



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

CARLOS ALEXANDRE LUCECKI

**NOVO COMPLEXO DE LANTÂNIO COMO CATALISADOR NA HIDRÓLISE DE
ÉSTERES DE FOSFATO**

Florianópolis

2020

Carlos Alexandre Lucecki

**NOVO COMPLEXO DE LANTÂNIO COMO CATALISADOR NA HIDRÓLISE DE
ÉSTERES DE FOSFATO**

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^ª. Dr^ª. Rosely A. Peralta

Florianópolis

2020

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

Lucecki, Carlos Alexandre
Novo complexo de lantânio como catalisador na hidrólise
de ésteres de fosfato / Carlos Alexandre Lucecki ;
orientador, Ademir Neves, coorientadora, Rosely Aparecida
Peralta, 2020.
117 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Química. 2. Catálise. 3. Lantanídeos . 4. Ésteres de
fosfato . 5. DNA. I. Neves, Ademir. II. Peralta, Rosely
Aparecida . III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Carlos Alexandre Lucecki

**NOVO COMPLEXO DE LANTÂNIO COMO CATALISADOR NA
HIDRÓLISE DE ÉSTERES DE FOSFATO**

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

Prof. Dr. Ricardo Ferreira Affeldt
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Prof. Dr. Júlio César da Rocha
Universidade do Estado 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. Marcus Cesar Mandolesi Sá
Coordenador do Programa

Prof. Dr. Ademir Neves
Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Rosely Aparecida Peralta
Coorientadora

Florianópolis, 2020.

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais Carlos e Valquiria e minha irmã Carol por todo amor, estímulo e compreensão durante esses anos de estudo e que apesar da distância sempre se fizeram presentes durante essa jornada pelo universo da química, ouvindo ideias, debatendo hipóteses e compartilhando preciosos ensinamentos acompanhados de um bom chimarrão, amo vocês incondicionalmente.

Ao Prof. Dr. Ademir Neves por me aceitar como orientando e por depositar em mim sua confiança para a realização deste trabalho. Agradeço pelas inúmeras discussões e críticas ao longo deste caminho, por todo incentivo e conhecimento compartilhado mesmo quando a vida nos impõe certas limitações, és um espelho como cientista que um dia quero me tornar. Sou grato pela sua amizade e por sempre preencher o LABINC com seu entusiasmo (*I wish you all the best my dear friend!*). À Prof^a. Dr^a. Rosely A. Peralta pela orientação e atenção que teve durante o desenvolvimento desta pesquisa, pela amizade durante esses dois anos que passei na UFSC e por me aguardar até tarde durante a realização dos exames de Inorgânica Avançada, sou extremamente grato e sentirei saudades da convivência diária.

Aos professores doutores Adailton J. Bortoluzzi e Hernán Terenzi pelas colaborações (análises) e discussões pertinentes a este trabalho. Aos demais professores que puderam transmitir seu conhecimento e experiências neste período e a todos os funcionários e técnicos que contribuem para o funcionamento da universidade.

A todos os meus colegas de laboratório (LABINC/GFEM) e de profissão em que tive a honra de conhecer durante essa caminhada, em especial aqueles que transcenderam o espaço acadêmico e se tornaram grandes amigos(as): Jé, por compartilhar gostos (as vezes estranhos), interesses e coisas em comum, por me ensinar que HOMO e LUMO podem ser um ótimo assunto durante um *Happy Hour* de uma sexta-feira à noite, juntamente com fluorescência atrasada. Obrigado por me ajudar durante o processo de escrita desta dissertação e por me acompanhar nas minhas incansáveis cinéticas via ESI - MS. Tu és uma inspiração como pessoa (bota fé?). Edi, por ter sido minha companheira durante o mestrado, dividindo problemas, angústias, risadas e cervejas. Obrigado por me mostrar que é possível chegar ao Departamento de Química sem precisar passar pela Bloco da Colina e por ter sido minha vizinha (foi bom enquanto durou) até a chegada do Elder. ‘Doutorando Elder’ por ter sido meu irmão de SC, compartilhando nerdices e experiências de quase-morte (POCl_3). MM’s e Mi por todas as

risadas e momentos de descontração que levarei para sempre em minha memória. Joachim (Sueco), por tornar o *lab* um lugar mais agradável desde a sua chegada, por me contratar como tradutor oficial em situações hilárias e por ter sido um ótimo amigo e professor de Inglês/Sueco nas horas vagas (*Jag vill ha en öl min vän*). Gili, por todas as críticas construtivas a respeito do meu trabalho e da minha pseudo-barba, por me incentivar nessa etapa final do mestrado e por ser um ótimo companheiro de academia por longas duas semanas. Vitinho, Filipy e André pelas conversas nas mesas de bares e/ou pelas rodas de café na salinha acompanhadas de boas piadas. Marcos, Cacau, Anderson e Bruna por terem me auxiliado durante o mestrado, discutindo ideias e resultados sem deixar o bom humor de lado.

Ao CNPq, CAPES e demais órgãos de fomento por viabilizarem a condução deste trabalho, bem como ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSC e a Central de Análises.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que de algum modo contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

“The chemists are a strange class of mortals, impelled by an almost insane impulse to seek their pleasures amid smoke and vapour, soot and flame, poisons and poverty, yet among all these evils I seem to live so sweetly that may I die if I were to change places with the Persian king.”

(Johann Joachim Becher, 1635 - 1682)

RESUMO

A atividade catalítica dos íons lantanídeos frente à hidrólise de ésteres de fosfato é notável quando comparada a outros metais de transição de alto desempenho biológico. Tais sistemas não são modelos que mimetizam propriamente a catálise enzimática, mas podem oferecer condições que se assemelham às observadas nos sítios ativos das enzimas. Esses complexos modelos além de servirem para estudos biológicos, podem apresentar aplicações importantes, tais como atividade farmacológica e catalisadores em processos industriais. Levando em consideração o conjunto de efeitos que contribuem para a atividade catalítica destes complexos modelos, a segunda esfera de coordenação apresenta um papel de suma importância na eficiência destas moléculas, sendo que tais estudos aplicados a complexos lantanídicos são pouco explorados. Dentro deste contexto, o presente trabalho contempla a síntese de um novo complexo de lantânio utilizando o ligante 2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((3-(metilamino)propil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol (H_2L^2). O complexo foi caracterizado por diversas técnicas incluindo: espectroscopia no infravermelho, espectroscopia eletrônica, espectrometria de massa, difração de raios X em monocristal e titulação potenciométrica. Testes de reatividade frente à hidrólise do bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-bdnpp) e 2,4-dinitrofenilfosfato (2,4-dnpp) foram realizados. Tais estudos em solução indicaram que o complexo inicialmente mononuclear dá origem a uma espécie binuclear durante a cinética de hidrólise do 2,4-bdnpp e 2,4-dnpp. O complexo apresentou um fator de aceleração de 30.000 vezes na hidrólise do diéster e 240 vezes na hidrólise do monoéster. A eficiência catalítica é 1.23 vezes maior na hidrólise do monoéster quando comparada ao diéster. Testes iniciais da interação do complexo ao ácido desoxirribonucleico (DNA) revelaram uma constante de ligação intrínseca na ordem de $10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, sendo que estudos mais aprofundados sobre possíveis mecanismos de clivagem do DNA estão em andamento.

Palavras-chave: Catálise. Lantanídeos. Ésteres de fosfato. DNA.

ABSTRACT

The catalytic activity of lanthanide ions in the hydrolysis of phosphate esters is remarkable when compared to other transition metals of high biological performance. These systems are not models that properly mimic enzymatic catalysis, but may offer conditions that resemble those observed in enzyme active sites. These complex models besides being useful for biological studies may present important applications, such as pharmacological properties and catalytic activity in industrial processes. Taking into consideration the set of effects that contribute to the catalytic activity of these complex models, the second coordination sphere plays a major role in the efficiency of these molecules and such studies applied to lanthanide complexes are almost unexplored. Within this context, the present work contemplates the synthesis of a new lanthanum complex using the 2-((bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)-6-(((2-hydroxy-5-methyl-3-(((3-(methylamino)propyl)amino)methyl)benzyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)-4-methylphenol (H_2L^2) ligand. The complex was characterized by several techniques including: infrared spectroscopy, electronic spectroscopy, mass spectrometry, single crystal X-ray diffraction and potentiometric titration. Reactivity tests in the hydrolysis of bis (2,4-dinitrophenyl) phosphate (2,4-bdnpp) and 2,4-dinitrophenyl phosphate (2,4-dnpp) were performed. These studies indicated that the initially mononuclear complex originates a binuclear species during the hydrolysis kinetics of 2,4-bdnpp and 2,4-dnpp. The complex showed a 30.000-fold rate enhancement in diester hydrolysis and 240-fold rate enhancement in monoester hydrolysis. The catalytic efficiency is 1.23 times higher in monoester hydrolysis when compared to diester. Initial tests of the interaction of the complex with deoxyribonucleic acid (DNA) revealed an intrinsic binding constant in the order of $10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ and further studies on possible DNA cleavage mechanisms are underway.

Keywords: Catalysis. Lanthanides. Phosphate Esters. DNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura tridimensional do DNA mostrando a interação entre os nucleotídeos, o esqueleto açúcar-fosfato, os sulcos maiores e menores da molécula, bem como as ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas.	26
Figura 2. Representação estrutural do centro ativo das PAPs.	30
Figura 3. Mecanismo proposto por Klabunde e colaboradores para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAPs.	31
Figura 4. Representação estrutural dos complexos reportados por Heying <i>et al.</i> , 2019 (I) e Maranha <i>et al.</i> , 2019 (II).	33
Figura 5. Representação estrutural dos complexos reportados por Mohanan <i>et al.</i> , 2014 (I), Raja <i>et al.</i> , 2015 (II), Shiju <i>et al.</i> , 2017 (III), Yu <i>et al.</i> , 2015 (IV) e Li <i>et al.</i> , 2016 (V).	37
Figura 6. Representação estrutural dos complexos reportados por Camargo <i>et al.</i> , 2008 (I) e Muxel <i>et al.</i> , 2014 (II).	38
Figura 7. Estruturas dos principais resíduos de aminoácidos encontrados na segunda esfera de coordenação das enzimas.	39
Figura 8. Representação da estrutura do ligante elaborado por Piovezan <i>et al.</i> , 2010. Em destaque azul o grupamento aldeído disponível para reações de substituições.	41
Figura 9. Representação estrutural do complexo elaborado por Pereira <i>et al.</i> , 2019. Em destaque azul as derivatizações realizadas no ligante.	41
Figura 10. Etapas da síntese do Cmff.	52
Figura 11. Etapas da síntese do Bpmamff.	53
Figura 12. Etapas da síntese do Hpy ₃	54
Figura 13. Etapas da síntese do H ₂ L ¹	56
Figura 14. Etapas da síntese do H ₂ L ²	57
Figura 15. Sobreposição dos espectros na região do infravermelho para o precursor H ₂ L ¹ e o ligante H ₂ L ²	61
Figura 16. Espectro de ¹ H NMR do ligante H ₂ L ² em CDCl ₃ a 200 MHz.	63
Figura 17. Espectro de NMR ¹³ C / DEPT - 135 do ligante H ₂ L ² em CD ₃ CN a 100 MHz.	64
Figura 18. Espectro de massa realizado no modo positivo para o ligante H ₂ L ² em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v).	65

Figura 19. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o ligante H_2L^2 . Erro calculado: 0,015%.	66
Figura 20. Sobreposição dos espectros na região do infravermelho para o ligante H_2L^2 e o complexo $La.H_2L^2$.	67
Figura 21. Espectro eletrônico do complexo (6×10^{-5} mol L^{-1}) em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). O <i>inset</i> apresenta o espectro eletrônico do ligante nas mesmas condições.	69
Figura 22. Espectro de massa realizado no modo positivo para o complexo $La.H_2L^2$ em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Fragmentos observados: (a) $m/z = 660,50$ $[C_{40}H_{50}N_7O_2]^+$, (b) $m/z = 859,39$ $[C_{40}H_{48}LaN_8O_5]^+$, (c) $m/z = 903,35$ $[C_{44}H_{59}LaN_8O_4]^+$ e (d) $m/z = 922,35$ $[C_{40}H_{49}LaN_9O_8]^+$.	70
Figura 23. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o fragmento (a) $m/z = 660,50$ $[C_{40}H_{50}N_7O_2]^+$. Erro calculado: 0,015%.	71
Figura 24. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o fragmento (b) $m/z = 859,39$ $[C_{40}H_{48}LaN_8O_5]^+$. Erro calculado: 0,012%.	72
Figura 25. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o fragmento (c) $m/z = 903,35$ $[C_{44}H_{59}LaN_8O_4]^+$. Erro calculado: 0,006%.	72
Figura 26. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o fragmento (d) $m/z = 922,35$ $[C_{40}H_{49}LaN_9O_8]^+$. Erro calculado: 0,009%.	73
Figura 27. ORTEP do complexo $La.H_2L^2$. Elipsóides com 70% de probabilidade.	74
Figura 28. Curva de titulação potenciométrica de 0,03 mmol do complexo em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v) com $I = 0,1$ mol L^{-1} (KCl) a 25 °C.	78
Figura 29. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH pela dissociação de 0,03 mmol do complexo em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v) com $I = 0,1$ mol L^{-1} (KCl) a 25 °C.	78
Figura 30. Esquema dos equilíbrios presentes em solução para a titulação potenciométrica do complexo $La.H_2L^2$.	80
Figura 31. Reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-bdnpp.	81
Figura 32. (---) Dependência da velocidade inicial de hidrólise do 2,4-bdnpp (V_0) promovida pelo complexo em diferentes valores de pH. Condições: $[Complexo] = 4,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} , $[2,4-bdnpp] = 2,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} , $[Tampões] = 0,05$ mol L^{-1} ($I = 0,05$ mol L^{-1}), acetonitrila/água (1:1 v/v) a 25 °C. (—) Diagrama de distribuição de espécies em função do pH	

pela dissociação de 0,03 mmol do complexo em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v) com $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl) a 25 °C. (a) = $[\text{La}(\text{H}_2\text{L}^2)]^{3+}$, (b) = $[\text{La}(\text{HL}^2)]^{2+}$, (c) = $[\text{La}_2(\text{HL}^2)(\text{OH})]^{4+}$ e (d) = $[\text{La}_2(\text{HL}^2)(\text{OH})_2]^{3+}$ 83

Figura 33. Dependência da proporção $\text{La}^{3+} / \text{H}_2\text{L}^2$ na velocidade de hidrólise do substrato 2,4-bdnpp a pH 6,50 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: $[\text{La}^{3+}] = 5,60 \times 10^{-6}$ a $2,80 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{L}^2] = 1,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{2,4-bdnpp}] = 0,56 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Tampão MES}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4), $T = 25 \text{ °C}$ 85

Figura 34. Espectro de massa realizado no modo positivo para uma cinética a pH 6,50 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Fragmentos observados: (a) $m/z = 590,38$ $[\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_3]^+$, (b) $m/z = 1090,38$ $[\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{La}_2\text{N}_9\text{O}_8]^+$ e (c) $m/z = 1520,20$ $[\text{C}_{54}\text{H}_{61}\text{La}_2\text{N}_{13}\text{O}_{20}\text{P}]^+$ 86

Figura 35. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o fragmento (a) $m/z = 590,38$ $[\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_3]^+$. Erro calculado: 0,011%..... 86

Figura 36. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o fragmento (b) $m/z = 1090,38$ $[\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{La}_2\text{N}_9\text{O}_8]^+$. Erro calculado: 0,015%..... 87

Figura 37. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o fragmento (c) $m/z = 1520,20$ $[\text{C}_{54}\text{H}_{61}\text{La}_2\text{N}_{13}\text{O}_{20}\text{P}]^+$. Erro calculado: 0,008%..... 87

Figura 38. Dependência da concentração do substrato 2,4-bdnpp na velocidade da reação catalisada pelo complexo a pH 6,00 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: $[\text{Complexo}] = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{2,4-bdnpp}] = 4,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Tampão MES}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4), $T = 25 \text{ °C}$ 88

Figura 39. Dependência da concentração do substrato 2,4-bdnpp na velocidade da reação catalisada pelo complexo a pH 6,50 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: $[\text{Complexo}] = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{2,4-bdnpp}] = 4,0 \times 10^{-4}$ a $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Tampão MES}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4), $T = 25 \text{ °C}$ 89

Figura 40. Dependência da concentração do substrato 2,4-bdnpp na velocidade da reação catalisada pelo complexo a pH 7,00 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: $[\text{Complexo}] = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{2,4-bdnpp}] = 4,0 \times 10^{-4}$ a $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Tampão HEPES}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4), $T = 25 \text{ °C}$ 89

Figura 41. Dependência da concentração do substrato 2,4-bdnpp na velocidade da reação catalisada pelo complexo a pH 6,50 em solução desgasificada de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: $[\text{Complexo}] = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{2,4-bdnpp}] = 4,0 \times 10^{-4}$ a $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

¹, [Tampão MES] = 0,05 mol L⁻¹, I = 0,05 mol L⁻¹ (LiClO₄), T = 25 °C, sob atmosfera de argônio.

..... 91

Figura 42. Linearização das constantes catalíticas obtidas em diferentes temperaturas para a reação de hidrólise do 2,4-dnpp promovida pelo complexo a pH 6,50 em meio acetonitrila/água (1:1 v/v). (A) equação de Arrhenius e (B) equação de Eyring, R² = 0,96. ... 93

Figura 43. Reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-dnpp. 94

Figura 44. (---) Dependência da velocidade inicial de hidrólise do 2,4-dnpp (V₀) promovida pelo complexo em diferentes valores de pH. Condições: [Complexo] = 4,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹, [2,4-dnpp] = 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹, [Tampões] = 0,05 mol L⁻¹ (I = 0,05 mol L⁻¹), acetonitrila/água (1:1 v/v) a 25 °C. (—) Diagrama de distribuição de espécies em função do pH pela dissociação de 0,03 mmol do complexo em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v) com I = 0,1 mol L⁻¹ (KCl) a 25 °C. (a) = [La(H₂L²)]³⁺, (b) = [La(HL²)]²⁺, (c) = [La₂(HL²)(OH)]⁴⁺ e (d) = [La₂(HL²)(OH)₂]³⁺ 96

Figura 45. Dependência da proporção La³⁺ / H₂L² na velocidade de hidrólise do substrato 2,4-dnpp a pH 6,50 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: [La³⁺] = 2,00 × 10⁻⁵ a 1,00 × 10⁻⁴ mol L⁻¹, [H₂L²] = 4,00 × 10⁻⁵ mol L⁻¹, [2,4-dnpp] = 1,00 × 10⁻³ mol L⁻¹, [Tampão MES] = 0,05 mol L⁻¹, I = 0,05 mol L⁻¹ (LiClO₄), T = 25 °C. 97

Figura 46. Espectro de massa realizado no modo positivo para uma cinética a pH 6,50 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Fragmentos observados: (a) m/z = 660,50 [C₄₀H₅₀N₇O₂]⁺, (b) m/z = 1090,38 [C₄₂H₅₄La₂N₉O₈]⁺ e (c) m/z = 1270,25 [C₄₆H₅₇La₂N₉O₁₄P]⁺. 98

Figura 47. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o fragmento (c) m/z = 1270,25 [C₄₆H₅₇La₂N₉O₁₄P]⁺. Erro calculado: 0,006%..... 98

Figura 48. Dependência da concentração do substrato 2,4-dnpp na velocidade da reação catalisada pelo complexo a pH 6,00 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: [Complexo] = 4,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹, [2,4-dnpp] = 2,0 × 10⁻⁴ a 1,2 × 10⁻³ mol L⁻¹, [Tampão MES] = 0,05 mol L⁻¹, I = 0,05 mol L⁻¹ (LiClO₄), T = 25 °C..... 99

Figura 49. Dependência da concentração do substrato 2,4-dnpp na velocidade da reação catalisada pelo complexo a pH 6,50 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: [Complexo] = 4,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹, [2,4-dnpp] = 2,0 × 10⁻⁴ a 1,2 × 10⁻³ mol L⁻¹, [Tampão MES] = 0,05 mol L⁻¹, I = 0,05 mol L⁻¹ (LiClO₄), T = 25 °C..... 100

Figura 50. Dependência da concentração do substrato 2,4-dnpp na velocidade da reação catalisada pelo complexo a pH 7,00 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: [Complexo] = $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, [2,4-dnpp] = $2,0 \times 10^{-4}$ a $1,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, [Tampão HEPES] = 0,05 mol L⁻¹, I = 0,05 mol L⁻¹ (LiClO₄), T = 25 °C..... 100

Figura 51. Dependência da concentração do substrato 2,4-dnpp na velocidade da reação catalisada pelo complexo a pH 6,50 em solução desgasificada de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: [Complexo] = $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, [2,4-dnpp] = $2,0 \times 10^{-4}$ a $1,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, [Tampão MES] = 0,05 mol L⁻¹, I = 0,05 mol L⁻¹ (LiClO₄), T = 25 °C, sob atmosfera de argônio. 102

Figura 52. Linearização das constantes catalíticas obtidas em diferentes temperaturas para a reação de hidrólise do 2,4-dnpp promovida pelo complexo a pH 6,50 em meio acetonitrila/água (1:1 v/v). (A) equação de Arrhenius e (B) equação de Eyring, R² = 0,99. .. 103

Figura 53. Mecanismo proposto para a hidrólise do 2,4-bdnpp..... 105

Figura 54. Titulação do complexo via espectroscopia eletrônica a partir de adições sucessivas de CT-DNA. [Complexo] = $5,50 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, [DNA] = $6,35 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $6,24 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em pH 7,20. O *inset* apresenta a linearização dos valores calculados a 255 nm para a obtenção do (K_b), $R^2 = 0,84$. 10

6

Figura 55. Espectro de ¹H NMR do ligante H₂L¹ em CDCl₃ a 200 MHz. 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo a IUBMB.	28
Tabela 2. Reagentes, solventes e materiais utilizados no trabalho.....	43
Tabela 3. Variação do coeficiente de absorção molar em 400 nm para o 2,4-dnp em diferentes valores de pH.	47
Tabela 4. Atribuições e respectivos números de onda (cm^{-1}) para as principais bandas observadas no espectro do ligante e seus precursores.	60
Tabela 5. Deslocamentos químicos em ppm (multiplicidade e integração) observados nos espectros de ^1H NMR para o ligante e seus precursores.....	62
Tabela 6. Deslocamentos químicos em ppm observados nos espectros de ^{13}C NMR do ligante H_2L^2 e seu precursor.	64
Tabela 7. Atribuições e respectivos números de onda (cm^{-1}) para as principais bandas observadas no espectro do ligante H_2L^2 e do complexo $\text{La.H}_2\text{L}^2$	68
Tabela 8. Máximos de absorção e coeficientes de absorção molar para o complexo e o ligante em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v).....	70
Tabela 9. Dados cristalográficos selecionados para os complexos $\text{La.H}_2\text{L}^2$ e La.HL^{1*}	75
Tabela 10. Comprimentos (Å) e ângulos ($^\circ$) de ligação selecionados para os complexos $\text{La.H}_2\text{L}^2$ e La.HL^{1*}	76
Tabela 11. Valores de pKa potenciométricos encontrados para o complexo $\text{La.H}_2\text{L}^2$	79
Tabela 12. Valores dos pKa potenciométricos e cinéticos obtidos para o complexo $\text{La.H}_2\text{L}^2$ em comparação com os valores dos complexos mono e binucleares (La.HL^1 e $\text{La.HL}^1\text{-Si}^*$).	84
Tabela 13. Parâmetros cinéticos obtidos da reação de hidrólise do 2,4-bdnpp catalisada pelo complexo na faixa de pH 6,00 - 7,00 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v) a 25 °C. Em destaque estão apresentados os parâmetros obtidos para os sistemas: La.HL^{1*} , $\text{La.HL}^1\text{-Si}^*$ e o pH de atividade máxima para o $\text{La.H}_2\text{L}^2$ respectivamente.	90

Tabela 14. Parâmetros cinéticos obtidos da reação de hidrólise do 2,4-bdnpp catalisada pelo complexo a pH 6,50 em solução degaseificada de acetonitrila/água (1:1 v/v) a 25 °C sob atmosfera de argônio.	92
Tabela 15. Parâmetros de ativação para a hidrólise do 2,4-bdnpp catalisada pelo complexo a pH 6,50.....	94
Tabela 16. Valores de pKa's cinéticos obtidos da hidrólise do 2,4-bdnpp e 2,4-dnpp.	96
Tabela 17. Parâmetros cinéticos obtidos da reação de hidrólise do 2,4-dnpp catalisada pelo complexo na faixa de pH 6,00 - 7,00 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v) a 25 °C. Em destaque estão apresentados os parâmetros obtidos para o sistema La.HL ¹ -Si* e o pH de atividade máxima para o La.H ₂ L ² respectivamente.	101
Tabela 18. Parâmetros cinéticos obtidos da reação de hidrólise do 2,4-dnpp catalisada pelo complexo a pH 6,50 em solução degaseificada de acetonitrila/água (1:1 v/v) a 25 °C sob atmosfera de argônio.	102
Tabela 19. Efeito da temperatura sobre os valores de k_{cat} para a hidrólise do 2,4-dnpp a pH 6,50. Condições: [Complexo] = $4,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , [2,4-dnpp] = $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ , [Tampões] = 0,05 mol L ⁻¹ ($I = 0,05$ mol L ⁻¹), acetonitrila/água (1:1 v/v) , T = 20 °C a 35 °C.	103
Tabela 20. Parâmetros de ativação para a hidrólise do 2,4-dnpp em comparação à hidrólise do 2,4-bdnpp catalisada pelo complexo a pH 6,50.....	104
Tabela 21. Constante de ligação intrínseca (K_b) obtida a partir da titulação com DNA-CT para o complexo La.H ₂ L ² comparada a outros complexos lantanídicos.	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deformação angular (IR)
δ	Deslocamento químico (NMR)
ε	Coefficiente de absorção molar
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo
ν	Frequência de estiramento axial
2,4-bdnpp	bis(2,4-dinitrofenil)fosfato
2,4-dnpp	2,4-dinitrofenilfosfato
ATR	Reflexão total atenuada, do inglês, <i>attenuated total reflectance</i>
Bpma	<i>N,N</i> -bis(2-piridilmetil)amina
Bpmafff	3-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído
BTP	Bis-tris-propano
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ CN	Acetonitrila deuterada
CHES	Ácido 2-[<i>N</i> -cicloexilamino]etanosulfônico
CMFF	3-clorometil-2-hidroxi-metilbenzaldeído
CT-DNA	<i>Calf thymus</i> -Ácido desoxirribonucleico
d	Dupleto (NMR)
dd	Duplo dupleto (NMR)
D ₂ O	Água deuterada
DEPT	Aprimoramento sem distorção por transferência de polarização, do inglês, <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>
dt	Duplo tripleto (NMR)
E	Eficiência catalítica
ESI-MS	Espectrometria de massas via ionização por electrospray, do inglês, <i>electrospray ionization-mass spectroscopy</i>
<i>f</i>	Fator catalítico
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho transformada por Fourier, do inglês, <i>fourier-transform infrared spectroscopy</i>
<i>h</i>	Constante de Planck

H ₂ L ¹	3-(((3 -((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído
H ₂ L ²	2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((3-(metilamino)propil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol
Hmb	2-hidroxi-5-metilbenzaldeído
HEPES	Ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazino]-etanosulfônico
His	Histidina
Hpy ₃	2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metil-6-(((piridin-2-ilmetil)amino)metil)fenol
<i>I</i>	Força iônica
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
IR	Infravermelho, do inglês, <i>infrared</i>
K _{ass}	Constante de associação
<i>K_b</i>	Constante de ligação intrínseca
<i>k_B</i>	Constante de Boltzmann
<i>k_{cat}</i>	Constante catalítica
<i>k_{nc}</i>	Constante da reação não catalisada
K _M	Constante de Michaelis-Menten
La.HL ¹	Complexo de La com o ligante aldeído
La.H ₂ L ²	Complexo de La com o ligante amínico
La.HL ¹ -Si	Complexo de La com o ligante aldeído ancorado em sílica 3-aminopropil
LMCT	Transferência de carga ligante-metal, do inglês, <i>ligant-metal charge transfer</i>
m	Multiplete (NMR)
MES	Ácido 2-[<i>N</i> -Morfolino]etanosulfônico
NIR	Infravermelho próximo, do inglês, <i>near infrared</i>
NMR	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear, do inglês, <i>nuclear magnetic resonance</i>
PAPs	Fosfatases Ácidas Púrpuras, do inglês, <i>purple acid phosphatases</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pK _a	Constante de acidez
ppm	Partes por milhão
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês, <i>ribonucleic acid</i>

s	Singleto (NMR)
t	Tripleto (NMR)
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
td	Triplo duplete (NMR)
TGS	Sulfato de triglicina, do inglês, <i>tryglice sulfate</i>
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
TS	Estado de transição, do inglês, <i>Transition State</i>
UV-Vis	Ultravioleta visível
V_0	Velocidade inicial
$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima
XRD	Difratometria de raios X, do inglês, <i>X-ray diffraction</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	A IMPORTÂNCIA DOS ÉSTERES DE FOSFATO.....	25
2.1.1	DNA	26
2.2	Metaloenzimas	27
2.2.1	Hidrolases e/ou Nucleases Sintéticas	29
2.3	Principais Propriedades dos íons Lantanídeos.....	34
2.3.1	Complexos de Lantanídeos como Hidrolases e/ou Nucleases	35
2.4	Segunda esfera de coordenação	39
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo Geral	42
3.2	Objetivos Específicos	42
4	METODOLOGIA	43
4.1	MATERIAIS E REAGENTES.....	43
4.2	MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO	44
4.2.1	Espectroscopia no Infravermelho (FTIR - ATR)	44
4.2.2	Espectroscopia Eletrônica (UV - Vis - NIR)	44
4.2.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (NMR)	44
4.2.4	Análise Elementar (C, H e N)	45
4.2.5	Espectrometria de Massa (ESI - MS (+))	45
4.2.6	Difratometria de raios X (XRD)	45
4.2.7	Titulação Potenciométrica	46
4.2.8	Experimentos Cinéticos	46
4.2.8.1	<i>Efeito do pH</i>	47
4.2.8.2	<i>Efeito da Concentração do Substrato</i>	48
4.2.8.3	<i>Determinação do Número de Ciclos Catalíticos</i>	49

4.2.8.4	<i>Reação Estequiométrica</i>	49
4.2.8.5	<i>Efeito Isotópico do Deutério</i>	49
4.2.8.6	<i>Efeito da Temperatura</i>	50
4.2.9	Testes de Interação do complexo com o DNA via Titulação	50
4.3	Procedimentos experimentais	52
4.3.1	Síntese do ligante	52
4.3.1.1	<i>Síntese do 3-(clorometil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (Cmff)</i>	52
4.3.1.2	<i>Síntese do 3-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (Bpmamff)</i> 53	
4.3.1.3	<i>Síntese do 2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metil-6-(((piridin-2-ilmetil)amino)metil)fenol (Hpy₃)</i>	54
4.3.1.4	<i>Síntese do 3-(((3-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (H₂L¹)</i>	56
4.3.1.5	<i>Síntese do Ligante 2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((3-(metilamino)propil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol (H₂L²)</i> 57	
4.3.2	Síntese do Complexo (La.H₂L²)	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Caracterização do Ligante e seus Precursores	59
5.1.1	Espectroscopia no Infravermelho (FTIR - ATR)	59
5.1.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (¹H NMR e ¹³C NMR) ..	61
5.1.3	Espectrometria de Massa (ESI - MS (+))	65
5.2	Caracterização do Complexo	67
5.2.1	Espectroscopia no Infravermelho (FTIR - ATR)	67
5.2.2	Espectroscopia Eletrônica (UV - Vis - NIR)	68
5.2.3	Espectrometria de Massa (ESI - MS (+))	70
5.2.4	Difratometria de Raios X (XRD)	73

5.2.5	Titulação Potenciométrica	77
5.3	Estudos de Reatividade.....	81
5.3.1	Reatividade Frente à Hidrólise 2,4-bdnpp	81
5.3.1.1	<i>Efeito do pH na Hidrólise do 2,4-bdnpp</i>	<i>81</i>
5.3.1.2	<i>Efeito da Concentração do Substrato na Hidrólise do 2,4-bdnpp</i>	<i>88</i>
5.3.1.3	<i>Efeito da Temperatura na Hidrólise do 2,4-bdnpp</i>	<i>92</i>
5.3.2	Reatividade Frente à Hidrólise 2,4-dnpp.....	94
5.3.2.1	<i>Efeito do pH na Hidrólise do 2,4-dnpp</i>	<i>95</i>
5.3.2.2	<i>Efeito da Concentração do Substrato na Hidrólise do 2,4-dnpp</i>	<i>99</i>
5.3.2.3	<i>Efeito da Temperatura na Hidrólise do 2,4-dnpp</i>	<i>103</i>
5.3.3	Testes de Interação do Complexo com o DNA via Titulação.....	105
6	CONCLUSÃO.....	108
	REFERÊNCIAS	107
	APÊNDICE	107

1 INTRODUÇÃO

Com o progresso da bioinorgânica nas mais diversas linhas de pesquisa, um tema que vem ganhando destaque é busca por pequenas moléculas capazes de clivar de maneira hidrolítica as ligações fosfodiésteres. A respeito dessa clivagem, modelos que se apresentam capazes de realizar a hidrólise dessas ligações no ácido desoxirribonucleico (DNA) tem atraído uma atenção especial na tentativa de elaboração e aplicação de fármacos (MCGEARY; SCHENK; GUDDAT, 2014). Atualmente, esses modelos são bem conhecidos e passaram a ser denominados como biomiméticos, ou seja, exercem a função de reproduzir propriedades físico-químicas dos catalisadores mais eficientes conhecidos na natureza: as enzimas, em especial as hidrolases e/ou nucleases.

Apesar das enzimas apresentarem diversas funções, algumas características limitam o seu emprego, como por exemplo, a dificuldade encontrada no processo de isolamento e purificação, que exigem um custo elevado além de uma complexa execução (R. FRANSSEN *et al.*, 2013). Logo, a modelagem de novos compostos que simulem a ação dessas enzimas (com foco nas hidrolases e/ou nucleases) é de grande interesse, principalmente no que diz respeito a segunda esfera de coordenação. Tal propriedade é apresentada como o conjunto de resíduos de aminoácidos que não estão ligados diretamente ao metal responsável pela catálise, mas que possuem função indispensável na eficiência e na seletividade dessas enzimas (MANN *et al.*, 2018). Dentro deste contexto, a atividade catalítica dos íons lantanídeos é notável quando comparada a outros metais de alto desempenho biológico, pois apresentam números de coordenação elevados, taxas rápidas de troca de ligantes e elevada estabilidade redox (FRANKLIN, 2001). Contudo, esses sistemas não são modelos que mimetizam propriamente a catálise enzimática, mas podem oferecer condições que se assemelham às observadas nos sítios ativos das enzimas. Tais complexos modelos, além de servirem para estudos biológicos, podem apresentar aplicações importantes, tais como atividades farmacológicas e catalisadores em processos industriais. Nesse âmbito, os complexos de La^{3+} apresentam um custo de produção muito inferior quando comparado aos outros metais da série lantanídica, como o Eu^{3+} e Gd^{3+} por exemplo.

Diante disso, o presente trabalho busca desenvolver um novo complexo de lantânio que seja capaz de atuar como catalisador na hidrólise de ésteres de fosfato. A motivação deste trabalho se dá pela carência de estudos envolvendo efeitos de segunda esfera de coordenação

aplicados à complexos lantanídicos em catálise homogênea. Logo, busca-se avaliar se a inserção de um grupamento amínico ao ligante possui uma influência positiva durante a catálise, contribuindo dessa maneira com o estudo de novos modelos funcionais aplicados a processos hidrolíticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tendo como objetivo o entendimento do porquê em desenvolver novos modelos que atuem efetivamente na hidrólise ésteres de fosfato e quais parâmetros podem ser modificados para se obter uma melhor resposta frente à clivagem, alguns tópicos devem ser elucidados. Nesta seção, será abordada a importância dos ésteres de fosfato na natureza, bem como as enzimas e modelos sintéticos que catalisam a hidrólise de ligações P-O. Por fim, uma descrição sobre o que se tem buscado a respeito desses modelos com base em metais da série lantanídica e suas principais propriedades como catalisadores no que diz respeito a reações de hidrólise serão discutidas.

2.1 A IMPORTÂNCIA DOS ÉSTERES DE FOSFATO

Os ésteres de fosfato formam uma classe de compostos extremamente abrangentes, sendo classificados em monoésteres, diésteres e triésteres de acordo com o número de grupos alquila ou arila presentes na estrutura.

Sabe-se que os triésteres de fosfato possuem uma ampla aplicação industrial, como a preparação de polímeros organofosforados, plastificantes, complexantes de metais pesados, inseticidas, pesticidas e outros compostos tóxicos (DOMINGOS *et al.*, 2003). No entanto, não desempenham nenhuma função biológica, diferentemente dos diésteres e monoésteres, sendo que este último, principalmente derivados da tirosina, serina e treonina estão presentes em diversos processos de sinalização e regulação da atividade biológica (BARFORD; DAS; EGLOFF, 1998).

Os ésteres de fosfato são conhecidos por apresentarem uma elevada resistência a mecanismos hidrolíticos, sendo a clivagem de fosfatos orgânicos extremamente desfavorável até mesmo para moléculas menores, como verificado na reação de hidrólise espontânea do difenilfosfato que possui um ($t_{1/2}$) de 180 anos a 100 °C (KHAN; KIRBY, 1970).

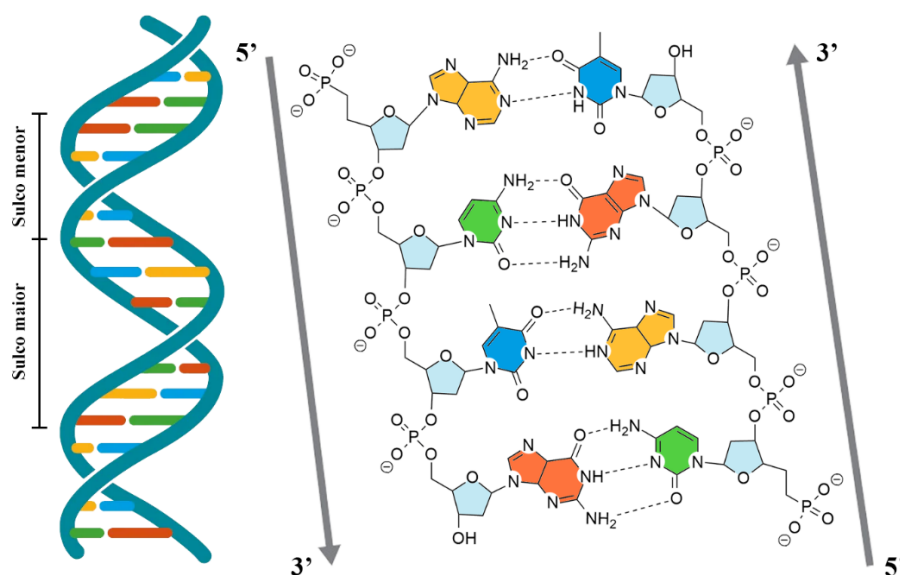
No que diz respeito aos diésteres de fosfato, este grupamento se encontra presente nas estruturas de diversas coenzimas e na estrutura do próprio ácido desoxirribonucleico (DNA), sendo que as funções executadas por esta molécula são pré-requisitos para que a própria vida ocorra. Desta maneira, a natureza selecionou o DNA e o ácido ribonucleico (RNA) para o armazenamento e transporte de informações genéticas devido à elevada estabilidade das

ligações fosfodiésteres, que conforme reportado, apresentam um tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de 13×10^4 a 10^6 anos para o DNA e 4×10^3 anos para o RNA a 25 °C em pH biológico (HEGG *et al.*, 1999).

2.1.1 DNA

De um modo geral, o DNA consiste em um longo polímero linear constituído de monômeros chamados nucleotídeos. Em 1953, Watson e Crick demonstraram que o DNA é composto por duas cadeias polinucleotídicas enoveladas em torno de um eixo, as quais formam uma estrutura de dupla-hélice. O pareamento dessas cadeias dá origem a duas cavidades denominadas sulco maior e sulco menor (WATSON; CRICK, 1953), como ilustradas na Figura 1.

Figura 1. Representação da estrutura tridimensional do DNA mostrando a interação entre os nucleotídeos, o esqueleto açúcar-fosfato, os sulcos maiores e menores da molécula, bem como as ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas.



Fonte: Adaptado de WATSON; CRICK, 1953.

Nota-se que os nucleotídeos estão ligados covalentemente via grupos fosfato, nas quais o grupo 5'-fosfato de uma unidade nucleotídica está ligado ao grupo 3'-hidroxila de outro, criando uma ligação fosfodiéster. As bases nitrogenadas são divididas em dois grupos denominados pirimidinas e purinas, sendo que o DNA contém duas bases púricas principais, adenina (A) e guanina (G), bem como duas pirimidinas, citosina (C) e timina (T), originando a

sequência ATCG, sendo que a (A) se encontra ligada com a (T) enquanto a (C) se liga com a (G) através de ligações de hidrogênio.

A estrutura geral covalente dos ácidos nucleicos consiste em fosfatos e resíduos de pentose alternados, sendo que as bases nitrogenadas podem ser consideradas como grupos laterais ligados em intervalos regulares. A estrutura do DNA possui propriedades hidrofílicas, no qual os grupos hidroxilas presentes na estrutura da pentose formam ligações de hidrogênio com a água em meio biológico. No que se refere aos grupos fosfato, os mesmos se apresentam completamente desprotonados e conseqüentemente carregados negativamente a pH neutro (LEHNINGER; NELSON; COX, 2013).

Todas essas características apresentadas fazem com que o DNA possua uma elevada estabilidade frente à mecanismos hidrolíticos, a qual dificulta sua manipulação como expressão, duplicação, reparação de danos e eliminação de DNA estranho. Tais problemas podem ser contornados através da ação de metaloenzimas que possuem a capacidade de clivar eficientemente o DNA, sendo que propostas mecanísticas da atuação dessas enzimas atraíram uma atenção especial nos últimos anos no que diz respeito à química biomimética, principalmente no desenvolvimento de novas drogas que atuem no combate ao câncer (SHIJU; ARISH; KUMARESAN, 2017), (ASADI *et al.*, 2017), (JASTRZĄB *et al.*, 2019).

2.2 METALOENZIMAS

Segundo o *Gold Book* da IUPAC, as metaloenzimas são definidas como: “Uma enzima que, no estado ativo, contém um ou mais íons metálicos, os quais são essenciais para sua função biológica” (“The IUPAC Compendium of Chemical Terminology”, [s.d.]). Sabe-se que as enzimas possuem um poder catalítico extraordinário, geralmente muito maior do que os catalisadores sintéticos. Elas têm um alto grau de especificidade para os seus respectivos substratos, aceleram as reações químicas e atuam em soluções aquosas sob condições suaves de temperatura e pH, sendo que poucos catalisadores não biológicos têm este conjunto de propriedades. Para desempenhar suas atividades, algumas enzimas não requerem nenhum outro grupo químico além de seus resíduos de aminoácidos, que se organizam de forma a criar microambientes que favoreçam determinadas reações químicas, enquanto que outras necessitam de componentes químicos adicionais conhecidos como cofatores, os quais podem ser íons metálicos e/ou moléculas orgânicas. Quando o cofator se liga covalentemente à parte

proteica da enzima, este recebe a denominação de grupo prostético (LEHNINGER; NELSON; COX, 2013).

As enzimas são classificadas internacionalmente com base no tipo de reação que elas catalisam, como por exemplo as hidrolases, que são enzimas capazes de clivar de maneira hidrolítica uma variedade de ligações químicas, tais como: Ésteres, éteres, amidas e entre outros. Esta classificação segue as normas adotadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), apresentada na Tabela 1 (GERARD P. MOSS, 2018).

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo a IUBMB.

Nº da classe	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxirredutases	Transferência de elétrons.
2	Transferases	Reações de transferência de grupos.
3	Hidrolases	Reações de hidrólise.
4	Liasas	Clivagem de C-C, C-O, C-N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas.
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares.
7	Translocases	Catalisa a translocação de prótons, íons inorgânicos, aminoácidos, carboidratos e etc.

Fonte: Adaptado de GERARD P. MOSS, 2018.

Embora as enzimas sejam os catalisadores mais eficientes conhecidos e possuam uma ampla aplicação nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, algumas características limitam o seu emprego em larga escala, como: baixa estabilidade térmica, alta sensibilidade ao pH e baixa tolerância frente a solventes orgânicos (FRANSSEN *et al.*, 2013). Outro fator que contribui para isto está na dificuldade no processo de isolamento e purificação, que exigem um custo elevado e uma complexa execução.

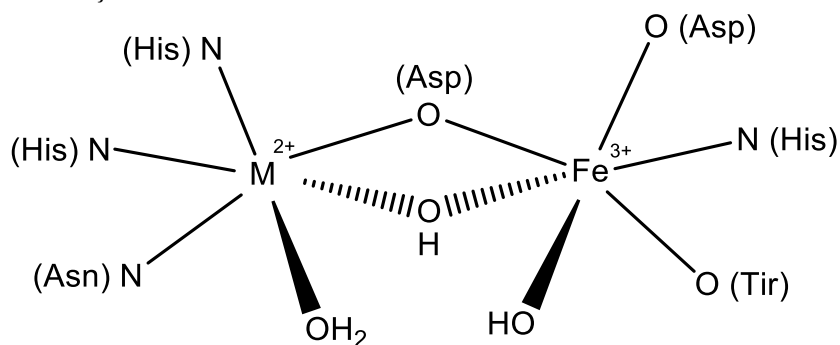
Logo, com o desígnio de manter as propriedades proficuas das enzimas e excluir esses malefícios, pesquisadores desenvolvem diversos modelos biomiméticos com aproximações estruturais e funcionais a esses compostos para as mais diversas aplicações (CHEN; WU, 2019). Este processo de modelagem envolve várias etapas de um trabalho minucioso, onde metais (geralmente de transição) são empregados para mimetizar o sítio ativo da enzima alvo e ligantes com efeitos de segunda esfera de coordenação são elaborados a fim de se obter comportamentos

semelhantes aos resíduos de aminoácidos. Esses estudos 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, contribuindo fortemente para o desenvolvimento de uma nova classe de compostos conhecidos como hidrolases e/ou nucleases sintéticas (PATHAK *et al.*, 2018), (BILAL; IQBAL, 2019), (JIANG; YOU; ZHANG, 2019).

2.2.1 Hidrolases e/ou Nucleases Sintéticas

Nas últimas décadas, a busca pelo o desenvolvimento de biomiméticos capazes de realizar hidrólise de substratos modelos (hidrolases) e/ou de ácidos nucleicos (nucleases) tem aumentado, tal fato é reflexo da ampla utilização desses catalisadores no desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos (MITIĆ *et al.*, 2006), (SCHENK *et al.*, 2013), (McGEARY; SCHENK; GUDDAT, 2014). Dentro desse contexto, a busca por complexos modelos às enzimas fosfatases ácidas púrpuras (PAPs), as quais, se supõe que estejam envolvidas em processos de osteoporose e câncer nos ossos, tem recebido uma notável atenção (MOHD-PAHMI *et al.*, 2011). As PAPs são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ésteres de fosfato e anidridos em meio ácido. Esta enzima se encontra presente em plantas, animais e em algumas bactérias, sendo pertencente à família das metalohidrolases dinucleares de valência mista ($M^{3+}M^{2+}$) (Figura 2), onde o metal trivalente é o Fe^{3+} e o metal divalente pode ser composto por: Fe em mamíferos, Mn ou Zn em plantas e fungos (SCHENK *et al.*, 2013). As PAPs binucleares de ferro se apresentam de duas formas: A inativa de coloração púrpura, a qual possui um sítio de $Fe^{3+} - Fe^{3+}$ e a cataliticamente ativa, que possui uma coloração rosa e é formada por um centro de $Fe^{3+} - Fe^{2+}$. A coloração dessas enzimas se dá devido a uma transição de transferência de carga ligante-metal (LMCT) de um resíduo de tirosina para o átomo de Fe^{3+} do centro binuclear (MITIĆ, 2006). As funções das PAPs apesar de diversas, ainda não foram totalmente elucidadas, mas se sabe que algumas delas estão relacionadas a processos de absorção óssea, transporte de ferro em fetos suínos e até mesmo na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (McGEARY; SCHENK; GUDDAT, 2014).

Figura 2. Representação estrutural do centro ativo das PAPs.

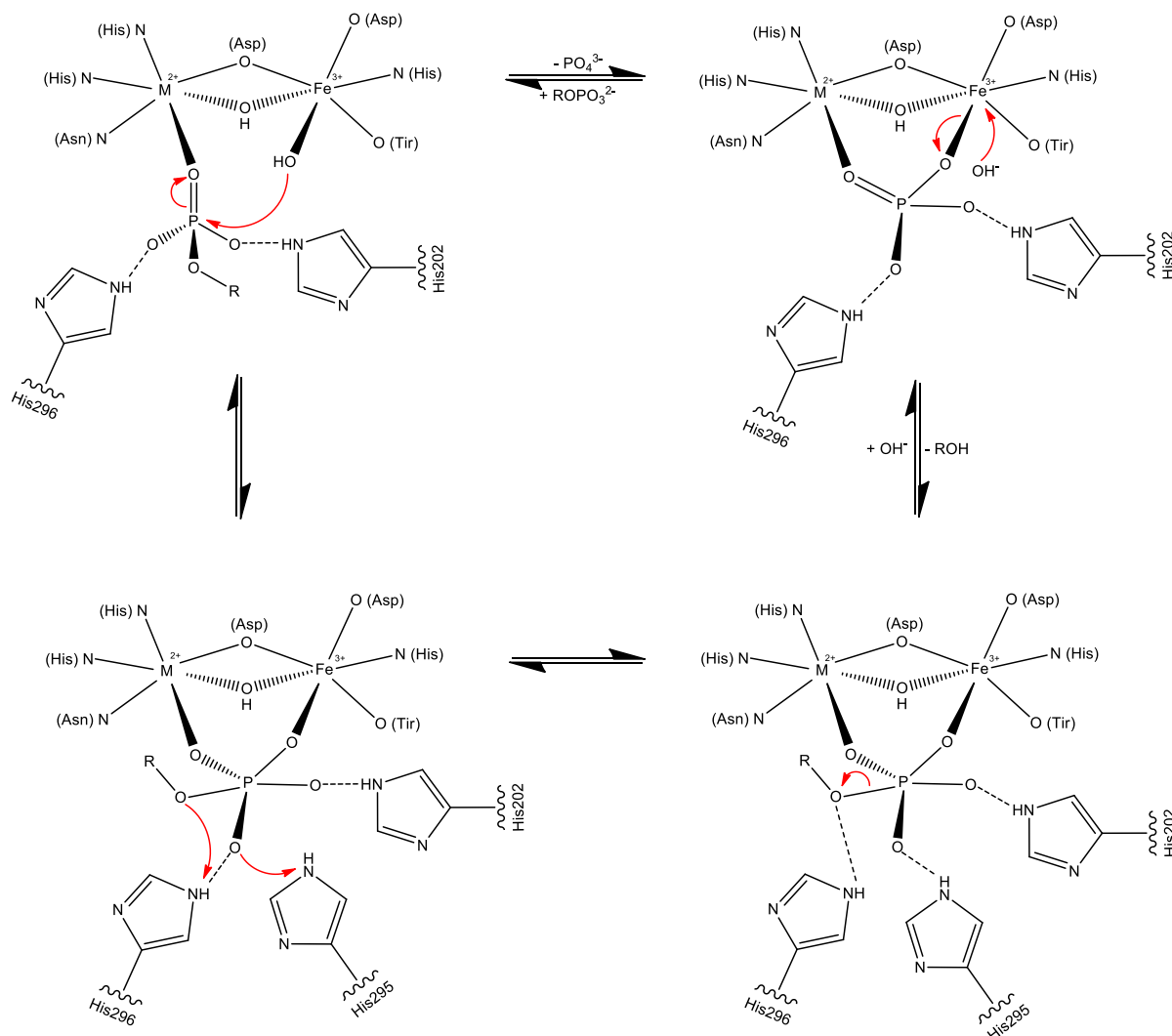


Fonte: Adaptado de SCHENK *et al.*, 2013.

Uma característica interessante a respeito dessas enzimas são os efeitos de segunda esfera de coordenação. Um trabalho reportado por Funhoff e colaboradores (2005) mostrou que três resíduos de histidina (His) (não coordenadas) exercem um papel fundamental na catálise, sendo que se houver a substituição das mesmas por alanina, uma redução significativa na atividade ocorrerá (FUNHOFF *et al.*, 2005).

A primeira proposta mecanística para tal reação foi desenvolvida por Klabunde e colaboradores (Figura 3) (STRATER *et al.*, 1995), onde se sugere que primeiramente o substrato se liga de maneira monodentada ao metal divalente e após a coordenação, o átomo de fósforo sofre um ataque nucleofílico através de um íon hidróxido coordenado no centro de Fe^{3+} . A inversão de configuração do átomo de fósforo durante a catálise indica que a reação ocorre via um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular, dando origem à formação de um estado de transição (TS) onde o fósforo se encontra pentacoordenado, sendo que esse intermediário gerado é estabilizado pelos resíduos de histidina não coordenados através de ligações de hidrogênio (MUELLER *et al.*, 1993). Após ataque nucleofílico e a liberação do álcool ou alcoxó, o substrato se coordena ao sítio ativo de maneira bidentada. Posteriormente, uma molécula de água ataca o centro de Fe^{3+} , liberando o produto da reação e reestabelecendo dessa maneira a espécie ativa. É importante ressaltar que outros autores também desenvolveram outras propostas mecanísticas para a ação das hidrolases binucleares frente a clivagem de ésteres de fosfato com diferenças na identidade do nucleófilo. Alguns autores por exemplo, reportaram que uma ponte $\mu\text{-OH}$ entre os centros metálicos seria o nucleófilo da reação (WANG *et al.*, 2000), (MERKX; AVERILL, 1999). Outros estudos realizados com a fosfatase extraída de batata doce ($\text{Fe}^{3+}\text{Mn}^{2+}$), evidenciaram a presença de uma ponte oxo a pH 4,90 como nucleófilo da reação (SCHENK *et al.*, 1999).

Figura 3. Mecanismo proposto por Klabunde e colaboradores para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAPs.



Fonte: Adaptado de (STRATER *et al.*, 1995).

Devido à elevada relevância dessas enzimas, ao longo dos anos diversos modelos biomiméticos começaram a serem elaborados levando em conta tantos os efeitos da primeira esfera de coordenação quanto os de segunda esfera, em destaque estão os trabalhos relatados por Neves e colaboradores.

Em 2007, um complexo biomimético que apresentava propriedades estruturais e funcionas similares às PAP's foi reportado (NEVES *et al.*, 2007) sendo que tal modelo foi o primeiro reportado na literatura que possuía um centro bimetalúlico de $\{Fe^{3+} - (\mu-OH) - Zn^{2+}\}$. Desde então, os autores vêm buscando novos compostos de coordenação que apresentassem

um sistema favorável para a realização da hidrólise de ésteres de fosfatos, tendo contribuições em vários artigos publicados na última década (PERALTA *et al.*, 2010), (XAVIER *et al.*, 2011), (OSÓRIO *et al.*, 2012), (DE SOUZA *et al.*, 2013), (MUXEL *et al.*, 2014), (CAMARGO *et al.*, 2015), (XAVIER; NEVES, 2016), (SILVA *et al.*, 2017), (AURAS *et al.*, 2018), (PEREIRA *et al.*, 2019).

Outros autores também têm colaborado no desenvolvimento e síntese de modelos capazes de clivar ligações de ésteres de fosfato via hidrolítica (MITIĆ *et al.*, 2006), (SILVA *et al.*, 2011), (DESBOUIS *et al.*, 2012), (MANCIN; SCRIMIN; TECILLA, 2012), (DAUMANN *et al.*, 2014), (REBILLY *et al.*, 2015), (HORN JR. *et al.*, 2018), (ADHIKARY *et al.*, 2018), (YU; COWAN, 2018), (PATHAK *et al.*, 2018).

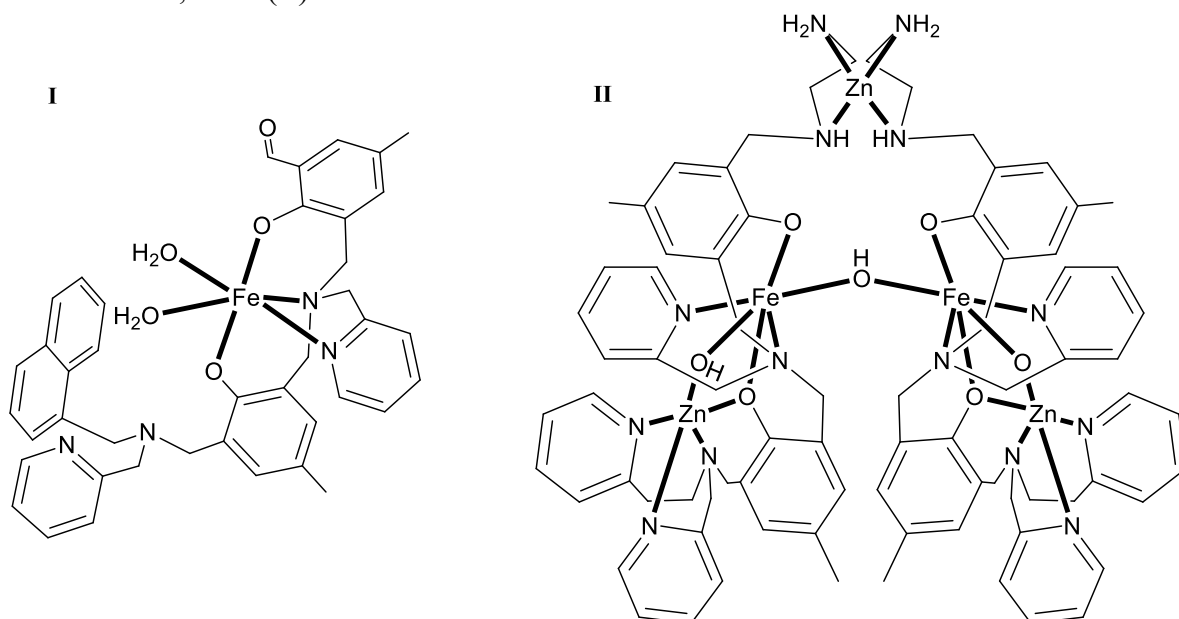
A maioria dos estudos reportados para hidrolases são relacionados a sistemas binucleares contendo $M^{3+} = Fe$ e $M^{2+} = Zn$ ou Cu . No entanto, Greatti e colaboradores (2008) desenvolveram dois complexos binucleares de Ni^{2+} a partir de ligantes contendo anéis piridínicos e imidazólicos. Os complexos se demonstraram eficientes frente à hidrólise do 2,4-bdnpp, possuindo fatores catalíticos na ordem de 10^5 e 10^6 vezes quando comparados à reação não catalisada (GREATTI *et al.*, 2008). Tempos depois, Oliveira e colaboradores (2009) relataram um complexo mononuclear Cu^{2+} que apresentou uma elevada atividade frente à hidrólise do DNA (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Os modelos mononucleares apresentam algumas propriedades interessantes que diferem dos sistemas binucleares, como por exemplo um mecanismo colaborativo descrito por Heying e colaboradores (2019). Tal trabalho foi relatado pelos autores como o primeiro complexo mononuclear de Fe^{3+} capaz de clivar as ligações diéster e monoéster do 2,4-bdnpp (Figura 4-I). O mecanismo proposto para a reação de hidrólise necessita de uma ação colaborativa entre duas unidades mononucleares do complexo, onde uma é responsável pela coordenação do substrato enquanto a outra gera o nucleófilo em sua esfera de coordenação (HEYING *et al.*, 2019).

Alguns modelos miméticos contendo números variados de metais no centro ativo também foram reportados recentemente, como é o caso do complexo elaborado por Maranha e colaboradores (2019), onde duas unidades binucleares de $\{Fe^{3+} - (\mu-OH) - Zn^{2+}\}$ se encontram conectadas através de uma ponte $\mu-OH$, enquanto um terceiro íon de Zn^{2+} aparece coordenado através das aminas terminais do ligante, dando origem a um complexo pentanuclear $\{[Fe_2^{3+} - (\mu-OH_3) - Zn_2^{2+}]Zn^{2+}\}$ (Figura 4-II). O complexo apresentou uma diminuição de 40% na eficiência catalítica de hidrólise do diéster bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-bdnpp) em

comparação ao seu análogo binuclear reportado por Neves *et al.*, 2007, demonstrando que, neste caso, a inserção de mais centros metálicos a esse sistema desfavorece a coordenação do substrato (constante de associação (K_{ass}) foi reduzido pela metade em relação ao binuclear) (MARANHA *et al.*, 2019).

Figura 4. Representação estrutural dos complexos reportados por Heying *et al.*, 2019 (I) e Maranha *et al.*, 2019 (II).



Fonte: Adaptado de HEYING *et al.*, 2019 e MARANHA *et al.*, 2019.

Tendo em vista todos os trabalhos apresentados nesta seção, muitos compostos são capazes de clivar ligações fosfodiésteres e/ou DNA, no entanto, a atividade catalítica dos compostos biomiméticos desenvolvidos ainda é baixa comparada a da enzima. Logo, para melhorar a eficiência destes modelos outras alternativas devem ser tomadas, as quais não contemplem apenas a reprodução do sítio catalítico da enzima com a utilização de metais biodisponíveis, mas que englobem outros metais de interesse neste processo de modelagem, como por exemplo os íons lantanídeos.

2.3 PRINCIPAIS PROPRIEDADES DOS ÍONS LANTANÍDEOS

A química dos lantanídeos se iniciou na Escandinávia por volta de 1794, quando Johann Gadolin conseguiu obter uma 'terra' (óxido) de um mineral preto posteriormente conhecido como gadolinita. Tempos depois outros minerais foram descobertos, como é o caso da cerita e da allanita, os quais possuem majoritariamente cério e lantânio em seu retículo cristalino. No entanto, meio século se passou até que o sueco Mosander conseguiu separar essas terras em seus óxidos componentes. Não era possível prever quantos desses elementos existiam até 1915, quando Henry Moseley descobriu a relação direta entre o número atômico de um elemento químico com o seu respectivo espectro de raios X, possibilitando dessa maneira a organização periódica de tais elementos (COTTON, 2006).

Os lantanídeos representam uma família numerosa de 15 elementos, sendo usualmente denominados, juntamente com Sc e Y, como “terras raras”. Tal nomenclatura não é adequada pois com exceção ao promécio, que não possui isótopos estáveis, os demais elementos apresentam uma abundância considerável na crosta terrestre. O elemento lantânio, por exemplo, possui maior abundância que o iodo na crosta terrestre. Os elementos dessa série normalmente são encontrados no estado de oxidação +3, com configurações eletrônicas do tipo $[Xe] 4f^n$ ($n = 0 - 14$), o que se deve à elevada energia de ionização do quarto elétron. Esta propriedade é reflexo da localização dos orbitais $4f$ que possuem uma distribuição radial mais próxima do núcleo que os orbitais preenchidos $5d$, $6s$ e $6p$ (COTTON, 2006).

Devido aos orbitais f serem internos, os elétrons destes participam de ligações químicas, porém, estas formadas com alto caráter eletrostático, já que a presença de outros orbitais mais externos preenchidos dificulta as sobreposições efetivas entre metal e ligantes. Outra propriedade derivada da distribuição radial dos orbitais f é a contração lantanídica, que se refere a uma menor diminuição do raio atômico do metal à medida que o número atômico aumenta quando comparado aos elementos dos blocos s , p e d (COTTON, 2006).

Tendo em vista o caráter iônico das ligações, quando formados complexos com íons desta série, as propriedades espectrais dos íons lantanídeos são minimamente perturbadas pela interação com o ligante, resultando em estreitas bandas $f - f$ de emissão e de absorção, geralmente característicos de cada íon metálico. Ainda, em relação a interação com os ligantes, o alto caráter iônico das ligações juntamente com os altos raios iônicos, propicia elevados números de coordenação. Logo, o poliedro de coordenação desses complexos é determinado predominantemente por efeitos de repulsão ligante-ligante.

Os íons lantanídeos possuem características de ácidos duros de Pearson e formam complexos mais estáveis com bases duras. Logo, estes metais não possuem valores de constantes de equilíbrio elevadas quando em contato com ligantes amínicos. Ainda com relação à primeira esfera de coordenação desses íons, em solução aquosa o número típico de moléculas de água coordenadas pode variar de 7 a 9 para íons menores (Lu^{3+}) e maiores (La^{3+}), respectivamente (CHOPPIN, 1989)

Estudos mostraram que íons lantanídeos livres em solução possuem uma elevada performance frente à clivagem de ligações fosfodiésteres (TSANG; NEVEROV; BROWN, 2003), (MEJÍA-RADILLO; YATSIMIRSKY, 2003). No entanto, tal aplicação possui algumas limitações, como por exemplo, em soluções básicas há a tendência de o metal precipitar na forma de seu hidróxido correspondente, sendo assim, a complexação desses metais à ligantes contendo sítios duros se apresenta como uma ótima alternativa para contornar esse problema.

Tendo em vista estas características intrínsecas dos lantanídeos, fatores como o ambiente de coordenação destes íons contribuem para formar um sistema termodinamicamente estável e altamente eficiente na catálise de ligações de ésteres de fosfato, tornando esses complexos modelos promissores de nucleases artificiais (LI *et al.*, 2016), (HUANG; VAZIN; LIU, 2016).

2.3.1 Complexos de Lantanídeos como Hidrolases e/ou Nucleases

Os sistemas biológicos desenvolveram enzimas nucleases capazes de catalisar a clivagem da fita do DNA, sendo que muitas dessas enzimas hidrolíticas são metaloenzimas, as quais utilizam ácidos duros como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+} tanto para ativar a ligação P-O quanto para gerar o nucleófilo. Nesta perspectiva, os íons lantanídeos atuam como ótimos ácidos de Lewis, possuindo números de coordenação elevados, taxas rápidas de troca de ligantes e elevada estabilidade redox (FRANKLIN, 2001).

Sabe-se que um processo de clivagem hidrolítica possui vantagens em relação ao oxidativo. A clivagem oxidativa do DNA produz radicais livres, ou seja, para aplicações em biologia molecular esses radicais resultam em cadeias que não podem ser religadas enzimaticamente e no caso de aplicações clínicas, a clivagem oxidativa pode causar danos à célula. Nos últimos anos, houve um grande interesse no desenvolvimento de complexos capazes de atuarem na hidrólise do DNA, embora esses sistemas preferencialmente devem ser ajustados

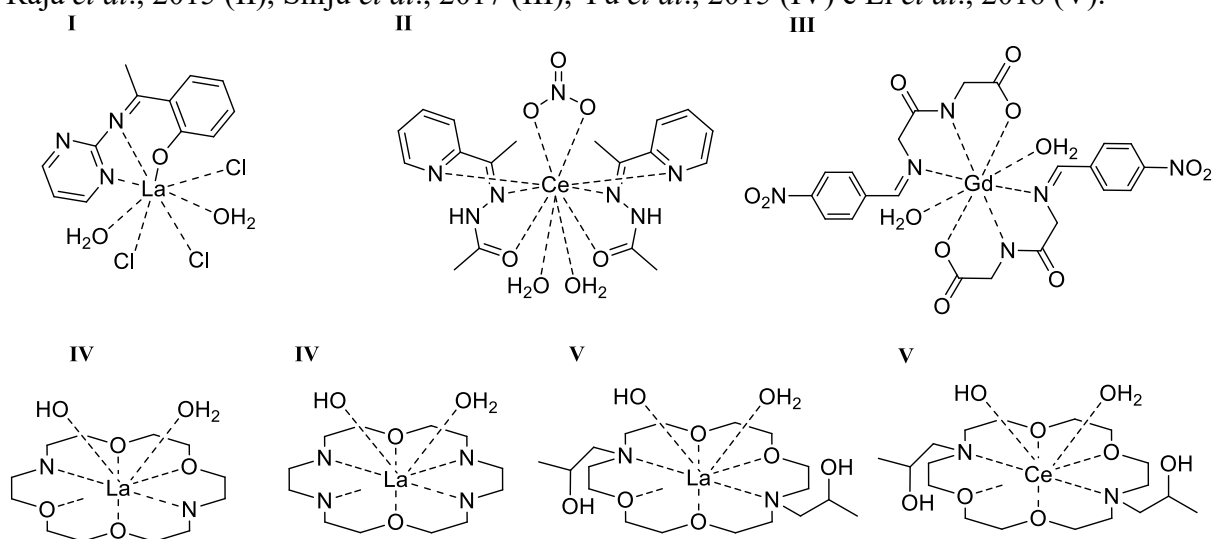
para promover um mecanismo hidrolítico do que um oxidativo. Logo, por esses motivos há um campo completamente aberto para o desenvolvimento de novas nucleases sintéticas baseadas em íons lantanídeos (HEGG; BURSTYN, 1998), (ASADI *et al.*, 2017), que apesar de não serem modelos estruturais das hidrolases, apresentam características específicas da ação enzimática, ou seja, apresentam unicamente a função de realizar a hidrólise de ligações P-O, sendo denominadas como modelos funcionais.

Os primeiros complexos lantanídicos atuando como nucleases descritos na literatura foram desenvolvidos a partir de ligantes macrocíclicos formados por bases de Schiff. Em 1992 Morrow e colaboradores foram os primeiros a mostrar que íons Ln^{3+} complexados com bases de Schiff podiam catalisar hidroliticamente o RNA (MORROW; BUTTREY; BERBACK, 1992).

Anos mais tarde, Gómez-Tagle e colaboradores (2001) realizaram estudos de reatividade frente à hidrólise de ésteres de fosfato ao longo da série lantanídica, utilizando-se dos metais complexados ao ligante-tampão bis-tris-propano (BTP). Os resultados mostraram que a atividade catalítica cresce com o aumento do raio iônico, pois ao se tratar dos íons lantanídeos coordenados se deve levar em conta que um aumento na eletrofilicidade do cátion (crescimento da densidade de carga) pode levar a um decréscimo na basicidade dos hidróxidos ligados (GÓMEZ-TAGLE; YATSIMIRSKY, 2001)

Mais recentemente, a modelagem de complexos lantanídicos que atuem na hidrólise de ésteres de fosfato vem sendo mais bem explorada. Alguns dos trabalhos mais relevantes abordam a clivagem do DNA através de complexos contendo: macrociclos, éteres ou aza coroas, bases de Schiff derivadas da glicilglicina, derivados de benzilhidrazonas, polioxometalatos, nanopartículas magnéticas revestidas com quitosona, entre outros (YU; XIE, 2014), (MOHANAN *et al.*, 2014) (Figura 5-I), (YU *et al.*, 2015) (Figura 5-IV), (RAJA; SUSEELAMMA; REDDY, 2015) (Figura 5-II), (RAJA; SUSEELAMMA; REDDY, 2016), (LUONG *et al.*, 2016), (LI *et al.*, 2016) (Figura 5-V), (SHIJU; ARISH; KUMARESAN, 2017) (Figura 5-III), (ASADI *et al.*, 2017).

Figura 5. Representação estrutural dos complexos reportados por Mohanan *et al.*, 2014 (I), Raja *et al.*, 2015 (II), Shiju *et al.*, 2017 (III), Yu *et al.*, 2015 (IV) e Li *et al.*, 2016 (V).



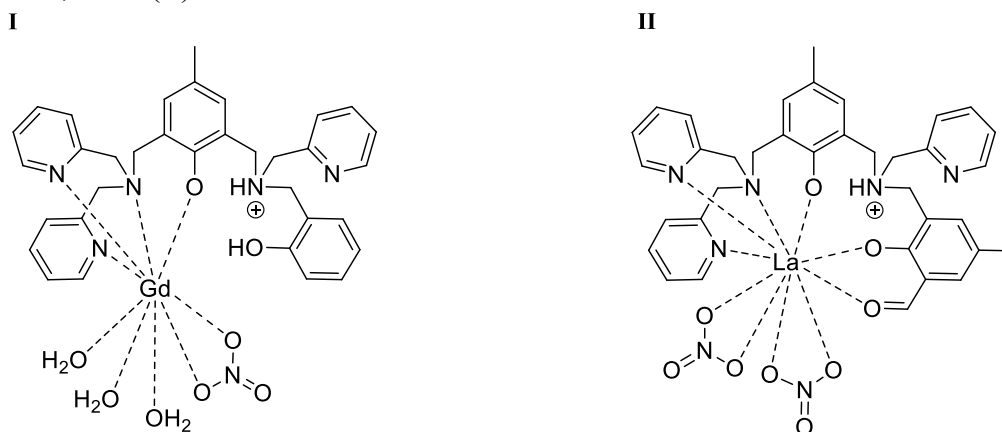
Fonte: Adaptado de MOHANAN *et al.*, 2014, RAJA *et al.*, 2015, SHIJU *et al.*, 2017, YU *et al.*, 2015 e LI *et al.*, 2016.

Camargo e colaboradores também deram suas contribuições a esses sistemas, sintetizando complexos lantanídicos coordenados a aminas e fenolatos de ligantes multidentados, os quais apresentaram uma elevada eficiência catalítica na hidrólise de ésteres de fosfato (CAMARGO *et al.*, 2008), (CAMARGO *et al.*, 2010a), (CAMARGO *et al.*, 2010b). Em especial, o complexo de Gd^{3+} (Figura 6-I) que contribuiu com um aumento na velocidade de reação de aproximadamente 100 milhões de vezes em comparação com a auto-hidrólise do 2,4-bdnpp (CAMARGO *et al.*, 2008).

No entanto, não são encontrados na literatura trabalhos que relacionem efeitos de segunda esfera de coordenação aplicados a complexos lantanídicos. Muxel e colaboradores (2014) foram os primeiros a explorar tal efeito em um complexo mononuclear de La^{3+} que possui atividade de monoesterase e diesterase, o qual apresentou um aumento de 28,000 vezes na velocidade de hidrólise do 2,4-bdnpp (Figura 6-II). Os autores sugerem que quando o complexo se encontra covalentemente ligado à sílica funcionalizada 3-aminopropil, ocorre a formação de uma espécie binuclear, cuja eficiência catalítica é 3 vezes maior quando comparada à espécie sem efeitos de segunda esfera (MUXEL *et al.*, 2014). Devido à baixa solubilidade do complexo ancorado em sílica alguns estudos em solução não foram realizados, dificultando a quantificação das espécies presentes no sistema durante a cinética. Desse modo, a elaboração

de ligantes com efeitos de segunda esfera que mantenham o catalisador solúvel no meio cinético são altamente desejados.

Figura 6. Representação estrutural dos complexos reportados por Camargo *et al.*, 2008 (I) e Muxel *et al.*, 2014 (II).



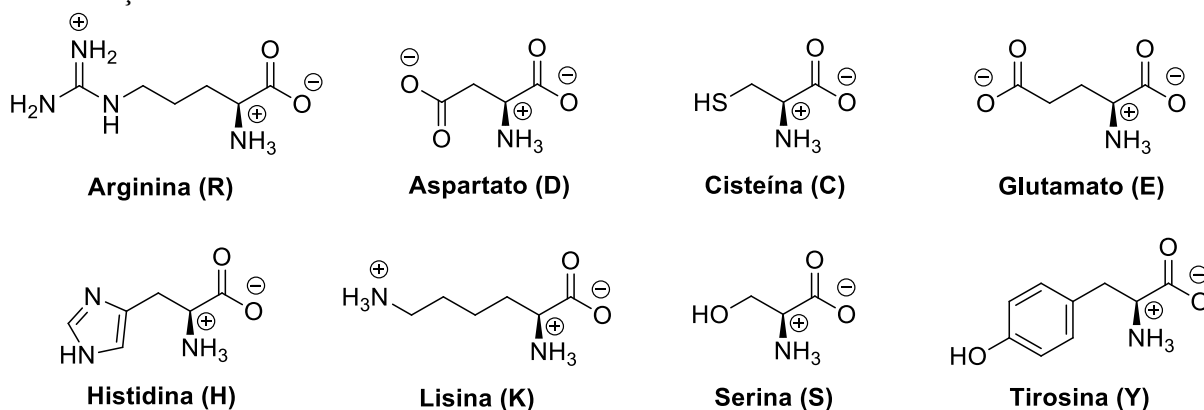
Fonte: Adaptado de CAMARGO *et al.*, 2008 e MUXEL *et al.*, 2014.

Como demonstrado, o desenvolvimento de eficientes complexos modelos para hidrolases e/ou nucleases derivados de íons lantanídeos mostraram-se de extrema relevância, entretanto ainda há muito que buscar nessa área. Esses sistemas não são modelos que mimetizam propriamente a catálise enzimática, mas podem oferecer condições que são semelhantes às observadas nos sítios ativos de enzimas. Dentro do emaranhado de efeitos que contribuem para o aumento da atividade catalítica destes complexos modelos, a segunda esfera de coordenação apresenta um papel de suma importância na eficiência destas moléculas, sendo que tais estudos aplicados a complexos lantanídicos são pouco explorados.

2.4 SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO

Denomina-se como segunda esfera de coordenação o conjunto de resíduos de aminoácidos que não estão ligados diretamente ao metal responsável pela catálise, mas que possuem função indispensável na eficiência e na seletividade das enzimas (MANN *et al.*, 2018). Os aminoácidos mais comumente encontrados na segunda esfera de coordenação são: arginina, aspartato, cisteína, glutamato, histidina, lisina, serina e tirosina (Figura 7), de modo que cada um contribui para a catálise de maneira específica.

Figura 7. Estruturas dos principais resíduos de aminoácidos encontrados na segunda esfera de coordenação das enzimas.



Fonte: Adaptado de NELSON e COX, 2014.

A tirosina, por exemplo, possui um anel aromático em sua estrutura que realiza interações hidrofóbicas com o substrato, auxiliando na orientação das espécies durante a catálise. Enquanto o glutamato e o aspartato são capazes de atuar em reações dependentes da transferência de prótons, utilizando os grupos carboxilas presentes em suas estruturas para desempenhar tal função (ZHAO *et al.*, 2013). Na lisina, arginina e histidina em pH fisiológico as amins se encontram protonadas, as quais contribuem através de interações eletrostáticas e/ou ligações de hidrogênio (HOLLIDAY; MITCHELL; THORNTON, 2009). A serina e cisteína possuem os grupos OH e SH, respectivamente, os quais podem atuar como nucleófilos durante um ataque hidrolítico ao substrato (NOTHLING *et al.*, 2017). Vários trabalhos já publicados na literatura visam a melhoria da atividade catalítica e seletividade de compostos biomiméticos com base nos efeitos de segunda esfera de coordenação tendo em vista seu papel na seletividade e melhor afinidade da enzima em relação ao substrato, fator que auxilia na

estabilização do estado de transição e muitas vezes é responsável pela geração do nucleófilo da reação (COOK; BOROVNIK, 2015), (MANN *et al.*, 2018), (L. SHOOK; S. BOROVNIK, 2008), (PIOVEZAN *et al.*, 2010), (DE SOUZA *et al.*, 2013), (BERNHARDT *et al.*, 2015), (CAMARGO *et al.*, 2018), (SIMMONS *et al.*, 2014), (REBILLY *et al.*, 2015), (SILVA *et al.*, 2017), (ZHAO *et al.*, 2013).

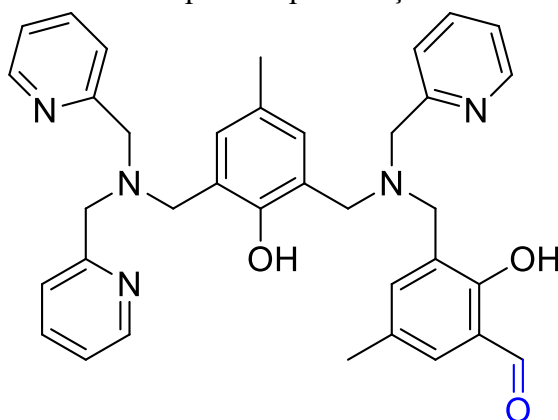
Desse modo, uma estratégia eficaz na elaboração de um composto biomimético é a inserção de grupos funcionais que possam simular o comportamento desses resíduos de aminoácidos. Um exemplo clássico é a utilização de grupamentos amina na cadeia lateral do mimético, os quais podem se assemelhar aos resíduos de lisina e histidina a pH fisiológico.

Há muitas maneiras de recriar o ambiente enzimático, modulando o ambiente químico dos ligantes com a adição de cadeias laterais que sejam ativas cataliticamente, como foi o caso do trabalho reportado por Silva e colaboradores (2017), onde o ligante da Figura 8 descrito por Piovezan e colaboradores (2010) sofreu algumas derivatizações através da inserção de diferentes aminas pelo grupamento aldeído da estrutura, aumentando em até oito vezes a eficiência catalíticas desses modelos em comparação ao modelo sem efeitos de segunda esfera (SILVA *et al.*, 2017).

Um outro trabalho de destaque foi reportado por De Souza e colaboradores (2015), o qual apresentou seis complexos com efeitos de segunda esfera de coordenação aplicados à hidrólise do 2-hidroxiopropil-4-nitrofenil-fosfato. A modelagem da segunda esfera partiu de um dendrímero de poliamidoamina que teve a sua massa molecular variada de 600 a 8000 g mol⁻¹. Os resultados indicaram que uma cadeia de 4000 g mol⁻¹ já é suficiente para representar o efeito de segunda esfera nesse caso, sendo que a inserção de mais grupos não apresentou mudanças significativas durante a catálise (DE SOUZA *et al.*, 2015).

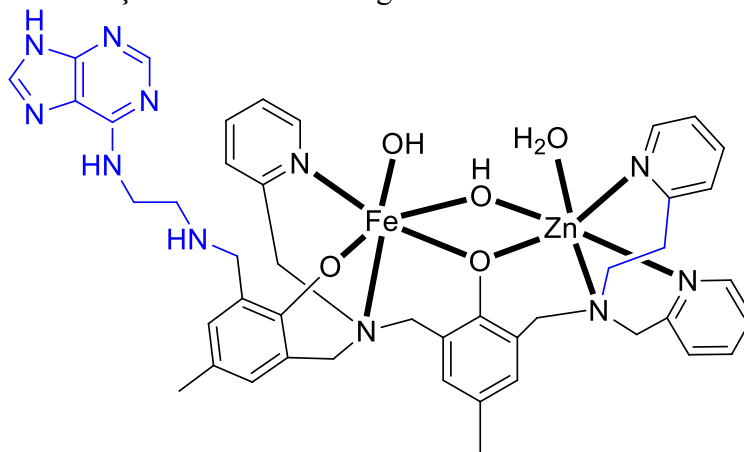
Recentemente, Pereira e colaboradores (2019) derivatizaram o ligante da Figura 8 através da adição de guanidina na segunda esfera de coordenação (Figura 9) e testaram tais efeitos na hidrólise de ésteres de fosfato. Essas modificações levaram a um significativo aprimoramento da afinidade de ligação e um aumento na eficiência catalítica desses modelos, sendo que os complexos também foram capazes de hidrolisar o DNA (PEREIRA *et al.*, 2019).

Figura 8. Representação da estrutura do ligante elaborado por Piovezan *et al.*, 2010. Em destaque azul o grupamento aldeído disponível para reações de substituições.



Fonte: Adaptado de PIOVEZAN *et al.*, 2010.

Figura 9. Representação estrutural do complexo elaborado por Pereira *et al.*, 2019. Em destaque azul as derivatizações realizadas no ligante.



Fonte: Adaptado de PEREIRA *et al.*, 2019.

Tendo em vista o que foi exposto, o presente trabalho busca desenvolver um novo complexo de lantânio que seja capaz de atuar como catalisador na hidrólise de ésteres de fosfato, utilizando como referência o trabalho desenvolvido por Muxel e colaboradores (2014), pois até o momento, é o único artigo reportado na literatura que envolve efeitos de segunda esfera de coordenação aplicados a complexos lantanídicos. Logo, a motivação deste trabalho se dá pela carência de tais estudos em catálise homogênea. Portanto, busca-se avaliar se a inserção de um grupamento amínico ao ligante sintetizado por Piovezan e colaboradores (2010) possui uma influência positiva durante a catálise, contribuindo dessa maneira com o estudo de novos modelos funcionais aplicados a processos hidrolíticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um novo complexo de lantânio como potencial catalisador em reações de hidrólise de ésteres de fosfato investigando efeitos de segunda esfera de coordenação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar um novo ligante N, O doador 2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((3-(metilamino)propil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol (H_2L^2);
- Sintetizar o complexo de lantânio empregando o ligante (H_2L^2) e posteriormente o caracterizar por análises elementares, espectroscópicas e espectrométricas;
- Realizar estudos em solução para o complexo obtido utilizando espectrometria de massas (ESI - MS (+)) e determinar as espécies e equilíbrios formados em solução por intermédio de estudos potenciométricos;
- Estudar a reatividade em meio homogêneo do complexo frente à hidrólise dos substratos: 2,4-bdnpp e 2,4-dnpp, monitorando espectrofotometricamente via UV - Vis a liberação do ânion 2,4-dnp;
- Realizar estudos de interação do complexo com o *Calf Thymus* - Ácido desoxirribonucleico (CT-DNA).

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os seguintes reagentes empregados nas sínteses e nas análises foram adquiridos de fontes comerciais e alguns utilizados com purificação prévia como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Reagentes, solventes e materiais utilizados no trabalho.

Reagentes/solventes/materiais	Pureza	Marca
<i>p</i> -Cresol	99,0%	Aldrich
Clorofórmio	99,8%	Vetec
Hidróxido de sódio	99,5%	Vetec
Ácido clorídrico	37,0%	Vetec
Sulfato de sódio anidro	99,0%	Lafan
Diclorometano	99,5%	Vetec
Argônio	5,0 Analítico	White Martins
2-piridinocarboxialdeído	Destilado	Aldrich
2-aminometilpiridina	Destilada	Aldrich
Tolueno	99,5%	Vetec
Hidrogênio	5,0 Analítico	White Martins
Trietilamina	Destilada	Vetec
Bicarbonato de sódio	99,7%	Aldrich
Isopropanol	99,5%	Lafan
Metanol	99,8%	Neon
Tetrahidrofurano	99,0%	Vetec
Borohidreto de sódio	99,0%	Aldrich
Cloreto de amônio	99,5%	Vetec
Carbonato de sódio	99,0%	Lafan
Nitrato de lantânio (III) hidratado	99,9%	Aldrich
<i>N</i> -metil-1,3-propanodiamina	Destilada	Aldrich
Ácido acético	99,7%	Vetec
Acetona	99,5%	Vetec
Acetonitrila	99,8%	Vetec
Acetonitrila UV/HPLC	99,9%	Tedia
Água deuterada	99,9%	Aldrich
Brometo de potássio	99,0%	Aldrich
Clorofórmio deuterado	99,0%	Aldrich
Acetonitrila deuterada	99,8%	Aldrich
Tampão biológico HEPES	99,5%	Aldrich
Tampão biológico MES	99,0%	Acros
Tampão biológico CHES	99,0%	Acros

4.2 MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

4.2.1 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR - ATR)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (UFSC) em um espectrofotômetro com Transformada de Fourier contendo um modo de Refletância Total Atenuada Horizontal (FTIR - ATR) da Perkin – Elmer modelo Spectrophotometer Spectrum 100, com cristal de ZnSe (45°) e um detector TGS (*triglycine sulfate*). As amostras foram dispostas diretamente sobre o cristal e analisadas no intervalo de 4000 - 400 cm^{-1} utilizando o ar ambiente como *background*.

4.2.2 Espectroscopia Eletrônica (UV - Vis - NIR)

Os espectros eletrônicos nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho próximo foram obtidos em um espectrofotômetro da Perkin - Elmer modelo Lambda - 750, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (UFSC). As análises em solução foram realizadas em um meio contendo acetonitrila/água (1:1 v/v), utilizando solventes de grau espectroscópico e celas de quartzo com capacidade para 4 mL e 1 cm de caminho óptico.

4.2.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

Os espectros de ^1H NMR e ^{13}C NMR foram registrados em um espectrômetro Bruker modelo AC 200 MHz, na Central de Análises do Departamento de Química (UFSC). Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em (ppm) utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ ppm) e empregando solventes deuterados nas leituras. As análises de 400 MHz foram realizadas pelo Prof. Dr. Fernando R. Xavier em um espectrômetro Bruker modelo FT - NMR Ascend400 instalado no Departamento de Química da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) *campus* de Joinville.

4.2.4 Análise Elementar (C, H e N)

As medidas para a determinação dos percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas em um analisador elementar de C, H, N, S e O da marca CE Instruments modelo EA 1110 CHNS - O, instalado na Central de Análises do Departamento de Química (UFSC).

4.2.5 Espectrometria de Massa (ESI - MS (+))

Os compostos sintetizados foram analisados via espectrometria de massa com ionização via eletrospray (ESI - MS (+)) pela técnica Vanessa Oliveira do Centro de Biologia Molecular Estrutural e pela mestrandia Jéssica Toigo. Os espectros foram obtidos no equipamento Amazon - Ions Trap MS. As análises foram realizadas em soluções (1:1 v/v) acetonitrila/água com vazão de $5 \mu\text{L min}^{-1}$ e concentração de aproximadamente 500 nmol L^{-1} . A temperatura do capilar foi mantida entre 180 e 200 °C e a voltagem do capilar entre 3500 e 4500 V. Alguns testes cinéticos também foram acompanhados via ESI - MS (+), tendo como finalidade elaborar uma proposta mecanística para o complexo. Para os espectros simulados utilizou-se do programa gratuito mMass (versão 5.5.0) (STROHALM, 2013).

4.2.6 Difractometria de raios X (XRD)

A análise por difratometria de raios X em monocristal foi realizada pelo Prof. Dr. Adailton J. Bortoluzzi na Central de Análises do Departamento de Química (UFSC). Os dados foram coletados em um difratômetro da Bruker modelo APEX II DUO usando radiação gerada por um tubo de molibdênio ($\text{MoK}\alpha \lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite. Durante a análise a amostra foi mantida à temperatura de 200 K. A estrutura cristalina foi resolvida através dos métodos diretos e refinada pelo método dos mínimos quadrados com matriz completa, utilizando-se os programas SIR97 e SHELXL-97 respectivamente (ALTOMARE et al., 1998), (SHELDRICK, 1997). As representações gráficas das estruturas moleculares foram geradas utilizando o programa PLATON (SPEK, 2009).

4.2.7 Titulação Potenciométrica

As constantes de protonação para o complexo determinadas por titulação potenciométrica foram realizadas em um titulador automático da Metrohm, modelo 844 Titrino Plus no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (UFSC). Esses Experimentos foram realizados em acetonitrila/água (1:1 v/v) com intuito de estudá-los no mesmo ambiente utilizado nos estudos de reatividade e também devido à baixa solubilidade do complexo em água. Utilizou-se um eletrodo indicador de vidro e um eletrodo de referência (Ag/AgCl), calibrado com uma solução de HCl ($0,010 \text{ mol L}^{-1}$) em acetonitrila/água e uma solução padrão de KOH ($0,100 \text{ mol L}^{-1}$) em água, para leitura direta de pH. A solução do complexo foi preparada com água (bidestilada previamente na presença de KMnO_4 e fervida) e acetonitrila de grau espectroscópico, com a força iônica ajustada para $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ com KCl. As medidas foram realizadas em uma célula termostatizada a $25,00 \pm 0,05 \text{ }^\circ\text{C}$, contendo o composto ($0,03 \text{ mmol}$) em 50 mL de solução acetonitrila/água (1:1 v/v), sob fluxo de argônio para eliminar a presença de CO_2 . A solução do composto teve o pH ajustado para próximo de 3,00 através da adição de $100 \text{ }\mu\text{L}$ de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, resultando em um volume final aproximado de $50,01 \text{ mL}$ e foram tituladas com uma solução padrão de KOH $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ com adições sucessivas de $0,05 \text{ mL}$ até $\text{pH} = 12,50$ por meio de um dosador automático do próprio equipamento. O valor de pK_w da solução acetonitrila/água utilizado para os cálculos, foi 15,40 (HERRADOR; GONZÁLEZ, 2002). As constantes de equilíbrio foram calculadas com o programa BEST7, bem como os diagramas de distribuição de espécies presentes em solução.

4.2.8 Experimentos Cinéticos

Os experimentos cinéticos foram realizados em um espectrofotômetro UV - Vis da Varian modelo Cary 50 BIO acoplado em um banho termostatizado. Os dados foram coletados através do software *Kinetics* previamente instalado no computador do espectrofotômetro e as medidas foram realizadas em triplicatas.

A atividade catalítica do complexo foi calculada a partir das reações de hidrólise dos substratos 2,4-bdnpp e 2,4-dnpp, os quais foram sintetizados de acordo com os métodos reportados por (BUNTON; FARBER, 1969) e (RAWJI; MILBURN, 1981), respectivamente. Na reação de hidrólise dos substratos descritos anteriormente há a liberação do ânion 2,4-dinitrofenolato (2,4-dnp) como produto, sendo possível acompanhar esta liberação via UV-Vis

através da variação da absorvância em 400 nm. A concentração de 2,4-dnp gerada em solução foi calculada a partir dos valores do coeficiente de absorção molar (ϵ) em 400 nm frente a diferentes valores de pH, conforme representado na Tabela 3 (PERALTA *et al.*, 2010).

Tabela 3. Variação do coeficiente de absorção molar em 400 nm para o 2,4-dnp em diferentes valores de pH.

pH	ϵ (mol L ⁻¹ cm ⁻¹)
3,50	2125
4,00	3410
4,50	7180
5,00	10080
5,50	11400
6,00	12000
6,50 - 10,25	12100

Fonte: Adaptado de PERALTA *et al.*, 2010.

As reações foram monitoradas até 5,0 % de conversão de substrato a produto, sempre utilizando uma condição onde o substrato se encontrava em excesso em relação à concentração do complexo (pseudo-primeira ordem). Os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais (PISZKIEWICZ, 1977), sendo que essas foram obtidas diretamente do gráfico da concentração de 2,4-dinitrofenolato liberado em função do tempo. Para cada valor de velocidade encontrada foi descontado o valor da auto-hidrólise do substrato, determinado através de um “branco” contendo apenas o substrato nas mesmas condições cinéticas que o sistema contendo o complexo e o substrato.

4.2.8.1 Efeito do pH

Os estudos com relação à velocidade de hidrólise dos substratos em função do pH visam obter um pH ótimo de atividade, bem como os valores de pKa cinéticos para as espécies em equilíbrio. Os testes foram realizados em uma faixa de pH entre 4,00 - 10,50 com 50 vezes de excesso do substrato para o 2,4-bdnpp e 25 vezes de excesso para o 2,4-dnpp em relação ao complexo, a 25 °C.

Para estudar a dependência do pH na hidrólise do 2,4-bdnpp foram utilizadas cubetas de vidro óptico com capacidade para 4 mL e caminho óptico de 1 cm, fechadas com tampa de teflon, nas quais foram adicionados 0,75 mL de solução aquosa do tampão ($[T]_{\text{Final}} = 0,05$ mol

L^{-1}), 0,05 mL de uma solução estoque do complexo em acetonitrila ($[C]_{Final} = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol } L^{-1}$), 0,15 mL de uma solução estoque do substrato também em acetonitrila ($[S]_{Final} = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$) e para completar o volume final de 1,5 mL do sistema reacional, foram adicionados 0,55 mL de acetonitrila.

O estudo frente à hidrólise do 2,4-dnpp em diferentes valores de pH seguiu uma metodologia similar, para tal foram utilizadas cubetas de vidro óptico com capacidade para 4 mL e caminho óptico de 1 cm, fechadas com tampa de teflon, nas quais foram adicionados 0,75 mL de solução aquosa do tampão ($[T]_{Final} = 0,05 \text{ mol } L^{-1}$), 0,05 mL de uma solução estoque do complexo em acetonitrila ($[C]_{Final} = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol } L^{-1}$), 0,15 mL de uma solução estoque do substrato também em acetonitrila ($[S]_{Final} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$) e para completar o volume final de 1,5 mL foram adicionados 0,55 mL de acetonitrila. Logo, após as adições a razão acetonitrila/água permaneceu (1:1 v/v) para ambos os estudos. Um “branco” também foi preparado utilizando as mesmas condições, com exceção à adição do complexo que teve seu volume substituído por acetonitrila. As reações foram iniciadas após as adições dos substratos ao meio.

Os tampões utilizados foram: MES para a faixa de pH entre 4,00 - 6,50, HEPES para a faixa de pH entre 7,00 - 8,50 e CHES para a faixa de pH entre 9,00 - 10,50 ($[T]_{Estoque} = 0,1 \text{ mol } L^{-1}$). A força iônica foi mantida constante para toda a faixa de pH de trabalho ($I = 0,1 \text{ mol } L^{-1}$, $LiClO_4$).

4.2.8.2 Efeito da Concentração do Substrato

Os estudos com relação à velocidade de hidrólise do 2,4-bdnpp e 2,4-dnpp em função da concentração dos mesmos visam obter parâmetros cinéticos como: velocidade máxima ($V_{Máx}$) e a constante de Michaelis - Menten (K_M). Através desses dados, é possível obter a constante catalítica para o complexo ($k_{cat} = V_{Máx}/[Complexo]$), bem como o fator catalítico, definido pela razão entre a constante catalítica e a constante da reação não catalisada ($f = k_{cat}/k_{nc}$), além da eficiência catalítica ($E = k_{cat}/K_M$).

Os testes foram realizados nos valores de pH: 6,00, 6,50 e 7,00 sob as mesmas condições descritas para o estudo do efeito do pH, resultando em cinéticas de saturação com comportamento de Michaelis - Menten. Os volumes adicionados de substrato em cada teste partiram de 0,03 mL a 0,225 mL ($[S]_{Final} = 4,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$) para o 2,4-bdnpp e 0,03 mL a 0,18 mL ($[S]_{Final} = 2,0 \times 10^{-4}$ a $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$) para o 2,4-dnpp. Por fim, para

completar o volume final de 1,5 mL nas cubetas, foi utilizado acetonitrila com o intuito de manter a razão acetonitrila/água (1:1 v/v).

4.2.8.3 Determinação do Número de Ciclos Catalíticos

Os testes foram realizados a fim de determinar o número de moléculas de substrato hidrolisadas por molécula de complexo, ou seja, determinar o número de ciclos catalíticos realizados pelo complexo (*turnover*). Para tal, uma cinética foi monitorada espectrofotometricamente via UV-Vis em um período de aproximadamente 3 horas a 25 °C em 445 nm ($\epsilon = 3600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nas condições de 50 e 25 vezes de excesso para o 2,4-bdnpp e 2,4-dnpp respectivamente no pH ótimo. O cálculo para encontrar o número de moléculas hidrolisadas baseou-se na equação de Lambert - Beer, onde o valor da concentração experimental de 2,4-dnp foi dividido pelo valor da concentração teórica do complexo, resultando no número de ciclos catalíticos.

4.2.8.4 Reação Estequiométrica

Uma cinética em condições estequiométricas entre o complexo e o substrato 2,4-bdnpp foi realizada ($[C]_{\text{Final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[S]_{\text{Final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) buscando avaliar se o monoéster 2,4-dnpp também é hidrolisado durante a reação. O teste foi acompanhado espectrofotometricamente via UV-Vis durante 24 horas a 25 °C em 400 nm ($\epsilon = 12100 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) no pH ótimo. O cálculo para encontrar o número de moléculas hidrolisadas baseou-se na equação de Lambert - Beer, onde o valor da concentração experimental de 2,4-dnp foi dividido pelo valor da concentração teórica do complexo, resultando no número de equivalentes liberados.

4.2.8.5 Efeito Isotópico do Deutério

Cinéticas com relação ao efeito isotópico do deutério foram realizadas para avaliar se há transferência de próton na etapa determinante da reação. Os testes foram realizados no pH ótimo sob as mesmas condições descritas para o estudo do efeito da concentração do substrato

para cada caso, sendo que a solução do tampão foi preparada em D₂O e teve seu valor ajustado para: $pD = \text{leitura do medidor de pH} + (4,29 \times 10^2 / T) - 1,04$ (FIFE; BRUICE, 1961).

4.2.8.6 Efeito da Temperatura

A partir do estudo do efeito da temperatura na catálise, importantes informações podem ser extraídas, como por exemplo os parâmetros de ativação para cada cinética. Diante disso, testes frente à hidrólise dos substratos 2,4-bdnpp e 2,4-dnpp foram realizados em diferentes temperaturas (20 - 35 °C) a fim de se obter esses parâmetros. As condições cinéticas utilizadas foram as mesmas que as descritas para o efeito da concentração do substrato no pH ótimo e os valores foram obtidos das equações de Arrhenius e Eyring (Equações 3 e 4).

4.2.9 Testes de Interação do complexo com o DNA via Titulação

Antes de se iniciar os testes de interação, o DNA precisa passar por uma análise prévia para determinar se o CT-DNA obtido de fonte comercial se apresenta livre de proteína. Para tal, determinou-se a razão entre as absorvâncias obtidas em 260 nm e 280 nm respectivamente, sendo que o resultado deve apresentar uma razão entre 1,80 e 1,90 para ser considerado satisfatório. A concentração de DNA na amostra foi determinada via espectroscopia eletrônica de UV - Vis, monitorando a banda presente em $\lambda = 260 \text{ nm}$ ($\epsilon = 6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (REICHMANN *et al.*, 1954), sendo que o valor da razão obtido foi igual a 1,80.

O experimento foi realizado em um sistema contendo duas cubetas. Na cubeta de controle, adicionaram-se inicialmente 990 μL do tampão (Tris-HCl/NaCl - pH 7,2, 50 mmol L^{-1} NaCl) e 10 μL de acetonitrila espectroscópica. Na outra cubeta adicionaram-se 990 μL do tampão e 10 μL da solução de complexo ($5,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Em seguida, foi realizada a correção da linha base e após uma leitura. Posteriormente, foi efetuada a adição de CT-DNA às cubetas (2 μL), sendo que a homogeneização da solução se deu de forma manual. Após a adição do DNA o sistema foi deixado em repouso por aproximadamente 1 minuto antes de iniciar a varredura, a fim de se estabelecer um equilíbrio entre as espécies em solução. O processo foi repetido 10 vezes, tendo os valores corrigidos pelo efeito de diluição. A constante de ligação K_b foi obtida através da Equação 1 (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013), onde ϵ_f e ϵ_b representam os coeficientes de absorção molar do complexo livre e completamente ligado respectivamente e ϵ_a representa o coeficiente de absorção molar após cada adição.

$$\frac{[DNA]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{[DNA]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} \quad (1)$$

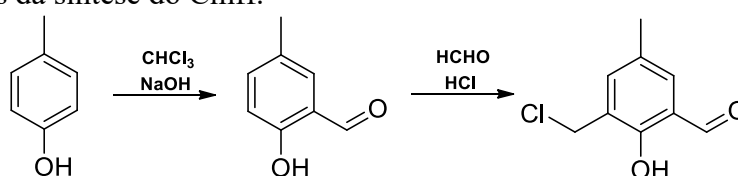
4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 Síntese do ligante

A seguir se apresentam as etapas de síntese do ligante (H_2L^2) utilizado neste trabalho. Os precursores sintetizados já foram reportados na literatura, enquanto o ligante final é de natureza inédita.

4.3.1.1 Síntese do 3-(clorometil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (Cmff)

Figura 10. Etapas da síntese do Cmff.



Fonte: O autor.

Primeiramente, preparou-se o 2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (Hmb) através de uma reação de formilação do *p*-Cresol (Figura 10) (THOER *et al.*, 1988). Em um balão de 3 bocas de 5000 mL, equipado com um agitador mecânico e condensador, adicionou-se o *p*-cresol (21,6 g, 200 mmol, $108,14 \text{ g mol}^{-1}$) em 1500 mL de clorofórmio. A solução foi mantida sob agitação e refluxo com temperatura controlada entre 56 - 60 °C. Posteriormente, durante um período de 3 horas, adicionaram-se pequenas alíquotas de uma solução de NaOH (60 g, 1,5 mmol, $40,00 \text{ g mol}^{-1}$) previamente preparada em 100 mL de água destilada. A mistura reacional foi mantida por mais 1 hora sob agitação e refluxo, em seguida, deixou-se o sistema para resfriar a temperatura ambiente. Após o resfriamento, adicionou-se aproximadamente 500 mL de água destilada e o meio foi acidificado com HCl concentrado até $pH = 2,00$ (sob agitação). Após a acidificação, a fase orgânica foi separada, lavada com água destilada, seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente foi retirado utilizando um rotaevaporador a 40 °C. O óleo obtido foi destilado à pressão reduzida com auxílio de uma coluna vigreux de 40 cm em uma faixa de temperatura entre 55 - 65 °C a 0,1 mmHg. Após a destilação, obteve-se um sólido amarelo que foi solubilizado em uma quantidade mínima de diclorometano e purificado com o auxílio de uma coluna cromatográfica, utilizando diclorometano como fase móvel e sílica como fase

estacionária. O solvente coletado foi removido por rotaevaporação e se obteve um sólido branco cristalino (Hmb) que posteriormente foi caracterizado.

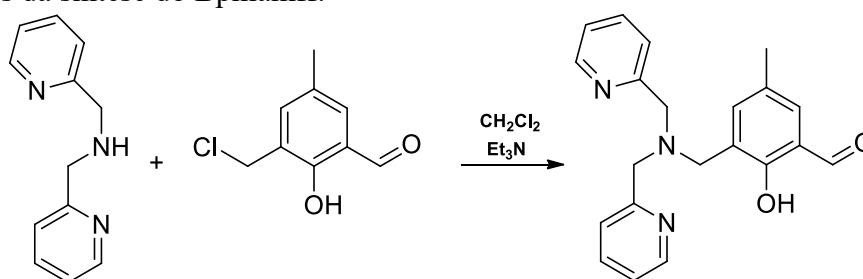
A última etapa consistiu na síntese do Cmff, sendo realizada seguindo a metodologia proposta por (KARSTEN *et al.*, 2002). Em um balão de 500 mL se adicionou o Hmb (6,4 g, 47 mmol, 136,15 g mol⁻¹), formaldeído 37% (3,81 g, 94 mmol) e 25 mL de HCl concentrado. O sistema foi mantido sob refluxo (90 - 100 °C) e agitação por 45 minutos, posteriormente a solução foi transferida para um béquer e resfriada a 0 °C em banho de gelo. Após o resfriamento, formou-se um precipitado compacto no fundo do béquer que foi triturado, filtrado sob vácuo, lavado com HCl concentrado e recristalizado em diclorometano quente. Após a recristalização, obteve-se um sólido branco que foi deixado sob vácuo para secar durante 6 horas. Rendimento: 85% (7,4 g, 40 mmol, 184,62 g mol⁻¹).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 2,36 (s, 3H, CH₃), 4,67 (s, 2H, CH₂), 7,35 (s, 1H, CH_{ar}), 7,47 (s, 1H, CH_{ar}), 9,87 (s, 1H, CH_{ald}), 11,25 (s, 1H, OH_{fenol}).

IR - ATR (cm⁻¹): ν (O-H) 3350, ν (C-H_{ar}, C-H_{alif}) 3028-2850, ν (C-H_{ald}) 2746, ν (C=O) 1663, ν (C=C) 1600-1470, δ (O-H_{fenol}) 1372, ν (C-O_{fenol}) 1256, δ (C-H_{ar}) 703, ν (C-Cl) 612.

4.3.1.2 Síntese do 3-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (Bpmamff)

Figura 11. Etapas da síntese do Bpmamff.



Fonte: O autor.

O procedimento experimental ilustrado na Figura 11 foi realizado de acordo com a rota descrita por Karsten e colaboradores (KARSTEN *et al.*, 2002). Em um balão de 250 mL, adicionou-se o Cmff (5,6 g, 30 mmol, 184,62 g mol⁻¹) previamente solubilizado em

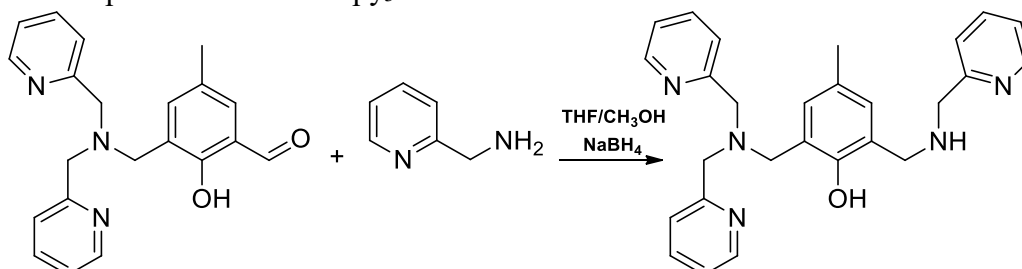
diclorometano (80 mL). Posteriormente, sob agitação e em banho de gelo, adicionaram-se 80 mL de uma solução contendo Bpma (6,0 g, 30 mmol, $199,26 \text{ g mol}^{-1}$) e trietilamina (4,2 mL, 30 mmol, $101,19 \text{ g mol}^{-1}$) solubilizados em diclorometano. Após a adição, removeu-se o banho de gelo e o sistema permaneceu sob agitação por 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, transferiu-se a solução para um funil de separação, onde a mesma foi lavada com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi separada e seca com Na_2SO_4 anidro e após filtração o solvente foi removido por rotaevaporação a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Após a remoção do solvente, obteve-se um óleo amarelo que foi rapidamente transferido para um béquer e recristalizado em isopropanol quente. Após poucas horas, formou-se um precipitado cristalino no fundo do béquer, que foi filtrado em funil de placa porosa, lavado com éter etílico gelado e seco sob vácuo durante 6 horas. O produto final foi obtido na forma de um sólido amarelo com um rendimento de 78 % (8,1 g, 23,4 mmol, $347,42 \text{ g mol}^{-1}$).

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 2,27 (s, 3H, CH_3), 3,80 (s, 2H, CH_2), 3,89 (s, 4H, CH_2), 7,21 (m, 3H, CH_{ar}), 7,41 (t, 3H, CH_{ar} , $J = 7,03 \text{ Hz}$), 7,66 (dt, 2H, CH_{ar} , $J = 7,52 \text{ Hz}$), 8,56 (d, 2H, CH_{ar} , $J = 4,22 \text{ Hz}$), 10,44 (s, 1H, CH_{ald}).

IR - ATR (cm^{-1}): ν (C- H_{ar} , C- H_{alif}) 3038-2849, ν (C=O) 1680, ν (C=N, C=C) 1591-1437, δ (O- H_{fenol}) 1378, ν (C-O $_{\text{fenol}}$) 1276, ν (C-N) 1114, δ (C- H_{ar}) 773.

4.3.1.3 Síntese do 2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metil-6-(((piridin-2-ilmetil)amino)metil)fenol (Hpy_3)

Figura 12. Etapas da síntese do Hpy_3 .



Fonte: O autor.

A reação de aminação redutiva (Figura 12) foi realizada seguindo a metodologia descrita na literatura (GREATTI *et al.*, 2008). Em um balão de 250 mL, adicionaram-se: 3,07

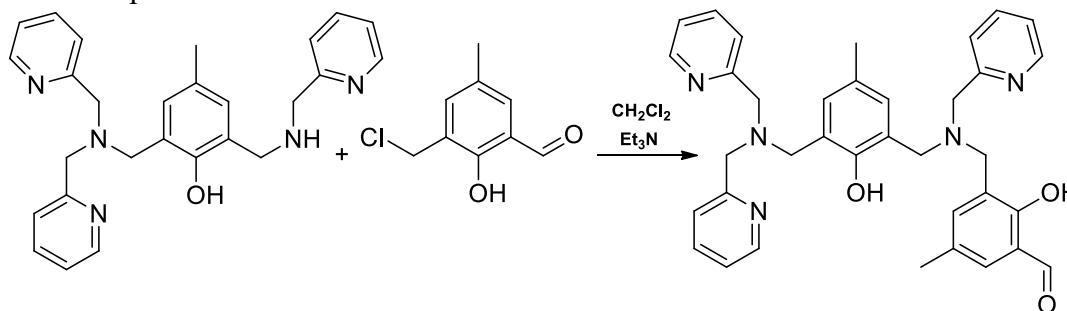
g de Bpmamff (8,8 mmol, 347,42 g mol⁻¹), 80 mL de CH₃OH/THF (1:1 v/v) e 0,97 g de 2-aminometilpiridina (9,0 mmol, 108,14 g mol⁻¹). Após as adições, a solução adquiriu uma coloração amarelo intenso e a mesma permaneceu sob agitação durante 1 hora. Posteriormente, em banho de gelo, iniciou-se a adição lenta de borohidreto de sódio (0,38 g, 10 mmol) a fim de reduzir a função imina formada durante a síntese. Ao final da adição, a solução apresentou uma coloração amarelo claro e a mesma permaneceu sob agitação por mais 1 hora. Após esse período, o solvente foi removido por rotaevaporação a 40 °C. O óleo resultante foi solubilizado em 60 mL de diclorometano, onde permaneceu sob agitação durante 15 minutos na presença de uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio. Por fim, a fase orgânica foi lavada em um funil de separação com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio. Após a extração, a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi removido por rotaevaporação a 40 °C. O óleo resultante foi deixado sob vácuo durante 6 horas para secar. Rendimento 95 % (3,7 g, 8,4 mmol, 439,56 g mol⁻¹).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 2,23 (s, 3H, CH₃), 3,76 (s, 2H, CH₂), 3,87 (s, 4H, CH₂), 3,93 (s, 4H, CH₂), 3,96 (s, 4H, CH₂), 6,85 (s, 1H, CH_{ar}), 6,94 (s, 1H, CH_{ar}), 7,15 (dd, 3H, CH_{ar}, *J* = 5,26 Hz), 7,37 (d, 3H, CH_{ar}, *J* = 7,00 Hz), 7,60 (td, 2H, CH_{ar}, *J* = 7,42 Hz), 8,55 (d, 2H, CH_{ar}, *J* = 2,98 Hz).

IR - ATR (cm⁻¹): ν (C-H_{ar}, C-H_{alif}) 3061-2824, ν (C=N, C=C) 1592-1434, δ (O-H_{fenol}) 1364, ν (C-O_{fenol}) 1233, ν (C-N) 1149, δ (C-H_{ar}) 761.

4.3.1.4 Síntese do 3-(((3-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (H_2L^1)

Figura 13. Etapas da síntese do H_2L^1 .



Fonte: O autor.

O procedimento experimental exposto na Figura 13 foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Piovezan e colaboradores (PIOVEZAN *et al.*, 2010). Em um balão de 250 mL, adicionaram-se: 3,7 g (8,4 mmol, 439,56 g mol⁻¹) de Hpy₃, 1,4 mL (10 mmol, 101,19 g mol⁻¹) de trietilamina, 1,7 g (9,2 mmol, 184,62 g mol⁻¹) de Cmff e 60 mL de diclorometano. Após as adições, o sistema permaneceu sob agitação e refluxo durante cinco dias. Após este período, a solução foi extraída em um funil de separação com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio. Posteriormente, a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi removido por rotaevaporação a 40 °C, resultando em um sólido amarelo que foi seco sob vácuo durante 6 horas. Rendimento 82 % (3,0 g, 6,9 mmol, 587,72 g mol⁻¹).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 2,21 (s, 3H, CH₃), 2,24 (s, 3H, CH₃), 3,75 - 3,87 (m, 12H, CH₂), 6,86 - 7,64 (m, 13H, CH_{ar}), 8,53 - 8,59 (m, 3H, CH_{ar}), 10,31 (s, 1H, CH_{ald}).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 20,4, 20,2, 54,1, 55,5, 56,3, 59,2, 59,5, 76,7, 77,0, 77,3, 122,1, 122,4, 123,0, 123,1, 123,2, 123,4, 125,0, 127,3, 128,0, 130,4, 131,0, 136,4, 136,6, 137,1, 148,8, 148,8, 153,9, 158,1, 158,5, 159,4, 192,0.

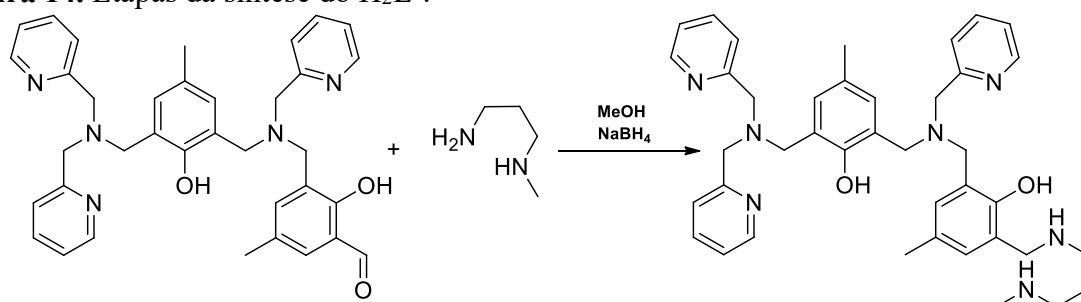
IR - ATR (cm⁻¹): ν (C-H_{ar}, C-H_{alif}) 3040-2800, ν (C-H_{ald}) 2716, ν (C=O) 1660, ν (C=N, C=C) 1574-1419, δ (O-H_{fenol}) 1350, ν (C-O_{fenol}) 1203, ν (C-N) 1099, δ (C-H_{ar}) 751.

CHN (Calculado para $C_{36}H_{37}N_5O_3$): C: 73,57% H: 6,35 N: 11,92 %.

CHN (Obtido para $C_{36}H_{37}N_5O_3$): C: 73,54 % H: 6,33% N: 11,93 %.

4.3.1.5 Síntese do Ligante 2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((3-(metilamino)propil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol (H_2L^2)

Figura 14. Etapas da síntese do H_2L^2 .



Fonte: O autor.

A síntese do ligante final (Figura 14) foi realizada seguindo a seguinte metodologia: Em um balão de 250 mL, adicionaram-se: 0,52 mL de *N*-metil-1,3-propanodiamina (5 mmol, 88,15 g mol⁻¹) e 80 mL de metanol (desgaseificado). Posteriormente, acrescentaram-se sob argônio 60 mL de uma solução metanólica desgaseificada contendo 1,47 g de H_2L^1 (2,5 mmol, 587,72 g mol⁻¹), onde o sistema permaneceu durante 4 horas sob agitação. Após esse período, em banho de gelo, adicionou-se 0,28 g de borohidreto de sódio (7,5 mmol, 37,83 g mol⁻¹) a fim de reduzir a função imina formada durante a síntese. A mistura reacional foi mantida sob agitação e atmosfera inerte por mais 3 horas. Após a redução, o solvente foi removido por rotaevaporação a 40 °C, resultando em um óleo que foi solubilizado em 60 mL de diclorometano. Posteriormente, o produto foi lavado com água em um funil de separação. Após a extração, a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente foi removido por rotaevaporação. O produto final foi obtido na forma de um sólido amarelo que foi seco sob vácuo durante 6 horas. Rendimento 79 % (1,30 g, 1,97 mmol, 659,86 g mol⁻¹).

¹H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ /ppm: 1,67 (m, 2H, CH_2), 2,21 (s, 6H, CH_3), 2,37 (s, 3H, CH_3), 2,64 (dt, 4H, CH_2 , $J = 13,00$ Hz), 3,74-3,80 (m, 14H, CH_2), 6,87 (m, 4H, CH_{ar}), 7,14 (t, 3H, CH_{ar} , $J = 6,42$ Hz), 7,41 (m, 3H, CH_{ar}), 7,60 (m, 3H, CH_{ar}), 8,55 (m, 3H, CH_{ar}).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3CN) δ/ppm : 20,2, 28,8, 35,5, 47,3, 50,0, 50,2, 54,5, 55,8, 55,8, 59,6, 59,8, 123,0, 123,6, 123,9, 124,0, 124,2, 124,3, 128,2, 128,2, 129,9, 130,2, 130,8, 131,2, 137,5, 137,6, 149,2, 149,3, 154,2, 154,2, 158,8, 159,3.

IR - ATR (cm^{-1}): ν (C-H_{ar}, C-H_{alif}) 3060-2820, ν (C=N, C=C) 1591-1436, δ (O-H_{fenol}) 1367, ν (C-O_{fenol}) 1230, ν (C-N) 1115, δ (C-H_{ar}) 753.

CHN (Calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{49}\text{N}_7\text{O}_2 + \text{CH}_3\text{OH}$): C:71,17% H:7,72 N: 14,17 %.

CHN (Obtido para $\text{C}_{40}\text{H}_{49}\text{N}_7\text{O}_2 + \text{CH}_3\text{OH}$): C: 71,00 % H: 7,68% N: 14,86 %.

4.3.2 Síntese do Complexo (La.H₂L²)

Em um tubo de Schlenk, adicionaram-se 0,66 g do ligante H₂L² (1 mmol, 659,86 g mol⁻¹) e 10 mL de metanol, submetendo-os a um banho de N_{2(l)} até total congelamento do solvente. Em seguida, o tubo foi acoplado a uma bomba de vácuo onde se deixou o solvente fundir à pressão reduzida. O processo de congelamento foi repetido 3 vezes com o intuito de remover o CO₂ presente no sistema e em seguida, adicionou-se 0,32 g de La(NO₃)₃ (1 mmol, 324,93 g mol⁻¹). A mistura reacional foi mantida em agitação e aquecimento (40 °C) por 45 minutos sob sistema selado e posteriormente, o solvente foi removido por rotaevaporação. Após a total evaporação do solvente, uma alíquota do sólido foi solubilizada em uma solução contendo acetonitrila/acetona (1:1 v/v) e transferida para um tubo de NMR. Por fim, o sistema foi deixado em repouso até o aparecimento de cristais incolores adequados para a resolução de raios X. Rendimento: 91% (0,89 g, 0,91 mmol, 980,23 g mol⁻¹).

IR - ATR (cm^{-1}): ν (C-H_{ar}, C-H_{alif}) 3042-2757, ν (C=N, C=C) 1587-1432, ν (NO₃⁻) 1302; 1383; 1463, ν (C-O_{fenol}) 1197, ν (C-N) 1110, δ (C-H_{ar}) 763.

CHN (Calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{LaN}_7\text{O}_2 + 2 \text{NO}_3^- + 2 \text{H}_2\text{O} + 0,7 \text{CH}_3\text{OH}$): C: 49,87% H: 5,63% N: 12,86%.

CHN (Obtido para $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{LaN}_7\text{O}_2 + 2 \text{NO}_3^- + 2 \text{H}_2\text{O} + 0,7 \text{CH}_3\text{OH}$): C: 49,73% H: 5,61% N: 12,88%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentadas as discussões relativas às sínteses, caracterizações e testes de reatividade do complexo frente à hidrólise dos substratos modelos (2,4-bdnpp) e (2,4-dnpp), bem como testes preliminares de interação do complexo com o DNA.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO LIGANTE E SEUS PRECURSORES

Os precursores sintetizados neste trabalho foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho (FTIR - ATR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^1H NMR). O ligante final além das técnicas listadas anteriormente, foi caracterizado por espectroscopia eletrônica (UV - Vis - NIR), análise elementar (C, H e N), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^{13}C NMR) / (DEPT - 135) e espectrometria de massa (ESI - MS (+)). Os principais valores obtidos dos espectros, bem como suas respectivas atribuições podem ser encontrados na seção anterior juntamente com as metodologias de síntese para cada composto.

5.1.1 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR - ATR)

A espectroscopia no infravermelho é uma importante ferramenta de caracterização, sendo utilizada geralmente como a primeira análise para a verificação qualitativa da estrutura química do produto final. Os precursores utilizados nesse trabalho já foram reportados na literatura, logo os valores obtidos para cada composto foram comparados com os relatados. As principais bandas de absorção para o ligante H_2L^2 foram devidamente (PAVIA et al., 2015) e os valores estão apresentados a seguir na Tabela 4, bem como as atribuições para cada grupamento.

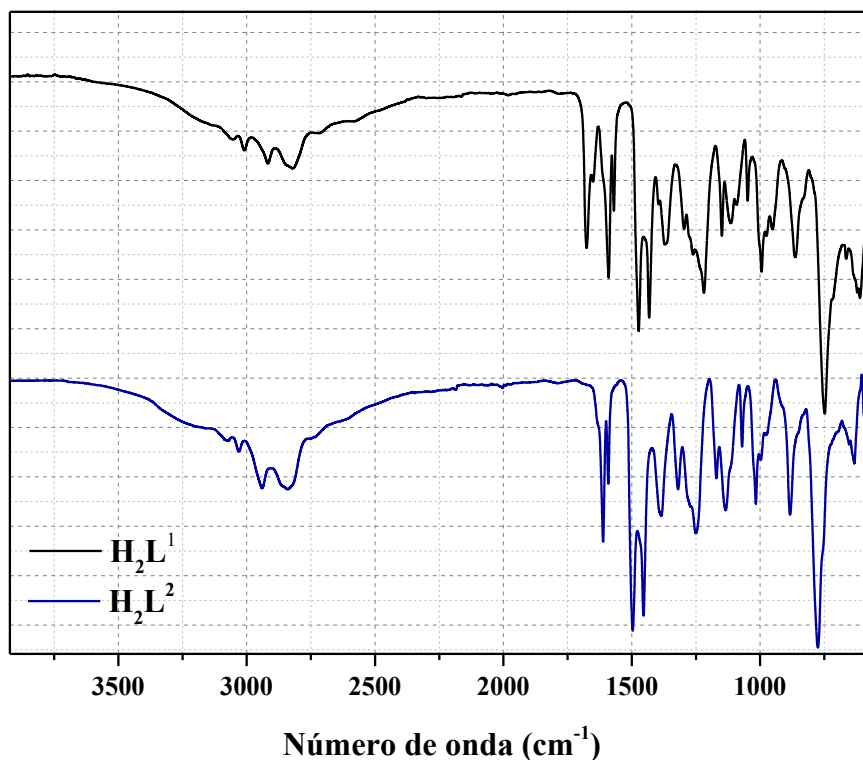
Tabela 4. Atribuições e respectivos números de onda (cm^{-1}) para as principais bandas observadas no espectro do ligante e seus precursores.

Atribuição	Cmff	Bpma	Bpmamff	Hpy ₃	H ₂ L ¹	H ₂ L ²
ν (O-H)	3350	-	-	-	-	-
ν (N-H)	-	3300	-	-	-	-
ν (C-H _{ar}), (C-H _{alif})	3028- 2850	3062- 2828	3038- 2849	3061- 2824	3040- 2800	3060- 2820
ν (C-H _{ald})	2746	-	-	-	2716	-
ν (C=O)	1663	-	1680	-	1660	-
ν (C=N), (C=C)	1600- 1470	1592- 1434	1591- 1437	1592- 1434	1574- 1419	1591- 1436
δ (O-H _{fen})	1372	-	1378	1364	1350	1367
ν (C-O _{fen})	1256	-	1276	1233	1203	1230
ν (C-N)	-	1148	1114	1149	1099	1115
δ (C-H _{ar})	703	758	773	761	751	753
ν (C-Cl)	612	-	-	-	-	-

A Tabela 4 apresenta os números de onda (cm^{-1}) para as principais bandas observadas no espectro do ligante e seus respectivos precursores. A partir desses valores, é possível notar que os precursores: Cmff, Bpmamff e H₂L¹ possuem uma banda em torno de 1668 cm^{-1} referente ao estiramento C=O, indicando a presença do grupamento aldeído nas estruturas. No entanto, nenhuma banda foi observada nessa região do espectro para o ligante final H₂L², dando indícios que a aminação redutiva foi eficiente e condizente com a proposta de síntese. Observa-se também a presença de um estiramento em 3300 cm^{-1} correspondente à ligação N-H do Bpma. Em torno de 1125 cm^{-1} se encontra a banda de estiramento C-N, presente em todos os compostos exceto no Cmff, tendo esse uma banda característica em 612 cm^{-1} referente ao estiramento C-Cl.

A respeito dos modos vibracionais relativos às deformações axiais e angulares das ligações (C-H, C=C, C=N, C-O e O-H), os mesmos são atribuídos às piridinas e fenóis presentes no ligante e seus precursores, sendo que os valores estão em concordância com ligantes similares já reportados na literatura (PIOVEZAN *et al.*, 2010). Todos os sinais descritos para o ligante H₂L² e o precursor H₂L¹ podem ser verificados na Figura 15.

Figura 15. Sobreposição dos espectros na região do infravermelho para o precursor H_2L^1 e o ligante H_2L^2 .



5.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (1H NMR e ^{13}C NMR)

Com o intuito de se obter informações estruturais acerca do ligante, foram realizadas análises utilizando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, sendo a mesma uma técnica não destrutiva que permite a identificação de compostos de uma maneira rápida e eficaz.

A espectroscopia de 1H NMR auxiliou na distinção dos hidrogênios presentes na estrutura do ligante H_2L^2 e seus precursores. As análises foram realizadas ao final de cada etapa de síntese visando obter informações que corroborassem com as estruturas previamente propostas. Os dados foram obtidos através da integração dos sinais presentes nos espectros, bem como os valores de deslocamento químico para cada grupamento. Os valores de deslocamento químico (δ em ppm), o número de átomos de hidrogênio e as atribuições dos sinais obtidos para cada composto estão apresentados na Tabela 5.

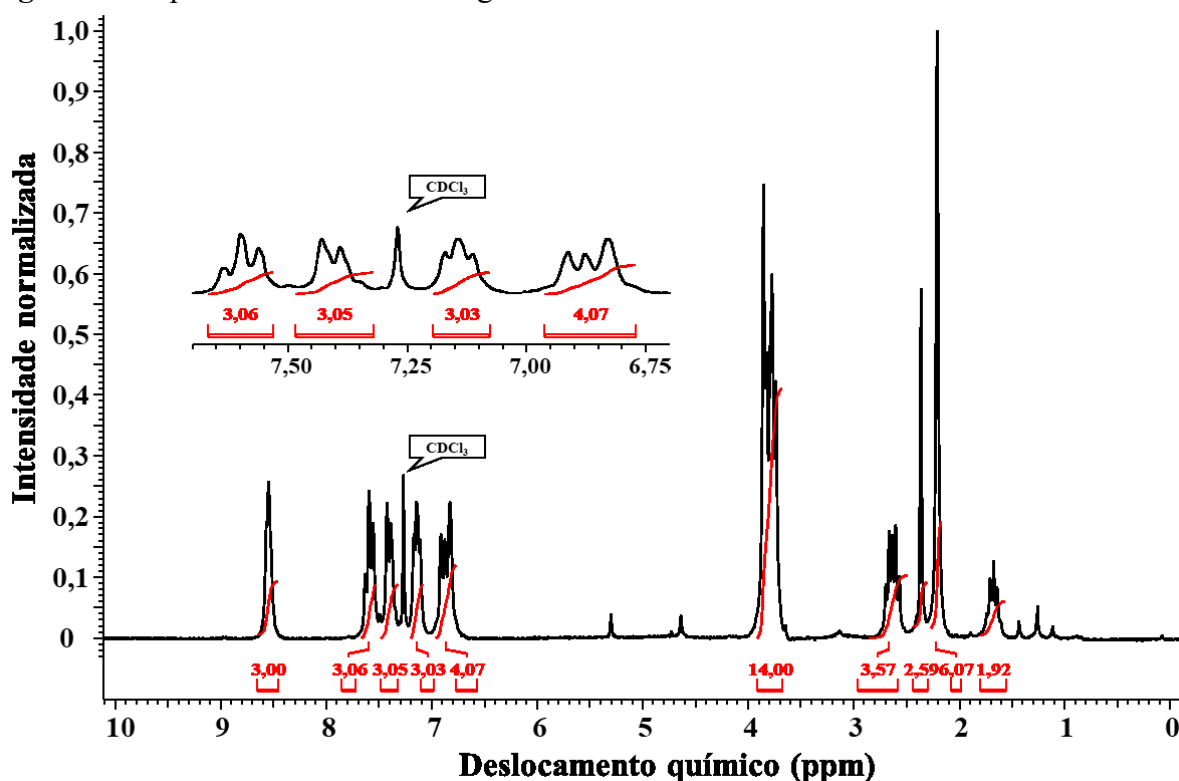
Tabela 5. Deslocamentos químicos em ppm (multiplicidade e integração) observados nos espectros de ^1H NMR para o ligante e seus precursores.

Atribuição	CH_3	CH_2	CH_{ald}	OH_{fenol}	CH_{ar}
Cmff	2,36 (s, 3H)	4,67 (s, 2H)	9,87 (s, 1H)	11,25 (s, 1H)	7,35 (s, 1H) 7,47 (s, 1H)
Bpma	-	3,99 (s, 4H)	-	-	7,15 (m, 2 H) 7,35 (d, 2H) ($J = 7,62$ Hz) 7,63 (dt, 2H) ($J = 1,59$ Hz) 8,56 (d, 2 H) ($J = 7,63$ Hz)
Bpnamff	2,27 (s, 3H)	3,80 (s, 2H) 3,89 (s, 4H)	10,44 (s, 1H)	-	7,21 (m, 3H) 7,41 (t, 3H) ($J = 7,03$ Hz) 7,66 (dt, 2H) ($J = 7,52$ Hz) 8,56 (d, 2H) ($J = 4,22$ Hz)
Hpy₃	2,23 (s, 3H)	3,76 (s, 2H) 3,87 (s, 4H) 3,93 (s, 4H) 3,96 (s, 4H)	-	-	6,85 (s, 1H) 6,94 (s, 1H) 7,15 (dd, 3H) ($J = 5,26$ Hz) 7,37 (d, 3H) ($J = 7,00$ Hz) 7,60 (td, 2H) ($J = 7,42$ Hz) 8,55 (d, 2H) ($J = 2,98$ Hz)
H₂L¹	2,21 (s, 3H) 2,24 (s, 3H)	3,75-3,87 (m, 12H)	10,31 (s, 1H)	-	6,86-7,64 (m, 13H) 8,53-8,59 (m, 3H)
H₂L²	2,21 (s, 6H) 2,37 (s, 3H)	1,67 (m, 2H) 2,64 (dt, 4H) ($J = 13,00$ Hz) 3,74-3,80 (m, 14H)	-	-	6,87 (m, 4H) 7,14 (t, 3H) ($J = 6,42$ Hz) 7,41 (m, 3H) 7,60 (m, 3H) 8,55 (m, 3H)

Utilizando-se da Tabela 5, é possível afirmar que os precursores e o ligante final foram obtidos conforme o proposto nas metodologias de síntese. Os valores encontrados para os precursores estão em concordância com os já descritos na literatura (PIOVEZAN *et al.*, 2010) e os sinais referentes ao espectro do ligante H_2L^2 foram devidamente atribuídos (PAVIA *et al.*, 2015).

O ligante final apresenta um espectro muito similar que o seu precursor H_2L^1 , tendo em vista que ambos possuem um arranjo estrutural semelhante. Conforme já evidenciado por FTIR-ATR, a distinção dos mesmos se dá pela ausência do sinal referente ao grupo funcional aldeído (10,31 ppm). Deste modo, as regiões do espectro onde o efeito de blindagem é maior contemplam os hidrogênios dos grupos metílicos presentes nas estruturas, ao passo que as regiões de menor blindagem fazem referência aos hidrogênios dos anéis aromáticos. Todos os sinais descritos para o precursor H_2L^1 e o ligante H_2L^2 podem ser verificados nos espectros das Figuras 55-A e 16, respectivamente.

Figura 16. Espectro de 1H NMR do ligante H_2L^2 em $CDCl_3$ a 200 MHz.



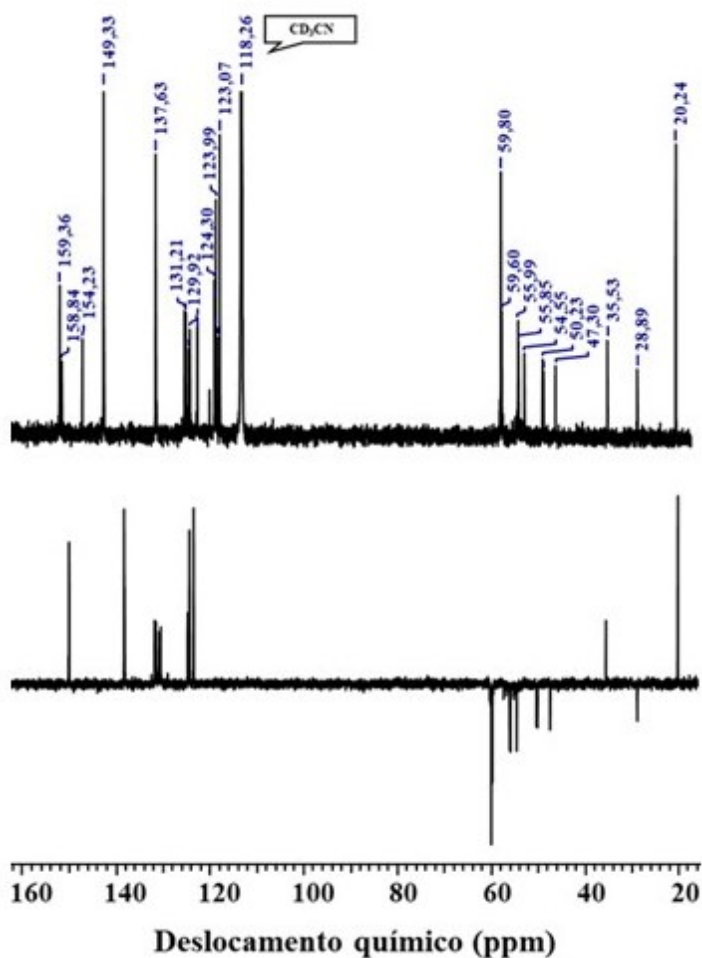
Análises via espectroscopia de ^{13}C NMR / DEPT - 135 também foram realizadas para o ligante final e seu precursor. Os deslocamentos químicos, bem como o espectro do ligante H_2L^2 estão apresentados na Tabela 6 e Figura 17, respectivamente. Na Tabela 6, nota-se para ambos os compostos dois sinais entre 20 - 35 ppm referentes aos carbonos das metilas e vinte sinais entre 122 - 159 ppm atribuídos aos carbonos aromáticos. Com relação aos grupos metílicos, na região de 28 - 59 ppm foram observados quatro sinais a mais para o ligante final em comparação ao seu precursor aldeído, fator que corrobora com a proposta de derivatização

do ligante. Por fim, como evidenciado em análises anteriores, o sinal referente ao carbono do grupamento aldeído se encontra ausente no espectro do ligante final.

Tabela 6. Deslocamentos químicos em ppm observados nos espectros de ^{13}C NMR do ligante H_2L^2 e seu precursor.

Atribuição	Deslocamento químico (ppm)	
	H_2L^1	H_2L^2
C (metila)	20,2, 20,4	20,2, 35,5,
C (metileno)	54,1, 55,5, 56,3, 59,2, 59,5	28,8, 47,3, 50,0, 50,2, 54,5, 55,8, 55,8, 59,6, 59,8
C (aromático)	122,1, 122,4, 123,0, 123,1, 123,2, 123,4, 125,0, 127,3, 128,0, 130,4, 131,0, 136,4, 136,6, 137,1, 148,8, 148,8, 153,9, 158,1, 158,5, 159,4	123,0, 123,6, 123,9, 124,0, 124,2, 124,3, 128,2, 128,2, 129,9, 130,2, 130,8, 131,2, 137,5, 137,6, 149,2, 149,3, 154,2, 154,2, 158,8, 159,3
C (aldeído)	192,0	-

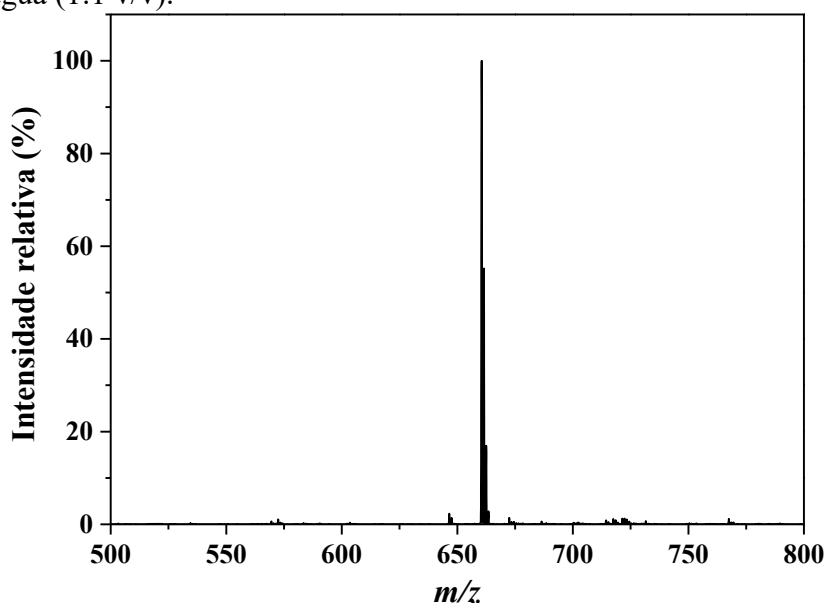
Figura 17. Espectro de NMR ^{13}C / DEPT - 135 do ligante H_2L^2 em CD_3CN a 100 MHz.



5.1.3 Espectrometria de Massa (ESI - MS (+))

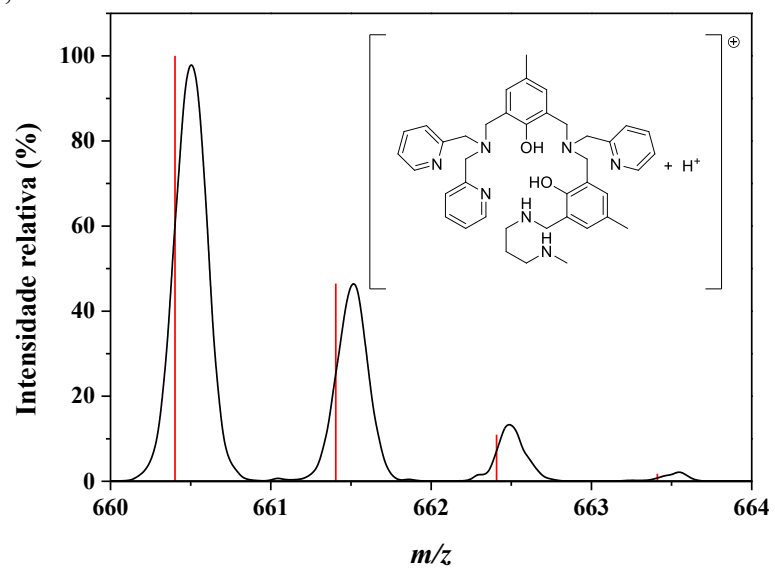
A espectrometria de massa com ionização por *electrospray* é uma ferramenta de grande importância na identificação de compostos. A partir da formação e ionização de um aerossol contendo o composto a ser analisado, é possível obter informações acerca das espécies carregadas existentes em solução, sendo elas separadas com base na razão massa/carga (m/z). A Figura 18 apresenta o espectro de massa para o ligante H_2L^2 , sendo que a análise evidenciou a formação de um íon molecular com razão $m/z = 660,50$.

Figura 18. Espectro de massa realizado no modo positivo para o ligante H_2L^2 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v).



A principal característica observada no espectro é a pequena fragmentação do ligante, a qual permitiu identificar a espécie mais estável frente ao processo de ionização. Como representado na Figura 19, através da sobreposição das distribuições isotópicas foi possível confirmar a existência de uma espécie monovalente, sendo a mesma correspondente ao ligante protonado. A estrutura simulada via ESI - MS (+) (STROHALM, 2013) corrobora com as técnicas espectroscópicas previamente discutidas.

Figura 19. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o ligante H_2L^2 . Erro calculado: 0,015%.



5.2 CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO

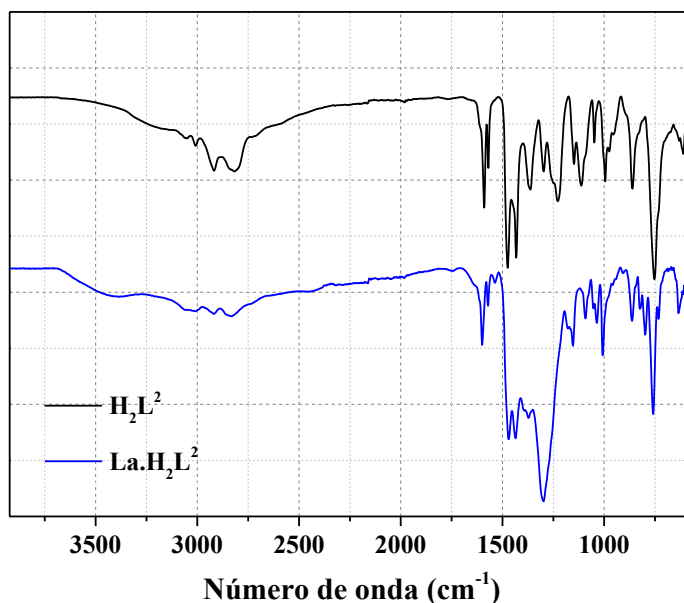
O complexo sintetizado neste trabalho foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho (FTIR - ATR), espectroscopia eletrônica (UV - Vis - NIR), análise elementar (C, H e N), espectrometria de massa (ESI - MS (+)), titulação potenciométrica e difratometria de raios X. Os principais valores obtidos dos espectros, bem como suas respectivas atribuições podem ser encontrados juntamente com a metodologia de síntese.

5.2.1 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR - ATR)

Com o intuito de obter informações qualitativas a respeito da formação do complexo, a espectroscopia na região do infravermelho se demonstrou bastante útil como análise primária. Através da correlação entre os espectros do ligante livre com o do complexo, foi possível observar que após a reação de complexação os sinais referentes a cada grupamento sofreram um pequeno deslocamento para uma região de menor energia, demonstrando que houve a coordenação do ligante ao centro metálico.

O complexo sintetizado neste trabalho é de natureza inédita. Logo, as bandas apresentadas no espectro da Figura 20 foram devidamente atribuídas e os sinais referentes a cada grupamento foram organizados na Tabela 7 (NAKAMOTO, 2008), (PAVIA *et al.*, 2015).

Figura 20. Sobreposição dos espectros na região do infravermelho para o ligante H_2L^2 e o complexo $La.H_2L^2$.



O ligante H_2L^2 apresentou sinais na região de 1591-1436 cm^{-1} referentes aos estiramentos C=N e C=C provenientes das ligações dos anéis aromáticos, sendo os mesmos também observados para o complexo em regiões de menor energia. O sinal obtido em 1230 cm^{-1} no espectro do ligante, corresponde ao estiramento C-O dos fenóis. Nota-se que o valor apresentou um maior de número de onda quando comparado ao complexo, indicando a coordenação dos oxigênios dos grupos fenólicos ao centro de La^{3+} . Por fim, foram detectados modos vibracionais relativos ao estiramento do íon nitrato em 1302, 1383 e 1463 cm^{-1} , sendo esse proveniente do sal de partida utilizado na síntese.

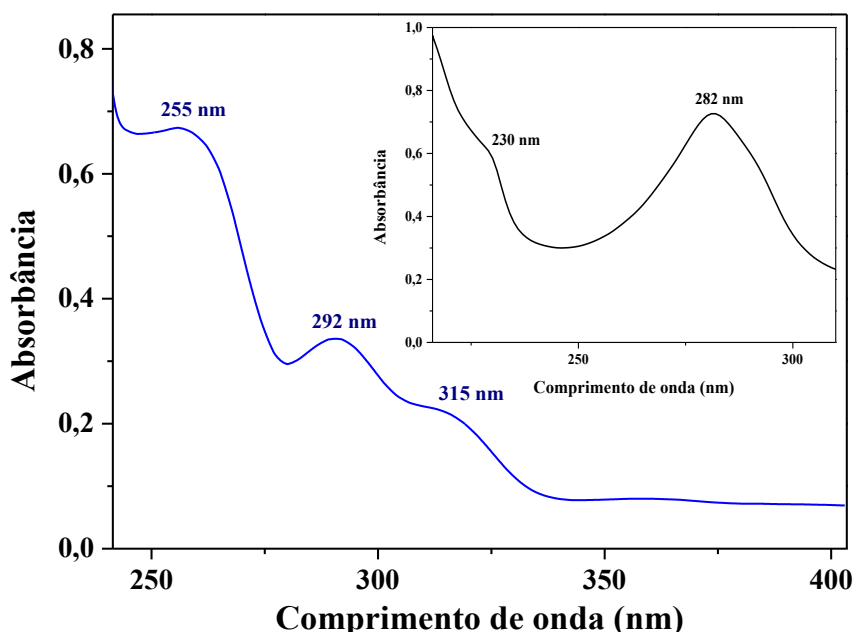
Tabela 7. Atribuições e respectivos números de onda (cm^{-1}) para as principais bandas observadas no espectro do ligante H_2L^2 e do complexo $La.H_2L^2$.

Atribuição	H_2L^2	$La.H_2L^2$
ν (C-H _{ar}), (C-H _{alif})	3060-2820	3042-2757
ν (C=N), (C=C)	1591-1436	1587-1432
ν (N-O _{nitrato})	-	1302, 1383, 1463
ν (C-O _{fen})	1230	1197
ν (C-N)	1115	1110
δ (C-H _{ar})	753	763

5.2.2 Espectroscopia Eletrônica (UV - Vis - NIR)

Com a finalidade de obter informações a respeito da interação da radiação eletromagnética com o complexo de estudo, medidas foram realizadas se utilizando das energias provenientes da faixa do visível, ultravioleta e infravermelho próximo. Os espectros foram monitorados na região de 800 nm - 240 nm em soluções de acetonitrila/água (1:1 v/v) como mostrados na Figura 21. Com relação as propriedades eletrônicas dos íons lantanídeos, é sabido que nem todos dão origem a transições $f-f$, incluindo obviamente as configurações f^0 e f^{14} que são relativas às espécies La^{3+} e Lu^{3+} respectivamente. As transições eletrônicas entre esses orbitais apesarem de serem proibidas pela regra de seleção de Laporte, ganham intensidade através de vibrações moleculares assimétricas que momentaneamente podem afetar o centro de simetria (acoplamento vibrônico), mesmo que os respectivos efeitos sejam ainda mais fracos do que nos complexos de metais de transição (COTTON, 2006).

Figura 21. Espectro eletrônico do complexo ($6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). O *inset* apresenta o espectro eletrônico do ligante nas mesmas condições.



O espectro do complexo apresentou apenas bandas relativas a transições eletrônicas do tipo $n \rightarrow \pi^*$ ou $\pi \rightarrow \pi^*$ oriundas dos grupos fenólicos e/ou piridínicos do ligante. Entretanto quando comparado o complexo com o ligante, por se tratar de um complexo com uma configuração f^0 , nenhuma banda relativa a transições $f - f$ foi observada. Ainda, é possível observar um deslocamento batocrômico dos máximos de absorção quando se compara o espectro do ligante com o do complexo e um aumento da resolução entre as bandas centradas em 292 e 315 nm para o complexo. Este aumento da resolução entre as bandas possivelmente decorre de uma mistura de transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ envolvendo pares de elétrons não ligantes dos grupos fenólicos e/ou piridínicos que no ligante aparecem em energia muito próxima, sendo observado um ombro no espectro do ligante para a banda em 282 nm. Porém, no complexo com a interação entre os pares não ligantes e o centro metálico, os pares de elétrons podem interagir de maneira distinta devido a simetria do complexo, o que resulta em uma maior resolução entre as bandas. Os valores de comprimentos de onda máximo, bem como os valores dos coeficientes de absorção molar para o complexo e o ligante estão expressos na Tabela 8.

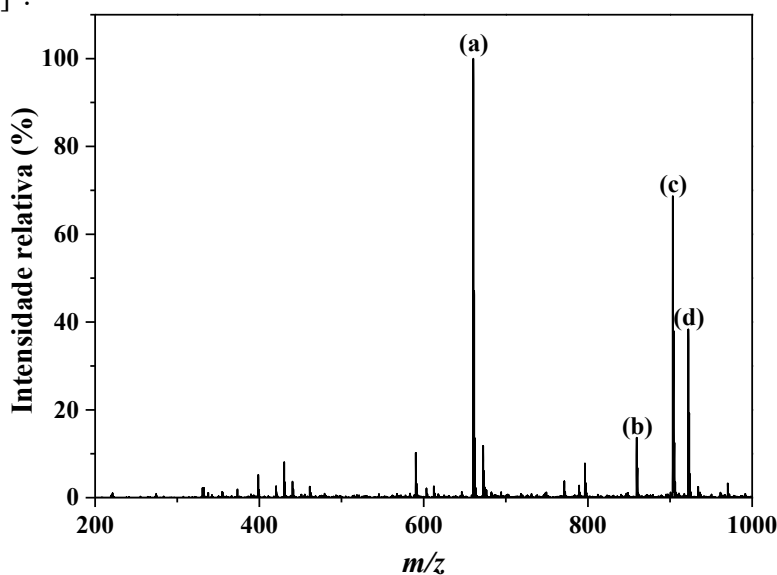
Tabela 8. Máximos de absorção e coeficientes de absorção molar para o complexo e o ligante em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v).

La.H ₂ L ²		H ₂ L ²	
$\lambda_{\text{Máx}}$ (nm)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{Máx}}$ (nm)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
255	7965	230	6300
292	3572	282	7050
315	2551	-	-

5.2.3 Espectrometria de Massa (ESI - MS (+))

Tendo em vista que a caracterização de complexos que possuem terras raras em sua estrutura é complexa, a análise de espectrometria de massa é uma técnica importante para auxiliar na determinação das espécies existentes em solução. Sabe-se que os íons lantanídeos são ácidos duros e possuem maior afinidade por bases duras, podendo haver a migração do metal ligado ao sítio macio para o sítio duro do ligante ou até mesmo a formação de espécies binucleares. Logo, com o intuito de investigar as formações dessas possíveis espécies, a análise do complexo foi conduzida em uma solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). O espectro medido pode ser verificado na Figura 22, bem como os principais fragmentos observados após a ionização da amostra.

Figura 22. Espectro de massa realizado no modo positivo para o complexo La.H₂L² em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Fragmentos observados: (a) $m/z = 660,50$ [C₄₀H₅₀N₇O₂]⁺, (b) $m/z = 859,39$ [C₄₀H₄₈LaN₈O₅]⁺, (c) $m/z = 903,35$ [C₄₄H₅₉LaN₈O₄]⁺ e (d) $m/z = 922,35$ [C₄₀H₄₉LaN₉O₈]⁺.



Na figura, é possível observar a formação de quatro espécies majoritárias, sendo eles nomeados como **(a)**, **(b)**, **(c)** e **(d)**. Os fragmentos estão em concordância com as possíveis quebras do complexo, tendo como o íon molecular a espécie **(a)** a qual corresponde ao ligante livre em solução somado a um próton, como já discutido na seção 5.1.3. O fragmento **(b)** é referente à espécie $[C_{40}H_{48}LaN_8O_5]^+$, caracterizada como um complexo mononuclear de La somado a um próton e um íon nitrato. Por fim, as espécies **(c)** e **(d)** também apresentaram a formação de um complexo mononuclear $[C_{44}H_{59}LaN_8O_4]^+$ e $[C_{40}H_{49}LaN_9O_8]^+$ respectivamente, sendo **(c)** uma espécie protonada somada a uma molécula de acetonitrila e duas de metanol provenientes da síntese. No caso do fragmento **(d)**, o sinal é relativo ao complexo diprotonado somado a dois íons nitrato, o qual corrobora com os valores obtidos pela técnica de análise elementar (C, H e N).

As espécies descritas foram determinadas através de uma comparação direta entre os padrões de distribuição isotópica, onde o espectro simulado para cada fragmento foi sobreposto ao espectro obtido experimentalmente a fim de obter dados qualitativos a respeito dos íons presentes em solução. Tais resultados dispostos nas Figuras 23 a 26 confirmam que em solução a espécie presente é a do complexo na sua forma mononuclear e apesar de existir um fragmento relativo ao ligante, nenhuma espécie correspondente à forma binuclear foi detectada.

Figura 23. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o fragmento (a) $m/z = 660,50 [C_{40}H_{50}N_7O_2]^+$. Erro calculado: 0,015%.

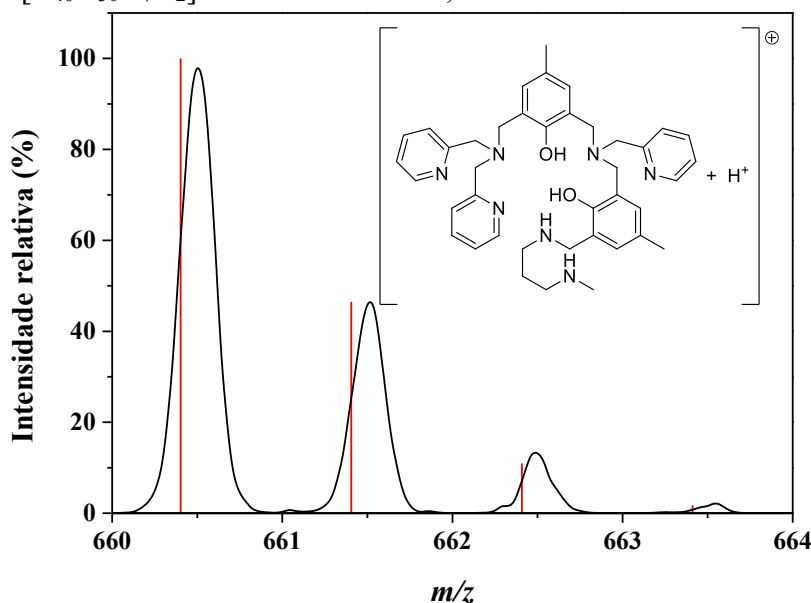


Figura 24. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o fragmento (b) $m/z = 859,39$ $[C_{40}H_{48}LaN_8O_5]^+$. Erro calculado: 0,012%.

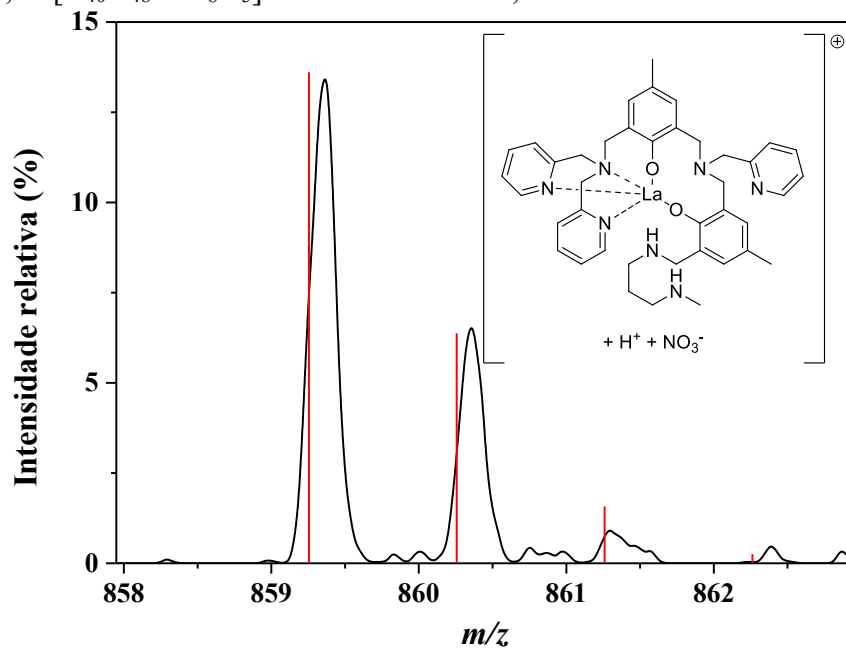


Figura 25. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o fragmento (c) $m/z = 903,35$ $[C_{44}H_{59}LaN_8O_4]^+$. Erro calculado: 0,006%.

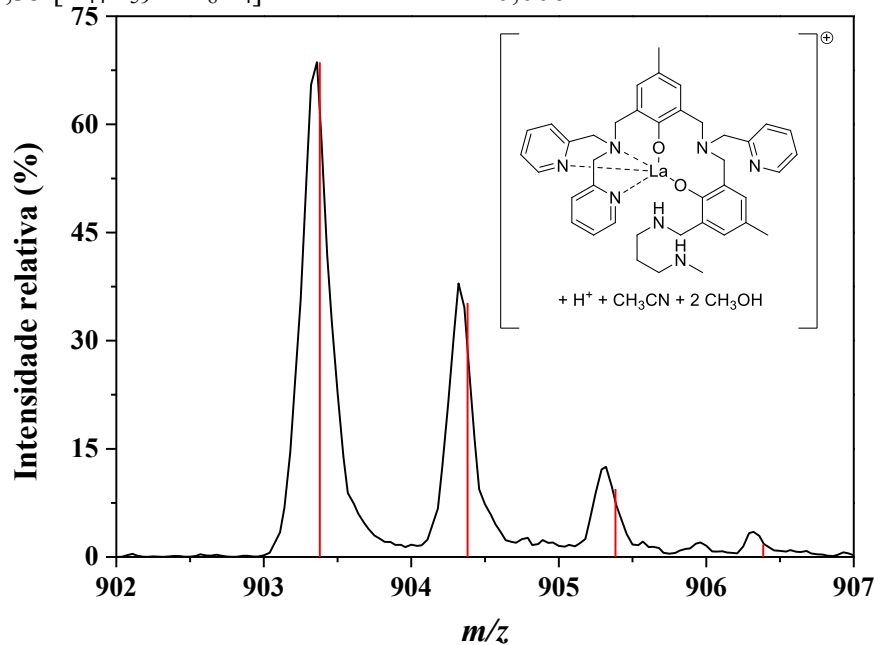
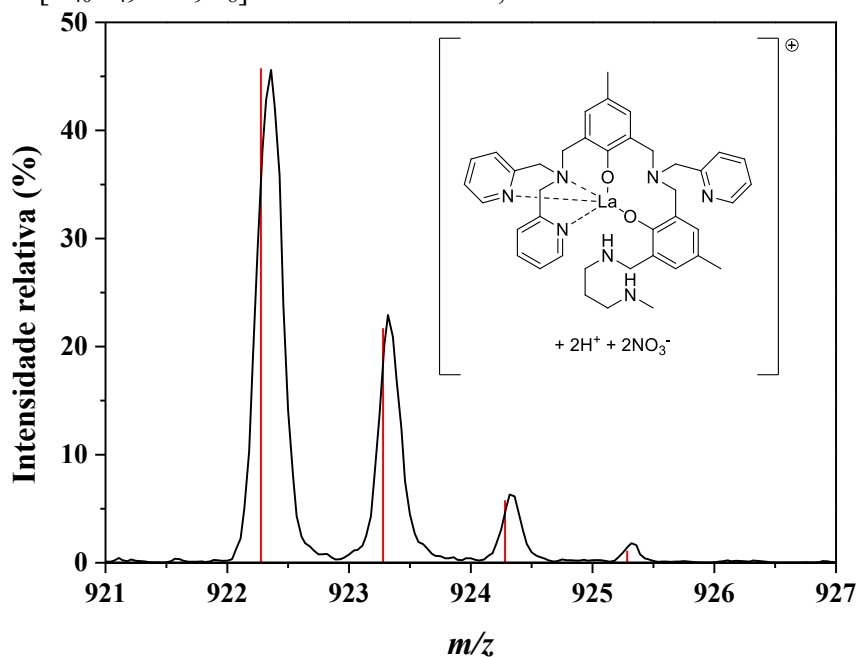


Figura 26. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o fragmento (d) $m/z = 922,35$ $[\text{C}_{40}\text{H}_{49}\text{LaN}_9\text{O}_8]^+$. Erro calculado: 0,009%.



5.2.4 Difractometria de Raios X (XRD)

A determinação da estrutura cristalina por difração de raios X em monocristal é uma técnica de suma importância que visa obter informações a respeito do ambiente de coordenação, como por exemplo a geometria do complexo, comprimentos e ângulos de ligações e parâmetros conformacionais. Para que tal ferramenta seja aplicada com sucesso na caracterização de compostos, faz-se necessário obter uma amostra na forma de monocristais.

Tendo esses aspectos em vista, o complexo em estudo foi recristalizado na presença de uma solução de acetonitrila/acetona (1:1 v/v), onde após a obtenção de cristais incolores foi realizada a análise de raios X. O complexo se cristalizou no sistema monoclinico no grupo espacial $P 2_1/c$, possuindo quatro unidades assimétricas por cela unitária. Os dados obtidos após o refinamento da estrutura pelo método dos mínimos quadrados revelaram uma estrutura que corresponde ao ORTEP da Figura 27 e os parâmetros cristalográficos da mesma estão organizados na Tabela 9. Algumas distâncias e ângulos de ligação foram selecionadas a fim de que possam ser comparados com os descritos na literatura, como mostrado na Tabela 10.

Alguns trabalhos já reportados reforçam essa hipótese (FERNANDES *et al.*, 2001), (BAISCH *et al.*, 2004), (LUO *et al.*, 2009) e como forma de compreender melhor esse sistema, outras tentativas de recristalização foram realizadas em recipientes lacrados sob atmosfera saturada de Ar e CO₂, no entanto, não foi possível de se obter cristais para ambos os casos. Como o sistema que continha excesso de CO₂ não formou nenhum cristal, entende-se que a inserção do mesmo se dá de forma lenta e que a gaseificação induzida impede a recristalização. No caso do argônio, possivelmente o gás arrastou grande parte do CO₂ presente no meio, impossibilitando a obtenção de um cristal de carga neutra.

A estrutura também apresentou duas aminas protonadas (hidrogênios não mostrados) e uma desordem em um dos grupamentos piridínicos da molécula, estando este não coordenado ao centro metálico, bem como a amina terciária que sustenta esse substituinte, tais características podem ser explicadas pela preferência dos íons lantanídeos por bases duras de Pearson. Essa propriedade fica evidente quando se compara o número de ligações realizadas pelo metal em sítios que possuem diferentes basicidades, sendo para esse caso, seis ligações provenientes de um sítio duro e apenas três derivadas de um sítio macio.

Tabela 9. Dados cristalográficos selecionados para os complexos La.H₂L² e La.HL^{1*}.

	La.H ₂ L ²	La.HL ^{1*}
Fórmula empírica	C ₄₆ H ₆₄ LaN ₁₀ O _{14,50}	C ₃₈ H ₄₀ Cl ₆ LaN ₇ O _{10,5}
Massa molar	1127,98 g.mol ⁻¹	1114,38 g.mol ⁻¹
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico
Grupo espacial	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>	P-1
Dimensões da cela unitária	<i>a</i> = 16,5675(14) Å	<i>a</i> = 9,8817(3) Å
	<i>b</i> = 19,4782(15) Å	<i>b</i> = 14,9229(4) Å
	<i>c</i> = 16,9471(14) Å	<i>c</i> = 34,1873(9) Å
	<i>α</i> = 90°	<i>α</i> = 87,4220(10)°
	<i>β</i> = 110,717(2)°	<i>β</i> = 87,8130(10)°
	<i>γ</i> = 90°	<i>γ</i> = 71,724(2)°
Volume	5115,3(7) Å ³	4780,7(2) Å ³
Z	4	4
Densidade	1,465 Mg/m ³	1,548 Mg/m ³
Tamanho do cristal	0,260 × 0,240 × 0,040 mm ³	0,240 × 0,220 × 0,160 mm ³
Reflexões coletadas	62304	47252
Reflexões independentes	14885 [R(int) = 0,0717]	18635 [R(int) = 0,0543]
Método de refinamento	Mínimos-quadrados/Matriz completa em F ²	Mínimos-quadrados/Matriz completa em F ²

Goodness-of-fit em F²	1,021	1,043
Índices finais R [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0503, wR2 = 0,1030	R1 = 0,0512, wR2 = 0,1393

* Adaptado de MUXEL *et al.*, 2014.

Tabela 10. Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação selecionados para os complexos La.H₂L² e La.HL^{1*}.

Ligação	Comprimentos (Å) / Ângulos (°)	
	La.H ₂ L ²	La.HL ^{1*}
La-O _{fenolato}	2,372(2)	2,374(3)
La-O _{fenolato}	2,405(3)	2,443(3)
La-O _{carbamato}	2,549(3)	-
La-O _{carbamato}	2,565(3)	-
La-O _{água}	2,606(2)	-
La-O _{nitrito}	2,697(3)	2,685(3)
La-N _{piridina}	2,739(3)	2,788(4)
La-N _{piridina}	2,767(3)	2,809(4)
La-N _{amina}	2,797(3)	2,784(4)
O _{fenolato} -La-O _{fenolato}	78,77(9)	75,96(11)
O _{fenolato} -La-O _{carbamato}	76,33(9)	-
O _{fenolato} -La-O _{carbamato}	140,66(8)	-
O _{fenolato} -La-O _{carbamato}	127,48(9)	-
O _{fenolato} -La-O _{carbamato}	146,04(8)	-
O _{carbamato} -La-O _{carbamato}	51,53(8)	-
O _{fenolato} -La-O _{água}	75,16(8)	-
O _{fenolato} -La-O _{água}	68,52(8)	-
O _{carbamato} -La-O _{água}	131,37(9)	-
O _{carbamato} -La-O _{água}	133,17(9)	-
O _{fenolato} -La-O _{nitrito}	90,09(9)	Não reportado
O _{fenolato} -La-O _{nitrito}	135,99(8)	132,67(11)
O _{carbamato} -La-O _{nitrito}	74,07(9)	-
O _{carbamato} -La-O _{nitrito}	71,80(9)	-
O _{água} -La-O _{nitrito}	67,47(8)	-
O _{fenolato} -La-N _{piridina}	82,55(9)	85,65(11)
O _{fenolato} -La-N _{piridina}	79,56(9)	76,13(11)
O _{carbamato} -La-N _{piridina}	67,45(9)	-
O _{carbamato} -La-N _{piridina}	82,97(9)	-
O _{água} -La-N _{piridina}	143,85(9)	-
O _{nitrito} -La-N _{piridina}	141,49(9)	Não reportado
O _{fenolato} -La-N _{piridina}	148,29(9)	158,48(12)
O _{fenolato} -La-N _{piridina}	87,06(9)	116,46(11)
O _{carbamato} -La-N _{piridina}	128,49(9)	-
O _{carbamato} -La-N _{piridina}	78,28(9)	-
O _{água} -La-N _{piridina}	73,27(8)	-
O _{carbamato} -La-N _{piridina}	80,59(9)	-
N _{piridina} -La-N _{piridina}	122,81(9)	102,97(12)

O _{fenolato} -La-N _{amina}	137,81(9)	102,43(11)
O _{fenolato} -La-N _{amina}	73,59(8)	72,19(11)
O _{carbamato} -La-N _{amina}	106,55(8)	-
O _{carbamato} -La-N _{amina}	72,49(9)	-
O _{água} -La-N _{amina}	121,04(8)	-
O _{nitrato} -La-N _{amina}	131,74(9)	Não reportado
N _{piridina} -La-N _{amina}	61,72(8)	60,58(12)
N _{piridina} -La-N _{amina}	61,14(8)	60,10(12)

* Adaptado de MUXEL *et al.*, 2014.

O complexo em estudo apresentou distâncias de ligações semelhantes com o complexo mononuclear de La³⁺ reportado por Muxel e colaboradores (2014), um exemplo dessa similaridade pode ser observado nas ligações La-O_{fenolato}, La-O_{nitrato}, La-N_{piridina} e La-N_{amina}, que possuem uma diferença média de 0,82%, 0,45%, 1,60% e 0,47% respectivamente em seus valores de comprimento. Os dados relativos aos ângulos de ligações também estão em concordância o complexo de referência, apenas os valores correspondentes às ligações O_{fenolato}-La-N_{piridina}, O_{fenolato}-La-N_{amina} e N_{piridina}-La-N_{piridina} apresentaram uma leve diferença, fator que pode ser justificado pela diferença do número de coordenação para ambos os casos, bem como as peculiaridades de cada sítio coordenante, como por exemplo, o número de íons nitratos ligados ao metal e sua hapticidade (o complexo de Muxel apresentou dois nitratos com $\eta = 2$), a presença ou ausência de uma molécula de água e a inserção de uma molécula de CO₂ na esfera de coordenação.

5.2.5 Titulação Potenciométrica

Os estudos de titulação potenciométrica se demonstraram úteis na identificação dos equilíbrios existentes em solução e conseqüentemente na obtenção dos valores de pKa de cada espécie gerada. A Figura 28 apresenta a curva de titulação potenciométrica de 0,03 mmol do complexo realizada em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v), a mesma apresentou uma região tamponada compreendida entre pH 2,00 e 3,00 e três regiões de pKa que podem ser observados mais precisamente no diagrama de distribuição de espécies na Figura 29.

Figura 28. Curva de titulação potenciométrica de 0,03 mmol do complexo em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v) com $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl) a 25 °C.

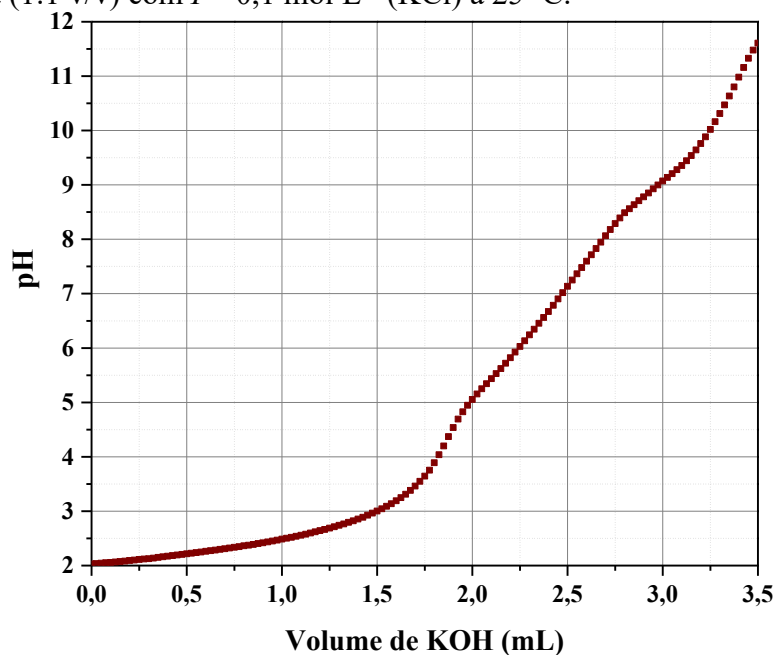
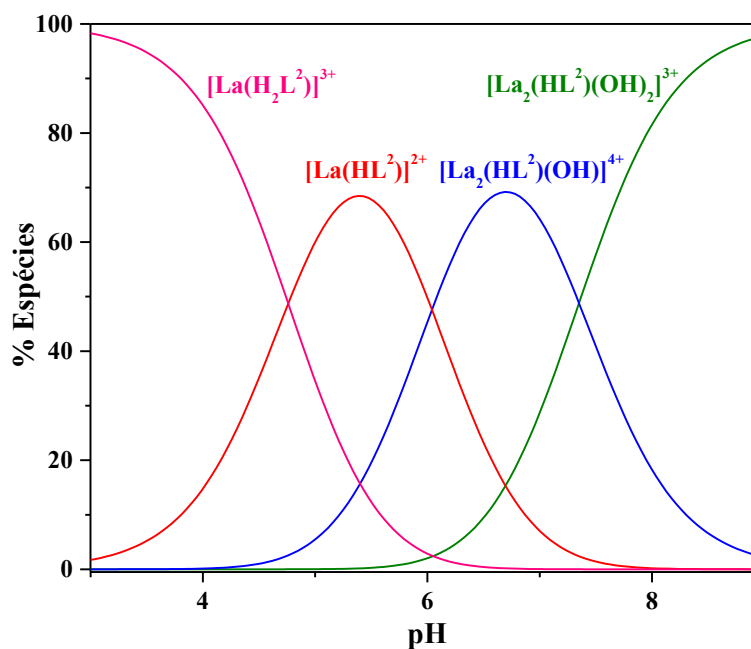


Figura 29. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH pela dissociação de 0,03 mmol do complexo em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v) com $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl) a 25 °C.



Tais experimentos buscaram avaliar a presença de moléculas de água coordenadas ao centro metálico quando o complexo se encontra em solução. Os dados obtidos estão sumarizados na tabela 11, onde os valores de pKa encontrados via potenciometria são apresentados.

A partir dos dados obtidos via titulação potenciométrica aliados aos estudos em solução via ESI - MS (+) (seções 5.3.1 e 5.3.2) e a trabalhos similares publicados na literatura por CAMARGO *et al.*, 2010, foi possível aferir as espécies presentes. Diante disso, atribuiu-se ao primeiro pKa a constante de desprotonação da amina terciária, a qual possui um valor próximo a 4,80. Neste pH ocorre uma provável formação de uma espécie binuclear ausente de grupos hidróxidos $[La_2(HL^2)]^{5+}$. Em pH 6,10, observa-se um segundo pKa correspondente à desprotonação de uma molécula de água coordenada ao centro metálico e consecutiva formação da espécie binuclear $[La_2(HL^2)(OH)]^{4+}$. Por fim, o terceiro pKa faz referência a uma segunda desprotonação de uma molécula de água originando a espécie $[La_2(HL^2)(OH)_2]^{3+}$.

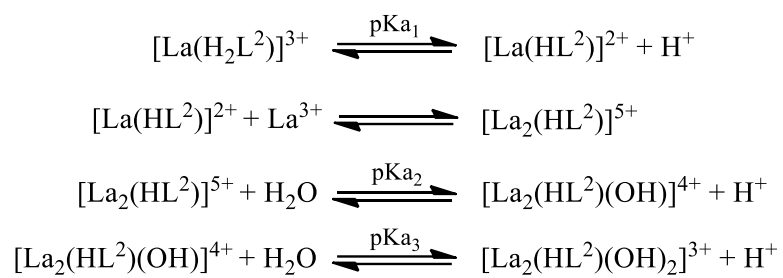
Tabela 11. Valores de pKa potenciométricos encontrados para o complexo $La.H_2L^2$.

Complexo	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃
$La.H_2L^2$	4,80	6,10	7,40

Estudo visando os cálculos das constantes de formação para cada espécie foram realizados, mas sem êxito. O processo de refinamento das titulações apresentou um erro elevado, dificultando dessa maneira a extração de qualquer dado com relação a espécies binucleares presentes no sistema. Logo, o equilíbrio proposto se baseia nos dados obtidos via ESI - MS (+) e em trabalhos já reportados pelo grupo (CAMARGO *et al.*, 2010), (MUXEL *et al.*, 2014).

Na Figura 30, estão apresentados os equilíbrios químicos propostos para o tratamento dos dados experimentais da titulação potenciométrica, envolvendo a desprotonação do complexo e as ionizações das moléculas de água coordenadas aos centros metálicos (as n moléculas de água coordenadas foram omitidas para facilitar a visualização).

Figura 30. Esquema dos equilíbrios presentes em solução para a titulação potenciométrica do complexo $\text{La.H}_2\text{L}^2$.



Fonte: O autor.

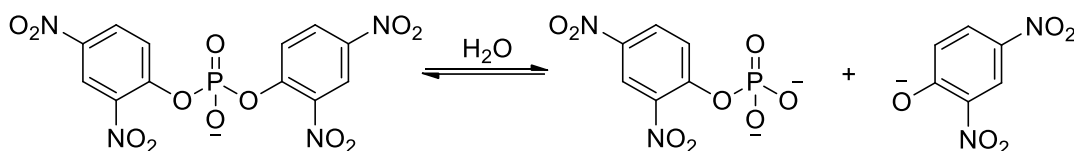
5.3 ESTUDOS DE REATIVIDADE

Nesta seção serão apresentados resultados referentes aos testes cinéticos realizados para o complexo lantanídico frente à hidrólise de ligações ésteres de fosfato. Como discutido, sabe-se que as ligações P-O apresentam uma elevada estabilidade frente a mecanismos de clivagem, logo o desenvolvimento de compostos capazes de hidrolisar com eficiência essas ligações é de suma importância. Tendo esses aspectos em vista, o complexo em estudo se apresentou como um ótimo modelo funcional para desempenhar tal papel como descrito nos tópicos a seguir.

5.3.1 Reatividade Frente à Hidrólise 2,4-bdnpp

Testes foram realizados utilizando-se do 2,4-bdnpp como substrato modelo, que por apresentar ligações fosfodiésteres em sua estrutura, simulam os grupos fosfato presentes no DNA (BUNTON; FARBER, 1969). A reação de hidrólise do substrato está representada na Figura 31, onde nota-se a liberação do monoéster 2,4-dnpp e do 2,4-dnp em solução, tendo a taxa de liberação desse último monitorada em $\lambda = 400$ nm.

Figura 31. Reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-bdnpp.



Fonte: O autor.

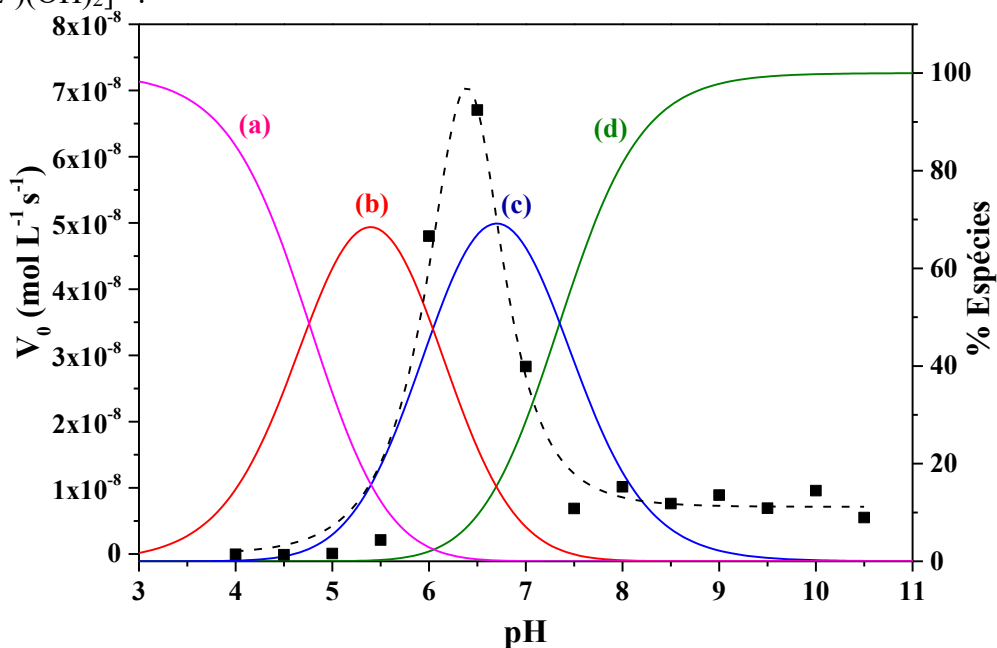
5.3.1.1 Efeito do pH na Hidrólise do 2,4-bdnpp

Primeiramente, foram realizados testes para avaliar a influência do pH na reação de hidrólise do substrato 2,4-bdnpp visando obter um valor de pH onde a atividade atinge seu valor máximo, para que através deste efeito, fosse possível verificar quais espécies estão envolvidas no processo de clivagem e então discutir possíveis propostas mecanísticas para o sistema estudado.

Após o tratamento cinético pelo método das velocidades iniciais (V_0), foi possível obter um perfil de pH em função de V_0 onde a atividade catalítica do complexo se demonstrou fortemente influenciada pelo pH do meio reacional, apresentando um perfil em forma de sino onde os valores máximos de atividade estão compreendidos em uma pequena faixa de pH (6,00 a 7,00), ou seja, valores próximos da neutralidade.

Com relação a outros valores de pH, a atividade catalítica é reduzida devido a protonação/desprotonação das espécies geradas em solução, sendo as mesmas analisadas mais precisamente quando se compara os dados cinéticos com o gráfico da distribuição de espécies oriundos da titulação potenciométrica, como ilustra a Figura 32. Para as regiões onde $\text{pH} < 5,50$, nota-se a formação das espécies protonadas **(a)** e **(b)** que devido ao meio ácido não apresentam grupos hidróxidos coordenados ao metal, justificando a baixa atividade nessa região. Observa-se que na faixa de $\text{pH} 6,00 - \text{pH} 7,00$ o complexo possui maior atividade frente à hidrólise do substrato, sendo a espécie **(c)** a cataliticamente ativa em solução devido a uma provável desprotonação de uma molécula de H_2O e consecutiva formação do nucleófilo (OH^-) a $\text{pH} 6,50$. Por fim, na região onde $\text{pH} > 7,00$ a espécie predominante é a **(d)**, tendo está uma diminuição na atividade de clivagem do 2,4-bdnpp devido a uma elevação da concentração de cargas negativas (OH^-) ao redor do centro metálico, dificultando a coordenação do substrato (carregado negativamente) e impedindo sua respectiva hidrólise.

Figura 32. (---) Dependência da velocidade inicial de hidrólise do 2,4-bdnpp (V_0) promovida pelo complexo em diferentes valores de pH. Condições: [Complexo] = $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, [2,4-bdnpp] = $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, [Tampões] = $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$), acetonitrila/água (1:1 v/v) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. (—) Diagrama de distribuição de espécies em função do pH pela dissociação de $0,03 \text{ mmol}$ do complexo em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v) com $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. (a) = $[\text{La}(\text{H}_2\text{L}^2)]^{3+}$, (b) = $[\text{La}(\text{HL}^2)]^{2+}$, (c) = $[\text{La}_2(\text{HL}^2)(\text{OH})]^{4+}$ e (d) = $[\text{La}_2(\text{HL}^2)(\text{OH})_2]^{3+}$.



O gráfico da dependência da velocidade inicial de hidrólise do 2,4-bdnpp mostrado foi ajustado utilizando da Equação 2 (KANTACHA *et al.*, 2011), onde a mesma descreve uma função constituída de duas variáveis que fazem referência aos valores de pKa cinéticos encontrados para o complexo, sendo possível comparar esses dados com os obtidos por titulação potenciométrica e conseqüentemente com outros trabalhos reportados na literatura. Tais valores podem ser consultados na Tabela 12.

$$V = V_0 \left[\frac{\left(1 + \frac{\gamma K a_2}{[H^+]}\right)}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K a_1} + \frac{K a_2}{[H^+]}\right)} \right] \quad (2)$$

Tabela 12. Valores dos pKa potenciométricos e cinéticos obtidos para o complexo La.H₂L² em comparação com os valores dos complexos mono e binucleares (La.HL¹ e La.HL¹-Si)*.

Complexo	Potenciométrico			Cinético	
	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃	pKa ₁	pKa ₂
La.HL ¹ *	5,50	9,60	-	9,20	-
La.HL ¹ -Si*		n.d.		5,12	6,94
La.H ₂ L ²	4,80	6,10	7,40	5,20±0,10	7,80±0,82

* Adaptado de MUXEL *et al.*, 2014, n.d. Não determinado.

A Tabela 12 apresenta os valores dos pKa potenciométricos e cinéticos obtidos para o complexo La.H₂L² em comparação com os valores dos complexos mono e binucleares (La.HL¹ e La.HL¹ imobilizado em sílica 3-aminopropil) como reportado por Muxel (MUXEL *et al.*, 2014).

Nota-se que os valores de pKa cinéticos obtidos apresentaram uma certa proximidade com o sistema binuclear, sendo que não foi possível realizar a titulação potenciométrica do complexo imobilizado devido à sua baixa solubilidade.

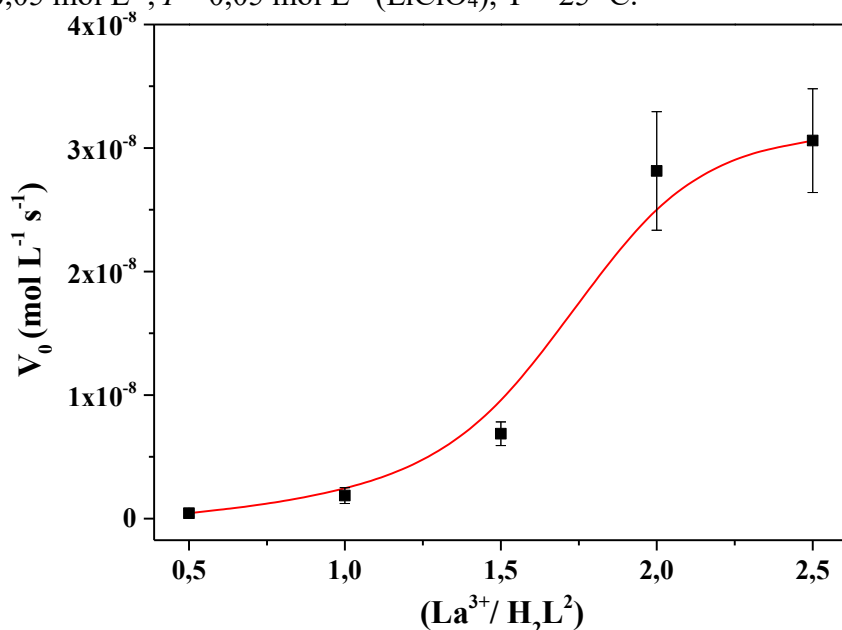
É importante ressaltar que a inserção da *N*-metil-1,3-propanodiamina ao ligante aldeído causou uma modificação no perfil cinético para o complexo La.H₂L², resultando em um máximo de atividade a pH 6,50 comparado ao complexo La.HL¹-Si que apresentou um perfil cinético similar com um máximo em pH 6,00, sendo ambos diferentes do sistema mononuclear La.HL¹ que apresentou um máximo em pH 9,00 (MUXEL *et al.*, 2014). Tais dados foram úteis para a elaboração da hipótese de que o complexo mononuclear sintetizado neste trabalho dá origem a uma espécie binuclear em solução, que por sua vez, afeta diretamente os valores dos pKa cinéticos.

Com o desígnio de confirmar a formação dessa espécie binuclear em solução, um estudo variando a proporção metal/ligante foi realizado sob as mesmas condições cinéticas no pH ótimo a fim de se obter uma razão onde a atividade é máxima. As proporções utilizadas ficaram compreendidas na faixa de 0,5 : 1,0 a 2,5 : 1,0, sendo o número de equivalentes de La³⁺ a variável em cada ponto, como mostrado na Figura 33.

Nota-se que para a razão igual a 1,0, o complexo apresentou um valor de V₀ igual a 1,90 × 10⁻⁹ mol L⁻¹ s⁻¹ e à medida que o número de equivalentes de La³⁺ é aumentado, a atividade catalítica se demonstra mais eficiente. Observa-se que a atividade atinge um valor máximo quando a razão é igual a 2,0 e a mesma permanece praticamente inalterada em razão 2,50, supondo-se que adição de mais equivalentes de íons de lantânio não exercem influência no desempenho da espécie cataliticamente ativa em solução, que por sua vez, utilizando-se desses

dados, é possível inferir que se trata de uma espécie binuclear que gerou um aumento de 15 vezes no valor de V_0 quando comparado a proporção 1,0 : 1,0.

Figura 33. Dependência da proporção $\text{La}^{3+} / \text{H}_2\text{L}^2$ na velocidade de hidrólise do substrato 2,4-bdnpp a pH 6,50 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: $[\text{La}^{3+}] = 5,60 \times 10^{-6}$ a $2,80 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{L}^2] = 1,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{2,4-bdnpp}] = 0,56 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Tampão MES}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.



Com o objetivo de caracterizar esta espécie binuclear no sistema, uma cinética sob as mesmas condições descritas foi acompanhada via ESI - MS (+) a fim de se obter mais informações a respeito dessa espécie gerada. Para tal, após a adição do substrato à solução contendo o catalisador, uma alíquota da mesma foi coletada com o auxílio de uma seringa e em seguida ionizada, dando origem aos fragmentos mostrados na Figura 34. O espectro apresentou um número elevado de fragmentações, sendo possível observar três sinais de interesse: **(a)**, **(b)** e **(c)**, onde através de um padrão de distribuição isotópica os fragmentos foram caracterizados (Figura 35 a 37). O fragmento **(a)** faz referência ao ligante sem o grupamento amina somado a uma molécula de água, enquanto o fragmento **(b)** elucida a presença de um complexo binuclear. Nota-se que o fragmento **(c)** é compatível ao complexo binuclear associado ao substrato, confirmando a hipótese da formação dessa espécie cataliticamente ativa em solução. É importante ressaltar que nenhuma espécie mononuclear foi detectada, tendo em vista a ausência do pico em $m/z = 922,35$.

Figura 34. Espectro de massa realizado no modo positivo para uma cinética a pH 6,50 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Fragmentos observados: (a) $m/z = 590,38$ $[C_{36}H_{40}N_5O_3]^+$, (b) $m/z = 1090,38$ $[C_{42}H_{54}La_2N_9O_8]^+$ e (c) $m/z = 1520,20$ $[C_{54}H_{61}La_2N_{13}O_{20}P]^+$.

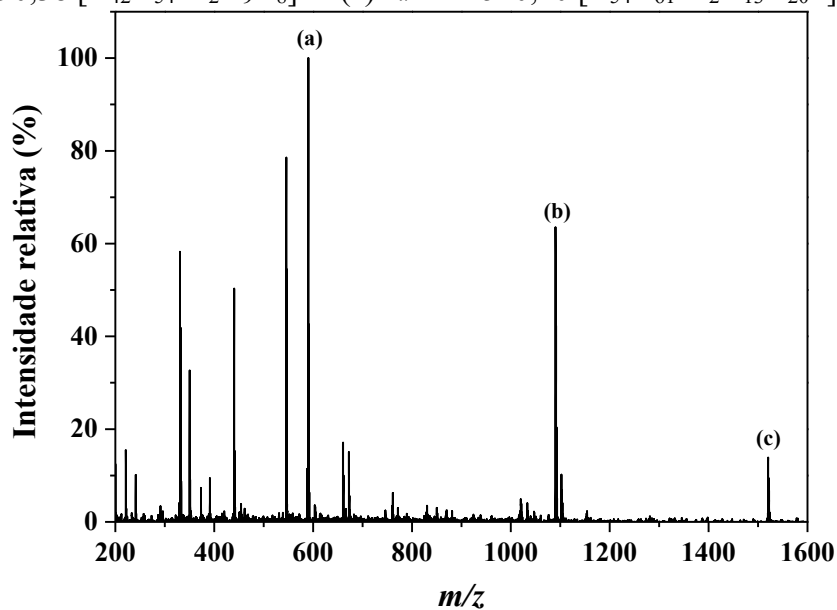


Figura 35. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o fragmento (a) $m/z = 590,38$ $[C_{36}H_{40}N_5O_3]^+$. Erro calculado: 0,011%.

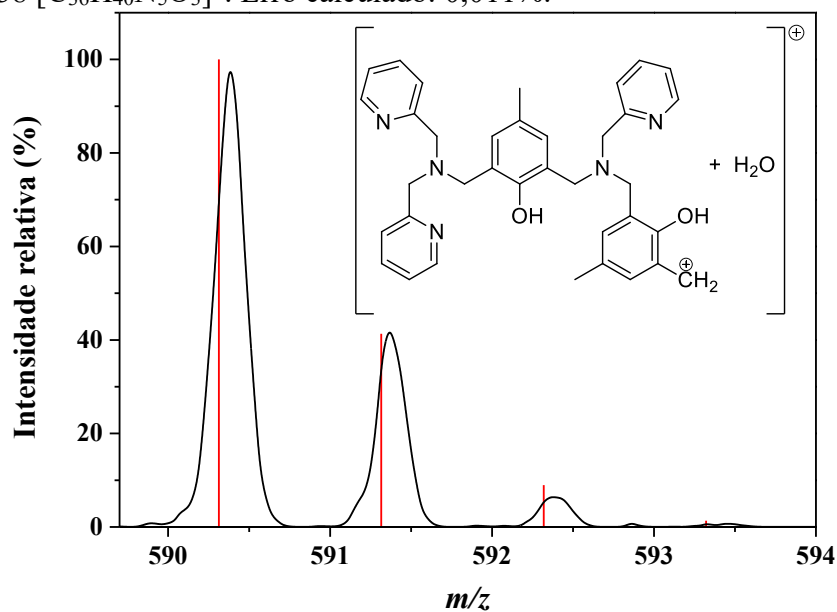


Figura 36. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o fragmento (b) $m/z = 1090,38$ $[C_{42}H_{54}La_2N_9O_8]^+$. Erro calculado: 0,015%.

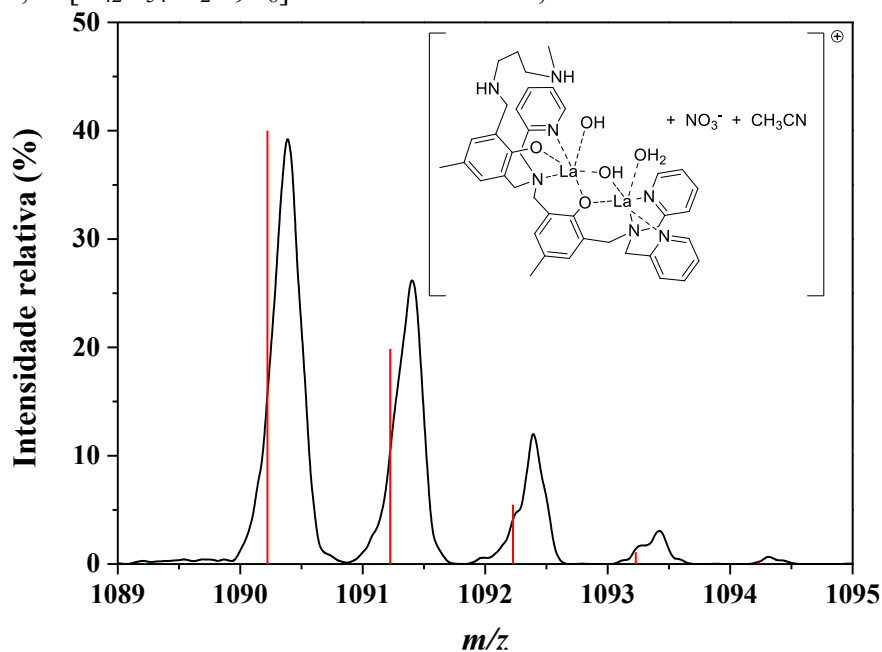
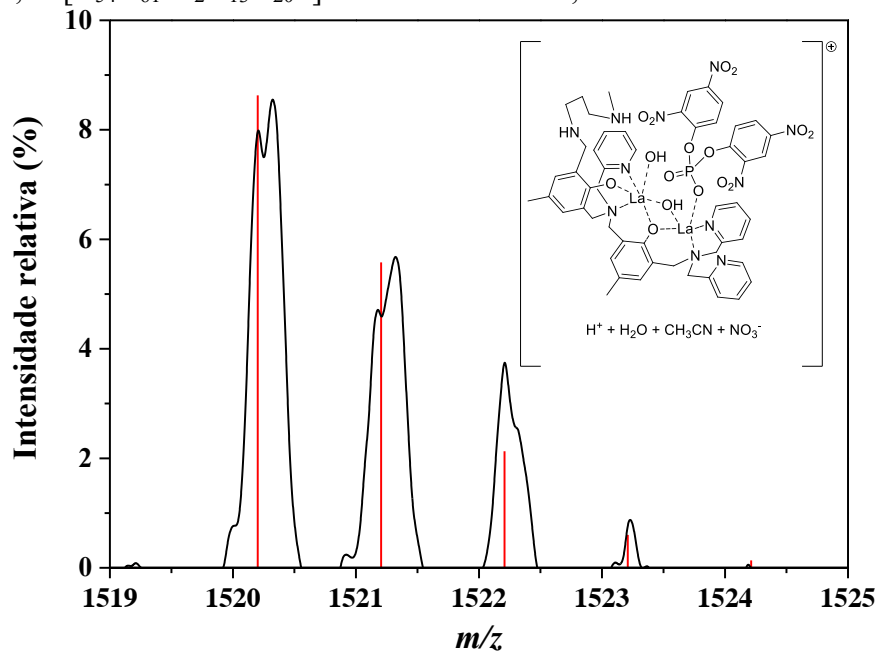


Figura 37. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o fragmento (c) $m/z = 1520,20$ $[C_{54}H_{61}La_2N_{13}O_{20}P]^+$. Erro calculado: 0,008%.



5.3.1.2 Efeito da Concentração do Substrato na Hidrólise do 2,4-bdnpp

A avaliação do efeito da concentração do substrato 2,4-bdnpp sobre a velocidade de hidrólise promovida pelo complexo foi investigada em pH: 6,00, 6,50 e 7,00, sendo que se acredita que a espécie cataliticamente ativa se trata de um arranjo binuclear. A velocidade da reação exibiu uma forte dependência com relação à concentração do substrato e o método das velocidades iniciais foi novamente empregado no tratamento dos dados. Após a construção de um gráfico ($[2,4\text{-bdnpp}]$ versus V_0) foi possível obter um perfil de saturação para cada pH, sendo empregada a equação não linear de Michaelis-Menten para a obtenção dos parâmetros cinéticos. Os gráficos da dependência da concentração do substrato na velocidade da hidrólise, bem como os parâmetros cinéticos para cada sistema estão apresentados nas Figuras 38 a 40 e na Tabela 13.

Figura 38. Dependência da concentração do substrato 2,4-bdnpp na velocidade da reação catalisada pelo complexo a pH 6,00 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: $[\text{Complexo}] = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[2,4\text{-bdnpp}] = 4,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Tampão MES}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

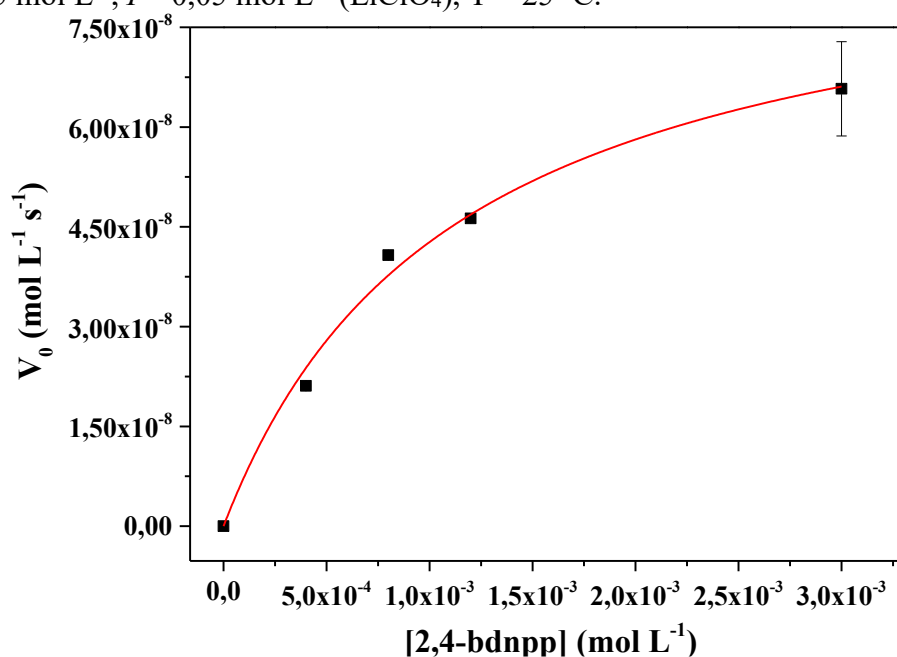


Figura 39. Dependência da concentração do substrato 2,4-bdnpp na velocidade da reação catalisada pelo complexo a pH 6,50 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: [Complexo] = $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, [2,4-bdnpp] = $4,0 \times 10^{-4}$ a $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, [Tampão MES] = $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

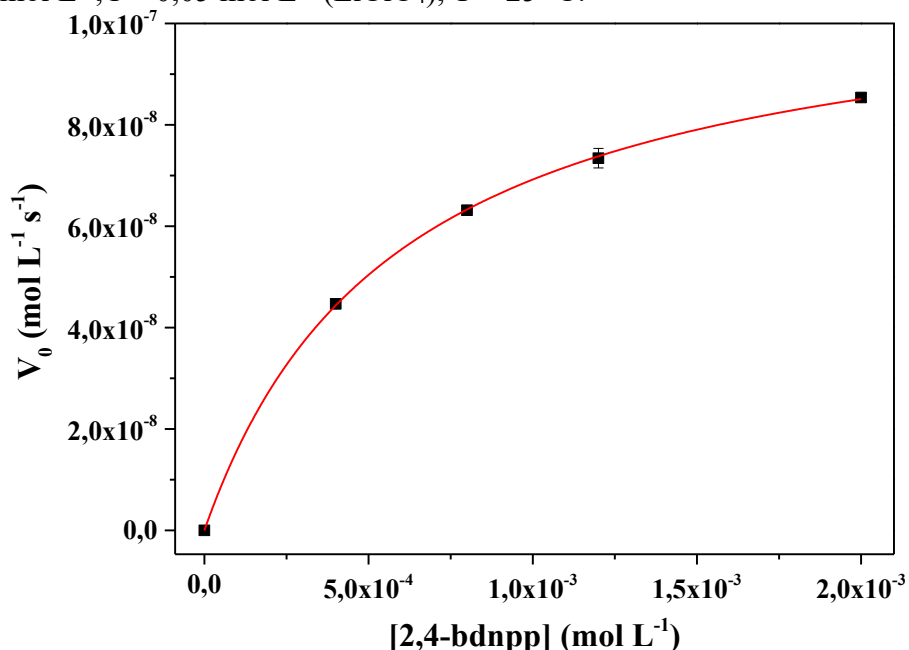


Figura 40. Dependência da concentração do substrato 2,4-bdnpp na velocidade da reação catalisada pelo complexo a pH 7,00 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: [Complexo] = $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, [2,4-bdnpp] = $4,0 \times 10^{-4}$ a $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, [Tampão HEPES] = $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

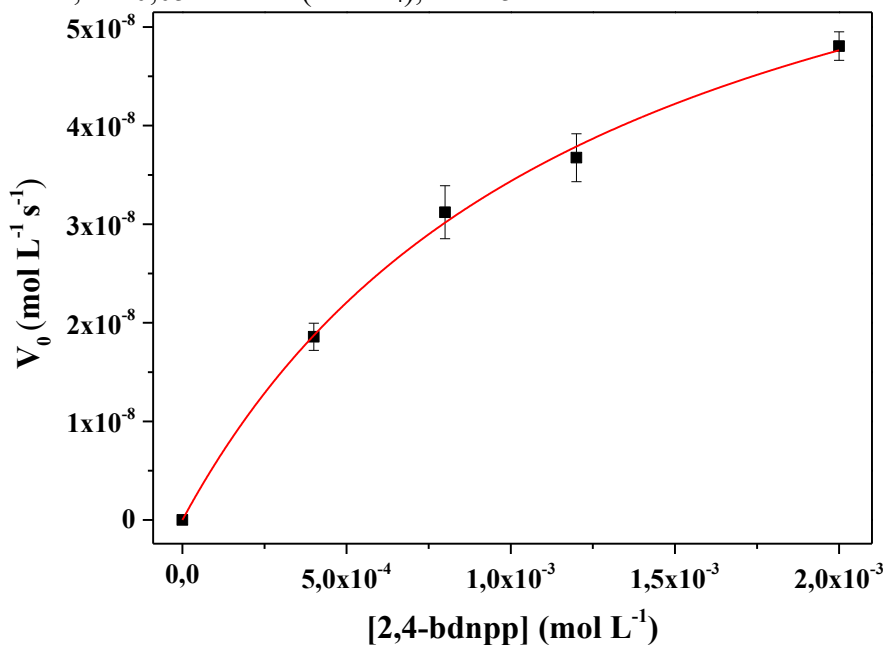


Tabela 13. Parâmetros cinéticos obtidos da reação de hidrólise do 2,4-bdnpp catalisada pelo complexo na faixa de pH 6,00 - 7,00 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v) a 25 °C. Em destaque estão apresentados os parâmetros obtidos para os sistemas: La.HL¹*, La.HL¹-Si* e o pH de atividade máxima para o La.H₂L² respectivamente.

pH	V _{Máx} (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	K _M (mol L ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹) ^(a)	E (mol ⁻¹ L s ⁻¹) ^(b)	K _{ass} (mol ⁻¹ L) ^(c)
9,00*	3,03 × 10⁻⁷	5,53 × 10⁻³	7,57 × 10⁻³	1,37	180,83
6,00*	1,64 × 10⁻⁷	1,89 × 10⁻³	8,20 × 10⁻³	4,33	529,10
6,00	9,09±0,10 × 10 ⁻⁸	1,13±0,70 × 10 ⁻³	4,54±0,06 × 10 ⁻³	4,00±1,00	884,95±337
6,50	1,10±0,15 × 10⁻⁷	5,95±0,30 × 10⁻⁴	5,50±0,75 × 10⁻³	9,24±0,76	1680,67±80
7,00	7,76±1,00 × 10 ⁻⁸	1,26±0,80 × 10 ⁻³	3,88±0,50 × 10 ⁻³	3,08±0,95	793,65±308

^(a) $k_{cat} = V_{Máx} / [La.H_2L^2]$, ^(b) $E = k_{cat} / K_M$, ^(c) $K_{ass} = K_M^{-1}$. * Adaptado de MUXEL *et al.*, 2014.

Tendo como base os testes cinéticos realizados para o complexo La.H₂L², é possível aferir que uma espécie binuclear é gerada em solução. Logo, supõe-se que a concentração inicial do complexo na cubeta têm seu valor dividido pela metade. A Tabela 13 mostra que no pH 6,50 o complexo possui uma eficiência catalítica muito superior aos demais, fator que pode ser justificado por um baixo valor de K_M atrelado a um alto valor de k_{cat}.

Nota-se que a afinidade do substrato pelo complexo decresce quase pela metade a pH neutro em relação ao pH ótimo, apresentando o menor valor de K_{ass} para a hidrólise do 2,4-bdnpp e conseqüentemente a menor eficiência catalítica. Tal comportamento pode ser explicado analisando o gráfico da distribuição de espécies, onde nota-se que a pH 7,00 a porcentagem da espécie **(c)** decai para 64% enquanto que a espécie **(d)** dobra em relação ao pH ótimo, deixando o complexo com mais íons OH⁻, dificultando a coordenação do substrato ao centro metálico. O complexo em pH 6,50 apresentou uma aceleração de 30.000 vezes em relação à reação não catalisada ($k_{nc} = 1,80 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$) sob as mesmas condições experimentais.

O tratamento dos dados para o sistema em estudo demonstrou que o complexo La.H₂L² possui uma afinidade 3 vezes maior pelo substrato que o complexo imobilizado (MUXEL *et al.*, 2014), o que pode ser explicado por efeitos de segunda esfera de coordenação provenientes das aminas terminais protonadas presentes em ambos os complexos. Sabe-se, que a elevação do pH ótimo pode estar relacionada com o papel das ligações de hidrogênio dos grupos amina presentes, indicando que quando a segunda esfera de coordenação atua como receptora de ligações de hidrogênio, os valores de pKa e pH ótimos são aumentados e quando atua como doadora de ligações de hidrogênio os mesmos são reduzidos (ZHAO *et al.*, 2013).

Os dados obtidos a partir do pH 6,00 demonstraram que essas condições possuem o segundo melhor pH de atividade, onde a eficiência catalítica é reduzida pela metade em relação ao pH 6,50, mas ainda assim possui uma eficiência muito próxima ao complexo de referência. Esta diminuição é causada pela maior concentração da espécie **(b)** neste valor de pH, a qual se

assemelha à porcentagem da espécie (c). Portanto, o somatório dos efeitos de segunda esfera de coordenação mais efetivas do complexo $\text{La.H}_2\text{L}^2$ implicaram na redução do valor de K_M , gerando um aumento na eficiência catalítica desse complexo em relação ao complexo imobilizado em sílica 3-aminopropil. Os valores obtidos para a espécie mononuclear La.HL^1 foram inferiores aos das espécies binucleares, sendo que a sua eficiência catalítica é aproximadamente 3 e 7 vezes menor que para os sistemas $\text{La.HL}^1\text{-Si}$ e $\text{La.H}_2\text{L}^2$ respectivamente (MUXEL *et al.*, 2014).

Para assegurar que a espécie contendo o grupamento ($-\text{COO}^-$) descrita na seção 5.2.4 não é formada durante a reação, uma cinética sob as mesmas condições experimentais foi realizada no pH ótimo utilizando-se de uma solução de tampão, complexo e substrato previamente desgaseificados. A cada ponto cinético houve a purga de argônio nas soluções de estoque e nas cubetas momentos antes de iniciar a varredura. O perfil de saturação e os dados obtidos estão apresentados na Figura 41 e Tabela 14, onde é possível observar que não houve uma mudança significativa entre os parâmetros cinéticos, tendo em vista que a variação se dá unicamente ao erro associado à medida. Os valores apresentados sugerem a presença da mesma espécie cataliticamente ativa para ambos os sistemas, a qual possui uma elevada eficiência catalítica.

Figura 41. Dependência da concentração do substrato 2,4-bdnpp na velocidade da reação catalisada pelo complexo a pH 6,50 em solução desgaseificada de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: $[\text{Complexo}] = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{2,4-bdnpp}] = 4,0 \times 10^{-4}$ a $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Tampão MES}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1} (\text{LiClO}_4)$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, sob atmosfera de argônio.

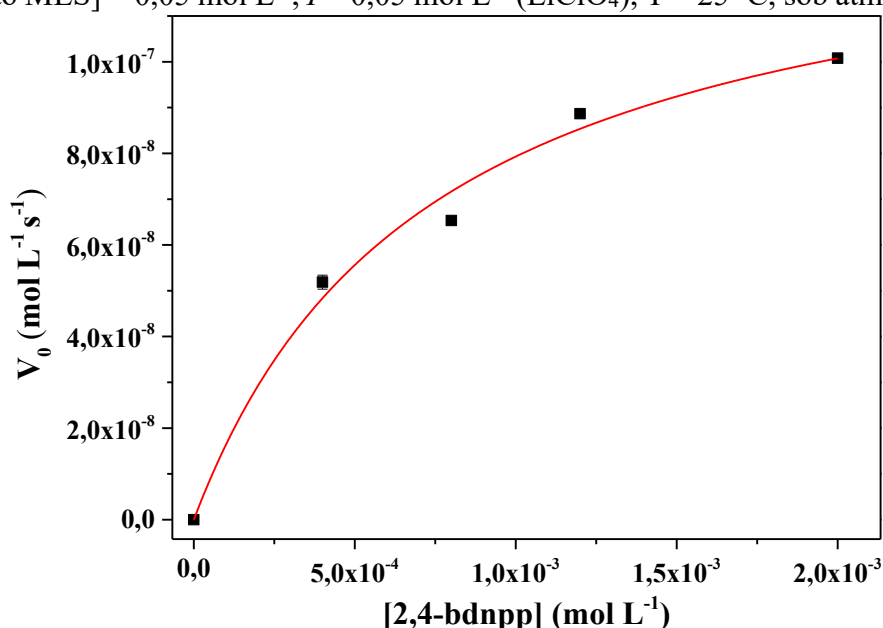


Tabela 14. Parâmetros cinéticos obtidos da reação de hidrólise do 2,4-bdnpp catalisada pelo complexo a pH 6,50 em solução desgaseificada de acetonitrila/água (1:1 v/v) a 25 °C sob atmosfera de argônio.

pH	$V_{M\acute{a}x}$ (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	K_M (mol L ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹) ^(a)	E (mol ⁻¹ L s ⁻¹) ^(b)	K_{ass} (mol ⁻¹ L) ^(c)
6,50	$1,38 \pm 0,20 \times 10^{-7}$	$7,41 \pm 0,35 \times 10^{-4}$	$6,90 \pm 1,00 \times 10^{-3}$	$9,31 \pm 0,87$	$1349,53 \pm 60,80$

^(a) $k_{cat} = V_{M\acute{a}x} / [La.H_2L^2]$, ^(b) $E = k_{cat} / K_M$, ^(c) $K_{ass} = K_M^{-1}$.

Tendo em vista o possível mecanismo de hidrólise do 2,4-bdnpp catalisado pelo complexo lantanídico, um estudo do efeito de D₂O foi realizado a fim de averiguar a presença ou ausência de transferência de prótons na etapa determinante da reação. É sabido que quando a razão $k_{cat(H)}/k_{cat(D)}$ estiver entre 0,80 e 1,50 é um forte indício de que não há a transferência de prótons na etapa determinante, sugerindo um mecanismo que envolve um ataque intramolecular (DEAL; HENGGE; BURSTYN, 1996). O valor encontrado para a razão $k_{cat(H)}/k_{cat(D)}$ foi aproximadamente 0,80, indicando que a hidrólise segue um mecanismo intramolecular, no qual o átomo de fósforo do substrato sofre um ataque nucleofílico através de um íon hidróxido gerado na esfera de coordenação do complexo.

Um pré-requisito importante de um catalisador é que após reagir com uma molécula do substrato, ocorra a liberação dos produtos e que consecutivamente a espécie ativa seja regenerada, para que deste modo o processo catalítico possa ser reiniciado. Para verificar se o complexo em estudo apresenta essa característica, realizou-se um experimento onde a reação de hidrólise do 2,4-bdnpp foi acompanhada espectrofotometricamente via UV-Vis em 445 nm por 3 horas a pH 6,50 e a temperatura ambiente. Com este estudo, observou-se que em um período de 3 horas o complexo foi capaz de realizar proporcionalmente a hidrólise de 4 moléculas de substrato para cada molécula de catalisador inicialmente adicionado.

5.3.1.3 Efeito da Temperatura na Hidrólise do 2,4-bdnpp

Todos os testes descritos até o momento para a hidrólise do substrato 2,4-bdnpp foram realizados a 25 °C, porém, importantes informações podem ser extraídas através de um estudo variando a temperatura do meio, como por exemplo: E_a , ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger e ΔG^\ddagger . Os testes tiveram como intervalo de trabalho a faixa de temperatura de 20°C - 35°C e o valor de E_a pôde ser calculado através da linearização da equação de Arrhenius (3), onde através de um gráfico $\ln k_{cat}$ versus $1/T$, foi possível de se obter o parâmetro $-E_a/R$ que corresponde ao coeficiente angular. Na equação, o valor de k representa a constante de velocidade observada, A o fator de

frequência das colisões, E_a a energia de ativação, R a constante dos gases ideais ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e T a temperatura em Kelvin.

$$k = A e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} \quad (3)$$

Um tratamento similar pode ser conduzido se utilizando da equação de Eyring (4), onde através de um gráfico linear $\ln(k_{\text{cat}}/T)$ versus $1/T$ é possível calcular o parâmetro ΔH^\ddagger por intermédio do coeficiente angular e ΔS^\ddagger a partir do correspondente coeficiente linear. Além disso, a energia livre de ativação ΔG^\ddagger pode ser obtida através da aplicação direta da relação termodinâmica: $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$. Os dados apresentados na equação representam a constante de Boltzmann (k_B), constante de Planck (h), entalpia de ativação (ΔH^\ddagger) e entropia de ativação (ΔS^\ddagger).

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \quad (4)$$

Diante desse contexto, a velocidade de hidrólise do substrato 2,4-bdnpp se demonstrou totalmente dependente da temperatura do sistema, implicando diretamente nos valores de k_{cat} obtidos para cada ponto cinético, como observado na Figura 42 através as linearizações das constantes de velocidade. Os parâmetros de ativação calculados para a reação estão sumarizados na Tabela 15.

Figura 42. Linearização das constantes catalíticas obtidas em diferentes temperaturas para a reação de hidrólise do 2,4-bdnpp promovida pelo complexo a pH 6,50 em meio acetonitrila/água (1:1 v/v). (A) equação de Arrhenius e (B) equação de Eyring, $R^2 = 0,96$.

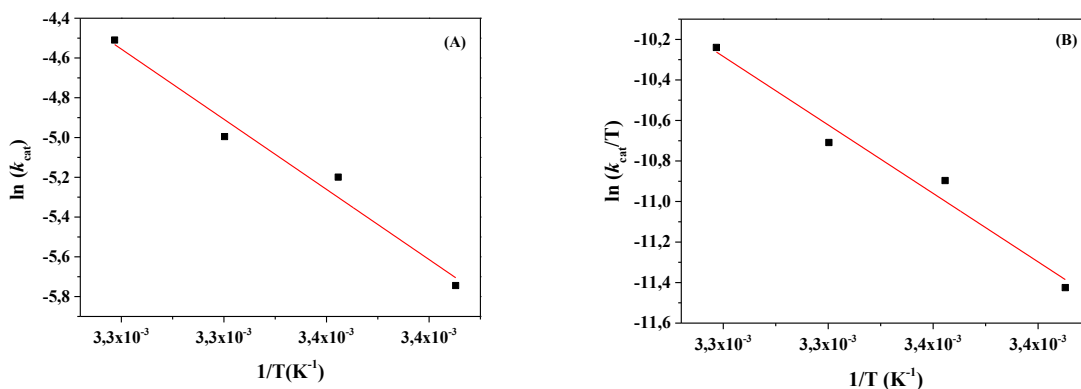


Tabela 15. Parâmetros de ativação para a hidrólise do 2,4-bdnpp catalisada pelo complexo a pH 6,50.

Catalisador	E_a (kJ mol ⁻¹)	ΔH^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	$-T\Delta S^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	ΔG^\ddagger (kJ mol ⁻¹) ^a
La.H ₂ L ²	58	56	-29,8 ^b	86
H ₂ O ^c	-	79	-34,4	113

(a) $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$, (b) Valor a 25 °C, (c) (KIRBY; YOUNAS, 1970).

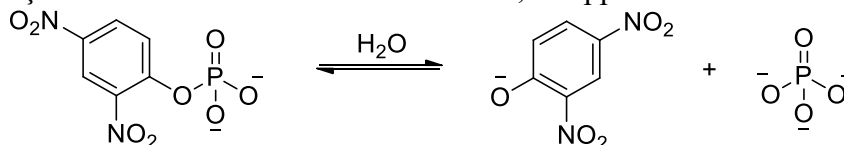
Através dos dados expostos na Tabela 15, nota-se que o complexo se apresenta como um ótimo modelo funcional para atuar na hidrólise de ligações de ésteres de fosfato, possuindo valores significativamente menores de ΔH^\ddagger quando comparado à reação não catalisada (80 kJ mol⁻¹) e conseqüentemente um baixo valor de energia de ativação (58 kJ mol⁻¹). Essa discrepância é explicada pelas interações eletrostáticas e possíveis ligações de hidrogênio que estabilizam o estado de transição, mas também tornam o ΔS^\ddagger menos favorável, já que uma maior reorganização é necessária ao redor do TS em cada ciclo catalítico.

5.3.2 Reatividade Frente à Hidrólise 2,4-dnpp

Um importante teste para a cinética de hidrólise do monoéster 2,4-dnpp é o acompanhamento da reação estequiométrica do complexo com o substrato 2,4-bdnpp por um período de 24 horas a temperatura ambiente, visando obter o número de equivalentes de 2,4-dnp liberados. Observou-se que durante esse tempo, dois equivalentes de 2,4-dinitrofenolato foram liberados, indicando que o monoéster também é hidrolisado durante a reação.

Para averiguar tal comportamento, um acompanhamento cinético direto da hidrólise do 2,4-dnpp foi realizado, o qual evidenciou um aumento da absorbância na região de $\lambda = 400$ nm, demonstrando que o complexo também apresenta atividade de monoesterase (Figura 43). Logo, o sistema contendo o monoéster foi estudado similarmente ao sistema que continha o diéster.

Figura 43. Reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-dnpp.



Fonte: O autor.

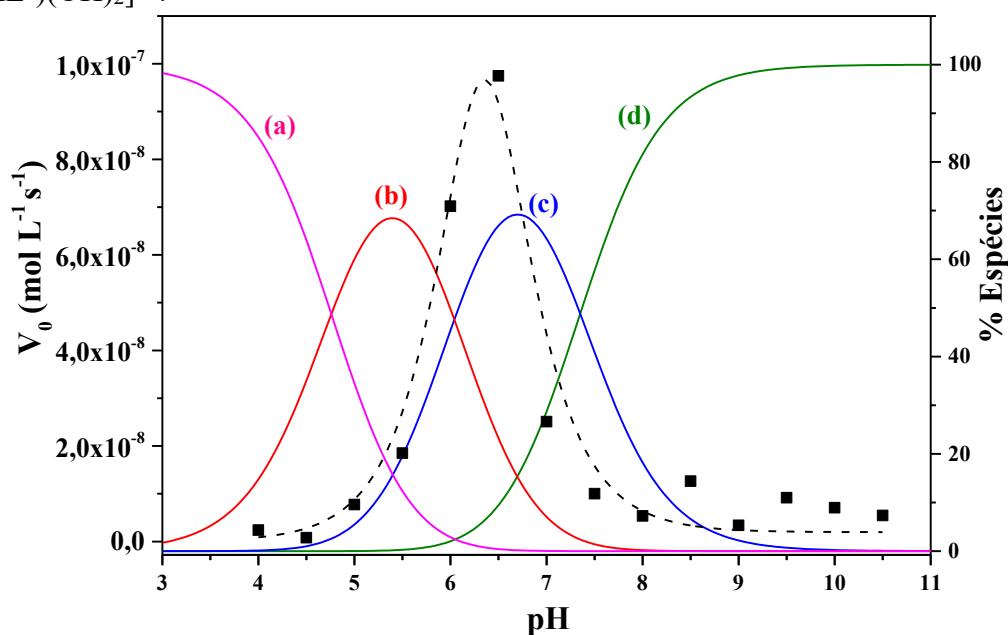
5.3.2.1 Efeito do pH na Hidrólise do 2,4-dnpp

Para avaliar a influência do pH na hidrólise do monoéster 2,4-dnpp, testes foram realizados adotando a mesma metodologia descrita para o diéster 2,4-bdnpp para a obtenção de um pH de atividade máxima. Após o tratamento dos dados pelo método das velocidades iniciais, foi possível obter um perfil de pH onde a atividade catalítica do complexo se demonstrou totalmente influenciável à medida que o pH tinha seu valor modificado.

O perfil de pH apresentou um formato de sino similar com o reportado para 2,4-bdnpp, sendo que os valores de atividade máxima se concentraram na mesma faixa de pH para ambos os casos, como mostra a Figura 44. Utilizando-se da Equação 2, foi possível calcular os valores de pKa cinéticos para a reação de clivagem do monoéster, que por sua vez foram muito próximos com os descritos para o diéster, como mostrado na Tabela 16. É importante ressaltar que o complexo mononuclear relatado por Muxel e colaboradores apresentou uma baixa eficiência como monoesterase, logo esse sistema não foi estudado. O complexo binuclear imobilizado em sílica 3-aminopropil demonstrou um perfil de pH de aumento exponencial, não sendo possível calcular os valores de pKa cinéticos para esse sistema (MUXEL *et al.*, 2014).

A discussão a respeito das espécies geradas em solução se dá da mesma maneira como discutida na seção 5.3.1, onde a protonação/desprotonação dos íons presentes no sistema influenciaram na atividade do complexo frente a hidrólise do 2,4-dnpp, sendo a espécie (c) a responsável pela maior atividade de hidrólise, existente também em pH 6,50.

Figura 44. (---) Dependência da velocidade inicial de hidrólise do 2,4-dnpp (V_0) promovida pelo complexo em diferentes valores de pH. Condições: $[\text{Complexo}] = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{2,4-dnpp}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Tampões}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$), acetonitrila/água (1:1 v/v) a 25 °C. (—) Diagrama de distribuição de espécies em função do pH pela dissociação de 0,03 mmol do complexo em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v) com $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl) a 25 °C. (a) = $[\text{La}(\text{H}_2\text{L}^2)]^{3+}$, (b) = $[\text{La}(\text{HL}^2)]^{2+}$, (c) = $[\text{La}_2(\text{HL}^2)(\text{OH})]^{4+}$ e (d) = $[\text{La}_2(\text{HL}^2)(\text{OH})_2]^{3+}$.



A Figura 44 mostra que as curvas obtidas para a hidrólise do 2,4-bdnpp e 2,4-dnpp possuem uma certa similaridade e apresentam um pH ótimo em 6,50, tal fato leva a considerar a hipótese do monoéster 2,4-dnpp estar ligado ao catalisador da mesma maneira que o diéster 2,4-bdnpp, mantendo a acidez de Lewis do centro metálico próxima para ambos os casos, a qual pode ser observada nos valores dos pKa's cinéticos.

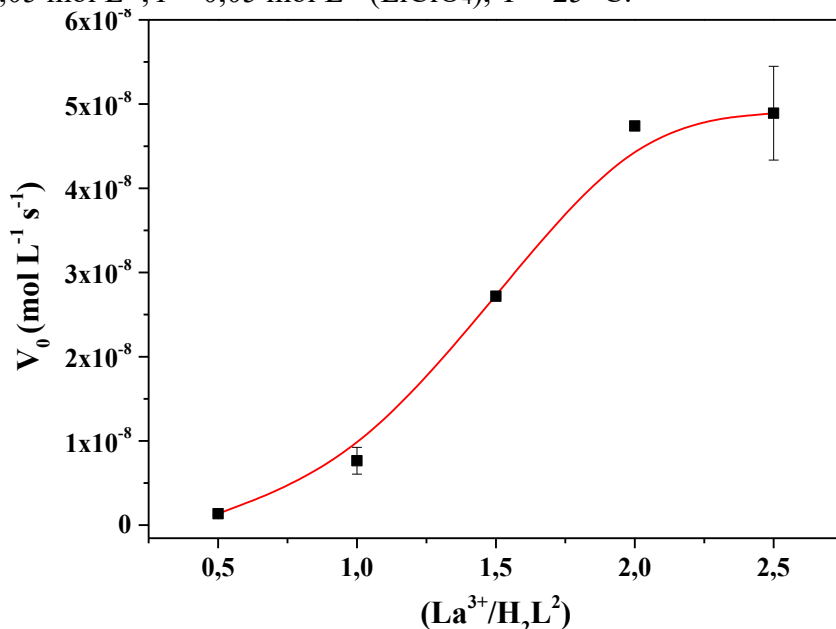
Tabela 16. Valores de pKa's cinéticos obtidos da hidrólise do 2,4-bdnpp e 2,4-dnpp.

	La.H ₂ L ²	
Substrato	pKa ₁	pKa ₂
2,4-dnpp	5,20±0,30	7,50±0,10
2,4-bdnpp	5,20±0,10	7,80±0,82

Na Tabela 16, nota-se uma similaridade com os valores de pKa obtidos para ambos os sistemas, indicando que além dos substratos se ligarem com a mesma hapticidade ao centro metálico, a espécie ativa responsável pela hidrólise de ambos é a mesma. Tais dados foram úteis para elaborar a hipótese de que o complexo mononuclear também origina uma espécie binuclear no mecanismo de hidrólise do monoéster.

Com o intuito de confirmar a formação dessa espécie binuclear em solução, um estudo variando a proporção metal/ligante também foi realizado sob as mesmas condições cinéticas no pH ótimo a fim de se obter uma razão onde a atividade é máxima. A metodologia utilizada foi a mesma que a descrita para o diéster, onde nota-se que a atividade atinge um valor máximo quando a razão é igual a 2,0 permanecendo invariável após a adição de mais equivalentes de íons de lantânio, sendo possível afirmar que essa razão facilita a formação de uma espécie binuclear, como mostrada na Figura 45.

Figura 45. Dependência da proporção $\text{La}^{3+} / \text{H}_2\text{L}^2$ na velocidade de hidrólise do substrato 2,4-dnpp a pH 6,50 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: $[\text{La}^{3+}] = 2,00 \times 10^{-5}$ a $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{L}^2] = 4,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[2,4\text{-dnpp}] = 1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Tampão MES}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.



A respeito da formação dessa espécie, uma cinética foi acompanhada via ESI - MS (+) visando confirmar a sua presença em solução, como no caso apresentado para o diéster. Após a adição do substrato ao meio cinético, uma pequena alíquota foi retirada do sistema com o auxílio de uma seringa e posteriormente adicionada ao espectrômetro, gerando os fragmentos observados na Figura 46. O espectro mostra três fragmentos de interesse, sendo (a) o ligante protonado livre em solução $m/z = 660,50$ $[\text{C}_{40}\text{H}_{50}\text{N}_7\text{O}_2]^+$ (seção 5.1.3), (b) o complexo binuclear com $m/z = 1090,38$ $[\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{La}_2\text{N}_9\text{O}_8]^+$ relatado na cinética do diéster (seção 5.3.1) e (c) o complexo binuclear associado ao monoéster $m/z = 1270,25$ $[\text{C}_{46}\text{H}_{57}\text{La}_2\text{N}_9\text{O}_{14}\text{P}]^+$, caracterizado através da distribuição isotópica apresentada na Figura 47. Novamente, apesar de

existir um fragmento referente ao ligante livre em solução nenhuma espécie mononuclear foi detectada.

Figura 46. Espectro de massa realizado no modo positivo para uma cinética a pH 6,50 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Fragmentos observados: (a) $m/z = 660,50$ $[\text{C}_{40}\text{H}_{50}\text{N}_7\text{O}_2]^+$, (b) $m/z = 1090,38$ $[\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{La}_2\text{N}_9\text{O}_8]^+$ e (c) $m/z = 1270,25$ $[\text{C}_{46}\text{H}_{57}\text{La}_2\text{N}_9\text{O}_{14}\text{P}]^+$.

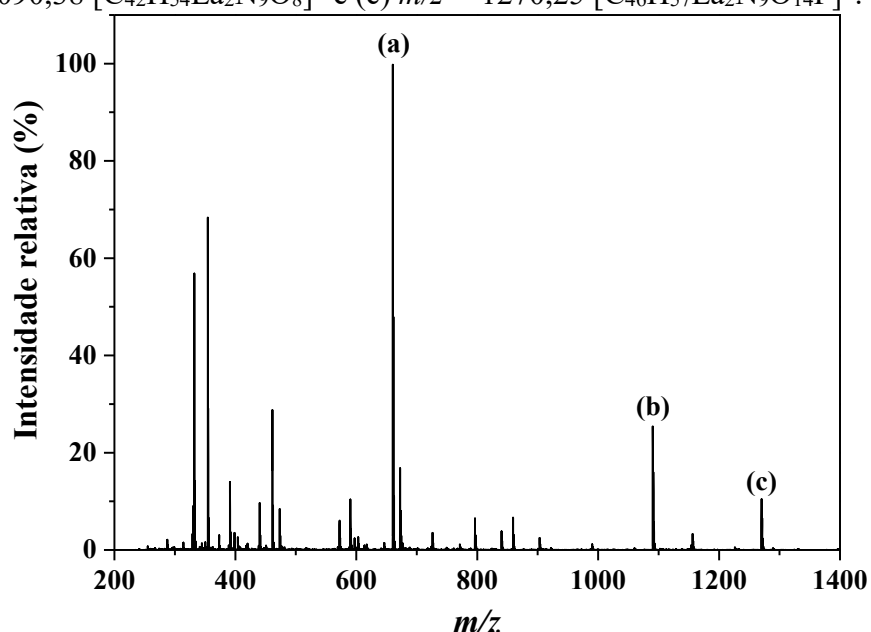
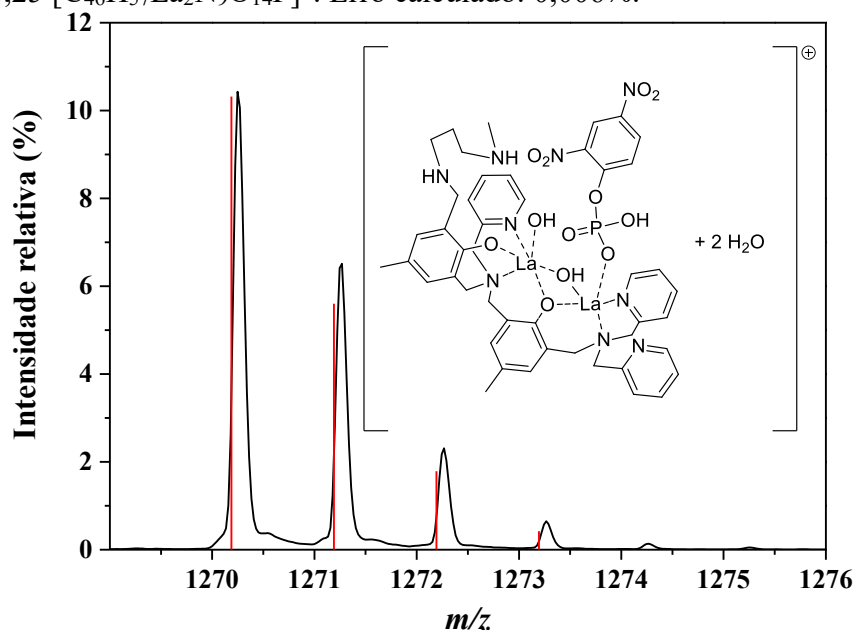


Figura 47. Perfil isotópico experimental (preto) e simulado (vermelho) para o fragmento (c) $m/z = 1270,25$ $[\text{C}_{46}\text{H}_{57}\text{La}_2\text{N}_9\text{O}_{14}\text{P}]^+$. Erro calculado: 0,006%.



5.3.2.2 Efeito da Concentração do Substrato na Hidrólise do 2,4-dnpp

A avaliação do efeito da concentração do monoéster na velocidade de hidrólise do mesmo foi monitorada nos valores de pH onde o complexo desempenhou uma maior atividade frente a clivagem (pH: 6,00, 6,50 e 7,00) com o objetivo de calcular os valores de $V_{Máx}$ e K_M para cada caso. A cinética se demonstrou fortemente influenciada pela concentração do substrato, sendo que a mesma foi tratada pelo método das velocidades, a qual apresentou um perfil de saturação que foi posteriormente ajustado pela equação não linear de Michaelis-Menten (Figura 48 a 50), obtendo-se os parâmetros cinéticos da Tabela 17. Novamente, a espécie ativa em solução se trata de um complexo binuclear, sendo assim, os cálculos seguiram a mesma metodologia adotada para a reação de hidrólise do diéster.

Figura 48. Dependência da concentração do substrato 2,4-dnpp na velocidade da reação catalisada pelo complexo a pH 6,00 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: $[Complexo] = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[2,4\text{-dnpp}] = 2,0 \times 10^{-4}$ a $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[Tampão \text{ MES}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

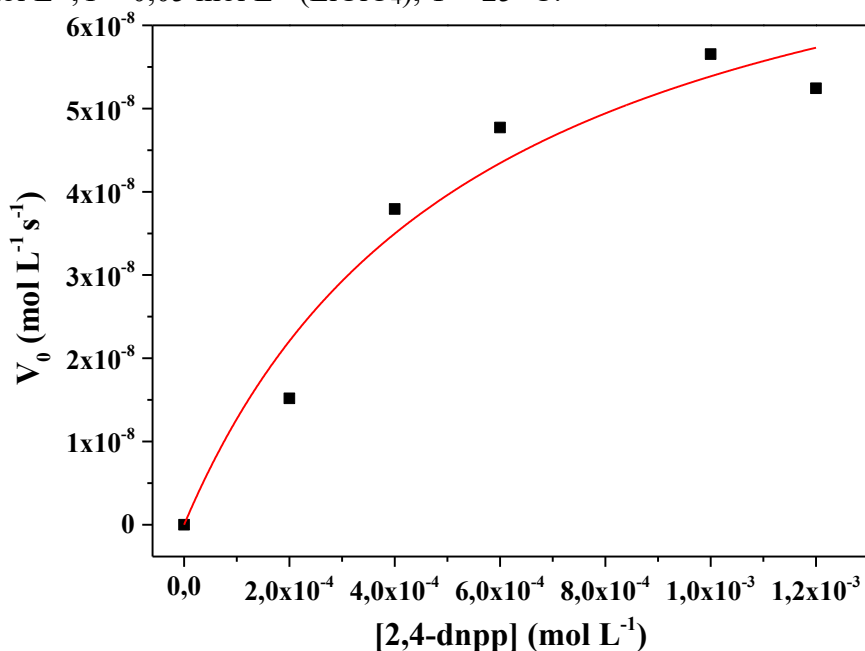


Figura 49. Dependência da concentração do substrato 2,4-dnpp na velocidade da reação catalisada pelo complexo a pH 6,50 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: [Complexo] = $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, [2,4-dnpp] = $2,0 \times 10^{-4}$ a $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, [Tampão MES] = $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

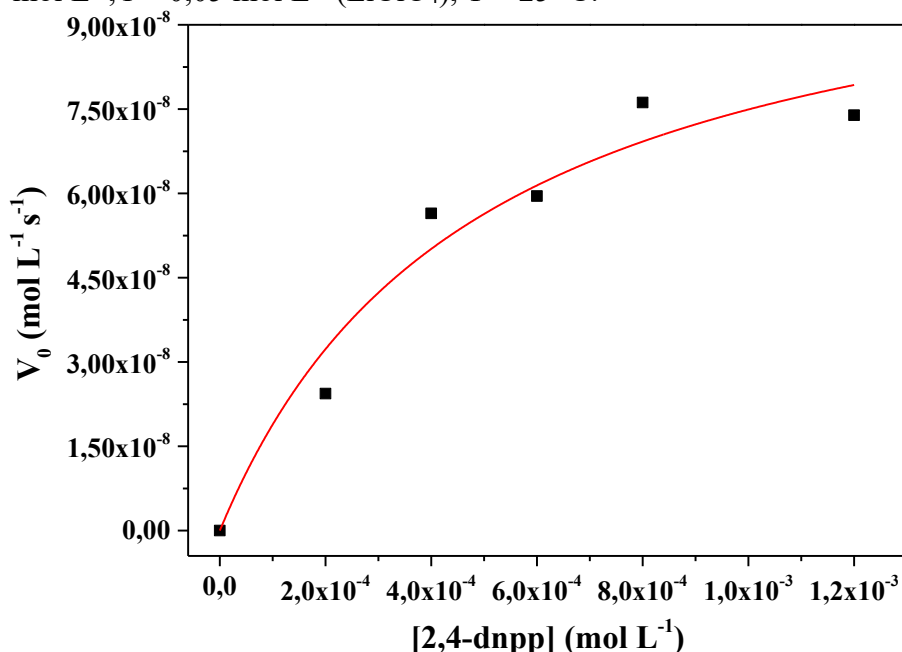


Figura 50. Dependência da concentração do substrato 2,4-dnpp na velocidade da reação catalisada pelo complexo a pH 7,00 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: [Complexo] = $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, [2,4-dnpp] = $2,0 \times 10^{-4}$ a $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, [Tampão HEPES] = $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

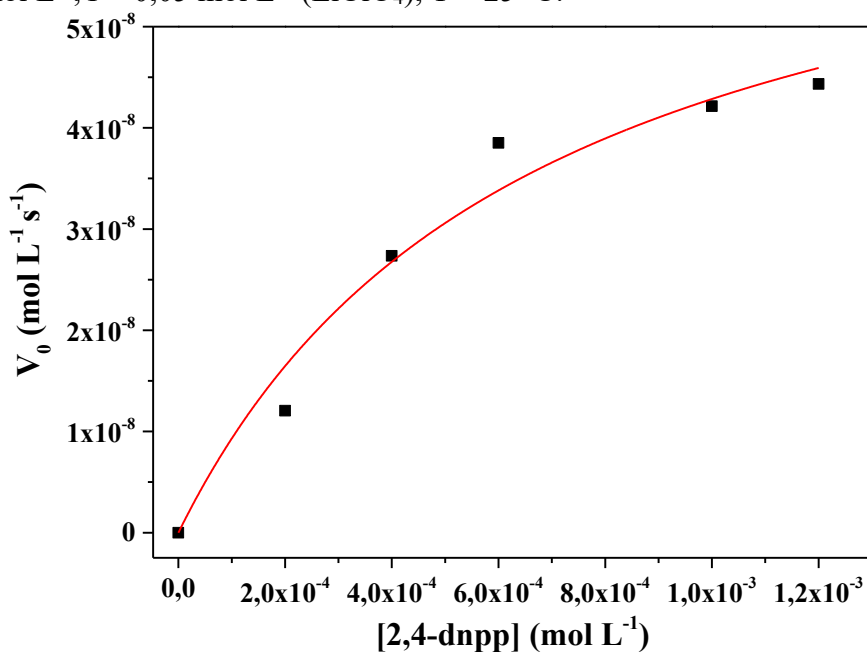


Tabela 17. Parâmetros cinéticos obtidos da reação de hidrólise do 2,4-dnpp catalisada pelo complexo na faixa de pH 6,00 - 7,00 em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v) a 25 °C. Em destaque estão apresentados os parâmetros obtidos para o sistema La.HL¹-Si* e o pH de atividade máxima para o La.H₂L² respectivamente.

pH	V _{Máx} (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	K _M (mol L ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹) ^(a)	E (mol ⁻¹ L s ⁻¹) ^(b)	K _{ass} (mol ⁻¹ L) ^(c)
6,00*	1,25 × 10⁻⁸	4,08 × 10⁻⁴	3,12 × 10⁻⁴	0,76	2451,00
6,00	8,42±0,70 × 10 ⁻⁸	5,63±0,40 × 10 ⁻⁴	4,21±0,30 × 10 ⁻³	7,48±0,08	1776,20±137
6,50	1,12±0,007 × 10⁻⁷	4,92±0,014 × 10⁻⁴	5,60±0,03 × 10⁻³	11,38±0,03	2032,52±5,84
7,00	7,15±0,30 × 10 ⁻⁸	6,68±1,00 × 10 ⁻⁴	3,58±0,12 × 10 ⁻³	5,36±0,61	1497,00±225,54

^(a) $k_{cat} = V_{Máx} / [La.H_2L^2]$, ^(b) $E = k_{cat} / K_M$, ^(c) $K_{ass} = K_M^{-1}$. * Adaptado de MUXEL *et al.*, 2014.

Os parâmetros cinéticos demonstram uma maior eficiência catalítica no pH 6,50, sendo a mesma 1.23 vezes maior que para o 2,4-bdnpp, fator que pode ser justificado pelo aumento de 2 % no valor de k_{cat} e pela elevada afinidade do complexo ao monoéster ($K_{ass} = 2032,52 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$), a qual reflete em um baixo valor de K_M . O complexo no pH ótimo apresentou uma aceleração de 240 vezes em relação à reação não catalisada ($k_{nc} = 2,33 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) sob as mesmas condições experimentais, a qual se apresenta 125 vezes menor em relação à hidrólise do diéster. Nota-se que o complexo La.HL¹-Si apresenta uma afinidade 1.20 vezes maior pelo monoéster que o sistema contendo La.H₂L², sendo que o 2,4-dnpp se encontra ligado de maneira bidentada para o primeiro caso e apesar dessa efetiva associação, o complexo não apresenta uma elevada eficiência catalítica.

É possível observar que os dados calculados para os valores de pH 6,00 e 7,00 (segundo e terceiro pH de maior atividade) apresentaram uma atividade de monoesterase muito superior que a do complexo referência, demonstrando que o catalisador desenvolvido é um ótimo modelo funcional para esse tipo de sistema.

Nota-se ainda que a afinidade do substrato pelo complexo La.H₂L² decresce a pH neutro, apresentando o menor valor de K_{ass} para a hidrólise do 2,4-dnpp e a menor eficiência catalítica devido a uma maior concentração da espécie **(d)** em solução. Faz-se necessário ressaltar que a auto-hidrólise do monoéster 2,4-dnpp é cerca de 130 vezes maior do que a hidrólise do diéster 2,4-bdnpp sob condições experimentais semelhantes.

Uma cinética em condições inertes utilizando solventes desgaseificados também foi realizada para a hidrólise do monoéster no pH ótimo. O objetivo deste estudo foi garantir que a espécie gerada após a inserção do CO₂ não é formada durante a reação (seção 5.2.4). O perfil de saturação e os dados obtidos estão expostos na Figura 51 e Tabela 18, onde se nota que não houve uma mudança significativa entre os parâmetros cinéticos, considerando que a variação

observada se dá unicamente ao erro da medida. Logo, os valores elucidam a presença da mesma espécie cataliticamente ativa para ambos os casos.

Figura 51. Dependência da concentração do substrato 2,4-dnpp na velocidade da reação catalisada pelo complexo a pH 6,50 em solução desgaseificada de acetonitrila/água (1:1 v/v). Condições: [Complexo] = $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, [2,4-dnpp] = $2,0 \times 10^{-4}$ a $1,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, [Tampão MES] = 0,05 mol L⁻¹, $I = 0,05$ mol L⁻¹ (LiClO₄), T = 25 °C, sob atmosfera de argônio.

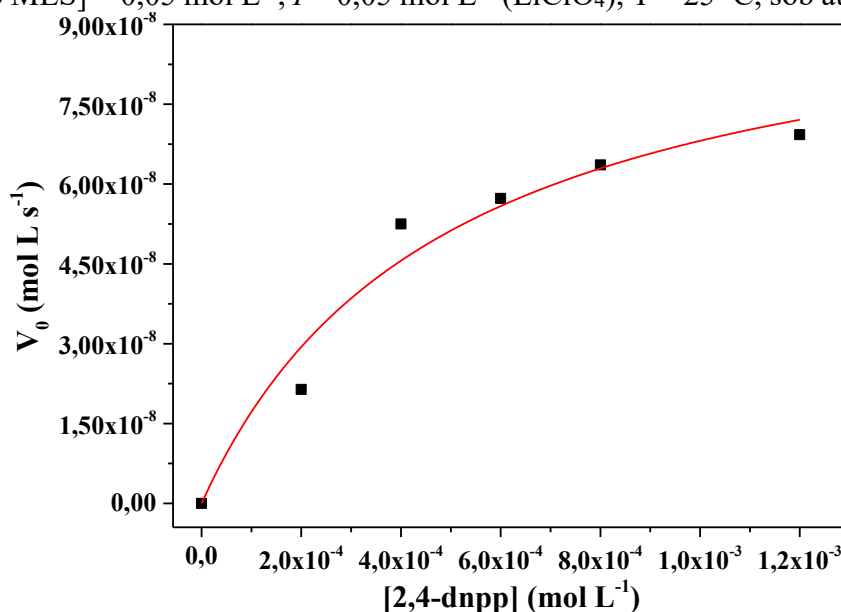


Tabela 18. Parâmetros cinéticos obtidos da reação de hidrólise do 2,4-dnpp catalisada pelo complexo a pH 6,50 em solução desgaseificada de acetonitrila/água (1:1 v/v) a 25 °C sob atmosfera de argônio.

pH	V _{Máx} (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	K _M (mol L ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹) ^(a)	E (mol ⁻¹ L s ⁻¹) ^(b)	K _{ass} (mol ⁻¹ L) ^(c)
6,50	1,01±0,37 × 10 ⁻⁷	4,91±0,40 × 10 ⁻⁴	5,05±1,00 × 10 ⁻³	10,30±0,62	2036,65±508

^(a) $k_{cat} = V_{Máx} / [La.H_2L^2]$, ^(b) $E = k_{cat} / K_M$, ^(c) $K_{ass} = K_M^{-1}$.

O estudo do efeito de deutério revelou um valor de $k_{cat(H)}/k_{cat(D)} = 0,81$. Quando a razão entre as constantes de velocidades de duas reações idênticas, realizadas em H₂O e D₂O estiver entre 0,80 e 1,50 é um indicativo que não há transferência de próton envolvida na etapa determinante da reação, sugerindo um mecanismo que envolve um ataque nucleofílico intramolecular (DEAL; HENGGE; BURSTYN, 1996). Logo, o átomo de fósforo do monoéster sofre um ataque nucleofílico através de um íon hidróxido gerado na esfera de coordenação do complexo.

Sabe-se que o catalisador deve se regenerar ao final de cada ciclo catalítico e para avaliar tal característica, uma cinética foi realizada a fim de determinar o número de moléculas de substrato hidrolisadas por molécula de complexo, ou seja, determinar o número de ciclos catalíticos realizados pelo complexo (*turnover*). Com este estudo, observou-se que em um

período de 3 horas o complexo foi capaz de realizar proporcionalmente a hidrólise de 4 moléculas de substrato para cada molécula de catalisador inicialmente adicionado.

5.3.2.3 Efeito da Temperatura na Hidrólise do 2,4-dnpp

A Tabela 19 apresenta a variação observada nos valores de k_{cat} para a hidrólise do 2,4-dnpp catalisada pelo complexo com variação na temperatura de 20 °C a 35 °C, a qual mostra um aumento das constantes de hidrólise à medida que a temperatura sobe 5 °C.

Tabela 19. Efeito da temperatura sobre os valores de k_{cat} para a hidrólise do 2,4-dnpp a pH 6,50. Condições: [Complexo] = $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, [2,4-dnpp] = $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, [Tampões] = $0,05$ mol L⁻¹ ($I = 0,05$ mol L⁻¹), acetonitrila/água (1:1 v/v), T = 20 °C a 35 °C.

Temperatura (°C)	k_{cat} (s ⁻¹)
20	$3,86 \times 10^{-3}$
25	$5,58 \times 10^{-3}$
30	$8,72 \times 10^{-3}$
35	$11,40 \times 10^{-3}$

Diante desse contexto, os parâmetros de ativação para a reação de hidrólise do monoéster a fosfato inorgânico foram obtidos das equações de Eyring e Arrhenius como descrito na seção 5.3.1.3. A Figura 52 apresenta as linearizações dos valores de k_{cat} e os parâmetros termodinâmicos para a reação de hidrólise podem ser consultados na Tabela 20.

Figura 52. Linearização das constantes catalíticas obtidas em diferentes temperaturas para a reação de hidrólise do 2,4-dnpp promovida pelo complexo a pH 6,50 em meio acetonitrila/água (1:1 v/v). (A) equação de Arrhenius e (B) equação de Eyring, $R^2 = 0,99$.

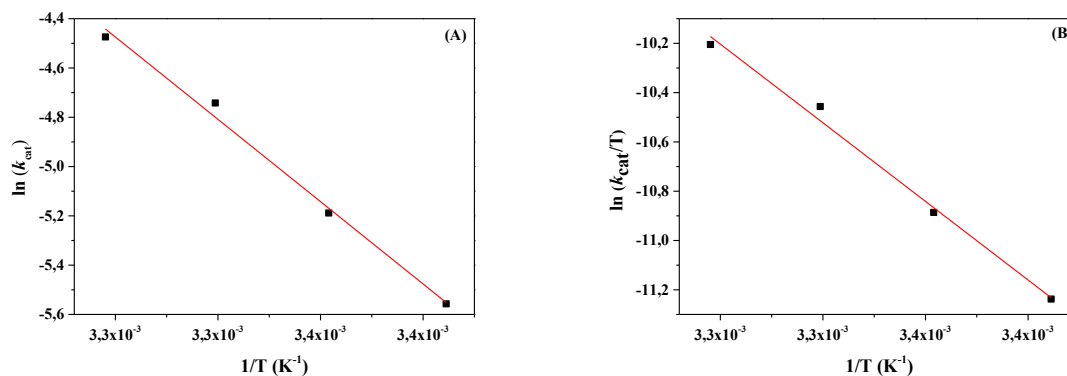


Tabela 20. Parâmetros de ativação para a hidrólise do 2,4-dnpp em comparação à hidrólise do 2,4-bdnpp catalisada pelo complexo a pH 6,50.

Substrato	E_a (kJ mol ⁻¹)	ΔH^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	$-T\Delta S^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	ΔG^\ddagger (kJ mol ⁻¹) ^a
2,4-dnpp	55	53	-32,8 ^b	85
2,4-bdnpp	58	56	-29,8 ^b	86

(a) $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$, (b) Valor a 25 °C.

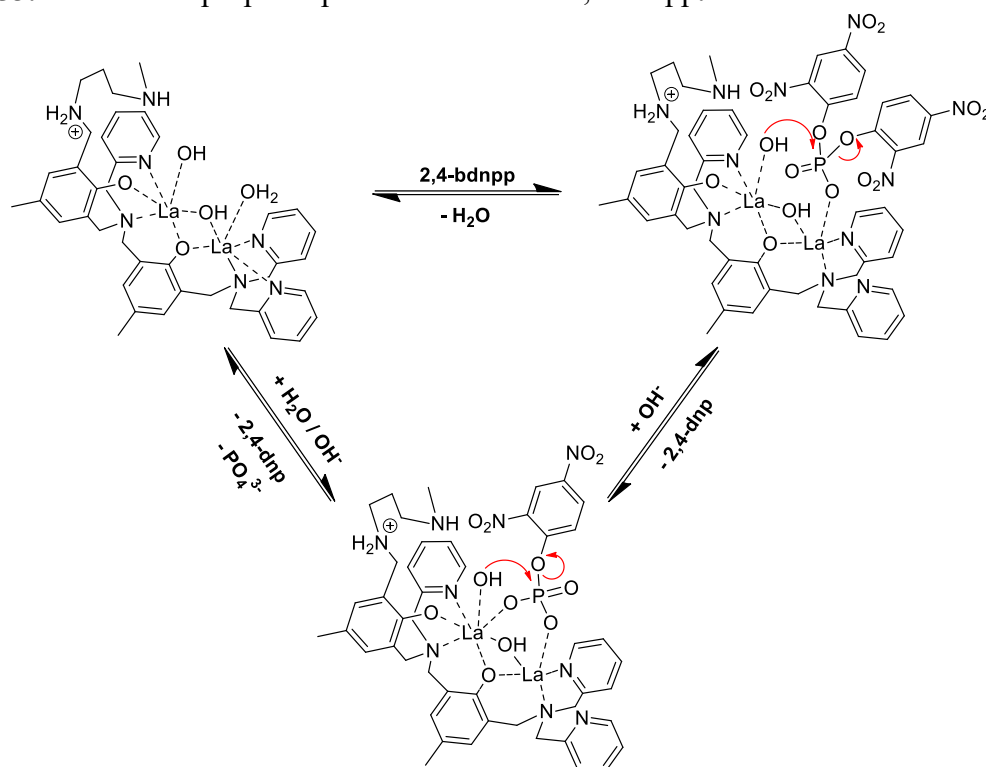
Na Tabela 20, foi possível verificar que os parâmetros termodinâmicos referentes à hidrólise do monoéster 2,4-dnpp possuem valores mais baixos quando comparados à hidrólise do diéster 2,4-bdnpp, fator que justifica o comportamento desses dois sistemas frente ao mecanismo de hidrólise, sendo que o complexo apresenta uma maior atividade de monoesterase que diesterase.

Do ponto de vista termodinâmico, os valores de energia de estabilização se apresentaram próximos para ambos os casos, mas uma diferença de aproximadamente 3 kJ mol⁻¹ no valor de ΔH^\ddagger contribui para que o monoéster seja hidrolisado mais facilmente, conjuntamente com o valor de ΔS^\ddagger que se apresentou mais negativo, o que deve resultar da maior carga do 2,4-dnpp, que ao interagir com o complexo carregado positivamente resulta em um TS com menor energia. No entanto, essas interações com substrato também levam a uma mudança significativa na entropia (isto é, ordem aprimorada durante a TS). Logo, é possível concluir que o complexo sintetizado nesse trabalho se apresenta como um ótimo modelo funcional para a hidrólise de ésteres de fosfato, tendo uma melhor performance frente à clivagem do monoéster, fator que pode ser justificado pelos parâmetros termodinâmicos e cinéticos obtidos para cada sistema.

Com base nos resultados de reatividade descritos para a hidrólise do 2,4-bdnpp e 2,4-dnpp em meio homogêneo, supõe-se que o mecanismo de hidrólise aconteça com o diéster 2,4-bdnpp se ligando de maneira monodentada a um íon de La³⁺, substituindo uma molécula de água coordenada. Este processo é seguido por um ataque nucleofílico intramolecular do íon hidróxido ao átomo de fósforo, onde a amina terminal protonada auxilia na estabilização do intermediário formado, resultando na quebra da ligação P-O e na liberação do 2,4-dinitrofenolato, seguido da coordenação do monoéster 2,4-dnpp de forma bidentada. A hidrólise do 2,4-dnpp a fosfato inorgânico ocorre por meio de um ataque intramolecular de um segundo grupo hidróxido gerado na esfera de coordenação do complexo, como ilustrado na Figura 53 (as *n* moléculas de água coordenadas não são mostradas a fim de facilitar a visualização). Nesta etapa, a amina terminal também auxilia na estabilização do intermediário

pentacoordenado via ligações de hidrogênio e após a liberação do fosfato inorgânico, ocorre o reestabelecimento da espécie ativa em solução.

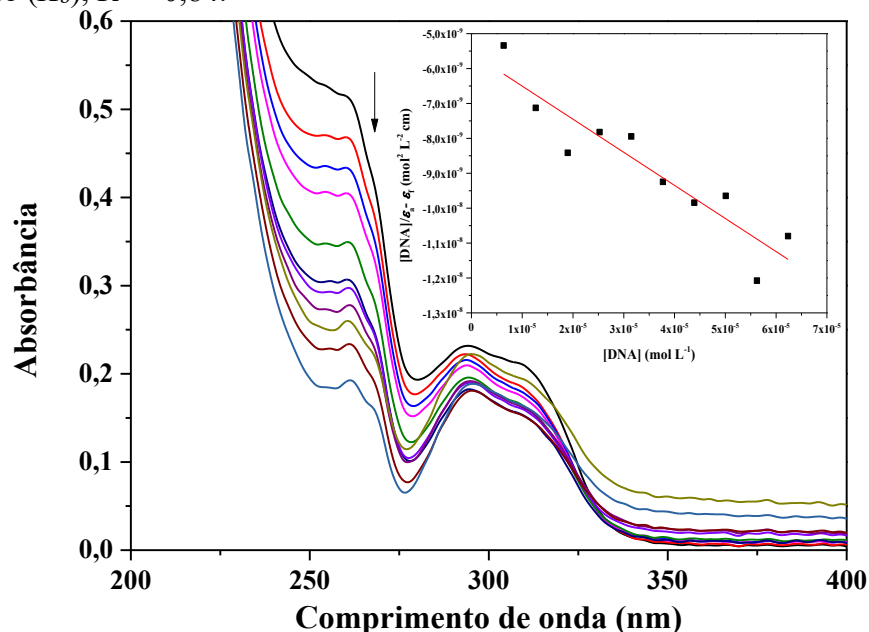
Figura 53. Mecanismo proposto para a hidrólise do 2,4-bdnpp.



5.3.3 Testes de Interação do Complexo com o DNA via Titulação

A espectroscopia eletrônica aplicada a estudos que envolvem o DNA, é um método rápido e eficaz que permite obter informações de cunho quantitativo a respeito da interação de pequenas moléculas com o ácido nucleico, sendo que essas interações podem resultar em fenômenos de deslocamento e/ou alteração das bandas observadas ao longo do espectro. Para tal, foram realizados estudos de interação através do monitoramento das bandas referentes às transições $n \rightarrow \pi^*$ ou $\pi \rightarrow \pi^*$ oriundas dos anéis fenólicos e/ou piridínicos do ligante, como mostra a Figura 54. O cálculo da constante de ligação intrínseca (K_b) entre o complexo e o DNA foi obtido como descrito na seção 4.2.9, onde o valor mede a força de ligação entre o complexo e o DNA, permitindo dessa maneira comparar os valores calculados com os já reportados, como exposto na Tabela 21.

Figura 54. Titulação do complexo via espectroscopia eletrônica a partir de adições sucessivas de CT-DNA. $[\text{Complexo}] = 5,50 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{DNA}] = 6,35 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $6,24 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,20. O *inset* apresenta a linearização dos valores calculados a 255 nm para a obtenção do (K_b), $R^2 = 0,84$.



Na Figura 54, é possível observar que a adição do DNA à solução contendo o complexo provocou hipocromismo nas bandas de transição intraligante, sendo que nenhuma alteração pronunciada foi observada nos valores de $\lambda_{\text{Máx}}$. É sabido que a presença de hipocromismo sem a ocorrência do batocromismo é um indicativo de que não há intercalação no DNA e que a interação entre essas espécies se dá puramente pelos sulcos do ácido nucleico (DARABI *et al.*, 2013). Logo, o hipocromismo observado possivelmente se trata de interações eletrostáticas e/ou ligações de hidrogênio com o DNA, de forma que ambas auxiliam na estabilização da dupla fita.

Tabela 21. Constante de ligação intrínseca (K_b) obtida a partir da titulação com DNA-CT para o complexo La.H₂L² comparada a outros complexos lantanídicos.

Complexo	K_b (mol ⁻¹ L)
La.H ₂ L ²	$1,71 \times 10^4$
La.NOR ^a	$0,13 \times 10^3$
La.CDC ^b	$7,62 \times 10^6$

(a) (SHABAN *et al.*, 2015), (b) (WANG *et al.*, 2007).

A Tabela 21 mostra que o complexo possui uma interação 130 vezes mais forte que o sistema apresentado por Shaban *et al.*, 2015, sendo que ambos possuem uma interação similar

ao DNA, ou seja, por via não intercalativa. O sistema reportado por Wang *et al.*, 2007 se demonstrou altamente eficiente, tendo em vista que a força de ligação é cerca de 446 vezes maior que para o complexo sintetizado nesse trabalho, a qual pode ser justificada por interações intercalativas. Estudos mais aprofundados da interação do complexo ao DNA, bem como a clivagem estão em andamento, pois embora o complexo se apresente como um ótimo modelo funcional para atuar na hidrólise de ésteres de fosfato, permanece o questionamento sobre propostas mecanísticas frente à clivagem do DNA.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi sintetizado um novo complexo de lantânio a partir do ligante H_2L^2 , o qual possui um grupamento amínico responsável por efeitos de segunda esfera de coordenação. A fórmula mínima encontrada através da análise elementar, bem como as bandas na região do infravermelho e os fragmentos gerados por ESI - MS (+) estão de acordo com a estrutura proposta. A estrutura cristalina obtida via difratometria de raios X evidenciou um complexo mononuclear similar, diferenciando-se apenas pela inserção de uma molécula de CO_2 ao centro metálico, a qual supõe-se que ocorreu durante o processo de recristalização.

Estudos em solução indicaram que o complexo inicialmente mononuclear dá origem a uma espécie binuclear durante a cinética de hidrólise do 2,4-bdnpp e 2,4-dnpp. As cinéticas realizadas sob condições inertes indicaram que a espécie contendo o grupamento ($-COO^-$) detectada via raios X não é formada durante as reações de hidrólise. O complexo apresentou um fator de aceleração de 30.000 vezes na hidrólise do diéster e 240 vezes na hidrólise do monoéster, demonstrando que o catalisador se apresenta como um ótimo modelo funcional para atuar nesse tipo de sistema, sendo que a eficiência catalítica é 1.23 vezes maior na hidrólise do monoéster quando comparada ao diéster. Os parâmetros termodinâmicos calculados para cada reação aliados às constantes cinéticas foram úteis na elaboração de uma proposta mecanística de atuação do complexo, onde uma espécie binuclear é responsável pela elevada atividade hidrolítica somada a efeitos de segunda esfera de coordenação provenientes da amina terminal.

Os testes de interação do complexo ao DNA provocaram hipocromismo nas bandas de transição intraligante com ausência de batocromismo, indicando que o complexo não se intercala ao DNA, resultando em uma constante de ligação intrínseca na ordem de $10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$. Logo, a interação entre essas espécies se dá puramente pelos sulcos do ácido nucleico através de ligações de hidrogênio e/ou interações eletrostáticas.

Como perspectiva futura, estudos mais aprofundados da interação do complexo ao DNA, bem como sua clivagem devem ser investigados a fim de se obter mais informações acerca da atuação deste complexo frente à mecanismos hidrolíticos. Estudos em solução monitorados via titulação potenciométrica, os quais visam obter valores relacionados a constantes de formação de cada espécie gerada *in situ* também devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARY, J. et al. Role of Electronegative Atom Present on Ligand Backbone and Substrate Binding Mode on Catecholase- and Phosphatase-Like Activities of Dinuclear Ni^{II} Complexes: A Theoretical Support. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 5, p. 1445–1454, 7 fev. 2018.
- ALTOMARE, A. et al. **SIR97: a new tool for crystal structure determination and refinement.** Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/iucr/doi/10.1107/S0021889898007717>. Acesso em: 29 nov. 2019.
- ASADI, Z. et al. Investigation of the complex structure, comparative DNA-binding and DNA cleavage of two water-soluble mono-nuclear lanthanum(III) complexes and cytotoxic activity of chitosan-coated magnetic nanoparticles as drug delivery for the complexes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 178, p. 125–135, 5 maio 2017.
- AURAS, B. L. et al. Synthesis, spectroscopic/electrochemical characterization and DNA interaction study of novel ferrocenyl-substituted porphyrins. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 32, n. 5, p. e4318, 2018.
- BAISCH, U. et al. N,N-Dialkylcarbamato Lanthanide Complexes, a Series of Isotypical Coordination Compounds. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2004, n. 6, p. 1219–1224, 2004.
- BARFORD, D.; DAS, A. K.; EGLOFF, M.-P. THE STRUCTURE AND MECHANISM OF PROTEIN PHOSPHATASES: Insights into Catalysis and Regulation. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 27, n. 1, p. 133–164, 1998.
- BERNHARDT, P. V. et al. An Approach to More Accurate Model Systems for Purple Acid Phosphatases (PAPs). **Inorganic Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 7249–7263, 3 ago. 2015.
- 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, jun. 2019.
- BUNTON, C. A.; FARBER, S. J. Hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 34, n. 4, p. 767–772, 1 abr. 1969.
- CAMARGO, M. A. et al. New Gadolinium Complex with Efficient Hydrolase-like Activity: A 100-Million-Fold Rate Enhancement in Diester Hydrolysis. **Inorganic Chemistry**, v. 47, n. 8, p. 2919–2921, abr. 2008.
- CAMARGO, M. A. et al. Synthesis, Structure, and Phosphatase-Like Activity of a New Trinuclear Gd Complex with the Unsymmetrical Ligand H₃L As a Model for Nucleases. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 3057–3063, 15 mar. 2010a.
- CAMARGO, M. A. et al. Efficient Phosphodiester Hydrolysis by Luminescent Terbium(III) and Europium(III) Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 13, p. 6013–6025, 5 jul. 2010b.

CAMARGO, T. P. et al. Synthesis, characterization, hydrolase and catecholase activity of a dinuclear iron(III) complex: Catalytic promiscuity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 146, p. 77–88, 1 maio 2015.

CAMARGO, T. P. et al. Second-Sphere Effects in Dinuclear Fe^{III}Zn^{II} Hydrolase Biomimetics: Tuning Binding and Reactivity Properties. **Inorganic Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 187–203, 2 jan. 2018.

CHEN, K.; WU, C.-D. Designed fabrication of biomimetic metal–organic frameworks for catalytic applications. **Coordination Chemistry Reviews**, Special issue on the 8th Chinese Coordination Chemistry Conference. v. 378, p. 445–465, 1 jan. 2019.

CHOPPIN. **Chemical properties of the rare earth elements**. Netherlands: Elsevier, 1989.

COOK, S. A.; BOROVNIK, A. S. Molecular Designs for Controlling the Local Environments around Metal Ions. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 8, p. 2407–2414, 18 ago. 2015.

COTTON, S. **Lanthanide and Actinide Chemistry**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2006.

DAUMANN, L. J. et al. Spectroscopic and mechanistic studies of dinuclear metallohydrolases and their biomimetic complexes. **Dalton Trans.**, v. 43, n. 3, p. 910–928, 2014.

DE SOUZA, B. et al. Second-Coordination-Sphere Effects Increase the Catalytic Efficiency of an Extended Model for Fe^{III}Mn^{II} Purple Acid Phosphatases. **Inorganic Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 3594–3596, 1 abr. 2013.

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

DEAL, K. A.; HENGGE, A. C.; BURSTYN, J. N. Characterization of Transition States in Dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-Catalyzed Activated Phosphate Diester Hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 7, p. 1713–1718, 1 jan. 1996.

DESBOUIS, D. et al. Copper(II), zinc(II) and nickel(II) complexes as nuclease mimetics. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 256, n. 11, p. 897–937, 1 jun. 2012.

DOMINGOS, J. B. et al. A química dos ésteres de fosfato. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 745–753, out. 2003.

FERNANDES, C. et al. Synthesis, characterization and crystal structure of a new unsymmetric tetranuclear copper-carbonate complex: reversible CO₂ fixation. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 4, n. 7, p. 354–357, 1 jul. 2001.

FIFE, T. H.; BRUCE, T. C. THE TEMPERATURE DEPENDENCE OF THE Δ_{pD} CORRECTION FOR THE USE OF THE GLASS ELECTRODE IN D₂O. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 65, n. 6, p. 1079–1080, 1 jun. 1961.

FRANKLIN, S. J. Lanthanide-mediated DNA hydrolysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 2, p. 201–208, 1 abr. 2001.

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.

GERARD P. MOSS. **Enzyme Nomenclature**. Disponível em: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/>. Acesso em: 10 jan. 2020.

GÓMEZ-TAGLE, P.; YATSIMIRSKY, A. K. Phosphodiester Hydrolysis by Lanthanide Complexes of Bis-Tris Propane. **Inorganic Chemistry**, v. 40, n. 15, p. 3786–3796, 1 jul. 2001.

GREATTI, A. et al. Synthesis, Structure, and Physicochemical Properties of Dinuclear NiII Complexes as Highly Efficient Functional Models of Phosphohydrolases. **Inorganic Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 1107–1119, 1 fev. 2008.

HEGG, E. L. et al. Structure–Reactivity Studies in Copper(II)-Catalyzed Phosphodiester Hydrolysis. **Inorganic Chemistry**, v. 38, n. 12, p. 2961–2968, 1 jun. 1999.

HEGG, E. L.; BURSTYN, J. N. Toward the development of metal-based synthetic nucleases and peptidases: a rationale and progress report in applying the principles of coordination chemistry. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 173, n. 1, p. 133–165, 1 jun. 1998.

HERRADOR, M. Á.; GONZÁLEZ, A. G. Potentiometric titrations in acetonitrile–water mixtures: evaluation of aqueous ionisation constant of ketoprofen. **Talanta**, v. 56, n. 4, p. 769–775, 11 mar. 2002.

HEYING, R. S. et al. Unusual hydrolase-like activity of a mononuclear Fe(III) complex. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 102, p. 245–250, 1 abr. 2019.

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, 17 jul. 2009.

HORN JR., A. et al. Synthesis, Magnetic Properties, and Catalytic Properties of a Nickel(II)-Dependent Biomimetic of Metallohydrolases. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, 2018.

HUANG, P.-J. J.; VAZIN, M.; LIU, J. In Vitro Selection of a DNzyme Cooperatively Binding Two Lanthanide Ions for RNA Cleavage. **Biochemistry**, v. 55, n. 17, p. 2518–2525, 3 maio 2016.

JASTRZĄB, R. et al. DNA as a target for lanthanide(III) complexes influence. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 382, p. 145–159, 1 mar. 2019.

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, 1 mar. 2019.

KANTACHA, A. et al. Phosphate ester cleavage promoted by a tetrameric iron(III) complex. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 25–32, jan. 2011.

KARSTEN, P. et al. Synthesis, Structure, Properties, and Phosphatase-Like Activity of the First Heterodinuclear FeIII-MnII Complex with the Unsymmetric Ligand H₂BPBPMP as a Model for the PAP in Sweet Potato. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 18, p. 4624–4626, 1 set. 2002.

KHAN, S. A.; KIRBY, A. J. The reactivity of phosphate esters. Multiple structure–reactivity correlations for the reactions of triesters with nucleophiles. **Journal of the Chemical Society B: Physical Organic**, n. 0, p. 1172–1182, 1 jan. 1970.

KIRBY, A. J.; YOUNAS, M. The reactivity of phosphate esters. Diester hydrolysis. **Journal of the Chemical Society B: Physical Organic**, p. 510, 1970.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 6th ed. New York: W.H. Freeman, 2013.

LI, F. et al. Comparison of catalytic activities of new La (III) and Ce (III) complexes with different diaza-crown ether ligands for DNA hydrolytic cleavage. **Progress in Reaction Kinetics and Mechanism**, v. 41, n. 3, p. 309–318, set. 2016.

L. SHOOK, R.; S. BOROVNIK, A. The effects of hydrogen bonds on metal-mediated O₂ activation and related processes. **Chemical Communications**, v. 0, n. 46, p. 6095–6107, 2008.

LUO, L. et al. Water molecule-enhanced CO₂ insertion in lanthanide coordination polymers. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 182, n. 8, p. 2213–2218, 1 ago. 2009.

LUONG, T. K. N. et al. Phosphate Ester Bond Hydrolysis Promoted by Lanthanide-Substituted Keggin-type Polyoxometalates Studied by a Combined Experimental and Density Functional Theory Approach. **Inorganic Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 9898–9911, 3 out. 2016.

MANCIN, F.; SCRIMIN, P.; TECILLA, P. Progress in artificial metallonucleases. **Chemical Communications**, v. 48, n. 45, p. 5545–5559, 2012.

MANN, S. I. et al. Coordination chemistry within a protein host: regulation of the secondary coordination sphere. **Chemical Communications**, v. 54, n. 35, p. 4413–4416, 2018.

MARANHA, F. G. et al. A new heteropentanuclear complex containing the [Fe₂III-Zn₃II(μ-OH)₃] structural motif as a model for purple acid phosphatases. **Inorganica Chimica Acta**, p. 119280, 13 nov. 2019.

MCGEARY, R. P.; SCHENK, G.; GUDDAT, L. W. The applications of binuclear metallohydrolases in medicine: Recent advances in the design and development of novel drug leads for purple acid phosphatases, metallo-β-lactamases and arginases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 76, p. 132–144, abr. 2014.

MEJÍA-RADILLO, Y.; YATSIMIRSKY, A. K. Complex formation and kinetics of phosphodiester cleavage in the hydrogen peroxide–lanthanide(III) system. **Inorganica Chimica Acta**, v. 351, p. 97–106, jul. 2003.

MERKX, M.; AVERILL, B. A. Probing the Role of the Trivalent Metal in Phosphate Ester Hydrolysis: Preparation and Characterization of Purple Acid Phosphatases Containing

AlIII₂ZnII and InIII₂ZnII Active Sites, Including the First Example of an Active Aluminum Enzyme. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 28, p. 6683–6689, 1 jul. 1999.

MITIĆ, N. et al. The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 8, p. 3338–3363, 1 ago. 2006.

MOHANAN, K. et al. Synthesis, spectroscopic characterization, DNA cleavage and antibacterial studies of a novel tridentate Schiff base and some lanthanide(III) complexes. **Journal of Rare Earths**, v. 32, n. 4, p. 379–388, 1 abr. 2014.

MOHD-PAHMI, S. H. et al. Synthesis, modelling and kinetic assays of potent inhibitors of purple acid phosphatase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 10, p. 3092–3094, 15 maio 2011.

MORROW, J. R.; BUTTREY, L. A.; BERBACK, K. A. Transesterification of a phosphate diester by divalent and trivalent metal ions. **Inorganic Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 16–20, jan. 1992.

MUELLER, E. G. et al. Purple acid phosphatase: a diiron enzyme that catalyzes a direct phospho group transfer to water. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 7, p. 2974–2975, abr. 1993.

MUXEL, A. A. et al. New La(III) Complex Immobilized on 3-Aminopropyl-Functionalized Silica as an Efficient and Reusable Catalyst for Hydrolysis of Phosphate Ester Bonds. **Inorganic Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2943–2952, 17 mar. 2014.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008.

NEVES, A. et al. An Unprecedented FeIII(μ -OH)ZnII Complex that Mimics the Structural and Functional Properties of Purple Acid Phosphatases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 24, p. 7486–7487, 1 jun. 2007.

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, 11 maio 2017.

OLIVEIRA, M. C. B. et al. Mononuclear CuII–Phenolate Bioinspired Complex is Catalytically Promiscuous: Phosphodiester and Peptide Amide Bond Cleavage. **Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2711–2713, 6 abr. 2009.

OSÓRIO, R. E. H. M. B. et al. Synthesis, Magnetostructural Correlation, and Catalytic Promiscuity of Unsymmetric Dinuclear Copper(II) Complexes: Models for Catechol Oxidases and Hydrolases. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 1569–1589, 6 fev. 2012.

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, 1 ago. 2018.

- PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 1. ed. [s.l.] CENGAGE, 2015.
- PERALTA, R. A. et al. Electronic Structure and Spectro-Structural Correlations of Fe^{III} Zn^{II} Biomimetics for Purple Acid Phosphatases: Relevance to DNA Cleavage and Cytotoxic Activity. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 24, p. 11421–11438, 20 dez. 2010.
- PEREIRA, C. et al. Guanidine- and purine-functionalized ligands of Fe^{III}Zn^{II} complexes: effects on the hydrolysis of DNA. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 675–691, 1 ago. 2019.
- 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, 15 mar. 2010.
- PISZKIEWICZ, D. **Kinetics of Chemical and Enzyme-Catalyzed Reactions**. New York: Oxford University Press, 1977.
- RAJA, K.; SUSEELAMMA, A.; REDDY, K. H. Synthesis, spectral properties, DNA binding interactions and DNA cleavage studies of lanthanide (III) complexes of 2-acetylpyridine acetylhydrazone: the X-ray crystal structure of 10-coordinate Ce (III) and Sm (III) complexes. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 12, n. 8, p. 1473–1486, 1 ago. 2015.
- RAJA, K.; SUSEELAMMA, A.; REDDY, K. H. Synthesis, spectral properties and DNA binding and nuclease activity of lanthanide (III) complexes of 2-benzoylpyridine benzhydrazone: X-ray crystal structure, Hirshfeld studies and nitrate- π interactions of cerium(III) complex. **Journal of Chemical Sciences**, v. 128, n. 1, p. 23–35, 1 jan. 2016.
- RAWJI, G.; MILBURN, R. M. 2,4-Dinitrophenyl dihydrogen phosphate: a new synthesis of its mono-2,6-lutidinium salt. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 1205–1206, 1 mar. 1981.
- REBILLY, J.-N. et al. Biomimetic cavity-based metal complexes. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 2, p. 467–489, 2015.
- REICHMANN, M. E. et al. A Further Examination of the Molecular Weight and Size of Desoxyribose Nucleic Acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, n. 11, p. 3047–3053, 1 jun. 1954.
- R. FRANSSEN, M. C. et al. Immobilised enzymes in biorenewables production. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6491–6533, 2013.
- SCHENK, G. et al. Binuclear Metal Centers in Plant Purple Acid Phosphatases: Fe–Mn in Sweet Potato and Fe–Zn in Soybean. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 370, n. 2, p. 183–189, 15 out. 1999.
- SCHENK, G. et al. Purple acid phosphatase: A journey into the function and mechanism of a colorful enzyme. **Coordination Chemistry Reviews**, A Tribute to Edward I. Solomon on his 65th Birthday: Part 2. v. 257, n. 2, p. 473–482, 15 jan. 2013.

SHABAN, S. Y. et al. Norfloxacin La(III)-based complex: synthesis, characterization, and DNA-binding studies. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 68, n. 17–18, p. 3247–3258, 17 set. 2015.

SHELDRICK, G. M. **SHELXS-97: program for the solution of crystal structures**. University of Gottingen, Alemanha: [s.n.].

SHIJU, C.; ARISH, D.; KUMARESAN, S. Synthesis, characterization, cytotoxicity, DNA cleavage, and antimicrobial activity of lanthanide(III) complexes of a Schiff base ligand derived from glycyglycine and 4-nitrobenzaldehyde. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2584–S2591, 1 maio 2017.

SILVA, G. A. DOS S. et al. Synthesis and characterization of Fe^{III} (μ -OH)Zn^{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.

SILVA, P. P. et al. Two New Ternary Complexes of Copper(II) with Tetracycline or Doxycycline and 1,10-Phenanthroline and Their Potential as Antitumoral: Cytotoxicity and DNA Cleavage. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 6414–6424, 18 jul. 2011.

SIMMONS, T. R. et al. Mimicking hydrogenases: From biomimetics to artificial enzymes. **Coordination Chemistry Reviews**, *Frontiers in Organometallic Chemistry*: 2014. v. 270–271, p. 127–150, 1 jul. 2014.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 124, p. 1–19, 5 jul. 2013.

SPEK, A. L. Structure validation in chemical crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 65, n. 2, p. 148–155, 1 fev. 2009.

STRATER, 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, 9 jun. 1995.

STROHALM, M. **mMass - Open Source Mass Spectrometry Tool**. [s.l.: s.n.].

The IUPAC Compendium of Chemical Terminology. Disponível em: <https://goldbook.iupac.org/>. Acesso em: 16 jan. 2020.

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, nov. 1988.

TSANG, J. S. W.; NEVEROV, A. A.; BROWN, R. S. La³⁺-Catalyzed Methanolysis of Hydroxypropyl-p-nitrophenyl Phosphate as a Model for the RNA Transesterification Reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 6, p. 1559–1566, 1 fev. 2003.

WANG, B. et al. Synthesis, crystal structure and DNA-binding studies of the Ln(III) complex with 6-hydroxychromone-3-carbaldehyde benzoyl hydrazone. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 10, p. 1492–1504, out. 2007.

WANG, X. et al. Spectroscopic Characterization of a Ternary Phosphatase–Substrate–Fluoride Complex. Mechanistic Implications for Dinuclear Hydrolases [J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 9235–9236]. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 33, p. 8103–8103, 23 ago. 2000.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737–738, abr. 1953.

XAVIER, F. R. et al. Bioinspired FeIIICdII and FeIIIHgII complexes: Synthesis, characterization and promiscuous catalytic activity evaluation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 12, p. 1740–1752, 1 dez. 2011.

XAVIER, F. R.; NEVES, A. Synthesis, physicochemical properties and in vitro catalytic activity of a dinuclear nickel(II) complex with a N5O-hexadentate ligand: A functional model for phosphohydrolases. **Polyhedron**, v. 109, p. 59–66, abr. 2016.

YU, L. et al. DNA Cleavage Activity: Comparison of two Lanthanum Complexes Based on Aza-Crown Ethers with Different Numbers of Nitrogen Atoms. **Progress in Reaction Kinetics and Mechanism**, v. 40, n. 4, p. 391–401, nov. 2015.

YU, L.; XIE, J. Mechanism of DNA Cleavage Catalysed by the System Comprising an Unsaturated Tetraaza Macrocyclic and La(III) and Ce(III) Ions. **Progress in Reaction Kinetics and Mechanism**, v. 39, n. 1, p. 27–37, mar. 2014.

YU, Z.; COWAN, J. Metal complexes promoting catalytic cleavage of nucleic acids — biochemical tools and therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 43, p. 37–42, abr. 2018.

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, 7 out. 2013.

APÊNDICE

Figura 55. Espectro de ^1H NMR do ligante H_2L^1 em CDCl_3 a 200 MHz.