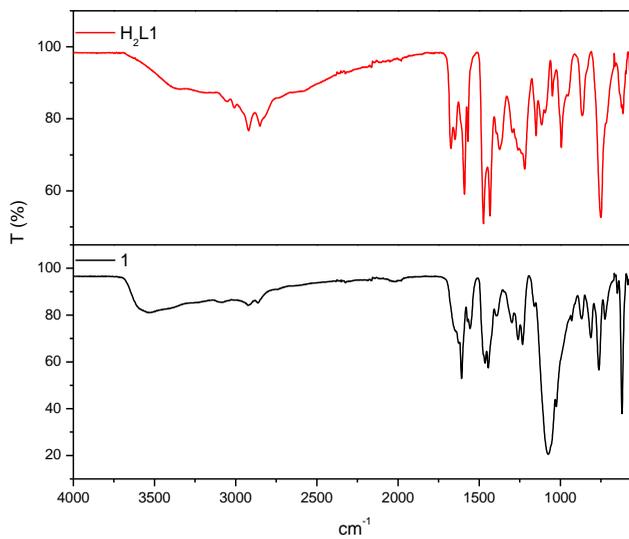


Figura 49. Espectro no IR do H_2L^2 -et (vermelho) e complexo 2 (preto) (ATR).

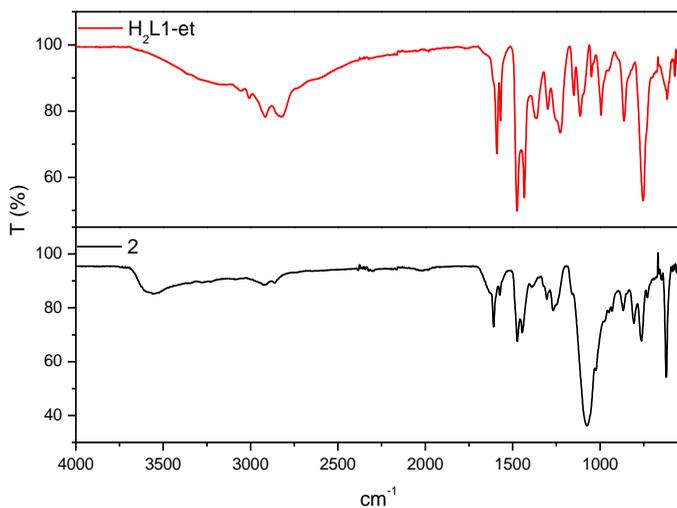


Figura 50. Espectro no IR do H_2L^2 -but (vermelho) e complexo 3 (preto) (ATR).

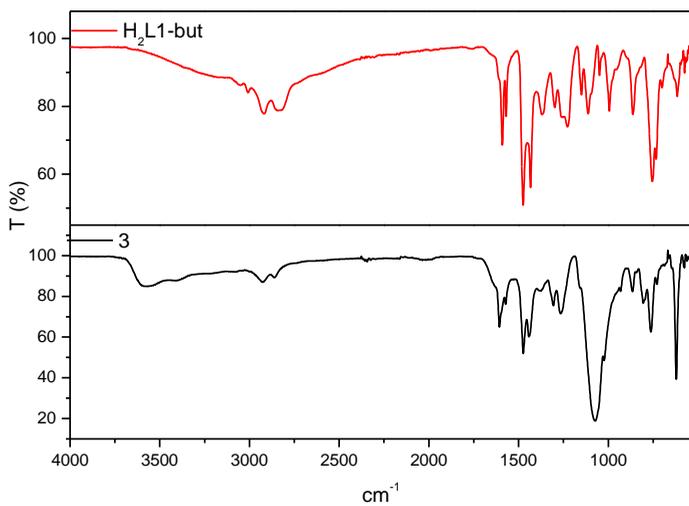


Tabela 8. Atribuições de bandas no IR para ligantes e complexos.

Atribuição	H ₂ L ²	1	H ₂ L ² -et	2	H ₂ L ² -but	3
v (O-H)	-	3438	-	3340	3386	-
v (C-H _{Ar} e C-H _{Alif})	3052- 2852	2918- 2860	3059- 2834	3020- 2856	3056- 2852	3017- 2863
v (C=O)	1673	1661	-	-	-	-
v (C=N e C=C)	1588- 1431	1606- 1420	1614- 1433	1609- 1447	1632- 1435	1607- 1443
δ (O-H _{Fenol})	1373	-	1369	-	1382	-
v (C-O _{Fenol})	1224	1263	1231	-	1238	-
v (C-N)	1114	-	1150	1158	1152	1144
δ (C-H _{Ar})	752	768	758	765	761	764
v (Cl-O)	-	1090	-	1095	-	1089

A coordenação do metal foi observada, uma vez que as principais bandas presentes nos ligantes foram deslocados em relação aos números de onda, para maior energia, após a formação dos complexos. Em todos os complexos, pode-se observar (Tabela 8) os valores referentes aos estiramentos e deformações angulares das ligações das piridinas e dos fenóis (C=C, C=N, C-H e C-O) presentes no ligante. Para o complexo **1**, pode-se verificar uma banda intensa em 1673 cm⁻¹ referente ao aldeído, que também se encontra no complexo em 1661 cm⁻¹, mostrando que não houve coordenação do grupo carbonila. Porém houve um deslocamento para menor número de onda, pois o metal no complexo é um ácido de Lewis, recebe elétrons, vibrando em valores de menor energia.

A ausência da banda observada no ligante em aproximadamente 1373 cm⁻¹, atribuída ao δ (O-H_{fenol}), é indicativa da coordenação do grupo do fenolato no lado "duro" do ligante ao centro de Fe^{III} e também da formação de uma ponte de fenoxo entre Fe^{III} e Zn^{II}. Os mesmos padrões são observados ao comparar os pares H₂L²-et/**2** (em 1369 cm⁻¹) e H₂L²-but/**3** (em 1382 cm⁻¹). Estes resultados estão de acordo com os relatados para complexos semelhantes anteriormente sintetizados (Peralta *et al.*, 2010; Piovezan *et al.*, 2010; Piovezan *et al.*, 2012; De Souza *et al.*, 2013; Muxel *et al.*, 2014; Camargo, T. P. *et al.*, 2015; De Souza *et al.*, 2015; Osório *et al.*, 2015).

Outras bandas que sugerem a formação do complexo é a presença da banda intensa em aproximadamente 1090 cm^{-1} , referente ao estiramento atribuído ao modo vibracional do contra-íon perclorato. Na região de 3438 (**1**), 3340 (**2**) e 3347 (**3**) cm^{-1} esse estiramento pode ser atribuído à molécula de água, que encobre os picos das aminas dos ligantes $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$ e $\text{H}_2\text{L}^2\text{-but}$.

4.2.2. Cálculos de Estrutura Eletrônica

Como não foi possível a obtenção de estruturas cristalinas binucleares dos complexos e, a fim de ajudar na elucidação das estruturas dos complexos formados, utilizando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) foram realizados cálculos de camada aberta.

As frequências vibracionais foram calculadas para todas as estruturas e são positivas para todas as estruturas dos complexos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2$ (**1a**), $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-et}$ (**2a**) e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-but}$ (**3a**) e os conjugados de fosfato $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-PO}_4$ (**1b**), $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-et-PO}_4$ (**2b**) e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-but-PO}_4$ (**3b**) mostram uma frequência negativa menor, que corresponde à rotação do anel aromático.

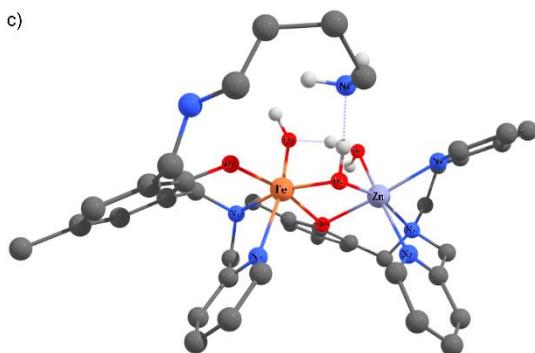
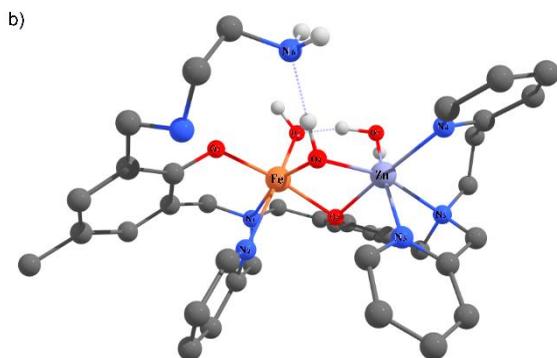
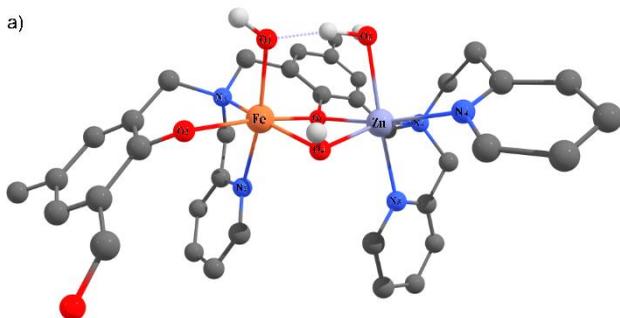
A estrutura mais provável para o íon Zn^{II} em solução mostra uma estrutura octaédrica com uma molécula de água coordenada. Embora já tenham sido publicados dados de estrutura cristalina de complexos semelhantes e os mesmos sejam um bom ponto de partida para cálculos geométricos do complexo **1**, a assimetria do lado macio traz um novo desafio, uma vez que as piridinas ligadas ao centro do Zn^{II} podem ter diferentes isômeros estruturais. Por esta razão, diferentes estruturas do complexo **1** foram otimizadas num grau inferior de teoria (base SVP) na tentativa de comparar suas energias totais. Além disso, as estruturas calculadas dos complexos **1-3** estão de acordo com dados cristalográficos já publicados na literatura obtida por Piovezan (Piovezan *et al.*, 2010) e Peralta (Peralta *et al.*, 2010), como pode ser visto na Tabela 9.

Tabela 9. Comprimentos de ligação selecionados para os complexos calculados para comparação com alguns valores de dados cristalográficos (os números dos átomos foram renumerados para se adequarem aos dados teóricos apresentados neste estudo).

Teórico	1	2	3	Dados Crist.	Complexo [Fe ^{III} (μ-OH)Zn ^{II} (L-CH ₃)]	Complexo [Fe ^{III} (μ-OH)Zn ^{II} (L ¹)]
Fe-Zn	3,113	3,050	3,050	Fe-Zn	3,0862(18)	3,0550(16)
Fe-N₁	2,262	2,264	2,264	Fe-N₁	2,186(3)	2,127(3)
Fe-N₂	2,232	2,288	2,288	Fe-N₂	2,137(8)	2,185(6)
Fe-O₁	1,936	1,926	1,926	Fe-O₁	1,892(3)	1,899(2)
Fe-O₂	1,963	1,977	1,977	Fe-O₂	2,112(3)	1,948(5)
Fe-O₃	2,086	2,092	2,092	Fe-O₃	2,053(3)	1,968(2)
Fe-O₄	2,028	1,984	1,984	Fe-O₄	1,920(7)	1,986(5)
Zn-N₃	2,259	2,279	2,279	Zn-N₃	2,152(7)	2,273(6)
Zn-N₄	2,156	2,167	2,167	Zn-N₄	2,056(8)	2,120(7)
Zn-N₅	2,212	2,206	2,206	Zn-N₅	2,073(8)	2,120(7)
Zn-O₃	2,180	2,207	2,207	Zn-O₃	2,101(3)	2,081(7)
Zn-O₄	2,057	2,027	2,027	Zn-O₄	1,969(6)	2,039(6)
Zn-O₅	2,207	2,172	2,172	Zn-O₅	-	2,067(6)

Como esperado, os resultados mostram os íons Fe^{III} são facialmente coordenados pelo braço tridentado duro dos ligantes, bem como um grupo hidróxido, a geometria octaédrica distorcida dos centros Fe^{III} são completadas por um grupo μ-fenolato central e um grupo μ-hidróxido que atuam como unidades ponte entre os dois centros metálicos. Além dos grupos pontes, os íons Zn^{II} mostra o braço tridentado macio dos ligantes são facialmente coordenado com uma molécula de água para completar a geometria octaédrica distorcida como pode ser visto e na Figura 51.

Figura 51. Estruturas calculadas para complexos (a) **1a**, (b) **2a** e (c) **3a**, respectivamente. Os átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbono são omitidos para maior clareza.



Os resultados mostram que a parte do ligante contendo etilpiridina encontra-se no mesmo lado da parte do ligante contendo fenol, sendo $6,77 \text{ kcal mol}^{-1}$ mais estável do que a conformação que a etil piridina ocupa a posição *trans*.

Os complexos **2** e **3** contêm cadeias carbônicas laterais com diaminas adicionadas ao grupo carbonil, a influência da posição dessas cadeias laterais foram calculadas e seus valores de energias comparados. Ambos os compostos apresentam uma maior estabilização, com a aproximação das aminas terminais ao oxigênio da ponte μ -hidroxo, formando uma ligação de hidrogênio tal como pode ser visto pela Figura 45b e 45c, com distâncias de 1,816 e 1,756 Å para os complexos **2** e **3**, respectivamente. Uma vez que ambas as estruturas, mostram uma diminuição da energia total ao fazer essas ligações de hidrogênio, a energia de estabilização decorrente da ligação de hidrogênio compensa na perda de entropia resultante da organização da cadeia lateral, que provavelmente é fixada em torno dessa geometria.

A protonação da amina terminal reduz a energia em ambos os casos. No entanto, existem vários efeitos sobrepostos, entre eles o da ligação formada. Por esta razão, e para avaliar a estabilização proporcionada pela formação de uma nova ligação, os cálculos foram realizados nas mesmas geometrias que as calculadas para os complexos com diaminas da cadeia lateral protonadas, mas com a remoção de um próton (H^+) que foi considerado uma carga pontual. Existe uma forte estabilização da cadeia lateral da etanodiamina com a presença de uma carga residual no sistema e com a nova conformação adotada, como evidenciado pela diferença de energia entre (**2**) e (**3**). A diferença de energia entre a amina protonada e o deslocamento da carga resulta em uma aproximação da energia de ligação. Os valores de energia de protonação são consistentes com os intervalos relatados na literatura. A diferença entre os valores de energia para a amina e a retirada da carga mostra que a energia muda devido às modificações conformacionais e à presença de carga na amina terminal, indicando um efeito eletrostático. No caso da cadeia lateral com butanodiamina ($\text{H}_2\text{L}^2\text{-but}$ e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-but}$), a diferença é muito baixa, enquanto que para a cadeia lateral com etanodiamina ($\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$ e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-et}$) esta diferença é positiva (Tabela 10).

Tabela 10. Valores de energia calculados para os complexos **2** e **3** e a influência da amina terminal protonada.

ΔE (kJ mol ⁻¹)	2	3
(-NH ₃ ⁺) – (-NH ₂ ⁺)	-1070,514	-1044,499
(-NH ₃ ⁺) – (-NH ₂)	-3022,578	-849,272
(-NH ₂) – (-NH ₂ ⁺)	1952,064	-195,227

Todos estes resultados indicam que as otimizações geométricas são verdadeiramente os mínimos de energia e são estruturas válidas para comparação das geometrias teóricas obtidas. A comparação das frequências vibracionais calculadas e obtidas por espectroscopia de IR correlacionam com a afirmação acima, uma vez que os dados mostram boa concordância tanto em energias como em intensidades. O cálculo teórico foi feito baseado na hipótese de uma única molécula em seu estado gasoso e no vácuo. Assim, nas Figuras 52 - 54 e na Tabela 11, a seguir, foi realizada a comparação entre os valores das frequências vibracionais experimentais dos complexos com aqueles que foram calculados.

Tabela 11. Atribuições de bandas no IR para complexos **1** – **3** (experimental e calculado).

Atribuição	1	1	2	2	3	3
	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.
ν (O-H)	3438	-	3340	-	-	-
ν (C-H _{Ar} e C-H _{Alif})	2918-2860	2949-2847	3020-2856	2935-2840	3017-2863	3046-2860
ν (C=O)	1661	1687	-	-	-	-
ν (C=N e C=C)	1606-1420	1626-1462	1609-1447	1470	1607-1443	1621-1461
δ (O-H _{Fenol})	-	-	-	-	-	-
ν (C-O _{Fenol})	1263	-	-	-	-	-
ν (C-N)	-	-	1158	-	1144	1144
δ (C-H _{Ar})	768	786	765	798	764	784
ν (Cl-O)	1090	-	1095	-	1089	-

Figura 52. Espectro de IR do complexo 1 (preto) e calculado para o complexo 1 (vermelho).

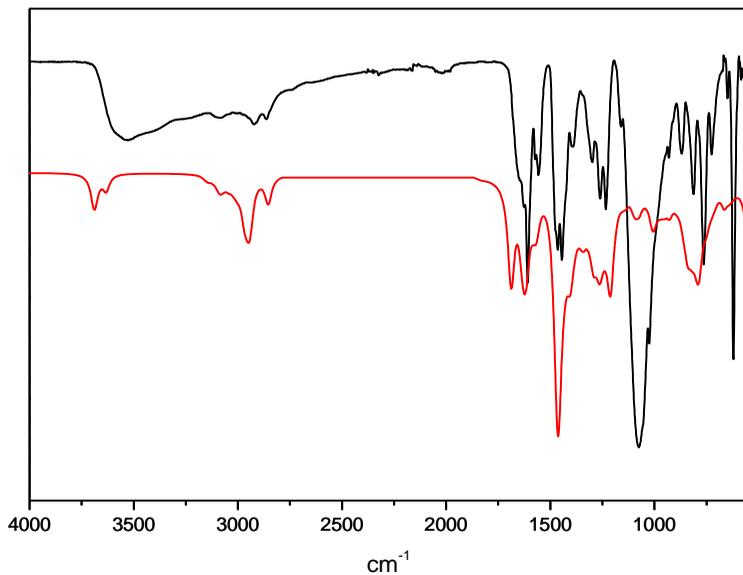


Figura 53. Espectro de IR do complexo 2 (preto) e calculado para o complexo 2 (vermelho).

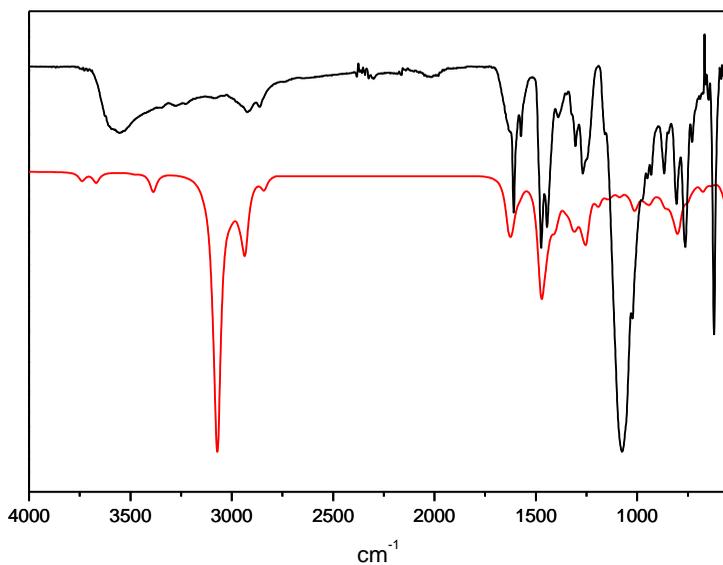
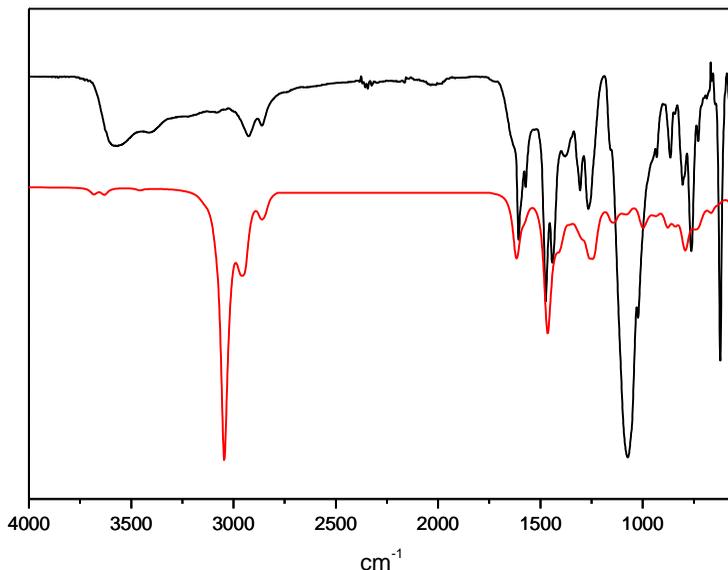


Figura 54. Espectro de IR do complexo **3** (preto) e calculado para o complexo **3** (vermelho).



4.2.3. *Análise Elemental de CHN*

A Análise Elemental é uma técnica usada para determinar as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio em uma amostra e assim avaliar a composição do complexo sintetizado. Na Tabela 12 observa-se que os resultados obtidos nas análises estão em concordância quando comparados os valores experimentais com os teóricos, indicando que as propostas estruturais são apropriadas. Esses valores foram calculados como base nas seguintes fórmulas moleculares: **(1)** $\text{FeZnC}_{37}\text{H}_{42}\text{N}_5\text{Cl}_2\text{O}_{14}$ (Figura 55a), **(2)** $\text{FeZnC}_{39}\text{H}_{50}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{O}_{13}$ (Figura 55b) e **(3)** $\text{FeZnC}_{41}\text{H}_{54}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{O}_{13}$ (Figura 55c).

Figura 55. Estruturas dos complexos correspondentes as fórmulas moleculares encontradas nas análises de CHN, (a) **1**, (b) **2** e (c) **3**.

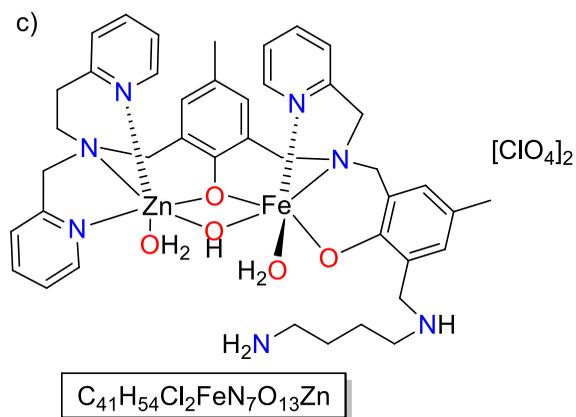
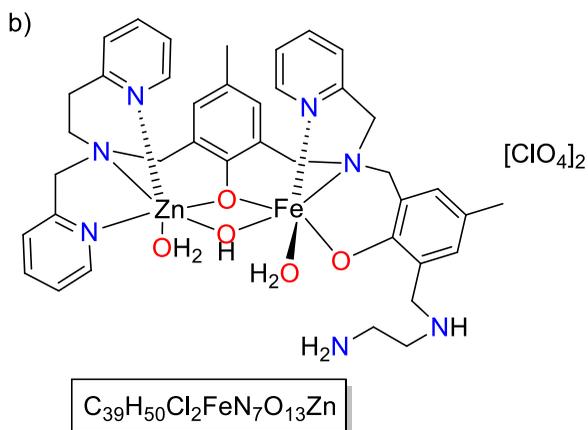
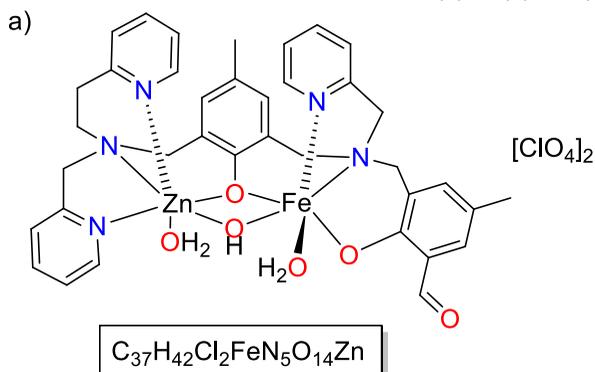


Tabela 12. Porcentagens obtidas na análise elementar com seus respectivos valores experimentais e teóricos.

Complexo	C% Exp.	C% Teo.	H% Exp.	H% Teo.	N% Exp.	N% Teo.
1	45,73	45,68	4,78	4,35	6,74	7,20
2	46,06	46,11	4,96	4,86	9,64	9,65
3	47,12	47,17	5,21	5,12	9,38	9,39

4.2.4. Condutimetria

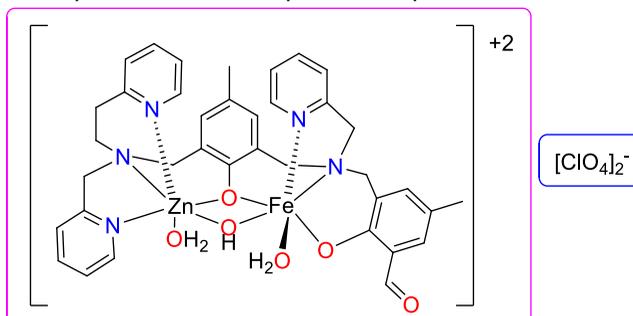
Realizou-se a condutimetria dos complexos em soluções com concentração de 1×10^{-3} mol L⁻¹. Esses dados estão sumarizados na Tabela 13.

Tabela 13. Valores de condutividade molar para os complexos **1 – 3**.

	Condutividade Molar ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Proporção Complexo: Contra-íon	Solvente	T (°C)
1	191,26	-	CH ₃ CN	21
1	184,23	-	CH ₃ CN	25
1	185,90	1:2	MeOH	25
2	230,68	1:2	CH ₃ CN	25
3	278,28	1:2	CH ₃ CN	25

Para todos os complexos foi possível observar que as estruturas encontradas na Análise Elementar de C, H e N se mantiveram em solução, pois em metanol para o complexo **1** mostrou uma condutividade molar de $185,90 \mu\text{S cm}^{-1}$, comparando com a literatura indica a presença de dois equivalentes de íons positivos por molécula de complexo, sendo 2 contra-íons percloratos, como pode ser observado na Figura 56.

Figura 56. Proposta de estrutura para o complexo 1.

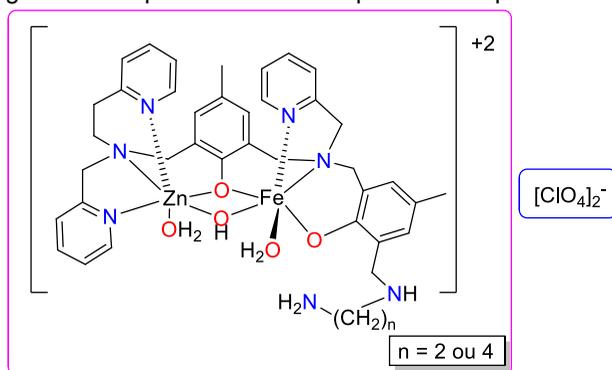


Proporção = 1:2

Para o complexo 1 também foi realizado em acetonitrila, porém não foi possível obter uma resposta conclusiva, pois a faixa de valores em acetonitrila caracteriza eletrólitos do tipo 1:1 a qual encontra-se entre $120 - 160 \mu\text{S cm}^{-1}$ e do tipo 1:2 encontra-se na faixa de $220 - 300 \mu\text{S cm}^{-1}$, mas não foi conclusiva pelo fato de que pode ter mistura de espécies protonadas e desprotonadas (mesmo o meio não sendo prótico, isto pode ocorrer pela pequena quantidade de água que está no solvente acetonitrila).

Os complexos 2 e 3 apresentaram respectivamente, $230,68$ e $278,28 \mu\text{S cm}^{-1}$, ou seja, a proporção é de 1:2, os quais são justificados conforme a Figura 57, estes dados encontram-se de acordo com a literatura e com os dados de CHN (Geary, 1970).

Figura 57. Proposta de estrutura para os complexos 2 e 3.



Proporção = 1:2

4.2.5. Absorção atômica

Para quantificar os dois metais presentes nos complexos, ferro e zinco, foram realizadas análise por espectrometria de absorção atômica. O uso dessa técnica de quantificação permite verificar a proporção desses metais em uma solução dos complexos, com concentração conhecida.

O procedimento foi aplicado satisfatoriamente para as soluções dos complexos em acetona/água (10:90% - V/V). Foram obtidos os valores das porcentagens de Fe e Zn nos complexos, como pode ser observado na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de absorção atômica em mg mL^{-1} para os complexos 1 – 3.

	Fe (mg mL^{-1})	% Exp.	% Teo.	Zn (mg mL^{-1})	% Exp.	% Teo.
1	2,59±0,08	5,72	5,74	3,27±0,07	6,73	6,72
2	4,91±0,03	5,51	5,49	5,97±0,13	6,44	6,43
3	4,20±0,18	5,30	5,34	4,89±0,05	6,29	6,26

A partir desses resultados, foi possível observar que para as análises de ferro e zinco, o valor experimental é muito similar ao teórico, baseando na estrutura do CHN. Essa técnica se mostrou bastante útil para a determinação a proporção de Fe:Zn, sendo essa de 1:1 para todos os complexos, ou seja, resultado para um complexo binuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$.

4.2.6. Espectroscopia Eletrônica (UV-Vis)

Para os complexos formados pelos metais Fe^{III} e Zn^{II} foram observadas bandas na região de aproximadamente 500 nm, as quais são atribuídas à transferência de carga do tipo ligante \rightarrow metal (TCLM) dos orbitais $p\pi$ do fenolato para os orbitais $d\pi$ do íon Fe^{III} (Lanznaster *et al.*, 2002; Peralta *et al.*, 2010). Para o complexo 1 é observada uma banda em 362 nm, atribuída a uma transição a partir do orbital $p\pi$ do fenolato para o orbital $d\sigma^*$ do Fe^{III} (Piovezan *et al.*, 2010). Todos os complexos apresentam bandas entre 250 e 300 nm atribuídas às transições intraligantes dos anéis da piridina e fenólicos. As bandas correspondentes de transição $d-d$ para esses complexos não podem ser observadas pois são encobertas pela banda de transferência de carga do tipo ligante \rightarrow

metal (TCLM) entre 500 a 600 nm. Esses resultados estão de acordo com outros complexos da literatura (Peralta *et al.*, 2010; Piovezan *et al.*, 2010; Jarenmark *et al.*, 2011; De Souza *et al.*, 2013; Camargo, T. P. *et al.*, 2015). Em todos os casos obteve-se um deslocamento batocrômico, ou seja, houve um deslocamento da banda de absorção para mais baixa energia e comprimento de onda maior (deslocamento para a região do vermelho), seguindo a ordem dos solventes empregados: $\lambda_{\text{máx}}$ CH₃CN:H₂O(1:1) < CH₃CN < CH₂Cl₂.

Dados dos espectros eletrônicos para os complexos são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Dados de espectroscopia eletrônica para complexos **1 – 3**.

Complexo	$\lambda_{\text{máx}}$ nm (ϵ mol L ⁻¹ cm ⁻¹) CH ₃ CN	$\lambda_{\text{máx}}$ nm (ϵ mol L ⁻¹ cm ⁻¹) CH ₃ CN:H ₂ O(1:1)	$\lambda_{\text{máx}}$ nm (ϵ mol L ⁻¹ cm ⁻¹) CH ₂ Cl ₂
1	513 (1552) 362 (13903) 294 (15117) 256 (33905)	507 (1230) 362 (9387) 294 (11891) 258 (24390)	522 (3078)
2	501 (1619) 291 (25620) 258 (35888)	490 (1304) 291 (18715) 258 (25539)	505 (2834)
3	526 (1927) 287 (19773) 258 (25598)	513 (1663) 291 (16695) 259 (21513)	536 (2428)

Figura 58. Espectros eletrônicos do complexo 1 com concentração de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

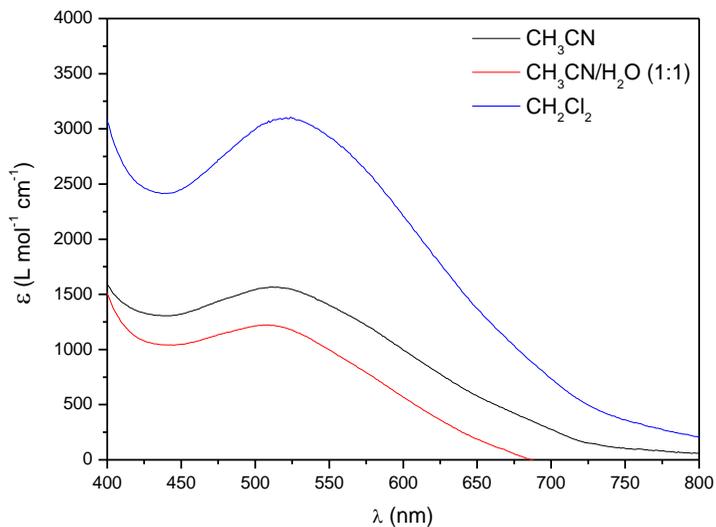


Figura 59. Espectros eletrônicos do complexo 2 com concentração de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

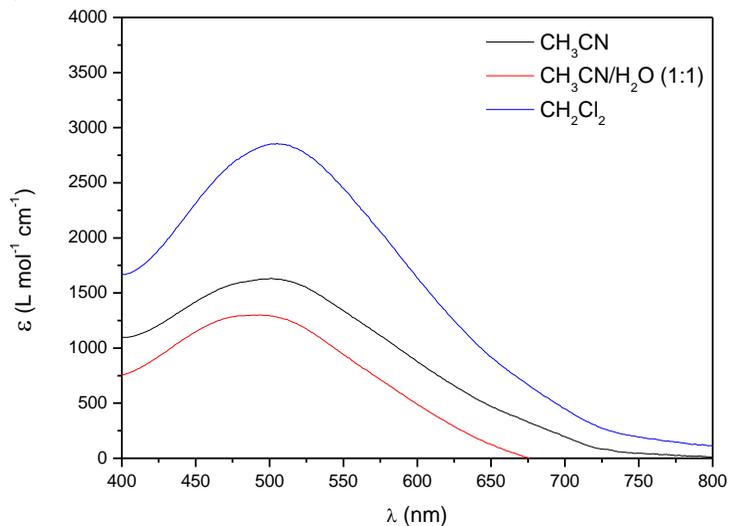


Figura 60. Espectros eletrônicos do complexo **3** com concentração de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

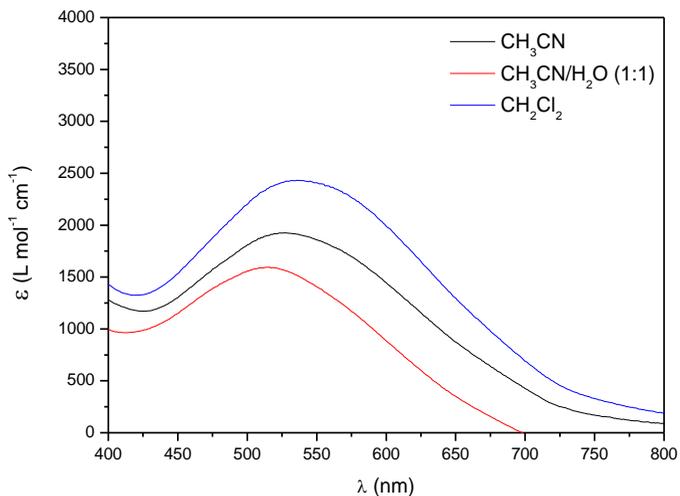


Figura 61. Espectro eletrônico do complexo **1** em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) com concentração de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

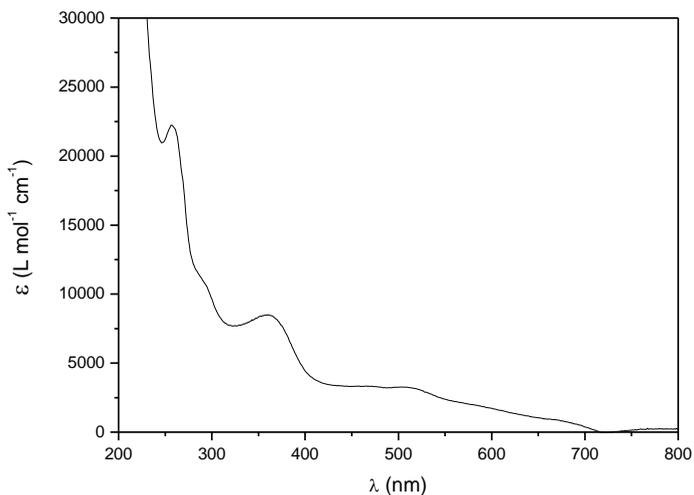


Figura 62. Espectro eletrônico do complexo **2** em CH₃CN/H₂O (1:1) com concentração de $3,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

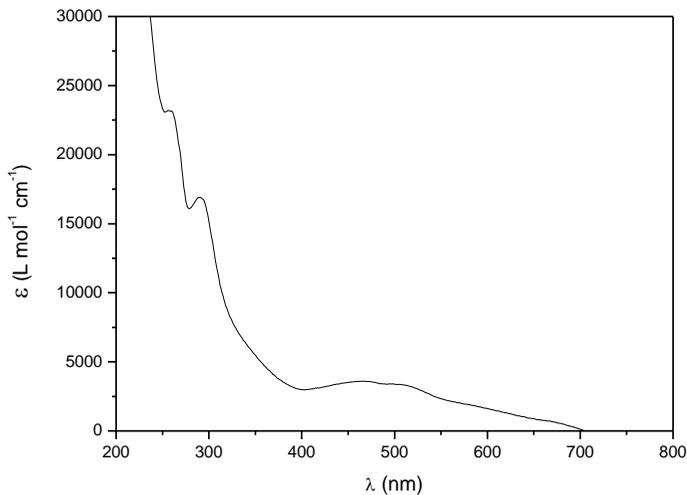
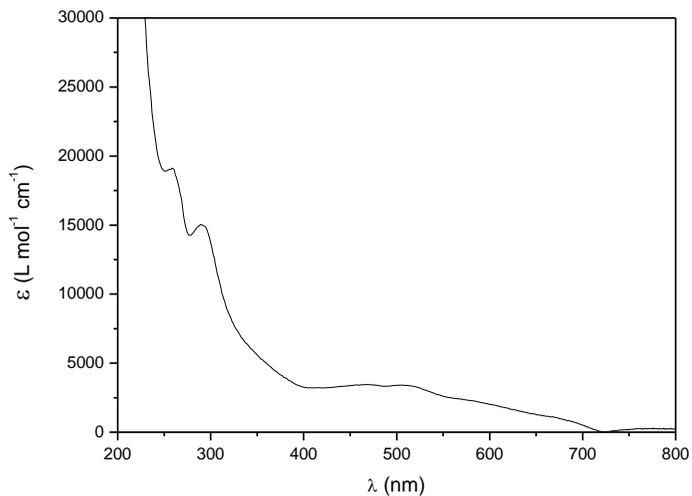


Figura 63. Espectro eletrônico do complexo **3** em CH₃CN/H₂O (1:1) com concentração de $3,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.



A fim de verificar a estabilidade dos complexos em solução e em estado sólido, foram realizadas análises de reflectância difusa para os complexos **1** (Figura 64), **2** (Figura 65) e **3** (Figura 66) e os espectros apresentam também a banda de transferência de carga em aproximadamente 500 nm, o que indica que os grupos fenolatos dos complexos estão coordenados independente do meio.

Figura 64. Espectro eletrônico do complexo **1** no estado sólido.

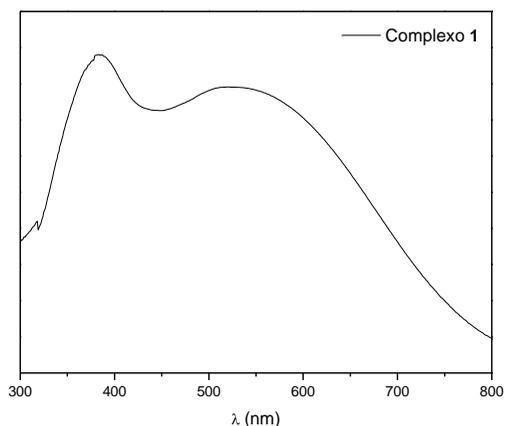


Figura 65. Espectro eletrônico do complexo **2** no estado sólido.

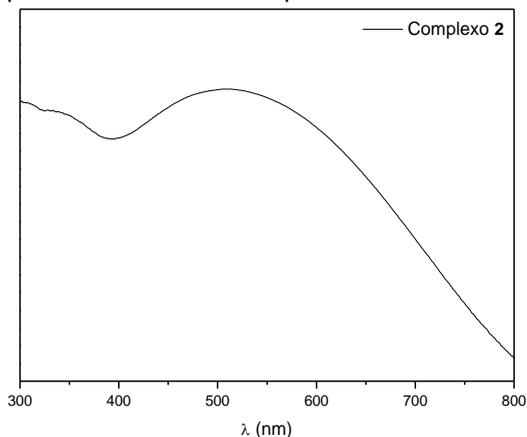
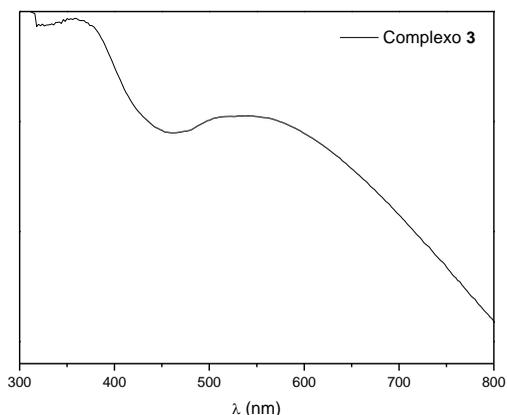


Figura 66. Espectros eletrônicos do complexo **3** no estado sólido.

4.2.7. Espectrometria de Massas com Ionização por Electro spray (ESI-MS e ESI-QTOF)

A espectrometria de massas via electro spray é uma técnica muito utilizada na caracterização de complexos, pois produz íons em estado gasoso direto da solução, trazendo informações qualitativas das espécies carregadas existentes da solução.

As análises de espectrometria de massas foram realizadas em acetonitrila/água – 1:1. Para os complexos **1**, **2** e **3**, os picos com m/z encontrados foram 809,21, 879,18 e 815,28, respectivamente. Esses valores podem ser atribuídos aos compostos $[\text{Fe}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}^2)]^{1+} + \text{CH}_3\text{CN} + \text{CH}_3\text{OH}$ (**1**), $[\text{Fe}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}^2\text{-et})]^{1+} + \text{Li}^+ + \text{ClO}_4^-$ (**2**) e $[\text{Fe}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}^2\text{-but})]^{1+} + \text{Li}^+ + \text{OH}^- + \text{H}_2\text{O}$ (**3**). O pico para o complexo **1** indica que o complexo possui acetonitrila e metanol, sem contra-íon.

Para todos os complexos pode ser visto que o centro de Fe^{III} foi reduzido para Fe^{II} . Nos complexos **2** e **3** observa-se a presença de íons Li^+ provindos do material de vidro utilizado na preparação da amostra ou da injeção da amostra (Hoffmann e Stroobant, 2007). Mesmo que os espectros de massas dos complexos mostram uma razão de massa-carga de uma unidade, as análises de condutividade indicam uma proporção molar de 2 para 1 de eletrólito, corroborando à formação de complexos e os valores estão de acordo com resultados anteriores.

Figura 67. Espectro de ESI-MS do complexo 1 em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) com a respectiva estrutura proposta. $m/z = 809,21$.

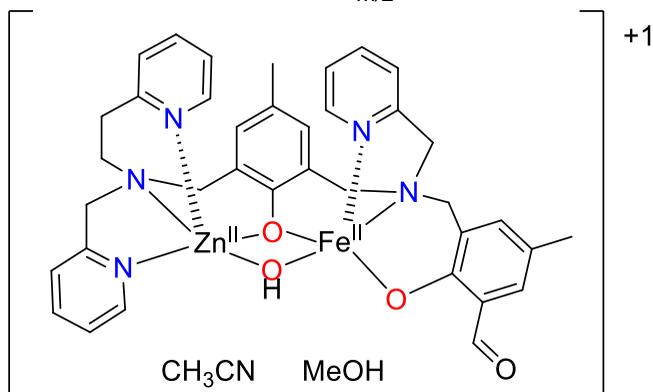
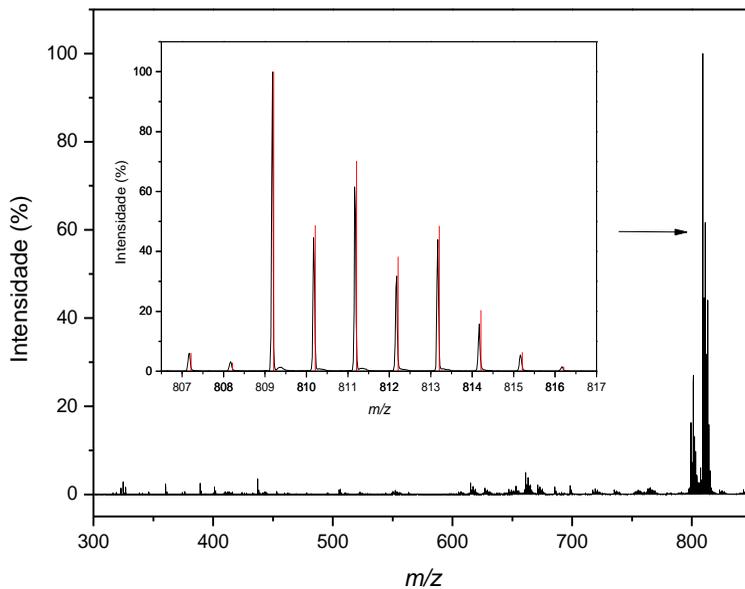


Figura 68. Espectro de ESI-QTOF do complexo **2** em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) com a respectiva estrutura proposta. $m/z = 879,18$.

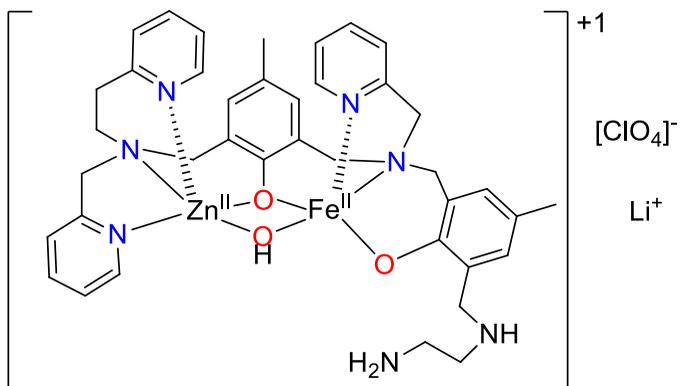
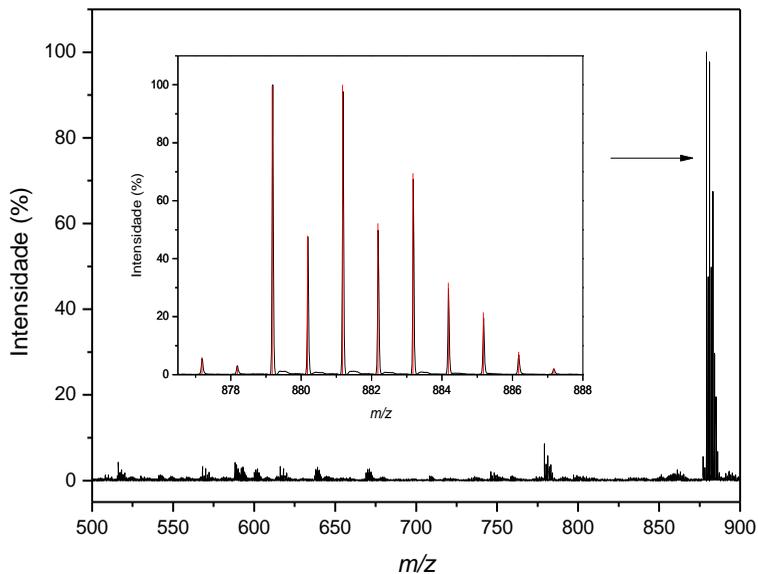
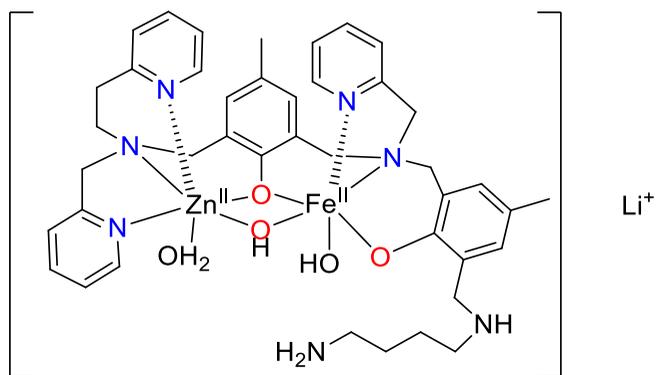
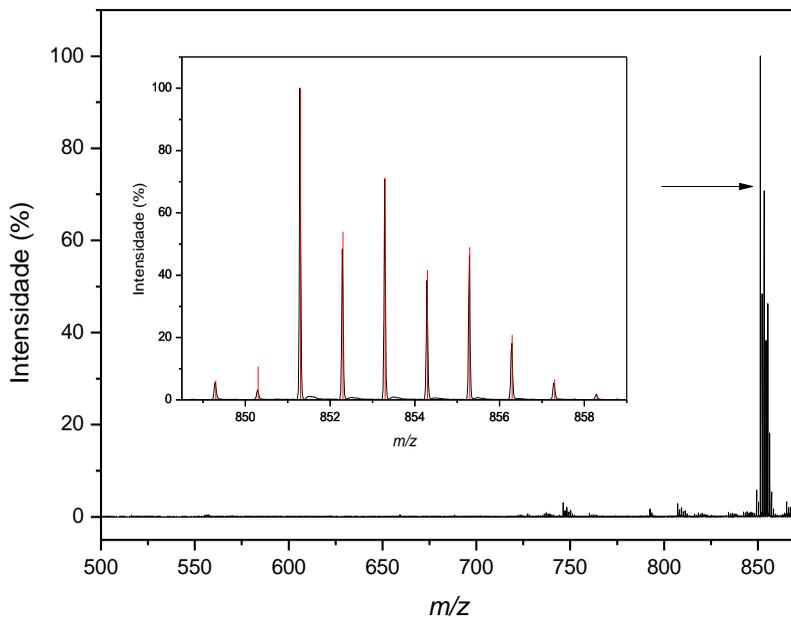


Figura 69. Espectro de ESI-QTOF do complexo **3** em CH₃CN/H₂O (1:1) com a respectiva estrutura proposta. $m/z = 815,28$.



4.2.8. Titulação Espectrofotométrica

Considerando os resultados espectroscópicos que fornecem informações sobre os ligantes e os seus centros metálicos, o equilíbrio químico dos complexos foram investigados, a fim de determinar as espécies presentes na solução. Observou-se que a banda de transferência de carga do fenolato para o Fe^{III} , tem seu $\lambda_{\text{máx}}$ fortemente dependente do pH da solução. Durante a análise, foram observados pontos isobésticos, indicando a presença de duas espécies em equilíbrio em cada faixa de pH estudada. Como já foi proposto anteriormente por outros autores (Lanznaster *et al.*, 2002; Neves *et al.*, 2007; Xavier *et al.*, 2009; Peralta *et al.*, 2010; Piovezan *et al.*, 2010), o primeiro pK_a é atribuído à formação de uma espécie com uma ponte do tipo $\mu\text{-OH}$ entre os centros metálicos, porém não foi possível observá-la pela titulação espectrofotométrica. O pK_{a1} corresponde a constante de desprotonação para a molécula de água coordenada com o centro de metal Fe^{III} e o pK_{a2} é atribuída à molécula de água coordenada com o centro de metal Zn^{II} (Tabela 16 e Figuras 70-72).

Tabela 16. Valores de pK_a s encontrados para os complexos 1 – 3 através da titulação espectrofotométrica.

	pK_{a1}	pK_{a2}
1	4,79±0,01	7,66±0,01
2	4,15±0,03	7,31±0,06
3	3,98±0,08	7,16±0,01

Figura 70. Titulação espectrofotométrica para o complexo 1. Faixa de pH: 4 – 8. Adição de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50) com $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl).

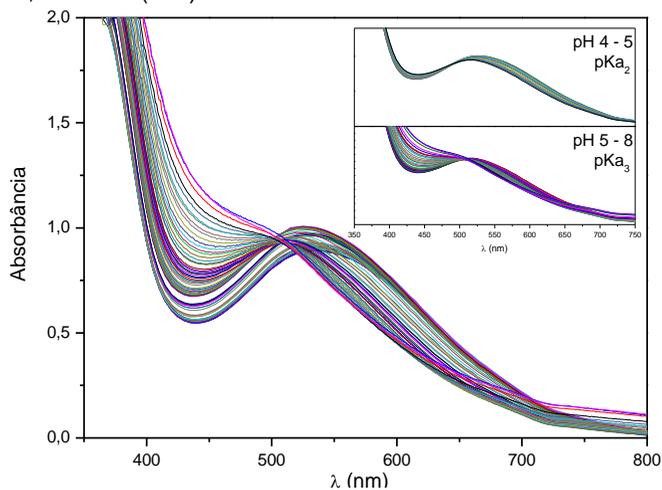


Figura 71. Titulação espectrofotométrica para o complexo 2. Faixa de pH: 4 – 8. Adição de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50) com $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl).

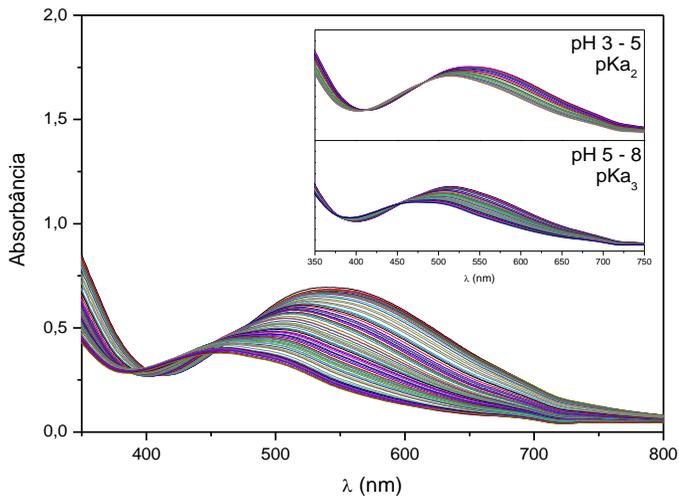
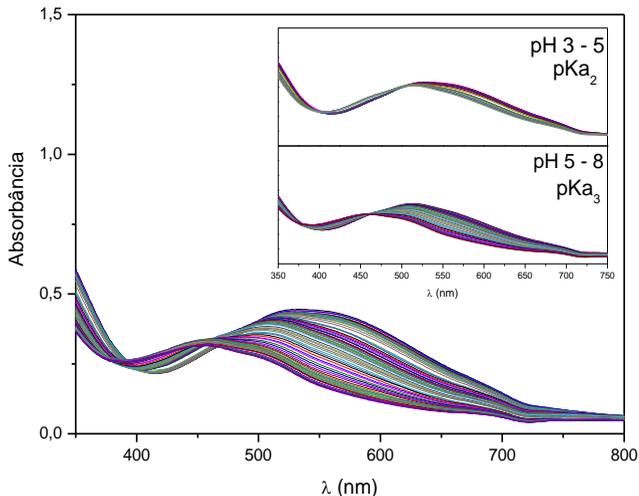


Figura 72. Titulação espectrofotométrica para o complexo **3**. Faixa de pH: 4 – 8. Adição de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50) com $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl).



Como esperado, os valores de pK_a encontrados para **1** são semelhantes aos relatados para o complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}^1)]$, devido à similaridade estrutural dos dois complexos. Por outro lado, os pK_{a1} e pK_{a2} para os complexos **2** e **3** são significativamente menores comparados ao complexo **1**. De acordo com os cálculos de DFT sugere que as estruturas das aminas protonadas levem a uma redução da energia quando comparada ao complexo com as aminas desprotonadas, sugerindo, por sua vez, fortes interações de hidrogênio entre os grupos amino terminais e o átomo de oxigênio μ -hidroxo ligado ao íon Fe^{III} (efeito da segunda esfera de coordenação).

4.2.9. Eletroquímica

As medidas eletroquímicas foram realizadas a pH 4 e 8 para todos os complexos. Todos os voltamogramas cíclicos mostram uma onda, que pode ser atribuída ao processo redox *quasi-reversível* $\text{Fe}^{\text{III}} + e^- \rightleftharpoons \text{Fe}^{\text{II}}$. Esses processos são altamente dependentes dos valores de pH, como pode ser visto na Tabela 17. Como esperado nessa faixa de potencial, os íons Zn^{II} não apresentam processos eletroquímicos.

Para o pH 4, a espécie predominante é $[(\text{H}_2\text{O})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)(\text{R})]^{2+}$ ($\text{R} = \text{L}^2, \text{L}^2\text{-et}, \text{L}^2\text{-but}$) enquanto a pH 8 ambas as moléculas de água coordenadas com os centros de metal Fe^{III} e Zn^{II} estão desprotonadas, prevalecendo a espécie $[(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH})(\text{R})]$ ($\text{R} = \text{L}^2, \text{L}^2\text{-et}, \text{L}^2\text{-but}$). Estes resultados estão de acordo com as espécies encontradas na titulação espectrofotométrica.

As variações na esfera de coordenação do centro Fe^{III} afetam o potencial redox devido a variações na densidade eletrônica. A protonação do grupo hidroxilo ligado ao centro de Fe^{III} diminui a densidade de elétrons no átomo de ferro e, portanto, causa uma mudança anódica no potencial redox, com estabilização do estado de oxidação de Fe^{II} , em comparação com as espécies desprotonadas.

O voltamograma de onda quadrada do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}^2)]$ (**1**) a pH 4,0 mostra um processo a +166 mV versus NHE, que é deslocado catodicamente para -325 mV quando o pH é aumentado para 8,0, indicando que, nesses valores de pH, diferentes espécies estão presentes em solução, conforme observado anteriormente a partir dos dados de titulação espectrofotométrica. Esse deslocamento é resultado do aumento da densidade de elétrons no centro de Fe^{III} , tornando mais difícil a redução. Um deslocamento catódico semelhante foi observado para o complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L-H})]$ relatado por Peralta (Peralta *et al.*, 2010) e mostrado na Tabela 17.

Tabela 17. Parâmetros de voltametria de onda quadrada para os complexos **1**, **2** e **3** em H₂O/CH₃CN (96:4, % v/v), [Complexo] = 1x10⁻⁴ mol L⁻¹. Eletrólito de suporte KCl 0,1 mol L⁻¹, célula eletrolítica contendo três eletrodos: um eletrodo de trabalho de carbono vítreo, um eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de referência comercial Ag/AgCl (Ag/AgCl vs. NHE = +197 mV (Inzelt *et al.*, 2012) e complexos da literatura para comparação. Potencial redox vs NHE.

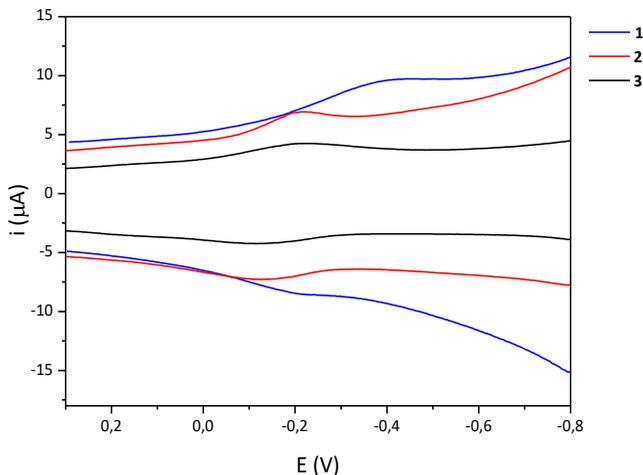
Complexos	E _{1/2} vs NHE	pH	E _{1/2} vs NHE	pH
1	+166 mV	4.0	-325 mV	8.0
2	+146 mV	4.0	-170 mV	8.0
3	+173 mV	4.0	-170 mV	8.0
[Fe ^{III} (μ-OH)Zn ^{II} (L-CH ₃)]	+57 mV	3.5	-197 mV	6.5
[Fe ^{III} (μ-OH)Zn ^{II} (L-H)]	+60 mV	3.5	-180 mV	6.5

Os complexos **2** e **3** mostram comportamento eletroquímico semelhante ao complexo **1** a pH 4, com valores de E_{1/2} +146 mV para o complexo **2** e +173 mV para o complexo **3**. Quando o pH é aumentado para 8,0, os complexos **2** e **3** têm o mesmo valor de E_{1/2} (-170 mV), que difere do complexo **1** cerca de 150 mV, sugerindo que as aminas protonadas facilitam o processo de redução. A remoção da densidade de elétrons do centro de Fe^{III} é mais forte para os complexos **2** e **3** do que para **1**. Isso ocorre porque as derivatizações dos complexos **2** e **3** mostram uma redução da energia devido à protonação do grupo lateral, sugerindo alguns tipo de interação entre a amina protonada e a molécula de água/hidroxo ou fenoxo terminais ligadas ao centro de Fe^{III}. Esta interação é provavelmente eletrostática e o efeito causa a remoção da densidade eletrônica do centro metálico, o que facilita a redução do metal.

Se compararmos os voltamogramas de onda quadrada de **1**, **2** e **3** (Figura 73), observamos que os complexos **2** e **3** mostram uma facilidade maior para a redução do centro de Fe^{III} quando comparado ao complexo **1**. A mudança nos valores de potencial mostra que a inserção de derivados de diamina terminal no ligante resulta em uma diminuição da densidade de carga do centro de

ferro e um deslocamento anódico do potencial redox, indicando a presença do efeito da segunda esfera de coordenação.

Figura 73. Voltamogramas de onda quadrada para os complexos **1** (azul), **2** (vermelho) e **3** (preto) em H₂O:CH₃CN (96:4 V/V%). Condições: *I* = NaCl 0,1 mol L⁻¹; Eletrodo de trabalho: carbono vítreo, eletrodo auxiliar: platina, referência: Ag/AgCl (Ag/AgCl vs NHE = +197 mV). [Complexo] = 1,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹.

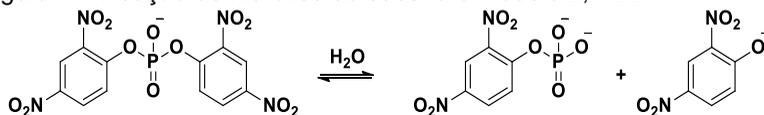


4.2.10. Estudos de Reatividade

4.2.10.1. Efeito do pH na hidrólise do 2,4-BDNPP

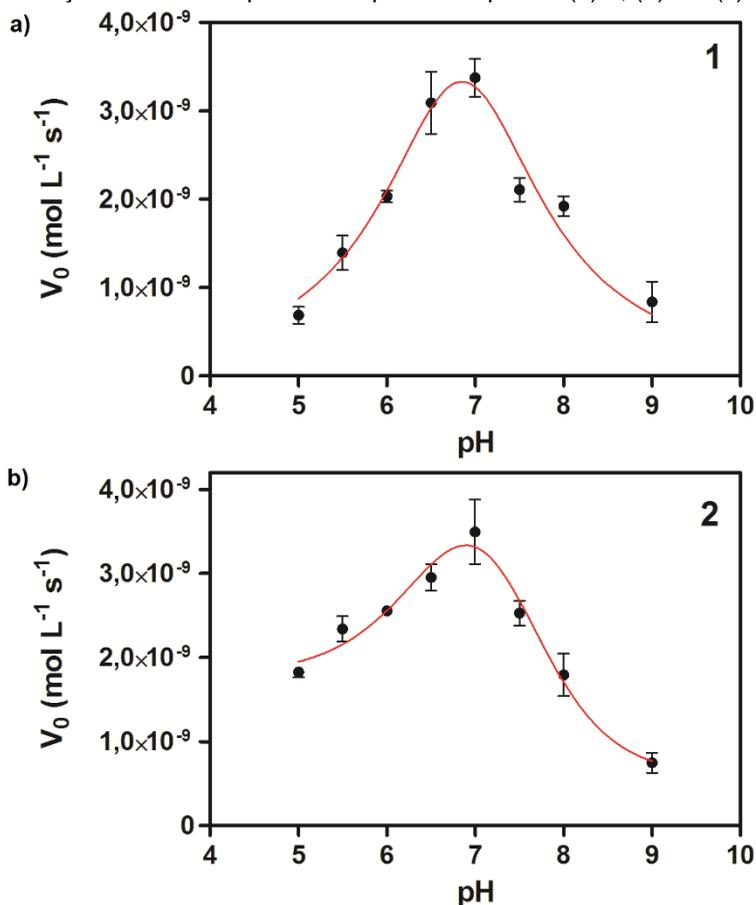
Estudos foram realizados utilizando o substrato fosfato de bis- (2,4-dinitrofenila) (2,4-BDNPP) como substrato modelo que possui ligações fosfodiéster, que simulam o grupo funcional fosfato de ácidos nucleicos (Bunton e Farber, 1969). A reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP é mostrada na Figura 74.

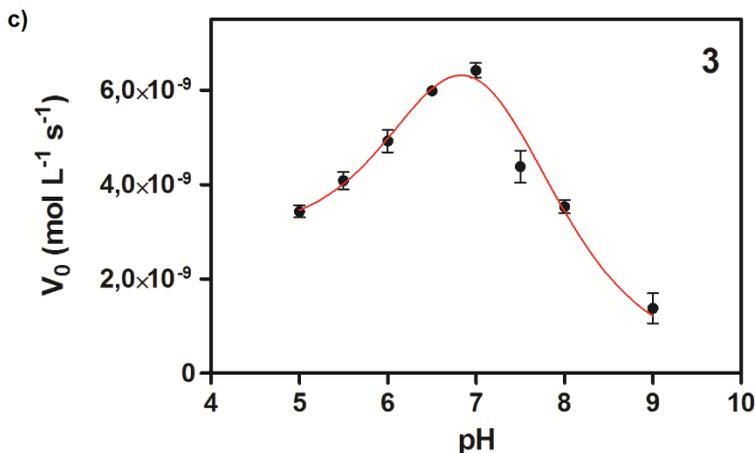
Figura 74. Reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP.



A fim de analisar o efeito do pH, medidas foram realizadas utilizando o substrato 2,4-BDNPP. O efeito do pH na atividade catalítica dos complexos foi avaliado de pH 5 a 9. Como pode ser visto na Figura 65, para todos os compostos, a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP mostrou uma forte dependência do pH, tendo um comportamento de sino e com atividade máxima em torno de pH 7,0 (Figura 75).

Figura 75. Dependência da velocidade inicial (V_0) nos valores de pH para a reação de hidrólise promovida pelos complexos (a) 1, (b) 2 e (c) 3.





Esse comportamento é semelhante aos resultados relatados anteriormente para outros complexos dinucleares de Fe^{III}Zn^{II} (Lanznaster *et al.*, 2002; Peralta *et al.*, 2010) e fosfatases ácidas púrpuras (PAP) isolada do feijão vermelho (kbPAP) (Beck, J. L. *et al.*, 1986).

Um bom ajuste para os perfis é conseguido aplicando uma aproximação gaussiana ($y = V_0 / (1 + ((x - \text{pH}) / \text{altura})^2)$) e os valores de pKas cinéticos obtidos a partir deste ajuste estão resumidos na Tabela 18. Os valores de pKa que foram determinados por espectroscopia UV-Vis e são inferiores aos valores de pKa cinéticos devido à ausência do substrato.

Tabela 18. Valores de pKas cinéticos e espectrofotométricos para os complexos.

Complexos	pKa cinético		pKa espectrofotométrico	
	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₁	pKa ₂
1	5,92±0,05	7,75±0,09	4,79±0,01	7,66±0,01
2	5,95±0,09	7,81±0,06	4,15±0,03	7,31±0,06
3	5,89±0,05	7,93±0,06	3,98±0,08	7,16±0,01

Conforme descrito anteriormente (seção 4.2.8) na discussão sobre a titulação espectrofotométrica, o primeiro valor de pKa cinético é atribuído à desprotonação da molécula de água coordenada ao Fe^{III}, que gera um nucleófilo de hidroxila

responsável pelo ataque ao átomo de fósforo. O segundo valor de pK_a cinético é atribuído à desprotonação da molécula de água ligada ao Zn^{II} .

Embora os valores de pH cinéticos sejam deslocados para valores maiores em relação aos pK_a s espectrofotométricos, porque o substrato 2,4-BDNPP impede a interação da amina protonada com H_2O/OH^- ligados, o comportamento mostrado na Figura 59 reforça a ideia de que $[(HO)Fe^{III}(\mu-OH)Zn^{II}(OH_2)(R)]^{2+}$ ($R = L^2, L^2\text{-et}, L^2\text{-but}$) é a espécie cataliticamente ativa. A velocidade inicial é dependente do pH e mostra um máximo, onde as espécies acima mencionadas estão em sua maior concentração e um comportamento semelhante para complexos relacionados tem sido relatado na literatura (Lanznaster *et al.*, 2002; Neves *et al.*, 2007; Peralta *et al.*, 2010; Piovezan *et al.*, 2010).

4.2.10.2. Efeito da Concentração do Substrato na hidrólise do 2,4-BDNPP

Foram realizados também testes do efeito da concentração do substrato na hidrólise do mesmo, para os complexos no pH 7 (atividade máxima). Observou-se que a dependência da velocidade de reação com a concentração de substrato apresentou um perfil de saturação e os dados foram tratados com a equação não linear de Michaelis-Menten, obtendo-se assim, os fatores cinéticos para cada complexo, encontram-se na Tabela 19 e na Figura 76.

Figura 76. Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP com a concentração do substrato para os complexos 1 – 3. Condições: pH = 7, [tampão HEPES] = 0,1 mol L⁻¹, I = 0,1 mol L⁻¹ (LiClO₄).

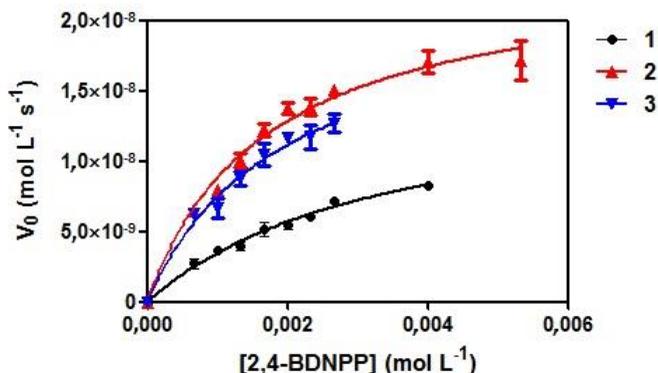


Tabela 19. Parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelos complexos 1 – 3 em pH 7,0, a 25°C.

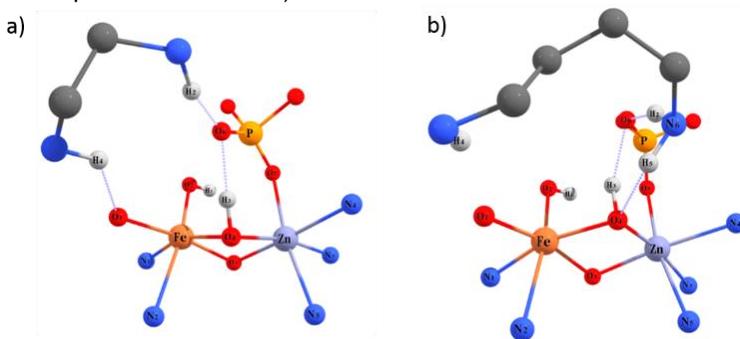
Complexos	k_{cat} (s ⁻¹) (x 10 ⁻⁵)	K_M (M) (x 10 ⁻⁴)	K_{assoc} (M ⁻¹) (x 10 ²)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	pH
1	32,1±3,31	34,0±5,70	2,94	0,09	7,0
2	112±5,56	16,1±1,91	6,21	0,69	7,0
3	111±1,14	20,5±4,36	4,87	0,54	7,0
(L ¹) (Piovezan <i>et al.</i> , 2010)	90,2	35,5	2,81	0,25	7,0
(L-CH ₃) (Peralta <i>et al.</i> , 2010)	92,0	30,5	3,27	0,30	6,5
(L-H) (Peralta <i>et al.</i> , 2010)	91,3	42,0	2,38	0,20	7,0

Como pode ser observado pelos dados na Tabela 19, a derivatização do ligante H₂L² através da adição de diaminas (complexos 2 e 3) levou a um aumento no valor de k_{cat} e uma diminuição de K_M quando comparado com o complexo 1. As mudanças no K_M mostram que o efeito das cadeias laterais derivatizadas que possuem uma amina livre como modelo de

segunda esfera de coordenação aumenta a afinidade do complexo (maior K_{assoc}) para o substrato. Ao comparar os modelos com os que têm apenas a primeira esfera de coordenação, esse comportamento é explicado levando em consideração as interações eletrostáticas decorrentes da protonação das aminas primárias na faixa de pH estudada, o que induz uma maior proximidade ao substrato (Smith *et al.*, 2012).

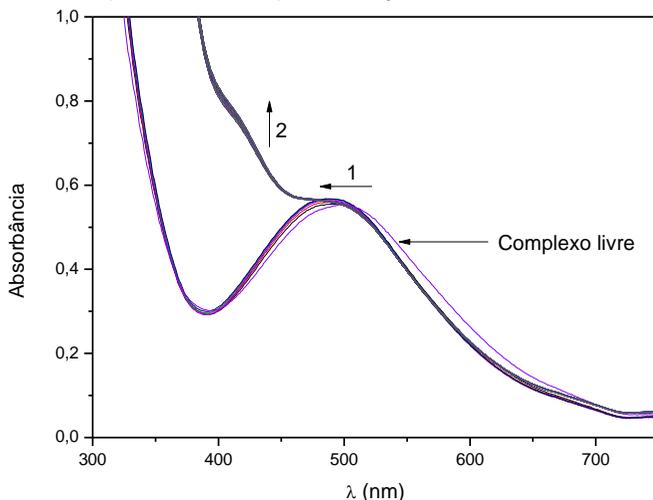
Os complexos **2** e **3** também têm melhor eficiência catalítica do que os complexos relatados por Peralta (Peralta *et al.*, 2010). Ao comparar os complexos **2** e **3**, os dados mostram um aumento no valor do K_M , mas os valores de k_{cat}/K_M diminuem com o aumento do comprimento da cadeia lateral. Esta tendência está de acordo com as distâncias calculadas dos conjugados **2b** e **3b**, que mostram maior proximidade da cadeia lateral e da subunidade de fosfato como mostra a Figura 77.

Figura 77. Representação dos mínimos de energia calculados para a interação entre conjugados **2b** e **3b** e o substrato (grande parte do ligante é omitida para maior clareza).



Para avaliar a atividade da monoesterase, se um ou dois grupos 2,4-dinitrofenolato do substrato foram hidrolisados, realizou-se uma reação estequiométrica entre os complexos **1** – **3** e o substrato 2,4-BDNPP (complexo/substrato 1:1), durante um período de 24 h a 25 °C. Os complexos conseguiram hidrolisar apenas um grupo fenolato, atuando apenas como diasterease. Para confirmar esse resultado, a atividade na presença de um substrato monoéster, o fosfato de 2,4-dinitrofenila (2,4-DNPP), também foi avaliada (Figura 78) e nenhum dos complexos foi capaz de hidrolisar esse substrato, confirmando que os complexos atuam apenas como diesterases.

Figura 78. (1) Mudança espectral observada devido à adição consecutiva de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 equivalentes do monoéster DNPP ao complexo **2**, pH 7,0, concentração de complexo = 3×10^{-4} mol L⁻¹, em CH₃CN:H₂O (50:50%) tampão HEPES. (2) Adição de 4 equivalentes do diéster BDNPP após 7 h de tempo de reação com DNPP.



Analogamente, o número de ciclos catalíticos para a hidrólise do 2,4-BDNPP foi realizado e para todos os complexos (**1** – **3**) verificou-se que catalisam a hidrólise de aproximadamente 5 moléculas de substrato, após um período de 24 horas, a pH 7,0 e 25 °C.

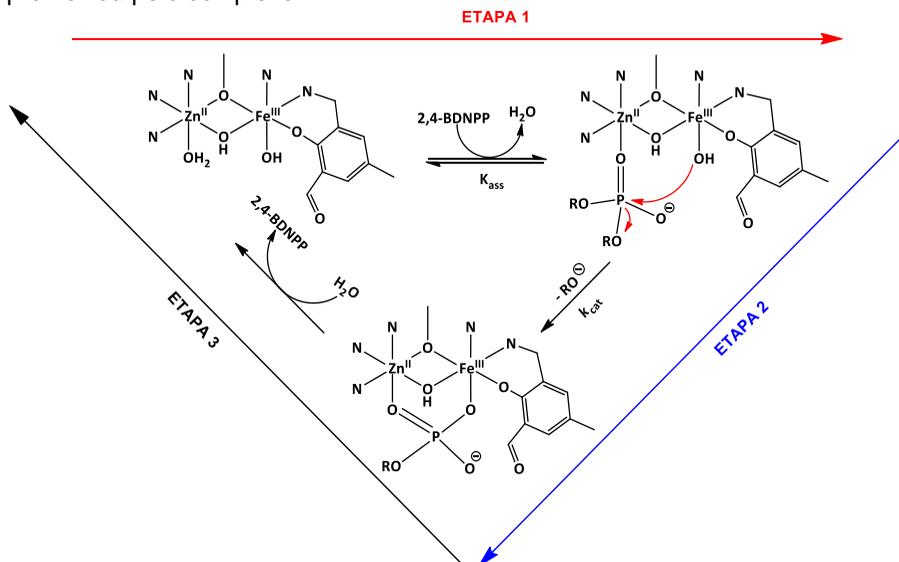
Finalmente para avaliar se a etapa determinante da reação envolve transferência de próton ou não, realizou-se experimento de efeito isotópico de deutério sobre a velocidade de hidrólise do 2,4-BDNPP pelos complexos em pH = 7. A razão entre as constantes de velocidades de duas reações de hidrólise do 2,4-BDNPP, sob as mesmas condições foram realizadas em H₂O e D₂O (k_H/k_D), os valores encontrados para essa razão k_H/k_D para os complexos **1**, **2** e **3** foram 1,48, 1,16 e 1,19 respectivamente. Isto sugere que não há transferência de prótons na etapa determinante da reação ($0,80 < k_H/k_D < 1,50$) (Deal *et al.*, 1996). Considerando todos os resultados experimentais, propõe-se um ataque nucleofílico intramolecular na hidrólise do 2,4-BDNPP promovido pelos complexos **1** - **3**.

4.2.10.3. Proposta mecânica para a Hidrólise do 2,4-BDNPP

Com base nos resultados anteriores, o mecanismo para a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP pelos complexos sintetizados pode ser descrito de forma análoga ao mecanismo proposto na literatura (Peralta *et al.*, 2010), onde a espécie catalítica $[(HO)Fe^{III}(\mu-OH)Zn^{II}(OH_2)]$ é responsável pela hidrólise do substrato. A Figura 79 mostra o mecanismo de três etapas. Na primeira etapa para o complexo **1**, o substrato desloca a molécula de água coordenada com o íon Zn^{II} .

Na segunda etapa, o íon hidróxido atua então como um nucleófilo atacando o átomo de fósforo do substrato, ocorrendo a clivagem da ligação fosfodiéster e liberando 2,4-dinitrofenolato. Após a clivagem, o substrato 2,4-DNPP permanece ligado ao Zn^{II} e a subsequente clivagem só pode ser vista com a adição de excesso de substrato, como mostra a etapa 3.

Figura 79. Mecanismo proposto para a hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo **1**.

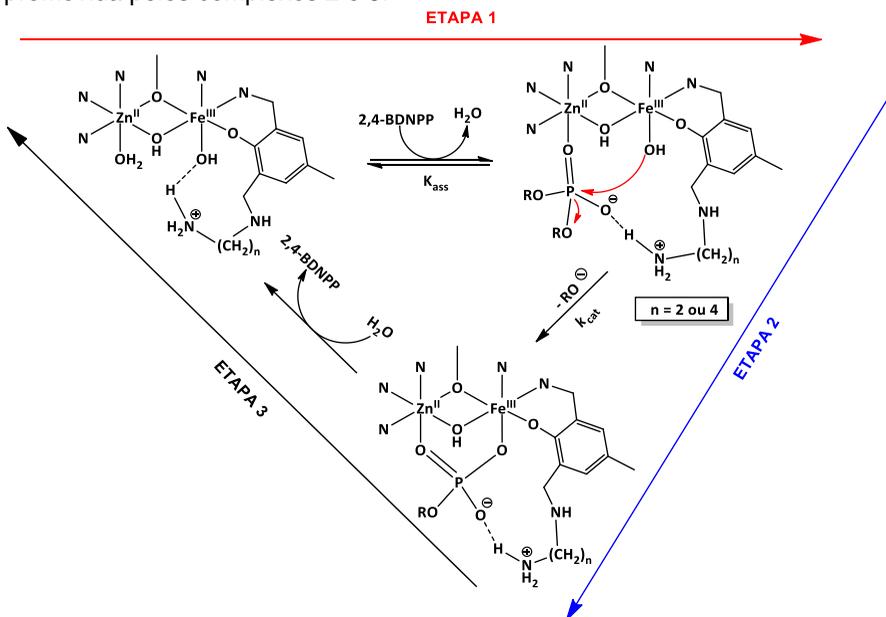


O mecanismo proposto para os complexos **2** e **3** é mostrado na Figura 80. A primeira etapa consiste na ligação do

substrato em um modo de coordenação monodentado ao centro de metal Zn^{II} , deslocando a água, de forma semelhante ao complexo **1**. Para os complexos **2** e **3**, a pH 7,0, a derivatização com diaminas está protonada e a proximidade do nucleófilo com o fosfato aumenta a afinidade entre o substrato e os complexos, explicando a maior eficiência catalítica (k_{cat}/K_M).

Posteriormente na segunda etapa, o íon hidróxido gerado no centro de Fe^{III} atua como um nucleófilo, atacando o átomo de fósforo do substrato, levando à clivagem da ligação fosfodiéster e ao conseqüente deslocamento do 2,4-dinitrofenolato. O monoéster de fosfato de 2,4-dinitrofenila é coordenado em um modo bidentado para os dois centros de metal e é então deslocado pelo excesso de água e substrato na reação, regenerando o complexo biomimético, como mostra a etapa 3. A diferença entre o mecanismo proposto para **1** em comparação com **2** e **3** indica uma ligação mais forte do substrato aos últimos complexos, pois encontram-se protonados nesse pH, demonstrando os efeitos da segunda esfera de coordenação.

Figura 80. Mecanismo proposto para a hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelos complexos **2** e **3**.



4.2.11. Clivagem de DNA Plasmidial

4.2.11.1. Efeito da Concentração dos Complexos

A atividade dos complexos binucleares de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ frente à clivagem de DNA plasmidial foi inicialmente verificada em termos de concentração, de 0 a $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ dos complexos em diferentes períodos de reação e temperatura: 6 horas a 37°C e 16 horas a 50°C . Nestas condições todos os complexos mostraram-se capazes de completamente clivar o DNA plasmidial utilizado (dados não mostrados), porém nas concentrações mais altas houveram precipitações das amostras nos poços dos géis, o que pode contribuir diminuindo a atividade. Considerando uma boa atividade foi possível utilizar menores concentrações de complexo e o tempo reacional foi reduzido de 16 para 4 horas a fim de se observar mais detalhadamente o efeito dos complexos (e a variação de sua concentração) no DNA, sendo investigada de 0 a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Estes resultados são mostrados nas Figuras 81 - 83.

Figura 81. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 1 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng , $\sim 25 \mu\text{M}$; [tampão] = HEPES (10 mM , $\text{pH } 7,0$); [complexo] = 1 a $10 \mu\text{M}$; temperatura = 50°C ; tempo = 4 horas ao abrigo de luz.

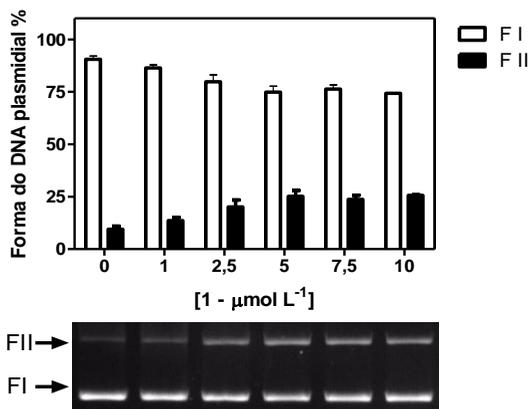


Figura 82. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 2 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng , ~ 25

μM ; [tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 1 a 10 μM ;
temperatura = 50 °C; tempo = 4 horas ao abrigo de luz.

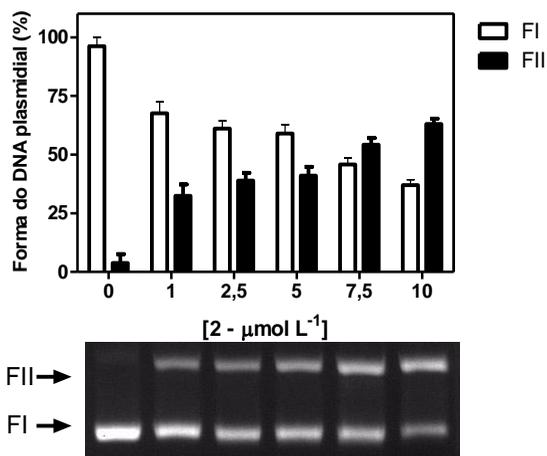
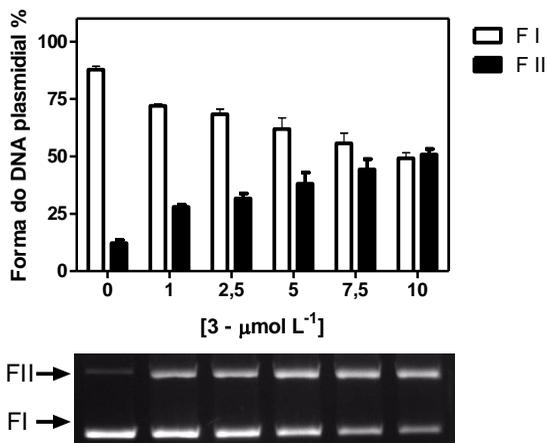


Figura 83. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 3 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μM ; [tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 1 a 10 μM ;
temperatura = 50 °C; tempo = 4 horas ao abrigo de luz.



Todos os complexos foram capazes de clivar o DNA de modo que o aumento da atividade depende da concentração do complexo, aumentando gradativamente de 0 a 10 μM , ou seja, à medida que a concentração do complexo aumenta no meio reacional aumenta também sua capacidade de clivagem de DNA.

O complexo **1** mostrou a menor capacidade de clivagem de DNA (Figura 71), pois o DNA tratado com 1 μM do complexo **1** mostrou aparecimento de ~14 % de F II, indicando que a forma superenovelada do DNA plasmidial (F I) foi clivada por quebras-simples para a forma circular aberta (F II). O aumento progressivo na concentração de complexo **1** aumentou a clivagem de DNA atingindo ~26 % de F II com 10 μM . Esses dados foram corrigidos a partir dos controles que continham acetona no lugar do complexo, os quais apresentaram auto-clivagem variando entre aproximadamente 5 a 10 % (referente ao 0 μM nos gráficos).

Os outros dois complexos **2** e **3**, em comparação com **1** foram mais ativos, em 10 μM , aproximadamente 63% (**2**) e 50% (**3**) de DNA apresentava-se em F II (Figuras 82 e 83), sugerindo que o complexo **2** possui maior clivagem frente ao DNA, seguindo essa série: **2**>**3**>**1**. Em comparação com os complexos reportados por Peralta (Peralta *et al.*, 2010), os valores mostraram-se melhores, e percebe-se que as modificações feitas no grupo carbonil lateral aumentam significativamente a clivagem frente ao DNA, devido ao efeito da segunda esfera de coordenação. A maior clivagem observada para os complexos **2** e **3** em comparação com **1** pode ser atribuída à presença do grupo amino na derivatização destes dois complexos, indicando que as modificações da segunda esfera nos complexos **2** e **3** levam a aproximadamente o dobro da clivagem de DNA em relação ao complexo **1**. A protonação da amina terminal em solução dá um caráter mais catiônico ao complexo, levando a maior atração eletrostática entre o complexo e o DNA, o qual, em solução, é carregado negativamente.

Ao comparar os complexos **2** e **3**, o complexo **2** tem uma atividade maior do que o complexo **3**, o que pode ser explicado pelo grupo amino terminal sendo geometricamente e espacialmente mais próximo do DNA em comparação com o complexo **3**. O mesmo efeito foi observado para o complexo **2** na clivagem do substrato de 4-BDNPP (ver Figura 77).

4.2.11.2. *Efeito do pH*

Para complexos em que o mecanismo hidrolítico é predominante, o pH do meio reacional se torna importante, pois podem influenciar na desprotonação das moléculas de água ligadas aos metais, dificultando a formação do nucleófilo (Mash *et al.*, 2003; Camargo *et al.*, 2010b; Camargo *et al.*, 2010d; Osorio *et al.*, 2012). Para os complexos **1 – 3** foi encontrado através de ensaios variando o pH de 5,5 a 9,0, como pH ótimo reacional em aproximadamente 7,0.

4.2.12. *Análise dos modos de interação*

4.2.12.1. *Efeito da força iônica*

As interações eletrostáticas entre o DNA e os catalisadores são uma das interações mais importantes nos sistemas de pequenas moléculas, uma vez que essas forças podem estabilizar o sistema e aumentar sua atividade (Domingos, 2003; Blackburn, 2006).

No DNA, os grupos fosfatos em pH 7,0 estão carregados negativamente e dessa maneira conferem à macromolécula uma carga negativa. Já os complexos metálicos podem agir como catiônicos em solução e dessa maneira através de forças eletrostáticas contribuem para a ligação e clivagem do DNA por esses complexos (Domingos, 2003). Deste modo, para confirmar se a interação destas moléculas com o DNA se dava através de interações eletrostáticas, por diferença de carga, foi adicionado na reação o NaCl.

Para verificar este efeito, realizaram-se ensaios com aumento da força iônica no meio reacional, visando neutralizar as cargas negativas do DNA e reduzir as interações eletrostáticas (Figuras 84 – 86). Os testes foram realizados em uma concentração fixa de complexo, na qual o complexo possui uma boa atividade de clivagem e evitando assim a possível precipitação.

Figura 84. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 1 em função de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$; [tampão] = HEPES (10 mmol L⁻¹, pH 7,0); [complexo] = 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [NaCl] = 5 – 50 mmol L⁻¹; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.

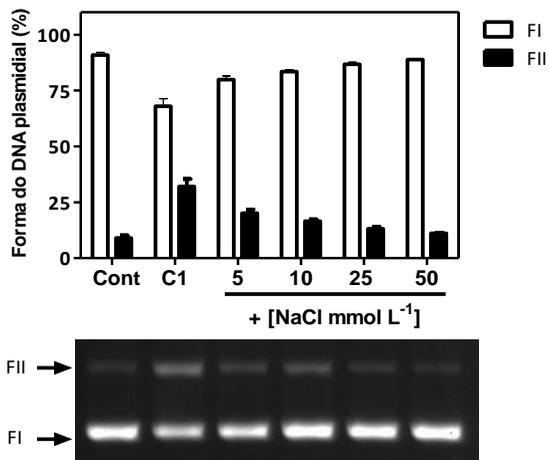


Figura 85. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **2** em função de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 7,0); [complexo] = 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [NaCl] = 5 – 50 mmol L^{-1} ; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.

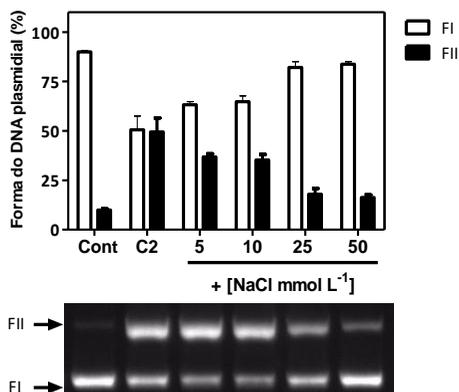
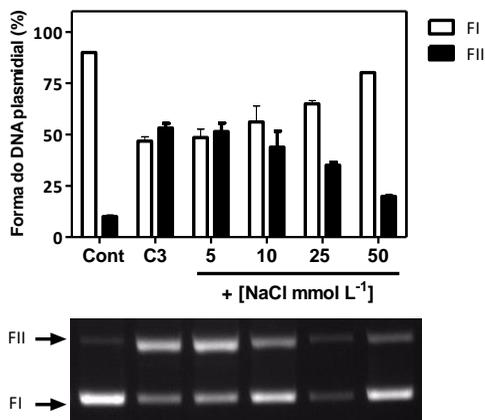


Figura 86. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **3** em função de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 7,0); [complexo] = 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [NaCl] = 5 – 50 mmol L^{-1} ; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.



Observa-se que, ao aumentar a concentração de NaCl (de 5 a 50 mM), a atividade de clivagem do DNA para os três complexos diminuiu gradualmente. A atividade de clivagem do complexo **1** foi inibida em aproximadamente 19%. Para os complexos **2** e **3**, os valores de inibição foram de 35% e 30%, respectivamente. Isso sugere que é estabelecida, em maiores concentrações de Na⁺, a competição entre os complexos e os íons para interagir com o esqueleto aniônico do DNA. Também os íons de sódio tendem a estabilizar uma conformação de DNA, reduzindo a repulsão dos grupos com carga negativa (Hagerman, 1988).

Pode-se também considerar que os íons Cl⁻ podem se coordenar aos centros metálicos dos complexos, pois existe um excesso de sal, levando a mudanças em suas atividades. Por conseguinte, os ensaios foram conduzidos na presença de LiClO₄ (Figuras 87 – 89), uma vez que os íons ClO₄⁻ se associam mais fracamente ao centro metálico em comparação com o ânion cloreto. Os mesmos resultados foram obtidos na comparação dos resultados de inibição na presença destes dois sais (NaCl ou LiClO₄), sugerindo que a inibição da clivagem foi devida à carga de neutralização em vez da interação entre os íons Cl⁻ e o centro metálico, resultados semelhantes foram encontrados na literatura (Muxel *et al.*, 2014; Camargo, Tiago P. *et al.*, 2015; Auras *et al.*, 2016).

Figura 87. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 1 em função de diferentes concentrações de LiClO_4 . Condições reacionais: $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng}$, $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{tampão}] = \text{HEPES}$ (10 mmol L^{-1} , $\text{pH } 7,0$); $[\text{complexo}] = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{LiClO}_4] = 5 - 50 \text{ mmol L}^{-1}$; temperatura = $50 \text{ }^\circ\text{C}$; tempo = 4 h ao abrigo de luz.

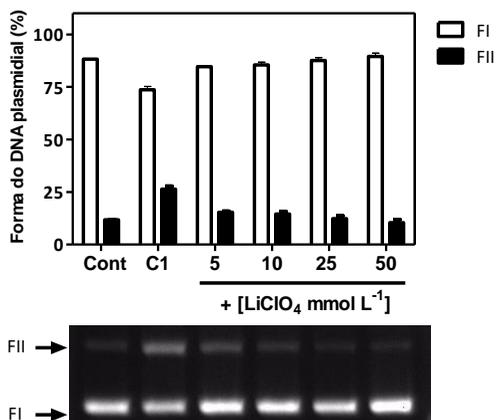


Figura 88. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 2 em função de diferentes concentrações de LiClO_4 . Condições reacionais: $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng}$, $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{tampão}] = \text{HEPES}$ (10 mmol L^{-1} , $\text{pH } 7,0$); $[\text{complexo}] = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{LiClO}_4] = 5 - 50 \text{ mmol L}^{-1}$; temperatura = $50 \text{ }^\circ\text{C}$; tempo = 4 h ao abrigo de luz.

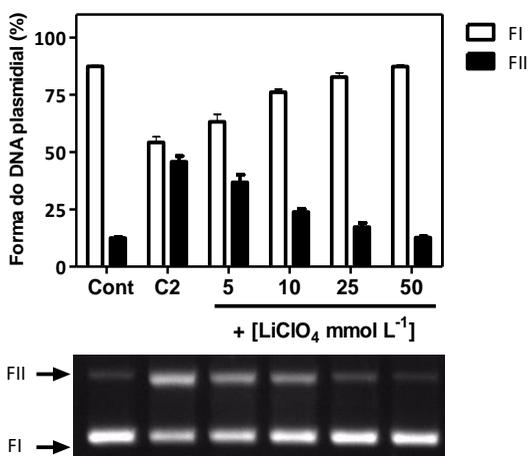
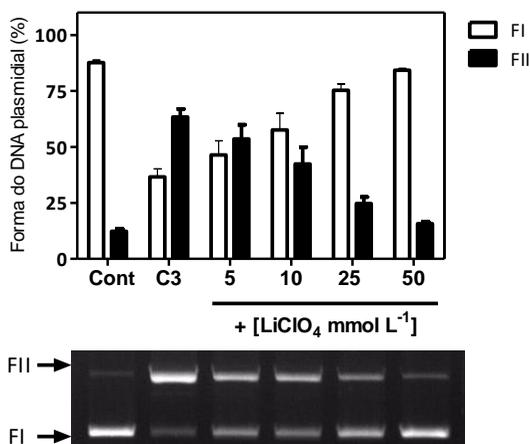


Figura 89. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **3** em função de diferentes concentrações de LiClO_4 . Condições reacionais: $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng}$, $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{tampão}] = \text{HEPES}$ (10 mmol L^{-1} , $\text{pH } 7,0$); $[\text{complexo}] = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{LiClO}_4] = 5 - 50 \text{ mmol L}^{-1}$; temperatura = $50 \text{ }^\circ\text{C}$; tempo = 4 h ao abrigo de luz.



4.2.12.2. Efeitos dos ligantes de sulco

O reconhecimento molecular de um biomimético pelo DNA depende do arranjo espacial dos grupamentos funcionais e suas propriedades estruturais, que devem ser fundamentais para a melhoria de fármacos (Morávek *et al.*, 2002; Terenzi *et al.*, 2016).

A ligação dessas pequenas moléculas por sulcos do DNA é um modo de associação intramolecular reversível caracterizado pela topografia e características químicas da molécula ligante (Kim e Nordén, 1993; Asatkar *et al.*, 2017). Os sulcos maiores e menores têm diferenças significativas de tamanho, forma, hidratação, potencial eletrostático e posição de sítios para pontes de hidrogênio (Oguey *et al.*, 2010). A associação por um sulco ou outro pode depender de diversas circunstâncias, por exemplo, a ligação ao sulco maior do DNA é um processo entálpico, enquanto a interação ao sulco menor é um processo favorecido por efeitos entrópicos (Breslauer *et al.*, 1987; Pages *et al.*, 2015).

Deste modo procurou-se determinar se a interação entre os complexos em estudo e o DNA se dava através do acesso de pelo menos um dos sulcos menor/maior do DNA. Para tal foram

realizados ensaios na presença de ligantes conhecidos de ambos os sulcos, sendo estes a netropsina que se liga no sulco menor (Van Dyke *et al.*, 1982) e o verde de metila ligante do sulco maior (Kim e Nordén, 1993).

Para garantir que houve interação desses bloqueadores com os sulcos do DNA, deixou-se por 30 minutos em repouso ao abrigo da luz. Após esse tempo, os complexos foram adicionados e os dados são apresentados nas Figuras 90 - 92.

Figura 90. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **1**, na presença dos diferentes ligantes de sulcos do DNA, netropsina (NET) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$; [tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 7,0); [complexo] = $5 \mu\text{mol L}^{-1}$; [NET] ou [VM] = $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; temperatura = $50 \text{ }^\circ\text{C}$; tempo = 4 h ao abrigo de luz.

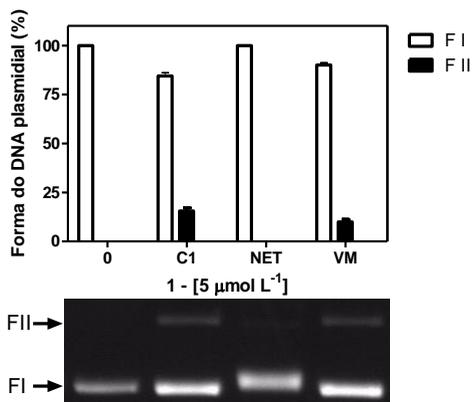


Figura 91. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **2**, na presença dos diferentes ligantes de sulcos do DNA, netropsina (NET) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [NET] ou [VM] = 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.

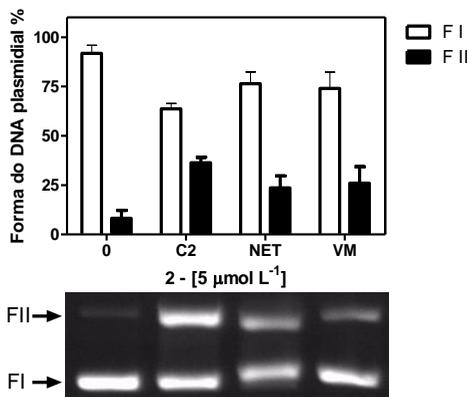
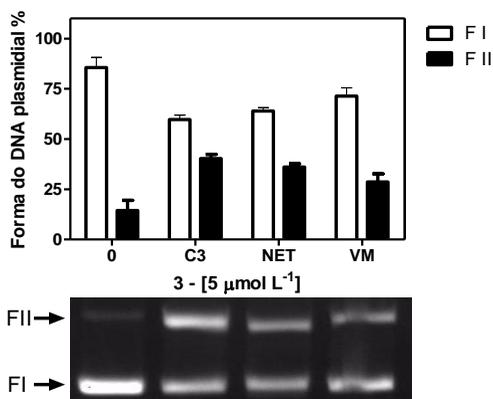
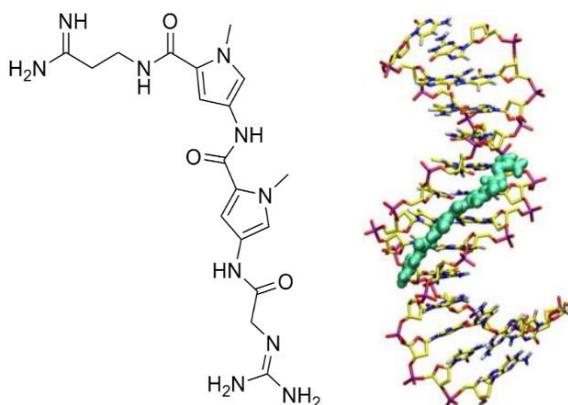


Figura 92. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **3**, na presença dos diferentes ligantes de sulcos do DNA, netropsina (NET) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 7,0); [complexo] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [NET] ou [VM] = 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.



O complexo **1** mostrou uma preferência pelo sulco menor do DNA (Figura 93), pois os resultados contendo netropsina como bloqueador de sulco não apresentou clivagem, porém a atividade frente ao bloqueador de sulco maior diminuiu de 15 para 9 % de F II, o que também pode ser um indicio de que ele tem a capacidade de inibir parcialmente a clivagem do DNA pelo complexo **1** (Camargo *et al.*, 2010; Peralta, *et al.*, 2010).

Figura 93. Representação estrutural da netropsina (esquerda) e estrutura cristalográfica de um DNA de dupla-hélice com uma molécula de ligada ao sulco menor (direita) (Bortolotto, T., 2006).



Já para os complexos **2** e **3** os resultados mostram que os dois bloqueadores de sulcos têm a capacidade de diminuir a clivagem dos mesmos frente ao DNA e não apresentam necessariamente uma especificidade por um dos sulcos, porém necessitam da interação com um desses sulcos para que a clivagem ocorra.

Na forma B-DNA os sulcos diferem-se em maior e menor, dependendo da largura da molécula, o que pode impossibilitar seu acesso. No caso de pequenas moléculas, há um número maior de exemplos de ligantes ao sulco menor, a ligação de pequenas moléculas ao sulco maior é menos observada (Blackburn *et al.*, 2006). A diferença entre a preferência do complexo **1** em relação aos complexos **2** e **3**, pode ser devido ao tamanho e o volume das estruturas dos complexos, pois a forma de interação da diamina com a cavidade onde encontram-se os centros metálicos é

diferente do que para o complexo **1** que possui aldeído e isso afasta a metila do fenolato terminal.

4.2.12.3. *Dicroísmo Circular*

O dicroísmo circular (CD) é um fenômeno originado a partir da interação de moléculas quirais com raios eletromagnéticos circularmente polarizados (Nakanishi, 1999). O espectro de absorção do DNA é analisado comumente em luz ultravioleta em um intervalo entre 180-300 nm, faixa onde as bases de DNA absorvem luz, esta absorção da luz circularmente polarizada para direita e esquerda pelo DNA difere, e esta diferença é chamada de CD (Johnson, 1996).

O DNA em sua forma B (B-DNA) possui bandas características de CD, sendo uma banda positiva em 275 nm resultante da helicidade direita deste DNA, e uma banda negativa em 245 nm devido ao empilhamento de bases (Nakanishi, 1999). Portanto este método foi utilizado para verificar alterações na estrutura secundário do DNA.

Para entender as mudanças da estrutura secundária do DNA desses complexos, foi verificado o empilhamento de base e a helicidade direita da dupla-fita. A adição de concentrações crescentes do complexo ao CT-DNA (200 μ M) foi realizada na razão [complexo]/[DNA] de 0,1 a 1,0.

Todos os complexos tiveram a estrutura secundária do DNA alterada, mostraram que as bandas típicas de DNA em 275 e 245 nm tiveram a intensidade fortemente reduzida e deslocada (Nakanishi, 1999).

O complexo **1** teve somente a diminuição da intensidade das bandas típicas do DNA, a ligação do complexo tende a diminuir helicidade direita do DNA, perdendo a torsão e conseqüentemente mudando empilhamento de bases (Nakanishi, 1999). Este comportamento foi o mesmo para outro complexo já relatado na literatura, em que mecanismo de interação tende a ser associada com os sulcos em vez de intercalação (Dehkordi, 2011; Derakhshankhah, 2012; Shahabadi, 2014).

Para os complexos **2** e **3**, que possuem derivatizações com 1,2-etilenodiamina e 1,4-butanodiamina e como estão protonadas em pH 7, o que sugere que o DNA assumira outra conformação, uma vez que há deficiência de elétrons que provoca um aumento da interação eletrostática. Referência e ensaios

paralelos utilizando apenas solução do complexo não provocaram essa alteração, o que mostra que é um efeito de diluição simples.

Figura 94. Espectro de dicroísmo circular de DNA na presença de concentrações crescentes do complexo 1. Condições reacionais: $[CT-DNA] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{tampão}] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ de HEPES pH 7,0; $[\text{complexo}] = 0$ a $181 \mu\text{mol L}^{-1}$; temperatura = $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

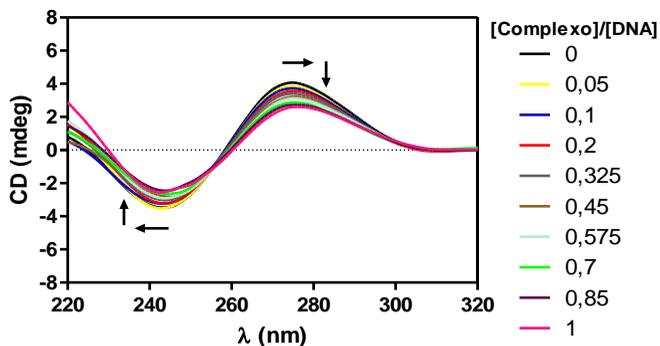


Figura 95. Espectro de dicroísmo circular de DNA na presença de concentrações crescentes do complexo 2. Condições reacionais: $[CT-DNA] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{tampão}] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ de HEPES pH 7,0; $[\text{complexo}] = 0$ a $181 \mu\text{mol L}^{-1}$; temperatura = $37 \text{ }^\circ\text{C}$

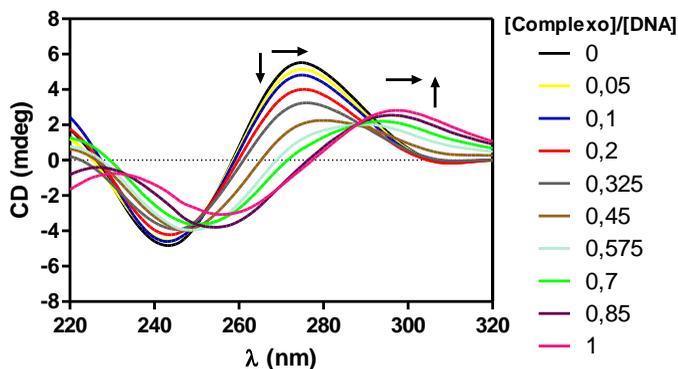
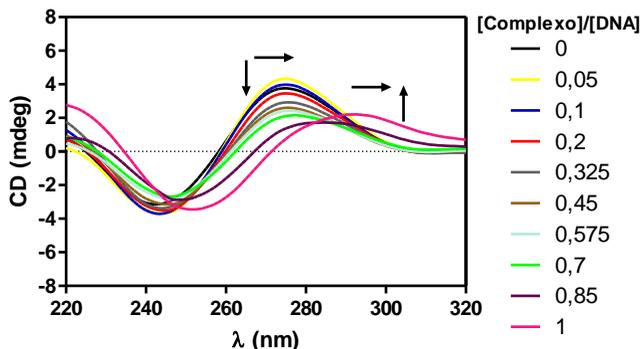


Figura 96. Espectro de dicroísmo circular de DNA na presença de concentrações crescentes do complexo **3**. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [tampão] = 10 mmol L^{-1} de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 181 $\mu\text{mol L}^{-1}$; temperatura = 37 $^{\circ}\text{C}$.



4.2.13. Avaliação do mecanismo de clivagem

4.2.13.1. Efeito dos inibidores de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Como já comentado anteriormente, complexos metálicos são capazes de clivar o DNA por dois mecanismos distintos: oxidativo e/ou hidrolítico e quando são realizadas sínteses de novas estruturas de complexos ou modificações naquelas estruturas já existentes, faz-se necessário compreender o tipo de mecanismo de clivagem. Sigman e colaboradores (Sigman *et al.*, 1979) propuseram que um complexo metálico pode clivar o DNA através da geração de espécies reativas de oxigênio, dessa maneira, torna-se importante investigar o mecanismo de clivagem para um novo complexo. As espécies reativas de oxigênio podem ser formadas a partir da redução do oxigênio molecular, que pode resultar em danos ao DNA por uma clivagem oxidativa (Jiang *et al.*, 2007; Butenko *et al.*, 2015; Raza *et al.*, 2016).

Para avaliar o comportamento dos complexos frente à clivagem do DNA utilizou-se sequestradores de radicais. Sendo eles:

1. DMSO – sequestrador de radicais (OH^\bullet)
2. KI – inibidor da geração de peróxidos (R-O-OH)
3. NaN_3 – sequestrador de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)

Os complexos **1**, **2** e **3** foram submetidos em testes de clivagem do DNA plasmidial na presença de sequestradores de ROS, os quais mostram evidências de um comportamento hidrolítico, pois em nenhum dos casos o inibidor foi capaz de evitar a clivagem do DNA pelos complexos. Esses resultados (Figuras 97 - 99) sugerem que os complexos não mudam o mecanismo de hidrólise de DNA. Alguns complexos são capazes de clivar o DNA por meio da geração de radicais e outras moléculas reativas contendo oxigênio, o que não acontece para esses complexos.

Figura 97. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **1**, na presença dos diferentes sequestradores de ROS. Condições reacionais: $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng}$, $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{tampão}] = \text{HEPES}$ (10 mmol L^{-1} , $\text{pH } 7,0$); $[\text{complexo}] = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{DMSO}] = 0,4 \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{KI}] = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NaN}_3] = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$; temperatura = $50 \text{ }^\circ\text{C}$; tempo = 4 h ao abrigo de luz.

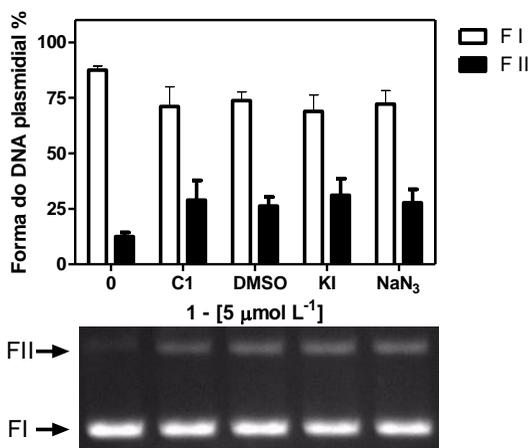


Figura 98. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **2**, na presença dos diferentes sequestradores de ROS. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$; [tampão] = HEPES (10 mmol L⁻¹, pH 7,0); [complexo] = $5 \mu\text{mol L}^{-1}$; [DMSO] = $0,4 \text{ mol L}^{-1}$; [KI] = $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; [NaN₃] = $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.

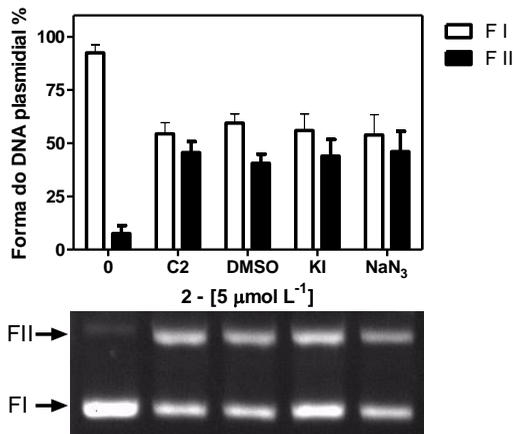
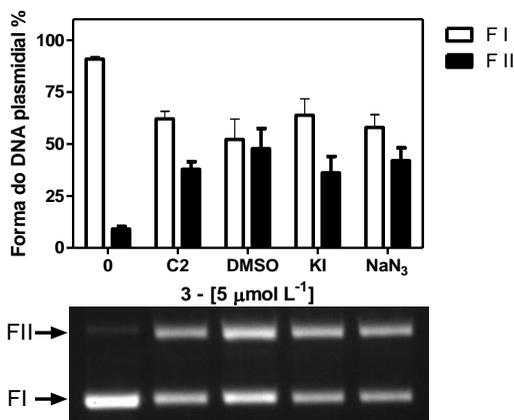


Figura 99. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **3**, na presença dos diferentes sequestradores de ROS. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$; [tampão] = HEPES (10 mmol L⁻¹, pH 7,0); [complexo] = $5 \mu\text{mol L}^{-1}$; [DMSO] = $0,4 \text{ mol L}^{-1}$; [KI] = $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; [NaN₃] = $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; temperatura = 50 °C; tempo = 4 h ao abrigo de luz.



Mesmo tendo fortes indícios através de outros complexos semelhantes que tais modificações na estrutura do complexo não alteram o mecanismo de hidrólise, não se pode afirmar somente com esse ensaio que o mecanismo é hidrolítico. Pois, pode ser um mecanismo oxidativo, o qual pode formar espécies reativas independentemente. Assim, como pode ocorrer a oxidação dessas moléculas antes mesmo que os sequestradores possam agir, por essa razão complementa-se esse ensaio com o sob atmosfera de argônio (Melvin *et al.*, 2001; Maheswari *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011).

4.2.13.2. Ensaio sob atmosfera de argônio

Com a finalidade de confirmar o mecanismo de clivagem apontado pelos ensaios de sequestradores de espécies reativas de oxigênio e verificar qual a influência do oxigênio molecular na clivagem do DNA pelos complexos, foram realizados testes de clivagem, nas condições padrão, porém na ausência de oxigênio, em atmosfera de argônio.

Esses ensaios foram realizados com concentração do complexo de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, durante 2 horas a 50°C sob atmosfera de argônio e foi realizado outro ensaio nas mesmas condições, com exceção da atmosfera de argônio, sendo agora na presença de oxigênio. O controle utilizado para essas reações de clivagem do DNA foi uma solução de FeEDTA/DTT, pois o complexo que é formado pode gerar radicais hidroxila na presença de oxigênio (Reações de Fenton) (Netto *et al.*, 1996).

Os resultados (Figuras 100 e 101) ajudam a confirmar os resultados dos inibidores de ROS, ou seja, eles praticamente não mudam sua atividade quando a reação é feita na ausência ou presença de oxigênio após 2 horas de reação. Esses complexos tiveram seu máximo de atividade em 4 horas, porém foi realizado esse teste em 2 horas, pois deve-se garantir por condições de segurança e assegurar que o dessecador utilizado em que as amostras ficaram sob atmosfera de argônio segura o vácuo, condição necessária para que as amostras não tenham contato com oxigênio.

Figura 100. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos 1 – 3 em aerobiose. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$; [tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 7,0); [complexos] = $5 \mu\text{mol L}^{-1}$; [FeEDTA] = $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; temperatura = $50 \text{ }^\circ\text{C}$; tempo = 2 h ao abrigo de luz.

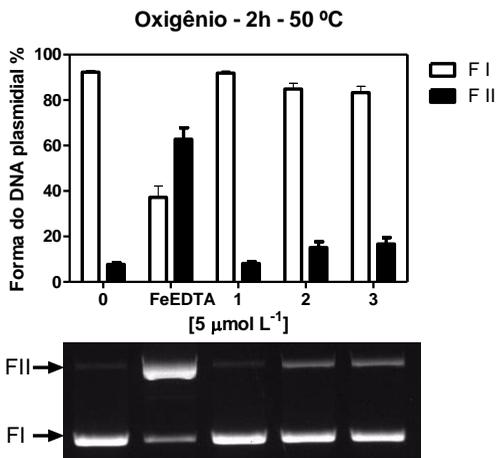
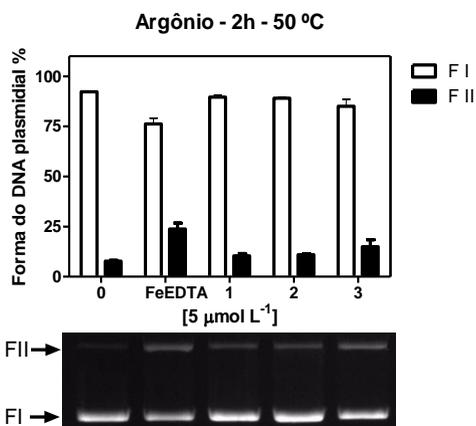


Figura 101. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos 1 – 3 em anaerobiose. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 7,0); [complexos] = $5 \mu\text{mol L}^{-1}$; [FeEDTA] = $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; Temperatura = $50 \text{ }^\circ\text{C}$; Tempo = 2 h ao abrigo de luz.



Através desses gráficos, pode-se observar que na presença ou ausência de oxigênio, a atividade do complexo continua semelhante. A solução de FeEDTA/DTT mostra claramente que na presença de oxigênio sua atividade é maior e na ausência de oxigênio é extremamente menor, comprovando a ausência de oxigênio no meio reacional. Esses resultados indicam um potencial mecanismo hidrolítico e estão de acordo com os complexos reportados anteriormente (Liu *et al.*, 2002; Horn Jr *et al.*, 2005; Lanznaster *et al.*, 2005; Peralta *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2009; Neves *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2013).

4.2.14. Ensaios Cinéticos

O perfil cinético da clivagem de DNA desses complexos foi analisado pela ausência de forma superenovelada do DNA plasmidial (F I) em função do tempo, ou seja, durante 4 horas. Tratando os dados como uma cinética de pseudo-primeira-ordem, onde há um excesso de catalisador em relação ao substrato, a constante observada de clivagem de DNA (k_{obs}) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de F I.

Foram utilizadas concentrações de 0 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tirando alíquotas nos seguintes pontos: 0, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos. A partir desses ensaios foram feitos gráficos do logaritmo da porcentagem de DNA intacto ($\ln \% \text{ Forma I}$) em função do tempo de reação (em horas), de forma que o coeficiente angular dos gráficos obtidos nos forneceu as constantes observadas de clivagem de DNA (k_{obs}) para diferentes concentrações de complexo. Após um gráfico com os valores de k_{obs} em função da sua respectiva concentração nos forneceu o perfil cinético característico de cada um dos complexos em estudo e são apresentados na Tabela 20 e na Figura 102.

Com os valores de k_{obs} , fez-se um gráfico versus a concentração dos complexos, foram tratados com a equação de Michaelis-Menten, na qual admitiu-se uma condição de pseudo-primeira ordem, pois tem excesso de complexo em relação ao DNA. Dessa forma foi possível obter valores k_{cat} (constantes de velocidade) e K_M (Michaelis-Menten) da atividade de cada complexo. Os valores obtidos serão somente comparados com complexos que tiveram os mesmos ensaios e tratamentos matemático. Isso porque o perfil obtido caracteriza pseudo-Michaelis-Menten, pois manteve-se a concentração do substrato

(DNA) e variou-se a concentração do complexo (catalisador). O tempo de meia-vida foi calculado como de primeira ordem.

Figura 102. Gráfico de k_{obs} versus concentração dos complexos 1 – 3. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$; [tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 7,0); [complexos] = 0,5 – $10 \mu\text{mol L}^{-1}$; temperatura = $50 \text{ }^\circ\text{C}$; tempo = 0 – 4 h ao abrigo de luz.

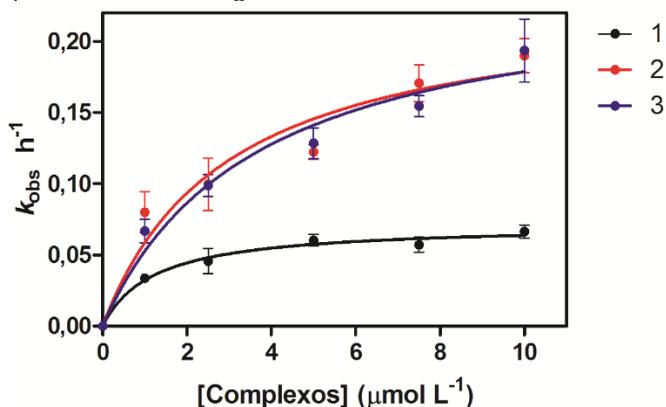


Tabela 20. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem dos complexos.

	1	2	3
k_{cat} ($\times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$)	0,714	2,311	2,434
K_M ($\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)	1,218	2,945	3,628
E_c (k_{cat}/K_M) ($\times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	5,8678	7,8471	6,7089
k_{cat}/k_{unc} ($\times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$)	1,987	6,419	6,761
K_{ass} ($\times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$)	8,914	3,395	2,756
$t_{1/2}$ (h)	9,7	3,0	2,8

$$*k_{unc} = 3,6 \times 10^{-8} \text{ h}^{-1}$$

Como pode ser observado através dos dados cinéticos dos complexos, a eficiência catalítica é maior para o complexo **2**, seguindo a mesma série do efeito da concentração, ou seja, **2>3>1**. Esses resultados mostram que em comparação com complexos reportados por Peralta (Peralta *et al.*, 2010), pode-se observar que o anel de seis membros do lado piridínico do Zn^{II} (lado macio) melhoraram a atividade dos complexos frente à

clivagem do DNA e comparando os complexos entre si, é possível perceber que as modificações na cadeia lateral com 1,2-etanodiamina (**2**) e 1,4-butadiamina (**3**) tiveram resultados melhores em relação ao complexo **1**, provando a interferência positiva dos efeitos de segunda esfera de coordenação.

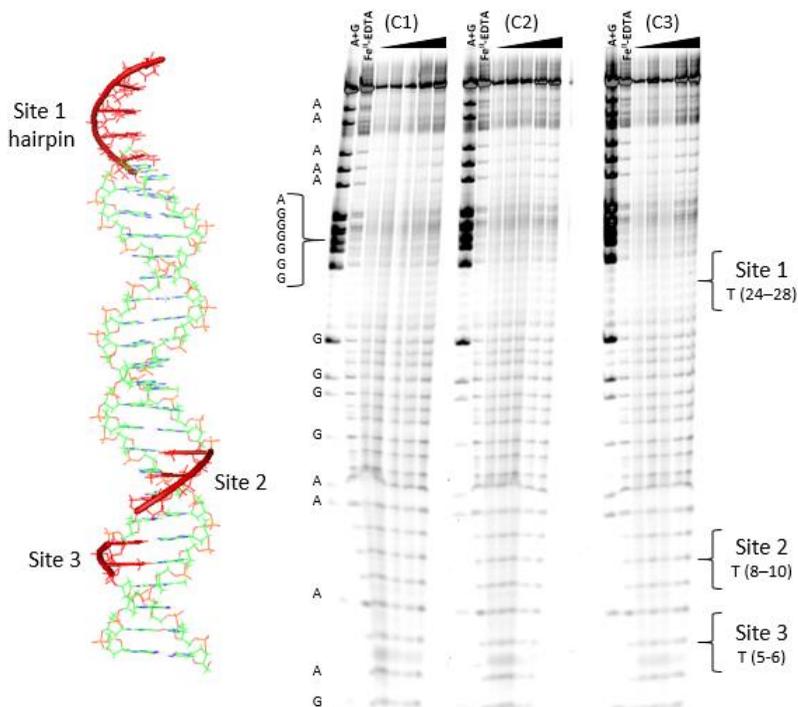
Comparando apenas os complexos **2** e **3**, a eficiência catalítica é um pouco maior para **2**, mesmo sendo da mesma ordem que para **3**. Estudos cinéticos anteriores com complexos de cobalto deram valores de $k_{\text{cat}} = 16,8$ e $6,02 \text{ h}^{-1}$ e $K_M = 3,64 \times 10^{-4}$ e $4,81 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, a pH 9,0 e 7,0, respectivamente (Massoud *et al.*, 2014). Outro exemplo a ser citado é um complexo de cobre(II) com fleroxacina e 1,10-fenantrolina que mostrou $k_{\text{cat}} = 12,64 \text{ h}^{-1}$ e $K_M = 3.10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (Xiao, Y. *et al.*, 2016) em condições comparáveis, sendo que nesse estudo os valores são melhores. Considerando os três complexos, **2** e **3** são mais ativos em relação ao complexo **1**. Souza e colaboradores também obtiveram melhores resultados para o complexo derivatizado em comparação com o complexo precursor, destacando o efeito da segunda esfera de coordenação (De Souza *et al.*, 2013).

4.2.15. Footprinting de DNA por Fe-EDTA

Uma técnica que permite a identificar regiões específicas de interação de pequenas moléculas com DNA é a metodologia de DNA *footprinting* (Jeff, 2016). Nesta metodologia, um agente capaz de clivar o DNA com baixa especificidade de sequência nucleotídica é submetido a fragmentar uma molécula de sequência conhecida na presença de como complexos metálicos, na tentativa de encontrar sítios específicos, em que a clivagem pelo agente é diminuída. Esta metodologia fornece muitas informações acerca da especificidade de complexos metálicos com DNA, principalmente aqueles que não possuem a capacidade de clivar o oligonucleotídeo. (Bailly *et al.*, 2005; Jeff, 2016).

Nesse experimento, o complexo liga-se ao oligonucleotídeo e posteriormente é adicionado uma solução de Fe-EDTA nessa reação, a qual é capaz de oxidar o DNA e até mesmo as ligações fosfodiéster. Nos locais em que a oxidação é dificultada resulta em algumas pegadas no perfil de fragmentação relativo ao local onde o complexo estaria ligado ao oligonucleotídeo, como é possível observar na Figura 103.

Figura 103. Footprinting por Fe^{II} -EDTA do oligonucleotídeo ATCG titulado com diferentes concentrações dos complexos **1** – **3**. Condições reacionais: [DNA] = ~ 20 μmol ; [tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 7,0); [complexos] = 0 – 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$; temperatura = 25 $^{\circ}\text{C}$; tempo = 90 segundos ao abrigo de luz.



Como mostrou a Figura 103, o experimento de *footprinting* em gel de alta resolução mostrou que uma diminuição de clivagem devido ao agente oxidante em regiões que possui timina quando na presença de 20 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos complexos **2** e **3**, indicando que modificações na coordenação da segunda esfera dão um possível local de ligação para esses complexos.

5. CONCLUSÕES

- ✓ A síntese e caracterização de três novos ligantes não simétricos derivados de H_2L^1 e com derivatizações foram feitas por diaminas foram realizadas com sucesso e com pureza adequada, bem como a síntese de seus respectivos complexos heterobinucleares $Fe^{III}(\mu-OH)Zn^{II}$, que imitam o sítio ativo de enzimas como as PAPs.
- ✓ Os cálculos foram realizados e as semelhanças com outras estruturas de complexos binucleares previamente relatadas foram observadas, pois possuem distâncias de ligações e comparando os espectros de infravermelho experimentais e calculados observa-se similaridades.
- ✓ Através da condutividade molar, espectrometria de massa e absorção atômica pode-se observar que essas técnicas se completam e trazem informações importantes sobre a espécie em solução que concordam com dados de CHN e de reflectância mostrando a estabilidade também em estado sólido.
- ✓ Com base nas propriedades físicas e espectroscópicas foi possível concluir que a espécie ativa é $(HO)Fe^{III}(\mu-OH)Zn^{II}(OH_2)$ e pode-se supor que estes complexos tenham a mesma estrutura no estado sólido por meio de valores obtidos de reflectância, pois foi possível observar valores muito semelhantes de $\lambda_{máximo}$.
- ✓ A obtenção dos parâmetros cinéticos para esses complexos permitiu verificar a influência positiva da segunda esfera de coordenação em sua atividade catalítica. A hidrólise do substrato 2,4-BDNPP pelos complexos **1** – **3** em CH_3CN/H_2O ajudou a elucidar os mecanismos envolvidos. Os complexos **2** e **3**, que possuem diaminas nas derivatizações, apresentaram maior atividade na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP. Entre os complexos **2** ($E_c = 0,69 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e **3** ($E_c = 0,54 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$), observou-se maior atividade para o complexo **2**, devido à proximidade do nucleófilo com a parte do fosfato e à presença dos grupos amino, o que aumenta significativamente a afinidade entre o substrato e os complexos. Isso também demonstra que os efeitos do anel de quelação de seis membros e da segunda esfera de coordenação são realmente significativos.

- ✓ Os complexos **2** e **3** são os mais ativos, com E_c de $7,8471 \times 10^4$ e $6,7089 \times 10^4$ L mol⁻¹ h⁻¹ em relação ao complexo **1** que foi $5,8678 \times 10^4$ L mol⁻¹ h⁻¹.
- ✓ também na clivagem do DNA, indicando novamente que as modificações introduzidas no ligante foram positivas.
- ✓ Análise cinética, dicroísmo circular, uso de sequestradores de espécies reativas de oxigênio, ensaios na ausência de oxigênio, bloqueadores de sulco do DNA e o *footprinting*, ajudam a compreender o mecanismo de reconhecimento e a clivagem da ligação fosfodiéster desses complexos.
- ✓ Estudos adicionais relacionados à modificação com outras derivatizações, métodos para a cristalização da estrutura binuclear e uma análise mais aprofundada para estabelecer claramente os mecanismos de ação abrem portas para serem foco de estudos futuros.

6. REFERÊNCIAS

ANDERSON, T. R.; TOVERUD, S. U. Purification and characterization of purple acid phosphatase from developing rat bone. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 247, n. 1, p. 131-139, 1986.

ASATKAR, A. K. et al. Cu(I) complexes of bis(methyl)(thia/selena) salen ligands: Synthesis, characterization, redox behavior and DNA binding studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 171, p. 18-24, 2017.

AURAS, B. L. et al. meso-Mono-[4-(1,4,7-triazacyclononanyl)]-tri(phenyl)]porphyrin and the respective zinc(II)-complex: complete characterization and biomolecules binding abilities. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 15, n. 4, p. 564-579, 2016.

BAILLY, C. et al. DNase I footprinting of small molecule binding sites on DNA. **Methods Mol Biol**, v. 288, p. 319-42, 2005.

BATISTA, S. C. et al. Highly efficient phosphate diester hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical FeIII/III model complex. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 6, n. 8, p. 1161-1165, 2003.

BECK, J. L. et al. Properties of a purple phosphatase from red kidney bean: a zinc-iron metalloenzyme. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 869, n. 1, p. 61-68, 1986.

BERNHARDT, P. V. et al. An Approach to More Accurate Model Systems for Purple Acid Phosphatases (PAPs). **Inorganic Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 7249-63, 2015.

BLACKBURN, G. M. **Nucleic Acids in Chemistry and Biology**. RSC Pub., 2006.

BORTOLOTTO, T. **Interação e clivagem de DNA por novos complexos mononucleares de Cu(II) e binucleares de Fe(III)Zn(II)**. 2015. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BOSCH, S. et al. Asymmetric mono- and dinuclear GaIII and ZnII complexes as models for purple acid phosphatases. **J Inorg Biochem**, 2015.

BRESLAUER, K. J. et al. Enthalpy-entropy compensations in drug-DNA binding studies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 24, p. 8922-8926, 1987.

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

BUTENKO, N. et al. The effect of phosphate on the nuclease activity of vanadium compounds. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 147, p. 165-176, 2015.

CAMARGO, M. A. et al. Efficient Phosphodiester Hydrolysis by Luminescent Terbium(III) and Europium(III) Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 13, p. 6013-6025, 2010.

CAMARGO, M. A. et al. Synthesis, Structure, and Phosphatase-Like Activity of a New Trinuclear Gd Complex with the Unsymmetrical Ligand H3L As a Model for Nucleases. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 3057-3063, 2010.

CAMARGO, T. P. et al. Synthesis, characterization, hydrolase and catecholase activity of a dinuclear iron(III) complex: Catalytic promiscuity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 146, p. 77-88, 2015.

CAMPBELL, H. D.; ZERNER, B. A low-molecular-weight acid phosphatase which contains iron. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 54, n. 4, p. 1498-1503, 1973.

CHEN, T. T. et al. Purification and Properties of a Progesterone-induced Basic Glycoprotein from the Uterine Fluids of Pigs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 248, n. 24, p. 8560-8566, 1973.

CHENNAM, K. P. et al. Synthesis, characterization, DNA interactions, DNA cleavage, radical scavenging activity, antibacterial, anti-proliferative and docking studies of new

transition metal complexes. **Journal of Fluorescence**, v. 26, n. 1, p. 189-205, 2016.

COMBA, P. et al. Monoesterase activity of a purple acid phosphatase mimic with a cyclam platform. **Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 1700-10, 2012.

COMBA, P. et al. Spectroscopic characterization of the active Fe(III)Fe(III) and Fe(III)Fe(II) forms of a purple acid phosphatase model system. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 12195-209, 2012.

CORINTI, D. et al. Hydrolysis of cis- and transplatin: structure and reactivity of the aqua complexes in a solvent free environment. **RSC Adv.**, v. 7, n. 26, p. 15877-15884, 2017.

COWAN, J. A. Chemical nucleases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 6, p. 634-642, 2001.

COWAN, J. A. Catalytic Metallodrugs. **Pure and Applied Chemistry**, v. 80, p. 1799–1810, 2008.

COX, R. S. E. A. Diesterase Activity and Substrate Binding in Purple Acid Phosphatases. **American Chemical Society**, v. 129, n. 31, p. 9550-9551, 2007.

DAS, B. et al. A Heterobimetallic FeIIIMnIIComplex of an Unsymmetrical Dinucleating Ligand: A Structural and Functional Model Complex for the Active Site of Purple Acid Phosphatase of Sweet Potato. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2014, n. 13, p. 2204-2212, 2014.

DAUMANN, L. J. et al. Asymmetric zinc(II) complexes as functional and structural models for phosphoesterases. **Dalton Transaction**, v. 42, n. 26, p. 9574-84, 2013.

DAUMANN, L. J. et al. Spectroscopic and mechanistic studies of dinuclear metallohydrolases and their biomimetic complexes. **Dalton Transaction**, v. 43, n. 3, p. 910-28, 2014.

DEAL, K. A.; HENGGE, A. C.; BURSTYN, J. N. Characterization of transition states in dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-

catalyzed activated phosphate diester hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 7, p. 1713-1718, 1996.

DEHKORDI, M. E. A. Spectrophotometric Study on the Binding of Two Water Soluble Schiff Base Complexes of Mn (III) with ct-DNA. **Journal of Fluorescence**, v. 21, p. 1649-1658, 2011.

DERAKHSHANKHAH, H. E. A. Synthesis, cytotoxicity and spectroscopy studies of a new copper (II) complex: calf thymus DNA and T47D as targets. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 9, p. 737-746, 2012.

DOMINGOS, J. B. E. A. **A química dos ésteres de fosfato**. 2003.

DONIA, A. M. Thermal stability of transition-metal complexes. **Thermochimica Acta**. v. 320, p. 187-199, 1998.

FIFE, T. H.; BRUICE, T. C. The temperature dependence of ΔpD correction for the use of the glass electrode em D_2O . **Journal of Physical Chemistry**, v. 65, n. 6, p. 1079-1080, 1961.

GEARY, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 81-122, 1970.

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

GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M. et al. Biological Activity of Flavonoids Copper Complexes. **Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie**, v. 631, p. 2181-2187, 2005.

GRAF, N.; LIPPARD, S. J. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 64, n. 11, p. 993-1004, 2012.

GUDDAT, L. W. E. A. Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase. **Structure with Folding and design**, v. 7, n. 7, p. 757-767, 1999.

HAGERMAN, P. J. Flexibility of DNA. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 265-286, 1988.

HEFLER, S. K.; AVERILL, B. A. The "manganese(III)-containing" purple acid phosphatase from sweet potatoes is an iron enzyme. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 146, n. 3, p. 1173-1177, 1987.

HEGG, E. L.; BURSTYN, J. N. Hydrolysis of Unactivated Peptide Bonds by a Macrocyclic Copper(II) Complex: Cu([9]aneN₃)Cl₂ Hydrolyzes Both Dipeptides and Proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 26, p. 7015-7016, 1995.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry**. 3. 2007. 502.

HORN JR, A. et al. Synthesis, crystal structure and properties of dinuclear iron(III) complexes containing terminally coordinated phenolate/H₂O/OH⁻ groups as models for purple acid phosphatases: efficient hydrolytic DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, p. 339-351, 2005.

INZELT, G.; LEWENSTAM, A.; SCHOL, F. **Handbook of Reference Electrodes**. 2012. 351.

JARENMARK, M. et al. Systematic synthesis of functional unsymmetric FeZn model complexes for plant purple acid phosphatases. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 13, n. 3, p. 334-337, 2010.

JARENMARK, M. et al. Synthesis, characterization, and reactivity studies of heterodinuclear complexes modeling active sites in purple acid phosphatases. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 3866-87, 2011.

JEFF, V. J., A, STAMATOYANNOPOULOS. Genomic footprinting. **Nature Methods**, v. 13, p. 213-221, 2016.

JIANG, Q. et al. Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, n. 15–16, p. 1951-1972, 2007.

JIN, Y. et al. Influence of Stereochemistry and Redox Potentials on the Single- and Double-Strand DNA Cleavage Efficiency of Cu(II)- and Ni(II)-Lys-Gly-His-Derived ATCUN Metallopeptides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 26, p. 8353-8361, 2007.

JOHNSON, W. C. **Determination of the Conformation of Nucleic Acids by Electronic CD**. 1996.

KAIJA, H. E. A. Phosphatase and oxygen radical-generating activities of mammalian purple acid phosphatase are functionally independent. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 292, p. 128-132, 2002.

KAIM, W.; SCHWEDERSKI, B.; KLEIN, A. **Bioinorganic Chemistry - Inorganic Elements in the Chemistry of Life: An Introduction and Guide**. 2^a edição. 2013.

KARSTEN, P. E. A. Synthesis, Structure, Properties, and Phosphatase-Like Activity of the First Heterodinuclear FeIII/MnII Complex with the Unsymmetric ligand H₂BPBPMP as a model for the PAP in Sweet Potato. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 41, p. 4624-4626, 2002.

KIKUTA, E.; AOKI, S.; KIMURA, E. New potent agents binding to a poly(dT) sequence in double-stranded DNA: bis(Zn²⁺-cyclen) and tris(Zn²⁺-cyclen) complexes. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 473-482, 2002.

KIM, S. K.; NORDÉN, B. Methyl green: A DNA major-groove binding drug. **FEBS Letters**, v. 315, n. 1, p. 61-64, 1993.

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

KLABUNDE, T. E. A. Mechanism of Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase based on crystal structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 259, p. 737-748, 1996.

KRÄMER, R. Bioinorganic models for the catalytic cooperation of metal ions and functional groups in nuclease and peptidase enzymes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 182, n. 1, p. 243-261, 1999.

LANZMASTER, M. et al. A new heterobinuclear FeIIICuII complex with a single terminal FeIII–O(phenolate) bond. Relevance to purple acid phosphatases and nucleases. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 10, p. 319-332, 2005.

LANZMASTER, M. et al. New FeIIIZnII complex containing a single terminal Fe–Ophenolate bond as a structural and functional model for the active site of red kidney bean purple acid phosphatase. **Inorganic Chemistry** 2002.

LEBANSKY, B. R.; MCKNIGHT, T. D.; GRIFFING, L. R. Purification and Characterization of a Secreted Purple Phosphatase from Soybean Suspension Cultures. **Plant Physiology**, v. 99, n. 2, p. 391-395, 1992.

LI, S. et al. DNA Cleavage and Condensation Activities of Mono- and Binuclear Hybrid Complexes and Regulation by Graphene Oxide. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 920, 2016.

LIN, M. F. et al. Purification and characterization of a new human prostatic acid phosphatase isoenzyme. **Biochemistry**, v. 22, n. 5, p. 1055-1062, 1983.

LINDQVIST, Y. E. A. Three-dimensional structure of a mammalian purple acid phosphatase at 2.2 Å resolution with a m-(hydr)oxo bridged di-iron center. **Journal Molecular Biology**, v. 291, p. 135-147, 1999.

LIU, C.; WANG, L. DNA hydrolytic cleavage catalyzed by synthetic multinuclear metallonucleases. **Dalton Transactions**, n. 2, p. 227-239, 2009.

LIU, C. et al. DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 248, p. 147-168, 2004.

LIU, C. et al. DNA Hydrolytic Cleavage by the Diiron(III) Complex $\text{Fe}_2(\text{DTPB})(\mu\text{-O})(\mu\text{-Ac})\text{Cl}(\text{BF}_4)_2$: Comparison with Other Binuclear Transition Metal Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 41, p. 913-922, 2002.

LUONG, T. K.; SHESTAKOVA, P.; PARAC-VOGT, T. N. Kinetic studies of phosphoester hydrolysis promoted by a dimeric tetrazirconium(IV) Wells-Dawson polyoxometalate. **Dalton Trans**, v. 45, n. 30, p. 12174-80, 2016.

MAHESWARI, P. U. et al. Structure, Cytotoxicity, and DNA-Cleavage Properties of the Complex $[\text{Cu}(\text{pbt})\text{Br}_2]$. **Inorganic Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 3719-3727, 2008.

MARTELL, A. E. The use of crystal structures to elucidate solution coordination chemistry. **Journal Materials Chemistry and Physics**, v. 35, p. 273-280, 1993.

MASH, H. E. et al. Complexation of Copper by Zwitterionic Aminosulfonic (Good) Buffers. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 3, p. 671-677, 2003.

MASSOUD, S. S. et al. Efficient hydrolytic cleavage of plasmid DNA by chloro-cobalt(II) complexes based on sterically hindered pyridyl tripod tetraamine ligands: synthesis, crystal structure and DNA cleavage. **Dalton Trans**, v. 43, n. 26, p. 10086-103, 2014.

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. **Eur J Med Chem**, v. 76, p. 132-44, 2014.

MCKEOWN, B. A. et al. Pt(II)-Catalyzed Ethylene Hydrophenylation: Influence of Dipyridyl Chelate Ring Size on Catalyst Activity and Longevity. **ACS Catalysis**, v. 3, n. 6, p. 1165-1171, 2013. ISSN 2155-5435

MELVIN, M. S. et al. Copper-nuclease efficiency correlates with cytotoxicity for the 4-methoxypyrrolic natural products. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 87, n. 3, p. 129-135, 2001.

MERKX, M.; AVERILL, B. A. Probing the role of the trivalent metal in phosphate ester hydrolysis: preparation and characterization of Purple Acid Phosphatases containing AlIII ZnII and InIII ZnII active sites, including the first example of an active aluminum enzyme. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 6683-6689, 1999.

MERKX, M.; PINKSE, M. W. H.; AVERILL, B. A. Evidence for nonbridged coordination of p-nitrophenyl phosphate to the dinuclear Fe(III)–M(II) center in bovine spleen purple acid phosphatase during enzymatic turnover. **Biochemistry**, v. 38, p. 9914- 9925, 1999.

MITIĆ, N. et al. The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 8, p. 3338-3363, 2006.

MITRA, K. Platinum complexes as light promoted anticancer agents: a redefined strategy for controlled activation. **Dalton Trans**, v. 45, n. 48, p. 19157-19171, 2016.

MORÁVEK, Z.; NEIDLE, S.; SCHNEIDER, B. Protein and drug interactions in the minor groove of DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, UK, v. 30, n. 5, p. 1182-1191, 2002.

MUKHERJEE, S. et al. Cytotoxic, DNA binding and drug reservoir property of Pt(II)–sulfur complexes: In-vitro kinetics, mechanism with bio-relevant molecules in aqueous medium and a theoretical approach. **Polyhedron**, v. 119, p. 84-97, 2016.

MUSUMECI, D. et al. A first-in-class and a fished out anticancer platinum compound: cis-[PtCl₂(NH₃)₂] and cis-[PtI₂(NH₃)₂] compared for their reactivity towards DNA model systems. **Dalton Trans**, v. 45, n. 20, p. 8587-600, 2016.

MUXEL, A. A. et al. New La(III) complex immobilized on 3-aminopropyl-functionalized silica as an efficient and reusable catalyst for hydrolysis of phosphate ester bonds. **Inorg Chem**, v. 53, n. 6, p. 2943-52, 2014.

NAIK, K. et al. Pyrazole bridged dinuclear Cu(II) and Zn(II) complexes as phosphatase models: Synthesis and activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1125, p. 671-679, 2016.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and coordination compounds**. 3 edição. 1977.

NAKANISHI, K., BEROVA, N. AND WOODY, R.W. **Circular Dichroism - Principles and Applications**. 1999.

NELSON, D., L; COX, M., M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 2014.

NETTO, L. E. S. et al. Removal of Hydrogen Peroxide by Thiol-specific Antioxidant Enzyme (TSA) Is Involved with Its Antioxidant Properties: TSA POSSESSES THIOL PEROXIDASE ACTIVITY. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 26, p. 15315-15321, 1996.

NEVES, A. et al. Catalytic promiscuity: catecholase-like activity and hydrolytic DNA cleavage promoted by a mixed-valence FeIII/FeII complex. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1201-1212, 2010.

NEVES, A. et al. An Unprecedented FeIII(μ -OH)ZnII Complex that Mimics the Structural and Functional Properties of Purple Acid Phosphatases. **Journal of American Chemical Society**, v. 129, p. 7486-7487, 2007.

OGUEY, C.; FOLOPPE, N.; HARTMANN, B. Understanding the Sequence-Dependence of DNA Groove Dimensions: Implications for DNA Interactions. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. 15931, 2010.

OLIVEIRA, M. C. B. et al. Mononuclear CuII-phenolate bioinspired complex is catalytically promiscuous: phosphodiester and peptide amide bond cleavage. **Journal Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2711-2713, 2009.

OSORIO, R. E. et al. Synthesis, magnetostructural correlation, and catalytic promiscuity of unsymmetric dinuclear copper(II) complexes: models for catechol oxidases and hydrolases. **Inorg Chem**, v. 51, n. 3, p. 1569-89, 2012.

OSÓRIO, R. E. H. M. B. et al. Synthesis, structure, magnetism, and hydrolase and catecholase activity of a new trinuclear copper(II) complex. **Inorganica Chimica Acta**, v. 435, p. 153-158, 2015.

PAGES, B. J. et al. Metal complex interactions with DNA. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 8, p. 3505-3526, 2015.

PATRA, A. K. DNA cleavage in red light promoted by copper(II) complexes of α -amino acids and photoactive phenanthroline bases. **Dalton Transactions**, v. 48, p. 6966-6976, 2008 2007.

PERALTA, R. A. et al. Electronic Structure and Spectro-Structural Correlations of Fe(III)Zn(II) Biomimetics for Purple Acid Phosphatases: Relevance to DNA Cleavage and Cytotoxic Activity. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 24, p. 11421-11438, 2010.

PERALTA, R. A. et al. New unsymmetric dinuclear Cu(II)Cu(II) complexes and their relevance to copper(II) containing metalloenzymes and DNA cleavage. **J Inorg Biochem**, v. 100, n. 5-6, p. 992-1004, 2006.

PIOVEZAN, C. et al. Heterodinuclear Fe(III)Zn(II)-bioinspired complex supported on 3-aminopropyl silica. Efficient hydrolysis of phosphate diester bonds. **Inorg Chem**, v. 49, n. 6, p. 2580-2, 2010.

PIOVEZAN, C. et al. Design of a dinuclear nickel(II) bioinspired hydrolase to bind covalently to silica surfaces: synthesis, magnetism, and reactivity studies. **Inorg Chem**, v. 51, n. 11, p. 6104-15, 2012.

RAGHEB, M. A.; ELDESOUKI, M. A.; MOHAMED, M. S. DNA binding, photo-induced DNA cleavage and cytotoxicity studies of lomefloxacin and its transition metal complexes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 138, p. 585-595, 2015.

RAZA, A. et al. Quercetin-Iron Complex: Synthesis, Characterization, Antioxidant, DNA Binding, DNA Cleavage, and Antibacterial Activity Studies. **Journal of Fluorescence**, p. 1-9, 2016.

ROBERTS, A. E.; SCHENK, G.; GAHAN, L. R. A Heterodinuclear FeII/ZnII Complex as a Mimic for Purple Acid Phosphatase with Site-Specific ZnII Binding. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2015, n. 19, p. 3076-3086, 2015.

RONCONI, L.; SADLER, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, n. 13-14, p. 1633-1648, 2007. ISSN 00108545.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L. Platinum Compounds: a new Class of Potent Antitumour Agents. . **Nature**, v. 222, n. 1591, p. 385, 1969.

ROSENBERG, B. V. Biological effects of platinum compounds. New agents for the control of tumors. **Platinum Metals Review**, v. 15, n. 2, p. 42, 1971.

Organização Mundial de Saúde (OMS), 2017. Disponível em: < www.who.int/cancer/ >. Acesso em: 02/06/17.

SCHENK, G. et al. Purple acid phosphatases from bacteria: similarities to mammalian and plant enzymes. **Gene**, v. 255, p. 419-424, 2000.

SCHENK, G. et al. Purple acid phosphatase: A journey into the function and mechanism of a colorful enzyme. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 2, p. 473-482, 2013.

SCHENK, G. E. A. Binuclear metal centers in purple acid phosphatases: Fe-Mn in sweet potato and Fe-Zn in soybean. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 370, p. 183-189, 1999.

SHAHABADI, N. H., L. Synthesis, characterization and multi-spectroscopic DNA interaction studies of a new platinum complex containing the drug metformin. . **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 128, p. 377-385, 2014.

SHOOK, R. L.; BOROVNIK, A. S. Role of the secondary coordination sphere in metal-mediated dioxygen activation. **Inorg Chem**, v. 49, n. 8, p. 3646-60, 2010.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. **Química Inorgânica**. 4ª edição. 2008.

SIGMAN, D., S; AND; CHEN, C., B. Chemical Nucleases: New Reagents in Molecular Biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 207-236, 1990.

SIGMAN, D. S. et al. Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline . cuprous complex. Inhibition of Escherichia coli DNA polymerase I. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 24, p. 12269-72, 1979.

SIGMAN, D. S.; MAZUMDER, A.; PERRIN, D. M. Chemical nucleases. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 6, p. 2295-2316, 1993.

SILVA, P. P. et al. Two New Ternary Complexes of Copper(II) with Tetracycline or Doxycycline and 1,10-Phenanthroline and Their Potential as Antitumoral: Cytotoxicity and DNA Cleavage. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 6414-6424, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos**. 5ª edição. 1994.

SMITH, S. J. et al. Spectroscopic and catalytic characterization of a functional Fe(III)Fe(II) biomimetic for the active site of uteroferrin and protein cleavage. **Inorg Chem**, v. 51, n. 4, p. 2065-78, 2012.

SOUZA, B. et al. The effect of chain size on the modeling of second sphere effects in biomimetic complexes. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 397, p. 76-84, 2015.

SOUZA, B. et al. Second-coordination-sphere effects increase the catalytic efficiency of an extended model for Fe(III)M(II) purple acid phosphatases. **Inorg Chem**, v. 52, n. 7, p. 3594-6, 2013.

SOUZA, B. B., A. J.; BORTOLOTTI, T.; FISCHER, F.L.; TEREZI, H.; FERREIRA, D. E. C.; ROCHA, W. R.; NEVES, A.

DNA photonuclease activity of four new copper(II) complexes under UV and red light: theoretical/experimental correlations with active species generation. **Dalton Transactions**, v. 39, p. 2027–2035, 2010.

SREEDHARA, A.; FREED, J. D.; COWAN, J. A. Efficient Inorganic Deoxyribonucleases. Greater than 50-Million-Fold Rate Enhancement in Enzyme-Like DNA Cleavage. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, p. 8814-8824, 2000.

SRISHAILAM, A. et al. Synthesis, characterization; DNA binding and antitumor activity of ruthenium(II) polypyridyl complexes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 141, p. 47-58, 2014.

STRÄTER, N. E. A. Crystal structure of a purple acid-phosphatase containing a dinuclear FeIII-ZnII active-site. *Science*. **Science**, v. 268, p. 1489-1492, 1995.

STRÄTER, N. et al. Two metal ion catalysis in enzymatic acyl- and phosphoril-transfer reactions. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 35, p. 2024-2055, 1996.

TAN, J.; WANG, B.; ZHU, L. DNA binding and oxidative DNA damage induced by a quercetin copper(II) complex: potential mechanism of its antitumor properties. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 727-739, 2009.

TANG, W. et al. Cooperative catalysis through noncovalent interactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 6, p. 1668-1672, 2013.

TERENZI, A. et al. Another step toward DNA selective targeting: NiII and CuII complexes of a Schiff base ligand able to bind gene promoter G-quadruplexes. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 18, p. 7758-7767, 2016.

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

THOER, A. et al. 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.

TIREL, E. Y. et al. Catalytic zinc complexes for phosphate diester hydrolysis. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 53, n. 31, p. 8246-50, 2014.

UPPENBERG, J. E. A. Crystal structure of a mammalian purple acid phosphatase. **Journal of Molecular Biology**, v. 290, p. 201-211, 1999.

URBACH, A. R.; WARING, M. J. Visualising DNA: Footprinting and 1-2D Gels. **Molecular BioSystems**, v. 1, n. 4, p. 287-293, 2005.

VAN DYKE, M. W.; HERTZBERG, R. P.; DERVAN, P. B. Map of distamycin, netropsin, and actinomycin binding sites on heterogeneous DNA: DNA cleavage-inhibition patterns with methidiumpropyl-EDTA.Fe(II). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, p. 5470-5474, 1982.

WALDRON, K. J. et al. Metalloproteins and metal sensing. **Nature**, v. 460, n. 7257, p. 823-30, 2009.

WANG, L.; LI, W.-J.; SONG, Y.-M. Antitumor activity and DNA binding studies on rare earth metal complexes with all-trans retinoic acid and L-glutamic acid. **RSC Advances**, v. 4, n. 80, p. 42285-42292, 2014.

WANG, M. Q. et al. Site-selective DNA hydrolysis induced by a metal-free peptide nucleic acid-cyclen conjugate. **Chem Commun (Camb)**, v. 47, n. 39, p. 11059-61, 2011.

WANG, Q. et al. Synthesis, characterization, DNA interaction, and antitumor activities of mixed-ligand metal complexes of kaempferol and 1,10-phenanthroline/2,2'-bipyridine. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 5, p. 2659-2666, 2014.

WANG, X. et al. Spectroscopic Characterization of a Ternary Phosphate-SubstrateFluoride Complex. Mechanistic Implications

for Dinuclear Hydrolases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 9235, 1999.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, v. 171, p. 737-738, 1953.

WILCOX, D. E. Binuclear Metallohydrolases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2435-2458, 1996.

XAVIER, F. R. et al. Unsymmetrical Fe(III)Co(II) and Ga(III)Co(II) complexes as chemical hydrolases: biomimetic models for purple acid phosphatases (PAPs). **Inorg Chem**, v. 48, n. 16, p. 7905-21, 2009.

XIAO, Y. et al. Synthesis, structure, and biological evaluation of a copper(II) complex with fleroxacin and 1,10-phenanthroline. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 27, p. 10928-10935, 2016.

YPSILANTIS, K. et al. Synthesis, reactivity and characterization of Pt(II) complexes with N,N' chelating ligands; structure and dimethylsulfoxide reactivity relationship. **Dalton Trans**, v. 46, n. 5, p. 1467-1480, 2017.

ZASTROW, M. L.; PECORARO, V. L. Designing Hydrolytic Zinc Metalloenzymes. **Biochemistry**, v. 53, n. 6, p. 957-978, 2014.

ZHANG, Q. et al. Identification of rice purple acid phosphatases related to phosphate starvation signalling. **Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 7-15, 2011.

ZHAO, M. et al. Insights into metalloenzyme microenvironments: biomimetic metal complexes with a functional second coordination sphere. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 21, p. 8360-8375, 2013.