

Sheila De Lucca Meller

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DE HIDROLASE
DE NOVOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO: EFEITO DA
CADEIA LATERAL E DA UNIDADE FERROCENO ANCORADA**

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

Florianópolis
2018

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

Meller, Sheila De Lucca

Síntese, caracterização e atividade de hidrolase
de novos compostos de coordenação: efeitos da cadeia
lateral e da unidade ferroceno ancorada / Sheila De
Lucca Meller ; orientador, Ademir Neves, 2018.
105 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e
Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Química. 2. Biomiméticos. 3. Segunda esfera de
coordenação. 4. Ferroceno. 5. Atividade catalítica.
I. Neves, Ademir. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III.
Título.

Sheila De Lucca Meller

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DE HIDROLASE
DE NOVOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO: EFEITO DA
CADEIA LATERAL E DA UNIDADE FERROCENO ANCORADA**

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

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2018.

Prof. Vanderlei Gageiro Machado, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

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

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

Prof. Fernando Roberto Xavier, Dr.
Universidade do Estado de Santa Catarina

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

Este trabalho é dedicado à minha família e amigos, por todo o apoio e carinho oferecidos durante esse período e por toda a vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família por todo o apoio e compreensão até então: sem vocês nada seria igual. Obrigada pelo carinho, pelas palavras de conforto e pelo entendimento de que, se nem sempre pude estar presente, foi porque era necessário. Amo vocês. Pra sempre.

Aos meus amigos lindos, torcendo por mim por todos esses anos, desde a época do colégio até agora, meu muito obrigada. Por menos que vocês entendessem o que eu estudava ou do que eu reclamava, vocês sempre estiveram por perto, ajudando-me sempre que eu gritava, ou até mesmo sem ter que pedir. Por vocês, eu movo o mundo se preciso for!

Aos amigos preciosos que essa Ilha da Magia me deu, sendo os que esbarrei por essa universidade, ou pela dança, ou simplesmente pela vida, sou grata por tê-los por perto. Se a experiência "Floripa" deixou coisa boa, com certeza uma delas foi vocês.

As loucas da ginástica, viciadas em academia e comida, essas mulheres divertidas e cheias de energia que me acolheram há tão pouco tempo, mas que parece uma vida inteira. Obrigada pelos conselhos, pela experiência e pelo amor e cuidado dedicados a mim. Vocês estão pra sempre no meu coração, aonde quer que todas nós formos! Sucesso pra nós!

A todas as pessoas que passaram pela EFC nesses tantos anos de vôlei na UFSC, por deixarem minhas semanas mais alegres e leves, especialmente as lindinhas do meu time do coração: sem vocês tudo seria bem mais difícil. Obrigada por me deixarem ser essa levantadora que não sabe ficar quieta um segundo! Vocês são essenciais.

Ao pessoal do LABINC, que com cada conversa, cada minuto de atenção, fizeram com que eu conseguisse sair o mais sã e salva possível dessa vida de pesquisadora. Cada chá e ideias novas, cada ombro pra chorar, cada conversa aleatória na salinha do café, sobre química, livros, séries e tudo mais, vai deixar saudades. Mas já saibam que eu volto pra visitar.

Agradeço à UFSC, pelo espaço de trabalho, e aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e INCT Catálise pelo dinheiro fornecido para a pesquisa. Meu muito obrigada também à Vanessa de Oliveira, pelas análises de espectrometria de

massas, realizadas em colaboração com o Centro de Biologia Molecular (CEBIME), da UFSC.

Enfim, a todos os professores, principalmente meu orientador, Prof. Dr. Ademir Neves, e as pessoas com o qual tive o prazer de aprender nesses anos, muito obrigada pelos conhecimentos repassados. Terminei o mestrado pronta pra uma nova etapa, aonde quer que seja, seja ela qual for, graças à todos vocês. Muito obrigada!

"Quando deixo de ser o que sou, torno-me aquilo que posso ser."

Lao Tzu

RESUMO

Através de ligantes mimeticamente projetados e íons metálicos, compostos de coordenação biomiméticos podem ser sintetizados e estudados, em um dos ramos crescentes da chamada química bioinorgânica. Além disso, as pesquisas desenvolvidas para a chamada segunda esfera de coordenação vêm sendo cada vez mais relevantes, mostrando os efeitos, na maioria positivos, da catálise de sistemas miméticos quando utilizados compostos que apresentem esse diferencial. Desse modo, este trabalho mostra a síntese de 2 complexos binucleares com centro de Fe(III)/Zn(II): um contendo a unidade lateral da 1,2-etilenodiamina (CAE_FeZn), e outro que além da cadeia amínica, apresenta também o organometálico ferroceno (CAEF_FeZn), um composto em ascensão em diversos ramos de pesquisa, mostrando interessantes resultados em áreas como medicina e farmacologia, devido as suas propriedades estruturais. Utilizando-se de diversas técnicas de caracterização, sendo elas espectroscópicas, como por exemplo RMN, infravermelho, ESI-MS, UV-vis, ou eletroquímicas, como voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada, os ligantes e complexos puderam ser caracterizados, mostrando concordância com as estruturas propostas para compostos semelhantes presentes na literatura. Ambos os complexos, pelos resultados obtidos pelas diversas técnicas de análise e comparações com a literatura, mostraram que a presença da cadeia amínica, e principalmente do ferroceno, quando atuando na segunda esfera de coordenação dos complexos, interagem de forma significativa com o centro metálico. Os complexos também foram testados hidroliticamente frente ao substrato modelo 2,4-BDNPP, mostrando aumento da eficiência catalítica com a adição da unidade ferroceno, corroborando o efeito positivo do organometálico quando atuando na segunda esfera de coordenação dos complexos biomiméticos, não dispensando futuros estudos mais aprofundados no tema, a fim de se avançar no entendimento de tais efeitos em processos de catálise através de compostos biomiméticos.

Palavras-chave: Segunda esfera de coordenação. Ferroceno. Biomiméticos. Atividade catalítica.

ABSTRACT

In one of the fastest growing branches of bioinorganic chemistry, biomimetic coordination compound as can be synthesized and studied through mimetically designed ligands and metal ions. In addition, the research developed for the second coordination sphere has been increasingly relevant, showing the most positive effects of the catalysis of mimetic systems when using compounds that present this characteristic. Hence, this work shows the synthesis of two binuclear complexes with Fe(III)/Zn(II) center: one containing the side unit of 1,2-ethylenediamine (CAE_FeZn), and another that besides the amine chain, also presents the organometallic ferrocene (CAEF_FeZn), a compound which increasing importance in several branches of research, showing interesting results in areas such as medicine and pharmacology, due to its structural properties. Using several characterization techniques such as NMR, infrared and UV-Vis spectroscopy, ESI-MS, and electrochemical methods, such as cyclic and square wave voltammetry, the ligands and complexes could be characterized, showing agreement with the proposed structures for similar compounds present in the literature. Both complexes, due to there sults obtained by the different analysis techniques and comparisons with the literature, showed that the presence of the amine chain, and especially the ferrocene, when acting in the second coordination sphere of the complexes, interact in a significant way with the metallic center. The complexes were also hydrolytically tested against the 2,4-BDNPP substrate, showing increased catalytic efficiency with the addition of the ferrocene unit, corroborating the positive effect of organometallic when acting in the second coordination sphere of the biomimetic complexes, stimulating further and deeper studies in the subject, in order to advance the understanding of such effects in processes of catalysis through biomimetic compounds.

Keywords: Second sphere of coordination. Ferrocene. Biomimetics. Catalytic activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura de uma ftalocianina de zinco funcionalizada com glicose. (BRYDEN, BOYLE, 2016)..... 31
- Figura 2. Exemplos de compostos biomiméticos contendo diferentes metais: (a) complexo de cobalto; (SONG, MENG *et al.*, 2017) (b) complexo mononuclear de cobre; (DALY, MARTIN, 2002) (c) modelo binuclear de gálio e zinco;. (CASELLATO, 2003). 33
- Figura 3. Estrutura de um complexo modelo mimético da metalohidrolase binuclear, com centro de Fe e Zn. (KARSTEN, NEVES *et al.*, 2002); (DANFORD, DOBROWOLSKI *et al.*, 2009).
34
- Figura 4. Esquema do sítio ativo de uma PAP encontrada no feijão vermelho, mostrando os resíduos de aminoácidos coordenantes, incluindo a tirosina ligada ao Fe(3+), que proporciona a transferência de carga do tipo ligante para o metal, (TCLM). (MITIC, SMITH *et al.*, 2006)..... 35
- Figura 5. Exemplo de composto mimético de fosfatase ácida púrpura com núcleo binuclear de Fe e Zn. (PERALTA, BORTOLUZZI *et al.*, 2010)..... 36
- Figura 6. Exemplos de compostos descritos na literatura com efeitos de segunda esfera de coordenação: (a) composto contendo a unidade pireno; (b) composto contendo ramificação com grupo ácido carboxílico. 38
- Figura 7. Exemplos de compostos contendo a unidade ferroceno em sua estrutura que são utilizados em pesquisas: (a) contra o câncer de mama (VESSIERES, TOP *et al.*, 2006); (b) contra tumores sólidos (SNEGUR, NEKRASOV *et al.*, 2008); (c) contra a malária, sendo representado o composto cloroquina (CQ) e seu similar, contendo ferroceno, ferroquina (FQ) (BIOT, DAHER *et al.*, 2006)..... 40
- Figura 8. Síntese dos pró-ligantes bpma, cmff, bpmamff e Hpy₃ (Heying, 2014). 48
- Figura 9. Síntese do H₂py₃mff, segundo descrito na literatura. (PIOVEZAN, JOVITO *et al.*, 2010)..... 48

Figura 10. Espectro de infravermelho do composto H_2py_3mff (pastilha de KBr).....	49
Figura 11. Espectro de RMN 1H em 200 MHz do composto H_2py_3mff em $CDCl_3$	50
Figura 12. Síntese do ligante LAE, semelhante ao descrito por Heying.	51
Figura 13. Espectro de infravermelho do composto LAE. (ATR em cristal de seleneto de zinco).	52
Figura 14. Espectro de RMN 1H em 200 MHz do composto LAE em $CDCl_3$	53
Figura 15. Síntese do ligante LAEF.	54
Figura 16. Espectro de infravermelho do composto LAEF. (ATR em cristal de seleneto de zinco).	55
Figura 17. Espectro de RMN 1H em 200 MHz do composto LAEF em $CDCl_3$	56
Figura 18. Síntese do complexo CAE_FeZn. (HEYING, 2014)..	57
Figura 19. Espectro de infravermelho do complexo CAE_FeZn.(ATR em cristal de seleneto de zinco).....	58
Figura 20. Síntese do complexo CAEF_FeZn. (HEYING, 2014) . 59	
Figura 21. Espectro de infravermelho do composto CAEF_FeZn.(ATR em cristal de seleneto de zinco).....	60
Figura 22. Espectros de infravermelho de comparação do ligante LAE com o seu respectivo complexo de Fe(III)Zn(II), CAE_FeZn. 65	
Figura 23. Espectros de infravermelho de comparação do ligante LAEF com o seu respectivo complexo de Fe(III)Zn(II), CAEF_FeZn.	65
Figura 24. Espectro de ESI-MS em CH_3CN grau MS do ligante LAE e seu fragmento $[LAE+1H]^+$ (pico base), com sua respectiva distribuição isotópica.	68

Figura 25. Espectro de ESI-MS em CH₃CN grau MS do ligante LAEF e seu fragmento [LAEF+1H]⁺ (pico base), com sua respectiva distribuição isotópica. 69

Figura 26. Espectro de ESI-MS em CH₃CN grau MS do complexo CAE_FeZn e seu fragmento [CAE_FeZn+Li+1H]⁺² (pico base), com sua respectiva distribuição isotópica..... 71

Figura 27. Espectro na região do UV-Vis do ligante LAEF em metanol grau espectroscópico. Ligante [LAEF] = 9,9x10⁻⁴ mol L⁻¹, com posteriores adições de 10 µL de uma solução [(NH₄)₂Ce^{IV}(NO₃)₆] = 1,03x10⁻³ mol L⁻¹..... 73

Figura 28. Espectro na região do UV-Vis do complexo CAE_FeZn em acetonitrila grau espectroscópico. [CAE_FeZn]_{inicial} na cubeta = 4,29x10⁻⁴ mol L⁻¹. Medidas seguintes feitas após sucessivas adições de 100 µL de CH₃CN, até [CAE_FeZn]_{final} = 2,14x10⁻⁴ mol L⁻¹. λ_{máx} = 537 nm; ε = 2320,9 L mol⁻¹ cm⁻¹..... 74

Figura 29. Espectro na região do UV-Vis do complexo CAEF_FeZn em acetonitrila grau espectroscópico. [CAEF_FeZn]_{inicial} na cubeta = 5,00x10⁻⁴ mol L⁻¹. Medidas seguintes feitas após sucessivas adições de 100 µL de CH₃CN, até [CAEF_FeZn]_{final} = 2,14x10⁻⁴ mol L⁻¹. λ_{máx} = 504 nm; ε = 1754,3 L mol⁻¹ cm⁻¹..... 75

Figura 30. Voltametria cíclica do ligante LAEF em acetonitrila na presença de TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte e ferroceno como padrão interno (E_{1/2} vs NHE = +400 mV); (GAGNÉ, KOVAL *et al.*, 1980) E_{1/2}= +404,5 mV e E_{1/2}= +559,5 mV. 76

Figura 31. Voltametria de onda quadrada do ligante LAEF em acetonitrila na presença de TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte e ferroceno como padrão interno (E_{1/2} vs NHE = +400 mV); (GAGNÉ, KOVAL *et al.*, 1980). E_{1/2}= +405 mV e E_{1/2}= +560 mV. 77

Figura 32. Voltametria cíclica da região correspondente aos processos do ferroceno do complexo CAEF_FeZn em acetonitrila na presença de TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte e ferroceno como padrão interno (E_{1/2} vs NHE = +400 mV); (GAGNÉ, KOVAL *et al.*, 1980) E_{1/2}= +469,5 mV e E_{1/2}= +705 mV.

- Figura 33. Voltametria de onda quadrada do complexo CAEF_FeZn em acetonitrila na presença de TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte e ferroceno como padrão interno ($E_{1/2}$ vs NHE = +400 mV); (GAGNÉ, KOVAL *et al.*, 1980) Processos: Fe⁺³/Fe⁺²: $E_{1/2} = -132$ mV e $E_{1/2} = -311$ mV..... 79
- Figura 34. Voltametria de onda quadrada do complexo CAE_FeZn em acetonitrila na presença de TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte e ferroceno como padrão interno ($E_{1/2}$ vs NHE = +400 mV); (GAGNÉ, KOVAL *et al.*, 1980) Processos: Fe⁺³/Fe⁺²: $E_{1/2} = -144$ mV e $E_{1/2} = -396$ mV..... 80
- Figura 35. Titulação espectrofotométrica do complexo CAE_FeZn nas condições CH₃CN/H₂O (1:1, v/v) a 25 °C, 0,1 mol L⁻¹ em KCl. [CAE_FeZn] = 2,14x10⁻⁴ mol L⁻¹. 83
- Figura 36. Titulação espectrofotométrica do complexo CAEF_FeZn nas condições CH₃CN/H₂O (1:1, v/v) a 25 °C, 0,1 mol L⁻¹ em KCl. [CAEF_FeZn] = 2,84x10⁻⁴ mol L⁻¹. 84
- Figura 37. Reação de hidrólise do substrato modelo para ligações de ésteres de fosfato, 2,4-BDNPP, utilizando os complexos biomiméticos CAE_FeZn e CAEF_FeZn como catalisadores. 87
- Figura 38. Dependência da velocidade inicial do complexo CAE_FeZn em função do pH para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP. Condições: CH₃CN/H₂O (1:1, v/v); [Complexo] = 4 x10⁻⁵ mol L⁻¹; [Substrato] = 3,0 x10⁻³mol L⁻¹; [tampão] = 5 x10⁻² mol L⁻¹; I = 5 x10⁻² LiClO₄ mol L⁻¹. 88
- Figura 39. Dependência da velocidade inicial do complexo CAEF_FeZn em função do pH para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP. Condições: CH₃CN/H₂O (1:1, v/v); [Complexo] = 4 x10⁻⁵ mol L⁻¹; [Substrato] = 3,0 x10⁻³mol L⁻¹; [tampão] = 5 x10⁻² mol L⁻¹; I = 5 x10⁻² LiClO₄ mol L⁻¹. 89
- Figura 40. Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP em função da concentração do substrato na presença de CAE_FeZn. Condições: CH₃CN/H₂O (1:1, v/v); [Complexo] = 4 x10⁻⁵ mol L⁻¹; [Substrato] = 3,0 x 10⁻³ mol L⁻¹; [tampão] = 5 x10⁻² mol L⁻¹; I = 5 x10⁻² LiClO₄ mol L⁻¹. 90
- Figura 41. Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP em função da concentração do substrato na presença de

CAEF_FeZn. Condições: CH₃CN/H₂O (1:1, v/v); [Complexo] = 4 x10⁻⁵ mol L⁻¹; [Substrato] = 3,0 x 10⁻³ mol L⁻¹; [tampão] = 5 x10⁻² mol L⁻¹; I = 5 x10⁻² LiClO₄ mol L⁻¹..... 91

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Comparação dos valores de bandas e estiramentos na região do infravermelho para os ligantes Hpy₃, H₂py₃mff, LAE e a LAEF. 64
- Tabela 2. Valores de deslocamento químico (em ppm) dos hidrogênios dos ligantes, e suas integrais (nH) para os compostos H₂py₃mff, LAE e a LAEF..... 66
- Tabela 3. Espécies obtidas para os ligantes LAE e LAEF, e para o complexo CAE_FeZn na análise de ESI-MS e suas razões *m/z*.
70
- Tabela 4. Valores de $E_{1/2}$ para os processos referentes a Fe⁺³/Fe⁺² obtidos por voltametria de onda quadrada para os complexos CAEF_FeZn e CAE_FeZn. 80
- Tabela 5. Valores de pKa para os complexos CAE_FeZn, CAEF_FeZn, FeZnH₂L_{Hex}^{a,x}, FeZnLAB^{b,x}. 86
- Tabela 6. Parâmetros cinéticos obtidos para os compostos deste trabalho, CAE_FeZn e CAEF_FeZn, e compostos semelhantes contidos na literatura: FeZnL_{ald} (PIOVEZAN, JOVITO *et al.*, 2010); FeZnLAB (CAMARGO, 2013); CABF_FeZn (MELLER, 2015) 91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LAE	2 - (((2-aminoetil)amino)metil) - 6 - (((3-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil) - 2 - hidroxil - 5 - metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil) - 4 - metilfenol
H ₂ py ₃ mff	2 - [N - bis - (2 - piridilmetil) aminometil] - 4 - metil - 6 - [N - (2-hidroxi - 3 - formil - 5 - metilbenzil) (2-piridilmetil) aminometil] fenol
HPy ₃	2 - [N-bis-(2-piridilmetil)aminometil] - 4 - metil - 6 - [N-(2-piridilmetil)aminometil]fenol
LAEF	2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((3-(((2-(ferrocenometil)amino)etil)amino)metil)-2-hidroxi - 5 - metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol
bpmamff	2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formilfenol
cmff	2-clorometil-4-metil-6-formilfenol
A ou Abs.	Absorvância
ACN	Acetonitrila
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxi)etil-1-piperazinoetanossulfônico
CHES	Ácido N-ciclohexil-2-aminoetanossulfônico
2,4-BDNP	Bis(2,4-dinitrofenil)fosfato
bpma	Bis(piridilmetil)amina
δ e ν	Deformação angular e axial no infravermelho
Chemical shift	Deslocamento químico no RMN
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
Fc	Ferroceno
Fc-CHO	Ferrocenocarboxialdeído
Fc ⁺	Ferrocínio
IV	Infravermelho
CAE_FeZn	perclorato de μ-hidroxi- 2 - (((2 - aminoetil)amino)metil) - 6 - (((3-((bis(piridin - 2 - ilmetil)amino)metil) - 2 - hidroxil - 5 - metilbenzil)(piridin - 2 - ilmetil)amino)metil) - 4 - metilfenol ferro (III) zinco(II)
CAEF_FeZn	perclorato de μ-hidroxi 2 - ((bis(piridin - 2 - ilmetil)amino)metil) - 6 - (((3 - ((2 -

((ferrocenometil)amino)etil)amino)metil) - 2 -
hidroxi - 5 - metilbenzil)(piridin-2-
ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol ferro (III) zinco (II)

T%	Porcentagem de transmitância
RMN- ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TMS	Tetrametilsilano
Et ₃ N	Trietilamina
UV-vis	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	30
2.1	QUÍMICA BIOINORGÂNICA: OS METAIS EM MEIO BIOLÓGICO E SUA UTILIZAÇÃO EM BIOMIMÉTICOS.....	30
2.2	METALOENZIMA BINUCLEAR: A BUSCA PELO MIMÉTICO DA FOSFATASE ÁCIDA PÚRPURA E SUAS MODIFICAÇÕES DE SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO	34
2.3	FERROCENO: O ORGANOMETÁLICO DE RELEVÂNCIA.....	38
3	OBJETIVOS	42
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	MATERIAIS	43
4.2	EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTAÇÃO	43
4.2.1	Espectrofotometria na Região do Infravermelho (IV)	43
4.2.2	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	44
4.2.3	Espectrometria de massas (ESI-MS).....	44
4.2.4	Espectrofotometria na Região do Ultra-violeta Visível (UV-vis).....	44
4.2.5	Titulação espectrofotométrica	45
4.2.6	Eletroquímica	45
4.2.7	Medidas de reatividade na hidrólise de ésteres de fosfato	46
4.3	SÍNTESES DOS LIGANTES	47
4.3.1	Síntese dos pró-ligantes bis(piridilmetil)amina (bpma), 2 - clorometil - 4 - metil - 6 -formilfenol (cmff), 2 - [N-bis-(2piridilmetil)aminometil]- 4 - metil - 6 - formilfenol	

(bpmamff) e 2 - [N-bis-(2-piridilmetil)aminometil] - 4 - metil - 6 - [N-(2-piridilmetil)aminometil]fenol (Hpy ₃).	47
4.3.2 Síntese do ligante 2 - [N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]- 4 - metil - 6 - [N(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil) aminometil] fenol - H ₂ py ₃ mff	48
4.3.3 Síntese do ligante 2 - (((2-aminoetil)amino)metil) - 6 - (((3-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil) - 2 - hidroxi - 5 - metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol - LAE	51
4.3.4 Síntese do ligante 2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((3-((2-(ferrocenometil)amino)etil)amino)metil)-2-hidroxi -5 - metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol - LAEF	54
4.4 SÍNTESE DOS COMPLEXOS HETEROBINUCLEARES	57
4.4.1 Síntese do complexo perclorato de μ -hidroxo- 2 - (((2 - aminoetil)amino)metil) - 6 - (((3-((bis(piridin - 2 - ilmetil)amino)metil) - 2 - hidroxi - 5 - metilbenzil)(piridin - 2 - ilmetil)amino)metil) - 4 - metilfenol ferro (III) zinco(II) - CAE_FeZn	57
4.4.2 Síntese do complexo perclorato de μ -hidroxo 2 - ((bis(piridin - 2 - ilmetil)amino)metil) - 6 - (((3 - (((2 - ((ferrocenometil)amino)etil)amino)metil) - 2 - hidroxi - 5 - metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol ferro (III) zinco (II) - CAEF_FeZn.....	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1 SÍNTESE DOS LIGANTES E COMPLEXOS.....	60
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	63
5.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho - IV	63
5.2.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio - RMN ¹ H	66
5.2.3 Espectrometria de massas (ESI-MS).....	67
5.2.4 Espectroscopia na região do ultravioleta e visível - UV-Vis	72

5.2.5	Eletroquímica	76
5.2.6	Titulação espectrofotométrica	82
5.3	ESTUDOS DE REATIVIDADE NA HIDRÓLISE DO SUBSTRATO 2,4-BDNPP.....	86
6	CONCLUSÃO.....	94
7	REFERÊNCIAS.....	96
8	ANEXOS.....	103

1 INTRODUÇÃO

Dentre as muitas possíveis áreas de pesquisa dentro da grande ciência conhecida como "química", a bioinorgânica vem se destacando nos últimos anos devido a sua grande interdisciplinaridade e relevância quanto aos estudos dos metais em meio biológico. Um dos ramos de estudo dessa área é a síntese de compostos biomiméticos, que atuam de modo a imitar compostos biologicamente naturais, como é o caso das enzimas, conhecidas por seu papel de catalisadoras nas reações metabólicas.

Um exemplo enzimático que é visado no design mimético no âmbito da química bioinorgânica são as metaloenzimas, que apresentam um sítio ativo formado por um ou mais íons metálicos. O uso dos miméticos das metaloenzimas é de grande valia nos estudos em grupos de pesquisa, uma vez que os biomiméticos apresentam menor massa molecular, são relativamente mais estáveis e também tem menor custo quando comparados às enzimas naturais.

Atuando como possíveis catalisadores, os biomiméticos de metaloenzimas são pensados para serem semelhantes aos compostos originais, tanto em seu sítio ativo metálico quanto nos seus ligantes diretos, a chamada primeira esfera de coordenação. Para melhores resultados, estudos são realizados para sintetizar esses miméticos com algumas modificações na sua esfera de coordenação externa, a chamada segunda esfera. Desse modo, possíveis interações das cadeias laterais "extras" com o substrato ou com o meio podem vir a auxiliar o efeito de catálise do composto sintético.

Muitos compostos são utilizados como "adicionais" de segunda esfera de coordenação, como cadeias carbônicas, cadeias de aminas laterais, e também alguns compostos aromáticos, como antraceno e pireno. (AMANN, PANDURSKI *et al.*, 2002). Baseado nesses fatos e na importância crescente do organometálico ferroceno na química, principalmente na área medicinal, devido a suas variadas propriedades, esse trabalho busca utilizar desse interessante metaloceno também para estudos de efeitos de segunda esfera, pensando então na síntese de novos biomiméticos de metaloenzimas contendo a unidade ferroceno em sua segunda esfera de coordenação, para

descobrir quais os efeitos dessa adição ao sistema mimético-enzimático.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

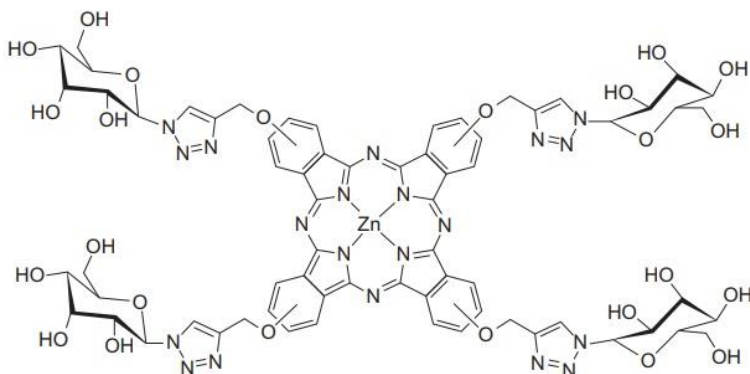
Baseando-se em algumas pesquisas e leituras, a breve revisão bibliográfica apresentada na sequência contém os principais tópicos relevantes do trabalho, assim como algumas definições específicas necessárias, para um melhor entendimento do trabalho apresentado.

2.1 QUÍMICA BIOINORGÂNICA: OS METAIS EM MEIO BIOLÓGICO E SUA UTILIZAÇÃO EM BIOMIMÉTICOS

Sendo atualmente dividida em várias sub-áreas, a química apresenta uma diversidade de estudos, pesquisas e aplicações que vem sendo desenvolvidas desde a descoberta do fogo, nos primórdios da humanidade. (GREENBERG, 2009) Incluída entre a matemática e a física nas chamadas "ciências exatas", a química tem a capacidade de englobar tanto essas quanto outras áreas em relevância atualmente, como medicina, farmacologia, toxicologia, biologia, revelando toda a sua interdisciplinaridade. Um exemplo desse comportamento interdisciplinar é o ramo da química chamado de química bioinorgânica ou química inorgânica biológica, que foca no estudo dos metais quando inseridos em meio biológico, ou seja, nas ações e interações dos íons metálicos dentro de um organismo vivo. (SHRIVER, ATKINS, 2008); (COWAN, 1993).

Surgindo como uma conexão entre a química e a biologia, a química bioinorgânica pode gerar vários ramos de pesquisa, muito mais do que somente o estudo da presença de metais em sistemas vivos, como por exemplo o uso de compostos contendo íons metálicos como possíveis fármacos para células tumorais (OKARVI, MAECKE, 2016) ou também a utilização de complexos metaloporfirínicos fluorescentes para uso em revelação de exames por imagem, como o exemplo da Figura 1 (BRYDEN, BOYLE, 2016).

Figura 1. Estrutura de uma ftalocianina de zinco funcionalizada com glicose. (BRYDEN, BOYLE, 2016)



Outro ramo dentro da química bioinorgânica é a utilização de compostos contendo metais para estudos e melhores entendimentos de sistemas biológicos mais complexos. Um exemplo são as pesquisas voltadas para o estudo de compostos modelo de moléculas biologicamente já existentes, os chamados biomiméticos, que buscam imitar essas substâncias "naturais" em sua forma eletrônica, estrutural e/ou funcional. A utilização desses miméticos é de extrema valia já que muitos dos compostos biológicos são de difícil obtenção, e normalmente apresentam um alto custo devido a dificuldade de purificação. Compostos naturais muitas vezes requerem também cuidados diferenciados para testes em bancada, já que precisam ser mantidos em condições consideradas como ideais, para que não desnaturem ou percam seu poder de ação, o que torna inviável o uso destes para tantos testes e trabalhos na área. (VINCENT, BOGATYREVA *et al.*, 2006).

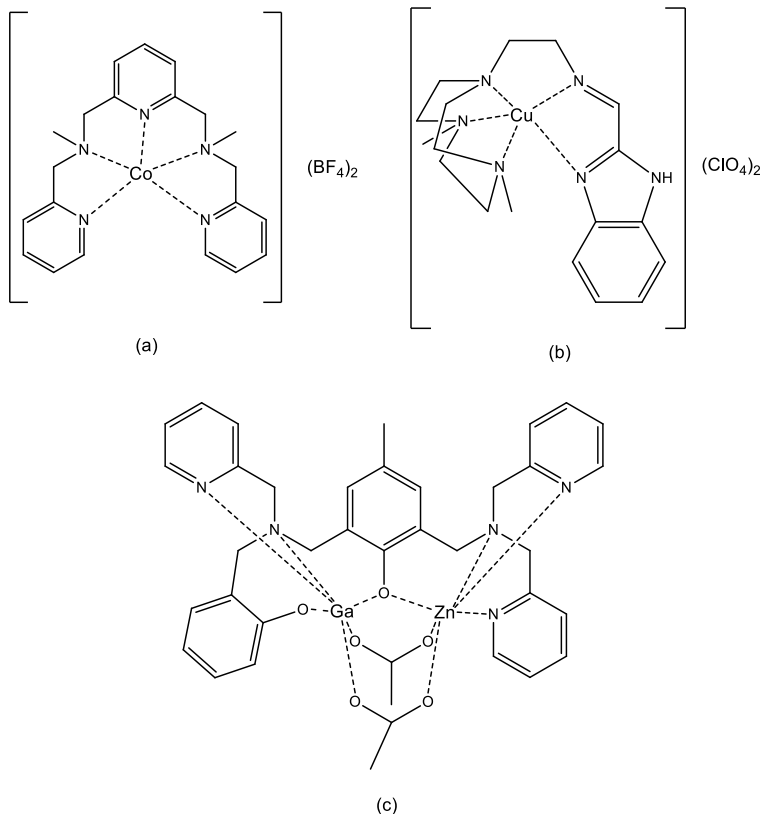
Pesquisas utilizando esses biomiméticos vem sendo desenvolvidas por inúmeros pesquisadores, sendo um exemplo a síntese de moléculas que imitam as enzimas. Enzimas funcionam como biocatalisadores dentro dos organismos vivos, acelerando reações metabólicas, já que se tratam de proteínas catalisadoras altamente específicas em relação às reações que catalisam, facilitando a conversão dos substratos aos seus respectivos produtos. (ALEXANDER, MATHIE *et al.*, 2011) Uma

classe de enzima de grande relevância na área de bioinorgânica é a classe das metaloenzimas. Essa tipo especial de enzima é constituída de cadeias poliméricas de aminoácidos ligados por ligações peptídicas, formando normalmente uma estrutura tridimensional, apresentando um sítio ativo que contenha um ou mais íons metálicos. (SCHENK, GAHAN *et al.*, 2005); (LEHNINGER, NELSON *et al.*, 2011).

Metaloenzimas, assim como as enzimas no geral, desempenham papel muito importante nas reações as quais estão inseridas, podendo atuar de muitas formas a fim de catalisar processos metabólicos, acelerando a conversão dos substratos em produtos. Esses produtos gerados pela reação com a metaloenzima muitas vezes servem como substrato para uma reação subsequente, na qual atua uma nova enzima, gerando assim o movimento do ciclo metabólico, possibilitando o correto funcionamento dos organismos vivos. (LIPPARD, BERG, 1994)

Desse modo, ao se preparar compostos similares às metaloenzimas, permite-se avaliar o papel que essa espécie de molécula representa nos processos biológicos. Para isso, não só o centro metálico, que representa o sítio ativo de ação, deve ser mimetizado, mas também seus ligantes característicos, a fim de recriar também a esfera de coordenação da metaloenzima original. (YU, CANGELOSI *et al.*, 2014) Muitos são os exemplos de moléculas baseadas em compostos nativos, que foram desenvolvidos a fim de se estudar o papel das metaloenzimas, mas sem utilizar os compostos naturalmente biológicos de fato, como mostra a Figura 2, que apresenta exemplos de compostos biomiméticos contendo metais, como em (a), que mostra um complexo de cobalto que catalisa reações de geração de hidrogênio fotocatalíticas (SONG, MENG *et al.*, 2017), em (b), com um exemplo de complexo mononuclear de cobre que atua como modelo estrutural para superóxido desmutase (DALY, MARTIN, 2002) e em (c), mostrando um modelo binuclear de gálio e zinco para fosfatase ácida púrpura. (CASELLATO, 2003)

Figura 2. Exemplos de compostos biomiméticos contendo diferentes metais: (a) complexo de cobalto; (SONG, MENG *et al.*, 2017) (b) complexo mononuclear de cobre; (DALY, MARTIN, 2002) (c) modelo binuclear de gálio e zinco;. (CASELLATO, 2003).



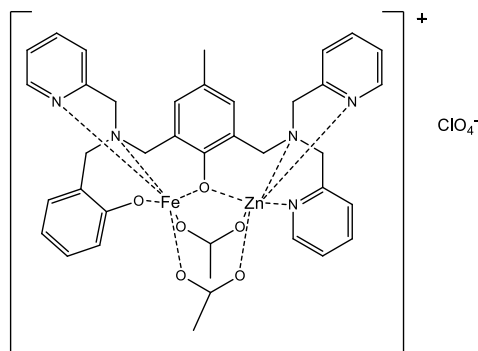
Como mostrado nos exemplos, vários metais diferentes podem ser usados na mimetização do sítio ativo das metaloenzimas. Há também a utilização de um ou mais centros metálicos em cada molécula. Essas escolhas são baseadas no sítio ativo real e em qual tipo de catálise essa metaloenzima vai atuar. A estrutura (c) da Figura 2 mostra um exemplo de complexo binuclear que atua como mimético de uma enzima específica da classe das hidrolases, a fosfatase ácida púrpura, a qual servirá de objeto de estudo para esse trabalho.

2.2 METALOENZIMA BINUCLEAR: A BUSCA PELO MIMÉTICO DA FOSFATASE ÁCIDA PÚRPURA E SUAS MODIFICAÇÕES DE SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO

Dentre as 6 grandes classes de enzimas criadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) para melhor separar as enzimas de acordo com as reações que elas catalisam, encontra-se a classe das *hidrolases*, que são as enzimas que catalisam reações de hidrólise. (LIPPARD, BERG, 1994); (LEHNINGER, NELSON *et al.*, 2011).

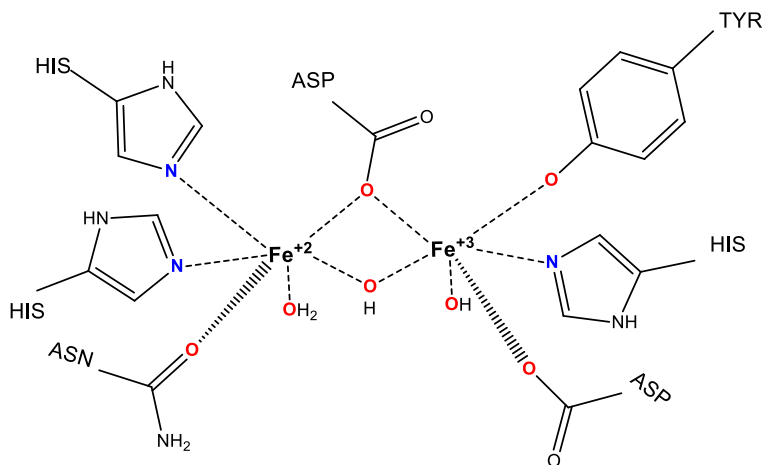
Um exemplo de hidrolase de relevância na bioinorgânica é a metalohidrolase binuclear. Com seus 2 centros metálicos, esse exemplo de hidrolase representa uma diversidade de enzimas capazes de catalisar a hidrólise de amidas, ésteres de fosfato ou ácidos carboxílicos. Sua importância se dá pelas pesquisas de seu uso na produção de possíveis fármacos contra alguns problemas de saúde, incluindo câncer, fibrose cística, osteoporose e depressão, podendo ser utilizada também como degradadores de organofosforados e pesticidas. (MITIC, SMITH *et al.*, 2006). Um exemplo de um composto biomimético para as metalohidrolases binucleares é apresentado na Figura 3, que mostra a estrutura de um complexo com centro binuclear de ferro e zinco, capaz de hidrolisar o substrato tioéster.

Figura 3. Estrutura de um complexo modelo mimético da metalohidrolase binuclear, com centro de Fe e Zn. (KARSTEN, NEVES *et al.*, 2002); (DANFORD, DOBROWOLSKI *et al.*, 2009).



Uma metalohidrolase binuclear existente é a fosfatase ácida púrpura (PAP, do inglês *Purple Acid Phosphatase*), cuja estrutura do sítio ativo é apresentada na Figura 4.

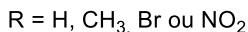
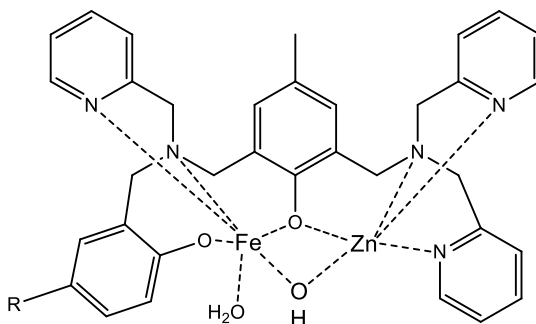
Figura 4. Esquema do sítio ativo de uma PAP encontrada no feijão vermelho, mostrando os resíduos de aminoácidos coordenantes, incluindo a tirosina ligada ao Fe^{3+} , que proporciona a transferência de carga do tipo ligante para o metal, (TCLM). (MITIC, SMITH *et al.*, 2006)



As PAPs recebem esse nome devido a sua cor púrpura, que é proveniente de uma transferência de carga tirosina- Fe^{3+} , coloração essa que é mais intensa quando a enzima está na sua forma inativa. Além disso, ela é chamada de "fosfatase ácida" por catalisar as hidrólises de ésteres de fosfato em pH ótimo mais ácido, entre 4 e 7. Essas metalohidrolases são um tipo de monoesterase binuclear que podem apresentar várias diferenças estruturais entre si, mas sempre mantendo o centro binuclear de Fe^{+3} e M^{+2} (sendo $\text{M} = \text{Fe}, \text{Zn}$ ou Mn), uma vez que esse tipo de enzima precisa do sítio ativo heterobivalente para a catálise ser estabilizada. Além da catálise de monoésteres e diésteres de fosfato pela qual é nomeada, essa metaloenzima atua ainda no transporte de ferro, reabsorção óssea, e geração de espécies reativas de O_2 . (MITIC, SMITH *et al.*, 2006); (KREBS, LIPSCOMB *et al.*, 1996); (COX, SCHENK *et al.*, 2007).

Baseado no sítio ativo e na esfera de coordenação da fosfatase ácida púrpura, bioinorgânicos começaram a desenvolver ligantes binucleantes que possuíssem átomos coordenantes semelhantes aos presentes na enzima original. Com esses ligantes e íons metálicos específicos são formados compostos de coordenação, tornando viável a mimetização do sistema escolhido. Um exemplo desse tipo de composto mimético é mostrado na Figura 5.

Figura 5. Exemplo de composto mimético de fosfatase ácida púrpura com núcleo binuclear de Fe e Zn. (PERALTA, BORTOLUZZI *et al.*, 2010)



O composto mimético apresentado na Figura 5, quando comparado com o esquema estrutural da PAP do feijão vermelho mostrada na Figura 4, apresenta-se bastante semelhante. Os resíduos de aminoácidos foram substituídos por compostos orgânicos com o mesmo átomo de ligação, como a tirosina por um fenol, e as histidinas por piridinas, sempre mantendo a coordenação pelo oxigênio e nitrogênio, respectivamente.

Outra característica importante da estrutura do biomimético é apresentada pelo uso dos centros de Fe(3+) e Zn(2+). De acordo com o mecanismo para a hidrólise de ésteres de fosfato descrito por Klabunde *et al.*, o metal bivalente é essencial no mecanismo, pois é no metal bivalente do sítio ativo que o substrato a ser hidrolisado se ligará, deixando o metal trivalente

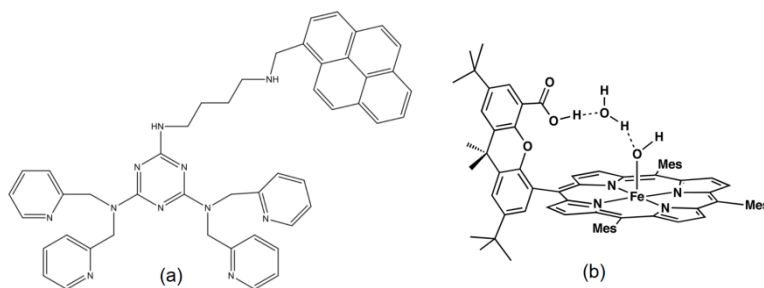
"livre" para gerar *in situ* o nucleófilo capaz de hidrolisar o substrato. (KLABUNDE, STRÄTER *et al.*, 1996) Além disso, a escolha dos metais ferro e zinco também são interessantes, uma vez que de todos os metais inseridos no meio biológico, os mais abundantes são o ferro e o zinco, corroborando quão essenciais ambos são para o bom funcionamento de um organismo. (COWAN, 1993). O ferro pode atuar como sítio ativo de inúmeras moléculas catalisadoras de reações como transferência de elétrons, reações ácido-base envolvendo ligação reversível de O₂, reações de desidratação/hidratação, e também hidrólises de ésteres. Enquanto isso, o zinco está presente no "mundo dos biocatalisadores" como formador de estrutura de proteínas e enzimas que atuam frente ao DNA, e também em alguns complexos capazes de catalisar hidrólise de ésteres e peptídeos. (SHRIVER, ATKINS, 2008).

Na busca pela maior similaridade catalítica do composto biomimético com a enzima original, alguns pesquisadores vêm adicionando ramificações nas moléculas, a fim de melhorar ainda mais o potencial de catálise dos compostos sintéticos. Essas ramificações são adicionadas para atuar também no sítio ativo do mimético, mas sem estar de fato coordenado ao centro metálico, ou seja, sem participar da primeira esfera, sendo então considerada a segunda esfera de coordenação. Os possíveis efeitos dessa segunda esfera na catálise são variáveis, podendo atuar estabilizando um estado de transição, aumentar a afinidade do mimético ao substrato ou até mesmo agir na estabilização de algum grupo de saída. Esses efeitos são gerados através de possíveis efeitos hidrofóbicos, interações eletrostáticas ou até mesmo por ligações de hidrogênio ou forças de Van der Waals. (LINDSTRÖM, PETTERSSON, 2003)

A maioria das moléculas utilizadas como aditivos para efeitos de segunda esfera são dos tipos iônicos ou moleculares, ou até mesmo partes da própria cadeia do ligante utilizado. Exemplos de compostos que podem ser utilizados para tal efeito são ciclodextrinas, éteres coroa, cadeias contendo átomos aptos a fazer ligações de hidrogênio, como aminas ou ácidos carboxílicos, polímeros, e também alguns compostos aromáticos, como pireno e antraceno. (STODDART, ZHICHANG *et al.*, 2014); (SHOOK, BOROVNIK, 2010). Alguns exemplos de complexos contendo esses compostos "adicionais" são mostrados na Figura 6, onde há a representação da estrutura de um ligante

biomimético para enzima catecol oxidase contendo a unidade pireno (a) (SILVA, 2014); e um complexo porfirínico de Fe(III)–OH do tipo "Hangman", com cadeia lateral contendo ácido carboxílico, possibilitando ligações de hidrogênio (b) (YEH, CHANG *et al.*, 2001).

Figura 6. Exemplos de compostos descritos na literatura com efeitos de segunda esfera de coordenação: (a) composto contendo a unidade pireno; (b) composto contendo ramificação com grupo ácido carboxílico.



O uso dessas diversas unidades ancoradas aos ligantes miméticos vêm mostrando resultados promissores nos campos da pesquisa da segunda esfera de coordenação. Pensando nessas possibilidades, iniciou-se a busca de novos possíveis compostos úteis para esse fim, que viessem a adicionar mais efeitos positivos nos compostos nos quais estariam inseridos, como é o caso do organometálico ferroceno.

2.3 FERROCENO: O ORGANOMETÁLICO DE RELEVÂNCIA

"O que será essa substância notável que fizemos?" Foi mais ou menos isso que Tom Kealy e Peter Pauson pensaram ao sintetizar de forma acidental o composto "formado por 2 unidades de C_5H_5 e um átomo de ferro, não só isolável, mas também estável em altas temperaturas, e não afetado nem por água e nem por ácidos e bases fortes." (PAUSON, 2001) Desde sua descoberta em 1951 (KEALY, PAUSON, 1951) o "composto sanduíche" chamado ferroceno vem sendo utilizado em vários campos de pesquisa, inclusive na química.

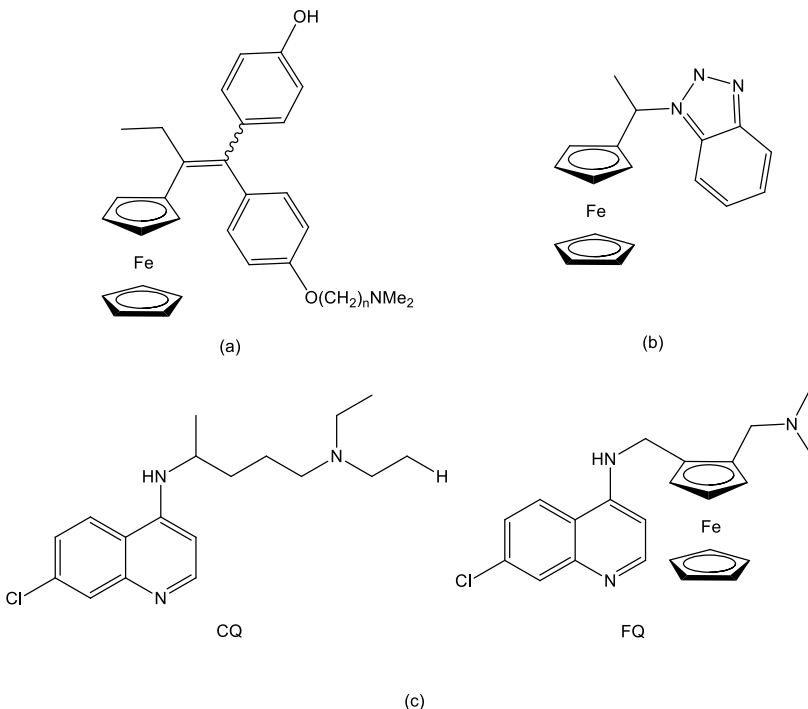
Além de ser considerado o marco inicial da química organometálica moderna, (van STAVEREN, METZLER-NOLTE,

2004) o ferroceno continua atraindo muitos pesquisadores por apresentar inúmeras propriedades, como alta estabilidade e baixo custo (PEREIRA, VENZKE *et al.*, 2013). Além disso, sua capacidade de sofrer redução e oxidação reversível possibilita o uso como marcador eletroquímico, podendo atuar como biossensor (FISH, JAOUEN, 2003) e em resinas trocadoras de elétrons (CORRY, MOONEY *et al.*, 2009).

Mais do que útil apenas no "universo" da química, o ferroceno ainda vem sendo muito visado e estudado como componente de várias moléculas de interesse em diversas áreas, como na biologia, pelos seus potenciais efeitos antibacterianos, (ABD-ELZAHER, EL-SHIEKH *et al.*, 2006) e também nas áreas de farmacologia e principalmente da medicina. (FOUDA, ABD-ELZAHER *et al.*, 2007); (ORNELAS, 2011) Exemplo desse uso medicinal do ferroceno pode ser visto no trabalho de Anne Vessières e colaboradores, no qual uma série de compostos baseados na molécula de tamoxifeno (utilizada no combate ao câncer de mama) foi sintetizada, incluindo a unidade ferroceno em sua estrutura, os chamados ferrocifenos (ver Figura 7). Esses compostos se mostraram bastante ativos contra células cancerosas, além de possivelmente apresentarem maiores vantagens de uso, como o aumento da citotoxicidade quando comparado ao tamoxifeno, e também pela atividade antitumoral dos compostos contendo ferroceno, devido à formação metabólica de íons ferrocínio. (VESSIERES, TOP *et al.*, 2006); (TOP, VESSIERES *et al.*, 2003).

Outro exemplo bastante relevante do uso do ferroceno na química medicinal é o composto chamado Ferroquina (FQ, Figura 7). Buscando reverter a resistência dos parasitas causadores da malária, como o protozoário *Plasmodium falciparum*, aos fármacos conhecidos para o combate à doença, Biot e colaboradores sintetizaram um composto baseado no já conhecido antimalárico cloroquina (CQ, Figura 7), mas incluindo a unidade ferroceno, produzindo um composto com alta atividade contra a malária quando testado *in vitro* contra o protozoário *Plasmodium falciparum*. (BIOT, DAHER *et al.*, 2006)

Figura 7. Exemplos de compostos contendo a unidade ferroceno em sua estrutura que são utilizados em pesquisas: (a) contra o câncer de mama (VESSIERES, TOP *et al.*, 2006); (b) contra tumores sólidos (SNEGUR, NEKRASOV *et al.*, 2008); (c) contra a malária, sendo representado o composto cloroquina (CQ) e seu similar, contendo ferroceno, ferroquina (FQ) (BIOT, DAHER *et al.*, 2006).



Pensando-se nos efeitos positivos do uso do ferroceno em compostos já sintetizados para fins biológicos, surge o interesse também da adição do grupo organometálico em novas moléculas de relevância bioinorgânica. Devido a possíveis interações do organometálico com o meio inserido, como ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas, o ferroceno pode adicionar algum efeito do tipo de segunda esfera de coordenação aos compostos, podendo atuar estabilizando um estado de transição ou talvez aumentando a afinidade com o substrato estudado. Alguns estudos básicos do efeito desse metaloceno na segunda esfera de coordenação de compostos catalíticos biomiméticos já

vêm sendo desenvolvidas dentro do grupo de pesquisa. (MELLER, 2015)

Baseado nesse trabalho preliminar e com mudanças estruturais nos compostos inorgânicos, esse trabalho visa a síntese de um novo composto de coordenação, com centro binuclear de $\text{Fe}(3+)$ e $\text{Zn}(2+)$, com modificação da cadeia lateral e adição do ferroceno. Essas modificações têm em vista a possível potencialização da atividade catalítica do complexo estudado, frente a testes com substrato modelo para clivagem hidrolítica de ligações de fosfato e possivelmente do DNA.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Sintetizar, purificar e caracterizar um ligante com ferroceno ancorado (LAEF) e seu similar sem a unidade ferroceno (LAE).

- Sintetizar, purificar e caracterizar um complexo binuclear heterovalente Fe/Zn com possível potencial catalítico com o ligante LAEF, e outro complexo similar com o ligante LAE.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar, purificar e caracterizar por RMN ^1H , IV, ESI-MS, o ligante LAE, e por RMN ^1H , IV, ESI-MS, UV-vis e eletroquímica o novo ligante com a unidade ferroceno LAEF;

- Sintetizar, purificar e caracterizar por IV, ESI-MS, UV-Vis e eletroquímica os complexos binucleares CAE_FeZn e CAEF_FeZn;

- Testar cataliticamente os complexos sintetizados frente à reação com o substrato modelo hidrolítico 2,4-BDNPP;

- Avaliar a atividade catalítica obtida para os complexos estudados, baseando-se em resultados de compostos semelhantes dentro do grupo de pesquisa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os seguintes reagentes, materiais, gases e solventes foram empregados nas sínteses e análises, adquiridos de fontes comerciais e sendo assim utilizados sem purificação prévia: hidróxido de sódio, ácido clorídrico 37 %, sulfato de sódio anidro, hidróxido de potássio, ferrocenocarboxialdeído, bicarbonato de sódio, boroidreto de sódio, brometo de potássio grau espectroscópico, cloreto de potássio, tampões biológicos MES, HEPES, CHES, perclorato de lítio, catalisador paládio/carbono 5%, sílica gel azul, perclorato de ferro (III) nonaidratado, perclorato de zinco (II) hexaidratado, argônio 5.0, nitrogênio 2.0, nitrato de cério (IV) amoniacal, clorofórmio deuterado, ácido acético glacial, clorofórmio PA, acetonitrila PA, diclorometano PA, isopropanol PA, metanol PA, etanol absoluto, éter etílico PA, acetona PA, tetrahidrofurano PA, acetonitrila, metanol e diclorometano de grau espectroscópico.

Alguns reagentes foram purificados antes de serem utilizados, sendo eles: piridina, 2-piridilcarboxialdeído, 2-(aminometil)piridina, 1,2-diaminoetano e trietilamina (destilados à pressão reduzida), POCl_3 (destilado em coluna microcapilar), 2,4-dinitrofenol (recristalizado em clorofórmio). O composto bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP) a ser utilizado, foi sintetizado, purificado e caracterizado de acordo com procedimento descrito na literatura (BUNTON, FABER, 1969).

4.2 EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTAÇÃO

Para a completa elaboração desse trabalho, alguns equipamentos e técnicas foram utilizadas, a fim de caracterizar os ligantes e complexos sintetizados. Os métodos utilizados e as condições de análise de cada técnica/equipamento são descritas na sequência.

4.2.1 Espectrofotometria na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros na região do IV foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer FTIR-ATR Spectrofotometer Spectrum 100, na região de 4000 a 600 cm^{-1} no Laboratório de Química Bioinorgânica e Cristalografia, no Departamento de

Química da UFSC. As amostras sólidas foram analisadas misturando-se uma pequena amostra do composto junto ao KBr, sendo macerado e compactado na forma de pastilhas, e as amostras na forma de óleos foram analisadas na forma de filme sobre a pastilha de KBr, solubilizando-se as amostras em diclorometano e deixando-se secar sob o calor de uma lâmpada, para ser realizada a análise. Também foram realizadas análises no módulo ATR (*Attenuated Total Reflection*, Reflectância Total Atenuada), no qual as amostras foram analisadas puras, pressionadas firmemente sobre o cristal de seleneto de zinco do módulo, sem adição ou mistura com composto algum.

4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em um aparelho Bruker AC 200, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC, em 200 MHz. Os deslocamentos químicos de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ ppm) e CDCl_3 como solvente.

4.2.3 Espectrometria de massas (ESI-MS)

Os compostos sintetizados (ligantes e complexos) foram analisados via espectrometria de massas com ionização via *eletrospray* (ESI-MS). Os espectros foram obtidos no equipamento Amazon – Ion Trap MS pela colaboração com o Prof. Dr. Hernán Terenzi, do Centro de Biologia Molecular Estrutural – UFSC, e as análises realizadas pela técnica Vanessa de Oliveira. As análises foram medidas a partir das soluções dos compostos em CH_3CN 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.

4.2.4 Espectrofotometria na Região do Ultra-violeta Visível (UV-vis)

Os espectros eletrônicos da região do ultravioleta e visível foram obtidos em espectrofotômetros UV-vis Varian Cary 50 BIO

e Perkin Elmer modelo Lambda 750, no Laboratório de Química Bioinorgânica e Cristalografia, no Departamento de Química da UFSC. As análises foram realizadas utilizando-se soluções dos compostos em solvente de grau espectroscópico e cubetas de quartzo, com capacidade para 1,5 mL e 1 cm de caminho óptico.

4.2.5 Titulação espectrofotométrica

As titulações espectrofotométricas dos complexos CAE_FeZn e CAEF_FeZn foram realizadas em condição CH₃CN/H₂O^a (1:1, v/v) a 25 °C, 0,1 mol L⁻¹ em KCl, com adição de solução de ácido clorídrico 1 mol L⁻¹ para deixar a solução em pH próximo a 2. Em um volume de 25 mL dessa solução foi adicionada a massa de complexo necessária para obter um espectro com absorvância próxima a 0,5, e então foram adicionadas alíquotas de base KOH de diferentes concentrações, levando o pH de aproximadamente 2,5 até 10,0, varrendo o espectro da amostra titulada a cada variação de 0,1 unidade de pH, em um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo Lambda 750, no Laboratório de Química Bioinorgânica e Cristalografia, no Departamento de Química da UFSC. Para cada complexo, a análise foi realizada 3 vezes, e os valores obtidos de pKa resultam da média dessas 3 análises.

^a A solução CH₃CN/H₂O (1:1, v/v) foi preparada com água deionizada e fervida, e posteriormente mantida em frasco vedado, sob atmosfera de argônio.

4.2.6 Eletroquímica

Os comportamentos redox do ligante LAEF e dos complexos foram investigados por voltametria cíclica (CV) e voltametria de onda quadrada (SW) em um potenciostato-galvanostato BAS (Bioanalytical Systems, Inc.) modelo Epsilon, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. Nos experimentos realizados para os compostos foram utilizadas soluções de diclorometano e acetonitrila de grau espectroscópico, sob atmosfera de argônio, com hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (0,1 mol L⁻¹) como eletrólito suporte. A cela eletroquímica foi montada tendo com composição três eletrodos: eletrodo de trabalho – carbono vítreo; eletrodo auxiliar – fio de platina; eletrodo de referência – Ag/Ag+.

Para correção do eletrodo de referência utilizou-se o ferroceno ($E_{1/2}$ vs NHE = +400 mV; $E_{1/2}$ vs Ag/Ag⁺ = +245 mV) como padrão interno. (GAGNÉ, KOVAL *et al.*, 1980)

4.2.7 Medidas de reatividade na hidrólise de ésteres de fosfato

A atividade catalítica dos complexos foi avaliada através da reação de hidrólise do substrato bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP), o qual foi sintetizado de acordo com o método descrito na literatura. (BUNTON, FABER, 1969) Os experimentos cinéticos foram realizados no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia – UFSC, 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 absorbância ocorrida em 400 nm, referente a liberação do ânion 2,4-dinitrofenolato, como produto da reação de hidrólise. (SMITH, PERALTA *et al.*, 2012)

Foram realizados estudos primeiramente variando-se o pH, a fim de se encontrar a melhor condição para a reação, e posteriormente, no pH ótimo, variando-se a concentração de substrato no meio. Os estudos em função do pH para atividade de hidrólise foram realizados em uma faixa de pH entre 4,0 e 9,5 a 25 °C. Utilizaram-se cubetas de vidro com capacidade para 4,0 mL e caminho óptico de 1 cm, nas quais foram adicionados 1500 µL de solução aquosa de tampão 0,1 mol L⁻¹ MES (pH 4,0 a 6,5), HEPES (pH 7,0 a 8,0) e CHES (8,5 a 9,5) com força iônica mantida constante ($I = 5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, LiClO₄), 100 µL de uma solução em acetonitrila do complexo ($[C]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹), 900 µL de acetonitrila e 500 µL de uma solução em acetonitrila do substrato ($[S]_{\text{final}} = 3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹). Os tampões foram preparados com água deionizada e as amostras em acetonitrila de grau espectroscópico.

Os experimentos cinéticos em condições de excesso de substrato, para determinação dos parâmetros de ativação, foram realizados nas mesmas condições, porém alterando o volume de acetonitrila e de solução de substrato mantendo a proporção CH₃CN/H₂O (1:1, v/v), para que a concentração de substrato variasse de 3×10^{-3} mol L⁻¹ a 3×10^{-4} mol L⁻¹. Correções de hidrólise espontânea do substrato 2,4-BDNPP foram realizadas

sob condições idênticas, porém sem a adição dos 100 μL do complexo, aumentando esse volume em acetonitrila.

O estudo do efeito isotópico de deutério na hidrólise do 2,4-BDNPP pelos complexos foi realizado similarmente ao estudo para a descoberta dos parâmetros de ativação, mudando-se o tampão pH = 6,50 feito com H_2O por D_2O . As reações foram monitoradas sob condições de excesso do substrato em 400 nm a 25 °C para ambos os complexos.

A determinação do número de moléculas de substrato hidrolisadas por molécula de complexo foi realizada pelo acompanhamento espectrofotométrico em 445 nm ($\epsilon = 3600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) na condição de 50 vezes de excesso do substrato ($[\text{S}]_{\text{final}} = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em relação ao complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

Os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais, baseando-se no tratamento de dados de complexos analisados de maneira semelhante dentro do grupo de pesquisa.

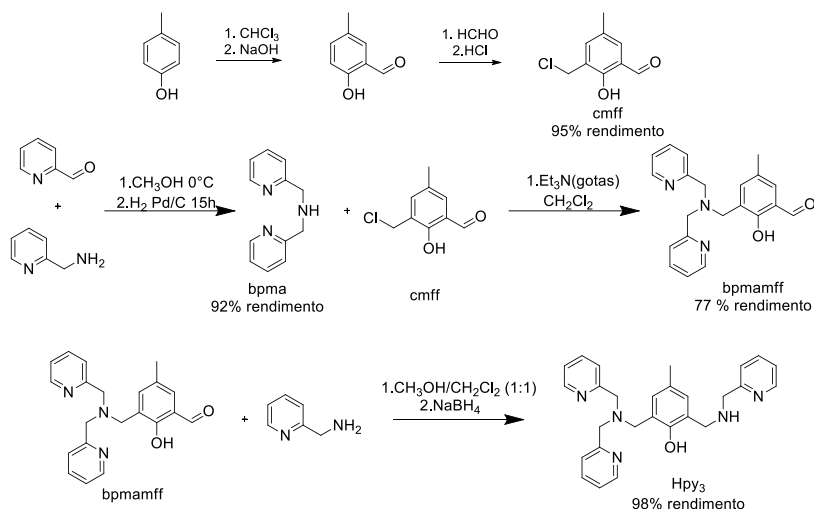
4.3 SÍNTESES DOS LIGANTES

4.3.1 Síntese dos pró-ligantes bis(piridilmetil)amina (bpma), 2 - clorometil - 4 - metil - 6 -formilfenol (cmff), 2 - [N-bis-(2piridilmetil)aminometil]- 4 - metil - 6 - formilfenol (bpmamff) e 2 - [N-bis-(2-piridilmetil)aminometil] - 4 - metil - 6 - [N-(2-piridilmetil)aminometil]fenol (Hpy₃).

Para a síntese dos ligantes finais com a cadeia lateral de etilenodiamina, LAE e LAEF (LAE com posterior adição da unidade ferroceno), fez-se uso de uma rota sintética composta de várias passos, alguns já conhecidos dentro do grupo de pesquisa e bastante descritas (JOVITO, 2010; HEYING, 2014). As etapas, referentes a síntese dos pró-ligantes bpma, cmff, bpmamff e HPy₃, foram realizadas conforme descrito na literatura: uma modificação de Neves (NEVES, BRITO *et al.*, 1996) para o bpma (PERALTA, 2005); uma reação de Reimer-Tiemann (THOER, DENIS *et al.*, 1988) seguida de clorometilação para o cmff; uma modificação de Karsten para o bpmamff (KARSTEN, NEVES *et al.*, 2002); e uma reação descrita por Greatti para o HPy₃ (GREATTI, BRITO *et al.*, 2004). A sequência de etapas que foi seguida é apresentada no esquema da Figura 8, e a descrição do procedimento da síntese desses pró-ligantes, tanto quanto

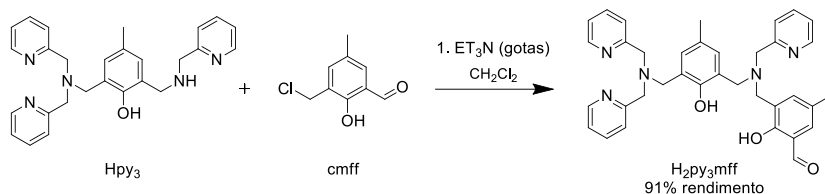
suas caracterizações, foi realizado conforme descrito na literatura (HEYING, 2014). Com o ligante Hpy₃ sintetizado e caracterizado prosseguiu-se para a síntese do ligante H₂py₃mff, e na sequência, os ligantes LAE e LAEF.

Figura 8. Síntese dos pró-ligantes bpma, cmff, bpmamff e Hpy₃ (Heying, 2014).



4.3.2 Síntese do ligante 2 - [N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4 - metil - 6 - [N(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil] fenol - H₂py₃mff

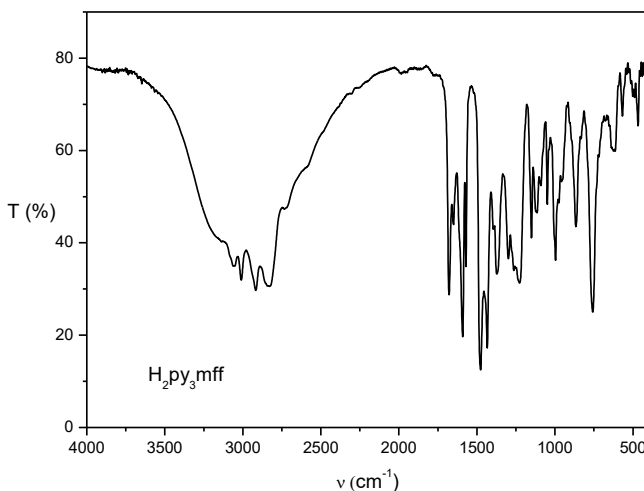
Figura 9. Síntese do H₂py₃mff, segundo descrito na literatura. (PIOVEZAN, JOVITO *et al.*, 2010)



Em um balão de 250 mL adicionaram-se 125 mL de diclorometano, 3,61 g de Hpy₃ (8,2 mmol; 440,45 g mol⁻¹) e 1,20

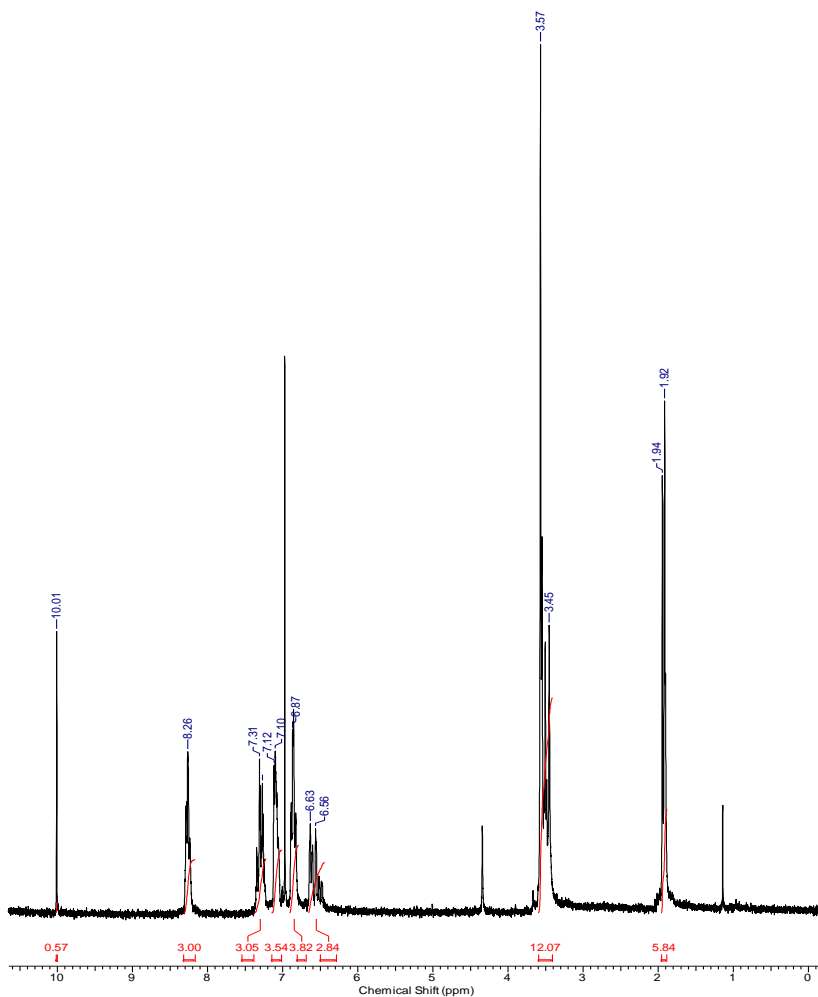
mL de trietilamina (8,2 mmol; 101,19 g mol⁻¹; 0,726 g mL⁻¹). À esta solução, foram adicionados 1,51 g de cmff (8,2 mmol; 184,62 g mol⁻¹). A mistura reacional permaneceu sob agitação e refluxo (entre 45°C e 50°C) por seis dias. Após este período a solução foi extraída com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio (10 x 15 mL). A fase orgânica foi separada e seca com Na₂SO₄ e concentrado sob pressão reduzida a 40°C gerando um óleo que quando seco sob vácuo gerou um sólido de coloração amarelo palha, com um rendimento de 91% em relação ao Hpy₃.

Figura 10. Espectro de infravermelho do composto H₂py₃mff (pastilha de KBr).



IV (cm⁻¹): ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}) 3058-2833; ν (C-H_{ald}) 2870 - 2773; ν (C=O) 1678; ν (C=N e C=C) 1602-1435; δ (O-H_{fenol}) 1373; ν (C-O) 1262; δ (C-H_{Ar}) 763.

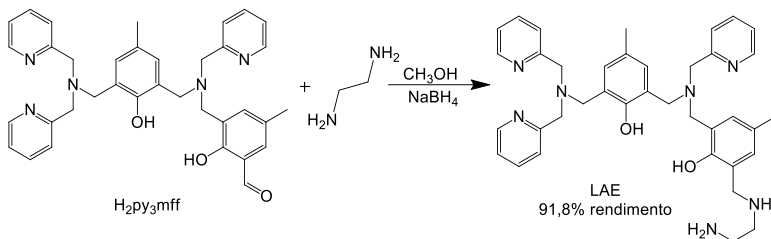
Figura 11. Espectro de RMN ^1H em 200 MHz do composto $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ em CDCl_3 .



Principais atribuições do RMN ^1H para o composto $\text{H}_2\text{Py}_3\text{mff}$ em CDCl_3 (200 MHz) δ_{H} (ppm): 1,92 (s, 3H, CH_3); 1,94 (s, 3H, CH_3); 3,45 - 3,57 (m, 12H, CH_2); 6,56 - 6,63 (m, 3H, CH_{Ar}); 6,87 (m, 4H, CH_{Ar}); 7,10 - 7,12 (m, 3H, CH_{Ar}); 7,31 (m, 3H, CH_{Ar}); 8,26 (tt, 3H, CH_{Ar}); 10,01 (s, 1H, CH_{ald}).

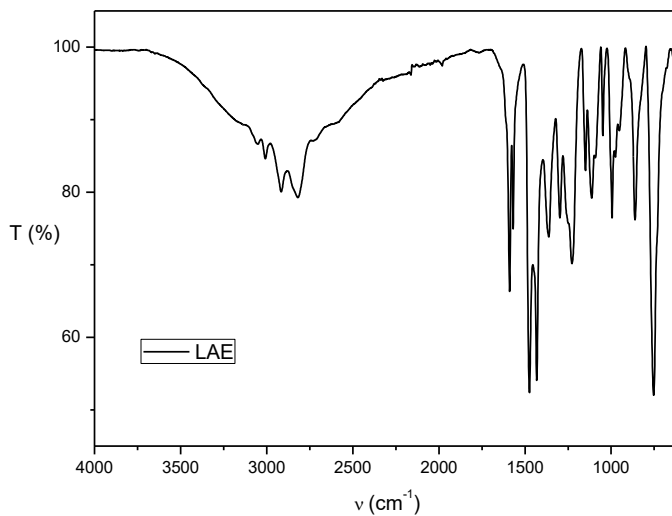
4.3.3 Síntese do ligante 2 - (((2-aminoetil)amino)metil) - 6 - (((3-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil) - 2 - hidroxil - 5 - metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol - LAE

Figura 12. Síntese do ligante LAE, semelhante ao descrito por Heying.



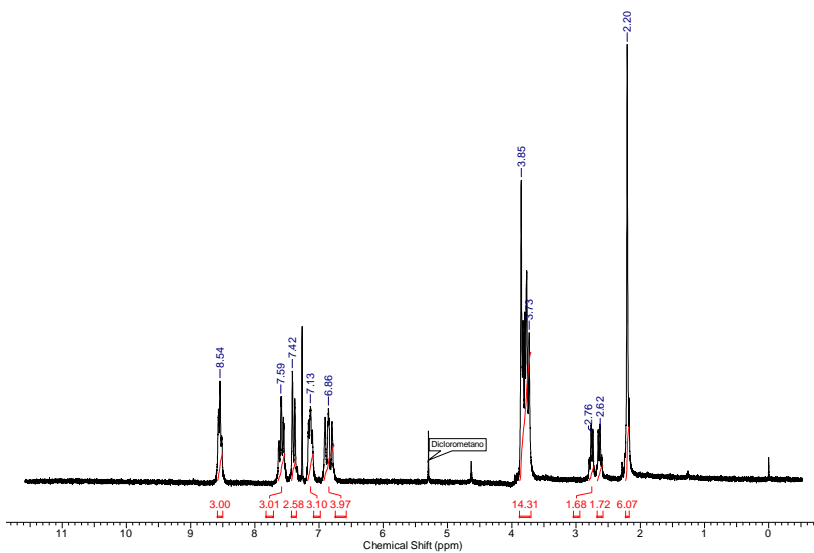
Em um balão de 125 mL foram adicionados 2,60 mL de 1,2-etilenodiamina (40 mmol; 60,10 g mol⁻¹; 0,899 g mL⁻¹) solubilizados em 50 mL de metanol, com mais 3 gotas de ácido acético glacial. Com o auxílio de um funil de adição, bem lentamente, foram adicionados 2,94 g de H₂py₃mff (5 mmol; 587,72 g mol⁻¹) solubilizados em metanol, deixando-se agitar por 4 dias em temperatura ambiente (tempo de reação obtido via análise por cromatografia de camada delgada com eluente metanol 100%). Decorrido esse período, foi feita a redução da imina com 0,23 g de boroidreto de sódio (6 mmol; 37,83 g mol⁻¹) em banho de gelo. Após a redução deixou-se agitando por mais 1 h e em seguida o solvente foi retirado em rotaevaporador sob pressão reduzida, e o óleo resultante solubilizado em diclorometano, e extraído com água (7 x 15 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrada, e o solvente retirado no rotaevaporador, resultando num óleo amarelo, que sob vácuo forma uma espuma, com rendimento de 91,8%.

Figura 13. Espectro de infravermelho do composto LAE. (ATR em cristal de seleneto de zinco).



IV (cm⁻¹): ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}) 3110-2751; ν (N-H) 3222-2593;
ν (C=N e C=C) 1617 - 1558 ; δ (O-H_{fenol}) 1061; ν (C-N) 1112; ν
(C-O) 1218 ; δ (C-H_{Ar}) 746.

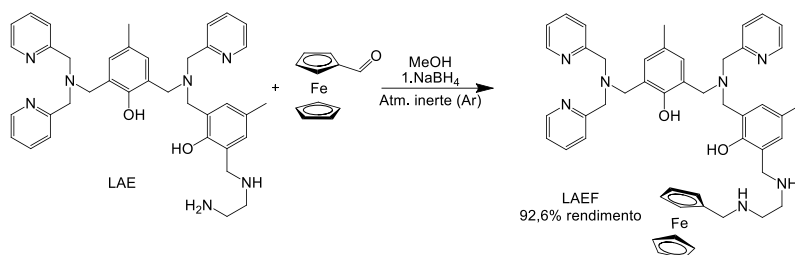
Figura 14. Espectro de RMN ^1H em 200 MHz do composto LAE em CDCl_3 .



Principais atribuições do RMN ^1H para o composto LAE em CDCl_3 (200 MHz) δ_{H} (ppm): 2,20 (s, 6H, CH_3); 2,62 (t, 2H, CH_2); 2,76 (t, 2H, CH_2); 3,73 - 3,85 (m, 14H, CH_2); 6,86 (t, 4H, CH_{Ar}); 7,13 (t, 3H, CH_{Ar}); 7,42 (d, 3H, CH_{Ar}); 7,59 (td, 3H, CH_{Ar}); 8,54 (t, 3H, CH_{Ar});

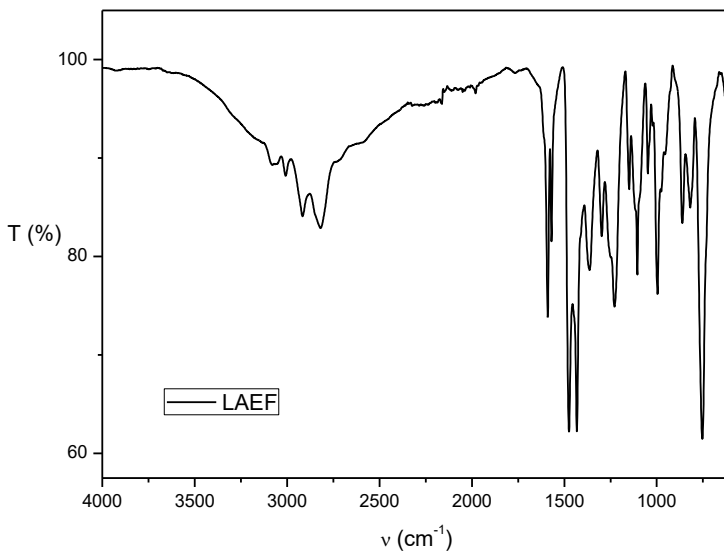
4.3.4 Síntese do ligante 2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((3-(((2-((ferrocenometil)amino)etil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol - LAEF

Figura 15. Síntese do ligante LAEF.



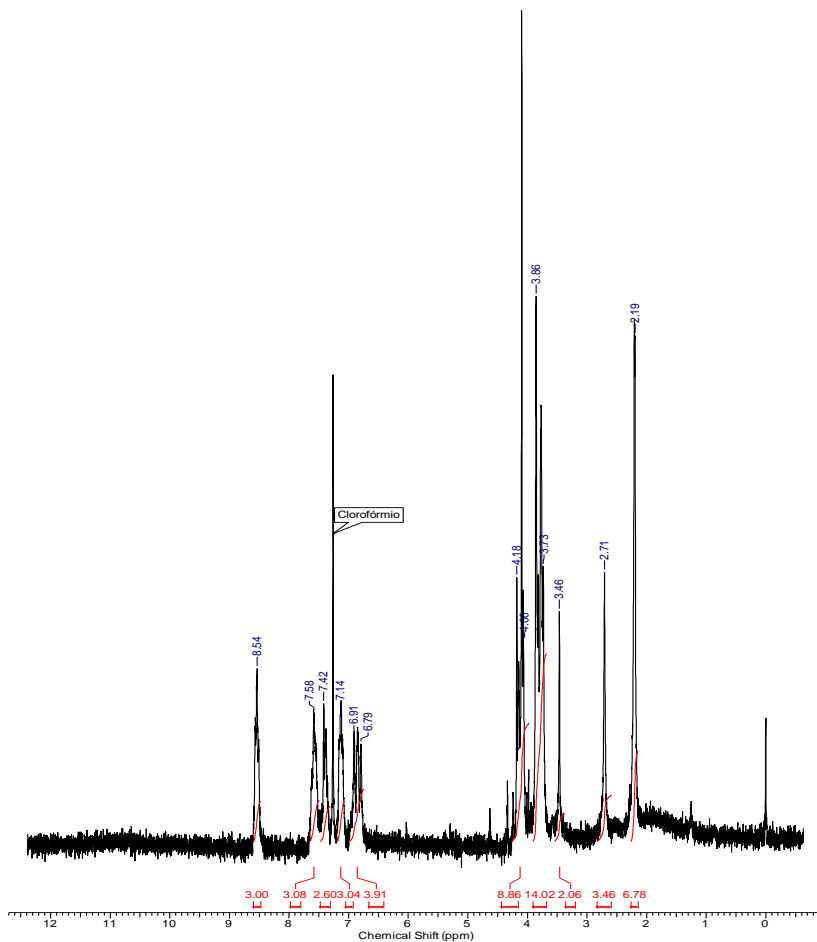
Em um balão de 3 bocas vedado foram solubilizados 0,17 g de ferrocenocarboxialdeído (0,82 mmol; 214,04 g mol⁻¹) em metanol e deixado agitando em temperatura ambiente, por 20 minutos, sob atmosfera de argônio, conforme descrito na literatura (SILVEIRA, VARGAS *et al.*, 2011). Passado esse tempo, 0,52 g de LAE (0,82 mmol; 631,81 g mol⁻¹) solubilizados em metanol foram adicionados lentamente ao aldeído e deixado agitando sob argônio por 1 hora. Passado esse tempo, a solução foi resfriada em banho de gelo e reduzida com 0,04 g de NaBH₄ (1 mmol; 37,83 g mol⁻¹), deixando-se agitando por mais 1 hora. O solvente foi então retirado em evaporador rotativo e o óleo resultante foi solubilizado em diclorometano e extraído com água (7 x 15 mL), seco com sulfato de sódio anidro e filtrado. Após, o solvente foi retirado sob pressão reduzida, gerando um óleo marrom com rendimento de 92,6%.

Figura 16. Espectro de infravermelho do composto LAEF. (ATR em cristal de seleneto de zinco).



IV (cm⁻¹): ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}) 3097-2731; ν (N-H) 3333-2357;
ν (C=N e C=C) 1657 - 1551 ; δ (O-H_{fenol}) 1087; ν (C-N) 1106; ν
(C-O) 1224 ; δ (C-H_{Ar}) 756.

Figura 17. Espectro de RMN ^1H em 200 MHz do composto LAEF em CDCl_3 .

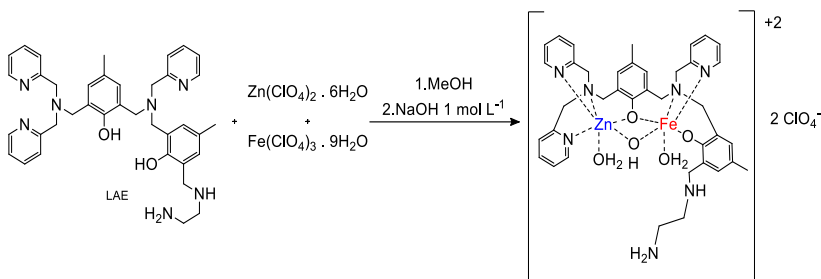


Principais atribuições do RMN ^1H para o composto LAEF em CDCl_3 (200 MHz) δ_{H} (ppm): 2,19 (s, 6H, CH_3); 2,71 (s, 4H, CH_2); 3,46 (s, 2H, CH_2); 3,73 - 3,86 (m, 14H, CH_2); 4,06 - 4,18 (m, 9H, CH_{Ar}); 6,85 (t, 4H, CH_{Ar}); 7,14 (m, 3H, CH_{Ar}); 7,42 (m, 3H, CH_{Ar}); 7,58 (m, 3H, CH_{Ar}); 8,54 (m, 3H, CH_{Ar});

4.4 SÍNTESE DOS COMPLEXOS HETEROBINUCLEARES

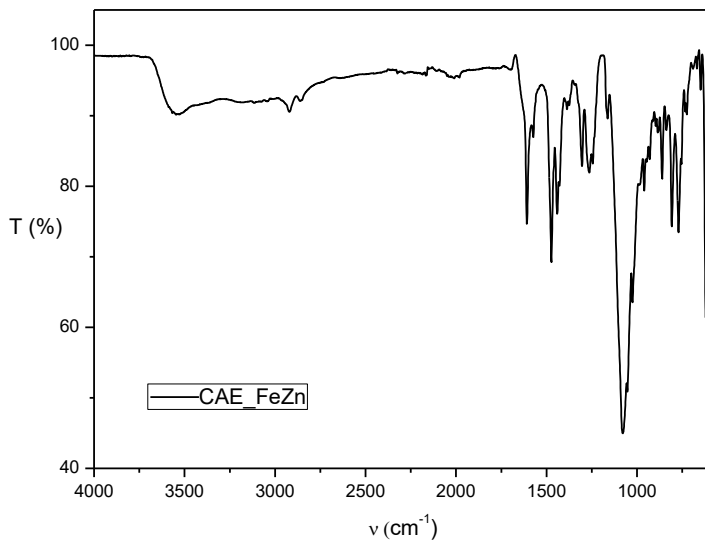
4.4.1 Síntese do complexo perclorato de μ -hidroxo- 2 - (((2 - aminoetil)amino)metil) - 6 - (((3-((bis(piridin - 2 - ilmetil)amino)metil) - 2 - hidroxi - 5 - metilbenzil)(piridin - 2 - ilmetil)amino)metil) - 4 - metilfenol ferro (III) zinco(II) - CAE_FeZn

Figura 18. Síntese do complexo CAE_FeZn. (HEYING, 2014).



Em um béquer de 600 mL adicionou-se uma solução de 0,379 g do ligante LAE (0,6 mmol; 631,81 g mol⁻¹) em 200 mL de metanol. Em seguida adicionou-se 0,223 g de perclorato de zinco (II) hexaidratado (0,6 mmol; 372,36 g mol⁻¹). Nessa mistura reacional foi adicionada muito lentamente, com um funil de adição, aproximadamente 200 mL de uma solução metanólica de 0,309 g de perclorato de ferro (III) nonaidratado (0,6 mmol; 516,20 g mol⁻¹). Após a adição da solução de ferro(III), a solução que inicialmente era amarela pálida, tornou-se roxa intensa. Adicionou-se então dois equivalentes de hidróxido de sódio (1,2 mL de uma solução 1 mol L⁻¹), e a solução tornou-se vermelha intensa. O volume de solvente foi reduzido a 40 mL em chapa de aquecimento. A seguir a solução foi filtrada em um béquer e deixada cristalizar. Sem a formação de cristais, adicionou-se éter etílico, o produto precipitou e foi lavado com água e éter gelado, resultando em um pó de coloração roxa.

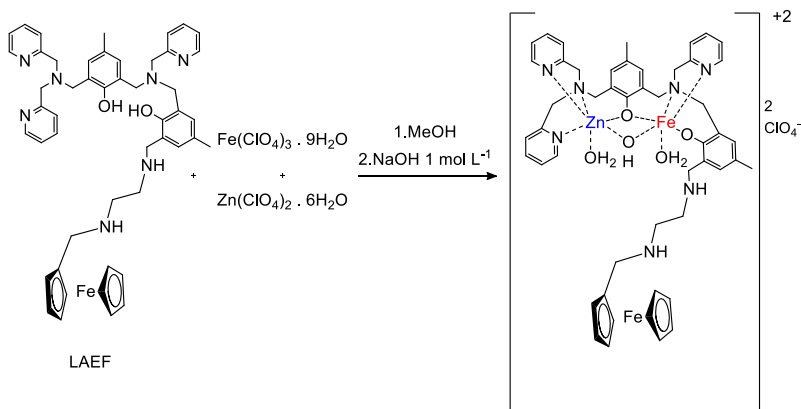
Figura 19. Espectro de infravermelho do complexo CAE_FeZn.(ATR em cristal de seleneto de zinco).



IV (cm⁻¹) : ν (O-H) 3554; ν (N-H) 2920 - 2849; ν (C-H_{Ar} e CH_{Alif}) 3191 - 2987; ν (C=N e C=C) 1609 - 1423; ν (C-N) 1312 - 1243; ν (Cl-O) 1079; δ (C-H_{Ar}) 619.

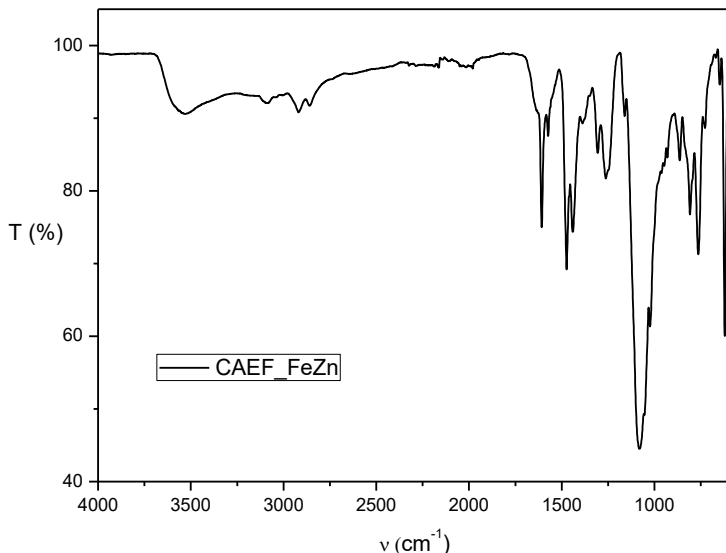
4.4.2 Síntese do complexo perclorato de μ -hidroxo 2 - ((bis(piridin - 2 - ilmetil)amino)metil) - 6 - (((3 - (((2 - ((ferrocenometil)amino)etil)amino)metil) - 2 - hidroxí - 5 - metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol ferro (III) zinco (II) - CAEF_FeZn

Figura 20. Síntese do complexo CAEF_FeZn. (HEYING, 2014) .



Em um béquer de 600 mL adicionou-se uma solução de 0,51 g do ligante LAEF (0,615 mmol, g mol⁻¹) em 200 mL de metanol. Em seguida adicionou-se 0,229 g de perclorato de zinco(II) hexaidratado (0,615 mmol, 372,36 g mol⁻¹). Nessa mistura reacional foi adicionada muito lentamente, com um funil de adição, aproximadamente 200 mL de uma solução metanólica de 0,317 g de perclorato de ferro(III) nonaidratado (0,615 mmol, 516,20 g mol⁻¹). Após a adição da solução de ferro(III), a solução que inicialmente era amarela pálida, tornou-se roxa intensa. Adicionou-se então dois equivalentes de hidróxido de sódio (1,2 mL de uma solução 1 mol L⁻¹), e a solução tornou-se vermelha intensa. O volume de solvente foi reduzido a 40 mL em chapa de aquecimento. A seguir a solução foi filtrada em um béquer e deixada cristalizar. Sem a formação de cristais, adicionou-se éter etílico, o produto precipitou e foi lavado com água e éter gelado, resultando em um pó de coloração roxa escura.

Figura 21. Espectro de infravermelho do composto CAEF_FeZn.(ATR em cristal de seleneto de zinco).



IV (cm^{-1}) : ν (O-H) 3532; ν (N-H) 2921 - 2855; ν (C-H_{Ar} e CH_{Alif}) 3134 - 2987; ν (C=N e C=C) 1608 - 1388; ν (C-N) 1304 - 1165; ν (Cl-O) 1081; δ (C-H_{Ar}) 623.

Com os ligantes e complexos sintetizados conforme as referências contidas na literatura, segue-se então para os resultados e discussões desse trabalho, apresentados a seguir.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE DOS LIGANTES E COMPLEXOS

Quando é proposta a síntese de um novo composto, tanto orgânico quanto inorgânico, têm-se em vista a execução de muitas etapas. Para a elaboração desse trabalho não foi diferente. Os dois ligantes finais foram sintetizados através de uma rota sintética composta por no mínimo 6 etapas, com a posterior síntese dos complexos heterobinucleares,

respectivamente. O sucesso de cada etapa sintética é resultado da qualidade dos produtos utilizados e da precisão do procedimento a ser realizado.

Iniciando a rota sintética escolhida, os pró-ligantes bpma, cmff, bpmamff e Hpy₃ foram sintetizados e obtidos com pureza e rendimentos satisfatórios (entre 75% e 100% de rendimento para todas as sínteses), assim como descritos na literatura.

A partir do Hpy₃, o composto H₂py₃mff foi sintetizado através de uma reação do tipo S_N2 (substituição nucleofílica bimolecular) do nitrogênio do Hpy₃ no carbono ligado ao cloro no cmff. A adição catalítica de base na solução de Hpy₃ foi para aumentar o caráter nucleofílico desse nitrogênio ao realizar o ataque ao cmff, auxiliando na reação. (MCMURRY, 2005)

A sequência da reação é dada por uma formação de imina e posterior redução, formando a ligação C-N entre o H₂py₃mff e a diamina utilizada. O excesso de base usado direciona a formação do LAE, já que com maior concentração de 1,2-etilenodiamina livre, a tendência à formação de uma imina em cada nitrogênio livre da diamina, ou seja, duas iminas, é diminuída.

O mesmo tipo de reação de formação de imina ocorre na ancoragem do grupamento ferroceno ao ligante LAE, gerando o ligante LAEF. Tendo agora apenas uma amina primária para reagir com a carbonila do ferrocenocarboxialdeído, a estequiometria 1:1 pode ser usada e mesmo assim obtendo um rendimento alto, superior à 90%. A reação "comum" de uma imina poderia ser facilitada pela adição de ácido catalítico, porém o sistema com ferroceno não aceita essa condição ácida, e quando em presença de oxigênio, acaba por oxidar o ferroceno. (SILVEIRA, VARGAS *et al.*, 2011) Desse modo, a reação para obtenção do ligante LAEF foi feita sob atmosfera inerte de argônio, mostrando bons resultados.

Um fato interessante a se notar do uso do ferroceno na síntese dos compostos foi a mudança da sua característica de "estabilidade" enquanto em seu estado sólido e puro, e quando em solução e ancorado em alguma substância orgânica. Podendo ser notado visivelmente em bancada, soluções contendo o ferroceno, mesmo que apenas o reagente inicial ferrocenocarboxialdeído (Fc-CHO), após pouco mais de 36h, começam a escurecer e apresentar em solução uma espécie de "precipitado" marrom-escuro, tornando-se totalmente pretas

horas depois, muito diferente de sua tonalidade laranja vibrante, que é visível segundos após sua solubilização.

O mesmo "fenômeno" ocorre também com os ligantes sintetizados contendo o ferroceno, ou qualquer composto sintetizado a partir do Fc-CHO e uma curta cadeia orgânica. Se não forem mantidos em baixa temperatura no freezer, sob atmosfera de argônio, mesmo os compostos em estado sólido contendo o organometálico acabam por oxidar, mostrando uma maior instabilidade dos compostos contendo ferroceno quando comparado com seu precursor sólido.

Essa característica de "instabilidade" adquirida pelos compostos sintetizados nesse trabalho que possuem ferroceno pode ser corroborada espectralmente em técnicas como espectrometria de massas (ver item 5.2.3), já que sem o uso constante de gás de purga, a fim de eliminar todo o excesso de oxigênio do meio, as amostras contendo o organometálico ficam mais favoráveis à sofrer oxidação quando em solução. (SILVEIRA, VARGAS *et al.*, 2011)

Com os dois ligantes de interesse puros e caracterizados (ver seções posteriores), os seus respectivos complexos heterobinucleares de ferro(3+) zinco(2+) foram sintetizados. Normalmente, quando se sintetiza um complexo metálico com apenas um exemplar de metal, como o cobre, todos os sítios coordenantes do ligante serão preenchidos com o metal em questão. Para uma coordenação heterobinuclear, como é o caso do CAE_FeZn e do CAEF_FeZn, algumas características devem ser levadas em consideração.

Quanto aos dois metais utilizados para a síntese, o Zn^{+2} e o Fe^{+3} , é importante considerar principalmente duas propriedades: a labilidade do metal, que é sua capacidade de trocar de ligante ou sítio coordenante mais facilmente, sendo como uma "instabilidade imposta" pelo meio; e sua definição de maciez ou dureza segundo Pearson, que leva em conta sua maior ou menor polarizabilidade, respectivamente.

O zinco(2+) é um metal mais lábil e considerado, se não macio, um ácido de fronteira segundo Pearson (SHRIVER, ATKINS, 2008). Já o Fe^{+3} , quando comparado ao Zn^{+2} , é um metal mais inerte quando já coordenado em um sítio específico, e é um ácido de Pearson mais duro (menos polarizável). Pensando nessas características, inicia-se a adição das soluções dos metais à solução do ligante pelo zinco(2+), que por sua

labilidade mais acentuada, tem a tendência de "ceder" um sítio coordenante ao ferro(3+), quando este começa a ser adicionado de forma lenta ao meio reacional, gerando então a heterobinuclearidade no complexo.

A posição de coordenação desse metal trivalente é guiada então pela sua acidez de Pearson. Tanto LAE quanto LAEF são ligantes com sítios de coordenação não simétricos, como pode ser visto nas Figuras 12 e 15, respectivamente. Um sítio tem nitrogênios livres para coordenação, enquanto o outro, além dos nitrogênios, ainda conta com o oxigênio do fenol da unidade cmff. O oxigênio é uma base dura segundo Pearson, e a maior estabilidade de ligação entre ácidos e bases de Pearson se dá quando há junção de compostos macios com macios e duros com duros. (HOUSECROFT, SHARPE, 2013) Desse modo, o Fe^{+3} , pela sua maior dureza, irá se coordenar no sítio que contém a base mais dura, que no caso é o oxigênio presente no cmff, deixando o segundo sítio com o Zn^{+2} .

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

Após a síntese dos compostos, seguiu-se uma série de caracterizações que pudessem comprovar que tanto os ligantes quanto os complexos idealizados foram sintetizados conforme previsto. A seguir são discutidos os resultados obtidos nas análises de IV, RMN 1H , eletroquímica, entre outras técnicas de detecção utilizadas.

5.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho - IV

A análise de espectroscopia IV auxilia na caracterização dos ligantes e complexos pelo acompanhamento da presença ou ausência de bandas de deformação ou estiramento específicos em cada nova etapa de síntese, como uma banda de OH de fenol, ou um estiramento de um C=O de uma carboxila de aldeído, por exemplo. Outro exemplo de análise que também pode ser feita é a possibilidade de deslocamentos das bandas já presentes nos compostos, mas que pela sequência da rota sintética podem deslocar ou mudar de intensidade, pelo aumento estrutural do composto a qual representam. (SILVERSTEIN, BASSLER *et al.*, 1994)

Seguindo a rota sintética dos ligantes, foram realizadas análises de IV, das quais se obtiveram as informações de deformações e estiramentos mostradas na Tabela 1. A medida que os ligantes finais foram sendo formados, alguns valores de estiramentos foram deslocados, como é o caso dos valores de C=N e C=C, e também a presença da banda de estiramento C=O do aldeído no espectro do H₂Py₃mff, que não está mais presente após a reação de aminação redutiva para a formação de LAE.

Tabela 1. Comparação dos valores de bandas e estiramentos na região do infravermelho para os ligantes Hpy₃, H₂py₃mff, LAE e a LAEF.

Atribuições	Hpy₃^a	H₂py₃mff	LAE	LAEF
v (C-H_{Ar} e C-H_{Alif})	3061 - 2824	3058- 2833	3110- 2751	3097 - 2731
v (C=O)	-	1678	-	-
v (C=N e C=C)	1592 a 1434	1602- 1435	1617- 1558	1657- 1551
δ (O-H_{fenol})	1364	1373	1061	1087
v (C-O_{fenol})	1233	1262	1218	1224
v (C-N)	1149	1297- 1213	1112	1106
δ (C-H_{Ar})	761	763	746	756
v (N-H)	-	3058- 3003	3222- 2593	3333- 2357

^a: Valores retirados da literatura (JOVITO, 2010).

Outra informação que pode ser obtida dessa análise é quanto aos deslocamentos dos estiramentos ou deformações das ligações no ligante após a formação do complexo.

Como pode ser visto nas Figuras 22 e 23, quando há a formação dos complexos binucleares, os valores de número de onda referentes as deformações e estiramentos dos ligantes variam ligeiramente, devido a reorganização da estrutura para a acomodação dos metais complexados. Outra constatação é a presença de algumas bandas antes não existentes, que no espectro dos complexos se tornam intensas, como o caso da banda de perclorato em 1080 cm⁻¹ no CAE_FeZn e em 1076 cm⁻¹ para o CAEF_FeZn, referentes ao contra íon dos complexos sintetizados.

Figura 22. Espectros de infravermelho de comparação do ligante LAE com o seu respectivo complexo de Fe(III)Zn(II), CAE_FeZn.

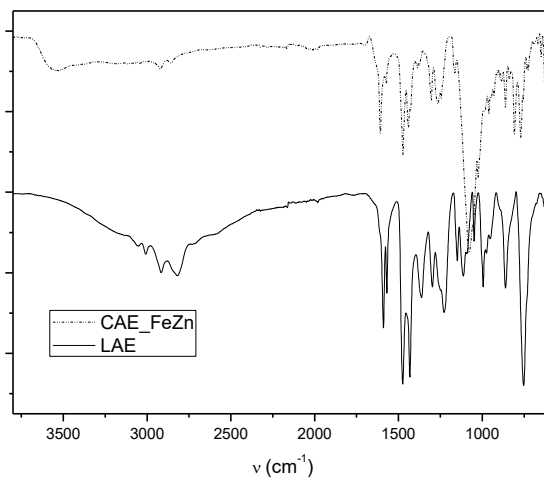
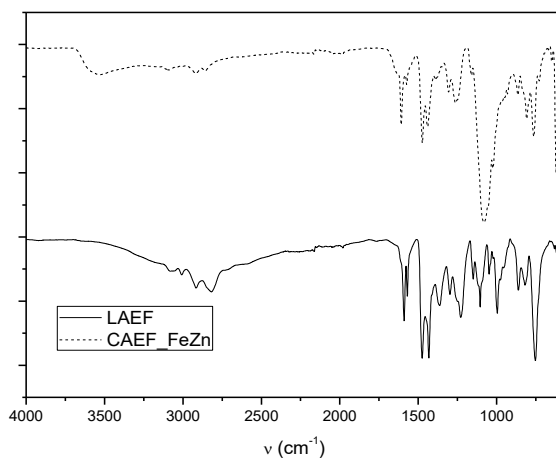


Figura 23. Espectros de infravermelho de comparação do ligante LAEF com o seu respectivo complexo de Fe(III)Zn(II), CAEF_FeZn.



5.2.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio - RMN ¹H

Apesar dos espectros de infravermelho serem capazes de mostrar funções orgânicas e ligações específicas em cada molécula, o uso de apenas essa técnica não é o ideal para a caracterização dos ligantes propostos, sendo necessária a combinação desta com outras. (SILVERSTEIN, BASSLER *et al.*, 1994)

Um outro modo de comprovar a obtenção dos ligantes propostos é através da técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. A medida que as reações foram sendo realizadas, cada produto final foi analisado pela técnica de ressonância, e as mudanças estruturais decorrentes das etapas de síntese puderam ser acompanhadas pelos espectros de RMN obtidos para cada pró-ligante.

A Tabela 2 mostra os valores dos principais deslocamentos químicos e os números de hidrogênio para o pró-ligante e ligantes finais.

Tabela 2. Valores de deslocamento químico (em ppm) dos hidrogênios dos ligantes, e suas integrais (nH) para os compostos H₂py₃mff, LAE e a LAEF.

Atribuições	H ₂ py ₃ mff	LAE	LAEF
CH ₃	1,92 (3H)	2,20 (6H)	2,19 (6H)
	1,94 (3H)		
CH ₂	3,45-3,57 (12H)	2,62 (2H)	2,71 (4H)
		2,76 (2H)	3,46 (2H)
		3,73-3,85 (14H)	3,73-3,86 (14H)
CH _{Ar}	6,56-6,63 (3H)	6,86 (4H)	4,06-4,18 (9H)
	6,87 (4H)	7,13 (3H)	6,85 (4H)
	7,10-7,12 (3H)	7,42 (3H)	7,14 (3H)
	7,31 (3H)	7,59 (3H)	7,42 (3H)
	8,26 (3H)	8,54 (3H)	7,58 (3H)
			8,54 (3H)
CH _{ald}	10,01 (1H)	-	-

Como pode ser observado na Tabela 2, através da integração dos picos de cada espectro pelo programa *ACD/NMR Processor Academic Edition*, foi obtido o número de hidrogênios presentes em cada amostra analisada por RMN de ¹H. Quando comparado com o número de hidrogênios que a molécula a ser

sintetizada deveria ter, a equivalência nesses números ajuda a provar que o composto pretendido foi sintetizado. Um exemplo dessas mudanças no espectro pode ser observada pelo aumento do número de hidrogênios após as reações com a diamina e depois, com a adição da unidade ferroceno (9H aromáticos).

A análise da região onde esses hidrogênios são observados (deslocamento químico) e a presença ou não de sinais característicos de cada molécula também auxilia na caracterização dos ligantes por essa técnica. Um exemplo é o sinal do hidrogênio em 10,01 ppm referente ao hidrogênio do aldeído do H_2Py_3mff , que está ausente no espectro após a reação de aminação redutiva com a 1,2-etilenodiamina. Desse modo, pode-se constatar que os ligantes foram sintetizados com sucesso e também com bom grau de pureza, percebido pela ausência de sinais díspares dos esperados, que poderiam ser de possíveis impurezas ou reagentes remanescentes, o que permitiu a sequência do projeto e assim, a síntese dos complexos binucleares.

5.2.3 Espectrometria de massas (ESI-MS)

Além das outras técnicas espectroscópicas, outra análise realizada a fim de corroborar as estruturas pretendidas nesse trabalho foi a de espectrometria de massas, através de uma ionização da solução dos compostos analisados via descarga de elétrons (ESI-MS).

Como pode ser observado na Figura 24, o fragmento correspondente ao ligante LAE acrescido de 1 próton foi encontrado na forma de pico base, sem muitas fragmentações, apresentando o perfil isotópico correspondente a sua estrutura composta apenas de carbono e hidrogênio. De forma similar, mostrado na Figura 25, o fragmento do ligante LAEF também foi encontrado na forma de pico base, tendo seu perfil experimental combinando com o perfil isotópico de ferro, mostrando a adição da unidade contendo ferro na sua estrutura. A diferença sutil entre os dois compostos e seus respectivos espectros se dá pela fragmentação, já que o espectro do ligante LAEF apresenta um número um pouco maior de fragmentações. Isso se deve ao fato da adição do ferroceno na estrutura, que além de aumentar a massa e consequentemente aumentar as chances de

fragmentação, também conta com a característica do ferroceno de oxidar mais facilmente na solução preparada para a análise.

Figura 24. Espectro de ESI-MS em CH_3CN grau MS do ligante LAE e seu fragmento $[\text{LAE}+1\text{H}]^+$ (pico base), com sua respectiva distribuição isotópica.

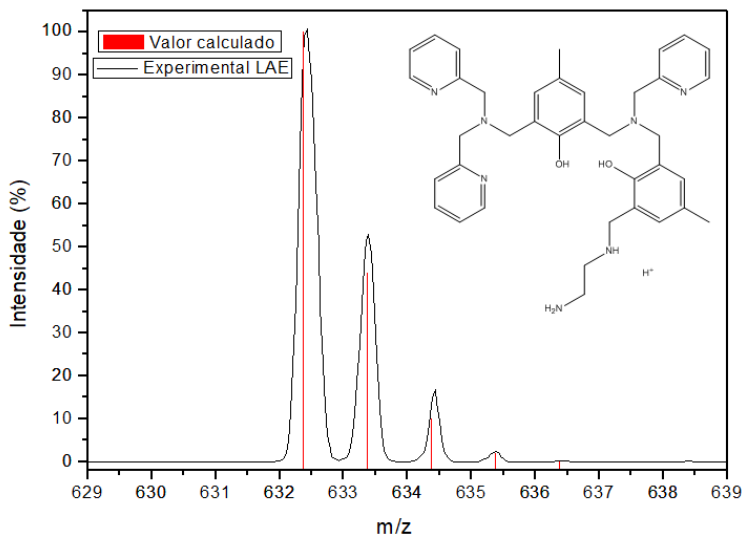
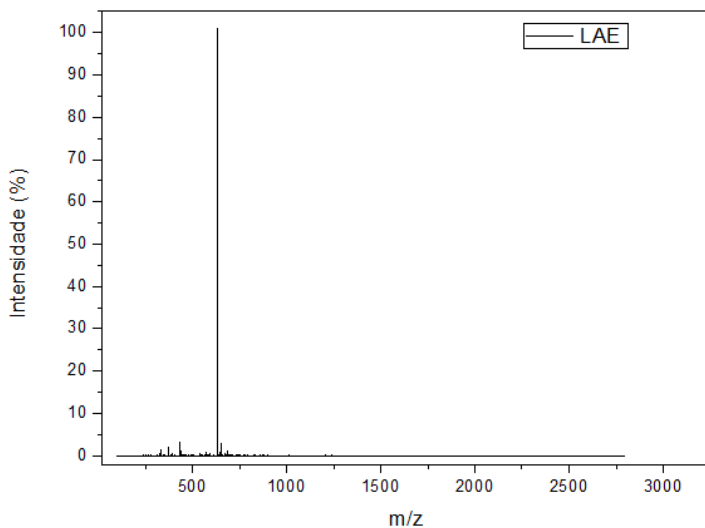
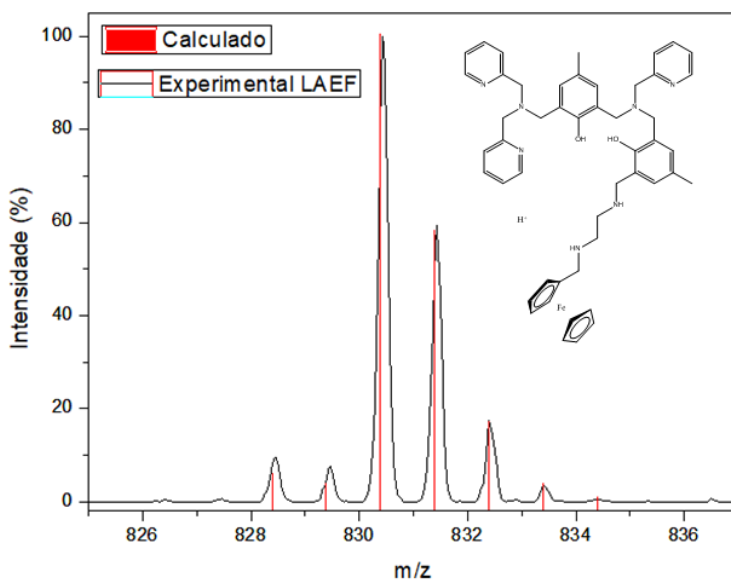
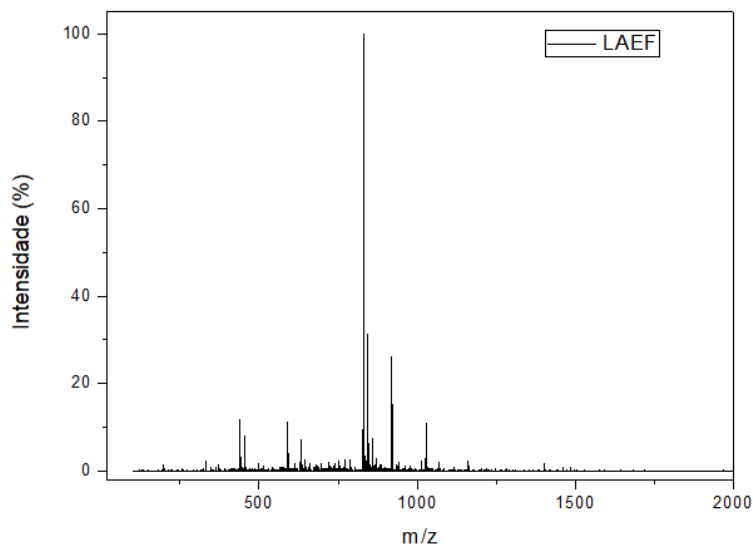


Figura 25. Espectro de ESI-MS em CH_3CN grau MS do ligante LAEF e seu fragmento $[\text{LAEF}+\text{H}]^+$ (pico base), com sua respectiva distribuição isotópica.



Sabe-se que o ferroceno em si é uma molécula bastante estável, porém quando utilizado ancorado à compostos orgânicos maiores, como é o caso do ligante LAEF e do complexo CAEF_FeZn sintetizados nesse trabalho, e em solução, como é o caso na análise de massas, essa característica se mostrou diminuída.

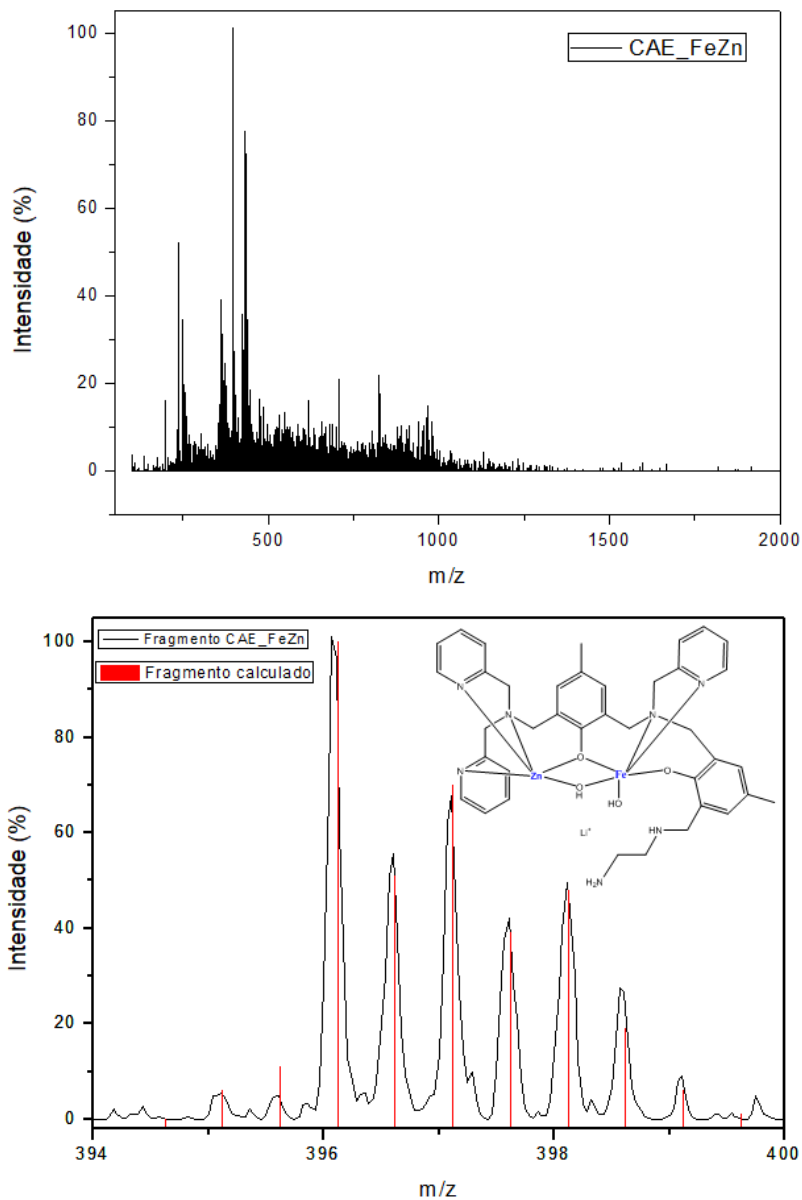
No ligante, por ser um composto relativamente pequeno e de menor complexidade, a fragmentação foi menor, ainda apresentando o pico base com o fragmento do ligante LAEF protonado, mostrando que a espectrometria de massas é plausível para a caracterização do ligante contendo o organometálico. Por outro lado, seu respectivo complexo binuclear CAEF_FeZn apresentou um grande número de fragmentos, mesmo quando testado em diversas condições, utilizando mais de uma amostra, não sendo possível encontrar nenhum fragmento relevante que correspondesse ao complexo sintetizado em sua forma "completa". Isso acaba mostrando que quanto maior a estrutura do composto, somado à presença do ferroceno na estrutura, maior a instabilidade do composto frente a espectrometria de massas. Devido a presença do organometálico, pode ocorrer um grande número de fragmentações, tornando difícil o uso dessa técnica para a caracterização do complexo binuclear.

Para o complexo CAE_FeZn, mesmo com fragmentações devido ao tamanho da molécula, observou-se um pico base correspondente ao íon molecular com carga +2 acrescido de um íon lítio, provavelmente proveniente das vidrarias utilizadas, e um próton, como mostra a Figura 26 e na Tabela 3. Seu perfil isotópico teórico é concordante com o experimental, mostrando que na estrutura há a presença dos íons de ferro e zinco, ajudando a corroborar a estrutura.

Tabela 3. Espécies obtidas para os ligantes LAE e LAEF, e para o complexo CAE_FeZn na análise de ESI-MS e suas razões *m/z*.

	Espécie	<i>m/z</i>
LAE	[LAE+1H] ⁺	632,38
LAEF	[LAEF+1H] ⁺	830,38
CAE_FeZn	[CAE_FeZn+Li+1H] ⁺²	396,13

Figura 26. Espectro de ESI-MS em CH_3CN grau MS do complexo CAE_FeZn e seu fragmento $[\text{CAE_FeZn}+\text{Li}+\text{H}]^{+2}$ (pico base), com sua respectiva distribuição isotópica.



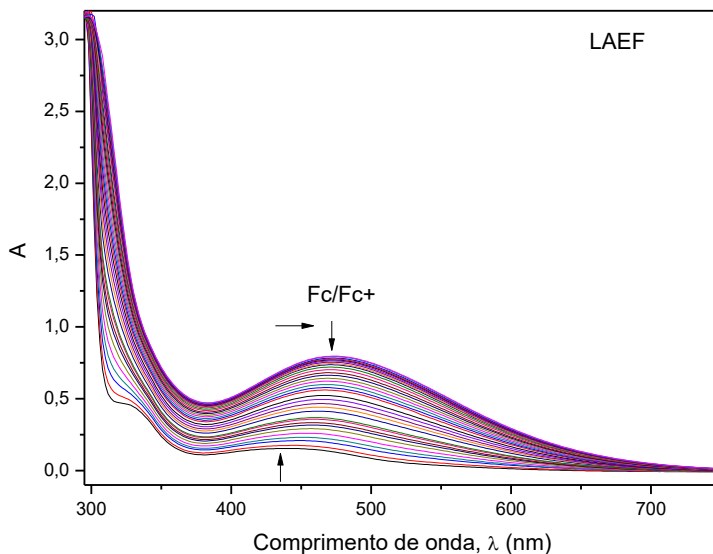
5.2.4 Espectroscopia na região do ultravioleta e visível - UV-Vis

A presença da unidade ferroceno já na estrutura do ligante LAEF permite que o mesmo possa ser caracterizado por mais técnicas que as normalmente utilizadas para tal, utilizando-se de sua propriedade de sofrer reações redox, formando o par ferroceno/ferrocínio (Fc/Fc^+) quando oxidado por algum agente oxidante. (ORNELAS, 2011) Desse modo, o ligante LAEF, que contém a unidade ferroceno, foi analisado através de espectroscopia na região do ultravioleta visível, utilizando uma solução com o oxidante $Ce(IV)$ (solução em metanol de $(NH_4)_2Ce^{IV}(NO_3)_6$), a fim de oxidar o ferroceno do LAEF à ferrocínio.

O espectro UV-vis do ferroceno é composto basicamente de 3 bandas principais, sendo uma de transferência de carga de alta intensidade na região do UV distante, e duas de baixa intensidade, do tipo $d-d$, em 440 nm e 325 nm, com ϵ de $96 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $55 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente. (SØRENSEN, NIELSEN, 2011).

Baseado nessas informações, foi realizado uma espécie de titulação com o ligante, adicionando-se alíquotas do oxidante $Ce(IV)$ e medindo o espectro da solução resultante, mostrada na Figura 27. Como esperado, a solução contendo apenas o ligante LAEF, por conter a unidade ferroceno, apresentou duas bandas, uma em 323 nm e outra em 438 nm, tendo um pequeno deslocamento devido a adição da parte orgânica na estrutura. A medida que foram sendo adicionadas as alíquotas de $Ce(IV)$, o ferroceno foi oxidando, tornando-se ferrocínio, o que causou a diminuição até basicamente a extinção da banda em 325 nm e deslocando a banda característica em 440 nm para 475 nm, mais próxima dos valores obtidos para a espécie pura do ferrocínio, (TROJÁNEK, LANGMAIER *et al.*, 2011), apresentando valores de ϵ bem mais elevados (na faixa de 700 a $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), mostrando que a formação do ferrocínio proporciona a presença de banda de transferência de carga TCML na estrutura, o que ajuda a comprovar a presença do organometálico na estrutura do ligante LAEF.

Figura 27. Espectro na região do UV-Vis do ligante LAEF em metanol grau espectroscópico. Ligante $[LAEF] = 9,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com posteriores adições de $10 \text{ } \mu\text{L}$ de uma solução $[(\text{NH}_4)_2\text{Ce}^{\text{IV}}(\text{NO}_3)_6] = 1,03 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

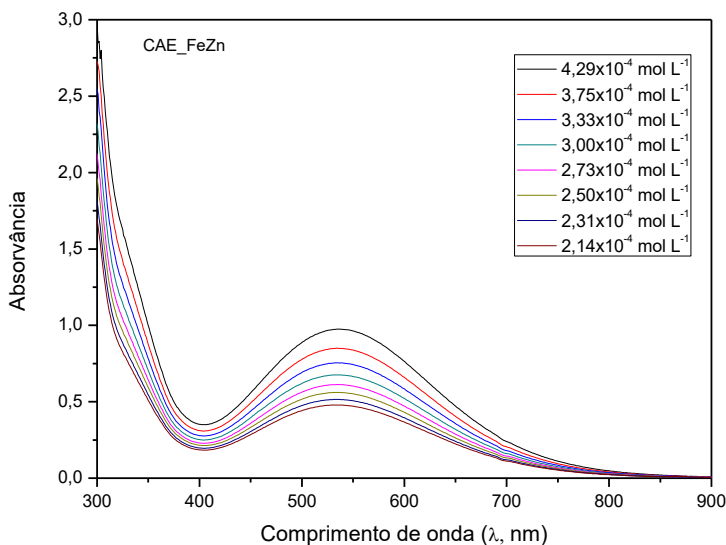


Os espectros da região do UV-vis dos complexos binucleares, tanto CAE_FeZn (Figura 28) quanto CAEF_FeZn (Figura 29), apresentaram bandas intensas na faixa entre 500 e 600 nm, que são referentes às transferências de carga ligante \rightarrow metal (TCLM) dos orbitais $\pi\pi$ do fenolato do ligante para os orbitais $d\pi^*$ do íon Fe(III). (GABER, MISKOWSKI *et al.*, 1974).

Para o complexo sem o ferroceno, a TCLM foi detectada em um $\lambda_{\text{máx}}$ de 537 nm com $\epsilon = 2320,9 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, enquanto que o complexo que apresenta o organometálico teve a banda em um $\lambda_{\text{máx}}$ de 504 nm com $\epsilon = 1754,3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ambos os valores condizem com os obtidos para os compostos semelhantes propostos na literatura, que apresentam os mesmos sítios ativos e ambientes de coordenação, e também com a própria enzima fosfatase ácida púrpura. (JOVITO, 2010);

(HEYING, 2014); (CAMARGO, 2013); (SCHENK, MITIĆ *et al.*, 2013).

Figura 28. Espectro na região do UV-Vis do complexo CAE_FeZn em acetonitrila grau espectroscópico. $[CAE_FeZn]_{inicial}$ na cubeta = $4,29 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Medidas seguintes feitas após sucessivas adições de 100 μ L de CH₃CN, até $[CAE_FeZn]_{final}$ = $2,14 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 537 nm; ϵ = 2320,9 L mol⁻¹ cm⁻¹.

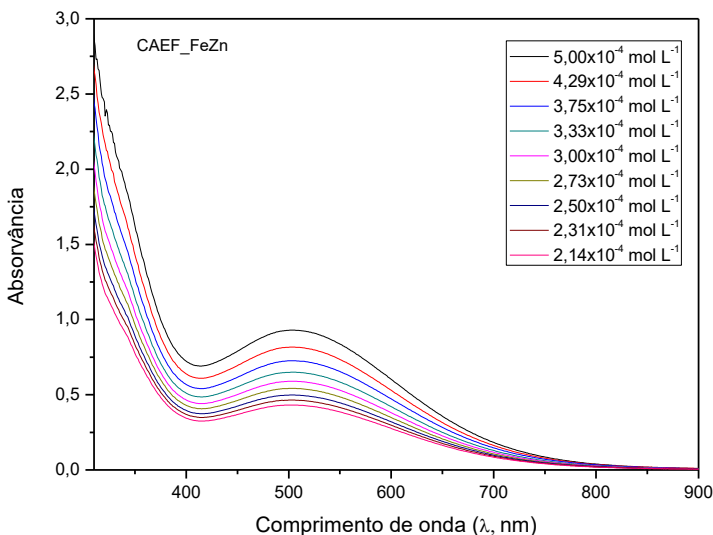


Quando comparado o valor da banda TCLM do complexo CAEF_FeZn com o seu semelhante CABF_FeZn (MELLER, 2015), que apresenta um $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 482 nm com ϵ = 2164 L mol⁻¹ cm⁻¹, percebe-se uma diferença devido a mudança na estrutura. Nos dois complexos há a unidade ferroceno, porém no CAEF_FeZn o espaçador entre o organometálico e a primeira esfera de coordenação é uma cadeia de 2 carbonos, enquanto no CABF_FeZn é uma cadeia composta por 4 carbonos. Essa diferença de tamanho e possível mobilidade da cadeia mostra que, de algum modo, a presença da cadeia lateral da diamina com o ferroceno, seja por atrações com o organometálico ou por ligações de hidrogênio da amina lateral, podem vir a interferir de

maneira relevante na densidade eletrônica inferida ao Fe(III) do complexo, gerando o deslocamento de $\lambda_{\text{máx}}$ e no valor de ϵ . Isso mostra que há sim um efeito de segunda esfera sendo gerado na molécula, a ponto de alterar os valores de densidade eletrônica do metal trivalente do sítio ativo, resultando em valores diferentes para cada estrutura, apenas pela modificação da segunda esfera.

Outras bandas passíveis de ser detectadas nessa região do espectro, são as transições *d-d* do íon Fe(III) e do ferroceno do ligante LAEF, porém estas não puderam ser observadas pois ficaram suprimidas pela TCLM na região de 500-600 nm, que é também a região onde seriam observadas essas transições. (SØRENSEN, NIELSEN, 2011); (SHRIVER, ATKINS, 2008).

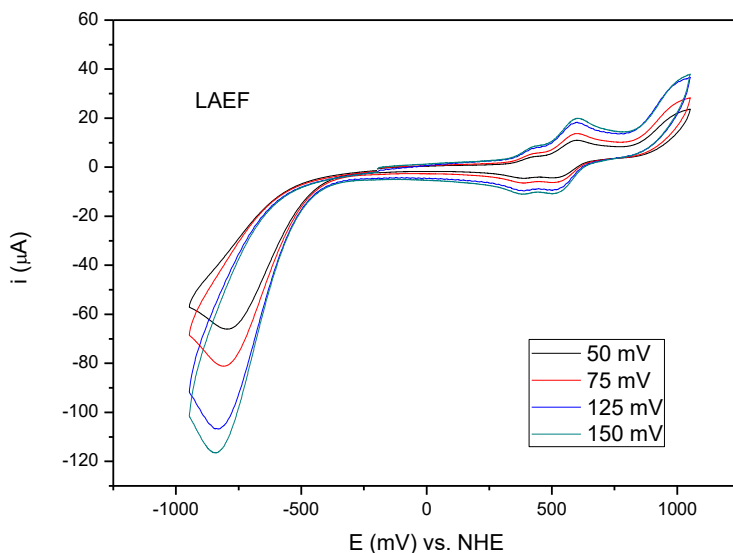
Figura 29. Espectro na região do UV-Vis do complexo CAEF_FeZn em acetonitrila grau espectroscópico. $[\text{CAEF_FeZn}]_{\text{inicial}}$ na cubeta = $5,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Medidas seguintes feitas após sucessivas adições de 100 μL de CH_3CN , até $[\text{CAEF_FeZn}]_{\text{final}} = 2,14 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{máx}} = 504 \text{ nm}$; $\epsilon = 1754,3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



5.2.5 Eletroquímica

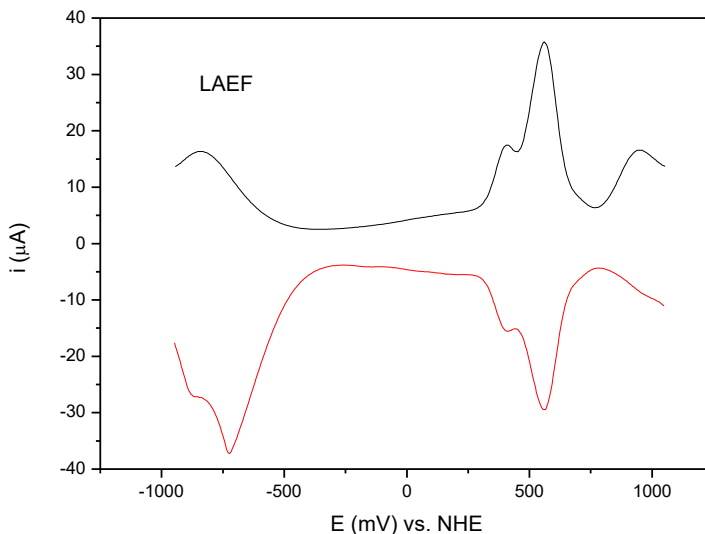
Pelo mesmo fato que pode ser caracterizado por UV-vis, o ligante LAEF pode ter a presença do ferroceno (pelo seu potencial eletroquímico de oxidação reversível, (PEREIRA, VENZKE *et al.*, 2013)) confirmada em sua estrutura por técnicas eletroquímicas, como voltametria cíclica (Figura 30) e voltametria de onda quadrada (Figura 31).

Figura 30. Voltametria cíclica do ligante LAEF em acetonitrila na presença de TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte e ferroceno como padrão interno ($E_{1/2}$ vs NHE = +400 mV); (GAGNÉ, KOVAL *et al.*, 1980) $E_{1/2} = +404,5$ mV e $E_{1/2} = +559,5$ mV.



Como pode ser visto na Figura 30 e 31, há uma diferença do normalmente encontrado para estruturas contendo ferroceno. Na voltametria cíclica, há 2 processos distintos: um com $E_{1/2} = +404,5$ mV e outro com $E_{1/2} = +559,5$ mV, vs NHE. O mesmo é apresentado na voltametria de onda quadrada (Figura 31): 2 processos com $E_{1/2} = +405$ mV e $E_{1/2} = +560$ mV.

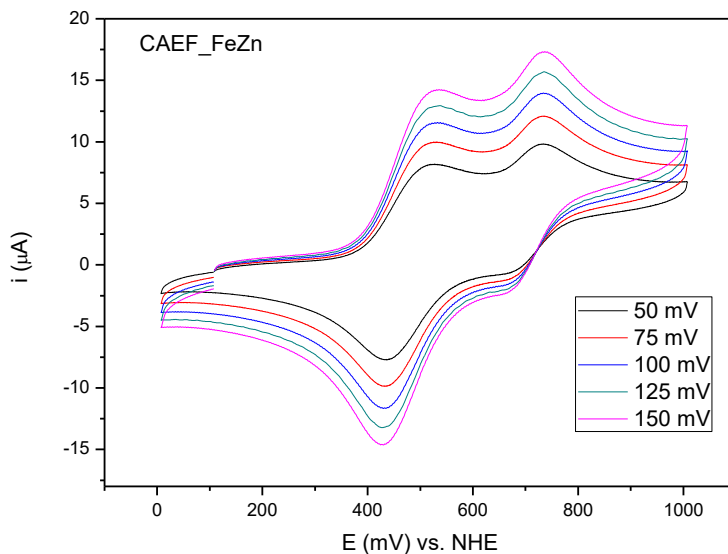
Figura 31. Voltametria de onda quadrada do ligante LAEF em acetonitrila na presença de TBAPF_6 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte e ferroceno como padrão interno ($E_{1/2}$ vs NHE = +400 mV); (GAGNÉ, KOVAL *et al.*, 1980). $E_{1/2} = +405 \text{ mV}$ e $E_{1/2} = +560 \text{ mV}$.



Algo semelhante foi relatado por You e Dehnen, que ao analisar o voltamograma cíclico e de pulso diferencial do composto por eles sintetizado ($[(\text{R}^{\text{Fc}}\text{Sn})_4\text{Sn}_6\text{S}_{10}]$, ver Anexo I), percebeu que o fato de ter mais de uma molécula de ferroceno em sua estrutura fazia com que houvesse mais de um comportamento redox para o centro de ferro do organometálico. (YOU, DEHNEN, 2013). Entretanto, no caso do trabalho aqui apresentado, não houve nenhuma indicação de que haja outra unidade ferroceno inserida na mesma molécula, como pode ser comprovado por RMN e ESI-MS. Desse modo, a presença de dois processos distintos para o organometálico mostra que por meio de alguma interação no sistema, há uma espécie de comunicação eletrônica, ou entre duas unidades distintas do ferroceno de moléculas diferentes, ou pela formação de algum equilíbrio entre espécies formadas pelas interações do organometálico com o sistema no qual está inserido.

O mesmo comportamento pode ser visto na Figura 32, que corresponde à região da faixa de potencial redox característica do ferroceno, mas agora no complexo binuclear de Fe/Zn, o CAEF_FeZn.

Figura 32. Voltametria cíclica da região correspondente aos processos do ferroceno do complexo CAEF_FeZn em acetonitrila na presença de TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte e ferroceno como padrão interno ($E_{1/2}$ vs NHE = +400 mV); (GAGNÉ, KOVAL *et al.*, 1980) $E_{1/2} = +469,5$ mV e $E_{1/2} = +705$ mV.



Como visto pelos valores encontrados para os potenciais de meia onda $E_{1/2} = +469,5$ mV e $E_{1/2} = +705$ mV, há uma mudança nos potenciais do ferro do metaloceno quando há a formação do complexo, mas o equilíbrio das espécies de ferroceno se mantém. Desse modo, percebe-se que a mudança no ambiente de coordenação, pela coordenação dos íons metálicos, modifica de alguma forma a densidade eletrônica do íon ferro da estrutura do ferroceno, mudando seu potencial de

meia-onda, mostrando mais uma vez que há algum tipo de interação intramolecular entre o organometálico e o sítio ativo.

Além do ferro do ferroceno, há no complexo CAEF_FeZn os íons de Fe(III) e Zn(II). Sabendo-se que o zinco não apresenta atividade redox na faixa de potencial estudada (PERALTA, BORTOLUZZI *et al.*, 2010), espera-se encontrar potenciais de oxirredução para o íon férrico. Por voltametria de onda quadrada para CAEF_FeZn (Figura 33) foi possível detectar um processo referente à redução do $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ com $E_{1/2} = -132$ mV. Outro processo de redução para o íon ferro também apareceu com $E_{1/2} = -311$ mV. Já para o complexo CAE_FeZn (Figura 34), os valores obtidos foram $E_{1/2} = -144$ mV e $E_{1/2} = -396$ mV (Tabela 4).

Figura 33. Voltametria de onda quadrada do complexo CAEF_FeZn em acetonitrila na presença de TBAPF_6 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte e ferroceno como padrão interno ($E_{1/2}$ vs NHE = +400 mV); (GAGNÉ, KOVAL *et al.*, 1980) Processos: $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$: $E_{1/2} = -132$ mV e $E_{1/2} = -311$ mV

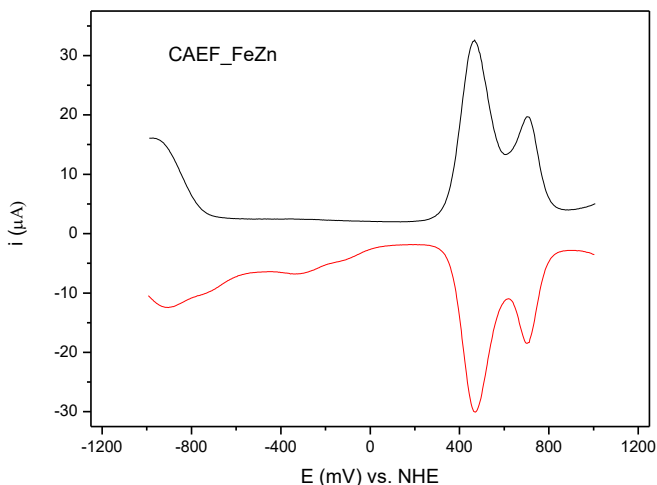


Figura 34. Voltametria de onda quadrada do complexo CAE_FeZn em acetonitrila na presença de TBAPF₆ 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte e ferroceno como padrão interno ($E_{1/2}$ vs NHE = +400 mV); (GAGNÉ, KOVAL *et al.*, 1980) Processos: Fe⁺³/Fe⁺²: $E_{1/2}$ = -144 mV e $E_{1/2}$ = -396 mV

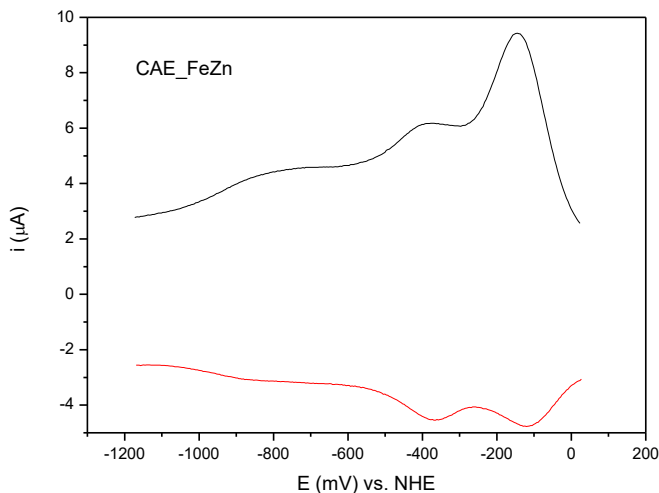


Tabela 4. Valores de $E_{1/2}$ para os processos referentes a Fe⁺³/Fe⁺² obtidos por voltametria de onda quadrada para os complexos CAEF_FeZn e CAE_FeZn.

	$E_{1/2}$ 1	$E_{1/2}$ 2
CAEF_FeZn	-132 mV	-311 mV
CAE_FeZn	-144 mV	-396 mV

De acordo com a literatura, nesse tipo de complexo há bastante interferência nos valores dos potenciais redox pela variação de pH do meio. Para a espécie Fe-OH₂ o potencial é próximo a -60 mV vs. NHE em pH = 3,5, enquanto que a espécie Fe-OH é formada próximo a -200 mV vs. NHE, em pH = 6,5, em experimentos em meio aquoso. (LANZMASTER, NEVES *et al.*, 2007). Como os experimentos realizados para CAEF_FeZn e

CAE_FeZn foram realizados em acetonitrila, os valores não podem ser comparados fielmente entre si. Porém, é possível que para o complexo CAEF_FeZn, o $E_{1/2} = -132$ mV e $E_{1/2} = -311$ mV correspondam as espécies Fe-OH₂ e Fe-OH, respectivamente, tendo valores mais negativos devido a interações ferroceno-etilenodiamina com o Fe(III), podendo até mesmo incluir alguma possível ligação do tipo Fe(III)-N, resultando em duas espécies em equilíbrio.

Para o complexo CAE_FeZn, que não contém o ferroceno, os valores de $E_{1/2}$ apresentaram o mesmo padrão, sendo $E_{1/2} = -144$ mV e $E_{1/2} = -396$ mV. Baseado nas estruturas dos complexos pode-se concluir que o efeito que causa esse processo tão negativo é causado pela cadeia lateral da etilenodiamina, que é o que há de semelhança nas duas moléculas, através de possíveis ligações de hidrogênio.

A medida que há essas ligações de hidrogênio da amina com o Fe do centro metálico, o íon metálico sofre interferência em seu potencial redox, nesse caso deixando o valor mais negativo. Essa influência da amina fica ainda mais evidente quando se considera que no complexo CAE_FeZn um grupo NH₂ dessa amina lateral se encontra "solto", interagindo mais facilmente com o ferro, diminuindo 85 mV do processo, quando comparado ao processo do complexo onde há o ferroceno nessa "ponta solta" da amina lateral, atrapalhando um pouco esse tipo de interação, tanto eletrônica quanto estericamente.

As influências e diferenças nos processos eletroquímicos do íon férrico e do ferro do ferroceno apontam mais uma vez que há interações significantes da parte externa do ligante no sítio ativo do complexo, mostrando o potencial efeito da segunda esfera de coordenação do sistema estudado.

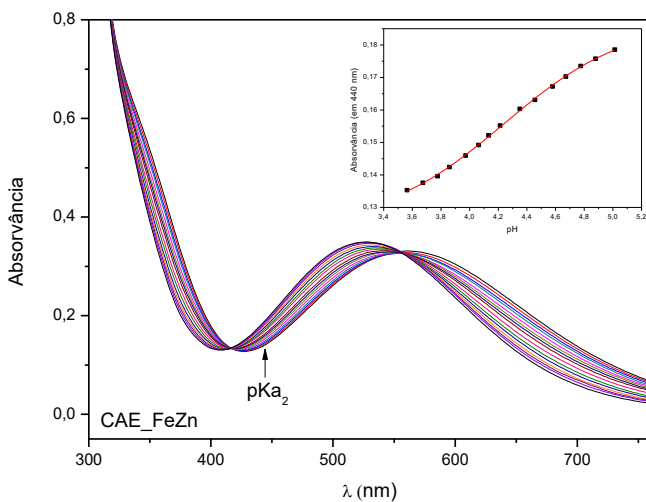
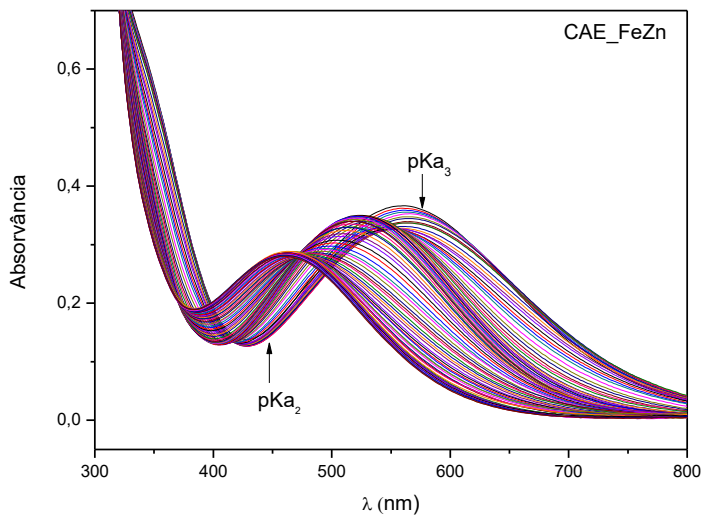
5.2.6 Titulação espectrofotométrica

A fim de verificar se, de modo semelhante aos complexos de sítio ativo similares contidos na literatura, há moléculas de água coordenadas aos metais, fez-se um estudo da titulação espectrofotométrica, para se verificar os valores de pKa da desprotonação dessas águas coordenadas ao sítio ativo dos complexos CAE_FeZn e CAEF_FeZn, e também os equilíbrios de espécies geradas em diferentes pHs.

Para ambos os complexos foi encontrado valores referentes aos pKas da desprotonação da água coordenada ao Fe(III) e também ao Zn(II). O primeiro pKa obtido é referente à desprotonação da água ligada ao Fe(III), já que o metal divalente é um ácido de Lewis mais forte, sendo mais fácil a retirada do próton de uma molécula de água ali coordenada. O segundo pKa obtido é referente à água coordenada ao Zn(II), obtido apenas em regiões de pH mais elevados quando comparado ao Fe(III). Valores de pKa da desprotonação da ponte entre os metais e também das aminas não puderam ser obtidas através da técnica, já que as regiões nas quais as mesmas seriam obtidas (pHs baixos e maiores de 8, respectivamente, de acordo com complexos previamente estudados (HEYING, 2014); (CAMARGO, 2013); (JOVITO, 2010)), há muita instabilidade de voltagem devido ao equilíbrio das espécies presentes, fazendo com que a técnica não seja a ideal para a obtenção desses pKas específicos.

As Figuras 35 e 36 a seguir mostram os perfis obtidos para os complexos CAE_FeZn e CAEF_FeZn, e seus valores de pKas estão apresentados na Tabela 5. Como se pode notar em ambos os perfis, o aumento do pH do meio gera um deslocamento do tipo hipsocrômico (para maiores energias) do comprimento de onda máximo da banda de transferência de carga TCLM, fenolato \rightarrow Fe(III). Isso acontece devido à mudança do ligante coordenado ao Fe(III), que muda de H₂O para OH com o aumento do pH durante a titulação. Essa desprotonação do ligante gera um aumento na densidade eletrônica no átomo de ferro, que resulta em uma maior diferença de energia entre o orbital $\pi\pi$ do fenolato e do $d\pi^*$ do metal. (HORN, VENCATO *et al.*, 2005).

Figura 35. Titulação espectrofotométrica do complexo CAE_FeZn nas condições $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v) a 25 °C, 0,1 mol L⁻¹ em KCl. $[\text{CAE_FeZn}] = 2,14 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.



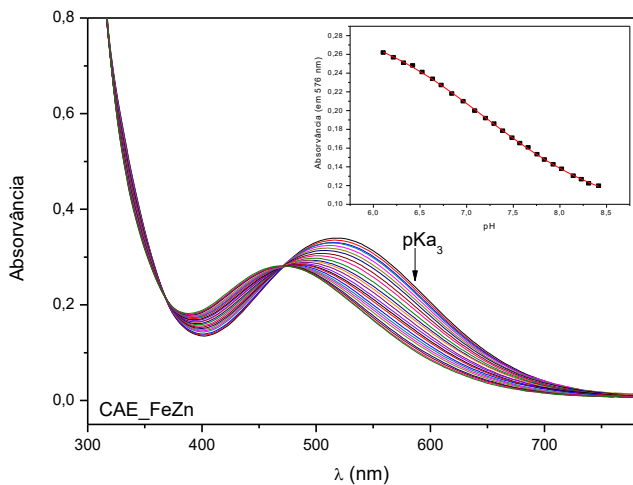
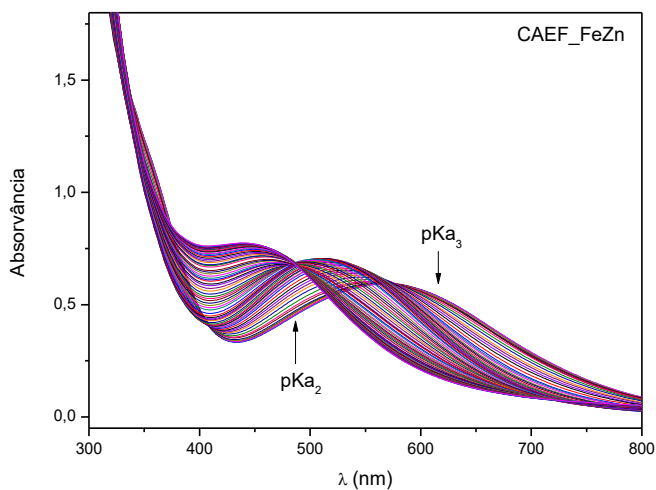


Figura 36. Titulação espectrofotométrica do complexo CAEF_FeZn nas condições $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v) a 25 °C, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em KCl. $[\text{CAEF_FeZn}] = 2,84 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.



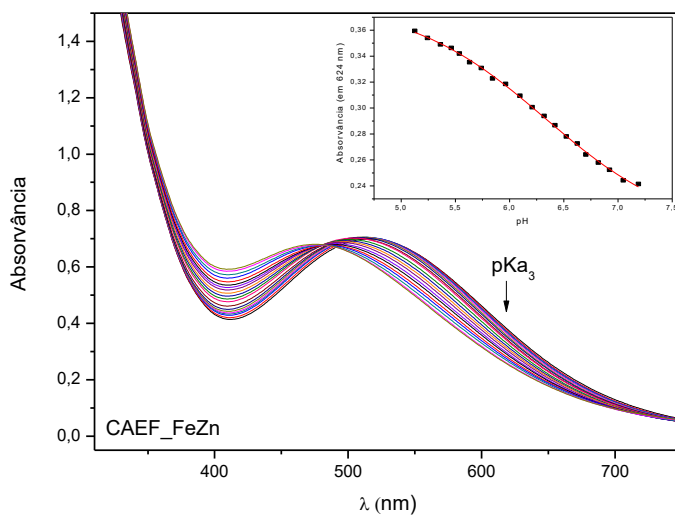
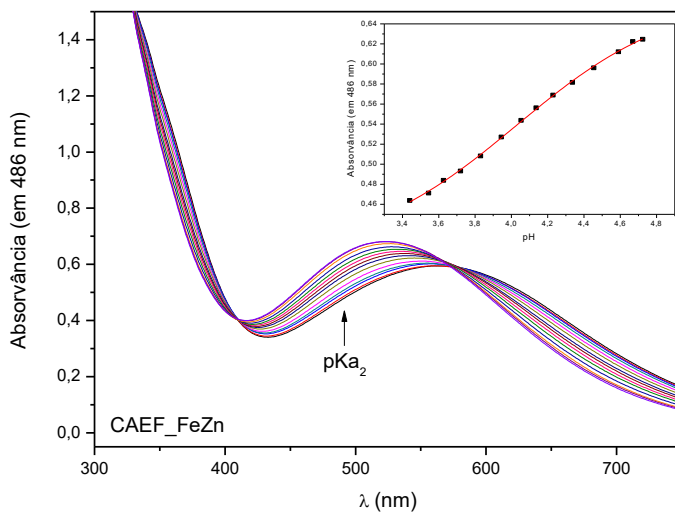


Tabela 5. Valores de pKa para os complexos CAE_FeZn, CAEF_FeZn, FeZnH₂L_{Hex}^{a,x}, FeZnLAB^{b,x}.

	pKa ₂	pKa ₃
CAE_FeZn	4,24	7,18
CAEF_FeZn	4,03	6,32
FeZnH₂L_{Hex}	4,27	7,29
FeZnLAB	4,08	7,61

^a: (HEYING, 2014) ^b: pKas potenciométricos (CAMARGO, 2013)

^x: Estruturas no Anexo I.

Os valores dos pKas obtidos para o complexo CAE_FeZn são condizentes com os valores da literatura, cujas estruturas são semelhantes, sendo que todas tem cadeias laterais de diamina, sendo o CAE_FeZn uma cadeia lateral com a 1,2-etilendiamina, o FeZnLAB com a 1,4-butanodiamina, e o FeZnH₂L_{Hex} com a 1,6-hexanodiamina. Já para o complexo contendo o ferroceno, CAEF_FeZn, nota-se uma diminuição dos valores de pKa quando comparados a todos os complexos analisados, cuja diferença é a "falta" do metaloceno. Essa mudança ocorre tanto na desprotonação da molécula de água ligada ao ferro, gerando a espécie (OH)Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II}(H₂O) quando ao zinco, gerando (OH)Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II}(OH), remetendo à interações do grupamento organometálico, que intervém na densidade eletrônica dos metais complexados, interferindo também na acidez de Lewis desses metais, baixando os valores de pKa, demonstrando mais uma vez a interferência criada pela inserção do ferroceno como efeito de segunda esfera.

5.3 ESTUDOS DE REATIVIDADE NA HIDRÓLISE DO SUBSTRATO 2,4-BDNPP

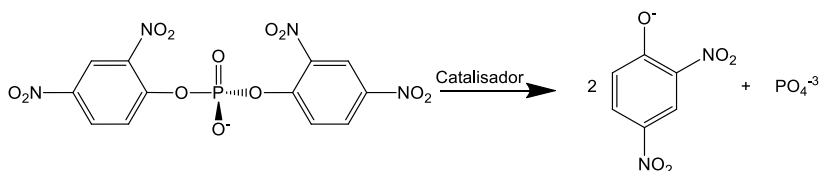
Como objetivo desse trabalho, os complexos CAEF_FeZn e CAE_FeZn foram sintetizados na tentativa de se desenvolver um composto modelo biomimético contendo efeito de segunda esfera de coordenação para a enzima hidrolítica PAP. Do mesmo modo que os complexos são considerados miméticos de enzima, há também o mimético das ligações de fosfato, o 2,4-BDNPP (Figura 37), que funciona como um substrato modelo para ésteres de fosfato. A reação dos complexos com esse substrato

modelo é então uma maneira de se testar a atividade catalítica dos complexos biomiméticos estudados. (PERALTA, BORTOLUZZI *et al.*, 2010)

A síntese dos complexos foi realizada pensando-se no mecanismo proposto da própria PAP, mostrado no Anexo II, no qual o substrato se aproxima da enzima, coordenando-se ao centro M(II), que é a posição mais lábil, deixando o centro Fe(III), um ácido mais forte, gerar no meio a espécie nucleofílica hidróxido, através de desprotonação da água antes ali coordenada (Fe-OH). Essa espécie nucleofílica então ataca o substrato, clivando a ligação de éster de fosfato. (KLABUNDE, STRÄTER *et al.*, 1996).

Baseado nesse mecanismo, os complexos sintetizados atuam de um modo similar na catálise do substrato modelo estudado: o substrato se ligaria ao Zn(II), enquanto a espécie Fe(III) gera *in situ* o eletrófilo (Fe-OH), fazendo essa espécie hidróxido atacar o substrato, liberando o 2,4-dinitrofenolato (Figura 37), que é detectado espectrofotometricamente na região de 400 nm. (SMITH, PERALTA *et al.*, 2012)

Figura 37. Reação de hidrólise do substrato modelo para ligações de ésteres de fosfato, 2,4-BDNPP, utilizando os complexos biomiméticos CAE_FeZn e CAEF_FeZn como catalisadores.



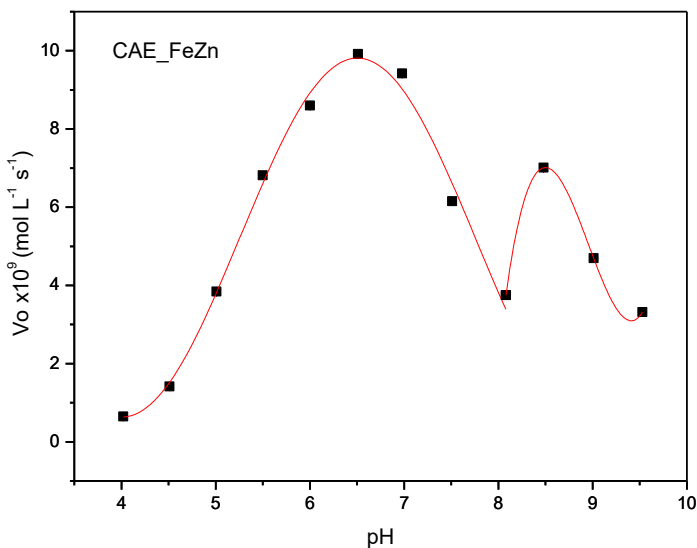
Para ambos os complexos foram realizados experimentos em triplicata da atuação do complexo como catalisador na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP, a 25 °C, com excesso de substrato, seguindo uma cinética de pseudo-primeira ordem. Primeiro, foram realizados testes buscando-se o pH ótimo de atuação e depois verificando os efeitos da adição crescente de substrato do meio.

Para se testar o pH ótimo para a reação, foram realizados testes da hidrólise do 2,4-BDNPP pelos complexos em 12 diferentes pHs, de 4,0 até 9,5. Os perfis gráficos na forma de

sino obtidos para os complexos, com pH ótimo para ambos em 6,50, são apresentados na sequência, nas Figuras 38 e 39.

A espécie que predomina em pHs mais baixos é $(OH)_2Fe^{III}(\mu OH)Zn^{II}(OH)_2$, mas à medida que o pH vai aumentando, ou seja, o meio vai ficando mais básico, há a desprotonação da água coordenada ao ácido de Lewis mais forte, que nesse caso é o Fe(III), formando a espécie $(OH)Fe^{III}(\mu OH)Zn^{II}(OH)_2$, que vai aumentando em concentração até atingir o seu máximo valor, no pH 6,50. Como essa espécie desprotonada é a que apresenta o nucleófilo para a clivagem da ligação de éster de fosfato do substrato modelo, no ponto onde houver a maior concentração dessa espécie, em pH 6,50, é onde haverá a maior atividade catalítica.

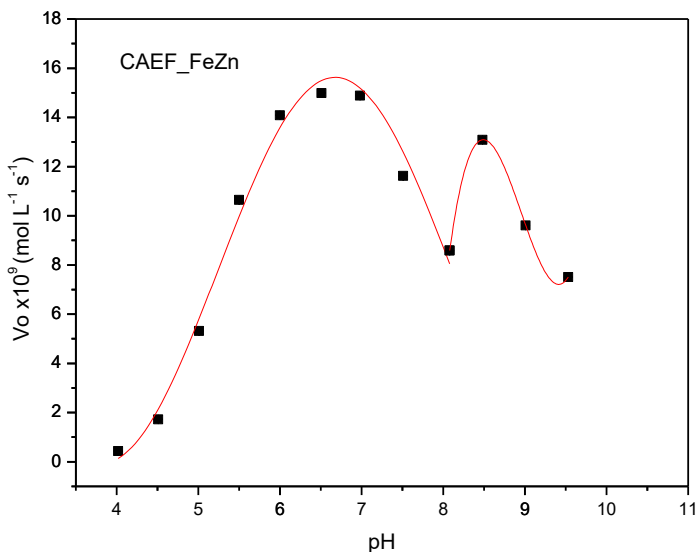
Figura 38. Dependência da velocidade inicial do complexo CAE_FeZn em função do pH para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP. Condições: CH_3CN/H_2O (1:1, v/v); $[Complexo] = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[Substrato] = 3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[tampão] = 5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $I = 5 \times 10^{-2} \text{ LiClO}_4 \text{ mol L}^{-1}$.



Após o pH considerado como ótimo, há uma diminuição na atividade de catálise, devido ao meio muito básico, que acaba formando a espécie $(OH)Fe^{III}(\mu OH)Zn^{II}(OH)$. Como o hidróxido

gerado no Zn(II) é um ligante menos lábil que a água antes ali coordenada, há uma maior dificuldade do substrato se ligar ao centro bivalente, e assim chegar próximo do nucleófilo e desse modo acontecer a reação de clivagem das ligações de fosfato do 2,4-BDNPP, o que torna a reação menos ativa cataliticamente. (MITIC, SMITH *et al.*, 2006); (KLABUNDE, STRÄTER *et al.*, 1996).

Figura 39. Dependência da velocidade inicial do complexo CAEF_FeZn em função do pH para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP. Condições: CH₃CN/H₂O (1:1, v/v); [Complexo] = 4 x10⁻⁵ mol L⁻¹; [Substrato] = 3,0 x10⁻³ mol L⁻¹; [tampão] = 5 x10⁻² mol L⁻¹; I = 5 x10⁻² LiClO₄ mol L⁻¹.



Sabendo o pH ótimo para a maior atividade catalítica dos complexos biomiméticos, partiu-se para testes do efeito de concentração do substrato, também feitos em triplicata, agora apenas no pH 6,50 para ambos com complexos. Para a obtenção dos parâmetros cinéticos do sistema estudado, as curvas obtidas foram tratadas de acordo com o método das velocidades iniciais pelo modelo de Michaelis-Menten.

A constante de Michaelis-Menten (K_M) representa a afinidade do substrato pelo catalisador, ou nesse caso, a

afinidade do 2,4-BDNPP pelos complexos utilizados. Desse modo, o inverso do valor de K_M representa a constante de associação K_{ASS} , que representa a associação da enzima-substrato. Então, quanto menor o valor de K_M , maior a afinidade.

Outro valor obtido é o do k_{cat} , que representa a velocidade da reação catalisada. Com esses dois valores, obtém-se a relação k_{cat}/K_M , que representa a eficiência catalítica geral do sistema, ao comparar tanto a velocidade da reação quanto a afinidade do complexo ao substrato (Tabela 6).

Figura 40. Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP em função da concentração do substrato na presença de CAE_FeZn. Condições: CH_3CN/H_2O (1:1, v/v); $[Complexo] = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[Substrato] = 3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[tampão] = 5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $I = 5 \times 10^{-2} \text{ LiClO}_4 \text{ mol L}^{-1}$.

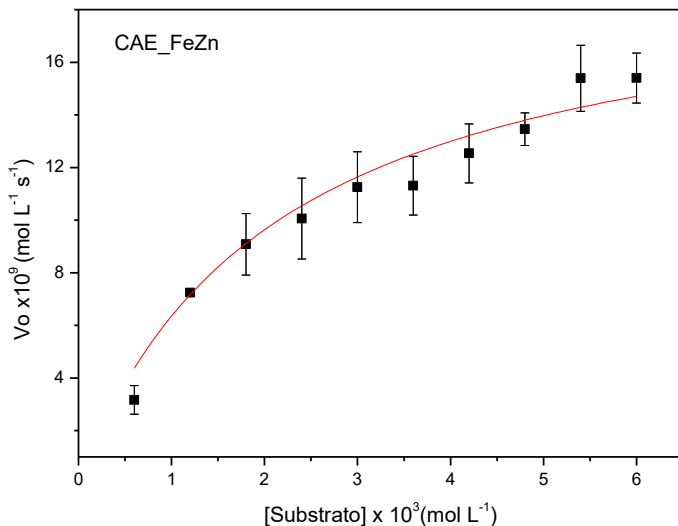


Figura 41. Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP em função da concentração do substrato na presença de CAEF_FeZn. Condições: CH₃CN/H₂O (1:1, v/v); [Complexo] = 4 x 10⁻⁵ mol L⁻¹; [Substrato] = 3,0 x 10⁻³ mol L⁻¹; [tampão] = 5 x 10⁻² mol L⁻¹; I = 5 x 10⁻² LiClO₄ mol L⁻¹.

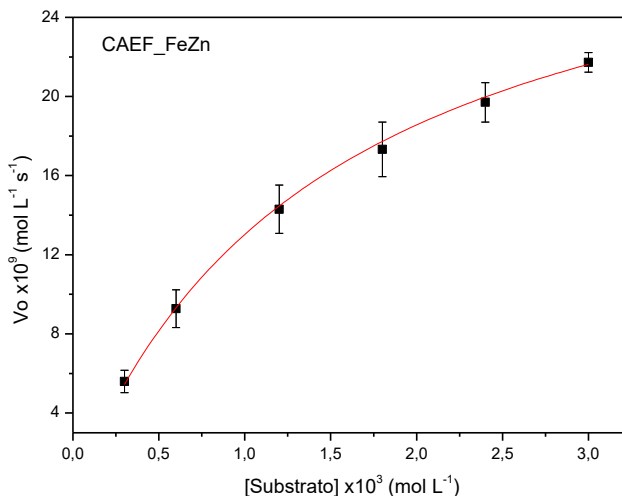


Tabela 6. Parâmetros cinéticos obtidos para os compostos deste trabalho, CAE_FeZn e CAEF_FeZn, e compostos semelhantes contidos na literatura: FeZnL_{ald} (PIOVEZAN, JOVITO *et al.*, 2010); FeZnLAB (CAMARGO, 2013); CABF_FeZn (MELLER, 2015)

	$K_M \times 10^{-3}$ (mol L ⁻¹)	K_{ASS} (L mol ⁻¹)	$k_{cat} \times 10^{-4}$ (s ⁻¹)	$E_{cat} \times 10^{-1}$ (L mol ⁻¹ s ⁻¹)
CAE_FeZn	2,14	467,29	4,99	2,33
CAEF_FeZn	1,48	675,68	8,07	5,45
FeZnL_{ald}^x	3,55	281,69	9,02	2,55
FeZnLAB^x	0,82	1219,51	1,60	1,80
CABF_FeZn^x	1,21	826,44	6,51	5,38

^x: Estruturas no Anexo I.

Todos os compostos comparados apresentam centro de Fe(III) e Zn(II), sendo suas diferenças nas cadeias laterais da

segunda esfera de coordenação. O composto FeZn_{ald} não apresenta nenhuma modificação de segunda esfera; CAE_FeZn e FeZnLAB tem como modificação a adição de uma cadeia lateral de 1,2-etilenodiamina e 1,4-butanodiamina, respectivamente; e CAEF_FeZn e CABF_FeZn têm a adição da 1,2-etilenodiamina e ferroceno, e 1,4-butanodiamina e ferroceno, respectivamente.

Desse modo, percebe-se pelos valores de K_{ASS} (Tabela 6) que as modificações na segunda esfera de coordenação auxiliam na associação do complexo ao substrato analisado. Isso pode ser explicado pelo número maior de interações possíveis dessa cadeia lateral com o 2,4-BDNPP, como interações de hidrogênio pelas aminas, ou eletrostáticas, caso as aminas estejam protonadas, já que o substrato é um ânion, facilitando a associação. (SMITH, PERALTA *et al.*, 2012)

Sabendo que o acréscimo de cadeias laterais à primeira esfera de coordenação auxiliam consideravelmente a associação do complexo com o substrato, foca-se então nos valores de k_{cat} , da velocidade da reação. Quando se analisa os efeitos da adição apenas da cadeia da diamina ou quando se acrescenta também o organometálico, fica evidente que o ferroceno, através de possíveis interações características, como efeitos hidrofóbicos, ou ainda por interações de dipolo e/ou forças de van der Waals, (LINDSTRÖM, PETTERSSON, 2003) altera de forma significativa a velocidade da reação, agindo de tal forma que consegue ativar ainda mais o centro metálico, fazendo a reação ser mais rápida.

A presença destes grupos adicionais à amina, de algum modo, gera uma espécie de região hidrofóbica no meio reacional, fazendo com que o nucleófilo haja com uma maior liberdade para realizar o ataque ao átomo de fósforo do substrato modelo. Este tipo de comportamento também é observado em algumas enzimas hidrolíticas, em que a presença de aminoácidos adjacentes ligados no sítio ativo destas enzimas leva a um aumento significativo da atividade catalítica. (COOK, CLELAND, 2007)

Para avaliar se o ataque nucleofílico ao átomo de fósforo do substrato seria semelhante aos compostos com mesmo sítio ativo já presentes na literatura, ou seja, de forma intramolecular, realizou-se um experimento de efeito isotópico de deutério na velocidade de hidrólise do 2,4-BDNPP em pH 6,50, que é de atividade máxima para os complexos. De acordo com valores da

literatura, caso a razão entre as constantes de velocidades de duas reações de hidrólise do 2,4-BDNPP, sob as mesmas condições realizadas em H₂O e D₂O (k_H/k_D), estiver entre 0,80 e 1,50 indica que não há transferência de próton envolvida na etapa determinante da reação, sugerindo então um ataque nucleofílico intramolecular. (DEAL, HENGGE *et al.*, 1996) O complexo CAE_FeZn apresentou uma razão k_H/k_D de 0,805 e para o complexo CAEF_FeZn, a razão k_H/k_D foi de 1,041. sugerindo então que o ataque se dá de forma intramolecular.

Para verificar se os complexos, assim como as enzimas, são capazes de se regenerar como catalisador, para atuarem em um novo ciclo catalítico, foi realizado um estudo em que a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP em pH 6,5 na presença de ambos os complexos foi acompanhada espectrofotometricamente em 445 nm ($\epsilon = 3600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ do produto 2,4-dinitrofenolato) durante 24 horas a 25 °C. Nesse período, observou-se que o complexo CAE_FeZn foi capaz de hidrolisar 2,4 equivalentes de substrato e o complexo CAEF_FeZn hidrolisou 2,9 equivalentes de substrato, mostrando que os 2 complexos são capazes de se regenerar e atuar novamente no ciclo catalítico.

De maneira geral, a adição de estruturas laterais que atuem na segunda esfera de coordenação de complexos biomiméticos se mostra vantajosa. Com a adição das diaminas, principalmente da 1,2-etanodiamina, já houve melhorias na eficiência catalítica do sistema, porém a adição do ferroceno mostrou ainda maior relevância na atividade catalítica. Sendo anexado às estruturas, o ferroceno fez com que a eficiência catalítica dos complexos aumentasse mais que o dobro, sendo que para o CAEF_FeZn, esse valor fosse de mais de 2,3 vezes.

Além disso, ao se comparar os 2 complexos com a cadeia 1,2-etilenodiamina, a adição do ferroceno aumentou tanto o K_{ASS} (1,4 vezes maior para o CAEF_FeZn) quanto o k_{cat} (1,6 vezes maior), mostrando que as estruturas propostas contendo o organometálico, não só se mostraram eficientes no seu papel como modelo biomimético da PAP, como mostraram resultados promissores como moléculas com efeito de segunda esfera de coordenação, comprovando que as modificações feitas nas moléculas desse trabalho auxiliam no aumento da eficiência catalítica do sistema estudado.

6 CONCLUSÃO

Os ligantes LAE e LAEF propostos nesse trabalho foram sintetizados com rendimentos satisfatórios, e foram caracterizados por técnicas como RMN, IV e ESI-MS, podendo ser utilizados para a síntese dos respectivos complexos binucleares de Fe(III) e Zn(II), CAE_FeZn e CAEF_FeZn. Os complexos obtidos, mesmo sem a formação de cristais e, conseqüentemente, sua definição da estrutura por difração de Raios X, ainda assim puderam ser caracterizados por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas, mostrando estar em concordância com complexos semelhantes de estrutura definida, já presentes na literatura.

O complexo CAE_FeZn mostrou que a adição da cadeia lateral da diamina interfere por meio de interações intramoleculares com o centro metálico, interferências essas que puderam ser comprovadas pelas técnicas utilizados nesse trabalho. Além da interferência da cadeia amínica, a adição do grupamento ferroceno à estrutura do complexo binuclear mostra que, através de equilíbrio de espécies do ferroceno, surgem interações significativas com modificações na densidade eletrônica do centro metálico, podendo ser corroboradas pelas técnicas eletroquímicas e pela titulação espectrofotométrica, que mostrou valores menores de pKa comparados à compostos sem a adição do organometálico.

Os estudos cinéticos frente à hidrólise do substrato 2,4-BDNPP mostram que os complexos atuam de forma similar aos seus semelhantes da literatura, apresentando atividade catalítica interessante, principalmente quando comparado ao composto FeZnH₂L_{ald}, que não apresenta nenhum adicional de segunda esfera. Quando compara-se os complexos contendo a unidade 1,2-etilenodiamina, percebe-se uma elevação na eficiência catalítica, quando comparado com compostos contendo espaçadores maiores, como a 1,4-butanodiamina, mostrando que a cadeia mais curta de algum modo é mais favorável à catálise. Mas, além da cadeia amínica, o grande diferencial do trabalho está na adição do organometálico ferroceno à estrutura. O composto CAEF_FeZn teve o maior valor de eficiência catalítica entre os 5 compostos analisados, tendo sua eficiência aumentada frente ao complexo sem efeitos de segunda esfera mais de 2 vezes, mostrando que a utilização do organometálico

em cadeias da chamada segunda esfera de coordenação não só é viável como promissora.

Outros estudos e análises devem ser realizados a fim de se esclarecer ainda mais esses efeitos positivos da inserção do organometálico nos complexos biomiméticos, assim como testes frente ao DNA, para comparar se as atividades frente ao substrato modelo são reproduzíveis também frente ao ácido nucléico.

7 REFERÊNCIAS

ABD-ELZAHER, M. M., EL-SHIEKH, S. M., *et al.* (2006). "Biological studies of newly synthesized ferrocenyl complexes containing triazinone moiety." **Applied Organometallic Chemistry** 20(10): 597-602.

ALEXANDER, S. P. H., MATHIE, A., *et al.* (2011). "Guide to Receptors and Channels (GRAC)." **British Journal of Pharmacology** 164: 1-324.

AMANN, N., PANDURSKI, E., *et al.* (2002). "A Model Nucleoside for Electron Injection into DNA: 5-Pyrenyl-2'-Deoxyribose." **Angewandte Chemie International Edition** 41(16): 2978-2980.

BIOT, C., DAHER, W., *et al.* (2006). "Design and Synthesis of Hydroxyferroquine Derivatives with Antimalarial and Antiviral Activities." **Journal of Medicinal Chemistry** 49(9): 2845-2849.

BRYDEN, F.,BOYLE, R. W. (2016). "Metalloporphyrins for Medical Imaging Applications." **Advances in Inorganic Chemistry: Insights from Imaging in Bioinorganic Chemistry** 68: 141-221.

BUNTON, C. A.,FABER, S. J. (1969). "The Hydrolysis of Bis(2,4-dinitrophenyl)Phosphate." **The Journal of Organic Chemistry** 34(4): 767-772.

CAMARGO, T. P. (2013). "Desenvolvimento de complexos heterobinucleares de FeIII/ZnII a partir de ligantes contendo o grupo pireno para estudo de interação com ésteres de fosfato e ácidos nucleicos". Doutorado **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Santa Catarina. 109p.

CASELLATO, A. (2003). "Síntese, Caracterização e Reatividade de Complexos modelos para as PAPs Gálio substituídas." Programa de Pós Graduação em Química **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina. 75p.

COOK, P. F.,CLELAND, W. W. (2007). "Enzyme kinetics and mechanism". Londres, Garland Science.

CORRY, A. J., MOONEY, Á., *et al.* (2009). "Synthesis, characterization and in vitro anti-cancer activity of N-(ferrocenyl)benzoyl tri- and tetrapeptide esters." **Inorganica Chimica Acta** 362(9): 2957-2961.

COWAN, J. A. (1993). "Inorganic biochemistry: an introduction". New York, VCH: 349p.

COX, R. S., SCHENK, G., *et al.* (2007). "Diesterase Activity and Substrate Binding in Purple Acid Phosphatase." **Journal of American Chemical Society** 129.

DALY, R. I., MARTIN, L. L. (2002). "Characterisation of a coordinated imidazole as a structural model for superoxide dismutase." **Inorganic Chemistry Communications** 5: 777-781.

DANFORD, J. J., DOBROWOLSKI, P., *et al.* (2009). "Thioester hydrolysis reactivity of an Fe(III)Zn(II) complex." **Inorganic Chemistry** 48(23): 11352-11361.

DEAL, K. A., HENGGE, A. C., *et al.* (1996). "Characterization of Transition States in Dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-Catalyzed Activated Phosphate Diester Hydrolysis." **Journal of American Chemical Society** 118: 1713-1718.

FISH, R. H., JAOUEN, G. (2003). "Bioorganometallic Chemistry: Structural Diversity of Organometallic Complexes with Bioligands and Molecular Recognition Studies of Several Supramolecular Hosts with Biomolecules, Alkali-Metal Ions, and Organometallic Pharmaceuticals." **Organometallics** 22: 2166-2177.

FOUDA, M. F. R., ABD-ELZAHER, M. M., *et al.* (2007). "On the medicinal chemistry of ferrocene." **Applied Organometallic Chemistry** 21(8): 613-625.

GABER, B. P., MISKOWSKI, V., *et al.* (1974). "Resonance Raman scattering from iron(III)- and copper(II)-transferrin and an iron(III) model compound. Spectroscopic interpretation of the transferrin binding site." **Journal of American Chemical Society** 96(22): 6868-6873.

GAGNÉ, R. R., KOVAL, C. A., *et al.* (1980). "Ferrocene as an Internal Standard for Electrochemical Measurements " **Inorganic Chemistry** 19: 2854-2855

GREATTI, A., BRITO, M. A., *et al.* (2004). "Synthesis, characterization and structure of a new dinickel(II) complex as model for urease." **Journal of Molecular Structure** 688(1-3): 185-190.

GREENBERG, A. (2009). "Uma breve história da química: da alquimia às ciências moleculares modernas.". São Paulo, Edgard Blucher.

HEYING, R. d. S. (2014). "Síntese, caracterização e atividade diesterase de novos modelos biomiméticos com efeitos de segunda esfera de coordenação para fosfatases ácidas púrpuras." Programa de Pós Graduação em Química **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina. 111p.

HORN, A., JR., VENCATO, I., *et al.* (2005). "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** 358(2): 339-351.

HOUSECROFT, C. E., SHARPE, A. G. (2013). "Química Inorgânica". Rio de Janeiro, LTC: 624p.

JOVITO, R. (2010). "Síntese, caracterização e avaliação da promiscuidade catalítica de complexos binucleares bioinspirados". Programa de Pós Graduação em Química **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Santa Catarina. 108p.

KARSTEN, P., NEVES, A., *et al.* (2002). "Synthesis, Structure, Properties, and Phosphatase-Like Activity of the First Heterodinuclear FeIIIMnII Complex with the Unsymmetric Ligand H₂BPBMP as a Model for the PAP in Sweet Potato." **Inorganic Chemistry** 41(18): 4624-4626.

KEALY, T. J., PAUSON, P. L. (1951). "A New Type of Organo-Iron Compound." **Nature** 168: 1039.

KLABUNDE, T., STRÄTER, N., *et al.* (1996). "Mechanism of Fe(III)–Zn(II) Purple Acid Phosphatase Based on Crystal Structures." **Journal of Molecular Biology** 259: 737–748.

KREBS, B., LIPSCOMB, W. N., *et al.* (1996). "Two-Metal Ion Catalysis in Enzymatic Acyl and Phosphoryl-Transfer Reactions " **Angewandte Chemie International Edition** 35: 2024-2055.

LANZMASTER, M., NEVES, A., *et al.* (2007). "An Unprecedented FeIII(μ -OH)ZnII Complex that Mimics the Structural and Functional Properties of Purple Acid Phosphatases." **Journal of American Chemical Society** 129(24): 7486-7487.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., *et al.* (2011). "Princípios de bioquímica de Lehninger". Porto Alegre, Artmed: 1273p.

LINDSTRÖM, B., PETTERSSON, L. J. (2003). "A brief history of catalysis." **CATTECH** 7(4): 130-138.

LIPPARD, S. J., BERG, J. M. (1994). "Principles of Bioinorganic Chemistry". Mill Valley, University Science Books: 411p.

MCMURRY, J. (2005). "Química orgânica ". São Paulo, Thomson. Combo - 1 & 2: 925p.

MELLER, S. L. (2015). "SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS CINÉTICOS DE UM COMPLEXO DE Fe(III)/Zn(II) DE UM NOVO LIGANTE CONTENDO A UNIDADE FERROCENO ANCORADA ". Graduação em Química **Trabalho de Conclusão de Curso**, Universidade Federal de Santa Catarina. 55p.

MITIC, N., SMITH, S. J., *et al.* (2006). "The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases." **Chemical Reviews** 106(8): 3338–3363.

NEVES, A., BRITO, M. A., *et al.* (1996). "FeIIIFeIII and FeIFeIII Complexes as Synthetic Analogues for the Oxidized and Reduced Forms of Purple Acid Phosphatases." **Inorganic Chemistry** 35(8): 2360-2368.

OKARVI, S. M., MAECKE, H. R. (2016). "Radiometallo-Labeled Peptides in Tumor Diagnosis and Targeted Radionuclide Therapy."

Advances in Inorganic Chemistry: Insights from Imaging in Bioinorganic Chemistry 68: 341-396.

ORNELAS, C. (2011). "Application of ferrocene and its derivatives in cancer research." **New Journal of Chemistry** 35(10): 1973.

PAUSON, P. L. (2001). "Ferrocene—how it all began." **Journal of Organometallic Chemistry** 637-639: 3-6.

PERALTA, R. A. (2005). "Novos complexos binucleares de cobre(II) e de Ferro(III) zinco(II): biomiméticos sintéticos para catecol oxidase e para fosfatases ácidas púrpuras.". Programa de Pós Graduação em Química **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Santa Catarina. 266p.

PERALTA, R. A., BORTOLUZZI, A. J., *et al.* (2010). "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** 49(24): 11421-11438.

PEREIRA, C. M. P., VENZKE, D., *et al.* (2013). "SÍNTESE DE HETEROCICLOS BIOATIVOS DERIVADOS DO FERROCENO." **Química Nova** 36: 143-152.

PIOVEZAN, C., JOVITO, R., *et al.* (2010). "Heterodinuclear Fe(III)Zn(II)-bioinspired complex supported on 3-aminopropyl silica. Efficient hydrolysis of phosphate diester bonds." **Inorganic Chemistry** 49(6): 2580-2582.

SCHENK, G., GAHAN, L. R., *et al.* (2005). "Phosphate forms an unusual tripodal complex with the Fe–Mn center of sweet potato purple acid phosphatase." **Proceedings of the National Academy of Sciences** 102(2): 273–278.

SCHENK, G., MITIĆ, N., *et al.* (2013). "Purple acid phosphatase: A journey into the function and mechanism of a colorful enzyme." **Coordination Chemistry Reviews** 257(2): 473-482.

SHOOK, R. L.,BOROVNIK, A. S. (2010). "Role of the secondary coordination sphere in metal-mediated dioxygen activation." **Inorg Chem** 49(8): 3646-3660.

SHRIVER, D. F., ATKINS, P. W. (2008). "Química Inorgânica". Porto Alegre, Bookman: 847p.

SILVA, M. P. (2014). "SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS CINÉTICOS DE COMPLEXOS DE COBRE(II) COM LIGANTES TRIAZÍNICOS COMO MODELOS BIOMIMÉTICOS DA METALOENZIMA CATECOL OXIDASE." Programa de Pós Graduação em Química **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina. 109p.

SILVEIRA, G. Q., VARGAS, M. D., *et al.* (2011). "Nanoreservoir operated by ferrocenyl linker oxidation with molecular oxygen." **Journal of Materials Chemistry** 21(16): 6034-6039.

SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., *et al.* (1994). "Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos". Rio de Janeiro, Guanabara Koogan: 387p.

SMITH, S. J., PERALTA, R. A., *et al.* (2012). "Spectroscopic and catalytic characterization of a functional Fe(III)Fe(II) biomimetic for the active site of uteroferrin and protein cleavage." **Inorganic Chemistry** 51(4): 2065-2078.

SNEGUR, L. V., NEKRASOV, Y. S., *et al.* (2008). "Ferrocenylalkyl azoles: bioactivity, synthesis, structure." **Applied Organometallic Chemistry** 22(2): 139-147.

SONG, X.-W., MENG, Y., *et al.* (2017). "A cobalt complex of a pentadentate aminopyridine ligand as an efficient catalyst for photocatalytic hydrogen generation." **Inorganic Chemistry Communications** 76: 52-54.

SØRENSEN, T., NIELSEN, M. (2011). "Synthesis, UV/vis spectra and electrochemical characterisation of arylthio and styryl substituted ferrocenes." **Central European Journal of Chemistry** 9(4): 610-618

STODDART, J. F., ZHICHANG, L., *et al.* (2014). "Second-Sphere Coordination Revisited." **CHIMIA International Journal for Chemistry** 68(5): 315-320.

THOER, A., DENIS, G., *et al.* (1988). "The Reimer-Tiemann Reaction in Slightly Hydrated Solid-liquid Medium: A New Method for

the Synthesis of Formyl and Diformyl Phenols." **Synthetic Communications** 18(16-17): 2095-2101.

TOP, S., VESSIERES, A., *et al.* (2003). "Synthesis, biochemical properties and molecular modelling studies of organometallic specific estrogen receptor modulators (SERMs), the ferrocifens and hydroxyferrocifens: evidence for an antiproliferative effect of hydroxyferrocifens on both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines." **Chemistry European Journal** 9(21): 5223-5236.

TROJÁNEK, A., LANGMAIER, J., *et al.* (2011). "Fine tuning of the catalytic effect of a metal-free porphyrin on the homogeneous oxygen reduction." **Chemical Communications** 47(19): 5446–5448 - Supplementary Information

van STAVEREN, D. R., METZLER-NOLTE, N. (2004). "Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene." **Chem. Rev.** 104: 5931-5985.

VESSIERES, A., TOP, S., *et al.* (2006). "Metal complex SERMs (selective oestrogen receptor modulators). The influence of different metal units on breast cancer cell antiproliferative effects." **Dalton Trans**(4): 529-541.

VINCENT, J. F., BOGATYREVA, O. A., *et al.* (2006). "Biomimetics: its practice and theory." **J R Soc Interface** 3(9): 471-482.

YEH, C.-Y., CHANG, C. J., *et al.* (2001). "'Hangman' Porphyrins for the Assembly of a Model Heme Water Channel." **Journal of American Chemical Society** 123(7): 1513-1514.

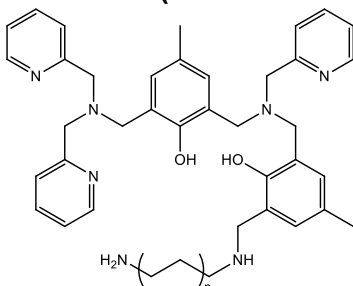
YOU, Z., DEHNEN, S. (2013). "Directed formation of a ferrocenyl-decorated organotin sulfide complex and its controlled degradation." **Inorganic Chemistry** 52(21): 12332-12334.

YU, F., CANGELOSI, V. M., *et al.* (2014). "Protein design: toward functional metalloenzymes." **Chemical Reviews** 114(7): 3495-3578.

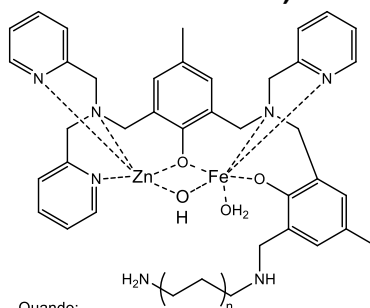
8 ANEXOS

Anexo I

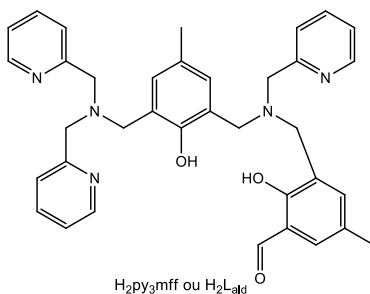
Estruturas contidas nesse trabalho (sintetizadas ou já presentes na literatura)



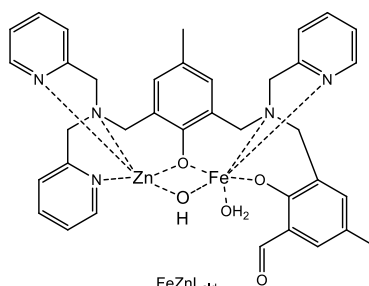
Quando:
 n=1: LAE
 n=2: LAB
 n=3: $\text{H}_2\text{L}_{\text{Hex}}$



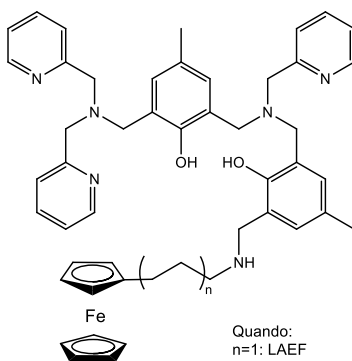
Quando:
 n=1: CAE_FeZn
 n=2: FeZnLAB
 n=3: FeZn $\text{H}_2\text{L}_{\text{Hex}}$



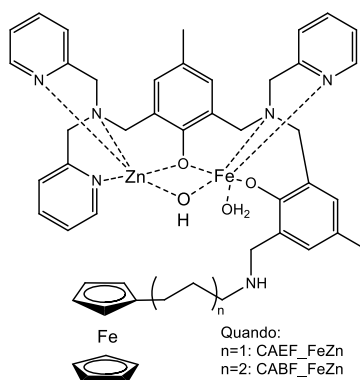
$\text{H}_2\text{Py}_3\text{mff}$ ou $\text{H}_2\text{L}_{\text{ald}}$



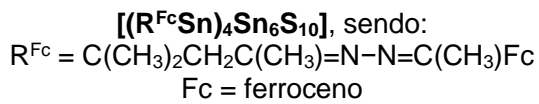
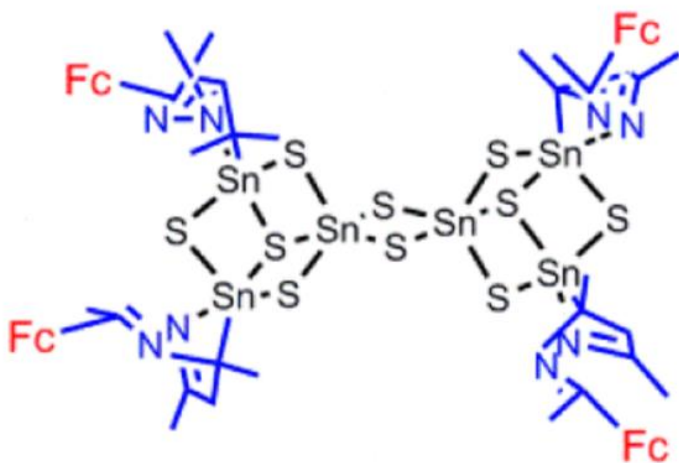
FeZn L_{ald}



Quando:
 n=1: LAEF
 n=2: LABF



Quando:
 n=1: CAEF_FeZn
 n=2: CABF_FeZn



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

