



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Claudia Pereira

**Ligantes Funcionalizados com Guanidina e Purina: Os efeitos na
hidrólise de ésteres de fosfato catalisados por complexos de $Fe^{III}Zn^{II}$**

FLORIANÓPOLIS

2019

Claudia Pereira

Ligantes Funcionalizados com Guanidina e Purina: Os efeitos na hidrólise de ésteres de fosfato catalisados por complexos de $Fe^{III}Zn^{II}$

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dra. Rosely A. Peralta

Coorientador: Prof. Dr. Ademir Neves

FLORIANÓPOLIS

2019

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

Pereira, Claudia

Ligantes Funcionalizados com Guanidina e Purina : Os efeitos na hidrólise de ésteres de fosfato catalisados por complexos de $Fe^{III}Zn^{II}$ / Claudia Pereira ; orientador, Rosely Aparecida Peralta, coorientador, Ademir Neves, 2019.

121 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, , Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Química. 2. Guanidina, Purina, Clivagem de DNA, PAP. I. Aparecida Peralta, Rosely . II. Neves, Ademir. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Química. IV. Título.

Claudia Pereira

Ligantes Funcionalizados com Guanidina e Purina: Os efeitos na hidrólise de ésteres de fosfato catalisados por complexos de Fe^{III}Zn^{II}

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Tiago Pacheco de Camargo
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

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

Prof. Dr. Hernán F. Terenzi
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Luiz A. S. Madureira
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Química.

Prof. Dr. Marcus Cesar Mandolesi Sa
Coordenador do Programa

Prof. Dra. Rosely A. Peralta
Orientadora

Florianópolis, 10 de Setembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Pedro e Terezinha pelo amor incondicional, apoio e a presença em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão e melhor amigo Artur e Cristiane minha irmã quase gêmea amada, vocês são o melhor de mim.

Ao grande homem que tenho ao meu lado, que me faz ser cada dia melhor e mais feliz, meu amigo, minha paixão, meu amor, Thiago Granetto.

Aos meus amigos especiais Marco, Rodrigo, Laís, Babi, Feschu, Filipy, Bruna, Jess, Marcolino, Vitinho, minha Alaninha e Tofu que sabem que estão guardados em meu coração e que contribuíram para deixar meus dias mais felizes (exceto o Tofu) nessa longa jornada; amo vocês.

Agradeço a todos os colegas e amigos do Labinc, André Khrull, Cacau, Renata e demais colegas, todos de alguma maneira me ajudaram muito e tenho por todos um carinho imenso.

Ao meu maior presente desse doutorado, meu amigo, meu confidente, meu professor e meu pai em tantas horas. Faça chuva ou faça sol, levarei você pra toda vida no meu coração, com você a vida é mais fácil e divertida e o respeito que tenho por você é imensurável. Te amo Gilinhandro.

Ao Prof.Dr. Ademir Neves, alguém simplesmente genial, pelo apoio e por me deixar fazer parte desse grupo tão especial, você é sensacional.

À ela, a minha orientadora, agradeço pela ajuda e orientação nesses 4 anos, mas principalmente pela amizade, respeito e por sempre me puxar para fazer o que eu tenho medo e me mostrar que sou capaz, e até depois de um fracasso dizer: Tenho muito orgulho de você. Profa Dra Rosely, és mais que especial para mim.

Aos membros da banca pela presença especial de todos. Ao Prof. Dr. Tiago Pacheco que é um amigo especial o qual não tenho palavras para agradecer toda amizade, ajuda e conhecimento que me passou durante tantos anos que passamos juntos. Muito disso devo a você meu amigo.

Ao departamento de química e o programa de pós-graduação em química da Universidade Federal de Santa Catarina, pela acolhida e oportunidade de formação neste centro de excelência.

Ao Governo Federal, CNPq, CAPES e demais órgãos de fomento por viabilizarem a execução deste trabalho.

*“Em meio às dificuldades encontra-se a oportunidade”
“Algo só é impossível até que alguém duvide e prove o contrário”.
(Albert Einstein)*

RESUMO

A importância do estudo do comportamento de compostos que mimetizam a ação de enzimas quando submetidos a alterações estruturais como o aumento do tamanho do anel do ligante e a inserção de compostos que simulam a segunda esfera de coordenação é indiscutível, trazendo importantes informações mecanísticas e estruturais. Neste trabalho, os efeitos catalíticos dos grupos aminoguanidina e aminopurina na segunda esfera de um complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ que mimetiza o sítio ativo da metalo-hidrolase fosfatase ácida púrpura (PAP) são investigados e os resultados obtidos foram extremamente relevantes para essa área da ciência. O ligante 3-(((3-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-il)metil)amino)metil-il)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído-($\text{H}_2\text{L1bpea}$) foi sintetizado e o complexo $[(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})(\text{L1bpea})](\text{ClO}_4)$ foi usado como base para comparação com complexos similares, previamente reportados na literatura. Modificações subsequentes foram conduzidas no grupo aldeído, onde aminoguanidina (amig) e aminopurina (apur) foram usadas como derivados da cadeia lateral. Os complexos $[(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})(\text{L1bpea})](\text{ClO}_4)$ (1), $[(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})(\text{L1bpea-amig})](\text{ClO}_4)$ (2) e $[(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})(\text{L1bpea-apur})](\text{ClO}_4)$ (3) foram caracterizados por métodos espectrocópicos (infravermelho, UV-Vis) e espectrometria de massa ESI-MS. A teoria funcional da densidade (DFT) também foi utilizada para compreender melhor a estrutura dos complexos. A atividade hidrolítica dos complexos 1, 2 e 3 foi analisada usando tanto o substrato modelo 2,4-BDNPP (bis-(2,4-dinitrofenil) fosfato) quanto o DNA. Os complexos 2 e 3, contendo os ligantes derivatizados, apresentaram uma constante de associação significativamente maior ($K_{\text{assoc}} \cong 1/K_M$) para o substrato ativado 2,4-BDNPP em relação ao complexo 1. A eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) também é maior devido a ligações de hidrogênio e/ou interações π -stacking entre o substrato e os grupos aminoguanidina e aminopurina presentes em 2 e 3, respectivamente. Cada um dos complexos também é capaz de hidrolisar o DNA, embora com taxa reduzida. Enquanto o complexo 3 é mais eficaz contra o 2,4-BDNPP, é o catalisador menos ativo na hidrólise do DNA. No geral, os resultados aqui relatados demonstram o significativo efeito de segunda esfera na catálise de

substratos diéster com a elucidação de um mecanismo inédito observado para esses tipos de compostos.

Palavras-chave: Guanidina, Purina, Clivagem de DNA, PAP

ABSTRACT

The importance of studying the behavior of compounds that mimic the action of enzymes when subjected to structural changes such as increasing the size of the ligand ring and the insertion of compounds that simulate the second sphere coordination is unquestionable, providing important mechanistic and structural information. In this work, the catalytic effects of aminoguanidine and aminopurine groups in the second sphere of a $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ complex that mimics the active site of the metallohydrolase purple acid phosphatase (PAP) are investigated, with a particular view on DNA as substrate. The ligand 3-(((3-((bis(2-(pyridin-2-yl)ethyl)amino)methyl)-2-hydroxy-5-methylbenzyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)-2-hydroxy-5-methylbenzaldehyde (H_2L_1bpea) was synthesized and its complex $[(OH)Fe^{\text{III}}(\mu-OH)Zn^{\text{II}}(H_2O)(L_1bpea)](ClO_4)$ used as a base for comparison with similar complexes previously published in the literature. Subsequent modifications were conducted in the aldehyde group, where aminoguanidine (amig) and aminopurine (apur) were used as side chain derivatives. The complexes $[(OH)Fe^{\text{III}}(\mu-OH)Zn^{\text{II}}(H_2O)(L_1bpea)](ClO_4)$ (1), $[(OH)Fe^{\text{III}}(\mu-OH)Zn^{\text{II}}(H_2O)(L_1bpea-amig)](ClO_4)$ (2) and $[(OH)Fe^{\text{III}}(\mu-OH)Zn^{\text{II}}(H_2O)(L_1bpea-apur)](ClO_4)$ (3) were characterized by spectroscopic methods (infrared, UV-Vis) and ESI-MS spectrometry. Density functional theory (DFT) was also used to better understand the structure of the complexes. The hydrolytic activity of complexes 1, 2 and 3 was analyzed using both the model substrate 2,4-BDNPP (bis-(2,4-dinitrophenyl)phosphate) and DNA. Complexes 2 and 3, containing the derivatized ligands, have a significantly higher association constant ($K_{\text{assoc}} \cong 1/K_M$) for the activated substrate 2,4-BDNPP compared to complex 1. The catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) is also higher due to hydrogen bonds and/or π -stacking interactions between the substrate and the aminoguanidine and aminopurine groups present in 2 and 3, respectively. Each of the complexes is also capable of hydrolyzing DNA, albeit with reduced rate. While complex 3 is most effective against 2,4-BDNPP it is the least active catalyst against DNA. Overall, the results reported herein demonstrate the significance of second-sphere effects in the catalysis of diester substrates with the elucidation of an unprecedented mechanism observed for these types of compounds.

Keywords: Guanidine, Purine, DNA Cleavage, PAP

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de Energia para um sistema catalisado por uma enzima.	23
Figura 2- Representação esquemática do sítio ativo das PAPs.....	27
Figura 3 - Fosfatase ácida púrpura do feijão vermelho (kbPAP)	28
Figura 4 - Propostas de ataque nucleofílico para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAPs.	30
Figura 5 - Complexo de Fe ^{III} Zn ^{II} previamente reportado por Silva <i>et al.</i> contendo grupo amino como segunda esfera de coordenação.....	32
Figura 6 - Ilustração da interação entre o grupo guanidina e fosfodiesterases.	33
Figura 7 - Exemplo de uma Nuclease sintética.	36
Figura 8 - Estrutura química do ligante não simétrico H ₂ bpbmp.	37
Figura 9 - Ligantes binucleantes não-simétricos utilizados na síntese dos compostos de coordenação.	55
Figura 10 - Espectro na região do infravermelho do ligante final H ₂ L1bpea em pastilha de KBr.	59
Figura 11 - Espectro na região do infravermelho do ligante final H ₂ L1bpea-amig em pastilha de KBr.	60
Figura 12- Espectro na região do infravermelho do ligante final H ₂ L1bpea-apur em pastilha de KBr.	60
Figura 13 – Região ampliada da sobreposição na região do infravermelho dos ligantes H ₂ L1bpea, H ₂ L1bpea-amig e H ₂ L1bpea-apur em pastilha de KBr.	61
Figura 14 - Espectro de ¹ H NMR do ligante H ₂ L1bpea em CDCl ₃	63
Figura 15 - Espectro de ¹ H NMR do ligante H ₂ L1bpea-amig em DMSO-d ₆	63
Figura 16 - Espectro de ¹ H NMR do ligante H ₂ L1bpea-apur em DMSO-d ₆	64
Figura 17. Espectro de massa ESI-MS do ligante Lbpea em CH ₃ CN:H ₂ O.....	65
Figura 18 - Representações dos complexos de Fe ^{III} Zn ^{II} sintetizados 1, 2 e 3.....	66
Figura 19 - Espectro de IR do ligante final H ₂ L1bpea (linha preta) e complexo 1 (linha vermelha) em pastilha de KBr.	67
Figura 20 - Espectro de IR do ligante final H ₂ L1bpea-amig (linha preta) e complexo 2 (linha vermelha) em pastilha de KBr.	68
Figura 21 - Espectro de IR do ligante final H ₂ L1bpea-apur (linha preta) e complexo 3 (linha vermelha) em pastilha de KBr.	68
Figura 22 - Espectro de massa ESI-MS do complexo 1 em CH ₃ CN.	72

Figura 23- Espectro de massa ESI-MS do complexo 2 em CH ₃ CN:DMSO.....	73
Figura 24 - Espectro de massa ESI-MS do complexo 3 em CH ₃ CN:DMSO.....	74
Figura 25 - Geometrias otimizadas do estado fundamental para os complexos 1, 2 e 3.	76
Figura 26 - Espectros de IR Experimental do complexo 1 (linha preta) e o calculado (linha vermelha).....	78
Figura 27 - Espectros de IR Experimental do complexo 2 (linha preta) e o calculado (linha vermelha).....	79
Figura 28 - Espectros de IR Experimental do complexo 3 (linha preta) e o calculado (linha vermelha).....	79
Figura 29 - Espectro eletrônico de absorção dos complexos 1, 2 e 3 em CH ₃ CN.....	81
Figura 30 - Espectro eletrônico de absorção dos complexos 1, 2 e 3 em estado sólido.....	82
Figura 31 - Espectro de absorção simulado para o complexo 1 em CH ₃ CN.	83
Figura 32 - Espectro de absorção simulado para o complexo 2 em CH ₃ CN.	83
Figura 33 - Espectro de absorção simulado para o complexo 3 em CH ₃ CN.	83
Figura 34 - Energias dos orbitais de fronteira calculados para os complexos 1, 2 e 3.	84
Figura 35 - Voltamogramas de onda quadrada para os complexos 1-3 em CH ₃ CN/H ₂ O (1:1 v/v). Condições: I = 0.1 mol L ⁻¹ NaCl; eletrodo de trabalho: carbono vítreo; eletrodo auxiliar de platina; eletrodo de referência: Ag/Ag ⁺ ; padrão interno: K ₃ [Fe(CN) ₆].	86
Figura 36 - Proposta para os equilíbrios observados no complexo 1 em solução H ₂ O/CH ₃ CN 1:1; I = 0,1 mol L ⁻¹ (KCl) à 25° C.	88
Figura 37 - Proposta para os equilíbrios observados no complexo 2 em solução H ₂ O/CH ₃ CN 1:1; I = 0,1 mol L ⁻¹ (KCl) à 25° C.	88
Figura 38 - Proposta para os equilíbrios observados no complexo 3 em solução H ₂ O/CH ₃ CN 1:1; I = 0,1 mol L ⁻¹ (KCl) à 25° C.	88
Figura 39 - Dependência das velocidades iniciais pelo pH na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP pelo complexo 1 [Complexo] _{final} = 2×10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , [2,4-BDNPP] _{final} = 2×10 ⁻³ mol L ⁻¹ , [tampões 4,5-9,5] _{final} = 0,05 mol L ⁻¹ em solução de CH ₃ CN/H ₂ O (1:1 v/v) à 25 °C (linha pontilhada).....	91

Figura 40 - Dependência das velocidades iniciais pelo pH na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP pelo complexo 2 [Complexo] _{final} = 2×10^{-5} mol L ⁻¹ , [2,4-BDNPP] _{final} = 2×10^{-3} , [tampões 4,5-9,5] _{final} = 0,05 mol L ⁻¹ em solução de CH ₃ CN/H ₂ O (1:1 v/v) à 25 °C (linha pontilhada).....	92
Figura 41 - Dependência das velocidades iniciais pelo pH na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP pelo complexo 3 [Complexo] _{final} = 2×10^{-5} mol L ⁻¹ , [2,4-BDNPP] _{final} = 2×10^{-3} mol L ⁻¹ , [tampões 4,5-9,5] _{final} = 0,05 mol L ⁻¹ em solução de CH ₃ CN/H ₂ O (1:1 v/v) à 25 °C (linha pontilhada).....	92
Figura 42 - Dependência da concentração do substrato sobre as velocidades de hidrólise no pH ótimo (pH 7,5) para o complexo 1. [complexo] _{final} = 2×10^{-5} mol L ⁻¹ , [tampão] _{final} = 0,05 mol L ⁻¹ em solução de CH ₃ CN/H ₂ O (1:1 v/v) à 25 °C..	93
Figura 43 - Dependência da concentração do substrato sobre as velocidades de hidrólise no pH ótimo (pH 7,0) para o complexo 2. [complexo] _{final} = 2×10^{-5} mol L ⁻¹ , [tampão] _{final} = 0,05 mol L ⁻¹ em solução de CH ₃ CN/H ₂ O (1:1 v/v) à 25 °C..	94
Figura 44 - Dependência da concentração do substrato sobre as velocidades de hidrólise no pH ótimo (pH 6,5) para o complexo 3. [complexo] _{final} = 2×10^{-5} mol L ⁻¹ , [tampão] _{final} = 0,05 mol L ⁻¹ em solução de CH ₃ CN/H ₂ O (1:1 v/v) à 25 °C..	94
Figura 45 - Dependência da eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) obtida em cada valor de pH (4,5-9,5) para 2.	95
Figura 46 - Dependência da eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) obtida em cada valor de pH (4,5-9,5) para 3.	96
Figura 47 - Efeito isotópico de deutério na clivagem hidrolítica do 2,4-BDNPP em D ₂ O para os complexos 1, 2 e 3.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das enzimas pela reação que catalisam segundo a IUBMB.....	24
Tabela 2 - Algumas enzimas hidrolíticas binucleares: conteúdo metálico no sítio ativo; papel metabólico e potencialidade farmacológica.....	25
Tabela 3 - Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) dos ligantes intermediários.....	57
Tabela 4 - Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) dos ligantes finais $\text{H}_2\text{L1bpea}$, $\text{H}_2\text{L1bpea-amig}$ e $\text{H}_2\text{L1bpea-apur}$	58
Tabela 5 - Deslocamentos químicos (ppm) observados nos espectros de ^1H NMR para os ligantes finais $\text{H}_2\text{L1bpea}$, $\text{H}_2\text{L1bpea-amig}$ e $\text{H}_2\text{L1bpea-apur}$	62
Tabela 6 - Porcentagens de C, H e N para os ligantes inéditos sintetizados (calculada/encontrada).....	64
Tabela 7 - Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) dos complexos 1, 2 e 3 e seus ligantes finais $\text{H}_2\text{L1bpea}$, $\text{H}_2\text{L1bpea-amig}$ e $\text{H}_2\text{L1bpea-apur}$	70
Tabela 8 - Porcentagens de C, H e N para os complexos inéditos 1, 2 e 3 (calculada/encontrada).....	71
Tabela 9 - Espécies determinadas na espectrometria de massa.....	75
Tabela 10 - Comprimentos de ligação selecionados para os complexos calculados e alguns valores de dados cristalográficos para comparação.....	77
Tabela 11 - Atribuições das bandas de IR para os complexos 1-3 (experimental e calculado).....	78
Tabela 12 - Espectro eletrônico dos complexos 1, 2 e 3 em CH_3CN , $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) e CH_2Cl_2	81
Tabela 13 - Potenciais redox (em V) determinados através de voltametria de onda quadrada (OQ) para o processo $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$	85
Tabela 14 - Valores das constantes de protonação obtidos para os complexos 1, 2 e 3.....	87
Tabela 15 - Parâmetros cinéticos para a hidrólise do 2,4-BDNPP catalisado pelos complexos 1, 2 e 3 e outros complexos para comparação.....	97
Tabela 16 - Parâmetros de ativação obtidos através da equação de Eyring para os complexos 1-3.....	99

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Mecanismo proposto por Klabunde e colaboradores para a ação de PAPs na catálise de hidrólise de ésteres de fosfato.....	29
Esquema 2 - Ilustração da hidrólise do 2,4-bis-dinitrofenilfosfato (2,4-BDNPP) liberando como produto o 2,4-dinitrofenolato (2,4-DNP).	46
Esquema 3 - Rota sintética para obtenção dos ligantes binucleantes.	56
Esquema 4 - Proposta mecanística para a hidrólise do diéster de fosfato promovida pelo complexo 1.....	100
Esquema 5 - Proposta mecanística para a hidrólise do diéster de fosfato promovida pelo complexo 2.....	102
Esquema 6 - Proposta mecanística para a hidrólise do diéster de fosfato promovida pelo complexo 3.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- 2,4 – BDNPP – bis(2,4-dinitrofenil)fosfato
 2,4 – dnpp – 2,4-dinitrofenilfosfato
 2,4 – dnp – 2,4-dinitrofenolato
 δ – deslocamento químico (NMR)
 δ – deformação angular simétrica ou assimétrica (IR)
 ϵ – coeficiente de absorção molar
 λ – comprimento de onda (nm)
 ΔE_p – diferença de potencial de pico
 ν – estiramento axial
 amig – aminoguanidina
 apur – 6 –aminopurina
 bpbmp– 2-bis[[(2-piridilmetil)-aminometil]-6-[(2-hidroxibenzil)-(2-piridilmetil)]aminometil]-4-metilfenol)
 CHES – Ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfônico
 cmff – 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol
 Complexo 1 - [(OH)Fe^{III}(μ -OH)Zn^{II}(H₂O)(L₁bpea)](ClO₄)
 Complexo 2 - [(OH)Fe^{III}(μ -OH)Zn^{II}(H₂O)(L₁bpea-amig)](ClO₄)
 Complexo 3 - [(OH)Fe^{III}(μ -OH)Zn^{II}(H₂O)(L₁bpea-apur)](ClO₄)
 DNA –ácido desoxirribonucléico do inglês *deoxiribonucleic acid*
 E_{1/2} – potencial de meia onda
 NHE – eletrodo normal de hidrogênio, do inglês *Normal Hydrogen Electrode*
 Epa – potencial de pico anódico
 Epc – potencial de pico catódico
 Fc/Fc⁺ – par redox ferroceno/ferrocínio
 H₂L₁bpea– 3-(((3-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil) amino) metil)-2 hidroxi-5-metilbenzaldeído
 H₂L₁bpea-amig- 2-(3-(((3-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzilideno)
 hidrazinacarboximidamida
 H₂L₁bpea-apur- 2-((2-(9H-purin-6-ilamino)etilamino)metil)-6-(((3-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol
 HEPES (7,0 – 8,0) Ácido 2-[4-(2-hidroxi-1-piperazinil)-etanosulfônico
 I – força iônica
 ipa – corrente de pico anódica
 ipc – corrente de pico catódica
 IUBMB – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
 k – constante de velocidade
 k_{cat} – constante catalítica
 K_M – constante de Michaelis-Menten
 K_{assoc} (Constante de associação) - $\approx 1/K_M$
 L1– 2-bis[[(2-piridilmetil)aminometil]-6-[(2hidroxibenzil)(2-piridilmetil)]aminometil]-4-metil-fenol)
 MES – Ácido 2- (N-morfolino)etanossulfônico
 pH – potencial hidrogeniônico
 pK_a – constante de dissociação ácida em escala logarítmica
 pK_w – constante de autoprotólise da água em escala logarítmica

PAPs – Fosfatases Ácidas Púrpuras

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês *ribonucleid acid*

^1H NMR– ressonância magnética nuclear de hidrogênio, do inglês *Hydrogen nuclear magnetic resonance*

TD-DFT/TDA – Tamm-Dancoff approximation

TS – Estado de transição, do inglês *transition state*

SUMÁRIO

1	JUSTIFICATIVA.....	21
1.1	A QUÍMICA BIOINORGÂNICA.....	21
1.2	METALOENZIMAS.....	22
1.3	METALOHIDROLASES	24
1.4	FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS (PAPS)	26
1.5	SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO.....	31
1.6	COMPOSTOS MODELO EM QUÍMICA BIOINORGÂNICA	34
1.6.1	COMPLEXOS MODELOS COMO HIDROLASES SINTÉTICAS	34
1.6.2	COMPLEXOS MODELOS PARA FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS	37
2	OBJETIVOS.....	40
2.1	OBJETIVO PRINCIPAL.....	40
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	MATERIAIS.....	41
3.2	MÉTODOS	42
3.2.1	ANÁLISE ELEMENTAR (CHN).....	42
3.2.2	ABSORÇÃO ATÔMICA (AA)	42
3.2.3	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO IR.....	43
3.2.4	ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA UV-VIS.....	43
3.2.5	ESTUDOS ELETROQUÍMICOS	43
3.2.6	TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA.....	44
3.2.7	ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	45
3.2.8	CÁLCULOS E CORRELAÇÕES.....	45
3.2.9	ESTUDO DE REATIVIDADE	46

3.2.10	SÍNTESE DOS LIGANTES	47
3.2.10.1	Preparo do bis(-2(piridin-2-il)etil)amina (bpea).....	47
3.2.10.2	Preparo do 3-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (bpeamff).....	48
3.2.10.3	Preparo do 2-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-4-metil-6-((piridin-2-il)metilamino)metil)fenol (BPEAMFFMetPY)	49
3.2.10.4	Preparo do 3-(((3-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído - H ₂ L1bpea	50
3.2.10.5	Preparo do 2-(3-(((3-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzilideno) hidrazinacarboximidamida - H ₂ L1bpea-amig.....	51
3.2.10.6	Síntese do 2-((2-(9H-purin-6-ilamino)etilamino)metil)-6-(((3-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol - H ₂ L1bpea-apur2	52
3.2.11	SÍNTESE DOS COMPLEXOS	52
3.2.11.1	Preparo do [(OH)Fe ^{III} (μ-OH)Zn ^{II} (H ₂ O)(L ₁ bpea)](ClO ₄) (1).....	53
3.2.11.2	Preparo do [(OH)Fe ^{III} (μ-OH)Zn ^{II} (H ₂ O)(L ₁ bpea-amig)](ClO ₄) (2).....	54
3.2.11.3	Preparo do [(OH)Fe ^{III} (μ-OH)Zn ^{II} (H ₂ O)(L ₁ bpea-apur)](ClO ₄) (3).....	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES.....	55
4.1.1	4.1.1 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO IR	57
4.1.2	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO- ¹ H NMR	61
4.1.3	ANÁLISE DE ELEMENTAR DE C, H E N	64
4.1.4	ESPECTROMETRIA DE MASSAS ESI-MS.....	65
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS.....	65
4.2.1	ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA	66
4.2.2	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO - IR.....	66
4.2.3	ANÁLISE ELEMENTAR DE C, H E N	70
4.2.4	ESPECTROMETRIA DE MASSAS ESI-MS.....	71
4.2.5	CÁLCULOS E CORRELAÇÕES	75
4.2.6	ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA – UV-VIS	80

4.2.7	ESTUDOS ELETROQUÍMICOS	85
4.2.8	TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA	87
4.2.9	REATIVIDADE- ATIVIDADE HIDROLÍTICA	90
4.2.9.1	Efeito do pH na hidrólise do 2,4-BDNPP	90
4.2.9.2	Efeito da concentração do substrato 2,4-BDNPP	93
4.2.9.3	PROPOSTAS MECANÍSTICAS PARA A HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP	100
5	CONCLUSÕES	103
6	REFERÊNCIAS.....	105

1 JUSTIFICATIVA

A síntese de compostos que se assemelham a determinadas enzimas, seja estrutural ou funcionalmente, tem sido uma área da ciência com destaque nos últimos anos. As enzimas desempenham papel fundamental em diversos processos biológicos se tornando extremamente notável ao ramo da pesquisa científica. A síntese dos denominados compostos biomiméticos tem sido perseguida como uma referência para o estudo dos sistemas de proteínas mais complexas e maiores já que estes compostos podem fornecer a base de aplicações inovadoras em medicina e chegar a um modelo consistente com as funções catalíticas desses grandes compostos. Em particular, a síntese de biomiméticos que têm a capacidade de clivar ligações fosfodiéster no DNA ganhou impulso considerável devido ao seu potencial como agentes anticancerígenos (Wang *et al.* 2011; Naik *et al.* 2016; Luong *et al.* 2016; Mukherjee *et al.* 2016; Li *et al.* 2016; Chennam *et al.* 2016; Tirel *et al.* 2014; Muxel *et al.* 2014). O campo do conhecimento conhecido hoje como química bioinorgânica ou química inorgânica biológica (Kaim e Schwederski 1994) atua na descoberta de novos modelos e com o objetivo de desenvolver compostos cada mais ativos e seletivos em relação aos seus substratos. Visto isso, tentativas de melhorar sua eficiência para essa reação têm envolvido modificações estruturais, como a inserção de grupos laterais (Souza *et al.* 2013; Camargo *et al.* 2018; Souza *et al.* 2015) para atuar como uma segunda coordenação. A tentativa de desenvolver compostos cada vez mais ativos e seletivos para diferentes substratos faz dessa área de estudo imprescindível para o avanço tecnológico.

1.1 A Química Bioinorgânica

A química bioinorgânica é uma ciência que atrai pesquisadores de todo mundo devido sua inter e multidisciplinaridade, já que abrange diferentes áreas como a bioquímica, toxicologia, fisiologia, farmacologia, microbiologia, física e a química. Na química ela está associada ao estudo da reatividade química dos íons metálicos frente a sistemas biológicos e sua importância está na busca do

entendimento de diversos princípios fundamentais da química no estudo de complicadas moléculas biológicas (Neves 2003).

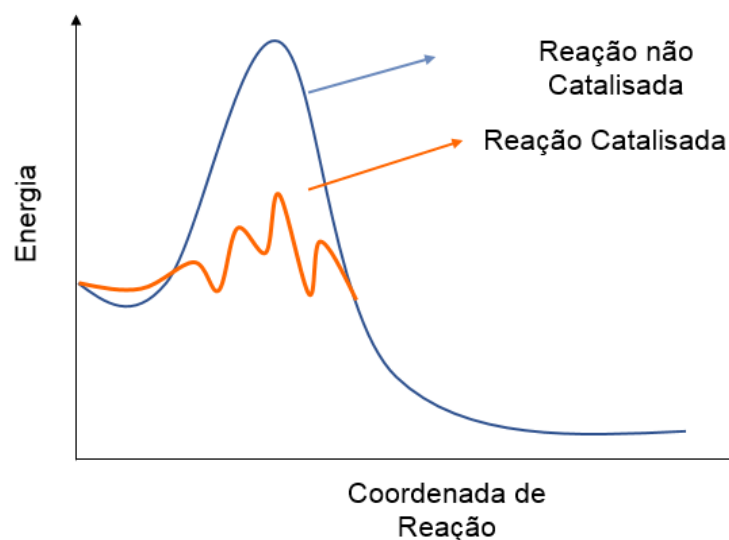
Embora a maioria das funções biológicas sejam desempenhadas por compostos orgânicos, a natureza aprendeu a utilizar as propriedades especiais dos metais, constituintes naturais de algumas enzimas, para exercer funções específicas ao processo da vida.

Dentre os sistemas biológicos de maior interesse tanto farmacológico como industrial, estão as enzimas. Estas são as biomoléculas mais extraordinárias dos sistemas vivos e apresentam como característica principal uma enorme eficiência catalítica, e ainda, algumas destas são alvos no desenvolvimento de fármacos para uma série de doenças como osteoporose, depressão, doenças neurodegenerativas como câncer, entre outras. Entende-se dessa forma que existe um grande interesse no estudo e conhecimento da função e atividades de enzimas em sistemas biológicos (Roat-Malone 2002; Mitić *et al.* 2006).

1.2 Metaloenzimas

Enzimas são proteínas que convertem rapidamente muitas moléculas de substrato em produtos com boa especificidade. Sabe-se que quase todas as reações dentro dos sistemas vivos são catalisadas por enzimas e que as mesmas atuam, na sua grande maioria, em soluções aquosas diluídas em condições brandas de temperatura e pH. Dentro do sistema imune, por exemplo, os neutrófilos secretam grânulos contendo várias enzimas que podem sintetizar compostos antibacterianos e também estão associadas à solução de inflamações (Farhad *et al.* 2017). Entende-se que maior parte do seu poder catalítico encontra-se na sua capacidade de aproximar os substratos em orientações favoráveis que promovam a formação dos estados de transição. As enzimas acabam por diminuir a energia de ativação, mudando o mecanismo de ação e acelerando as reações em que são empregadas como ilustrado na Figura 1 (Roat-Malone 2002; Nelson 2004).

Figura 1 - Diagrama de Energia para um sistema catalisado por uma enzima.



As enzimas podem requerer um componente prostético (não proteico) para desempenhar sua função catalítica, que é chamado de cofator, podendo este ser um íon metálico, uma molécula orgânica ou ambos, isto é, um composto de coordenação. Uma apoenzima é cataliticamente inativa sem a associação de o cofator que, neste caso, pode ser chamado de coenzima, quando se refere à uma molécula orgânica. Quando o cofator é um íon metálico, podem ocorrer diferentes situações onde o metal pode ser retido pela proteína se encontrando permanente associado, ou, a ligação com o metal é fraca, com um alto grau de dissociação, ligando-se apenas no momento da função catalítica.

O papel que os metais desempenham nos processos catalíticos podem ser diversos: Essas espécies podem ligar-se aos substratos de modo à orientá-los de maneira adequada para a ocorrência da reação; Os íons metálicos possuem a capacidade de mediar reações de oxidorredução, visto que, a maioria podem alterar reversivelmente seus estados de oxidação; A estabilização eletrostática de cargas negativas e a catálise nucleofílica pela ionização da água também podem ser desempenhados por íon metálicos. As diferentes maneiras que os metais participam dos processos catalíticos estão relacionados à efeitos estruturais e eletrônicos exercidos pela associação do metal. Estes aspectos estão intimamente relacionados

entre si e dão origem a uma substancial diminuição da energia de ativação permitindo a função catalítica da enzima (Chapman *et al.* 1983 e Vallee 1968).

As enzimas podem ser classificadas estruturalmente, de acordo com o a natureza química do grupo prostético em metaloproteínas, metaloporfirinas e metaloflavina. Como também, podem ser classificadas cataliticamente, de acordo com as reações que catalisam (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação das enzimas pela reação que catalisam segundo a IUBMB.

Classe	Tipos De Reações Catalisadas
Oxidoredutases	Oxidação-redução.
Transferases	Transferência de grupos doadores para receptores.
Hidrolases	Clivagem de ligações, com intervenção de água.
Liasas	Clivagem de ligações, sem hidrólise ou oxidação.
Isomerases	Isomerizações.
Ligases	Formação de ligações, por condensação de substâncias.

Fonte: Stryer 1996.

Atualmente muitos estudos a respeito desses sistemas tem sido reportados e mostraram que a hidrólise de ésteres carboxílicos, amidas e mono, di, e triésteres de fosfatos em sistemas biológicos é geralmente catalisada por metalo hidrolases com sítios metálicos binucleares (Comba *et al.* 2012). Dessa forma as metalohidrolases são as metaloenzimas de interesse no presente trabalho.

1.3 Metalohidrolases

Metalohidrolases binucleares constituem um grande e estruturalmente diverso grupo de enzimas que possuem sítios ativos binucleares para catalisar a hidrólise de amidas, ésteres de fosfato e de ácidos carboxílicos (Crichton 2008). Algumas

enzimas pertencentes à esta classe são demonstradas na Tabela 2, juntamente com seu conteúdo metálico (Mitic *et al.* 2006).

Tabela 2 - Algumas enzimas hidrolíticas binucleares: conteúdo metálico no sítio ativo; papel metabólico e potencialidade farmacológica.

Enzima	Sítio ativo	Papel metabólico	Aplicação
Fosfatase ácida púrpura (PAP)	Fe ^{III} Fe ^{II} ; Fe ^{III} Zn ^{II} Fe ^{III} Mn ^{II}	Reabsorção óssea, transporte de ferro, geração de ROS	Drogas anti-osteoporóticas
Urease	Ni ^{II} Ni ^{II}	Hidrólise da uréia	Pesticidas e drogas contra poliomielite
Leucina aminopeptidase	Zn ^{II} Zn ^{II}	Degradação protéica e síntese de aminoácidos	Fármacos contra leucemia mielóide, fibrose cística e distúrbios oculares
Inositol monofosfatase	Mg ^{II} Mg ^{II}	Transdução de sinal	Fármacos contra distúrbios depressivos

Fonte: Mitic *et al.* 2006.

Apesar da grande versatilidade estrutural e variações no íon metálico (Tabela 2), as metalohidrolases binucleares possuem um mecanismo de interação com o substrato semelhante por toda essa classe. Porém, a identidade do nucleófilo atacante, a estabilização dos intermediários da reação, e a relativa contribuição dos íons metálicos variam substancialmente (Mitic *et al.* 2006). Os íons metálicos encontrados nessas enzimas, em geral, apresentam efeitos cooperativos atuando de três maneiras distintas em mecanismos enzimáticos. Primeiramente, em algumas enzimas, como as fosfatases ácidas púrpuras, podem agir diminuindo o valor do pKa de moléculas de água ligadas ao metal, podendo gerar nucleófilos em condições de pH fisiológico. No segundo caso, o metal pode agir como sítio de ligação da enzima com o substrato. Finalmente, o centro metálico pode atuar no mecanismo hidrolítico por sua interação com o grupo de saída, desde que este possua uma carga negativa durante o estado de transição (Mitic *et al.* 2006; Haas 2009).

A única enzima da classe das hidrolases que necessita de um sítio ativo heterovalente para que sua função seja estabelecida é a Fosfatase Ácida Púrpura, sendo esta a enzima foco do trabalho aqui apresentado.

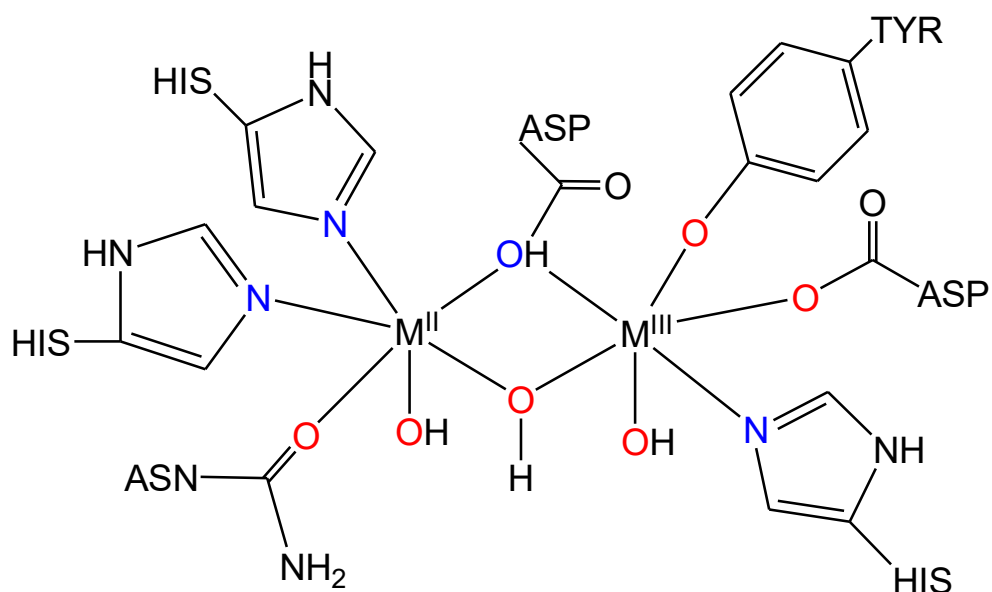
1.4 Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs)

Fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) são metaloenzimas contendo um sítio ativo binuclear de valência mista capaz de catalisar a hidrólise de ésteres de fosfato e anidridos em pH ácido (faixa de pH entre 4 e 7) e é caracterizada pela intensa coloração púrpura de sua forma inativa (Klabunde 1997).

As PAPs possuem um sítio ativo com a combinação $Fe^{III}M^{II}$ ($M = Fe, Mn$ ou Zn) (Figura 2) e são encontradas numa variedade de seres vivos, indo de bactérias à fungos, sendo encontradas também em plantas e animais, incluindo lisossomos humanos (Klabunde e Krebs 1997; Than e Feldmann 1999; Schenk *et al.* 1999). A cor púrpura observada nas PAPs em $\lambda_{max} = 505-550$ nm com $\epsilon = 4,000$ L mol⁻¹ cm⁻¹, é devido ao processo de transferência de carga tirosinato $\rightarrow Fe^{III}$ (Doi 1988; Vincent 1990).

As PAPs de mamíferos utilizam exclusivamente um centro $Fe^{III} Fe^{II/III}$ sendo que apenas a forma de valência mista é hidroliticamente ativa, contudo, a oxidação facilmente reversível do centro metálico está ligada à atividade de peroxidase dessa enzima bifuncional levando a formação de íons superóxido e íons hidroxila (Kaija *et al.* 2002; Bernhardt 2004).

Figura 2- Representação esquemática do sítio ativo das PAPs.



A primeira PAP que teve sua estrutura cristalina determinada, por difração de Raios X, foi a enzima do feijão vermelho (kidney bean – kbPAP) (Figura 3). Outras que tiveram estruturas resolvidas são a resistente ao tartarato (tarPAP), a encontrada nos ossos dos ratos (rbTRAP) e a da ufPAP (fluido uterino de suínos), dentre outras (Uppenberg *et al.* 1999; Lindqvist *et al.* 1999; Guddat *et al.* 1999). A partir das informações até então obtidas, tornou-se possível fazer maiores considerações acerca do mecanismo pelo qual essas enzimas hidrolisam ésteres de fosfato em condições ácidas após se obterem as estruturas resolvidas das PAPs. Os resultados obtidos mostraram a importância da obtenção de cristais para a determinação da estrutura desses grandes compostos e seus mecanismos de ação.

Figura 3 - Fosfatase ácida púrpura do feijão vermelho (kbPAP) .

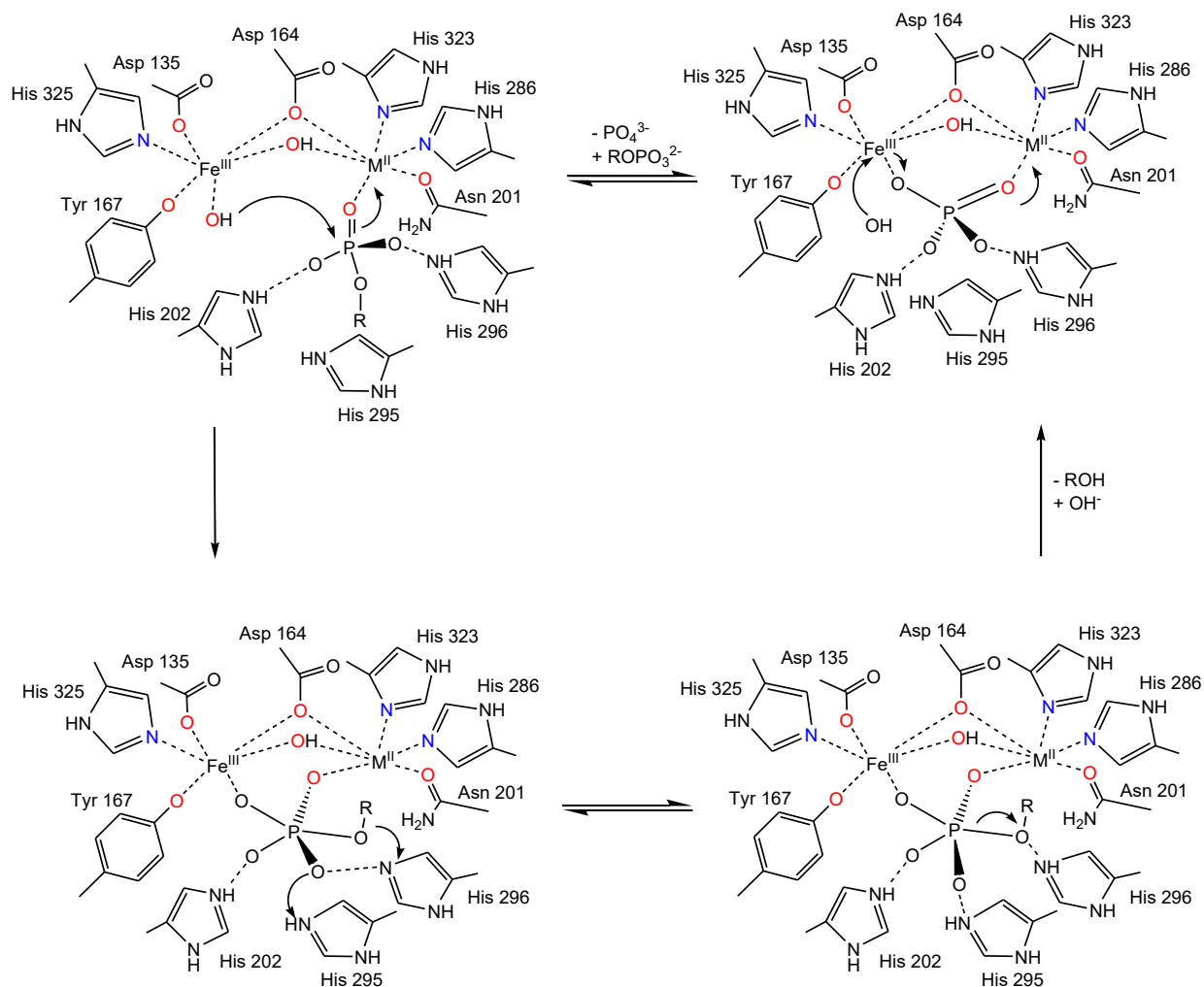


Fonte: Klabunde *et al.* 1996 (Figura adaptada de PDB).

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

Três mecanismos já foram propostos para a ação desses compostos. No primeiro mecanismo (Esquema 1), inicialmente proposto por Klabunde e colaboradores (Klabunde *et al.* 1997), a ação é descrita como uma catálise assistida por metal através de um mecanismo S_N2 , onde o grupo fosfato preferencialmente se liga ao M^{II} (Fe ou Zn). Subseqüentemente o fosfato é atacado pelo grupo OH^- ligado ao centro de Fe^{III} . Nesse mecanismo é ressaltado o forte caráter ácido do íon Fe^{III} , atuando como ácido de Lewis podendo gerar um grupo hidróxido nucleofílico a partir de uma molécula de água coordenada em sua primeira esfera de coordenação. Os resíduos de histidina próximos ao centro bimetálico (His202, His295 e His296), por sua vez, estão em posições adequadas para interagir com o íon fosfato reduzindo a densidade eletrônica do átomo de fósforo pela estabilização da carga negativa sobre os dois átomos de oxigênio do grupo fosfato por ligações de hidrogênio.

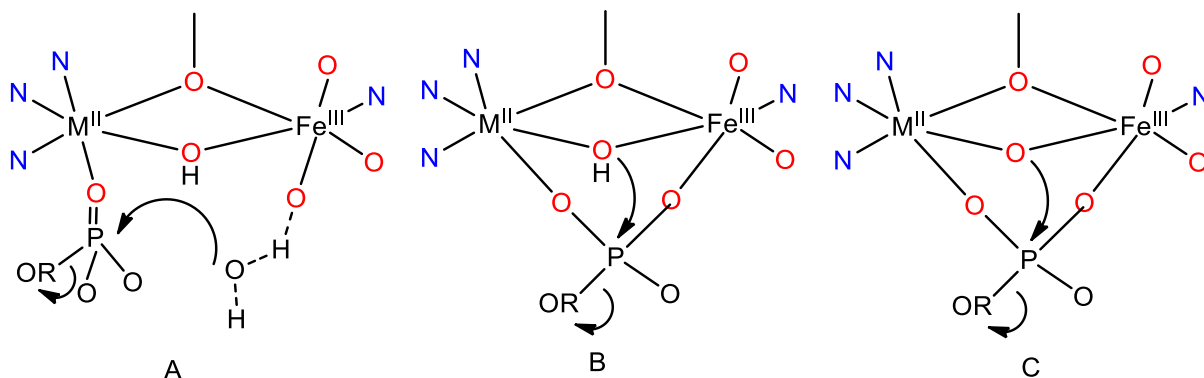
Esquema 1 - Mecanismo proposto por Klabunde e colaboradores para a ação de PAPs na catálise de hidrólise de ésteres de fosfato.



Fonte: Adaptado de Klabunde *et al.* 1997.

No segundo mecanismo (Figura 4 A), o hidróxido ligado ao centro de Fe^{III} atua como uma base geral para desprotonar uma segunda molécula de água, que ataca o fosfato ligado ao M^{II} . Em outro mecanismo (Figura 4 B) o éster de fosfato faz uma ponte entre Fe^{III} e M^{II} . A ponte $\mu-OH$, convenientemente orientada, atua como um nucleófilo e ataca o fosfato em ponte em orientação oposta ao grupo de saída. Um quarto mecanismo foi descrito por Schenk e colaboradores ao analisarem uma PAP de batata doce com centro metálico $Fe^{III}Mn^{II}$ (Schenk *et al.* 1999). Neste mecanismo, uma ponte $\mu-oxo$ é responsável pelo ataque nucleofílico ao fosfato (Figura 4 C).

Figura 4 - Propostas de ataque nucleofílico para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAPs.



Fonte: Adaptadas de A (Merkx *et al.* 1999); B (Wang *et al.* 1999) e C (Schenk *et al.* 1999 e Lanznaster *et al.* 2005).

As PAPs de mamíferos têm sido reconhecidas como potenciais alvos para o desenvolvimento de quimioterápicos no tratamento da osteoporose (Oddie *et al.* 2000; Moss 1995; Valizadeh *et al.* 2004; Feder *et al.* 2012; Hussein *et al.* 2018). Em contraste, as PAPs vegetais são menos seletivas em relação à sua composição de íons metálicos, usando predominantemente centros $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ ou $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}$ (Schenk *et al.* 2013; Schenk *et al.* 1999; Durmus *et al.* 1999; Beck *et al.* 1999). As fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) têm atraído atenção considerável de enzimologistas, químicos inorgânicos e medicinais, bem como biólogos de plantas devido às suas propriedades biofísicas e seu potencial como (i) alvos para o desenvolvimento de drogas anti-osteoporóticas e (ii) aditivos para fertilizantes (Wilcox 1996; Mitić *et al.* 2006; Schenk *et al.* 2013).

O papel das PAPs em organismos vivos ainda não é totalmente estabelecido, desta maneira, a síntese de complexos modelo é extremamente útil para o maior entendimento acerca do processo de ação dessas enzimas, podendo-se obter informações estruturais e dos mecanismos envolvidos nas reações, uma vez que se consiga simular todo o ambiente enzimático envolvido no processo de catálise.

O desenvolvimento de modelos biomiméticos capazes de simular a primeira esfera de coordenação de enzimas já é um processo bastante conhecido e traz bons resultados quanto a reprodução de propriedades estruturais e eletrônicas das enzimas de interesse. Pode-se citar como exemplo modelos da enzima *Catecol*

oxidase que oxida catecóis a quinonas, que conseguem oxidar catecóis ativados, como o 3,5-di-*terc*-butilcatecol, com constantes catalíticas (k_{cat}) cerca de 10^4 a 10^5 vezes menores quando comparadas a oxidação de substratos não ativados pela enzima (Lindström 2003) e outros com resultados tão eficientes quanto da enzima (Ackermann, Buchler e Meyer 2007).

Visto a importância da elaboração de modelos biomiméticos e sua contribuição para o entendimento das PAPs, o atual objetivo das pesquisas é tornar os modelos cada vez mais eficientes e mais seletivos, tais como as enzimas e, desta forma, acredita-se que um caminho possível para alcançar resultados tão eficientes quanto os das enzimas seja através de estudos dos resíduos de aminoácidos definidos como a “Segunda Esfera de Coordenação”, esses resíduos não estão diretamente coordenados ao centro metálico no sítio ativo, porém, são indispensáveis para a atividade.

1.5 Segunda Esfera de Coordenação

A segunda esfera de coordenação pode ser definida como espécies químicas não covalentemente ligadas ao metal pertencente ao sítio ativo de uma enzima. Essas “cadeias laterais” que se encontram próximas ao sítio ativo podem ser responsáveis por uma melhor afinidade e reconhecimento quanto ao substrato a partir de junções que podem interagir de forma seletiva com o substrato desejado; podem também estabilizar o estado de transição, ser responsável pela geração da espécie ativa na catálise assim como também podem atuar na estabilização do grupo de saída.

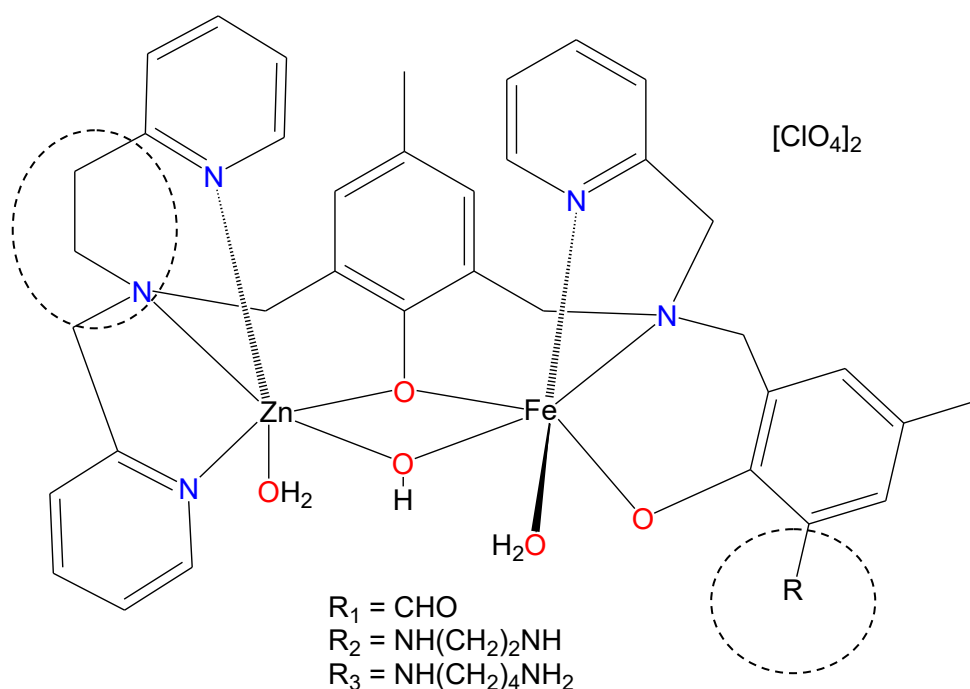
Com o objetivo de simular a segunda esfera de coordenação são utilizados polímeros, dendrímeros, grupos laterais funcionais como aminas e ácidos carboxílicos, dispositivos supramoleculares, como ciclodextrinas, calix[n]arenes, nanoestruturas e até cadeias proteicas como grupos laterais (Lindström 2003; Neves *et al.* 2007)

O funcionamento da segunda esfera de coordenação para a atividade catalítica se dá através de interações intermoleculares como: ligação de hidrogênio,

interações eletrostáticas, efeitos hidrofóbicos e forças de Van der Waals (Neves *et al.* 2007).

A fim de estudar o mecanismo de hidrólise fosfodiéster empregada por um biomimético da hidrolase bimetálica, Silva e colaboradores relataram recentemente uma modificação do ligante inicial H2L1 (Figura 5) para sondar os efeitos na segunda esfera de coordenação quando um grupo amino terminal foi inserido (Silva *et al.* 2017). Os círculos tracejados mostram os locais onde as modificações foram realizadas, grupos amino terminais foram introduzidos do lado o sítio de Fe^{III}, enquanto um carbono foi introduzido do lado do sítio de Zn^{II}.

Figura 5 - Complexo de Fe^{III}Zn^{II} previamente reportado por Silva *et al.* contendo grupo amino como segunda esfera de coordenação.



Fonte: Adaptada de Silva *et al.* 2017.

Os resultados obtidos por Silva e colaboradores foram consistentes com os de um estudo relacionado, onde um polímero com aminas terminais foi usado para imitar os resíduos de aminoácidos das PAPs (Souza *et al.* 2013; Souza *et al.* 2015, Silva *et al.* 2017). Todos estes sistemas apresentaram melhor eficiência catalítica em relação ao substrato do modelo ativado bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP). Além disso, a introdução de grupos de pireno na esfera externa de um mimético Fe^{III}Zn^{II} do sítio ativo de PAP aumentou as interações de ligação hidrofóbica entre o

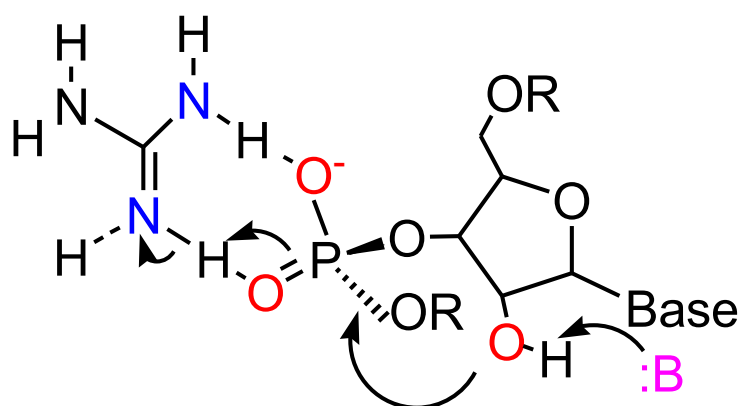
complexo e o 2,4-BDNPP, levando também a uma melhoria da eficiência catalítica do biomimético (Camargo *et al.* 2018).

Estes estudos demonstram que introduzindo modificações na segunda esfera de coordenação, a eficiência catalítica da metalo-hidrolase pode ser significativamente aumentada proporcionando um ambiente que melhore a associação entre o catalisador e o reagente.

No contexto do desenvolvimento de um biomimético com maior eficiência em relação ao DNA, estudos prévios que investigaram os efeitos positivos dos ligantes funcionalizados com guanidina na clivagem de éster de fosfato e reconhecimento de RNA foram de grande interesse (Perreault 1997; 2008; Salvio 2017).

O grupo funcional guanidínio é comumente usado na natureza para reconhecer e ligar ânions através do emparelhamento iônico e ligação de hidrogênio. Padrões específicos de ligações de hidrogênio podem ser encontrados em estruturas cristalinas de sais simples de guanidínio. A análise destes sais simples revela uma variedade de características que são encontradas em sistemas naturais. Estas características foram aplicadas a uma série de fosfodiesterases artificiais para o RNA (Figura 6). Estes receptores incorporam grupos de guanidínio posicionados para imitar os padrões de ligação de hidrogênio encontrados em sais de guanidínio simples e enzimas naturais (Perreault 1997, Tjioe *et al.*, 2011).

Figura 6 - Ilustração da interação entre o grupo guanidina e fosfodiesterases.



Fonte: Adaptado de Perreault 1997.

Outro grupo interessante de aminas são as purinas, que são compostas de um anel de pirimidina ligado a um anel de imidazol. Duas purinas, adenina e guanina, formam os blocos de construção do DNA e RNA, e são componentes

importantes de várias biomoléculas, como ATP, GTP, AMPc, NADH e Coenzima A (Mandal 2017). As purinas são compostas por um anel pirimidínico e um anel imidazólico fundidos em conjunto possuindo uma estrutura rígida e planar e dessa forma capaz de fornecer características distintas importantes na interação entre o complexo e o substrato.

Até o momento, há poucos relatos descrevendo o uso de purinas na síntese de compostos biomiméticos (Mandal 2017; Amo-Ochoa *et al.* 2013; Holmen 1997; Jean 2001) apesar de seu potencial promissor em melhorar as interações entre esses compostos e o substrato do DNA, o que também pode levar a reatividade aumentada.

Diante ao exposto, acredita-se que a derivatização de novos compostos contendo grupos aminoguanidinas e aminopurinas possa trazer grandes contribuições no estudo de segunda esfera de coordenação, bem pouco desenvolvido até então em modelos biomiméticos para PAPs.

1.6 Compostos Modelo em Química Bioinorgânica

Até o momento em que a primeira estrutura cristalina das PAPs foi obtida, muito se inferiu sobre a composição do seu sítio ativo através do estudo de complexos modelo, podendo-se então comparar as propriedades físico-químicas obtidas diretamente da enzima com as propriedades obtidas para os modelos. Dessa forma, foram reportados na literatura diversos complexos com diferentes ligantes contendo átomos de oxigênio e nitrogênio doadores (Than 1999). A partir do momento de foram obtidas as estruturas de raios X desses compostos puderam então ser confirmadas muitas das propostas que haviam sido previamente reportadas.

1.6.1 COMPLEXOS MODELOS COMO HIDROLASES SINTÉTICAS

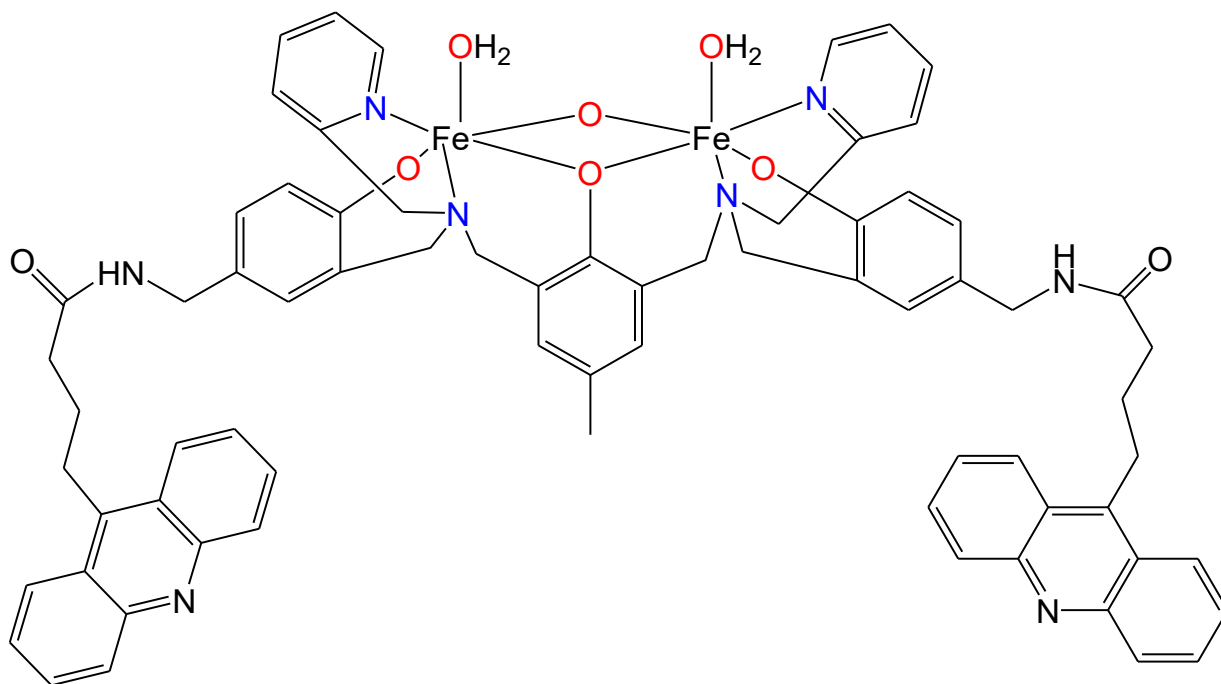
Nos dias atuais, a utilização de compostos biomiméticos para a hidrólise de ácidos nucleicos se encontra como alvo de constante pesquisa devido sua habilidade de clivar essas macromoléculas eficientemente, de maneira não degradativa e com alto grau de seletividade para sítios e/ou estruturas específicas,

podendo dessa forma oferecer diversas aplicações para a manipulação de genes, desenvolvimento de sondas moleculares e ainda novos compostos com finalidades terapêuticas (Mancin 2012).

O interesse em modelar a reatividade de metalohidrolases é, indiscutivelmente, uma área de grande interesse científico (Smith *et al.* 2007; Liu 2004). Em paralelo, o poder catalítico de complexos mono e binucleares na hidrólise de ésteres e anidridos do ácido fosfórico podem fornecer informações importantes para a modelagem molecular dos catalisadores, bem como o auxílio na elucidação dos mecanismos de reação das enzimas nativas (Liu 2004).

Como exemplo de uma hidrolase sintética pode-se citar o trabalho de Chen e colaboradores, onde eles apresentam a síntese e a atividade de um complexo binuclear de Fe^{III} contendo dois grupos acridina (Figura 7) (Chen *et al.* 2009). O complexo apresentou uma alta afinidade pelo DNA demonstrado pelo alto valor na constante de ligação ($K_b = 7,6 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$). Um resultado muito importante neste sistema foi aumento de 300 vezes em relação ao complexo que não possui os grupos acridina. Além disso, experimentos na ausência de oxigênio apontam para um mecanismo hidrolítico o que é altamente desejável para futuras aplicações bioquímicas deste sistema.

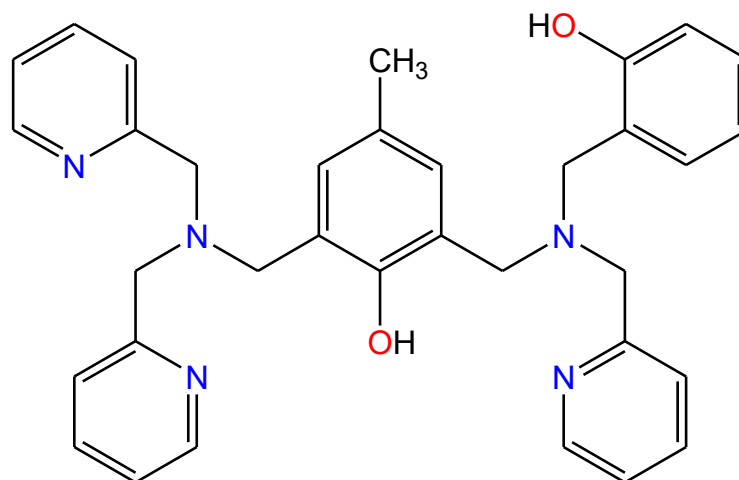
Figura 7 - Exemplo de uma Nuclease sintética.



Fonte: Adaptado de Chen *et al.* 2009.

Muitos complexos homo e heterobinucleares têm sido citados mostrando excelentes resultados na hidrólise de ésteres de fosfato. Neves e colaboradores a partir do ligante não simétrico H₂bpbmp (Figura 8), sintetizaram compostos que são capazes de atuar na hidrólise do substrato modelo bis(2,4-dinitrofenilfosfato)(2,4-BDNPP) (Batista *et al.* 2003, Gahan *et al.* 2009, Greatti *et al.* 2008; Lanznaster *et al.* 2005; Neves *et al.* 2007; Peralta 2010, Schenk *et al.* 2008; Smith *et al.* 2007; Xavier *et al.* 2009). Dentre os compostos sintetizados o que apresentou maior atividade na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP foi o complexo [Ga^{III}Co^{II}(bpbmp)(μ-OAc)₂]ClO₄ onde bpbmp = 2-bis[{{(2-piridilmetil)-aminometil}-6-{{(2-hidroxibenzil)-(2-piridilmetil)}}aminometil]-4-metilfenol)) e foi obtido um fator de aceleração sobre a reação não catalisada de 10.000 vezes (Xavier *et al.* 2009).

Figura 8 - Estrutura química do ligante não simétrico H₂bpmp.



Fonte: Adaptado de Neves *et al.* 2007.

A hidrólise de substratos modelo (2,4-BDNPP) e também do DNA por complexos de Cu^{II} sintetizados com ligantes binucleantes simétricos e não-simétricos contendo braços piridínicos e fenólicos foi reportada por Rossi e colaboradores, mostrando que complexos de Cu^{II} podem ser extremamente versáteis (Rossi *et al.* 2002 e 2005).

1.6.2 COMPLEXOS MODELOS PARA FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS

A síntese de biomiméticos que têm a capacidade de clivar ligações fosfodiéster no DNA ganhou impulso considerável devido ao seu potencial como agentes antitumorais (Wang *et al.* 2011; Naik *et al.* 2016; Luong *et al.* 2016; Mukherjee 2016; Li *et al.* 2016; Chennam *et al.* 2016; Tirel *et al.* 2014; Muxel *et al.* 2014). No entanto, estes compostos têm apresentado geralmente uma afinidade e reatividade bastante baixas para o DNA (oxidativo ou hidrolítico).

Em 1995, foi reportado por Nordlander um complexo descrito como modelo funcional para as PAPs. Esse complexo teve sua atividade catalítica avaliada frente a reação de hidrólise do 4-nitrofenilfostato e apresentou uma atividade acelerada de 160 vezes em relação a reação não catalisada, muito superior às atividades reportadas até a data de sua publicação.

Neves e colaboradores publicaram um complexo binuclear de valência mista $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})(\text{bpbpmp})](\text{ClO}_4)_2$ em 2007, representando o primeiro modelo estrutural para o sítio ativo da kbPAP (PAP do feijão) com um grupo fenolato terminal, uma ponte hidróxido e uma molécula de água ligada ao sítio de Fe^{III} e apresentou um fator de aceleração de 4.800 vezes (Neves *et al.* 2007).

No que diz respeito a influência do tamanho do anel quelato de complexos metálicos na eficiência catalítica do mesmos, alguns trabalhos já foram descritos e com resultados promissores. McKeown *et al.* 2013 e colaboradores, estudaram a expansão de ligantes bis-dipiridil de um quelato de cinco a seis membros para hidrogenilação do etileno catalisada por Pt^{II} por uma via não ácida, o qual proporcionou um aumento da atividade. Os estudos das etapas elementares do ciclo catalítico atribuíram o desempenho melhorado a níveis elevados temperaturas a uma mudança favorável na entropia de ativação com um aumento no tamanho do anel quelato. Este resultado abre caminho para diversos outros, já que ainda não foram reportados diferentes estudos com este foco na catálise de ésteres de fosfato, servindo como motivação para tal.

A síntese de pequenas moléculas que mimetizam o sítio ativo de PAPs tem sido perseguida como uma referência para o estudo dos sistemas de proteínas mais complexas e maiores, mas também porque estes compostos podem fornecer a base de aplicações inovadoras em medicina (como quimioterápicos) e agricultura (como aditivos para fertilizantes) (Camargo *et al.* 2015, Comba *et al.* 2012, Souza *et al.* 2015, Silva 2017, Camargo *et al.* 2018, Comba *et al.* 2012, Peralta *et al.* 2010, Piovezan *et al.* 2010, Lanznaster *et al.* 2002, Neves *et al.* 2007, Lanznaster *et al.* 2005, Smith *et al.* 2007, Schenk *et al.* 2008, Xavier *et al.* 2009, Smith *et al.* 2012, Bosch *et al.* 2014, Roberts 2015; Bernhardt *et al.* 2015, Bosch *et al.* 2015 e Bosch *et al.* 2016).

Neste sentido, o presente trabalho relata a síntese e caracterização por estudos espectroscópicos e computacionais de três novos ligantes e seus respectivos complexos $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}$, a partir do ligante H2L1 (Figura 5) como plataforma. O ligante mostrado na Figura 5 sintetizado por Silva teve aqui mantido a modificação no primeiro anel do sítio de Zn^{II} e ainda foi realizado mais um aumento da cadeia de carbono no segundo anel com o objetivo de se observar o efeito do tamanho do anel quelato na reatividade desses compostos. A escolha da combinação $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ decorre da existência desses metais no sítio ativo das PAPs e

se sustenta na facilidade da elucidação dos resultados apresentados, pois, o metal Zn^{II} possuindo um sistema d^{10} com todos os orbitais preenchidos facilita a interpretação das análises realizadas.

A fim de sondar os efeitos da segunda esfera de coordenação na reatividade dos complexos em direção ao DNA e 2,4-BDNPP, foram inseridos os grupos laterais aminoguanidina (amig) e 6-aminopurina (apur) no ligante primeiramente modificado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Projetar, sintetizar e caracterizar novos ligantes derivatizados com os grupos aminoguanidina e 6-aminopurina e seus complexos inspirados em sistemas biológicos que apresentem propriedades adequadas ao estudo destes frente a diferentes ésteres de fosfato de modo a analisar o efeito da segunda esfera de coordenação na atividade catalítica dos mesmos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar novos ligantes polidentados, com diferentes números de membros na porção macia dos ligantes.
- Sintetizar novos ligantes derivatizados com os grupos aminoguanidina e 6-aminopurina a partir do ligante inicial;
- Sintetizar e comparar as propriedades físico-químicas dos novos complexos sintetizados com compostos semelhantes reportados na literatura;
- Estudos de reatividade dos complexos sintetizados na hidrólise de ésteres de fosfato buscando compreender o mecanismo de atividade dos mesmos e comparar com outros modelos já descritos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Os seguintes reagentes, materiais, gases e solventes empregados nas sínteses e análises, foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia: Cloreto de hidroxilamônio >99%, p-cresol >99%, hidróxido de sódio, ácido clorídrico 37%, sulfato de sódio anidro, formaldeído 37% em H₂O, hidróxido de potássio, etilenoglicol, cloreto de tosila, dietilenotriamina, salicilaldeído, trietilamina >99%, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, borohidreto de sódio, hidróxido de lítio, ácido sulfúrico 98%, ácido acético 33%, brometo de potássio grau espectroscópico, bicarbonato de aminoguanidina, 6-aminopurina, cloreto de potássio, cloreto de tionila, tampões biológicos MES, HEPES, CHES, perclorato de lítio, carvão ativo, celite, sílica gel azul, perclorato de ferro^{III} nonahidratado, perclorato de zinco^{II} hexahidratado, acetato de sódio trihidratado, perclorato de sódio, ferroceno, argônio 5.0, hidrogênio, nitrogênio 2.0, , DMSO deuterado, clorofórmio deuterado, água deuterada, clorofórmio PA, acetonitrila PA, diclorometano PA, isopropanol PA, metanol PA, tetrahidrofurano PA, etanol absoluto, éter etílico PA, éter de petróleo, benzeno, acetona PA, etanol, acetonitrila e DMSO grau espectroscópico.

Foram purificados antes de utilizados os seguintes reagentes: hexafluorofosfato de tetrabutílamônio recristalizado em etanol, 2-vinilpiridina (destilada à pressão reduzida), Trietilamina 37% e 2-(2-aminometil)piridina foram destilados previamente. 2,4-dinitrofenol (recristalizado em clorofórmio). Os compostos bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP) (Bunton, 1969) e 2,4-dinitrofenilfosfato (2,4-dnpp) (Rawji, 1981) foram sintetizados, purificados e caracterizados de acordo com seus respectivos procedimentos descritos na literatura.

3.2 MÉTODOS

A síntese dos ligantes foi baseada na tentativa de mimetizar o sítio ativo das PAPs, ou seja, mimetizar a interação dos aminoácidos presentes na estrutura da molécula. Após a caracterização dos intermediários e ligantes finais, foram sintetizados e caracterizados os respectivos complexos heterobimetálicos 1, 2 e 3.

Os cálculos utilizando DFT foram realizados para a validação de estruturas, visto a não obtenção de cristais adequados para a análise por cristalografia de Raios X.

O estudo das propriedades físico-químicas dos diferentes compostos sintetizados foi utilizado para comparação da influência dos grupos laterais aminoguanidina e aminopurina inseridos no ligante iniciais na reatividade de modelos para PAPs.

Os estudos de reatividade frente a substratos modelo adequados avaliaram a capacidade catalítica dos compostos sintetizados na tentativa de contribuir para a elucidação do mecanismo pelo qual a clivagem hidrolítica se processa.

3.2.1 ANÁLISE ELEMENTAR (CHN)

Análises elementares de carbono, hidrogênio e oxigênio (CHN) com o objetivo de determinar a fórmula mínima e conseqüente fórmula molecular dos compostos sintetizados foram efetuadas em um aparelho Perkin-Elmer 2400 provido de detectores para C, H, N e S na central de análises da Universidade Federal de Santa Catarina para o complexo 1. O restante dos compostos analisados (ligantes H₂L1bpea, H₂L1bpea-amig, H₂L1bpea-apur, complexo 2 e 3) foram efetuadas em um mesmo equipamento na Central analítica do IQ-USP.

3.2.2 ABSORÇÃO ATÔMICA (AA)

A espectrometria de absorção atômica foi realizada em um espectrômetro de absorção Perkin Elmer PinAAcle 900T com o objetivo de determinar qualitativa e

quantitativamente a presença dos metais Fe e Zn, sendo realizados de acordo com as especificações recomendadas pelo fabricante. A total operação e coleta e foram realizados pela servidora Jucélia Beatriz Dario para posterior tratamento dos dados obtidos.

3.2.3 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO IR

Os espectros no infravermelho foram realizados em um espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR – 2000, na região de 4000 a 450 cm^{-1} . As amostras sólidas foram preparadas por dispersão em KBr de grau espectroscópico, com o qual se trabalha sob uma lâmpada de 200 W em ambiente com umidade controlada, e prensadas (10 toneladas) formando pastilhas com cerca de 1 cm de diâmetro e 0,5 mm de espessura. Estas pastilhas são postas diretamente no caminho óptico do equipamento, analisando-se, então, o percentual de transmitância (%T) da luz. Já para a análise de amostras não sólidas devem ser preparadas pastilhas de KBr do mesmo modo já descrito sobre as quais foram adicionadas gotas do óleo.

3.2.4 ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA UV-VIS

Os espectros electricos foram obtidos para todos os complexos na faixa de 300-700 nm em CH_3CN , $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v) e CH_2Cl_2 como solventes, utilizando um espectrofotetro Perkin-Elmer (modelo Lambda-750). A análise foi realizada utilizando solventes de grau espectroscópico e cubetas de quartzo com capacidade de 1 mL e percurso óptico de 1,00 cm. Os valores de ϵ são dados em $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

3.2.5 ESTUDOS ELETROQUÍMICOS

O comportamento redox dos complexos foi investigado por voltametria de onda quadrada em um potenciostato-galvanostato modelo Epsilon EC/2000. Os experimentos foram realizados em soluções de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v) sob atmosfera de argônio. Cloreto de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foi utilizado como eletrólito suporte e as células eletroquímicas foram compostas por três eletrodos: trabalho – carbono vítreo; auxiliar - platina; referencia - Ag/Ag^+ . Para a correção do eletrodo de

referência o sal hexacianoferrato(III) de potássio ($E_{1/2}$ vs NHE = 358 mV) foi usado (Lide 2000).

A reversibilidade dos processos eletroquímicos foi analisada considerando os seguintes pontos:

- Processos reversíveis: O módulo da diferença entre os potenciais de pico catódico e anódico ($\Delta E_p = |E_{pc} - E_{pa}|$) deve ser de 59 mV para processos reversíveis que transferem apenas 1 e⁻. A razão i_{pc} e i_{pa} deve ser aproximadamente igual a 1, sendo i_{pc} a corrente máxima catódica e i_{pa} a corrente máxima anódica.
- Processos *quasi*-reversíveis: Os potenciais de pico (E_p) aumentam com o aumento da velocidade de varredura. Os valores de ΔE_p variam de maneira pronunciada de acordo com a velocidade de varredura de potenciais.
- Processos irreversíveis: Ao efetuar varreduras em diferentes velocidades os potenciais deslocam-se sempre para sentidos anódicos (E_{pa}) ou catódicos (E_{pc}) não se observando, geralmente, o pico de retorno.

3.2.6 TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

As constantes de protonação para os complexos 1, 2 e 3 foram investigadas usando um titulador automático Titrino plus Methron 848 equipado com um eletrodo combinado (Ag/AgCl) calibrado para ler $-\log[H^+]$ diretamente, designado como pH. A temperatura da experiência foi mantida a $25,00 \pm 0,05$ °C e utilizou-se água bidestilada sem gás na presença de $KMnO_4$ para preparar as soluções.

O eletrodo foi calibrado usando os dados obtidos da titulação de um volume conhecido de uma solução padrão de HCl $0,0100$ mol L⁻¹ com uma solução padrão de KOH $0,100$ mol L⁻¹ sem CO_2 . A força iônica foi mantida constante a $0,1$ mol L⁻¹ pela adição de KCl. As experiências foram realizadas em 50 ml de um sistema de solventes CH_3CN/H_2O 1:1 v/v, contendo $0,025$ mmol do complexo, purgados com Argônio e limpos com duas torres borbulhantes com soluções de KOH $0,1$ mol L⁻¹ e titulados com padrão de $0,100$ mol L⁻¹. KOH isento de CO_2 de pH 2,6 a 12,0 através da adição de alíquotas de $0,025$ mL de uma base. Os experimentos foram realizados

em triplicatas e a análise dos dados foi realizada usando o programa BEST7 (Martell e Montekaitis 1992). Os diagramas das espécies foram obtidos com os programas SPE (Martell 1992) e SPEPLOT (Martell 1992).

3.2.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As Medidas de espectrometria de massa com ionização via electrospray foram efetuadas em colaboração com o Prof. Dr. Hernán Terenzi do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina. Os compostos foram medidos em um espectrômetro Amazon Ion Trap MS em soluções de CH₃CN, CH₃CN /H₂O (1:1 v/v) e 1% DMSO, com concentrações de 1-5 µmol L⁻¹ e com um fluxo de 180 µL min⁻¹. A temperatura dos capilares foi mantida entre 180 and 200 °C e a voltagem entre -400 and -500 V (Strohalm *et al.* 2010).

3.2.8 CÁLCULOS E CORRELAÇÕES

As otimizações de geometria dos complexos 1, 2 e 3 foram realizadas com o software gratuito Orca 4.0.1 (Neese 2018), no nível da Teoria do Funcional de Densidade (DFT), usando o funcional PBE0. O conjunto de base escolhido foi Def2-TZVP para átomos de Zinco e Ferro e Def2-SVP para os outros átomos (Schafer 1992, Weigend 2005), usando a aproximação da resolução de identidade para a parte de Coulomb e a abordagem da cadeia de esferas para a troca de Hartree-Fock, com a base auxiliar correspondente (Izsak 2011, Kosmann 2010). Os cálculos também incluíram correção de dispersão da Grimme com amortecimento D3BJ (Grimme *et al.* 2010 e 2011). As frequências vibracionais para ambos os complexos não apresentaram frequências imaginárias. Os conjugados de fosfato também foram otimizados e as frequências vibracionais dos complexos **2-PO** e **3-PO** mostraram uma pequena frequência negativa devido à rotação dos anéis aromáticos. Para simular os espectros de absorção, a Teoria do Funcional de Densidade dependente do tempo sob a aproximação de Tamm-Dancoff (TD-DFT/TDA) foi empregada para obter as primeiras 50 excitações singleto-singleto, usando o mesmo protocolo de cálculo (Petrenko 2011, Grimme 2013, Runge 1984 e Gross 1985). As

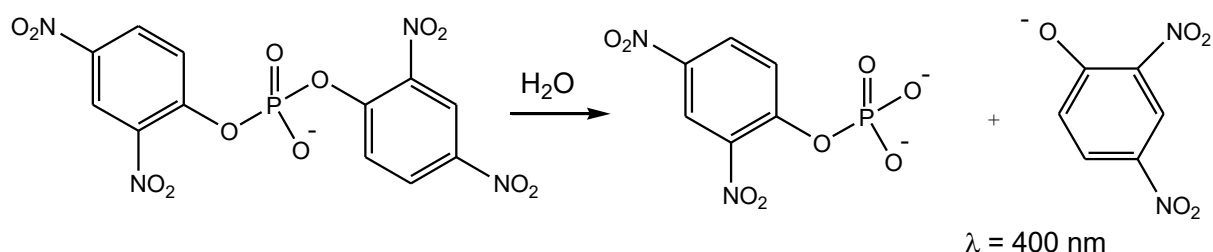
representações em 3D dos complexos foram obtidas utilizando o programa Chemcraft.

3.2.9 ESTUDO DE REATIVIDADE

Os experimentos cinéticos foram realizados com o objetivo de investigar se os complexos 1, 2 e 3 possuem a habilidade de catalisar a hidrólise do diéster de fosfato

2,4-BDNPP ($\epsilon = 7.182 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em pH 4,5; 10.078 em pH 5,0; 11.405 em pH 5,5; 12.004 em pH 6,0 e 12.100 $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em pH $\geq 6,5$) que está relacionado à liberação de 2,4-dinitrofenolato (2,4-DNP), produto da reação de hidrólise (Peralta 2010) e ilustrado no Esquema 2.

Esquema 2 - Ilustração da hidrólise do 2,4-bis-dinitrofenilfosfato (2,4-BDNPP) liberando como produto o 2,4-dinitrofenolato (2,4-DNP).



As reações foram monitoradas até 5% de conversão de substrato a produto e os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais (Piszkiewicz 1977). Uma solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v) foi usada para os complexos 1 e 2 e uma solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (1:1:0.02 v/v) para 3 devido a sua baixa solubilidade. O substrato ativado 2,4-BDNPP foi utilizado sob condições de pseudo-primeira ordem ($[\text{S}] \gg [\text{Complexo}]$, $\sim 100:1$). As reações foram monitoradas espectrofotometricamente a 400 nm, a absorção máxima do produto 2,4-DNP (Peralta *et al.* 2010). O efeito do pH na atividade catalítica de 1, 2 e 3 foi investigado na faixa de pH entre 4,5 e 9,5. A influência do pH nas propriedades catalíticas de 1, 2 e 3 foi avaliada usando os seguintes tampões: 0,05 mol L^{-1} ácido 2- (N-

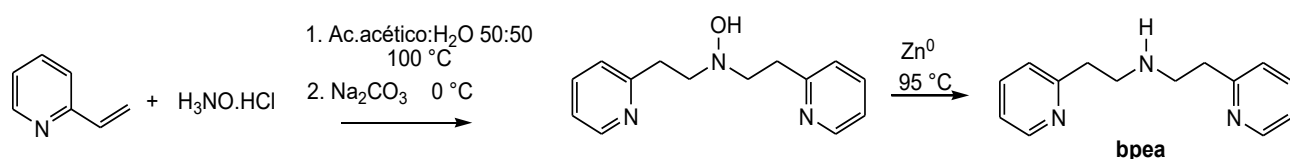
morfolino)etanossulfônico (MES - de 4,5 a 6,5), Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanossulfônico (HEPES -de 7,0 a 8,0) e Ácido 2-(ciclohexilamino)etanossulfônico (CHES - de 8,5 a 9,0). Ensaios para avaliar o efeito da concentração de substrato na taxa de hidrólise de 2,4-BDNPP promovida pelos complexos 1-3 foram conduzidos no respectivo pH ótimo (7,5; 7,0 e 6,5, respectivamente) e na faixa de 0,1-3,5 mmol L⁻¹ de substrato [C] = 2 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ a 25 °C. Esses experimentos foram realizados em diferentes temperaturas (25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C) para obter uma estimativa dos parâmetros de ativação para cada complexo. Para determinar se o monoéster também é hidrolisado, foi realizada uma reação estequiométrica entre os complexos 1, 2 e 3 e o substrato 2,4-BDNPP. Para calcular o número de ciclos catalíticos, foi realizada uma experiência onde a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP (1,5 mmol L⁻¹), catalisada pelos complexos 1, 2 e 3 ([C] = 3 × 10⁻⁵ mol L⁻¹), foi monitorada espectrofotometricamente em 445 nm (ϵ = 3.600 L mol⁻¹ cm⁻¹) (Peralta 2010). Para avaliar se ocorre transferência de prótons na etapa determinante da velocidade da reação, o efeito isotópico do deutério na taxa de hidrólise de 2,4-BDNPP foi determinado para os complexos 1, 2 e 3 nas mesmas condições descritas acima, mas com tampões deuterados.

3.2.10 SÍNTESE DOS LIGANTES

A seguir se apresentam as rotas sintéticas utilizadas para alguns compostos já descritos na literatura, e, outras rotas propostas para a obtenção dos intermediários e ligantes finais inéditos contidos no presente projeto.

3.2.10.1 Preparo do bis(-2(piridin-2-il)etil)amina (bpea)

O bpea foi preparado com modificações na metodologia já descrita na literatura por Mundinger e colaboradores (Mundinger *et al.* 2012).

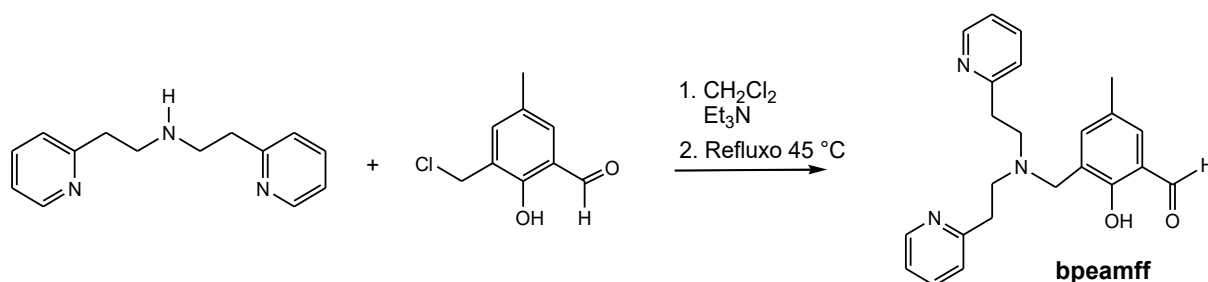


Em um balão de 125 mL, 7,00 g de cloridrato de hidroxilamina (0,1 mol, 69,49 g mol⁻¹) foram adicionados a 50 mL de uma solução de ácido acético a 50%. A esta solução, 21,56 mL de 2-vinilpiridina (0,2 mol, 105,14 g mol⁻¹, 0,975 g mL⁻¹) foram adicionados e a mistura reacional foi aquecida a 100 ° C durante 15 minutos. Subsequentemente, a mistura foi transferida para um béquer e 32,00 g (0,3 mol, 105,98 g mol⁻¹) de carbonato de sódio foram adicionados sob um banho de gelo. O sólido obtido foi filtrado e lavado com acetona. A solução restante foi concentrada e solubilizada numa quantidade mínima de benzeno e éter de petróleo (5:3 v/v). Após 24 horas, foi obtido um sólido microcristalino amarelo pálido. O sólido foi filtrado e lavado com éter etílico gelado resultando no produto hidroxil-bpea. A redução da hidroxil-bpea foi realizada por aquecimento com zinco metálico pré-ativado em solução de ácido clorídrico 2 mol L⁻¹ a 95 ° C por 1,5 h. Depois de arrefecer esta solução, ajustou-se o pH para 10 com uma solução aquosa de cloreto de amônio e depois extraiu-se com diclorometano (8 × 20 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi removido sob pressão reduzida. Rendimento: 61% baseado em 2-vinilpiridina. (MM= 227,14 g mol⁻¹)

IR – em KBr (cm⁻¹): ν (N-H) 3400; ν (C-H_{Ar}) 3043; ν (C-H_{Alif}) 2934 - 2810; ν (C=C) 1594; ν (CH₂) 1443; δ (C-H_{Ar}) 843 - 801, δ (C-H_{Ar}) 708.

¹H-NMR 400 (CDCl₃), δ ppm – 8,45 (d, *J*=3.4 Hz, 2H); 7,27-7,21 (td, *J*=6.2, 0.7, 4.2 Hz, 2H); 6,82-6,80 (d, *J*=4.4 Hz, 2H); 6,76-6,73 (m, 2H); 2,74 (t, *J*=5.3 Hz, 4H); 2,56 (t, *J*=2.1 Hz, 4H); 1,49 (s, 1H) (A1).

3.2.10.2 Preparo do 3-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (bpeamff)

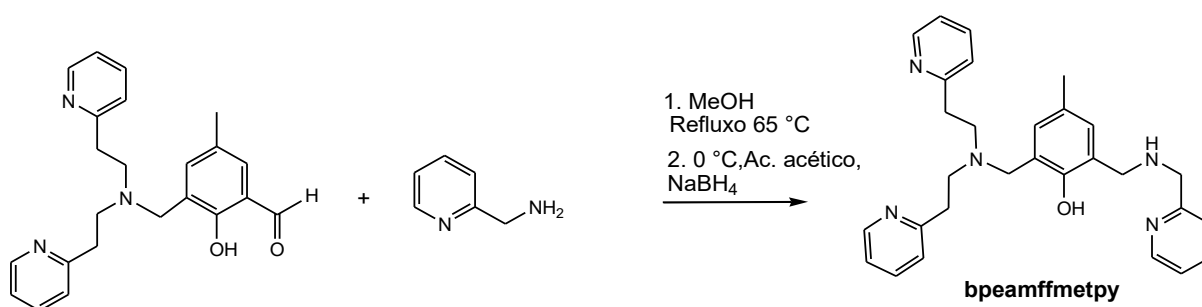


Em um balão de 125 mL, foram adicionados 0,92 g de cmff (5 mmol, 184,62 g mol⁻¹) e 50 mL de diclorometano. Em seguida, 1,13 g de bpea (5 mmol, 227,14 g mol⁻¹) e trietilamina (em excesso de 30%) foram adicionados sob banho de gelo. O banho de gelo foi removido e a mistura foi submetida a refluxo durante 6 dias a 45 ° C. Após este período, a fase orgânica foi lavada com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (8 × 20 mL), seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida. Rendimento: 80,6% baseado em bpea.

IR – em KBr (cm⁻¹): $\nu(\text{C-H}_{\text{Ar}}$ e C-H_{Alif}) 3060 - 2922; $\nu(\text{C=O})$ 1687; $\nu(\text{C=N}$ e $\text{C=C})$ 1600 - 1473; $\delta(\text{O-H}_{\text{fenol}})$ 1441; $\nu(\text{C-O}_{\text{fenol}})$ 1220; $\nu(\text{C-N})$ 1114; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 762.

¹H-NMR 400 (CDCl₃), δ ppm – 10.1 (s, 1 H); 8.5 (ddd, $J=4.9, 1.8, 0.9$ Hz, 2 H); 7.5 (td, $J=7.7, 4.3, 1.9$ Hz, 2 H); 7.4 (dd, $J=2.2, 0.6$ Hz, 1 H); 7.4 (dd, $J=2.2, 0.6$ Hz, 1 H); 7.1 (m, 2 H); 7.0 (m, 3 H); 3.8 (s, 2 H); 3.0 (m, 8 H); 2.2 (s, 3 H) (A2).

3.2.10.3 Preparo do 2-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-4-metil-6-((piridin-2-il)metilamino)metil)fenol (BPEAMFFMetPY)



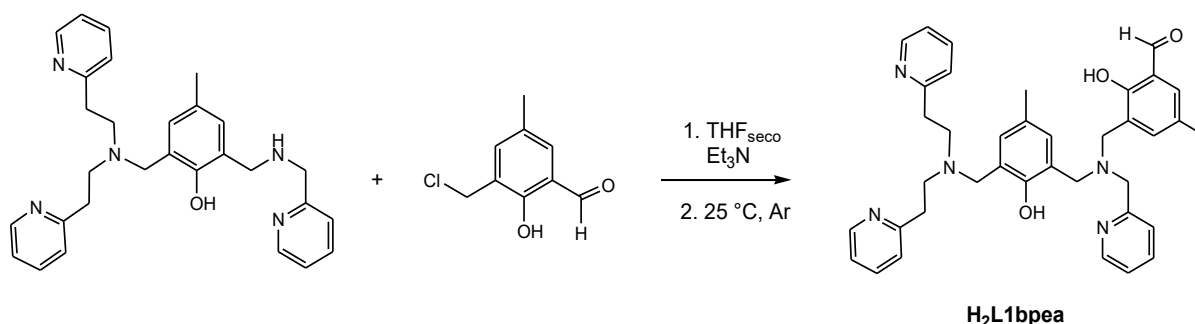
Num balão de 125 mL, 1,85 g de bpeamff (4,93 mmol, 375,19 g mol⁻¹) foram dissolvidos em cerca de 50 mL de metanol. Em seguida, adicionaram-se 0,54 mL de 2-aminometilpiridina (5,17 mmol, 108,14 g mol⁻¹, 1,04 g mL⁻¹) e a mistura foi submetida a refluxo durante 4 dias e sob agitação. Após este período, a solução foi arrefecida a 0°C num banho de gelo durante aproximadamente 20 minutos. Subsequentemente, 0,29 mL de ácido acético glacial (4,93 mmol, 60,04 g mol⁻¹, 1,05 g mL⁻¹) foram adicionados ao sistema e 3 equivalentes de borohidreto de sódio (14,79 mmol, 37,83 g mol⁻¹, 0,56 g) foram adicionados lentamente, durante de 1 h. Quando a adição foi completada, a solução permaneceu sob agitação em um banho de gelo por 1 h. Após este tempo, o banho de gelo foi removido e a mistura reacional

foi deixada em agitação durante mais 1 h. O solvente foi removido sob pressão reduzida e depois foram adicionados 70 mL de água. O pH da solução foi ajustado para 7 em banho de gelo com ácido clorídrico 2 mol L⁻¹. Após a neutralização, esta foi realizada a extração do produto da reação com diclorometano (6 × 30 mL) e a fase orgânica resultante foi lavada com cloreto de amônio saturado (4 × 20 mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi removido sob pressão reduzida. Rendimento: 77,4% baseado em bpeamff.

IR – em KBr (cm⁻¹): ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}) 3067-2927; ν (C=N e C=C) 1595-1475; δ (O-H_{fenol}) 1425; ν (C-O_{fenol}) 1255; ν (C-N) 1124; δ (C-H_{Ar}) 744.

¹H-NMR 400 (CDCl₃), δ ppm – 8,50 (dd, J = 3,3; 1,4 Hz, 3 H); 7,54 (m, 3 H); 7,35 (d, J = 6,4 1 H); 7,10 (m, 5 H); 6,91 (s, 2 H); 6,73 (s, 1H); 3,97 (d, J =4.2 Hz, 2 H); 3,84 (d, J = 6,8 Hz, 4 H); 3,02 (m, 9 H); 2,21 (s, 3 H) (A3).

3.2.10.4 Preparo do 3-(((3-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído – H₂L1bpea



Em um balão de 250 mL, em 10 mL de tetrahydrofurano seco, foram dissolvidos 0,49 g do precursor bpeamffmetpy (1,06 mmol, 467,27 g mol⁻¹). Em seguida, 0,146 mL de trietilamina (1,06 mmol, 101,19 g mol⁻¹, 0,73 g mL⁻¹) foram adicionados. A mistura foi mantida em banho de gelo durante 15 minutos. Após este período, 0,195 g do cmff (1,06 mmol, 184,04 g mol⁻¹) dissolvido em tetrahydrofurano foram adicionados. O banho de gelo foi removido e a mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente sob atmosfera de argônio. Após 50 horas, o solvente foi removido sob pressão reduzida e o sólido resultante foi solubilizado em diclorometano e lavado com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (6 × 40

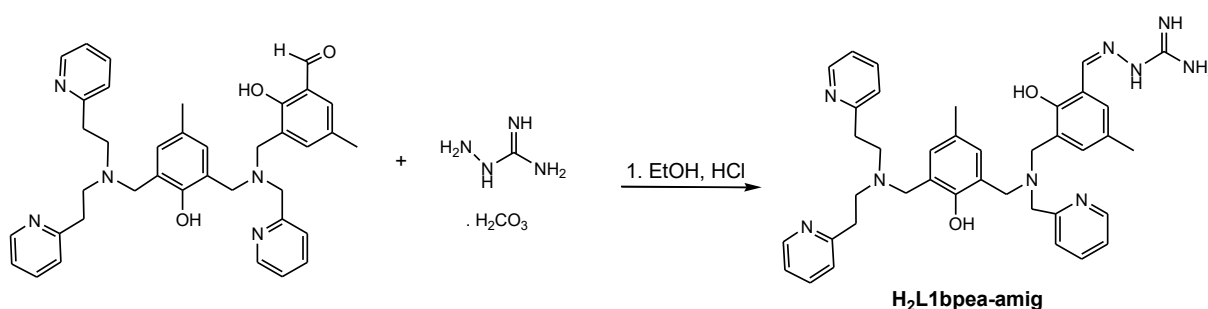
mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida. Rendimento: 84,7% baseado em bpeamffmetpy.

IR – em KBr (cm^{-1}): $\nu(\text{C-H}_{\text{ald}})$ 2843; $\nu(\text{C=O}_{\text{ald}})$ 1684; $\nu(\text{C=N})$, (C=C) 1649-1476; $\delta(\text{O-H}_{\text{fenol}})$ 1380; $\nu(\text{C-O}_{\text{fenol}})$ 1224; $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$ 756.

$^1\text{H-NMR}$ 400 (CDCl_3), δ ppm – 10,32 (s, 1 H); 8,55 (dt, $J=5.6, 1.2$ Hz, 1 H); 8,48 (dd, $J=5.4, 2.3$ Hz, 2 H); 7,63 (m, 1 H); 7,55 (m, 2 H); 7,46 (m, 2 H); 7,16 (m, 8 H); 6,91 (d, $J=2.6$ Hz, 1 H); 6,72 (d, $J=1.2$ Hz, 1 H); 3,84 (s, 4 H); 3,79 (s, 2 H); 3,66 (s, 2 H); 3,02 (s, 8 H); 2,25 (s, 3 H); 2,19 (s, 3 H).

CHN calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_3 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$: C: 66,85; H: 6,19; N: 9,99. Encontrado: C: 66,09; H: 6,43; N: 10,17%.

3.2.10.5 Preparo do 2-(3-(((3-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzilideno)hidrazinacarboximidamida - H₂L1bpea-amig.

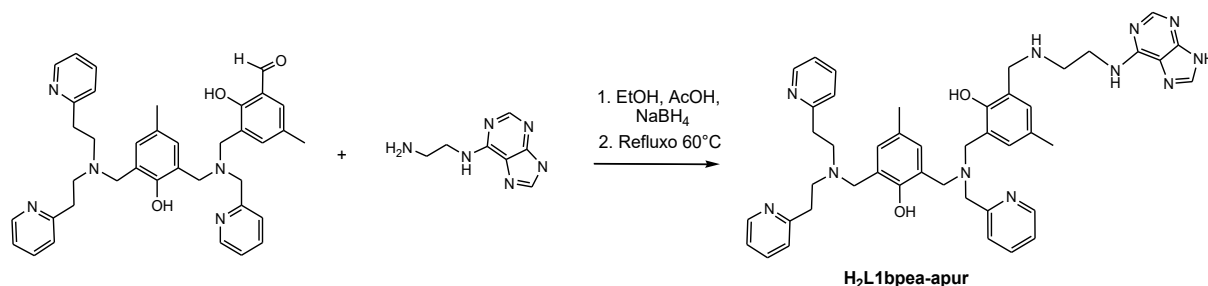


O bicarbonato de aminoguanidina 0,356 g (2,62 mmol, 136,11 g mol^{-1}) foi solubilizado em aproximadamente 30 mL de etanol e colocado em um balão de 125 mL, sob agitação, foram adicionadas gotas de HCl 4 mol L^{-1} até completa neutralização da base. Subsequentemente, o precursor H₂L1bpea 1,61 g (2,62 mmol, 615,32 g mol^{-1}) foi solubilizado em aproximadamente 20 mL de etanol e foi adicionado a aminoguanidina. A mistura reacional permaneceu sob agitação a 25 ° C. Após 30 horas, o solvente foi removido sob pressão reduzida. Rendimento: 69%.

IR – em KBr (cm^{-1}): $\nu(\text{C-H}_{\text{Ar}}$ e $\text{C-H}_{\text{alif}})$ 3064-2950; $\nu(\text{C=N})$, (C=C) 1627-1464; $\nu(\text{N-H})$ 1538; $\delta(\text{O-H})$ 1300; $\nu(\text{C-O}_{\text{fenol}})$ 1227; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 876; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 786.

$^1\text{H-NMR}$ 400 (DMSO), δ ppm – 12,21 (1H); 8,04 (16H); 4,34 (8H); 3,47 (8H); 2,14 (4H); 1,05 (2H). CHN calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{45}\text{N}_9\text{O}_2 \cdot 2\text{EtOH}$: C: 67,60; H: 7,52; N: 16,50. Encontrado: C: 67,65; H: 7,58; N: 16,45% baseado em $\text{H}_2\text{L1bpea}$.

3.2.10.6 Síntese do 2-((2-(9H-purin-6-ilamino)etilamino)metil)-6-(((3-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol - $\text{H}_2\text{L1bpea-apur2}$



Em um balão de 2 bocas de 125 mL foi adicionado 0,615 g (3,45 mmol, $178,19 \text{ g mol}^{-1}$) da 6-aminopurina em 20 mL de etanol. Aqueceu-se a mistura a 60 e depois adicionou-se lentamente (durante cerca de 3 horas) 2,12 g (3,45 mmol, $615,32 \text{ g mol}^{-1}$) do ligante $\text{H}_2\text{L1bpea}$ juntamente com 3 gotas de ácido acético glacial. A mistura reacional foi submetida a refluxo durante 24 horas a 60°C . A mistura foi então arrefecida até à temperatura ambiente e colocada em banho de gelo, com a seguinte adição de 0,130 g (3,45 mmol, $37,83 \text{ g mol}^{-1}$) de borohidreto de sódio (NaBH_4) durante 90 minutos. Posteriormente o pH foi ajustado para 7 e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O sólido resultante foi re-disperso em diclorometano (40 mL) e a solução resultante foi lavada com água desionizada ($4 \times 20 \text{ mL}$). O produto foi obtido como um sólido amarelo claro. Rendimento: 80% baseado em $\text{H}_2\text{L1bpea}$.

IR – em KBr (cm^{-1}): $\nu(\text{C-H}_{\text{Ar}}$ e C-H_{alif}) 3061-2920; $\nu(\text{N-H})$ 1595; $\nu(\text{C=C})$, (C=N) 1614-1438; $\delta(\text{O-H}_{\text{fenol}})$ 1369; $\nu(\text{C-O}_{\text{fenol}})$ 1239; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 858; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 754.

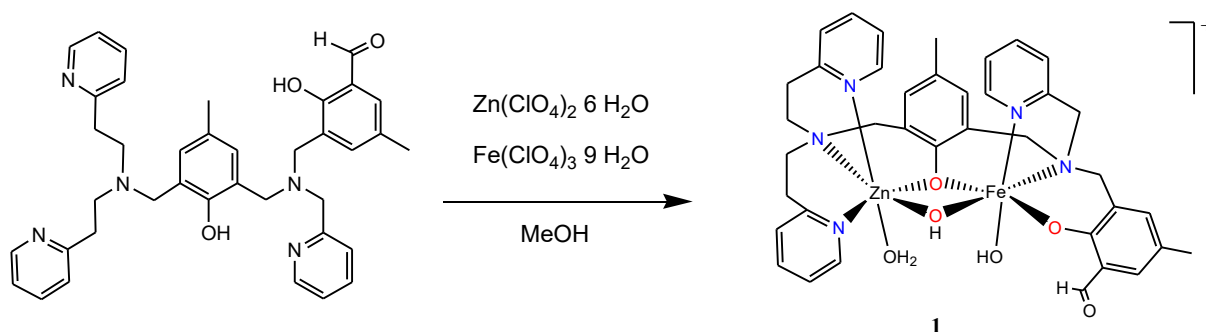
$^1\text{H-NMR}$ 400 (DMSO), δ ppm – 7,52 (18H); 3,38 (10H); 2,83 (8H); 2,12 (8H). CHN calculado para $\text{C}_{45}\text{H}_{51}\text{N}_{11}\text{O}_2 \cdot 3 \text{EtOH}$: C: 66,86; H: 7,59; N: 16,82. Encontrado: C: 67,20; H: 7,31; N: 16,43%.

3.2.11 SÍNTESE DOS COMPLEXOS

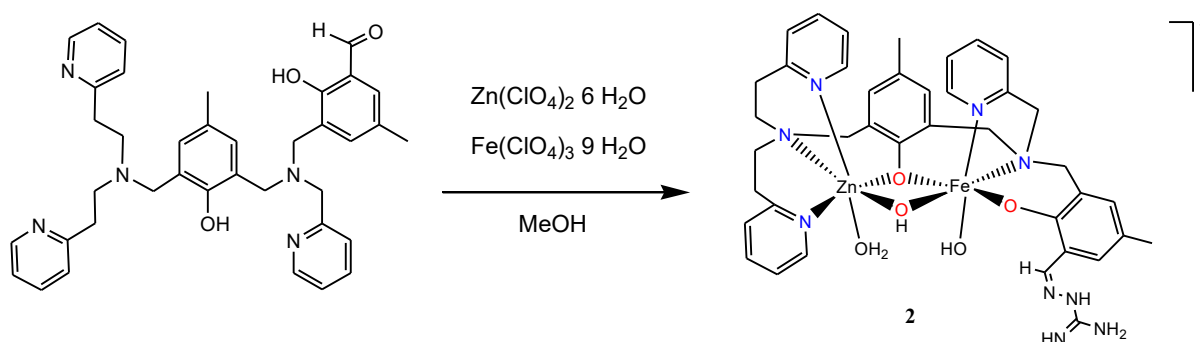
Na síntese dos complexos binucleares foram utilizados sais hidratados de Fe^{III} e Zn^{II} sob a forma de percloratos juntamente com os ligantes binucleantes propostos na seção anterior utilizando pontes exógenas do tipo μ -hidróxido conforme descrito no esquema a seguir:

Os complexos heterobinucleares de valência mista foram sintetizados conforme metodologia descrita por Neves e colaboradores, onde a característica não simétrica dos ligantes é utilizada para a seletividade de adição do metal no estado de oxidação 2+ seguido da adição do metal 3+, formando então o composto de coordenação esperado (Neves *et al.* 2007).

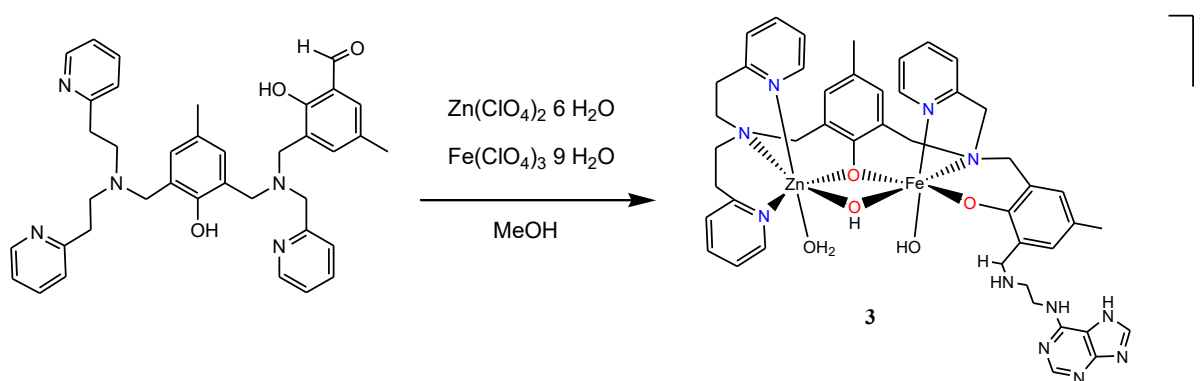
3.2.11.1 Preparo do $[(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})(\text{L}_1\text{bpea})](\text{ClO}_4)$ (**1**).



O complexo foi sintetizado adicionando muito lentamente 0,5 mmol de perclorato de ferro (III) nonahidratado (0,26 g, $516,20 \text{ g mol}^{-1}$) a uma solução metanólica (200 mL) contendo 0,307 g de $\text{H}_2\text{L}_1\text{bpea}$ (0,5 mmol, $615,32 \text{ g mol}^{-1}$) e 0,5 mmol de de perclorato de zinco (II) hexahidratado (0,19 g, $372,38 \text{ g mol}^{-1}$) sob agitação a 40°C . A solução foi agitada por aproximadamente 30 min e, em seguida, NaClO_4 foi adicionado (1 mmol, 0,12 g). A solução foi filtrada e após 5 dias, um sólido roxo foi obtido. Rendimento: 0,31 g, 63%. CHN calculado para $\text{FeZnC}_{38}\text{H}_{43}\text{ClN}_5\text{O}_{10} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: C: 48.53; H: 5.25; N: 7.45. Encontrado: C: 48.66; H: 4.95; N: 7.11%. IR – em KBr (cm^{-1}): $\nu(\text{O-H})$ 3492; $\nu(\text{C-H}_{\text{aliph}})$ 2915,2857; $\nu(\text{C=O}_{\text{ald}})$ 1653; $\nu(\text{C=C})$ 1604; $\nu(\text{C=N})$ 1555; $\nu(\text{C=C})$ 1481; $\nu(\text{Cl-O})$ 1090; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 870; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 763; $\delta(\text{C=C}_{\text{Ar}})$ 623. Absorção atômica, em mg kg^{-1} , Fe: 2.654 ± 0.006 e Zn: 3.084 ± 0.003 .

3.2.11.2 Preparo do $[(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})(\text{L}_1\text{bpea-amig})](\text{ClO}_4)$ (**2**).

Preparado de forma semelhante ao complexo **1**, mas usando $\text{H}_2\text{L}_1\text{bpea-amig}$ como ligante. Rendimento: 0.28 g, 54%. CHN calculado para $\text{FeZnC}_{39}\text{H}_{47}\text{ClN}_9\text{O}_9 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: C: 47.00; H: 5.36; N: 12.65. Encontrado: C: 46.73; H: 4.99; N: 12.71%. IR – em KBr (cm^{-1}): $\nu(\text{O-H})$ 3554; $\nu(\text{C-H}_{\text{Alif}})$ 2932-2862; $\nu(\text{C=N})$ 1608; $\nu(\text{N-H})$ 1554; $\nu(\text{C=C})$ 1445; $\nu(\text{C-O}_{\text{fenol}})$ 1265; $\nu(\text{Cl-O})$ 1086; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 876; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 767. Absorção Atômica, em mg kg^{-1} , Fe: 2.376 ± 0.012 e Zn: 2.975 ± 0.004 .

3.2.11.3 Preparo do $[(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})(\text{L}_1\text{bpea-apur})](\text{ClO}_4)$ (**3**).

Preparado de forma semelhante ao complexo **1**, mas usando $\text{H}_2\text{L}_1\text{bpea-apur}$ como ligante. rendimento: 0.37 g, 65%. CHN calculado para $\text{FeZnC}_{45}\text{H}_{53}\text{ClN}_{11}\text{O}_9 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: C, 49.83; H, 5.30; N, 14.20. Encontrado: C, 50.10; H, 4.99; N, 13.93. IR – em KBr (cm^{-1}): $\nu(\text{O-H})$ 3439; $\nu(\text{C-H}_{\text{Alif}})$ 2923-2856; $\nu(\text{C=C})$ 1604; $\nu(\text{N-H})$ 1567; $\nu(\text{C=N})$ 1470; $\nu(\text{C-O}_{\text{fenol}})$ 1262; $\nu(\text{Cl-O})$ 1086; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 861; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 736. Absorção Atômica, em mg kg^{-1} , Fe: 2.500 ± 0.022 e Zn: 3.015 ± 0.002 .

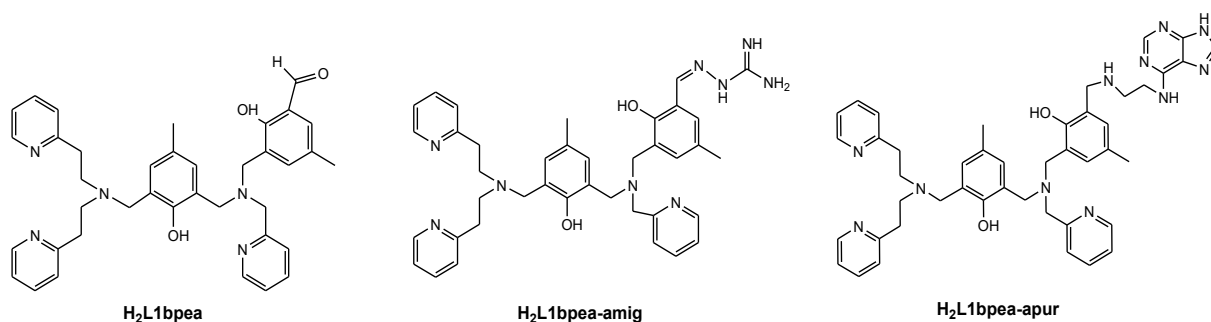
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nessa seção serão apresentadas as caracterizações e as respectivas discussões relativas às sínteses dos ligantes e dos complexos, bem como os testes de reatividade dos complexos frente a substratos modelos (ésteres fosfóricos).

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES

Os ligantes binucleantes inéditos não-simétricos sintetizados **H₂L1bpea**, **H₂L1bpea-amig** e **H₂L1bpea-apur**, Figura 9, utilizados no presente trabalho foram obtidos com rendimentos adequados de acordo com as rotas sintéticas descritas na seção experimental. Esses compostos apresentaram elevado grau de pureza, de acordo com as caracterizações dos mesmos por análise elementar de C, H, e N, espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

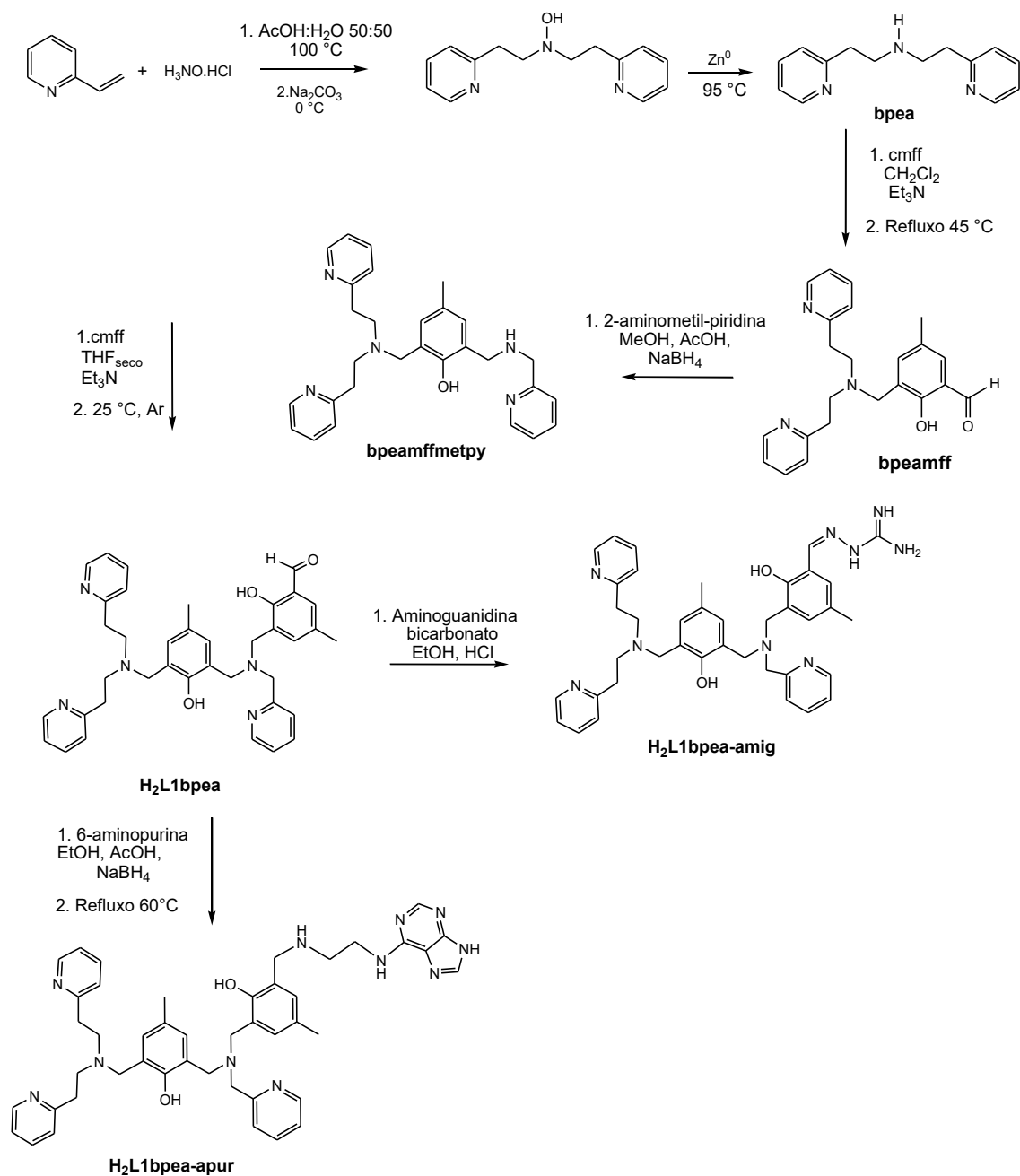
Figura 9 - Ligantes binucleantes não-simétricos utilizados na síntese dos compostos de coordenação.



Inicialmente como apresentado no Esquema 3, a 2-vinilpiridina foi reagida com cloridrato de hidroxilamina para formação do derivado de hidroxilamina, que posteriormente foi reduzido com Zinco metálico para obtenção do **bpea**. Na etapa seguinte, o reagente cmff, anteriormente obtido através da reação de clorometilação, foi reagido com o precursor **bpea**, para formação do **bpeamff**. Após, o grupo aldeído presente no **bpeamff** foi submetido a uma reação de aminação-redutiva com 2-aminometilpiridina, para formação do **bpeamffmetpy**. Por último, o **bpeamffmetpy**

através de uma reação predominantemente do tipo S_N2 com o reagente cmff deu origem ao ligante final H₂L1bpa, com um grupo aldeído terminal. Para a obtenção dos outros dois ligantes derivatizados, o aldeído terminal do H₂L1bpa foi reagido com bicarbonato de aminoguanidina e com 6-aminopurina para obtenção dos ligantes H₂L1bpa-amig e H₂L1bpa-apur, respectivamente.

Esquema 3 - Rota sintética para obtenção dos ligantes binucleantes.



4.1.1 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO IR

Todas as etapas referentes à síntese de precursores e dos ligantes finais foram monitoradas por espectroscopia na região do IR. As bandas de absorção dos grupamentos característicos de cada composto orgânico em questão foram observadas e devidamente atribuídas (Silverstein 1994). A seguir, estão sumarizadas as bandas relevantes dos ligantes intermediários (Tabela 3) e dos ligantes finais (Tabela 4).

Tabela 3 - Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) dos ligantes intermediários.

	<i>bpea</i>	<i>bpeamff</i>	<i>bpeamffmetpy</i>
$\nu(\text{N-H})$	3400	-	-
$\nu(\text{C-H}_{\text{Ar}})$	3043	3060	3067
$\nu(\text{C-H}_{\text{Alif}})$	2934	2922	2927
$\nu(\text{C=O})$	-	1687	-
$\nu(\text{C=N})$	-	-	1595
$\nu(\text{C=C})$	1594	1473	1475
$\delta(\text{O-H}_{\text{fenol}})$	-	1441	1425
$\nu(\text{C-O}_{\text{fenol}})$	-	1220	1255
$\nu(\text{CH}_2)$	1443	-	-
$\nu(\text{C-N})$	-	1114	1124
$\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$	708	762	744

No espectro na região do IR do intermediário *bpea* foi possível observar a banda característica do grupamento N-H em 3400 cm^{-1} , confirmando a presença do grupo amino. Foram observados também, o estiramento das ligações C-H_{ar} (3043 cm^{-1}) e

C=C (1594 cm^{-1}). Uma banda de deformação angular fora do plano em 708 cm^{-1} também pode ser observada. Para o ligante *bpeamff* se observa a presença de grupos alifáticos e aromáticos, tal como no composto anteriormente analisado. A banda em 1687 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C=O do grupo aldeído. Observa-se também a presença da deformação angular das ligações O-H_{fenol} e C-O_{fenol} em 1441 e 1220 cm^{-1} respectivamente, confirmando a presença do grupo fenólico formando com a inserção do *cmff*. O último intermediário analisado foi o *bpeamffmety*, que apresenta as bandas mencionadas anteriormente com a exclusão da banda em 1687 cm^{-1} , confirmando a ligação entre o grupo metilpiridina e o grupo aldeído pertencente ao ligante anteriormente analisado *bpeamff*.

Tabela 4 - Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) dos ligantes finais H₂L1bpea, H₂L1bpea-amig e H₂L1bpea-apur.

	<i>H₂L1bpea</i>	<i>H₂L1bpea-amig</i>	<i>H₂L1bpea-apur</i>
$\nu(\text{C-H}_{\text{Ar}})$	3007	3064	3061
$\nu(\text{C-H}_{\text{Alif}})$	2929	2950	2920
$\nu(\text{C-H}_{\text{Ald}})$	2843	-	-
$\nu(\text{C=O}_{\text{ald}})$	1684	-	-
$\nu(\text{C=N})$	1649	1627	1614
$\nu(\text{N-H})$	-	1538	1595
$\nu(\text{C=C})$	1476	1464	1438
$\nu(\text{C-O}_{\text{fenol}})$	1224	1227	1239
$\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$	756	786	754

Os ligantes finais H₂L1bpea, H₂L1bpea-amig e H₂L1bpea-apur apresentaram bandas de absorção características e similares às apresentadas pelos seus precursores. Na região de 3064 e 3061 cm^{-1} são encontradas bandas de estiramento das ligações C-H dos anéis aromáticos. Entre 2950 e 2920 cm^{-1} aproximadamente,

nota-se bandas relativas aos estiramentos das ligações C-H das cadeias alifáticas. Para o ligante H₂L1bpea em 1476 e 1649 cm⁻¹ tem-se bem pronunciada a absorção dos anéis aromáticos (C=C e C=N) e em 1224 cm⁻¹ o estiramento da ligação C-O, indicando a presença dos grupos fenólicos. De forma semelhante são observados os mesmos estiramentos anteriormente citados para os ligantes H₂L1bpea-amig e H₂L1bpea-apur em 1464-1627 cm⁻¹ e 1438 - 1614 cm⁻¹ respectivamente para (C=C e C=N). De maneira pronunciada também são encontradas as bandas nas regiões de 756 cm⁻¹ para o H₂L1bpea, 786 cm⁻¹ para H₂L1bpea-amig e 754 cm⁻¹ para H₂L1bpea-apur referentes a deformação angular fora do plano da ligação C-H dos anéis aromáticos. A ocorrência de várias bandas pronunciadas nesta região é característica de grupos aromáticos polinucleares, o que reforça a indicação da ocorrência do grupo 6-aminopurina para o ligante H₂L1bpea-apur, onde nota-se também nessa região a presença de bandas mais alargadas, uma vez que nessa região também aparecem bandas referentes a torção da ligação N-H, conforme demonstrado nas Figuras 10, 11 e 12 e também é mostrada na figura 13 uma sobreposição ampliada dos ligantes finais.

Figura 10 - Espectro na região do infravermelho do ligante final H₂L1bpea em pastilha de KBr.

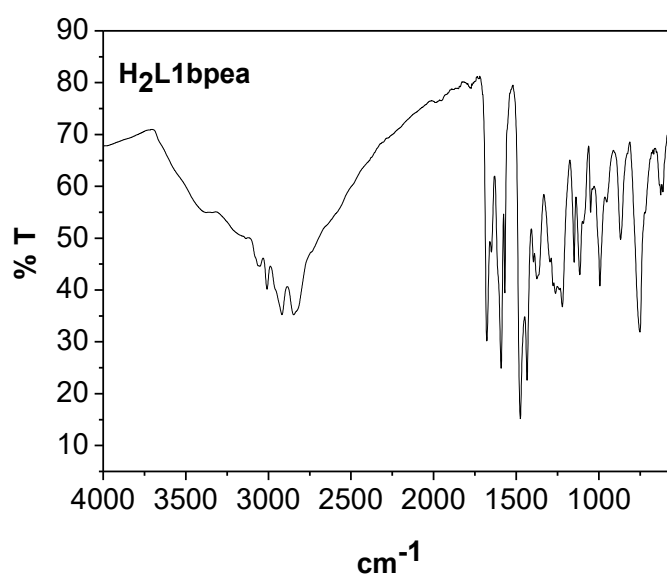


Figura 11 - Espectro na região do infravermelho do ligante final H₂L1bpea-amig em pastilha de KBr.

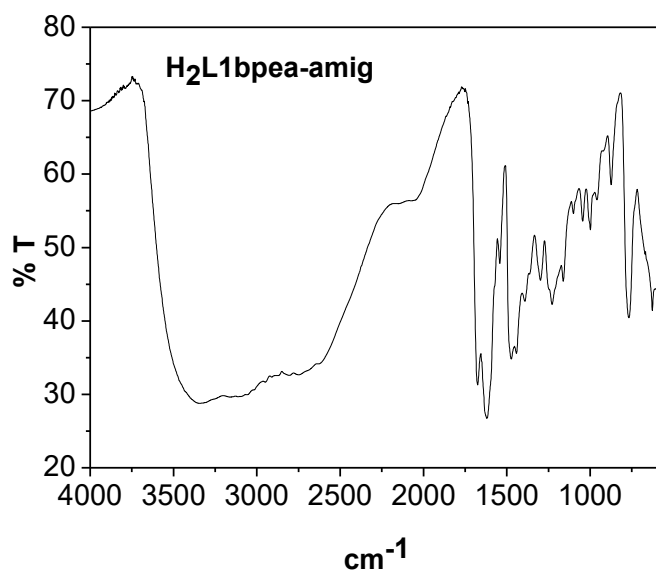


Figura 12- Espectro na região do infravermelho do ligante final H₂L1bpea-apur em pastilha de KBr.

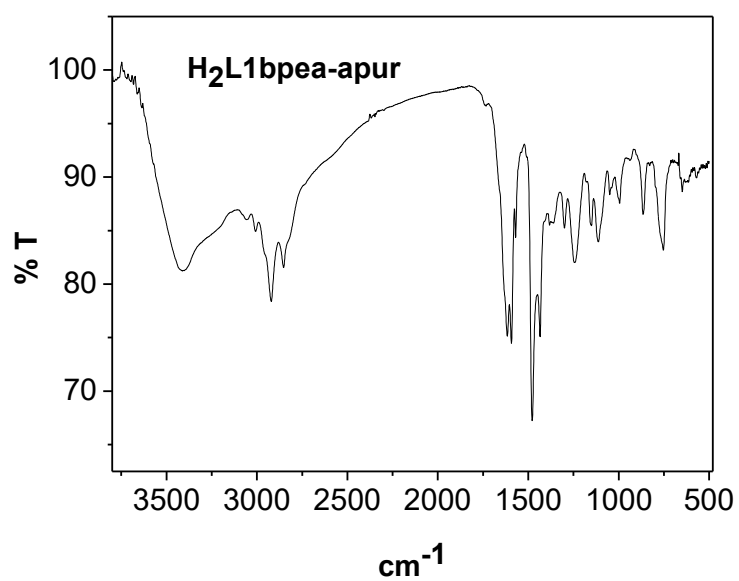
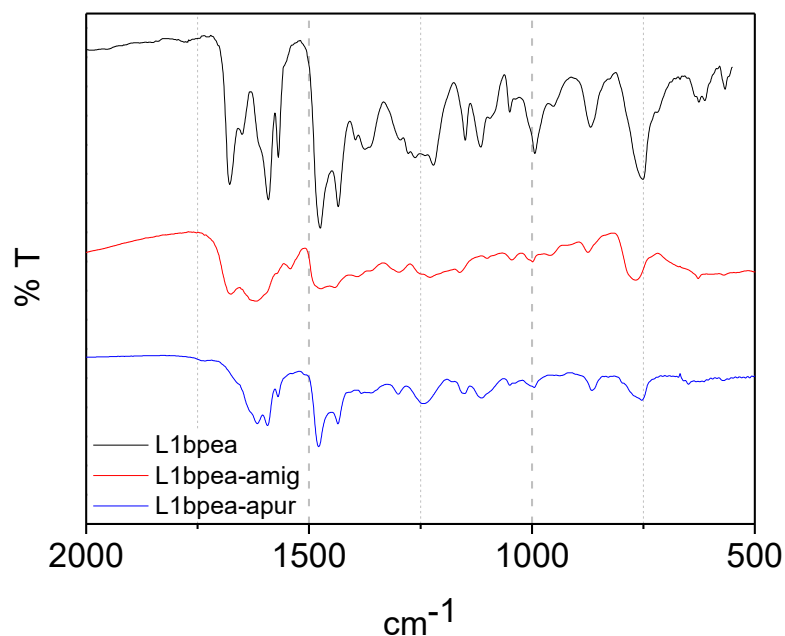


Figura 13 – Região ampliada da sobreposição na região do infravermelho dos ligantes H₂L1bpea, H₂L1bpea-amig e H₂L1bpea-apur em pastilha de KBr.



4.1.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO- ¹H NMR

A partir da espectroscopia de ¹H NMR é possível observar os deslocamentos químicos e a integração dos sinais. Com a integração se determina o número de átomos de Hidrogênios presentes nos compostos analisados. Desta forma, foi possível distinguir entre os átomos de hidrogênios metílicos, metilênicos e aromáticos. Os valores de deslocamento químico (δ em ppm), o número de átomos de hidrogênio correspondentes e as atribuições dos sinais estão sumarizados na Tabela 5 (Silverstein 1991).

Para os ligantes H₂L1bpea-amig e H₂L1bpea-apur foi somente possível atribuir os valores de integração uma vez que os mesmos possuem extrema dificuldade de solubilidade nos solventes utilizados para medição de ressonância, sendo necessário o uso de outras técnicas para melhor compreensão sobre a pureza dos mesmos. Embora, pouco precisa tenha sido a análise para os ligantes derivatizados, pode-se visualizar o desaparecimento do sinal do aldeído em campo mais alto confirmando a entrada dos grupos laterais aminoguanidina e 6-

aminopurina adicionados ao ligante inicial H₂L1bpea. Os espectros são mostrados nas Figuras 14, 15 e 16. Para os ligantes intermediários bpea, bpeamff e bpeamffmetPy os espectros são apresentados nos apêndices A1, A2 e A3.

Tabela 5 - Deslocamentos químicos (ppm) observados nos espectros de ¹H NMR para os ligantes finais H₂L1bpea, H₂L1bpea-amig e H₂L1bpea-apur.

Atribuição	H₂L1bpea	H₂L1bpea-amig	H₂L1bpea-apur
¹ H (CH ₃)	2,19 (s, 3H); 2,25 (s, 3 H)	1,05 (2H); 2,14 (4H)	2,12 (8H)
¹ H (CH ₂)	3,02 (s, 8H); 3,66 (s, 2H); 3,79 (s, 2H); 3.84 (s, 4 H)	3,47 (8H); 4,34 (8H)	2,83 (8H); 3,38 (10H)
¹ H Aromático	6,72 (d, 1 H); 6,91 (d, 1H); 7,16 (m, 8H); 7,46 (m, 2H); 7,55 (m, 2H); 7,63 (m, 1H); 8,48 (dd, 2H); 8,55 (dt, 1H); 10,32 (s, 1H);	8,04 (16H); 12,21 (1H)	7,52 (18H)

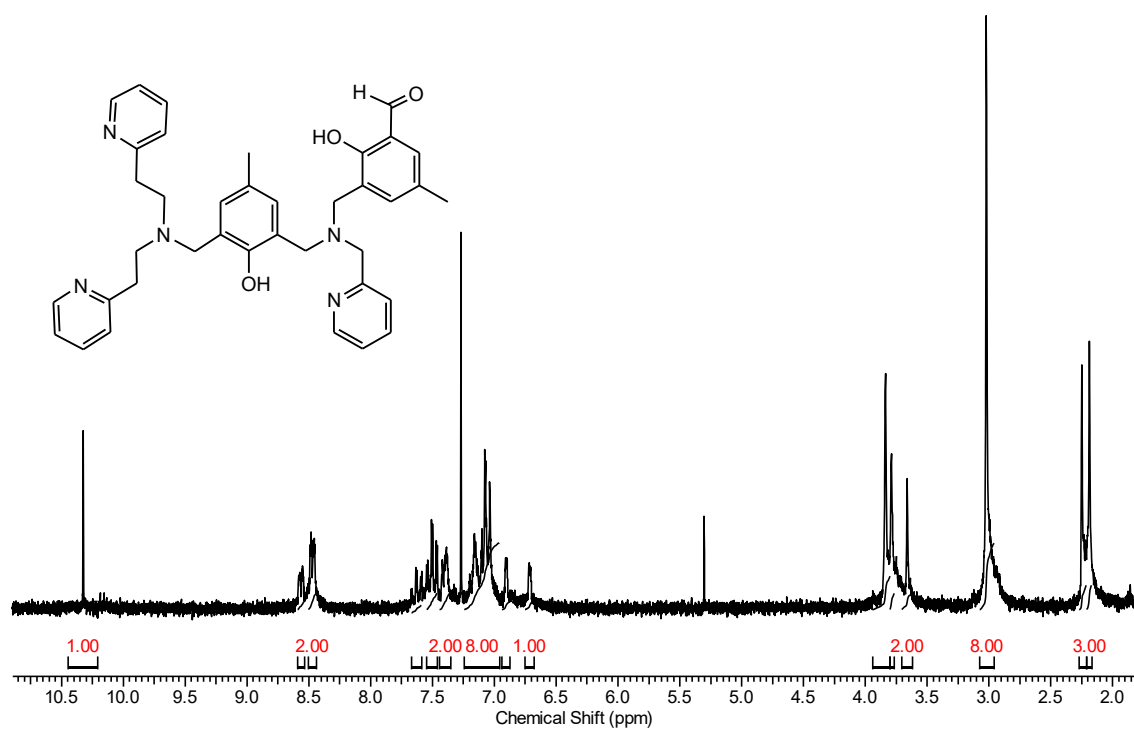
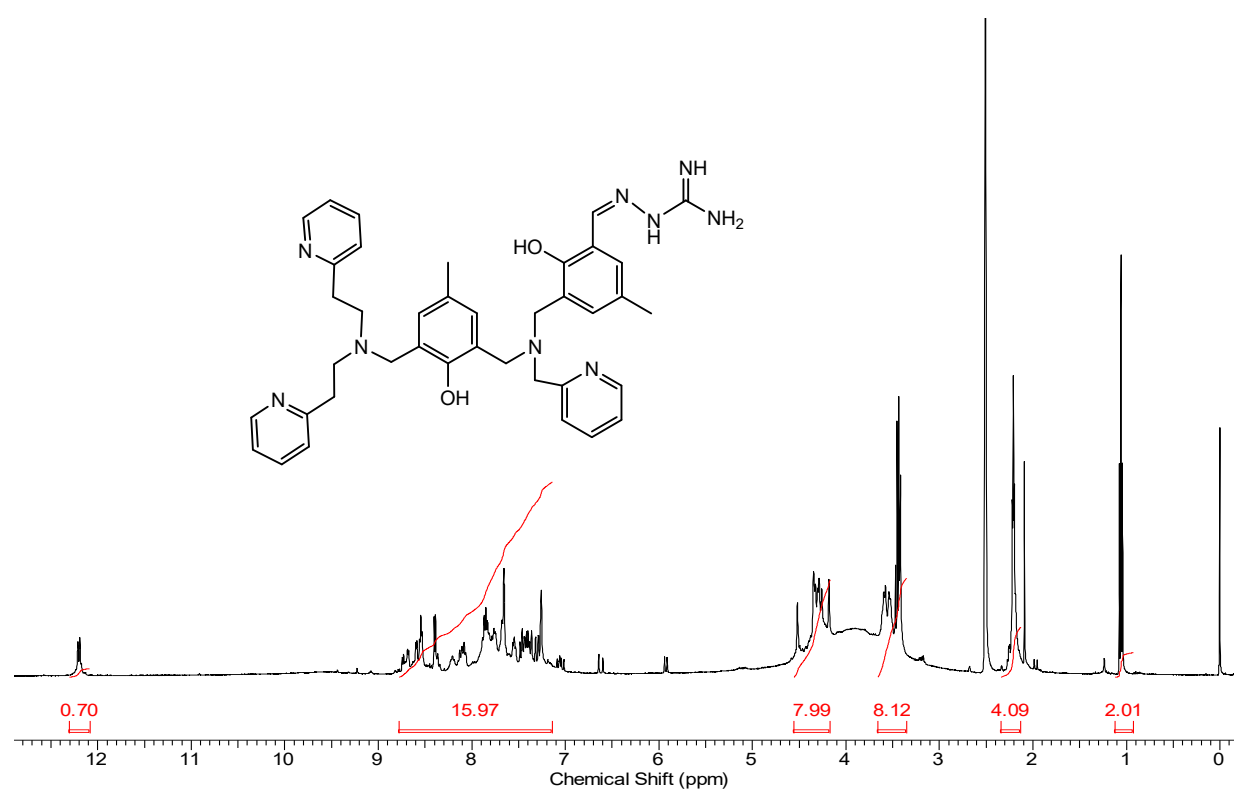
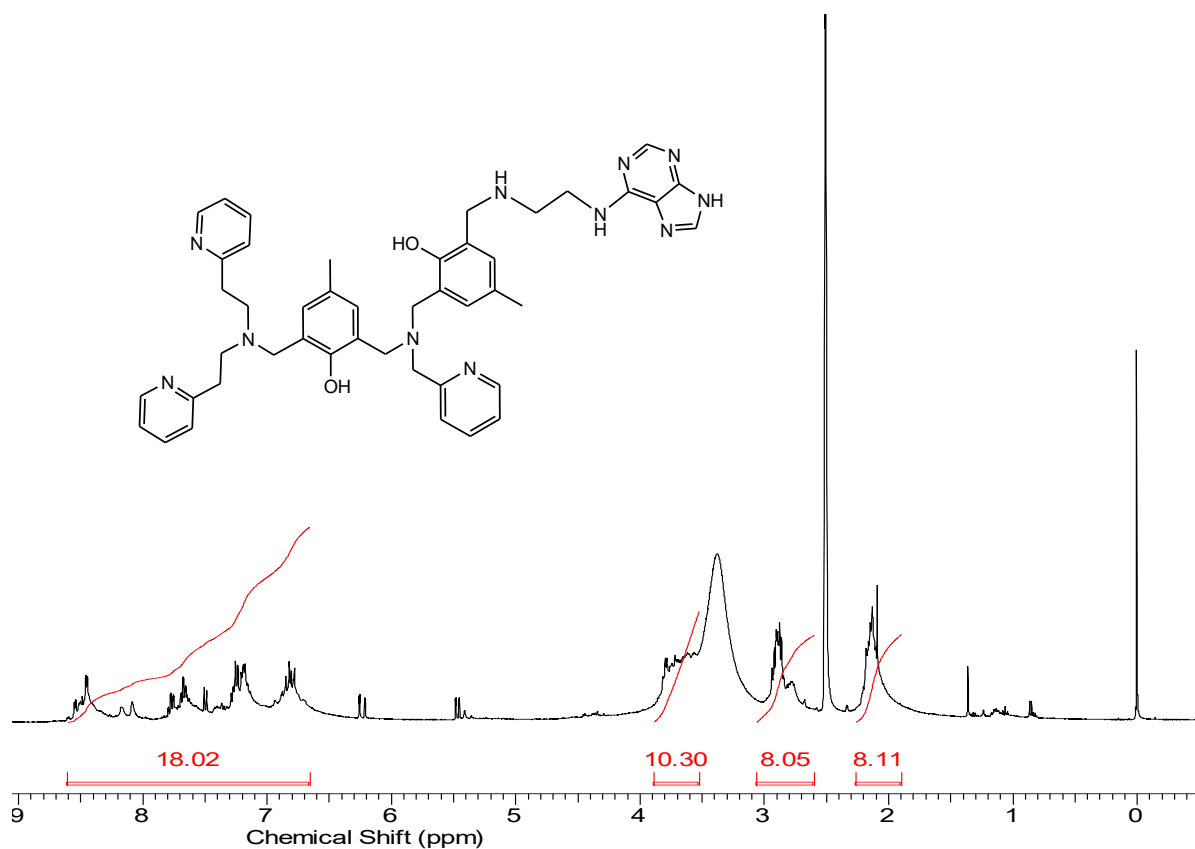
Figura 14 - Espectro de ^1H NMR do ligante H₂L1bpea em CDCl_3 .Figura 15 - Espectro de ^1H NMR do ligante H₂L1bpea-amig em DMSO-d_6 .

Figura 16 - Espectro de ^1H NMR do ligante H₂L1bpea-apur em DMSO-d₆.

4.1.3 ANÁLISE DE ELEMENTAR DE C, H E N

Os ligantes binucleantes sintetizados foram também caracterizados por análise elementar de CHN e apresentaram resultados concordantes com as fórmulas moleculares propostas, apresentadas na Tabela 6. Em todos os casos, a fórmula mínima foi determinada com a adição de moléculas de solventes, os quais foram utilizados em processos de síntese e/ou de purificação dos ligantes.

Tabela 6 - Porcentagens de C, H e N para os ligantes inéditos sintetizados (calculada/encontrada).

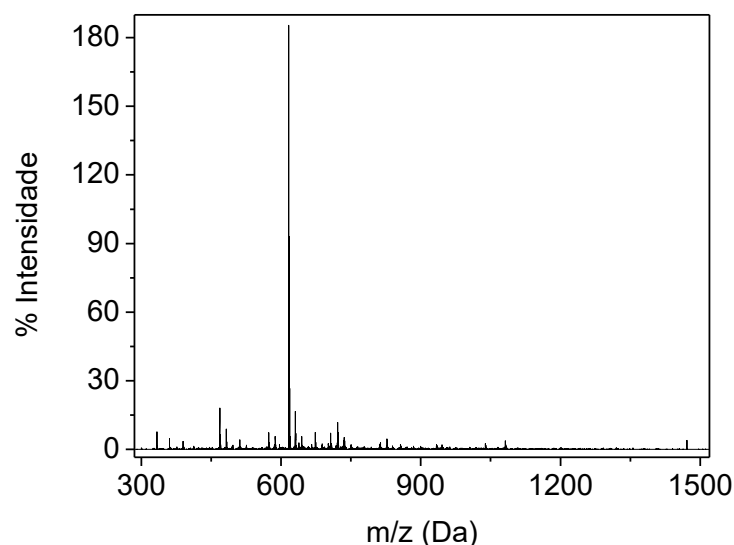
Ligante	H ₂ L1bpea	H ₂ L1bpea-amig	H ₂ L1bpea-apur
Fórmula Molecular	C ₃₈ H ₄₁ N ₅ O ₃ .CH ₂ Cl ₂	C ₃₉ H ₄₅ N ₉ O ₂ .2EtOH	C ₄₅ H ₅₁ N ₁₁ O ₂ .3EtOH
% C	66,85 / 66,09	67,60 / 67,65	66,86 / 67,20
% H	6,19 / 6,43	7,52 / 7,58	7,59 / 7,31
% N	9,99 / 10,17	16,50 / 16,45	16,82 / 16,43

4.1.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS ESI-MS

A espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) foi utilizada na caracterização dos ligantes, ao produzir íons em fase gasosa diretamente da solução contendo o composto analisado, mostrou informações qualitativas acerca das espécies carregadas existentes neste sistema. Desta forma foi possível determinar a presença do íon molecular para o ligante final L1bpea, confirmando sua obtenção, não sendo possível a análise dos ligantes derivatizados que apresentaram grande fragmentação em solução impossibilitando a obtenção dos dados.

A Figura 17 mostra o espectro obtido para o ligante L1bpea apresentando um íon molecular em $m/z = 616,3$ atribuído a espécie Lbpea + H.

Figura 17. Espectro de massa ESI-MS do ligante Lbpea em $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$.

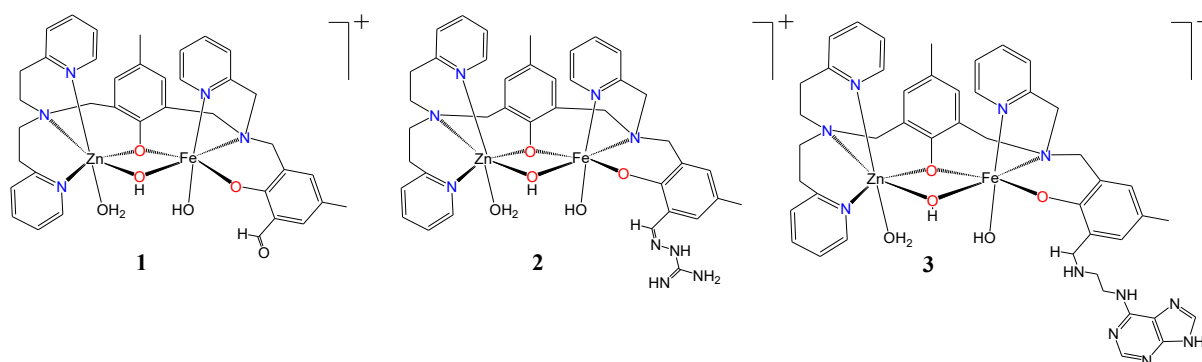


4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

Os complexos descritos neste trabalho foram caracterizados por uma grande variedade de métodos físicos e químicos tanto no estado sólido (análise elementar de CHN, espectroscopia na região do Infravermelho e do UV/Vis), quanto em solução (medidas eletroquímicas, absorção atômica, titulação potenciométrica e espectroscopia eletrônica na região do UV/Vis). Tais estudos visam elucidar a

composição química, o arranjo estrutural e propriedades ácido-base dessas moléculas inéditas de interesse bioinorgânico. O conhecimento destas propriedades é fundamental para a identificação da espécie ativa nos processos de clivagem hidrolítica de ésteres de fosfato (substratos modelo), bem como da molécula de DNA. A Figura 18 contém as representações dos complexos binucleares de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ inéditos sintetizados e utilizados no presente trabalho.

Figura 18 - Representações dos complexos de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ sintetizados 1, 2 e 3.



4.2.1 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

A espectrometria de absorção atômica foi realizada com o objetivo de determinar qualitativa e quantitativamente a presença dos metais Fe e Zn e mostraram-se em concordância com os valores esperados. O complexo 1 apresentou um valor de Fe: 2.654 ± 0.006 e Zn: 3.084 ± 0.003 , o complexo 2 Fe: 2.376 ± 0.012 e Zn: 2.975 ± 0.004 e o complexo 3 Fe: 2.500 ± 0.022 e Zn: 3.015 ± 0.002 em mg kg^{-1} denotando a presença dos metais em ambos os complexos na proporção de 1:1.

4.2.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO - IR

A espectroscopia no IR é geralmente utilizada como uma análise preliminar, uma vez que a formação dos compostos de interesse pode ser acompanhada pela presença das bandas características do ligante assim como o desaparecimento das mesmas no caso da formação dos complexos. Bandas adicionais, referentes ao

contração, ligantes exógenos ponte e moléculas de solvente, bem como deslocamentos ou alargamentos, também são observadas.

Os espectros de IR dos complexos 1, 2 e 3 (Figuras 19, 20 e 21) foram comparados com os dos espectros de ligantes isentos de metais.

Figura 19 - Espectro de IR do ligante final H₂L1bpea (linha preta) e complexo 1 (linha vermelha) em pastilha de KBr.

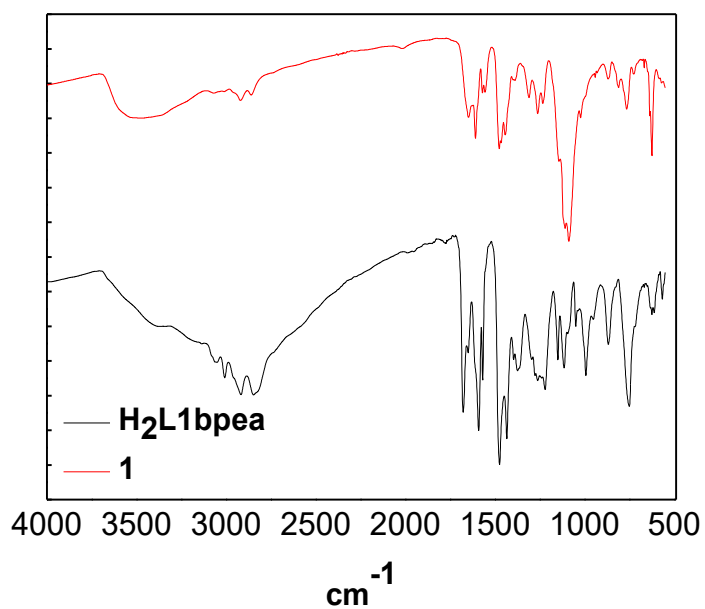


Figura 20 - Espectro de IR do ligante final H₂L1bpea-amig (linha preta) e complexo 2 (linha vermelha) em pastilha de KBr.

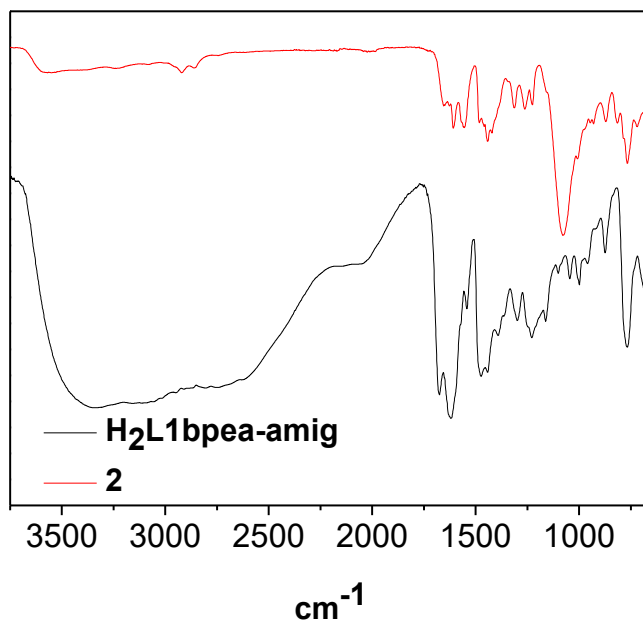
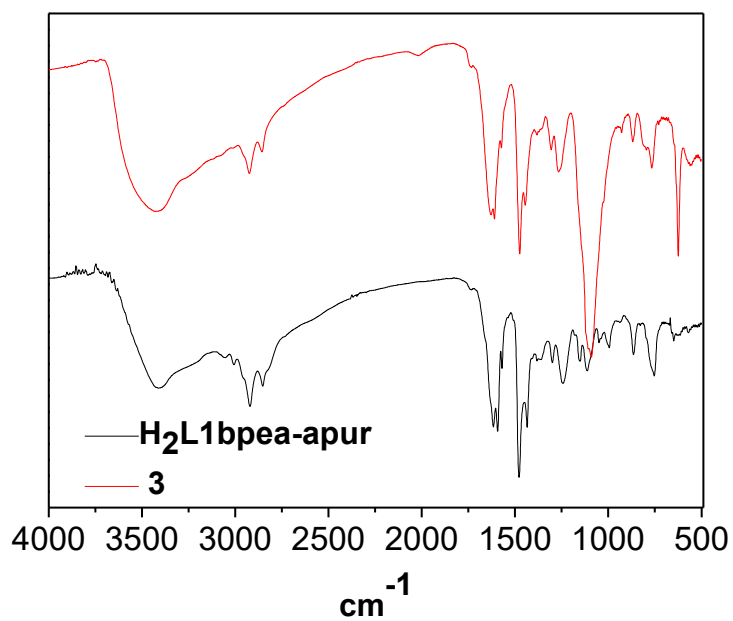


Figura 21 - Espectro de IR do ligante final H₂L1bpea-apur (linha preta) e complexo 3 (linha vermelha) em pastilha de KBr.



Para o complexo 1, as bandas de ligantes relacionadas aos trechos das ligações de aldeído C = O e C - H em torno de 1653 e 2856 cm⁻¹, respectivamente,

permanecem no complexo, porém mostrando alguns deslocamentos devido à complexação. Para 2 e 3, tanto os complexos como os ligantes exibiram bandas correspondentes ao alongamento da ligação N-H devido aos derivados de amina. Comum a cada um dos três ligantes, a banda atribuída ao estiramento da ligação O-H do grupo fenol, em torno de 1300 cm^{-1} , não está presente nos complexos. Essa observação é consistente com o oxigênio fenólico desprotonado atuando como um ligante para os centros Fe^{III} e Zn^{II} , formando uma ponte fenoxo. Além disso, para todos os complexos, observa-se uma faixa em torno de 1090 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação Cl-O do grupo perclorato presente como um contra-íon. Para o complexo 3, esta faixa de perclorato apresenta maior intensidade quando comparada aos complexos 1 e 2, devido à presença de outras bandas de absorção próximas a esta faixa. A tabela 7 mostra as atribuições das bandas dos complexos e seus respectivos ligantes.

Os resultados obtidos para os complexos 1, 2 e 3 estão de acordo com os relatados para complexos semelhantes na literatura (Silva *et al.* 2017; Camargo *et al.* 2018; Peralta *et al.* 2010; Piovezan *et al.* 2010) bem como as frequências obtidas nos estudos de DFT (vide seção 4,2,4). Os trabalhos já reportados na literatura citados acima dão suporte para os resultados aqui obtidos indicando que a geometria mais provável em torno do íon Zn^{II} em solução é octaédrica. Dudev reportou um trabalho com o objetivo de elucidar a geometria de coordenação do estado fundamental mais preferível para os complexos de zinco em um ambiente proteico e dessa forma utilizou de DFT para os cálculos de energias livre que também mostraram resultados similares aos aqui obtidos. (Dudev e Lim 2000). Além disso, os resultados da análise elementar e da espectrometria de absorção atômica para os complexos 1, 2 e 3 são consistentes com as fórmulas propostas.

Tabela 7 - Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) dos complexos 1, 2 e 3 e seus ligantes finais $\text{H}_2\text{L1bpea}$, $\text{H}_2\text{L1bpea-amig}$ e $\text{H}_2\text{L1bpea-apur}$.

Atribuição	1	L1bpea	2	L1bpea- amig	3	L1bpea- apur
$\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ e $\text{C-H}_{\text{alif}})$	2913 - 2856	3007 - 2929	2908 - 2862	3064 - 2950	2923 - 2851	3061 - 2920
$\nu(\text{C=O}_{\text{ald}})$	1653	1684	-	-	-	-
$\nu(\text{C=N}$ e $\text{C=C})$	1609 - 1481	1649 - 1476	1608 - 1445	1627 - 1464	1601 - 1438	1614 - 1438
$\nu(\text{O-H}_{\text{fenol}})$	-	1380	-	1300	-	1369
$\nu(\text{C-O}_{\text{fenol}})$	1258	1224	1265	1227	1262	1239
$\nu(\text{Cl-O})$	1094	-	1095	-	1089	-
$\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$	766	756	765	786	766	754

4.2.3 ANÁLISE ELEMENTAR DE C, H E N

Os complexos sintetizados foram caracterizados por análise elementar de CHN e apresentaram resultados concordantes com as fórmulas moleculares propostas. As amostras foram deixadas na estufa por pelo menos 48 horas antes de serem acondicionadas em frascos apropriados para posterior análise. Os resultados obtidos apresentaram uma boa correlação entre os valores calculados e teóricos. A Tabela 8 apresenta a fórmula molecular, massa molar e as porcentagens de C, H, e N (calculada/encontrada) para os complexos sintetizados. Entretanto, mesmo deixando as amostras na estufa como citado anteriormente as propostas ainda foram sugeridas com moléculas de água presentes, o que pode decorrer da umidade do ar.

Tabela 8 - Porcentagens de C, H e N para os complexos inéditos **1**, **2** e **3** (calculada/encontrada).

Complexo	1	2	3
Fórmula Molecular	FeZnC ₃₈ H ₄₃ ClN ₅ O ₁₀ .3H ₂ O	FeZnC ₃₉ H ₄₇ ClN ₉ O ₉ .3H ₂ O	FeZnC ₄₅ H ₅₃ ClN ₁₁ O ₉ .2H ₂ O
MM (g mol ⁻¹)	940,51	996,58	1084,69
% C	48,53 / 48,66	47,00 / 46,73	49,83 / 50,10
% H	5,25 / 4,95	5,36 / 4,99	5,30 / 4,99
% N	7,45 / 7,11	12,65 / 12,71	14,20 / 13,93

4.2.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS ESI-MS

A espectrometria com ionização por electrospray se apresenta como uma técnica de análise aplicada com sucesso na caracterização dos complexos em solução, ao produzir íons em fase gasosa diretamente da solução contendo o composto a ser analisado. Ela permite obter informações qualitativas acerca das espécies carregadas existentes em solução.

A análise ESI-MS do complexo 1 foi realizada em solução pura de CH₃CN (500 nmol L⁻¹) e foi observado um grupo de picos com um máximo (100%) em *m/z* 375,1 com uma carga 2+ (Figura 22). Isso pode ser atribuído à espécie [Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II}(L₁bpea)]²⁺, sob as condições ESI-MS. Para o complexo 2, foi encontrado um pico com alta intensidade (Figura 23) de *m/z* 414,1 com carga 2+.

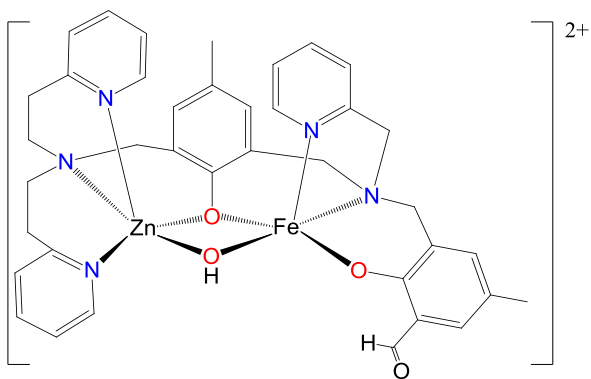
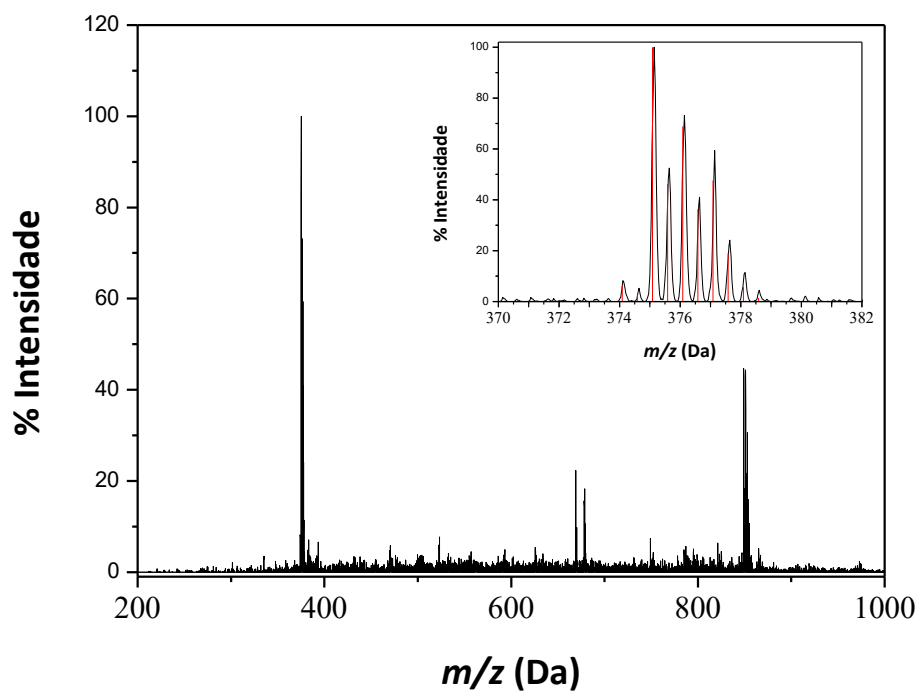
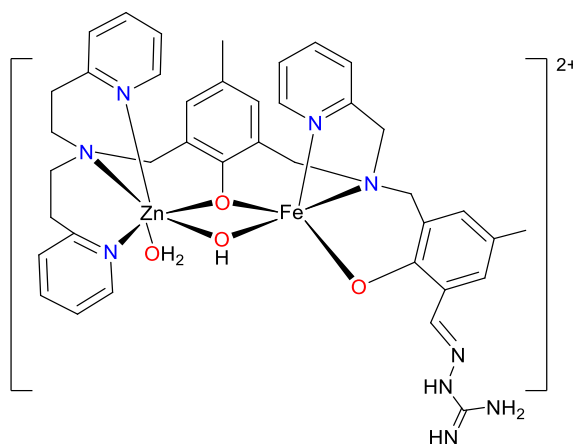
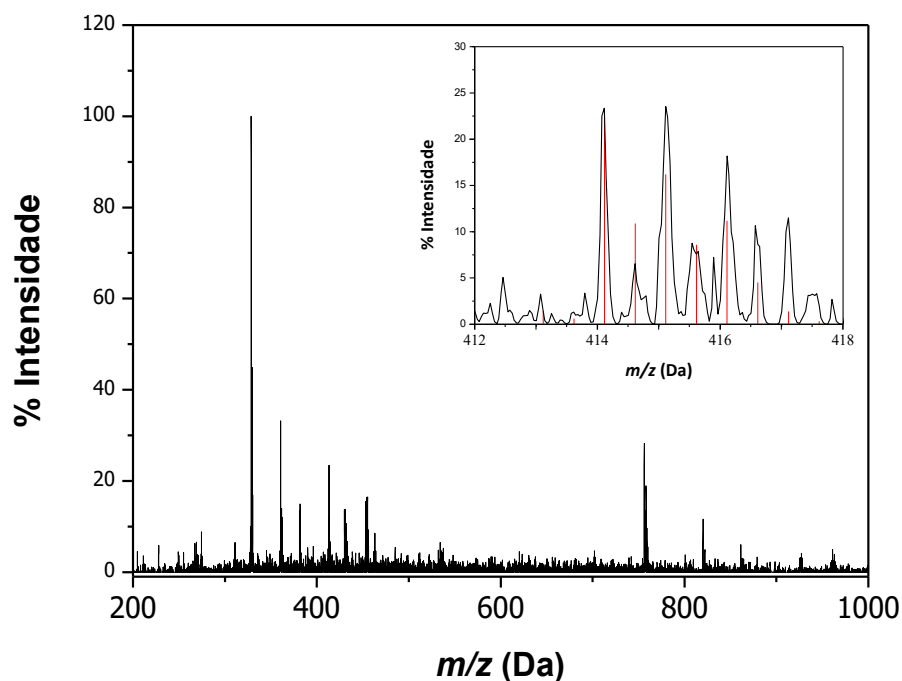
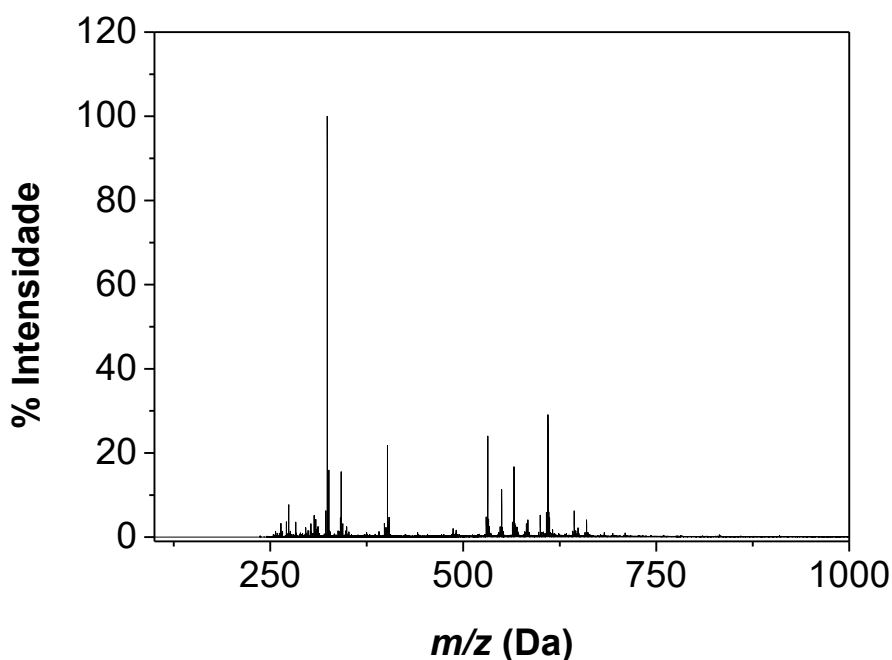
Figura 22 - Espectro de massa ESI-MS do complexo 1 em CH₃CN.

Figura 23- Espectro de massa ESI-MS do complexo 2 em CH₃CN:DMSO.



O sinal encontrado pode ser atribuído à espécie $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})(\text{L1bpea-mig})]^{2+}$. Esta atribuição indica a redução do grupo aminoguanidina. Para o complexo 3, o ESI/MS foi realizado em solução de CH₃CN/ DMSO (100:1 v:v), devido à menor solubilidade em acetonitrila e como pode ser observado na figura 23, devido ao alto perfil de fragmentação deste composto sob condições ESI-MS, não foi possível observar o pico do íon molecular (Figura 24).

Figura 24 - Espectro de massa ESI-MS do complexo **3** em CH₃CN:DMSO.

A principal característica observada na análise de ESI-MS para os complexos obtidos é a permanência dos ligantes inéditos na esfera de coordenação, juntamente a moléculas de água e hidróxido, referentes aos demais ligantes e a ponte, respectivamente e seus fragmentos estão sumarizados na tabela 9. A partir desta observação, pode-se inferir a alta estabilidade dos complexos em solução, o que é de extrema importância quando se visa as aplicações de hidrólise que serão reportadas nas próximas seções.

Tabela 9 - Espécies determinadas na espectrometria de massa.

	Espécie	m/z	Representação
1	FeZnC ₃₈ H ₄₁ N ₅ O ₄ ⁺ (2+)	375,1	[Fe ^{III} (μ-OH)Zn ^{II} (L1bpea)] ²⁺
	FeZnC ₃₉ H ₄₆ N ₉ O ₄ (2+)	414,1	[Fe ^{III} (μ-OH)Zn ^{II} (H ₂ O)(L1bpea-amig)] ²⁺
3	-	-	-

4.2.5 CÁLCULOS E CORRELAÇÕES

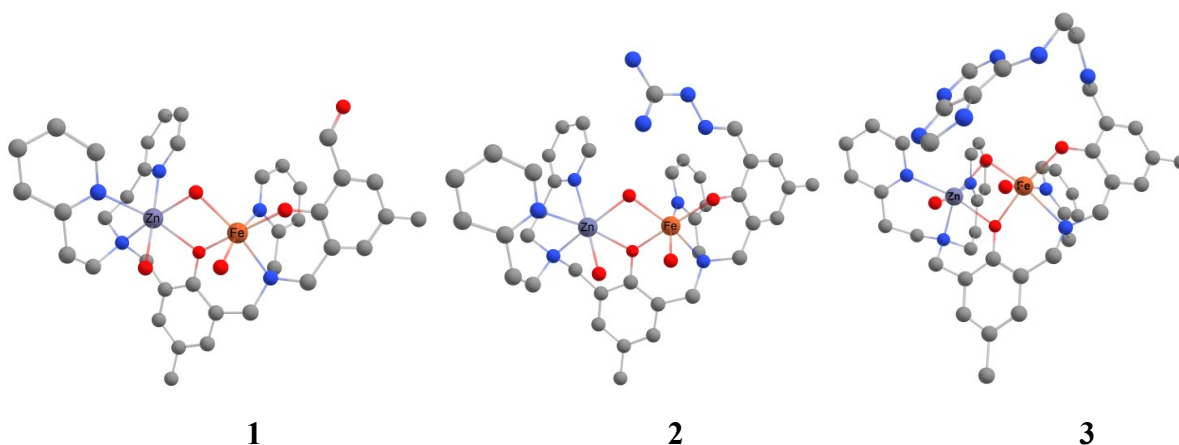
Com o intuito de aprofundar ainda mais o conhecimento dos mecanismos de hidrólise dos complexos, foram realizados cálculos de estrutura eletrônica dos mesmos. Dentro dos diversos métodos que podem ser empregados para o cálculo da estrutura eletrônica dos sistemas multieletrônicos, a maioria apresenta exigência superior de recursos computacionais e não são aplicáveis aos sistemas estudados neste trabalho. Assim, o método da Teoria do Funcional de Densidade que apresenta um custo computacional mais razoável e inclui um pouco de correlação eletrônica através dos funcionais, foi escolhido.

Inicialmente, como não foram obtidos monocristais para análise de raios X, os cálculos de DFT foram utilizados para visualizar estruturas prováveis para os complexos 1, 2 e 3 e seus conjugados de fosfato. A otimização das estruturas dos três complexos foi realizada considerando a espécie mais provável no pH ótimo do meio cinético, conforme apresentado na seção 4.2.8. Assim, os cálculos foram realizados considerando um grupo hidroxila terminal ligado ao centro de ferro e um ligante de água no centro de zinco. Também foi assumido que os grupos aminoguanidina (no complexo 2) e aminopurina (no complexo 3) estejam protonados, conforme observado na titulação potenciométrica para o pH ótimo da cinética.

Um das formas de verificar o mínimo de energia para os complexos é através dos modos vibracionais. Assim, quando observadas as frequências vibracionais das estruturas calculadas, para todos os complexos nenhuma frequência negativa foi encontrada, indicando que as estruturas estão no mínimo.

Como mostrado na Figura 25, todos os centros de zinco e ferro exibem uma geometria pseudo-octaédrica, que é esperada para o estado de solução para esses complexos, com base em estudos anteriores com sistemas semelhantes (Camargo *et al.* 2018, Lanznaster *et al.* 2002).

Figura 25 - Geometrias otimizadas do estado fundamental para os complexos 1, 2 e 3.



Como pode ser visto na Tabela 10, todos das ligações e ângulos estão em boa concordância com os dados relatados anteriormente para complexos $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}$, para os quais foram obtidas estruturas de raios X (Piovezan *et al.* 2010; Peralta *et al.* 2010).

Tabela 10 - Comprimentos de ligação selecionados para os complexos calculados e alguns valores de dados cristalográficos para comparação.

Ligações	1	2	3	Complexo [Fe ^{III} (μ-OH)Zn ^{II} (L1*)] (Piovezan <i>et al.</i> 2010)	Complexo [Fe ^{III} (μ-OH)Zn ^{II} (L-CH ₃)] (Peralta <i>et al.</i> 2010)
Fe-Zn	3,166	3,116	3,124	3,523(1)	3,0862(18)
Fe-N1	2,232	2,222	2,250	2,127(3)	2,186(3)
Fe-N2	2,263	2,223	2,211	2,185(6)	2,137(8)
Fe-O1	1,911	1,907	1,890	1,899(2)	1,892(3)
Fe-O2	1,944	1,955	2,052	1,948(5)	2,112(3)
Fe-O3	2,073	2,032	2,006	1,968(2)	2,053(3)
Fe-O4	1,996	2,064	1,992	1,986(5)	1,920(7)
Zn-N3	2,193	2,114	2,112	2,273(6)	2,152(7)
Zn-N4	2,155	2,183	2,150	2,120(7)	2,056(8)
Zn-N5	2,220	2,283	2,292	2,120(7)	2,073(8)
Zn-O3	2,099	2,131	2,205	2,081(7)	2,101(3)
Zn-O4	2,078	2,073	2,037	2,039(6)	1,969(6)
Zn-O5	2,254	2,221	2,217	2,067(6)	-

* L1= [Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II}(2-bis[[(2-piridilmetil)aminometil]-6-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)]aminometil]-4metil-fenol)].

As frequências e intensidades vibracionais calculadas foram comparadas com os espectros de infravermelho experimentais (Figuras 19, 20 e 21), mostrando concordância razoável. É importante notar que nenhum ânion perclorato foi incluído nas previsões teóricas, daí a falta de banda intensa em torno de 1100 cm⁻¹. Na Tabela 11 estão relacionadas as principais bandas e atribuições (Silverstein 1994;

Nakamoto 1978) para os complexos sintetizados e sua comparação com as atribuições calculadas por DFT e os espectros são mostrados nas Figuras 26, 27 e 28.

Tabela 11 - Atribuições das bandas de IR para os complexos 1-3 (experimental e calculado).

Atribuição	1	1	2	2	3	3
	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.
$\nu(\text{O-H})$	3476	3908 - 3892	3570	3927 - 3843	3429	3919 - 3866
$\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ e $\text{C-H}_{\text{alif}})$	2913 - 2856	3270 - 2961	2908 - 2862	3248 - 3028	2923 - 2851	3273 - 3023
$\nu(\text{C=O})$	1656	1837	-	-	-	-
$\nu(\text{C=N e C=C})$	1609 - 1445	1699 - 1481	1608 - 1445	1745 - 1484	1601 - 1438	1722 - 1447
$\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$	766	821 - 779	765	822 - 746	766	790 - 749
$\nu(\text{Cl-O})$	1094	-	1095	-	1089	-

Figura 26 - Espectros de IR Experimental do complexo 1 (linha preta) e o calculado (linha vermelha).

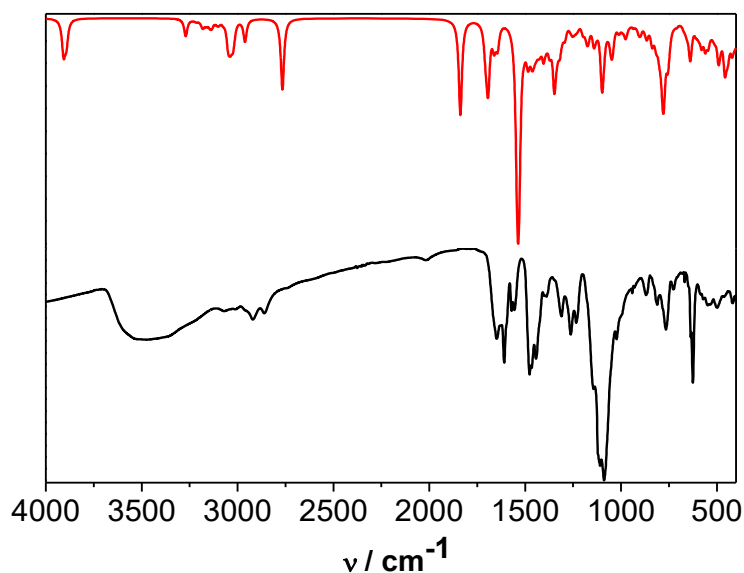


Figura 27 - Espectros de IR Experimental do complexo 2 (linha preta) e o calculado (linha vermelha).

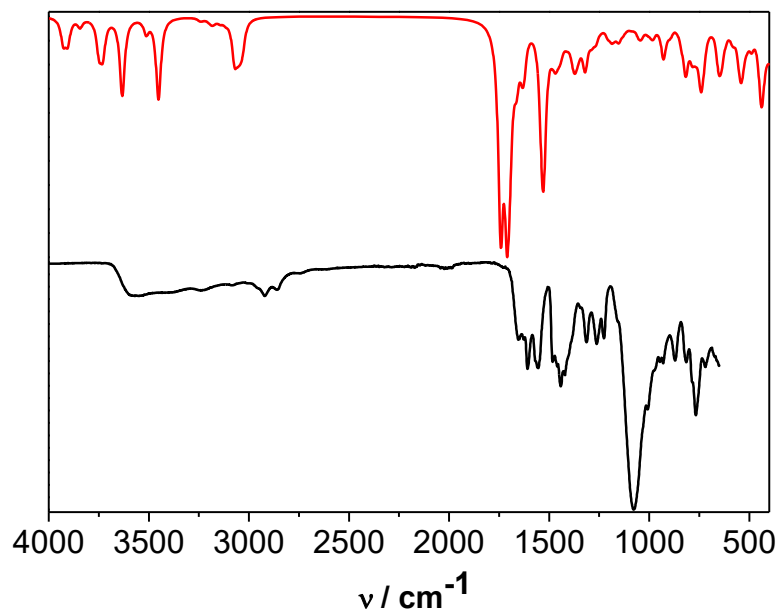
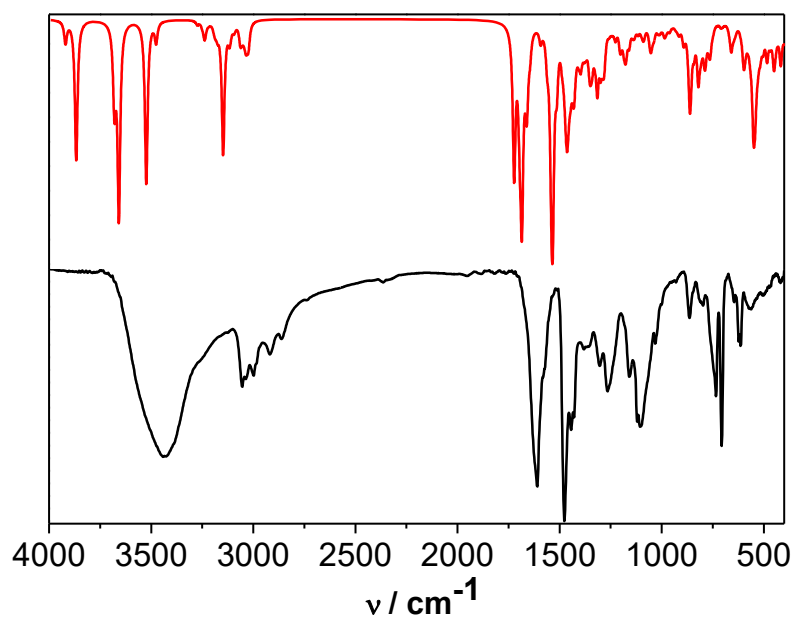


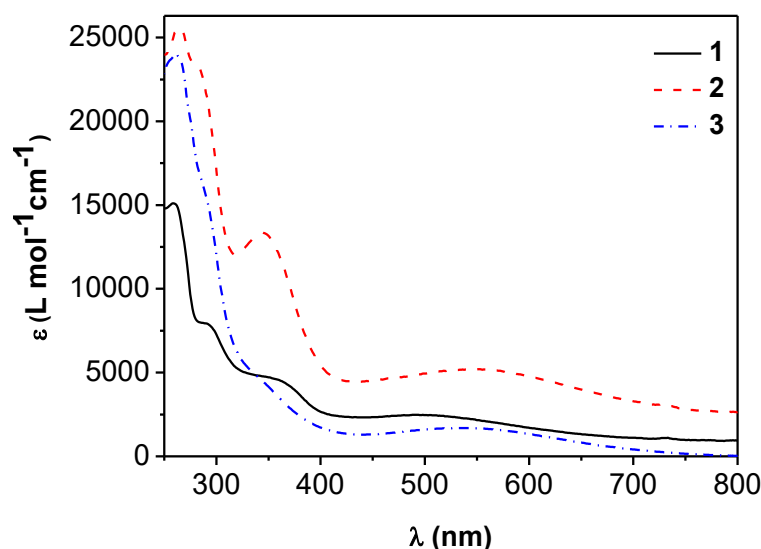
Figura 28 - Espectros de IR Experimental do complexo 3 (linha preta) e o calculado (linha vermelha).



4.2.6 ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA – UV-VIS

Em sequência, os espectros eletrônicos dos complexos foram obtidos com o propósito de se obter algumas informações a respeito da interação com a luz visível e ultravioleta e correlacionar com as demais propriedades físico-químicas e reatividade. Para complexos octaédricos de metais como por exemplo o Fe^{III} de configuração d^5 alto spin e o Zn^{II} não se deve esperar que haja a presença de bandas referentes à transições do tipo $d-d$ já que no primeiro caso estas são proibidas pela regra de seleção de spin e Laporte e no segundo os orbitais d estão totalmente preenchidos. Entretanto, podem ser observados bandas de maior energia referentes a transições entre os orbitais centrados nos metais e os orbitais centrados nos ligantes, ou seja, as transições do tipo transferência de carga Metal \rightarrow Ligante (MLCT) e as do tipo Ligante \rightarrow Metal (LMCT). Elas são permitidas por simetria e caracterizadas por altos valores de coeficientes de absorção molar (ϵ). Ainda, o espectro eletrônico pode apresentar bandas referentes à transições intraligantes (IL) (Housecroft 2011; Miessler 2014).

Os espectros de absorção UV-Vis para todos os complexos foram obtidos usando diferentes solventes. Em soluções de CH_3CN (Figura 29) se observou intensas bandas de absorção com λ_{max} em 502, 547 e 536 nm, respectivamente, para os complexos 1, 2 e 3, (Tabela 12), atribuídas à uma transferência de carga ligante-metal (LMCT) dos orbitais ($p\pi$) do grupo fenolato para os orbitais ($d\pi^*$) do íon Fe^{III} , o que também é observado em PAPs (Schenk *et al.* 2013; Karsten 2002; Mitić *et al.* 2009).

Figura 29 - Espectro eletrônico de absorção dos complexos 1, 2 e 3 em CH₃CN.Tabela 12 - Espectro eletrônico dos complexos 1, 2 e 3 em CH₃CN, CH₃CN:H₂O (1:1) e CH₂Cl₂.

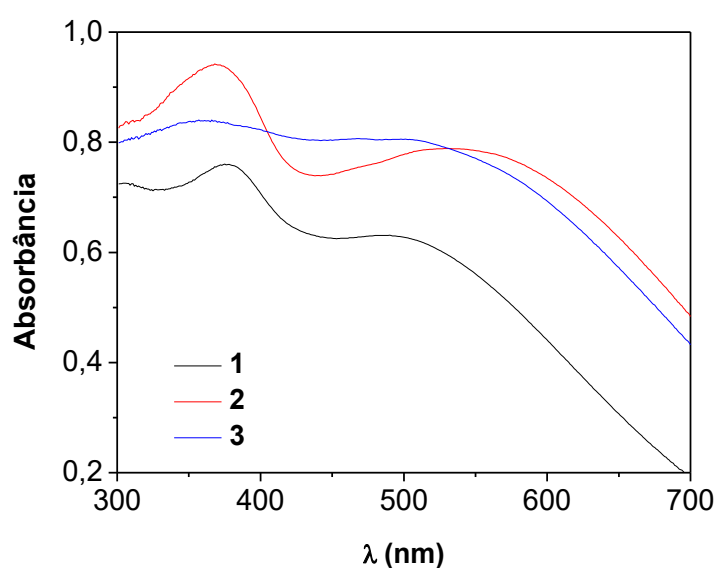
	CH ₃ CN	CH ₃ CN:H ₂ O (1:1)	CH ₂ Cl ₂
1	502 (3184)	498 (3157)	495 (3684)
2	547 (7789)	518 (6800)	534 (7426)
3	536 (1812)	505 (3146)	523 (3031)

Uma segunda transição também foi observada em torno de 350 nm com intensidade variada para os compostos, que é atribuída a uma transição TCLM envolvendo os orbitais ($p\pi$) do grupo fenolato e os orbitais ($d\sigma^*$) do centro de Fe^{III}. Além disso, todos os complexos exibem bandas intensas entre 250 e 300 nm, atribuídas a transições intra-ligantes nos anéis de piridina e fenólicos (Smith *et al.* 2009; Bosch *et al.* 2014; Luo 2012).

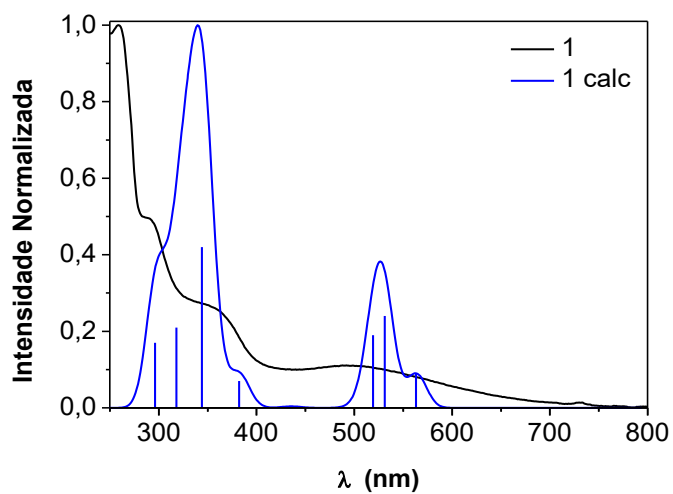
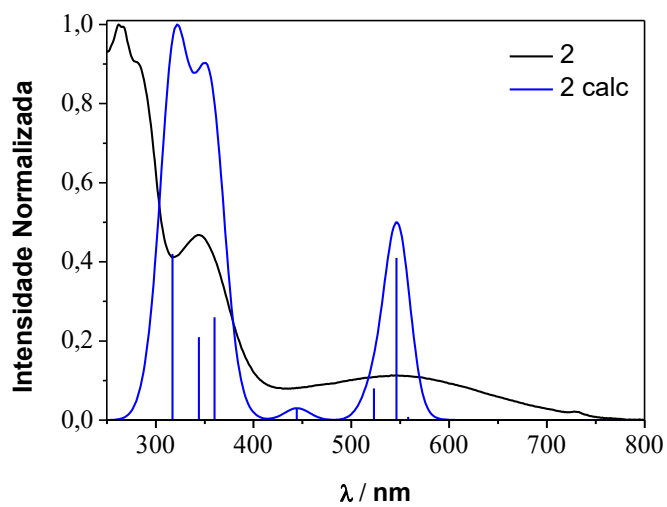
Ao comparar os espectros obtidos em diferentes solventes, observou-se que as bandas de TC são influenciadas pelo solvente, com um deslocamento batocrômico de CH₂Cl₂ para CH₃CN para todos os complexos e, quando comparado ao máximo em CH₃CN, a adição de água leva a um deslocamento hipsocrômico. Estes deslocamentos são maiores para os complexos 2 e 3, que possuem grupos

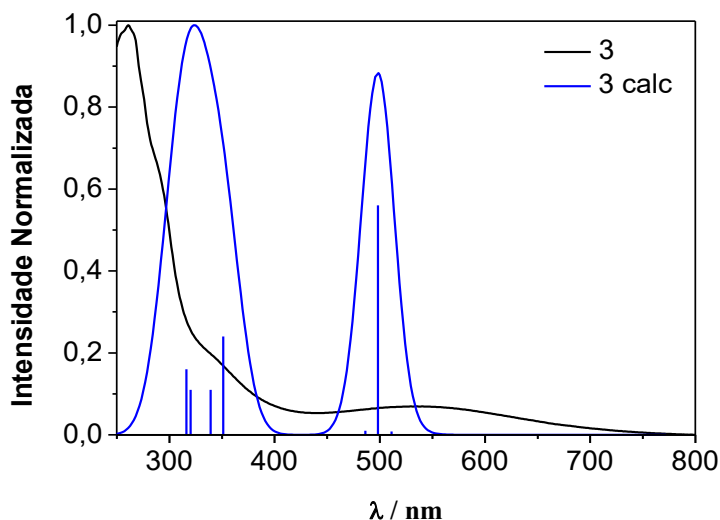
laterais que podem interagir com solventes polares. Os espectros de absorção no estado sólido para os complexos 1-3 (Figura 30) foram também obtidos e apresentaram máximos de absorção em torno de 500-550 nm para todos os complexos, indicando que a coordenação dos ligantes em torno dos centros metálicos é mantida em solução.

Figura 30 - Espectro eletrônico de absorção dos complexos 1, 2 e 3 em estado sólido.



A teoria do funcional de densidade dependente do tempo (TD-DFT) foi utilizada como forma de simular os espectros de absorção (Figuras 31, 32 e 33) e ajudar a entender as atribuições de bandas acima (Tabela 12).

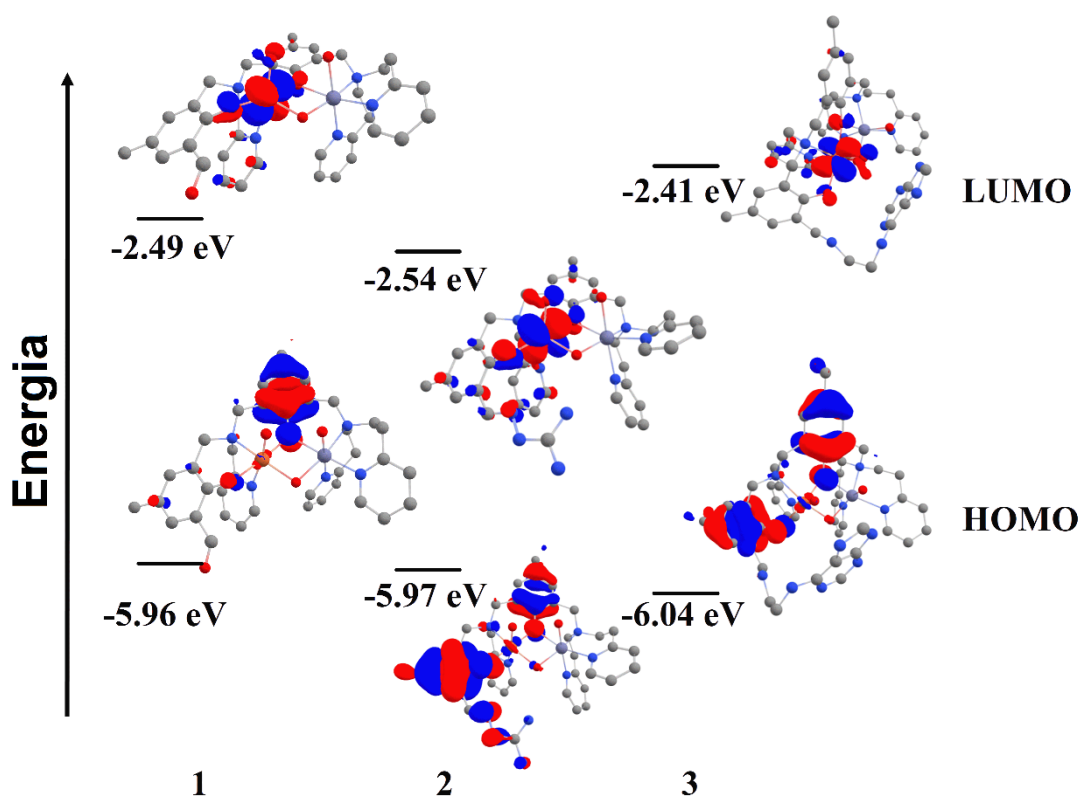
Figura 31 - Espectro de absorção simulado para o complexo 1 em CH₃CN.Figura 32 - Espectro de absorção simulado para o complexo 2 em CH₃CN.Figura 33 - Espectro de absorção simulado para o complexo 3 em CH₃CN.



Com base nesses cálculos, a ampla faixa de absorção na região (~ 500-550 nm) do composto 1 ocorre devido a três excitações ($S_1 \leftarrow S_0$, $S_2 \leftarrow S_0$ e $S_3 \leftarrow S_0$), todas relacionadas a uma LMCT de grupos fenolatos a diferentes orbitais $d\pi$ do centro de Fe^{III} . Entretanto para o composto 2, a transição de mais baixa energia é uma transição $d-d$ (589 nm), porém experimentalmente está encoberta pela transição de LMCT muito mais intensa na mesma faixa de energia. Já para o composto 3, a banda de mais baixa energia também é devida a uma LMCT, mas com uma contribuição significativa de transições $d-d$, o que pode explicar o menor valor de coeficiente de absorção desse complexo quando comparado aos complexos 1 e 2. Ainda, para 1-3, um ombro próximo a 380 nm também é observado, em que a transição calculada é referente a uma LMCT do grupo fenolato para os orbitais $d\sigma$, como mencionado acima, e transições $\pi-\pi^*$ (intra-ligantes ILCTs) envolvendo orbitais nos grupos piridina e fenolato. As transições restantes na extremidade de alta energia do espectro são transições $\pi-\pi^*$ com uma pequena contribuição de LMCT.

Além disso, no que diz respeito ao HOMO e LUMO dos complexos (Figura 34), o HOMO do complexo 2 tem uma grande contribuição do grupo aminoguanidina. Portanto, a solvatação deste grupo e/ou a possibilidade de ligação de hidrogênio é provavelmente a razão para a grande variação na faixa de LMCT observada em diferentes solventes. O mesmo argumento se aplica ao complexo 3, devido à presença da amina carregada presente no grupo aminopurina.

Figura 34 - Energias dos orbitais de fronteira calculados para os complexos 1, 2 e 3.



4.2.7 ESTUDOS ELETROQUÍMICOS

O comportamento redox de todos os complexos foi avaliado por voltametria de onda quadrada (OQ). Os potenciais redox foram referenciados ao eletrodo normal de hidrogênio (NHE) pelo uso do padrão interno ferroceno ($E_{1/2} = 0,400$ V vs NHE (Gagné 1980) para experimentos feitos em acetonitrila, e hexacianoferrato de potássio ($E_{1/2} = 0,358$ V vs NHE) (Lide 2000), para os experimentos realizados em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v). A Tabela 13 apresenta um resumo dos potenciais obtidos para os processos de transferência de elétrons dos complexos 1, 2 e 3 presentes neste trabalho.

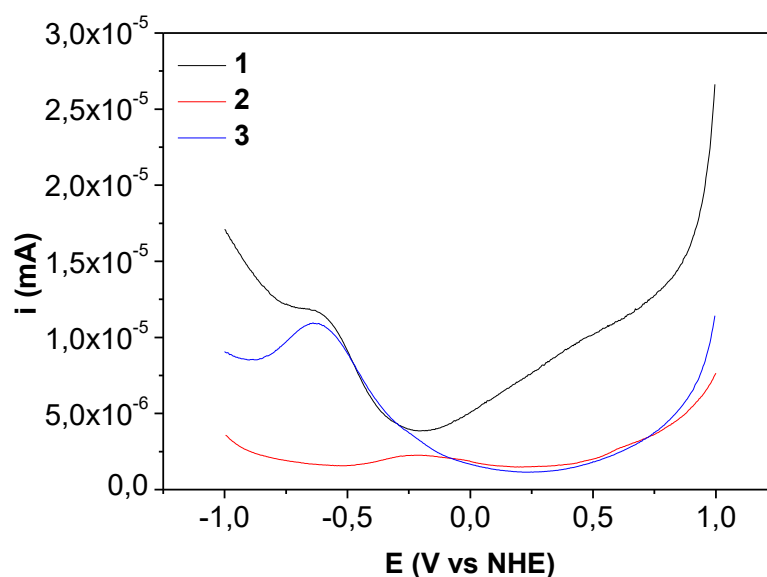
Tabela 13 - Potenciais redox (em V) determinados através de voltametria de onda quadrada (OQ) para o processo $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$.

E_{pc} (mV vs NHE)^a	
1	-600
2	-212
3	-630

^aMedido em solução de CH₃CN/H₂O (1:1 v/v) com concentração de 1×10⁻³ mol L⁻¹.

Os voltamogramas dos complexos (Figura 35) mostram apenas um processo redox, atribuído ao par redox Fe^{III}/Fe^{II} com E_{pc} = - 600 mV para 1, E_{pc} = - 212 mV para 2 e E_{pc} = - 630 mV para 3. Nesse caso é possível observar que os potenciais de redução seguem a mesma tendência observada para as energias calculadas do LUMO dos complexos, ou seja, quanto menor a energia do LUMO da espécie (mais negativo) menor o potencial de redução da mesma. O processo redox de Fe^{III}/Fe^{II} para o complexo 2 é, no entanto, mais positivo (anódico) do que esperado quando observado a energia do LUMO, possivelmente devido à fraca descrição do solvente e/ou efeitos de correlação. Os resultados obtidos diferem da maioria dos compostos semelhantes aqui comparados no que diz respeito ao ambiente de coordenação, contudo, as interações dos grupos laterais, assim como a flexibilidade aumentada do anel do ligante pode ter interferido de maneira significativa nos valores encontrados.

Figura 35 - Voltamogramas de onda quadrada para os complexos 1-3 em CH₃CN/H₂O (1:1 v/v). Condições: I = 0.1 mol L⁻¹ NaCl; eletrodo de trabalho: carbono vítreo; eletrodo auxiliar de platina; eletrodo de referência: Ag/Ag⁺; padrão interno: K₃[Fe(CN)₆].



4.2.8 TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

Os estudos de titulação potenciométrica dos complexos foram realizados em solução acetonitrila/água (1:1 v/v) devido à baixa solubilidade dos mesmos em água. Esses experimentos foram realizados para avaliar a presença de moléculas de água coordenadas aos centros metálicos, quando se encontram em solução. Isto é possível devido à influência da acidez de Lewis dos metais, que diminuem os valores de pK_a destas moléculas de água possibilitando que estes possam ser titulados em meio aquoso. (Martell 1996)

Os valores de pK_a encontrados estão listados na Tabela 14 e a atribuição proposta dos processos de equilíbrio correspondentes são mostradas nas Figuras 36, 37 e 38.

Tabela 14 - Valores das constantes de protonação obtidos para os complexos 1, 2 e 3.

Complexo	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	pK_{a4}
1	$3,27 \pm 0,27$	$5,73 \pm 0,32$	$8,29 \pm 0,26$	

2	$3,07 \pm 0,11$	$5,67 \pm 0,28$	$8,06 \pm 0,15$	$10,08 \pm 0,09$
3	$3,16 \pm 0,23$	$6,06 \pm 0,06$	$7,43 \pm 0,19$	$9,42 \pm 0,17$

Figura 36 - Proposta para os equilíbrios observados no complexo **1** em solução $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 1:1; $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl) à 25°C .

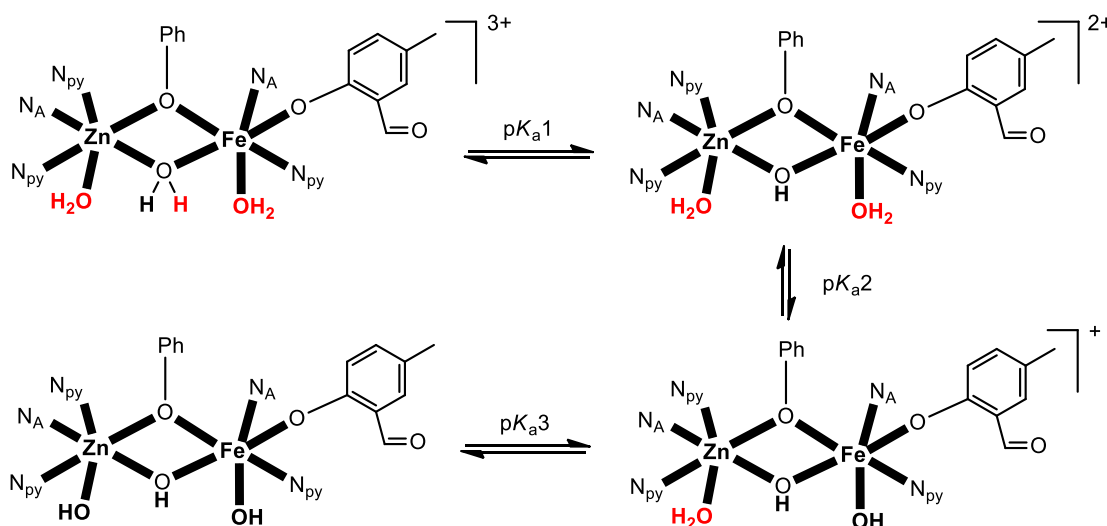


Figura 37 - Proposta para os equilíbrios observados no complexo **2** em solução $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 1:1; $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl) à 25°C .

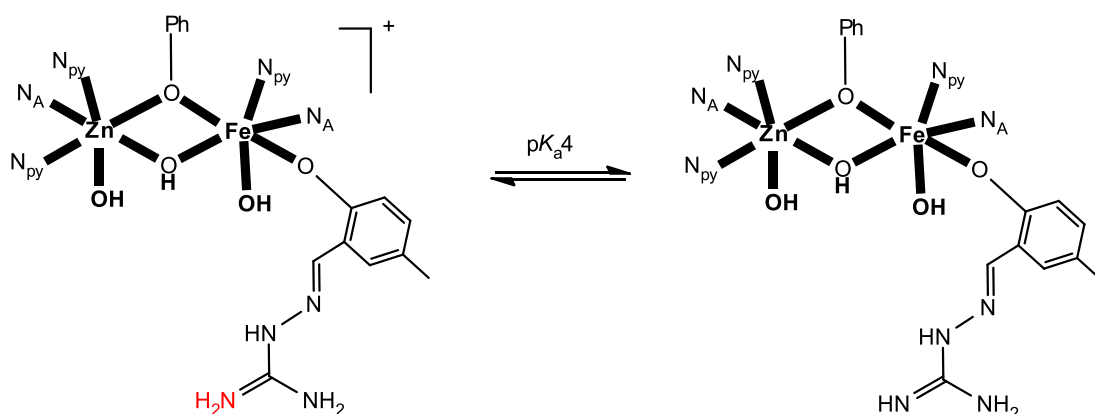
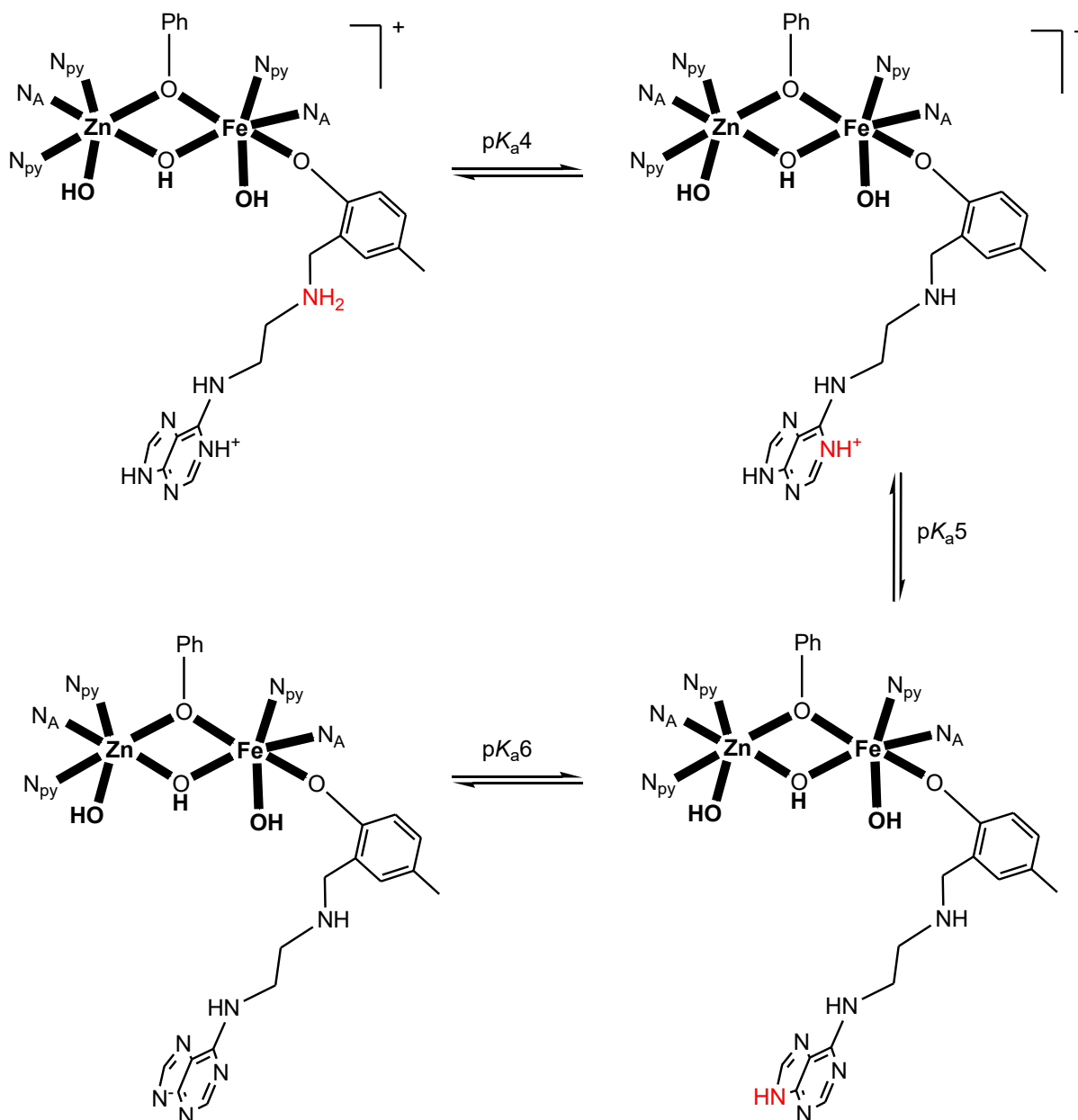


Figura 38 - Proposta para os equilíbrios observados no complexo **3** em solução $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 1:1; $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl) à 25°C .



A primeira constante, pK_{a1} ($\sim 3.0-3.3$), é atribuída à desprotonação de uma molécula de água coordenada e à formação de uma ponte hidroxio entre os centros Fe^{III} e Zn^{II}. A segunda constante de protonação (pK_{a2} ; $\sim 5.7-6.0$) é atribuída a uma molécula de H₂O, ligada ao Fe^{III}, e a terceira constante (pK_{a3} ; $\sim 7.5-8.3$) à desprotonação de uma molécula de H₂O ligada ao centro de Zn^{II}. A desprotonação das últimas moléculas citadas são atribuídas à moléculas de água ligadas aos centros de Fe^{III} e Zn^{II}, respectivamente, devido a acidez relativa entre eles, onde o centro de Fe^{III} é o mais ácido. Os valores para os três complexos são comparáveis

àqueles obtidos para o complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L1})]$ ($\text{pK}_{\text{a}1} = 3,33$, $\text{pK}_{\text{a}2} = 5,07$ e $\text{pK}_{\text{a}3} = 8,21$) já reportado por Piovezan (Piovezan *et al.* 2010).

O ligeiro aumento no $\text{pK}_{\text{a}3}$ é provavelmente devido à presença do anel de seis membros presente nos três complexos, enquanto que em $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L1})]$ o grupo aminopiridil forma um anel de cinco membros quando coordenado com o centro Fe^{III} . Os valores de $\text{pK}_{\text{a}2}$ indicam uma acidez aumentada para a água ligada a Fe^{III} no complexo 2 quando comparada com o complexo 1. Para o complexo 3, o efeito oposto foi observado. Este comportamento está de acordo com os potenciais de redução (Tabela 13) e as energias LUMO (Figura 34) dos complexos.

A diminuição nos valores de $\text{pK}_{\text{a}3}$ para 2 e 3 é consistente com efeitos de segunda esfera, como relatado anteriormente (Camargo *et al.* 2018). O $\text{pK}_{\text{a}4}$ é observado apenas para os complexos 2 e 3 e representa, portanto, os equilíbrios associados às modificações do ligante. Para o complexo 2, este equilíbrio é atribuído à protonação/desprotonação do grupo aminoguanidina (Figura 37); para o complexo 3 é atribuído à protonação/desprotonação da amina do grupo etilenodiamina (Figura 38). Ambas as atribuições estão de acordo com os valores para aminas livres em solução (Cox 2013). Dois valores adicionais de pK_{a} foram observados para o complexo 3 a $4,67 \pm 0,15$ (atribuído à dissociação das espécies protonadas na posição N1 da purina) e $11,17 \pm 0,30$ (atribuído à dissociação do imino hidrogênio na posição N9 da purina) e pode ser observado no Apêndice A4 (Benoit 1985).

4.2.9 REATIVIDADE- ATIVIDADE HIDROLÍTICA

Um dos objetivos da química biomimética é a obtenção de moléculas que exibam atividade catalítica análoga à das enzimas. Sendo assim, todos os complexos foram testados quanto às suas propriedades catalíticas como hidrolases sintéticas e os resultados dos testes cinéticos de reatividade estão descritos nesta seção.

4.2.9.1 Efeito do pH na hidrólise do 2,4-BDNPP

A atividade de fosfodiesterase dos complexos para a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP mostrou uma forte dependência do pH (Figuras 39, 40 e 41). Os dados foram ajustados de acordo com a equação 1, utilizando $\gamma = 0,3$ (Kantacha *et al.* 2011).

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

Em cada caso, a dependência do pH das velocidades iniciais exibiu um comportamento em forma de sino, com atividades máximas em torno de pH 7,5, 7,0 e 6,5 para os complexos 1, 2 e 3, respectivamente. Esses valores máximos são consistentes com aqueles relatados para compostos com ambientes de coordenação similares (Peralta 2010; Lanznaster 2002). Embora sejam um pouco mais elevados do que os relatados para PAPs, eles estão bem dentro da faixa de outras hidrolases bimetálicas com ambientes de coordenação semelhantes (por exemplo, urease, várias diesterases, metalo- β -lactamases) (Zambelli *et al.* 2011; Selleck *et al.* 2016; Pedroso *et al.* 2016). Enquanto os perfis em forma de sino para os complexos 2 e 3 são um pouco mais amplos do que para 1, cada complexo atinge um máximo entre pK_{a2} e pK_{a3} (ver Tabela 14) o que sugere que o hidróxido ligado ao centro de Fe^{III} atua como nucleófilo e o substrato provavelmente está ligado ao centro de Zn^{II} deslocando a molécula de água a ele coordenada (Figuras 36, 37 e 38 acima). Esse mecanismo está de acordo com o proposto para outros biomiméticos de metalo-hidrolases dinucleares (Camargo *et al.* 2018; Peralta *et al.* 2010; Neves *et al.* 2007; Bernhardt 2015) e vários sistemas da enzima correspondente. (Twitchett 2002; Hadler *et al.* 2009; Mitic *et al.* 2014).

Figura 39 - Dependência das velocidades iniciais pelo pH na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP pelo complexo 1 $[Complexo]_{final} = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[2,4-BDNPP]_{final} =$

$2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, [tampões 4,5-9,5]_{final} = $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v) à 25°C (linha pontilhada).

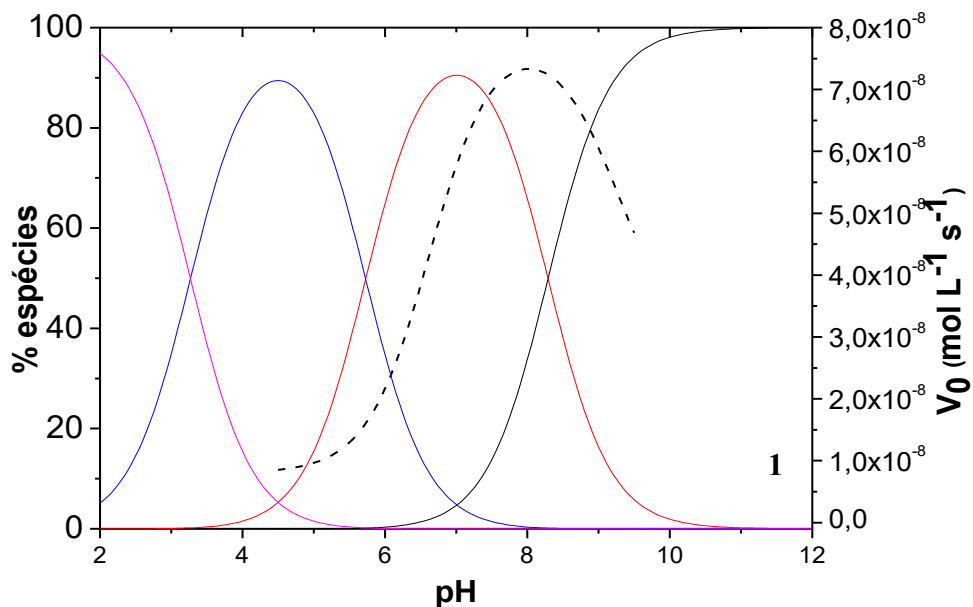


Figura 40 - Dependência das velocidades iniciais pelo pH na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP pelo complexo 2 [Complexo]_{final} = $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, [2,4-BDNPP]_{final} = 2×10^{-3} , [tampões 4,5-9,5]_{final} = $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v) à 25°C (linha pontilhada).

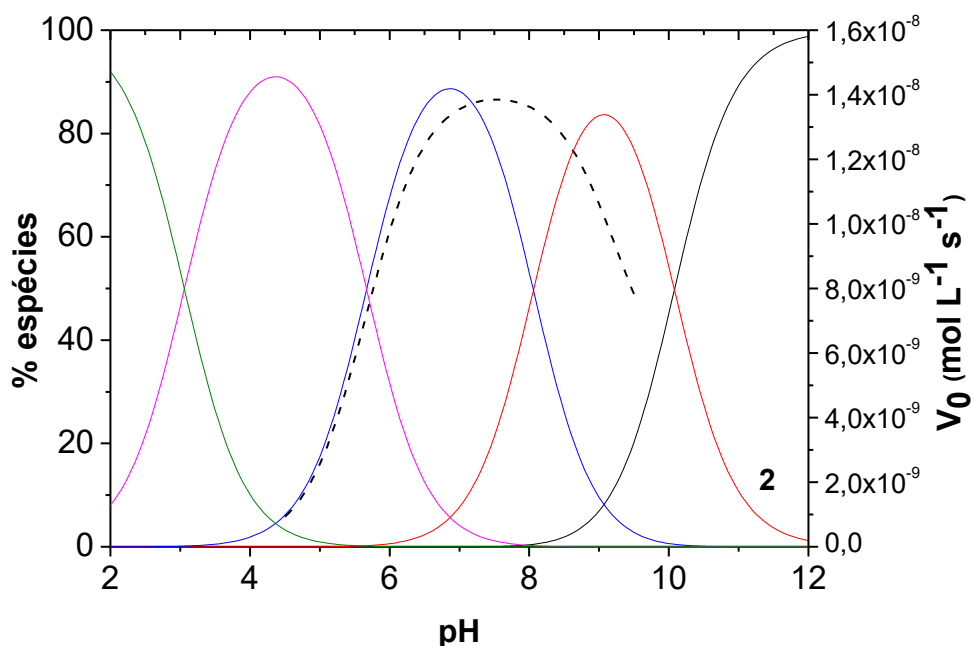
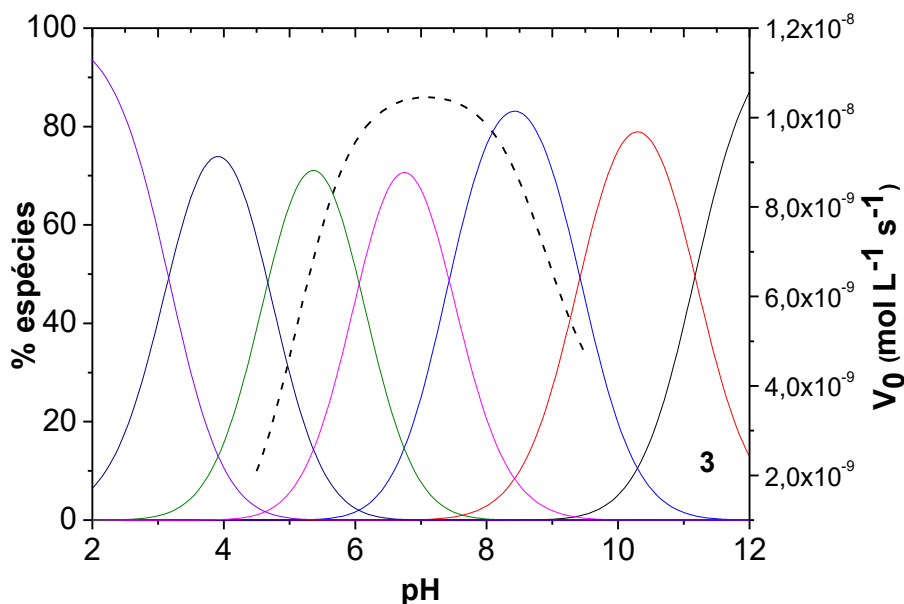


Figura 41 - Dependência das velocidades iniciais pelo pH na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP pelo complexo 3 [Complexo]_{final} = $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, [2,4-BDNPP]_{final} =

$2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{tampões } 4,5-9,5]_{\text{final}} = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v) à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (linha pontilhada).



4.2.9.2 Efeito da concentração do substrato 2,4-BDNPP

A dependência das velocidades iniciais de hidrólise frente a concentração de 2,4-BDNPP foi investigada com os complexos em seu pH ótimo (Figuras 42, 43 e 44). É evidente que as modificações do ligante nos complexos 2 e 3 levam a um aumento significativo (> 10 vezes) das taxas de reações, indicando a relevância dos efeitos de segunda esfera na otimização da eficiência catalítica da biomimética (Camargo *et al.* 2018).

Figura 42 - Dependência da concentração do substrato sobre as velocidades de hidrólise no pH ótimo (pH 7,5) para o complexo 1. $[\text{complexo}]_{\text{final}} = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{tampão}]_{\text{final}} = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v) à $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

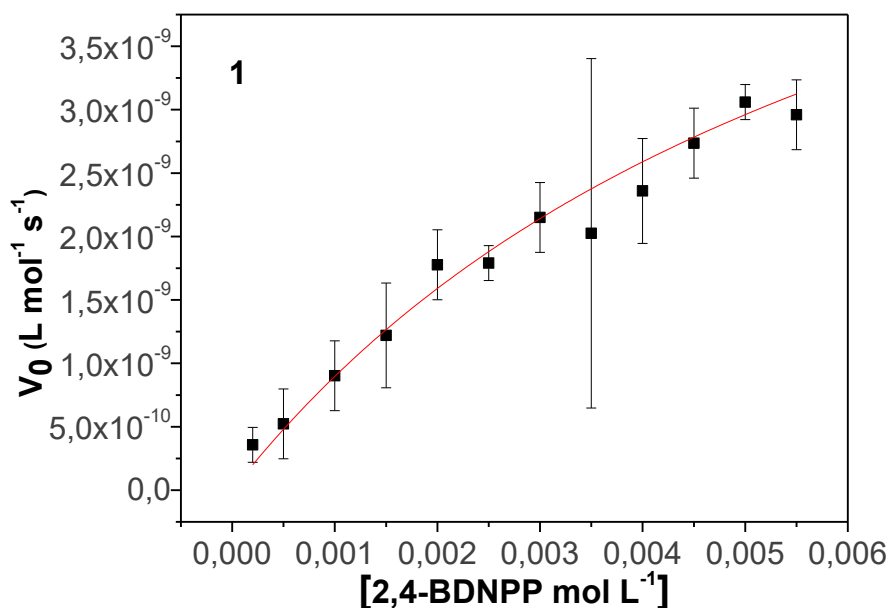


Figura 43 - Dependência da concentração do substrato sobre as velocidades de hidrólise no pH ótimo (pH 7,0) para o complexo 2. $[\text{complexo}]_{\text{final}} = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{tampão}]_{\text{final}} = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v) à 25 °C.

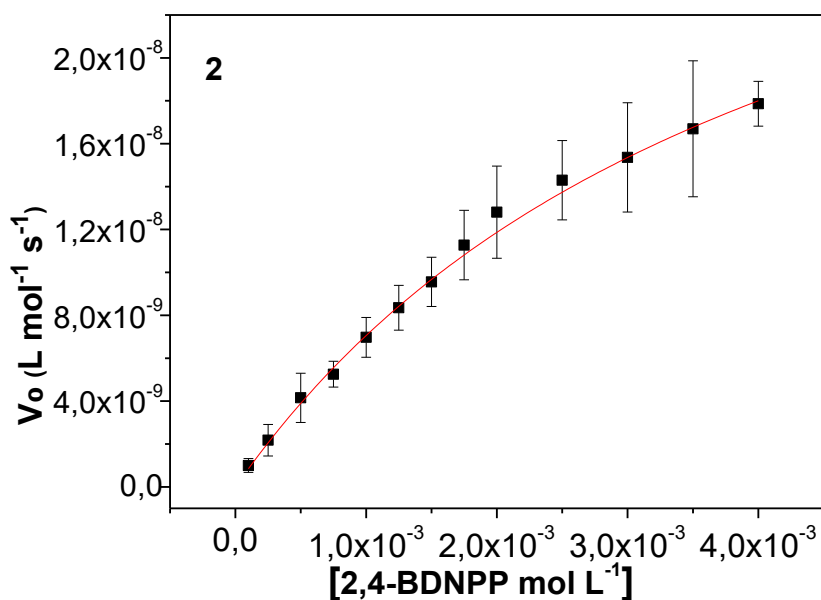
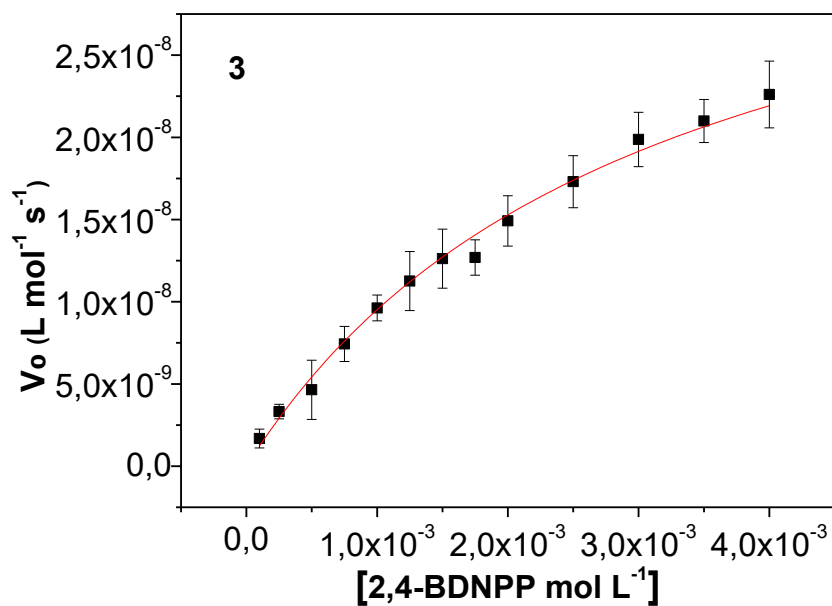


Figura 44 - Dependência da concentração do substrato sobre as velocidades de hidrólise no pH ótimo (pH 6,5) para o complexo 3. $[\text{complexo}]_{\text{final}} = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{tampão}]_{\text{final}} = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v) à 25 °C.



Para os complexos 2 e 3 foram realizados os experimentos em todos os valores de pH e os gráficos da razão k_{cat}/K_M vs pH são apresentados nas Figuras 4 e 46. A equação de Michaelis-Menten $v_0 = V_{max} ([S]/([S] + K_M))$ foi usada para calcular os parâmetros cinéticos k_{cat} e K_M (constante de Michaelis). Os parâmetros catalíticos relevantes estão resumidos na Tabela 15; complexos relacionados também foram incluídos (Silva *et al.* 2017; Carmargo *et al.* 2018, Jarenmark *et al.* 2011).

Figura 45 - Dependência da eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) obtida em cada valor de pH (4,5-9,5) para 2.

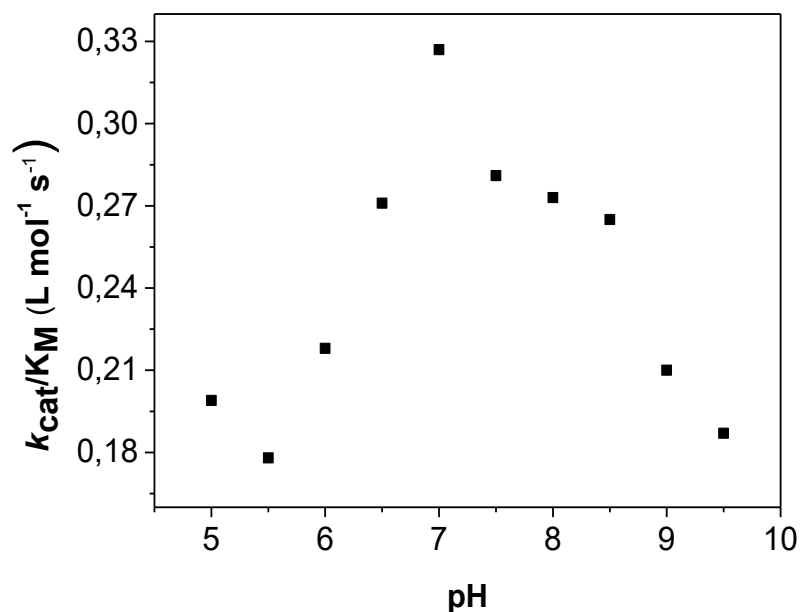
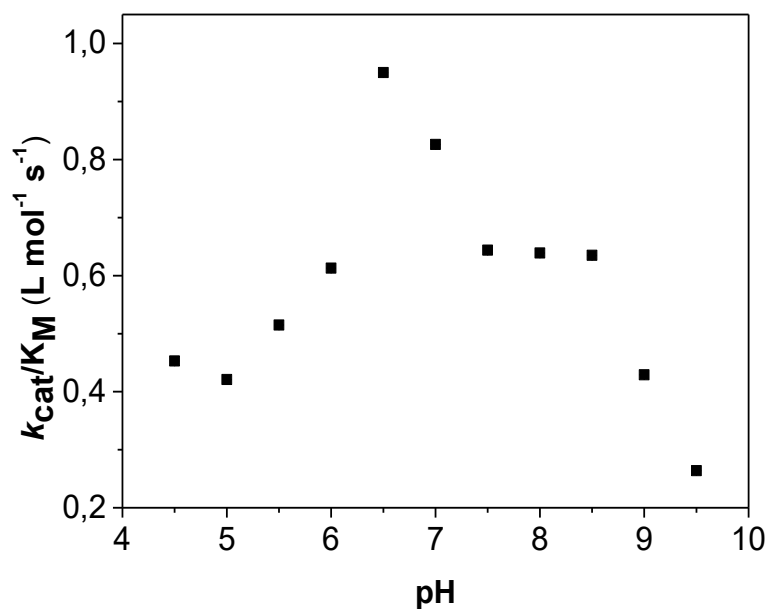


Figura 46 - Dependência da eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) obtida em cada valor de pH (4,5-9,5) para **3**.



Silva e colaboradores relataram complexos de $Fe^{III}Zn^{II}$ usando um ligante inicial muito semelhante ao do complexo 1, mas contendo um átomo de carbono a menos no lado macio do ligante (compare as Figuras 5 e 18). Esta modificação praticamente não teve efeito sobre k_{cat} e apenas uma pequena sobre K_M , levando a

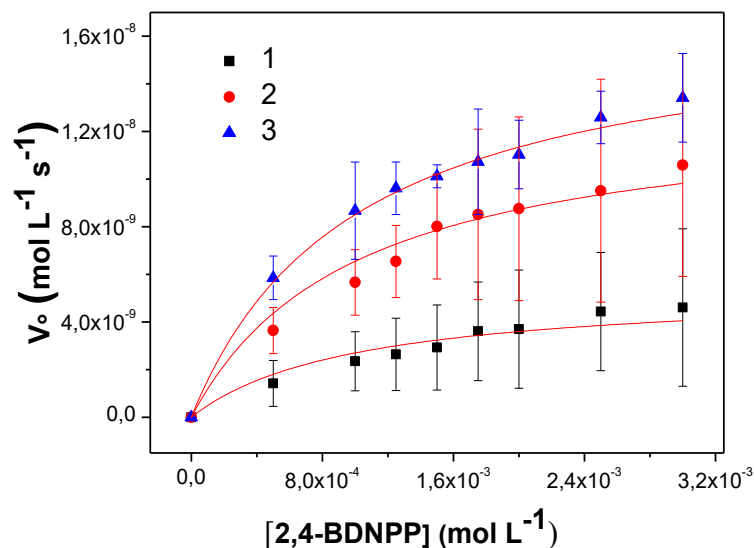
um impacto geral muito modesto sobre a eficiência catalítica (k_{cat}/K_M). Esta pequena variação era esperada para o k_{cat} , que tem maior influência no lado duro do ligante (onde se encontra o íon Fe^{III} e o nucleófilo). Em contraste, a adição do grupo aminoguanidina ao lado duro do ligante (Fe^{III}) no complexo 2 conduz a um aumento de 9 vezes na eficiência catalítica. Um outro aumento de 50% na eficiência catalítica é alcançado quando se modifica o lado duro do ligante com o grupo aminopurina que é mais rígido e planar (complexo 3). Semelhante à eficiência catalítica, a constante de associação K_{assoc} ($\approx 1/K_M$) aumenta de 148 para 325 do complexo 1 para o complexo 3 (Tabela 15), demonstrando que a presença dos grupos amino protonados, carregados positivamente, melhora a ligação do substrato.

Tabela 15 - Parâmetros cinéticos para a hidrólise do 2,4-BDNPP catalisado pelos complexos 1, 2 e 3 e outros complexos para comparação.

Complexo	k_{cat} (s^{-1}) ($\times 10^3$)	K_M ($mol\ L^{-1}$) ($\times 10^3$)	K_{assoc} ($L\ mol^{-1}$)	k_{cat}/K_M ($L\ mol^{-1}\ s^{-1}$)	pH
1	0,35±1,02	6,75± 1,57	148	0,05	7,5
2	1,86±1,92	4,28± 0,32	233	0,43	7,0
3	1,94± 2,99	3,07± 0,38	325	0,63	6,5
Silva <i>et al.</i> 2017	0,32± 0,03	3,40± 0,57	294	0,09	7,0
Jarenmark <i>et al.</i> 2011	0,67	0,03	36	0,02	6,6
Camargo <i>et al.</i> 2018	0,21± 0,01	0,66± 0,03	1500	0,32	6,5

No complexo 2, assim como no complexo reportado por Silva 2017, esse aumento na eficiência catalítica se deve à interações eletrostáticas. No complexo 3, interações adicionais do tipo π -stacking através do grupo aminopurina levam a um aumento adicional da ligação do substrato, como mostrado na Figura 47.

Figura 47 - Efeito isotópico de deutério na clivagem hidrolítica do 2,4-BDNPP em D_2O para os complexos 1, 2 e 3.



É interessante notar que em um complexo Fe^{III}Zn^{II} usando uma estrutura de ligante semelhante aos complexos 1, 2 e 3, mas com uma maior modificação no lado duro do ligante, utilizando o grupo pireno, a ligação do substrato é reforçada (ou seja, alta K_{assoc} e baixa K_{M} ; Tabela 15). No entanto, este ganho na afinidade tem um preço porque o seu k_{cat} é menor do que o do sistema não modificado (isto é, complexo 1), conduzindo a uma eficiência catalítica global menor do que a dos complexos 2 e 3 (Camargo *et al.* 2018). Vale salientar que o mecanismo de hidrólise apresentado por Camargo e colaboradores é diferente, e dessa forma, não pode ser igualmente comparável, contudo, o tipo de interação existente na segunda esfera é semelhante. Assim, entende-se que a otimização da eficiência catalítica de um sistema de ligantes requer um equilíbrio fino entre a ligação de um substrato e a apresentação deste substrato numa orientação adequada ao centro catalítico. Isso naturalmente explica a complexidade estrutural observada nas enzimas naturais e define o grande desafio para o químico sintético.

De modo a analisar se o produto monoéster formado após a hidrólise de 2,4-BDNPP também é hidrolisado, foi realizada uma reação estequiométrica entre os complexos e o substrato. Para cada complexo, após 55 h de incubação à 50 °C, observou-se apenas atividade diesterásica, em concordância com estudos realizados com os complexos relacionados listados na Tabela 14 (Silva *et al.* 2017; Camargo *et al.* 2018, Jarenmark *et al.* 2011). O número de ciclos catalíticos, estimado a partir de uma reação que foi monitorada por 24h a 25 °C em 445 nm ($\epsilon =$

3600 L.mol⁻¹.cm⁻¹) com uma relação substrato/complexo de 50:1, apresentou valores de 10, 8 e 11 turnovers, respectivamente, para os complexos 1, 2 e 3 em seus pHs ótimos, resultados estes, que estão de acordo com compostos similares já relatados (Silva *et al.* 2017; Camargo *et al.* 2018; Peralta *et al.* 2010).

O efeito isotópico do deutério na velocidade de hidrólise foi determinado para investigar se ocorre transferência de prótons na etapa determinante da velocidade da reação (Figura 47). A relação k_H/k_D para 1 é 0,82, que se encontra dentro da faixa (0,80 <k_H/k_D <1,50) onde a transferência de prótons não contribui para o passo limitante da reação (Deal 1996). Em contraste, para os complexos 2 e 3 os valores correspondentes são 2,13 e 2,31, respectivamente; Assim, é provável que a catálise ocorra através de um mecanismo de base geral (k_H/k_D > 2) com uma transferência de prótons ocorrendo durante a etapa de determinação da velocidade (Deal 1996).

Experimentos cinéticos com o objetivo de avaliar o efeito da temperatura nas velocidades de catálise hidrolítica foram realizados de 25 a 50 °C, proporcionando estimativas dos parâmetros de ativação das reações (Tabela 16).

Tabela 16 - Parâmetros de ativação obtidos através da equação de Eyring para os complexos 1-3.

	ΔH^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	$T\Delta S^\ddagger$ ^a (kJ mol ⁻¹)	ΔG^\ddagger (kJ mol ⁻¹)
H ₂ O ^(Bunton 1969)	79,0	-34,4	113,8
1	74,4 ± 0,2	-17,0 ± 0,1	91,4 ± 0,5
2	43,2 ± 0,4	-45,7 ± 0,2	89,0 ± 0,6
3	19,7 ± 0,3	-68,7 ± 0,2	88,4 ± 0,4

^a à 25 °C

A influência da segunda esfera de coordenação pode ser dividida em um efeito entálpico e outro entrópico. A contribuição entálpica para a barreira de ativação diminui (é menos endotérmica) de 1 para 3, provavelmente devido à estabilização do estado de transição (TS) através de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre os grupos aminoguanidina e aminopurina dos ligantes e o substrato 2,4-BDNPP.

No entanto, estas interações de ligação melhoradas entre o substrato e os ligantes também conduzem a uma alteração significativa da entropia (ordem melhorada durante o TS) em ambos os complexos modificados. Como resultado, o ΔG^\ddagger indica que as barreiras de ativação para os dois complexos modificados são menores que as do complexo 1 não modificado, de acordo com as eficiências catalíticas aumentadas de 2 e 3 (Tabela 15), porém não tanto quanto poderia ser, devido a uma mudança de entropia desfavorável (Souza *et al.* 2013).

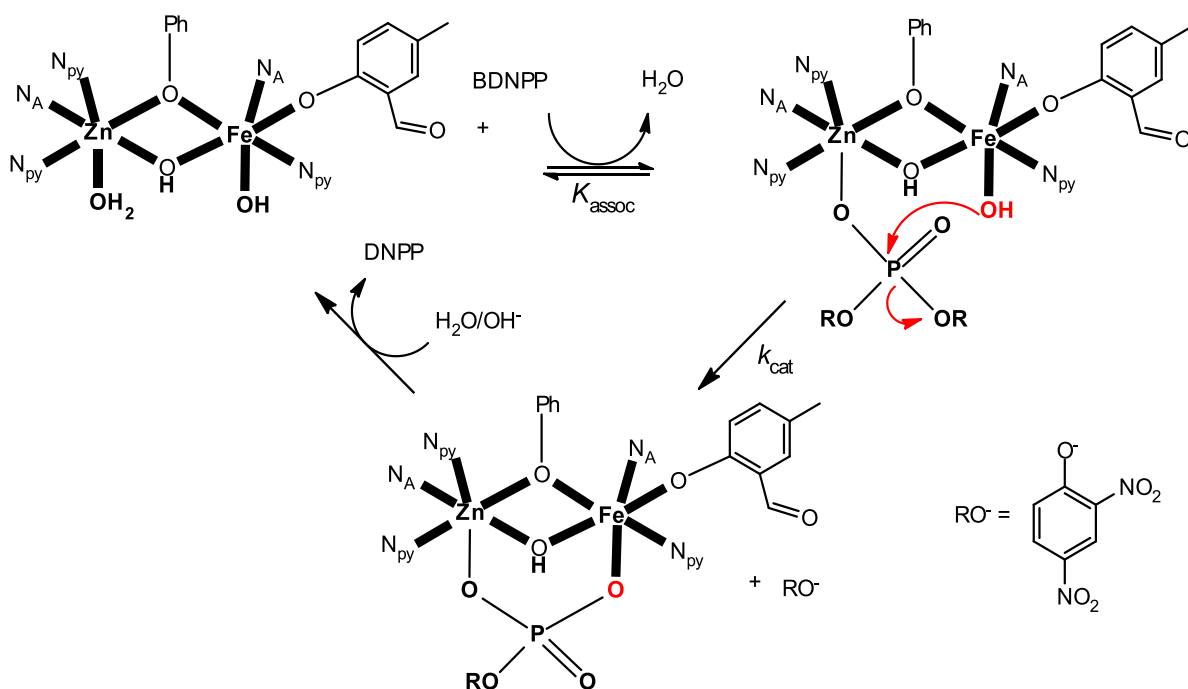
4.2.9.3 PROPOSTAS MECANÍSTICAS PARA A HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP

Tendo em vista os resultados obtidos e discutidos nas seções anteriores propõe-se os mecanismos de clivagem hidrolítica do 2,4-BDNPP para os complexos 1, 2 e 3, mostrando que 2 e 3 atuam por um mecanismo semelhante. Algumas das evidências para esta proposição foram obtidas das diversas técnicas de caracterização cujos complexos aqui descritos foram submetidos (seção 3).

Comum a cada sistema, e também de acordo com propostas para complexos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ relacionados (Souza *et al.* 2013, Carmargo *et al.* 2018; Peralta *et al.* 2010 e Neves *et al.* 2007), um hidróxido ligado ao centro de Fe^{III} ($\text{pK}_{\text{a}2}$; Tabela 14) desempenha um papel crucial no mecanismo (Esquemas 4, 5 e 6).

Além disso, no complexo substrato-catalisador inicial, o substrato liga-se ao centro de Zn^{II} , deslocando a molécula de água. No entanto, a diferença observada no efeito isotópico do solvente ($k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$) entre 1, 2 e 3 indica uma variação mecanística distinta entre os complexos modificados e o complexo inicial. Para 1, nenhuma transferência de prótons é relevante na etapa determinante da velocidade e um esquema mecanístico mais simples envolve o papel do hidróxido ligado ao centro de Fe^{III} como nucleófilo (Esquema 4).

Esquema 4 - Proposta mecanística para a hidrólise do diéster de fosfato promovida pelo complexo 1.



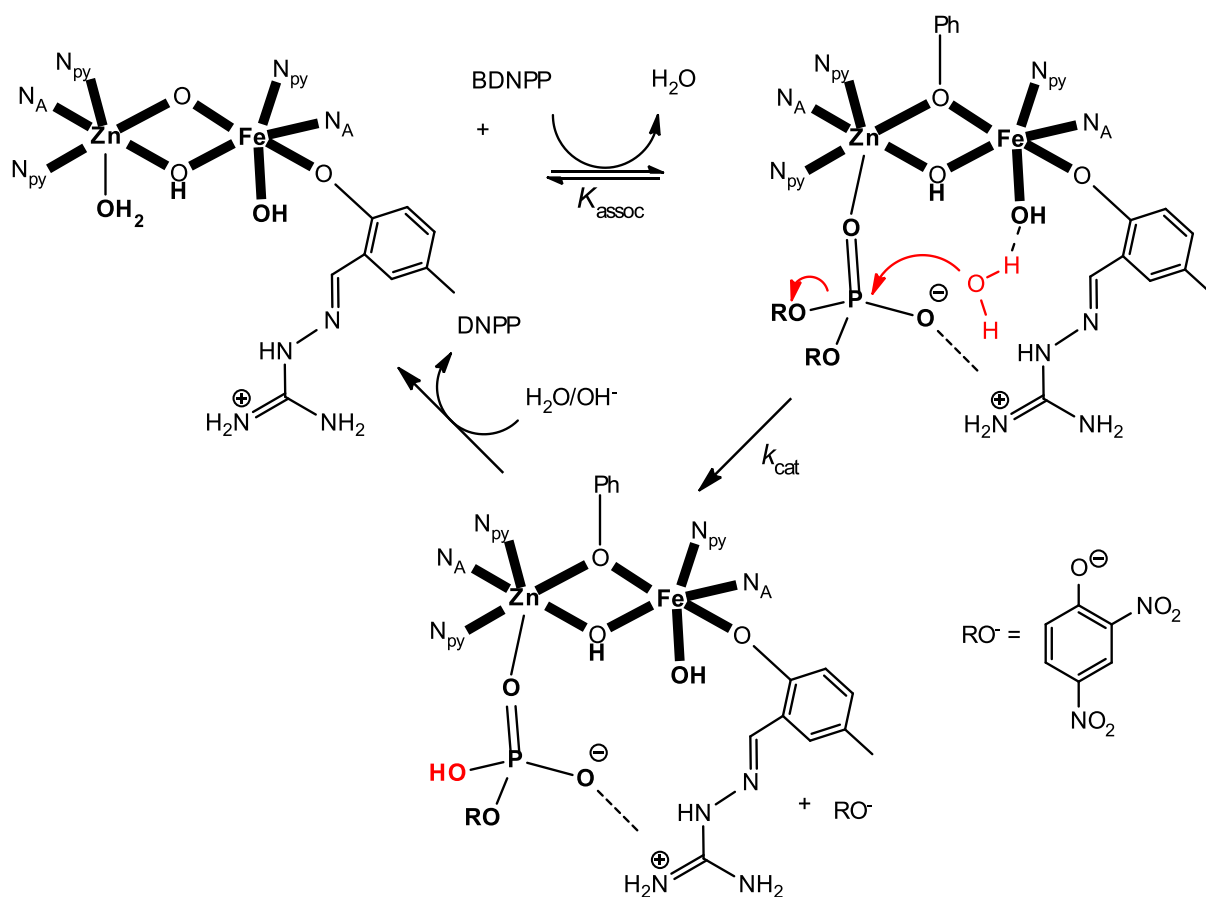
Em contraste, uma transferência de próton desempenha um papel importante no mecanismo empregado por 2 e 3; a razão $k_H/k_D > 2$ sugere o envolvimento de uma base geral. Assim, é proposto que o hidróxido ligado ao Fe^{III} ative uma molécula de água ligada por uma ligação de hidrogênio atuando como nucleófilo iniciador da reação (Esquemas 5 e 6). Os aumentos das K_{assoc} e k_{cat} , bem como a estabilização da TS para 2 e 3, são atribuídos a efeitos de segunda esfera que levam a uma melhor ligação do substrato e possivelmente também facilitam a ligação do nucleófilo nessa esfera externa.

Na etapa final do ciclo catalítico, o produto monoéster DNPP é liberado e duas moléculas de água reconstituem o centro catalítico. Aqui, uma grande diferença entre os esquemas mecanísticos propostos para 1, 2 e 3 é que no complexo 1 o DNPP é ligado a ambos os íons metálicos, enquanto nos complexos modificados ele só interage com o centro de Zn^{II} . Assim, espera-se que o deslocamento do DNPP seja mais rápido nos complexos modificados, de acordo com seus valores de k_{cat} significativamente aumentados quando comparados a 1 (Tabela 15).

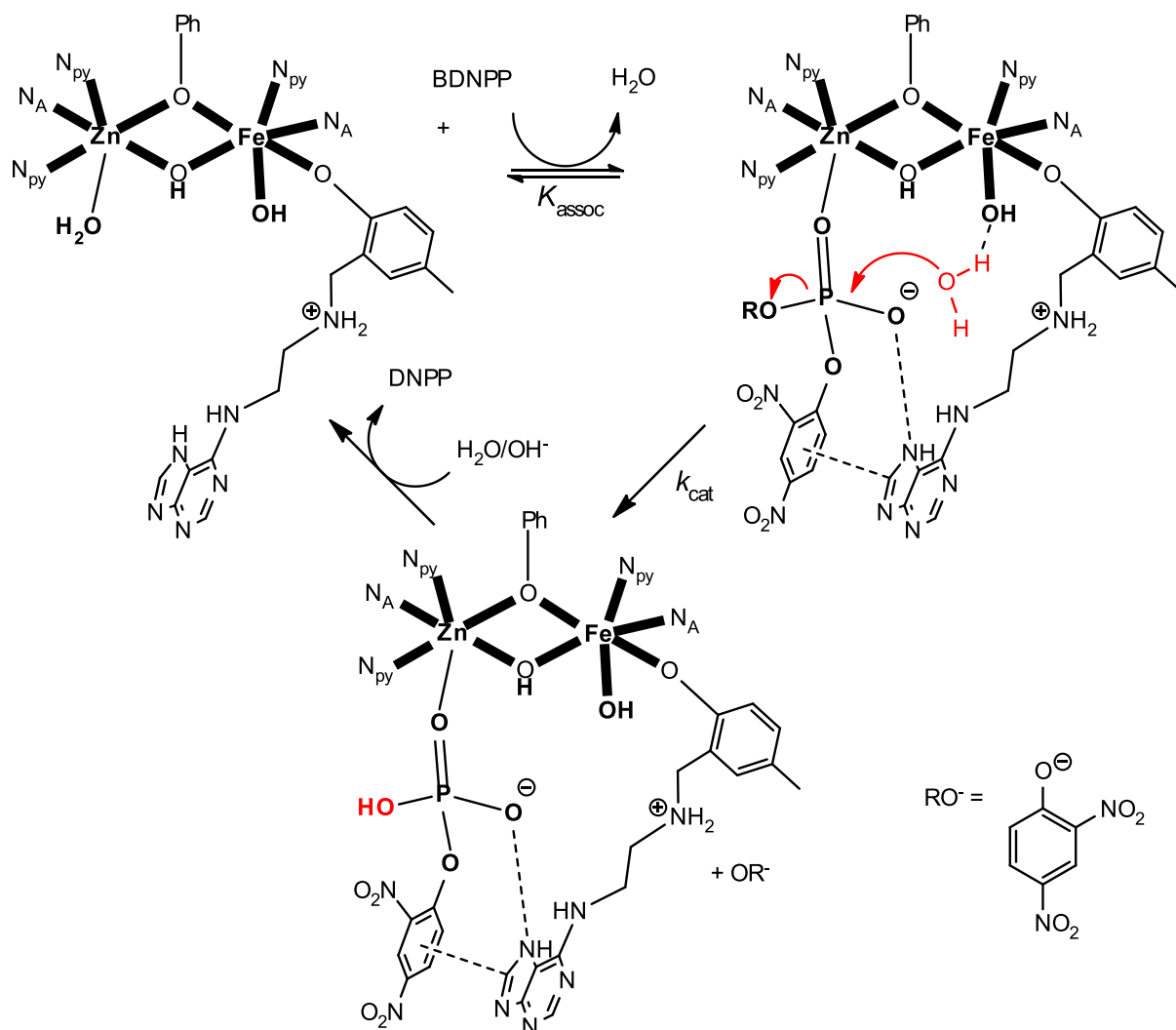
É interessante notar que os esquemas mecanísticos semelhantes também foram propostos para as PAPs; dependendo da composição do íon metálico no sítio ativo e também do substrato utilizado, as PAP parecem ser capazes de utilizar ou

um hidróxido ligado ao centro de Fe^{III}, ou um hidróxido na esfera externa como nucleófilos para iniciar a reação de hidrólise (Mitic *et al.* 2010).

Esquema 5 - Proposta mecanística para a hidrólise do diéster de fosfato promovida pelo complexo **2**.



Esquema 6 - Proposta mecanística para a hidrólise do diéster de fosfato promovida pelo complexo **3**.



5 CONCLUSÕES

Foram sintetizados e caracterizados por IR, ^1H NMR, o ligante inédito $\text{H}_2\text{L1bpea}$ e a partir deste, fez-se a derivatização com os grupos aminoguanidina e 6-aminopurina dando origem a mais dois ligantes inéditos, $\text{H}_2\text{L1bpea-amig}$ e

H₂L1bpea-apur. Ambos os ligantes apresentam características binucleantes não-simétricas e seus precursores também foram sintetizados com bons rendimentos e grau de pureza adequado à síntese dos compostos de coordenação descritos ao longo deste trabalho. Partindo-se do ligante H₂L1bpea, foi sintetizado o complexo 1 [(OH)Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II}(H₂O)(L₁bpea)](ClO₄), a partir do ligante H₂L1bpea-amig o complexo 2 [(OH)Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II}(H₂O)(L₁bpea-amig)](ClO₄) e a partir do ligante H₂L1bpea-apur o complexo 3 [(OH)Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II}(H₂O)(L₁bpea-apur)](ClO₄).

Estes complexos foram caracterizados por análise elementar de CHN, para poder se encontrar suas fórmulas mínimas; por espectrometria de absorção atômica podendo qualificar e quantificar os metais presentes; por infravermelho, de onde foi possível identificar as bandas provenientes dos ligantes e contra-íons; espectroscopia eletrônica em solução e sólida, de onde se atribuíram bandas *d-d* e de transferência de carga; eletroquímica, cujos experimentos forneceram os valores dos potenciais redox; titulação potenciométrica, que possibilitou a obtenção das constantes de protonação e os cálculos teóricos para se comparar e corroborar com as informações coletadas.

Testes de atividade frente ao substrato modelo 2,4-BDNPP assistidos pelos complexos 1, 2, e 3 foram realizados e as modificações realizadas nos ligantes conduziram a um aumento significativo da afinidade de ligação (K_{assoc}) e eficiência catalítica para o substrato modelo 2,4-BDNPP. No geral, os resultados aqui relatados demonstram um efeito bastante significativo de segunda esfera na catálise de substratos diéster. Enquanto a adição de grupos funcionais pode aumentar as interações entre o catalisador e o reagente (evidenciado por uma afinidade de ligação melhorada), essas interações precisam ser afinadas cuidadosamente para evitar um alinhamento não-ideal entre o reagente e o nucleófilo que desencadeia a hidrólise. Uma possível extensão para esses estudos pode envolver modificações na porção macia do ligante, onde se encontra o centro de Zn^{II}. No entanto, o estudo obtido aqui demonstra o potencial das modificações da esfera externa no projeto de ligantes adequados para complexos hidrolíticos que podem ser úteis em aplicações como a terapia do câncer.

6 REFERÊNCIAS

ACKERMANN, Jens; BUCHLER, Silke; MEYER, Franc. Structure–activity correlations in highly preorganized dicopper catechol oxidase model systems. **Comptes Rendus Chimie**, [s.l.], v. 10, n. 4-5, p.421-432, abr. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2006.09.014>.

ALLEE, B. L.; WILLIAMS, R. J.. Metalloenzymes: the entatic nature of their active sites.. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 59, n. 2, p.498-505, 1 fev. 1968. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.59.2.498>.

AMO-OCHOA, Pilar et al. Substituent and Noncovalent Interaction Effects in the Reactivity of Purine Derivatives with Tetracarboxylato-dirhodium(II) Units. Rationalization of a Rare Binding Mode via N3. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 52, n. 4, p.2174-2181, fev. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic302602c>.

BATISTA, Suzana Cimara et al. Highly efficient phosphate diester hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical FeIII/Nil model complex. **Inorganic Chemistry Communications**, [s.l.], v. 6, n. 8, p.1161-1165, ago. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1387-7003\(03\)00219-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1387-7003(03)00219-3).

BECK, Jennifer L. et al. Properties of a purple phosphatase from red kidney bean: a zinc-iron metalloenzyme. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Protein Structure And Molecular Enzymology**, [s.l.], v. 869, n. 1, p.61-68, jan. 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838\(86\)90310-9](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838(86)90310-9).

BELOUSOFF, Matthew J. et al. Synthesis, X-Ray Crystal Structures, and Phosphate Ester Cleavage Properties of bis(2-Pyridylmethyl)amine Copper(II) Complexes with Guanidinium Pendant Groups. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 47, n. 19, p.8641-8651, 6 out. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic8004079>.

BENOIT, Robert L.; FRÉCHETTE, Monique. Protonation of hypoxanthine, guanine, xanthine, and caffeine. **Canadian Journal Of Chemistry**, [s.l.], v. 63, n. 11, p.3053-3056, nov. 1985. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/v85-506>.

BENOIT, Robert L.; FRÉCHETTE, Monique. Protonation of hypoxanthine, guanine, xanthine, and caffeine. **Canadian Journal Of Chemistry**, [s.l.], v. 63, n. 11, p.3053-3056, nov. 1985. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/v85-506>.

BERNHARDT, Paul V. et al. An Approach to More Accurate Model Systems for Purple Acid Phosphatases (PAPs). **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 54, n. 15, p.7249-7263, 21 jul. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b00628>.

BERNHARDT, Paul V.; SCHENK, Gerhard; WILSON, Gregory J.. Direct Electrochemistry of Porcine Purple Acid Phosphatase (Uteroferrin)†. **Biochemistry**, [s.l.], v. 43, n. 32, p.10387-10392, ago. 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi0490338>.

BEROVA, Nina; NAKANISHI, Koji; WOODY, Robert W.. **Circular Dichroism: Principles and Applications**. New York: Wiley, 2000.

BOSCH, Simone et al. Asymmetric mono- and dinuclear Ga III and Zn II complexes as models for purple acid phosphatases. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [s.l.],

v. 162, p.343-355, set. 2016. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.12.028>.

BOSCH, Simone et al. Dinuclear Zinc(II) Complexes with Hydrogen Bond Donors as Structural and Functional Phosphatase Models. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 53, n. 17, p.9036-9051, 14 ago. 2014. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/ic5009945>.

BOSCH, Simone et al. Selective Coordination of Gallium(III), Zinc(II), and Copper(II) by an Asymmetric Dinucleating Ligand: A Model for Metallophosphatases. **Chemistry - A European Journal**, [s.l.], v. 21, n. 50, p.18269-18279, 18 nov. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201503348>.

BUNTON, Clifford A.; FARBER, S. J.. Hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate. **The Journal Of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.767-772, abr. 1969. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jo01256a001>.

BUSSCHAERT, Nathalie et al. Applications of Supramolecular Anion Recognition. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 115, n. 15, p.8038-8155, 21 maio 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00099>.

CAMARGO, Tiago P. et al. Synthesis, characterization, hydrolase and catecholase activity of a dinuclear iron(III) complex: Catalytic promiscuity. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 146, p.77-88, maio 2015. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.02.017>.

CAMARGO, Tiago Pacheco et al. Second-Sphere Effects in Dinuclear FeIII/znII Hydrolase Biomimetics: Tuning Binding and Reactivity Properties. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 57, n. 1, p.187-203, 13 dez. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b02384>.

CHAPMAN, S. K. et al. Metalloproteins and Electron Transfer. **Acs Symposium Series**, [s.l.], p.177-197, 3 mar. 1983. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY.
<http://dx.doi.org/10.1021/bk-1983-0211.ch009>.

Chemcraft - graphical software for visualization of quantum chemistry computations.
<https://www.chemcraftprog.com>.

CHEN, Xiaoqiang et al. Bisintercalator-containing dinuclear iron(III) complex: An efficient artificial nuclease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 19, n. 15, p.4139-4142, ago. 2009. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.06.003>.

CHENNAM, Kishan Prasad et al. Synthesis, characterization, DNA interactions, DNA cleavage, radical scavenging activity, antibacterial, anti-proliferative and docking studies of new transition metal complexes. **Journal Of Fluorescence**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.189-205, 6 nov. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10895-015-1701-3>.

COMBA, Peter et al. Monoesterase Activity of a Purple Acid Phosphatase Mimic with a Cyclam Platform. **Chemistry - A European Journal**, [s.l.], v. 18, n. 6, p.1700-1710, 10 jan. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201100229>.

COMBA, Peter et al. Spectroscopic Characterization of the Active FeIII/FeII and FeII/FeI Forms of a Purple Acid Phosphatase Model System. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 51, n. 22, p.12195-12209, 30 out. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic301347t>.

COX, Brian G.. **Solvent Effects on Acid-Base Strength**. New York: Oxford University Press, 2013.

CRICHTON, Robert. **Biological Inorganic Chemistry An Introduction**. Amsterdã: Elsevier, 2008.

DEAL, Kim A.; HENGGE, Alvan C.; BURSTYN, Judith N.. Characterization of Transition States in Dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-Catalyzed Activated Phosphate Diester Hydrolysis. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 118, n. 7, p.1713-1718, jan. 1996. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja952306p>.

DOI, Kei; ANTANAITIS, Bradley C.; AISEN, Philip. The binuclear iron centers of uteroferrin and the purple acid phosphatases. **Structure And Bonding**, [s.l.], p.1-26, 1988. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/3-540-50130-4_1.

DRENNAN, Catherine L; TOLMAN, William B. Bioinorganic chemistry. **Current Opinion In Chemical Biology**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.113-114, abr. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.02.040>.

DUDEV, Todor; LIM, Carmay. Tetrahedral vs Octahedral Zinc Complexes with Ligands of Biological Interest: A DFT/CDM Study. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 122, n. 45, p.11146-11153, nov. 2000. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja0010296>.

DURMUS, Atila et al. The active site of purple acid phosphatase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) . Metal content and spectroscopic characterization. **European Journal Of Biochemistry**, [s.l.], v. 260, n. 3, p.709-716, 5 mar. 1999. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00230.x>.

FARHADI, Shaheen A. et al. Enzymes as Immunotherapeutics. **Bioconjugate Chemistry**, [s.l.], v. 29, n. 3, p.649-656, 29 dez. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00719>.

FEDER, Daniel et al. Identification of Purple Acid Phosphatase Inhibitors by Fragment-Based Screening: Promising New Leads for Osteoporosis Therapeutics. **Chemical Biology & Drug Design**, [s.l.], v. 80, n. 5, p.665-674, 3 set. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.12001>.

FLANAGAN, J.u. et al. Identification and molecular modeling of a novel, plant-like, human purple acid phosphatase. **Gene**, [s.l.], v. 377, p.12-20, ago. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2006.02.031>.

GAGNE, Robert R.; KOVAL, Carl A.; LISENSKY, George C.. Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v.

19, n. 9, p.2854-2855, set. 1980. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic50211a080>.

GAGNE, Robert R.; KOVAL, Carl A.; LISENSKY, George C.. Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 19, n. 9, p.2854-2855, set. 1980. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic50211a080>.

GAHAN, Lawrence R. et al. Phosphate Ester Hydrolysis: Metal Complexes As Purple Acid Phosphatase and Phosphotriesterase Analogues. **European Journal Of Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 2009, n. 19, p.2745-2758, jul. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ejic.200900231>.

GREATTI, Alessandra et al. Synthesis, Structure, and Physicochemical Properties of Dinuclear NiII Complexes as Highly Efficient Functional Models of Phosphohydrolases. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 47, n. 3, p.1107-1119, fev. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic702132t>.

GRIMME, Stefan et al. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. **The Journal Of Chemical Physics**, [s.l.], v. 132, n. 15, p.154104-154104, 21 abr. 2010. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.3382344>.

GRIMME, Stefan. A simplified Tamm-Dancoff density functional approach for the electronic excitation spectra of very large molecules. **The Journal Of Chemical Physics**, [s.l.], v. 138, n. 24, p.244104-244104, 28 jun. 2013. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.4811331>.

GRIMME, Stefan; EHRLICH, Stephan; GOERIGK, Lars. Effect of the damping function in dispersion corrected density functional theory. **Journal Of Computational Chemistry**, [s.l.], v. 32, n. 7, p.1456-1465, 1 mar. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21759>.

GROSS, E. K. U.; KOHN, Walter. Local density-functional theory of frequency-dependent linear response. **Physical Review Letters**, [s.l.], v. 55, n. 26, p.2850-2852, 23 dez. 1985. American Physical Society (APS). <http://dx.doi.org/10.1103/physrevlett.55.2850>.

GUDDAT, Luke W et al. Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase. **Structure**, [s.l.], v. 7, n. 7, p.757-767, jul. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0969-2126\(99\)80100-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0969-2126(99)80100-2).

HAAS, Kathryn L.; FRANZ, Katherine J.. Application of Metal Coordination Chemistry To Explore and Manipulate Cell Biology. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 109, n. 10, p.4921-4960, 14 out. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr900134a>.

HADLER, Kieran S. et al. Structural Flexibility Enhances the Reactivity of the Bioremediator Glycerophosphodiesterase by Fine-Tuning Its Mechanism of Hydrolysis. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 131, n. 33,

p.11900-11908, 26 ago. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja903534f>.

HOLM, Richard H.; KENNEPOHL, Pierre; SOLOMON, Edward I.. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 96, n. 7, p.2239-2314, jan. 1996. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr9500390>.

HOLMÉN, Anders; NORDÉN, Bengt; ALBINSSON, Bo. Electronic Transition Moments of 2-Aminopurine. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 119, n. 13, p.3114-3121, abr. 1997. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja9635600>.

HOUSECROFT, C. E; SHARPE, A. G. **Inorganic Chemistry**. Prentice Hall, 2011.

HUSSEIN, Waleed M. et al. Purple acid phosphatase inhibitors as leads for osteoporosis chemotherapeutics. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 157, p.462-479, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.004>.

IZSÁK, Róbert; NEESE, Frank. An overlap fitted chain of spheres exchange method. **The Journal Of Chemical Physics**, [s.l.], v. 135, n. 14, p.144105-144105, 14 out. 2011. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.3646921>.

JAIN, Swapan S; TULLIUS, Thomas D. Footprinting protein–DNA complexes using the hydroxyl radical. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 3, n. 6, p.1092-1100, jun. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.72>.

JAIN, Swapan S; TULLIUS, Thomas D. Footprinting protein–DNA complexes using the hydroxyl radical. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 3, n. 6, p.1092-1100, jun. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.72>.

JARENMARK, Martin et al. Synthesis, Characterization, and Reactivity Studies of Heterodinuclear Complexes Modeling Active Sites in Purple Acid Phosphatases. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 50, n. 9, p.3866-3887, 2 maio 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic1020324>.

JEAN, J. M.; HALL, K. B.. 2-Aminopurine fluorescence quenching and lifetimes: Role of base stacking. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 98, n. 1, p.37-41, 2 jan. 2001. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.98.1.37>.

KAIJA, Helena et al. Phosphatase and Oxygen Radical-Generating Activities of Mammalian Purple Acid Phosphatase Are Functionally Independent. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 292, n. 1, p.128-132, mar. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2002.6615>.

KAIM, Wolfgang; SCHWEDERSKI, Brigitte; KLEIN, Axel. **Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life: An Introduction and Guide**. New York: John Wiley & Sons, 1994.

KANTACHA, Anob et al. Phosphate ester cleavage promoted by a tetrameric iron(III) complex. **Jbic Journal Of Biological Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.25-32, 28 ago. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-010-0696-0>.

KARSTEN, Peter et al. Synthesis, structure and catalase-like activity of a new dinuclear mixed valence MnII/MnIII complex containing an unsymmetric N5O2 donor ligand. **Inorganic Chemistry Communications**, [s.l.], v. 5, n. 6, p.434-438, jun. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1387-7003\(02\)00435-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1387-7003(02)00435-5).

KLABUNDE, Thomas et al. Mechanism of Fe(III) – Zn(II) Purple Acid Phosphatase Based on Crystal Structures. **Journal Of Molecular Biology**, [s.l.], v. 259, n. 4, p.737-748, jun. 1996. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1996.0354>.

KLABUNDE, Thomas; KREBSE, Bernt. The Dimetal Center in purple acid phosphatases. **Metal Sites In Proteins And Models**, [s.l.], p.177-198, 1997. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/3-540-62874-6_12.

KOSSMANN, Simone; NEESE, Frank. Efficient Structure Optimization with Second-Order Many-Body Perturbation Theory: The RIJCOSX-MP2 Method. **Journal Of Chemical Theory And Computation**, [s.l.], v. 6, n. 8, p.2325-2338, 2 jul. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ct100199k>.

LANZNASTER, Mauricio et al. A new heterobinuclear FeIIICuII complex with a single terminal FeIII–O(phenolate) bond. Relevance to purple acid phosphatases and nucleases. **Jbic Journal Of Biological Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.319-332, 21 abr. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-005-0635-7>.

LANZNASTER, Mauricio et al. New FeIIIZnIIComplex Containing a Single Terminal Fe–OphenolateBond as a Structural and Functional Model for the Active Site of Red Kidney Bean Purple Acid Phosphatase. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 41, n. 22, p.5641-5643, nov. 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic025892d>.

LI, Shuo et al. DNA Cleavage and Condensation Activities of Mono- and Binuclear Hybrid Complexes and Regulation by Graphene Oxide. **Molecules**, [s.l.], v. 21, n. 7, p.920-920, 15 jul. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21070920>.

LIDE, David R. **Handbook of inorganic chemistry and physics**. New York: Crs Press, 2000.

LINDQVIST, Ylva et al. Three-dimensional structure of a mammalian purple acid phosphatase at 2.2 Å resolution with a μ -(hydr)oxo bridged di-iron center. **Journal Of Molecular Biology**, [s.l.], v. 291, n. 1, p.135-147, set. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1999.2962>.

LINDSTRÖM, Bård; PETTERSSON, Lars J.. A brief history of catalysis. **Cattech**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.130-138, 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1025001809516>.

LIPPARD, Stephen J.; BERG, Jeremy M.. **Principles of bioinorganic chemistry**. Califórnia: University Science Books, 1994.

LIU, Changlin et al. DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 248, n. 1-2, p.147-168, jan. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cct.2003.11.002>.

LIU, Y. et al. Supramolecular Archimedean Cages Assembled with 72 Hydrogen Bonds. **Science**, [s.l.], v. 333, n. 6041, p.436-440, 21 jul. 2011. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1204369>.

LUO, Dawei; FAN, Ying; XU, Xun. The effects of aminoguanidine on retinopathy in STZ-induced diabetic rats. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 22, n. 13, p.4386-4390, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.130>.

LUONG, Thi Kim Nga; SHESTAKOVA, Pavletta; PARAC-VOGT, Tatjana N.. Kinetic studies of phosphoester hydrolysis promoted by a dimeric tetrazirconium(IV) Wells–Dawson polyoxometalate. **Dalton Transactions**, [s.l.], v. 45, n. 30, p.12174-12180, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6dt02211a>.

LUONG, Thi Kim Nga; SHESTAKOVA, Pavletta; PARAC-VOGT, Tatjana N.. Kinetic studies of phosphoester hydrolysis promoted by a dimeric tetrazirconium(IV) Wells–Dawson polyoxometalate. **Dalton Transactions**, [s.l.], v. 45, n. 30, p.12174-12180, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6dt02211a>.

MANCIN, Fabrizio; SCRIMIN, Paolo; TECILLA, Paolo. Progress in artificial metallonucleases. **Chemical Communications**, [s.l.], v. 48, n. 45, p.5545-5559, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c2cc30952a>.

MANDAL, Soham; MÜLLER, Jens. Metal-mediated DNA assembly with ligand-based nucleosides. **Current Opinion In Chemical Biology**, [s.l.], v. 37, p.71-79, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.01.019>.

MARTELL, Arthur E; HANCOCK, Robert D.. **Metal Complexes in Aqueous Solutions**. New York: Springer Us, 1996.

MARTELL; MONTEKAITIS. **Determination and use of stability constants**. New York: Vcd, 1992.

MASSOUD, Salah S. et al. Efficient hydrolytic cleavage of plasmid DNA by chlorocobalt(II) complexes based on sterically hindered pyridyl tripod tetraamine ligands: synthesis, crystal structure and DNA cleavage. **Dalton Transactions**, [s.l.], v. 43, n. 26, p.10086-10103, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c4dt00615a>.

MCKEOWN, Bradley A. et al. Pt(II)-Catalyzed Ethylene Hydrophenylation: Influence of Dipyridyl Chelate Ring Size on Catalyst Activity and Longevity. **ACS Catalysis**, [s.l.],

v. 3, n. 6, p.1165-1171, 3 maio 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cs400231f>.

MERKX, Maarten; PINKSE, Martijn W. H.; AVERILL, Bruce A.. Evidence for Nonbridged Coordination of p-Nitrophenyl Phosphate to the Dinuclear Fe(III)–M(II) Center in Bovine Spleen Purple Acid Phosphatase during Enzymatic Turnover. **Biochemistry**, [s.l.], v. 38, n. 31, p.9914-9925, ago. 1999. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi9904454>.

MISSLER, G. L.; TARR, D. A. **Inorganic Chemistry**. Prentice Hall 2014.

MITIĆ, Nataša et al. Catalytic Mechanisms of Metallohydrolases Containing Two Metal Ions. **Metal-containing Enzymes**, [s.l.], p.49-81, 2014. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.07.002>.

MITIĆ, Nataša et al. Metal-Ion Mutagenesis: Conversion of a Purple Acid Phosphatase from Sweet Potato to a Neutral Phosphatase with the Formation of an Unprecedented Catalytically Competent MnII/MnIIActive Site. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 131, n. 23, p.8173-8179, 17 jun. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja900797u>.

MITIĆ, Nataša et al. The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 106, n. 8, p.3338-3363, ago. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr050318f>.

MITIĆ, Nataša et al. The Divalent Metal Ion in the Active Site of Uteroferrin Modulates Substrate Binding and Catalysis. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 132, n. 20, p.7049-7054, 26 maio 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja910583y>.

MOSS, Donald W. et al. Clinical and Biological Aspects of Acid Phosphatase. **Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.431-467, jan. 1995. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/10408369509084690>.

MUKHERJEE, Subhjit et al. Cytotoxic, DNA binding and drug reservoir property of Pt(II)–sulfur complexes: In-vitro kinetics, mechanism with bio-relevant molecules in aqueous medium and a theoretical approach. **Polyhedron**, [s.l.], v. 119, p.84-97, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2016.08.024>.

MUNDINGER, Stephan et al. Modification and Optimization of the Bis-picolylamide-Based Relay Protection for Carboxylic Acids to be Cleaved by Unusual Complexation with Cu²⁺ Salts. **The Journal Of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 77, n. 20, p.8968-8979, out. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jo301349t>.

MUXEL, Alfredo A. et al. New La(III) Complex Immobilized on 3-Aminopropyl-Functionalized Silica as an Efficient and Reusable Catalyst for Hydrolysis of Phosphate Ester Bonds. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 53, n. 6, p.2943-2952, 3 mar. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic402705r>.

NAIK, Krishna et al. Pyrazole bridged dinuclear Cu(II) and Zn(II) complexes as phosphatase models: Synthesis and activity. **Journal Of Molecular Structure**, [s.l.], v. 1125, p.671-679, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.07.036>.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. New York: John Wiley & Sons, 1978.

NEESE, Frank. Software update: the ORCA program system, version 4.0. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1327-1327, 17 jul. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/wcms.1327>.

NELSON, David Le; COX, Michael M.. **Lehninger: principles of biochemistry**. New York: Freeman & Co., 2004.

NEVES, Ademir et al. An Unprecedented FeIII(μ -OH)ZnIIComplex that Mimics the Structural and Functional Properties of Purple Acid Phosphatases. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 129, n. 24, p.7486-7487, jun. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja071184l>.

NEVES, Ademir. **Apostila Bioinorgânica**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina., 2003.

NORLANDER, Ebbe; WHALEN, Anne M.. Iron 1992. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 142, p.43-99, jul. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0010-8545\(95\)96884-h](http://dx.doi.org/10.1016/0010-8545(95)96884-h).

ODDIE, G.w. et al. Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. **Bone**, [s.l.], v. 27, n. 5, p.575-584, nov. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s8756-3282\(00\)00368-9](http://dx.doi.org/10.1016/s8756-3282(00)00368-9).

PATHAK, Chandni et al. Heterodinuclear Zn(II)–Fe(III) and Homodinuclear M(II)–M(II) [M = Zn and Ni] complexes of a Bicompartmental [N6O] ligand as synthetic mimics of the hydrolase family of enzymes. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 185, p.30-42, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.04.018>.

PATHAK, Chandni 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 [N6O] Unsymmetrical Ligand. **Acs Omega**, [s.l.], v. 2, n. 8, p.4737-4750, 21 ago. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.7b00671>.

PATHAK, Chandni; GANGWAR, Manoj Kumar; GHOSH, Prasenjit. Homodinuclear [Fe(III)–Fe(III)] and [Zn(II)–Zn(II)] complexes of a binucleating [N4O3] symmetrical ligand with purple acid phosphatase (PAP) and zinc phosphoesterase like activity. **Polyhedron**, [s.l.], v. 145, p.88-100, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2018.01.029>.

PEDROSO, Marcelo M. et al. Call Binding Regulates and Dominates the Reactivity of a Transition-Metal-Ion-Dependent Diesterase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemistry - A European Journal**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.999-1009, 14 dez. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201504001>.

PERALTA, Rosely A. et al. Electronic Structure and Spectro-Structural Correlations of FeIII ZnII Biomimetics for Purple Acid Phosphatases: Relevance to DNA Cleavage and Cytotoxic Activity. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 49, n. 24, p.11421-11438, 20 dez. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic101433t>.

PERDEW, John P.; BURKE, Kieron; ERNZERHOF, Matthias. Generalized Gradient Approximation Made Simple. **Physical Review Letters**, [s.l.], v. 77, n. 18, p.3865-3868, 28 out. 1996. American Physical Society (APS). <http://dx.doi.org/10.1103/physrevlett.77.3865>.

PERDEW, John P.; BURKE, Kieron; ERNZERHOF, Matthias. Generalized Gradient Approximation Made Simple [Phys. Rev. Lett. 77, 3865 (1996)]. **Physical Review Letters**, [s.l.], v. 78, n. 7, p.1396-1396, 17 fev. 1997. American Physical Society (APS). <http://dx.doi.org/10.1103/physrevlett.78.1396>.

PERREAULT, Denise M.; CABELL, Larry A.; ANSLYN, Eric V.. Using guanidinium groups for the recognition of RNA and as catalysts for the hydrolysis of RNA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 5, n. 6, p.1209-1220, jun. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0896\(97\)00051-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0896(97)00051-5).

PETRENKO, Taras; KOSSMANN, Simone; NEESE, Frank. Efficient time-dependent density functional theory approximations for hybrid density functionals: Analytical gradients and parallelization. **The Journal Of Chemical Physics**, [s.l.], v. 134, n. 5, p.054116-054116, 7 fev. 2011. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.3533441>.

PIOVEZAN, Clovis et al. Heterodinuclear FeIII ZnII-Bioinspired Complex Supported on 3-Aminopropyl Silica. Efficient Hydrolysis of Phosphate Diester Bonds. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 49, n. 6, p.2580-2582, 15 mar. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic902489j>.

PISZKIEWICZ. **Kinetics of chemical and enzyme-catalyzed reactions**. New York: Oxford University Press, 1977.

RAWJI, Gulnar; MILBURN, Ronald M.. 2,4-Dinitrophenyl dihydrogen phosphate: a new synthesis of its mono-2,6-lutidinium salt. **The Journal Of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 46, n. 6, p.1205-1206, mar. 1981. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jo00319a032>.

ROAT-MALONE, Rosette M.. **Bioinorganic Chemistry - A Short Course**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2002.

ROBERTS, Asha E.; SCHENK, Gerhard; GAHAN, Lawrence R.. A Heterodinuclear FeIII ZnII Complex as a Mimic for Purple Acid Phosphatase with Site-Specific

ZnII Binding. **European Journal Of Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 2015, n. 19, p.3076-3086, 9 jun. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ejic.201500351>.

ROBINSON, Whitney D. et al. The secreted purple acid phosphatase isozymes AtPAP12 and AtPAP26 play a pivotal role in extracellular phosphate-scavenging by *Arabidopsis thaliana*. **Journal Of Experimental Botany**, [s.l.], v. 63, n. 18, p.6531-6542, nov. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ers309>.

ROSENZWEIG, Amy C; DOOLEY, David M. Bioinorganic chemistry. **Current Opinion In Chemical Biology**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.89-90, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.036>.

ROSSI, Liane M. et al. Hydrolytic activity of a dinuclear copper(II,II) complex in phosphate diester and DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], v. 337, p.366-370, set. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0020-1693\(02\)01111-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0020-1693(02)01111-8).

ROSSI, Liane M. et al. Synthesis, structure and properties of unsymmetrical μ -alkoxo-dicopper(II) complexes: biological relevance to phosphodiester and DNA cleavage and cytotoxic activity. **Inorganica Chimica Acta**, [s.l.], v. 358, n. 6, p.1807-1822, mar. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2004.10.027>.

RUNGE, Erich; GROSS, E. K. U.. Density-Functional Theory for Time-Dependent Systems. **Physical Review Letters**, [s.l.], v. 52, n. 12, p.997-1000, 19 mar. 1984. American Physical Society (APS). <http://dx.doi.org/10.1103/physrevlett.52.997>.

SALVIO, Riccardo; CASNATI, Alessandro. Guanidinium Promoted Cleavage of Phosphoric Diesters: Kinetic Investigations and Calculations Provide Indications on the Operating Mechanism. **The Journal Of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 82, n. 19, p.10461-10469, 19 set. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.7b01925>.

SCHÄFER, Ansgar; HORN, Hans; AHLRICHS, Reinhart. Fully optimized contracted Gaussian basis sets for atoms Li to Kr. **The Journal Of Chemical Physics**, [s.l.], v. 97, n. 4, p.2571-2577, 15 ago. 1992. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.463096>.

SCHÄFER, Ansgar; HORN, Hans; AHLRICHS, Reinhart. Fully optimized contracted Gaussian basis sets for atoms Li to Kr. **The Journal Of Chemical Physics**, [s.l.], v. 97, n. 4, p.2571-2577, 15 ago. 1992. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.463096>.

SCHENK, G. et al. Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants. **Gene**, [s.l.], v. 250, n. 1-2, p.117-125, maio 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00186-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00186-4).

SCHENK, Gerhard et al. Binuclear Metal Centers in Plant Purple Acid Phosphatases: Fe–Mn in Sweet Potato and Fe–Zn in Soybean. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 370, n. 2, p.183-189, out. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1999.1407>.

SCHENK, Gerhard et al. Probing the role of the divalent metal ion in uteroferrin using metal ion replacement and a comparison to isostructural biomimetics. **Jbic Journal Of Biological Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.139-155, 16 out. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-007-0305-z>.

SCHENK, Gerhard et al. Purple acid phosphatase: A journey into the function and mechanism of a colorful enzyme. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 257, n. 2, p.473-482, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.020>.

SELLECK, Christopher et al. AIM-1: An Antibiotic-Degrading Metallohydrolase That Displays Mechanistic Flexibility. **Chemistry - A European Journal**, [s.l.], v. 22, n. 49, p.17704-17714, 25 out. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201602762>.

SILVA, Graciela Aparecida dos Santos et al. Synthesis and characterization of FeIII(μ -OH)ZnII complexes: effects of a second coordination sphere and increase in the chelate ring size on the hydrolysis of a phosphate diester and DNA. **Dalton Transactions**, [s.l.], v. 46, n. 34, p.11380-11394, 2017. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c7dt02035j>.

SILVERSTEIN, Robert M.; BASSLER, Clayton G.; MORRILL, Terence C.. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SMITH, Sarah J. et al. Spectroscopic and Catalytic Characterization of a Functional FeIIIFeII Biomimetic for the Active Site of Uteroferrin and Protein Cleavage. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 51, n. 4, p.2065-2078, 30 jan. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic201711p>.

SMITH, Sarah J. et al. Structural and Catalytic Characterization of a Heterovalent Mn(II)Mn(III) Complex That Mimics Purple Acid Phosphatases. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 48, n. 21, p.10036-10048, 2 nov. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic9005086>.

SMITH, Sarah J. et al. The reaction mechanism of the Ga(III)Zn(II) derivative of uteroferrin and corresponding biomimetics. **Jbic Journal Of Biological Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 12, n. 8, p.1207-1220, 15 ago. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-007-0286-y>.

SOUZA, Bernardo de et al. Second-Coordination-Sphere Effects Increase the Catalytic Efficiency of an Extended Model for FeIIIMII Purple Acid Phosphatases. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 52, n. 7, p.3594-3596, 15 mar. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic400025j>.

SOUZA, Bernardo de et al. The effect of chain size on the modeling of second sphere effects in biomimetic complexes. **Journal Of Molecular Catalysis A: Chemical**, [s.l.], v. 397, p.76-84, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcata.2014.11.006>.

STROHALM, Martin et al. MMass3: A Cross-Platform Software Environment for Precise Analysis of Mass Spectrometric Data. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 82, n. 11, p.4648-4651, jun. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac100818g>.

STRYAER, Lubert. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

THAN, Roberto; FELDMANN, Arnold A.; KREBS, Bernt. Structural and functional studies on model compounds of purple acid phosphatases and catechol oxidases. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 182, n. 1, p.211-241, fev. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0010-8545\(98\)00234-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0010-8545(98)00234-3).

THAN, Roberto; FELDMANN, Arnold A.; KREBS, Bernt. Structural and functional studies on model compounds of purple acid phosphatases and catechol oxidases. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], v. 182, n. 1, p.211-241, fev. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0010-8545\(98\)00234-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0010-8545(98)00234-3).

TIREL, Emmanuel Y. et al. Catalytic Zinc Complexes for Phosphate Diester Hydrolysis. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 53, n. 31, p.8246-8250, 11 jun. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201400335>.

TJIOE, Linda et al. Phosphodiester Cleavage Properties of Copper(II) Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane Ligands Bearing Single Alkyl Guanidine Pendants. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 51, n. 2, p.939-953, 22 dez. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic2019814>

TWITCHETT, Mark B. et al. Reactivity of MII Metal-Substituted Derivatives of Pig Purple Acid Phosphatase (Uteroferrin) with Phosphate. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 41, n. 22, p.5787-5794, nov. 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic020037f>.

TWITCHETT, Mark B.; SYKES, A. Geoffrey. Structure, Properties and Reactivity of the FeII/FeIII and ZnII/FeIII Purple Acid Phosphatases. **European Journal Of Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 1999, n. 12, p.2105-2115, dez. 1999. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1099-0682\(199912\)1999:123.0.co;2-2](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1099-0682(199912)1999:123.0.co;2-2).

UPPENBERG, Jonas et al. Crystal structure of a mammalian purple acid phosphatase 1 Edited by R. Huber. **Journal Of Molecular Biology**, [s.l.], v. 290, n. 1, p.201-211, jul. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1999.2896>.

VALIZADEH, Mohsen et al. Phosphotyrosyl peptides and analogues as substrates and inhibitors of purple acid phosphatases. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 424, n. 2, p.154-162, abr. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2004.01.008>.

VINCENT, John B.; OLIVIER-LILLEY, Gay L.; AVERILL, Bruce A.. Proteins containing oxo-bridged dinuclear iron centers: a bioinorganic perspective. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 90, n. 8, p.1447-1467, dez. 1990. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr00106a004>.

WANG, Liangsheng et al. Comparative genetic analysis of Arabidopsis purple acid phosphatases AtPAP10, AtPAP12, and AtPAP26 provides new insights into their roles in plant adaptation to phosphate deprivation. **Journal Of Integrative Plant Biology**, [s.l.], v. 56, n. 3, p.299-314, mar. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jipb.12184>.

WANG, Ming-qi et al. Site-selective DNA hydrolysis induced by a metal-free peptide nucleic acid–cyclen conjugate. **Chemical Communications**, [s.l.], v. 47, n. 39, p.11059-11061, 2011. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c1cc14185f>.

WANG, Xuedong et al. Spectroscopic Characterization of a Ternary Phosphatase–Substrate–Fluoride Complex. Mechanistic Implications for Dinuclear Hydrolases. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 121, n. 39, p.9235-9236, out. 1999. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja990732v>.

WEIGEND, Florian; AHLRICHS, Reinhart. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s.l.], v. 7, n. 18, p.3297-3305, 2005. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b508541a>.

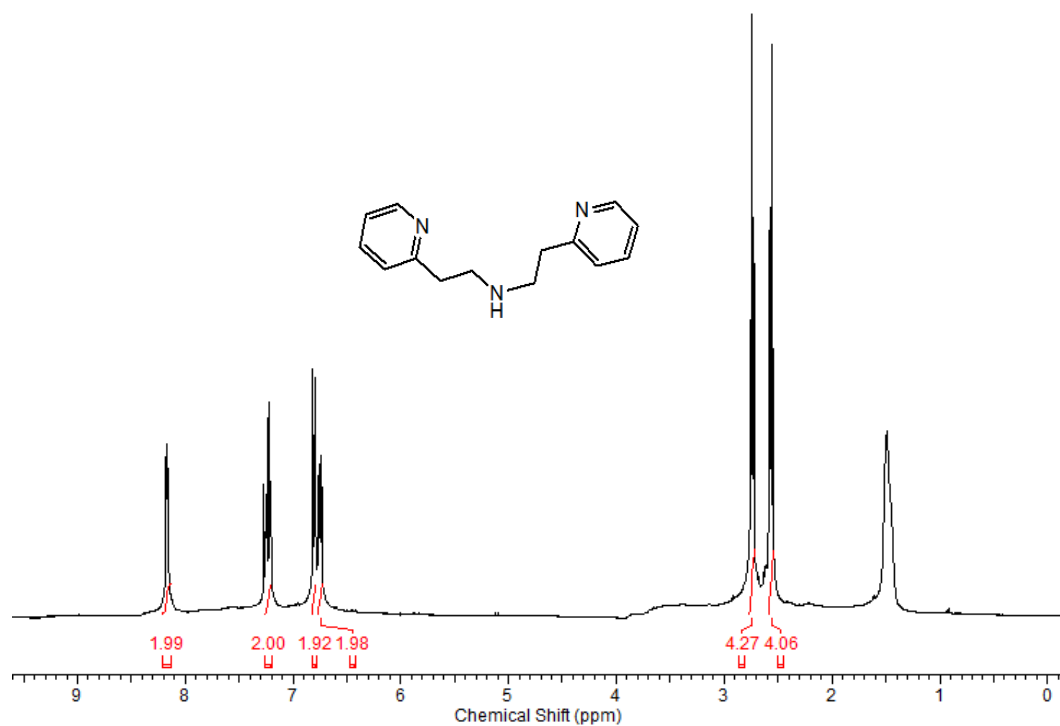
WILCOX, Dean E.. Binuclear Metallohydrolases. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 96, n. 7, p.2435-2458, jan. 1996. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr950043b>.

XAVIER, Fernando R. et al. Unsymmetrical FeIII and GaIII Complexes as Chemical Hydrolases: Biomimetic Models for Purple Acid Phosphatases (PAPs). **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 48, n. 16, p.7905-7921, 17 ago. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ic900831q>.

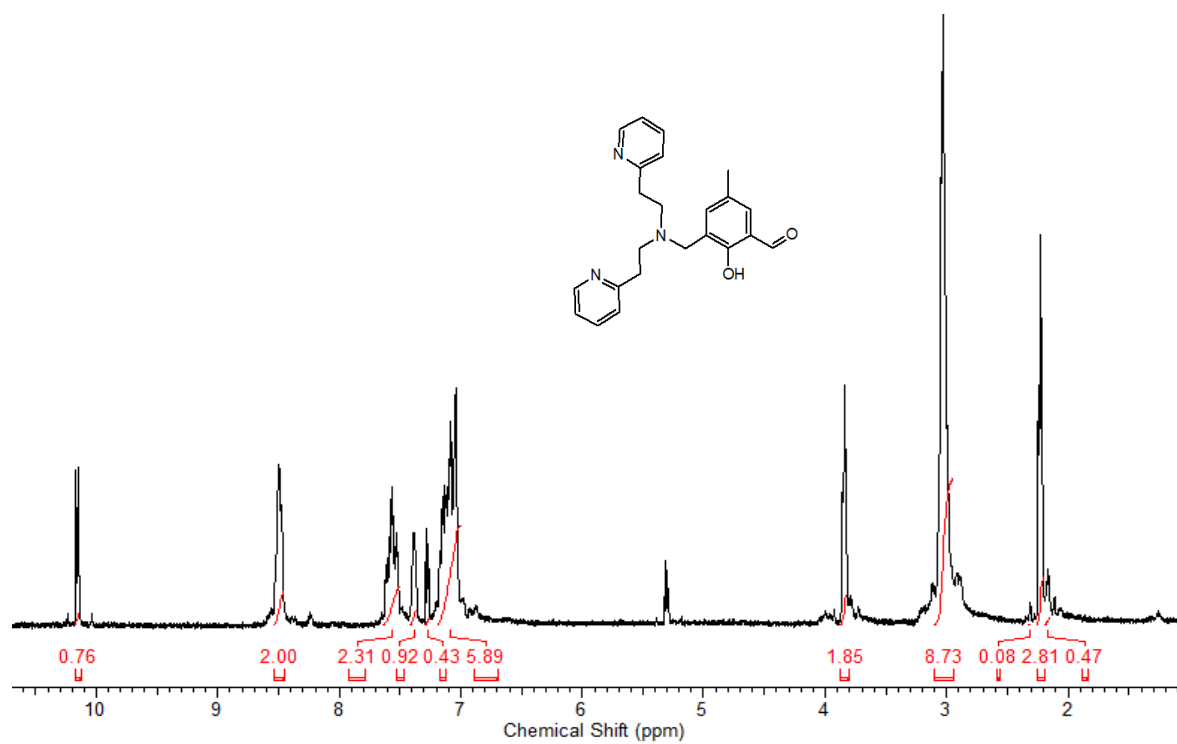
ZAMBELLI, Barbara et al. Chemistry of Ni²⁺ in Urease: Sensing, Trafficking, and Catalysis. **Accounts Of Chemical Research**, [s.l.], v. 44, n. 7, p.520-530, 19 jul. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ar200041k>.

APÊNDICE A

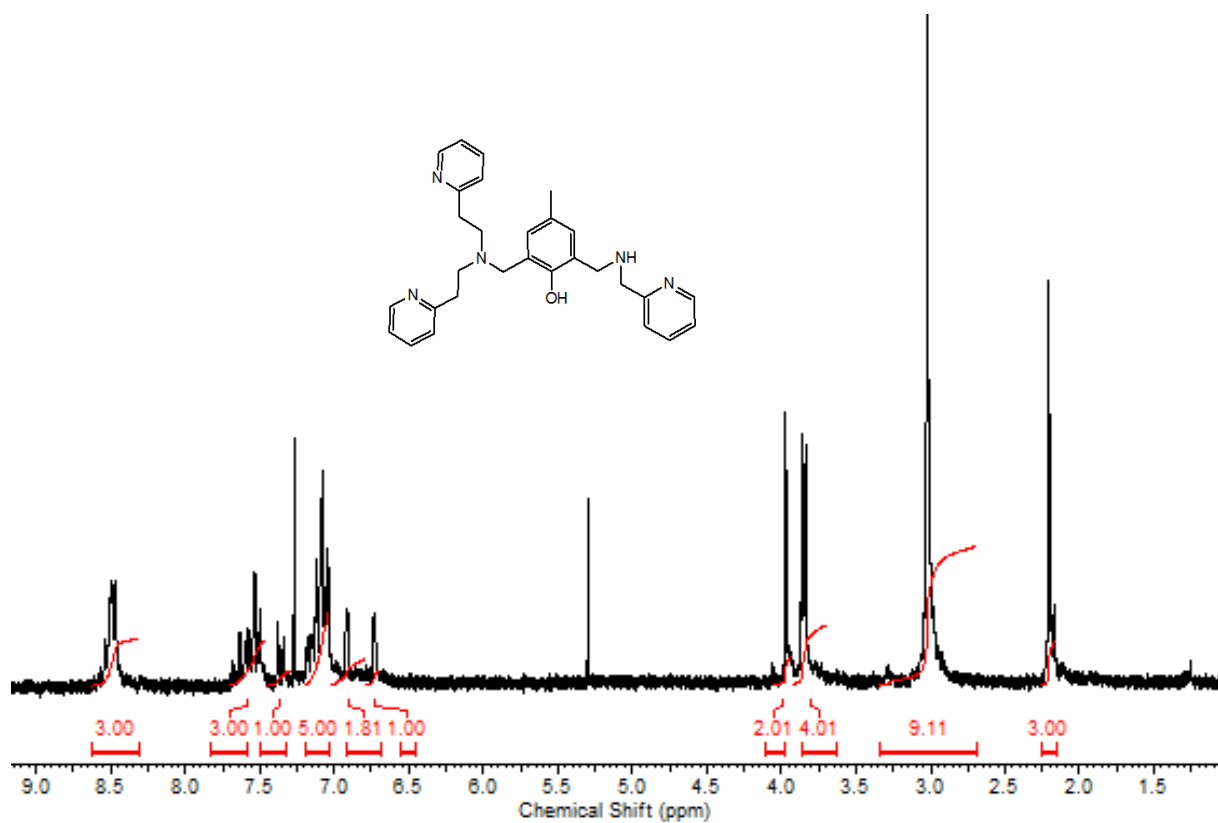
A1. Espectro de ¹H NMR do ligante bpea em CDCl₃.



A2. Espectro de ^1H NMR do ligante bpeamff em CDCl_3 .



A3. Espectro de ^1H NMR do ligante bpeamffmetPy em CDCl_3 .



A4. Proposta para os equilíbrios observados no complexo **3** em solução $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 1:1; $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl) à 25°C .

