



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

ANDRÉ PINHEIRO MACHADO ROOS

**NOVOS COMPLEXOS DE Ga^{III}/M^{II} COM EFEITOS DE SEGUNDA ESFERA DE
COORDENAÇÃO COMO MODELOS BIOMIMÉTICOS PARA FOSFATASES
ÁCIDAS PÚRPURAS**

FLORIANÓPOLIS

2019

André Pinheiro Machado Roos

**NOVOS COMPLEXOS DE Ga^{III}/M^{II} COM EFEITOS DE SEGUNDA ESFERA DE
COORDENAÇÃO COMO MODELOS BIOMIMÉTICOS PARA FOSFATASES
ÁCIDAS PÚRPURAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de Mestre em Química.
Orientador: Prof. Dr. Ademir Neves
Coorientadora: Prof. Dra. Rosely A. Peralta

Florianópolis

2019

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

Roos, André Pinheiro Machado

Novos complexos de GaIII/MII com efeitos de segunda esfera de coordenação como modelos biomiméticos para fosfatases ácidas púrpuras / André Pinheiro Machado Roos ; orientador, Ademir Neves, coorientadora, Rosely A. Peralta, 2019.

124 p.

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

Inclui referências.

1. Química. 2. Fosfatases ácidas púrpuras (PAPs). 3. Complexos biomiméticos. 4. Segunda esfera de coordenação. I. Neves, Ademir. II. Peralta, Rosely A.. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Química. IV. Título.

André Pinheiro Machado Roos

Novos complexos de Ga^{III}/M^{II} com efeitos de segunda esfera de coordenação como modelos biomiméticos para fosfatases ácidas púrpuras

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

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

Profa. Juliana Paula da Silva, Dra.
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 mestre em Química.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Programa

Prof. Dra. Rosely A. Peralta
Coorientadora

Florianópolis, 26 de julho de 2019.

Este trabalho é dedicado à minha mãe, pela amizade e amor incondicionais e ao meu pai, por todos os conselhos e preocupação com minha felicidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Cláudia, por sempre ter feito de tudo para que eu pudesse ter uma formação de qualidade, seja profissionalmente ou como indivíduo. Obrigado por todo o carinho, dedicação, amor, os puxões de orelha que me fizeram crescer e, principalmente, por ser o melhor exemplo de caráter e honestidade que eu poderia ter. Agradeço ao meu pai, Pedro, por todos os conselhos, pela atenção e pelos churrascos de domingo cheios de risadas.

À Gabriela, por ter me acompanhado em praticamente toda essa jornada, me apoiando, acalmando e cuidando de mim de diversas formas. Muito obrigado pelo carinho e companheirismo.

Ao professor Ademir Neves pela orientação e pela oportunidade que me deu para realizar este trabalho e me acolher no seu grupo. Agradeço também pelo entusiasmo e amor que sempre demonstrou pela pesquisa, que certamente me motivaram ao longo do caminho.

À professora Rosely por me fazer esquecer que ela era minha coorientadora por me orientar tão bem quanto faz com seus alunos. Agradeço muito pela atenção que teve com o meu trabalho, a rapidez com que sempre me atendeu e a disponibilidade em todos os momentos.

Aos meus colegas de Labinc por terem me acolhido tão bem no grupo, apesar de eu não estar tão presente nos horários habituais. Ao André, Renata e Cláudia pelas dicas e orientações para a realização do meu trabalho. Agradeço especialmente à Alana, por ter sido a pessoa que melhor me acolheu, abdicando de horas da sua pesquisa para me aconselhar e me mostrar o funcionamento de quase todas as coisas no laboratório, ficando ao meu lado em horários não convencionais. Muito obrigado pelo carinho demonstrado por mim.

Por fim, agradeço ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem, ou que seus planos nunca vão dar certo, ou que você nunca vai ser alguém.
(Renato Russo)

RESUMO

Neste trabalho, foram sintetizados e caracterizados dois novos modelos biomiméticos heterobinucleares de $\text{Ga}^{\text{III}}/\text{M}^{\text{II}}$ de fosfatases ácidas púrpuras substituídas, a partir do ligante derivatizado com um grupo aminoálcool na cadeia lateral para o estudo de efeitos de segunda esfera de coordenação na catálise da hidrólise de ésteres de fosfato. A caracterização dos complexos foi realizada por técnicas de espectroscopia nas regiões do IR e UV, espectrometria de massas, análise elementar de CHN e titulações espectrofotométricas. Estudos cinéticos revelaram que os complexos contendo grupos aminoálcool são capazes de aumentar os valores da constante catalítica (k_{cat}) da reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP e diminuir os valores da constante de Michaelis (K_M), elevando a eficiência catalítica em relação aos seus análogos que possuem apenas a primeira esfera de coordenação. Ensaio de efeito isotópico de deutério e de inibição de atividade pelo ânion fluoreto permitiram a proposta de um mecanismo de reação diferente dos observados até então para modelos biomiméticos de PAPs, onde um grupo OH presente na segunda esfera de coordenação atua como nucleófilo. Os complexos sintetizados realizam a reação de hidrólise através de dois caminhos mecanísticos distintos que atuam em conjunto contribuindo para o aumento da velocidade de reação. A modificação da segunda esfera de coordenação com a inclusão de um aminoálcool possibilitou a existência de uma segunda espécie nucleofílica, que demonstrou ser relevante na atividade dos complexos estudados. Os efeitos de segunda esfera de coordenação observados vão além daqueles já propostos que contemplam apenas o aumento da interação do substrato com o catalisador através de interações eletrostáticas ou ligações de hidrogênio.

Palavras-chave: Fosfatases ácidas púrpuras (PAPs). Complexos biomiméticos. Segunda esfera de coordenação.

ABSTRACT

This work consists on the synthesis, characterization and kinetic studies of second coordination sphere effects of two new biomimetic models for substituted purple acid phosphatases that are heterobinuclear Ga^{III}/M^{II} complexes containing one aminoalcohol side chain. The characterization of the complexes was performed using both UV and IR spectroscopy, mass spectrometry, CHN elemental analysis and spectrophotometric titrations. Kinetic studies revealed that complexes containing aminoalcohol groups are capable of increasing the catalytic constant (k_{cat}) values of the hydrolysis reaction of the 2,4-BDNPP substrate and decreasing the Michaelis constant (K_M) values, thus increasing the catalytic efficiency in relation to its analogues which have only the first sphere of coordination approach. Deuterium isotope effect and fluoride inhibition assays allowed the proposal of a different reaction mechanism from those observed until then for biomimetic models of PAPs, with the OH group present on the second coordination sphere acting as a nucleophile. The synthesized complexes perform the hydrolysis reaction through two distinct mechanistic paths that act together contributing to the increase of the reaction rate. The inclusion of an aminoalcohol on the second coordination sphere allowed the existence of a second nucleophilic specie, which proved to be relevant in the activity of the studied complexes. The second coordination sphere effects herein presented go beyond those already proposed who contemplate only the increase of the substrate-complex interactions through hydrogen bonding and electrostatic interactions.

Keywords: Purple acid phosphatases (PAPs). Biomimetic complexes. Second coordination sphere.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da enzima SOD2 (esquerda) ¹⁸ e seu respectivo modelo biomimético (direita). ¹⁷	30
Figura 2 – Sítio ativo da Carboxipeptidase A e o papel da segunda esfera de coordenação....	32
Figura 3 – Resíduos de Aminoácidos relevantes encontrados na segunda esfera de coordenação de enzimas.	33
Figura 4 – Influência das ligações de hidrogênio no pKa da água coordenada a um complexo mononuclear de zinco.	34
Figura 5 – Complexo binuclear de ferro com aminas carregadas positivamente capazes de auxiliar a clivagem de um monoéster de fosfato.	35
Figura 6 – Representação esquemática do sítio ativo de uma PAP, incluindo os resíduos de aminoácido presentes na segunda esfera de coordenação.	38
Figura 7 – Proposta mecanística para a hidrólise de um monoéster de fosfato por uma PAP.	39
Figura 8 – Estrutura do ligante H ₂ py ₃ mff. ⁸⁵	40
Figura 9 – Estrutura do ligante H ₂ LdiaminOH sintetizado neste trabalho.	41
Figura 10 – Esquema da síntese do cmff. ⁹⁴	51
Figura 11 – Espectro de IR (ATR) do cmff.	53
Figura 12 – Espectro de ¹ H NMR do cmff em CDCl ₃	53
Figura 13 – Esquema da síntese do bpma.	54
Figura 14 – Espectro de IR (ATR) do bpma.	54
Figura 15 – Espectro de ¹ H NMR do bpma em CDCl ₃	55
Figura 16 – Esquema da síntese do bpmamff.	55
Figura 17 – Espectro de IR (ATR) do bpmamff.	56
Figura 18 – Espectro de ¹ H NMR do bpmamff em CDCl ₃	57
Figura 19 – Esquema da síntese do Hpy ₃	57
Figura 20 – Espectro de IR (ATR) do Hpy ₃	58
Figura 21 – Espectro de ¹ H NMR do Hpy ₃ em CDCl ₃	59
Figura 22 – Esquema da síntese do H ₂ py ₃ mff.	59
Figura 23 – Espectro de IR (ATR) do H ₂ py ₃ mff.	60
Figura 24 – Espectro de ¹ H NMR do H ₂ py ₃ mff em CDCl ₃	61
Figura 25 – Esquema da síntese do H ₂ LdiaminOH.	62
Figura 26 – Espectro de IR (ATR) do H ₂ LdiaminOH.	63

Figura 27 – Espectro de ^1H NMR do $\text{H}_2\text{LdiaminOH}$ em CDCl_3	64
Figura 28 – Esquema de síntese dos complexos deste trabalho.	65
Figura 29 – Rota sintética para obtenção dos ligantes utilizados neste trabalho.....	67
Figura 30 – Espectro de ESI-MS do $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ em CH_3CN	71
Figura 31 - Ampliação do conjunto de sinais com $m/z = 588,30$ do espectro de ESI-MS do $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$. Em vermelho, a simulação da distribuição isotópica para a espécie proposta.	71
Figura 32 – Espectro de ESI-MS do $\text{H}_2\text{LdiaminOH}$ em CH_3CN	73
Figura 33 – Ampliação do conjunto de sinais com $m/z = 676,43$ do espectro de ESI-MS do $\text{H}_2\text{LdiaminOH}$. Em vermelho, a simulação da distribuição isotópica para a espécie proposta e sua estrutura.	73
Figura 34 – Espectro de IR do complexo 1d e do seu respectivo ligante (ATR).	75
Figura 35 – Espectro de IR do complexo 2d e do seu respectivo ligante (ATR).	75
Figura 36 – Espectro de IR do complexo 1 e do seu respectivo ligante (ATR).	76
Figura 37 – Espectro de IR do complexo 2 e do seu respectivo ligante (ATR).	76
Figura 38 – Espectros eletrônicos do complexo 1d em diferentes meios. $[\text{C}] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	78
Figura 39 – Espectros eletrônicos do complexo 2d em diferentes meios. $[\text{C}] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	79
Figura 40 – Espectros eletrônicos do complexo 1 em diferentes meios. $[\text{C}] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	79
Figura 41 – Espectros eletrônicos do complexo 2 em diferentes meios. $[\text{C}] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	80
Figura 42 – Estrutura proposta para o complexo 1d de acordo com a análise elementar de CHN.	81
Figura 43 – Estrutura proposta para o complexo 2d de acordo com a análise elementar de CHN.	81
Figura 44 – Estrutura proposta para o complexo 1 de acordo com a análise elementar de CHN.	82
Figura 45 – Estrutura proposta para o complexo 2 de acordo com a análise elementar de CHN.	82
Figura 46 – Espectro de ESI-MS do complexo 1d em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, %v/v) contendo 0,1% v/v de ácido fórmico.	83
Figura 47 – Ampliação do pico base do espectro de ESI-MS do complexo 1d, com simulação da distribuição isotópica em vermelho.	83

Figura 48 – Espectro de ESI-MS do complexo 2d em CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, %v/v) contendo 0,1% v/v de ácido fórmico.	84
Figura 49 – Ampliação do pico base do espectro de ESI-MS do complexo 2d, com simulação da distribuição isotópica em vermelho.	85
Figura 50 – Espectro de ESI-MS do complexo 1 em CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, %v/v) contendo 0,1% v/v de ácido fórmico.	86
Figura 51 – Ampliação do pico base do espectro de ESI-MS do complexo 1, com simulação da distribuição isotópica em vermelho.	86
Figura 52 – Espectro de ESI-MS do complexo 2 em CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, %v/v) contendo 0,1% v/v de ácido fórmico.	87
Figura 53 – Ampliação do pico base do espectro de ESI-MS do complexo 2, com simulação da distribuição isotópica em vermelho.	87
Figura 54 – Estruturas propostas para os picos base dos complexos 1d, 2d, 1 e 2 observados nos seus respectivos espectros de ESI-MS.	88
Figura 55 – Titulação espectrofotométrica do complexo 1d na faixa de pH de 2,9 a 6,3, em CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, % v/v), e ajuste de dados para obtenção do primeiro pKa. [C] = 8x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	90
Figura 56 – Titulação espectrofotométrica do complexo 1d na faixa de pH de 5,1 a 8,8, em CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, % v/v), e ajuste de dados para obtenção do segundo pKa. [C] = 8x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	90
Figura 57 – Titulação espectrofotométrica do complexo 2d na faixa de pH de 3,9 a 4,8, em CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, % v/v), e ajuste de dados para obtenção do primeiro pKa. [C] = 8x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	91
Figura 58 – Titulação espectrofotométrica do complexo 2d na faixa de pH de 4,7 a 9,2, em CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, % v/v), e ajuste de dados para obtenção do segundo pKa. [C] = 8x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	91
Figura 59 – Titulação espectrofotométrica do complexo 1 na faixa de pH de 3,3 a 5,0, em CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, % v/v), e ajuste de dados para obtenção do primeiro pKa. [C] = 8x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	92
Figura 60 – Titulação espectrofotométrica do complexo 1 na faixa de pH de 3,0 a 10,4, em CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, % v/v), e ajuste de dados para obtenção do segundo pKa. [C] = 8x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	92
Figura 61 – Titulação espectrofotométrica do complexo 2 na faixa de pH de 3,1 a 4,1, em	

CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, % v/v), e ajuste de dados para obtenção do primeiro pKa. [C] = 8x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	92
Figura 62 – Titulação espectrofotométrica do complexo 2 na faixa de pH de 5,3 a 9,2, em CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, % v/v), e ajuste de dados para obtenção do segundo pKa. [C] = 8x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	93
Figura 63 – Proposta das espécies em equilíbrio observadas em solução para os complexos 1d, 2d, 1 e 2.	94
Figura 64 – Reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP.	94
Figura 65 – Influência do pH na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP utilizando o complexo 1d como catalisador. Condições: CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, %v/v); [Complexo] = 4x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; [Substrato] = 2,5x10 ⁻³ mol L ⁻¹ ; [Tampão] = 5x10 ⁻² mol L ⁻¹ ; I = 5x10 ⁻² mol L ⁻¹ LiClO ₄ ; 25 °C.	95
Figura 66 – Influência do pH na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP utilizando o complexo 2d como catalisador. Condições: CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, %v/v); [Complexo] = 4x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; [Substrato] = 2,5x10 ⁻³ mol L ⁻¹ ; [Tampão] = 5x10 ⁻² mol L ⁻¹ ; I = 5x10 ⁻² mol L ⁻¹ LiClO ₄ ; 25 °C.	96
Figura 67 – Influência do pH na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP utilizando o complexo 1 como catalisador. Condições: CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, %v/v); [Complexo] = 4x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; [Substrato] = 2,5x10 ⁻³ mol L ⁻¹ ; [Tampão] = 5x10 ⁻² mol L ⁻¹ ; I = 5x10 ⁻² LiClO ₄ mol L ⁻¹ ; 25 °C.	96
Figura 68 – Influência do pH na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP utilizando o complexo 2 como catalisador. Condições: CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, %v/v); [Complexo] = 4x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; [Substrato] = 2,5x10 ⁻³ mol L ⁻¹ ; [Tampão] = 5x10 ⁻² mol L ⁻¹ ; I = 5x10 ⁻² mol L ⁻¹ LiClO ₄ ; 25 °C.	97
Figura 69 – Influência da concentração do substrato na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP utilizando o complexo 1d como catalisador. Condições: CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, %v/v); [Complexo] = 4x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; [Tampão] = 5x10 ⁻² mol L ⁻¹ (HEPES, pH = 7,0; I = 5x10 ⁻² mol L ⁻¹ LiClO ₄ ; 25 °C.	99
Figura 70 – Influência da concentração do substrato na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP utilizando o complexo 2d como catalisador. Condições: CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, %v/v); [Complexo] = 4x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; [Tampão] = 5x10 ⁻² mol L ⁻¹ (MES, pH = 6,0; I = 5x10 ⁻² mol L ⁻¹ LiClO ₄ ; 25 °C.	99
Figura 71 – Influência da concentração do substrato na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP utilizando o complexo 1 como catalisador. Condições: CH ₃ CN/H ₂ O	

(1:1, %v/v); [Complexo] = 4×10^{-5} mol L ⁻¹ ; [Tampão] = 5×10^{-2} mol L ⁻¹ (MES, pH = 6,5; I = 5×10^{-2} mol L ⁻¹ LiClO ₄ ; 25 °C.	100
Figura 72 – Influência da concentração do substrato na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP utilizando o complexo 1d como catalisador. Condições: CH ₃ CN/H ₂ O (1:1, %v/v); [Complexo] = 4×10^{-5} mol L ⁻¹ ; [Tampão] = 5×10^{-2} mol L ⁻¹ (HEPES, pH = 7,0; I = 5×10^{-2} LiClO ₄ mol L ⁻¹ ; 25 °C.	100
Figura 73 – Monitoramento da absorvância do meio reacional contendo o composto 1d após a adição de 0, 1, 2, 4, 8 e 12 equivalentes de monoéster em relação ao complexo ([C] = 4×10^{-5} mol L ⁻¹). As duas linhas contínuas do gráfico com maiores valores de absorvância correspondem às leituras realizadas 1 h e 5 h após a adição dos 12 equivalentes de 2,4-DNPP. As linhas tracejadas correspondem às leituras realizadas 1 h e 12 h após a adição do 2,4-BDNPP.	104
Figura 74 - Possíveis modos de inibição provocados pelo fluoreto.	107
Figura 75 – Porcentagem de inibição da reação de hidrólise em função da concentração de fluoreto no meio reacional.	108
Figura 76 – Influência da concentração do substrato na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP para os complexos 1d, 2d, 1 e 2 na presença do inibidor fluoreto.	109
Figura 77 – Proposta mecanística para a hidrólise do 2,4-BDNPP realizada pelos complexos 1d e 2d. Caminho A: ataque do OH coordenado ao gálio. Caminho B: ataque do OH presente na segunda esfera de coordenação.	112
Figura 78 – Proposta para a liberação do produto e regeneração do catalisador na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP realizada pelos complexos 1d e 2d.	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coeficientes de absorção do produto de hidrólise do 2,4-BDNPP, o 2,4-dinitrofenolato, no comprimento de onda de 400 nm em diferentes valores de pH. ⁹¹	47
Tabela 2 – Principais bandas e atribuições dos espectros de IR dos precursores dos ligantes H ₂ py ₃ mff e H ₂ LdiaminOH. Atribuições realizadas de acordo com Silverstein e Webster. ⁹⁹ ..	68
Tabela 3 – Principais bandas e atribuições dos espectros de IR dos ligantes H ₂ py ₃ mff e H ₂ LdiaminOH. Atribuições realizadas de acordo com Silverstein e Webster. ⁹⁹	68
Tabela 4 – Deslocamentos químicos e atribuições dos espectros de ¹ H NMR dos precursores do H ₂ py ₃ mff e H ₂ LdiaminOH.....	69
Tabela 5 – Deslocamentos químicos e atribuições dos espectros de ¹ H NMR do H ₂ py ₃ mff e H ₂ LdiaminOH.....	70
Tabela 6 – Principais bandas e suas atribuições observadas nos espectros de IR (ATR) dos complexos 1d e 2d e do ligante H ₂ LdiaminOH.....	77
Tabela 7 – Principais bandas e suas atribuições observadas nos espectros de IR (ATR) dos complexos 1 e 2 e do ligante H ₂ py ₃ mff.	77
Tabela 8 – Análise elementar dos complexos estudados neste trabalho com as porcentagens (teórica/experimental) de C, H e N.....	81
Tabela 9 – Valores de pKa encontrados na titulação espectrofotométrica dos complexos 1d, 2d, 1 e 2.	89
Tabela 10 – Comparação entre os valores de pKa obtidos através da titulação potenciométrica e da cinética para os complexos estudados.....	98
Tabela 11 – Parâmetros cinéticos dos complexos 1d, 2d, 1 e 2 e de outros compostos descritos na literatura.	101
Tabela 12 – Valores da razão k_H/k_D observados para os complexos estudados.	105
Tabela 13 – Valores da razão $V_{0(H)}/V_{0(D)}$ encontrados para os complexos estudados em diferentes concentrações de 2,4-BDNPP.....	106
Tabela 14 – Valores da razão k_{cat}/k_F determinados para os complexos 1d, 2d, 1 e 2.	109

Hpy3 – 2-[*N*-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[*N*-(2-piridilmetil)aminometil]fenol

IR – Infravermelho (do inglês, *infrared*)

k_{cat} – Constante catalítica

k_{D} – Constante catalítica em meio contendo água deuterada

k_{F} – Constante catalítica em meio contendo fluoreto

k_{H} – Constante catalítica em meio contendo água

K_{M} – Constante de Michaelis

MES – Ácido 2-(*N*-morfolino)etanossulfônico

NHE – Eletrodo normal de hidrogênio (do inglês, *normal hydrogen electrode*)

PAP – Fosfatase ácida púrpura (do inglês, *purple acid phosphatase*)

pH – Potencial hidrogeniônico

SOD – Superóxido dismutase

TBAF – Fluoreto de tetra-*n*-butilamônio (do inglês, *tetra-*n*-butylammonium fluoride*)

TMS – Tetrametilsilano

UV-Vis – Ultravioleta-visível

V_0 – Velocidade inicial

$V_{\text{máx}}$ – Velocidade máxima

SUMÁRIO

1	JUSTIFICATIVA	27
2	INTRODUÇÃO	29
2.1	CATÁLISE E QUÍMICA BIOMIMÉTICA.....	29
2.2	EFEITOS DE SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO.....	31
2.3	FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS.....	36
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL.....	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	MATERIAIS	45
4.2	MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO	45
4.2.1	Espectroscopia na região do infravermelho (IR)	45
4.2.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H NMR)	45
4.2.3	Espectrometria de massas	46
4.2.4	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)	46
4.2.5	Titulação espectrofotométrica	46
4.2.6	Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN)	47
4.2.7	Estudos de atividade de fosfatase	47
4.2.7.1	Estudo do efeito do pH na atividade fosfatase	48
4.2.7.2	Estudo do efeito da concentração do substrato na atividade fosfatase.....	48
4.2.7.3	Tratamento dos dados cinéticos	48
4.2.7.4	Atividade monoestearase e número de moléculas hidrolisadas por molécula de complexo	49
4.2.7.5	Inibição da atividade pelo fluoreto	50
4.2.7.6	Efeito isotópico de deutério.....	51
4.3	METODOLOGIAS DE SÍNTESE.....	51
4.3.1	Síntese dos ligantes	51

4.3.1.1	Precursor cmff – 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol.....	51
4.3.1.2	Precursor bpma – bis(piridilmetil)amina.....	54
4.3.1.3	Precursor bpmamff – 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formilfenol ...	55
4.3.1.4	Precursor Hpy ₃ – 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil]fenol	57
4.3.1.5	Ligante H ₂ py ₃ mff – 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol	59
4.3.1.6	Ligante H ₂ LdiaminOH – 2- {[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil}-6- {[(2-hidroxi-3- {[(2-[(2-hidroxietil)amino]etil)amino]metil}-5-metilbenzil) (piridin-2-ilmetil)amino]metil}-4-metilfenol.....	62
4.3.2	Síntese dos complexos	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES	67
5.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS	74
5.2.1	Espectroscopia na região do infravermelho (IR).....	74
5.2.2	Espectroscopia na região do UV-Vis	78
5.2.3	Análise elementar de CHN	80
5.2.4	Espectrometria de massas.....	82
5.2.5	Titulação espectrofotométrica.....	88
5.3	ESTUDOS DE ATIVIDADE FOSFATASE	94
5.3.1	Influência do pH na atividade fosfatase	95
5.3.2	Efeito da da concentração do substrato na atividade fosfatase.....	98
5.3.3	Atividade monoestearase e número de moléculas hidrolisadas por molécula de complexo	103
5.3.4	Efeito isotópico do deutério	105
5.3.5	Inibição da atividade catalítica pelo fluoreto.....	106
5.4	PROPOSTA MECANÍSTICA	109
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	115
	REFERÊNCIAS	117

1 JUSTIFICATIVA

Após a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina, a procura por novos complexos metálicos com essa mesma característica vem crescendo constantemente. As enzimas, por suas características únicas, como a alta especificidade e atividade catalíticas, despertam um grande interesse em diversas áreas de pesquisa, entre elas a química bioinorgânica e química medicinal. Por possuírem em seus sítios ativos centros metálicos, as enzimas motivam a síntese de diversos complexos que mimetizem sua estrutura ou funcionalidade, seja com o objetivo de elucidação do seu mecanismo de ação, seja na busca de novos fármacos e compostos com aplicações biotecnológicas.

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é o alvo mais importante para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais devido ao seu papel fundamental nos processos de replicação e transcrição. A capacidade de uma substância de clivar o DNA é de extrema importância tanto do ponto de vista medicinal como nas áreas de biotecnologia e engenharia genética. Através dessa propriedade, um modelo biomimético pode ser aplicado, por exemplo, para clivar as ligações de diéster de fosfato do DNA de uma célula cancerígena, destruindo assim a sua estrutura celular. Além disso, a possibilidade de um complexo modelo clivar de maneira específica o DNA com determinadas sequências de bases específicas é altamente desejável para sua aplicação como nuclease de restrição, utilizada em técnicas de recombinação do DNA.

As fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) são enzimas de grande interesse biológico por atuarem na hidrólise de ésteres de fosfato, uma vez que modelos bioinspirados dessas enzimas possuem potencial para clivar as ligações de fosfato presentes no DNA. Nesse contexto, o grupo de pesquisa LABINC (Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia) vem ao longo de sua história trabalhando na construção de modelos biomiméticos de fosfatases ácidas púrpuras. Através dos trabalhos desenvolvidos, foi possível obter compostos com propriedades eletrônicas e estruturais semelhantes ao sítio ativo da enzima. Desse modo, os esforços atuais consistem em modular a atividade catalítica dos complexos através da inserção de grupos que, mesmo não coordenados diretamente aos centros metálicos, possuem papel fundamental no mecanismo de reação, podendo aumentar ou reduzir a eficiência catalítica.

Tais efeitos motivam a síntese de diversos modelos biomiméticos de fosfatases ácidas púrpuras possuindo estruturas de modo a obter uma segunda esfera de coordenação capaz de auxiliar na hidrólise de ésteres de fosfato. A proposta do presente trabalho é a

inclusão de um aminoálcool na segunda esfera de coordenação de modelos bioinspirados, visando-se avaliar o efeito da presença de uma hidroxila terminal não coordenada ao metal na atividade catalítica dos complexos estudados.

2 INTRODUÇÃO

2.1 CATÁLISE E QUÍMICA BIOMIMÉTICA

A catálise é um fenômeno do qual a humanidade se beneficia desde o início de sua história como, por exemplo, na obtenção de álcool a partir do açúcar através da fermentação.¹ O primeiro uso conhecido de um catalisador inorgânico é de 1552, quando Valerius Cordus promoveu a conversão de álcool em éter utilizando ácido sulfúrico.² Apesar de processos catalíticos já serem utilizados pela humanidade há tanto tempo, somente em 1835 os conceitos de catálise e catalisador foram definidos por Berzelius,³ dando início a uma nova era de descobertas nessa área.⁴

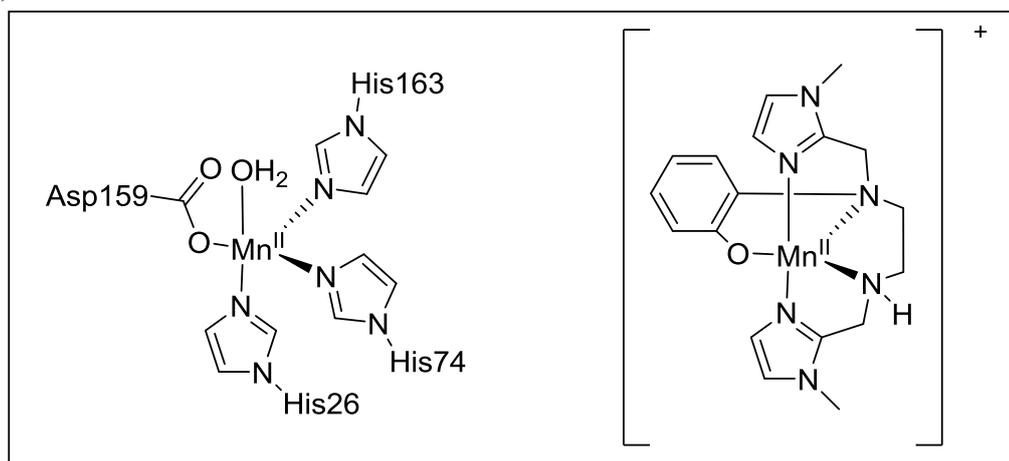
Desde então, uma grande diversidade de catalisadores foi descoberta e o processo de catálise foi melhor compreendido entre os pesquisadores. Muitos processos catalíticos são atualmente fundamentais para humanidade, como a síntese de amônia a partir de nitrogênio e hidrogênio,⁵ o craqueamento catalítico do petróleo⁶ e a produção de polímeros com a utilização de catalisadores do tipo Ziegler-Natta,⁷ por exemplo. A catálise, por mais que já tenha revolucionado o modo de viver da sociedade, ainda é uma área de pesquisa com uma grande perspectiva de crescimento pois há uma constante busca por novos fármacos, processos industriais mais eficazes e novas tecnologias.^{8,9}

Embora o uso de catalisadores esteja amplamente difundido e haja atualmente uma série de processos industriais bastante eficazes, ainda existe um grupo de moléculas com propriedades catalíticas únicas que fascina os pesquisadores: as enzimas. Suas características mais intrigantes são as altas quimio, régio e enantiosseletividades, além de grande afinidade e capacidade de reconhecimento do substrato.¹⁰ Esses catalisadores biológicos macromoleculares são capazes de realizar transformações químicas jamais alcançadas até então por sistemas catalíticos sintéticos.¹¹ As enzimas da superfamília do citocromo P450, por exemplo, catalisam diversas reações de oxidação como hidroxilação de ligações C-H saturadas, oxidação de compostos aromáticos e reações de epoxidação com rendimentos praticamente quantitativos, utilizando oxigênio molecular como oxidante e à temperatura ambiente e pressão atmosférica.¹² Já os catalisadores sintéticos convencionais requerem o emprego de altas temperaturas e pressões, emprego de oxidantes fortes, além de as reações apresentarem baixas conversões e seletividade quando comparadas às reações enzimáticas.^{13,14}

Apesar de as enzimas serem os catalisadores mais eficientes conhecidos e possuírem grande aplicação nas indústrias farmacêuticas e alimentícias, onde a seletividade das reações é fundamental, algumas de suas características impedem uma utilização mais ampla em escala industrial.¹¹ A sua natureza frágil, caracterizada por fatores como baixa estabilidade térmica, sensibilidade ao pH e baixa tolerância a solventes orgânicos e íons metálicos, limita o emprego de enzimas em processos catalíticos.¹⁵

Inspirados pelas habilidades ímpares das enzimas como catalisadores e visando manter a alta eficiência catalítica dessas e eliminar suas principais desvantagens, como baixa estabilidade e elevados custos de isolamento e purificação, pesquisadores desenvolveram diversos modelos biomiméticos com aproximações estruturais e funcionais de enzimas.¹⁰ Esse tipo de modelagem, na química bioinorgânica, geralmente envolve a utilização de metais de transição presentes no sítio ativo da enzima e ligantes com funções químicas semelhantes às dos resíduos de aminoácidos coordenados a esses centros metálicos.¹⁶ A enzima superóxido dismutase de manganês (SOD2), por exemplo, possui um modelo sintético (Figura 1) onde os anéis imidazólicos e o oxigênio fenólico mimetizam os resíduos de histidina e aspartato ligados ao centro de manganês na SOD2, respectivamente.¹⁷

Figura 1 – Representação da enzima SOD2 (esquerda)¹⁸ e seu respectivo modelo biomimético (direita).¹⁷



Fonte: adaptado de Ching *et al.*¹⁷ e Perry *et al.*¹⁸

A partir de complexos biomiméticos com propriedades estruturais e comportamento catalítico semelhantes aos das enzimas de interesse, é possível verificar o efeito provocado por alterações químicas realizadas nos modelos, como a substituição dos metais empregados e modificação da primeira e segunda esfera de coordenação dos compostos. Estudos como esse possibilitam uma melhor compreensão do mecanismo da reação catalisada pela enzima, além

de oferecer a perspectiva de obtenção de catalisadores com propriedades adequadas para diversas aplicações, principalmente com foco em química medicinal.¹⁹⁻²³ Um exemplo disso são as enzimas hidrolases e fosfatases, cujo estudo e desenvolvimento de complexos modelos podem viabilizar compostos com propriedades adequadas para a clivagem de DNA de células cancerígenas, visando uma aplicação de relevância para a humanidade no tratamento do câncer.

2.2 EFEITOS DE SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO

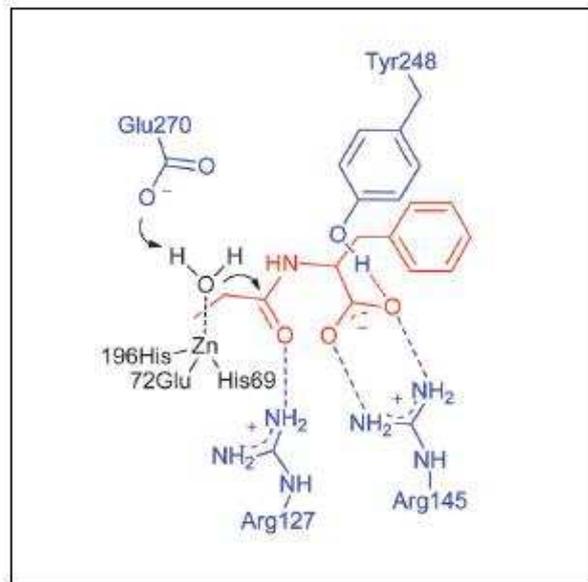
Embora modelos biomiméticos tenham obtido êxito em se aproximar estruturalmente do sítio ativo de enzimas e possuam ligantes com funções químicas semelhantes aos resíduos de aminoácidos coordenados aos centros metálicos dessas, a diferença de atividade catalítica entre complexos sintéticos e enzimas ainda é marcante.²⁴ Isto ocorre porque faltam aos compostos bioinspirados interações não covalentes presentes nas enzimas, como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, efeitos hidrofóbicos e forças de van der Waals.

Estudos na área de engenharia de proteínas revelaram que mudanças em alguns aminoácidos não coordenantes em enzimas levam a uma perda significativa de atividade ou seletividade na catálise. Esses aminoácidos que não estão diretamente coordenados aos centros metálicos são indispensáveis para a eficiência catalítica e são chamados de grupos de segunda esfera de coordenação.²⁴ As interações proporcionadas pelas moléculas presentes na segunda esfera de coordenação das enzimas modulam as características físico-químicas dos sítios ativos, assim como permitem reconhecimento e atração pelo substrato, atingindo os requisitos para que ocorra a reação.²⁵

Para ilustrar a relevância de tais efeitos, toma-se como exemplo a enzima carboxipeptidase A,²⁶ capaz de clivar ligações peptídicas, que é um dos tipos de ligação mais estável encontrado na natureza. Essa peptidase, específica para peptídeos C-terminais, contém um centro metálico de zinco e atua por um mecanismo ácido-base onde os efeitos de segunda esfera de coordenação são determinantes na catálise (Figura 2). O resíduo de tirosina (Tyr248) proporciona especificidade com o substrato via interações hidrofóbicas através do anel aromático enquanto o hidrogênio fenólico realiza ligação de hidrogênio com oxigênio do grupo carboxilato do substrato, promovendo a dessolvatação e uma orientação favorável para a catálise.²⁷ O resíduo de arginina (Arg145) realiza duas ligações de hidrogênio com o grupo carboxilato, ancorando o substrato e contribuindo para a especificidade da catálise. A função

do resíduo de glutamina (Glu270) é de abstrair o hidrogênio da molécula de água coordenada ao centro de zinco, gerando o nucleófilo responsável pelo ataque e, posteriormente, transferir o próton ao substrato para polarizar a ligação de amida e expulsar o grupo de saída.²⁸ Um segundo resíduo de arginina (Arg127) é responsável por estabilizar o estado de transição tetraédrico proposto através de ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila do substrato.²⁷

Figura 2 – Sítio ativo da Carboxipeptidase A e o papel da segunda esfera de coordenação.



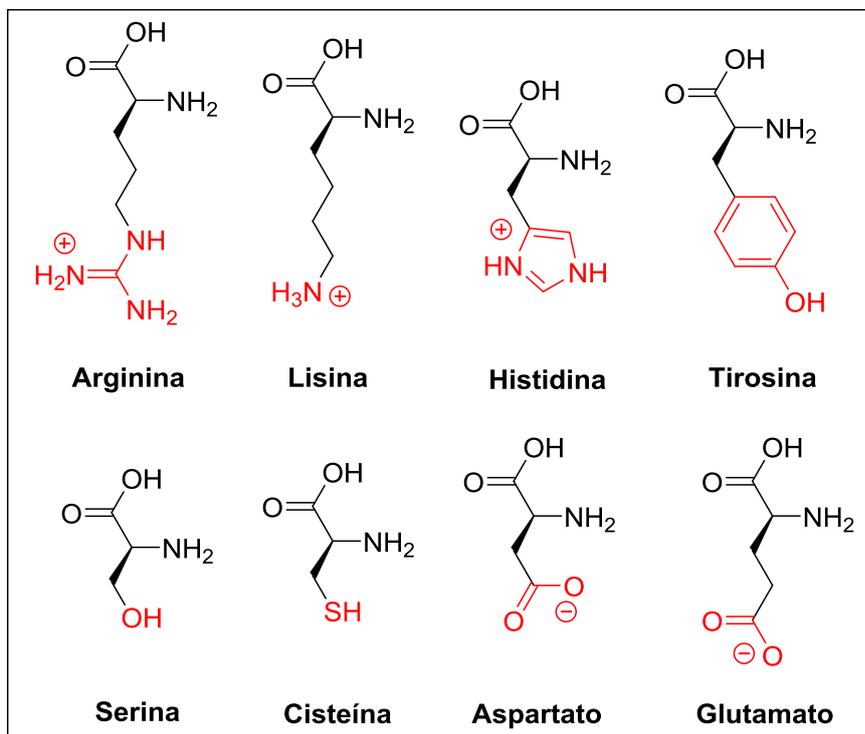
Fonte: adaptado de Zhao *et al.*²⁴

Através de descobertas mecanísticas obtidas, como o papel dos aminoácidos residuais na atividade da Carboxipeptidase A, observa-se que os efeitos de segunda esfera de coordenação são responsáveis por diversas funções fundamentais na catálise enzimática, entre elas: proporcionar afinidade e especificidade com o substrato, estabilizar o estado de transição, ativar o nucleófilo e auxiliar na geração e expulsão do grupo de saída. As interações mais comuns presentes na segunda esfera de coordenação são atrações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.²⁴

Os aminoácidos mais comumente encontrados na segunda esfera de coordenação de enzimas (Figura 3) são a histidina, cisteína, aspartato, glutamato, arginina, tirosina, serina e lisina.²⁹ Os grupos funcionais presentes nos aminoácidos auxiliam na catálise de diversas formas, de acordo com suas características. A lisina, arginina e histidina, por exemplo, são carregadas positivamente em pH fisiológico, favorecendo atrações eletrostáticas e realizando ligações de hidrogênio com o substrato.²⁹ O glutamato e aspartato contêm carboxilas que

podem doar ou receber um próton na catálise, o que favorece reações onde há processos de transferência de próton.²⁴ A tirosina, que possui um anel aromático em sua estrutura, é capaz de realizar interações hidrofóbicas com o substrato, contribuindo com a especificidade e correto posicionamento dos reagentes para a catálise.²⁴ A serina e cisteína possuem os grupos OH e SH, respectivamente, que atuam como nucleófilos realizando o ataque ao substrato, principalmente em esterases, proteases e hidrolases.³⁰⁻³²

Figura 3 – Resíduos de Aminoácidos relevantes encontrados na segunda esfera de coordenação de enzimas.

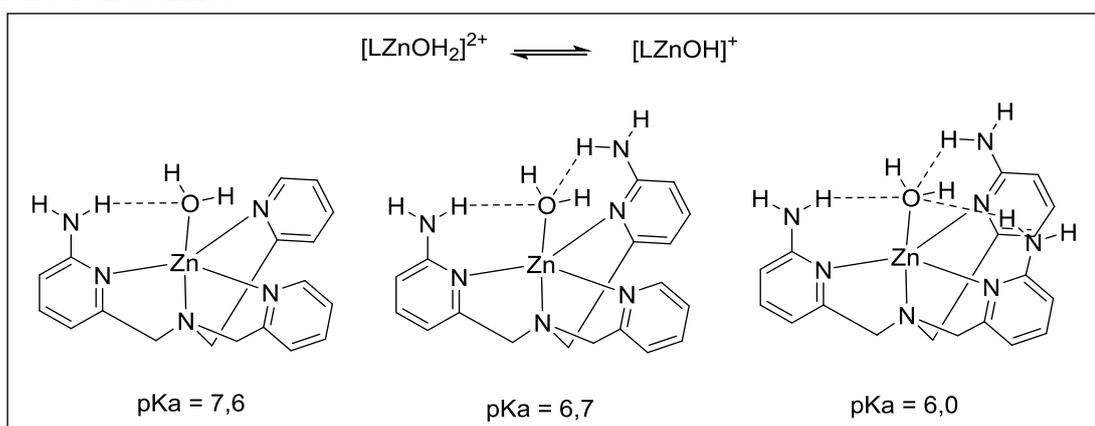


Fonte: elaborado pelo autor (2019).

No desenvolvimento de modelos biomiméticos, uma estratégia eficaz é a inclusão de grupos funcionais, na segunda esfera de coordenação, que sejam capazes de proporcionar efeitos semelhantes àqueles que são provocados pela presença dos resíduos de aminoácidos nas enzimas. Um dos principais exemplos dessa abordagem é a utilização de aminas e iminas na segunda esfera de coordenação, mimetizando resíduos positivamente carregados em pH fisiológico, como a lisina e histidina.³³⁻⁴⁰ Guanidinas geralmente são empregadas como grupos capazes de mimetizar a função de resíduos de arginina,^{24,41-43} enquanto ácidos carboxílicos são utilizados por possuírem a capacidade de receber ou doar um próton, atuando de maneira semelhante a resíduos de aspartato e glutamato.^{44,45}

A síntese de complexos biomiméticos com diferentes grupos funcionais na segunda esfera de coordenação possibilita a compreensão de detalhes mecanísticos de reações catalisadas por enzimas. No trabalho desenvolvido por Mareque-Rivas *et al.*³⁷, foi demonstrado que os pKas de nucleófilos possuem dependência direta da capacidade de doação de ligações de hidrogênio na segunda esfera de coordenação: quanto mais as aminas atuam como doadoras de ligações de hidrogênio, menor é o pKa das moléculas de água ligadas ao zinco (Figura 4). Nessa pesquisa, um complexo de zinco com três aminas aromáticas teve um pKa de 6,0, duas unidades abaixo do pKa observado para o respectivo complexo sem as aminas.

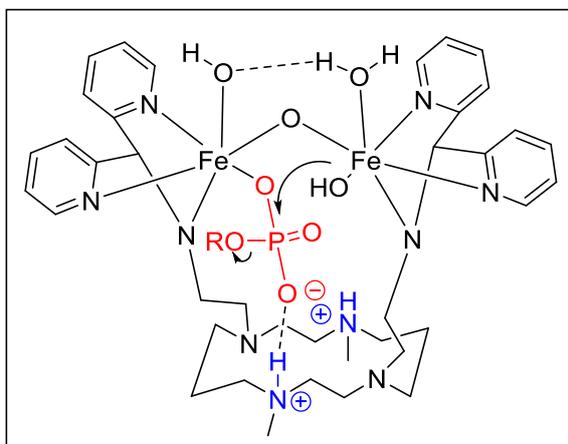
Figura 4 – Influência das ligações de hidrogênio no pKa da água coordenada a um complexo mononuclear de zinco.



Fonte: adaptado de Mareque-Rivas *et al.*³⁷

Além das interações por ligações de hidrogênio, as aminas, quando protonadas, possibilitam interações eletrostáticas com o substrato, favorecendo e orientando a coordenação ao centro metálico do catalisador. O primeiro modelo biomimético funcional de fosfatase ácida púrpura capaz de realizar a hidrólise de um monoéster de fosfato continha uma plataforma contendo aminas positivamente carregadas, conforme ilustrado na Figura 5.⁴⁶ De acordo com os autores do trabalho, tanto as interações eletrostáticas quanto as ligações de hidrogênio são relevantes para a aproximação do substrato e coordenação de maneira monodentada ao complexo binuclear de ferro.⁴⁶ Esse tipo de associação com o complexo possibilita que o nucleófilo presente no centro de ferro livre seja capaz de realizar o ataque ao substrato, completando a reação.

Figura 5 – Complexo binuclear de ferro com aminas carregadas positivamente capazes de auxiliar a clivagem de um monoéster de fosfato.



Fonte: adaptado de Comba *et al.*⁴⁶

Apesar de a inclusão de grupos funcionais em complexos biomiméticos ser capaz de elucidar os papéis de alguns aminoácidos na segunda esfera de coordenação de enzimas e proporcionar efeitos vantajosos para a catálise, ainda há outros fatores que podem e devem ser considerados na construção dos compostos modelo. O conjunto de resíduos de aminoácidos presentes na segunda esfera de coordenação possui uma estrutura específica e muito bem organizada de modo a permitir a aproximação do substrato na posição adequada e promover especificidade.³¹ Por isso, além da adição de grupos funcionais, outra estratégia que vem sendo explorada para a construção de modelos é a utilização de química supramolecular. Conceitualmente, a presença de moléculas com cavidades bem definidas, na segunda esfera de coordenação de complexos, podendo receber o substrato, mimetiza o efeito do microambiente de aminoácidos dispostos ao redor dos centros metálicos das enzimas.²⁴ Nesse sentido, foram desenvolvidos modelos biomiméticos baseados em química supramolecular, destacando-se o uso de ciclodextrinas,⁴⁷⁻⁴⁹ calix[n]arenos,^{50,51} e poucos estudos, mas promissores, com cucurbit[n]urilas.^{52,53} O desenvolvimento de catalisadores contendo polímeros ou suportes sólidos também vem sendo uma estratégia amplamente utilizada na construção de modelos biomiméticos, destacando-se a funcionalização de sílica,^{34,54} uso de polietilenoimina,³⁶ dendrímeros^{55,56} e hidrogéis.⁵⁷ Recentemente, foi sintetizado um complexo de cobre com abordagem de química supramolecular onde, através da tecnologia biotina-estreptavidina, foi possível a construção de um modelo de enzima artificial contendo uma proteína na segunda esfera de coordenação.⁵⁸ Estudos com esse composto revelaram a importância do papel das ligações de hidrogênio entre a proteína e o ligante, favorecendo a

sua coordenação ao centro metálico e aumentando a constante de equilíbrio de associação metal-ligante.

Com base nos resultados obtidos até então através de estudos de efeitos de segunda esfera de coordenação, nota-se que esta área é promissora para a obtenção de modelos biomiméticos eficazes, visto que as próprias enzimas têm sua atividade intimamente relacionada com o ambiente de resíduos de aminoácidos não coordenados aos centros metálicos. As fosfatases ácidas púrpuras, por exemplo, são enzimas onde a alteração da segunda esfera de coordenação provoca mudanças significativas na sua atividade.²⁴ Portanto, a construção de modelos destas enzimas que envolvam efeitos que vão além da primeira esfera de coordenação são necessários para que se obtenha complexos com boa eficiência catalítica.

2.3 FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS

As fosfatases ácidas púrpuras são um grupo de monoestearases não específicas que catalisam suas reações em um intervalo de pH de 4 a 7.^{59,60} Essas enzimas são caracterizadas por uma coloração roxa intensa em sua forma inativa e pelo baixo pH de atividade ótima, motivo pelo qual receberam sua denominação.^{61,62} As PAPs pertencem ao grupo das metalohidrolases binucleares, o qual também contém as proteínas serina/treonina fosfatases, arginase, aminopeptidases, urease e a 3'-5'-exonuclease de DNA polimerase.⁶³ Essas enzimas possuem em comum a necessidade de dois íons metálicos próximos, formando um centro binuclear capaz de realizar a reação de hidrólise e, através de algumas variações mecanísticas de enzima para enzima, desempenhar as suas funções biológicas.⁶⁴

As fosfatases ácidas púrpuras estão presentes tanto em mamíferos quanto em plantas e fungos.^{60,65} Elas são as únicas hidrolases binucleares que possuem um sítio de valência mista na sua forma cataliticamente ativa: $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Fe}^{\text{II}}$ em mamíferos e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Zn}^{\text{II}}$ ou $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Mn}^{\text{II}}$ em plantas e fungos.⁶⁴ Uma notável característica é que a substituição de um átomo de Fe^{II} por um de Zn^{II} em uma fosfatase ácida púrpura de mamífero praticamente não afeta a atividade catalítica e, ao mesmo tempo, a substituição de um átomo de Zn^{II} por um de Fe^{II} é igualmente possível em uma enzima de origem vegetal.^{66,67}

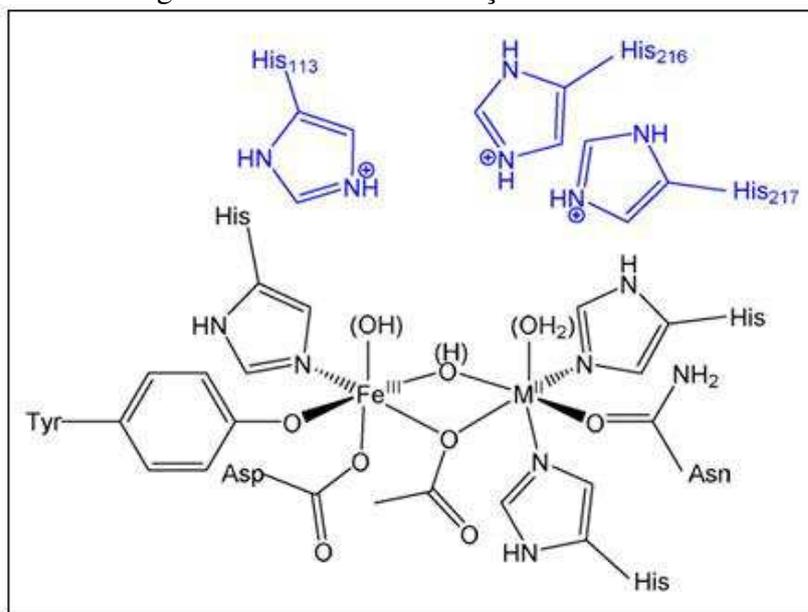
As PAPs binucleares de ferro apresentam duas formas interconversíveis: a inativa, de coloração roxa, consistindo de um sítio de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Fe}^{\text{III}}$ e, a cataliticamente ativa, que é rosa e formada por um centro de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Fe}^{\text{II}}$. A coloração dessas enzimas se dá devido a uma transição de transferência de carga ligante-metal de um resíduo de tirosina para o átomo de Fe^{III} do centro binuclear.^{59,61,68,69} A existência das duas formas da PAP em mamíferos indica que a

atividade dessa enzima pode ser modulada *in vivo* através do controle do estado de oxidação de um dos átomos de ferro, já que o potencial de redução do par $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ é de 340 mV em relação ao eletrodo normal de hidrogênio (NHE) e o processo é reversível.^{69,70}

Embora as PAPs encontradas em mamíferos e plantas contenham apenas ferro, zinco e manganês, já foi provado que a substituição do centro de Fe^{III} por um centro de Ga^{III} na fosfatase ácida púrpura do útero de suínos gerou derivados com uma atividade catalítica bastante semelhante a da enzima original.⁷¹ Dessa forma, o centro diamagnético de Ga^{III} pode substituir o centro paramagnético de Fe^{III} em complexos biomiméticos de fosfatases ácidas púrpuras. Esta alteração proporciona vantagens importantes, visto que o uso de complexos de gálio permite a caracterização por técnica de ressonância magnética nuclear, além da evidência de que existem compostos de gálio com atividades antitumorais.^{72,73}

Através de sucessivos estudos realizados, principalmente a obtenção da estrutura cristalina do sítio ativo de diversos tipos de PAP, como a do feijão vermelho e a de mamíferos,^{60,74,75} foi possível a elucidação do ambiente de coordenação ao redor do centro binuclear dessas enzimas.^{63,64,76,77} Apesar de diferenças observadas entre as fosfatases ácidas púrpuras de origem animal e vegetal, tendo elas menos de 20% de homologia na sequência de aminoácidos, observa-se que as estruturas dos sítios ativos possuem uma similaridade marcante.⁶³ Em todas as PAPs, os dois centros metálicos estão separados por uma distância de 3,1 Å e ligados em ponte de maneira monodentada por um resíduo de aspartato e um íon de hidroxila. Coordenados diretamente ao centro metálico de Fe^{III} há um resíduo de tirosina, histidina e aspartato. Já ao centro metálico M^{II} (onde $\text{M} = \text{Zn}, \text{Mn}$ ou Fe), estão coordenados dois resíduos de histidina e um de asparagina.^{60,74,75} Na Figura 6⁷⁷ é apresentada a representação do sítio ativo de uma fosfatase ácida púrpura.

Figura 6 – Representação esquemática do sítio ativo de uma PAP, incluindo os resíduos de aminoácido presentes na segunda esfera de coordenação.



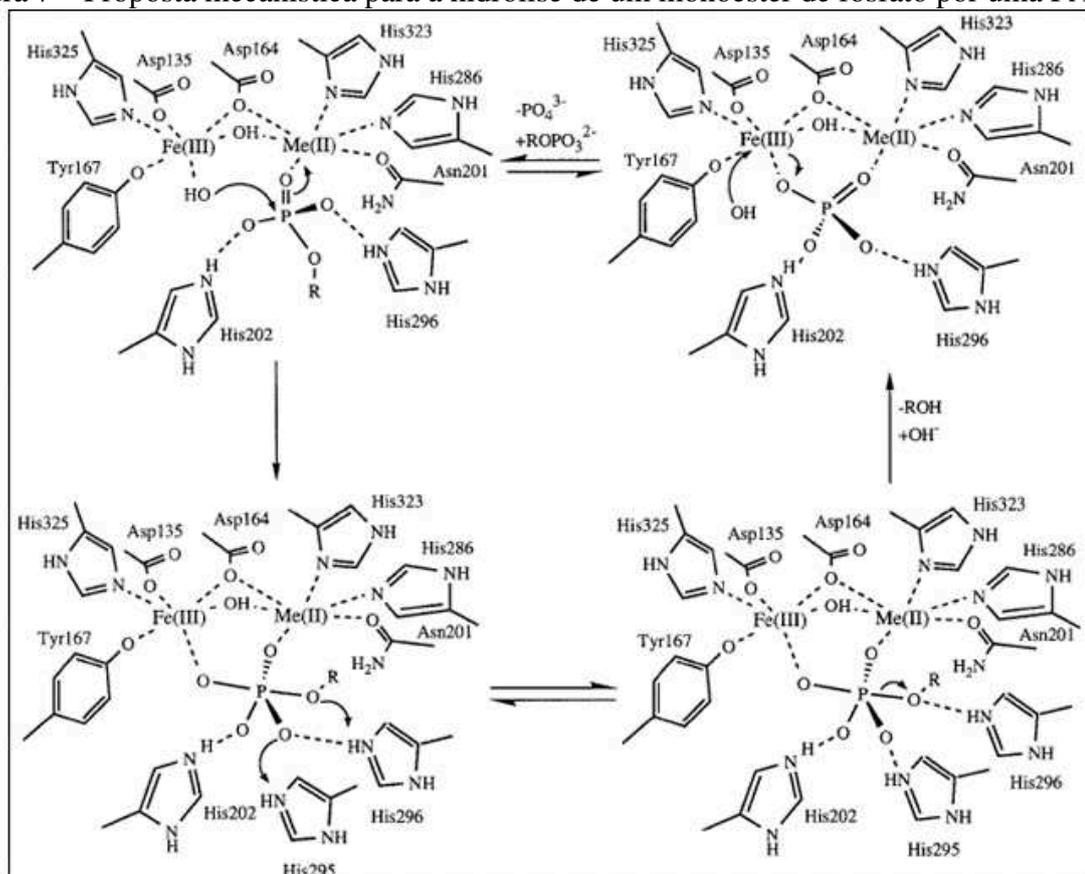
Fonte: adaptado de Bosch *et al.*⁷⁷

Especial destaque deve ser dado aos três resíduos de histidina que apesar de não estarem diretamente coordenados aos metais (His 113, His 216 e His 217), exercem um papel fundamental na catálise. Modificações nesses resíduos podem tanto aumentar quanto reduzir a eficiência das PAPs, podendo até mesmo inativá-las totalmente.⁷⁸ Quando os resíduos de histidina são substituídos por resíduos de alanina na fosfatase ácida púrpura do feijão, observa-se um grande decréscimo na atividade catalítica, por exemplo.⁷⁹ Portanto, os efeitos de segunda esfera de coordenação demonstram importância fundamental na eficiência dos catalisadores, sendo necessário que modelos biomiméticos dessas enzimas sejam desenvolvidos não apenas baseados na primeira esfera de coordenação, mas considerando também os efeitos de segunda esfera que tornam a catálise eficiente.

A proposta mecanística aceita atualmente para as fosfatases ácidas púrpuras, incluindo os efeitos de segunda esfera de coordenação, foi desenvolvida por Klabunde *et al.* (Figura 7).⁷⁴ Inicialmente, o substrato se coordena de maneira monodentada ao centro metálico de carga M(II) através da troca por uma molécula de água coordenada a esse metal. Através de interações com o M(II) e com resíduos de histidina não coordenados, o substrato se posiciona de maneira adequada para sofrer o ataque nucleofílico de um íon hidróxido coordenado ao centro de Fe(III). A inversão de configuração do fósforo durante a catálise indica que a reação ocorre via um mecanismo SN2, com a formação de um estado de transição pentacoordenado do substrato.⁸⁰ Novamente os resíduos de histidina não

coordenados auxiliam na estabilização do intermediário formado. Após o ataque nucleofílico do íon hidroxila ao fósforo e da formação e expulsão de uma molécula de álcool, a molécula de fosfato se coordena ao complexo de maneira bidentada. Finalmente, há a troca de ligantes onde uma molécula de água ataca o centro de Fe(III), liberando o produto da reação e, após a desprotonação da molécula de água ligada ao Fe(III), reestabelecendo o catalisador.

Figura 7 – Proposta mecanística para a hidrólise de um monoéster de fosfato por uma PAP.

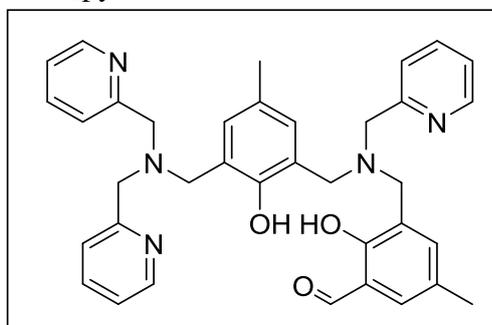


Fonte: adaptado de Mueller *et al.*⁸⁰

Dada a importância da reação catalisada pelas fosfatases ácidas púrpuras, diversos modelos biomiméticos dessas enzimas foram desenvolvidos englobando tanto complexos com abordagem da primeira esfera de coordenação quanto compostos com efeitos de segunda esfera.^{78,81-83} Especial destaque deve ser dado ao primeiro complexo biomimético de PAP com a unidade estrutural $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}]$ desenvolvido por Neves *et al.*⁸⁴ A partir desse modelo foi possível obter características estruturais e eletrônicas bastante semelhantes às das enzimas. A continuidade desse trabalho se deu com a criação de um novo ligante assimétrico, o $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ (Figura 8),⁸⁵ ponto de partida para a obtenção de complexos com uma modelagem de segunda esfera de coordenação. O ponto mais relevante desse ligante reside na

versatilidade da carbonila presente no fenol terminal do H_2py_3mff , que permite diversas modificações a fim de moldar a segunda esfera de coordenação dos complexos biomiméticos.

Figura 8 – Estrutura do ligante H_2py_3mff .⁸⁵

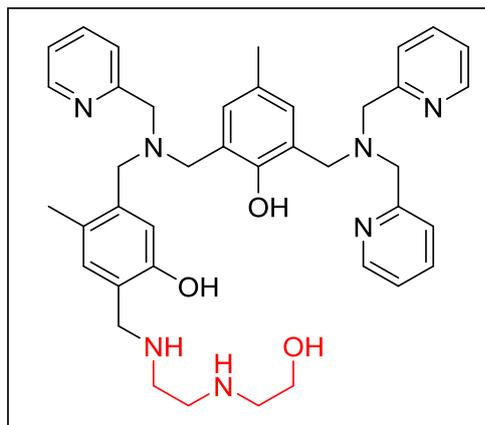


Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Diversas transformações foram realizadas pelo grupo na carbonila do ligante H_2py_3mff , como, por exemplo, a funcionalização com 3-aminopropil sílica,⁸⁶ a adição de grupos pirenos intercalantes com o DNA,⁸⁶ a adição de diaminas com diferentes tamanhos de cadeia^{38,87,88} e a funcionalização com polietilenoimina.³⁶ Os efeitos de segunda esfera trabalhados, até então, proporcionam um aumento da afinidade do substrato pelo catalisador através de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio entre os grupos amina protonados do ligante e o fosfato, levando a alterações relevantes nos parâmetros cinéticos dos complexos desenvolvidos.

Neste contexto, o presente trabalho visa a obtenção de complexos biomiméticos de $Ga^{III}M^{II}$ a partir de um novo ligante dinucleante ($H_2LdiaminOH$, Figura 9) obtido da reação do H_2py_3mff com um aminoálcool. Os efeitos de segunda esfera de coordenação de um grupo OH terminal, mimetizando um resíduo de serina, ainda são desconhecidos em modelos biomiméticos de PAPs e serão o objeto deste estudo. A estratégia empregada neste modelo consiste em desenvolver um composto que possua um nucleófilo na segunda esfera de coordenação que seja capaz de reagir com ésteres de fosfato, auxiliando no processo de hidrólise. A inspiração para este trabalho são as enzimas serina proteases, onde um resíduo de serina é o nucleófilo responsável por realizar a clivagem de ligações peptídicas,³² umas das ligações químicas mais fortes encontradas na natureza.

Figura 9 – Estrutura do ligante H₂LdiaminOH sintetizado neste trabalho.



Fonte: elaborado pelo autor (2019).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho visa o estudo dos efeitos de segunda esfera de coordenação de complexos heterobinucleares de $\text{Ga}^{\text{III}}/\text{M}^{\text{II}}$ (onde $\text{M} = \text{Zn}$ ou Cu) com o ligante dinucleante $\text{H}_2\text{LdaminOH}$ que contém em sua cadeia lateral grupos amina e uma hidroxila terminal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar, purificar e caracterizar por técnicas espectroscópicas os ligantes $\text{H}_2\text{LdaminOH}$ e $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$;
- Sintetizar os complexos de $\text{Ga}^{\text{III}}/\text{M}^{\text{II}}$ com o ligante $\text{H}_2\text{LdaminOH}$ e com o ligante $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ e realizar a caracterização dos complexos obtidos através de técnicas espectroscópicas, espectrométricas e análise elementar de CHN;
- Sintetizar complexos heterobinucleares de $\text{Ga}^{\text{III}}/\text{M}^{\text{II}}$ com o ligante $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$, que possui apenas efeitos de primeira esfera de coordenação, para a comparação entre as atividades catalíticas dos compostos estudados;
- Investigar a cinética da hidrólise do substrato modelo do DNA bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP) realizada pelos complexos sintetizados;
- Realizar testes de inibição da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP provocada pelo fluoreto para investigações mecanísticas dos complexos;
- Avaliar a eficiência dos catalisadores e verificar a validade da proposta desses novos complexos como modelos biomiméticos para fosfatases ácidas púrpuras;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Com exceção dos reagentes 2-(aminometil)piridina e 2-piridilcarboxialdeído, que foram purificados através de destilação à pressão reduzida, todos os demais reagentes, solventes e materiais empregados na síntese dos ligantes e complexos foram obtidos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia.

O substrato modelo bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP) foi sintetizado, purificado e caracterizado de acordo com procedimento já descrito na literatura.⁸⁸ As soluções dos complexos e substrato utilizadas nos ensaios cinéticos foram preparadas em solventes de grau UV/HPLC.

4.2 MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

4.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IR)

Os espectros na região do IR foram obtidos com um espectrofotômetro FTIR – Spectrum 100 da PerkinElmer. As amostras foram analisadas pela técnica de refletância total atenuada (ATR), utilizando um acessório de ATR horizontal (ZnSe, 45°) e um detector de sulfato de triglicina. O intervalo de varredura foi de 4000-500 cm^{-1} , com uma resolução de 4,0 cm^{-1} , sendo realizadas 8 varreduras para cada amostra. Para a correção das medidas das amostras, o branco utilizado foi o próprio cristal.

4.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H NMR)

Os espectros de ^1H NMR foram obtidos em um espectrômetro Bruker AC 200, na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, com frequência de 200 ou 400 MHz. Os deslocamentos químicos de hidrogênio foram registrados em ppm, utilizando-se o tetrametilsilano (TMS), com $\delta = 0,00$ ppm, como referência interna. Todos os espectros foram obtidos empregando o CDCl_3 como solvente.

4.2.3 Espectrometria de massas

Os ligantes e complexos sintetizados neste trabalho foram analisados no Centro de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME) da UFSC, através da espectrometria de massas com ionização via eletrospray (ESI-MS). Os espectros foram obtidos no equipamento Amazon – Ion Trap MS através da análise de soluções com concentração de aproximadamente 500 ppb e fluxo de $180 \mu\text{L min}^{-1}$. Os ligantes foram analisados em solução de acetonitrila grau MS e os complexos em uma solução de acetonitrila/água (1:1, % v/v) contendo 0,1% v/v de ácido fórmico. A temperatura do capilar foi mantida entre 180 e 200 °C e a voltagem, na faixa de -3500 a -4500 V. As simulações de distribuição isotópica para o pico base das espécies propostas foram realizadas no programa mMass.⁸⁹

4.2.4 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os espectros eletrônicos na região do UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro da PerkinElmer, modelo Lambda 750. As análises em solução foram realizadas utilizando-se solventes de grau espectroscópico e cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm e capacidade para 1,5 mL. Os complexos foram dissolvidos em soluções de acetonitrila e acetonitrila/água (1:1, % v/v) com concentrações de $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

4.2.5 Titulação espectrofotométrica

As titulações espectrofotométricas foram executadas com soluções de $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dos complexos em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, % v/v). Os experimentos foram realizados em uma célula termoestabilizada a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ por um banho da Visomes Plus e a força iônica do meio foi ajustada com a adição de KCl na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

As leituras de pH foram realizadas com um pHmetro Oakton pH 2700, sendo a titulação realizada com a adição manual de KOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Foram retiradas alíquotas de 1 mL a cada alteração de 0,15 no valor de pH das soluções e os espectros foram obtidos na região do UV-Vis utilizando um espectrofotômetro UV-Vis Varian Cay 50 Bio. Após cada medida, a alíquota foi devolvida para a célula termoestabilizada para prosseguir a titulação. Os dados obtidos foram ajustados com curvas sigmoidais e os valores de pKa foram obtidos a partir do ponto de inflexão destas.

4.2.6 Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN)

As análises dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. Foi utilizado um analisador elementar CHNS/O da marca PerkinElmer modelo 2400 Series II acoplado com uma balança PerkinElmer modelo Autobalance AD6000. O gás de combustão empregado foi oxigênio e o gás de arraste, hélio.

4.2.7 Estudos de atividade de fosfatase

A atividade catalítica dos complexos foi avaliada através do monitoramento da reação de hidrólise do substrato modelo bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP), sintetizado de acordo com procedimento descrito na literatura.⁹⁰ Para tal estudo, foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostaticado, onde foi avaliada a variação da absorbância em 400 nm referente a formação do ânion 2,4-dinitrofenolato, produto da hidrólise do substrato. Todos os experimentos foram realizados em um meio reacional de CH₃CN/H₂O (1:1, % v/v), no qual o coeficiente de absorção do produto formado em 400 nm varia com o pH de acordo com a Tabela 1.⁸⁹ As reações foram monitoradas por 20 minutos, a 25 °C, e as correções referentes à auto-hidrólise do substrato no meio reacional foram realizadas através do acompanhamento da variação de absorbância de uma solução na ausência dos complexos, mantendo idênticas todas as demais condições experimentais.

Tabela 1 – Coeficientes de absorção do produto de hidrólise do 2,4-BDNPP, o 2,4-dinitrofenolato, no comprimento de onda de 400 nm em diferentes valores de pH.⁹¹

pH	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
4	3410
4,5	7180
5	10080
5,5	11400
6	12000
6,5-10,0	12100

4.2.7.1 Estudo do efeito do pH na atividade fosfatase

Para avaliar a influência do pH na atividade dos complexos, os experimentos foram executados em uma faixa de pH entre 4,0 e 10,0. Foram utilizadas cubetas de vidro com capacidade de 4 mL e caminho óptico de 1 cm, nas quais adicionou-se 750 μL de solução aquosa de tampão 0,1 mol L^{-1} MES (pH 4,0 a 6,5), HEPES (pH 7,0 a 8,0) ou CHES (pH 9,0 a 10,0) contendo 0,1 mol L^{-1} de LiClO_4 para manter a força iônica constante. A essas cubetas também foram adicionados 100 μL de solução de complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}), 400 μL de acetonitrila e 250 μL de solução do substrato ($[\text{S}]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}) em acetonitrila, totalizando 1,5 mL de solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 no meio reacional.

4.2.7.2 Estudo do efeito da concentração do substrato na atividade fosfatase

As avaliações do efeito da variação da concentração de 2,4-BDNPP na velocidade inicial de reação foram realizadas nos pHs de atividade ótima de cada complexo. As concentrações de tampão e de complexo utilizadas foram idênticas às empregadas no estudo do efeito do pH. Em cada experimento, foram adicionados nas cubetas diferentes volumes da solução de substrato, de modo a executar medidas na faixa de concentração de 8×10^{-4} mol L^{-1} a 1×10^{-2} mol L^{-1} , e completou-se o volume até 1,5 mL com acetonitrila, mantendo sempre fixa a relação $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, %v/v).

4.2.7.3 Tratamento dos dados cinéticos

Os dados cinéticos foram tratados pelo método das velocidades iniciais que, por sua vez, foram determinadas através da inclinação da reta obtida através do estudo da variação de absorbância do meio reacional com o tempo. Em toda as reações, foram utilizadas concentrações elevadas de substrato em relação ao complexo para manter as condições de uma cinética de pseudo-primeira ordem.

Através do gráfico das velocidades iniciais em função do pH do meio reacional, foram obtidos os pHs de atividade máxima dos complexos. Utilizando o mesmo gráfico, os valores de pK_a dos complexos foram obtidos através do ajuste não linear dos dados experimentais baseado na seguinte equação, que consiste em um modelo para um sistema diprótico com duas espécies ativas:⁹²

$$v_0 = \frac{v_{\max} \left(1 + \frac{\gamma K_{a2}}{[H^+]} \right)}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} + \frac{K_{a2}}{[H^+]} \right)}$$

Nesta equação, v_{\max} é a velocidade máxima obtida nas condições experimentais e γ é um fator relativo a atividade das duas espécies em equilíbrio e foi mantido com um valor de 0,3.⁷⁷

No estudo do efeito do substrato, foram obtidos gráficos da velocidade inicial de reação em função da concentração de 2,4-BDNPP que resultaram em curvas de saturação com perfis de Michaelis-Menten. Através de um ajuste não linear dos dados experimentais baseado no modelo de Michaelis-Menten⁹³ para cinética de enzimas foram obtidos os seguintes parâmetros cinéticos da reação: a velocidade máxima (V_{\max}) e a constante de Michaelis (K_M). A constante catalítica (k_{cat}) da reação foi calculada a partir de uma equação simples ($k_{\text{cat}} = V_{\max}/[C]$) utilizando o valor de velocidade máxima determinado através da regressão não linear. A eficiência catalítica da reação ($E = k_{\text{cat}}/K_M$) também foi calculada a partir dos dados cinéticos determinados neste experimento.

4.2.7.4 Atividade monoestearase e número de moléculas hidrolisadas por molécula de complexo

A atividade dos complexos frente à hidrólise do substrato modelo de monoéster de fosfato, o 2,4-dinitrofenil fosfato (2,4-DNPP), foi determinada através do monitoramento da variação de absorvância em 400 nm após incrementos sucessivos no número de equivalentes de substrato no meio reacional. Foram realizadas leituras da absorvância após a adição de 0, 1, 2, 4, 8 e 12 equivalentes de monoéster em relação ao complexo ($[C] = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Posteriormente à adição de 12 equivalentes, as cubetas foram mantidas dentro do espectrofotômetro para novas leituras da absorvância após 1 hora e 5 horas. Por último, foram adicionados ao meio 4 equivalentes do diéster de fosfato 2,4-BDNPP e realizadas medidas 1 hora e também 12 horas após essa nova inclusão de substrato. Ainda com o intuito de verificar a atividade monoestearase, realizou-se em outro experimento o acompanhamento da reação em condições estequiométricas de complexos e o substrato 2,4-BDNPP ($[C]_{\text{final}} = [S]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) durante 55 horas, a 50°C, monitorando a absorvância em 400 nm.

A determinação do número de moléculas de substrato hidrolisadas por molécula de complexo foi realizada pelo acompanhamento espectrofotométrico da absorbância em 445 nm ($\epsilon = 3600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁹¹ na condição de cem vezes de excesso do substrato ($[S]_{\text{final}} = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em relação ao complexo ($[C]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). O experimento foi conduzido a 25 °C, durante 24 horas.

4.2.7.5 Inibição da atividade pelo fluoreto

O estudo da inibição da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP devido à presença do ânion fluoreto foi realizado utilizando o fluoreto de tetra-n-butilamônio (TBAF) como inibidor, em concentrações que variaram de $6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Para o estudo de inibição em função da concentração de fluoreto, partiu-se de uma solução $0,018 \text{ mol L}^{-1}$ de TBAF em acetonitrila da qual foram retiradas alíquotas de 50, 100, 150 e 200 μL que foram adicionadas ao meio reacional em condições idênticas às descritas no ensaio de efeito do pH. Os ensaios foram realizados no pH de atividade máxima de cada complexo e o volume de solução de TBAF adicionado foi contabilizado no volume total de 1,5 mL do meio reacional, sendo adicionada acetonitrila suficiente para manter a proporção de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, % v/v).

O percentual de inibição foi calculado a partir da determinação da velocidade inicial da reação na ausência de fluoreto, assumindo-se esse valor como a velocidade da reação não inibida. Desse modo, obtendo-se o valor de velocidade inicial das reações inibidas, foi possível avaliar qual porcentagem de decréscimo da velocidade de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{inibição} = 100 - (V_{0 \text{ inibida}} / V_{0 \text{ não inibida}}) \times 100$$

Para a determinação da constante catalítica na presença de fluoreto (k_F) foram realizados ensaios de efeito de concentração do substrato na atividade catalítica dos complexos, de forma idêntica ao descrito no item 4.2.7.2, porém em um meio contendo uma concentração de $6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de TBAF. Essas constantes foram comparadas com as constantes catalíticas na ausência do inibidor para verificar a extensão da inibição pelo ânion fluoreto.

4.2.7.6 Efeito isotópico de deutério

Para avaliar se na etapa determinante da reação ocorre transferência de prótons foi realizada a análise do efeito isotópico do deutério. O ensaio foi realizado através de experimentos de efeito de concentração do substrato na atividade dos complexos, em procedimento idêntico ao descrito no item 4.2.7.2, porém em meio contendo solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1, % v/v). Os ensaios foram conduzidos nos pHs e pDs (com as devidas correções relativas ao produto de ionização da água deuterada) de atividade máxima dos complexos visando a comparação entre a constante catalítica em meio contendo H_2O (k_{H}) e a constante catalítica em meio de D_2O (k_{D}).

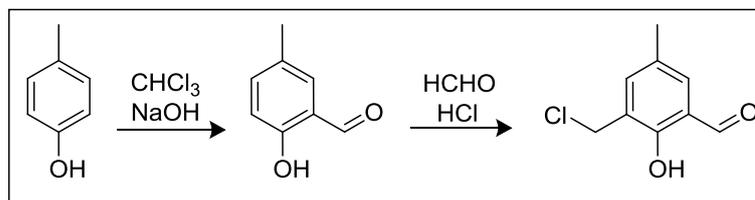
4.3 METODOLOGIAS DE SÍNTESE

4.3.1 Síntese dos ligantes

Neste trabalho, foram sintetizados complexos a partir de dois ligantes, o $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ e o $\text{H}_2\text{LdiaminOH}$, onde o primeiro é material de partida para a síntese do segundo. Desse modo, serão descritas todas as sínteses necessárias para a obtenção do ligante $\text{H}_2\text{LdiaminOH}$ incluindo a metodologia para a formação do $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$.

4.3.1.1 Precursor cmff – 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol

Figura 10 – Esquema da síntese do cmff.⁹⁴



Inicialmente o intermediário 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído (HMB) foi obtido através de uma formilação do *p*-cresol.⁹⁵ Para isso, acoplou-se um balão de 3 bocas de 5000 mL a um condensador e se manteve agitação com um agitador mecânico. Adicionou-se ao balão 21,6 g de *p*-cresol (200 mmol; 108,14 g mol⁻¹) e 1,5 L de clorofórmio. Esta solução permaneceu sob agitação e em temperatura controlada (56-60 °C). Durante 3 horas, adicionou-se em pequenas porções o total de 60 g de hidróxido de sódio (1,5 mol; 40,00 g mol⁻¹) suspensos em 100 mL

de água destilada. Após o término da adição, a reação permaneceu sob agitação por mais 1 hora e então o sistema reacional foi resfriado à temperatura ambiente.

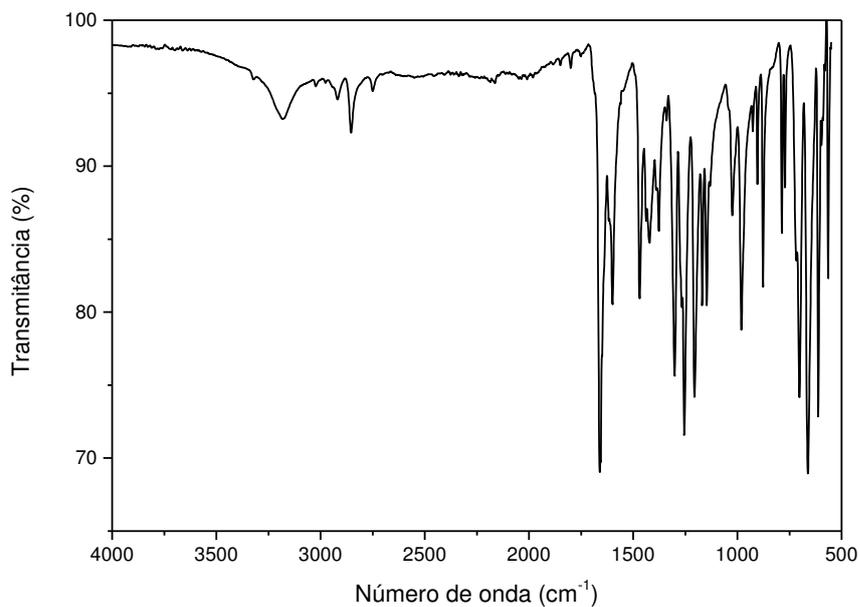
Na sequência, adicionou-se aproximadamente 500 mL de água destilada ao sistema reacional e, sob agitação, o pH foi ajustado até próximo de 2 com ácido clorídrico concentrado. A fase orgânica foi separada, lavada com água destilada, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido à pressão reduzida.

O produto, de coloração preta, foi destilado à pressão reduzida e obteve-se o HMB como um sólido branco, que foi posteriormente solubilizado em uma quantidade mínima de diclorometano e purificado através de separação cromatográfica em coluna de sílica. Utilizando diclorometano como solvente, o fator de retenção apresentado pelo HMB foi de 0,86. Por fim, o diclorometano foi removido à pressão reduzida e obteve-se um sólido cristalino.

Para a síntese do cmff, adicionou-se em um balão de 500 mL 6,4 gramas de HMB (47 mmol; $136,15 \text{ g mol}^{-1}$), 3,81 g de formaldeído 37% (94 mmol; $30,03 \text{ g mol}^{-1}$) e 25 mL de ácido clorídrico concentrado. O sistema reacional foi mantido sob refluxo e agitação por 30 minutos, e, em seguida, foi resfriado à 0 °C. Após o resfriamento, formou-se um precipitado compacto no fundo do balão, o qual foi transferido para um béquer, triturado, filtrado sob vácuo e recristalizado a quente em diclorometano. Após 5 recristalizações em diclorometano, obteve-se um sólido branco, com P.F.: 94-96 °C e rendimento de 85% em relação ao HMB.

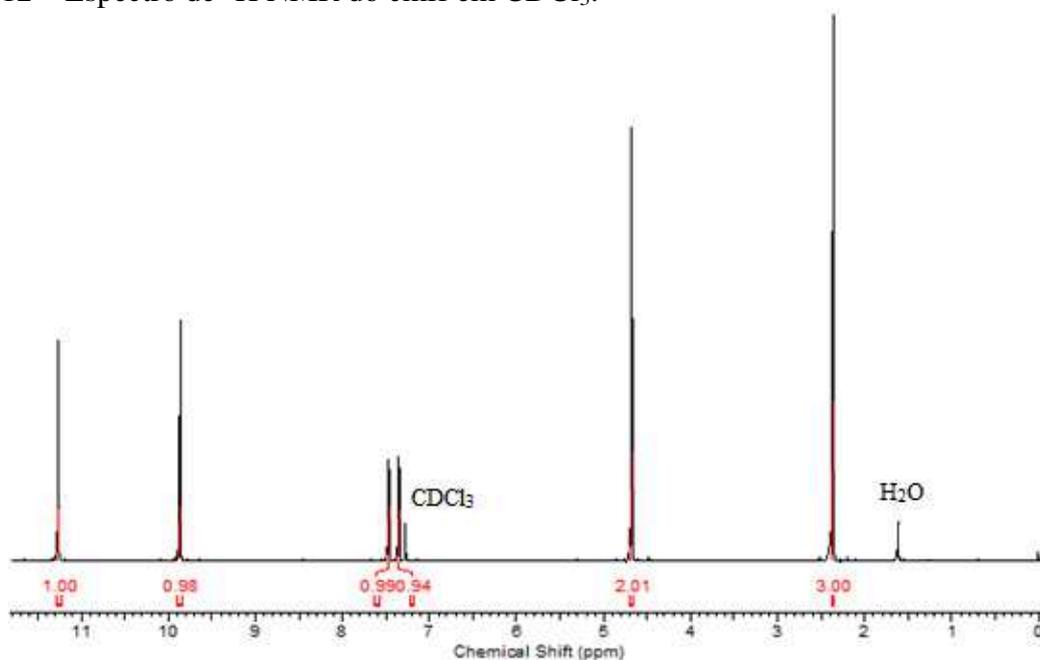
ATENÇÃO: O composto bis(clorometil)éter, um potente agente carcinogênico altamente tóxico, é formado durante a síntese do cmff. Desta forma, a reação deve ser realizada somente em capelas com boa exaustão, utilizando-se de máscaras e luvas. A capela e todo o material utilizado deve ser lavado posteriormente com alguma solução alcalina, como a mistura etanol/água/KOH: 60 mL/40 mL/5 g, para ocorrer a hidrólise do bis(clorometil)éter para formaldeído de forma rápida. A solução reacional e todos os resíduos devem ser descartados somente após a correção do pH (pH > 9,0), com a adição de hidróxido de sódio ou potássio.

Figura 11 – Espectro de IR (ATR) do cmff.



IR (ATR) em cm^{-1} : ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3180-2749; ν (C=O) 1659; ν (C=N e C=C) 1600-1470; δ (C-H_{ar}) 750; ν (C-Cl) 613.

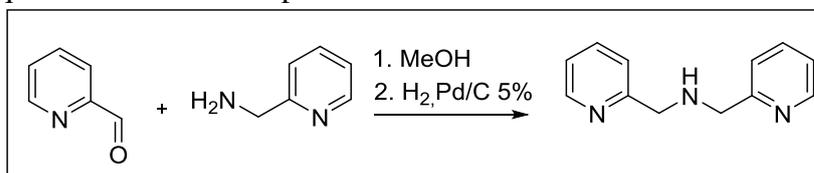
Figura 12 – Espectro de ^1H NMR do cmff em CDCl_3 .



^1H NMR (400 MHz; CDCl_3), δ em ppm: 2,35 (s, 3 H, CH_3); 4,67 (s, 2 H, CH_2); 7,34 (s, 1 H, CH_{ar}); 7,46 (s, 1 H, CH_{ar}); 9,86 (s, 1 H, CH_{ald}); 11,25 (s, 1 H, OH).

4.3.1.2 Precursor bpma – bis(piridilmetil)amina

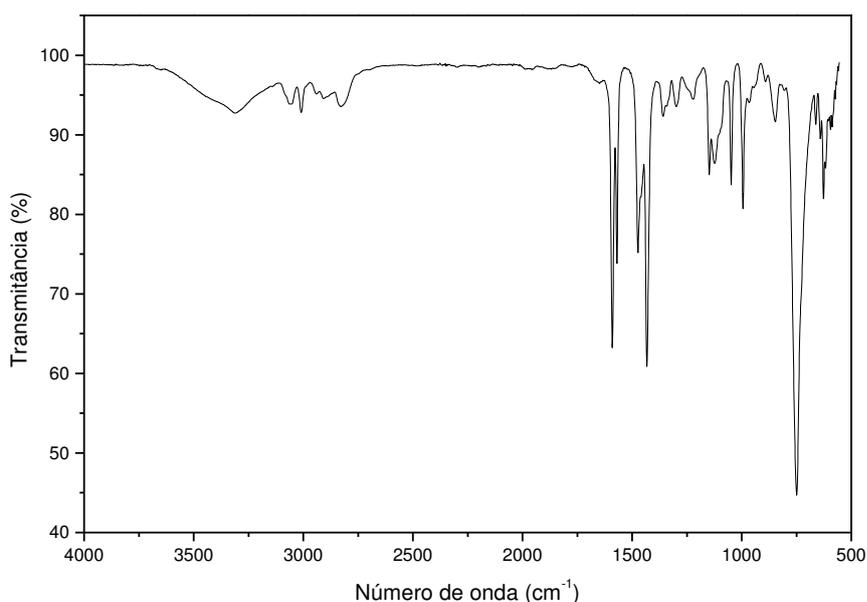
Figura 13 – Esquema da síntese do bpma.



O precursor bpma foi sintetizado através de uma reação de aminação redutiva entre a 2-(aminometil)piridina e o 2-piridilcarboxialdeído, já descrita em literatura.⁹⁶ Em um balão de 250 mL, 10,8 g da 2-(aminometil)piridina (100 mmol; 108,14 g mol⁻¹) foram solubilizados em 40 mL de metanol. Sob banho de gelo, adicionou-se lentamente a esta solução 9,51 mL de 2-piridilcarboxialdeído (100 mmol; 107,11 g mol⁻¹; 1,12 g mL⁻¹) com o auxílio de um funil de adição. Após o término da adição, o banho de gelo foi retirado e o sistema reacional permaneceu sob agitação por 1 hora.

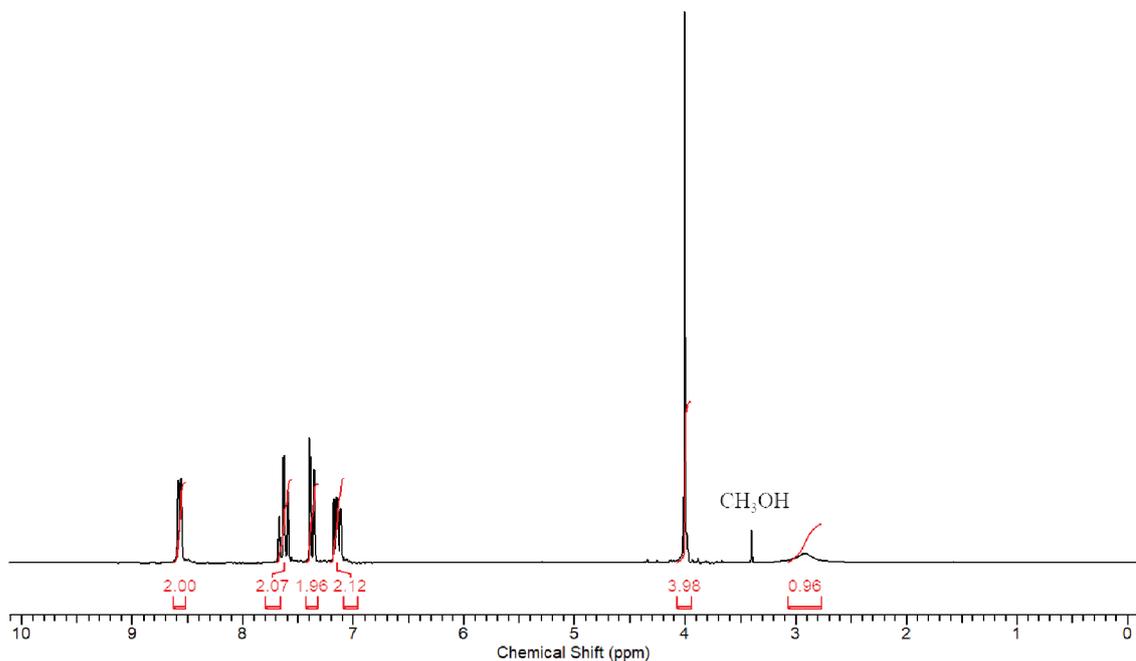
Após este período, a solução foi transferida para um reator de hidrogenação e adicionou-se ao sistema 1 g de catalisador paládio/carbono 5%. A reação foi conduzida sob agitação e atmosfera de hidrogênio a 40 psi por 15 horas. Em seguida, a mistura foi filtrada em um funil de Büchner contendo celite para separar o catalisador e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Obteve-se um óleo amarelo com rendimento de 96%.

Figura 14 – Espectro de IR (ATR) do bpma.



ATR) em cm⁻¹: ν (N-H) 3313; ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3057-2828; ν (C=N e C=C) 1590-1432; ν (C-N) 1148; ν (C-H_{ar}) 750.

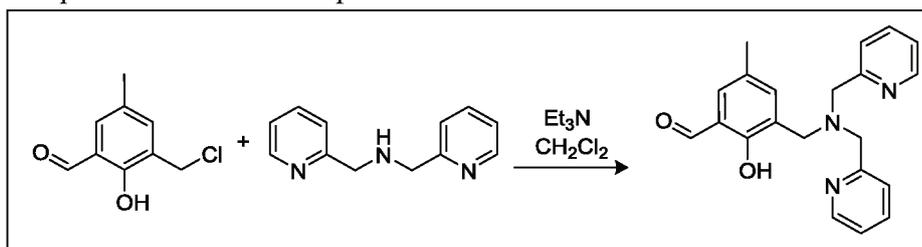
Figura 15 – Espectro de ^1H NMR do bpmma em CDCl_3 .



^1H NMR (200 MHz; CDCl_3), δ em ppm: 2,91 (s, 1 H, NH); 4,04 (s, 4 H, CH_2); 7,21 (ddd, $J = 7,4, 4,9, 0,8$ Hz, 2 H, CH_{ar}); 7,42 (d, $J = 7,8$ Hz, 2 H, CH_{ar}); 7,70 (td, $J = 7,6, 1,8$ Hz, 2 H, CH_{ar}); 8,62 (d, $J = 4,2$ Hz, 2 H, CH_{ar}).

4.3.1.3 Precursor bpmamff – 2-[*N*-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formilfenol

Figura 16 – Esquema da síntese do bpmamff.

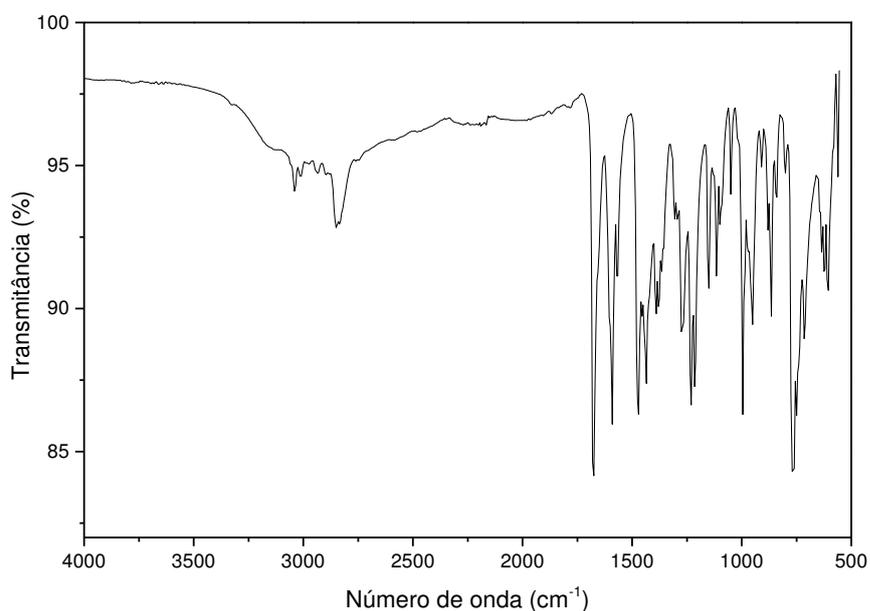


A síntese do bpmamff foi realizada de acordo com rota já descrita na literatura.⁹⁷ Em um balão de 250 mL, 5,6 g de cmff (30 mmol; $184,62 \text{ g mol}^{-1}$) foram dissolvidos em 80 mL de diclorometano. À esta solução, adicionou-se lentamente, a 0°C e sob agitação, com um funil de adição, 80 mL de uma solução de bpmma (6,0 g; 30 mmol; $199,26 \text{ g mol}^{-1}$) em diclorometano. Após o término desta, o sistema reacional permaneceu sob agitação por mais 3 horas, em temperatura ambiente.

Após este período, transferiu-se a solução para um funil de separação, no qual foi lavada uma vez com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio. As fases orgânica e aquosa foram separadas, a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida.

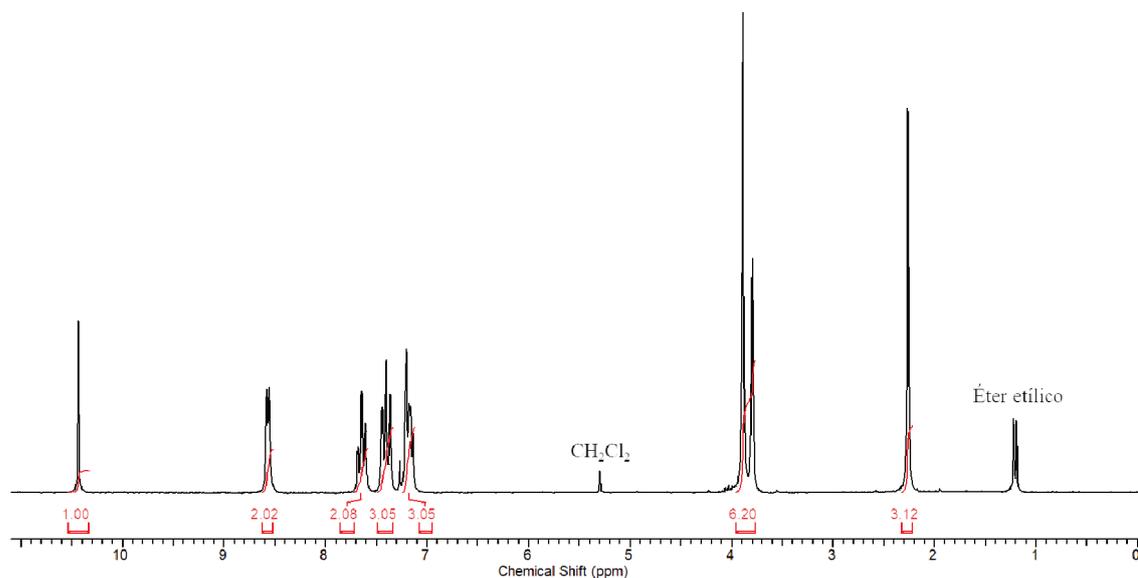
O óleo resultante foi solubilizado em 40 mL de 2-propanol quente. Essa solução foi deixada em repouso para a recristalização do produto. Após 12 h, filtrou-se o precipitado cristalino formado em um funil de placa porosa, lavando-o com isopropanol. Ao final, foi obtido um sólido amarelo com rendimento de 79%.

Figura 17 – Espectro de IR (ATR) do bpmamff.



IR (ATR) em cm^{-1} : ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3040-2834; ν (C=O) 1677; ν (C=N e C=C) 1590-1435; ν (C-N) 1150; δ (C-H_{ar}) 765.

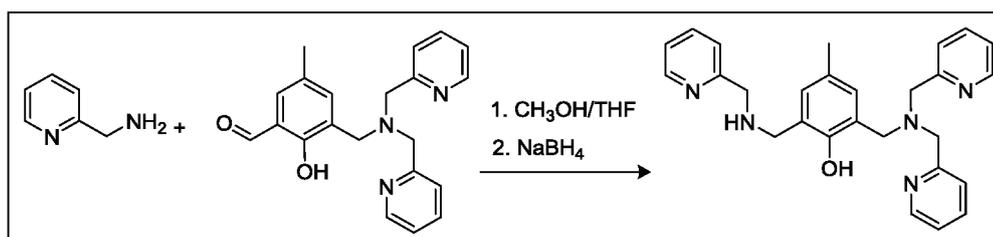
Figura 18 – Espectro de ^1H NMR do bpmamff em CDCl_3 .



^1H NMR (200 MHz; CDCl_3), δ em ppm: 2,27 (s, 3 H, CH_3); 3,80 (s, 2 H, CH_2); 3,90 (s, 4 H, CH_2); 7,15-7,21 (m, 3 H, CH_{ar}); 7,41 (m, 3 H, CH_{ar}); 7,65 (td, $J = 7,7, 1,6$ Hz, 2 H, CH_{ar}); 8,57 (d, $J = 4,2$ Hz, 2 H, CH_{ar}); 10,43 (s, 1 H, CH_{ald}).

4.3.1.4 Precursor Hpy₃ – 2-[*N*-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[*N*-(2-piridilmetil)aminometil]fenol

Figura 19 – Esquema da síntese do Hpy₃.

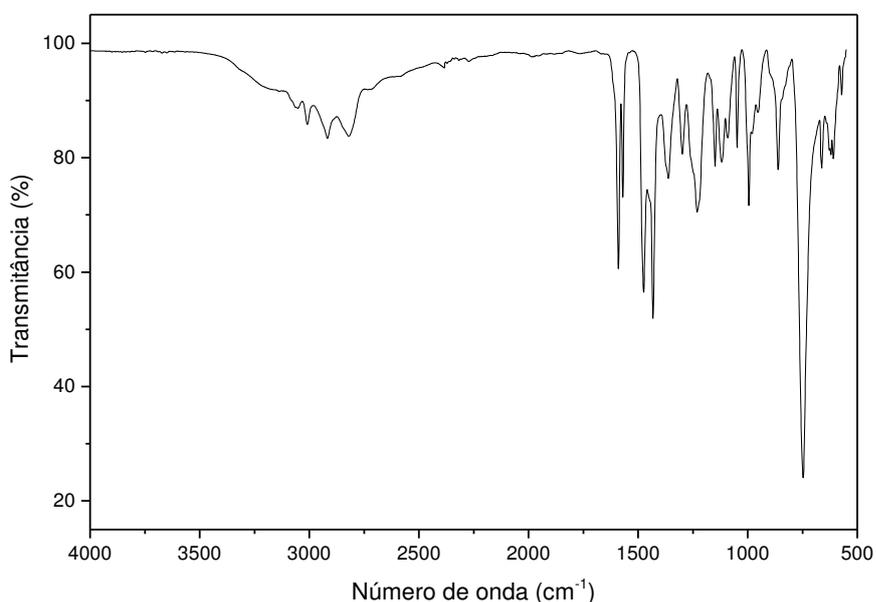


A síntese do Hpy₃ foi realizada de acordo com procedimento experimental já descrito na literatura.⁹⁸ Em um balão de 250 mL, 6,14 g de bpmamff (17,6 mmol; 347,42 g mol⁻¹) foram dissolvidos em 80 mL de uma mistura de $\text{CH}_3\text{OH}/\text{THF}$ (1:1, v/v). Acrescentou-se a esse sistema 1,8 mL de 2-(aminometil)piridina (18 mmol; 108,14 g mol⁻¹; 1,049 g mL⁻¹) e foi mantida agitação por 1 hora.

Após esse período, adicionou-se lentamente 0,76 g de borohidreto de sódio (20 mmol; $37,83 \text{ g mol}^{-1}$) ao balão. Ao final da adição, a reação permaneceu sob agitação por mais 12 horas e, em seguida, o solvente foi evaporado à pressão reduzida.

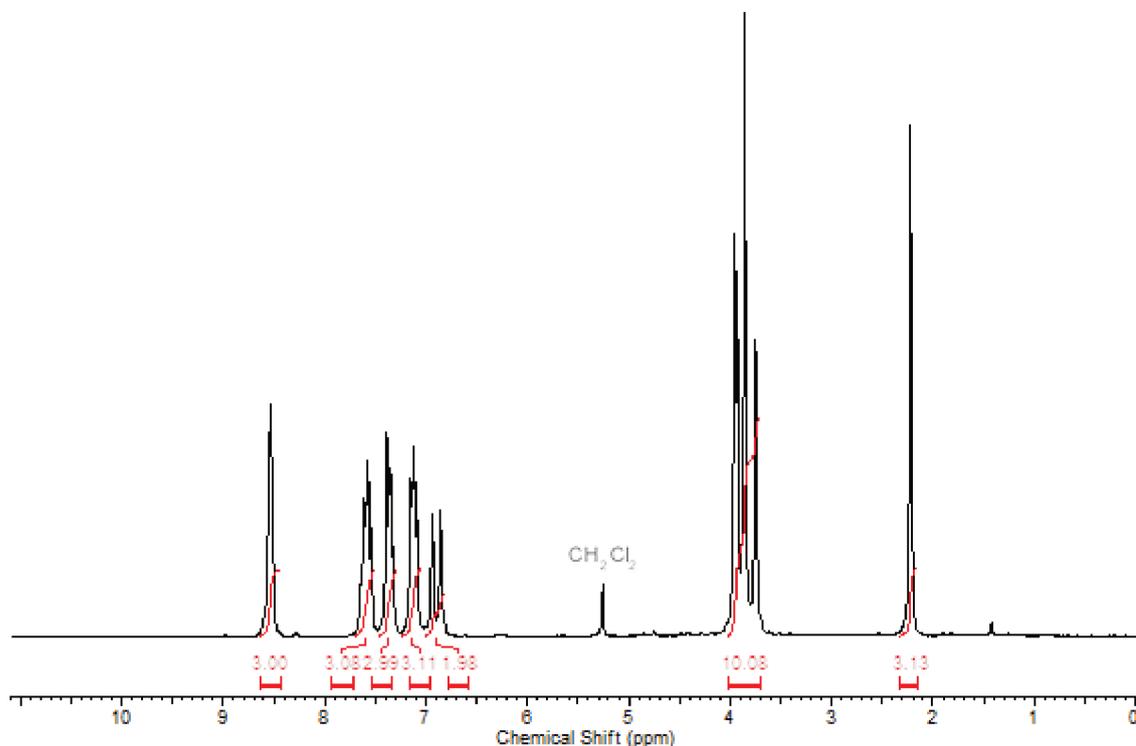
O óleo resultante foi dissolvido em 60 mL de diclorometano e a fase orgânica foi lavada 5 vezes com 50 mL de solução de bicarbonato de sódio saturada. Posteriormente, a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente foi removido à pressão reduzida, resultando em um óleo claro, com rendimento de 91%.

Figura 20 – Espectro de IR (ATR) do Hpy₃.



IR (ATR) em cm^{-1} : ν (N-H) 3213; ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3013-2818; ν (C=N e C=C) 1591-1433; ν (C-N) 1148; δ (C-H_{ar}) 746.

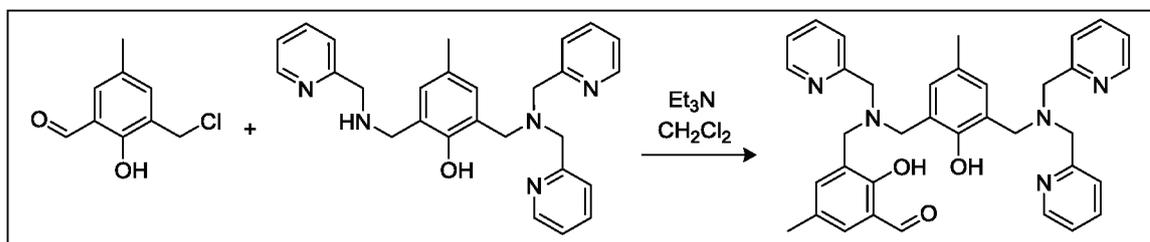
Figura 21 – Espectro de ^1H NMR do Hpy₃ em CDCl_3 .



^1H NMR (200 MHz; CDCl_3), δ em ppm: 2,23 (s, 3 H, CH_3); 3,75-3,96 (m, 10 H, CH_2); 6,89 (d, $J = 16,9$ Hz, 2 H, CH_{ar}); 7,11-7,17 (m, 3 H, CH_{ar}); 7,34-7,40 (m, 3 H, CH_{ar}); 7,56-7,67 (m, 3 H, CH_{ar}); 8,55 (d, $J = 2,3$ Hz, 2 H, CH_{ar}).

4.3.1.5 Ligante $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ – 2-[*N*-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[*N*-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol

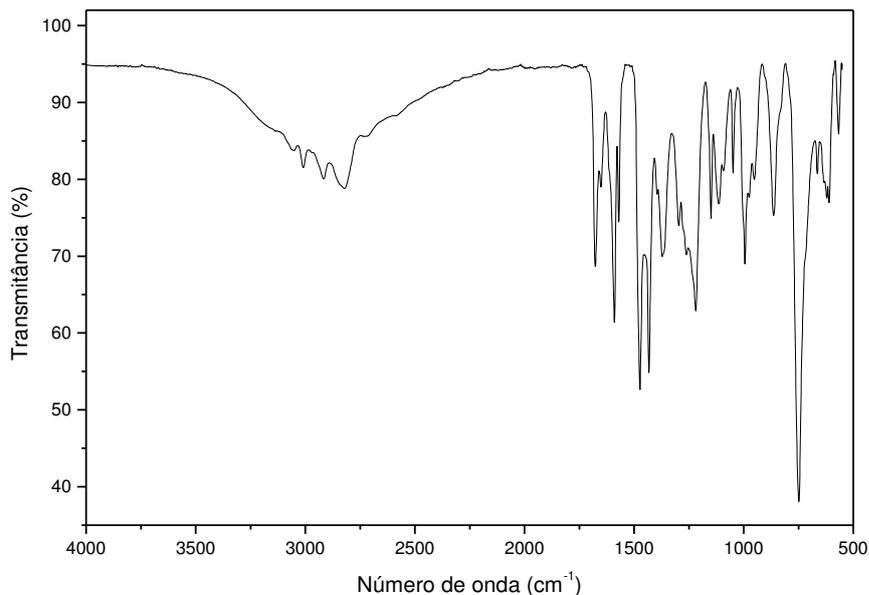
Figura 22 – Esquema da síntese do $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$.



O ligante foi preparado de acordo com metodologia já descrita por Piovezan *et al.*³⁴ Em um balão de 250 mL, adicionaram-se 3,7 g de Hpy₃ (8,4 mmol; 439,56 g mol⁻¹), 1,4 mL de trietilamina (10 mmol; 101,19 g mol⁻¹) em 40 mL de diclorometano. À solução formada, adicionou-se 1,7 g de cmff (9,2 mmol; 184,62 g mol⁻¹) também dissolvido em 20 mL de diclorometano. O sistema reacional permaneceu sob refluxo e agitação durante 5 dias.

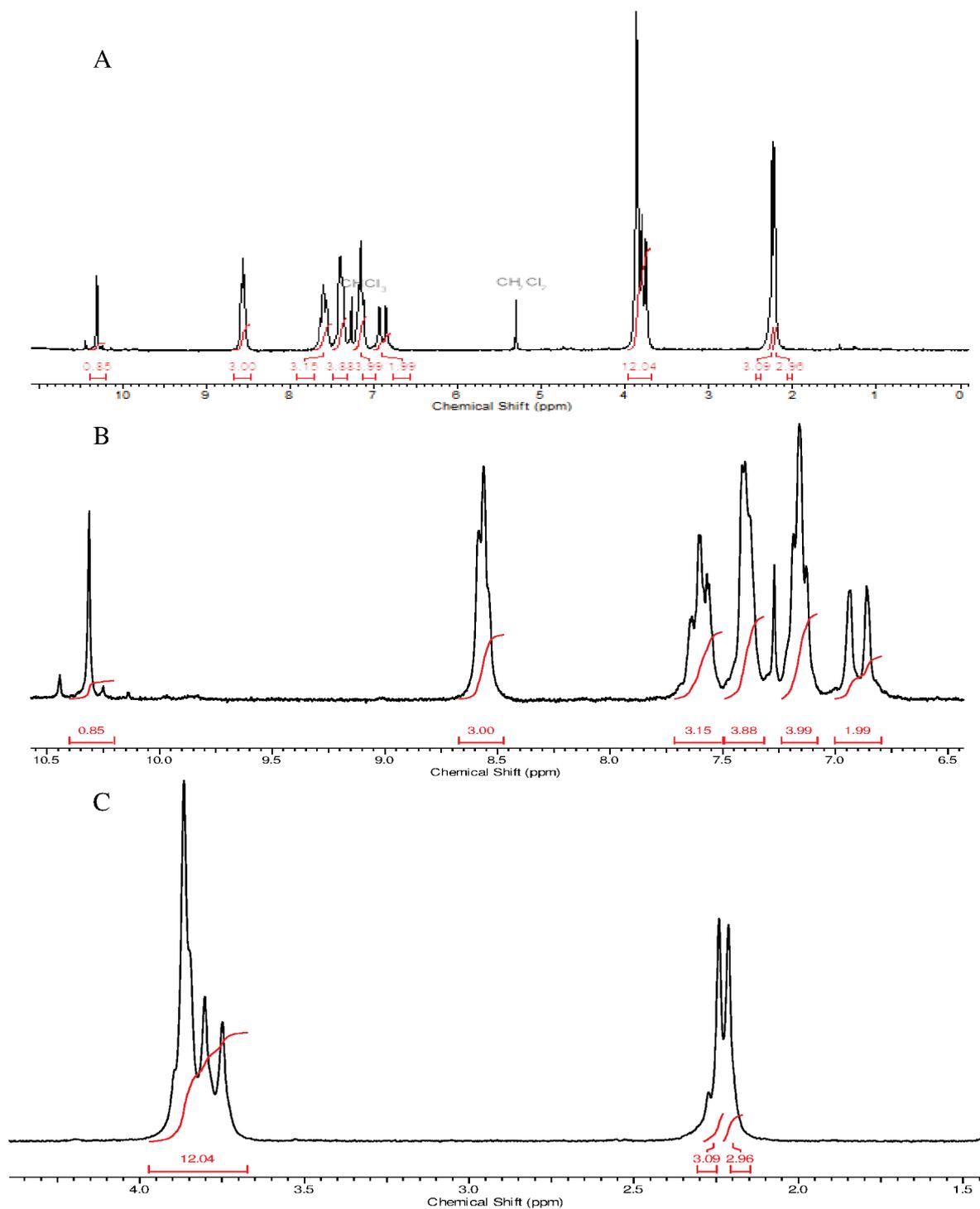
Após este período, a solução foi lavada com uma solução aquosa 10% de cloreto de amônio (4 x 40 mL) e com solução aquosa de bicarbonato de sódio saturada (4 x 40 mL). Ao final, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente removido sob pressão reduzida. Foi obtido um sólido amarelo, com rendimento de 82%.

Figura 23 – Espectro de IR (ATR) do H₂py₃mff.



IR (ATR) em cm^{-1} : ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3055-2830; ν (C=O) 1677; ν (C=N e C=C) 1592-1433; ν (C-N) 1149; δ (C-H_{ar}) 748.

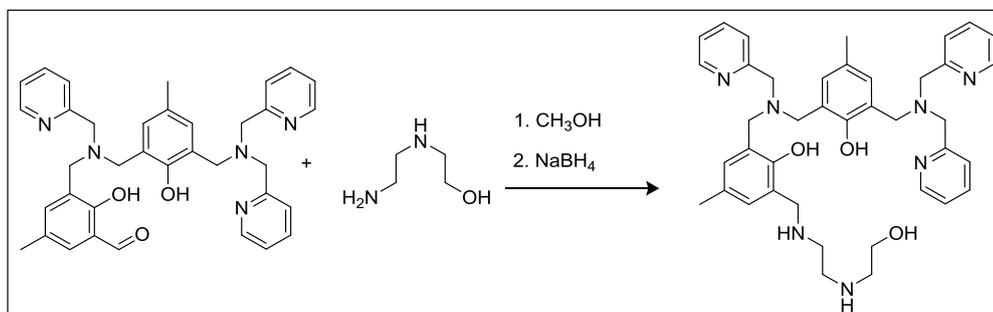
Figura 24 – Espectro de ^1H NMR do $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ em CDCl_3 . A: espectro completo. B: sinais de ^1H aromáticos. C: sinais de ^1H alifáticos.



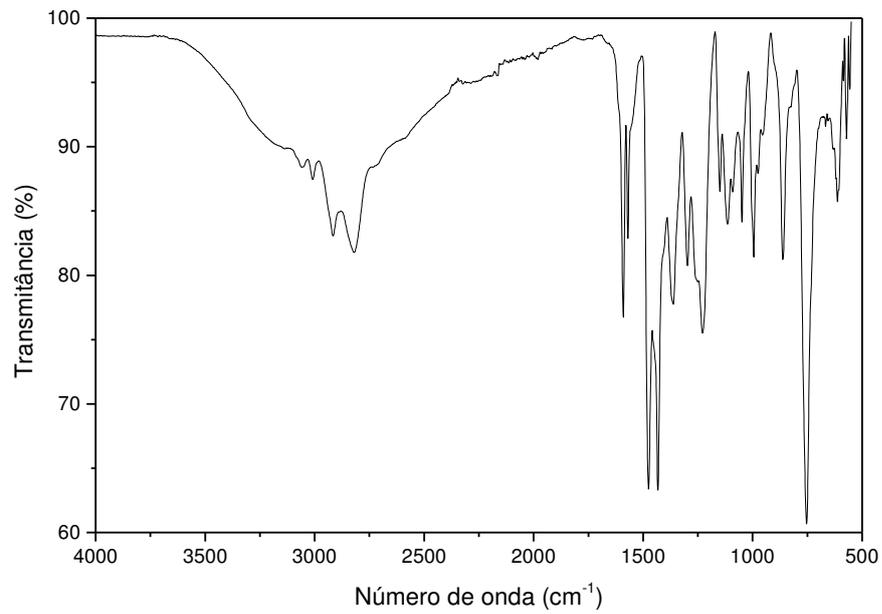
^1H NMR (200 MHz; CDCl_3), δ em ppm: 2,21 (s, 3 H, CH_3); 2,24 (s, 3 H, CH_3); 3,75-3,87 (m, 12 H, CH_2); 6,86 (s, 1 H, CH_{ar}); 6,94 (s, 1 H, CH_{ar}); 7,15-7,18 (m, 4 H, CH_{ar}); 7,38-7,41 (m, 4 H, CH_{ar}); 7,57-7,63 (m, 3 H, CH_{ar}); 8,54-8,58 (m, 3 H, CH_{ar}); 10,32 (s, 1 H, CH_{ald}).

4.3.1.6 Ligante H₂LdiaminOH – 2-{{[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil}-6-{{[(2-hidroxi-3-{{[(2-{{(2-hidroxi)etil)amino]etil}amino)metil]-5-metilbenzil} (piridin-2-ilmetil)amino]metil}-4-metilfenol

Figura 25 – Esquema da síntese do H₂LdiaminOH.

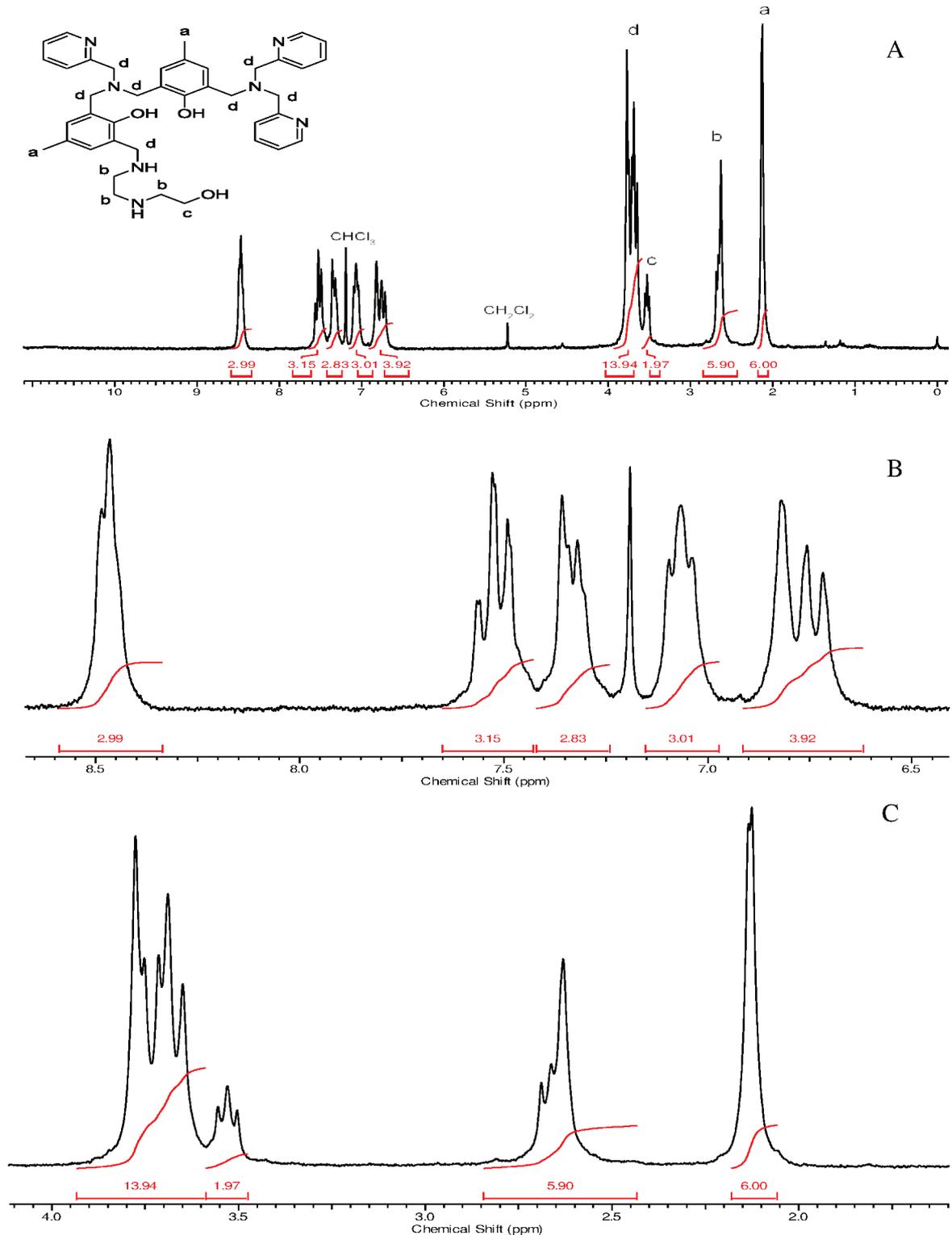


Em um balão de 250 mL, dissolveu-se 2,35 g de H₂py₃mff (4 mmol, 587,72 g mol⁻¹) em 60 mL de metanol. Com um funil de adição, acrescentaram-se lentamente 40 mL de uma solução metanólica de 2-[(2-aminoetil)amino]etan-1-ol (0,416 g, 4 mmol, 104,15 g mol⁻¹). O sistema permaneceu sob agitação por 6 horas e então adicionou-se, em banho de gelo, borohidreto de sódio (0,167 g, 4,4 mmol, 37,83 g mol⁻¹). A mistura reacional permaneceu por 12 horas sob agitação e, após esse período, o solvente foi retirado sob vácuo a 40 °C. O produto resultante foi dissolvido em 60 mL de diclorometano e a fase orgânica foi lavada com solução aquosa de bicarbonato de sódio saturada (6x80 mL) em um funil de separação. Após a extração, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido a vácuo. Rendimento de 89 % (2,41 g, 3,56 mmol, 675,88 g mol⁻¹).

Figura 26 – Espectro de IR (ATR) do H₂LdiaminOH.

IR (ATR) em cm^{-1} : ν (N-H) 3274; ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3056-2818; ν (C=N e C=C) 1592-1433;
 δ (O-H_{fenol}) 1368; ν (C-O_{fenol}) 1235; ν (C-N) 1149; ν (C-H_{ar}) 751.

Figura 27 – Espectro de ^1H NMR do H_2L diaminOH em CDCl_3 . A: espectro completo. B: sinais de ^1H aromáticos. C: sinais de ^1H alifáticos.

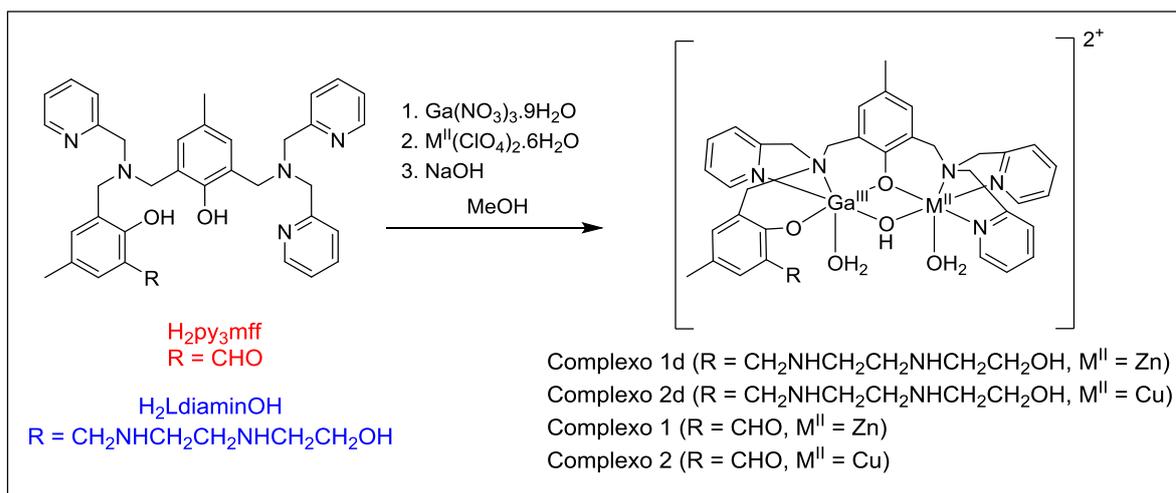


^1H NMR (200 MHz; CDCl_3), δ em ppm: 2,13 (s, 6 H, CH_3); 2,43-2,84 (m, 6H, CH_2); 3,47-3,59 (m, 2H, CH_2); 3,60-3,89 (m, 14 H, CH_2); 6,67-6,89 (m, 4 H, CH_{ar}); 6,99-7,13 (m, 3 H, CH_{ar}); 7,28-7,39 (m, 3 H, CH_{ar}); 7,45-7,60 (m, 3 H, CH_{ar}); 8,46 (dd, $J = 4,0, 0,8$ Hz, 3 H, CH_{ar}).

4.3.2 Síntese dos complexos

Os complexos foram sintetizados todos através da mesma metodologia, conforme mostrado no esquema da Figura 28:

Figura 28 – Esquema de síntese dos complexos deste trabalho.



Em um béquer de 600 mL, foi solubilizado 1 mmol do ligante ($\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ ou $\text{H}_2\text{LdaminOH}$) em 200 mL de metanol. A esta solução, foram adicionados, com o auxílio de um funil de adição, 0,42 g (1 mmol, 417,87 g mol⁻¹) de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ solubilizado previamente em 100 mL de metanol. A adição foi realizada lentamente, durante 2 horas, a 40 °C. Duas horas após esta etapa, adicionou-se lentamente ao sistema, com o auxílio do funil de adição, uma solução de 100 mL de metanol contendo 1 mmol do sal de zinco ou cobre: $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Posteriormente à adição do M^{II} , manteve-se agitação por 12 horas a temperatura ambiente.

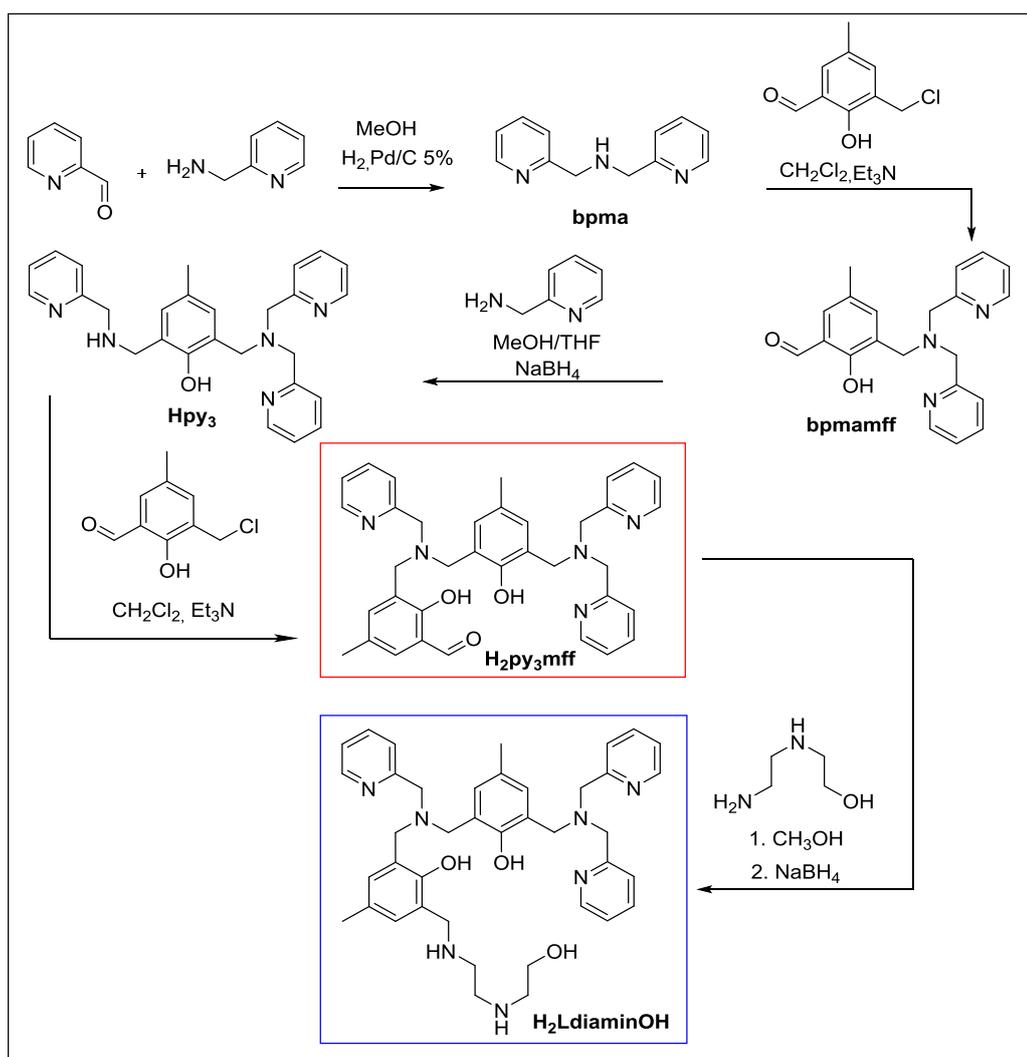
Foram adicionados 3 equivalentes de uma solução de hidróxido de sódio (3 mL de uma solução 1 mol L⁻¹) após esse período. O sistema foi mantido sob agitação e aquecimento para redução do volume de solvente para 30 mL. A solução resultante foi deixada em repouso para recristalizar. Os pós obtidos através da evaporação lenta do solvente foram lavados com éter etílico gelado e água gelada e posteriormente secos. Os rendimentos das reações foram de 57% para o complexo 1d (793,04 mg, 1220,07 g mol⁻¹), 65% para o complexo 2d (573,7 mg, 1006,50 g mol⁻¹), 59% para o complexo 1 (519,4 mg, 880,29 g mol⁻¹) e 78% para o complexo 2 (771,4 mg, 988,92 g mol⁻¹).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES

Os precursores cmff, bpma, bpmamff, Hpy₃ e os ligantes H₂py₃mff e H₂LdiaminOH foram sintetizados (Figura 29) com rendimentos de moderados a bons e caracterizados pelas técnicas de espectroscopia no infravermelho e ¹H NMR. Os ligantes finais ainda foram analisados através da técnica de espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS). Com o auxílio desses recursos analíticos, foi possível observar que tanto os intermediários quanto ligantes finais foram sintetizados com adequado grau de pureza e seus espectros estão condizentes com aqueles obtidos em trabalhos anteriores.^{34,38,40,99,100}

Figura 29 – Rota sintética para obtenção dos ligantes utilizados neste trabalho.



Conforme observado na Figura 29, a rota para obtenção dos ligantes baseia-se em uma sequência de reações de aminação redutiva e de substituição nucleofílica com o cloro do cmff como grupo de saída. Desse modo, a técnica de infravermelho foi adequada para uma avaliação preliminar do sucesso da reação pois no caso das aminações redutivas, observa-se o desaparecimento da banda de estiramento da ligação C=O em relação ao aldeído precursor. Além disso, nas reações de substituição nucleofílica, há o desaparecimento da banda da ligação C-Cl em relação ao cmff e o aparecimento da banda da ligação C=O em relação à amina precursora devido à incorporação de um grupo aldeído na molécula (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – Principais bandas e atribuições dos espectros de IR dos precursores dos ligantes H₂py₃mff e H₂LdiaminOH. Atribuições realizadas de acordo com Silverstein e Webster.⁹⁹

Atribuições	cmff	bpma	bpmamff	Hpy ₃
v (N-H)	-	3310	-	3213
v (C-H _{ar} e C-H _{alif})	3180- 2749	3057- 2828	3040- 2834	3013- 2818
v (C=O)	1659	-	1677	-
v (C=N e C=C)	1600- 1470	1590- 1432	1590- 1435	1591- 1433
v (C-N)	-	1148	1150	1148
δ (C-H _{ar})	702	749	765	746
v (C-Cl)	613	-	-	-

Tabela 3 – Principais bandas e atribuições dos espectros de IR dos ligantes H₂py₃mff e H₂LdiaminOH. Atribuições realizadas de acordo com Silverstein e Webster.⁹⁹

Atribuições	H ₂ py ₃ mff	H ₂ LdiaminOH
v (N-H)	-	3274
v (C-H _{ar} e C-H _{alif})	3055-2830	3056-2818
v (C=O)	1677	-
v (C=N e C=C)	1592-1433	1592-1433
v (C-N)	1149	1149
δ (C-H _{ar})	748	751

A técnica de ¹H NMR foi utilizada para a confirmação de que os precursores foram sintetizados com sucesso, sendo que os ligantes finais ainda foram caracterizados por

espectrometria de massas. Através dos deslocamentos químicos observados para as respectivas moléculas e das integrações dos sinais dos hidrogênios (Tabelas 4 e 5), verifica-se que as sínteses foram bem-sucedidas e a quantidade de átomos de hidrogênio esperada para cada composto foi encontrada.¹⁰¹

Tabela 4 – Deslocamentos químicos e atribuições dos espectros de ¹H NMR dos precursores do H₂py₃mff e H₂LdiaminOH.

Atribuições	cmff	bpma	bpmamff	Hpy₃
NH	-	2,91 (1 H)	-	-
CH ₃	2,35 (3 H)	-	2,27 (3 H)	2,23 (3 H)
CH ₂	4,67 (2 H)	4,04 (4 H)	3,80 (2 H) 3,90 (4 H)	3,75-3,96 (10 H)
C-H _{ar}	7,34 (1 H) 7,46 (1 H)	7,21 (2 H) 7,42 (2 H) 7,70 (2 H) 8,62 (2 H)	7,15-7,21 (3 H) 7,41 (3 H) 7,65 (2 H) 8,57 (2 H)	6,89 (2 H) 7,11-7,17 (3 H) 7,34-7,40 (3 H) 7,56-7,67 (3 H) 8,55 (2 H)
C-H _{ald}	9,86 (1 H)	-	10,43 (1 H)	-
O-H	11,25 (1 H)	-	-	-

Tabela 5 – Deslocamentos químicos e atribuições dos espectros de ^1H NMR do $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ e $\text{H}_2\text{LdiaminOH}$.

Atribuições	$\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$	$\text{H}_2\text{LdiaminOH}$
CH_3	2,21-2,24 (6 H)	2,13 (6 H)
CH_2	3,75-3,87 (12 H)	2,43-2,84 (6 H) 3,47-3,59 (2 H) 3,60-3,89 (14 H)
C-H_{ar}	6,86 (1 H) 6,94 (1 H) 7,15-7,18 (4 H) 7,38-7,41 (4 H) 7,57-7,63 (3 H) 8,54-8,58 (3 H)	6,67-6,89 (4 H) 6,99-7,13 (3 H) 7,28-7,39 (3 H) 7,45-7,60 (3 H) 8,37-8,57 (3 H)
C-H_{ald}	10,32 (1 H)	-

O ligante $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$, sintetizado em diversos outros trabalhos por ser um ótimo substrato para a derivatização e obtenção de compostos com efeitos de segunda esfera de coordenação, foi obtido com êxito, conforme é possível observar no seu espectro de massas (Figuras 30 e 31). O pico base, em $m/z = 588,30$, corresponde ao ligante protonado: a espécie $[\text{H}_2\text{py}_3\text{mff} + \text{H}^+]$. O espectro possui pouca fragmentação e nenhum outro sinal relevante foi encontrado.

Figura 30 – Espectro de ESI-MS do H_2py_3mff em CH_3CN .

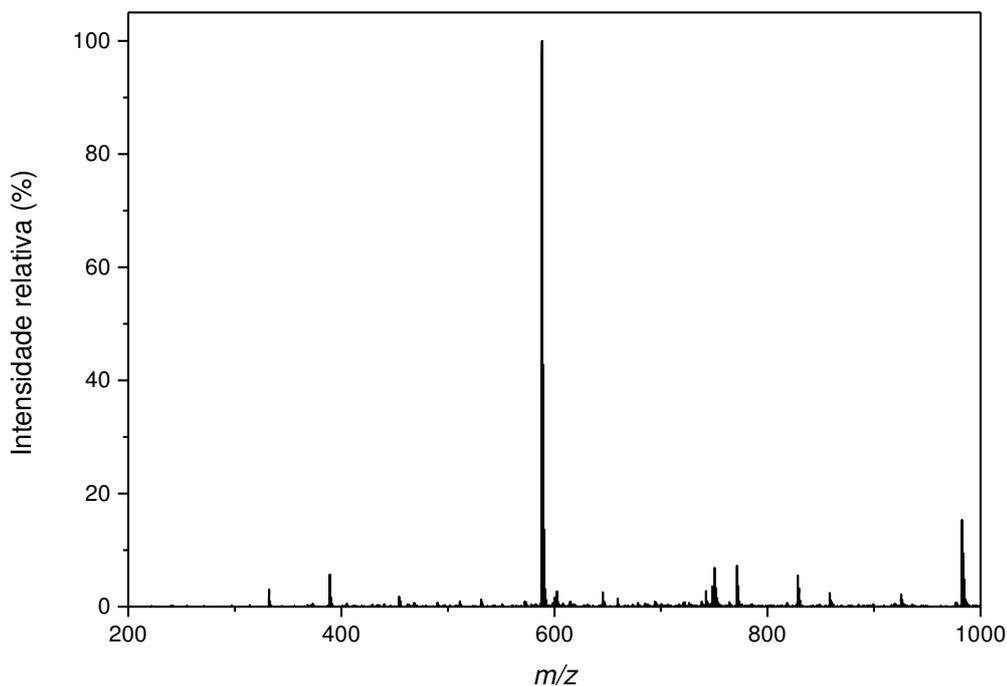
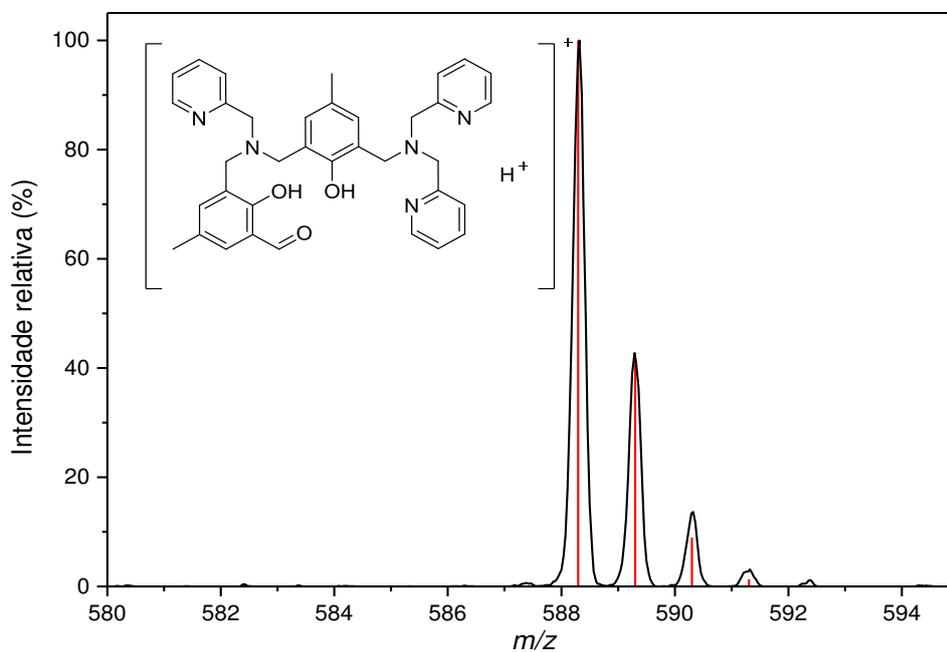


Figura 31 – Ampliação do conjunto de sinais com $m/z = 588,30$ do espectro de ESI-MS do H_2py_3mff . Em vermelho, a simulação da distribuição isotópica para a espécie proposta.



O ligante H_2L diaminOH foi obtido através de uma reação de aminação redutiva entre o H_2py_3mff e o aminoálcool 2-[(2-aminoetil)amino]etan-1-ol. Aparentemente, a imina formada durante a reação possui alta estabilidade devido ao papel desenvolvido pelas ligações de hidrogênio da molécula, visto que inicialmente uma tentativa de hidrogenação catalítica

com catalisador de Pd/C 5% foi mal sucedida. Alternativamente, a redução foi realizada com êxito utilizando o borohidreto de sódio como agente redutor. Mesmo assim, devido à alta estabilidade da imina, a reação teve que ser mantida por 12 horas para que a conversão fosse completa.

Por ser um ligante heptadentado e pela presença do fenol central, o H₂LdiaminOH possui um arranjo estrutural que favorece a formação de complexos binucleares. Uma característica relevante desse composto é que ele é não simétrico, possuindo uma região dura e uma região macia. Na região dura, estão disponíveis para coordenação ao centro metálico dois átomos de nitrogênio e um de oxigênio: um nitrogênio alifático de amina terciária, um nitrogênio piridínico e um oxigênio proveniente do fenol terminal. Já na região mole, estão disponíveis três átomos de nitrogênio para coordenação: um nitrogênio alifático de amina terciária e dois nitrogênios piridínicos. De acordo com a teoria de ácidos e bases duros e moles de Pearson,¹⁰² espera-se que na formação de um complexo heterobinuclear, com metais de valência mista (Ga^{III} e Cu^{II}, por exemplo), a região dura se coordene ao metal mais duro (Ga^{III}) e a região mole se coordene ao metal mais mole (Cu^{II}). Esta tendência é confirmada em análises de difratometria de raios X de monocristal de complexos heterobinucleares sintetizados com ligantes não simétricos semelhantes do H₂LdiaminOH.^{34,100} O sétimo átomo coordenante do ligante corresponde a um oxigênio do fenol central, que tem a função de atuar como uma ponte entre os dois metais e permitir um espaçamento adequado entre eles de modo a viabilizar a catálise. A cadeia lateral do H₂LdiaminOH ainda possui dois átomos de nitrogênio e um de oxigênio que poderiam atuar como átomos coordenantes. Porém, nos intervalos de pH em que os complexos geralmente trabalham, espera-se que os grupos NH das aminas secundárias estejam protonados e, dessa forma, não se coordenem aos centros metálicos.¹⁰³

O ligante H₂LdiaminOH foi obtido com êxito, conforme é possível observar no seu espectro de massas (Figuras 32 e 33). O pico base, em $m/z = 676,43$, corresponde ao ligante protonado: a espécie $[M+H^+]$. O espectro possui pouca fragmentação, apresentando somente mais um pico relevante, em $m/z = 698,43$, correspondente a espécie $[M+Na^+]$, onde o átomo de sódio pode ser proveniente da vidraria utilizada no processo de síntese, algo comumente observado em espectros de massa,¹⁰⁴ ou da purificação, já que foi realizada uma extração com solução saturada de bicarbonato de sódio.

Figura 32 – Espectro de ESI-MS do H₂LdiaminOH em CH₃CN.

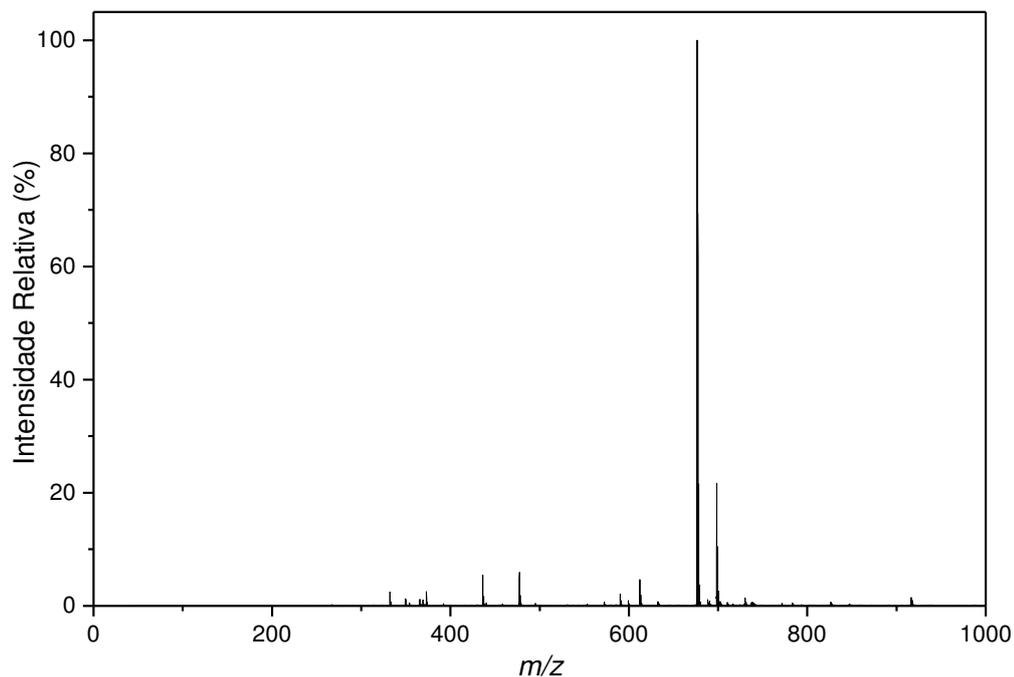
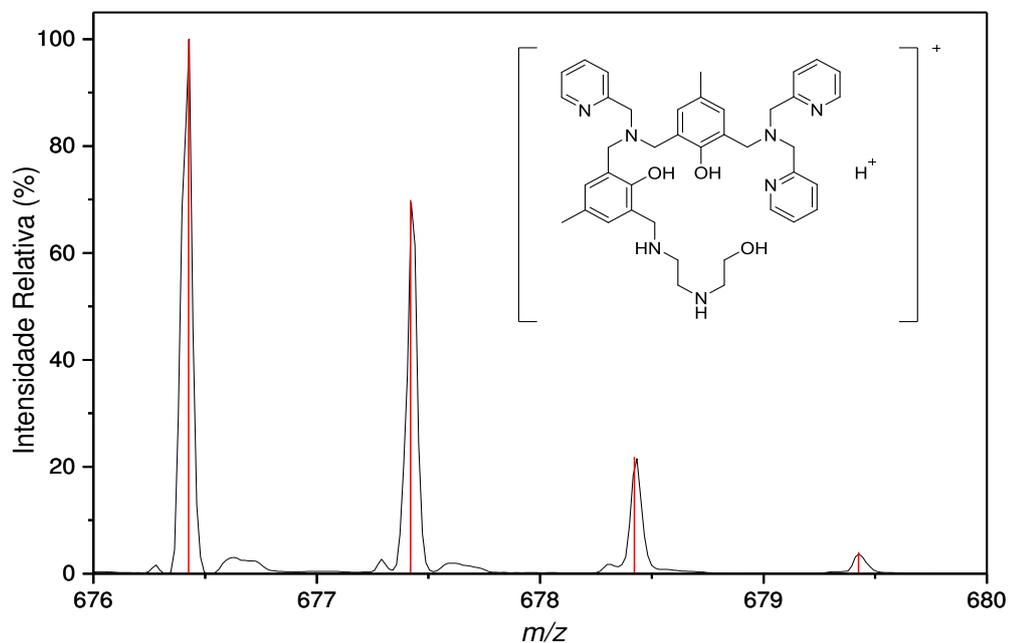


Figura 33 – Ampliação do conjunto de sinais com $m/z = 676,43$ do espectro de ESI-MS do H₂LdiaminOH. Em vermelho, a simulação da distribuição isotópica para a espécie proposta e sua estrutura.



5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

Os complexos GaZnH₂LdiaminOH (1d), GaCuH₂LdiaminOH (2d), GaZnH₂py₃mff (1) e GaCuH₂py₃mff (2) foram sintetizados através da adição de um equivalente de cada metal em uma solução metanólica dos respectivos ligantes. Os sais utilizados para o preparo dos complexos continham contra-íons não coordenantes como o NO₃⁻ e o ClO₄⁻. Ainda foi adicionado ao meio NaOH para desprotonar os fenóis presentes na estrutura do ligante e para a formação de uma ponte μ -hidroxo entre os metais. Ao contrário dos métodos desenvolvidos para síntese de complexos semelhantes, os compostos GaZnH₂LdiaminOH (1d) e GaCuH₂LdiaminOH (2d) demandaram um procedimento diferenciado de síntese, onde o metal trivalente foi adicionado lentamente por primeiro e somente após a formação do complexo mononuclear de Gálio, foi adicionado o metal bivalente para a obtenção com complexo heterobinuclear. Nas tentativas de síntese em que o M^{II} foi adicionado antes do Ga^{III} foi obtida uma mistura entre o composto heterobinuclear e o complexo homobinuclear do metal bivalente, verificado no espectro de massas. Desse modo, todas as sínteses foram realizadas com a adição de Ga^{III} seguida da adição do M^{II}. Os complexos foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia na região do infravermelho, análise elementar de CHN, espectroscopia na região do UV-Vis, espectrometria de massas e titulação espectrofotométrica.

5.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IR)

A espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada como uma técnica preliminar de caracterização para verificar o sucesso da síntese dos complexos. A principal alteração entre os espectros dos complexos e seus respectivos ligantes (Figuras 34, 35, 36 e 37) é o aparecimento de uma banda intensa, em cerca de 1081cm⁻¹, relativa ao estiramento da ligação Cl-O do contra-íon perclorato,¹⁰⁵ dando indícios de que ocorreu a formação dos compostos visados. Também é possível observar nos complexos o aparecimento de uma larga banda em cerca de 3500 cm⁻¹ atribuída ao estiramento da ligação O-H proveniente da água ou metanol coordenados aos centros metálicos. Nos complexos 1d e 2d, essas bandas são ainda mais largas quando comparadas aos complexos 1 e 2 e aparecem em cerca de 3550 cm⁻¹ devido ao grupo OH adicional do aminoálcool presente na cadeia lateral.

Figura 34 – Espectro de IR do complexo 1d e do seu respectivo ligante (ATR).

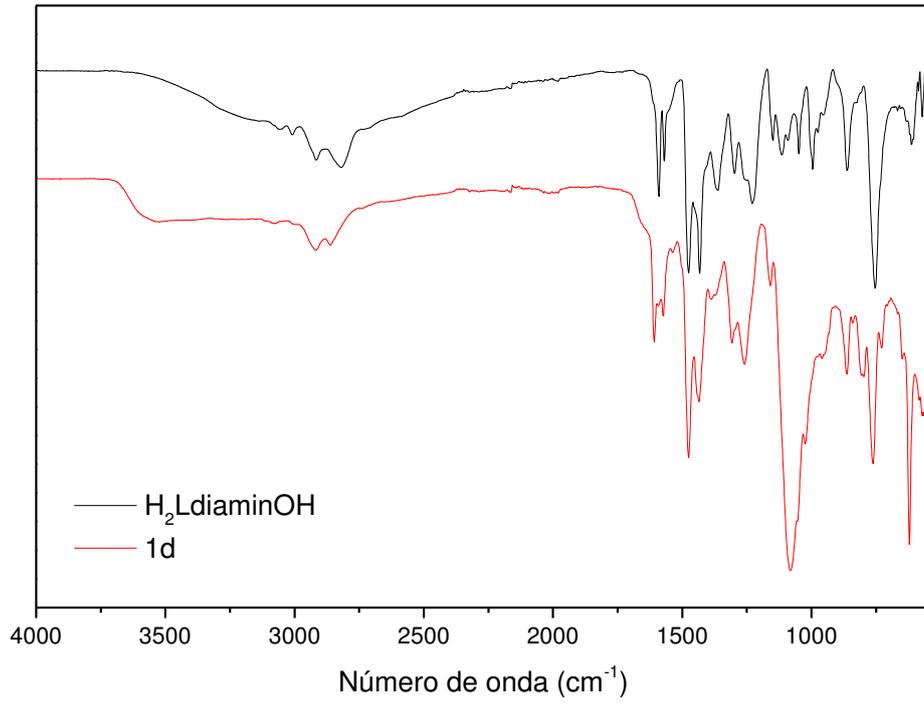


Figura 35 – Espectro de IR do complexo 2d e do seu respectivo ligante (ATR).

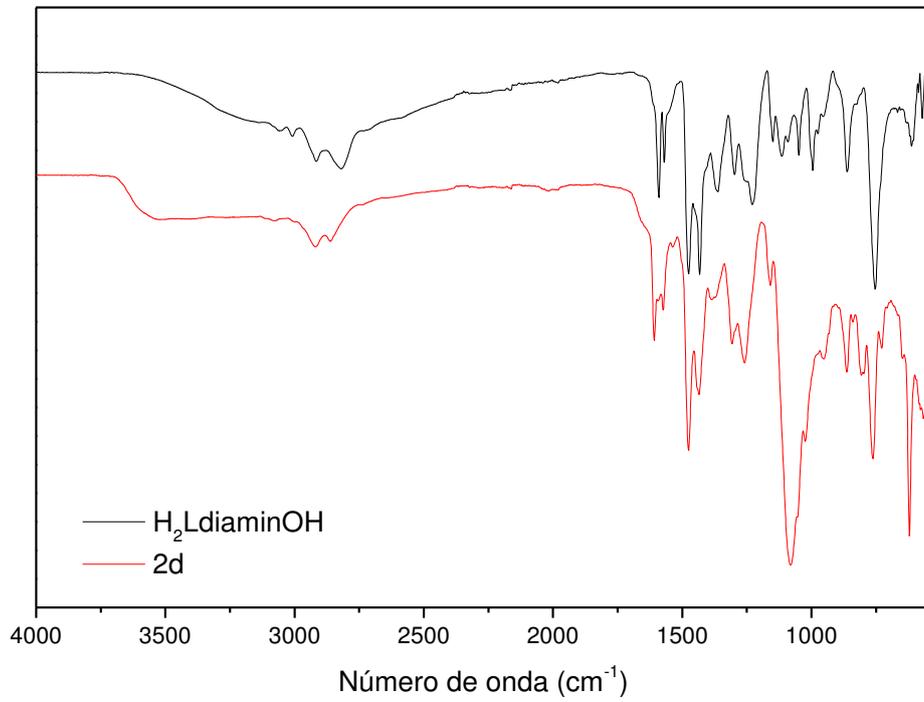


Figura 36 – Espectro de IR do complexo 1 e do seu respectivo ligante (ATR).

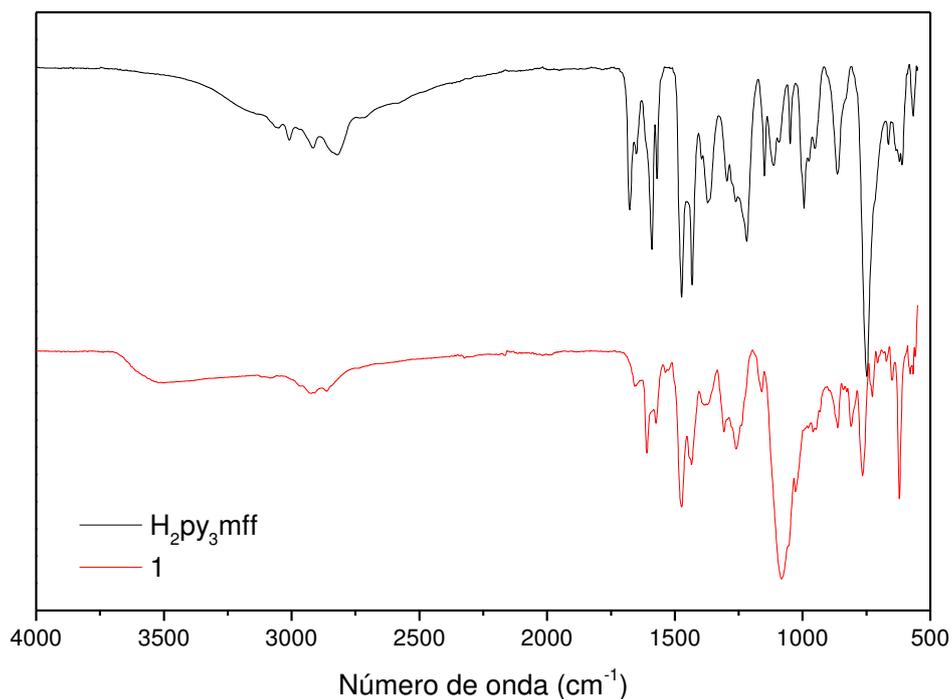
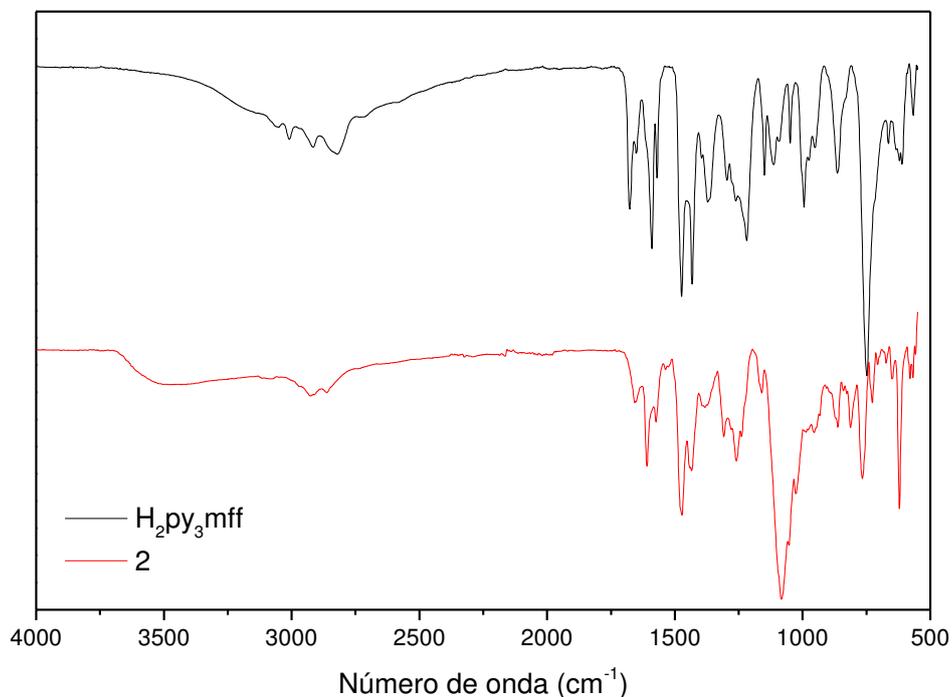


Figura 37 – Espectro de IR do complexo 2 e do seu respectivo ligante (ATR).



As Tabelas 6 e 7 mostram as principais bandas observadas nos espectros dos complexos sintetizados e seus respectivos ligantes precursores. Nota-se que há um deslocamento no número de onda de algumas bandas, destacando-se as vibrações referentes às

deformações angulares de C-H dos anéis piridínicos e dos anéis fenólicos. Esse tipo de alteração corrobora com o aparecimento das bandas de estiramento da ligação Cl-O no sentido de confirmar o êxito na obtenção dos complexos.

Comparando-se as principais bandas dos ligantes, nota-se que a principal diferença entre eles é a ausência da banda de estiramento da ligação C=O no H₂LdiaminOH, indicando que a derivatização do H₂py₃mff foi realizada com êxito. A ausência da mesma banda também é percebida ao comparar-se os complexos derivatizados (1d e 2d) com seus respectivos análogos (1 e 2). No caso dos complexos 1 e 2, ainda é observado uma redução na frequência de vibração característica de estiramento da ligação C=O do aldeído em relação ao H₂py₃mff. Isso ocorre devido à coordenação aos centros metálicos, já que há um deslocamento da densidade eletrônica para o fenolato, enfraquecendo a ligação C=O,¹⁰⁰ ou ainda devido à ligação de hidrogênio entre a molécula de água coordenada ao Ga^{III} e o oxigênio da carbonila, que contribui para o mesmo efeito.

Tabela 6 – Principais bandas e suas atribuições observadas nos espectros de IR (ATR) dos complexos 1d e 2d e do ligante H₂LdiaminOH.

Atribuição	H ₂ LdiaminOH (cm ⁻¹)	1d (cm ⁻¹)	2d (cm ⁻¹)
v O-H	-	3568	3553
v C-H _{ar} e C-H _{alif}	3056 - 2818	3079-2860	3080 - 2859
v C=C e C=N	1592 - 1433	1609 - 1435	1608 - 1433
δ O-H	1368	1387	1386
v C-N	1149	1159	1158
v Cl-O _{perclorato}	-	1081	1082
δ C-H _{ar}	751	762	759
δ C-H _{py}	612	621	618

Tabela 7 – Principais bandas e suas atribuições observadas nos espectros de IR (ATR) dos complexos 1 e 2 e do ligante H₂py₃mff.

Atribuição	H ₂ py ₃ mff (cm ⁻¹)	1 (cm ⁻¹)	2 (cm ⁻¹)
v O-H	-	3528	3494
v C-H _{ar} e C-H _{alif}	3055 - 2830	3080-2862	3081 - 2861
v C=O	1677	1658	1655
v C=C e C=N	1592 - 1433	1609 - 1434	1609 - 1435
δ O-H	1368	1382	1381
v C-N	1149	1161	1159
v Cl-O _{perclorato}	-	1082	1082
δ C-H _{ar}	748	765	765
δ C-H _{py}	621	621	620

5.2.2 Espectroscopia na região do UV-Vis

Os complexos 1d, 2d, 1 e 2 foram estudados pela técnica de espectroscopia na região do UV-Vis (Figuras 38, 39, 40 e 41) de 200 a 800 nm em soluções de CH₃CN e CH₃CN/H₂O (meio utilizado para as medidas cinéticas). Todos os complexos analisados apresentaram apenas bandas de transferência de carga intraligante.

Os complexos 1 e 2 apresentam uma banda a mais (351, $\epsilon = 5868 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o complexo 1; 365 nm, $\epsilon = 6237 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o complexo 2) em relação aos complexos 1d e 2d. Essa banda é referente a presença da carbonila e é mais um indicativo de que a derivatização do ligante H₂py₃mff para a formação do H₂LdiaminOH foi executada com êxito visto que, como esperado, os complexos 1d e 2d não apresentam tal sinal em seu espectro. Ainda é possível concluir que essa banda corresponde a uma transição do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ da ligação C=O por conter um valor de ϵ correspondente a uma transição permitida e pelo deslocamento batocrômico apresentado quando há um aumento da polaridade do meio.¹⁰⁶ Não é observada a banda referente a transição do tipo $n \rightarrow \pi^*$ da carbonila por esta ser proibida e apresentar um baixo valor de ϵ . Além disso, transições desse tipo exibem um comportamento hipsocrômico com o aumento da polaridade do meio.¹⁰⁶ Nos espectros dos complexos 1d e 2d, não foi observado deslocamento das bandas com a alteração do solvente.

Figura 38 – Espectros eletrônicos do complexo 1d em diferentes meios. $[C] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

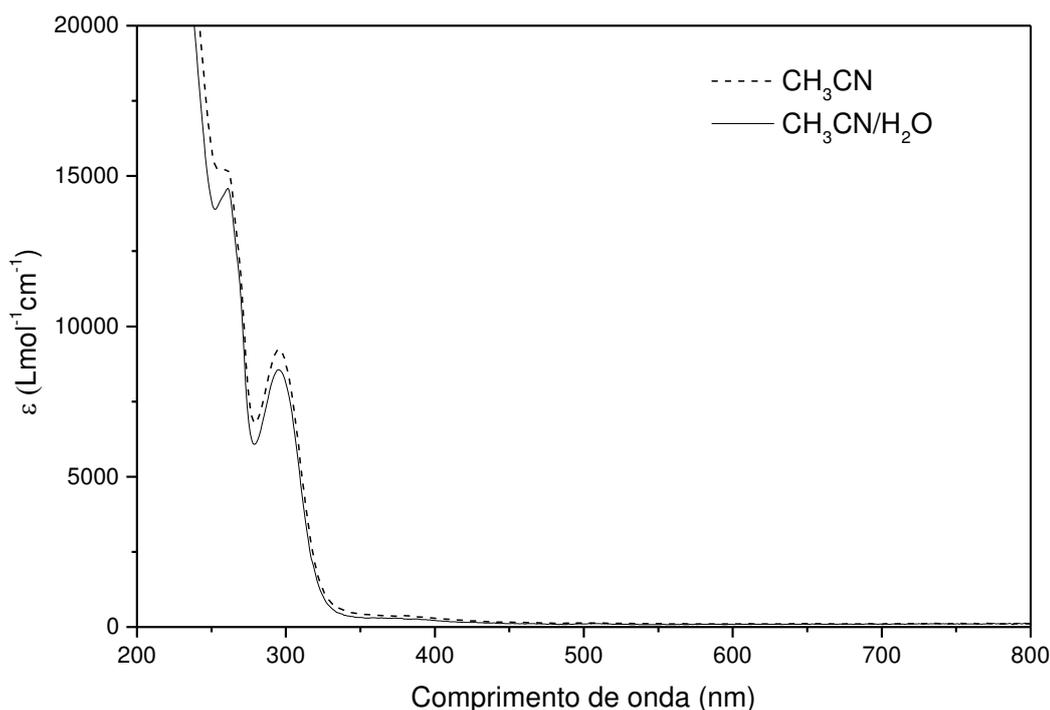


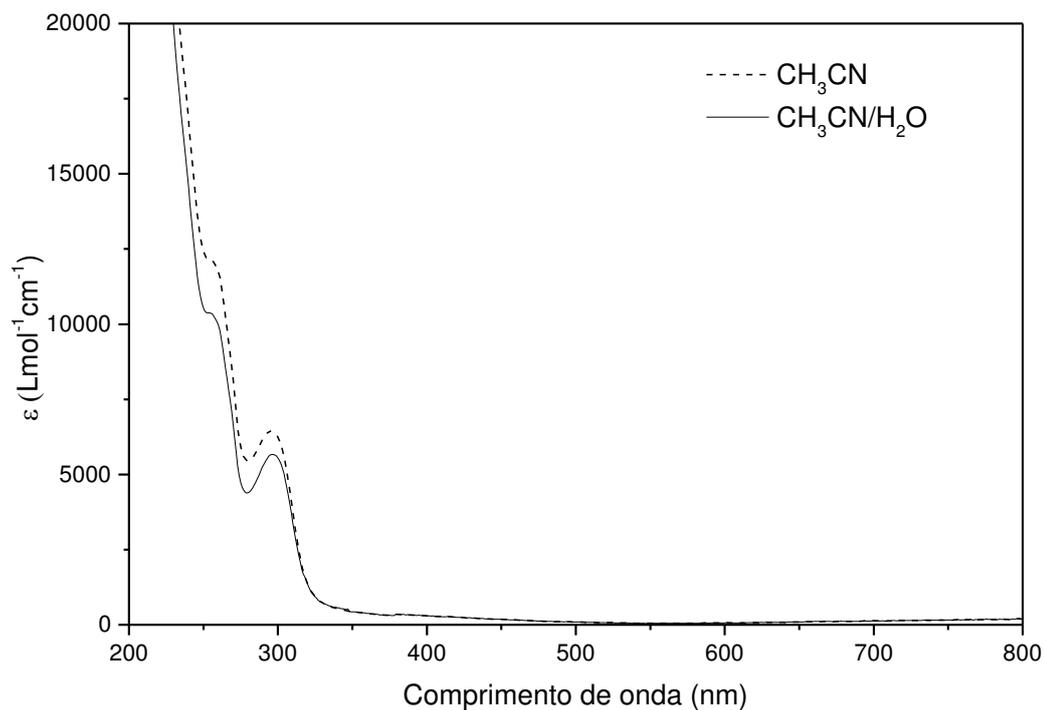
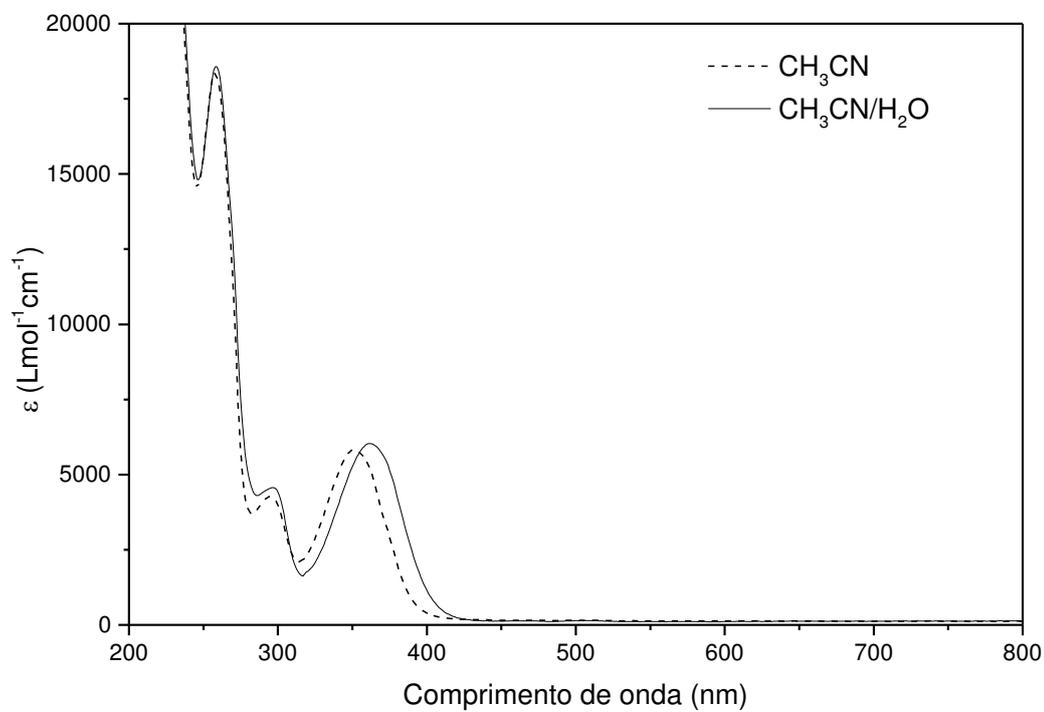
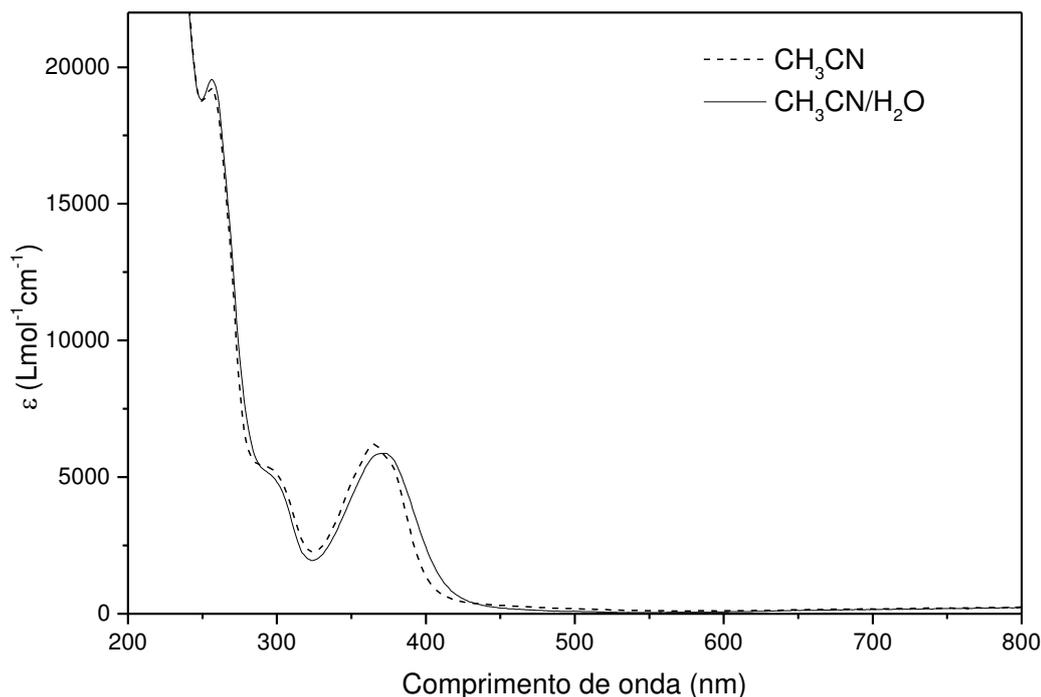
Figura 39 – Espectros eletrônicos do complexo 2d em diferentes meios. $[C] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.Figura 40 – Espectros eletrônicos do complexo 1 em diferentes meios. $[C] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 41 – Espectros eletrônicos do complexo 2 em diferentes meios. $[C] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.



5.2.3 Análise elementar de CHN

A partir dos resultados da análise elementar dos complexos 1d, 2d, 1 e 2 (Tabela 8), foram propostas estruturas para estes compostos (Figuras 42, 43, 44 e 45). Desse modo, os valores de porcentagem de C, H e N calculados para as estruturas propostas apresentaram boa concordância com os valores experimentais.

De um modo geral, os complexos apresentaram pelo menos duas moléculas de água em sua fórmula molecular, coordenadas ou não aos centros metálicos, com exceção do complexo 1d, que possui uma molécula do solvente da síntese (metanol) coordenada. O contra-íon comum em todos os compostos é o perclorato, sendo que nos complexos 1d e 1 há uma hidroxila coordenada ao Ga^{III} também presente. Através das estruturas propostas, nota-se que os grupos amina da cadeia lateral do composto 2d se encontram protonadas. Essa é uma característica esperada e, inclusive, considerada em propostas mecanísticas de modelos biomiméticos contendo aminas na segunda esfera de coordenação.^{38,100}

Tabela 8 – Análise elementar dos complexos estudados neste trabalho com as porcentagens (teórica/experimental) de C, H e N.

Complexo	Fórmula Molecular	% C	% H	% N
1d	C ₄₂ H ₅₇ ClGaN ₇ O ₁₁ Zn	49,82/50,26	5,59/5,29	9,78/9,31
2d	C ₄₀ H ₅₄ Cl ₃ CuGaN ₈ O ₂₁	39,30/39,24	4,45/4,29	9,17/9,66
1	C ₃₆ H ₄₁ ClGaN ₅ O ₁₁ Zn	48,57/48,29	4,64/4,49	7,87/7,52
2	C ₃₆ H ₄₂ Cl ₂ CuGaN ₅ O ₁₅	43,72/43,74	4,28/3,93	7,08/6,89

Figura 42 – Estrutura proposta para o complexo 1d de acordo com a análise elementar de CHN.

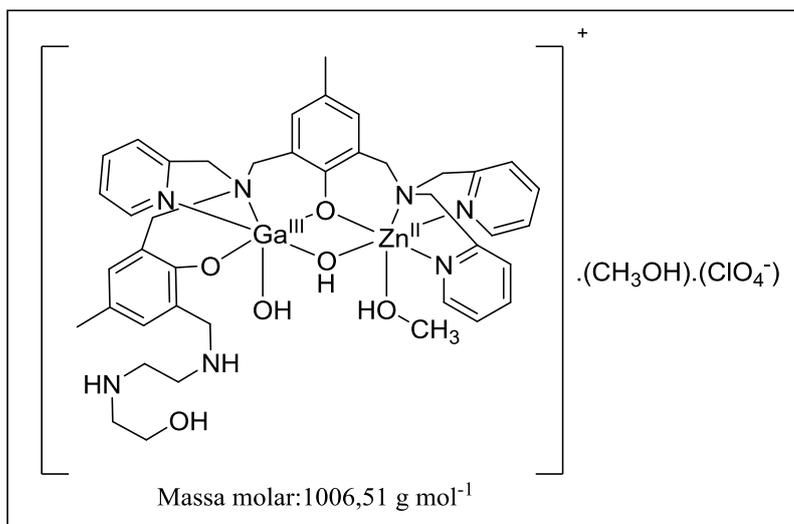


Figura 43 – Estrutura proposta para o complexo 2d de acordo com a análise elementar de CHN.

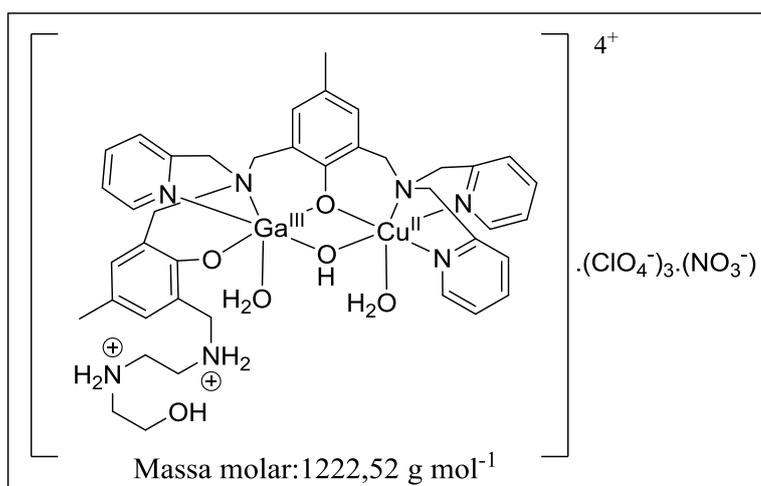


Figura 44 – Estrutura proposta para o complexo 1 de acordo com a análise elementar de CHN.

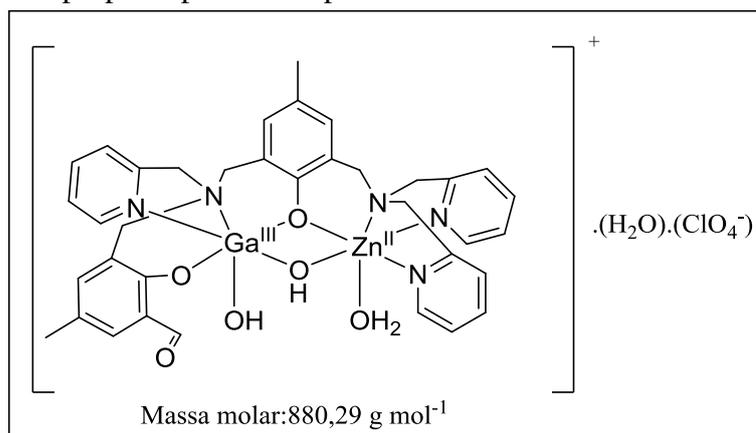
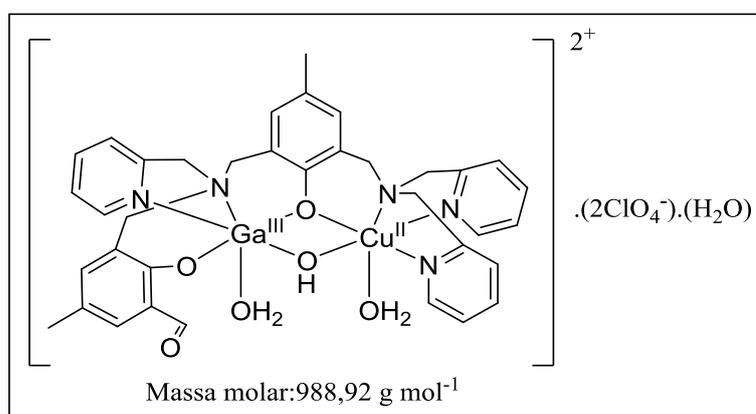


Figura 45 – Estrutura proposta para o complexo 2 de acordo com a análise elementar de CHN.



5.2.4 Espectrometria de massas

A técnica de espectrometria de massas, em conjunto com a análise elementar, foi fundamental para confirmar que os compostos foram obtidos com êxito. Os espectros de massa dos complexos sintetizados neste trabalho foram obtidos em uma solução de CH₃CN/H₂O (1:1, %v/v) contendo 0,1% v/v de ácido fórmico. Como os complexos 1d e 2d possuem uma cadeia lateral contendo grupos amina e álcool, tanto os espectros de massa em acetonitrila quanto os em acetonitrila/água destes apresentaram um elevado grau de fragmentação, impedindo uma maior elucidação estrutural desses compostos. Para contornar este problema, fez-se necessária a adição do ácido fórmico, que é comumente utilizado em espectrometria de massas como espécie doadora de prótons e facilitador da formação de íons positivos.¹⁰⁶ Assim, a quantidade de íons positivos formados sem que haja fragmentação eleva-se, possibilitando maior elucidação estrutural. Desse modo, foram obtidos espectros

com diversos fragmentos importantes contendo a estrutura do ligante preservada. Entretanto, os espectros apresentam nos seus picos base, ou em alguns fragmentos importantes, moléculas de ácido fórmico na forma molecular ou ionizada.

O espectro do complexo 1d (Figura 46) apresenta como pico base um fragmento com $m/z = 403,61$ (Figura 47). A estrutura proposta para esse fragmento corresponde ao complexo sem ponte e com o OH do aminoálcool desprotonado: $[\text{GaZn}(\text{H}_2\text{LdiaminOH}) - \text{H}]^{2+}$ (Figura 54). Fragmentos do tipo $[\text{M} - \text{H}]^+$ são comumente encontrados em álcoois, portanto o pico base observado corrobora com a estrutura proposta na análise elementar de CHN comprovando a formação do complexo visado. O espectro da Figura 46 ainda apresenta alguns fragmentos importantes como aquele em $m/z = 449,61$, correspondente à espécie $[\text{GaZn}(\text{H}_2\text{LdiaminOH})(\text{HCOO}^-)(\text{HCOOH})]^{2+}$, e outro em $m/z = 476,64$ cuja espécie proposta é $[\text{Ga}(\mu\text{-OH})\text{Zn}(\text{H}_2\text{LdiaminOH})(\text{HCOOH})(\text{CH}_3\text{CN})_2]^{2+}$.

Figura 46 – Espectro de ESI-MS do complexo 1d em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, %v/v) contendo 0,1% v/v de ácido fórmico.

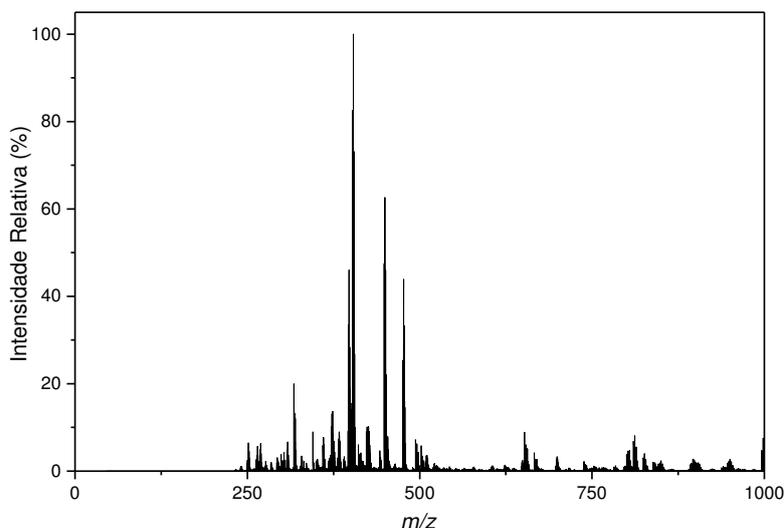
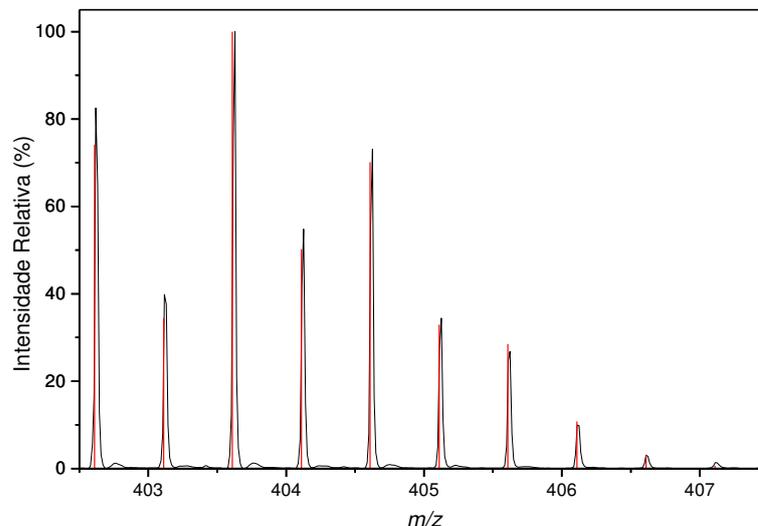


Figura 47 – Ampliação do pico base do espectro de ESI-MS do complexo 1d, com simulação da distribuição isotópica em vermelho.



O pico base observado no espectro do complexo 2d (Figuras 48 e 49) é correspondente à espécie $[\text{GaCu}(\text{H}_2\text{LdiaminOH})(\text{HCOOH})(\text{HCOO}^-)]^{2+}$ (Figura 54), mostrando a estrutura do ligante íntegra, os dois metais esperados e mais duas moléculas de ácido fórmico (uma delas ionizada). O segundo maior pico, em $m/z = 476,13$, correspondente à espécie $[\text{Ga}(\mu\text{-OH})\text{Cu}(\text{H}_2\text{LdiaminOH})(\text{HCOOH})_2(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$, mais uma vez demonstra a estrutura do ligante íntegra. Além disso, há a ponte $\mu\text{-OH}$, duas moléculas de ácido fórmico e 3 moléculas de água. Outros fragmentos importantes em $m/z = 403,11$ e $m/z = 269,13$ correspondem às espécies $[\text{GaCu}(\text{H}_2\text{LdiaminOH}) - \text{H}]^{2+}$ e $[\text{GaCu}(\text{H}_2\text{LdiaminOH})]^{3+}$, respectivamente.

Figura 48 – Espectro de ESI-MS do complexo 2d em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, %v/v) contendo 0,1% v/v de ácido fórmico.

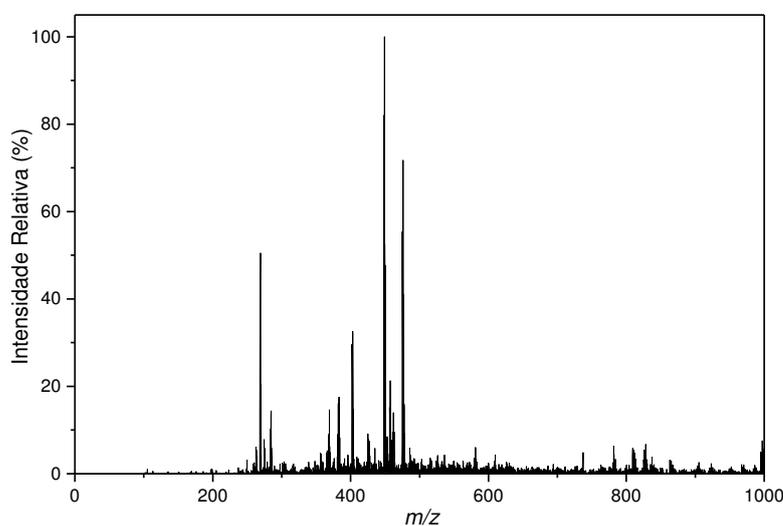
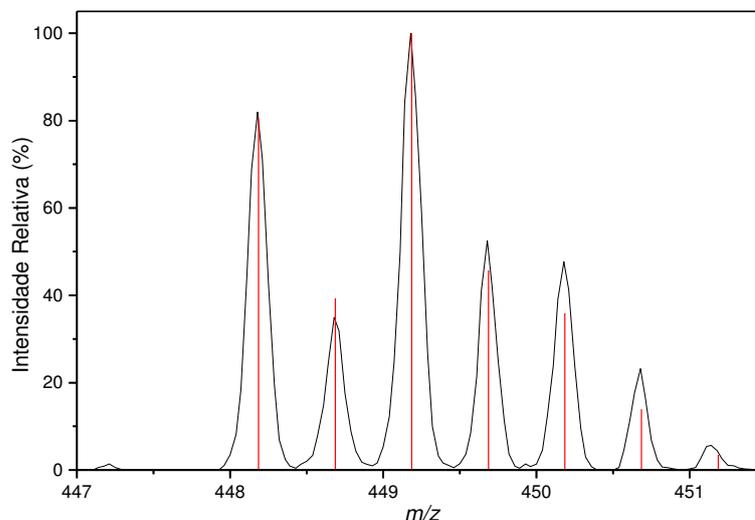


Figura 49 – Ampliação do pico base do espectro de ESI-MS do complexo 2d, com simulação da distribuição isotópica em vermelho.



O complexo 1 apresentou em seu espectro de ESI-MS (Figura 50) um pico base com $m/z = 368,56$ (Figura 51). Esse sinal corresponde à espécie $[\text{Ga}(\mu\text{-OH})\text{Zn}(\text{H}_2\text{py}_3\text{mff})]^{2+}$ (Figura 54), que possui o ligante preservado e uma ponte $\mu\text{-OH}$, exatamente o esperado pela metodologia de síntese empregada e pela proposta da análise elementar. É possível observar ainda no espectro mais três sinais com alta intensidade relativa. O primeiro, com $m/z = 650,21$, corresponde a uma espécie mononuclear de zinco do complexo $[\text{ZnH}_2\text{py}_3\text{mff}]^+$, que pode ter sido formada através do próprio processo de ionização no espectrômetro de massas. Vale ressaltar que complexos semelhantes de GaZn também já apresentaram sinais referentes a espécies mononucleares em trabalhos anteriores.⁷⁷ O segundo pico, com $m/z = 736,12$, corresponde a espécie $[\text{Ga}(\mu\text{-Oxo})\text{Zn}(\text{H}_2\text{py}_3\text{mff})]^+$. Pontes do tipo $\mu\text{-oxo}$ não são comumente encontradas em complexos biomiméticos de GaZn e, provavelmente, essa espécie também deve ter sido formada durante o processo de ionização. O terceiro fragmento, com $m/z = 754,13$, corresponde a espécie $[(\text{OH})\text{Ga}(\mu\text{-OH})\text{Zn}(\text{H}_2\text{py}_3\text{mff})]^+$ que novamente apresenta uma ponte $\mu\text{-OH}$, esperada de acordo com o processo de síntese.

Figura 50 – Espectro de ESI-MS do complexo 1 em CH₃CN/H₂O (1:1, %v/v) contendo 0,1% v/v de ácido fórmico.

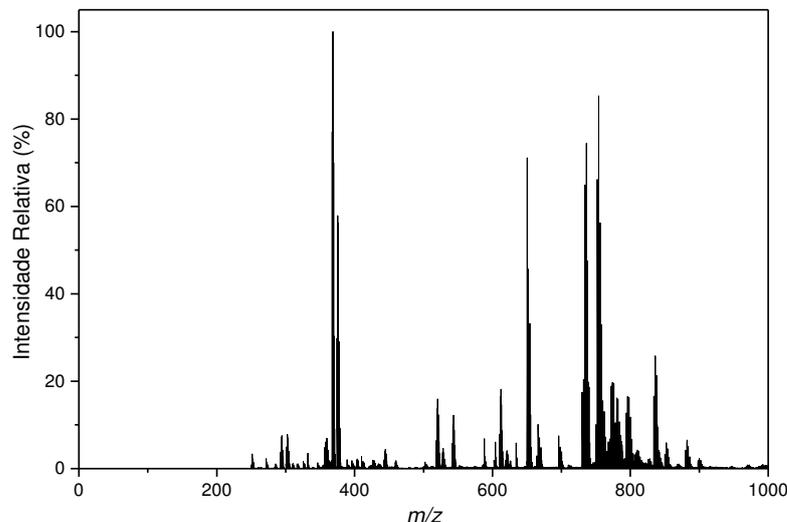
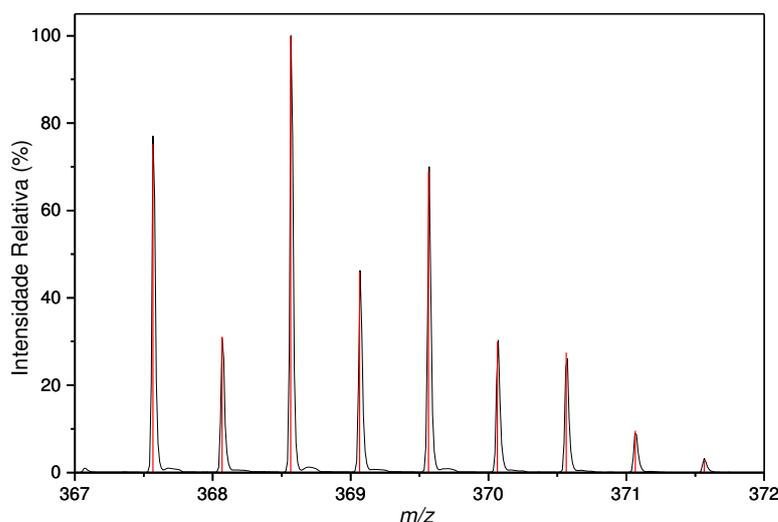


Figura 51 – Ampliação do pico base do espectro de ESI-MS do complexo 1, com simulação da distribuição isotópica em vermelho.



O espectro de ESI-MS do complexo 2 (Figura 52) apresentou um pico base com $m/z = 382,06$ (Figura 53), o que corresponde à espécie $[\text{GaCu}(\text{H}_2\text{py}_3\text{mff})(\text{HCOO}^-)]^{2+}$ (Figura 54), ou seja, o complexo esperado porém sem a ponte $\mu\text{-OH}$ e com uma molécula de formiato associada. Outro fragmento importante aparece em $m/z = 368,06$, correspondendo a espécie esperada de $[\text{Ga}(\mu\text{-OH})\text{Cu}(\text{H}_2\text{py}_3\text{mff})]^{2+}$. Ainda há mais uma espécie $[\text{Ga}(\mu\text{-OH})\text{Cu}(\text{H}_2\text{py}_3\text{mff})(\text{HCOO}^-)]^+$ contendo a ponte hidroxilo, em $m/z = 781,13$. Por último, há um sinal com $m/z = 809,12$ cuja espécie proposta é $[\text{GaCu}(\text{H}_2\text{py}_3\text{mff})(\text{HCOO}^-)_2]^+$.

Figura 52 – Espectro de ESI-MS do complexo 2 em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, %v/v) contendo 0,1% v/v de ácido fórmico.

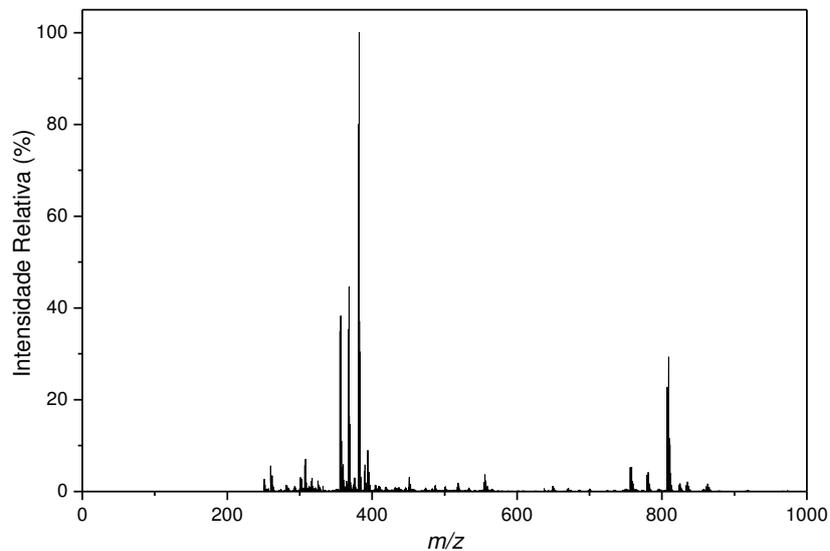


Figura 53 – Ampliação do pico base do espectro de ESI-MS do complexo 2, com simulação da distribuição isotópica em vermelho.

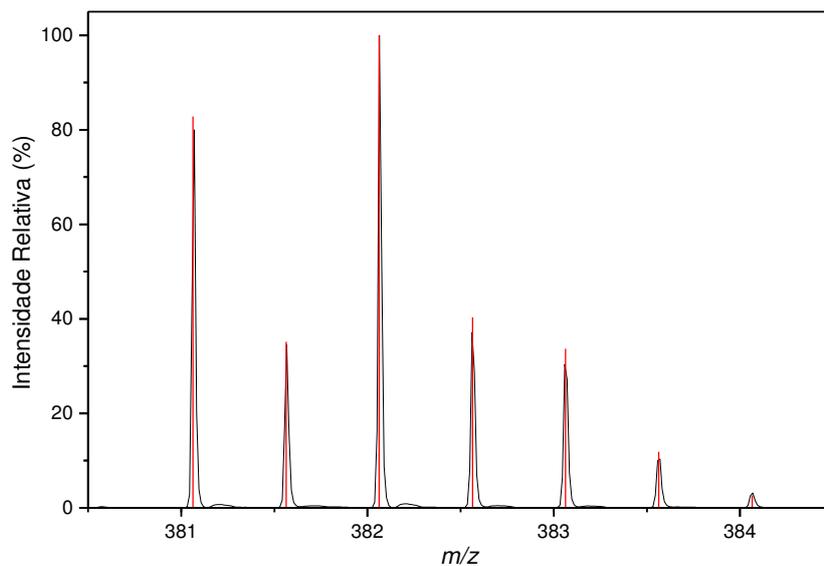
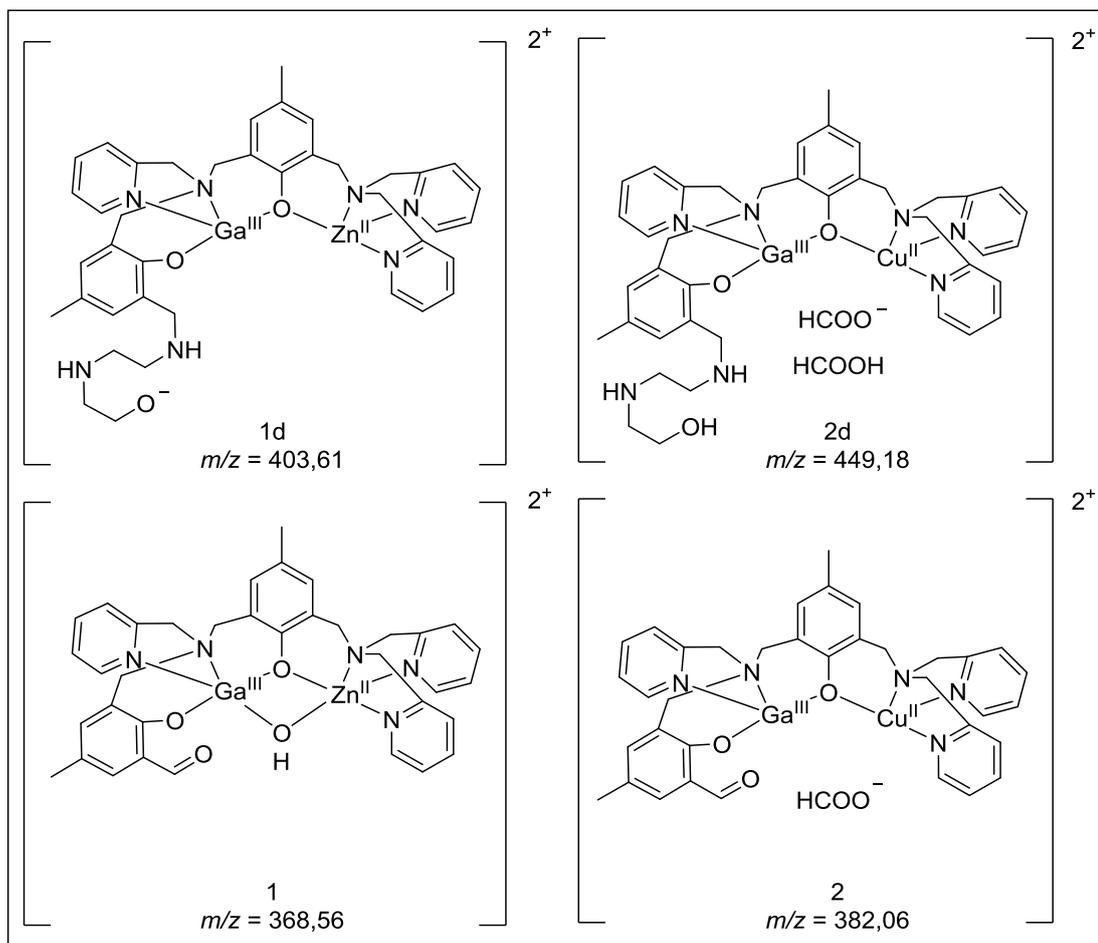


Figura 54 – Estruturas propostas para os picos base dos complexos 1d, 2d, 1 e 2 observados nos seus respectivos espectros de ESI-MS.



5.2.5 Titulação espectrofotométrica

As titulações espectrofotométricas dos complexos 1d, 2d, 1 e 2 (Figuras 55-62) foram realizadas em meio de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, %v/v) com o objetivo de se determinar as constantes de equilíbrio ácido-base dos compostos (pKas) e propor quais são as espécies presentes em função do pH. Visto que a alteração do pH do meio pode desprotonar as moléculas de água coordenadas aos centros metálicos, alterando a reatividade dos complexos, as titulações espectrofotométricas possuem um importante papel ao relacionar os valores de pKa obtidos com a atividade catalítica observada em função do pH. Como todos os complexos estudados apresentaram apenas bandas intraligante, a variação da absorbância das soluções durante a titulação não foi tão pronunciada quanto as titulações observadas para complexos semelhantes onde o metal trivalente é o átomo de Fe^{III} .³⁸

Os complexos apresentaram dois valores de pKa (Tabela 9), que se correlacionam fortemente com os valores de pKa encontrados nos ensaios de atividade catalítica em função

do pH (seção 5.3.1). Desse modo, baseado no comportamento cinético dos complexos e nos mecanismos propostos para atuação de fosfatases^{63,64}, o primeiro pKa provavelmente deve estar relacionado com a desprotonação da molécula de água coordenada ao gálio. Da mesma forma, o segundo pKa provavelmente é referente à desprotonação da molécula de água coordenada ao metal divalente. Os valores de pKa do complexo 2 estão perfeitamente de acordo com os valores encontrados para este em trabalho desenvolvido anteriormente.⁹⁸ A Figura 63 apresenta as propostas para os equilíbrios ácido-base observados para os compostos estudados.

Tabela 9 – Valores de pKa encontrados na titulação espectrofotométrica dos complexos 1d, 2d, 1 e 2.

Complexo	pK_{a1}	pK_{a2}
1d	4,72±0,04	7,39±0,04
2d	4,39±0,06	7,68±0,05
1	4,17±0,04	7,41±0,03
2	3,88±0,06	7,50±0,06

Observa-se uma tendência de aumento do primeiro pKa em cerca de 0,5 unidade ao se comparar os complexos derivatizados 1d e 2d com seus pares que não possuem uma cadeia lateral capaz de promover efeitos de segunda esfera de coordenação. Aparentemente, as interações através de ligações de hidrogênio dos grupos amina e álcool dos compostos 1d e 2d estabiliza a molécula de água coordenada ao gálio, tornando mais difícil a abstração de um próton. Nota-se que o segundo pKa praticamente não se altera entre os complexos, indicando que os compostos 1d e 2d exercem maior efeito na molécula de água coordenada ao gálio. Isso é um fenômeno plausível pois a derivatização foi realizada no lado duro do ligante, o que provavelmente causaria maior influência no ambiente ao redor do metal trivalente.

Figura 55 – Titulação espectrofotométrica do complexo 1d na faixa de pH de 2,9 a 6,3, em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, % v/v), e ajuste de dados para obtenção do primeiro pKa. $[\text{C}] = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

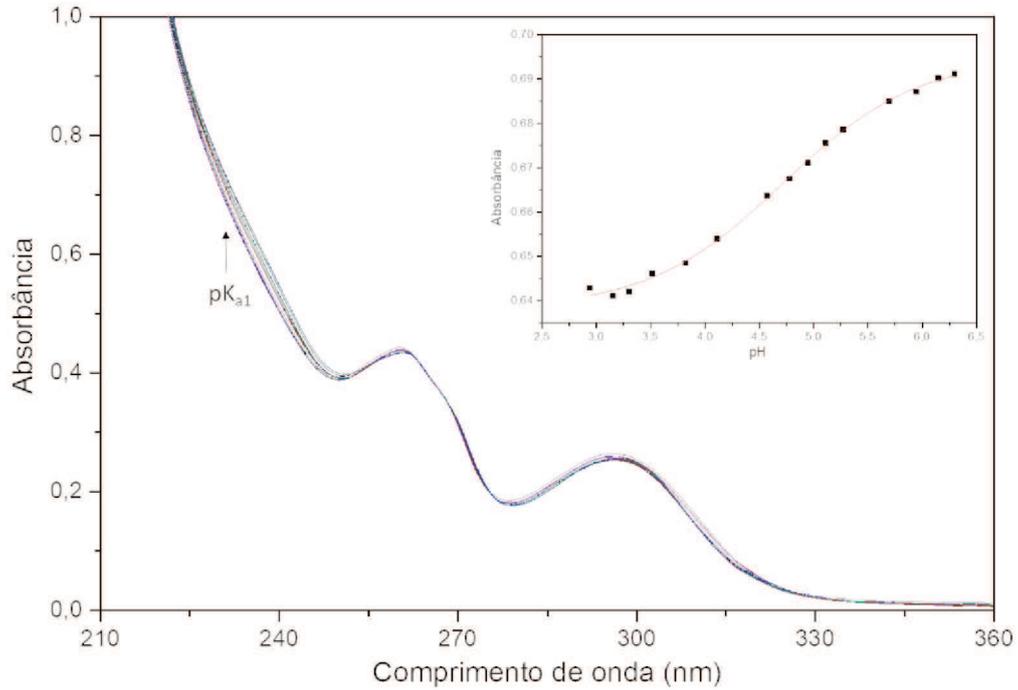


Figura 56 – Titulação espectrofotométrica do complexo 1d na faixa de pH de 5,1 a 8,8, em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, % v/v), e ajuste de dados para obtenção do segundo pKa. $[\text{C}] = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

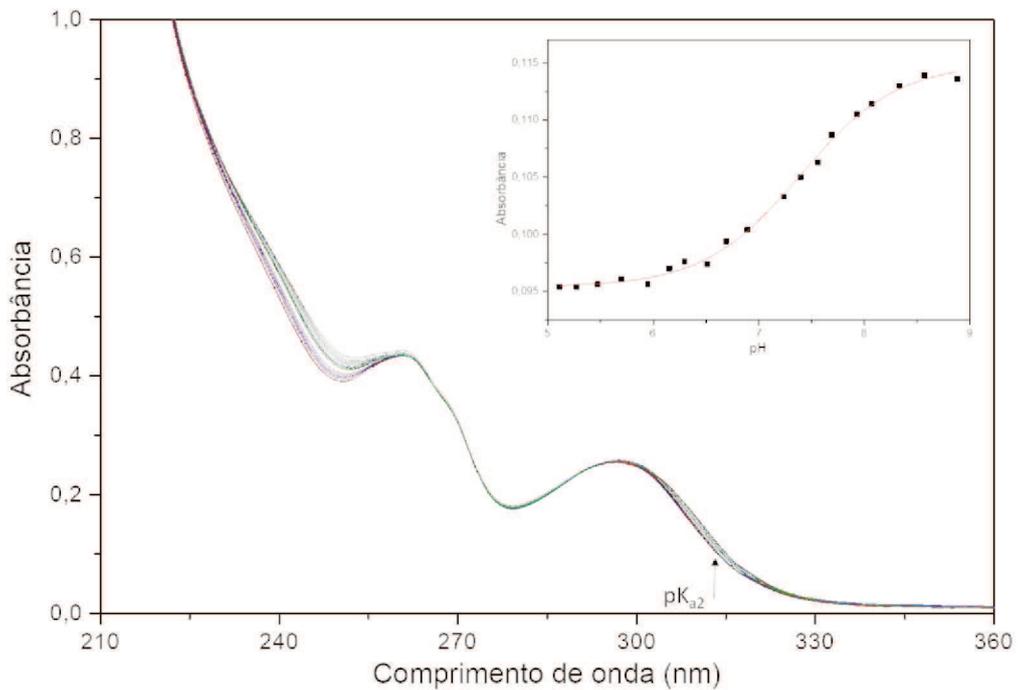


Figura 57 – Titulação espectrofotométrica do complexo 2d na faixa de pH de 3,9 a 4,8, em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, % v/v), e ajuste de dados para obtenção do primeiro pKa. $[\text{C}] = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

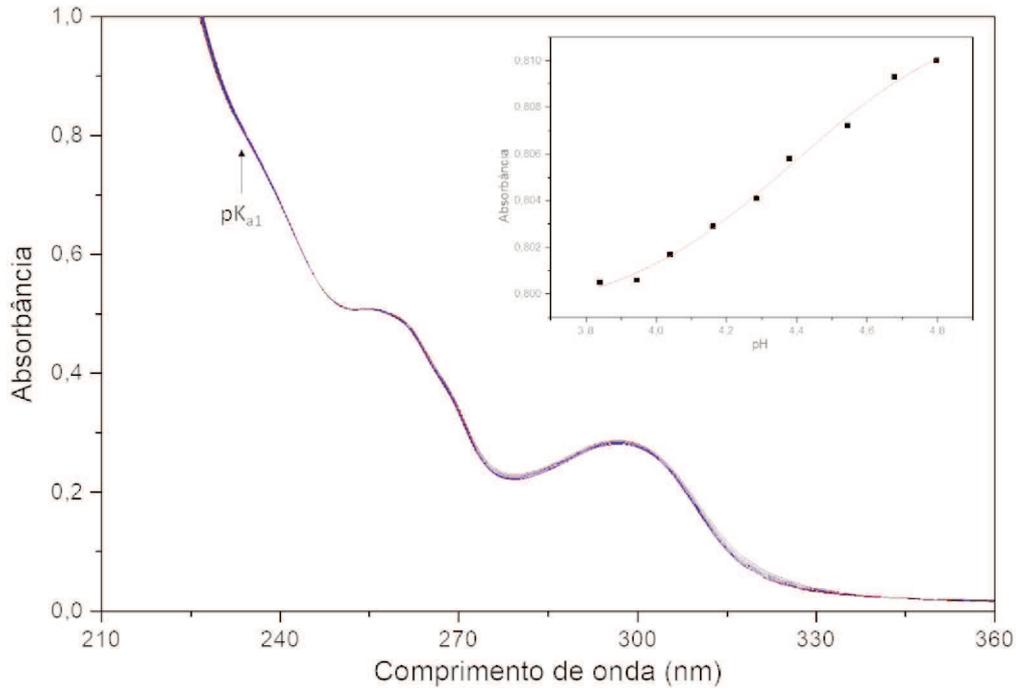


Figura 58 – Titulação espectrofotométrica do complexo 2d na faixa de pH de 4,7 a 9,2, em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, % v/v), e ajuste de dados para obtenção do segundo pKa. $[\text{C}] = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

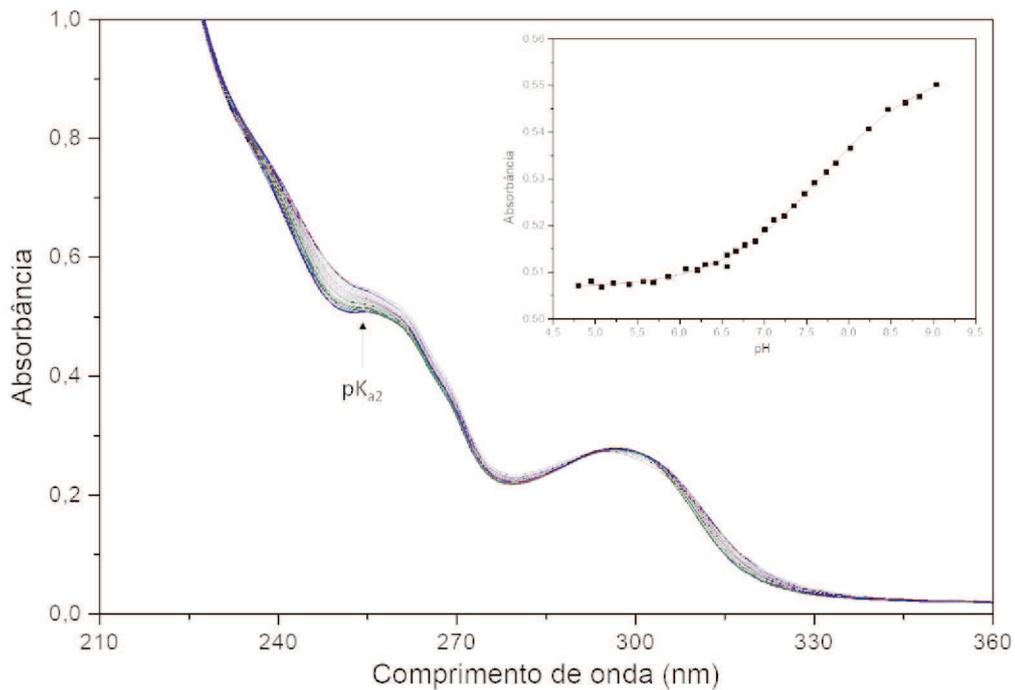


Figura 59 – Titulação espectrofotométrica do complexo 1 na faixa de pH de 3,3 a 5,0, em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, % v/v), e ajuste de dados para obtenção do primeiro pK_a . $[\text{C}] = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

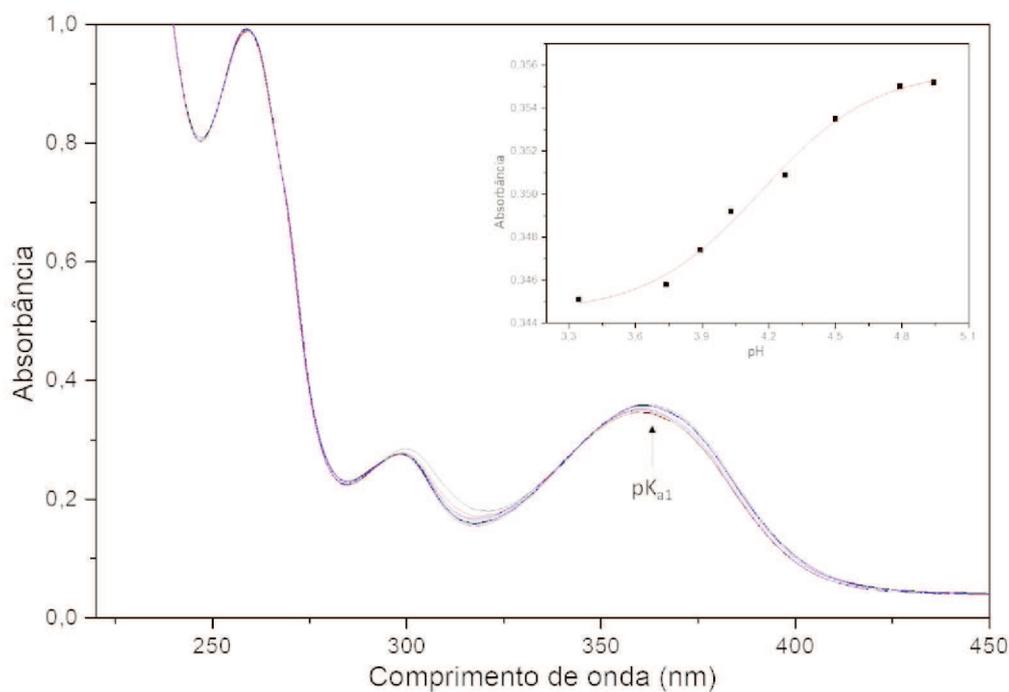


Figura 60 – Titulação espectrofotométrica do complexo 1 na faixa de pH de 3,0 a 10,4, em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, % v/v), e ajuste de dados para obtenção do segundo pK_a . $[\text{C}] = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

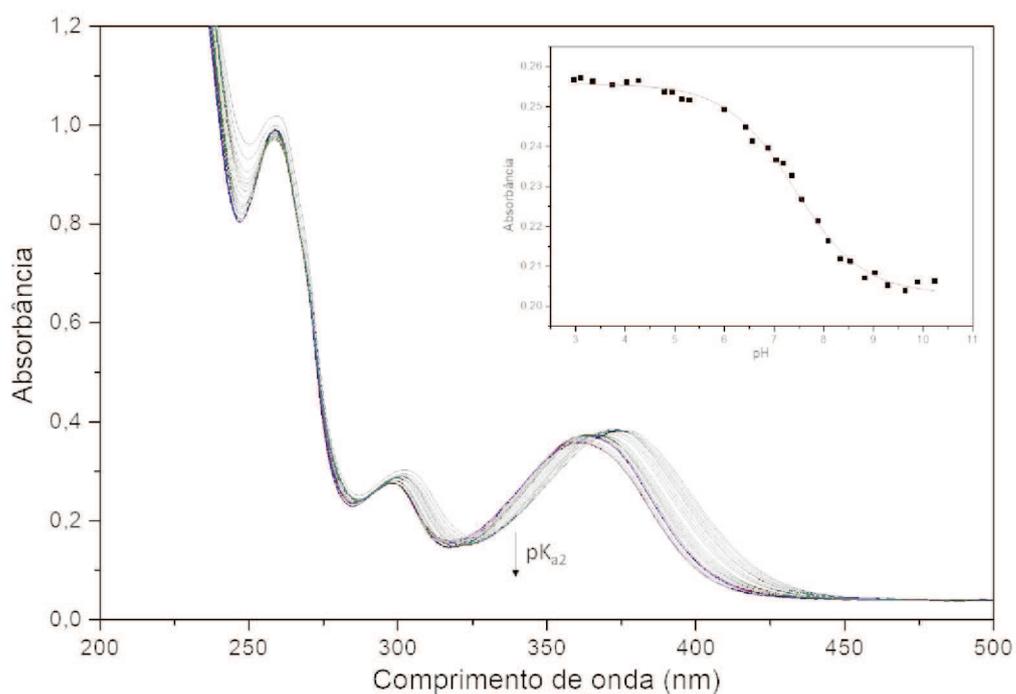


Figura 61 – Titulação espectrofotométrica do complexo 2 na faixa de pH de 3,1 a 4,1, em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, % v/v), e ajuste de dados para obtenção do primeiro pK_a . $[\text{C}] = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

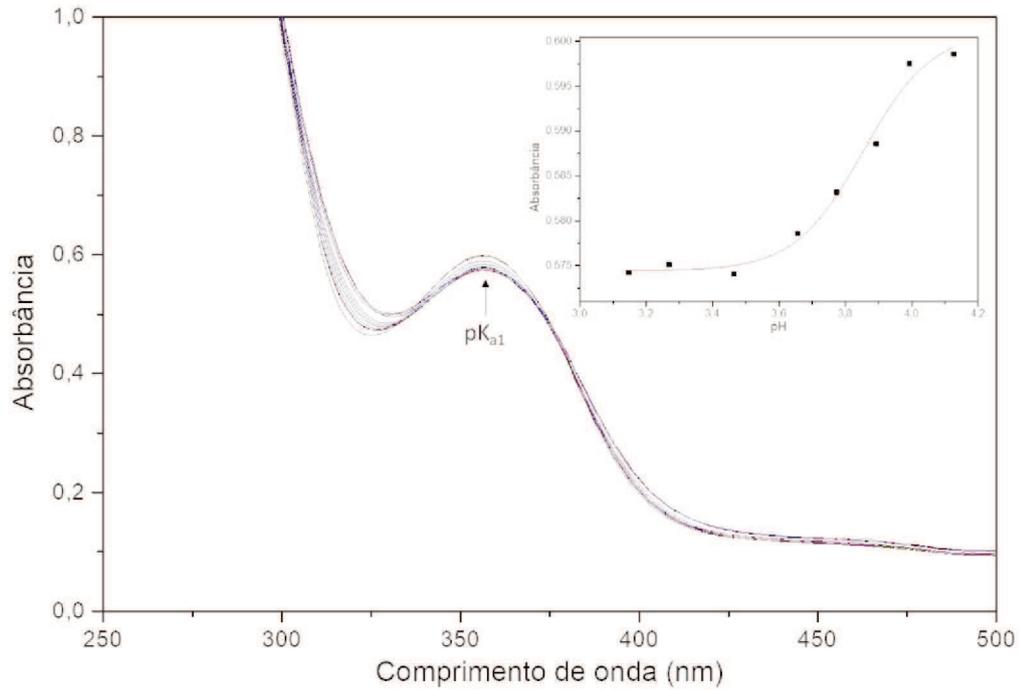


Figura 62 – Titulação espectrofotométrica do complexo 2 na faixa de pH de 5,3 a 9,2, em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, % v/v), e ajuste de dados para obtenção do segundo pK_a . $[\text{C}] = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

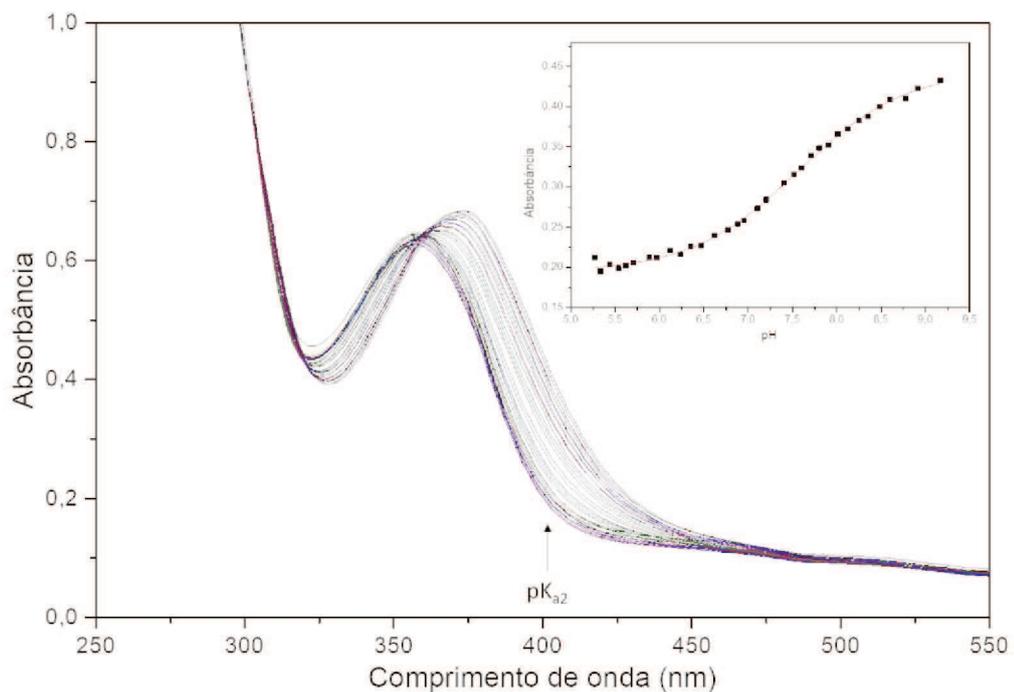
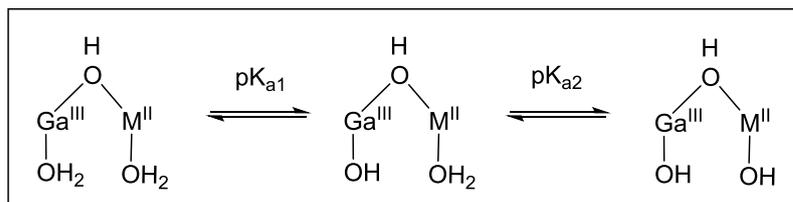


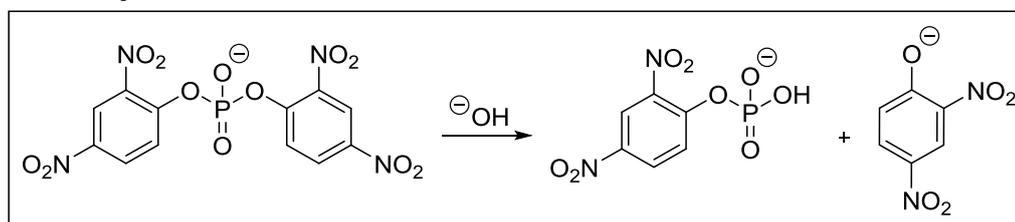
Figura 63 – Proposta das espécies em equilíbrio observadas em solução para os complexos 1d, 2d, 1 e 2.



5.3 ESTUDOS DE ATIVIDADE FOSFATASE

A estratégia empregada para o estudo da atividade catalítica dos complexos sintetizados foi utilizar o substrato modelo ativado 2,4-BDNPP, um fosfodiéster que mimetiza os grupos presentes nas estruturas do DNA e RNA. Esse substrato foi escolhido por apresentar como subproduto o 2,4-dinitrofenilfenolato (Figura 64), que possui uma banda de absorção característica em 400 nm, e por conter grupos nitro, o que facilita a reação de hidrólise visto que esses grupos ajudam a estabilizar a carga negativa do produto formado.

Figura 64 – Reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP.



Para a realização dos estudos cinéticos, foram sintetizados quatro complexos: o 1d e 2d, que possuem um ligante derivatizado do H_2py_3mff contendo uma cadeia lateral de aminoálcool, e os complexos 1 e 2, que são complexos formados através da complexação com o H_2py_3mff . O objetivo da síntese dos complexos 1 e 2 é de justamente poder avaliar com precisão os efeitos de segunda esfera de coordenação da cadeia de aminoálcool presente nos complexos 1d e 2d. Desse modo, o composto 1d é semelhante ao composto 1, contendo centros metálicos idênticos, apenas divergindo pela presença dos grupos funcionais amina e álcool. O mesmo ocorre entre os complexos 2d e 2. Ressalta-se que o composto 2 já foi preparado em trabalho anterior¹⁰⁰, porém seus dados cinéticos foram obtidos em condições diferentes das utilizadas nesta pesquisa, o que impediria uma comparação direta dos resultados deste com o complexo 2d.

5.3.1 Influência do pH na atividade fosfatase

Os estudos da influência do pH na atividade catalítica dos complexos foram realizados com o objetivo de verificar o pH de atividade máxima de cada composto e de se obter informações acerca das suas espécies ativas e, conseqüentemente, do mecanismo pelo qual ocorre a reação de hidrólise. Os perfis de atividade dos complexos em função do pH são apresentados nas Figuras 65, 66, 67 e 68, nas quais ainda há uma curva obtida através de um ajuste não-linear dos dados experimentais de acordo com um modelo para um sistema enzimático diprótico com duas espécies ativas (seção 4.2.7.3).

Figura 65 – Influência do pH na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP utilizando o complexo 1d como catalisador. Condições: CH₃CN/H₂O (1:1, %v/v); [Complexo] = 4×10^{-5} mol L⁻¹; [Substrato] = $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; [Tampão] = 5×10^{-2} mol L⁻¹; $I = 5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ LiClO₄; 25 °C.

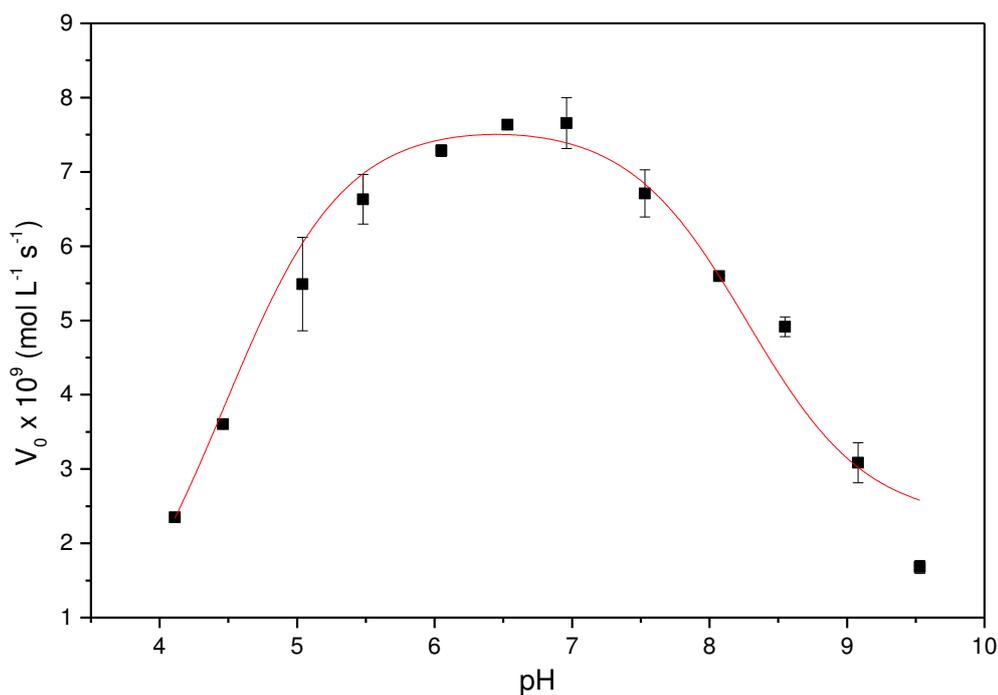


Figura 66 – Influência do pH na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP utilizando o complexo 2d como catalisador. Condições: CH₃CN/H₂O (1:1, %v/v); [Complexo] = 4×10^{-5} mol L⁻¹; [Substrato] = $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; [Tampão] = 5×10^{-2} mol L⁻¹; I = 5×10^{-2} mol L⁻¹ LiClO₄; 25 °C.

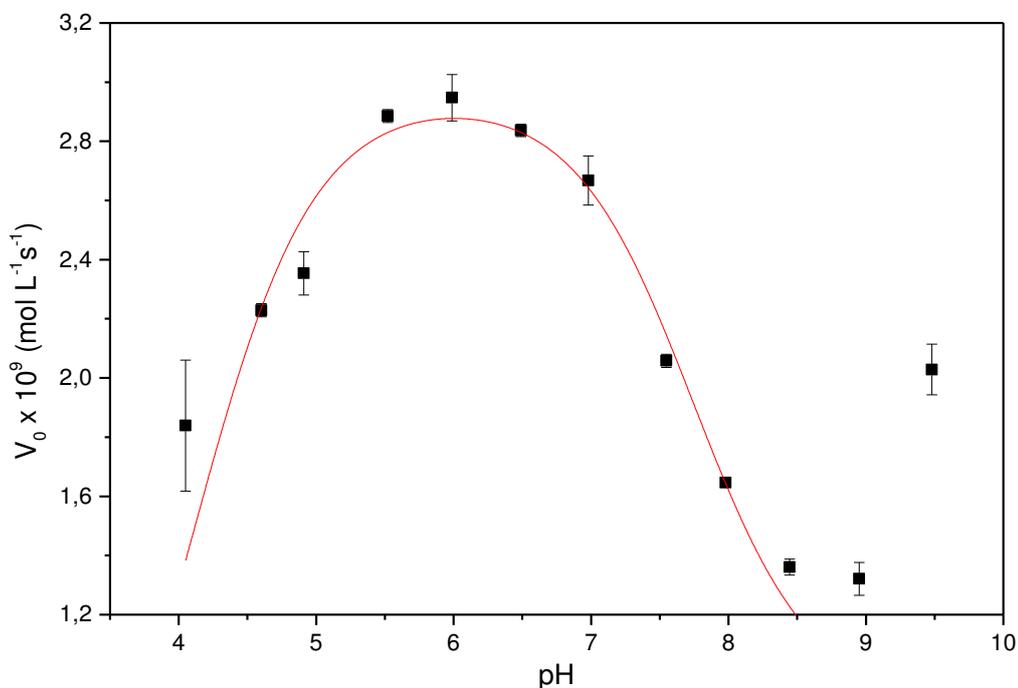


Figura 67 – Influência do pH na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP utilizando o complexo 1 como catalisador. Condições: CH₃CN/H₂O (1:1, %v/v); [Complexo] = 4×10^{-5} mol L⁻¹; [Substrato] = $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; [Tampão] = 5×10^{-2} mol L⁻¹; I = 5×10^{-2} mol L⁻¹ LiClO₄; 25 °C.

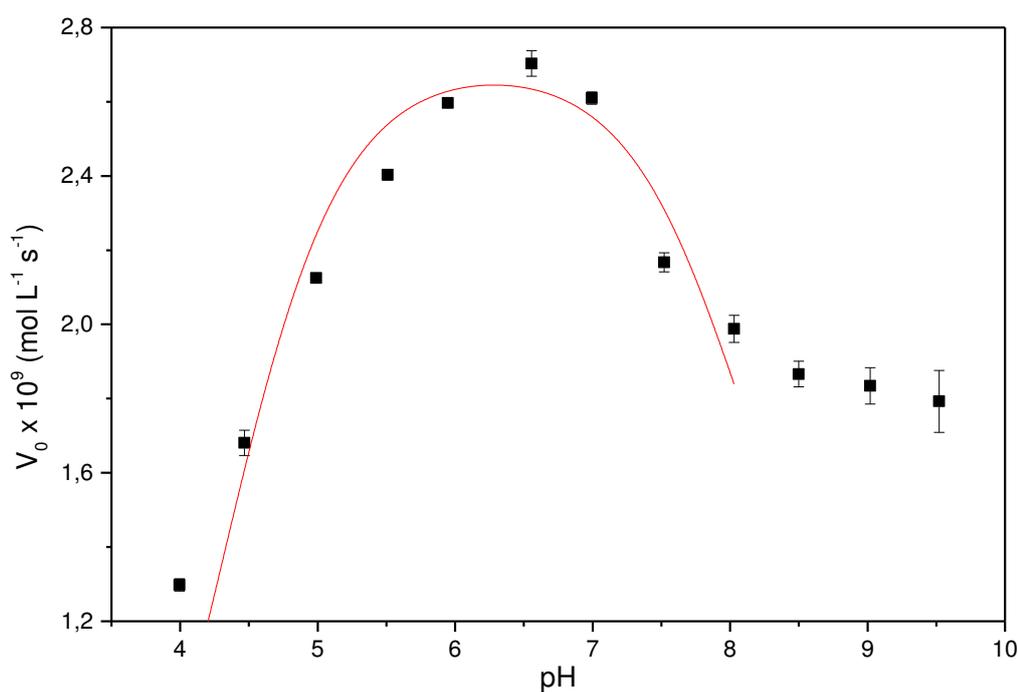
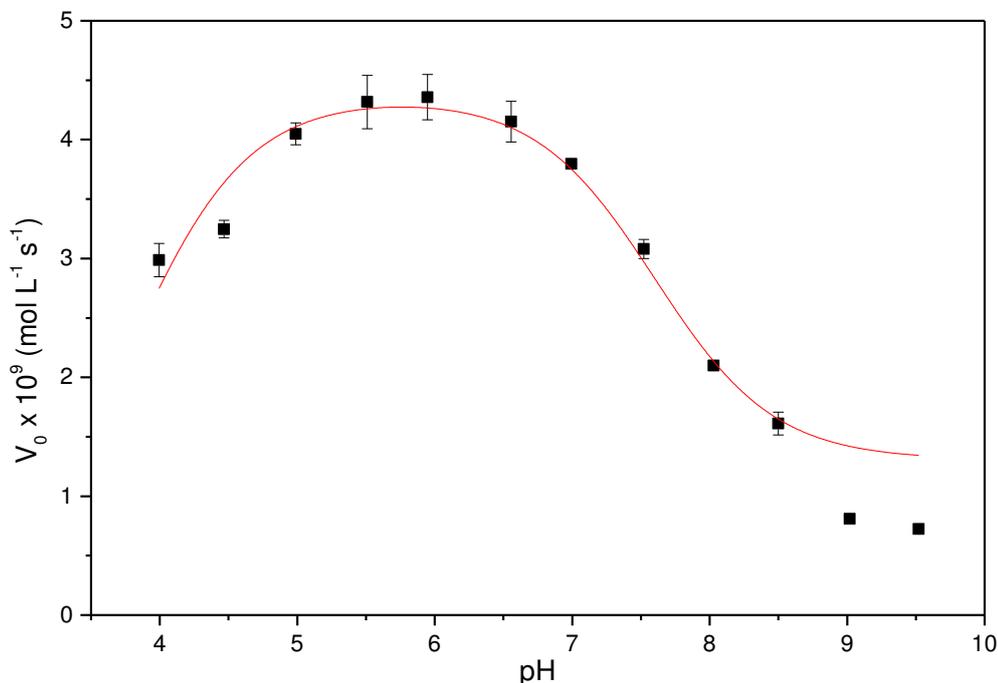


Figura 68 – Influência do pH na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP utilizando o complexo 2 como catalisador. Condições: CH₃CN/H₂O (1:1, %v/v); [Complexo] = 4×10^{-5} mol L⁻¹; [Substrato] = $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; [Tampão] = 5×10^{-2} mol L⁻¹; $I = 5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ LiClO₄; 25 °C.



Através da regressão não-linear dos dados experimentais foram obtidos os valores de pK_a cinéticos dos complexos estudados, que possuem boa correlação com aqueles determinados através de titulações espectrofotométricas (Tabela 10). Todos os complexos apresentaram um perfil de sino para a atividade catalítica. Com base nesse experimento e nas propostas mecanísticas existentes para as PAPs,^{63,64} é possível propor que ao menos uma das espécies ativas dos complexos corresponde a (OH)Ga^{III}(μ-OH)M^{II}(OH₂), sendo que para os complexos 1d e 2d ainda pode haver uma espécie ativa com o grupo OH do álcool desprotonado. Entretanto, essa espécie não foi observada na titulação espectrofotométrica, mas pode estar contribuindo para a atividade catalítica nos estudos cinéticos. A espécie predominante em pH ácido é a (OH₂)Ga^{III}(μ-OH)M^{II}(OH₂) onde não há a presença do nucleófilo necessário para que a reação ocorra, que é o OH coordenado ao metal trivalente. Em pH alcalino, a espécie predominante (OH)Ga^{III}(μ-OH)M^{II}(OH) contém o nucleófilo adequado, porém o metal divalente ao qual o substrato se coordena possui um grupo hidróxido coordenado, que é menos lábil que a água. Pelo fato de este grupo estar ligado de maneira mais forte ao centro metálico, a coordenação do substrato é dificultada, resultando em perda da atividade catalítica.

Tabela 10 – Comparação entre os valores de pKa obtidos através da titulação potenciométrica e da cinética para os complexos estudados.

Complexo		pK _{a1}	pK _{a2}
1d	Espectrofotométrico	4,72±0,04	7,39±0,04
	Cinético	4,47±0,01	8,27±0,01
2d	Espectrofotométrico	4,39±0,06	7,68±0,05
	Cinético	4,10±0,08	7,74±0,05
1	Espectrofotométrico	4,17±0,04	7,41±0,03
	Cinético	4,13±0,08	7,61±0,28
2	Espectrofotométrico	3,88±0,06	7,50±0,06
	Cinético	3,76±0,11	7,60±0,12

O pH de atividade máxima do complexo 1d foi de 7,0, enquanto o do complexo 2d foi de 6,0. Essa diferença corrobora com os pKas determinados pelos complexos espectrofotometricamente, onde o composto 1d apresenta pKa cerca de 0,33 maior que o composto 2d. Os complexos 1 e 2 apresentaram pHs de atividade máxima com valores de 6,5 e 5,5, respectivamente. Isso significa que a inclusão da cadeia lateral contendo um aminoálcool elevou tanto os pKas quanto o pH de atividade ótima dos complexos. Esse comportamento difere do observado por Souza¹⁰⁰, onde a derivatização do ligante H₂py₃mff com polietilenoimina reduziu o pH de atividade máxima do respectivo complexo. Desse modo, o ambiente criado através das ligações de hidrogênio do grupo aminoálcool aparentemente exerce efeitos de segunda esfera de coordenação diversos dos já observados quando a cadeia lateral consiste em grupos amina ou imina.^{38,88,100}

5.3.2 Efeito da da concentração do substrato na atividade fosfatase

A fim de se obter os parâmetros cinéticos da reação de hidrólise para cada complexo, foi realizado o estudo da influência da concentração do substrato 2,4-BDNPP na velocidade inicial. Os ensaios foram realizados no pH ótimo de atividade catalítica dos complexos e são apresentados nas Figuras 69, 70, 71 e 72.

Figura 69 – Influência da concentração do substrato na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP utilizando o complexo 1d como catalisador. Condições: CH₃CN/H₂O (1:1, %v/v); [Complexo] = 4×10^{-5} mol L⁻¹; [Tampão] = 5×10^{-2} mol L⁻¹ (HEPES, pH = 7,0; $I = 5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ LiClO₄; 25 °C.

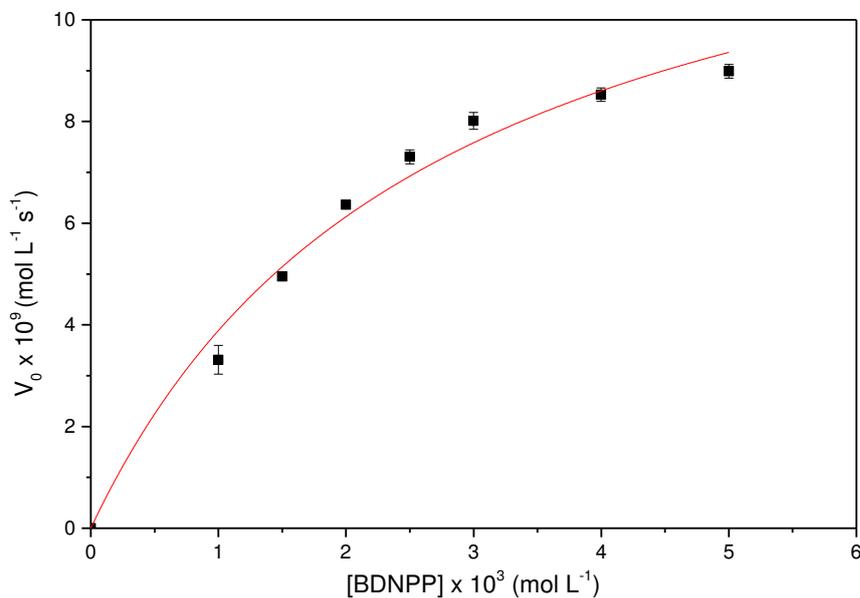


Figura 70 – Influência da concentração do substrato na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP utilizando o complexo 2d como catalisador. Condições: CH₃CN/H₂O (1:1, %v/v); [Complexo] = 4×10^{-5} mol L⁻¹; [Tampão] = 5×10^{-2} mol L⁻¹ (MES, pH = 6,0; $I = 5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ LiClO₄; 25 °C.

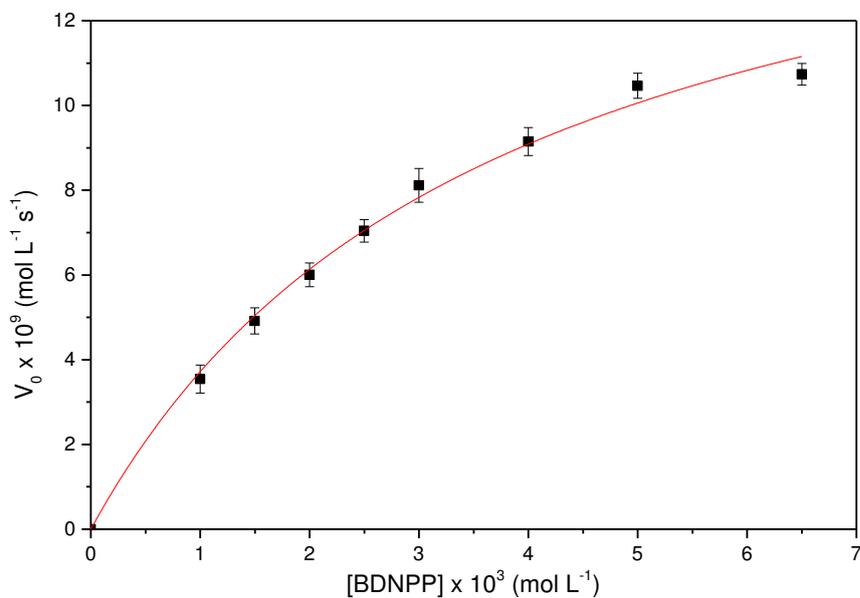


Figura 71 – Influência da concentração do substrato na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP utilizando o complexo 1 como catalisador. Condições: CH₃CN/H₂O (1:1, %v/v); [Complexo] = 4×10^{-5} mol L⁻¹; [Tampão] = 5×10^{-2} mol L⁻¹ (MES, pH = 6,5; $I = 5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ LiClO₄; 25 °C.

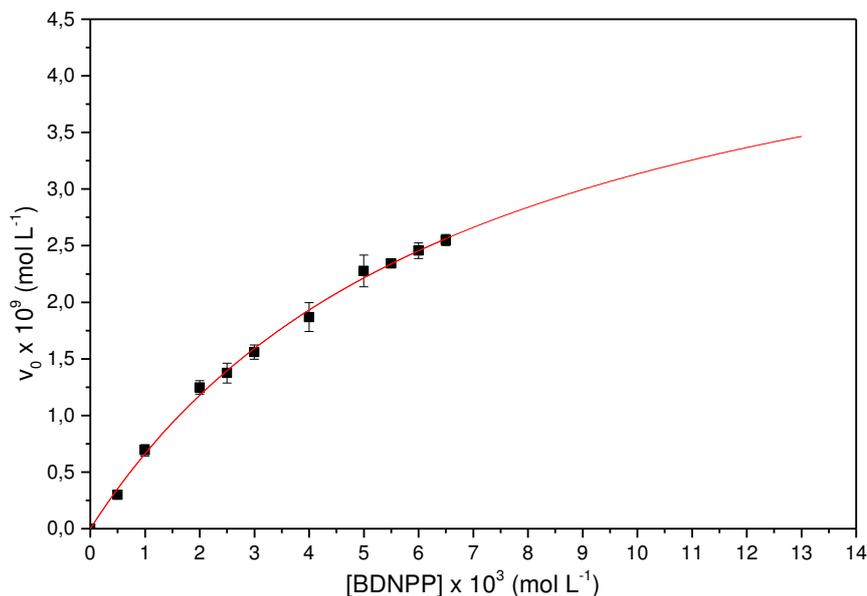
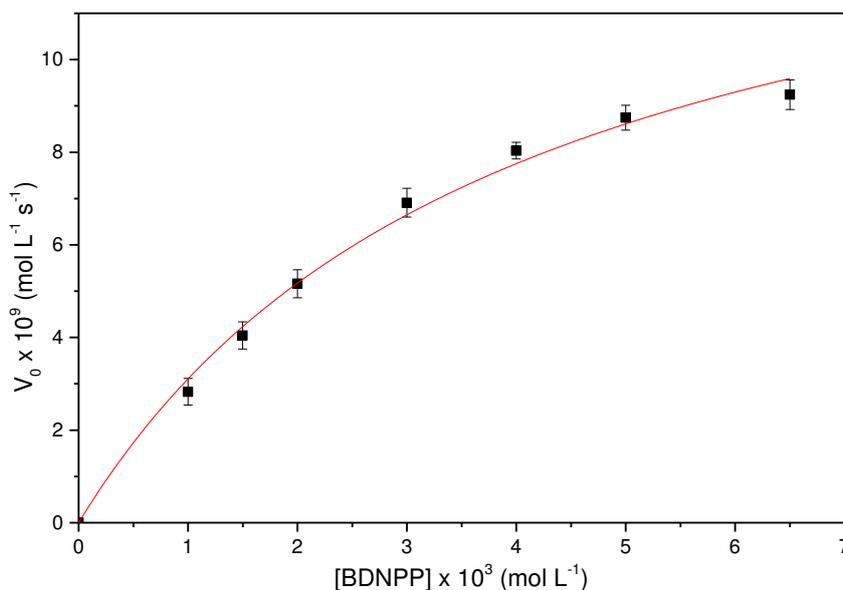


Figura 72 – Influência da concentração do substrato na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP utilizando o complexo 1d como catalisador. Condições: CH₃CN/H₂O (1:1, %v/v); [Complexo] = 4×10^{-5} mol L⁻¹; [Tampão] = 5×10^{-2} mol L⁻¹ (HEPES, pH = 7,0; $I = 5 \times 10^{-2}$ LiClO₄ mol L⁻¹; 25 °C.



Os complexos estudados apresentaram um perfil de saturação, típico de sistemas enzimáticos, obedecendo a uma cinética do tipo Michaelis-Menten. O ajuste não-linear dos dados experimentais segundo o modelo proposto por Michaelis e Menten⁹³ permitiu a

determinação dos parâmetros cinéticos da reação, sejam eles k_{cat} (constante catalítica) e K_M (constante de Michaelis). A Tabela 11 reúne os parâmetros cinéticos obtidos para os complexos sintetizados neste trabalho e os valores encontrados para outros complexos com efeitos de segunda esfera de coordenação já desenvolvidos.

Tabela 11 – Parâmetros cinéticos dos complexos 1d, 2d, 1 e 2 e de outros compostos descritos na literatura.

Complexo	pH ótimo	$k_{\text{cat}} \times 10^4$ (s^{-1})	$K_M \times 10^3$ (mol L^{-1})	$E = k_{\text{cat}}/K_M$ ($\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)
1d	7,0	3,60±0,34	2,71± 0,50	0,13± 0,03
2d	6,0	4,88± 0,09	2,75± 0,38	0,18± 0,02
1	6,5	1,34± 0,05	7,09± 1,07	0,02± 0,003
2	6,0	3,87± 0,10	3,87± 0,50	0,10± 0,01
FeCu ¹⁰⁰	7,0	18,8± 0,11	3,08± 0,03	0,61± 0,02
FeCu-PEI ¹⁰⁰	6,0	4,00± 0,25	0,40± 0,13	0,10± 0,01
FeZn_{ald} ³⁴	7,0	9,02	3,55	0,25
CAE-FeZn ⁴⁰	6,5	4,99	2,14	0,23
FeZnLAB ⁸⁷	6,0	1,60	0,82	0,20
FeZnH₂LHex ³⁸	6,5	2,02	2,22	0,09

A constante de Michaelis está relacionada com a afinidade do substrato pelo catalisador, sendo aproximadamente igual a constante de dissociação do complexo catalisador-substrato. Ou seja, quanto menor o valor de K_M , maior é a afinidade entre o complexo e o 2,4-BDNPP. Ao se observar os dados constantes na Tabela 11, é possível verificar que os complexos contendo a cadeia lateral composta de grupos amina e álcool (1d e 2d) possuem valores de K_M inferiores aos seus análogos que prescindem de tais grupos (1 e 2, respectivamente). Esse mesmo efeito de segunda esfera de coordenação foi observado em trabalhos anteriores que continham na cadeia lateral grupos amina ou imina.^{38,40,87,100} A tendência se justifica pelo fato de esses grupos funcionais estarem carregados positivamente no pH de atividade máxima dos complexos, contribuindo para o aumento da afinidade com o substrato através de atrações eletrostáticas com os grupos fosfato, que são carregados negativamente. Desse modo, como uma tendência geral em todos os trabalhos realizados, os complexos derivatizados com grupos amina, como os complexos 1d e 2d, possuem valores de K_M inferiores aos compostos que abordam apenas a primeira esfera de coordenação.

Ao se analisar os valores de k_{cat} da Tabela 11, é possível verificar que o complexo 1d possui uma constante catalítica cerca de 2,7 vezes superior ao seu análogo (complexo 1), enquanto no complexo 2d esse aumento é de 1,3 vezes (em relação ao complexo 2). Esse

comportamento é inédito para complexos sintetizados a partir da derivatização do ligante H_2py_3mff , que via de regra possuem valores de k_{cat} inferiores aos observados para seus análogos que abordam a primeira esfera de coordenação. Como exemplo, verifica-se que o complexo FeCu-PEI possui um valor de k_{cat} cerca de 4 vezes inferior ao seu análogo FeCu.¹⁰⁰ Do mesmo modo, os complexos CAE-FeZn,⁴⁰ FeZnLAB⁸⁷ e FeZnH₂LHex³⁸ que são complexos contendo grupos amina, possuem valores de k_{cat} inferiores ao seu precursor sem efeitos de segunda esfera de coordenação: FeZn_{ald}.³⁴

O aumento dos valores das constantes catalíticas dos complexos 1d e 2d em relação aos complexos 1 e 2 provavelmente está relacionado com a presença do grupo OH presente na cadeia lateral dos complexos derivatizados, que mimetiza um resíduo de serina. Analogamente à função já descrita para esse resíduo de aminoácido nas enzimas serino-proteases,^{32,107} o grupo OH terminal do aminoálcool pode estar atuando como um nucleófilo na hidrólise do substrato, oferecendo um segundo caminho para que a reação ocorra. Desse modo, os complexos 1d e 2d possivelmente possuam dois nucleófilos distintos atuando em conjunto para a hidrólise do fosfodiéster, o que explica seus valores de k_{cat} superiores aos complexos 1 e 2, que a princípio possuem apenas o grupo OH coordenado ao gálio como nucleófilo.

Outra característica incomum observada para os complexos 1d e 2d é a elevação do pH ótimo de hidrólise em relação aos análogos, conforme já destacado na seção 5.3.1. Esse comportamento também pode estar associado com a presença do grupo OH do aminoálcool, visto que esse nucleófilo pode ser ativo em pHs mais elevados e o pH ótimo para os complexos seja aquele onde o somatório das espécies nucleofílicas ativadas seja o maior possível. Alternativamente, a elevação do pH ótimo pode estar relacionada com o papel das ligações de hidrogênio dos grupos amina e álcool presentes nos complexos: quando a segunda esfera de coordenação atua como receptora de ligações de hidrogênio, os pKas e pHs ótimos são aumentados e, quando atua como doadora de ligações de hidrogênio, os pKas e pHs ótimos são reduzidos.²⁴

O somatório dos efeitos de segunda esfera de coordenação dos complexos 1d e 2d, ao aumentar k_{cat} e reduzir K_M , implicou no aumento da eficiência catalítica desses complexos em relação aos seus análogos. Essa característica também é bastante incomum quando se trata de complexos obtidos a partir da derivatização do ligante H_2py_3mff . Embora os complexos com efeitos de segunda esfera de coordenação reduzam o K_M em todos os casos já observados, os valores de k_{cat} também são reduzidos e em uma extensão até maior. Desse modo, os complexos 1d e 2d se destacam dos demais modelos que abordam segunda esfera de

coordenação por proporcionarem um aumento da eficiência catalítica em relação aos seus análogos.

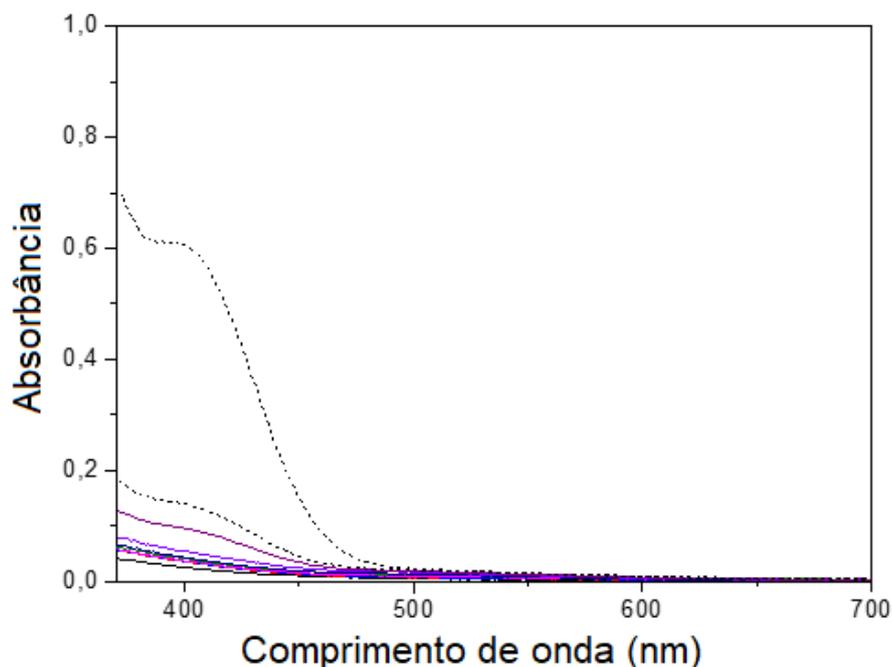
5.3.3 Atividade monoestearase e número de moléculas hidrolisadas por molécula de complexo

A capacidade de hidrolisar monoésteres de fosfato é bastante desejada para modelos biomiméticos de PAPs, já que esse é essencialmente o papel das enzimas.^{63,64} Atualmente há apenas um complexo heterobinuclear modelo de fosfatase ácida púrpura com atividade monoestearase relevante.⁷⁷ Isso ocorre porque o monoéster de fosfato normalmente se coordena de maneira bidentada aos complexos e não há algum nucleófilo forte o suficiente disponível para realizar a reação de hidrólise.^{63,64}

Para verificar a atividade monoestearase dos complexos, foram adicionados ao meio reacional de 1 a 12 equivalentes do substrato 2,4-DNPP e monitorou-se a absorbância em 400 nm após cada adição. A Figura 73 apresenta os resultados obtidos para o complexo 1d. As duas linhas contínuas do gráfico com maiores valores de absorbância correspondem às leituras realizadas 1 h e 5 h após a adição dos 12 equivalentes de 2,4-DNPP. Assim como os demais compostos estudados neste trabalho, o complexo 1d apresentou uma atividade monoestearase muito baixa, o que impediu estudos cinéticos mais profundos.

Um dos subprodutos da hidrólise de um diéster de fosfato é o monoéster de fosfato. Por isso, os complexos devem ter a capacidade de liberar esse subproduto para poderem hidrolisar uma próxima molécula de substrato. A fim de verificar essa habilidade, após a adição dos 12 equivalentes de monoéster de fosfato e de 5 horas de reação com esse substrato, foram adicionados 4 equivalentes do diéster (Figura 73, linhas tracejadas) 2,4-BDNPP. Verifica-se que após 12 h de reação a absorbância do sistema aumentou de maneira significativa para o complexo 1d. Desse modo, infere-se que o diéster de fosfato é capaz de deslocar o monoéster coordenado aos centros metálicos, iniciando um novo ciclo catalítico e regenerando o catalisador. O mesmo comportamento foi observado para os demais complexos estudados.

Figura 73 – Monitoramento da absorbância do meio reacional contendo o composto 1d após a adição de 0, 1, 2, 4, 8 e 12 equivalentes de monoéster em relação ao complexo ($[C] = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). As duas linhas contínuas do gráfico com maiores valores de absorbância correspondem às leituras realizadas 1 h e 5 h após a adição dos 12 equivalentes de 2,4-DNPP. As linhas tracejadas correspondem às leituras realizadas 1 h e 12 h após a adição do 2,4-BDNPP.



Ainda com o objetivo de avaliar a atividade monoestearase dos complexos estudados, realizou-se uma reação em condições estequiométricas entre estes e o substrato 2,4-BDNPP. Após 55 horas de reação, a 50 °C, verificou-se que todos os complexos foram capazes de gerar apenas 1 equivalente do produto 2,4-dinitrofenolato. Isso indica que os complexos estudados possuem apenas atividade diestearase, sendo incapazes de hidrolisar moléculas de monoésteres de fosfato.

Uma característica relevante para um composto ser considerado um catalisador é a capacidade de ele ser renovado a cada ciclo catalítico para realizar novamente a conversão química desejada. Para verificar o número de ciclos catalíticos realizados para cada complexo antes de ele ser desativado, foram realizados estudos cinéticos de 24 h, a 25 °C, da reação de hidrólise contendo um excesso de cem vezes de substrato. Neste experimento, o complexo 1d foi capaz de hidrolisar 2,8 equivalentes e os complexos 2d, 1 e 2 hidrolisaram 3,0, 2,0 e 4,4 equivalentes, respectivamente. Apesar de esses números serem baixos, eles estão de acordo com o comportamento de outros modelos biomiméticos de PAPs.^{38,77}

5.3.4 Efeito isotópico do deutério

Com o intuito de se obter maiores informações acerca do mecanismo pelo qual atuam os complexos sintetizados, foram realizados ensaios de efeito da concentração do substrato na atividade fosfatase em um meio de CH₃CN/D₂O (1:1, % v/v) e, dessa forma, foram obtidas as constantes catalíticas dos complexos em meio deuterado (k_D). Quando não há transferência de próton na etapa determinante da velocidade de reação, a razão entre as constantes catalíticas em H₂O e em D₂O (k_H/k_D) é próxima de 1, admitindo-se valores entre 0,8 e 1,9.¹⁰⁸ Valores de k_H/k_D superiores a 2,0 geralmente estão associados a uma catálise básica ou a outros caminhos reacionais que envolvam transferência de próton.

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de efeito isotópico do deutério. É possível observar que os valores de k_H/k_D observados para os complexos 1d e 2d são superiores a 3,0, indicando que esses possuem um caminho mecanístico diferente dos seus complexos análogos com abordagem somente de primeira esfera de coordenação, que apresentaram valores inferiores a 1,9. De acordo com o comportamento observado, é plausível propor que a justificativa para essa elevada razão de k_H/k_D seja um caminho reacional onde há a abstração do próton do grupo OH terminal do grupo aminoálcool presente nos complexos 1d e 2d. Desse modo, a etapa determinante da velocidade da reação para esses complexos estaria associada a geração da espécie nucleofílica, que é o grupo OH desprotonado.

Tabela 12 – Valores da razão k_H/k_D observados para os complexos estudados.

Complexo	$k_H \times 10^4$ (s ⁻¹)	$k_D \times 10^4$ (s ⁻¹)	k_H/k_D
1d	3,60	1,05	3,47
2d	4,88	1,55	3,15
1	1,34	0,77	1,71
2	3,87	2,05	1,89

As constantes catalíticas obtidas na Tabela 12 foram determinadas através do ajuste não-linear dos dados segundo uma cinética de Michaelis-Menten, representando o comportamento dos complexos quando esses estão saturados com o substrato. Para se obter informações sobre a atuação do complexo fora do limite da saturação, foram determinadas as razões entre as velocidades iniciais de reação (e, conseqüentemente, a razão entre suas constantes de velocidade) em H₂O e D₂O ($V_{0(H)}/V_{0(D)}$) em diferentes concentrações de substrato (Tabela 13). Os resultados indicam que em qualquer concentração de substrato os complexos 1d e 2d atuam por um mecanismo onde há transferência de próton na etapa

limitante da reação. Já os complexos 1 e 2 possuem valores bem próximos de 1,0 em baixas concentrações de substrato. Quando a concentração aumenta e se está próximo da saturação, os valores entre $V_{0(H)}/V_{0(D)}$ aumentam e chegam perto do limite aceitável para a proposição de um mecanismo que não envolva a transferência de prótons. Isso ocorre porque, provavelmente, em concentrações altas de substrato, os complexos estudados podem também apresentar um caminho reacional secundário de hidrólise por catálise básica, onde há a abstração de um próton de uma molécula de água do meio e posterior ataque nucleofílico da hidroxila formada.

Tabela 13 – Valores da razão $V_{0(H)}/V_{0(D)}$ encontrados para os complexos estudados em diferentes concentrações de 2,4-BDNPP.

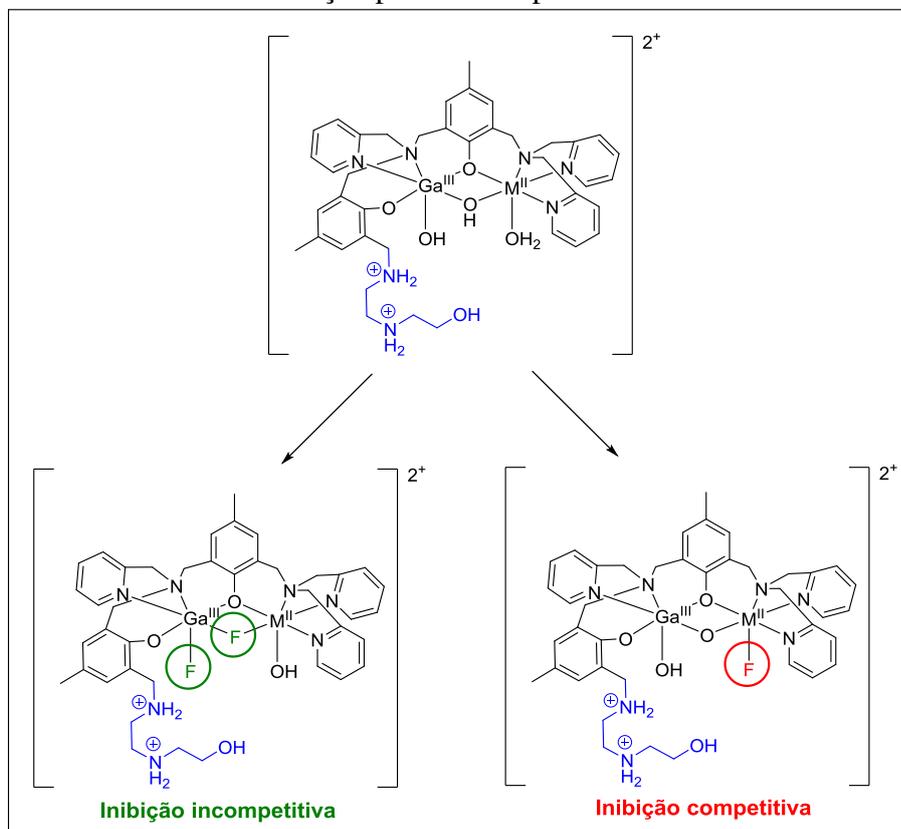
[BDNPP] (mol L ⁻¹)	$V_{0(H)}/V_{0(D)}$			
	1d	2d	1	2
1,00x10 ⁻³	2,22	2,37	1,04	1,05
1,50 x10 ⁻³	2,32	2,31	1,06	1,05
2,00 x10 ⁻³	2,46	2,32	1,16	1,19
3,00 x10 ⁻³	2,66	2,70	1,36	1,44
4,00 x10 ⁻³	2,75	2,95	1,44	1,43
5,00 x10 ⁻³	2,82	3,41	1,50	1,46

5.3.5 Inibição da atividade catalítica pelo fluoreto

Ainda com o objetivo de investigar os caminhos mecanísticos pelos quais os complexos realizam a hidrólise do diéster de fosfato, foram realizados ensaios de redução da atividade pelo ânion fluoreto. Esse tipo de inibição pode estar relacionado a dois diferentes fatores: o ânion fluoreto pode se coordenar tanto ao centro metálico divalente quanto ao trivalente. Quando a coordenação ocorre ao metal divalente, o fluoreto compete com o substrato pelo sítio ativo impedindo a coordenação do fosfodiéster e diminuindo a velocidade de reação.¹⁰⁹ A inibição deste tipo é chamada de competitiva (Figura 74). Ao se coordenar ao centro metálico trivalente, o fluoreto substitui a molécula de hidróxido ligada ao gálio ou o hidróxido em ponte, inibindo a reação por eliminar os nucleófilos presentes no catalisador.¹⁰⁹ Essa é a inibição incompetitiva (Figura 74), já que não há a competição entre o fluoreto e o substrato pela coordenação ao complexo. Há ainda um terceiro tipo de inibição, a não

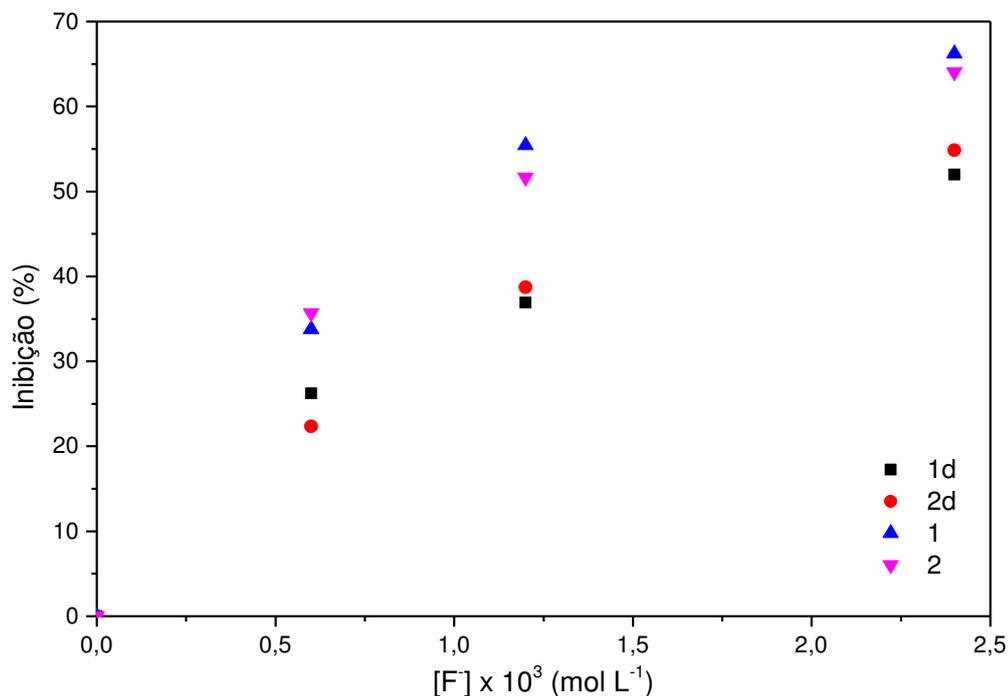
competitiva. Ela é um caso particular onde a extensão da inibição competitiva e incompetitiva é da mesma magnitude.

Figura 74 - Possíveis modos de inibição provocados pelo fluoreto.



A Figura 75 representa os resultados obtidos na extensão de inibição da reação de hidrólise em função do aumento da concentração de fluoreto no meio reacional. Verifica-se que os complexos 1 e 2 são inibidos de forma mais significativa do que os complexos 1d e 2d. Somente com os ensaios realizados, não há como afirmar se a inibição é competitiva, incompetitiva ou não competitiva.

Figura 75 – Porcentagem de inibição da reação de hidrólise em função da concentração de fluoreto no meio reacional.



Para averiguar mais profundamente a influência do fluoreto na hidrólise, foram realizados estudos de efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de reação (Figura 76) e determinou-se a constante catalítica dos complexos na presença de fluoreto (k_F) na concentração de 6×10^{-4} mol L⁻¹ (Tabela 14). Todos os complexos apresentaram um perfil de saturação seguindo uma cinética do tipo Michaelis-Menten.

Nota-se que a razão entre as constantes catalíticas em meio sem inibidor e em meio contendo fluoreto (k_{cat}/k_F) é menor que 1,7 para os complexos 1d e 2d e superior a 3,5 para os complexos 1 e 2. Esse resultado corrobora com o que foi observado na Figura 74 e permite concluir que a inibição dos complexos derivatizados é bastante inferior à dos seus análogos.

O comportamento observado, de certa forma, está de acordo com o proposto nas seções anteriores pois os complexos contendo os grupos aminoálcool em sua cadeia lateral possuem um nucleófilo alternativo, prescindindo do grupo OH coordenado ao gálio para que sejam capazes de hidrolisar o substrato. Desse modo, a presença do ânion fluoreto não inibe em extensão tão grande a atividade desses complexos. Alternativamente há a hipótese de que a modificação da cadeia lateral pode estar auxiliando a estabilizar o OH coordenado ao gálio através de ligações de hidrogênio, dificultando a sua troca por um ânion fluoreto e preservando o nucleófilo.

Figura 76 – Influência da concentração do substrato na velocidade inicial da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP para os complexos 1d, 2d, 1 e 2 na presença do inibidor fluoreto.

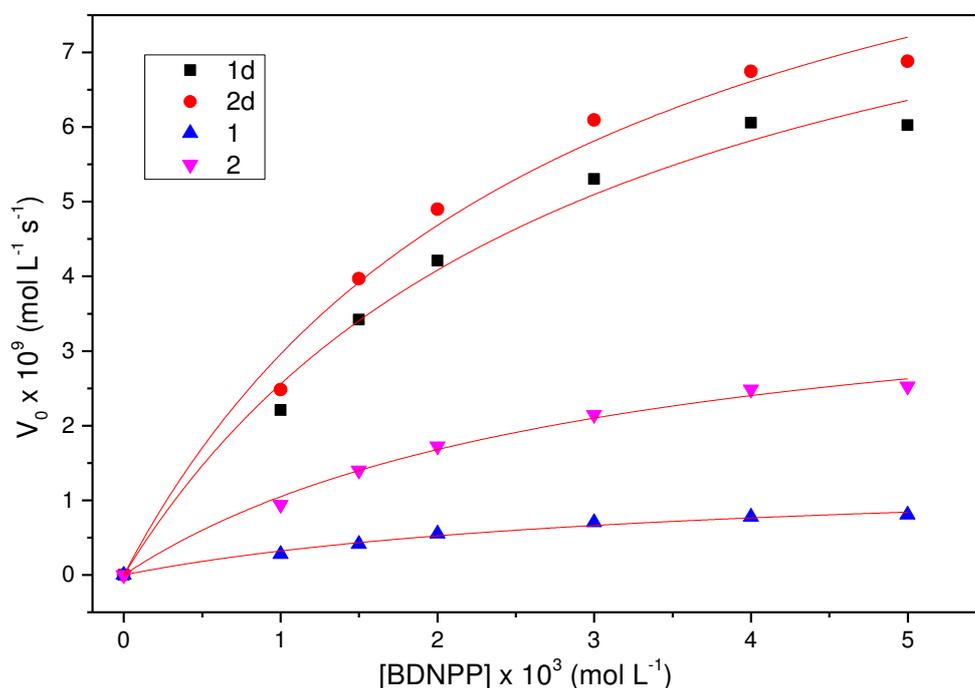


Tabela 14 – Valores da razão $k_{\text{cat}}/k_{\text{F}}$ determinados para os complexos 1d, 2d, 1 e 2.

Complexo	$k_{\text{cat}} \times 10^4 \text{ (s}^{-1})$	$k_{\text{F}} \times 10^4 \text{ (s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/k_{\text{F}}$
1d	3,60	2,53	1,42
2d	4,88	3,01	1,62
1	1,34	0,35	3,83
2	3,87	2,05	3,68

5.4 PROPOSTA MECANÍSTICA

Com base nos experimentos descritos neste trabalho, sejam eles o efeito do pH, titulações espectrofotométricas, efeito da concentração de substrato, efeito isotópico de deutério e inibição pelo fluoreto, é plausível propor que os complexos 1 e 2 apresentam um mecanismo de reação muito semelhante ao amplamente discutido na literatura para as fosfatases ácidas púrpuras (Figura 7).⁷⁴ No caso dos complexos 1d e 2d, os comportamentos cinéticos observados foram distintos, indicando um mecanismo incomum para modelos biomiméticos de PAPs.

A proposta mecanística para a atuação dos complexos 1d e 2d na hidrólise do 2,4-BDNPP é apresentada nas Figuras 77 e 78. Inicialmente, o substrato se coordena ao metal

divalente através da troca de ligante com uma molécula de água, formando o intermediário 2. As ligações de hidrogênio que os grupos amina e álcool são capazes de realizar, somadas às interações eletrostáticas dos grupos amina positivamente carregados, aumentam a afinidade do substrato pelo catalisador, o que está em concordância com os baixos valores de K_M observados para esses complexos. A partir desta etapa, propõe-se que a reação possa proceder por dois caminhos mecanísticos distintos.

O caminho A (Figura 77) corresponde ao mecanismo convencional de reação das PAPs onde o nucleófilo é a molécula de hidróxido coordenada ao átomo de gálio. Desse modo, o nucleófilo ataca o substrato, expulsando uma molécula de 2,4-dinitrofenolato. Ao sofrer o ataque nucleofílico, o monoéster de fosfato formado coordena-se ao complexo de maneira bidentada, dando origem ao intermediário 6. Neste ponto, ocorre a liberação do produto através da sua troca por uma molécula de água e uma de hidróxido, regenerando o catalisador e dando origem a um novo ciclo catalítico (Figura 78).

O caminho B corresponde a um mecanismo onde o nucleófilo é o OH do grupo álcool presente na cadeia lateral do complexo. Nessa proposta, o OH do grupo álcool, em um processo concertado, realiza o ataque nucleofílico ao fosfato e o grupo OH coordenado ao gálio atua como uma base, abstraindo o próton do álcool e ativando o nucleófilo para que haja o ataque (Figura 77). Esse caminho mecanístico é semelhante ao papel já descrito para o resíduo de serina nas propostas mecanísticas das enzimas serino proteases.^{32,107} Baseado na inatividade monoestearase desses complexos, se sugere que, da mesma forma que ocorre no caminho A, o monoéster de fosfato se coordene de maneira bidentada ao catalisador, formando o intermediário 5. Em seguida, o oxigênio do álcool é protonado e há um novo ataque nucleofílico ao fosfato realizado por uma hidroxila externa ao complexo. Neste segundo ataque, o grupo álcool ligado ao fosfato é o grupo de saída e coordena-se ao metal trivalente do complexo, enquanto o produto da reação é liberado do metal divalente através de uma reação de troca de ligante com uma molécula de água (intermediário 8, Figura 78). Por fim, o álcool coordenado ao átomo de gálio é trocado por uma molécula de hidróxido, reestabelecendo o catalisador e dando origem a um novo ciclo catalítico.

A proposta apresentada para os complexos 1d e 2d contempla os resultados observados nos experimentos cinéticos e titulação espectrofotométrica. Não há como desprezar a atuação do OH coordenado ao gálio como um nucleófilo relevante pelo perfil de sino obtido na cinética desses complexos em função do pH e pelos valores de pKa cinéticos determinados, que estão apenas um pouco acima dos pKas de moléculas de água coordenadas a um centro de gálio em complexos que tratam apenas da primeira esfera de coordenação. Por

outro lado, os valores de k_{cat} superiores aos seus análogos e os resultados obtidos nos ensaios de efeito isotópico e inibição por fluoreto revelam que o OH presente na segunda esfera de coordenação é um nucleófilo relevante, senão o principal, na reação de hidrólise para estes complexos. Desse modo, o mais provável é que os dois nucleófilos estejam atuando em conjunto e a reação de hidrólise possa ocorrer tanto pelo caminho A quanto pelo B e o somatório desses efeitos seja o responsável pelos valores de k_{cat} obtidos para os complexos 1d e 2d.

Figura 77 – Proposta mecânica para a hidrólise do 2,4-BDNPP realizada pelos complexos 1d e 2d. Caminho A: ataque do OH coordenado ao gálio. Caminho B: ataque do OH presente na segunda esfera de coordenação.

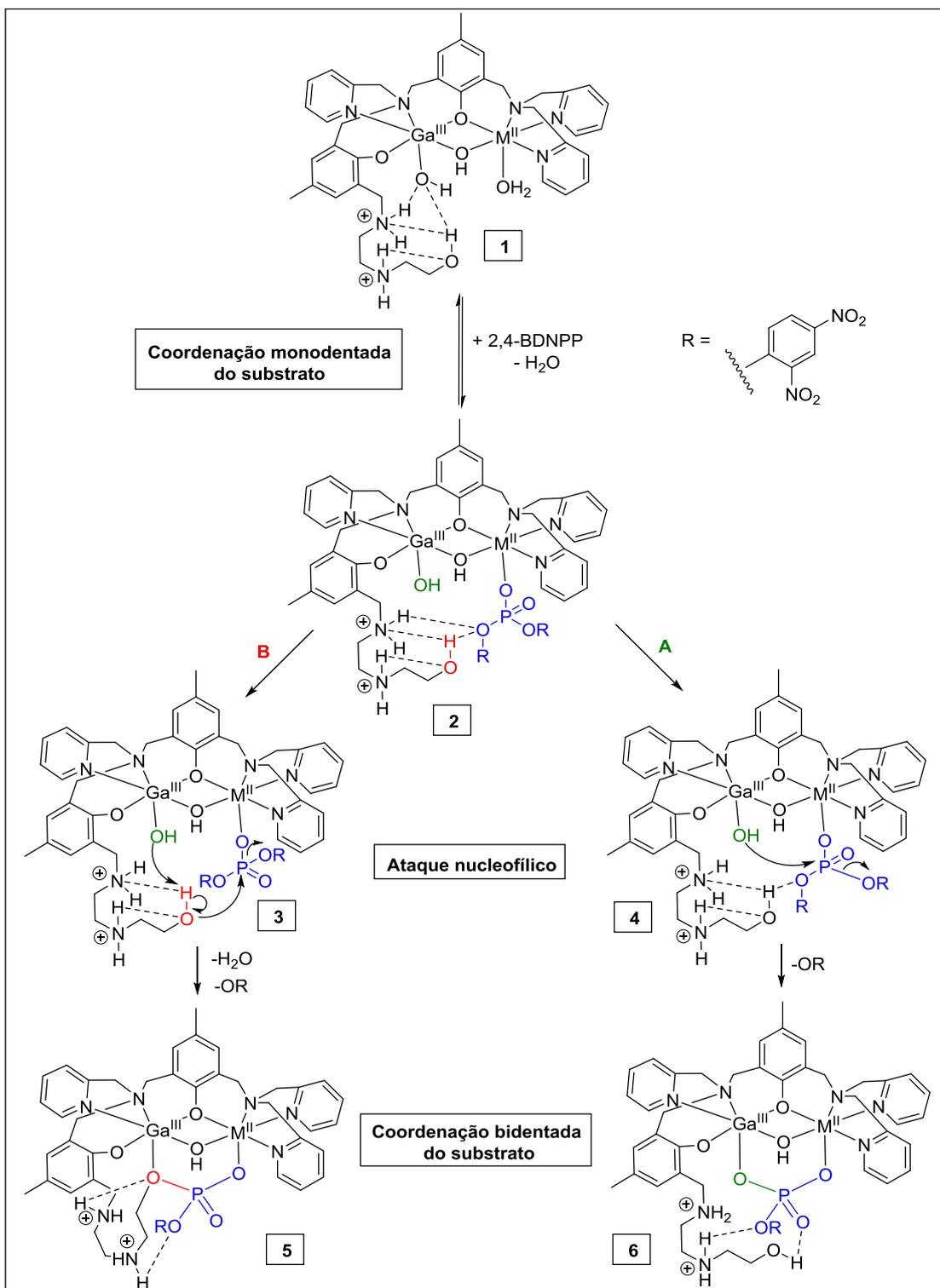
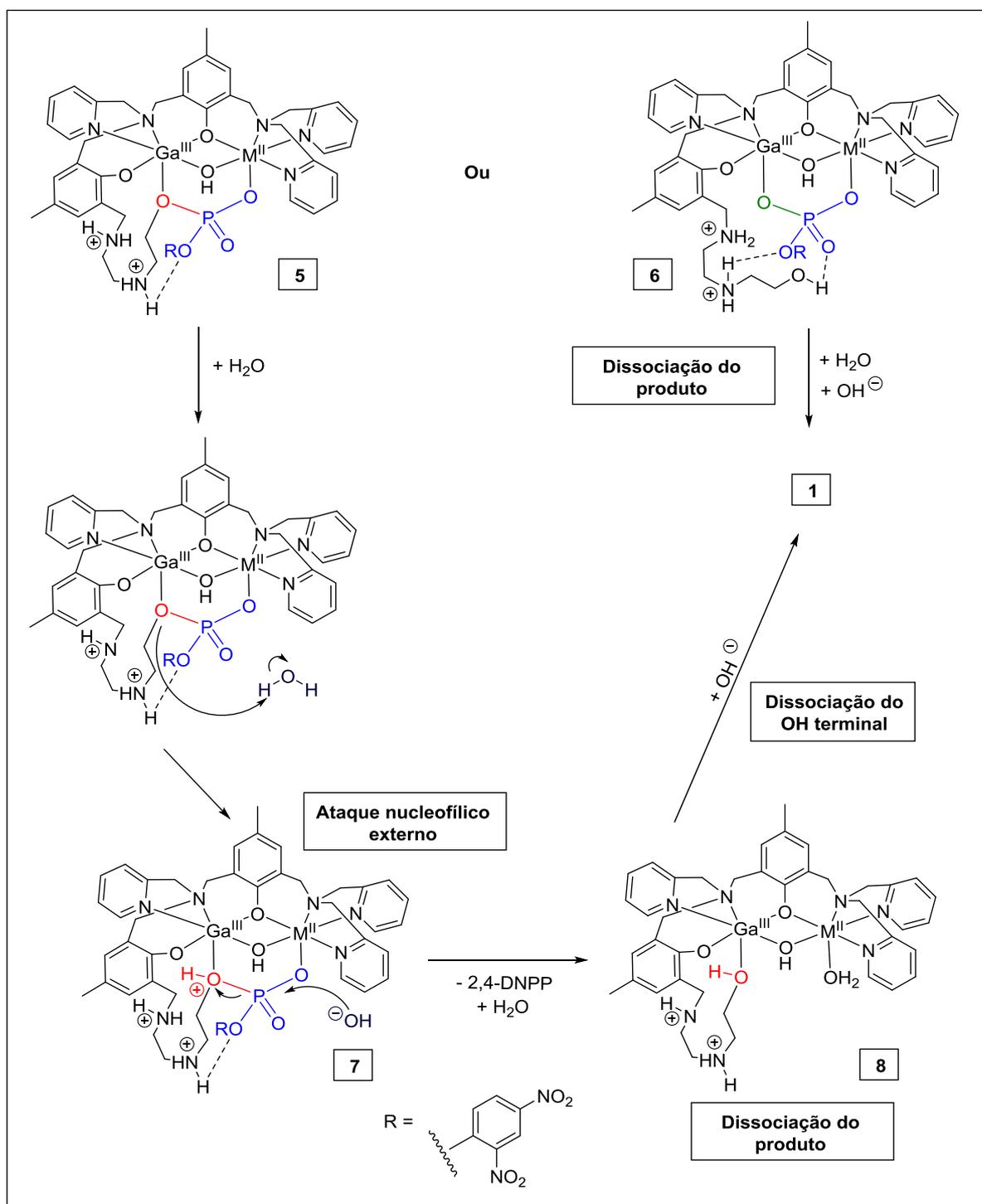


Figura 78 – Proposta para a liberação do produto e regeneração do catalisador na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP realizada pelos complexos 1d e 2d.



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ligantes H_2py_3mff e $H_2LdiaminOH$, assim como os complexos 1d, 2d, 1 e 2, foram sintetizados com rendimentos satisfatórios e pureza adequada. Não foi possível obter a estrutura por difração de raios-X dos complexos estudados, o que permitiria uma maior elucidação estrutural e confirmação de importantes considerações realizadas acerca dos complexos 1d e 2d. Através da técnica da espectroscopia na região do infravermelho, foi possível obter a confirmação da coordenação dos ligantes ao centro metálico. As análises de espectrometria de massas e de CHN corroboraram entre si e confirmaram o êxito na obtenção dos complexos.

Os valores de pKa obtidos através de titulações espectrofotométricas e ensaios cinéticos revelam que os complexos 1d e 2d possuem efeitos de segunda esfera de coordenação, elevando o pH ótimo de hidrólise e o pKa de desprotonação da molécula de água coordenada ao centro de gálio. Aparentemente não há um efeito marcante referente à desprotonação da molécula de água ligada ao centro divalente.

Os ensaios de atividade de fosfatase dos complexos 1d e 2d revelaram que esses compostos possuem uma característica inédita para modelos biomiméticos de PAPs, que é a presença de um nucleófilo ativo na segunda esfera de coordenação. O efeito global da inclusão de um aminoálcool na cadeia lateral dos complexos foi um aumento da eficiência catalítica dos complexos em relação aos seus análogos (complexos 1 e 2) através tanto do aumento de k_{cat} quanto da redução do valor de K_M . Com base nos estudos realizados, conclui-se que esses complexos atuam por dois caminhos mecanísticos diferentes, onde tanto o OH coordenado ao gálio quanto o OH da segunda esfera de coordenação são capazes de realizar a hidrólise do substrato.

Os estudos realizados até aqui fornecem apenas uma base inicial na investigação do papel de aminoálcoois na segunda esfera de coordenação de modelos biomiméticos de fosfatases ácidas púrpuras. Ainda são necessários outros ensaios como a determinação dos parâmetros termodinâmicos, a obtenção de estruturas por difração de raios X e ensaios de clivagem do DNA para se obter maiores informações acerca do mecanismo e da potencial aplicação desses complexos. É necessário confirmar ainda qual é o principal nucleófilo responsável para a conversão do substrato em produto, visto que ainda há de se confirmar se quem atua como nucleófilo é o OH presente na segunda esfera de coordenação ou um nucleófilo externo ao complexo (catálise básica). De modo geral, a inclusão de um

aminoálcool na segunda esfera de coordenação dos complexos provocou efeitos catalíticos positivos e é possível afirmar que os complexos 1d e 2d são modelos de PAPs com características promissoras.

REFERÊNCIAS

- 1 - WISNIAK, J. The history of catalysis: from the beginning to nobel prizes. **Educación Química**, v. 21, n. 1, p. 60-69, 2010.
- 2 – GREEN, S. **Industrial Catalysis**. Macmillan Company, 1928.
- 3 – BERZELIUS, J. J. **Arsberattelsen om framsteg i fysik och kemi**. 1835.
- 4 – LINDSTROM, B.; PETTERSSON, L. J. A Brief History of Catalysis. **CATTECH**, v. 7, n. 4, p. 130–138, 2003.
- 5 – SCHLÖGL, L. Catalytic synthesis of ammonia – a “never-ending story”?. **Angewandte Chemie**, v.42, p. 2004-2008, 2003.
- 6 – HEINEMANN, H. *et al.* **Handbook of heterogeneous catalysis**. v.1, VCH, 1997.
- 7 – CHUM, P.S.; SWOGER, K. W. Olefin polymer technologies – history and recent progress at the Dow Chemical Company. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 8, p. 797-819, 2008.
- 8 – CHOUDHURY, J. Recent developments on artificial switchable catalysis. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 6, p. 487-495, 2018.
- 9 – SHIJU, N. R.; GULIANTS, V. V. Recent developments in catalysis using nanostructured materials. **Applied Catalysis A: General**, v. 356, n. 1, p. 1-17, 2009.
- 10 – CHEN, K.; WU, C.-D. Designed fabrication of biomimetic metal-organic frameworks for catalytic applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 378, p. 445-465, 2019.
- 11 – DROUT, R. J. *et al.* Catalytic applications of enzymes encapsulated in metal-organic frameworks. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 381, p. 151-160, 2019.
- 12 – DESINOV, I. G. *et al.* Structure and chemistry of cytochrome P450. **Chemistry Reviews**, v. 105, n. 6, p. 2253-2277, 2005.
- 13 – DICK, R. A.; HULL, K. L.; SANFORD, M. S. A highly selective catalytic method for the oxidative functionalization of C-H bonds. **Journal of American Chemical Society**, v. 126, n. 8, p. 2300-2301, 2004.
- 14 – DESAI, L. V.; HULL, K. L.; SANFORD, M. S. Palladium-catalyzed oxygenation of unactivated sp³ C-H bonds. **Journal of American Chemical Society**, v. 126, n. 31, p. 9542-9543, 2004.
- 15 – FRANSSSEN, M. C. R. *et al.* Immobilised enzymes in biorenewables production. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6491-6534, 2013.

- 16 - DAUMANN, L. J. *et al.* Spectroscopic and mechanistic studies of dinuclear metallohydrolases and their biomimetic complexes. **Dalton Transactions**, v. 43, p. 910-928, 2014.
- 17 - CHING, H. Y. V. *et al.* Bioinspired superoxide-dismutase mimics: the effect of functionalization with cationic polyarginine peptides. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 160, p. 172-179, 2016.
- 18 - PERRY, J. J. P. *et al.* The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1804, n. 2, p. 245-262, 2010.
- 19 - BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Chemical, physical, and biological coordination: An interplay between materials and enzymes as potential platforms for immobilization. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 388, p. 1-23, 2019.
- 20 - JIANG, Z.; YOU, Q.; ZHANG, X. Medicinal chemistry of metal chelating fragments in metalloenzyme active sites: a perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 165, p. 172-197, 2019.
- 21 - PATHAK, C. *et al.* Heterodinuclear Zn(II)-Fe(III) and homodinuclear M(II)-M(II) [M = Zn and Ni] complexes of a bicompartamental [N₆O] ligand as synthetic mimics of the hydrolase family of enzymes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 185, p. 30-42, 2018.
- 22 - FURNHAM, N. *et al.* Large-scale analysis exploring evolution of catalytic machineries and mechanism in enzyme superfamilies. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 2, p. 253-267, 2016.
- 23 - QUE, L.; BANCI, L. Bioinorganic Chemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, n. 2, 169-170, 2002.
- 24 - ZHAO, M. *et al.* Insights into metalloenzyme microenvironments: biomimetic metal complexes with a functional second coordination sphere. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 21, p. 8360-8375, 2013.
- 25 - LU, Y. *et al.* Design of functional metalloproteins. **Nature**, v. 460, n. 7257, p. 855-862, 2009.
- 26 - CHRISTIANSON, D. W.; LIPSCOMB, W. N. Carboxypeptidase A. **Accounts of Chemical Research**, v. 22, n. 2, p. 62-69, 1989.
- 27 - FERNÁNDEZ, D. *et al.* Progress in metallo-carboxypeptidases and their small molecular weight inhibitors. **Biochimie**, v. 92, n. 11, p. 1484-1500, 2010.
- 28 - XU, D.; GUO, H. Quantum mechanical/molecular mechanical and density functional theory studies of a prototypical zinc peptidase (Carboxypeptidase A) suggest a general acid-general base mechanism. **Journal of American Chemical Society**, v. 131, n. 28, p. 9780-9788, 2009.

- 29 – HOLLIDAY, G. L.; MITCHELL, J. B. O.; THORNTON, J. M. Understanding the functional roles of Amino Acid Residues in Enzyme Catalysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 390, n. 3, p. 560-577, 2009.
- 30 – NOTHLING, M. D. *et al.* Simple design of an enzyme-inspired supported catalyst based on a catalytic triad. **Chem**, v. 2, n. 5, p. 732-745, 2017.
- 31 – KIRBY, A. J.; HOLLFELDER, F. **From enzyme models to model enzymes**. 1. ed. RSC Publishing, 2009. 273 p.
- 32 – CARTER, P.; WELLS, J. A. Dissecting the catalytic triad of a serine protease. **Nature**, v. 332, n. 6164, p. 564-568, 1988.
- 33 – WALL, M. *et al.* Rapid Hydrolysis of 2',3'-cAMP with a Cu(II) Complex: Effect of Intramolecular Hydrogen Bonding on the Basicity and Reactivity of a Metal-Bound Hydroxide. **Journal of American Chemical Society**, v. 121, n. 19, p. 4710-4711, 1999.
- 34 – PIOVEZAN, C. *et al.* Heterodinuclear Fe^{III}Zn^{II}-bioinspired complex supported on 3-aminopropyl silica. Efficient hydrolysis of phosphate diester bonds. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2580-2582, 2010.
- 35 – NG, G. K. -Y.; ZILLER, J. W.; BOROVNIK, A. S. Preparation and structures of dinuclear complexes containing M^{II}-OH centers. **Chemical Communications**, v. 48, n. 19, p. 2546-2548, 2012.
- 36 – SOUZA, B. *et al.* Second-coordination-sphere effects increase the catalytic efficiency of an extended model for Fe^{III}M^{II} purple acid phosphatases. **Inorganic Chemistry**, v. 52, p. 3594-3596, 2013.
- 37 – MAREQUE-RIVAS, J. C.; PRABAHARAN, R.; ROSALES, R. T. M. Relative importance of hydrogen bonding and coordinating groups in modulating the zinc-water acidity. **Chemical Communications**, v. 1, p. 76-77, 2004.
- 38 – HEYING, R. S. **Síntese, caracterização e atividade diesterase de novos modelos biomiméticos com efeitos de segunda esfera de coordenação para fosfatases ácidas púrpuras**. 2014. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- 39 – BERNHARDT, J. C. *et al.* An approach to more accurate model systems for purple acid phosphatases (PAPs). **Inorganic Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 7249-7263, 2015.
- 40 – MELLER, S. L. **Síntese, caracterização e atividade de hidrolase de novos compostos de coordenação: efeito da cadeia lateral e da unidade ferroceno ancorada**. 2018. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- 41 – SHENG, X. *et al.* Synthesis, DNA-binding, cleavage, and cytotoxic activity of new 1,7-dioxo-4,10-diazacyclododecane artificial receptors containing bisguanidinoethyl or diaminoethyl double side arms. **Chemistry - a European Journal**, v. 13, p. 9703-9712, 2007.

- 42 – ZHANG, T. *et al.* The use of differential receptors to pattern peptide phosphorylation. **Journal of American Chemical Society**, v. 131, n. 33, p. 11976-11984, 2009.
- 43 – TJIOE, L. *et al.* Phosphodiester cleavage properties of copper(II) complexes of 1,4,7-triazacyclononane ligands bearing single alkyl guanidine pendants. **Inorganic Chemistry**, v. 51, p. 939-953, 2012.
- 44 – LEE, C. H.; DOGUTAN, D. K.; NOCERA, D. G. Hydrogen generation by Hangman metalloporphyrins. **Journal of American Chemical Society**, v. 133, n. 23, p. 8775-8777, 2011.
- 45 – CARVER, C.T.; MATSON, B. D.; MAYER, J. M. Electrocatalytic oxygen reduction by iron tetra-arylporphyrins bearing pendant proton relays. **Journal of American Chemical Society**, v. 134, n. 12, p. 5444-5447, 2012.
- 46 – COMBA, P. *et al.* Monoestearase activity of a purple acid phosphatase mimic with a cyclam platform. **Chemistry - a European Journal**, v. 18, p. 1700-1710, 2007.
- 47 – SINGLETON, M. L.; REIBENSPIES, J. H.; DARENSBOURG, M. Y. A cyclodextrin host/guest approach to a hydrogenase active site biomimetic cavity. **Journal of American Chemical Society**, v. 132, n. 26, p. 8870-8871, 2010.
- 48 – ZHAO, M. *et al.* Rapid hydrolysis of phosphate ester promoted by Ce(IV) conjugating with a β -cyclodextrin monomer and dimer. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 15, p. 4469-4476, 2012.
- 49 – KITAGISHI, H. *et al.* A water-soluble supramolecular complex that mimics the heme/copper hetero-binuclear site of Cytochrome c Oxidase. **Chemical Science**, v. 9, n. 7, p. 1989-1995, 2018.
- 50 – LE POUL, N. *et al.* Monocopper center embedded in a biomimetic cavity: from supramolecular control of copper coordination to redox regulation. **Journal of American Chemical Society**, v. 129, n. 28, p. 8801-8810, 2007.
- 51 – BAKIRCI, H. *et al.* Dynamically self-assembling metalloenzyme models based on calixarenes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 44, p. 7400-7404, 2006.
- 52 – KONER, A. L. *et al.* Transition-metal-promoted chemoselective photoreactions at the cucurbituril rim. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 2, p. 545-548, 2010.
- 53 – MASSON, E. *et al.* Cucurbituril chemistry: a tale of supramolecular success. **RSC Advances**, v. 2, n. 4, p. 1213-1247, 2012.
- 54 – SONNAY, M. *et al.* Modulating the cobalt redox potential through imidazole hydrogen bonding interactions in a supramolecular biomimetic protein-cofactor model. **Chemical Science**, v. 7, n. 6, p. 3836-3842, 2016.
- 55 – MARTIN, M. *et al.* Metallodendrimers as transphosphorylation catalysts. **Journal of American Chemical Society**, v. 129, n. 22, p. 6982-6983, 2007.

- 56 – ZHAO, M. *et al.* Iron complexes of dendrimer-appended carboxylates for activating dioxygen and oxidizing hydrocarbons. **Journal of American Chemical Society**, v. 130, n. 13, p. 4352-4363, 2008.
- 57 – WANG, Q. *et al.* A supramolecular-hydrogel-encapsulated hemin as an artificial enzyme to mimic peroxidase. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 23, p. 4285-4289, 2007.
- 58 – MANN, S. I. *et al.* Coordination chemistry within a protein host: regulation of the secondary coordination sphere. **Chemical communications**, v. 54, p. 4413-4416, 2018.
- 59 – KLABUNDE, T. *et al.* Structural relationship between the mammalian Fe(III)-Fe(II) and the Fe(III)-Zn(II) plant purple acid phosphatases. **FEBS Letters**, v. 367, p. 56-60, 1995.
- 60 – GUDDAT, L. W. *et al.* Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase. **Structure**, v. 7, n. 7, p. 757-767, 1999.
- 61 – SINN, E.; O'CONNOR, C. J. Evidence for a binuclear iron site in pig allantoic fluid acid phosphatase (uteroferrin). **Inorganica Chimica Acta**, v. 78, p. 13-15, 1983.
- 62 – VINCENT, J. B.; OLIVIER-LILLEY, G. L.; AVERILL, B. A. Proteins containing oxo-bridged dinuclear iron centers: a bioinorganic perspective. **Chemical Reviews**, v. 90, n. 8, p. 4447-4467, 1990.
- 63 – MITIĆ, N. *et al.* The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 8, p. 3338-3363, 2006.
- 64 – SCHENK, G. *et al.* Purple acid phosphatase: a journey into the function and mechanism of a colorful enzyme. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 2, p. 473-482, 2013.
- 65 – KLABUNDE, T.; KREBS, B. The dimetal center in purple acid phosphatases. **Structure and Bonding**, p. 177-198, 1997.
- 66 – BECK, J. L. *et al.* Enzymatically active zinc, copper and mercury derivatives of the one-iron form of pig allantoic fluid acid phosphatase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 791, n. 3, p. 357-363, 1984.
- 67 – BECK, J. L. *et al.* Properties of the Fe(II)-Fe(III) derivative of red kidney bean purple phosphatase. Evidence for a binuclear Fe-Zn center in the native enzyme. **Journal of American Chemical Society**, v. 110, n. 10, p. 3317-3318, 1988.
- 68 – ANTANAITIS, G. *et al.* The novel “g = 1.74” EPR spectrum of pink and purple uteroferrin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 23, p. 11204-11209, 1980.
- 69 – WANG, D. L. *et al.* Electrochemical properties of the diiron core of Uteroferrin and its anion complexes. **Biochemistry**, v. 30, n. 33, p. 8187-8194, 1991.
- 70 – BERNHARDT, P. V.; SCHENK, G.; WILSON, G. J. Direct electrochemistry of porcine purple acid phosphatase (Uteroferrin). **Biochemistry**, v. 43, n. 32, p. 10387-10392, 2004.

- 71 – SMITH, S. J. *et al.* The reaction mechanism of the Ga(III)Zn(II) derivative of uteroferrin and corresponding biomimetics. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.12, n. 8, p. 1207-1220, 2007.
- 72 – JAKUPEC, M.A.; KEPPLER, B. K. Gallium in cancer treatment. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 15, p. 1575-1583, 2004.
- 73 – CHITAMBAR, C. R. Gallium-containing anticancer compounds. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 10, p. 1257-1272, 2012.
- 74 – STRÄTER, N. *et al.* Crystal structure of a purple acid phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active site. **Science**, v. 268, n. 5216, p. 1489-1492, 1995.
- 75 – KLABUNDE, T. *et al.* Mechanism of Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase based on crystal structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 259, n. 4, p. 737-748, 1996.
- 76 – SCHENK, G. *et al.* Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants. **Gene**, v. 250, n. 1-2, p. 117-125, 2000.
- 77 – BOSCH, S. *et al.* Asymmetric mono- and dinuclear Ga^{III} and Zn^{II} complexes as models for purple acid phosphatases. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 162, p. 343-355, 2016.
- 78 – SOUZA, B. *et al.* Second-coordination-sphere effects increase the catalytic efficiency of an extended model for Fe^{III}M^{II} purple acid phosphatases. **Inorganic Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 3594-3596, 2013.
- 79 – FUNHOFF, E.G. *et al.* Substrate positioning by His92 is important in catalysis by purple acid phosphatase. **The FEBS Journal**, v. 272, n. 12, p. 2968-2977, 2005.
- 80 – MUELLER, E. G. *et al.* Purple acid phosphatase: a diiron enzyme that catalyzes a direct phospho group transfer to water. **Journal of American Chemical Society**, v. 115, n. 7, p. 2974-2975, 1993.
- 81 – ROBERTS, A. E.; SCHENK, G.; GAHAN, L. R. A heterodinuclear Fe^{III}Zn^{II} complex as a mimic for purple acid phosphatase with site-specific Zn^{II} binding. **Journal of Inorganic Chemistry**, v. 19, p. 3076-3086, 2015.
- 82 – HORN Jr. *et al.* Synthesis, magnetic properties, and catalytic properties of a nickel(II)-dependent biomimetic of metallohydrolases. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. 441, p. 1-14, 2018.
- 83 – PATHAK, C.; GANGWAR, M. K.; GHOSH, P. Homodinuclear Fe(III)-Fe(III) and Zn(II)-Zn(II) complexes of a binucleating [N₄O₃] ligand with purple acid phosphatase (PAP) and zinc phosphoesterase like activity. **Polyhedron**, v. 145, p. 88-100, 2018.
- 84 – NEVES, A. *et al.* An unprecedented Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II} complex that mimics the structural and functional properties of purple acid phosphatases. **Journal of American Chemical Society**, v. 129, n. 24, p. 7486-7487, 2007.

- 85 – JOVITO, R. **Síntese, Caracterização e avaliação da promiscuidade catalítica de complexos binucleares bioinspirados**. 2010. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- 86 – MUXEL, A. A. *et al.* New La(III) complex immobilized on 3-aminopropyl-functionalized sílica as an efficient and reusable catalyst for hydrolysis of phosphate ester bonds. **Inorganic Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2943-2952, 2014.
- 87 – CAMARGO, T. P. **Desenvolvimento de complexos heterobinucleares de Fe “Zn” a partir de ligantes contendo o grupo pireno para estudo de interação com ésteres de fosfato e ácidos nucleicos**. 2013. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- 88 – SILVA, G. A. S. *et al.* Synthesis and characterization of $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}$ 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**, v. 46, n. 34, p. 11380-11394, 2017.
- 89 – STROHALM, M. *et al.* mMass3: a cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 11, p. 4648-4651, 2010.
- 90 – BUNTON, C. A.; FARBER, S. J. The hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 34, n. 4, p. 767-772, 1969.
- 91 – PERALTA, R. A. *et al.* Electronic structure and spectro-structural correlations of $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ biomimetics for purple acid phosphatases: relevance to DNA cleavage and cytotoxic activity. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 24, p. 11421-11438, 2010.
- 92 – SEGEL, I. H. **Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems**. 1. ed. Wiley-Interscience, 1969, 957 p.
- 93 – JOHNSON, K. A.; GOODY, R. S. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis–Menten paper. **Biochemistry**, v. 50, n. 39, p. 8264–8269, 2011.
- 94 – KARSTEN, P. *et al.* Synthesis, structure, properties and phosphatase-like activity of the first heterodinuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}$ complex with the unsymmetric ligand H₂BPBPMP as a model for the PAP in sweet potato. **Inorganic Chemistry**, v. 41, p. 4624-4626, 2002.
- 95 – THOER, A. *et al.* The Reimer-Tiemann reaction in slightly hydrated solid-liquid medium: a new method for the synthesis of formyl and diformyl phenols. **Synthetic Communications**, v. 18, n. 16-17, p. 2095-2101, 1988.
- 96 – NEVES, A. *et al.* $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ and $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ complexes as synthetic analogues for the oxidized and reduced forms of purple acid phosphatases. **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 8, p. 2360-2368, 1996.
- 97 – KARSTEN, P. *et al.* Synthesis, structure, properties, and phosphatase-like activity of the first heterodinuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}$ complex with the unsymmetric ligand H₂BPBPMP as a model for the PAP in sweet potato. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 18, p. 4624-4626, 2002.

- 98 – GREATTI, A. *et al.* Synthesis, structure, and physicochemical properties of dinuclear Ni^{II} complexes as highly efficient functional models of phosphohydrolases. **Inorganic Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 1107-1119, 2008.
- 99 – HOMRICH, A. M. **Novos complexos binucleares de cobre(II): síntese, caracterização, atividade biomimética de catecolase e estudos de interação com o DNA**. 2019. Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- 100 – SOUZA, B. **Estudo de novos catalisadores biomiméticos com efeitos de segunda esfera de coordenação: síntese, caracterização e catálise**. 2013. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- 101 – SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.
- 102 – PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. **Journal of American Chemical Society**, v. 85, n. 22, p. 3533-3539, 1963.
- 103 – RAYER, A. V. Dissociation constants (pK_a) of tertiary and cyclic amines: structural and temperature dependences. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 59, n. 11, p. 3805-3813, 2014.
- 104 – HOFFMANN, E. **Mass spectrometry: principles and applications**. 1. ed. John Wiley & Sons, 2007. 502 p.
- 105 – NAKAMOTO, K. **Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds, part B: applications in coordination, organometallic, and bioinorganic chemistry**. 6. ed. Wiley-Blackwell, 2010. 424 p.
- 106 – PAVIA, D. L. *et al.* **Introduction to spectroscopy**. 5. ed. Cengage Learning, 2015.
- 107 – HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501-4524, 2002.
- 108 – JOHNSON, S. L. General base and nucleophilic catalysis of ester hydrolysis and related reactions. In: GOLD, V. (Ed.) **Advances in physical organic chemistry**. 5. ed. New York. Academic Press, 1967. p. 236-330.
- 109 – ELLIOT, T. W. Inhibition studies of purple acid phosphatases: implications for the catalytic mechanism. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 8, p. 1558-1565, 2006.