

Luana Jacomini

**NOVOS COMPLEXOS BINUCLEARES SIMÉTRICOS DE Fe<sup>III</sup>,  
Co<sup>III</sup> E Cu<sup>II</sup>: A INFLUÊNCIA DOS METAIS NA ATIVIDADE  
CATALÍTICA FRENTE REAÇÕES DE OXIDAÇÃO E HIDRÓ-  
LISE E SUAS INTERAÇÕES COM ÁCIDOS NUCLEICOS**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-graduação da Universidade Fede-  
ral de Santa Catarina para a obtenção  
do Grau de Mestre em Química.  
Orientadora: Prof. Dra. Rosely Apare-  
cida Peralta

Florianópolis

2019

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

Jacomini, Luana

Novos complexos binucleares simétricos de FeIII, CoIII e CuII: a influência dos metais na atividade catalítica frente reações de oxidação de hidrólise e suas interações com ácidos nucleicos / Luana Jacomini ; orientador, Rosely Aparecida Peralta, 2019.  
157 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Química. 2. Química. 3. Biomiméticos. 4. Promiscuidade catalítica. 5. ácidos nucleicos. I. Peralta, Rosely Aparecida. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Luana Jacomini

**NOVOS COMPLEXOS BINUCLEARES SIMÉTRICOS DE Fe<sup>III</sup>,  
Co<sup>III</sup> E Cu<sup>II</sup>: A INFLUÊNCIA DOS METAIS NA ATIVIDADE  
CATALÍTICA FRENTE REAÇÕES DE OXIDAÇÃO E HIDRÓ-  
LISE E SUAS INTERAÇÕES COM ÁCIDOS NUCLEICOS**

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

Florianópolis, 18 de Fevereiro de 2019

---

Prof. Vanderlei Gageiro Machado, Dr.  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Rosely Aparecida Peralta, Dr.<sup>a</sup>  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Adailton João Bortoluzzi, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

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



Este trabalho é dedicado aos meus pais  
Ivan e Cleusa.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por permitir que eu chegasse até aqui. Aos meus pais Ivan e Cleusa e minhas irmãs Laura e Milena, por todo o carinho, incentivo, força e compreensão durante esses dois anos, sem vocês não teria conseguido. Obrigada por cada ligação, cada palavra carinhosa e por toda ajuda e suporte que me deram para que o mestrado fosse possível.

O meu noivo Cleiton, que aguentou a distância, mas também não mediu esforços para vir me visitar quando a saudade apertou. Sou grata por ter você na minha vida, por acreditar tanto em mim e me incentivar a nunca desistir de nada. Obrigada por todo seu companheirismo, todas as conversas em todos os momentos, tenho sorte de ter uma pessoa como você na minha vida. Te amo!

Agradeço a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosely Peralta, por ter me acolhido no LABINC e por ter me ajudado tanto. Cada orientação foi muito valiosa não só para meu crescimento na pesquisa, mas também como pessoa. Agradeço cada conselho e puxão de orelha que me fizeram acreditar mais no meu trabalho e em mim. Também agradeço ao Prof. Dr. Ademir Neves, pelas valiosas contribuições neste trabalho. Aos membros da banca, Professores Dr. Adailton Bortoluzzi, Dr. Fernando Xavier e Dr. Hernán Terenzi por terem aceitado o convite e por todas as contribuições neste trabalho.

Aos colegas “labinquianos” por terem me acolhido tão bem no laboratório, por todas as conversas, risadas, cafés, almoços no RU e por me ajudarem tanto; vocês tornaram tudo mais leve e divertido, agradeço por ter conhecido cada um de vocês: Alana, André Amorim, André Rosos, Anderson, Andrei, Bruna, Cacau, Carlos, Claudia Pereira, Dani, Edinara, Filipy, Gili, Marcos, Renata, Toigo e Vitor. Agradeço de modo especial ao André Amorim por me receber tão bem na B5, obrigada por toda sua ajuda e seus abraços nos dias não tão bons. A Alana por toda amizade e parceria. A Bruna, Toigo, Filipy e Larissa, vocês deixam tudo mais divertido, obrigada pelas piadas, cervejas e passes do RU. A família que Floripa me deu: Cláudia, Mari e Lorenzo, vocês são exemplo de bondade, respeito e humildade, é muito bom saber que existem pessoas como vocês e o melhor ainda é saber que tenho a amizade de vocês!

Ao CEBIME pelas análises dos complexos frente ao DNA e a Alana pela disponibilidade para realizar os experimentos.

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



“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

(Benjamin Disraeli)



## RESUMO

A busca por complexos que possam atuar como miméticos de enzimas é algo notável na pesquisa e no desenvolvimento da química bioinorgânica. Esse estudo se refere à síntese e caracterização de um ligante simétrico e três complexos binucleares com centros metálicos sendo os metais  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ,  $\text{Co}^{\text{III}}$  e  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , para mimetizar as enzimas, tais como catecóis oxidases, em reações de oxidação e fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) para reações de hidrólise. Também procurou-se avaliar quais dos centros metálicos seria o mais promissor para futuras modificações nas cadeias laterais, visto que o ligante possui em sua estrutura dois centros aldeídos. Os fenóis caracterizam a parte dura do ligante e as piridinas, são consideradas macias. O ligante e seus novos complexos foram completamente caracterizados por métodos espectroscópicos, eletroquímicos, espectrométricos e análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio. Posteriormente os complexos  $\text{FeL}_1$ ,  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$ , foram analisados frente aos substratos modelos 3,5-di-*terc*-butilcatecol e 2,4-BDNPP. A partir da obtenção de parâmetros cinéticos foi possível verificar a influência do centro metálico nas atividades catalíticas. Diferentes estudos como testes de detecção de peróxido e cinética na ausência de oxigênio para catálise de oxidação do substrato 3,5-di-*terc*-butilcatecol e efeito isotópico, monoéster e cinética com excesso de substrato para hidrólise do substrato 2,4-BDNPP ajudaram a elucidar os mecanismos envolvidos na catálise. O complexo  $\text{FeL}_1$ , teve bons resultados nas reações de oxidação e hidrólise, acredita-se que a dureza do centro metálico tenha influenciado nesses resultados. Estudos iniciais de interação com o DNA, utilizando os complexos  $\text{FeL}_1$  e  $\text{CuL}_1$ , indicam claramente diferenças nas interações com a mudança do centro metálico. Estudos mais aprofundados podem ajudar a elucidar o mecanismo de reconhecimento e a clivagem da ligação fosfodiéster desses complexos.

**Palavras-chave:** Catecol Oxidase. Fosfatases Ácidas Púrpuras. Promiscuidade Catalítica, Clivagem do DNA.



## ABSTRACT

The search for complexes that can act as enzyme mimetics is a remarkable thing in the research and development of bioinorganic chemistry. This study refers to the synthesis and characterization of a symmetric ligand and three binuclear complexes with metal centers ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ,  $\text{Co}^{\text{III}}$ , and  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ) to mimic enzymes, such as catechol oxidases, in oxidation reactions and purple acid phosphatases (PAPs) for hydrolysis reactions. Furthermore, it was also sought to evaluate which of the metal centers would be the most promising for future modifications in the lateral chains, since the ligand has in its structure two aldehyde centers. The phenols characterize the hard part of the binder and the pyridines, are considered soft. The ligand and its new complexes were completely characterized by spectroscopic, electrochemical, spectrometric and elemental analysis of carbon, hydrogen and nitrogen. Subsequently, the  $\text{FeL}_1$ ,  $\text{CoL}_1$ , and  $\text{CuL}_1$  complexes were analyzed against the substrates models 3,5-di-*tert*-butylcatechol and 2,4-BDNPP. After obtaining the kinetic parameters, it was possible to verify the influence of the metallic center upon the catalytic activities. Different studies such as peroxide and kinetics detection testes in the absence of oxygen for oxidation catalysis of the substrate 3,5-di-*tert*-butylcatechol and isotopic, monoester and excess-substrate kinetics for 2,4-BDNPP substrate hydrolysis have helped to elucidate the mechanisms involved in catalysis. The  $\text{FeL}_1$  complex had good results in the oxidation and hydrolysis reactions, it is believed that the hardness of the metallic center influenced these results. Initial DNA interaction studies, employing the  $\text{FeL}_1$  and  $\text{CuL}_1$  complex, clearly indicate differences in interaction with the change of the metal center. Further studies may help elucidate the mechanism of recognition and cleavage of the phosphodiester linkage of such complexes.

**Keywords:** Catechol Oxidases. Purple Acid Phosphatases. Catalytic promiscuity. DNA cleavage.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Propriedades químicas dos metais. ....	30
Figura 2- Fórmula estrutural das cobalaminas Vitaminas B <sub>12</sub> (R = CN, CH <sub>3</sub> e adenosicobalaminas). ....	31
Figura 3- Sítio ativo da catecol oxidase na forma oxidada (forma <i>met</i> ) encontrada na <i>Ipomoeas</i> batatas. ....	33
Figura 4 – Representação da estrutura tridimensional da enzima catecol oxidase encontrada na <i>Ipomoeas</i> batatas. ....	34
Figura 5- Mecanismo da catálise oxidativa. ....	35
Figura 6- Mecanismo da catálise oxidativa para Co <sup>III</sup> Co <sup>III</sup> . ....	36
Figura 7- Complexos publicados na literatura com atividade catecolase, sendo: a) MAGHESURAM, <i>et al.</i> , 2018; b) OLIVEIRA, <i>et al.</i> , 2016; c) PERALTA, <i>et al.</i> , 2010 e d) NEY, <i>et al.</i> , 2015. ....	38
Figura 8- Composição e estrutura tridimensional do DNA mostrando a interação entre os nucleotídeos, o esqueleto açúcar-fosfato e os sulcos maiores e menores da molécula. ....	40
Figura 9- Representações dos três modos principais de interação de moléculas com o DNA. O ligante é mostrado em vermelho e as cadeias de DNA em preto: (a) Interação eletrostática. (b) intercalação. (c) Ligação pelos sulcos. ....	41
Figura 10- Sítio ativo das Fosfatases Ácidas Purpuras. ....	42
Figura 11- Proposta mecanística de ésteres de fosfatos promovidas pelas PAPs. ....	43
Figura 12- Proposta mecanística de ésteres de fosfatos promovidas pelas PAPs. ....	44
Figura 13- Esquema do ligante H <sub>2</sub> L. ....	46
Figura 14- Trabalhos publicados na literatura de biomiméticos para as PAPs, sendo: a) CAMARGO, <i>et al.</i> , 2017; b) COMBA, <i>et al.</i> , 2012; c) SMITH, <i>et al.</i> , 2012 e d) PERALTA, <i>et al.</i> , 2010. ....	47
Figura 15- Espectro na região do infravermelho em ATR do precursor CMFF. ....	64
Figura 16- Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz) em CDCl <sub>3</sub> do precursor CMFF. ....	65
Figura 17- Espectro na região do infravermelho em ATR do precursor 2ald-fenol. ....	67
Figura 18- Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (200 MHz) em CDCl <sub>3</sub> do 2ald-Fenol. ....	68
Figura 19- Espectro na região do infravermelho em ATR do 2Py-Fenol. ....	69

Figura 20- Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz) em $\text{CDCl}_3$ do ligante 2py-Fenol. ....	70
Figura 21- Espectro na região do infravermelho em ATR do 2py2mff-fenol. ....	71
Figura 22- Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) em $\text{CDCl}_3$ do ligante 2py2mff-Fenol. ....	72
Figura 23- Rota sintética do complexo $\text{FeL}_1$ . ....	73
Figura 25- Rota sintética do complexo $\text{CoL}_1$ . ....	74
Figura 27- Rota sintética do Complexo $\text{CuL}_1$ . ....	76
Figura 28- Espectro de infravermelho em ATR do Complexo $\text{CuL}_1$ . ....	77
Figura 29- Complexos sintetizados a partir do ligante 2py2mff-Fenol. ....	79
Figura 30- Comparação dos espectros dos precursores e ligante final, 2py2mff-Fenol. ....	81
Figura 31- Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) em $\text{CDCl}_3$ do ligante 2py2mff-Fenol. ....	83
Figura 32- Espectro de ESI-MS do 2py2mff-Fenol em metanol em <b>(a)</b> distribuição isotópica e <b>(b)</b> simulação da espécie $[\text{C}_{39}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_5]^+$ ....	84
Figura 33- Espectro de infravermelho em ATR do ligante (preto), $\text{FeL}_1$ (azul), $\text{CoL}_1$ (vermelho) e $\text{CuL}_1$ (verde). ....	87
Figura 35- Espectro de ESI-MS do complexo $\text{CoL}_1$ em metanol em <b>(a)</b> distribuição isotópica e <b>(b)</b> , <b>(c)</b> e <b>(d)</b> apresentam simulação isotópica das espécie proposta. ....	90
Figura 37- Espectro eletrônico dos complexos $\text{FeL}_1$ , $\text{CoL}_1$ e $\text{CuL}_1$ em solução de MeOH, MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 50% (v/v), sendo: a) $\text{FeL}_1$ , b) $\text{CoL}_1$ e c) $\text{CuL}_1$ . ....	95
Figura 38- Voltamograma do complexo $\text{FeL}_1$ ( $1,0 \times 10^{-3}$ mol $\text{L}^{-1}$ ), em $\text{CH}_3\text{CN}$ . Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo; Referência: Ag/AgCl; Auxiliar: Platina; Eletrólito suporte: TBA( $\text{PF}_6$ ) 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ (a) voltametria cíclica e (b) voltametria de onda quadrada (pulso – 25 mV, frequência = 15 Hz). ....	99
Figura 39- Voltamograma do complexo $\text{CoL}_1$ ( $1,0 \times 10^{-3}$ mol $\text{L}^{-1}$ ), em $\text{CH}_3\text{CN}$ . Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo; Referência: Ag/AgCl; Auxiliar: Platina; Eletrólito suporte TBA( $\text{PF}_6$ ) 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ (a) voltametria cíclica e (b) voltametria de onda quadrada (pulso – 25 mV, frequência = 15 Hz). ....	100
Figura 40- Voltamograma do complexo $\text{CuL}_1$ ( $1,0 \times 10^{-3}$ mol $\text{L}^{-1}$ ), em $\text{CH}_3\text{CN}$ . Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo; Referência: Ag/AgCl; Auxiliar: Platina; Eletrólito suporte TBA( $\text{PF}_6$ ) 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ (a) voltametria cíclica e (b) voltametria de onda quadrada (pulso – 25 mV, frequência = 15 Hz). ....	101

Figura 41- Ilustração da barreira de Franck-Condon para o processo redox $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{III}}$ .....	103
Figura 42- Diagrama de distribuição das espécies em função do pH para o complexo $\text{FeL}_1$ . .....	105
Figura 43- Diagrama de distribuição das espécies em função do pH para o complexo $\text{CoL}_1$ .....	105
Figura 44- Proposta de equilíbrio observado para os complexos $\text{FeL}_1$ e $\text{CoL}_1$ , Sendo $\text{M}=(\text{Fe}^{\text{III}}$ para $\text{FeL}_1$ e $\text{Co}^{\text{III}}$ para $\text{CoL}_1$ ). .....	107
Figura 45- Gráfico da titulação espectrofotométrica do complexo $\text{FeL}_1$ em metanol/água (1:1 v/v).....	107
Figura 46- Gráfico da titulação espectrofotométrica do complexo $\text{CoL}_1$ em metanol/água (1:1 v/v).....	108
Figura 47- Diagrama de distribuição das espécies em função do pH para o complexo $\text{CuL}_1$ .....	109
Figura 48- Proposta de equilíbrio observado para o complexo $\text{CuL}_1$ ..	110
Figura 49 - Gráfico da titulação espectrofotométrica do complexo $\text{CuL}_1$ em metanol/água (1:1 v/v).....	111
Figura 50- Reação de oxidação do 3,5 DTBC para 3,5 DTBQ. ....	112
Figura 51 - Dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5 DTBC com o pH para o complexo $\text{FeL}_1$ . Condições: $[\text{Complexo}]=3,02 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; $[\text{3,5-DTBC}]= 2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; $[\text{Tampões}]=3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; Solução MeOH/H <sub>2</sub> O (32:1 v/v) a 25 °C. ....	113
Figura 52- Dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5 DTBC com o pH para o complexo $\text{CoL}_1$ . Condições: $[\text{Complexo}]=2,86 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; $[\text{3,5-DTBC}]= 2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; $[\text{Tampões}]=3,3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ; Solução MeOH/H <sub>2</sub> O (32:1 v/v) a 25 °C	113
Figura 53- Dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5 DTBC com o pH para o complexo $\text{CuL}_1$ . Condições: $[\text{Complexo}]=2,74 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; $[\text{3,5-DTBC}]= 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; $[\text{Tampões}]=3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; Solução MeOH/H <sub>2</sub> O (32:1 v/v) a 25 °C.	114
Figura 54-Dependência da velocidade do 3,5-DTBC com a concentração do substrato para o complexo $\text{FeL}_1$ . Condições $[\text{C}]= 1,51 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; $[\text{3,5 DTBC}] = (3,03 \times 10^{-4} \text{ a } 3,63 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})$ ; $[\text{tampão}] = 3,03 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ; (TRIS, pH 9,0) em solução MeOH/H <sub>2</sub> O (32:1 v/v) a 25 °C. ....	116
Figura 55- Dependência da velocidade do 3,5-DTBC com a concentração do substrato para o complexo $\text{CoL}_1$ . Condições $[\text{C}]=2,87 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; $[\text{3,5 DTBC}] = (1,2 \times 10^{-3} \text{ à } 7,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})$ ; $[\text{tampão}] = 3,03 \times 10^{-2}$ ; (TRIS, pH 8,5) em solução MeOH/H <sub>2</sub> O (32:1 V/V) a 25 °C.....	116

Figura 56- Dependência da velocidade do 3,5-DTBC com a concentração do substrato para o complexo $\text{CuL}_1$ . Condições $[\text{C}]=2,74 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; $[\text{3,5 DTBC}] = (3,64 \times 10^{-4} \text{ à } 4,24 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})$ ; $[\text{tampão}] = 3,03 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ; (TRIS, pH 8,5) em solução $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (32:1v/v) a 25 °C. ....	117
Figura 57- Proposta de mecanismo para a oxidação do 3,5-DTBC utilizando complexo $\text{FeL}_1$ e $\text{CoL}_1$ , sendo $\text{M}^{\text{III}}\text{M}^{\text{III}}$ : $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ , $\text{Co}^{\text{III}}\text{Co}^{\text{III}}$ e $\text{M}^{\text{II}}\text{M}^{\text{II}}$ : $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}$ , $\text{Co}^{\text{II}}\text{Co}^{\text{II}}$ . ....	120
Figura 58- Mecanismo propostos para oxidação do 3,5-DTBC com o complexo $\text{CuL}_1$ como catalisador. ....	121
Figura 59 - Reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP. ....	122
Figura 60- Dependência da velocidade de reação de oxidação do 2,4-BDNPP com o pH para o complexo $\text{FeL}_1$ . Condições: $[\text{Complexo}]=3,02 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; $[\text{2,4 BDNPP}]= 2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; $[\text{Tampões}]=3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; Solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v) a 25 °C. ....	124
Figura 61- Dependência da velocidade 2,4-BDNPP com a concentração do substrato para o complexo $\text{FeL}_1$ . Condições $[\text{Complexo}]=1,21 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; $[\text{2,4- BDNPP}]= (3,33 \times 10^{-4} \text{ à } 4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})$ ; $[\text{Tampões}]=5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ; Solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v) a 25 °C. ....	126
Figura 62- (1) Mudança espectral observada devido à adição consecutiva de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 equivalentes do monoéster 2,4-DNPP ao complexo $\text{FeL}_1$ , pH 7,0, concentração de complexo = $1,26 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , em $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (50:50%) tampão HEPES. (2) Adição de 4 equivalentes do diéster 2,4-BDNPP após 8 h de tempo de reação com 2,4-DNPP. ....	128
Figura 63- Mecanismo proposto para a hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo $\text{FeL}_1$ . ....	130
Figura 64- Efeito do pH para os complexos $\text{FeL}_1$ e $\text{CuL}_1$ . Condições: $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng} \sim 25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ; $[\text{Tampão}] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; (MES pH 6,0; HEPES pH 7,0 e 8,0; CHES pH 9,0; e CAPS pH 10,0); $[\text{FeL}_1] = 25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ; $[\text{CuL}_1] = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ; Temperatura = 50 °C; Tempo = 4 h na ausência da luz. ....	131
Figura 65 - Ensaio de única concentração e tempo de reação para os complexos $\text{FeL}_1$ e $\text{CuL}_1$ , condição: $[\text{CT-DNA}] = 200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ; $[\text{CuL}_1] = 0 - 200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ; $[\text{FeL}_1] = 0 - 90 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ; $[\text{Tampão}] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ (MES pH 6,0); Temperatura = 37°C. ....	133
Figura 66 – Complexos utilizados para comparação das constantes cinéticas, onde (a) (GABRIEL, 2016) e (b) (BORTOLOTTI, 2015). ....	134

Figura 67- Espectros de CD do CT-DNA na presença de concentrações crescentes dos complexos FeL <sub>1</sub> . Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 μmol L <sup>-1</sup> ; [CuL <sub>1</sub> ] = 0 – 200 μmol L <sup>-1</sup> ; [FeL <sub>1</sub> ] = 0 – 90 μmol L <sup>-1</sup> ; [Tampão] = 10 mmol L <sup>-1</sup> (MES pH 6,0); Temperatura = 37°C.....	136
Figura 68- Espectro do estudo da consente de ligação em (a) FeL <sub>1</sub> e (b) CuL <sub>1</sub> . Condições: [CT-DNA] = 6,43x10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> , adição (0 à 20 μl); [FeL <sub>1</sub> ]= 1,76x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> e [CuL <sub>1</sub> ] = 1,07x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> ; em pH (MÊS 6,0). .....	138
Figura 69- Complexos utilizados para comparação, onde: (a) (PERALTA, <i>et al.</i> , 2010) e (b) (ROY, <i>et al.</i> , 2007). .....	140



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação das enzimas. ....	30
Tabela 2- Valores do coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) do fenolato do substrato 2,4-BDNPP em diferentes valores de pH.....	56
Tabela 3- Relação das bandas características dos precursores e ligantes obtidos pela técnica de infravermelho em ATR (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2000).....	80
Tabela 4- Tabela das atribuições de deslocamento químico do ligante 2Py2mf-Fenol. ....	82
Tabela 5- Relação das bandas do ligante 2py2mf-Fenol e dos respectivos complexos a partir da técnica de infravermelho por ATR (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2000; NAKAMOTO, 1977). ....	85
Tabela 6- Porcentagem (calculada/encontrada) de C, H, N para os complexos sintetizados.....	94
Tabela 7- Máximos de absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) e coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) para os complexos em diferentes solventes e em meio sólido. ....	97
Tabela 8 - Dados eletroquímicos para os complexos. ....	102
Tabela 9- Valores de constantes de desprotonação para os complexos. ....	104
Tabela 10- Valores encontrados para “pH ótimo” dos complexos e a correlação entre $pK_a$ cinéticos e $pK_a$ espectrofotométricos na qual as constantes refletem a coordenação da molécula de água aos centros metálicos. ....	115
Tabela 11-Parâmetros cinéticos dos complexos $FeL_1$ , $CoL_1$ e $CuL_1$ e a comparação com a literatura.....	117
Tabela 12- Valores encontrados para “pH ótimo” do complexo $FeL_1$ e a correlação entre $pK_a$ cinéticos e $pK_a$ espectrofotométrico no qual as constantes refletem a coordenação da molécula de água aos centros metálicos. ....	125
Tabela 13-Parâmetros cinéticos obtidos calculados para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisadas pelo complexo $FeL_1$ . ....	126
Tabela 14- Comparação dos valores de $k_{\text{obs}}$ ( $h^{-1}$ ) dos complexos e a comparação com a literatura.....	134
Tabela 15- Valores de $K_B$ para os complexos $FeL_1$ e $CuL_1$ .....	139



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>2Ald-Fenol</b>	2-hidroxi-1,3-metilaldeído
<b>2py2mff</b>	4-metil-2,6-bis (3-(piridin-2-il) propil) fenol
<b>2py2mff-fenol</b>	3,3 '- (((2-hidroxi-5-metil-1,3-fenileno) bis (metileno)) bis (piridin-2-ilmetil) bis (metileno)) bis (2-hidroxi -5-metil-benzaldeído))
<b>3,5-DTBC</b>	3,5-di- <i>terc</i> -butilcatecol
<b>3,5-DTBQ</b>	3,5-di- <i>terc</i> -butilquinona
<b>CD</b>	Dicloísmo Circular
<b>CMFF</b>	2-clorometil-4-metil-6-formofenol
<b>CoL<sub>1</sub></b>	Complexo binuclear de Co <sup>III</sup>
<b>CuL<sub>1</sub></b>	Complexo binuclear de Cu <sup>II</sup>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>E</b>	Eficiência Catalítica
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminatetraacético
<b>ENH</b>	Eletrodo normal de hidrogênio
<b>E<sub>pa</sub></b>	Potencial do pico anódico
<b>E<sub>pc</sub></b>	Potencial do pico catódico
<b>ESI-MS</b>	Espectrometria de massa com ionização via eletrospray
<b>FeL<sub>1</sub></b>	Complexo binuclear de Fe <sup>III</sup>
<b>H<sub>2</sub>BPBMP</b>	2-[ <i>N</i> -bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[ <i>N</i> -(2-hidroxi-benzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol
<b>HMB</b>	2-hidroxi-5-metilbenzaldeído
<b>IV</b>	Espectro na região do Infravermelho
<b>K<sub>ass</sub></b>	Constante de associação
<b>K<sub>b</sub></b>	Constante de ligação intrínseca
<b>k<sub>cat</sub></b>	Constante catalítica
<b>K<sub>M</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>k<sub>obs</sub></b>	Constante Cinética do DNA
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>PAP's</b>	Fosfátases Ácidas Púrpuras
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>S</b>	Substrato
<b>T</b>	Tampão
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético

<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>UV-Vis</b>	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível
<b>V</b>	Volt
<b>v<sub>0</sub></b>	Velocidade Inicial
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidade máxima
<b>δ</b>	Deformação angular (IV)
<b>δ<sub>H</sub></b>	Deslocamento químico do hidrogênio (RMN <sup>1</sup> H)
<b>ε</b>	Absortividade molar
<b>λ<sub>máx</sub></b>	Comprimento de onda, absorção máxima
<b>v</b>	Estiramento (IV)





## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>27</b>
2.1	QUÍMICA BIOINORGÂNICA .....	27
2.2	O PAPEL DOS METAIS NAS METALOENZIMAS .....	28
2.3	CATECOL OXIDASE .....	32
<b>2.3.1</b>	<b>Reações na catálise oxidativa</b> .....	<b>32</b>
<b>2.3.2</b>	<b>A enzima catecol oxidase</b> .....	<b>32</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Complexos modelos para catecol oxidase</b> .....	<b>37</b>
2.4	ÁCIDOS NUCLÉICOS E LIGAÇÕES FOSFODIÉSTER ...	39
2.5	FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS .....	41
<b>2.5.1</b>	<b>Complexos modelos para Fosfatases Ácidas Púrpuras</b> ....	<b>45</b>
2.6	PROMISCUIDADE CATALÍTICA .....	48
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>51</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTAL</b> .....	<b>53</b>
4.1	MATERIAIS .....	53
4.2	MÉTODOS DE INSTRUMENTAÇÃO .....	53
<b>4.2.1</b>	<b>Espectroscopia no Infravermelho – IV</b> .....	<b>53</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio – RMN <sup>1</sup>H</b> .....	<b>54</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)</b> .....	<b>54</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Espectrometria de massas</b> .....	<b>54</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Eletroquímica</b> .....	<b>54</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Titulação Espectrofotométrica</b> .....	<b>55</b>
<b>4.2.7</b>	<b>Análise elementar de CHN</b> .....	<b>55</b>
<b>4.2.8</b>	<b>Testes cinéticos</b> .....	<b>56</b>
3.3.9.1	Atividade catalítica frente a reações de oxidação .....	57

3.3.9.2	Atividade catalítica frente a reações de hidrólise.....	58
4.3	INTERAÇÃO COM O DNA.....	59
4.3.1	<b>Efeito do pH na Clivagem do DNA .....</b>	<b>60</b>
4.3.2	<b>Constante Cinética dos complexos (<math>k_{obs}</math>).....</b>	<b>60</b>
4.3.3	<b>Dicroísmo Circular .....</b>	<b>61</b>
4.3.4	<b>Constante de ligação (Kb) .....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>SINTESES .....</b>	<b>63</b>
5.1	SÍNTESE DO PRECURSOR (2-CLOROMETIL-4-METIL-6-FORMOFENOL)-CMFF .....	63
5.2	SÍNTESE DO PRECURSOR 2ALD-FENOL (2-HIDROXI-1,3-METILALDEÍDO).....	66
5.3	SÍNTESE DO PRECURSOR 2PY-FENOL - [4-METIL-2,6-BIS (3- (PIRIDIN-2-IL) PROPIL) FENOL].....	68
5.4	SÍNTESE DO LIGANTE SIMÉTRICO 2PY2MFF-FENOL [3,3 -' - (((2-HIDROXI-5-METIL-1,3-FENILENO) BIS (METILENO)) BIS (PIRIDIN-2-ILMETIL) BIS (METILENO)) BIS (2-HIDROXI -5-METIL-BENZALDEÍDO))] .....	70
5.5	SÍNTESE DO COMPLEXO FeL <sub>1</sub> .....	73
5.6	SÍNTESE DO COMPLEXO CoL <sub>1</sub> .....	74
5.7	SÍNTESE DO COMPLEXO CuL <sub>1</sub> .....	76
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>79</b>
6.1	CARACTERIZAÇÃO DO LIGANTE .....	80
6.1.1	<b>Espectroscopia no Infravermelho – IV .....</b>	<b>80</b>
6.1.2	<b>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear RMN <sup>1</sup>H .....</b>	<b>82</b>
6.1.3	<b>Espectrometria de massa do ligante 2py2mff-Fenol.....</b>	<b>83</b>
6.2	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS .....	85
6.2.1	<b>Espectroscopia no infravermelho –IV.....</b>	<b>85</b>
6.2.2	<b>Espectrometria de massas .....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>Análise elementar de CHN.....</b>	<b>94</b>
7.1.1	<b>Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis .....</b>	<b>95</b>

<b>7.1.2</b>	<b>Eletrouímica .....</b>	<b>98</b>
<b>7.1.3</b>	<b>Titulação espectrofotométrica.....</b>	<b>104</b>
<b>7.2</b>	<b>REATIVIDADE.....</b>	<b>111</b>
<b>7.2.1</b>	<b>Reatividade dos complexos frente ao substrato 3,5-DTBC .....</b>	<b>111</b>
5.3.1.1	Efeito do pH para reação de oxidação do 3,5-DTBC .....	112
5.3.1.2	Efeito da concentração do substrato na reação de oxidação do 3,5-DTBC.....	115
<b>7.2.2</b>	<b>Proposta mecanística para reação de oxidação do 3,5-DTBC .....</b>	<b>119</b>
<b>7.2.3</b>	<b>Reatividade do complexo FeL<sub>1</sub> frente ao substrato 2,4-BDNPP – Estudo da promiscuidade catalítica.....</b>	<b>121</b>
5.3.2.1	Efeito do pH para reação de hidrólise do 2,4-BDNPP .....	123
5.3.2.2	Estudo da concentração do substrato 2,4-BDNPP.....	125
<b>7.2.4</b>	<b>Proposta mecanística para hidrólise do 2,4-BDNPP .....</b>	<b>127</b>
<b>8</b>	<b>ESTUDOS DE CLIVAGEM DO DNA.....</b>	<b>131</b>
8.1	EFEITO DO pH .....	131
8.2	ESTUDO DA CONSTANTE CINÉTICA ( $k_{obs}$ ).....	133
8.3	DICROÍSMO CIRCULAR .....	134
8.4	ESTUDO DA INTERAÇÃO COM O DNA POR ESPECTROSCOPIA ELETRONICA ( $K_B$ ) .....	137
<b>9</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>141</b>
<b>10</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>142</b>
<b>11</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>143</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Entre tantos assuntos estudados em química, a bioinorgânica tem ganhado grande destaque nos últimos anos por apresentar uma ampla interdisciplinaridade e relevância quanto aos estudos dos metais em meio biológico. Um dos focos de estudo dessa área é a síntese de compostos biomiméticos, os quais atuam de modo a imitar compostos biologicamente naturais, como as enzimas, as quais são conhecidas por seu papel como catalisadores de reações metabólicas.

Tamanha é a importância desses compostos naturais, que muitos estudos são realizados fazendo o “*design*” de miméticos, ou seja, imitam o centro ativo dessas moléculas, com a finalidade de compreensão da atuação das enzimas como catalisadores. A utilização de modelos miméticos que se assemelham às metaloenzimas é muito vantajosa, pois as moléculas sintetizadas apresentam menor complexidade, menor massa molecular, são relativamente mais estáveis e apresentam baixo custo comparado às enzimas nativas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Com base em pesquisas e leituras, é apresentado um breve histórico dos compostos biomiméticos, os principais trabalhos publicados nos últimos anos sobre o assunto além dos tópicos de relevância para este trabalho, para um melhor entendimento da pesquisa realizada.

### 2.1 QUÍMICA BIOINORGÂNICA

A química bioinorgânica pode ser definida, de modo simplificado, como a investigação da função do metal em ambientes biológicos. O surgimento da bioinorgânica se deu por volta dos anos 70 e por ser uma ciência ampla e multidisciplinar atrai pesquisadores de diversas áreas do conhecimento como, por exemplo: Química, Bioquímica, Física e Matemática. O crescimento desta área deve-se principalmente à necessidade de compreender plenamente os processos biológicos mediados por metais (LU, *et al.*, 2018; COWAN, 1993).

A química inorgânica e a biologia são ciências que se beneficiam muito uma da outra. Portanto, a química inorgânica sintética e física foi bem sucedida em esclarecer o papel dos íons metálicos nos sistemas biológicos. A química bioinorgânica sintética é possível graças a uma série de desenvolvimentos em biologia. Com isso, chega-se à conclusão

de que sistemas de modelos biomiméticos é a combinação dessas duas áreas (LU, *et al.*, 2018).

Embora as metaloproteínas sejam conhecidas há quase um século, foi somente na década de 1960 que os químicos inorgânicos tentaram sintetizar cofatores biológicos. Esta abordagem bem sucedida utiliza ligantes multidentados contendo heteroátomos relevantes para ligar metais com no mínimo um estado de oxidação e números de coordenação. Uma grande vantagem estratégica foi que pequenas moléculas eram fáceis de cristalizar, permitindo que complexos bem definidos fossem usados como modelos para espectroscopia e reatividade nos sítios das metaloproteínas enigmáticas. Através destes estudos, muitos sistemas bioinorgânicos interessantes foram revelados (MOCNY & PECORARO, 2015).

No entanto, apesar do grande progresso na modelagem biomimética, ainda é difícil imitar algumas das características das metaloproteínas, como por exemplo: modulação de sítios específicos da esfera de coordenação secundária e régio-estéreo seletividade do sistema. Modelos que produzem tanto a estrutura como a função das metaloproteínas são raras e esse talvez seja um dos maiores desafios no design de ligantes para essa função (HOLM & SOLOMON, 2004).

Diversos sistemas requerem a presença de íons metálicos para o seu funcionamento, com isso o número de artigos publicados em química bioinorgânica tem aumentado consideravelmente com o passar dos anos. Além disso, metais não essenciais também têm sido introduzidos na biologia humana tanto no diagnóstico como também no tratamento de doenças na forma de fármacos (MAECK, 2016; MOCNY & PECORARO, 2015; LIPPARD & BERG, 1994).

## 2.2 O PAPEL DOS METAIS NAS METALOENZIMAS

As proteínas são classificadas como macromoléculas e apresentam diferentes papéis biológicos. São formadas a partir de aminoácidos por ligações peptídicas, sendo que muitos destes possuem átomos doadores de elétrons adequados à quelação de íons metálicos (NELSON & COX, 2008; FENTON, 1995).

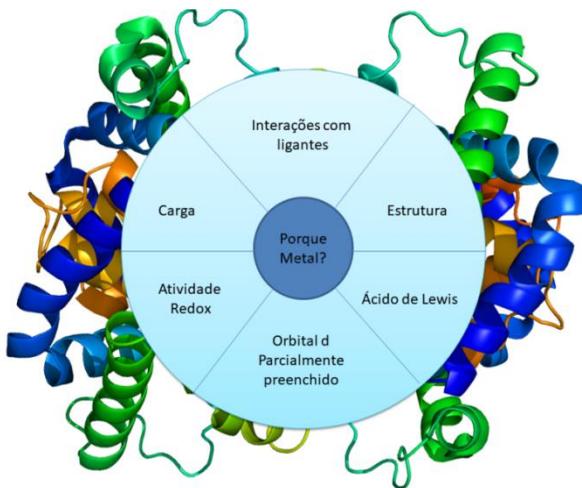
As enzimas são as proteínas mais notáveis, são unidades funcionais do metabolismo celular, pois apresentam atividade catalítica, ou seja, elas aceleram as reações químicas sem a formação de subprodutos, apresentam maior grau de especificidade por seus substratos e funcionam, na sua grande maioria, em soluções aquosas diluídas em condições brandas de temperatura e pH (HOLM, 1996; FENTON, 1995). A sele-

ção de um metal para sua utilização na catálise enzimática resulta da combinação de suas propriedades físico-químicas como o potencial redox e a química de coordenação, e sua acessibilidade ao ambiente de coordenação por sistemas biológicos (WIESZCZYCKA & STASZAK, 2017).

Os íons metálicos tem um papel muito importante e realizam uma variedade de funções associadas aos sistemas vivos, podem atuar no sistema estrutural para estabilizar a estrutura da proteína e no funcional em que os íons metálicos estão envolvidos na reatividade do sítio ativo (FENTON, 1995). As interações entre íons metálicos e biomoléculas são geralmente da mesma natureza das existentes em complexos, e por isso são tratadas de acordo com as teorias da química de coordenação, por esse motivo as propriedades das biomoléculas que contém metais dependem do número e distribuição de elétrons de valência nos orbitais *d* (COWAN, 1993).

Pesquisadores estudaram por muito tempo propriedades, função e mecanismo das metaloenzimas, e foi concluído que sua atividade depende de fatores como: ajuste de suas propriedades redox, acessibilidade ao substrato e acidez de Lewis de seu centro metálico. A reatividade e seletividade das enzimas podem ser modificadas pela mudança do caráter doador e/ou receptor dos ligantes, controlando sua geometria e disposição ao redor do centro metálico (WIESZCZYCKA & STASZAK, 2017; MOCNY & PECORARO, 2015). A Figura 1 mostra em um esquema as propriedades necessárias de um composto de coordenação para que possa atuar como um catalisador enzimático.

Figura 1- Propriedades químicas dos metais.



Adaptado de (WIESZCZYCKA & STASZAK, 2017).

As enzimas são divididas em seis classes diferentes, e ainda apresentam subclasses. Como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1- Classificação das enzimas.

Nº da Classe	Nome da Classe	Função
1	Oxirredutases	Transferência de elétrons
2	Transferases	Transferem grupos funcionais
3	Hidrolases	Reações de hidrólise
4	Liases	Adicionam ou removem elementos de água, amônia ou dióxido de carbono.
5	Isomerases	Realizam reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos
6	Ligases	Catalisam a ligação entre duas moléculas.

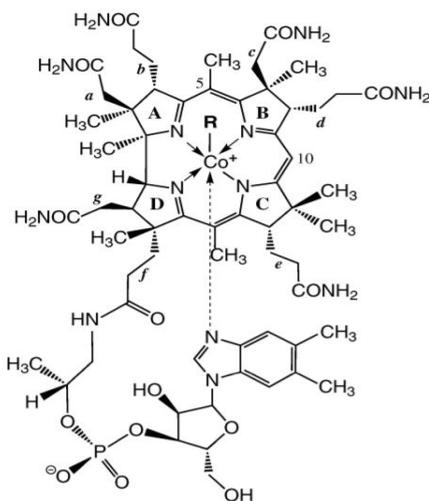
Adaptado de (NELSON & COX, 2008).

Destacam-se neste trabalho, as enzimas que tem como função a transferência de elétrons e as que realizam reações de hidrólise. No entanto, muitas enzimas não conseguem realizar suas funções sozinhas e

precisam da ajuda de um cofator. Os cofatores são compostos orgânicos ou inorgânicos essenciais para a atividade de uma enzima, e estão ligados permanentemente a molécula da enzima, mas na ausência deles a enzima é inativa. A vitamina B<sub>12</sub>, também conhecida como cobalamina, responsável pelo crescimento celular e respiração, é formada por um átomo de cobalto em um anel tetrapirrólico e é um exemplo de coenzima (GRUBER, 2011).

O íon cobalto pode estar ligado variavelmente a grupos metila, 5'-desoxidenosil, hidróxi ou ciano, dando origem às diferentes formas da vitamina: metal-cobalamina, desoxidenol-cobalamina, hidróxi-cobalamina e ciano-cobalamina. Sendo as duas primeiras formas suas coenzimas. A Figura 2 mostra a vitamina B<sub>12</sub> e a forma de coenzima.

Figura 2- Fórmula estrutural das cobalaminas Vitaminas B<sub>12</sub> (R = CN, CH<sub>3</sub> e adenosicobalaminos).



Adaptado de (GRUBER, 2011).

Assim, o desenvolvimento de complexos miméticos com o objetivo de melhor compreender as funções e reações enzimáticas tem sido foco de químicos bioinorgânicos durante as últimas décadas. Além de compreender o possível mecanismo de atuação da enzima através de tais miméticos, uma ideia de longo prazo é desenvolver complexos que seriam muito úteis como catalisadores.

## 2.3 CATECOL OXIDASE

### 2.3.1 Reações na catálise oxidativa

Reações de oxidação são fundamentais em síntese orgânica e desempenham um papel importante na produção de produtos farmacêuticos, agroquímicos e produtos finos. Por isso, os processos de oxidação em indústrias químicas envolvem predominantemente o uso de oxigênio molecular como o oxidante primário (DEY & MUKHERJEE, 2016; COWAN, 1993).

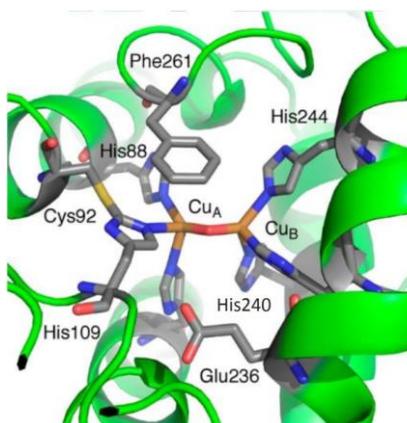
Quando as reações de oxidação são promovidas por enzimas, o cofator deve possuir pelo menos um estado de oxidação e um sítio de coordenação disponível para ligação com o substrato. A estrutura eletrônica do cofator também promove a fácil coordenação ao substrato e posterior liberação do produto, sendo que este sítio de coordenação vago geralmente pode estar ocupado por uma molécula de água fracamente coordenada que pode ser rapidamente substituída pelo substrato (WIESZCZYCKA & STASZAK, 2017; COWAN, 1993). As reações de oxidação promovidas por enzimas envolvem basicamente a transferência de elétron, e uma das mais conhecidas por promoverem esse tipo de reação são as catecóis oxidases. Reações utilizando catalisadores que ativam a formação de oxigênio molecular são inspiradoras, além disso, são uma forma de elucidar o mecanismo de atuação das enzimas e auxiliar na compreensão de compostos de coordenação para químicos bioinorgânicos.

### 2.3.2 A enzima catecol oxidase

As catecóis oxidases, são metaloenzimas com centro binuclear de cobre que pertencem à classe das oxirredutases, e são classificadas como enzimas de cobre do tipo III. Elas são conhecidas por promoverem a catálise de reações de transferência de dois elétrons, durante a oxidação do substrato *o*-difenol para sua *o*-quinona correspondente (ZÉRON, *et al.*, 2017; DEY, *et al.*, 2014; MARTÍNEZ, *et al.*, 2012; MAJUMDER, *et al.*, 2013). A atividade de catecolase ocorre a partir da redução do oxigênio molecular à água, em um processo conhecido como atividade de catecolase. As quinonas resultantes altamente reativas sofrem auto polimerização, formando um pigmento polifenólico marrom (melanina), que serve para proteger um tecido danificado de patógenos e insetos (MOLITOR, *et al.*, 2016; SOLEM, *et al.*, 2016; KOVAL, *et al.*, 2006). A Figura 3 demonstra a estrutura do sítio ativo da catecol oxidase da

*Ipomoeas batatas* (batata doce) na sua forma oxidada (forma *met*). Em laranja estão representados os átomos de cobre e em vermelho o átomo de oxigênio da ponte exógena  $\mu$ -hidroxo (SOLOMON, 2014).

Figura 3- Sítio ativo da catecol oxidase na forma oxidada (forma *met*) encontrada na *Ipomoeas batatas*.

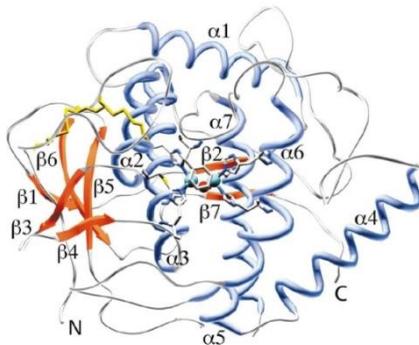


Adaptado de (SOLOMON, 2014).

A primeira enzima da catecol oxidase foi isolada em 1937 a partir de uma gama de vegetais e frutas – como, por exemplo, batata, espinafre, maçã e uva. No entanto, a presença das catecóis oxidases não se restringe somente as plantas. Essa enzima está presente também em insetos e crustáceos e suas principais funções incluem a fotossíntese, coloração de flores e a proteção contra ataques patogênicos. (PENTTINER, *et al.*, 2018; KREBS, *et al.*, 2002).

As enzimas têm uma massa molar que varia de 38 a 45 kDa e seu formato elipsoidal com dimensões de 55 x 45 x 45 Å e a estrutura secundária é denominada por regiões de  $\alpha$ -hélice. Sua estrutura cristalina quanto extraída da batata doce *Ipomoeas batatas*, foi resolvida, nas formas oxidada Cu(II)-Cu(II) e reduzida Cu(I)-Cu(I) (EICKEN; ZIPPEL; BÜLDT-KARENTZOPOULOS; KREBS, 1998; KLABUNDE *et al.*, 1998). A Figura 4 apresenta a estrutura tridimensional da catecol oxidada encontrada na *Ipomoeas batatas* (batata doce) onde os átomos de cobre estão representados em laranja, alfa hélices em azul, folhas beta em verde e ligações dissulfeto em amarelo (KREBS, *et al.*, 2002).

Figura 4 – Representação da estrutura tridimensional da enzima catecol oxidase encontrada na *Ipomoeas batatas*.

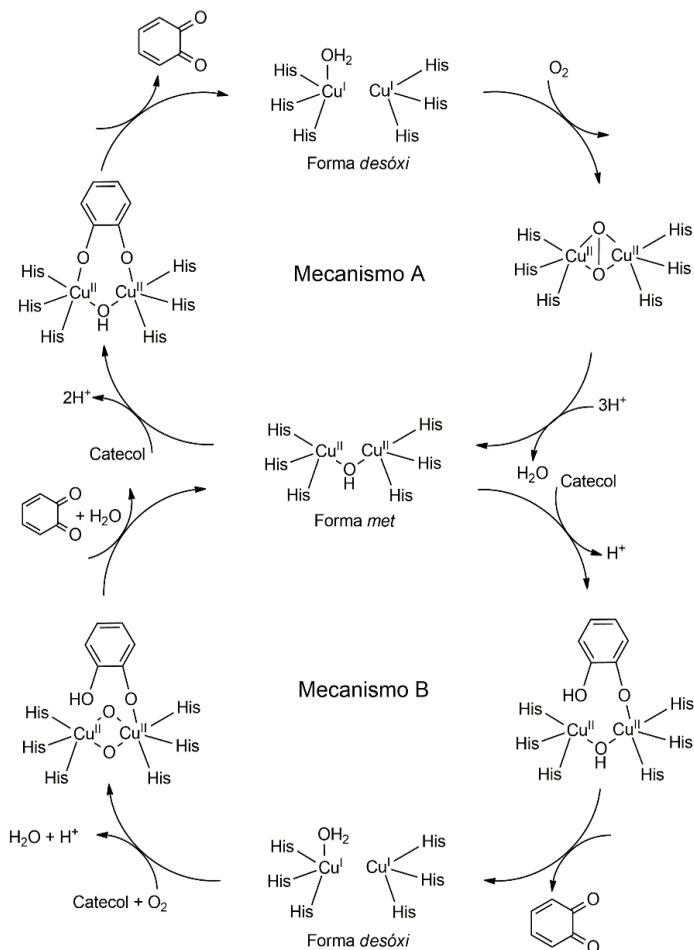


Adaptado de (SOLOMON, *et al.*, 2014).

Klabunde, em 1998 descreveu a estrutura cristalina da catecol oxidase, em que se concluiu que a enzima apresenta em seu sítio ativo um centro binuclear de cobre(II), uma ponte hidróxido e cada um dos centros de cobre(II) está coordenado por três átomos de nitrogênio provenientes dos resíduos de histidina o qual adota um ambiente quase trigonal-piramidal, cuja estrutura é conhecida como a forma *met* da enzima. Portanto, a estrutura cristalina da catecol apresentaria três estados distintos: o estado nativo *met*, no qual o centro metálico estaria na forma ( $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$ ), a *desoxi*, na qual os dois centros de cobre estariam reduzidos e, portanto, na forma ( $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{I}}$ ) e o estado de complexação com o inibidor tiofenil. Assim o dioxigênio produz a forma *oxi*, a qual sofre ataque nucleofílico da molécula de difenol. A oxidação para a *o*-quinona correspondente conduz à forma *met* novamente, fechando o ciclo catalítico, como apresentado na Figura 5 (**Mecanismo A**). Muitos trabalhos propõem que inicialmente o substrato se liga a enzima de forma monodentada após a desprotonação da hidroxila, facilitando a redução da forma *met* ( $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$ ) (DEY & MUKHERJEE, 2016; SOLEM, *et al.*, 2016; EICKEN, *et al.*, 1999; KLABUNDE, *et al.*, 1998). No entanto, ainda existem muitas especulações sobre tal fato, pois o mesmo não foi confirmado. Um exemplo de como ocorre o ciclo catalítico com o substrato coordenando-se de forma monodentada é apresentado na Figura 5 (**Mecanismo B**). O ciclo inicia-se com a forma *met*, onde o substrato coordena-se e é liberado na forma de *o*-quinona. Neste momento o centro metálico apresenta-se na forma reduzida desóxi, enquanto isso o dioxigênio produz a forma *oxi*, a qual sofre ataque nucleofílico da molécula de *o*-difenoil. A oxidação para a quinona correspondente conduz à forma

*met* novamente, fechando o ciclo catalítico (PENTTINER, *et al.*, 2018; DEY & MUKHERJEE, 2016; KLABUNDE, 1998).

Figura 5- Mecanismo da catálise oxidativa.



Adaptado de (DEY & MUKHERJEE, 2016).

Complexos de cobalto têm sido pouco investigados como miméticos para atividade de catecolase e poucos grupos realizaram o estudo de um possível mecanismo para esses complexos. Na maioria dos casos observa-se que é algo muito semelhante ao que ocorre com os centros de



### 2.3.3 Complexos modelos para catecol oxidase

Muitos trabalhos vêm sendo publicados ao longo dos anos, por diversos grupos de pesquisa buscando principalmente compreender o mecanismo destas enzimas. Como já mostrado nas seções anteriores a catecol oxidase apresenta um centro binuclear de cobre(II) em seu sítio ativo, portanto vários complexos com esse metal foram projetados para tal estudo. Além da questão mecanística, pesquisadores buscam modificações que favoreçam a atividade catalítica tanto no ligante como no centro metálico do complexo de coordenação.

Desta forma, pesquisas utilizando complexos de cobalto podem ser destacadas, visto que neste trabalho também se utiliza esse sistema para reações de oxidação. Dey e colaboradores, investiram no estudo da atividade catecolase com diferentes ligantes *o*-doadores, com centro bivalente de cobalto  $\text{Co}^{\text{III}}\text{Co}^{\text{II}}$  (Dey, *et al.*, 2014). Majumder e colaboradores, também realizaram o estudo de um complexo binucleares com valência mista de cobalto, para um complexo macrocíclico (MAJUMDER, *et al.*, 2013). Recentemente, Ghosh e colaboradores, realizaram o estudo de dois complexos mononucleares de Cobalto(III), com ligantes que apresentam em sua estrutura grupos N,O-doadores (GHOSH, *et al.*, 2017). Além de complexos contendo cobalto, centros binucleares de cobre(II), manganês(II) e ferro(III), também recebem destaque nos estudos de reações de oxidação. (OLIVEIRA, *et al.*, 2016; MAGHESURAM, *et al.*, 2018; CAMARGO, *et al.*, 2015).

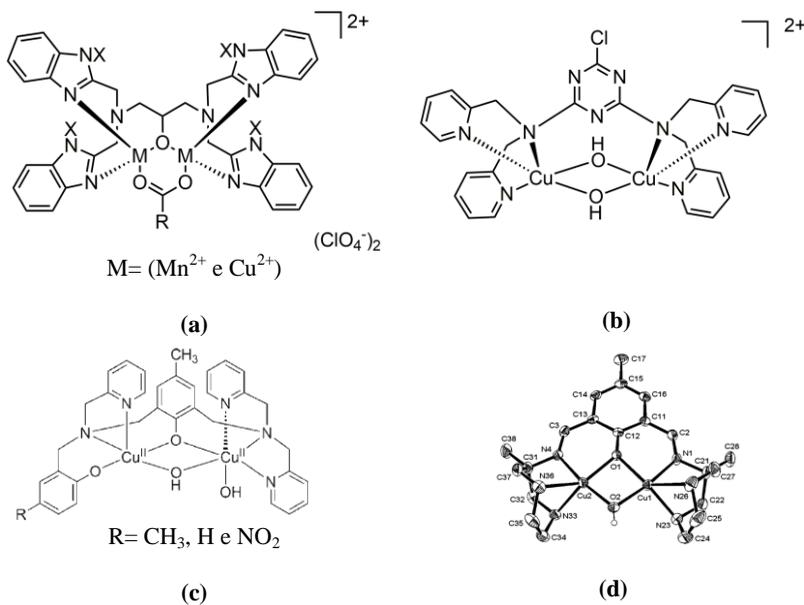
Recentemente foi publicado por Oliveira e colaboradores, um complexo binuclear de cobre(II) com ligantes do tipo triazinas, no qual além de ser avaliada a atividade catalítica deste complexo e mecanismo de atuação, também foi investigada a polimerização de dopamina utilizando o complexo de cobre (OLIVEIRA, *et al.*, 2016). Maghesuran e colaboradores compararam a atividade catalítica de um ligante simétrico contendo grupos imidazóis coordenados a centros binucleares de cobre(II), assim como o efeito causado na atividade quando esses centros metálicos foram substituídos por manganês(II). Observando que a presença de manganês(II) promove a diminuição da atividade catalítica, além disso suas pesquisas demonstraram que metais de transição suportados por ligantes relativamente ricos em elétrons produzem maiores valores de  $k_{\text{cat}}$  para a oxidação do catecol (MAGHESURAM, *et al.*, 2018).

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando porfirinas ligadas aos centros metálicos de cobre(II) como, por exemplo, o trabalho publicado por Castro e colaboradores, no qual utilizam macrociclo tetra-

pirrólico para elaboração de complexos de cobre(II) com a finalidade de avaliar não somente a atividade catalítica da catecol oxidase, mas também a utilização destes complexos como agentes antitumorais (CASTRO, *et al.*, 2016). Rey e colaboradores estudaram as propriedades do complexo binuclear utilizando fenantrolina ligadas ao centro metálico de cobre(II) além das propriedades do complexo como catalisador da reação de oxidação, também foram testadas suas interações com ácidos nucleicos e sua atividade como antitumoral (REY, *et al.*, 2015).

Os trabalhos citados são apenas alguns exemplos do que já foi estudado recentemente com centros metálicos em reações de oxidação envolvendo a enzima catecol oxidase. Apesar de sempre ser buscado um melhor entendimento do mecanismo de atuação da enzima e melhoria das atividades catalíticas dos complexos modelos, muitos trabalhos têm investido no estudo de propriedades secundárias, como por exemplo: atividades antitumorais, antibacterianas ou interações com ácidos nucleicos, com a finalidade de aprofundar os estudos dos complexos com meios biológicos. Alguns exemplos destes estudos são apresentados na Figura 7.

Figura 7- Complexos publicados na literatura com atividade catecolase, sendo: a) MAGHESURAM, *et al.*, 2018; b) OLIVEIRA, *et al.*, 2016; c) PERALTA, *et al.*, 2010 e d) NEY, *et al.*, 2015.



## 2.4 ÁCIDOS NUCLÉICOS E LIGAÇÕES FOSFODIÉSTER

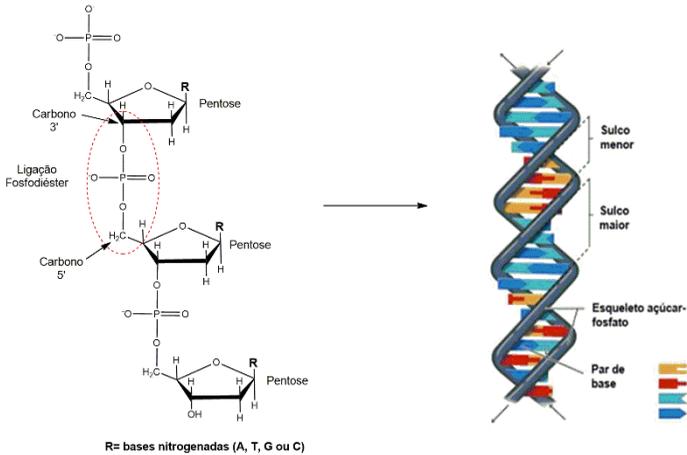
Muitos foram os pesquisadores que direta ou indiretamente contribuíram para elucidar as questões sobre função e estrutura da molécula do DNA. Compreender e esclarecer essa estrutura incentivou a busca do entendimento dessas moléculas no ambiente biológico (PATHAK, *et al.*, 2017; OLIVEIRA, *et al.*, 2004).

O DNA e RNA são conhecidos como ácidos nucleicos, no entanto se diferem, em suas estruturas e funcionalidade. O DNA possui em sua estrutura duas cadeias helicoidais enquanto o RNA possui apenas uma. Além disso, O DNA é responsável pelo armazenamento das informações genéticas, enquanto o RNA é responsável por sintetizar proteínas. São compostos por estruturas chamadas nucleotídeos as quais se unem para formar uma dupla hélice, a qual foi descoberta pelos cientistas James Watson e Francis Crick em 1956. De modo geral, o DNA é um polímero, o qual carrega em sua estrutura todas as informações genéticas (NELSON & COX, 2008).

Os nucleotídeos, que fazem parte da estrutura do DNA, são compostos de uma base nitrogenada, a qual pode ser tanto adenina, guanina, citosina, timina ou (no caso de RNA, a timina é substituída por uracila), um açúcar de cinco carbonos, a ribose, e um ou mais grupos fosfato. Sua estrutura apresenta duas cadeias polinucleotídicas em formato de hélice, formando uma dupla-hélice, cujas fitas se envolvem em torno do próprio eixo em sentidos opostos (uma  $5' \rightarrow 3'$  e outra  $3' \rightarrow 5'$ , seguindo suas ligações fosfodiéster junto aos átomos de oxigênio do açúcar. A Figura 8 exemplifica a estrutura do DNA (WATSON E CRICK, 1953; NELSON & COX, 2008).

As duas unidades de açúcar-fosfato se retorcem em uma conformação helicoidal em torno do pacote de pares de bases central. Dessa maneira é formada duas regiões bem definidas na estrutura do DNA, as quais são denominadas de sulco maior e sulco menor. Devido à característica de pareamento as duas fitas de DNA são ditas complementares. Essa propriedade garante a replicação precisa do DNA e por sua vez a transmissão dos códigos genéticos (BERG, 2002). A Figura 8 apresenta a estrutura do DNA, sendo possível observar a composição da estrutura do DNA assim como as bases nitrogenadas que compõe a macromolécula, assim como as regiões de sulco.

Figura 8- Composição e estrutura tridimensional do DNA mostrando a interação entre os nucleotídeos, o esqueleto açúcar-fosfato e os sulcos maiores e menores da molécula.



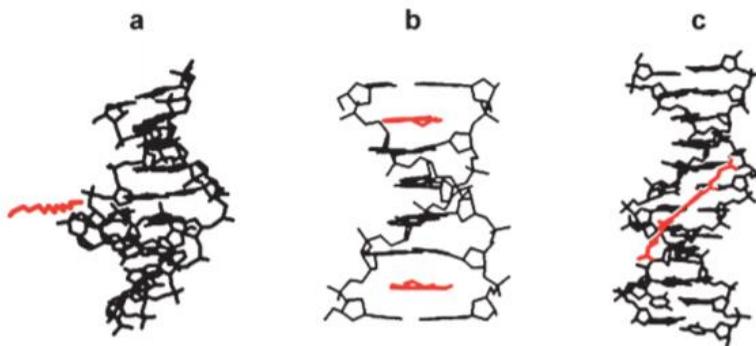
Adaptado de (HORTON, 2006).

As enzimas podem alterar ou reconhecer uma conformação em lugares específicos do DNA. A estrutura tridimensional mais encontrada em sistemas biológicos é a forma B, porém outras conformações também são encontradas como as A e Z (NELSON & COX, 2008; BLACKBURN, 2006).

As interações entre pequenas e/ou macromoléculas com o DNA se dão por meio de forças intermoleculares clássicas (ligação covalente, ligação de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, entre outras), associadas a uma região ou macroestrutura da hélice do DNA (bases nitrogenadas, sulco maior ou menor, eixo da hélice ou esqueleto de fosfato-carbono, por exemplo). Existem três maneiras principais em que complexos de baixa massa molar podem interagir com a dupla cadeia de DNA: Interações eletrostáticas, que envolve a ligação da molécula no exterior da hélice por meio de interações não específicas, principalmente com o esqueleto de açúcar-fosfato; intercalação, no qual um sistema de um anel aromático planar se insere entre dois pares de bases adjacentes, perpendiculares ao eixo helicoidal; e ligação pelos sulcos, no qual o ligante faz contato direto com grupos funcionais sobre as bordas das bases que se projetam em ambos os sulcos maior ou menor. Além disso, vários compostos

podem ligar-se ao DNA de modo covalente como é o caso da cisplatina, por exemplo. Os compostos que têm o potencial para ser clinicamente úteis normalmente são intercalantes ou ligantes de sulcos (BLACKBURN, 2006). A Figura 9 exemplifica os tipos de interação com o DNA.

Figura 9- Representações dos três modos principais de interação de moléculas com o DNA. O ligante é mostrado em vermelho e as cadeias de DNA em preto: (a) Interação eletrostática. (b) intercalação. (c) Ligação pelos sulcos



Adaptado de (BLACKBURN, 2006).

Atualmente, há um grande interesse da comunidade científica no desenvolvimento de biomiméticos que possam desempenhar a função de clivagem do DNA e até mesmo atuarem como possíveis antitumorais, além do desenvolvimento de sistemas químicos mais reativos e eficientes na hidrólise de ligações fosfodiéster (PATHAK, *et al.*, 2018; SILVA, *et al.*, 2017; SILVA, *et al.*, 2011; WANG, *et al.*, 2011; PERALTA; *et al.*, 2010).

## 2.5 FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS

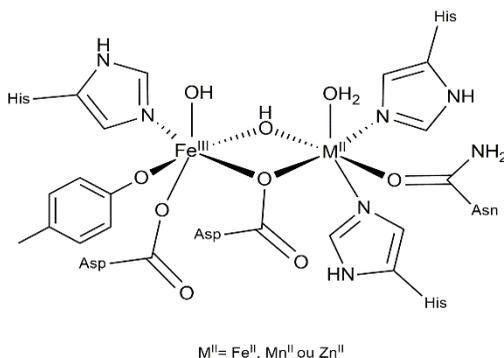
Os ésteres de fosfatos são, sem dúvida, um dos mais importantes grupos em ambientes biológicos, uma vez que desempenham um papel central em vários processos, como a energia intracelular, transferência de energia e metabolismo. Sua alta estabilidade pode ser a principal razão pela qual a natureza prefere este grupo na estrutura biomolecular porque as taxas de hidrólise do fosfato na ausência de um catalisador são extremamente lentas. No entanto, ligações de ésteres de fosfato (P-O) podem hidrolisar na presença de alguns catalisadores específicos como

as Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs) (PATHAK, *et al.*, 2018; ESTEVES, *et al.*, 2015).

As Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs) são metaloenzimas presentes encontrados em animais, plantas, fungos e bactérias e estão associadas a uma variedade de funções biológicas. Pertencem à classe das hidrolases, catalisando a hidrólise de vários substratos fosforilados e tem atividade máxima em uma faixa de pH de 4 a 7. A cor púrpura é resultante de um processo de transferência de carga do tipo ligante-metal (OTyr→Ferro(III) que ocorre em torno de 560 nm e estão entre as enzimas mais eficientes, sendo conhecidas por sua capacidade de reduzir drasticamente a energia de ativação associada à clivagem hidrolítica das ligações fosfodiéster (McGEARY, *et al.*, 2014; SCHENK, *et al.*, 2013; DESBOIUS, *et al.*, 2012; SMITH, *et al.*, 2007; SCHENK, *et al.*, 2008).

O sítio ativo das PAPs é composto por um centro binuclear Fe(III)-M(II) (M=Fe, Mn ou Zn), e foram isoladas de uma variedades de fonte de animais, plantas e leveduras. No entanto as PAPs mais estudadas são provenientes do feijão vermelho (kbPAP) e foi a primeira desse grupo a ter a estrutura cristalina resolvida por Difractometria de raio X. O centro bimetalúco desta enzima é composto por Fe(III) e Zn(II) os quais estão ligados a resíduos de aminoácidos de forma a proporcionar um ambiente de coordenação com menor polarizabilidade e maior densidade eletrônica na região do íon Fe(III) e uma região com maior polarizabilidade e menor densidade eletrônica na região do íon Zn(II) (McGEARY, *et al.*, 2014; SCHENK, *et al.*, 2013; DESBOIUS, *et al.*, 2012). A estrutura geral das PAPs é apresentada na Figura 10.

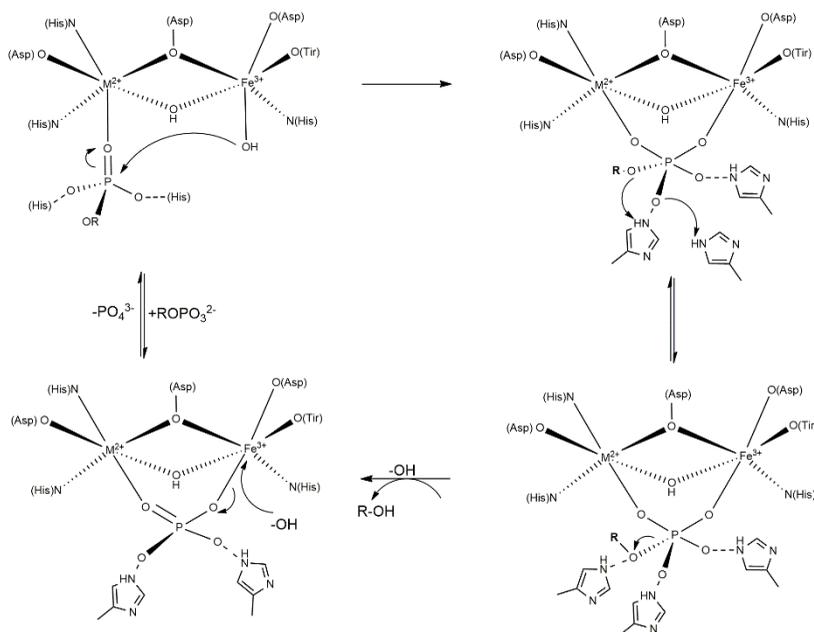
Figura 10- Sítio ativo das Fosfatases Ácidas Purpuras.



Adaptado de (KLABUND, 1996).

A primeira PAP que teve sua estrutura resolvida por difratometria de raio X do grupo das metaloenzimas foi a kbPAP. Com a resolução das estruturas das PAPs, detalhes acerca do mecanismo em que as metaloenzimas hidrolisam os ésteres de fosfato começaram a ser elucidados e a partir disso foi proposto que a reação ocorre por um mecanismo de catálise do tipo  $S_N2$  (DESBOIUS, *et al.*, 2012; KLABUNDE, 1996), como mostrado na Figura 11.

Figura 11- Proposta mecanística de ésteres de fosfatos promovidas pelas PAPs.



Adaptado de (KLABUNDE, 1996).

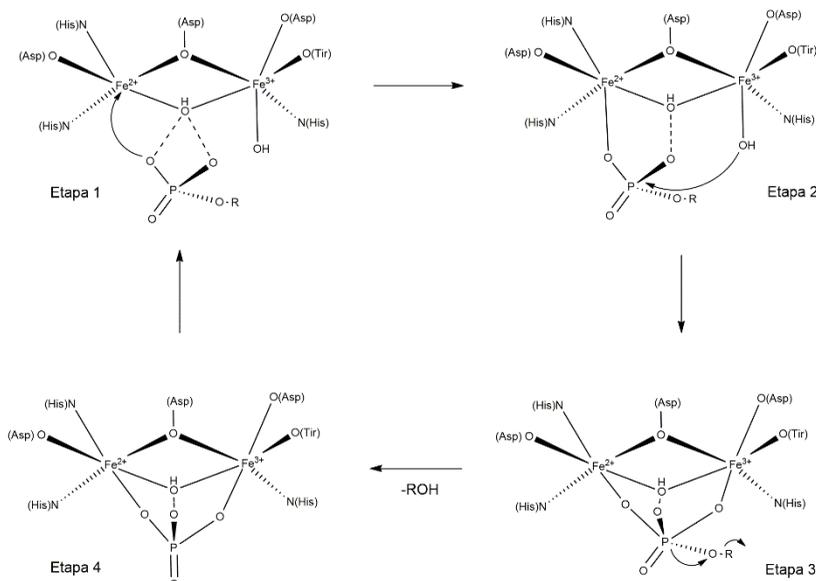
Com base na similaridade estrutural verificada para rbPAP, Lindqvist e colaboradores sugeriram um mecanismo semelhante ao proposto por Klabunde, em que o grupo fosfato de substrato liga-se ao centro do  $M^{II}$  de maneira monodentada, pelo deslocamento de uma molécula de água (LINDQVIST, 1999).

Como o átomo de fósforo tem sua eletrofilicidade aumentada quando o grupo fosfato se coordena, o ataque nucleofílico do íon hidroxila coordenado ao centro de  $Fe^{III}$  é favorecido, visto que está na posição adequada para um ataque “em linha” sobre o átomo de fósforo, como

consequência deste ataque ocorre a inversão de configuração no átomo. Além disso, há três histidinas (His202, His295 e His 296) próximas ao centro bimetálico em posições que podem interagir com o íon fosfato. Para enzimas PAPs de mamíferos este papel é desempenhado por dois resíduos de histidinas e um aspartato (LINDQVIST, 1999).

O ataque nucleofílico resulta em um estado de transição pentacoordenado que deve ser estabilizado pelos resíduos de histidinas, His202 e His 295, conservados no sítio ativo. A hidrólise deve ocorrer a partir da protonação do grupo álcool abandonador pelo resíduo de histidina His296, e consequentemente a clivagem da ligação P-OR. Recentemente, Selleck e colaboradores propuseram um mecanismo para (ufPAPs), o qual está ilustrado na Figura 12.

Figura 12- Proposta mecanística de ésteres de fosfatos promovidas pelas PAPs.



Adaptado de (SELLECK, 2017).

Na etapa 1, o substrato interage via ligações de hidrogênio, com o grupo  $\mu-OH$  no local ativo. Este modo de ligação foi inicialmente proposto com base em medidas cinéticas de fluxo interrompido. Seguindo para a etapa 2, o substrato se reorganiza para formar um complexo de Michaelis, cataliticamente competente, ligando-se de forma monodentada. Possivelmente, nesta fase, uma molécula de água entra no sítio ativo

e coordena-se ao centro de Ferro(III). Assim, o substrato está preparado para o ataque por este mesmo centro metálico. O ataque do substrato leva a um estado de transição pentacoordenado, e a ligação entre oxigênio e o  $\mu$ -OH desempenha um papel fundamental na estabilização neste estado. A liberação do grupo de saída (etapa 3) leva a um complexo ligado ao produto. A liberação subsequente da fração de fosfato regenera o sítio ativo para o próximo ciclo catalítico (SELLECK, *et al.*, 2017).

O papel das PAPs em organismos vivos ainda não foi totalmente esclarecido, entende-se apenas que a mesma esteja envolvida em uma diversidade de processos, que vão desde a geração de espécies que reagem ao oxigênio (ROS) em macrófagos até doenças metabólicas dos ossos como osteoporose e câncer com metástases (McGEARY, 2014). Desta forma, a elaboração de complexos modelos se mostra bastante útil, uma vez que se consiga simular todo o ambiente enzimático envolvido no processo de catálise. Na próxima seção, serão apresentados alguns trabalhos recentes de compostos de hidrolases sintéticas.

### 2.5.1 Complexos modelos para Fosfatases Ácidas Púrpuras

Um grande número de estudos envolvendo compostos miméticos que funcionam como modelo para as PAPs foram relatados na literatura. No entanto, pesquisadores bioinorgânicos tem dado atenção à síntese de complexos metálicos que favoreçam a formação de ponte exógenas entre os metais ligados a grupos N,O-doadores e presença de sítios lábeis, os quais mostram-se importantes no processo catalítico (ZHAO, M. *et al.*, 2013).

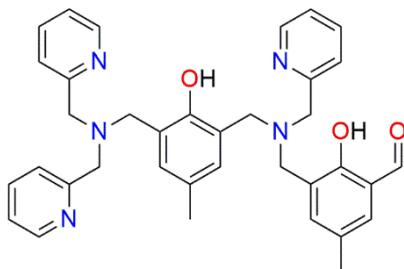
Peralta e colaboradores, investigaram o efeito de uma série de ligantes com grupos retiradores para um complexo de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  na atividade catalítica além do estudo mecanístico da ação dos catalisadores. Neste trabalho também se investigou como modificações nos ligantes poderiam influenciar na clivagem do DNA plasmidial e citotoxicidade dos compostos de coordenação (PERALTA, *et al.*, 2010).

Muitos trabalhos têm levado em consideração a variação do centro divalente e como a atividade catalítica é influenciada com a mudança do metal coordenante. Trabalhos como este foram publicados por Schenk, no qual realizou-se um estudo utilizando o centro metálico de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}$ . Lanznaster e colaboradores pesquisaram a atividade catalítica para centros binucleares de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  utilizando o ligante (BPBPMP), que apresenta três grupos piridínicos e um grupo fenolato, este ligado ao centro de Ferro(III). Em seu trabalho também foram realizados estudos de interação com ésteres de fosfato. Em 2017, Pathak e colaboradores

também avaliaram a eficiência de variados centros metálicos para um ligante com grupos piridínicos coordenados a  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$  no qual  $\text{M}^{\text{II}}$  (Zn, Ni, Co e Cu) enquanto, Smith e colaboradores estudaram um centro metálico de  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ . (SMITH, *et al.*, 2015; PATHAK, *et al.*, 2017; LANZMASTER, *et al.*, 2005; SCHEN, *et al.*, 2005). Com isso, é possível observar a importância dos centros metálicos com diferentes metais, em ligantes com átomos N, O-doadores.

Atualmente, além da variação dos centros metálicos tem se investido na modificação dos ligantes, principalmente na segunda esfera de coordenação, isso é possível devido à adição de grupos ativos cataliticamente, como o trabalho realizado por Piovezan e colaboradores no qual foi sintetizado um derivado do ligante  $\text{H}_2\text{BPBPMP}$  com um grupo aldeído presente no fenol lateral, o qual foi nomeado como  $\text{H}_2\text{L}$ . A presença deste grupo permite a reação deste ligante com diversos outros compostos e suportes como a sílica 3-aminopropil funcionalizada. Esse sistema foi utilizado por Piovezan e colaboradores e apresentou um fator catalítico em torno de 118.500 vezes mais rápido quando comparado à reação não catalisada (PIOVEZAN, *et al.*, 2012). O ligante  $\text{H}_2\text{L}$  é apresentado na Figura 13.

Figura 13- Esquema do ligante  $\text{H}_2\text{L}$ .

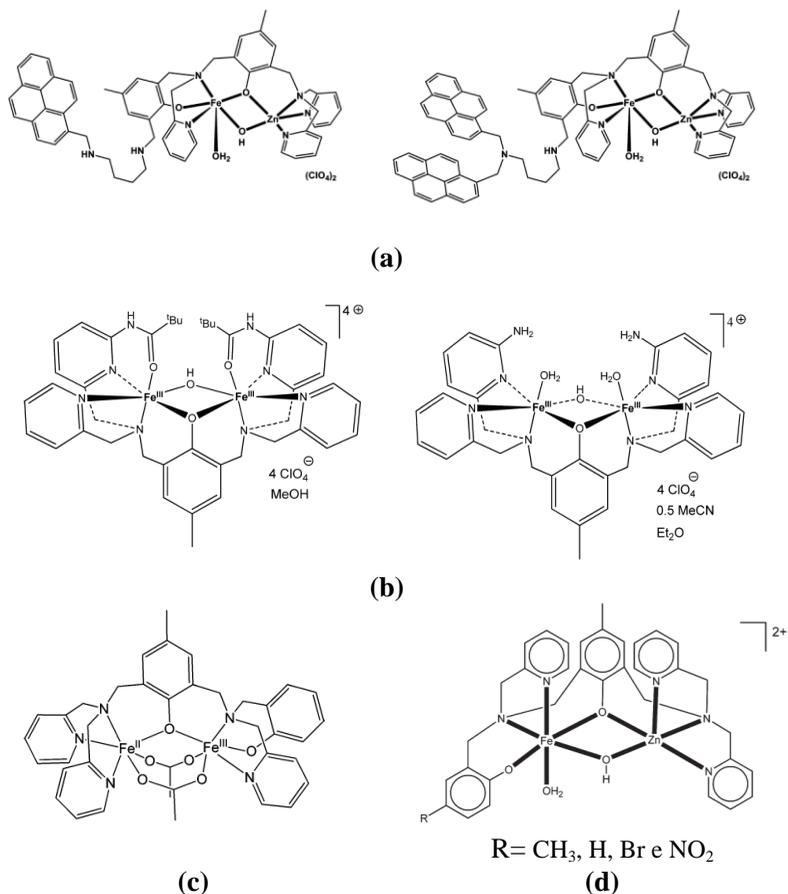


Adaptado de (PIOVEZAN, *et al.*, 2012).

Comba e colaboradores buscaram em seus ligantes comparar a atividade dos complexos com aminas presentes nas cadeias laterais, enquanto Camargo e colaboradores investiram na adição de grupos pireno em uma das cadeias laterais estudando propriedades fluorescentes desses sistemas e suas aplicações. Já Silva e colaboradores, buscaram a modificação do anel quelato em complexos binucleares de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  promovendo o aumento da cadeia carbônica. (CAMARGO, T. *et al.*, 2017; SILVA, G. *et al.*, 2017; COMBA, P. *et al.*, 2012).

Para todos esses complexos estudados, além de ser feito estudo da atividade catalítica e de mecanismo de reação, os compostos de coordenação também foram avaliados frente à interação com o DNA buscando aplicações em meios biológicos. A Figura 14 apresenta alguns trabalhos envolvendo o estudo das PAPs.

Figura 14- Trabalhos publicados na literatura de biomiméticos para as PAPs, sendo: a) CAMARGO, *et al.*, 2017; b) COMBA, *et al.*, 2012; c) SMITH, *et al.*, 2012 e d) PERALTA, *et al.*, 2010.



## 2.6 PROMISCUIDADE CATALÍTICA

Por definição, a promiscuidade catalítica é a habilidade que um único sítio ativo possui de catalisar mais de uma transformação química diferente. Ela constitui uma importante propriedade enzimática e desempenha um papel natural na evolução e, ocasionalmente, na biossíntese de metabólitos secundários (KAZLAUKAS, 2005).

A promiscuidade foi explorada por Rona e colaboradores no início da década de 1930 em uma série de experiências com lipase de fígado de porco e pancreático em solventes orgânicos para a resolução de álcoois quirais e ésteres. Um bom exemplo de promiscuidade de substratos é uso da piruvato descarboxilase para formar ligações carbono-carbono, o que foi inicialmente estudado em 1921 e é, hoje, uma atividade industrial. Dentre as muitas enzimas que apresentam promiscuidade de substrato, a metano monooxigenase é a que catalisa a reação de um maior número de substratos (COPLEY, 2003).

É de grande interesse desenvolver compostos de coordenação que possuam promiscuidade catalítica, sendo possível realizar o estudo de atuação e seu respectivo mecanismo de ação para reações diferenciadas. Como exemplo, Camargo e colaboradores publicaram, recentemente, um complexo binuclear de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$  utilizando um ligante simétrico, que atua tanto na catálise oxidativa de catecóis como na hidrólise de fosfatos (CAMARGO, *et al.*, 2015). Em 2010, o sistema  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$  já havia sido utilizado para o estudo de atividade catalítica por Neves e colaboradores, no entanto o ligante utilizado era assimétrico e bons resultados foram obtidos tanto na atividade de catecol oxidase quanto para as fosfatases ácidas púrpuras (NEVES, *et al.*, 2010). Complexos com centros binucleares  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{II}}$  também apresentaram promiscuidade catalítica, nos estudos de Rey e colaboradores. Esses complexos também apresentaram atividade na oxidação de catecóis, assim como na reação de hidrólise promovida pela fosfatase. Rey utilizou em seu estudo, um ligante simétrico contendo grupos diazepínicos (AAZ) nas extremidades (REY, 2007). Na literatura, existem muitos outros trabalhos que tratam de casos na promiscuidade catalítica natural, ocasionada ou até mesmo forçada, como aquelas que ocorrem com grandes varrições de temperatura, pH ou solventes distintos (HULT & BERGLUND, 2007).

Assim, este trabalho buscou realizar um estudo de três complexos com centros binucleares de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ,  $\text{Co}^{\text{III}}$  e  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , como catalisadores frente a reações de oxidação e hidrólise. A escolha destes metais para a realização dessa pesquisa está diretamente ligada às publicações recentes, cita-

dos em seções anteriores, mostrando os bons resultados frente às reações de interesse.



## 3 OBJETIVOS

### 3.1.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral sintetizar e caracterizar complexos binucleares de ferro(III), cobalto(III) e cobre(II) a partir de um novo ligante simétrico e estudar a promiscuidade catalítica destes utilizando o substrato 3,5-di-*terc*-butilcatecol para reações de oxidação e *bis*-(2,4-dinitrofenil)fosfato para reações de hidrólise, além de testar a capacidade dos complexos frente à clivagem do DNA.

### 3.1.2 Objetivos específicos

- 1) Sintetizar, purificar e caracterizar por técnicas espectrométricas e espectroscópicas o ligante 2py2mff-Fenol.
- 2) Sintetizar e caracterizar os complexos de ferro(III), cobalto(III) e cobre(II) por análises espectroscópicas (infravermelho, absorção na região do ultravioleta-visível e titulação espectrofotométrica), espectrometria de massa e medidas eletroquímicas (voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada).
- 3) Investigar a reatividade e promiscuidade catalítica dos complexos obtidos frente à reação de oxidação do substrato 3,5-di-*terc*-butilcatecol e à reação de hidrólise do substrato *bis*-(2,4-dinitrofenil)fosfato.
- 4) Analisar os resultados obtidos para a proposição de novos complexos e sua promiscuidade catalítica frente a reações de oxidação e hidrólise.
- 5) Avaliar o potencial dos complexos sintetizados frente à clivagem do DNA plasmidial e ct-DNA.



## 4 EXPERIMENTAL

### 4.1 MATERIAIS

Os seguintes reagentes, materiais, gases e solventes, empregados nas sínteses e análises, foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia: hidróxido de sódio, ácido clorídrico 37 %, sulfato de sódio anidro, hidróxido de potássio, trietilamina, ácido trifluoracético, *p*-cresol, hexametilnotetramina, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, borohidreto de sódio, hidróxido de lítio, brometo de potássio grau espectroscópico, cloreto de potássio, tampões biológicos MES, HEPES, CHES, perclorato de lítio, acetato de cobre(II) hexa-hidratado, perclorato de ferro(II) hexa-hidratado, perclorato de cobalto(II) hexa-hidratado, acetato de sódio, perclorato de sódio, hexacianoferrato(III) de potássio, perclorato de lítio, argônio 5.0, clorofórmio deuterado, água deuterada, clorofórmio PA, acetonitrila PA, diclorometano PA, isopropanol PA, metanol PA, etanol absoluto, acetona PA, e acetonitrila grau espectroscópico.

Os compostos 2-(aminometil)piridina e trietilamina foram purificados (destilado à pressão reduzida) antes de sua utilização. O solvente ácido trifluoracético foi destilado a pressão reduzida e seco com P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. O composto 3,5-di-*terc*-butilcatecol foi recristalizado utilizando éter de petróleo e o composto bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato foi sintetizado, purificado e caracterizado de acordo com o procedimento descrito na literatura (BUNTON & FARBER 1969).

### 4.2 METODOS DE INSTRUMENTAÇÃO

#### 4.2.1 Espectroscopia no Infravermelho – IV

Os espectros das amostras foram realizados utilizando um espectrofotômetro com Transformada de Fourier e com acessório de Refletância Total Atenuada Horizontal (FTIR - ATR) da Perkin-Elmer Spectrophotometer Spectrum 100, no laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia do Departamento de Química - UFSC. As amostras tanto sólidas como óleo, foram empregadas diretamente no aparelho, sobre o cristal e analisadas por refletância total atenuada, no intervalo de 4000 – 500 cm<sup>-1</sup> em temperatura ambiente. As medidas foram corrigidas utilizando background sem a inserção da amostra.

#### 4.2.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio – RMN $^1\text{H}$

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos em um espectrômetro Bruker – AC 200, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC, em 200 e 400 MHz. Os deslocamentos químicos de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS,  $\delta = 0,00$  ppm) e como solvente  $\text{CDCl}_3$ .

#### 4.2.3 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os espectros eletrônicos na região do ultravioleta-visível e infravermelho próximo foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo Lambda-750, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia do Departamento de Química - UFSC.

As leituras foram realizadas utilizando solvente com grau espectroscópico em cubetas de quartzo com volume total de 1 mL e caminho óptico de 1 cm. Para espectros de refletância difusa, em estado sólido, foi utilizado o módulo acoplável, em que as amostras foram dispersas em pastilhas de KBr espectroscópico.

#### 4.2.4 Espectrometria de massas

Os compostos sintetizados (ligante e complexos) foram analisados via espectrometria de massa com ionização via eletrospray (ESI-MS). Os espectros foram medidos pelas técnicas responsáveis, sendo obtidos no equipamento Amazon - *IonTrap MS*, do Centro de Biologia Molecular Estrutural – UFSC. As análises foram realizadas a partir das soluções dos ligantes e complexos em  $\text{CH}_3\text{OH}$  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. Os dados obtidos são expressos pela relação  $m/z$  dos fragmentos que apresenta a intensidade relativa dos picos frente ao pico base (100%).

#### 4.2.5 Eletroquímica

O comportamento redox dos complexos foi investigado por voltametria cíclica e de onda quadrada em um potenciostato/galvanostato modelo Basi, Epsilon no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC.

Os experimentos foram realizados em  $\text{CH}_3\text{CN}$  com  $[\text{C}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , sob atmosfera de argônio. As análises foram realizadas em uma cela eletroquímica contendo três eletrodos: eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de pseudo referência  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ . Para as análises realizadas em  $\text{CH}_3\text{CN}$  foi utilizado hexafluorofosfato de tetrabutilamônio ( $\text{TBAPF}_6$ ,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) como eletrólito suporte e o par ferroceno/Ferrocínio como padrão interno ( $E_{1/2}$  vs ENH =  $400 \text{ mV}$ ) (GAGNE, KOVAL *et al.*, 1980).

#### 4.2.6 Titulação Espectrofotométrica

As constantes de protonação foram determinadas por titulação espectrofotométrica utilizando um espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo Lambda-750 no Laboratório de Química Bioinorgânica e Cristalografia – UFSC. Os  $pK_a$  foram calculados utilizando o programa Origin.

Os experimentos foram realizados em  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (50:50, %v/v), com força iônica de  $\text{KCl}$  à  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e os valores de pH foram ajustados com  $\text{KOH}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , variando de 2,5 a 9,0. As titulações foram realizadas em uma cela termoequilibrada a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , controlada por um banho termostatizado Visomes Plus. Os valores de pH foram controlados utilizando um pHmetro previamente calibrado e as leituras foram realizadas de modo manual adicionando-se alíquotas de aproximadamente  $1 \text{ mL}$  da solução em uma cubeta de quartzo.

Após cada medida, a alíquota foi devolvida para a solução que estava sendo titulada. As medidas foram realizadas em um volume de solução final de  $30 \text{ mL}$ , com concentração dos complexos de aproximadamente  $1,89 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Os pontos do gráfico foram ajustados com uma curva sigmoide e os valores de  $pK_a$  foram obtidos pelo ponto de inflexão. Os diagramas de espécies presentes em solução em função do pH foram plotados com o programa SPECIES.

#### 4.2.7 Análise elementar de CHN

As medidas para a determinação dos percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio para os complexos sintetizados foram realizadas na central de análises do departamento de química da - UFSC. Foi utilizado um analisador elementar CHNS/O Analyser PerkinElmer (Modelo – 2400 Series II) acoplado com balança PerkinElmer (Modelo – Autobalance AD 6000). Gás de arraste: hélio grau 5.0 e combustão: oxigênio grau 6,0.

### 4.2.8 Testes cinéticos

A atividade catalítica dos complexos foi avaliada através da reação de oxidação do substrato 3,5-di-*terc*-butilcatecol (3,5- DTBC). Os experimentos cinéticos foram realizados em triplicata, sob condições de excesso de substrato monitorado por um espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostatizado. A variação de absorvância ocorrida em 400 nm ( $\epsilon=1645 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (CHAVES, 2015) é referente à formação da 3,5-di-*terc*-butilquinona (3,5-DTBQ). As reações foram monitoradas por 5 minutos para complexos de cobre e 10 minutos para os complexos de cobalto e ferro e os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais.

Para as atividades catalíticas de reação de hidrólise do substrato bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP) os experimentos cinéticos foram realizados em triplicata sob condições de excesso de substrato, sendo monitorado por um espectrofotômetro UV-vis Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostatizado, ocorrida em 400 nm, referente a liberação do ânion 2,4-dinitrofenolato, como produto da reação de hidrólise, a variação de absorvância em relação ao pH e é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2- Valores do coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) do fenolato do substrato 2,4-BDNPP em diferentes valores de pH.

pH	$\epsilon \text{ (L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$
5,0	10078
5,5	11405
6,0	12004
6,5-9,0	12100

Adaptado de (PERALTA, *et al.* 2010).

As reações foram monitoradas por 10 minutos e os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais. Para ambos os testes cinéticos foram utilizados gráficos das velocidades iniciais ( $v_0$ ) em função do pH, que permitiu a obtenção do pH ótimo, valor no qual a atividade catalítica é máxima. A determinação das velocidades iniciais em função da concentração do substrato foi realizada no pH ótimo sob as mesmas condições descritas para o estudo de influência no pH, resultando em cinéticas de saturação com comportamento de Michaelis-Menten. Por meio deste experimento determinou-se a velocidade máxima ( $v_{m\acute{a}x}$ ) e a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ). Também foi determinada a cons-

tante catalítica ( $k_{\text{cat}} = v_{\text{máx}}/[C]$ ), e a eficiência catalítica foi determinada pela razão entre a constante catalítica e de Michaelis-Mentem ( $E = k_{\text{cat}}/K_M$ ).

### 3.3.9.1 Atividade catalítica frente a reações de oxidação

Os estudos em função do pH para a atividade de catecolase dos complexos  $\text{FeL}_1$ ,  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$ , os quais visam a obtenção do pH ótimo de atividade frente à oxidação do substrato 3,5-di-*terc*-butilcatecol, foram realizados pela variação da concentração de substrato em uma faixa de pH entre 5,5 e 10,0 a 25°C.

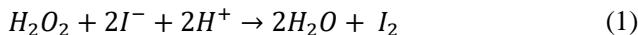
Para o complexo  $\text{FeL}_1$  adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  da solução aquosa do tampão, 50  $\mu\text{L}$  de uma solução em metanol do complexo ( $[3,02 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}]$ ) e 1500  $\mu\text{L}$  de metanol, a reação foi iniciada com adição de 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de substrato em metanol ( $[S] = 2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). Já para o complexo  $\text{CoL}_1$ , adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  da solução aquosa do tampão, 25  $\mu\text{L}$  de uma solução em metanol do complexo ( $[C] = 2,86 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) e 1550  $\mu\text{L}$  de metanol a reação foi iniciada com adição de 25  $\mu\text{L}$  de uma solução do substrato em metanol ( $[S] = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ). Por fim para o complexo  $\text{CuL}_1$  adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  da solução aquosa do tampão 50  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de tampão 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  MES (pH 5,5 a 6,5), HEPES (pH 7,0 a 8,0) e CHES (9,0 a 10,0), 30  $\mu\text{L}$  de uma solução em metanol do complexo ( $[C] = 2,74 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) e 1550  $\mu\text{L}$  de metanol, a reação foi iniciada com a adição de 25  $\mu\text{L}$  de uma solução do substrato em metanol ( $[S] = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ).

Os experimentos cinéticos em condições de excesso de substrato, para determinação dos parâmetros cinéticos, foram realizados nas mesmas condições, porém alterando o volume de metanol e de solução de substrato mantendo a proporção  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (32:1, %v/v), para que a concentração de substrato variasse de  $3,03 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  a  $3,63 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para o complexo  $\text{FeL}_1$ ,  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  a  $7,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para o complexo de  $\text{CoL}_1$  e  $3,64 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  a  $4,24 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para o complexo  $\text{CuL}_1$ . Correções de oxidação espontânea do substrato 3,5-DTBC foram realizadas em condições idênticas, sem a adição do complexo.

A formação de peróxido de hidrogênio nas reações de oxidação do 3,5-DTBC catalisadas pelos complexos de cobre, ferro e cobalto por uma modificação do método de iodometria (CAMARGO, 2015), onde uma mistura reacional foi preparada nas mesmas condições cinéticas. Após uma hora de reação, um volume igual de água foi adicionado e a quinona formada no meio reacional foi extraída com diclorometano. A

porção aquosa foi acidificada com ácido sulfúrico ([ácido]=  $5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) a pH  $\cong$  2, para interromper a reação de oxidação. Posteriormente, 1 mL de solução aquosa de iodeto de potássio (0,3 mol L<sup>-1</sup>) foram adicionados.

Na presença de peróxido de hidrogênio ocorre a seguinte reação apresentada pela Equação 1:



Em excesso de iodeto ocorre a formação do tri-iodeto, mostrado na Equação 2:



Esta reação geralmente é lenta, mas em meio ácido torna-se praticamente instantânea. A formação do I<sub>3</sub><sup>-</sup> pode ser monitorada espectrofotometricamente devido ao surgimento de uma banda característica em 353 nm ( $\epsilon = 26000$  L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (ACKERMANN, *et al.*, 2002).

A variação da estequiometria da reação foi realizada nos valores ótimos de pH ótimos de cada complexo nas mesmas condições cinéticas, na ausência de oxigênio, durante 20 minutos a 25 °C. Em todos os experimentos correções da oxidação espontânea do substrato 3,5-DTBC foram realizadas em condições idênticas sem a adição do complexo.

### 3.3.9.2 Atividade catalítica frente a reações de hidrólise

Os estudos em função do pH para atividade de hidrólise foram realizados em uma faixa de pH entre 4,5 e 10,0 a 25 °C. Utilizaram-se cubetas de vidro com capacidade para 4,0 mL e caminho óptico de 1,0 cm, nas quais foram adicionados 750  $\mu$ L de solução aquosa de tampão 0,1 mol L<sup>-1</sup> MES (pH 3,5 a 6,5), HEPES (pH 7,0 a 8,0) e CHES (9,0 a 9,5) com força iônica mantida constante ([I] = 0,1 mol L<sup>-1</sup>, LiClO<sub>4</sub>), 30  $\mu$ L de uma solução em acetonitrila do complexo ([C] =  $3,02 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) e 450  $\mu$ L de acetonitrila, onde a reação foi iniciada com a adição de 200  $\mu$ L de uma solução do substrato em acetonitrila ([S] =  $2,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>).

Os experimentos cinéticos em condições de excesso de substrato, para determinação dos parâmetros cinéticos, foram realizados nas mesmas condições, porém alterando o volume de acetonitrila e de solução de substrato mantendo a proporção CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (50:50, % v/v), para que

a concentração de substrato variasse de  $3,33 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  a  $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Correções de hidrólise espontânea do substrato 2,4-BDNPP foram realizadas em condições idênticas, sem a adição do complexo.

O estudo do efeito isotópico de deutério na hidrólise do 2,4-BDNPP foi realizado para o complexo  $\text{FeL}_1$ , nas mesmas condições cinéticas, já descritas anteriormente. O tampão foi feito utilizando água deuterada no pH “ótimo” ( $\text{pD}=7,0$ ). As reações foram monitoradas em condições de 100 vezes de excesso do substrato e acompanhadas pelo surgimento da banda referente ao substrato em 400 nm a 25 °C o tratamento de dados é feito pela relação entre ( $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ ).

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 ( $[\text{S}]_{\text{final}} = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) em relação ao complexo ( $[\text{C}]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), a reação foi acompanhada por 24 horas à 25 °C.

Também foi realizado o acompanhamento da reação estequiométrica em 400 nm entre os complexos e o substrato ( $[\text{C}]_{\text{final}} = [\text{S}]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) com duração de 55 horas a 50 °C. Em todos os experimentos cinéticos a correção da hidrólise espontânea do substrato.

Para avaliar a atividade na presença de um substrato monoéster, 2,4-dinitrofenila (2,4-DNPP), com a adição consecutiva de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 equivalentes do monoéster ao complexo  $\text{FeL}_1$ , pH 7,0, concentração do complexo =  $6,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , em  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (50:50%) tampão HEPES. Após 7 horas das adições dos equivalentes, foi adicionado 4 equivalentes do diéster 2,4-BDNPP e observado aumento da banda em 400 nm.

### 4.3 INTERAÇÃO COM O DNA

Os testes de interação com o DNA foram realizados no Centro de Biologia Molecular e Estrutural (CEBIME) da UFSC. Para os testes de interação foram utilizados o DNA plasmidial o qual foi utilizado para os ensaios de clivagem o plasmídeo pBSK-II (Stratagene, USA) dupla-fita e superenovelado, com 2961 pb. Este plasmídeo foi amplificado a partir da transformação em células competentes, neste caso a bactéria *Escherichia coli* DH5- $\alpha$ , seguindo protocolo preconizado por Ausubel e colaboradores (1995) e detalhadamente descrito por Oliveira (2006). Após a multiplicação, as culturas bacterianas foram centrifugadas e o DNA extraído e purificado seguindo o protocolo do kit de extração e purificação de DNA plasmidial *HiSpeed Plasmid Maxi Kit* (Qiagen). A concen-

tração do DNA plasmidial extraído foi quantificada por espectrofotometria UV-Vis ( $A_{260} = 1,0 = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de DNA) e a integridade verificada por eletroforese em gel de agarose (Ausubel, 1999; Oliveira, 2006). Para testes de constante cinética de clivagem ( $K_{obs}$ ) foi utilizado ct-DNA proveniente da Sigma-Aldrich.

### 4.3.1 Efeito do pH na Clivagem do DNA

Para analisar o efeito do pH na clivagem do DNA plasmidial mediadas pelos complexos estudados neste trabalho, foram realizados testes de clivagem do DNA em diferentes tampões (MES pH 6; HEPES pH 7 e 8; CHES pH 9 e CAPS pH 10). As concentrações finais dos complexos para os testes foram  $[\text{FeL}_1] = 10 \mu\text{M}$  e  $[\text{CuL}_1] = 25 \mu\text{M}$ . Para o complexo  $\text{FeL}_1$  foi necessário a utilização de uma concentração inferior comparada ao complexo  $\text{CuL}_1$ , devido a sua precipitação em concentrações mais elevadas. Cada reação ocorreu por 8 horas à  $50^\circ\text{C}$ . Os tampões foram selecionados por sua estabilidade e inércia em reação (Mash *et al.*, 2003). A determinação do pH “ótimo” foi realizada pela técnica de eletroforese em gel de agarose (1%), na presença de brometo de etídio (intercalante com DNA). Os géis foram fotografados e posteriormente quantificados por densimetria.

### 4.3.2 Constante Cinética dos complexos ( $k_{obs}$ )

Os ensaios de  $k_{obs}$  foram realizados com a finalidade de se obter as constantes cinéticas dos complexos  $\text{FeL}_1$  e  $\text{CuL}_1$ . Em cada tubo eppendorf adicionaram-se  $14 \mu\text{L}$  de DNA pBSK-II ( $[\text{DNA}] \approx 25 \text{ mmol L}^{-1}$ ),  $14 \text{ mL}$  de tampão MES 6,0 ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ),  $77 \text{ mL}$  de água e  $35 \text{ mL}$  de solução estoque de complexo, totalizando  $140 \text{ mL}$ . Alíquotas de  $20 \text{ mL}$  dos sistemas reacionais foram retiradas no início das reações e após transcorridas (0, 1, 3, 4, 7 e 8) horas a  $50^\circ\text{C}$ . Após a retirada de cada alíquota, adicionou-se  $5 \text{ mL}$  de tampão de corrida à mesma para finalizar a reação de clivagem.

Controles nas mesmas condições reacionais, mas na ausência dos complexos, foram realizados para observar a degradação espontânea do DNA. A constante cinética de clivagem ( $k_{obs}$ ) para os complexos  $\text{FeL}_1$  e  $\text{CuL}_1$  foram calculadas, tomando a reação como de pseudo primeira ordem. O valor de  $k_{obs}$  foi obtido diretamente a partir do coeficiente angular da regressão linear e originada do plote do logaritmo natural da quantidade de forma intacta de DNA em função do tempo de reação. Os

valores de  $k_{obs}$  de cada complexo foram corrigidos subtraindo-se destes o valor do  $k_{obs}$  obtido do controle, que foi considerado equivalente à degradação espontânea do plasmídeo pBKS-II.

### 4.3.3 Dicroísmo Circular

Os ensaios de CD foram realizados com o espectropolarímetro de CD modelo J-815 (Jasco, USA). Uma amostra de 200  $\mu\text{M}$  de CT-DNA em 10  $\mu\text{M}$  de tampão (MES pH 6,0) foi titulada com concentrações crescentes dos complexos na razão de [Complexo]/[DNA] de 0,05 a 1. As varreduras foram realizadas na faixa de 220 a 500 nm, a 37 °C. Espectros contendo somente os complexos foram determinados na ausência de DNA e nenhum sinal significativo foi encontrado.

### 4.3.4 Constante de ligação (Kb)

Os métodos de interação dos complexos necessitam de prévia análise do DNA utilizado. Para determinação se o CT-DNA obtido de fonte comercial estava livre de proteína, determinou-se a razão entre 260 nm e 280 nm dando um valor de 1,85, satisfatório para os experimentos. O valor da razão 260/280 nm deve ficar entre 1,8 e 1,9 para uma amostra livre de proteína (REICHMANN, *et al.*, 1954). A concentração do DNA foi determinada através da espectroscopia eletrônica em um espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo Lambda-750, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia do Departamento de Química - UFSC no máximo de absorção em 260 nm para o DNA com  $\epsilon = 6600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (REICHMANN, *et al.*, 1954). O experimento foi realizado em um sistema de duas cubetas: Na cubeta 1 (controle) adicionaram-se inicialmente 480  $\mu\text{L}$  do tampão (MES, pH 6,0), e 240  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{CN}$  espectroscópica; Na cubeta 2 (leitura) adicionaram-se inicialmente 480  $\mu\text{L}$  do tampão (MES, pH 6,0), 155  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{CN}$  e 85  $\mu\text{L}$  de solução de complexo  $1,73 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Foram realizadas de 20 de 1,0  $\mu\text{L}$  adições de CT-DNA na concentração de  $6,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Os espectros da titulação espectrofotométrica foram obtidos a partir da adição das sucessivas quantidades de CT-DNA as soluções dos complexos.

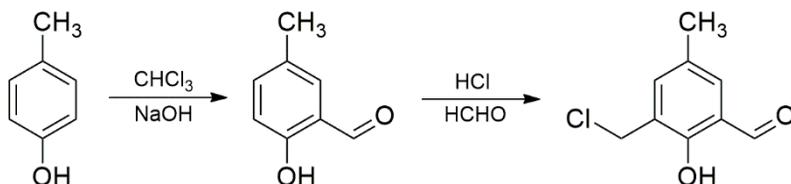
A análise de dados da titulação permite o cálculo da constante de ligação intrínseca (Kb) entre o complexo e o DNA, utilizando um gráfico de  $[\text{DNA}] / (\epsilon A - \epsilon F) \times [\text{DNA}]$ . A constante de ligação intrínseca mede a força de ligação do complexo ao DNA. O Kb é calculado através da Equação 3 (PYLE *et al.*, 1989).

$$\frac{[DNA]}{(\varepsilon A - \varepsilon F)} = \frac{[DNA]}{(\varepsilon B - \varepsilon F)} + \frac{1}{KB(\varepsilon B - \varepsilon F)} \quad (3)$$

Nesta equação  $\varepsilon F$ ,  $\varepsilon A$  e  $\varepsilon B$  correspondem respectivamente ao coeficiente de absorção molar para o complexo metálico livre, ao coeficiente de absorção para cada adição de DNA e ao coeficiente de absorção para o complexo totalmente ligado ao DNA.

## 5 SÍNTESES

### 5.1 SÍNTESE DO PRECURSOR (2-CLOROMETIL-4-METIL-6-FORMOFENOL)-CMFF.



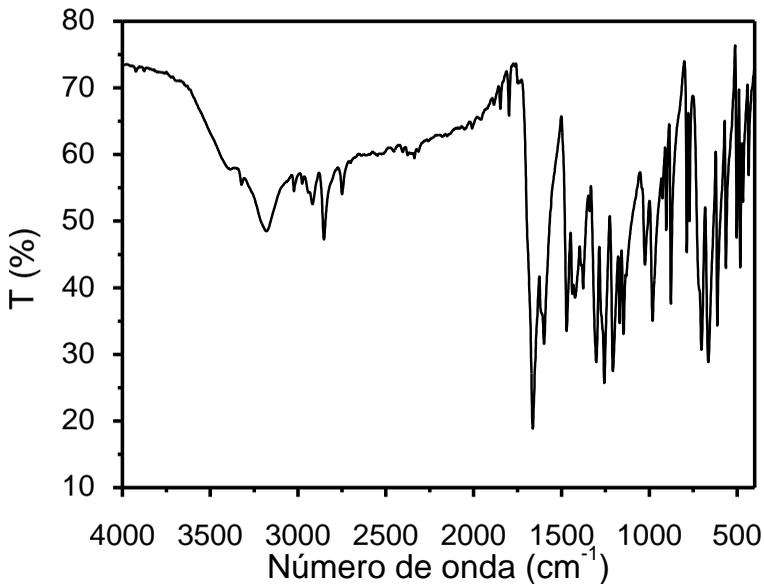
Inicialmente preparou-se o 2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (HMB) em uma reação de formilação do p-cresol (THOER, 1988). Em um balão de 3 bocas de 5L, equipado com um agitador mecânico e um condensador. Adicionou-se o p-cresol (21,6 g, 200 mmol,  $108,14 \text{ g mol}^{-1}$ ) em 1,5 L de clorofórmio. A solução foi mantida em agitação em banho com temperatura controlada entre  $56 - 60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Foi realizada a adição de  $\text{NaOH}$  (480 g, 12 mol,  $40,00 \text{ g mol}^{-1}$ ), solubilizado em 200 mL de água destilada, em pequenas porções durante 3 primeiras horas. A reação foi mantida por mais uma hora e então o sistema foi resfriado até a temperatura ambiente. Foram adicionados aproximadamente 1,5 L de água destilada e, sob agitação, foi acidificado com  $\text{HCl}$  concentrado, aproximadamente 1200 mL, até  $\text{pH} = 2$ .

A fase orgânica (óleo escuro viscoso) foi separada, lavada com água destilada, seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e o solvente foi removido à pressão reduzida. O produto foi então destilado à pressão reduzida. O HMB foi obtido como um sólido amarelo e purificado com coluna cromatográfica em sílica, utilizando diclorometano como eluente. O solvente foi retirado à pressão reduzida sendo obtido um sólido cristalino. Na segunda etapa da síntese, em um balão de 500 mL adicionou-se o HMB (6,4 g, 47 mmol,  $136,15 \text{ g mol}^{-1}$ ), formaldeído 37% (3,81 g, 94 mmol) e ácido clorídrico concentrado (25 mL). O sistema foi mantido em refluxo e agitação por 30 minutos e, posteriormente, resfriado a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ , formando um precipitado no fundo do balão, que foi triturado, filtrado sob vácuo e recristalizado a quente em diclorometano, sendo obtido um sólido branco, o qual foi deixado no dessecador com sílica sob vácuo para secar. P.F.:  $94-96 \text{ }^\circ\text{C}$  com rendimento de 85% (7,4 g, 40 mmol,  $184,62 \text{ g mol}^{-1}$ )

em relação ao HMB. A Figura 15 apresenta o gráfico de IV para o pró-ligante CMFF.

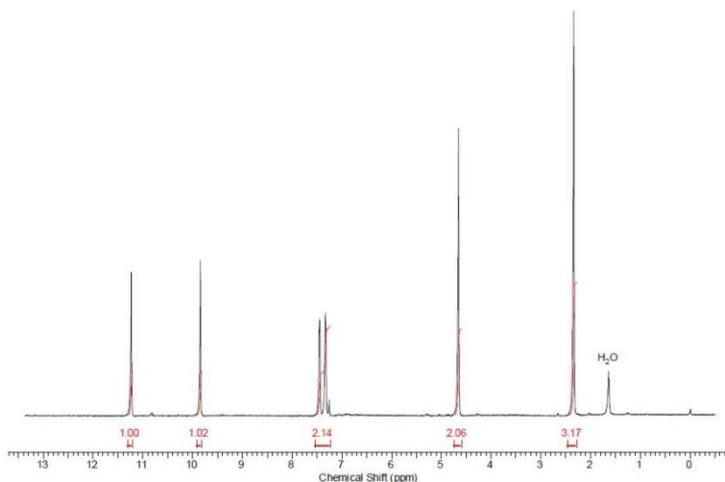
IV (KBr) em  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu$  (C-H<sub>ar</sub> e C-H<sub>alif</sub>) 3028-2918;  $\nu$  (CH<sub>ald</sub>) 2850;  $\nu$  (C=O) 1663;  $\nu$  (C=C) 1600-1470;  $\delta$  (O-H<sub>fenol</sub>) 1372;  $\nu$  (C-O<sub>fenol</sub>) 1256;  $\delta$  (C-H<sub>ar</sub>) 703;  $\nu$  (C-Cl) 612.

Figura 15-Espectro na região do infravermelho em ATR do precursor CMFF.



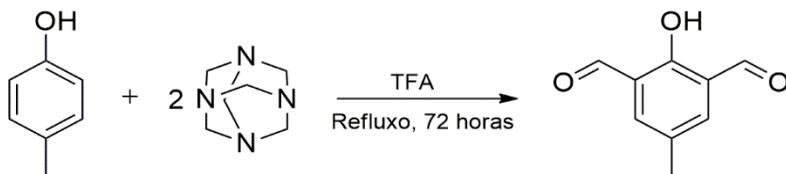
$^1\text{H}$ -RMN  $\delta\text{H}$  (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) em ppm: 11,25 (s, 1 H,  $\text{OH}_{\text{fenol}}$ ); 9,86 (s, 1  $\text{CH}_{\text{ald}}$ ); 7,46 (s, 1 H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ); 7,35 (s, 1 H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ); 4,67 (s, 2 H,  $\text{CH}_2$ ); 2,35 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$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

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



**Atenção:** durante a última etapa de reação pode formar o composto bis-(clorometil)éter, altamente tóxico e comprovadamente um potente agente carcinogênico. Portanto, essa reação deve ser realizada em capela com boa exaustão, utilizando-se máscara e luvas, e todo o material utilizado deve ser lavado com solução alcalina (por exemplo, etanol/água/KOH: 60 mL/40 mL/5 g, na capela), pois o bis-(clorometil)éter é rapidamente hidrolisado a formaldeído na presença de base. A solução reacional e todos os resíduos devem ser descartados somente após correção do pH ( $\text{pH} > 9,0$ ) por adição de hidróxido de sódio ou potássio.

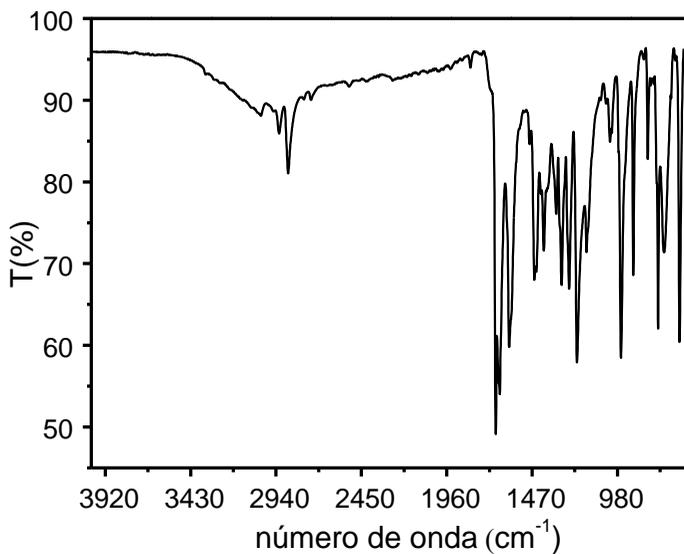
## 5.2 SÍNTESE DO PRECURSOR 2ALD-FENOL (2-HIDROXI-1,3-METILALDEÍDO).



A síntese do precursor foi realizada de acordo com (LINDOY, 1998). Em um balão de 125 mL foram adicionados 25 mL de ácido trifluoroacético, em banho de gelo. Em seguida, foi adicionado hexametilenoetetramina (10,59 g, 75,5 mmol, 140,13 g mol<sup>-1</sup>) e *p*-cresol (4,35 g, 26,4(9 mmol, 164,05 g), as adições foram realizadas em atmosfera de argônio. O sistema foi mantido em refluxo a 70 °C durante 72 horas. O produto obtido foi adicionado em uma solução de 100 mL de ácido clorídrico 2 mol L<sup>-1</sup> e deixado por 10 minutos. Em seguida, a mistura foi transferida a um funil de extração, no qual o produto foi extraído utilizando (1 x 200mL) de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (1 x 200 mL) de HCl, (1 x 200 mL) de H<sub>2</sub>O e por fim (1 x 200 mL) de solução salina de NaCl. A fase orgânica foi seca utilizando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> realizando uma filtração simples, seguida de evaporação do solvente, a pressão reduzida, e como produto obteve-se um sólido amarelo claro, com rendimento de 71,27%, relação ao *p*-cresol. A reação foi acompanhada por placa CCD, a partir disso foi estipulado o tempo reacional.

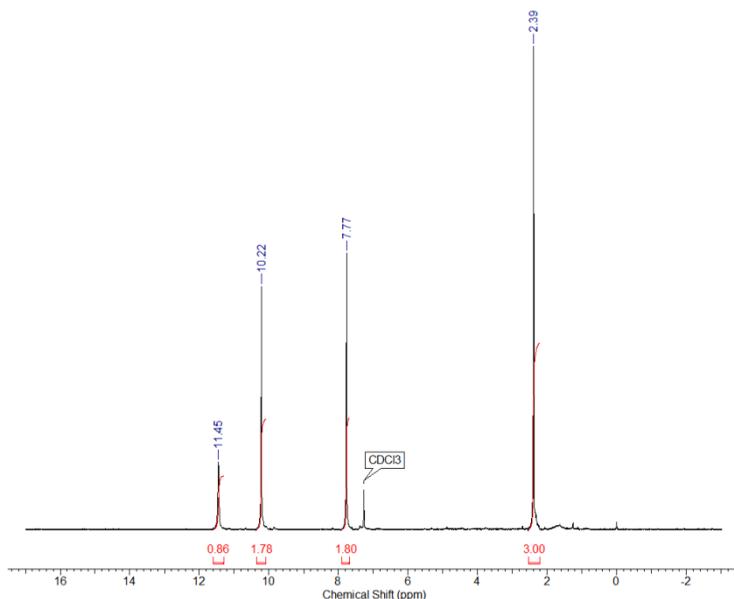
IV em  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$  e  $\text{C-H}_{\text{alif}})$  3028 e 2926;  $\nu(\text{C-H}_{\text{ald}})$  2870;  $\nu(\text{C=O})$  1678;  $\nu(\text{C=C}$  e  $\text{C=N})$  1600 e 1456;  $\delta(\text{O-H}_{\text{fenol}})$  1330;  $\nu(\text{C-O}_{\text{fenol}})$  1211;  $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$  746.

Figura 17- Espectro na região do infravermelho em ATR do precursor 2ald-fenol.

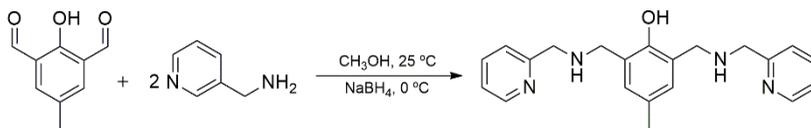


RMN de  $^1\text{H}$ : (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ /ppm: 2,39 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 7,77 (d, 2H,  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 10,22 (d, 2H,  $\text{CH}_{\text{ald}}$ ); 11,45 (s, 1H, OH).

Figura 18- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do 2ald-Fenol.



### 5.3 SÍNTESE DO PRECURSOR 2PY-FENOL - [4-METIL-2,6-BIS (3- (PIRIDIN-2-IL) PROPIL) FENOL].

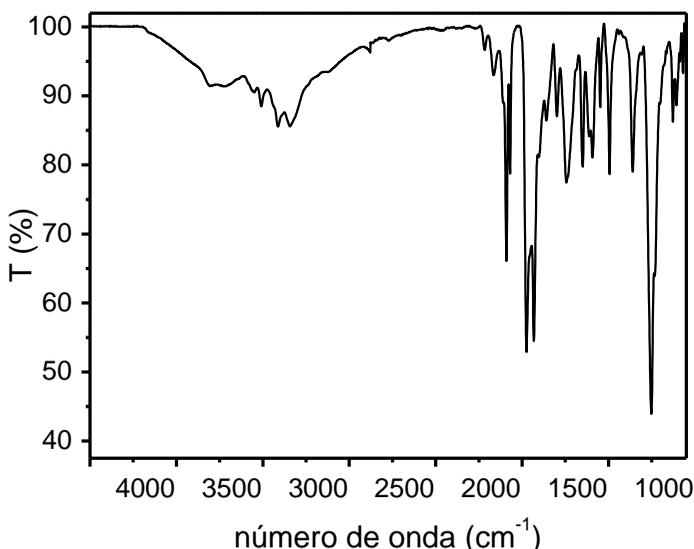


Em um balão de 100 mL foi adicionado o 2-hidroxi-1,3-metildialdeído (1,59 g, 9,68 mmol,  $164,16 \text{ g mol}^{-1}$ ) que foi solubilizado em 30 mL de metanol. Em seguida, foi realizada a adição lenta, utilizando um funil de adição, de uma mistura de 2-aminometilpiridina (2,09 g, 19,37 mmol,  $108,14 \text{ g mol}^{-1}$ ) e 20 mL de metanol ao balão contendo o 2ald-Fenol, sendo que a reação ocorreu por aproximadamente 3 horas. Como produto obteve-se a formação da imina apresentando coloração laranja. Em seguida, foi realizada a adição de  $\text{NaBH}_4$  (0,756 g, 20 mmol,

37,83 g mol<sup>-1</sup>) em banho de gelo, com a finalidade de promover a redução da ímina formada, a reação ocorreu por 1 hora. Em seguida, o pH do meio reacional foi corrigido para 7,0 utilizando uma solução de HCl 2 mol L<sup>-1</sup>. Posteriormente, foi realizada a evaporação do solvente, o produto restante no balão foi solubilizado com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e extraído com água (5 x 15 mL). A fase orgânica foi seca utilizando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> realizando uma filtração simples, seguida de evaporação do solvente, a pressão reduzida, e como produto obteve-se um óleo amarelo escuro, com rendimento de 53,10%, em relação ao ligante 2ald-fenol. A reação foi acompanhada por placa CCD, a partir disso foi estipulado o tempo reacional.

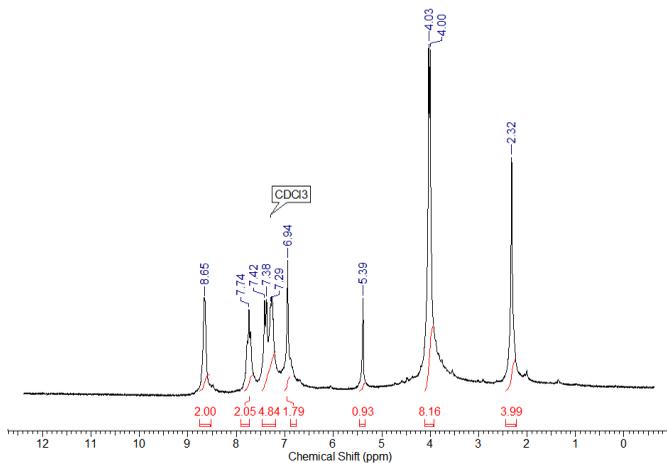
IV em cm<sup>-1</sup>:  $\nu$  (N-H<sub>amina</sub>) 3220  $\nu$  (C-H<sub>ar</sub> e C-H<sub>alif</sub>) 2909 e 2842;  $\nu$  (C=C e C=N) 1592 e 1433;  $\delta$  (O-H<sub>fenol</sub>) 1297;  $\nu$  (C-O<sub>fenol</sub>) 1243;  $\delta$  (C-H<sub>ar</sub>) 753.

Figura 19- Espectro na região do infravermelho em ATR do 2Py-Fenol.

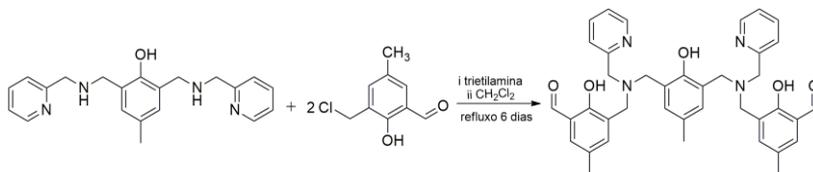


RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 2,32 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 4,00-4,03 (d, 8H,  $\text{CH}_2$ ); 5,39 (s, 1H, OH); 6,94 (d, 2H  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ); 7,29-7,42 (t, 4 $\text{CH}_{\text{piridina}}$ ); 7,74 (t, 2 $\text{CH}_{\text{piridina}}$ ); 8,65 (d, 2 $\text{CH}_{\text{piridina}}$ ).

Figura 20- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do ligante 2py-Fenol.



#### 5.4 SÍNTESE DO LIGANTE SIMÉTRICO 2PY2MFF-FENOL [3,3'-(((2-HIDROXI-5-METIL-1,3-FENILENO) BIS (METILENO)) BIS (PIRIDIN-2-ILMETIL) BIS (METILENO)) BIS (2-HIDROXI-5-METIL-BENZALDEÍDO))]

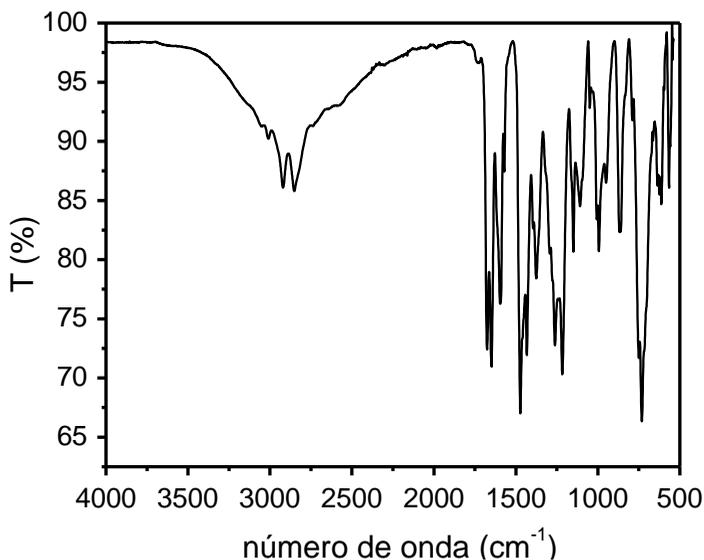


Em um balão de 250 mL foi adicionado o 2Py-Fenol (2,23 g, 6,08 mmol,  $366,21 \text{ g mol}^{-1}$ ) dissolvido em 50 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Em seguida, foi adicionado lentamente trietilamina (1,23 g, 12,50 mmol,  $101,19 \text{ g mol}^{-1}$ ) ao balão. Seguidamente, em um béquer o cmff (2,24 g, 12,50 mmol,  $184,03 \text{ g mol}^{-1}$ ) foi solubilizado em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e adicionado gota a gota ao meio reacional em banho de gelo. A reação foi mantida em refluxo a  $45^\circ\text{C}$  durante 6 dias, e foi extraída (4 x 15 mL) com  $\text{NaHCO}_3$  e (8 x 15 mL) com  $\text{H}_2\text{O}$ . A fase orgânica foi seca utilizando  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  realizando uma

filtração simples, seguida de evaporação do solvente, a pressão reduzida, como produto obteve-se um sólido amarelo claro, com rendimento de 88,95%, em relação ao 2py-Fenol. A reação foi acompanhada por placa CCD, a partir disso foi estipulado o tempo reacional.

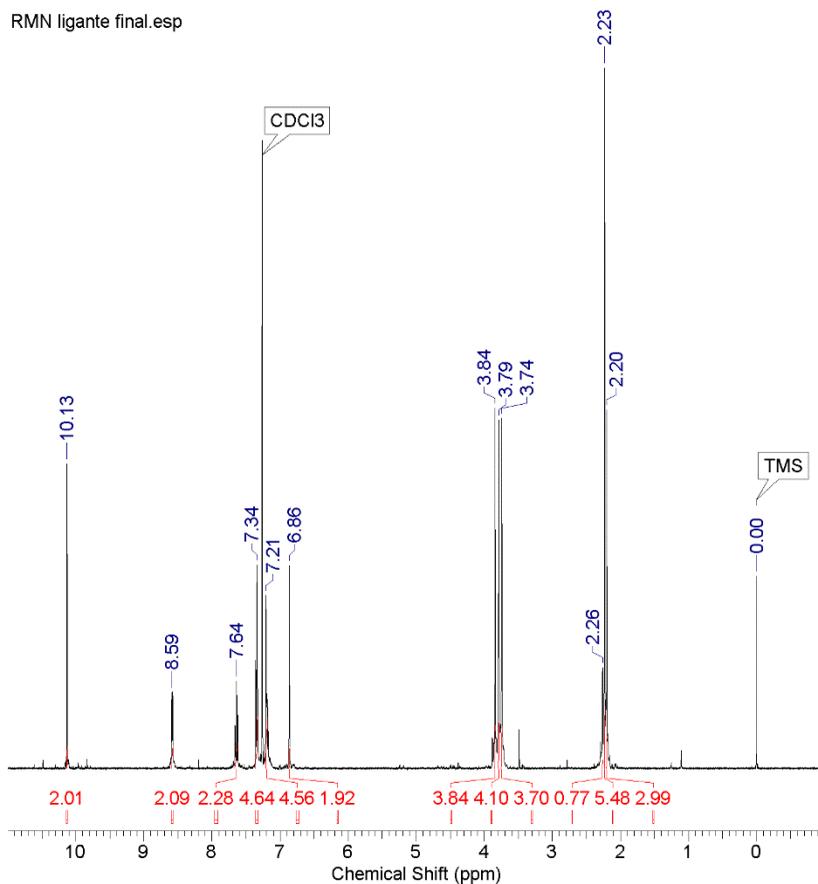
IV em  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$  e  $\text{C-H}_{\text{alif}}$ ) 3009 e 2921;  $\nu(\text{C-H}_{\text{ald}})$  2857;  $\nu(\text{C=O})$  1674;  $\nu(\text{C=C}$  e  $\text{C=N})$  1594 e 1475;  $\delta(\text{O-H}_{\text{fenol}})$  1375;  $\nu(\text{C-O}_{\text{fenol}})$  1261;  $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$  731.

Figura 21- Espectro na região do infravermelho em ATR do 2py2mf-fenol.



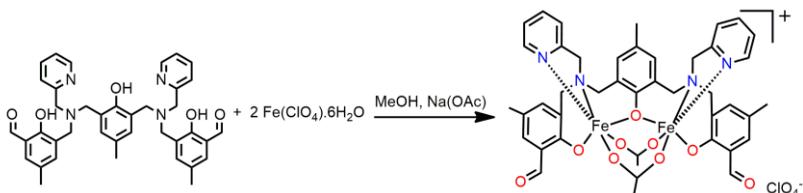
RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 2,22-2,25 (m, 9H,  $\text{CH}_{3\text{arom}}$ ), 3,77-3,86 (t, 12H,  $\text{CH}_2$ ); 6,88 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ); 7,23 (t, 4H,  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ); 7,39 (t, 4H,  $\text{CH}_{\text{piridina}}$ ) 8,60-8,62 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{piridina}}$ ); 10,15 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{ald}}$ ).

Figura 22- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do ligante 2py2mff-Fenol.



## 5.5 SÍNTESE DO COMPLEXO FeL<sub>1</sub>

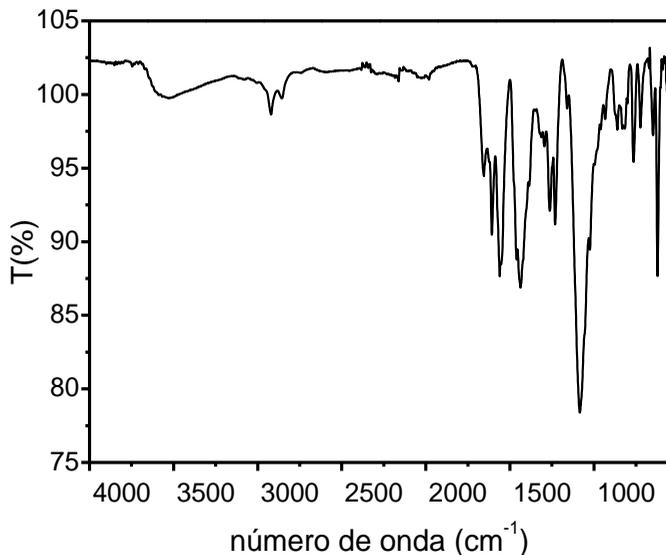
Figura 23- Rota sintética do complexo FeL<sub>1</sub>.



A uma solução metanólica contendo 0,32 g (0,5 mmol; 644,30 g mol<sup>-1</sup>) do ligante 2py2mff-Fenol com algumas gotas de diclorometano, utilizado para facilitar na solubilidade. Em seguida, foi adicionado 0,25 g de Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1,0 mmol; 362,87 g mol<sup>-1</sup>), sob agitação e leve aquecimento. Após 10 minutos adicionou-se 0,13 g de NaOAc (1,0 mmol; 136,08 g mol<sup>-1</sup>). A solução púrpura resultante permaneceu em agitação e aquecimento por aproximadamente 30 minutos. A seguir, filtrou-se o complexo e deixou-se em repouso. Após a lenta evaporação do solvente, lavou-se com isopropanol e éter etílico gelado, foi obtido um pó de coloração púrpura com massa de 0,27 g e rendimento 67 % em relação ao ligante 2py2mff-Fenol.

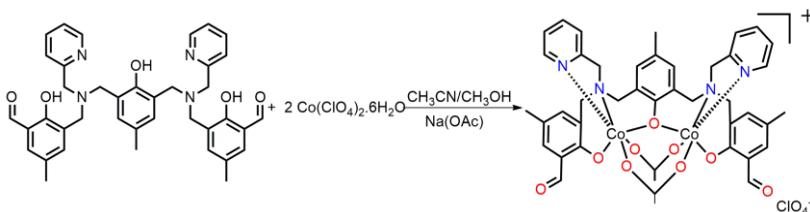
IV(ATR), em  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu$  ( $\text{C-H}_{\text{ar}}$  e  $\text{C-H}_{\text{alif}}$ ) 3009 e 2922;  $\nu$  ( $\text{C-H}_{\text{ald}}$ ) 2858;  $\nu$  ( $\text{C=O}_{\text{ald}}$ ) 1656;  $\nu$  ( $\text{C=C}$  e  $\text{C=N}$ ) 1608 e 1552;  $\nu_{\text{ass}}$  (OAc) 1561;  $\nu_{\text{sim}}$  (OAc) 1461;  $\nu$  ( $\text{ClO}_4^-$ ) 1086 e ( $\text{C-Har}$ ) 621.

Figura 24- Espectro na região do infravermelho em ATR do complexo  $\text{FeL}_1$ .



## 5.6 SÍNTESE DO COMPLEXO $\text{CoL}_1$

Figura 25- Rota sintética do complexo  $\text{CoL}_1$ .

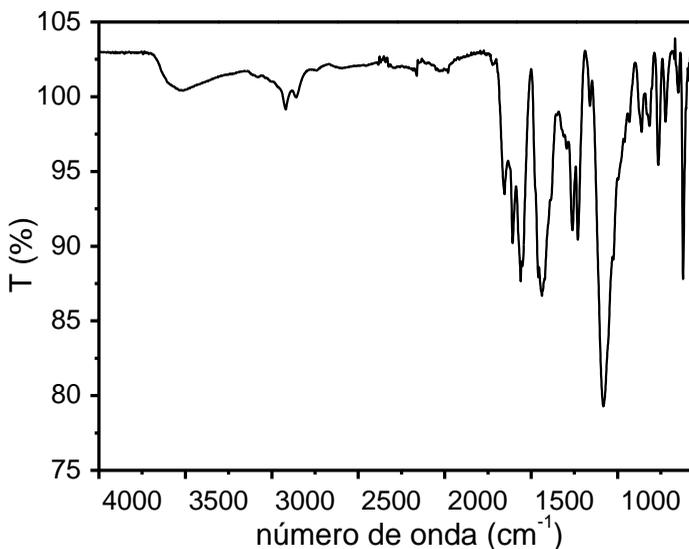


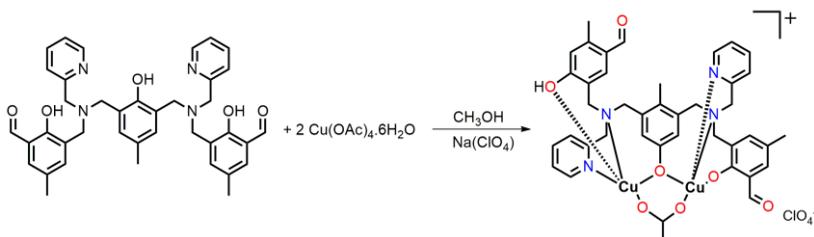
A uma solução de acetonitrila e metanol contendo 0,32 g do ligante 2Py2mff-Fenol ( $0,5 \text{ mmol}$ ;  $644,30 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), foi adicionado 0,25 g de  $\text{Co}(\text{ClO}_4)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $1,0 \text{ mmol}$ ;  $365,93 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), sob agitação e leve aquecimento. Após 10 minutos foi adicionado 0,13 g de NaOAc ( $1,0$

mmol;  $136,08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). A solução marrom resultante permaneceu em agitação e aquecimento por aproximadamente 30 minutos. A seguir, filtrou-se e deixou-se em repouso. Após a lenta evaporação do solvente, lavou-se o complexo com isopropanol e éter etílico gelado, foi obtido um pó de coloração marrom com massa de 0,22g e rendimento de 51 % em relação ao ligante 2py2mff-Fenol.

IV(ATR), em  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}} \text{ e } \text{C-H}_{\text{alif}})$  3010 e 2922;  $\nu(\text{C}=\text{H}_{\text{ald}})$  2855;  $\nu(\text{C}=\text{O}_{\text{ald}})$  1655;  $\nu(\text{C}=\text{C} \text{ e } \text{C}=\text{N})$  1652 e 1550;  $\nu_{\text{ass}}(\text{OAc})$  1561;  $\nu_{\text{sim}}(\text{OAc})$  1459;  $\nu(\text{ClO}_4)$  1088 e  $(\text{C-Har})$  621.

Figura 26- Espectro de infravermelho em ATR do complexo  $\text{CoL}_1$ .

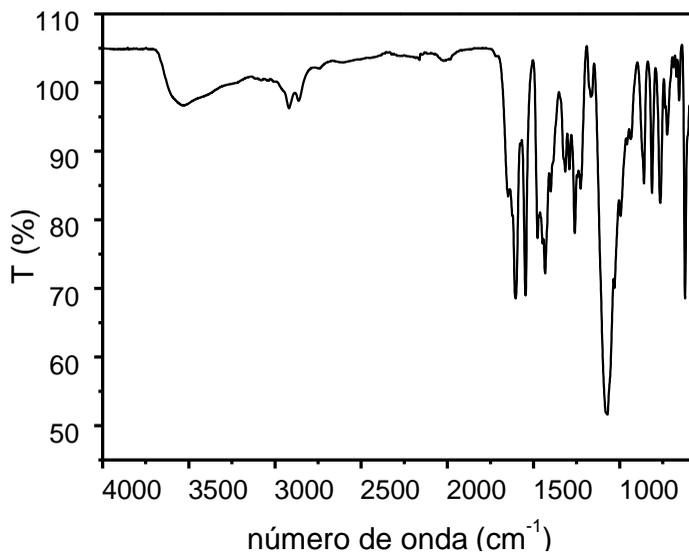


5.7 SÍNTESE DO COMPLEXO CuL<sub>1</sub>Figura 27- Rota sintética do Complexo CuL<sub>1</sub>.

As sínteses dos complexos foram realizadas seguindo metodologias conhecidas. Em um béquer foi adicionado o 2py2mff-Fenol (0,32 g, 0,5 mmol, 664,30 g mol<sup>-1</sup>) dissolvido em 20 mL de Metanol. A solução foi mantida em agitação e aquecimento brando até a completa solubilização do ligante. Em seguida, foi adicionado lentamente o sal do metal Cu<sub>2</sub>(OAc)<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,199 g, 1,0 mmol, 181,63 g mol<sup>-1</sup>). A solução foi mantida em agitação durante 15 minutos, e posteriormente foi realizada a adição do sal NaClO<sub>4</sub> (0,12 g, 1,0 mmol, 122,44 g mol<sup>-1</sup>). A solução permaneceu em agitação e aquecimento durante 20 minutos, esta apresentou coloração esverdeada. Depois da evaporação lenta do solvente o pó obtido foi lavado com isopropanol e éter gelado, obtendo massa de 0,34 g e rendimento de 81 % do complexo em relação ao ligante 2py2mff-Fenol.

IV(ATR), em cm<sup>-1</sup>: ν (C-H<sub>ar</sub> e C-H<sub>alif</sub>) 3008 e 2919; ν (C=H<sub>ald</sub>) 2862; ν (C=O<sub>ald</sub>) 1649; ν (C=C e C=N) 1605 e 1476; ν<sub>ass</sub> (OAc) 1545; ν<sub>sim</sub> (OAc) 1447; ν (ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>) 1076 e (C-Har) 620.

Figura 28- Espectro de infravermelho em ATR do Complexo  $\text{CuL}_1$ .



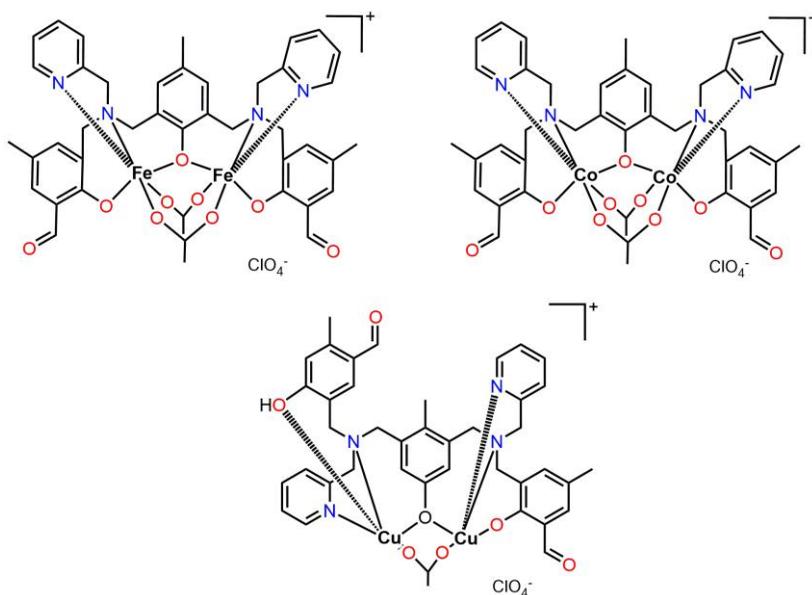
**Atenção:** Embora nenhum problema tenha sido encontrado nas sínteses e purificações dos complexos, sempre devem ser tomadas precauções no manuseio de sais de perclorato, por serem potencialmente explosivo!



## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentadas as caracterizações e respectivas discussões em relação às sínteses do ligante e complexos. Também serão apresentados resultados relacionados à atividade dos complexos frente a reações de oxidação e hidrólise e finalmente resultados de interação dos complexos com ácidos nucleicos. Na Figura 29, estão apresentados os complexos de estudados neste trabalho.

Figura 29- Complexos sintetizados a partir do ligante 2py2mff-Fenol.



Fonte: A Autora.

## 6.1 CARACTERIZAÇÃO DO LIGANTE

A partir das rotas sintéticas descritas na seção experimental foi possível obter tanto na síntese dos precursores quanto do 2py2mff-Fenol, bons rendimentos. O ligante foi obtido com grau de pureza adequado para ser utilizado na síntese dos complexos, sendo caracterizado por técnicas de espectroscopia de infravermelho (IV), espectroscopia de ressonância magnética (RMN  $^1\text{H}$ ) e espectrometria de massa.

### 6.1.1 Espectroscopia no Infravermelho – IV

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica simples e eficiente, onde a partir dela foram atribuídas as principais bandas dos precursores e do ligante final 2py2mff-Fenol, com base na semelhança, de modo a serem utilizadas para acompanhar a formação dos compostos em cada etapa de reação. As bandas características dos precursores e ligante são apresentadas na Tabela 3.

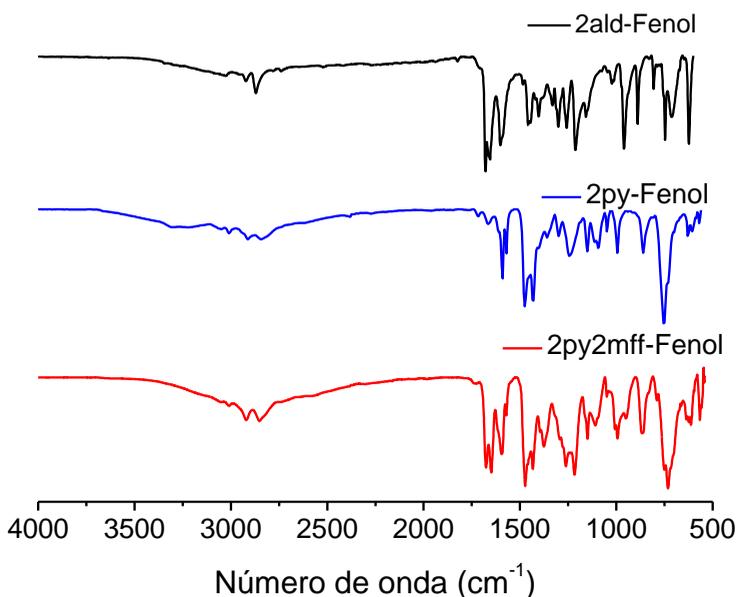
Tabela 3- Relação das bandas características dos precursores e ligantes obtidos pela técnica de infravermelho em ATR (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2000).

Atribuições	2ald-Fenol	2py-Fenol	2py2mff-Fenol
$\nu$ (N-H <sub>amina</sub> )	---	3220	---
$\nu$ (C-H <sub>arom</sub> e C-H <sub>alifático</sub> )	3028/2926	2909 / 2842	3009/2921
$\nu$ (C-H <sub>aldeído</sub> )	2870	---	2857
$\nu$ (C=O <sub>aldeído</sub> )	1678	---	1674
$\nu$ (C=C e C=N)	1600/---	1592 / 1433	1594/1475
$\delta$ (O-H <sub>fenol</sub> )	1330	1297	1375
$\nu$ (C-O <sub>fenol</sub> )	1211	1243	1261
$\delta$ (C-H <sub>arom</sub> )	746	753	731

Os resultados provenientes dos estiramentos e vibrações das moléculas para os precursores até o 2py2mff-Fenol forneceram resultados preliminares das sínteses realizadas. Na síntese do ligante 2ald-Fenol foi

observado principalmente a presença das bandas intensas em  $1678\text{ cm}^{-1}$  referentes ao estiramento da banda C=O do grupo aldeído (PAVIA, 2009; SILVERSTEIN, WEBSTER, 2000). Em seguida, para a formação do ligante diamina, a presença dos estiramentos das ligações N-H dos grupos aminas em  $3220\text{ cm}^{-1}$ , C=N em  $1456\text{ cm}^{-1}$  foram um forte indicativo de que a reação foi bem sucedida. Posteriormente, para a formação do 2py2mff-Fenol, é observado novamente o aparecimento de uma banda intensa referente ao estiramento C=O aldeído ( $1674\text{ cm}^{-1}$ ), além da ausência de estiramentos referentes ao grupo amina (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2000). A Figura 30 apresenta o espectro com a variação das bandas dos precursores e ligante final, 2py2mff-Fenol.

Figura 30- Comparação dos espectros dos precursores e ligante final, 2py2mff-Fenol.

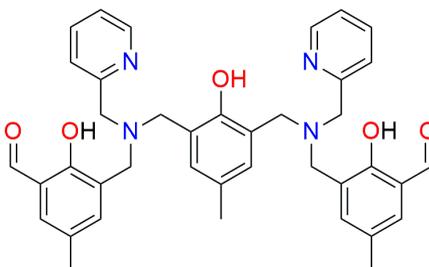


## 6.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear RMN $^1\text{H}$

A espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  foi uma técnica útil para a caracterização dos compostos sintetizados. Os deslocamentos químicos e a integração dos sinais de cada espectro permitiram determinar o número de hidrogênios presentes em cada composto. Os valores de deslocamento químico ( $\delta_{\text{H}}$  em ppm), o número de hidrogênios correspondentes e as atribuições dos sinais do 2py2mff-Fenol estão listados na Tabela 4.

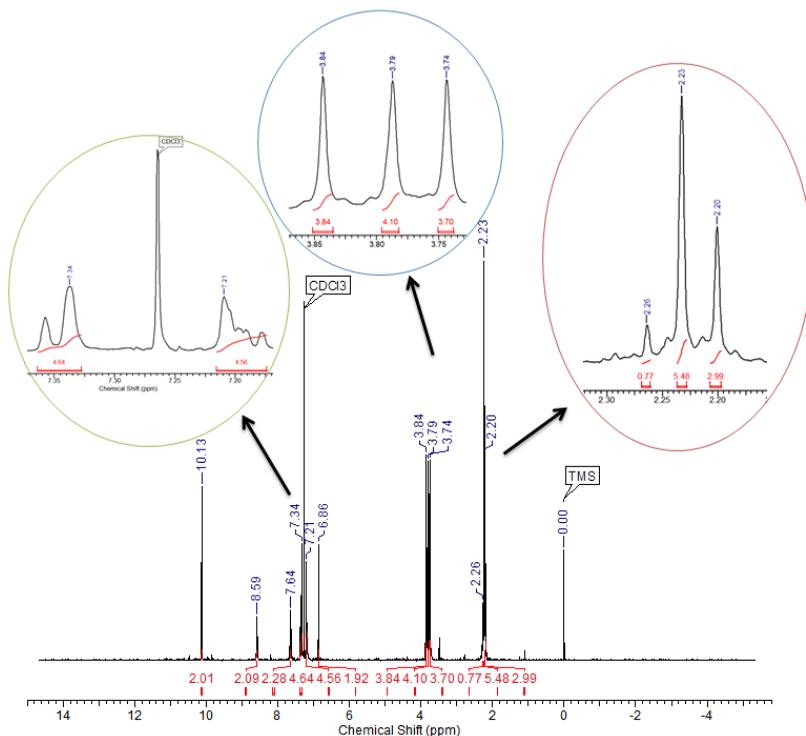
Tabela 4- Tabela das atribuições de deslocamento químico do ligante 2Py2mff-Fenol.

Posições (ppm)
2,20-2,26 (s, 9H)
3,74-3,79 (s, 12H)
6,85 (s, 2H)
7,21-7,34 (m, 8H)
7,64 (t, 2H)
8,59 (d, 2H)
10,13 (s, 2H)



Os sinais de ressonância apresentam no campo de maior blindagem os grupamentos metila, em campo intermediário estão presentes os sinais referentes a grupamentos metileno e em campo de menor blindagem estão representados os hidrogênios relacionados aos anéis aromáticos. Também, é notada a sinais em 10,13 referentes aos hidrogênios dos grupos aldeídos. A Figura 31 apresenta o espectro de RMN do ligante 2py2mff-Fenol.

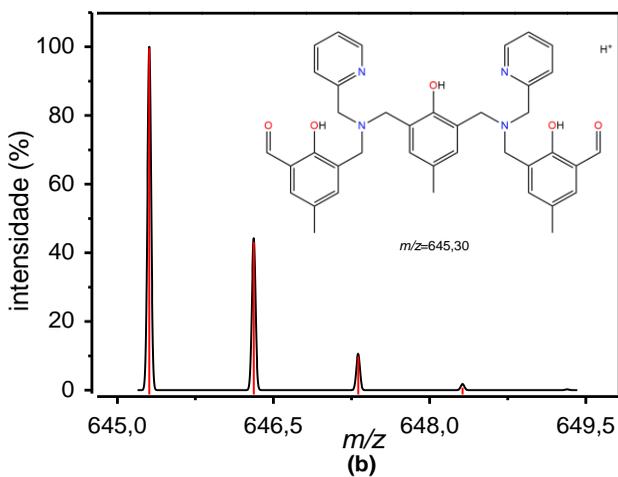
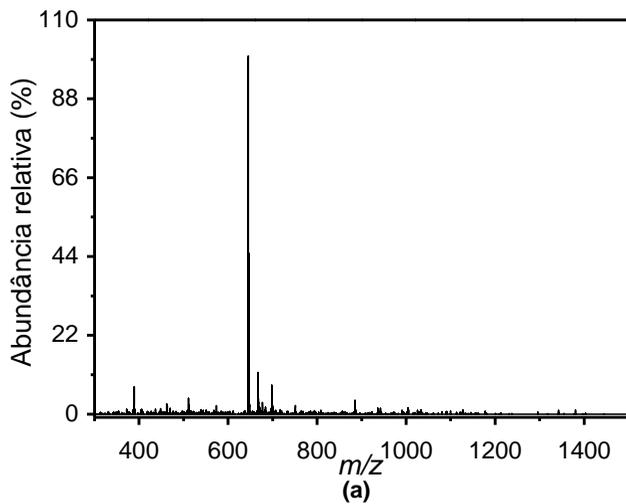
Figura 31- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do ligante 2py2mff-Fenol.



### 6.1.3 Espectrometria de massa do ligante 2py2mff-Fenol

A espectrometria de massa por ionização eletrospray foi aplicada na caracterização do ligante final (2py2mff-Fenol), com o propósito de obter informações qualitativas referentes às espécies carregadas em solução. A técnica indicou para o ligante a presença de um pico de íon molecular com ( $m/z = 644,30$ ), referente à espécie  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Acredita-se que a espécie mais provável para estar protonada seria um dos aldeídos presentes na molécula. Também foi verificada a ausência de outros picos significativos para a análise. A Figura 32 evidencia o espectro obtido experimentalmente sobreposto ao teórico.

Figura 32- Espectro de ESI-MS do 2py2mff-Fenol em metanol em (a) distribuição isotópica e (b) simulação da espécie  $[C_{39}H_{40}N_4O_5]^+$ .



## 6.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

A partir dessa seção, o ligante 2py2mff-Fenol será denominado  $L_1$  todas as vezes que seu nome for associado aos complexos.

### 6.2.1 Espectroscopia no infravermelho –IV

As análises de infravermelho para os complexos são utilizadas como uma técnica preliminar para as demais caracterizações. A técnica fornece as bandas características associadas aos números de onda dos grupos funcionais característicos de vibrações moleculares dos compostos em estudo. Os complexos foram comparados com o ligante  $L_1$  com a finalidade de obter informações iniciais a respeito da coordenação do ligante com os centros metálicos. A Tabela 5 compara as bandas do  $L_1$  com cada um dos complexos.

Tabela 5- Relação das bandas do ligante 2py2mff-Fenol e dos respectivos complexos a partir da técnica de infravermelho por ATR (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2000; NAKAMOTO, 1977).

Estiramentos	2py2mff-Fenol	Fe $L_1$	Co $L_1$	Cu $L_1$
$\nu$ (C-H <sub>arom</sub> e C-H <sub>alif</sub> )	3009/2921	3009/2922	3010/2922	3008/2919
$\nu$ (C-H <sub>ald</sub> )	2828	2858	2855	2862
$\nu$ (C=O <sub>ald</sub> )	1671	1656	1655	1649
$\nu$ (C=C/C=N)	1608/1473	1608/1552	1652/1550	1605/1476
$\nu_{ass}$ (COO <sup>-</sup> <sub>acetato</sub> )	---	1561	1561	1545
$\nu_{sim}$ (COO <sup>-</sup> <sub>acetato</sub> )	---	1461	1459	1447
$\delta$ (O-H <sub>fenol</sub> )	1376	---	---	1313
$\nu$ (C-O <sub>fenol</sub> )	1264	1268	1260	1258
$\nu$ (C-N)	1148	1156	1161	1161
$\nu$ (ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )	---	1086	1088	1076
$\delta$ (C-H <sub>arom</sub> )	729	621	621	620

A partir dos números de onda, decorrente das vibrações das ligações, é possível observar uma diferença significativa nos valores observados entre os grupos presentes nos complexos em comparação aos do ligante. Foi observado um deslocamento para região de menor energia

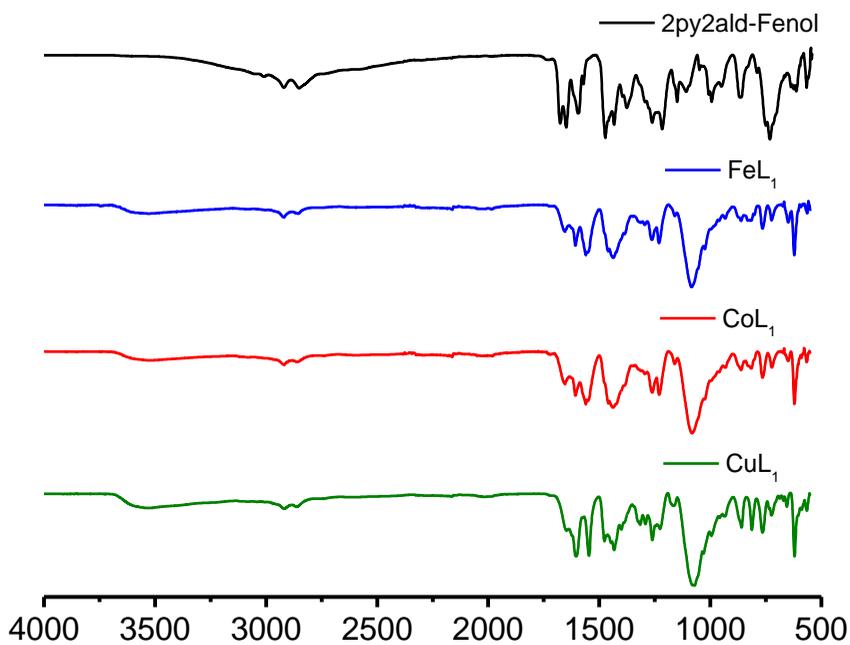
das bandas dos complexos. Essa diferença ocorre porque ao se coordenar ao centro metálico, o comprimento das ligações dos átomos adjacentes diminui logo, o deslocamento das bandas dos complexos comparadas às bandas do ligante livre é menos energético.

Destaca-se o desaparecimento das bandas referentes aos estiramentos  $O-H_{\text{fenol}}$  dos complexos  $FeL_1$  e  $CoL_1$ , sendo um indicativo de que os fenóis estejam desprotonados, por outro lado observa-se a presença dessa banda para o complexo de  $CuL_1$  sendo um indicativo de que pelo menos um dos fenóis estejam protonados no complexo.

A presença de bandas referentes às vibrações dos grupos acetatos assimétricos e simétricos é notada em todos os complexos, apresentando uma diferença entre as mesmas de  $100\text{ cm}^{-1}$  para  $FeL_1$ ,  $102\text{ cm}^{-1}$  para  $CoL_1$  e  $98\text{ cm}^{-1}$  para  $CuL_1$  sendo esses um forte indicativo de que os grupos acetatos estão coordenados em ponte de forma bidentada aos complexos (NAKAMOTO, 1977). Uma banda intensa referente ao estiramento do perclorato também está presente em cada um dos espectros dos complexos, indicando a presença do contra-íon. A Figura 33 compararam os espectros dos complexos com o ligante.

Os valores atribuídos na tabela referente aos estiramentos tanto dos ligantes quanto dos complexos, estão de acordo com valores já publicados na literatura (NEVES, *et al.*, 2001; SMITH, *et al.*, 2012; ME-GHERSAN, *et al.*, 2018).

Figura 33- Espectro de infravermelho em ATR do ligante (preto),  $\text{FeL}_1$  (azul),  $\text{CoL}_1$  (vermelho) e  $\text{CuL}_1$  (verde).



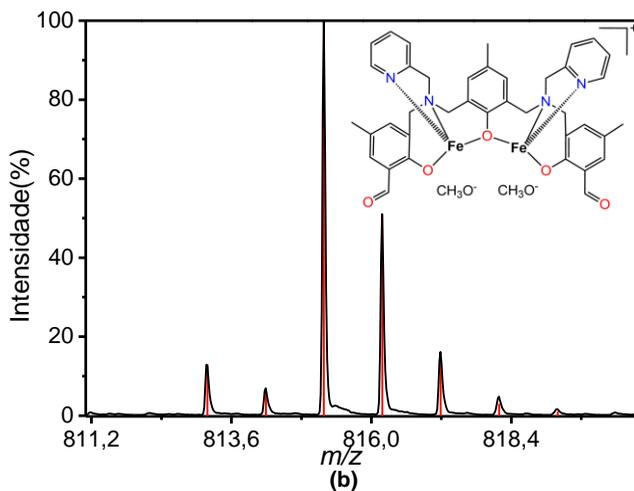
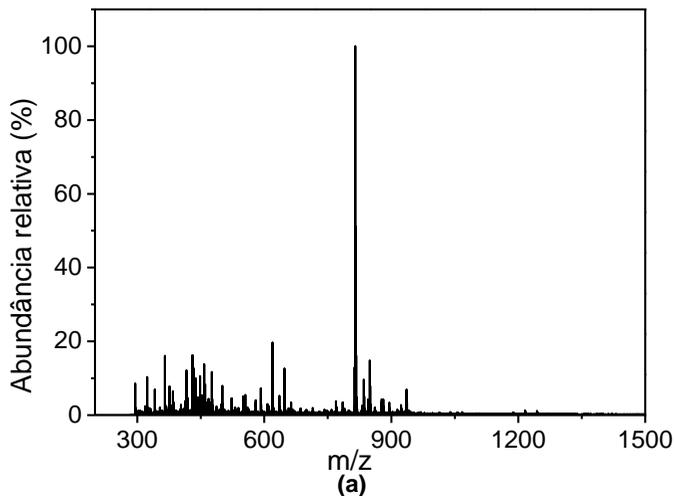
Todos esses fatores são um indicativo de coordenação do ligante com os metais em estudo. Não é possível notar grande diferença em relação aos espectros de infravermelho para os complexos  $\text{FeL}_1$ ,  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$ , visto que apenas os metais que coordenam o sistema mudam, sendo mantido o mesmo ligante para todas as sínteses.

### 6.2.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas foi de grande importância no estudo dos complexos, fornecendo um indicativo das espécies geradas em solução e seus respectivos íons moleculares. Os espectros de massa dos complexos  $\text{FeL}_1$ ,  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$  são apresentados nas Figuras 32, 33 e 34.

O complexo  $\text{FeL}_1$  apresenta um grupo de picos com razão massa/carga em 815,18 o qual foi atribuído à espécie  $[\text{C}_{41}\text{H}_{43}\text{Fe}_2\text{N}_4\text{O}_7 + 2\text{CH}_3\text{O}]^+$ , sendo que a diferença entre os sinais forneceu o valor de carga da espécie, desta maneira o fragmento mais estável apresenta carga (1+). A presença dos grupos metóxido na forma de aduto é atribuída à presença de metanol tanto na síntese como na utilização como solvente na análise realizada. A partir do gráfico de distribuição das espécies é observado que as intensidades dos demais conjuntos de espécies apresentam uma intensidade menor que 20%, portanto foram desconsiderados na análise. A simulação isotópica da espécie, sobreposição dos espectros teóricos e experimentais assim como a estrutura proposta é apresentada na Figura 34.

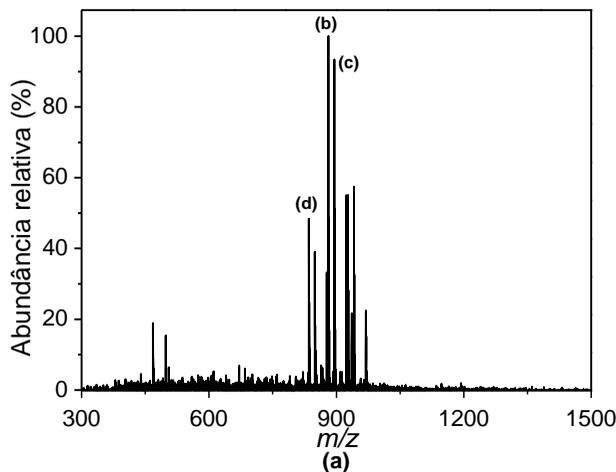
Figura 34- Espectro de ESI-MS do complexo FeL<sub>1</sub> em metanol em (a) distribuição isotópica e (b) simulação isotópica da espécie proposta.

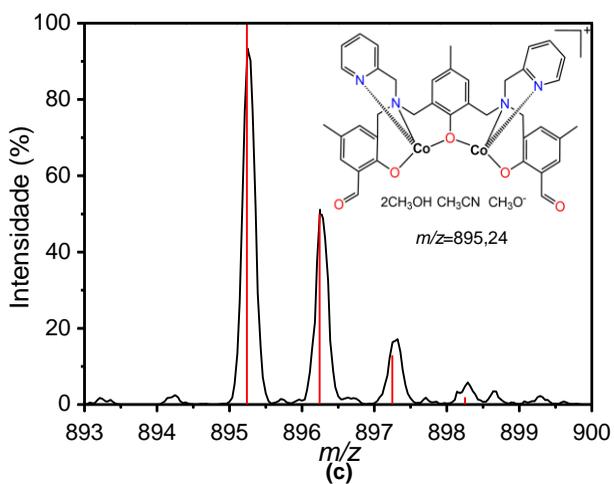
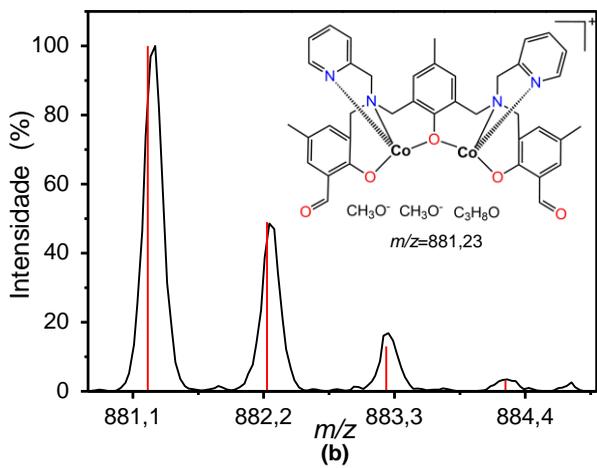


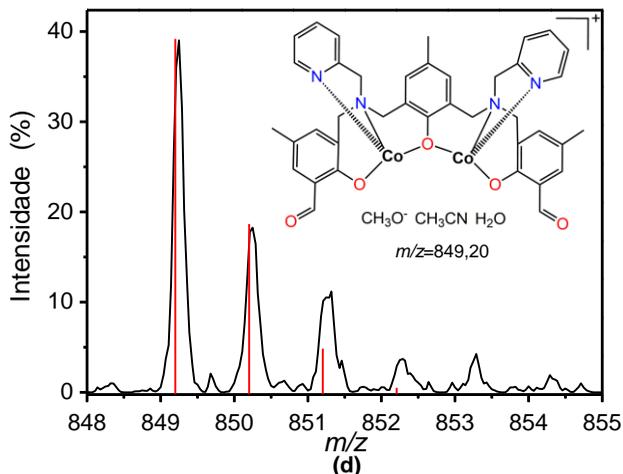
O complexo CoL<sub>1</sub> apresentou um pico em relação massa/carga em 881,23 que pode ser atribuído a espécie  $[C_{43}H_{47}Co_2N_4O_9 + 2CH_3O + C_3H_8O]^+$ , a diferença entre os sinais forneceu para a espécie analisada

uma carga (1+). Um segundo pico em 849,20 foi atribuído à espécie  $[\text{C}_{42}\text{H}_{45}\text{Co}_2\text{N}_5\text{O}_7 + \text{CH}_3\text{O}^- + \text{CH}_3\text{CN} + \text{H}_2\text{O}]^+$  e outro em 895,25  $[\text{C}_{44}\text{H}_{51}\text{Co}_2\text{N}_5\text{O}_8 + 2\text{CH}_3\text{OH} + \text{CH}_3\text{CN} + \text{CH}_3\text{O}^-]^+$ . A presença de grupos metóxido na forma de aduto pode ser atribuída à presença de metanol tanto na síntese como solvente na análise, a presença de acetonitrila também pode ser atribuída à utilização da mesma na síntese do complexo e a presença de isopropanol é atribuída à utilização do mesmo na purificação do complexo após a síntese. A primeira proposta, apresentada em **(b)** atribuiu-se que os dois centros de cobalto estão presentes como  $\text{Co}^{3+}$ . Para as demais espécies propostas, apresentadas em **(c)** e **(d)** atribui-se que um dos centros de cobalto sobre redução, ficando na forma  $\text{Co}^{2+}$ . A simulação isotópica da espécie, sobreposição dos espectros teóricos e experimentais assim como a estrutura proposta é apresentada na Figura 35.

Figura 34- Espectro de ESI-MS do complexo  $\text{CoL}_1$  em metanol em **(a)** distribuição isotópica e **(b)**, **(c)** e **(d)** apresentam simulação isotópica das espécie proposta.

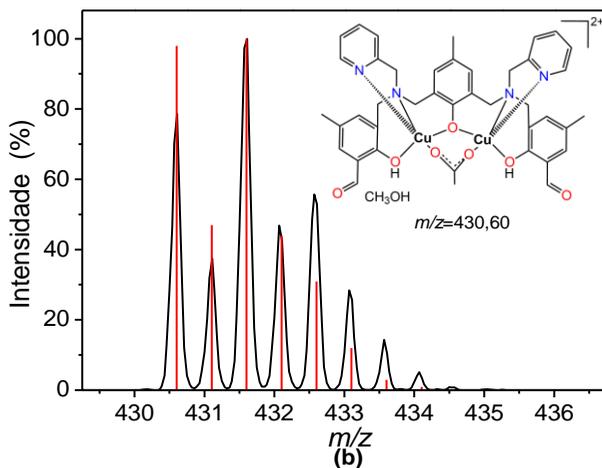
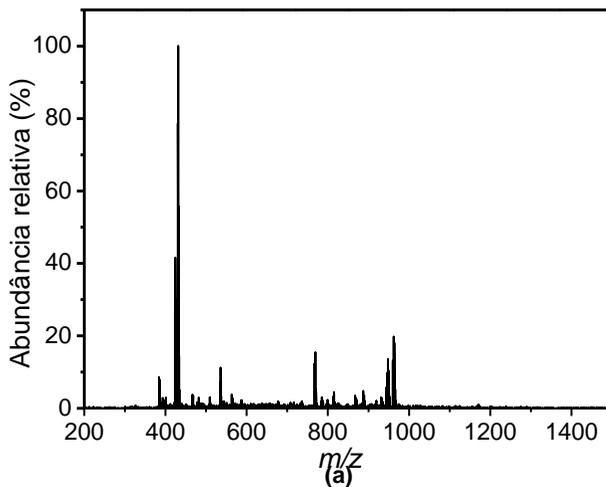






Já o complexo  $\text{CuL}_1$  apresenta um grupo de picos em razão massa/carga em 430,60 o qual pode ser atribuído à espécie  $[\text{C}_{42}\text{H}_{47}\text{Cu}_2\text{N}_4\text{O}_8 + \text{CH}_3\text{OH}]^{2+}$ . A diferença entre os sinais forneceu o valor da carga da espécie, dessa maneira o fragmento mais estável apresenta carga (+2). Na proposta, é observada a presença da ponte acetato, assim como de uma molécula de metanol. Este pode ser atribuído tanto pela utilização do mesmo na síntese do complexo quanto na solubilização da amostra. A simulação isotópica da espécie, sobreposição dos espectros teóricos e experimentais assim como a estrutura proposta é apresentada na Figura 36.

Figura 36- Espectro de ESI-MS do complexo CuL<sub>1</sub> em (a) distribuição isotópica e (b) simulação isotópica da espécie proposta.



A presença de grupos metóxidos, presentes como adutos, para as propostas de espécies já vem sendo reportado na literatura (LANZNASTER, *et al.*, 2005; SMITH, *et al.*, 2007).

## 7 Análise elementar de CHN

Os resultados obtidos em relação à análise elementar apresentam uma boa correlação entre os valores teóricos e calculados. A Tabela 6 apresenta a fórmula molecular e as porcentagens de C, H e N (calculada/encontrada) para os complexos sintetizados bem como a proposta relativa às composições químicas de cada complexo.

Tabela 6- Porcentagem (calculada/encontrada) de C, H, N para os complexos sintetizados.

Com plexo	Fórmula molecular	% C	% H	% N
FeL <sub>1</sub>	C <sub>45,8</sub> H <sub>53</sub> Cl <sub>2</sub> Fe <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>19,5</sub>	42,66/42,50	4,18/4,79	4,36/5,03
CoL <sub>1</sub>	C <sub>43</sub> H <sub>18</sub> ClCo <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>14,5</sub>	50,61/51,33	4,62/4,81	5,48/5,57
CuL <sub>1</sub>	C <sub>41</sub> H <sub>46</sub> Cl <sub>2</sub> Cu <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>15</sub>	47,27/47,68	4,29/4,49	5,31/5,42
Composições químicas				Massa Molar
FeL <sub>1</sub>	[FeL <sub>1</sub> (1,5CH <sub>3</sub> OH) (3H <sub>2</sub> O) (2ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )]			1114,49
CoL <sub>1</sub>	[CoL <sub>1</sub> (1,5H <sub>2</sub> O) (ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )]			1006,18
CuL <sub>1</sub>	[CuL <sub>1</sub> (2CH <sub>3</sub> OH) (2ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )]			1032,82

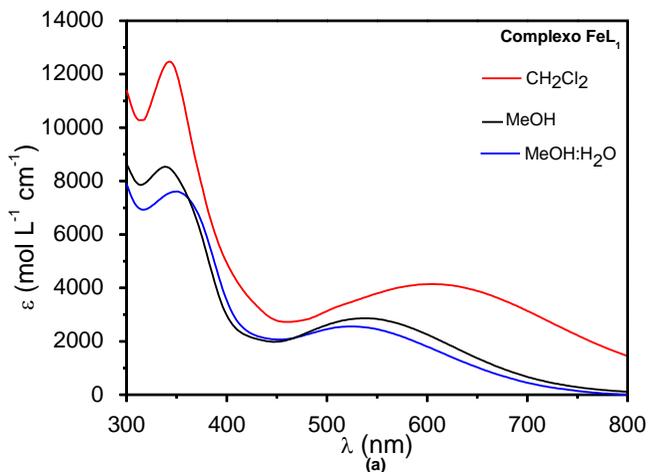
Alguns desvios foram encontrados nas fórmulas moleculares propostas para os complexos, visto que a presença de umidade ou moléculas de solvente adsorvidas nas amostras podem alterar os resultados.

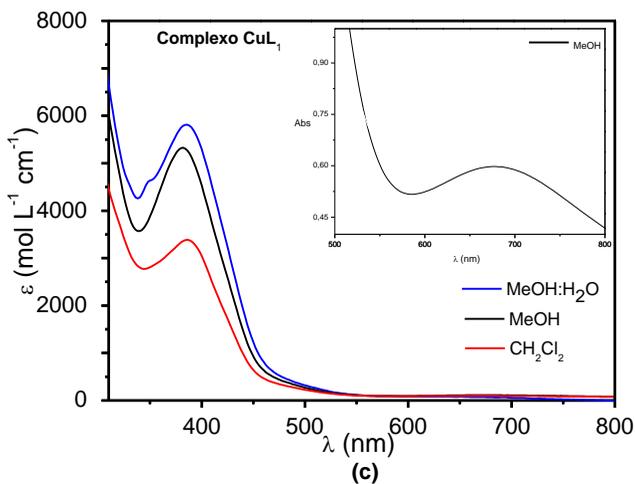
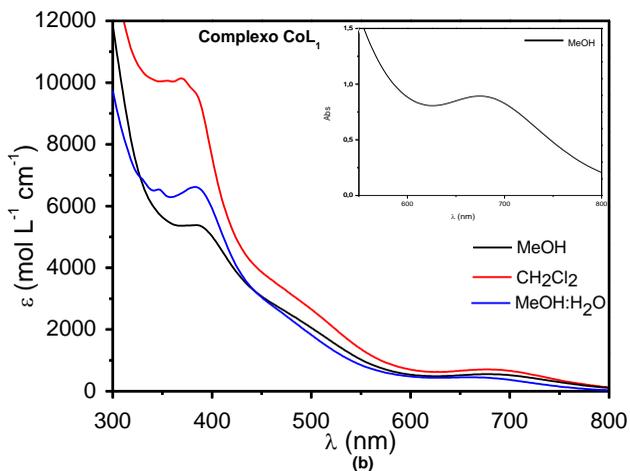
Em todas as amostras foram encontradas moléculas de água que podem ser provenientes do próprio ambiente. Também são encontrados percloratos, referentes aos sais dos metais utilizados na síntese dos complexos, como no caso dos complexos FeL<sub>1</sub> e CoL<sub>1</sub>. No caso do complexo CuL<sub>1</sub> a presença de perclorato é decorrente a utilização do mesmo como contra-íon na síntese.

### 7.1.1 Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis

Os espectros de absorção dos complexos estudados foram investigados na região de 300 e 900 nm, utilizando-se como solventes: água, metanol, diclorometano e acetonitrila, como solventes. Os espectros dos complexos foram plotados em função dos valores de seus coeficientes de absorção ( $\epsilon / \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) e podem ser observados na Figura 37.

Figura 35- Espectro eletrônico dos complexos  $\text{FeL}_1$ ,  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$  em solução de MeOH, MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  50% (v/v), sendo: a)  $\text{FeL}_1$ , b)  $\text{CoL}_1$  e c)  $\text{CuL}_1$ .





Os espectros eletrônicos dos complexos  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$  apresentaram bandas de absorção de baixa intensidade em regiões de menor energia, em 672 e 664 nm, respectivamente, as quais são referentes às transições do tipo  $d-d$  dos centros metálicos de cobalto(III) e cobre(II) em diclorometano, mutuamente. Para o complexo  $\text{FeL}_1$ , não é possível observar este tipo de transição, visto que a mesma é proibida pela regra de seleção de spin para sistemas  $d^5$  spin alto, como é o caso do ferro(III) (MIESSLER, 2014). No entanto, esse complexo apresenta uma banda

intensa entre 606 nm em diclorometano, a qual é atribuída a um processo de transferência de carga do tipo ligante  $\rightarrow$  metal (TCLM) proveniente os orbitais  $\pi\pi$  dos grupos fenolato para os orbitais  $d\pi^*$  do íon ferro(III) (GABER, 1974).

Os três complexos apresentaram uma banda referente a um processo de transferência de carga ligante  $\rightarrow$  metal (TCLM) na região entre 338 a 386 nm referentes às transferências de carga entre os orbitais do  $\pi\pi$  do fenolato para os orbitais  $d\sigma^*$  do metal (COMBA, *et al.*, 2012; PALHANO, 2017; PERALTA, *et al.*, 2010). Para alguns solventes, é possível essa transição aparecer na forma de ombro, por estarem parcialmente encobertos por transições intraligante do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  dos anéis piridínicos e fenólicos (KREBS, 1994; GABER, 1974).

Os complexos  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$  não tiveram seus espectros eletrônicos estudados em acetonitrila e em condições cinéticas de hidrólise, uma vez que estes não apresentaram atividade frente à hidrólise do 2,4-BDNPP. Um resumo dos dados obtidos via espectroscopia UV-Vis para os complexos  $\text{FeL}_1$ ,  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$  estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7- Máximos de absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) e coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) para os complexos em diferentes solventes e em meio sólido.

Complexo	$\lambda$ (nm) [ $\epsilon$ ] mol L <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>					
	CH <sub>3</sub> OH	CH <sub>3</sub> OH:H <sub>2</sub> O	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN	CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O	Sólido
FeL <sub>1</sub>	538					
	[2862]	524 [2558]	606[4142]	582[3932]	526	614
	338	350 [7606]	342[12469]	340[1007]	350	390
CoL <sub>1</sub>	[8533]					
	676 [407]	600 [630]	672 [741]	-----	-----	671
	390[402]	382 [9657]	372 [9120]			398
CuL <sub>1</sub>	679 [154]					
	386	645[210]	664 [188]	-----	-----	677
	[5326]	385[6080]	386 [3510]			396

Os espectros eletrônicos do complexo  $\text{FeL}_1$  apresentaram um deslocamento batocrômico na região de transferência de carga dos orbitais  $\pi\pi$  dos grupos fenolato para os orbitais  $d\pi^*$  do íon ferro(III), (deslocamento para a região do vermelho) de acordo com a polaridade do solvente seguindo a ordem:  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O} < \text{CH}_3\text{OH} < \text{CH}_3\text{CN} < \text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Também foi observado hipocromismo em meio aquoso e esta mudança pode ser atribuída à liberação de pontes  $\mu$ -acetato podendo ocorrer uma substituição das mesmas por moléculas de água ou hidróxido. Comportamentos semelhantes também foram reportados por Xavier e colaboradores (2009) para complexos contendo ferro(III).

Já para o complexo  $\text{CoL}_1$ , foi observada uma hipercromismo em diclorometano em relação aos solventes próticos, o que era esperado, visto que o diclorometano se trata de um solvente aprótico, com um menor força de coordenação e, portanto, não interfere na esfera de coordenação do complexo. Já em metanol, o solvente pode interagir com o metal, fazendo com que o mesmo deixe de estar totalmente disponível para transferência de carga com o fenolato. No entanto, em meio aquoso, é observado um aumento no coeficiente de absorção. A presença de água no meio promove a hidrólise dos acetatos, proporcionando o aumento no coeficiente de absorção.

Para os espectros eletrônicos do complexo  $\text{CuL}_1$  não são observadas mudanças significativas nos comprimentos de onda com a troca dos solventes. No entanto, nota-se uma variação pronunciada nos coeficientes de absorção. Em diclorometano, por exemplo, nota-se um menor coeficiente de absorção, em quanto em meios coordenantes como metanol e metanol:água, o coeficiente de absorção aumenta consideravelmente, tal fato pode estar diretamente relacionado com o raio iônico dos metais, visto que complexos  $\text{Cu(II)}$  apresentam um raio de 73 pm, superior aos dos centros de  $\text{Fe(III)}$  e  $\text{Co(II)}$  (HOUSECROFT, C. & SHAPE, A.G, 2012).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7 é observado que à medida que aumenta a dureza do centro metálico ocorre um deslocamento para a região de menor energia (deslocamento batocrômico). Considerando o ligante utilizado como tendo características, base dura, é possível sugerir que quando o mesmo interage com o centro metálico, ácido duro, a interação duro-duro é favorecida, portanto a energia é minimizada, esse deslocamento segue a seguinte ordem de dureza: ferro(III) > cobalto (III) > cobre(II).

### 7.1.2 Eletroquímica

Os comportamentos eletroquímicos dos complexos foram estudados utilizando as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada. Por questões de solubilidade e melhor definição dos processos as medidas foram realizadas em acetonitrila. Todos os potenciais redox foram referenciados ao eletrodo normal de hidrogênio (ENH) utilizando como padrão o par redox ferroceno/ferrocínio ( $E_{1/2} = 400$  mV) (GAGNE, KOVAL *et al.*, 1980). Os voltamogramas cíclicos e de onda quadrada dos complexos  $\text{FeL}_1$ ,  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$ , são apresentados nas figuras 38, 39 e 40 respectivamente.

Figura 36- Voltamograma do complexo  $\text{FeL}_1$  ( $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), em  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo; Referência:  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ; Auxiliar: Platina; Eletrólito suporte:  $\text{TBA}(\text{PF}_6)$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (a) voltametria cíclica e (b) voltametria de onda quadrada (pulso  $-25 \text{ mV}$ , frequência =  $15 \text{ Hz}$ ).

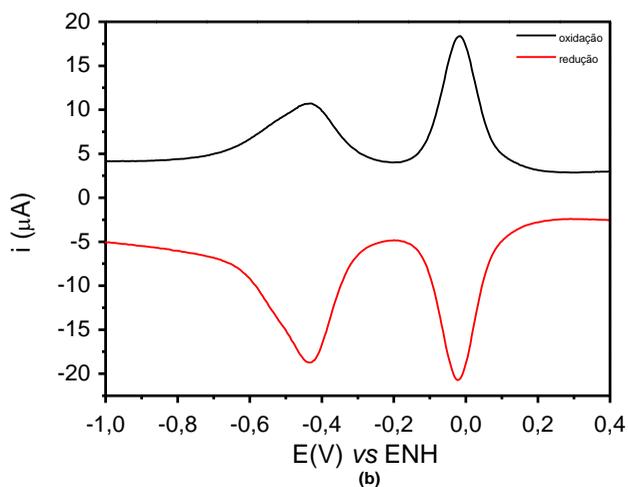
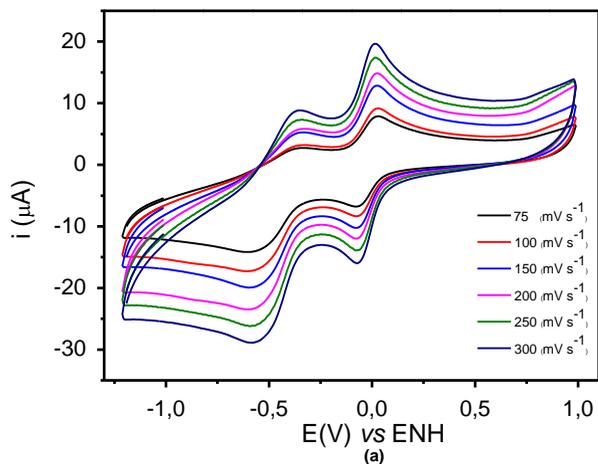


Figura 37- Voltamograma do complexo  $\text{CoL}_1$  ( $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), em  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo; Referência:  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ; Auxiliar: Platina; Eletrólito suporte  $\text{TBA}(\text{PF}_6)$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (a) voltametria cíclica e (b) voltametria de onda quadrada (pulso  $-25 \text{ mV}$ , frequência =  $15 \text{ Hz}$ ).

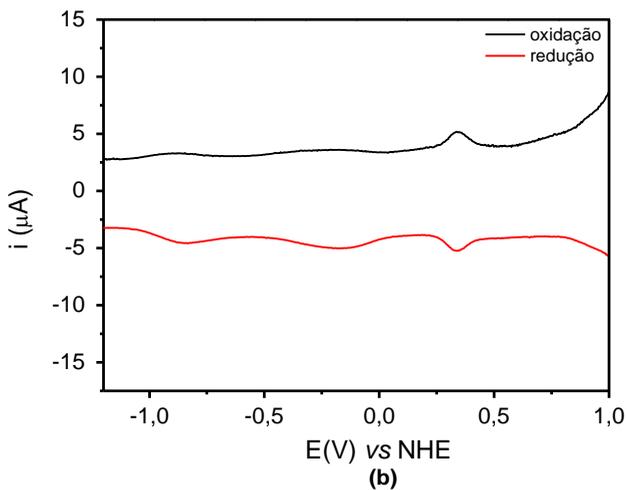
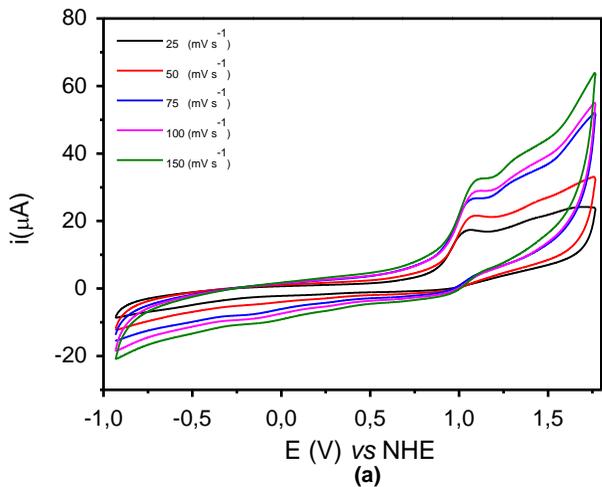
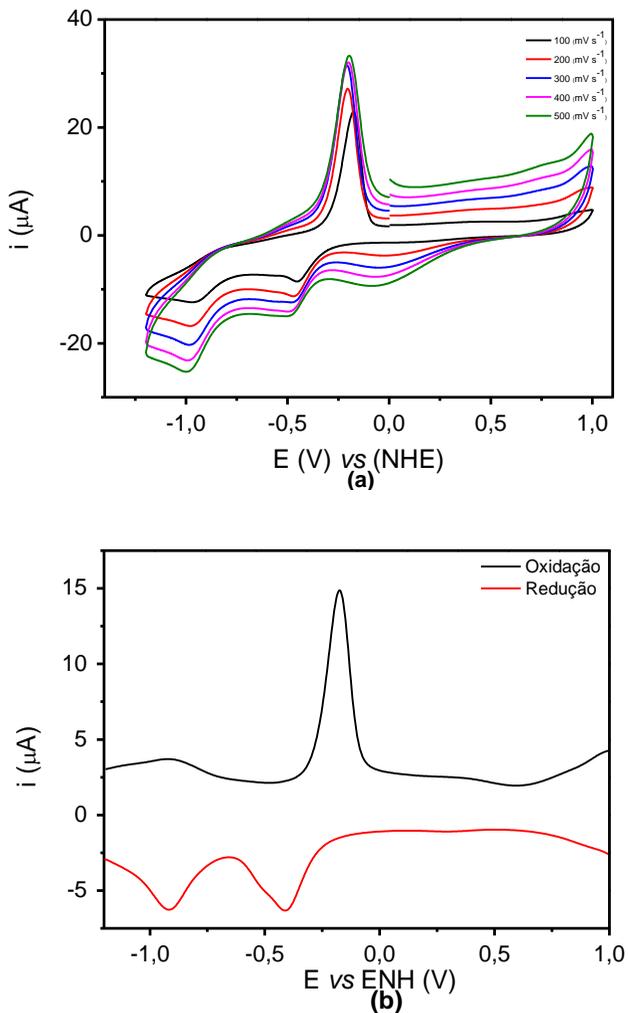


Figura 38- Voltamograma do complexo  $\text{CuL}_1$  ( $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), em  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo; Referência:  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ; Auxiliar: Platina; Eletrólito suporte  $\text{TBA}(\text{PF}_6)$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (a) voltametria cíclica e (b) voltametria de onda quadrada (pulso  $-25 \text{ mV}$ , frequência =  $15 \text{ Hz}$ ).



Os potenciais eletroquímicos obtidos a partir dos voltamogramas apresentados nas Figuras 38, 39 e 40, estão sumarizados na Tabela 8.

Tabela 8 - Dados eletroquímicos para os complexos.

Complexo	Epc <sub>1</sub> (V)	Epc <sub>2</sub> (V)	Epa <sub>1</sub> (V)	Epa <sub>2</sub> (V)	E <sub>1/2</sub> 1	E <sub>1/2</sub> 2
FeL <sub>1</sub>	-0,066	-0,603	0,023	-0,035	-0,018	-0,482
CoL <sub>1</sub>	-0,181	-0,847	-0,220	-0,887	-0,200	-0,866
CuL <sub>1</sub>	-0,448	-0,959	-0,824	-----	-0,891	-----
1 <sup>a</sup>	0,067	-0,243	-----	-----	-----	-----
1 <sup>b</sup>					-0,270	-0,920
1 <sup>c</sup>	-0,559	-0,677	-----	-----	-----	-----

1<sup>a</sup> refere-se a [Fe<sup>III</sup>(μ-OH)(bbpmp)]; (CAMARGO *et al.*, 2015)

1<sup>b</sup> refere-se a [(Co<sup>III</sup><sub>2</sub>(H<sub>2</sub>L)<sub>2</sub>(OAc)<sub>2</sub>)]CH<sub>3</sub>OH; (Dey&Mukherjee, 2014).

1<sup>c</sup> refere-se a [Cu<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>bbppnol) (μ-OAc)(μ-ClO<sub>4</sub>)]<sup>+</sup>; (NEVES, et al., 2001).

A partir dos valores apresentados na Tabela 8, é observada uma tendência em relação ao potencial de redução dos complexos. Nota-se que quanto maior a dureza do centro metálico maior a facilidade de redução. Além disso, os valores encontrados são condizentes com a literatura (CAMARGO *et al.*, 2015; DEY *et al.*, 2014; XAVIER *et al.*, 2009; PALHANO, 2017; NEVES, 2001).

Como os complexos estudados neste trabalho são simétricos, os voltamogramas dos complexos poderiam apresentar sobreposição aparecendo uma única onda referente a cada um dos processos. O aparecimento dos dois processos é um indicio de acoplamento, o que é se esperar em virtude da presença da ponte acetato entre os centros metálicos.

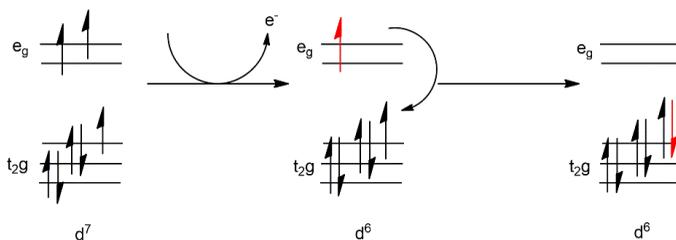
Os voltamogramas cíclicos investigados na faixa de +1,2 à -1,0 V, e de onda quadrada para o complexo FeL<sub>1</sub> apresentaram dois processos *quasi*-reversíveis, ou seja, a diferença entre os potenciais varia pronunciadamente de acordo com a velocidade de varredura. O primeiro processo aparece em -0,066 V vs ENH, referente ao par redox Fe<sup>III</sup>Fe<sup>I</sup>/<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup> e o segundo potencial de redução em -0,603 V vs ENH referente ao processo Fe<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>. Valores similares foram reportados por (CAMARGO, *et al.*, 2015) para processos realizados em pH 6,8 sendo este um valor próximo ao pH 6,5 o qual é um valor aparente do complexo em solução.

Os voltamogramas cíclicos investigados na faixa entre +1,5 e -1,2 V do complexo CoL<sub>1</sub> não apresentam nenhum processo referente aos processos redox do cobalto. No entanto, o voltamograma de onda qua-

drada apresenta dois processos irreversíveis, ou seja, não é observado processo de retorno para o processo de oxidação. Além disso, os processos se mostraram pouco intensos referentes à redução do cobalto. O primeiro processo de redução é atribuído ao par redox  $\text{Co}^{\text{III}}\text{Co}^{\text{I}}/\text{Co}^{\text{III}}\text{Co}^{\text{II}}$  com potencial de  $-0,181\text{ V vs ENH}$  e o segundo apresenta potencial em  $-0,847\text{ V vs ENH}$  atribuído ao processo  $\text{Co}^{\text{III}}\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{II}}\text{Co}^{\text{II}}$ . Os valores de  $E_{1/2}$  obtidos para o complexo  $\text{CoL}_1$  estão de acordo com a literatura (DEY *et al.*, 2014; XAVIER *et al.*, 2009; PALHANO, 2017). Também é observado um processo reversível com potencial de  $+0,350\text{ V}$ , o qual pode ser atribuído ao ligante.

Processos referentes à oxidação de  $\text{Co}^{\text{II}}$  para  $\text{Co}^{\text{III}}$  apresentam maior dificuldade em ocorrer, tendo valores de corrente reduzidos, tal fato pode ser explicado pela barreira de Franck-Condon (HOUSECROFT & SHARPE, 2008). Portanto, a etapa determinante para o processo redox é a velocidade com que ocorre a inversão do spin eletrônico restante nos orbitais  $e_g$  logo após o processo de oxidação seguido do emparelhamento do mesmo em um dos orbitais  $t_{2g}$  semi-preenchidos. Isso porque, em relação às regras de seleção, essa transição não é permitida por spin, devido à mudança na multiplicidade dos elétrons. Este fenômeno sugere uma relação direta das velocidades de varredura com a resposta de corrente ligada pelo equipamento. Comportamento semelhante foi observado no trabalho de (XAVIER, 2006). O processo que envolve a barreira de Franck-Condon pode ser visualizado na Figura 41.

Figura 41- Ilustração da barreira de Franck-Condon para o processo redox  $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{III}}$ .



Barreira de Franck-Condon

Fonte: A autora.

O voltamograma cíclico investigado  $+1,2$  a  $-1,2\text{ V}$ , e de onda quadrada para o complexo de  $\text{CuL}_1$  apresentou dois processos irreversíveis de redução, sendo o primeiro em  $-0,450\text{ V vs ENH}$  referente ao par

redox  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}}$  e o segundo em  $-0,966\text{ V}$  vs ENH referente ao par redox  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{I}}$ . Valores similares para os processos são reportados por (NEVES, 2001), os quais são apresentados na Tabela 6 como ( $\mathbf{1}^{\text{c}}$ ). Também foi observada uma onda anódica intensa em aproximadamente  $-0,179\text{ V}$ , no entanto, este processo ainda é desconhecido, podendo ser atribuído a formação de óxido de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  ou  $\text{Cu}^0$  na superfície do eletrodo ou ainda, a um processo de oxidação do tipo  $\text{Cu}^{\text{I}} \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}$  do segundo centro de cobre como reportado na literatura por (ADAMS *et al.*, 1996 e ZURITA *et al.*, 1996).

### 7.1.3 Titulação espectrofotométrica

Os estudos de titulação espectrofotométrica dos complexos  $\text{FeL}_1$ ,  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$  foram realizados em solução metanol/água (50:50 v/v). Os experimentos foram executados para avaliar a presença de moléculas de água coordenadas aos centros metálicos. A Tabela 9 apresenta as constantes de desprotonação para os complexos estudados.

Tabela 9- Valores de constantes de desprotonação para os complexos.

Complexo	$\text{pK}_{\text{a}1}$	$\text{pK}_{\text{a}2}$	$\text{pK}_{\text{a}3}$	$\text{pK}_{\text{a}4}$
<b>FeL<sub>1</sub></b>	3,41±0,07	4,71±0,03	6,25±0,05	7,51±0,05
<b>CoL<sub>1</sub></b>	3,03±0,05	4,96±0,03	6,47±0,05	7,25±0,02
<b>CuL<sub>1</sub></b>	-----	4,43±0,01	6,57±0,02	7,08±0,01
<b>1<sup>a</sup></b>	2,90±0,10	4,22±0,20	6,25±0,20	7,56±0,20
<b>1<sup>d</sup></b>	-----	4,81	5,93	7,60

<sup>1<sup>a</sup></sup> refere-se a  $[\text{Fe}_2^{\text{III}}(\mu\text{-OH})(\text{bbpmp})]$ ; (CAMARGO, *et al.*, 2015).

<sup>1<sup>d</sup></sup> refere-se a  $[\text{Cu}_2^{\text{II}}(\text{HL-H})(\text{m-OAc})(\text{ClO}_4)+(\mu\text{-OH})(\text{bbpmp})]$ ; (PERALTA, *et al.*, 2010).

Para os complexos  $\text{FeL}_1$  e  $\text{CoL}_1$  foram observadas quatro constantes de desprotonação, enquanto que para o complexo  $\text{CuL}_1$  foram observadas três. Os complexos estudados têm grupos acetatos como ponte, e a labilidade deste grupo aumenta com o aumento do pH, e podem ser hidrolisados gerando aquo-complexos (GAHAM, 2009; XAVIER, 2009). A coordenação de moléculas de água é observada a partir das variações dos  $\text{pK}_{\text{a}}$  para cada um dos complexos. As Figuras 42 e 43 apresenta o diagrama de espécies para os complexos  $\text{FeL}_1$  e  $\text{CoL}_1$ .

Figura 39- Diagrama de distribuição das espécies em função do pH para o complexo  $\text{FeL}_1$ .

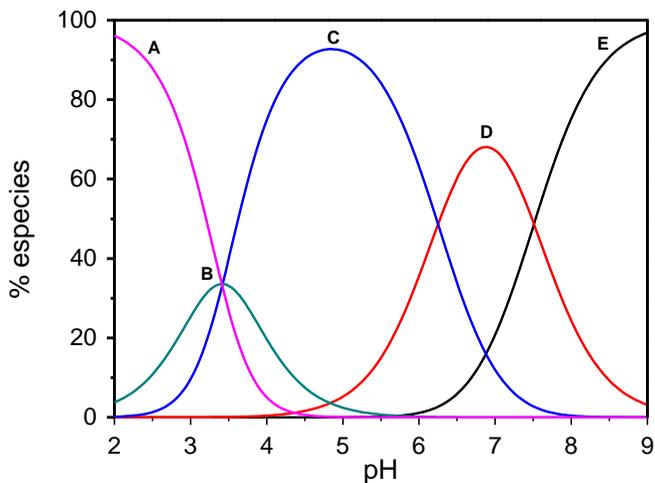
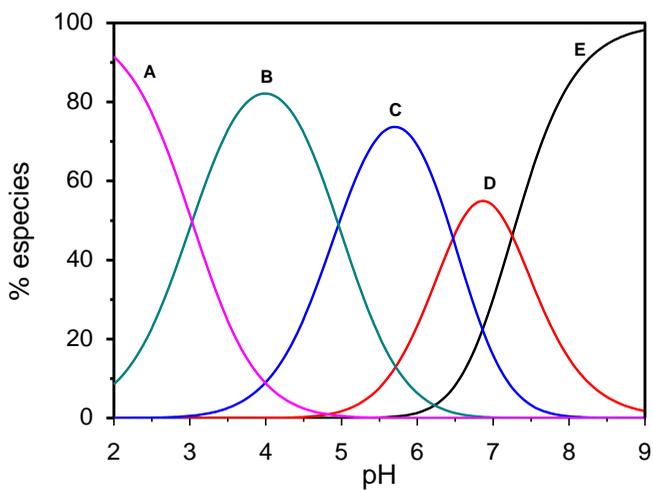


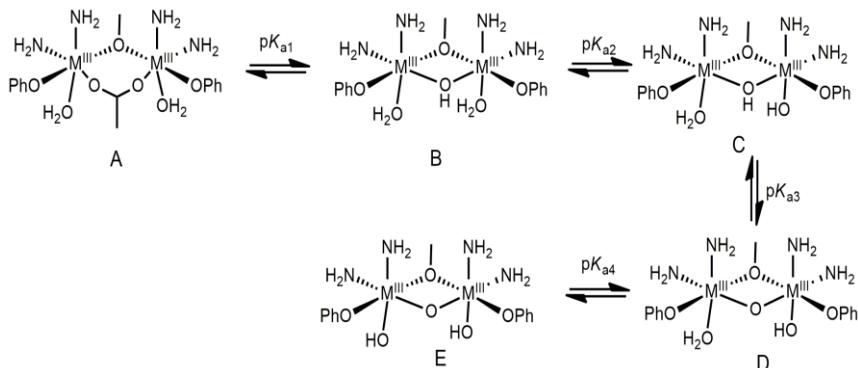
Figura 43- Diagrama de distribuição das espécies em função do pH para o complexo  $\text{CoL}_1$ .



Para os complexos  $\text{FeL}_1$  e  $\text{CoL}_1$  foram encontradas quatro constantes de desprotonação. A primeira foi atribuída à quebra da ponte ( $\mu\text{-OAc}$ ) e formação da ponte ( $\mu\text{-OH}$ ) gerando a espécie **(B)**  $[(\text{H}_2\text{O})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH}_2)^+]$  a segunda constante, é atribuída à desprotonação de uma molécula de água de um dos centros de ferro(III), formando a espécie **(C)**  $[(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH}_2)^+]$  o terceiro  $\text{p}K_a$  é atribuído à formação de uma ponte ( $\mu\text{-O}$ ) entre os centros metálicos dando origem a espécie **(D)**  $[(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-O})\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH}_2)]$ . Finalmente a quarta constante é atribuída à desprotonação de uma molécula de água do segundo centro de Fe(III) da molécula do complexo favorecendo a formação da espécie **(E)**  $[(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-O})\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH})]$ .

A sugestão da formação da ponte ( $\mu\text{-O}$ ) é condizente com a literatura (CAMARGO, *et al.*, 2015; SMITH, *et al.*, 2012; COMBA, *et al.*, 2012; WU, 1990). Os valores atribuídos à desprotonação das moléculas de água também vão de acordo com valores já reportados (SILVA, *et al.*, 2017; CAMARGO, 2015; COMBA, *et al.*, 2012). As mesmas espécies são atribuídas para o complexo de cobalto. A Figura 44 esquematiza a distribuição de espécies com a variação do pH dos complexos.

Figura 44- Proposta de equilíbrio observado para os complexos  $\text{FeL}_1$  e  $\text{CoL}_1$ , Sendo  $\text{M}=(\text{Fe}^{\text{III}}$  para  $\text{FeL}_1$  e  $\text{Co}^{\text{III}}$  para  $\text{CoL}_1$ ).



Os gráficos obtidos através da titulação espectrofotométrica dos complexos  $\text{FeL}_1$  e  $\text{CoL}_1$  são mais uma forte evidência da formação das espécies propostas, e estão apresentados nas Figuras 45 e 46 respectivamente.

Figura 40- Gráfico da titulação espectrofotométrica do complexo  $\text{FeL}_1$  em metanol/água (1:1 v/v).

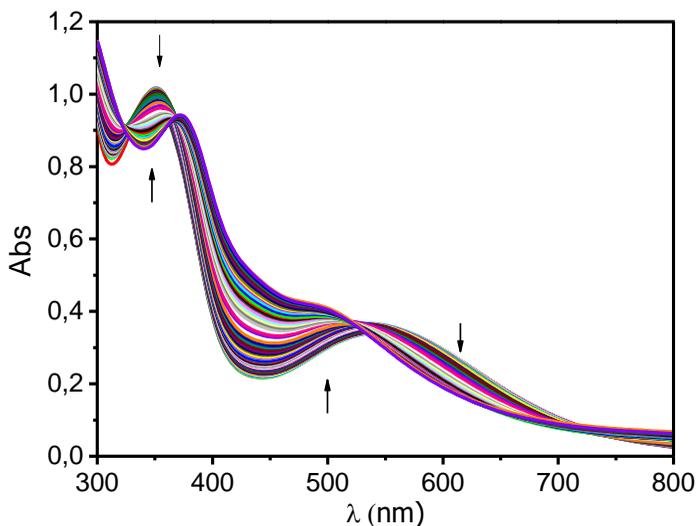
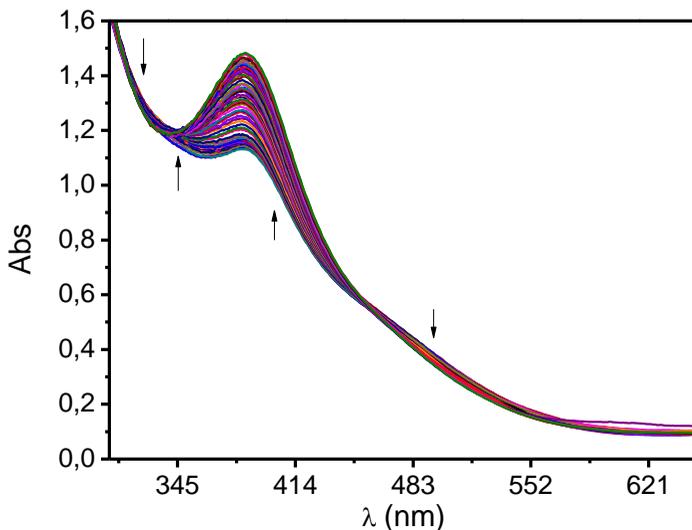


Figura 41- Gráfico da titulação espectrofotométrica do complexo  $\text{CoL}_1$  em metanol/água (1:1 v/v).

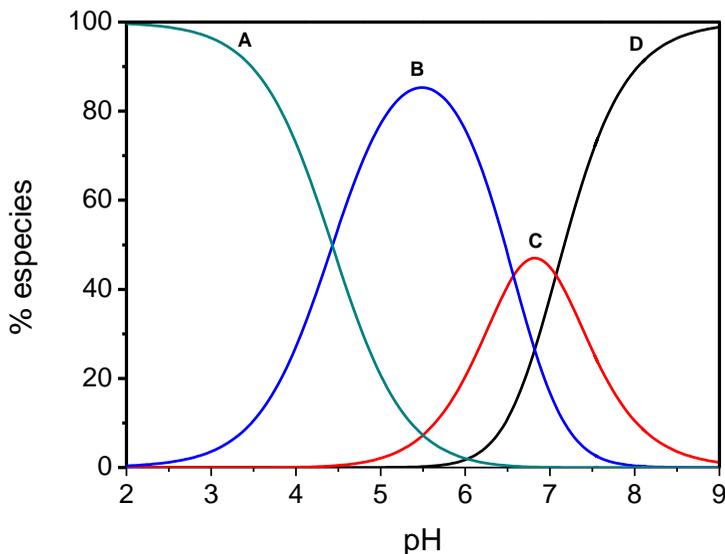


Observando os gráficos da titulação dos complexos, é possível observar que desde o início da titulação as bandas de transferência de carga dos complexos estão presentes, sendo um forte indicativo de que no início da titulação em pH de aproximadamente 2,5, os fenóis já estão desprotonados, na forma de fenolatos, isso porque os metais presentes nestes complexos possuem maior acidez de Lewis, portanto os  $pK_a$  de desprotonação dos fenóis devem ser menores do que encontrado.

Além disso, nota-se que para o complexo  $\text{FeL}_1$  o  $pK_{a1}$  é entre as espécies **A** e **C** enquanto para o complexo  $\text{CoL}_1$  o  $pK_{a1}$  é entre as espécies **A** e **B**. Dessa forma, assim que formada a ponte acetato entre o complexo de Ferro já existe uma grande quantidade da espécie ativa.

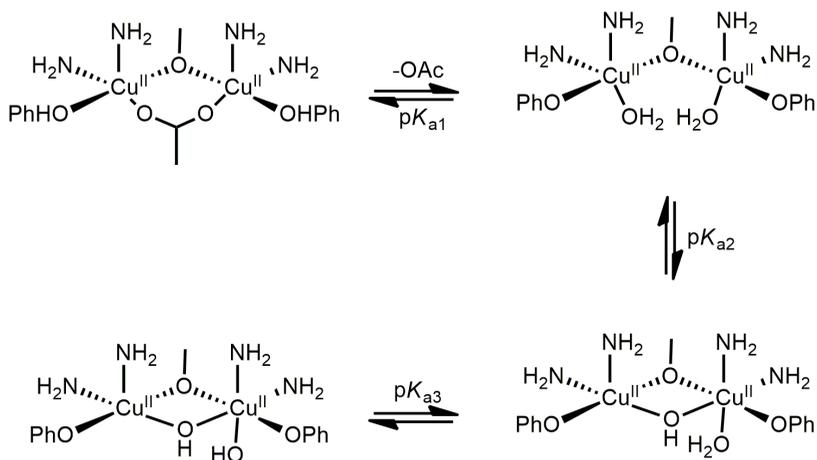
Já o complexo  $\text{CuL}_1$  apresentou três constantes de desprotonação. Na Figura 47 é apresentado o diagrama de destruição de espécies em relação a variação do pH.

Figura 42- Diagrama de distribuição das espécies em função do pH para o complexo  $\text{CuL}_1$ .



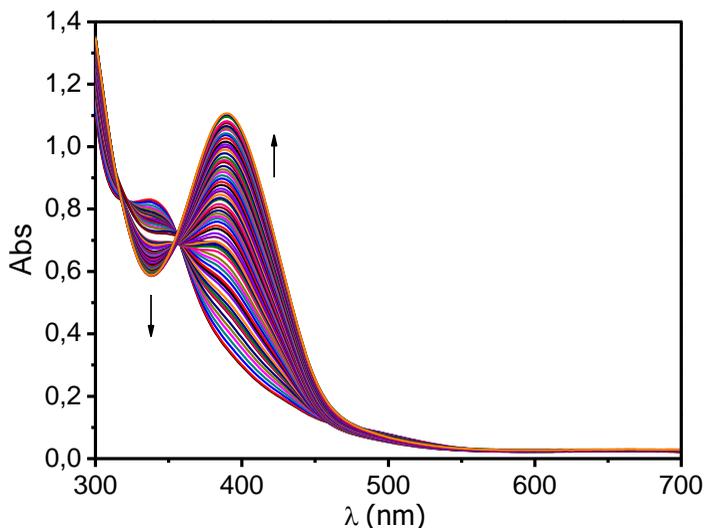
Diferente de como sugerido para os complexos anteriores, em pH's baixos acredita-se que os fenóis coordenados ao complexo estejam protonados. Portanto para o complexo  $\text{CuL}_1$  a primeira constante pode ser atribuída à quebra da ponte acetato e desprotonação dos grupos fenóis dando origem à espécie **(B)**  $[(\text{H}_2\text{O})\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OH}_2)]^{2+}$ . A segunda constante de desprotonação é atribuída à formação de uma ponte hidróxido entre os centros metálicos de cobre(II), formando a espécie **(C)**  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OH}_2)]$ . Finalmente a terceira constante é atribuída à desprotonação de uma molécula de água presente em um dos centros do metal formando a espécie **(D)**  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OH})]$ , espécie ativa. Os valores encontrados estão de acordo com os observados na literatura por (PERALTA, 2010). A partir dessas informações foi proposto o seguinte equilíbrio para o complexo o qual é apresentado na Figura 48.

Figura 48- Proposta de equilíbrio observado para o complexo  $\text{CuL}_1$ .



As informações podem ser obtidas através do gráfico pela resultante da titulação espectrofotométrica do complexo  $\text{CuL}_1$ , o que fortalece as propostas feitas para as espécies e é apresentado na Figura 49.

Figura 49 - Gráfico da titulação espectrofotométrica do complexo  $\text{CuL}_1$  em metanol/água (1:1 v/v).



A partir do gráfico proveniente da titulação espectrofotométrica, é possível observar a mudança nas bandas em função da variação do pH. Nota-se que no início da titulação existe a presença de fenol na forma protonada, com a adição de base ocorre a modificação da banda indicando que o primeiro  $pK_a$  é proveniente da desprotonação do fenol, fortalecendo a proposta de equilíbrio do complexo  $\text{CuL}_1$ .

## 7.2 REATIVIDADE

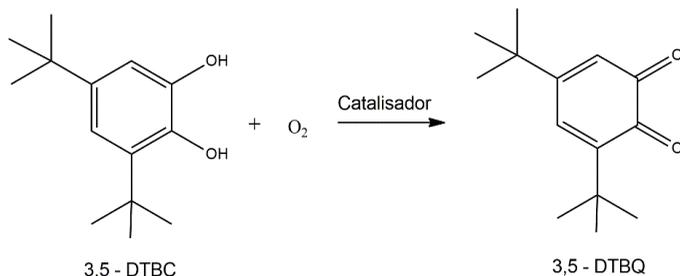
### 7.2.1 Reatividade dos complexos frente ao substrato 3,5-DTBC

Um dos princípios no desenvolvimento de biomiméticos é a síntese de moléculas que apresentem atividade catalítica semelhante à das enzimas. Neste trabalho, foram desenvolvidos complexos com o ligante  $L_1$ , com centros metálico de ferro(III), cobalto(III) e cobre(II) com a finalidade de observar a influência do metal na catálise de reações de oxidação.

A escolha do substrato modelo para a reação de oxidação foi realizada por este apresentar características como: baixo potencial redox, que facilita a formação da 3,5-di-*terc*-butilquinona (3,5 DTBQ), assim

como substituintes volumosos que causam impedimento estérico, garantindo que não ocorram reações de paralelas, como de polimerização, por exemplo (MAGHERUSAN *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2016; CASTRO *et al.*, 2016; DEY *et al.*, 2016). A Figura 50 mostra a reação de oxidação do catecol para quinona na presença de catalisador.

Figura 50- Reação de oxidação do 3,5 DTBC para 3,5 DTBQ.



Fonte: A autora

### 5.3.1.1 Efeito do pH para reação de oxidação do 3,5-DTBC

O estudo do pH ótimo para a reação de oxidação é feito pela observação da variação de  $v_0$  em relação ao pH, sendo possível determinar o  $pK_a$  cinético relacionando as moléculas de água coordenadas aos centros metálicos. Estes valores podem ainda ser comparados com os valores obtidos na titulação espectrofotométrica. No entanto, tem sido atribuído esse  $pK_a$  à desprotonação do próprio catecol e sua coordenação em ponte com o metal, podendo mascarar o  $pK_a$  cinético do complexo relacionado às moléculas de água coordenadas (CHAVES, 2015; CAMARGO, *et al.*, 2015). Além disso, uma informação muito importante fornecida a partir do gráfico é o pH ótimo para que a reação de oxidação ocorra. A faixa de pH analisada foi de 5,5 até 10,0 na qual foram observadas regiões em que a velocidade de reação é independente do pH. As Figuras 51, 52 e 53 apresentam os gráficos obtidos a partir dos valores de  $v_0$  em função pH para os complexos de  $FeL_1$ ,  $CoL_1$  e  $CuL_1$ .

Figura 43 - Dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5 DTBC com o pH para o complexo  $\text{FeL}_1$ . Condições:  $[\text{Complexo}] = 3,02 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[\text{3,5-DTBC}] = 2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[\text{Tampões}] = 3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; Solução MeOH/H<sub>2</sub>O (32:1 v/v) a 25 °C.

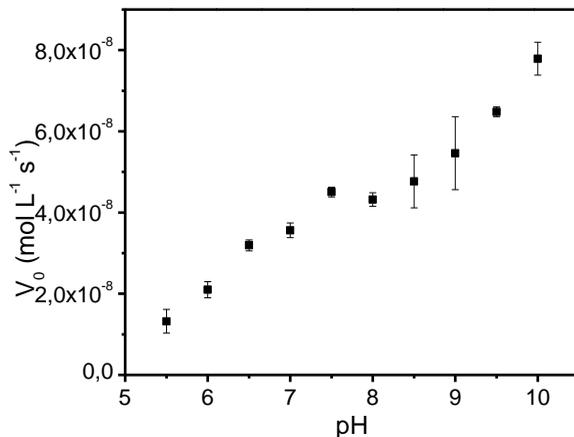


Figura 44- Dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5 DTBC com o pH para o complexo  $\text{CoL}_1$ . Condições:  $[\text{Complexo}] = 2,86 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[\text{3,5-DTBC}] = 2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[\text{Tampões}] = 3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; Solução MeOH/H<sub>2</sub>O (32:1 v/v) a 25 °C

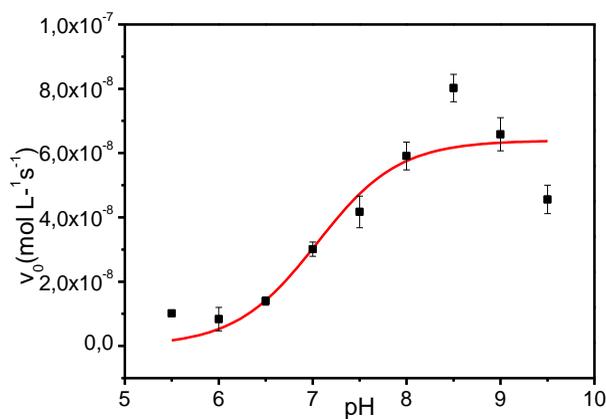
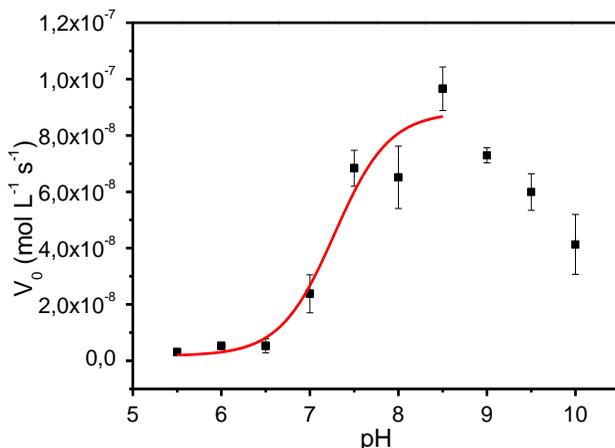


Figura 45- Dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5 DTBC com o pH para o complexo  $\text{CuL}_1$ . Condições:  $[\text{Complexo}] = 2,74 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[\text{3,5-DTBC}] = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[\text{Tampões}] = 3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; Solução MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (32:1v/v) a 25 °C.



A partir do estudo de efeito do pH, obtiveram-se os valores de pH ótimo para os complexos. Para os complexos  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$ , esse valor foi de pH 8,5 enquanto que para o complexo  $\text{FeL}_1$  observou-se um aumento da velocidade com o aumento do pH em toda a faixa analisada, não sendo estabelecido um pH ótimo. Aparentemente existe um  $\text{p}K_a$  cinético na região mais ácida, podendo indicar uma espécie ativa, no entanto, não tanto quanto a espécie (E) já apresentada na Figura 45. Para a comparação com valores da literatura para complexos semelhantes, utilizou-se o pH 9,0 para a cinética (CAMARGO, *et al.*, 2015).

Um comportamento atípico foi observado na catálise de oxidação em função do pH dos complexos  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$ , nos quais houve a diminuição da velocidade inicial com o aumento do pH após pH 8,5. Acredita-se que com o aumento do pH pode ocorrer a desprotonação de algum grupo existente nos complexos que façam que ele perca a sua atividade. Comportamento semelhante em relação ao perfil do gráfico de efeito de pH foi observado por Oliveira para complexos binucleares de cobre(II) (OLIVEIRA, 2013). No entanto, não é possível fazer qualquer afirmação a cerca deste fato. A Tabela 10 relaciona os valores de  $\text{p}K_a$  cinético e espectrofotométrico.

Tabela 10- Valores encontrados para “pH ótimo” dos complexos e a correlação entre  $pK_a$  cinéticos e  $pK_a$  espectrofotométricos na qual as constantes refletem a coordenação da molécula de água aos centros metálicos.

Complexo	pH	$pK_a$	$pK_a$
	Ótimo	Cinético	Espectrofotométrico
FeL1	$\geq 8,5$	-----	$7,51 \pm 0,05$
CoL1	$\approx 8,5$	7,04	$7,25 \pm 0,02$
CuL1	$\approx 8,5$	7,27	$7,08 \pm 0,01$

Como já mencionado, o  $pK_a$  cinético dos complexos está relacionado com  $pK_a$  do próprio substrato catecol, mascarando o  $pK_a$  referente a desprotonação de uma das moléculas de água coordenadas aos centros de cobalto(III) e cobre(II). No entanto, acredita-se que em pH mais elevados ocorra a desprotonação de uma molécula de água coordenada aos centros metálicos, a qual deve gerar a espécie cataliticamente ativa, para a reação de oxidação do 3,5-DTBC devido aos dados obtidos pela titulação espectrofotométrica. Complexos semelhantes descritos na literatura, também reforçam essa proposta. (CAMARGO *et al.*, 2015; OSÓRIO, *et al.*, 2015; PERALTA, *et al.*, 2010 ).

### 5.3.1.2 Efeito da concentração do substrato na reação de oxidação do 3,5-DTBC

A avaliação do efeito da concentração do substrato 3,5-DTBC sobre a velocidade de oxidação promovida pelos complexos FeL<sub>1</sub>, CoL<sub>1</sub> e CuL<sub>1</sub> foi investigada para o complexo FeL<sub>1</sub> em pH 9,0 e 8,5 e para os complexos CoL<sub>1</sub> e CuL<sub>1</sub>, estes valores estão próximos dos pH ótimos, como já descritos na seção anterior.

Nesse experimento é possível observar que com o aumento da concentração do substrato modelo, a relação entre  $v_0$  e concentração de 3,5-DTBC tende a uma curva de saturação. Esta dependência foi observada para os três sistemas, sugerindo que a catálise ocorre com a formação de um intermediário complexo-substrato para todos os casos. Desta forma, o modelo de Michaelis-Menten pode ser aplicado para os três sistemas. As figuras 54, 55 e 56 apresentam os gráficos de dependência da velocidade inicial ( $v_0$ ) em relação à concentração do substrato modelo para os complexos FeL<sub>1</sub>, CoL<sub>1</sub> e CuL<sub>1</sub>.

Figura 46-Dependência da velocidade do 3,5-DTBC com a concentração do substrato para o complexo  $\text{FeL}_1$ . Condições  $[\text{C}] = 1,51 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[\text{3,5 DTBC}] = (3,03 \times 10^{-4} \text{ a } 3,63 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})$ ;  $[\text{tampão}] = 3,03 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ; (TRIS, pH 9,0) em solução MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (32:1 v/v) a 25 °C.

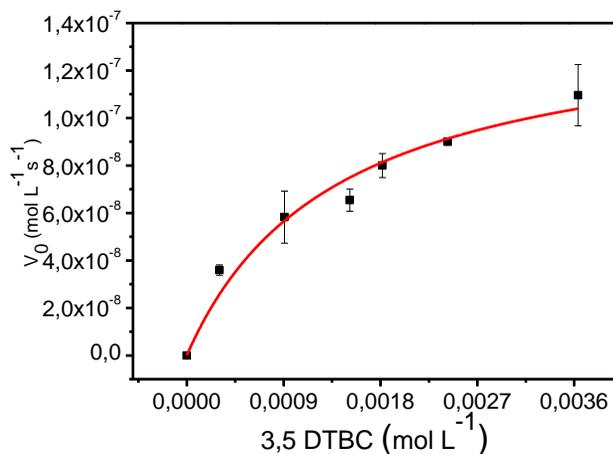


Figura 47- Dependência da velocidade do 3,5-DTBC com a concentração do substrato para o complexo  $\text{CoL}_1$ . Condições  $[\text{C}] = 2,87 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[\text{3,5 DTBC}] = (1,2 \times 10^{-3} \text{ a } 7,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})$ ;  $[\text{tampão}] = 3,03 \times 10^{-2}$ ; (TRIS, pH 8,5) em solução MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (32:1 V/V) a 25 °C.

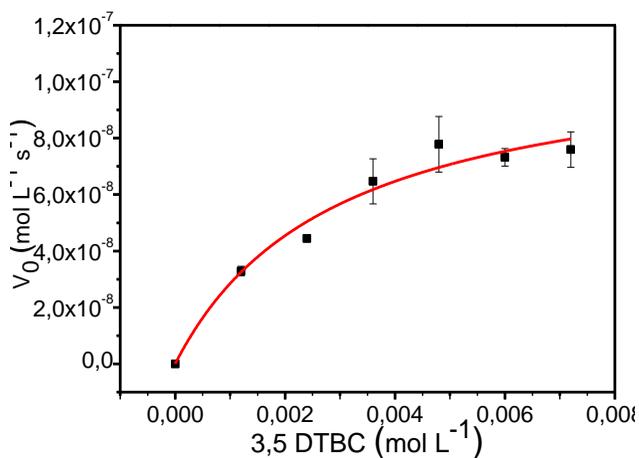
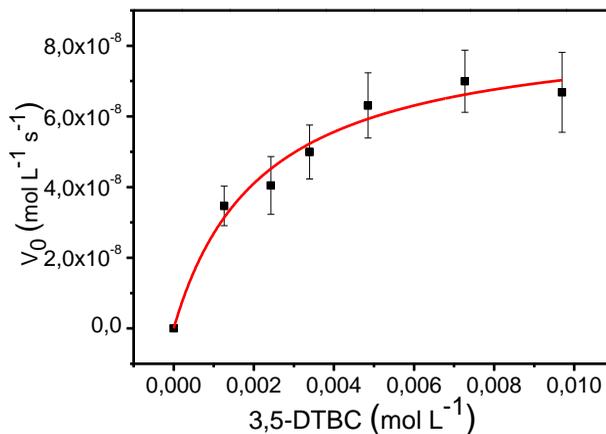


Figura 48 - Dependência da velocidade do 3,5-DTBC com a concentração do substrato para o complexo  $\text{CuL}_1$ . Condições  $[\text{C}]=2,74 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[\text{3,5 DTBC}] = (3,64 \times 10^{-4} \text{ à } 4,24 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})$ ;  $[\text{tampão}] = 3,03 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ; (TRIS, pH 8,5) em solução MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (32:1v/v) a 25 °C.



A Tabela 11 apresenta os parâmetros cinéticos para os complexos modelos, e compara com complexos da literatura.

Tabela 11-Parâmetros cinéticos dos complexos  $\text{FeL}_1$ ,  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$  e a comparação com a literatura.

Complexo	$v_{\text{máx}} \times 10^{-8}$ ( $\text{mol L s}^{-1}$ )	$K_{\text{M}} \times 10^{-3}$ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}} \times 10^{-3}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{\text{ass}} \times 10^{-3}$ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ( $\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
$\text{FeL}_1$	$14,37 \pm 1,87$	$1,39 \pm 0,47$	$9,52 \pm 0,84$	71,90	$6,84 \pm 3,56$
$\text{CoL}_1$	$12,30 \pm 1,39$	$2,94 \pm 0,91$	$4,28 \pm 0,88$	34,00	$1,45 \pm 0,79$
$\text{CuL}_1$	$8,65 \pm 0,67$	$2,21 \pm 0,29$	$3,15 \pm 0,51$	45,20	$1,43 \pm 0,44$
<b>1<sup>a</sup></b>	----	7,30	9,54	13,60	1,30
<b>1<sup>b</sup></b>	----	8,70	21,0	11,50	2,41
<b>1<sup>c</sup></b>	----	0,840	5,70	119,00	6,78

<sup>1<sup>a</sup></sup> refere-se a  $[\text{Fe}_2^{\text{III}}(\mu\text{-OH})(\text{bbppm})]$ ; (CAMARGO, *et al.*, 2015).

<sup>1<sup>b</sup></sup> refere-se a  $[(\text{Co}^{\text{III}}_2(\text{H}_2\text{L})_2(\text{OAc})_2)]\text{CH}_3\text{OH}$  (Dey&Mukherjee, *et al.*, 2014).

<sup>1<sup>c</sup></sup> refere-se a  $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{bbppnol})(\mu\text{-OAc})(\mu\text{-ClO}_4)]^+$  (NEVES, *et al.*, 2001).

A partir dos valores obtidos nos estudos cinéticos, observou-se que o complexo  $\text{FeL}_1$ , apresentou o maior  $K_{\text{ass}}$  em relação aos complexos estudados neste trabalho, significando que a ligação do complexo com substrato é favorecida. Também, nota-se que a constante catalítica

$k_{\text{cat}}$  é consideravelmente superior aos complexos de  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$ , além de apresentar uma boa eficiência catalítica.

Vários trabalhos foram reportados na literatura, realizando estudos de catálise oxidativa utilizando o cobre(II) como centro metálico, por esse metal apresentar resultados satisfatórios relacionados à eficiência catalítica (MAGHERUSAN *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2016; DEY *et al.*, 2016). No entanto, complexos de ferro(III) já vem apresentando resultados razoáveis para catálises de oxidação, como apresentados por Camargo, *et al.*, 2015 em que, assim com neste trabalho, o complexo de ferro(III) mostra-se promissor (CAMARGO, *et al.*, 2015).

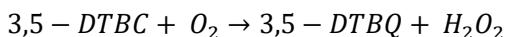
Em contrapartida, o complexo  $\text{CoL}_1$ , apresentou valores inferior em relação a  $K_{\text{ass}}$  entre os complexos estudados, indicando que sua associação com o substrato não é tão favorável. A constante catalítica,  $k_{\text{cat}}$ , é a segunda entre os complexos. Poucos trabalhos foram publicados utilizando centros binucleares de cobalto como catalisadores de reações de oxidação, no entanto Dey & Mukherjee, 2014 apresentam um complexo  $[(\text{Co}^{\text{III}})_2(\text{H}_2\text{L})_2(\text{OAc})_2]\text{CH}_3\text{OH}$ , o qual mostra eficiência catalítica de 2,41, sendo uma das maiores eficiências relatadas para complexos com centros binucleares de cobalto. (DEY & MUKHERJEE, 2014). Portanto, comparando o  $\text{CoL}_1$  aos já publicados, esse complexo apresentou uma eficiência catalítica considerável para centros binucleares contendo cobalto.

As constantes obtidas para o complexo  $\text{CuL}_1$ , o qual apresenta centros metálicos de cobre(II), apresentou a segunda melhor  $K_{\text{ass}}$  entre os complexos estudados, porém um menor  $k_{\text{cat}}$ , além disso os valores da eficiência catalítica assemelham-se com o complexo  $\text{CoL}_1$ . Acredita-se que essa semelhança se deve as proximidades em suas propriedades químicas. Neves e colaboradores (2001), publicaram um complexo com centro binuclear de cobre(II)  $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{BBPPNOL})(\mu\text{-OAc})(\mu\text{-ClO}_4)]^+$ , com um ligante simétrico contendo grupos fenolatos em suas extremidades. Para esse complexo, obtiveram um  $K_{\text{ass}}$  de 1190 e eficiência catalítica de 6,78, valores superiores aos encontrados neste trabalho (NEVES, *et al.*, 2001).

A constante cinética ( $k_{\text{cat}}$ ) está diretamente relacionada com os potenciais redox, onde foi observada uma facilidade de redução para metais com maior acidez de Lewis, seguindo a ordem decrescente  $\text{FeL}_1 > \text{CoL}_1 > \text{CuL}_1$ . Seguindo essa mesma ordem, foi observado que na cinética, metais mais duros obtiveram maiores  $k_{\text{cat}}$ , os quais favorecem a reação catalítica.

### 7.2.2 Proposta mecanística para reação de oxidação do 3,5-DTBC

Com a finalidade de esclarecer o mecanismo desempenhado pelos complexos na oxidação do substrato 3,5-DTBC, foi realizado um teste de detecção de peróxido de hidrogênio, por meio de modificação do método de iodometria (CAMARGO, *et al.*, 2015). Para tanto, foi avaliada a formação de peróxido durante a reação de oxidação do 3,5-DTBC catalisadas pelos complexos  $\text{FeL}_1$ ,  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$ , nas mesmas condições cinéticas em pH “ótimo”. O teste mostrou-se positivo para a presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo confirmado pela reação com iodeto gerando  $\text{I}_3^-$ , de forma que a oxidação dos complexos ocorra de acordo com a seguinte estequiometria:



Outro experimento realizado para o esclarecimento do mecanismo da reação de oxidação do 3,5-DTBC foi o acompanhamento da reação na ausência de oxigênio. Neste experimento realizou-se uma reação, nas mesmas condições cinéticas em pH ótimo, sem a presença de oxigênio durante 20 minutos, no qual foi observado uma absorvância reduzida. Passado este intervalo, foi aplicado oxigênio na amostra, na qual se verificou o aumento imediato da absorvância, indicando a formação da 3,5-DTBQ. A partir desse resultado pode-se afirmar que a presença do oxigênio é fundamental na reoxidação dos centros metálicos dos complexos  $\text{FeL}_1$ ,  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$ .

Com base em todos os resultados obtidos para os complexos estudados é proposto que para  $\text{pH} \geq 8,5$  o hidróxido ligado ao centro metálico ajude a desprotonar o substrato, formando o aduto enzima-substrato. A reação se dá pela redução dos centros metálicos e oxidação do catecol para a formação da quinona. Em seguida, o oxigênio molecular é coordenado, formando um estado intermediário, e os centros metálicos se reoxidam e geram peróxido de hidrogênio, completando dessa maneira, o ciclo catalítico. As Figuras 57, 58 representam uma proposta mecanística para a oxidação do substrato modelo 3,5-DTBC com os complexos  $\text{FeL}_1$ ,  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$  como catalisadores da reação.

Figura 49- Proposta de mecanismo para a oxidação do 3,5-DTBC utilizando complexo  $FeL_1$  e  $CoL_1$ , sendo  $M^{III}M^{III}$ :  $Fe^{III}Fe^{III}$ ,  $Co^{III}Co^{III}$  e  $M^{II}M^{II}$ :  $Fe^{II}Fe^{II}$ ,  $Co^{II}Co^{II}$ .

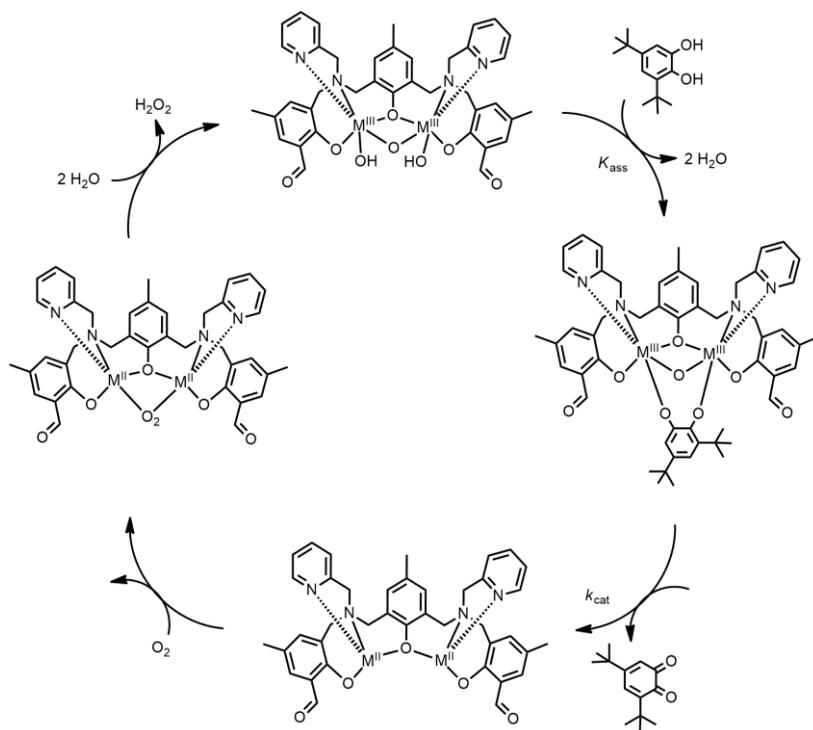
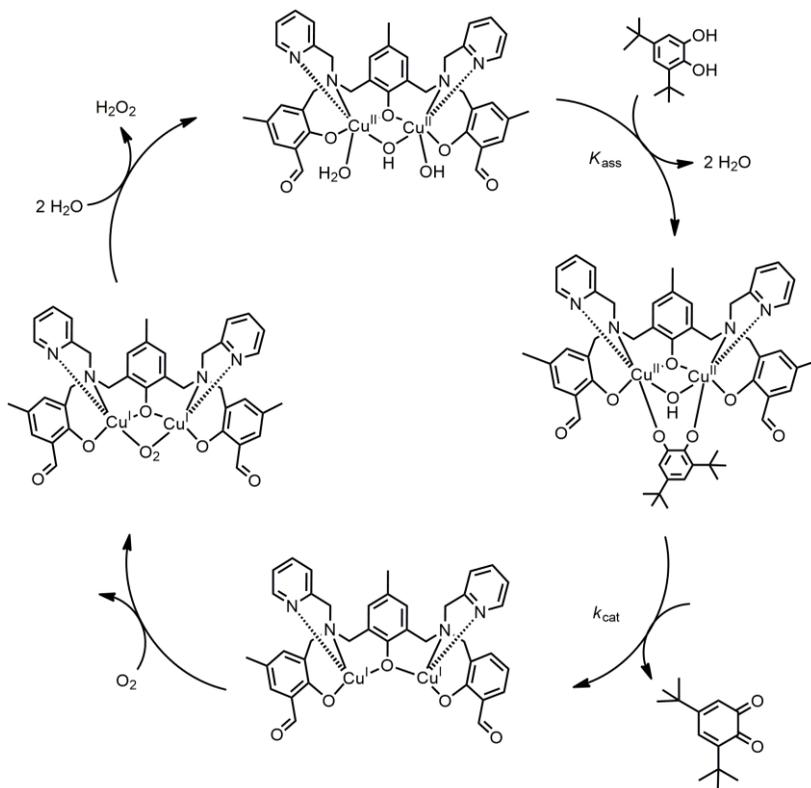


Figura 58- Mecanismo proposto para oxidação do 3,5-DTBC com o complexo CuL<sub>1</sub> como catalisador.

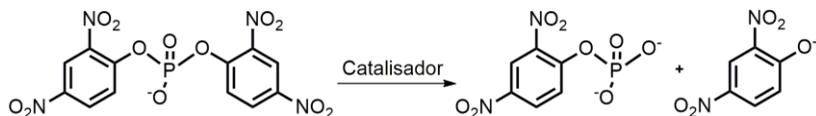


Mecanismos semelhantes já foram publicados na literatura, para complexos contendo os metais tratados nesse trabalho (OLIVEIRA, *et al.*, 2016; CAMARGO, *et al.*, 2015; PERALTA, *et al.*, 2010; SMITH, *et al.*, 2008).

### 7.2.3 Reatividade do complexo FeL<sub>1</sub> frente ao substrato 2,4-BDNPP – Estudo da promiscuidade catalítica

Foram realizados experimentos cinéticos com o objetivo de investigar a capacidade dos complexos em catalisar a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP. A reação de liberação do íon 2,4-dinitrofenolato (2,4-DNP) é apresentada na Figura 59.

Figura 59 - Reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP.



Fonte: A autora.

Os estudos iniciais frente ao substrato 2,4-BDNPP foram realizados para os três complexos, porém apenas o complexo  $\text{FeL}_1$  foi ativo na catálise da reação de hidrólise desse substrato, portanto os resultados aqui apresentados são referentes a este complexo.

Para que complexos possam ser considerados eficientes como hidrolases sintéticas esses devem possuir as seguintes características: ser capazes de fornecer dois sítios lábeis *cis*-orientados para coordenar o ataque intramolecular, reduzir o  $\text{p}K_a$  da molécula de água em orientação a um sítio metálico (ácido de Lewis) e assim fornecer um nucleófilo (íon hidróxido) ligado ao metal em pH próximo ao neutro, ativar o substrato frente ao ataque nucleofílico e ou estabilizar o estado de transição e liberar os produtos a uma velocidade razoável (HENDRY, *et al.*, 1989; HENDRY, *et al.*, 1990).

Dessa forma, acredita-se que o complexo estudado, apresente as características necessárias para que seja considerada uma hidrolase sintética eficiente. O complexo apresenta ponte  $\mu\text{-OAc}$ , a qual pode ser hidrolisadas facilmente. As moléculas de água encontram-se em posição adequada para atuarem tanto como nucleófilos, quanto para sua atuação como grupos de saída, onde o substrato pode ligar-se a molécula de forma efetiva. Essas informações podem ser sustentadas através os  $\text{p}K_a$  fornecidos pela titulação espectrofotométrica.

### 5.3.2.1 Efeito do pH para reação de hidrólise do 2,4-BDNPP

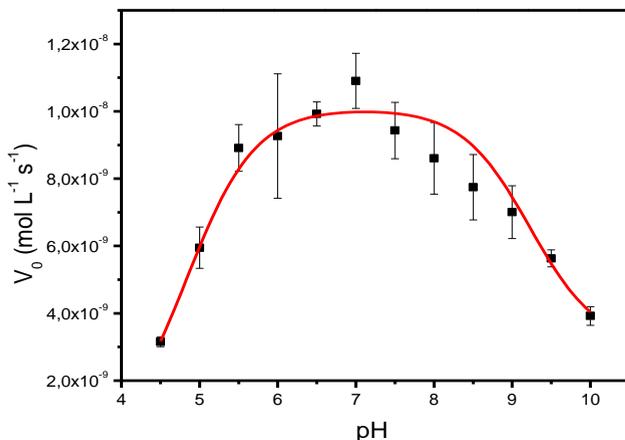
O estudo do efeito do pH para a reação de hidrólise foi realizado a partir da determinação de  $v_0$  com a variação do pH. Essa análise teve como intuito analisar a influência do pH na reação e por sua vez determinar o pH ótimo para prosseguir com os demais testes. Como consequência, foi possível determinar o  $pK_a$  cinético das moléculas de água coordenadas aos centros metálicos e comparar com os já encontrado pela técnica de titulação espectrofotométrica.

A reação de hidrólise mostrou grande influência pelo pH, na qual foi investigada em uma faixa entre 4,5 e 10 para o complexo  $FeL_1$ . O gráfico de efeito de pH apresentou uma curva no formato de “sino” e está representado na Figura 60. O ajuste teórico da curva foi feita segundo a equação descrita por Smith e colaboradores e está representada na Equação 4 e o gráfico de efeito de pH está apresentado na Figura 62 (SMITH *et al.*, 2012).

$$V = V_0 \frac{1 + \frac{\gamma K_{a2}}{[H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} + \frac{K_{a2}}{[H^+]}} \quad (4)$$

Nesta equação  $V_0$  é a taxa inicial e  $V$  é a variação máxima a qual é atingida em determinadas condições. O fator  $\gamma$  está relacionado à atividade catalítica relativa das espécies ativas na equação. Neste caso, atribuiu-se para  $\gamma$  atribui-se um valor fixo de ( $\gamma = 0,3$ ).

Figura 50- Dependência da velocidade de reação de oxidação do 2,4-BDNPP com o pH para o complexo  $\text{FeL}_1$ . Condições:  $[\text{Complexo}] = 3,02 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[2,4 \text{ BDNPP}] = 2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[\text{Tampões}] = 3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; Solução  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, v/v) a 25 °C.



A Figura 60 apresenta o comportamento do complexo com a variação do pH e juntamente com os resultados propostos nos estudos espectrofométricos é proposto que a espécie ativa, em solução, no pH 7,0 seja formada por uma molécula de água ligada a um dos centros de Fe(III), enquanto o segundo centro de Fe(III) esteja ligado por um íon hidróxido, estando presente a seguinte espécie  $[(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-O})\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH}_2)]$ . Em pH ácido, a velocidade inicial da reação é mínima, devido a coordenação de uma molécula de água em cada um dos centros de Fe(III), logo a reação de hidrólise não é tão favorecida, pois a água não é um bom nucleófilo. Nesse pH temos a presença da seguinte espécie  $[(\text{H}_2\text{O})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH}_2)]^+$ . Em pH acima de 7,0 é observada novamente a diminuição da velocidade de reação, isso porque em valores de pH mais básico, ocorre a desprotonação das moléculas de água coordenadas aos centros metálicos, não tendo mais um bom grupo de saída para que a reação de hidrólise seja favorecida, a espécie majoritária neste pH é a seguinte  $[(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-O})\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH})]$ .

O gráfico de efeito de pH está de acordo com os resultados já observados anteriormente na titulação espectrofotométrica, onde é observado que a partir do pH 5,0 tem-se um aumento da atividade do complexo, nessa região está presente aproximadamente 95 % da espécie

ativa, em pH 7,0 ainda existe aproximadamente 70 % da espécie ativa, indicando uma grande faixa de atividade desse complexo. Também foram observados dois pontos de inflexão, que são devido ao perfil de “sinó” da curva, com esses pontos foram obtidos dois  $pK_a$  cinéticos, os quais podem ser correlacionados com as constantes de protonação determinadas espectrofotometricamente para as moléculas de água ligadas aos centros metálicos. A comparação dos valores é apresentada na Tabela 12.

Tabela 12- Valores encontrados para “pH ótimo” do complexo  $FeL_1$  e a correlação entre  $pK_a$  cinéticos e  $pK_a$  espectrofotométrico no qual as constantes refletem a coordenação da molécula de água aos centros metálicos.

Complexo	pH	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$
	“ótimo”	Cinéticos		Espectrofotométrico	
<b><math>FeL_1</math></b>	7,0	4,84	9,22	$4,71 \pm 0,03$	$7,51 \pm 0,05$

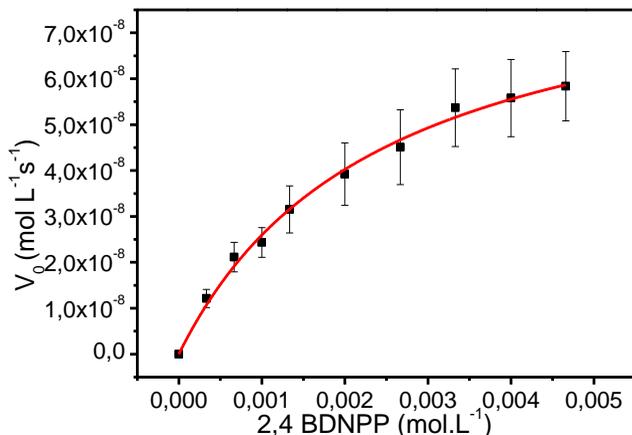
Comparando os valores de  $pK_a$  obtidos por ambas as técnicas, apresentadas é possível observar uma boa concordância entre os primeiros  $pK_a$ , no entanto para o segundo  $pK_a$  cinético e espectrofotométrico, essas variações podem estar relacionadas ao meio em que as análises foram realizadas, no entanto, para uma precisão maior seriam necessárias as análises dos  $pK_a$  pela titulação potenciométrica.

### 5.3.2.2 Estudo da concentração do substrato 2,4-BDNPP

O efeito da concentração do substrato 2,4-BDNPP em relação à velocidade de reação da hidrólise, promovida pelo complexo  $FeL_1$  foi realizada em pH 7,0 o qual está em torno do pH “ótimo” descrito na seção anterior.

Nesse experimento foi possível observar a dependência linear da velocidade inicial com baixas concentrações de substrato, e com o aumento da concentração de 2,4-BDNPP, observando-se um perfil de saturação, de Michaelis-Mentem. Esta dependência entre  $v_0$  e  $[S]$  sugere que a reação de hidrólise ocorre com a formação de um intermediário complexo-substrato. A Figura 61 apresenta a dependência da velocidade da reação de hidrólise em função da variação da concentração de substrato 2,4-BDNPP catalisada pelo complexo  $FeL_1$ .

Figura 51- Dependência da velocidade 2,4-BDNPP com a concentração do substrato para o complexo FeL<sub>1</sub>. Condições [Complexo]= $1,21 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>; [2,4- BDNPP]=( $3,33 \times 10^{-4}$  à  $4,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>); [Tampões]= $5,0 \times 10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>; Solução CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v) a 25 °C.



A partir do ajuste da equação não linearizada de Michaelis-Mentem, foram obtidos os dados iniciais para que os cálculos dos parâmetros cinéticos do complexo pudessem ser calculados. Os parâmetros cinéticos entram-se dipostos na Tabela 13.

Tabela 13-Parâmetros cinéticos obtidos calculados para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisadas pelo complexo FeL<sub>1</sub>.

Complexo	v <sub>máx</sub> x10 <sup>-8</sup> (mol L <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> x10 <sup>-3</sup> (mol L <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> x10 <sup>-3</sup> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>ass</sub> x10 <sup>-3</sup> (mol <sup>1</sup> L)	E=k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> (mol L s <sup>1</sup> )
FeL <sub>1</sub>	1,39±0,88	2,29±0,29	1,15±0,22	43,6	0,506±0,16
<b>1<sup>a</sup></b>	-----	7,20±0,11	1,21±0,12	13,8	0,170±0,68
<b>1<sup>e</sup></b>	-----	4,63	1,88	21,6	0,424

**1<sup>a</sup>** refere-se a [Fe<sub>2</sub><sup>III</sup>(μ-OH)(bbpmp)]; (CAMARGO, 2015).

**1<sup>e</sup>** refere-se a [Fe<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup>(μ-OAc)<sub>2</sub>(BF<sub>4</sub>).H<sub>2</sub>O]; (SMITH, *et al.*, 2012).

Os parâmetros cinéticos do complexo FeL<sub>1</sub> foram comparados com o complexo **1<sup>a</sup>** e **1<sup>e</sup>**, reportados na literatura (CAMARGO *et al.*, 2015; SMITH *et al.*, 2012) respectivamente. O complexo **1<sup>a</sup>** é composto por um ligante simétrico denominado (H<sub>2</sub>BBPMP), composto por um lado macio proveniente de piridinas e um lado duro atribuído a presença

de dois fenóis. Já o complexo **2**, é composto por um ligante assimétrico designado ( $H_2BPBPMP$ ) o qual apresenta átomos doadores macios compostos por piridinas e um átomo doador duro proveniente de um grupo fenol.

Os três complexos apresentam  $k_{cat}$  próximos, sendo isso um reflexo das proximidades dos  $pK_a$  encontrados referentes à desprotonação da água ligada a um dos centros de ferro(III), gerando a espécie ativa para a reação de hidrólise. Peralta e colaboradores mencionam, que se a força do nucleófilo é similar, então se espera que as atividades catalíticas dos complexos sejam semelhantes (PERALTA, *et al.*, 2010).

De acordo com os valores dispostos na Tabela 12, o complexo  $FeL_1$  apresenta um menor  $K_M$  comparado aos complexos **1<sup>a</sup>** e **1<sup>e</sup>** indicando uma boa associação entre substrato e complexo. O complexo  $FeL_1$ , destaca-se na eficiência catalítica, sendo 4,72 e 1,19 vezes mais eficiente que o complexos **1<sup>a</sup>** e **1<sup>e</sup>** respectivamente. Logo, a presença dos grupos metila e aldeído no ligante de certa forma influenciam positivamente na ligação do substrato com o complexo, tornando a suscetibilidade de ligação mais efetiva.

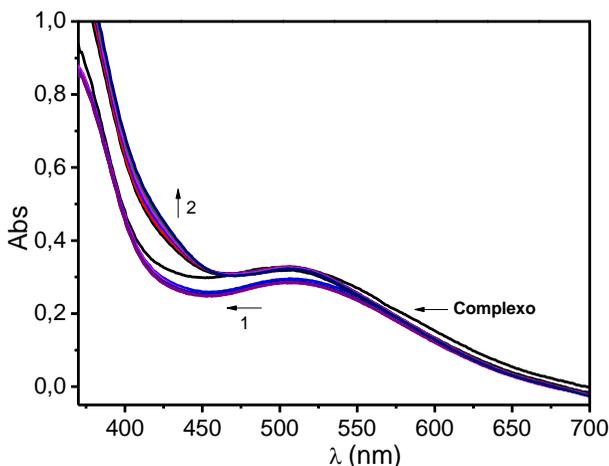
Também, é possível levar em consideração a influência da ponte gerada. Neste trabalho, foi proposta a partir dos  $pK_a$  obtidos, a formação de uma ponte ( $\mu-O$ ) que está presente na espécie ativa, a qual pode influenciar como um facilitador na saída da uma molécula de água, quando o substrato liga-se ao complexo. Assim, os valores encontrados em relação à eficiência catalítica nada mais são do que uma resultante dos valores de  $K_M$ .

#### 7.2.4 Proposta mecanística para hidrólise do 2,4-BDNPP

Para avaliar a atividade de monoesterase, ou seja, se um ou dois grupos 2,4-dinitrofenolato do substrato foram hidrolisados, realizou-se uma reação estequiométrica entre o complexo  $FeL_1$  e o substrato 2,4-BDNPP ambos a uma concentração de ( $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), no qual foi observado durante o período de 55 h a  $50^\circ\text{C}$  que duas moléculas foram liberadas, indicando inicialmente que o complexo pode atuar como fosfodiesterase e monoesterase. Desse modo, para confirmar esse resultado o complexo  $FeL_1$  foi avaliado quanto à possibilidade de hidrólise do monoéster (2,4-DNPP) em um experimento realizado em condições de pH ótimo e excesso de substrato (1, 2, 4, 6, 8 e 10 equivalentes). Após oito horas de experimento, apenas a autohidrólise foi observada. Assim, é possível concluir que o complexo  $FeL_1$  atua somente como fosfodiesterase. Passado o período de oito horas, o substrato 2,4-BDNPP foi adi-

cionado e pode ser observado um aumento da absorbância, indicando a interação entre complexo e substrato, no entanto, a interação entre o substrato 2,4-BDNPP não é tão intensa, o que pode ser atribuída à pequena constante catalítica.

Figura 52- (1) Mudança espectral observada devido à adição consecutiva de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 equivalentes do monoéster 2,4-DNPP ao complexo  $FeL_1$ , pH 7,0, concentração de complexo =  $1,26 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , em  $CH_3CN:H_2O$  (50:50%) tampão HEPES. (2) Adição de 4 equivalentes do diéster 2,4-BDNPP após 8 h de tempo de reação com 2,4-DNPP.



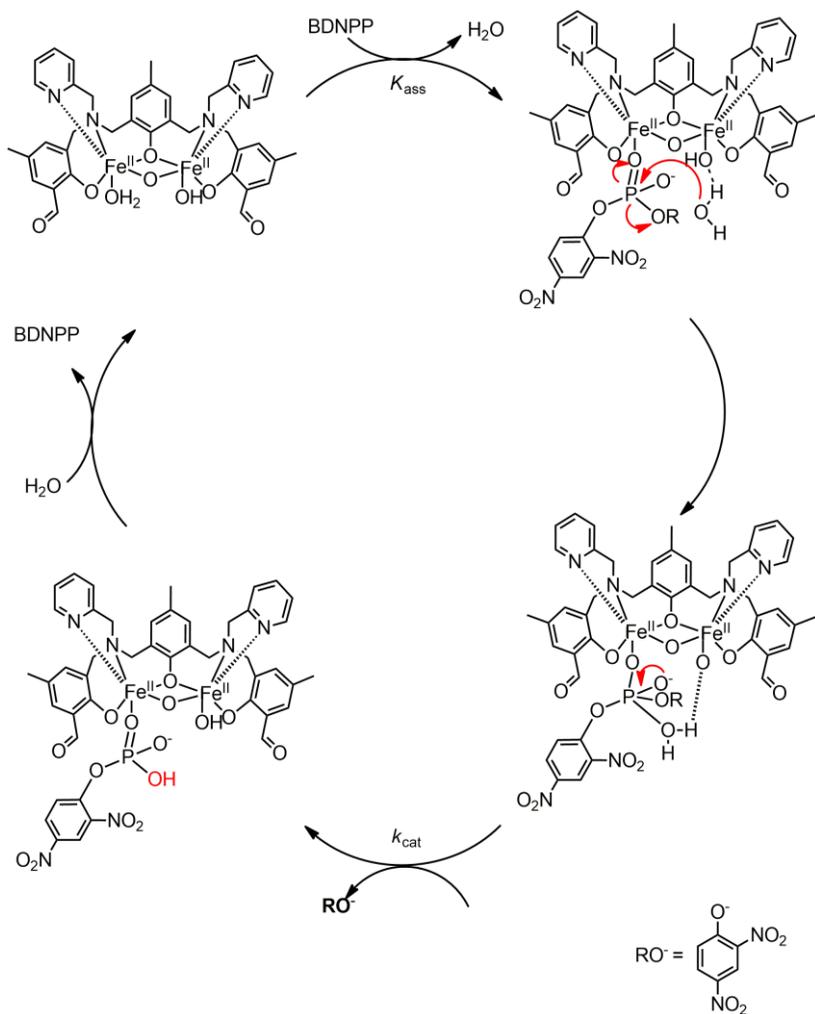
Com o objetivo de avaliar se o complexo estudado, assim como as enzimas, é capaz de regenerar-se a cada ciclo catalítico, foi realizado um estudo em que reação de hidrólise do 2,4-BDNPP em pH 7,0 sendo acompanhada por espectroscopia em 445 nm ( $\epsilon = 3600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) durante 24 horas a 25 °C. Neste intervalo de tempo, foi observado que o complexo foi capaz de hidrolisar aproximadamente cinco equivalentes de substrato, mostrando que o complexo  $FeL_1$  é capaz de se regenerar e atuar novamente no ciclo catalítico.

Para avaliar se o ataque nucleofílico ao átomo de fósforo do substrato seria semelhante ao complexo  $1^a$ , descrito por Camargo e colaboradores, que apresenta valores de ( $k_H/k_D=0,97$ ) (CAMARGO *et al.*, 2015) e ainda elucidar o mecanismo de hidrólise do 2,4-BDNPP foi realizado um experimento de efeito isotópico de deutério na velocidade de hidrólise em pH 7,0 (atividade máxima).

De acordo com valores descrito na literatura, caso a razão entre as constantes de velocidade de duas reações de hidrólise, realizadas nas mesmas condições, em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{D}_2\text{O}$  ( $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ ), estiverem entre 0,80 e 1,50, indica que não há transferência de próton envolvida na etapa determinante da reação, sugerindo que a reação ocorre por um mecanismo intramolecular (Deal, *et al.*, 1996). Para o complexo  $\text{FeL}_1$  foi obtido um valor de  $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} > 2$  indicando um mecanismo de catálise básica que leva a transferência de prótons na etapa determinante da reação.

Os estudos de efeito de pH, juntamente com os dados obtidos através da titulação espectrofotométrica, os quais fornecem os  $\text{p}K_{\text{a}}$ , evidenciam que a espécie ativa seja  $[(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-O})\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH}_2)]$ . O mecanismo proposto ocorre em três etapas. Na primeira o substrato desloca a molécula de água coordenada de um dos centros de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Em seguida, uma molécula de água, provoca o ataque do átomo de fósforo do substrato, ocorrendo à clivagem da ligação P-O e liberando 2,4-dinitrofenolato. Após a clivagem, o substrato 2,4-BDNPP permanece ligado ao centro de  $\text{Fe}(\text{III})$  e a subsequente clivagem ocorre com o ataque de uma segunda molécula de água ao centro de  $\text{Fe}(\text{III})$  acarretando a liberação de uma molécula de DNPP, restaurando o ciclo catalítico. A proposta mecanística da catálise promovida pelo complexo  $\text{FeL}_1$  pode ser observada na Figura 63.

Figura 53- Mecanismo proposto para a hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo **FeL<sub>1</sub>**.



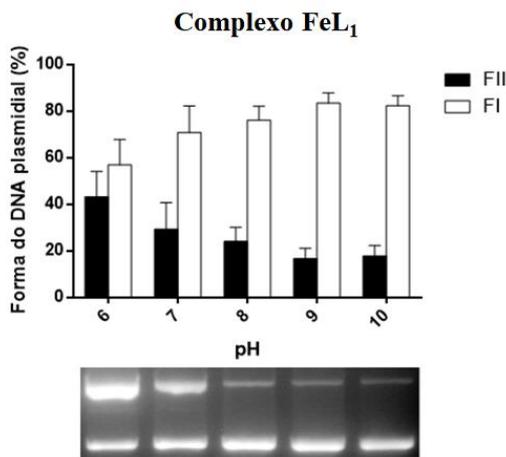
## 8 ESTUDOS DE CLIVAGEM DO DNA

Nesta seção serão apresentados os resultados dos estudos referentes à interação dos complexos  $\text{FeL}_1$  e  $\text{CuL}_1$  frente ao DNA, a partir de estudos de pH, interação e constantes de velocidade.

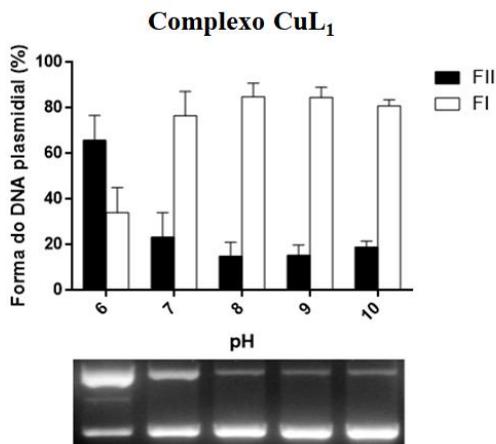
### 8.1 EFEITO DO pH

Para investigar o efeito do pH no meio reacional no processo de clivagem de DNA plasmidial pelos complexos  $\text{FeL}_1$  e  $\text{CuL}_1$ , foi realizado teste de clivagem de DNA em diferentes tampões (MES, HEPES e CHES) em uma faixa de pH (5,5 a 9,0). A Figura 64 apresenta os resultados do estudo de pH para os complexos  $\text{FeL}_1$  e  $\text{CuL}_1$ .

Figura 54- Efeito do pH para os complexos  $\text{FeL}_1$  e  $\text{CuL}_1$ . Condições:  $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng} \sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $[\text{Tampão}] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; (MES pH 6,0; HEPES pH 7,0 e 8,0; CHES pH 9,0; e CAPS pH 10,0);  $[\text{FeL}_1] = 25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $[\text{CuL}_1] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; Temperatura = 50 °C; Tempo = 4 h na ausência da luz.



(a)



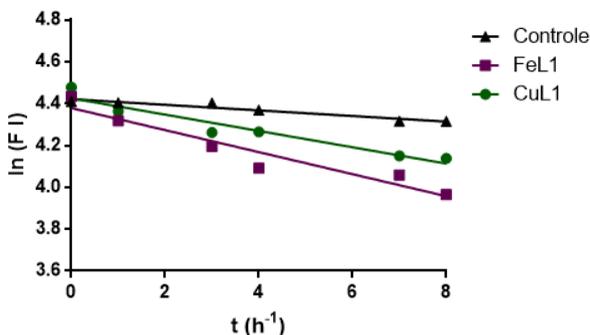
(b)

A partir das figuras é observado que em pH 6,0 os complexos proporcionam maior clivagem ao DNA plasmidial. Nota-se uma que em pH maiores a clivagem diminui consideravelmente, sugerindo a formação de uma espécie não ativa frente a clivagem do DNA. A partir deste teste ficou estabelecido o pH ideal para os demais testes realizados, por este propiciar uma maior atividade catalítica para ambos os complexos.

## 8.2 ESTUDO DA CONSTANTE CINÉTICA ( $k_{obs}$ )

Para os complexos  $FeL_1$  e  $CuL_1$  foram realizados estudos determinação da constante cinética, a qual pode-se acompanhar a clivagem da forma (F I) do DNA em pH 6,0. A Figura 65 apresenta as curvas dos complexos.

Figura 55 - Ensaio de única concentração e tempo de reação para os complexos  $FeL_1$  e  $CuL_1$ , condição:  $[CT-DNA] = 200 \mu mol L^{-1}$ ;  $[CuL_1] = 0 - 200 \mu mol L^{-1}$ ;  $[FeL_1] = 0 - 90 \mu mol L^{-1}$ ;  $[Tampão] = 10 mmol L^{-1}$  (MES pH 6,0); Temperatura =  $37^\circ C$ .



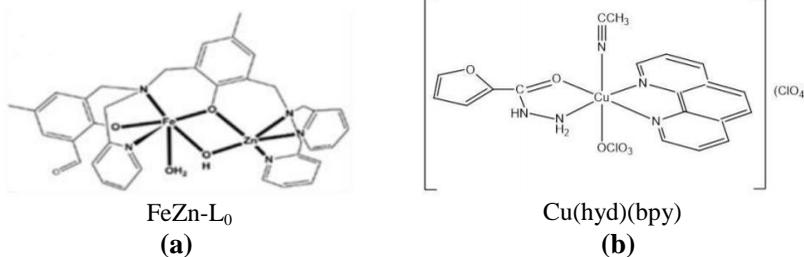
Os valores de  $k_{obs}$  obtidos para os complexos mostraram uma maior constante cinética para o complexo  $FeL_1$  em oito horas de reação. Esse resultado concorda com os obtidos na cinética de hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP, no qual o complexo  $FeL_1$  foi o único ativo como catalisador de éster de fosfato. Assim, acredita-se que a espécie que interage tanto na reação de hidrólise quanto na clivagem do DNA plasmidial é a mesma. A tabela 14 apresenta dos valores de  $k_{obs}$  obtidos para os complexos em estudo e compara o valor de  $k_{obs}$  com resultados já reportados na literatura.

Tabela 14- Comparação dos valores de  $k_{obs}$  ( $h^{-1}$ ) dos complexos e a comparação com a literatura.

Complexo	Concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	$k_{obs}$ ( $h^{-1}$ )
FeL <sub>1</sub>	0-90	0,05
CuL <sub>1</sub>	0-200	0,04
FeZn-L <sub>0</sub>	0-10	0,80
Cu(hyd)(bpy)	0-25	0,13

Os complexos descritos na literatura FeZn-L<sub>0</sub> e Cu(hyd)(bpy) estudados por Gabriel e Bortolotto, respectivamente, apresentaram maior  $k_{obs}$  comparados aos complexos estudados, logo clivavam a (F I) do DNA com mais facilidade, enquanto os complexos FeL<sub>1</sub> e CuL<sub>1</sub> necessitam de uma alta concentração para que ocorra a clivagem da (F I) do DNA. Isso pode ser atribuída tanto aos grupos ligantes ao centro metálico, no caso do complexo de cobre, como também a valência mista presente no complexo FeZn (GABRIEL, 2016; BORTOLOTTI, 2015). A Figura 66 apresenta os ligantes utilizados para a comparação das constantes cinéticas com os complexos FeZn-L<sub>0</sub> e Cu(hyd)(bpy).

Figura 56 – Complexos utilizados para comparação das constantes cinéticas, onde (a) (GABRIEL, 2016) e (b) (BORTOLOTTI, 2015).



### 8.3 DICROÍSMO CIRCULAR

O dicroísmo circular (CD) é um fenômeno originado a partir da interação de moléculas quirais com raios eletromagnéticos circularmente polarizados (NAKANISHI, 1999). O espectro de absorção do DNA é analisado comumente em luz ultravioleta em um intervalo entre 180-300 nm, faixa na qual as bases de DNA absorvem luz, esta absorção da luz

circularmente polarizada para direita e esquerda pelo DNA difere, e esta diferença é chamada de CD (JOHNSON, 1996).

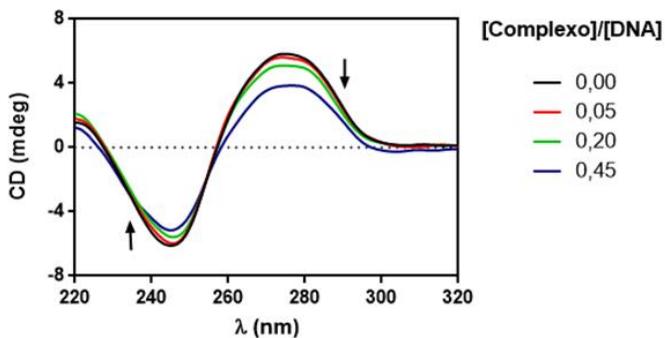
O DNA em sua forma B (B-DNA) possui bandas características de CD, sendo uma banda positiva em 275 nm resultante da helicidade direita deste DNA, e uma banda negativa em 245 nm devido ao empilhamento de bases (NAKANISHI, 1999). Portanto este método foi utilizado para verificar alterações na estrutura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

Para entender as mudanças da estrutura secundária do DNA desses complexos, foi verificado o empilhamento de base e a helicidade direita da dupla-fita. A adição de concentrações crescentes do complexo ao ct-DNA (200  $\mu$ M) foi realizada na razão [complexo]/[DNA] de 0,0 a 0,45 para o complexo de  $\text{FeL}_1$ . Como já mencionado anteriormente os estudos para esse complexo foram realizado com concentrações menores devido a sua precipitação, e a razão [complexo]/[DNA] de 0,0 a 1,0 para os complexos de  $\text{CuL}_1$ . A Figura 69 apresenta os espectros de CD.

Foi observado que com a adição crescente dos complexos  $\text{FeL}_1$  e  $\text{CuL}_1$  houve um hipocromismo das bandas do DNA em torno de 270 nm e um hiperchromismo em aproximadamente 235 nm. Isso ocorre porque a ligação do complexo tende a diminuir a helicidade direta do DNA, perdendo a torção e conseqüentemente mudando o empilhamento das bases. (NAKANISHI, 1999). Resultados similares foram reportados nos trabalhos de Silva e Gabriel para complexos binucleares de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  (Silva *et al.*, 2017; Gabriel, 2016). Os espectros de CD do ct-DNA para os complexo  $\text{FeL}_1$  e  $\text{CuL}_1$  são apresentados na Figuras 67.

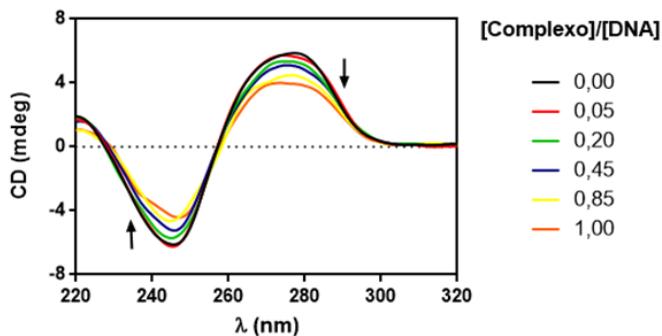
Figura 57- Espectros de CD do CT-DNA na presença de concentrações crescentes dos complexos  $\text{FeL}_1$ . Condições reacionais:  $[\text{CT-DNA}] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $[\text{CuL}_1] = 0 - 200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $[\text{FeL}_1] = 0 - 90 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $[\text{Tampão}] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$  (MES pH 6,0); Temperatura =  $37^\circ\text{C}$ .

### Complexo $\text{FeL}_1$



(a)

### Complexo $\text{CuL}_1$



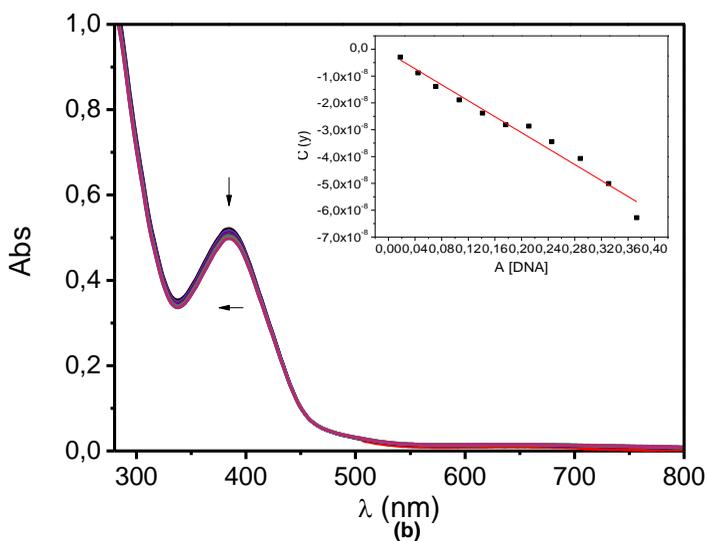
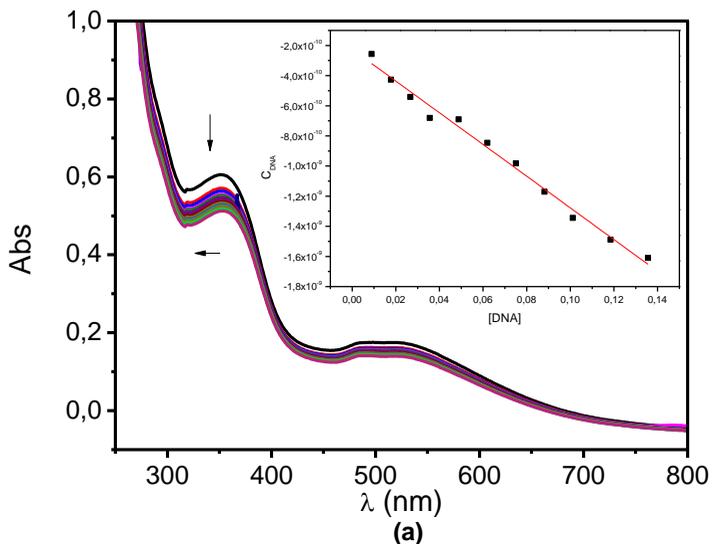
(b)

#### 8.4 ESTUDO DA INTERAÇÃO COM O DNA POR ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA ( $K_B$ )

A interação de moléculas de DNA foi caracterizada por espectroscopia eletrônica, uma vez que as interações com o ct-DNA podem ocasionar a mudança em relação ao ambiente de coordenação do complexo acarretando alterações nas transições eletrônicas. Assim é possível observar modificações nas bandas com a adição de pequenas quantidades de DNA como um indicativo de interação com os complexos. Complexos metálicos que se ligam ao DNA através de intercalação normalmente resultam em hipocromismo e deslocamento batocrômico, devido ao modo intercalativo envolvendo uma forte interação de empilhamento entre o cromóforo aromático e os pares de base do DNA. A força do hipocromismo é comumente consistente com a força da interação da intercalação (ANITHA, *et al.*, 2013).

A ligação de complexos à dupla fita do DNA pode ocorrer de diferentes maneiras, em função da sua estrutura, carga e tipo de ligante. Assim, várias explicações têm sido sugeridas para a origem dos efeitos mencionados, como por exemplo: pela interação eletrostática do complexo com o DNA em razão a formação de ligações de hidrogênio entre o ligante e as bases do DNA e até mesmo, sem excluir uma possibilidade de uma intercalação parcial (ANITHA, *et al.*, 2013; POLICARPI, 2011; LIU, *et al.*, 2002). A Figura 68 apresenta os espectros e gráficos para os complexos  $FeL_1$  e  $CuL_1$ .

Figura 68- Espectro do estudo da consente de ligação em (a)  $\text{FeL}_1$  e (b)  $\text{CuL}_1$ . Condições:  $[\text{CT-DNA}] = 6,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , adição (0 à 20  $\mu\text{l}$ );  $[\text{FeL}_1] = 1,76 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e  $[\text{CuL}_1] = 1,07 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; em pH (MÊS 6,0).



O espectro inicial corresponde ao complexo livre (ausência de DNA), enquanto que as demais curvas foram coletadas após adição sucessiva de ct-DNA à solução do complexo. É notado, para ambos os complexos a diminuição da absorvância (hipocromismo) e um pequeno deslocamento das bandas sendo um indicativo de que as interações que acontecem entre os complexos e ct-DNA são de natureza eletrostáticas ou até mesmo por sulco (LIU, 2002; NIKOLIS; METHENITIS; PNEUMATIKAKIS, 2003). Os valores de  $K_b$  para os complexos  $FeL_1$  e  $CuL_1$  estão apresentados na Tabela 15 e comparados com complexos da literatura.

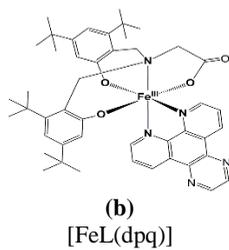
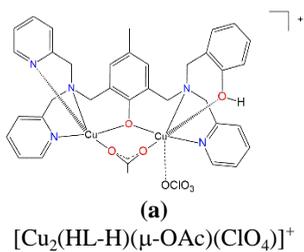
Tabela 15- Valores de  $K_b$  para os complexos  $FeL_1$  e  $CuL_1$ .

Complexo	$K_b$
$FeL_1$	$4,63 \times 10^6$
$CuL_1$	$2,23 \times 10^7$
<b>1<sup>d</sup></b>	$1,90 \times 10^4$
<b>1<sup>f</sup></b>	$2,10 \times 10^5$

Em que: **1<sup>d</sup>** refere-se ao complexo  $[Cu_2(HL-H)(\mu-OAc)(ClO_4)]^+$ ; (PERALTA, *et al.*, 2010). **1<sup>f</sup>** refere-se ao complexo  $[FeL(dpq)]$ ; (ROY, *et al.*, 2007).

A partir dos resultados observados na Tabela 14, podemos observar que o complexo  $CuL_1$  apresenta maior constante de ligação com de ligação ct-DNA, tendo maior interação com essa molécula. Os valores da constante dos complexos estudados, foram relativamente maiores aos complexos comparados **1<sup>d</sup>** e **1<sup>f</sup>** (Figura 69) Acredita-se que os complexos  $FeL_1$  e  $CuL_1$  tendem a uma maior capacidade de modificação das estruturas do DNA, podendo ocorrer por uma mais de um tipo de interação (sulco e eletrostática). No entanto, outros experimentos são necessários para que possa ser afirmado algo sobre o modo de interação dos complexos com o DNA como testes utilizando sais.

Figura 69- Complexos utilizados para comparação, onde: (a) (PERALTA, *et al.*, 2010) e (b) (ROY, *et al.*, 2007).



## 9 CONCLUSÕES

A síntese dos precursores e ligante final simétrico foram realizadas com sucesso e com pureza adequada, bem como a síntese de seus respectivos complexos binucleares  $\text{FeL}_1$ ,  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$ .

Os complexos foram caracterizados por infravermelho, sendo possível identificar as bandas provenientes dos ligantes e a presença dos contra-íons, espectroscopia eletrônica, na qual foi possível atribuir as bandas *d-d* e de transferência de carga, e eletroquímicas, cujos experimentos forneceram os valores dos potenciais redox.

Por meio da técnica de titulação espectrofotométrica, foi possível determinar os  $\text{p}K_a$  para os complexos e as respectivas espécies predominantes em cada faixa de pH, sendo essa uma informação primordial para os estudos cinéticos.

Todos os complexos ( $\text{FeL}_1$ ,  $\text{CoL}_1$  e  $\text{CuL}_1$ ) mostraram-se ativos para cinéticas de oxidação utilizando o substrato modelo 3,5-di-*terc*-butilcatecol no qual foi obtida a seguinte ordem de eficiência catalítica para os complexos  $\text{FeL}_1 > \text{CuL}_1 > \text{CoL}_1$ .

Os complexos foram testados para reações de hidrólise, utilizando o substrato 2,4-BDNPP, na qual somente o complexo  $\text{FeL}_1$  foi promissor para tal reação, mostrando-se promiscuo para as duas reações estudadas.

Testes iniciais de interações com o DNA foram realizados utilizando os complexos  $\text{FeL}_1$  e  $\text{CuL}_1$ , os quais mostraram-se promissores na clivagem do DNA plasmidial e nas interações com ct-DNA.

## 10 PERSPECTIVAS

- ✓ Aprofundar os estudos dos complexos frente ao DNA, realizando testes como: análise cinética, uso de sequestradores de espécies reativas de oxigênio, ensaios na ausência de oxigênio, bloqueadores de sulco do DNA e *footprinting*, os quais ajudam a compreender o mecanismo de reconhecimento e a clivagem da ligação fosfodiéster dos complexos que podem ser hidrolítico ou oxidativo.
- ✓ Comprovar os resultados obtidos ao longo deste trabalho em relação a preferência de interação do ligante com complexos de centros mais duros, que segue a ordem:  $\text{FeL}_1 > \text{CoL}_1 > \text{CuL}_1$  utilizando cálculos computacionais.
- ✓ Visando a melhoria das atividades catalítica dos complexos espera-se investir no efeito de segunda esfera dos complexos, principalmente para o complexo de  $\text{FeL}_1$  que mostrou-se promissor para as catalises de oxidação e hidrólise.

## 11 REFERÊNCIAS

ADAMS, H. *et al.* Formation of axial phenolate-metal bonds in square-pyramidal complexes. **Dalton Transactions**, v. 11, p. 2233-2237, 1996.

ANDREINI, C. *et al.* Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. **Journal Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, p. 1205-1218, 2008.

ANITHA, P. *et al.* Synthesis, characterization, DNA interaction, antioxidant and anticancer activity of new ruthenium(II) complexes of thiosemicarbazone/semicarbazone bearing 9,10-phenanthrenequinone. **Journal of Photochemistry and Photobiology Biology**, v. 129, p. 17-26, 2013.

AUSUBEL, F. M. B. *et al.* **Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology**. 1999.

BEINERT, H. Bioinorganic Chemistry: A New Field or Discipline? Words, Meanings, and Reality. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 37967-37972, 2002.

BERG, J. M. *et al.*, **Biochemistry**. 5a ed. New York: W. H. Freeman & Co Ltd, 2002.

BERNHARDT, V. P. *et al.* An approach to more accurate model systems for purple acid phosphatase (PAPs). **Inorganic Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 7249-7263, 2015.

BERGLUND, P. & HULT, K. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. **TRENDS in Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 233-238, 2007.

BORTOLOTTO, T. **Interação e clivagem de DNA por novos complexos mononucleares de Cu(II) e binucleares de Fe(III)Zn(II)**. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

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

CAMARGO, P. T. *et al.* Second-Sphere Effects in Dinuclear Fe<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup> Hydrolase Biomimetics: Tuning Binding and Reactivity Properties. **Inorganic Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 187-203, 2017.

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

CASTRO, K. A. D. F. *et al.* New copper porphyrins as functional models of catechol oxidase. **Journal of Catalysis**, v. 344, p. 303-312, 2016.

CHAVES, Cláudia. **Síntese, caracterização e atividade de catecolase de complexos de cobre com ligantes tripodais**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

COMBA, P. *et al.* Spectroscopic Characterization of the Active Fe<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup> and Fe<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup> Forms of a Purple Acid Phosphatase Model System. **Inorganic Chemistry**, v. 51, p. 12195-12209, 2012.

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

DESBOUIS, D. *et al.* Copper(II), zinc(II) and nickel(II) complexes as nuclease mimetics. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 937, p. 897-937, 2012.

DEY, K. S. & MUKHERJEE, A. The synthesis, characterization and catecholase activity of dinuclear cobalt (II/III) complex of an O-donor rich Schiff base ligand. **New Journal Chemistry**, v. 38, p. 4985-4995, 2014.

DEY, K. S. & MUKHERJEE, A. Catechol oxidase and phenoxazinone synthase: Biomimetic functional models and mechanistic studies. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 330, p. 80-115, 2016.

DEY, S. K. *et al.*, The synthesis, characterization and catecholase activity of dinuclear cobalt(II/III) complexes of a O-donor rich Schiff base ligand. **New Journal Chemistry**, v. 38, p. 4985-4995, 2014.

ESTEVEZ, L. F. *et al.*, Theoretical proposal for the whole phosphate diester hydrolysis mechanism promoted by a catalytic promiscuous dinuclear copper(II) complex. **Inorganic Chemistry**, v. 55, p. 2806-2818, 2015.

FENTON, D. E. **Biocoordination Chemistry**. New York: Oxford Chemistry Primers, 1995.

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

GABRIEL, P. **Efeito da alteração na segunda esfera de coordenação de complexos binucleares de Fe<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup> e Fe<sup>III</sup>Cu<sup>II</sup> como modulador da atividade de clivagem e interação com DNA**. Dissertação (Mestrado) – Pós graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

GAGNÉ, R. R. *et al.* Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements. **Inorganic Chemistry**, v. 19, p. 2854- 2855, 1980.

GAHAN, L. R. *et al.* Phosphate Ester Hydrolysis: Metal Complexes As Purple Acid Phosphatase and Phosphotriesterase Analogues. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 19, 2745-2758, 2009.

GERDEMANN, C. *et al.* The Crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, p. 183-191, 2002.

GHOSH, K. Two cobalt (III) Schiff base complex of the type [Co(ABC)(DE)X]: facile synthesis, characterization, catechol, oxidase and phenoxazinone synthase mimicking activity. **Chemistry Select**, v. 2, p. 8207-8220, 2017.

GRUBER, K. *et al.* Vitamin B12-derivatives—enzyme cofactors and ligands of proteins and nucleic acids. **Chemical Society Reviews**, v. 40, p. 4346-4363, 2011.

GUDDAT, L. *et al.* Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase. **Structure**, v. 7, n. 7, p. 757-768, 1999.

HOLM, R. H., & SOLOMON, E. I. Biomimetic. Inorganic Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 104, n.3, p. 347-348, 2004.

HOLM, R. H. *et al.* Structural and functional aspects of metal sites in biology. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 2239-2314, 1996.

HORTON, R. *et al.* **Principles of Biochemistry**. 4th. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2006.

HOUSECROFT, C. & SHAPE, A. G. **Inorganic Chemistry**, 4<sup>a</sup> edição, Editora: Person, 2012.

KLABUND, T. *et al.* Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. **Nature America Inc**, v. 5, n, 12, p. 1084-1090, 1998.

KOVAL, I. *et al.* Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies. In: **Chemical Society Reviews**, v. 35, p. 814-84, 2006.

LANZMASTER, M. *et al.* A new heterobinuclear Fe<sup>III</sup>Cu<sup>II</sup> complex with a single terminal Fe<sup>III</sup>-O(phenolate) bond. Relevance to purple acid phosphatases and nucleases. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 10, p. 319-332, 2005.

LINDOY, F. L. *et al.*, Mono- and Diformylation of 4-substituted phenols: A new application of the Duff reaction. **Synthesis**, p. 1029-1032, 1998.

LINDQVIST, Y. *et al.* Three-dimensional structure of a mammalian purple acid phosphatase at 2.2 Å resolution with a  $\mu$ -(hydroxo bridged di-iron center. **Journal Molecular Biology**, v. 291, p. 135-147, 1999.

LIPPARD, S. J. & BERG, J. M. "**Principles of Bioinorganic Chemistry**". Mill Valley, University Science Books, 1994.

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

LU, T. *et al.*, Bioinorganic chemistry of the natural  $[\text{Fe}(\text{no})_2]$  motif: evolution of a functional model for no-related biomedical application and revolutionary development of a translational model. **Inorganic Chemistry**. doi: 10.1021/acs.inorgchem.8b01818.

MAGHERUSAN, M. A. *et al.* Catechol oxidase activity of comparable dimanganese and dicopper complexes. **Dalton Transaction** v. 47, p. 15555-15564, 2018.

MAJUMDER, S. *et al.* Dinuclear mixed-valence  $\text{Co}^{\text{III}}\text{Co}^{\text{II}}$  complexes derived from a macrocyclic ligand: unique example of a  $\text{Co}^{\text{III}}\text{Co}^{\text{II}}$  complex showing catecholase activity. **Dalton Transaction**, v. 42, p. 4561-4569, 2013.

MARTÍNEZ, A. Dinuclear Copper Complexes with Imidazole Derivative Ligands: A Theoretical Study Related to Catechol Oxidase Activity. **The Journal physical Chemistry**, v. 116, p. 8038-8044, 2012.

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

MERKX, M. *et al.* Evidence for nonbridged coordination of p-nitrophenyl phosphate to the dinuclear Fe(III)-M(II) center in bovine spleen purple acid phosphatase during enzymatic turnover. **Biochemistry**, v. 38, p. 9914- 9925, 1999.

MERKX, M. & AVERILL, B. A. Probing the role of the trivalent metal in phosphate ester hydrolysis: preparation and characterization of Purple Acid Phosphatases containing  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  and  $\text{In}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  active sites, including the first example of an active aluminum enzyme. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 28, p. 6683- 6689, 1999.

MESSLER, L.G; FISCHER, J. P; TARR, A. D. **Inorganic Chemistry**, 2014, 5<sup>a</sup> ed. Person.

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

MOCNY, S. C, & PECORATO, L. C. De Novo Protein Design as a Methodology for Synthetic Bioinorganic Chemistry. **Accounts of chemical research**, v. 48, n. 8, p. 2388-2356, 2015.

MOLITOR, C. *et al.* Aurone synthase is a catechol oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of plant polyphenol oxidases. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 113, n. 13, p. 1806-1815.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of inorganic coordination compounds**. 3<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons, 1977, 342p.

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

NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 2008. 5<sup>a</sup> ed. W. H. Freeman and Company.

NEVES, A. *et al.* An Unprecedented  $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}$  Complex that Mimics the Structural and Functional Properties of Purple Acid Phosphatases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 24, p. 7486-7487, 2007.

NEVES, A. *et al.* Synthesis, structure, physicochemical properties and catecholase-like activity of a new dicopper(II) complex. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 6, p. 747-754, 2001.

OLIVEIRA, A. *et al.* Dopamine polymerization promoted by a catecholase biomimetic  $\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})\text{Cu}^{\text{II}}$  complex containing a triazine-based ligand. **Dalton Transaction**, v. 45, p. 15294-15297, 2016.

OLIVEIRA, M. C. B. **Nucleases Sintéticas: Caracterização bioquímica e mecanismo de ação sobre DNA.** 2006. Tese (doutorado). Departamento de Química, Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis.

OLIVEIRA, J. F. **Oxidação de catecóis promovida por complexos binucleares de Cu(II): Catálise homogênea e heterogênea.** Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

PALHANO, T. M. R. S. **Complexos binucleares de cobalto com ligantes n,o-doadores macrocíclicos: elaboração e estudos como catalisadores na oxidação de catecóis.** 2017. Dissertação (mestrado). Departamento de Química, Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis.

PATHAK, C. *et al.* Modeling the active site of the purple acid phosphatase enzyme with hetero-dinuclear mixed valence M(II)-Fe(III) [M= Zn, Ni, Co and Cu] complexes supported over a [N<sub>6</sub>O] Unsymmetrical Ligand. **ACS Omega**, v.2, p. 4737-4750, 2017.

PATHAK, C. *et al.*, Homodinuclear [Fe(III)Fe(III)] and [Zn(II)Zn(II)] complexes of a binucleating [N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>] symmetrical ligand with purple acid phosphatase (PAP) and zinc phosphoesterase like activity. **Polyhedron**, v. 145, p. 88-100, 2018.

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

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à espectroscopia.** São Paulo: Cengage Learning, 2009.

PENTTINER, L. *et al.* A new Crystal form of *Aspegillus oryzae* catechol oxidase and evaluation of copper site structures in coupled binuclear copper enzymes. **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1-15, 2018.

PERALTA, R. A. *et al.* Catecholase and DNase activities of copper(II) complexes containing phenolate-type ligands. **Journal Physical Organic Chemistry**, v. 23, p. 1000-1013, 2010.

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

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

PIOVEZAN, C. *et al.* Heterodinuclear Fe<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup>-Bioinspired Complex Supported on 3-Aminopropyl Silica. Efficient Hydrolysis of Phosphate Diester Bonds. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2580–2582, 2010.

PYLE, A. M. *et al.* Mixed-ligand complexes of ruthenium (II): factors governing binding to DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, p. 3051-3058, 1989.

REICHMANN, M. E. *et al.* Further examination of the molecular weight and size of desoxypentose nucleic acid. **Journal of the American Chemical Society**. v. 76, p. 3047-3053, 1954.

ROY, M. *et al.* Ternary Iron(III) Complex Showing Photocleavage of DNA in the Photodynamic Therapy Window. **Inorganic Biochemistry**, v. 46, p. 4368-4370, 2007.

SELLECK, C., *et al.* Visualization of the Reaction Trajectory and Transition State in a Hydrolytic Reaction Catalyzed by a Metalloenzyme. **Chemistry European Journal**, v. 23, p. 4770-4781, 2017.

SCHENK, G. *et al.* Binuclear metal centers in purple acid phosphatases: Fe-Mn in sweet potato and Fe-Zn in soybean. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 370, n. 2, p. 183-189, 1999.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectral de compostos orgânicos**. 6ª ed. Rio de Janeiro (RJ): LTC, 2000, 460p.

SCHENK, G. *et al.* Phosphate forms an unusual tripodal complex with the Fe–Mn center of sweet potato purple acid phosphatase, **PNAS**, v. 102, p. 273-278, 2005.

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

SHOKOHI-POUR, Z. A novel Schiff base derived from the gabapentin drug and copper (II) complex: Synthesis, characterization, interaction with DNA/protein and cytotoxic activity. **Journal of photochemistry and photobiology B: Biology**, v. 162, p. 34-44, 2016.

SILVA, S. A. G. *et al.* Synthesis and characterization of  $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}$  complexes: Effects of second coordination sphere and increase in the chelate ring size on the hydrolysis of a phosphate diester and DNA. **Dalton Transactions**, v. 46, p. 11380-11394, 2017.

SMITH, S. J. *et al.* Spectroscopic and Catalytic Characterization of a Functional  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$  Biomimetic for the Active Site of Uteroferrin and Protein Cleavage. **Inorganic Chemistry**, v. 51, p. 2065-2078, 2012.

SMITH, S. J. *et al.* The reaction mechanism of the Ga(III)Zn(II) derivative of uteroferrin and corresponding biomimetics. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, p. 1207-1220, 2007.

SOLEM, E. *et al.* Tyrosinase versus catechol oxidase: one asparagine makes the difference. **Angewandte Chemie**, v. 55, p. 2884-2888, 2016.

SOLOMON, E. *et al.* Copper active sites in biology. **Chemical Reviews**, v. 144, p. 3659-3853, 2014.

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

WANG, X. *et al.* Spectroscopic complex. Mechanistic implications for dinuclear hydrolases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 9235-9236, 1999.

WANG, M. *et al.* Site-selective DNA hydrolysis induced by a metal-free peptide nucleic acid-cyclen conjugate. **Chemical communication**, v. 47, p. 11059-11061, 2011.

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

WIESZCZYCKA, K., & STASZAK, K. Artificial metalloenzymes as catalysts in non-natural compounds synthesis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 351, p. 160-171, 2017.

WU, F. *et al.* p-Oxo/hydroxo bis (p-carboxylato)diiron(III) and dimanganese(III) Complexes with Capping Tris (imidazo1-2-y1)phosphine Ligands. **Inorganic Chemistry**, v.29, p. 5174-5183, 1990.

XAVIER, F. R. **Desenvolvimento de complexos heterobinucleares a partir de ligantes binucleantes contendo braços macrocíclicos, piri-dínicos e fenólicos como modelos de hidrolases/nucleases químicas.** 2010. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

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

XAVIER, F. R. **Novos complexos binucleares não-simétricos de ferro (III) cobalto(II) e de gálio(III) cobalto(II) como modelos miméticos para as fosfatases ácidas púrpuras metalo-substituídas.** 2006. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

ZÉRON, P. Dinuclear Copper(II) Complexes with Distant Metal Centers: Weaker Donor Groups Increase Catecholase Activity. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v.1, p. 56-62, 2017.

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

ZURITA, D. *et al.* A first model for the oxidized active form of the active site in galactose oxidase: a free-radical copper complex. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 2, p. 45-55, 1997.

