



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

Filipy Gobbo Maranhã

**Estudo da influência de metais na segunda esfera de coordenação em biomiméticos para
as Fosfatases Ácidas Púrpuras**

Florianópolis
2020

Filipy Gobbo Maranh

**Estudo da influência de metais na segunda esfera de coordenação em biomiméticos para
as Fosfatases Ácidas Púrpuras**

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

Florianópolis, fevereiro de 2020

Ficha de identificação da obra

Maranha, Filipy Gobbo

Estudo da influência de metais na segunda esfera de coordenação em biomiméticos para as Fosfatases Ácidas Púrpuras / Filipy Gobbo Maranhã ; orientador, Ademir Neves, coorientador, Rosely A. Peralta, 2020.
123 p.

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

Inclui referências.

1. Química. 2. Fosfatases Ácidas Púrpuras. 3. Segunda esfera de coordenação. 4. Biomiméticos. I. Neves, Ademir. II. Peralta, Rosely A.. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Filipy Gobbo Maranhã

Estudo da influência de metais na segunda esfera de coordenação em biomiméticos para as Fosfatases Ácidas Púrpuras

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

Prof^a Giovana Gioppo Nunes, Dra.
Universidade Federal do Paraná

Prof. Clóvis Piovezan, Dr.
Universidade Federal da Fronteira Sul

Prof. Adolfo Horn Jr., Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Prof. Marcus César Mandolesi Sá, Dr.
Coordenador(a) do Programa

Prof. Ademir Neves, Dr.
Orientador

Prof^a. Rosely A. Peralta, Dr^a.
Coorientadora

Florianópolis, fevereiro de 2020.

Este trabalho é dedicado aos meus amados pais, Carla e Daniel e
à minha amada e eterna companheira, Larissa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais Carla e Daniel que me proporcionaram chegar neste importante momento, não medindo esforços para a um ensino de qualidade em instituições públicas e gratuitas. Sou eternamente grato pelo amor, carinho e conselhos que me tornaram o que sou hoje. Sempre senti a falta de vocês nestes anos. Eu sei de toda a dificuldade enfrentada, das ajudas e acolhidas em momentos de dificuldades. Espero retribuir em dobro tudo o que vocês me propiciaram para que tenham o devido descanso e alegria que vocês merecem mais que tudo. Amo vocês!

Em especial a minha eterna companheira, Larissa. Esta mulher incrível que me proporcionou momentos de lucidez e criticidade com seus conselhos, juntamente com sua imensa alegria e simpatia, acompanhados de seu belo sorriso dentuço de paranaense. Realmente não sei se estaria aqui se não fosse por sua sensatez e carinho. I love you 3000.

Quero agradecer ao meu irmão Giuliano que, apesar do azedume, foi fundamental nestes anos na proximidade e ajuda com nossos pais.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ademir Neves pela confiança, compreensão, contribuições e discussões. Sua paixão pela Química é linda e invejável. O doutorado acaba, mas o carinho e admiração por você sempre estará comigo. Grande abraço, camarada!

À Prof. Dra. Rosely A. Peralta, por todos os conselhos, contribuições, ensinamentos, auxílio e oportunidades.

Ao Prof. Adailton João Bortoluzzi pelas análises de difração de raios X e discussão dos resultados.

Aos meus colegas do LABINC pelas experiências, conselhos, orientações e alegrias ao longo desses anos. Vocês têm minha eterna gratidão.

Aos meus amigos Laís, Leko, Tizzi, Pri, Nicolas e Vitinho que proporcionaram a mim e a Larissa um grande acolhimento e momentos de alegria aqui em Florianópolis. Sempre com boas risadas, bons papos, boas comidas e muita bebida.

A todos meus amigos não citados aqui.

Aos membros da banca, Prof. Dra. Giovana Gioppo Nunes, Prof. Dr. Clóvis Piovezan e Prof. Dr. Adolfo Horn Jr. que se disponibilizaram a ler, avaliar e discutir este trabalho, contribuindo para sua concretização como tese de doutorado.

Ao programa CAPES-STINT, pela oportunidade de intercâmbio, e ao Prof. Dr. Ebbe Nordlander pela orientação enquanto estive em Lund, Suécia.

À UFSC, à Central de Análises do Departamento de Química, ao Departamento de Química, ao CEBIME, ao Programa de Pós-Graduação em Química e aos órgãos de fomento CNPq (pela bolsa de doutorado), INCT-Catálise, FAPESC e CAPES pela oportunidade para a realização desta pesquisa.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

A ciência atua na fronteira entre o conhecimento e a ignorância sem medo de admitir que não sabemos. Não há nenhuma vergonha nisso. A única vergonha é fingir que temos todas as respostas. (Neil deGrasse Tyson, 2014)

RESUMO

Modelos biomiméticos para simular a primeira esfera de coordenação já são bastante difundidos e conhecidos e com isto, os efeitos de segunda esfera de coordenação tem ganhado destaque nos trabalhos mais recentes e trazendo importantes informações estruturais e mecanísticas. Neste trabalho, foi realizado o estudo da influência de metais presentes na segunda esfera de coordenação em biomiméticos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ para as Fosfatases Ácidas Púrpuras. Com o ligante inédito $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$ (2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((4'-metil-[2,2'-bipiridin]-4-il)metil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol), foram sintetizados três novos complexos: um mononuclear $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}})](\text{Cl})_2$ – (1), um binuclear $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})_2\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}_{\text{bipy}})](\text{ClO}_4)_2$ – (2) e um trinuclear $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})_2\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}_{\text{bipy}})\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}_2](\text{ClO}_4)_2$ – (3). Partindo-se do ligante já conhecido $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$, foi sintetizado um novo complexo pentanuclear $[\text{Fe}_2^{\text{III}}(\mu\text{-OH})_3\text{Zn}_3^{\text{II}}(\text{L}^2\text{-et})_2](\text{ClO}_4)_5$ (4), o qual teve a sua estrutura de raios X resolvida. Os quatro complexos foram caracterizados por espectroscopia vibracional na região do infravermelho e do ultravioleta e visível, análise elementar de CHN, espectrometria de massas, titulação potenciométrica (1, 2 e 3) ou espectrofotométrica (4), condutimetria e voltametria de onda quadrada. Os complexos (2), (3) e (4) foram testados quanto às suas propriedades catalíticas como hidrolases sintéticas, envolvendo o substrato modelo 2,4-BDNPP, apresentando capacidade catalítica com acelerações de 1620, 3030 e 4780 vezes, respectivamente, em relação à reação não catalisada. Os complexos (2) e (3) conduziram a um aumento significativo da afinidade de ligação (K_{ass}) para o substrato modelo 2,4-BDNPP, enquanto o complexo (4) apresentou um menor valor. Em ambos complexos, foi possível elucidar mecanismos por ataques nucleofílicos intramoleculares.

Palavras-chave: Fosfatases Ácidas Púrpuras. Segunda esfera de coordenação. Biomiméticos.

ABSTRACT

Metal complexes bioinspired in metalloenzymes and the N,O-donors mimicking the aminoacid residues in the first coordination sphere of these metals are already known and with this, the effects of the second coordination sphere have gained importance in the most recent works and bringing important structural and mechanism information. In this work, was performed the study of the influence of metals present in the second sphere of coordination in synthetic biomimetics Fe^{III}Zn^{II} for Purple Acid Phosphatases. With the new ligand H₂L_{bipy} (2-((bis(pyridin-2-ilmethyl)amino)methyl)-6-(((2-hydroxy-5-methyl-3-(((4'-methyl-[2,2'-bipyridin]-4-il)methyl)amino)methyl)benzyl)(pyridin-2-ilmethyl)amino)-4-methylphenol), three new complexes were synthesized: a mononuclear [Pd(H₂L_{bipy})](Cl)₂ – (1), a binuclear [Fe^{III}(μ-OAc)₂Zn^{II}(L_{bipy})](ClO₄)₂ – (2) and a trinuclear [Fe^{III}(μ-OAc)₂Zn^{II}(L_{bipy})Pd^{II}Cl₂](ClO₄)₂ – (3). Besides these three complexes, it was synthesized with the already known ligand H₂L_{2-et}, a new pentanuclear complex [Fe₂^{III}(μ-OH)₃Zn₃^{II}(L_{2-et})₂](ClO₄)₅ (4). This complex was characterized by X-ray analysis. All the four complexes were characterized through FTIR and UV-VIS spectroscopies, elemental analysis, mass spectrometry, potentiometric (1, 2 and 3) or spectrophotometric titration (4), conductimetry and square-wave voltammetry. The hydrolase-like catalytic activity of complexes (2), (3) and (4) were tested with the model substrate 2,4-BDNPP, presenting catalytic acceleration factor of 1620, 3030 and 4780 times the uncatalyzed reaction. Complexes (2) and (3) led to a significant increase in binding affinity (K_{ass}) with the model substrate 2,4-BDNPP, while complex (4) presented a lower value. For both complexes, it was possible to propose a mechanism by the terminal hydroxo bonded to the Fe^{III} ion.

Keywords: Purple Acid Phosphatases. Second Coordination Sphere. Biomimetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema demonstrativo do sítio ativo e seus substratos para diferentes metaloenzimas binucleares: (a) fosfatase ácida púrpura, (b) urease, (c) leucina amino-peptidase, (d) fosfatase alcalina, (e) endonuclease, (f) inositol monofosfatase (g) fosfotriesterase e (h) EcoRV endonuclease.....	16
Figura 2 – Representação esquemática das várias maneiras em que os íons metálicos podem, em princípio, facilitar a hidrólise de um éster de fosfato. (i) podem agir diminuindo o valor do pKa de moléculas de água ligadas ao metal; (ii) o metal pode agir como sítio de ligação da enzima com o substrato e estabilizar o estado de transição; (iii) o centro metálico pode atuar no mecanismo hidrolítico por sua interação com o grupo de saída.....	17
Figura 3 – Intermediários catalíticos para as fosfatases ácidas púrpuras: (a) ataque nucleofílico de um hidróxido terminal em um substrato éster de fosfato ligado de forma monodentada ao sítio metálico divalente; (b) ataque nucleofílico do hidróxido em ponte ao substrato éster de fosfato ligado de forma bidentada aos sítios metálicos; (c) ataque nucleofílico de um íon hidróxido, gerado na segunda esfera de coordenação do Fe ^{III} , em um substrato éster de fosfato ligado de forma monodentada ao sítio metálico divalente; (d) uma ponte μ -oxo é responsável pelo ataque nucleofílico ao fosfato	19
Figura 4 – Esquema do Sítio Ativo da PAP do feijão vermelho (a) e a estrutura do complexo bioinspirado [FeZn(μ -OH)(bpbmp)(OH ₂)] ²⁺ (b)	21
Figura 5 – Similaridade estrutural entre as enzimas PhoD e PAP. Comparação do ambiente de coordenação dos íons metálicos PhoD (esquerda) com aqueles da PAP da batata doce (direita). As cores dos elementos são: Fe ^{III} em laranja, Ca ^{II} em verde, Mn ^{II} em roxo, oxigênio em vermelho; nitrogênio em azul escuro; enxofre em amarelo; fósforo em azul claro; carbonos na PhoD em azul-céu e e carbonos na PAP em castanho. As ligações de coordenação de íons metálicos são mostradas por linhas tracejadas	23
Figura 6 – Representação da estrutura do complexo [Fe ^{III} Fe ^{II} (L ³)(OH)(OH ₂) ₂] com efeito de segunda esfera de coordenação na estabilização da ligação monodentada do éster de fosfato ao complexo.....	24
Figura 7 – Derivatizações do ligante H ₂ py ₃ mff para obtenção dos ligantes H ₂ L _{bipy} (a) e H ₂ L ² -et (b) utilizados neste trabalho.....	27
Figura 8 – Representação das estruturas químicas dos ligantes não-simétricos H ₂ L _{bipy} e H ₂ L ² -et utilizados neste trabalho	47

Figura 9 – Sobreposição dos espectros vibracionais na região do infravermelho (a) e região padrão de absorção característico (“ <i>fingerprint</i> ”) (b) dos precursores.....	49
Figura 10 – Sobreposição dos espectros vibracionais na região do infravermelho (a) e região padrão de absorção característico (“ <i>fingerprint</i> ”) (b) do ligante precursor bipyNH ₂ e dos ligantes H ₂ py ₃ mff e H ₂ L _{bipy}	50
Figura 11 - Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz) do ligante precursor bipyNH ₂ em CDCl ₃	52
Figura 12 – Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) do ligante H ₂ L _{bipy} em CDCl ₃	53
Figura 13 – Espectros de RMN de ¹³ C (acima) e de DEPT-135 de ¹³ C (abaixo) do ligante H ₂ L _{bipy} em CDCl ₃ (100 MHz)	54
Figura 14 – Espectro de massa ESI-QTOF-MS de alta resolução no modo de ionização positivo do ligante H ₂ L _{bipy} em metanol (a), o perfil de distribuição isotópica referente à espécie [H ₂ L _{bipy} + H ⁺] ⁺ e razão <i>m/z</i> = 771,4115 (experimental – em preto) e <i>m/z</i> = 771,4129 (simulado – em vermelho) (b) e a estrutura da espécie proposta (c). Os outros picos são todos relacionados aos fragmentos do ligante.	55
Figura 15 – ORTEP do ambiente de coordenação do complexo (4). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.	56
Figura 16 – Sobreposição dos espectros vibracionais na região do infravermelho (a) e região padrão de absorção característico (“ <i>fingerprint</i> ”) (b) dos complexos (1), (2) e (3) com o ligante H ₂ L _{bipy}	60
Figura 17 – Sobreposição dos espectros vibracionais na região do infravermelho (a) e região padrão de absorção característico (“ <i>fingerprint</i> ”) (b) dos complexos Fe ^{III} Zn ^{II} L ² -et e (4) com o ligante H ₂ L ² -et	63
Figura 18 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) do complexo (1) em CDCl ₃	64
Figura 19 – Espectro de massa ESI-QTOF-MS de alta resolução no modo de ionização positivo do complexo (1) em metanol (a), o perfil de distribuição isotópica referente à espécie [H ₂ L _{bipy} Pd ^{II} Cl] ⁺ e razão <i>m/z</i> = 911,2726 (experimental – em preto) e <i>m/z</i> = 911,2780 (simulado – em vermelho) (b) e a estrutura da espécie proposta (c). Os outros picos são todos relacionados aos fragmentos do complexo	66
Figura 20 – Espectro de massa ESI-QTOF-MS de alta resolução no modo de ionização positivo do complexo (2) em acetonitrila/água (1:1; v/v) (a), o perfil de distribuição isotópica referente à espécie [Fe ^{III} (μ-OAc)Zn ^{II} (L _{bipy})(H ⁺)(OH ⁻) ₂ (Na ⁺)] ⁺ e <i>m/z</i> = 1006,2707 (experimental – em preto) e <i>m/z</i> = 1006,2728 (simulado – em vermelho) (b) e a estrutura da espécie proposta (c), o perfil de distribuição isotópica referente à espécie [Fe ^{II} (μ-OAc)Zn ^{II} (L _{bipy})(H ⁺) ₂ (OH ⁻	

$)_2(\text{Na}^+)]^{2+}$ e $m/z = 503,6315$ (experimental – em preto) e $m/z = 503,6425$ simulado – em vermelho) **(d)** e a estrutura da espécie proposta **(e)**. Os outros picos são todos relacionados aos fragmentos do complexo 67

Figura 21 – Espectro de massa ESI-QTOF-MS de alta resolução no modo de ionização positivo do complexo **(3)** em acetonitrila/água (1:1; v/v) **(a)**, o perfil de distribuição isotópica referente à espécie $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}_{\text{bipy}})(\text{H}^+)_2(\text{CH}_3\text{O}^-)_2(\text{OH}^-)\text{Pd}^{\text{II}}(\text{Cl})_2]^{2+}$ e razão $m/z = 572,5716$ (experimental – em preto) e $m/z = 572,5747$ (simulado – em vermelho) **(b)** e a estrutura da espécie proposta **(c)**. Os outros picos são todos relacionados aos fragmentos do complexo... 68

Figura 22 – Espectro de massa ESI-QTOF-MS de alta resolução no modo de ionização positivo do complexo **(4)** em acetonitrila/água (1:1; v/v) **(a)**, o perfil de distribuição isotópica referente à espécie $[\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{Zn}_3^{\text{II}}(\mu\text{-OH})_3(\text{L}^2\text{-et})_2(\text{CH}_3\text{O})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)]^{2+}$ e razão $m/z = 919,1967$ (experimental – em preto) e $m/z = 919,1975$ (simulado – em vermelho) **(b)** e a estrutura da espécie proposta **(c)**. Os outros picos são todos relacionados aos fragmentos do complexo... 69

Figura 23 – Espectros eletrônicos do ligante $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$ ($3,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e dos complexos **(1)** ($2,70 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), **(2)** ($2,80 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e **(3)** ($2,60 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em solução de acetonitrila **(a)** e de acetonitrila/água (1/1; v/v) **(b)** 70

Figura 24 – Espectros eletrônicos do ligante do complexo **(4)** ($1,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em solução de acetonitrila e de acetonitrila/água (1/1; v/v) 73

Figura 25 – Proposta para os equilíbrios e espécies (A-G) observados no complexo **(1)** em solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1; v/v). $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl) à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 75

Figura 26 – Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o complexo **(1)**..... 76

Figura 27 – Proposta para os equilíbrios e espécies (A-F) observados no complexo **(2)** em solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1; v/v). $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl) à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 77

Figura 28 – Proposta para os equilíbrios e espécies (A-H) observados no complexo **(3)** em solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1; v/v). $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl) à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 78

Figura 29 – Titulação espectrofotométrica do complexo **(4)** nas faixas de pH de 3,5-5,5 **(a)** e 5,5-8,5 **(b)**. Adições de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução de NaOH em uma solução do complexo **(4)** em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1; v/v) com $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl). $[\text{4}] = 5,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 79

Figura 30 – Proposta para os equilíbrios e espécies (A-D) observados no complexo **(4)** em solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1; v/v). $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl) à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 80

Figura 31 – Voltamogramas de onda quadrada para os complexos (1), (2) e (3) ([1], (2) e (3)] = 1.0×10^{-4} mol L ⁻¹) em solução de acetonitrila e 0,1 mol L ⁻¹ de n-Bu ₄ NPF ₆ como eletrólito suporte.	83
Figura 32 – Voltamogramas de onda quadrada para o complexo (4) [(4)] = $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹) em solução de acetonitrila e 0,1 mol L ⁻¹ de n-Bu ₄ NPF ₆ como eletrólito suporte. O par Fc ⁺ /Fc foi utilizado como padrão interno para todos os experimentos.	84
Figura 33 – Esquema ilustrativo para a reação hidrolítica do substrato modelo 2,4-BDNPP catalisada pelos complexos (2), (3) e (4).	85
Figura 34 – Dependência das velocidades iniciais em função do pH na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada pelo complexo (2) [(2)] _{final} = 2×10^{-5} mol L ⁻¹ , [2,4-BDNPP] _{final} = 2×10^{-3} mol L ⁻¹ , [tampões 4,0-10,5] _{final} = 0,05 mol L ⁻¹ em solução de CH ₃ CN/H ₂ O (1/1; v/v) à 25 °C (linha pontilhada). As distribuições das espécies correspondentes são mostradas em linhas sólidas	86
Figura 35 – Dependência das velocidades iniciais em função do pH na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada pelo complexo (3) [(3)] _{final} = 2×10^{-5} mol L ⁻¹ , [2,4-BDNPP] _{final} = 2×10^{-3} mol L ⁻¹ , [tampões 4,0-10,5] _{final} = 0,05 mol L ⁻¹ em solução de CH ₃ CN/H ₂ O (1/1; v/v) à 25 °C (linha pontilhada). As distribuições das espécies correspondentes são mostradas em linhas sólidas	87
Figura 36 – Dependência das velocidades iniciais em função do pH na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada pelo complexo (4) [(4)] _{final} = 2×10^{-5} mol L ⁻¹ , [2,4-BDNPP] _{final} = 2×10^{-3} mol L ⁻¹ , [tampões 4,0-10,5] _{final} = 0,05 mol L ⁻¹ em solução de CH ₃ CN/H ₂ O (1/1; v/v) à 25 °C (linha pontilhada). As distribuições das espécies correspondentes são mostradas em linhas sólidas	87
Figura 37 – Curvas da dependência da velocidade da reação de hidrólise, em diversos valores de Ph (5,5 – 9,0), em função da variação da concentração do substrato 2,4-BDNPP (a) e dependência da eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) obtida em cada valor de pH (5,5 – 9,0) para o complexo (2) (b).....	89
Figura 38 – Curvas da dependência da velocidade da reação de hidrólise, em diversos valores de pH (5,5 – 9,0), em função da variação da concentração do substrato 2,4-BDNPP (a) e dependência da eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) obtida em cada valor de pH (5,5 – 9,0) para o complexo (3) (b).....	90
Figura 39 – Curva da dependência da velocidade da reação de hidrólise na variação da concentração do substrato 2,4-BDNPP catalisada pelo complexo (4)	90

Figura 40 – Variação da constante k_{cat} em função da temperatura e ajustada segundo a equação de Eyring para os complexos (2) e (3).....	95
Figura 41 – Mudança espectral durante a hidrólise do 2,4-BDNPP catalisado por (1) (a), (2) (b) e (3) (c) em pH 7,0	97
Figura 42 – Proposta da hidrólise simultânea de duas moléculas de substrato 2,4-BDNPP promovida pelo complexo (4).....	98
Figura 43 – A: Deslocamento espectral observado pela adição consecutiva de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 equivalentes do monoéster 2,4-DNPP em uma solução dos complexos (2) (a), (3) (b) e (4) (c). B: Adição de 4 equivalentes de diéster 2,4-BDNPP no meio reacional após 5 horas de acompanhamento do monoéster 2,4-DNPP	98
Figura 44 – Efeito isotópico de deutério na clivagem hidrolítica do substrato 2,4-BDNPP em D ₂ O para os complexos (2), (3) e (4).....	100
Figura 45 – Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz) do ligante precursor bipy em CDCl ₃	121
Figura 46 – Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz) do ligante precursor bipyCHO em CDCl ₃	121
Figura 47 – Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz) do ligante precursor bipyNH ₂ OH em CDCl ₃	122
Figura 48 – Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz) do ligante H ₂ py ₃ mff em CDCl ₃ ..	122

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Materiais, reagentes e solventes utilizados nas sínteses e análises	29
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) atribuídos aos precursores e ligantes $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ e $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$	49
Tabela 2 – Deslocamentos químicos (ppm), multiplicidade e integração observados nos espectros de RMN de ^1H para o ligante $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$ e seus ligantes precursores	51
Tabela 3 – Porcentagens de C, H e N (calculada/encontrada) para o ligante $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$	54
Tabela 4 – Dados cristalográficos da estrutura de refinamento do complexo (4).....	57
Tabela 5 – Distâncias (Å) e ângulos ($^\circ$) de ligação para o complexo (4).....	58
Tabela 6 – Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) atribuídos ao ligante $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$ e aos complexos (1), (2) e (3).....	62
Tabela 7 – Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) atribuídos ao ligante $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$ e aos complexos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-et}$ (SILVA, 2017; SILVA <i>et al.</i> , 2017) e (4).....	63
Tabela 8 – Porcentagens de C, H e N (calculada/encontrada) para os complexos (1), (2), (3) e (4)	65
Tabela 9 – Razões m/z calculadas (calc.) e obtidas (exp.) por espectrometria de massas usando um espectrômetro de massas ESI-QTOF-MS de alta resolução no modo de ionização positivo.	70
Tabela 10 – Dados de espectroscopia na região do ultravioleta e visível para o ligante $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$ e os complexos (1), (2) e (3)	71
Tabela 11 – Dados de espectroscopia na região do ultravioleta e visível para o complexos (4) e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-et}$ (SILVA, 2017; SILVA <i>et al.</i> , 2017)	74
Tabela 12 – Valores de pK_a correspondentes à desprotonação de moléculas de água coordenadas, para os complexos (1), (2) e (3)	74
Tabela 13 – Comparação de valores de pK_a de desprotonação de moléculas de água coordenadas ao Pd^{II} no complexo (1) com o de sistemas similares	75
Tabela 14 – Comparação de valores de pK_a de desprotonação de moléculas de água coordenadas ao Fe^{III} e ao Zn^{II} dos complexos (2) e (3) com o de sistemas similares.....	79
Tabela 15 – Potenciais redox (em V, relativo ao padrão interno NHE determinados através de voltametria de onda quadrada para os complexos (1), (2), (3) e (4) em solução de acetonitrila e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{n-Bu}_4\text{NPF}_6$ como eletrólito suporte.....	82

Tabela 16 – Correlação entre os valores de pK_a cinéticos e pK_a potenciométricos para os complexos (2) e (3). As constantes com índices subscritos 1 e 2 refletem a coordenação da molécula de água ao Fe^{III} e ao Zn^{II} , respectivamente	88
Tabela 17 – Correlação entre os valores de pK_a cinéticos e pK_a potenciométricos para os complexos $Fe^{III}Zn^{II}L^2$ -et e (4). As constantes com índices subscritos 1 e 2 refletem a coordenação da molécula de água ao Fe^{III} e ao Zn^{II} , respectivamente.....	89
Tabela 18 – Parâmetros cinéticos obtidos e calculados na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada pelos complexos (2), (3) e (4).....	91
Tabela 19 – Parâmetros cinéticos obtidos e calculados em função do pH ótimo na reação de hidrólise do 2,4-.....	93
Tabela 20 – Parâmetros cinéticos obtidos e calculados em função do pH ótimo na reação de hidrólise do 2,4-.....	94
Tabela 21 – Parâmetros de ativação para as hidrólises do 2,4-BDNPP pelos complexos (2) e (3).....	95

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Esquema de síntese da 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (bipy)	37
Esquema 2 – Esquema de síntese da 4-metil-2,2'-bipiridina-4-carboxialdeído (bipyCHO).....	38
Esquema 3 – Esquema de síntese da 4-metil-2,2'-bipiridina-4-carbaldoxima (bipyNOH).....	39
Esquema 4 – Esquema de síntese da 4-metil-4'-aminometil-2,2'-bipiridina (bipyNH ₂)	40
Esquema 5 – Esquema de síntese do ligante H ₂ L _{bipy}	41
Esquema 6 – Esquema de síntese do complexo (1).....	42
Esquema 7 – Esquema de síntese do complexo (2).....	43
Esquema 8 – Esquema de síntese do complexo (3).....	44
Esquema 9 – Esquema de síntese do complexo (4).....	45
Esquema 10 – Rota sintética para obtenção do ligante H ₂ L _{bipy}	48
Esquema 11 – Proposta de mecanismo para a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovida pelo complexo (2).....	101
Esquema 12 – Proposta de mecanismo para a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovida pelo complexo (3).....	102
Esquema 13 – Proposta de mecanismo para a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovida pelo complexo (4).....	104

LISTA DE ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS

2,2-bipy	2,2'-bipiridina
2,4-BDNPP	bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato de piridínio
2,4-DNP	2,4-dinitrofenolato
2,4-DNPP	2,4-dinitrofenil-fosfato de lutidínio
bipy	4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina
bipyCHO	4-metil-2,2'-bipiridina-4-carboxialdeído
bipyNH ₂	4-metil-4'-aminometil-2,2'-bipiridina
bipyNOH	4-metil-2,2'-bipiridina-4-carbaldoxima
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CHES	Ácido 2-[N-cicloexilamino]etanossulfônico
D ₂ O	Óxido de deutério
dap	1,2-diaminopropano
DEPT	Intensificação da distorção por transferência de polarização (do inglês, “ <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i> ”)
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês, “ <i>deoxyribonucleic acid</i> ”)
E _{1/2}	Potencial de meia onda
en	1,2-etilenodiamina
E _{pa}	Potencial de pico anódico
E _{pc}	Potencial de pico catódico
ESI-QTOF-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
EXAFS	Espectroscopia de estrutura fina estendida de raios X
f	Fator catalítico
Fc ⁺ /Fc	Par redox, ferrocínio/ferroceno
FTIR-ATR	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier e com acessório de reflectância total atenuada horizontal
<i>h</i>	Constante de Planck
H ₂ bbpmp	2-[N-bis(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-N'-[(2-piridilmetil)(2-hidróxi benzil)aminometil]- fenol
H ₂ L	2-bis[{(2-piridilmetil)-aminometil} -6- {(2-hidroxibenzil)-(2-piridil metil)} aminometil]-4-metilfenol

H ₂ L ¹ _{bpea-amig}	2-(3-(((3-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzilideno)hidrazinacarboximidamida
H ₂ L ¹ _{bpea-apur}	2-(((2-(9H-purin-6-ilamino)etilamino)metil)-6-(((3-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol
H ₂ L ² -et	(2-(((2-aminoetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((2-(piridin-2-il)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol)
H ₂ LAB	2-(((3-(((4-aminobutil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilfenil)metil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol
H ₂ Lbipy	(2-(((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((4'-metil-[2,2'-bipiridin]-4-il)metil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol)
H ₂ L-CH ₃ :	2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N0-(2-piridilmetil)(2-hidroxi-5-metilbenzil)aminometil]fenol
H ₂ LHex	2-(((3-(((6-aminohexil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilfenil)metil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol
H ₂ L-NO ₂	2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)(2-hidroxi-5-nitrobenzil)aminometil]fenol
H ₂ LP1	2-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-6-[[((2-hidroxi-5-metil-3-(((4-((piren-1-ilmetil)amino)butil)amino)metil)fenil)metil)(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol
H ₂ LP2	2-[[((3-(((4-[[bis(piren-1-ilmetil)amino]butil)amino)metil]-2-hidroxi-5-metilfenil)metil)(piridin-2-ilmetil)amino]metil)-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol
H ₂ py ₃ mff	2-bis[[2-piridilmetil)aminometil]-6-((2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil))aminometil]-4-metil-fenol
H ₃ HPBA	Ácido 2-((2-hidroxi-5-metil-3-((piridin-2-ilmetilamino)metil)benzil)(2-hidroxibenzil)amino)acético
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
HTPPNOL	N,N,N'-tris-(2-piridilmetil)-1,3-diaminopropan-2-ol

I	Força iônica
J	Constante de acoplamento magnético
K	Constante de Boltzmann
K_{ass}	Constante de associação
k_{cat}	Constante catalítica
K_{m}	Constante de Michaelis-Menten
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico monohidratado
NHE	Eletrodo normal de hidrogênio (do inglês, “ <i>normal hydrogen electrode</i> ”)
PAP	Fosfatases ácidas púrpuras (do inglês, “ <i>purple acid phosphatases</i> ”)
pH	Potencial hidrogeniônico
PhoA	Fosfatase alcalina A
PhoD	Fosfatase alcalina D
PhoX	Fosfatase alcalina X
pic	2-(aminometil)piridina
pK_{a}	Constante de dissociação ácida em escala logarítmica
pK_{w}	Constante de autoprotólise da água em escala logarítmica
ppm	Partes por milhão
R	Constante dos gases ideais
rkbPAP	Fosfatase ácida púrpura de feijão vermelho (do inglês, “ <i>kidney bean purple acid phosphatase</i> ”)
RMN	Ressonância magnética nuclear
TCLM	Transferência de carga do tipo ligante-metal
TCML	Transferência de carga do tipo metal-ligante
TGS	Sulfato de triglicina
TMS	Tetrametilsilano
UV-Vis	Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível
V_0	Velocidade inicial
$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima
ϵ	Coefficiente de absorção molar
λ	Comprimento de onda (nm)
ΛM	Condutividade Molar
δ	Deformação angular simétrica ou assimétrica (IV)
δ	Deslocamento químico (RMN)

Δ_{vas-vs}	Diferença de deformação angular assimétrica ou simétrica
Δ_{Ep}	Diferença de potencial de pico
ΔG^\ddagger	Energia livre de ativação
ΔH^\ddagger	Entalpia de ativação
ΔS^\ddagger	Entropia de ativação
v	Estiramento axial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Metalohidrolases.....	15
1.1.1	Fosfatase Ácida Púrpura.....	17
1.2	Compostos modelos ou biomiméticos.....	20
1.2.1	Segunda esfera de coordenação.....	21
1.3	Justificativa do trabalho.....	25
2	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos específicos.....	28
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	29
3.1	Materiais	29
3.2	Métodos e instrumentação	30
3.2.1	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	30
3.2.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono .	31
3.2.3	Análise elementar de C, H e N.....	31
3.2.4	Espectrometria de massas.....	31
3.2.5	Espectroscopia na região do ultravioleta e visível	32
3.2.6	Titulação espectrofotométrica e potenciométrica.....	32
3.2.7	Condutimetria	33
3.2.8	Cristalografia de raios X.....	33
3.2.9	Eletroquímica.....	34
3.2.10	Estudos de reatividade	34
3.3	Síntese do ligante e seus precursores.....	36
3.3.1	Síntese dos precursores	37
<i>3.3.1.1</i>	<i>Síntese da 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (bipy).....</i>	<i>37</i>
<i>3.3.1.2</i>	<i>Síntese da 4-metil-2,2'-bipiridina-4-carboxialdeído (bipyCHO).....</i>	<i>38</i>

3.3.1.3	<i>Síntese da 4-metil-2,2-bipiridina-4-carbaldoxima (bipyNOH)</i>	39
3.3.1.4	<i>Síntese da 4-metil-4'-aminometil-2,2'-bipiridina (bipyNH₂)</i>	40
3.3.2	Síntese do ligante 2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((4'-metil-[2,2'-bipiridin]-4-il)metil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol - H₂L_{bipy}	41
3.4	Síntese dos complexos	42
3.4.1	Síntese do complexo [Pd^{II}(H₂L_{bipy})](Cl)₂ - (1)	42
3.4.2	Síntese do complexo [Fe^{III}(μ-OAc)₂Zn^{II}(L_{bipy})](ClO₄)₂ - (2)	43
3.4.3	Síntese do complexo [Fe^{III}(μ-OAc)₂Zn^{II}(L_{bipy})Pd^{II}Cl₂](ClO₄)₂ - (3)	44
3.4.4	Síntese do complexo [Fe₂^{III}(μ-OH)₃Zn₃^{II}(L²-et)₂](ClO₄)₅ - (4)	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	Caracterização dos precursores e do ligante	47
4.1.1	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	48
4.1.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono .	51
4.1.3	Análise elementar de C, H e N	54
4.1.4	Espectrometria de massas	55
4.2	Caracterização dos complexos.....	56
4.2.1	Cristalografia de raios X	56
4.2.2	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	60
4.2.3	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio	63
4.2.4	Análise Elementar de C, H e N	64
4.2.5	Espectrometria de massas	65
4.2.6	Espectroscopia na região do ultravioleta e visível	70
4.2.7	Titulação potenciométrica e espectrofotométrica	74
4.2.8	Condutimetria	81
4.2.9	Eletroquímica	81
4.3	Estudo de Reatividade	85

4.3.1	Efeito do pH na hidrólise do 2,4-BDNPP.....	86
4.3.2	Efeito da concentração do substrato na hidrólise do 2,4-BDNPP	89
4.3.3	Efeito da temperatura sobre a velocidade de hidrólise do 2,4-BDNPP	94
4.3.4	Proposta de mecanismo para a hidrólise do 2,4-BDNPP	96
5	CONCLUSÕES.....	105
6	PERSPECTIVAS	107
	REFERÊNCIAS.....	108
	APÊNDICE A – Espectros de RMN de ¹ H dos ligantes precursores bipy, bipyCHO, bipyNH ₂ OH e H ₂ py ₃ mff.....	121
	TRABALHO PUBLICADO	123

1 INTRODUÇÃO

A Química Bioinorgânica é uma área a qual é caracterizada pela sua interdisciplinaridade, tanto nas áreas de química, quanto nas áreas de física, biologia, medicina, farmácia, etc. Um dos campos de pesquisa na área trata da investigação da reatividade química e mediação dos íons metálicos em processos biológicos (LIPPARD; BERG, 1994). Um exemplo a ser citado é a hemoglobina, encontrada nas células dos glóbulos vermelhos, que contém um íon ferro coordenado à molécula de porfirina. Este grupamento, chamado de Heme, é responsável pelo transporte de oxigênio no plasma sanguíneo (SCHERLIS; ESTRIN, 2001).

Dentre as diversas áreas existentes na química bioinorgânica, o presente trabalho busca o entendimento de processos biológicos específicos e catalíticos desempenhados por metaloenzimas, pois estas apresentam como principal característica uma grande eficiência catalítica e alto grau de especificidade. Isto ocorre devido à grande estabilidade pelo sítio ativo da biomolécula como também pelas ligações intermediárias exógenas e terminais da cadeia lateral da proteína coordenada ao metal (BERG *et al.*, 2019; FENTON, 2008; HOLM; KENNEPOHL; SOLOMON, 1996).

Em vista disto, o estudo de complexos modelos tem contribuído de forma significativa para a obtenção de informações sobre a estrutura e funções das metaloenzimas de interesse pela comparação das propriedades físico-químicas desses complexos com as propriedades conhecidas das enzimas, o que permite inferir acerca da estrutura e das funções das mesmas (JOVITO, 2010).

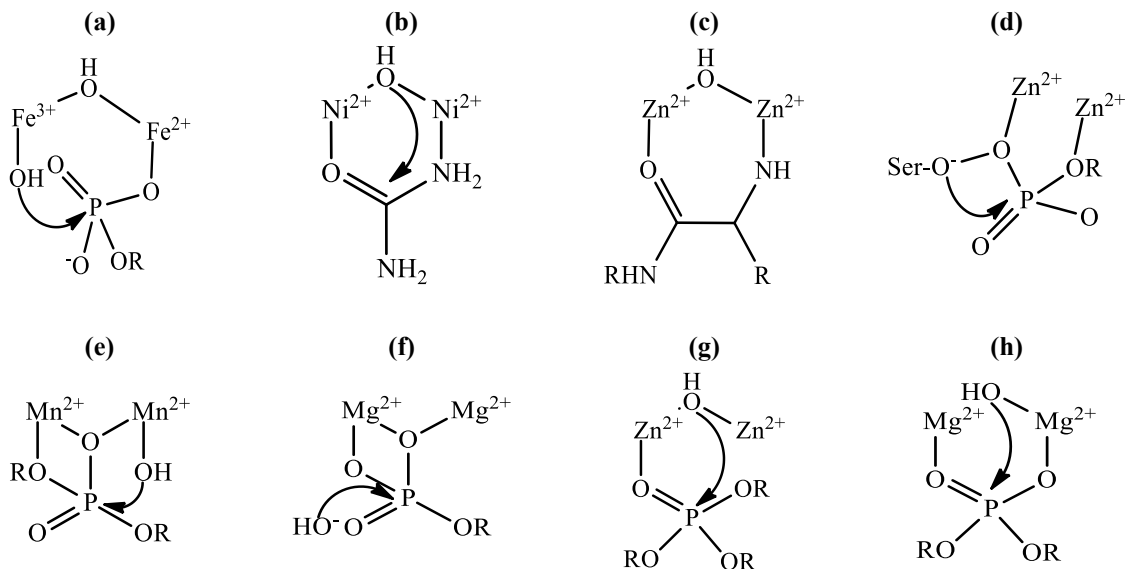
1.1 METALOHIDROLASES

Metalohidrolases constituem um grande e estruturalmente diverso grupo de enzimas que possuem sítios ativos capazes de clivar, de modo hidrolítico, uma série de ligações químicas de grupamentos fosfatos, amidas, ésteres, éteres, nitrilas, entre outras (MCCLEVERTY; MEYER, 2004; MITIĆ *et al.*, 2006).

Algumas metalohidrolases contêm apenas um íon metálico nos seus sítios ativos. Porém, devido aos efeitos dos vários modos de catálise tenderem a ser multiplicativos (WILLIAMS *et al.*, 1999), muitas enzimas utilizam dois ou mais íons metálicos simultaneamente para fornecer máxima aceleração da reação catalisada (MCCLEVERTY; MEYER, 2004). Na Figura 1 estão representados os centros catalíticos de algumas metalohidrolases juntamente com seus íons

metálicos e suas propostas mecanísticas de acordo com as reações que catalisam (MITIĆ *et al.*, 2006).

Figura 1 – Esquema demonstrativo do sítio ativo e seus substratos para diferentes metaloenzimas binucleares: (a) fosfatase ácida púrpura, (b) urease, (c) leucina amino-peptidase, (d) fosfatase alcalina, (e) endonuclease, (f) inositol monofosfatase (g) fosfotriesterase e (h) EcoRV endonuclease

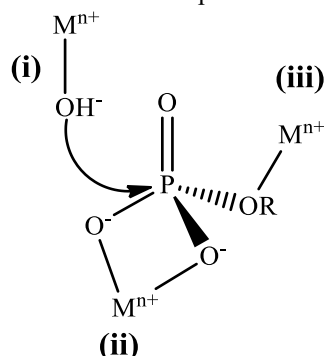


Fonte: Adaptado de Mitić, N. *et al.* The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 8, p. 3341.

Porém, este trabalho tem um foco específico em uma classe de metalohidrolases denominadas fosfohidrolases, as quais catalisam com um alto grau de especificidade e de forma não degradativa a hidrólise de ligações do tipo ésteres de fosfatos de aminoácidos, sacarídeos fosfatados, nucleotídeos e nucleases (COWAN, 2001; WILCOX, 1996).

Muitas das enzimas hidrolisam as ligações fosfodiéster utilizam íons metálicos como ácido de Lewis para promover a catálise, de modo que: (i) podem agir diminuindo o valor do pK_a de moléculas de água ligadas ao metal, podendo gerar nucleófilos em condições de pH fisiológico; (ii) o metal pode agir como sítio de ligação da enzima com o substrato e estabilizar o estado de transição; (iii) o centro metálico pode atuar no mecanismo hidrolítico por sua interação com o grupo de saída, desde que este possua uma carga negativa durante o estado de transição (Figura 2) (HAAS; FRANZ, 2009; MCCLEVERTY; MEYER, 2004; MITIĆ *et al.*, 2006).

Figura 2 – Representação esquemática das várias maneiras em que os íons metálicos podem, em princípio, facilitar a hidrólise de um éster de fosfato. **(i)** podem agir diminuindo o valor do pKa de moléculas de água ligadas ao metal; **(ii)** o metal pode agir como sítio de ligação da enzima com o substrato e estabilizar o estado de transição; **(iii)** o centro metálico pode atuar no mecanismo hidrolítico por sua interação com o grupo de saída



Fonte: Adaptado de Meyer, T.; McCleverty, J. **Comprehensive coordination chemistry II: from biology to nanotechnology**. v. 8, 2. ed. Amsterdam, Boston: Elsevier, 2005. p. 642.

Como observado na Figura 1, muitas enzimas contêm em seu sítio ativo dois centros metálicos. Porém, a única enzima da classe das metalohidrolases que necessita de um sítio ativo heterovalente $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$, no qual $\text{M}^{\text{II}} = \text{Fe}, \text{Zn}$ ou Mn , para a que a catálise seja estabelecida é a Fosfatase Ácida Púrpura (PAP) (Figura 1a) (BECK *et al.*, 1986; DURMUS *et al.*, 1999; MITIĆ *et al.*, 2006; SCHENK *et al.*, 1999, 2007).

O foco do presente trabalho está no estudo de biomiméticos sintético dessa classe de enzimas.

1.1.1 Fosfatase Ácida Púrpura

Fosfatases ácidas púrpuras são metalohidrolases que contêm em seu sítio ativo dois centros metálicos de valência mista e catalisam a clivagem hidrolítica de vários ésteres e anidridos fosfóricos em pH ácido (faixa de pH entre 4 e 7), sendo caracterizadas pela intensa coloração púrpura, em sua forma inativa (KLABUNDE *et al.*, 1996; MCCLEVERTY; MEYER, 2004; MITIĆ *et al.*, 2006).

As PAPs podem ser encontradas em plantas e animais e possuem um sítio ativo do tipo: $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ no feijão vermelho (FEDER *et al.*, 2019; KLABUNDE *et al.*, 1996; STRÄTER, NORBERT *et al.*, 2005; UPPENBERG *et al.*, 1999); $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}$ na batata doce (SCHENK *et al.*, 1999, 2005); e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ em animais (GUDDAT *et al.*, 1999; LINDQVIST *et al.*, 1999; SELLECK *et al.*, 2017; UPPENBERG *et al.*, 1999). Também podem ser encontradas em fontes microbianas, contudo, seu mecanismo de ação ainda não está bem estabelecido (HAYMAN; COX, 1994; KAIJA *et al.*, 2002; SCHENK *et al.*, 2005).

Em plantas, as PAPs possuem função na liberação de grupos fosfato. Nos mamíferos, tem funções biológicas no transporte de ferro (KETCHAM *et al.*, 1985), na reabsorção óssea por osteoclastos (CLARK *et al.*, 1989; REINHOLT *et al.*, 1990), na desfosforilação de fosfoproteínas em eritrócitos e na geração de hidroxiradicais e espécies reativas de oxigênio (HAYMAN; COX, 1994; KAIJA *et al.*, 2002; SCHENK *et al.*, 2005).

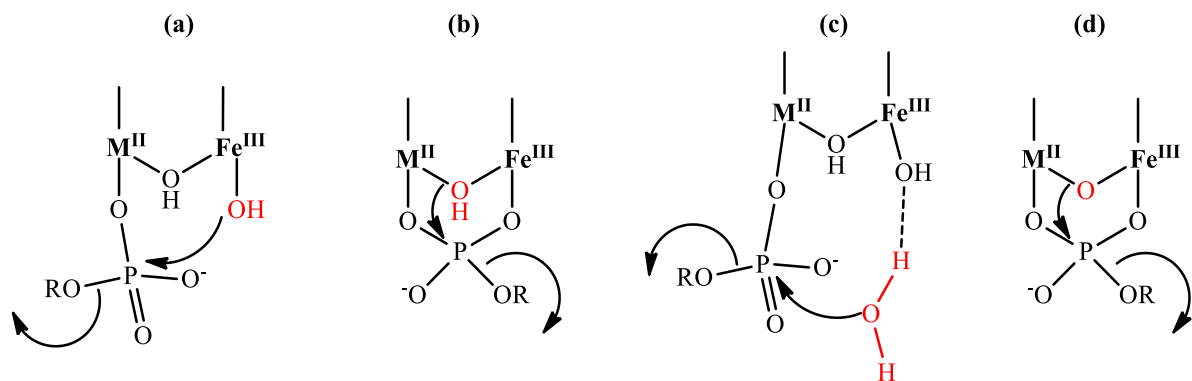
Todas as PAPs, sejam elas de fontes animais ou vegetais, apesar de diferirem no tamanho e em algumas regiões da cadeia polipeptídica, apresentam o mesmo conjunto de aminoácidos na formação do seu sítio ativo, possuindo centros metálicos binucleares de valência mista $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$, sendo $\text{M} = \text{Zn}, \text{Mn}$ ou Fe (BECK *et al.*, 1986; DURMUS *et al.*, 1999; MITIĆ *et al.*, 2006; SCHENK *et al.*, 1999, 2007). Além disto, estes centros são quimicamente idênticos no que diz respeito à primeira esfera de coordenação, exibindo ambientes de coordenação octaédricos tanto no Fe^{III} quanto no M^{II} (ANTANAITIS; AISEN; LILIENTHAL, 1983; AVERILL *et al.*, 1987; KLABUNDE *et al.*, 1996; QUE; TRUE, 2007; YANG, Y.-S.; MCCORMICK; SOLOMON, 1997).

A primeira PAP a ter sua estrutura resolvida pela técnica de difração de raios X foi a rkbPAP (fosfatase ácida púrpura do feijão vermelho) (FEDER *et al.*, 2019; KLABUNDE *et al.*, 1996; STRÄTER, N. *et al.*, 1995; STRÄTER, NORBERT *et al.*, 2005). Além dessa, as PAPs presentes na batata doce (SCHENK *et al.*, 2005), no fluido uterino de suínos (GUDDAT *et al.*, 1999; SELLECK *et al.*, 2017), nos ossos de ratos (LINDQVIST *et al.*, 1999; UPPENBERG *et al.*, 1999) e em humanos (STRÄTER, NORBERT *et al.*, 2005), também tiveram suas estruturas resolvidas. Um fato interessante e que comprova a heterovalência, está no caso das PAPs encontradas em mamíferos, que podem apresentar-se em dois estados de oxidação: o estado totalmente oxidado $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$, que é inativo frente à hidrólise de ésteres de fosfatos, e a forma reduzida $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$, que é a espécie ativa (QUE; TRUE, 2007), sugerindo que apenas um dos centros metálicos é oxidado/reduzido, enquanto que o outro mantém-se no estado de oxidação 3+ (KLABUNDE *et al.*, 1996).

Devido a essas semelhanças estruturais entre os sítios ativos das PAPs, foi sugerido que a catálise da reação de hidrólise de ésteres de fosfato possa ocorrer através de quatro mecanismos, sendo que cada um utiliza grupos hidróxidos como diferentes nucleófilos: um OH^- terminal ligado ao Fe^{III} (Figura 3a); OH^- em ponte (Figura 3b); ou um OH^- na segunda esfera de coordenação do Fe^{III} (Figura 3c) (MERKX; AVERILL, 1999; MERKX; PINKSE; AVERILL, 1999). O OH^- ligado ao Fe^{III} utiliza a maior acidez de Lewis do Fe^{III} *versus* Zn^{II} para gerar o nucleófilo em $\text{pH} < 7$. Neste caso, o substrato liga-se ao metal divalente, que age

como um ácido de Lewis para ativá-lo para o ataque nucleofílico (KLABUNDE *et al.*, 1996; LINDQVIST *et al.*, 1999; MCCLEVERTY; MEYER, 2004; STRÄTER, N. *et al.*, 1995). Outra proposta sobre o mecanismo catalítico das PAPs está na questão em que o íon hidróxido presente como ponte entre os centros metálicos seja o agente nucleofílico ao grupo fosfato, que também se liga de maneira bidentada, formando uma ponte entre os metais (SMOUKOV *et al.*, 2002). Por fim, tem-se a ideia do ataque de um íon hidróxido gerado na segunda esfera de coordenação do Fe^{III} com um éster de fosfato ligado de maneira monodentada ao centro metálico divalente (MCCLEVERTY; MEYER, 2004). O quarto mecanismo, uma ponte μ -oxo é responsável pelo ataque nucleofílico ao fosfato (Figura 3d) foi descrito por Schenk e colaboradores ao analisarem uma PAP de batata doce com centro metálico Fe^{III}Mn^{II} (SCHENK *et al.*, 1999).

Figura 3 – Intermediários catalíticos para as fosfatases ácidas púrpuras: (a) ataque nucleofílico de um hidróxido terminal em um substrato éster de fosfato ligado de forma monodentada ao sítio metálico divalente; (b) ataque nucleofílico do hidróxido em ponte ao substrato éster de fosfato ligado de forma bidentada aos sítios metálicos; (c) ataque nucleofílico de um íon hidróxido, gerado na segunda esfera de coordenação do Fe^{III}, em um substrato éster de fosfato ligado de forma monodentada ao sítio metálico divalente; (d) uma ponte μ -oxo é responsável pelo ataque nucleofílico ao fosfato



Fonte: Adaptado de (a, b e c) Merckx, M. e Averill, B. A. Probing the role of the trivalent metal in phosphate ester hydrolysis: preparation and characterization of purple acid phosphatases containing Al^{III}Zn^{II} and In^{III}Zn^{II} active sites, including the first example of an active aluminum enzyme. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 28, 1999, p. 6688. (d) 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, 1999.

Até o presente momento, não há evidência experimental conclusiva sobre a verdadeira estrutura do complexo enzima-substrato. Os mecanismos propostos mostram que o ânion fosfato liga-se, em alguma etapa da catálise, numa coordenação do tipo bidentada em ponte a ambos os cátions metálicos do sítio ativo das PAPs. Estudos espectroscópicos de estrutura fina pela absorção de raios X estendidos (EXAFS) realizados por True e Wang (TRUE *et al.*, 1993;

WANG *et al.*, 1991) para esse tipo de ligação, favorecem o mecanismo proposto por Smoukov (2012), pois espera-se que este tipo de ligação aproxime a ponte μ -hidroxo ao íon bivalente, tornando-o um ligante *quasi*-terminal (M^{II} -OH⁻) e, portanto, mais nucleofílico, mesmo sabendo que o íon hidróxido apresente uma nucleofilicidade muito maior do que quando coordenado como ponte (TWITCHETT; SYKES, 1999).

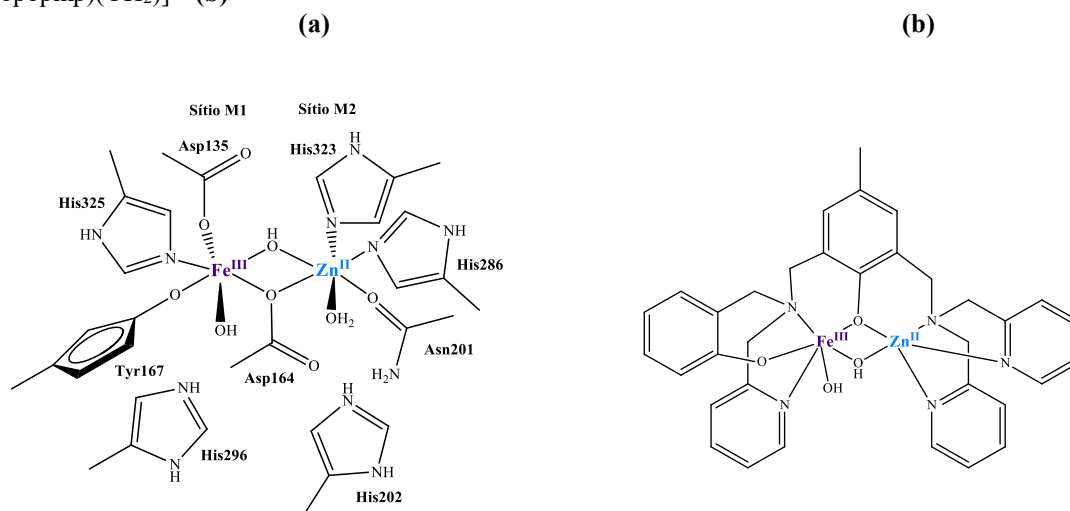
Diante disto, o uso de compostos de baixa massa molar que mimetizem o sítio ativo das metaloenzimas e que possam ser utilizados como catalisadores bioinspirados, tem contribuído na elucidação de propriedades e mecanismos de ação de enzimas. Esses catalisadores bioinspirados devem apresentar características físico-químicas semelhantes às PAPs, podendo obter-se informações estruturais e dos mecanismos envolvidos nas reações.

1.2 COMPOSTOS MODELOS OU BIOMIMÉTICOS

Em busca da elucidação do mecanismo de hidrólise pelas PAPs e do esclarecimento mais conciso do papel destas em organismos vivos, as informações obtidas por diversas técnicas de análise, aliadas a um trabalho de comparação de resultados de modelos sintéticos, forneceram muitas informações e propostas acerca do sítio ativo das PAPs.

Diversos grupos de pesquisa têm trabalhado no estudo comparativo envolvendo compostos miméticos que funcionam como modelo para as PAPs (BERNHARDT *et al.*, 2015; CAMARGO *et al.*, 2018; COMBA; GAHAN; HANSON; *et al.*, 2012; COMBA; GAHAN; MEREACRE; *et al.*, 2012; JARENMARK *et al.*, 2011; MITIĆ *et al.*, 2006; PATHAK *et al.*, 2017, 2018; PATHAK; GANGWAR; GHOSH, 2018; PERALTA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2019; PIOVEZAN *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2017). Esses complexos metálicos podem ser projetados com ligantes específicos que assumam uma certa conformação ao redor do íon metálico, para o estudo de interações com biomoléculas (LIPPARD; BERG, 1994). Um exemplo a ser citado está no primeiro complexo binuclear de $Fe^{III}(\mu-OH)Zn^{II}$ (Figura 4b), obtido por Neves e bioinspirado nas propriedades estruturais e físico-químicas das PAPs (NEVES *et al.*, 2007). Este complexo possui características físico-químicas semelhantes as PAPs, como a presença de um grupo fenolato terminal coordenado ao íon Fe^{III} análogo ao grupo Tirosina167 (Figura 4a) (MITIĆ *et al.*, 2006; NEVES *et al.*, 2007).

Figura 4 – Esquema do Sítio Ativo da PAP do feijão vermelho (a) e a estrutura do complexo bioinspirado $[\text{FeZn}(\mu\text{-OH})(\text{bpbpmp})(\text{OH}_2)]^{2+}$ (b)



Fonte: adaptado de (a) Mitić, N. *et al.* The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 8, p. 3343. (b) Neves, A. *et al.* An Unprecedented $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}$ Complex that Mimics the Structural and Functional Properties of Purple Acid Phosphatases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 24, p. 7487.

As propriedades físico-químicas, estruturais e catalíticas comparadas entre as metaloenzimas de interesse e os compostos modelos bioinspirados são de suma importância para considerá-los (ou não) bons modelos sintéticos. Deste modo, o químico bioinorgânico deve seguir uma metodologia sistematizada na elaboração desses compostos biomiméticos, partindo de ligantes que possuam grupos doadores análogos aos aminoácidos presentes no sítio catalítico das metaloenzimas de interesse. Neste contexto, será utilizado as PAPs como fonte para o desenvolvimento de uma classe de complexos metálicos sintéticos.

1.2.1 Segunda esfera de coordenação

Devido a importância da elaboração de modelos bioinspirados em PAPs e a contribuição para o entendimento das mesmas, as atuais pesquisas objetivam tornar os modelos mais eficientes e seletivos. Um possível caminho para isto está na incorporação de grupos funcionais que não estejam diretamente coordenados ao sítio ativo heterovalente da molécula (primeira esfera de coordenação) e sim, disponíveis para estabilizar o estado de transição na hidrólise de ésteres de fosfatos originando, portanto, uma segunda esfera de coordenação. Grupos de aminoácidos ou de outras moléculas que não estão diretamente coordenados ao

centro catalítico, mas são indispensáveis para a atividade enzimática, são definidos como segunda esfera de coordenação.

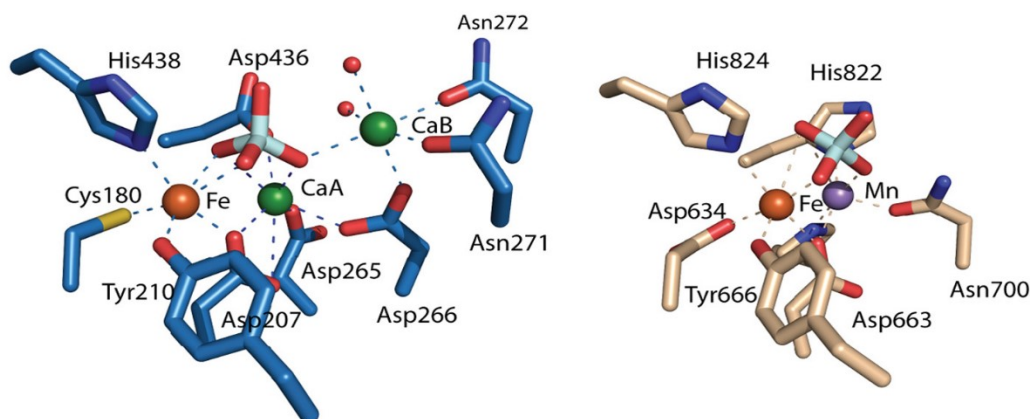
Efeitos de segunda esfera de coordenação em metaloenzimas tem como objetivo melhorar e interagir de forma seletiva com o substrato. Com isto, aumentam a estabilidade do estado de transição enzima-substrato, gerando espécies ativas e/ou estabilizando grupos de saída na catálise, alterando as propriedades físicas e químicas dos sítios ativos destas enzimas. Estas interações ocorrem de maneira não-covalente, tais como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, efeitos hidrofóbicos e π - π (TANG *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2013).

Além destas características para a segunda esfera de coordenação, foram recentemente identificadas classes de enzimas que acomodam mais de dois íons metálicos em sua estrutura. Destes metais, dois destes estão relacionados com o centro catalítico binuclear da enzima enquanto que, um ou mais metais se coordenam em locais distintos, mas próximo ao centro catalítico e agem como ativadores da atividade enzimática. As enzimas da família das fosfatases alcalinas A, X e D (PhoA, PhoX e PhoD, respectivamente), que estão relacionadas à atividade de fosfatases alcalinas extra citoplasmática bacteriana, são exemplos de enzimas que utilizam mais de dois metais para realizarem a atividade catalítica (PEDROSO, MARCELO M. *et al.*, 2016; PEDROSO, MARCELO MONTEIRO *et al.*, 2017; RODRIGUEZ *et al.*, 2014; YONG *et al.*, 2014). As enzimas PhoX são exclusivamente fosfomonoesterases e apresentam dois íons Fe^{III} e três íons Ca^{II} (YONG *et al.*, 2014). As enzimas PhoA são predominantemente fosfomonoesterases e contém três íons metálicos sendo, dois Zn^{II} e um Mg^{II} (LASSILA; ZALATAN; HERSCHLAG, 2011). Por fim, as enzimas da família PhoD são enzimas com atividade de fosfodiesterase, mas também possuem atividade significativa de fosfomonoesterase. A PhoD apresenta um íon Fe^{III} e dois íons Ca^{II} (RODRIGUEZ *et al.*, 2014; ZAMBONELLI; CASALI; ROBERTS, 2003).

Dados estruturais mostram que o sítio ativo da PhoD é distinto do encontrado para as PAPs, mas mostram que a semelhança entre essas duas enzimas está na característica de conservarem a posição e o número de coordenação para os íons Fe^{III} , como pode ser observado na Figura 5. Um fato muito interessante, e que diverge da PAP, está relacionado com a PhoD utilizar um segundo metal divalente (Ca^{II}) que pode se ligar em um local distinto, mas próximo ao local do centro catalítico heterovalente $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$. Deste modo, a presença do segundo Ca^{II} faz com que o mesmo seja um ativador da atividade enzimática. Estas observações estão correlacionadas diretamente com os efeitos de segunda esfera de coordenação fornecidos por este metal, nos quais essas interações extras resultam em um aumento da estabilidade do estado

de transição enzima-substrato e, conseqüentemente, aumentam a constante catalítica (PEDROSO, MARCELO M. *et al.*, 2016; PEDROSO, MARCELO MONTEIRO *et al.*, 2017).

Figura 5 – Similaridade estrutural entre as enzimas PhoD e PAP. Comparação do ambiente de coordenação dos íons metálicos PhoD (esquerda) com aqueles da PAP da batata doce (direita). As cores dos elementos são: Fe^{III} em laranja, Ca^{II} em verde, Mn^{II} em roxo, oxigênio em vermelho; nitrogênio em azul escuro; enxofre em amarelo; fósforo em azul claro; carbonos na PhoD em azul-céu e e carbonos na PAP em castanho. As ligações de coordenação de íons metálicos são mostradas por linhas tracejadas



Fonte: adaptado Rodriguez, F. et al. Crystal structure of the *Bacillus subtilis* phosphodiesterase PhoD reveals an iron and calcium-containing active site. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 45, p. 30894.

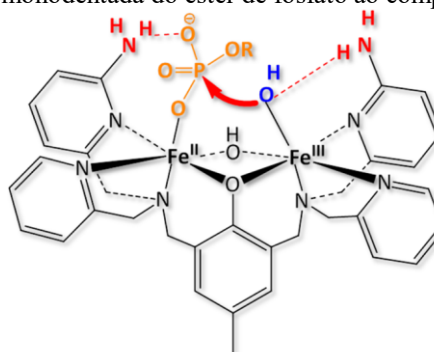
Modelos biomiméticos para simular a primeira esfera de coordenação já são bastante difundidos e conhecidos, apresentando resultados satisfatórios quanto as propriedades estruturais e eletrônicas das metalohidrolases de interesse, porém com valores de reatividade bem inferiores em relação a atividade catalítica ao comparar com o modelo-metalohidrolase.

Uma das principais funções da segunda esfera de coordenação de metalohidrolases é na ativação do nucleófilo por meio de interações intermoleculares de ligação de hidrogênio, de interações eletrostáticas, de efeitos hidrofóbicos e de forças de van der Waals (NEVES *et al.*, 2007). Para este fim, grupos laterais cataliticamente ativos tem sido utilizado, como por exemplo, polímeros, dendrímeros, grupos laterais funcionais amina, amida e ácido carboxílico. Aminas alifáticas, por exemplo, podem ser protonadas em pH mais ácidos, tornando-se carregadas positivamente quando em solução podendo fazer contribuições eletrostáticas. Já as aminas aromáticas e amidas são grupamentos neutros e podem ser ativos na doação ou recepção de ligações de hidrogênio (BONOMI *et al.*, 2008; CAMARGO *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2017; TJIOE *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2013).

Dentre os poucos resultados obtidos para compostos modelos para as PAPs com efeitos de segunda esfera de coordenação, pode-se citar o complexo binuclear [Fe^{III}Fe^{II}(L³)(OH)(OH₂)₂] (Figura 6) o qual os autores sugerem que uma amina aromática

proveniente do ligante é capaz de estabilizar a ligação monodentada do éster de fosfato ao complexo, o que facilitaria o ataque do grupo hidroxila terminal ligado ao Fe^{III} (COMBA; GAHAN; MEREACRE; *et al.*, 2012). Além deste, para mimetizar o microambiente exercido pelos resíduos de histidina mais próximos do sítio das fosfatases ácidas púrpuras (Figura 4a), Souza e colaboradores funcionalizaram o polímero polietilenoimina através de interações covalentes com um complexo modelo heterobinuclear. Os resultados obtidos indicaram que apesar de diminuir a atividade (k_{cat}) quando comparado ao mesmo complexo isolado, o sistema polietilenoimina e complexo apresentou uma maior eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) e uma elevada constante de associação (K_{ass}) com o substrato. Isto ocorre devido a dois efeitos opostos da polietilenoimina: os grupos amina carregados positivamente interagem com o substrato no estado fundamental ou no de transição do substrato; e as cadeias de polietilenoimina podem dificultar a reorganização ao redor do estado de transição (DE SOUZA *et al.*, 2015).

Figura 6 – Representação da estrutura do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{L}^3)(\text{OH})(\text{OH}_2)_2]$ com efeito de segunda esfera de coordenação na estabilização da ligação monodentada do éster de fosfato ao complexo



Fonte: Comba, P. et al. Spectroscopic characterization of the active $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ and $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ forms of a purple acid phosphatase model system. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 22, 2012, p. 12195.

Nota: $\text{L}^3 = \text{HL}^3$: 2,6-Bis(((6-aminopiridin-2-il)metil)(piridin-2-ilmetil)-amino)metil)-4-metilfenol

Trabalhos mais recentes publicados pelo nosso grupo de pesquisa, utilizaram a introdução de grupos 1,2-etanodiamina e pireno na esfera externa de um mimético $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ do sítio ativo de PAP (CAMARGO *et al.*, 2018). Estes complexos apresentaram uma alta eficiência catalítica, decorrente das interações de segunda esfera de coordenação que aumentaram a afinidade pelo substrato modelo 2,4-BDNPP. Seguindo esta linha de pesquisa, Silva e Pereira não só modificaram a segunda esfera de coordenação com grupos amina livres, como também avaliaram o efeito do aumento do anel quelato ao redor do centro divalente. Seus complexos modelos apresentaram um significativo aumento na constante de associação (K_{ass}) com o substrato, em razão do aumento do anel quelato e pela presença dos grupos amino protonados

resultando, portanto, em uma maior atividade na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP (PEREIRA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2017).

1.3 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

O planejamento e a síntese de novos ligantes polidentados simétricos e não-simétricos tem sido objeto de estudo de diferentes grupos de pesquisa, no qual se estabelece como condição fundamental para a obtenção de complexos bioinspirados nas fosfatases ácidas púrpuras. Isto garante ambientes quimicamente distintos em torno dos centros binucleares de Fe^{III} e M^{II} ($\text{M} = \text{Zn}, \text{Mn}$ ou Cu), pois é uma característica essencial para as propriedades catalíticas do complexo modelo (DE SOUZA *et al.*, 2015; SMITH *et al.*, 2012). Além do emprego como sistemas bioinspirados na elucidação dos mecanismos das correspondentes enzimas e nucleases, os complexos podem ser utilizados como fármacos seja como agente quimioterápico ou como antibiótico.

O destaque para o estudo das hidrolases sintéticas como biocatalisadores deve-se à habilidade das mesmas em clivar as ligações de ácidos nucleicos de modo não degradativo. Apesar do grande avanço na construção de modelos bioinspirados, as atuais pesquisas objetivam tornar os modelos mais eficientes e seletivos, visando, por exemplo, a obtenção de ligantes que facilitem a ligação do substrato ao metal, com melhoria na estabilidade do complexo metálico, e de complexos que contenham grupos capazes de tornar a clivagem de ácidos nucleicos sítio-dirigida.

Para isto, parte-se da ideia de obter sistemas relativamente conhecidos em termos de suas propriedades físico-químicas e de seus mecanismos, para facilitar posteriores análises. Dentre os diversos complexos modelos das fosfatases ácidas púrpuras já reportados na literatura, destacam-se para a hidrólise de fosfatos e DNA os complexos derivados do ligante 2 [*N*-bis(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-*N'*-[(2-piridilmetil)(2-hidróxibenzil)aminometil]-fenol - H_2bpbmp . (Karsten *et al.*, 2002). Estes apresentam propriedades espectroscópicas, eletrônicas e estruturais bastante similares as enzimas que se propõem a mimetizar e possuem uma alta eficiência catalítica, além de ter seu mecanismo de ação bem elucidado (KARSTEN *et al.*, 2002; NEVES *et al.*, 2007).

A partir dos bons resultados deste ligante, o mesmo grupo sintetizou um ligante derivado do H_2bpbmp com um grupo aldeído presente no fenol lateral, o $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ (PIOVEZAN *et al.*, 2010), para estudar possíveis efeitos de segunda esfera de coordenação.

Neste grupo aldeído foi possível incorporar grupos funcionais não coordenantes ao sítio ativo do composto, com disponibilidade para estabilizar o estado de transição na hidrólise de ésteres de fosfatos (CAMARGO *et al.*, 2018).

Neste contexto, utilizando a experiência do grupo de pesquisa na síntese de ligantes não-simétricos que possibilitem a obtenção de complexos heterobimetálicos heterovalentes, realizou-se no presente trabalho a síntese de um ligante que possui um grupo 4-metil-4'-aminometil-2,2'-bipiridina derivado no grupo aldeído do ligante H₂py₃mff. A partir deste novo ligante H₂L_{bipy} (2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((4'-metil-[2,2'-bipiridin]-4-il)metil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol), é possível manter a coordenação dos ions Fe^{III} e Zn^{II} no centro ativo do complexo e, um terceiro metal (Pd^{II}) pode ser coordenado à bipiridina para avaliar as atividades secundárias na estabilização das cargas negativas do substrato no estado de transição (efeitos de segunda esfera).

Além disto, este novo complexo bioinspirado nas PAPs poderá realizar hidrólise sítio-dirigida de ligações fosfato do DNA, pois o grupo com Pd^{II} do complexo tem grande probabilidade de ligar-se a suas bases adjacentes (G-C, 60% ou A-G, 20%). Além disto, o Pd^{II} estará coordenado à bipiridina e a dois cloretos, sendo estes passíveis de hidrólise, com a incorporação de uma ou duas moléculas de água. Estas espécies tornam o composto mais carregado positivamente, que pode facilmente reagir com o DNA nuclear a partir de ligações covalentes com bases de purinas, como é o caso da cisplatina. Portanto, espera-se que esse novo complexo interaja com o DNA de forma similar a cisplatina, ou seja, induzindo uma torção na estrutura do DNA de aproximadamente 35° em torno do sulco maior (Fuertes *et al.*, 2003). Estes estudos já estão sendo realizados no Centro de Biologia Molecular Estrutural da UFSC em colaboração com o trabalho do doutorando Philippe Gabriel, sob a orientação do Prof. Dr. Hernán Terenzi.

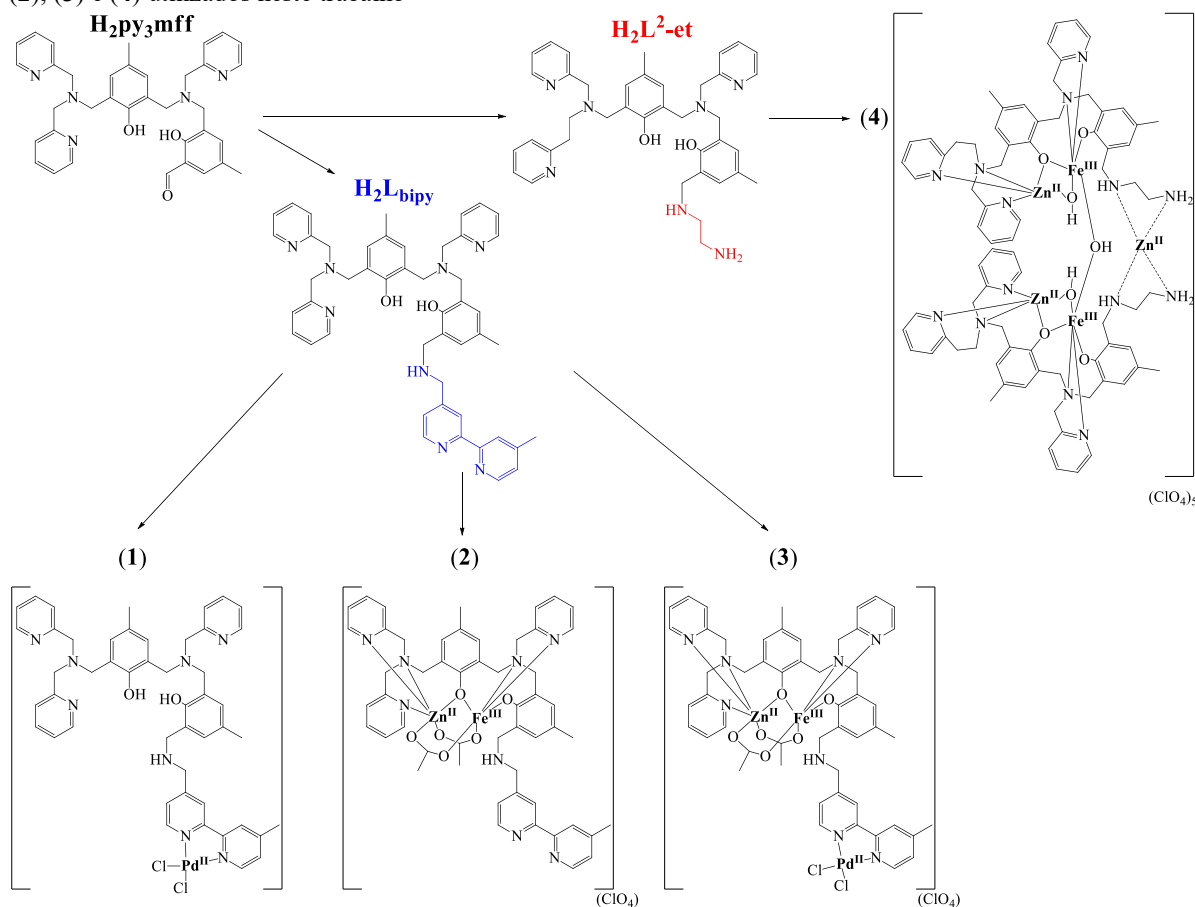
Paralelamente, no período de doutorado sanduíche de cinco meses realizado na Lunds Universitet (Lund, Suécia) e sob coorientação do Prof. Dr. Ebbe Nordlander e em cooperação com o trabalho de doutorado da Dra. Graciela Aparecida dos Santos Silva, também foi realizado o estudo inicial dos efeitos ocasionados pela presença de um íon metálico divalente na segunda esfera de coordenação com o ligante já estudado H₂L²-et (2-(((2-aminoetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((2-(piridin-2-il)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol). No presente estudo, foi escolhido o metal Zn^{II} para ser coordenado na diamina pendente e, através de diversas metodologias de síntese, foi obtido um

complexo pentanuclear, o qual foi possível obter sua estrutura cristalina. A partir deste, foi possível avaliar suas propriedades físico-químicas e reatividade frente ao substrato 2,4-BDNPP, comparando possíveis efeitos de segunda esfera de coordenação em relação ao complexo heterobinuclear $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}^2\text{-et})](\text{ClO}_4)_2$ (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017).

Com isto em mente, neste trabalho busca-se analisar qual a função que um metal não pertencente ao centro ativo heterovalente do biomimético das PAPs pode desempenhar nas suas propriedades físico-químicas e na atividade de hidrólise catalítica do substrato 2,4-BDNPP. Este estudo pode, portanto, elucidar mais informações acerca dos efeitos de segunda esfera de coordenação nas enzimas PAPs, com uma comparação análoga às encontradas para a enzima PhoD [1,2].

Os ligantes $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$ e $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$, utilizados neste trabalho, são derivatizados do ligante $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ e podem ser visualizados na Figura 7. Os complexos (1), (2) e (3) foram obtidos a partir do $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$ e o complexo (4), com o ligante $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$.

Figura 7 – Derivatizações do ligante $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ para obtenção dos ligantes $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$ e $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$ e dos complexos (1), (2), (3) e (4) utilizados neste trabalho



2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar novos complexos bioinspirados em Fosfatases Ácidas Púrpuras e avaliar a influência de metais na segunda esfera de coordenação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Projetar e sintetizar um novo ligante não-simétrico H_2L_{bipy} ;
- Caracterizar o novo ligante H_2L_{bipy} por espectroscopia vibracional na região do infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, análise elementar de C, H e N e Espectrometria de massas;
- Sintetizar novos complexos derivados do novo ligante H_2L_{bipy} contendo os íons metálicos Fe^{III} , Zn^{II} e Pd^{II} ;
- Caracterizar os complexos por espectroscopia vibracional na região do infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio; análise elementar de C, H e N; espectrometria de massas; espectroscopia na região do ultravioleta e visível; titulação potenciométrica e espectrofotométrica; condutimetria e voltametria de onda quadrada;
- Comparar as propriedades físico-químicas dos novos compostos sintetizados com metalohidrolases e nucleases sintéticas descritas na literatura;
- Estudos de reatividade destes complexos frente a substratos modelos, buscando auxiliar e ampliar os conhecimentos sobre o papel dos íons metálicos presentes nessas macromoléculas, bem como as vias mecanísticas pelas quais a clivagem dos ésteres fosfóricos se processam.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS

Os seguintes reagentes, materiais, gases e solventes empregados nas sínteses e análises, foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem ou com purificação prévia, como relacionado no Quadro 1.

Quadro 1 – Materiais, reagentes e solventes utilizados nas sínteses e análises

Materiais/Reagentes/Solventes	Pureza/Processo de Purificação	Marca
1,2-etanodiamina (C ₂ H ₈ N ₂)	Destilado sob pressão reduzida (~80 mmHg – 87 °C)	Sigma-Aldrich
1,4-dioxano (C ₄ H ₈ O ₂)		Sigma-Aldrich
2-(2-aminoetil)piridina (C ₇ H ₁₀ N ₂)	Destilado sob pressão reduzida (~12 mmHg – 92 °C)	Sigma-Aldrich
2-(2-aminometil)piridina (C ₆ H ₈ N ₂)	Destilado sob pressão reduzida (~12 mmHg – 82 °C)	Sigma-Aldrich
2,6-lutidina (C ₇ H ₉ N)	Destilado sob pressão reduzida (~80 mmHg – 74 °C)	Sigma-Aldrich
2-piridilcarboxialdeído (C ₆ H ₅ NO)	Destilado sob pressão reduzida (~80 mmHg – 105,9 °C)	Sigma-Aldrich
4-metilpiridina (C ₆ H ₇ N)	Destilado sob pressão reduzida (~80 mmHg – 70 °C)	Sigma-Aldrich
Acetanilida (C ₈ H ₉ NO)	98,00%	Sigma-Aldrich
Acetato de sódio (CH ₃ COOH)	99,80%	AppliChem
Acetona (C ₃ H ₆ O)	99,50%	Vetec
Acetonitrila (CH ₃ CN)	99,80%	Vetec
Acetonitrila UV/HPLC	99,90%	Tedia
Ácido clorídrico (HCl)	37,00%	Vetec
Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	98,00%	Vetec
Água deuterada (D ₂ O)	99,80%	Acros
Argônio	5.0 Analítico	White Martins
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	99,70%	Sigma-Aldrich
Borohidreto de sódio (NaBH ₄)	99,00%	Sigma-Aldrich
Brometo de potássio (KBr)	99,00%	Sigma-Aldrich
Carbonato de potássio (K ₂ CO ₃)	99,00%	Vetec
Catalisador Pd/C 5%		Sigma-Aldrich
Cianoborohidreto de sódio (NaCNBH ₃)	99,00%	Sigma-Aldrich
Cloreto de potássio (KCl)	99,00%	Sigma-Aldrich
Clorofórmio deuterado (CDCl ₃)	99,00%	Sigma-Aldrich
Clorofórmio (CHCl ₃)	99,80%	Vetec
Clorofórmio UV/HPLC	99,90%	Vetec
Dicloreto de (1,5-ciclooctadieno)paládio(II) (C ₈ H ₁₂ Cl ₂ Pd)	99,00%	Sigma-Aldrich

Diclorometano (CH ₂ Cl ₂)	99,50%	Vetec
Dimetilformamida (DMF/C ₃ H ₇ NO)	99,50%	Merck
Dimetilsulfóxido (DMSO/C ₂ H ₆ OS)	99,90%	Vetec
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	98,00%	Vetec
Éter etílico (C ₄ H ₁₀ O)	99,00%	Vetec
Glicerina	99,50%	Vetec
Hexano (C ₆ H ₁₄)	95,00%	Lafan
Hidróxido de amônio (NH ₄ OH)		Vetec
Hidróxido de sódio (NaOH)	99,50%	Vetec
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	99,50%	Lafan
Metabissulfito de sódio (Na ₂ S ₂ O ₅)	99,00%	Vetec
Metanol (CH ₃ OH)	99,80%	Neon
Metanol UV/HPLC	99,90%	J.T. Baker
Óxido de trifetilfosfina (C ₁₈ H ₁₅ OP)	99,00%	Sigma-Aldrich
Perclorato de ferro(III) nonahidratado (Fe(ClO ₄) ₃ ·9H ₂ O)	99,00%	Acros
Perclorato de sódio (NaClO ₄)	99,00%	Acros
Perclorato de zinco(II) hexahidratado (Zn(ClO ₄) ₂ ·6H ₂ O)	98,00%	Sigma-Aldrich
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	99,00%	Vetec
Sulfato de sódio anidro (Na ₂ SO ₄)	99,00%	Lafan
Tampão biológico CHES	99,50%	Acros
Tampão biológico HEPES	99,00%	Sigma-Aldrich
Tampão biológico MES	99,00%	Acros
Tolueno (C ₇ H ₈)	99,50%	Vetec
Trietilamina (C ₆ H ₁₅ N)	Destilado sob pressão reduzida (~80 mmHg – 70 °C)	Vetec
Zinco metálico em pó		Vetec

Fonte: O autor.

3.2 MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

3.2.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros eletrônicos vibracionais na região do infravermelho (IV) dos ligantes precursores, do ligante final e dos complexos sintetizados foram obtidos em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier e com acessório de Reflectância Total Atenuada horizontal (FTIR-ATR) Perkin Elmer (modelo Spectrum 100), com cristal de ZnSe (45°) e um detector TGS (sulfato de triglicina) no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia da UFSC. As amostras foram analisadas à 25 °C, com 18 varreduras no intervalo de 4000-450 cm⁻¹ e resolução de 4 cm⁻¹. As medidas foram corrigidas pelo espectro do branco (análise sem amostra sob o cristal).

3.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C dos precursores e dos ligantes sintetizados foram obtidos em espectrômetros Bruker (modelos Avance 200 e 400) de 200 e 400 MHz na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3), utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) de hidrogênio estão relacionados em parte por milhão (ppm) em relação ao TMS ($\delta = 0$ ppm). Os gráficos de RMN de ^1H apresentam número de átomos de hidrogênio deduzidos da integral relativa. Os deslocamentos químicos estão expressos ainda, em relação ao sinal central do CDCl_3 (77,36 ppm), no caso do espectro de carbono.

3.2.3 Análise elementar de C, H e N

As medidas para a determinação dos percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio para os ligantes e complexos sintetizados foram realizadas em um analisador elementar de C, H, N e S PerkinElmer (modelo 2400) usando uma balança PerkinElmer (modelo AD-4 Autobalance) e cápsula de estanho, na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. A acetanilida ($\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}$) foi utilizada como referência para calibração.

3.2.4 Espectrometria de massas

Os espectros de massa dos ligantes e dos complexos sintetizados foram obtidos em um equipamento Bruker (modelo micrOTOF Q-II) equipado com uma seringa automática (modelo KD Scientific) para injeção de amostra, no Centro de Biologia Molecular Estrutural da UFSC. As análises foram realizadas em alta resolução e no modo de ionização positiva a partir de soluções dos ligantes em CH_3OH e dos complexos em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{água}$ (1/1; v/v) com concentração de aproximadamente 500 ppb. As amostras foram injetadas com fluxo constante de $3 \mu\text{L min}^{-1}$ com temperatura do capilar mantida entre 180 e 200 °C e voltagem entre -400 e -500 V. A faixa de varredura foi em relação m/z de 100 a 2000. As simulações dos espectros foram calculadas utilizando o programa Mmass (STROHALM *et al.*, 2010).

3.2.5 Espectroscopia na região do ultravioleta e visível

Os espectros de absorção eletrônica na região do ultravioleta e visível dos ligantes e dos complexos sintetizados foram obtidos em um espectrofotômetro PerkinElmer (modelo Lambda 750) no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia da UFSC. As análises foram realizadas com faixa de varredura de 200-800 nm, à $25 \pm 1,0$ °C e em cubeta de quartzo com capacidade de 1 mL e caminho óptico de 1 cm. As análises em solução foram realizadas utilizando-se CH_3CN e $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1; v/v) para obter os valores de ϵ em $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.2.6 Titulação espectrofotométrica e potenciométrica

As constantes de protonação ($\text{p}K_a$) para os complexos (1), (2) e (3) foram investigadas usando um titulador automático Titrino plus Methron 848 equipado com um eletrodo combinado (Ag/AgCl), calibrado para ler $-\log[\text{H}^+]$ diretamente e designado como pH. Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada na presença de KMnO_4 , fervida e sob atmosfera de argônio pré-purgado em solução de KOH 0,100 mol L^{-1} .

O eletrodo foi calibrado usando os dados obtidos da titulação de um volume conhecido de uma solução aquosa padrão de HCl 0,0100 mol L^{-1} com uma solução aquosa padrão de KOH 0,100 mol L^{-1} isenta de carbonatos. Cada titulação foi realizada em uma cela termoequilibrada a $25,00 \pm 0,1$ °C, controlada por um banho da Microquímica Ind. Com. Ltda. As experiências foram realizadas com 50 mL de uma solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1; v/v) e $\text{p}K_w = -15,40$ (HERRADOR; GONZÁLEZ, 2002), contendo 0,025 mmol do complexo. A força iônica foi ajustada com KCl à 0,100 mol L^{-1} e o sistema foi titulado com KOH 0,100 mol L^{-1} na faixa de pH de 2,5-12,0 através da adição de alíquotas de 0,025 mL de base. Os experimentos foram realizados em triplicatas e a análise dos dados foi realizada usando o programa BEST7 (ARTHUR E. MARTELL, RAMUNAS J. MOTEKAITIS, 1992). Os diagramas das espécies foram obtidos com os programas SPE (ARTHUR E. MARTELL, RAMUNAS J. MOTEKAITIS, 1992) e SPEPLOT (ARTHUR E. MARTELL, RAMUNAS J. MOTEKAITIS, 1992).

Para o complexo (4), os valores de $\text{p}K_a$ foram determinados por titulação espectrofotométrica no Laboratório de Química Bioinorgânica e Cristalografia da UFSC. Os experimentos foram realizados em solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1; v/v) e $\text{p}K_w = -15,40$ (HERRADOR; GONZÁLEZ, 2002). Cada titulação foi realizada em uma cela

termoestabilizada a $25,00 \pm 0,1$ °C, controlada por um banho da Microquímica Ind. Com. Ltda. As medidas foram feitas em um volume de solução final de 25 mL com aproximadamente 4×10^{-5} mol dos compostos presentes. A força iônica foi ajustada com KCl à $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ e o sistema foi titulado com KOH $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ na faixa de pH de 3,5-10,0. Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e fervida e sob atmosfera de argônio pré-purgado em solução de KOH. As adições de base foram feitas de forma manual e as medidas de pH foram realizadas com um medidor de pH Oakton (modelo pH2700). Alíquotas de aproximadamente 500 μL foram removidas a cada ponto e o espectro na região do ultravioleta e visível foi obtido em um espectrofotômetro PerkinElmer (modelo Lambda 750) no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia da UFSC. Após as leituras, as alíquotas foram devolvidas para a solução que estava sendo titulada. As curvas foram ajustas com uma curva sigmoide e os valores de pK_a foram obtidos a partir do ponto de inflexão.

3.2.7 Condutimetria

As medidas condutimétricas dos complexos foram realizadas no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia da UFSC. Foram preparadas soluções dos complexos com concentrações de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A calibração do equipamento foi realizada com uma solução padrão de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ cuja condutividade é de $100 \mu\text{S cm}^{-1}$ em água a 25 °C. Os valores para sistemas não aquosos foram ajustados segundo a literatura (GEARY, 1971).

3.2.8 Cristalografia de raios X

A análise de difração de raios X de monocristal do complexo (4) foi realizada pelo Prof. Dr. Adailton João Bortoluzzi na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. A coleta dos dados foi realizada em um difratômetro Bruker (modelo KAPPA APEX II DUO) equipado com um tubo de molibdênio ($\text{MoK}\alpha \lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite. A temperatura da amostra foi ajustada à $150 \pm 2 \text{ K}$ com um soprador Oxford Cryosystems (modelo Cryostream 700). Os cristais do complexo (4) apresentaram baixo poder de difração, sendo as medidas registradas em varreduras φ e ω com 30 segundos de exposição por reflexão, utilizando o software APEX2, e com uma resolução máxima de $0,83 \text{ \AA}$. Um total de 1420 reflexões foram coletados e corrigidos por Lorentz e efeitos de polarização e por absorção utilizando método semi-empírico multi-scan SADABS (BRUKER, [S.d.]). A

estrutura foi resolvida por métodos diretos e refinada aplicando o método dos mínimos quadrados utilizando matriz completa através dos softwares SHELXS e SHELXL2014, respectivamente (SHELDRICK, 2015). Todos os átomos não-hidrogênios foram refinados com parâmetros de deslocamento anisotrópico, exceto para o tolueno. Átomos de hidrogênio ligados à átomos de carbono foram posicionados em suas posições idealizadas com distâncias e valores de Uiso a partir dos padrões de refinamento do programa. Átomos de hidrogênio de aminas e grupos hidroxilo foram localizados a partir do mapa de densidade eletrônica de Fourier. Átomos de hidrogênio de grupos amina e hidroxilo foram obtidos a partir do mapa diferencial de Fourier. Vários átomos residuais de acetonitrila, água solvatada e contra íons perclorato têm valores anormais de adp. Entretanto esses átomos foram refinados anisotropicamente com tensor definido positivo, gerando vários alertas no relatório *checkcif*.

3.2.9 Eletroquímica

O comportamento redox dos complexos foi investigado por voltametria de onda quadrada em um potenciostato-galvanostato Basi Bioanalytical Systems, Inc. (modelo Epsilon) no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia da UFSC. Os experimentos foram realizados com soluções dos complexos $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em CH₃CN, contendo hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (0,1 mol L⁻¹) como eletrólito suporte, sob atmosfera de argônio. A cela eletroquímica foi composta por três eletrodos: eletrodo de trabalho – carbono vítreo; eletrodo auxiliar – fio de platina; eletrodo de referência – Ag/AgCl. Para correção do eletrodo de referência, utilizou-se o ferroceno ($E_{1/2}$ vs NHE = 400 mV) como padrão interno (GAGNE; KOVAL; LISENSKY, 1980).

3.2.10 Estudos de reatividade

A atividade de diesterase e monoesterase dos complexos foi determinada usando o substrato ativado bis-(2,4-dinitrofenil)-fosfato de piridínio (2,4-BDNPP) e o 2,4-dinitrofenil-fosfato de lutidínio (2,4-DNPP), respectivamente, a partir da liberação do ânion 2,4-dinitrofenolato (2,4-DNP), como produto da reação de hidrólise. Os substratos ativados 2,4-BDNPP e 2,4-DNPP foram sintetizados e obtidos como sais piridínio (BUNTON; FARBER, 1969) e lutidínio (RAWJI; MILBURN, 1981), respectivamente. Os estudos de reatividade para a hidrólise dos fosfatos foram realizados em um espectrofotômetro UV/Vis Varian Cary Bio

50) acoplado a um banho termoequilibrado, no Laboratório de Química Bioinorgânica e Cristalografia da UFSC.

A variação de absorvância ocorrida em 400 nm, está relacionada à liberação do ânion 2,4-DNP, como produto da reação de hidrólise (BATISTA *et al.*, 2003). As reações foram monitoradas até 5% de conversão de substrato a produto e os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais (PISZKIEWICZ, 1977). As velocidades iniciais foram obtidas do gráfico da absorvância do 2,4-DNP liberado em função do tempo e calculadas via seu coeficiente de absorção, a partir dos valores da inclinação da curva da absorvância *versus* tempo para os primeiros 10 minutos de reação. Em todos os experimentos cinéticos a correção da hidrólise espontânea do substrato foi realizada através da diferença direta, ou seja, experimentos em condições idênticas exceto pela ausência do complexo foram acompanhados em paralelo, e a constante da reação não catalisada descontada da constante total da reação.

Os estudos em função do pH para a atividade de hidrólise dos complexos, os quais visam a obtenção do pH ótimo de atividade frente à hidrólise do substrato (2,4-BDNPP) e os pK_a cinéticos para cada complexo, foram realizados em uma faixa de pH entre 4,0 e 10,5 a 25 °C. Utilizaram-se cubetas de vidro óptico com capacidade para 2000 μL e caminho óptico de 1 cm, fechadas com tampa de teflon. As reações foram efetuadas em soluções $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1; v/v) nas seguintes condições: 750 μL de solução tampão aquosa recentemente preparada ($[\text{tampão}]_{\text{final}} = 5,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) a partir dos tampões (i) ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico monohidratado (MES; pH 4,0 – 6,5), (ii) Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanossulfônico (HEPES; pH 7,0 – 8,5) e (iii) Ácido N-Ciclohexil-2-aminoetanossulfônico (CHES; pH 9,0 – 10,0) com força iônica mantida constante ($I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, LiClO_4), 100 μL de uma solução em CH_3CN de complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), 550 μL de CH_3CN . A reação foi iniciada com a adição de 100 μL de uma solução em CH_3CN do substrato 2,4-BDNPP ($[\text{2,4-BDNPP}]_{\text{final}} = 1,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Os coeficientes de absorção molar do produto de reação (2,4-DNP) foram determinados em cada pH sob as mesmas condições experimentais das medições de reatividade em diferentes pH ($\lambda = 400 \text{ nm}/\epsilon, \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (3,5/2.125; 4,0/3.410; 4,5/7.180; 5,0/10.080; 5,5/11.400; 6,0/12.000; 6,5-10,0/12.100) (PERALTA *et al.*, 2010).

Os experimentos cinéticos em função da variação da concentração de substrato foram realizados de 25 a 50 °C e como descrito a seguir: 750 μL de solução tampão aquosa recentemente preparada (pH 5,0 – 9,0; $[\text{tampão}]_{\text{final}} = 5,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), 600 - 0 μL de CH_3CN e 100 μL de uma solução em CH_3CN de complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), foram

adicionadas em cubetas de vidro óptico com capacidade para 2000 μL e caminho óptico de 1 cm, fechadas com tampa de teflon. A reação foi iniciada com a adição de uma solução em CH_3CN do substrato 2,4-BDNPP ($[\text{2,4-BDNPP}]_{\text{final}} = 6,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $7,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). O tratamento matemático utilizado para a obtenção dos parâmetros cinéticos foi o método não-linear de Michaelis-Menten (PISZKIEWICZ, 1977).

A determinação do número de moléculas de substrato hidrolisadas por molécula de complexo foi realizada pelo acompanhamento espectrofotométrico em 445 nm ($\epsilon = 3600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) na condição de 50 vezes de excesso do substrato ($[\text{2,4-BDNPP}]_{\text{final}} = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em relação ao complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), em pH 7,0 e 25 °C. Realizou-se também o acompanhamento da reação estequiométrica em 400 nm entre o complexo e o substrato ($[\text{C}]_{\text{final}} = [\text{S}]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) durante 50 horas a 50 °C e pH 7,0.

O estudo do efeito isotópico de deutério na hidrólise do 2,4-BDNPP foi realizado pelo acompanhamento de duas reações paralelas (como descrito no efeito de pH) onde as soluções tampões HEPES pH e pD 7,0 ($\text{pD} = \text{leitura do medidor de pH} + (4,29 \times 10^2 / ^\circ\text{T}) - 1,04$) (FIFE; BRUICE, 1961) foram previamente preparadas em H_2O e D_2O , respectivamente.

O experimento cinético para avaliar a atividade de monoesterase foi monitorado em pH 7,0 (mesmas condições experimentais do estudo de efeito de pH). A reação foi iniciada com a adição de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 equivalentes do substrato ativado 2,4-DNPP e realizada a leitura de absorbância após cada adição. Após a última adição, a reação foi mantida por um período de 5 h (com leituras a cada 60 minutos). Terminado esse período, 4 equivalentes do substrato 2,4-BDNPP foram adicionados à mistura reacional e a reação foi acompanhada em um período de 1 h.

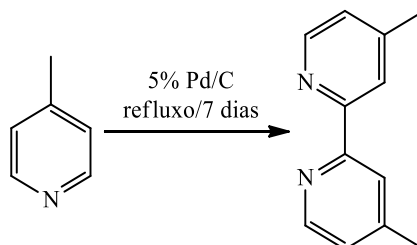
3.3 SÍNTESE DO LIGANTE E SEUS PRECURSORES

A seguir apresentam-se as rotas sintéticas utilizadas para a síntese dos ligantes utilizados neste trabalho. O ligante $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$ foi sintetizado pela Dra. Graciela Aparecida dos Santos Silva em sua tese de doutorado e utilizado em conjunto neste trabalho (SILVA, 2017). O ligante 2-bis[$\{(2\text{-piridilmetil})\text{aminometil}\}$]-6- $\{(2\text{-hidroxibenzil})(2\text{-piridilmetil})\}$ aminometil]-4-metil-fenol ($\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$) foi sintetizado conforme procedimento publicado na literatura (PIOVEZAN *et al.*, 2010).

3.3.1 Síntese dos precursores

3.3.1.1 Síntese da 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (bipy)

Esquema 1 – Esquema de síntese da 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (bipy)



Fonte: O autor.

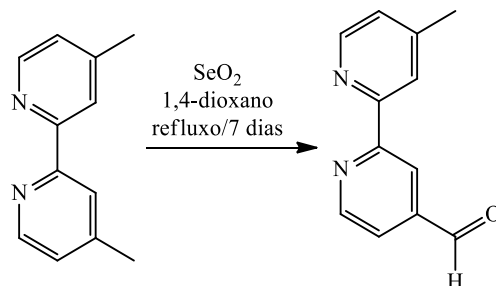
Em um balão de fundo redondo de 500 mL, 209 mL (215 mmol; $93,13 \text{ g mol}^{-1}$; $0,957 \text{ g cm}^{-3}$) de 4-metilpiridina (previamente destilada) e 4,0 g de catalisador Pd/C (5%, m/m) foram misturados e mantidos sob refluxo a $140 \text{ }^\circ\text{C}$ por 7 dias. Em seguida, a mistura reacional foi filtrada à vácuo, a fim de remover o catalisador. O filtrado foi evaporado até secar em um evaporador rotativo, obtendo-se um sólido amarelo pálido (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina). O residual coletado (4-metilpiridina) pode ser reacondicionado em um frasco para posterior purificação por destilação e reuso. Após 10 dias de recristalização em acetato de etila, 13,7 g ($74,4 \text{ mmol}$; $184,24 \text{ g mol}^{-1}$) do produto (Esquema 1) foram obtidos como cristais incolores (WU *et al.*, 2008). Rendimento: 7,5% em relação à 4-metilpiridina.

IV (ATR) em cm^{-1} : $\nu (\text{C-H})_{\text{ar}}$ e $(\text{C-H})_{\text{alif}}$ 3069-2851; $\nu (\text{C=N})$ e (C=C) 1600-1370; $\delta (\text{CH})_3$ as 1458; $\delta (\text{C-H})_{\text{ar}}$ 826; $\delta (\text{C=C})$ 670.

RMN de ^1H , δ/H (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,40 (s, 6 H, CH_3); 7,10 (d, 2 H, CH_{ar}); 8,20 (s, 2 H, CH_{ar}); 8,51 (d, 2 H, CH_{ar}).

3.3.1.2 Síntese da 4-metil-2,2'-bipiridina-4-carboxialdeído (bipyCHO)

Esquema 2 – Esquema de síntese da 4-metil-2,2'-bipiridina-4-carboxialdeído (bipyCHO)



Fonte: O autor.

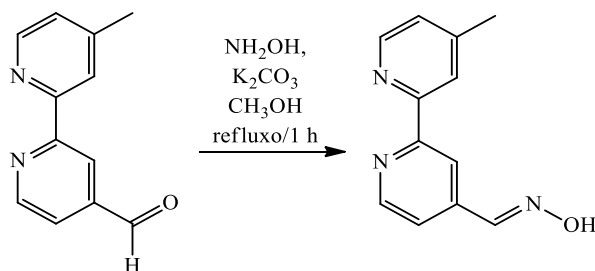
Em um balão de fundo redondo de 500 mL, 7,21 g (65 mmol; 110,96 g mol⁻¹) de SeO₂ foram misturados em 50 mL de 1,4-dioxano. À essa mistura, foram adicionados 9,21 g (50 mmol; 184,24 g mol⁻¹) de 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina dissolvidos em 200 mL de 1,4-dioxano. A mistura reacional foi mantida em refluxo por 24 h e depois filtrada, enquanto quente, através de uma camada de celite em um filtro de placa porosa. A celite foi lavada com 50 mL de etanol e a fase etanólica foi combinada com o primeiro filtrado. O solvente foi removido por evaporação rotativa. O resíduo foi suspenso em uma solução saturada de NaHCO₃ (50 mL) e extraído com CH₂Cl₂ (5 × 50 mL). As fases orgânicas foram combinadas e adicionado MgSO₄ anidro para secagem do solvente. O produto foi filtrado e o CH₂Cl₂ foi removido por evaporação rotativa. Em um béquer de 200 mL, o resíduo sólido obtido foi suspenso em uma solução aquosa de metabissulfito de sódio 0,3 mol L⁻¹ (100 mL) e agitado por 30 minutos (agitação magnética). O sólido foi filtrado e depois suspenso novamente em 50 mL de solução de metabissulfito de sódio a 0,3 mol L⁻¹. A suspensão foi agitada durante 30 minutos e filtrada. Os filtrados foram combinados e realizada a extração com acetato de etila (2 × 25 mL). Foi adicionado hidrogenocarbonato de sódio sólido (32 g) à fase aquosa e o produto foi extraído com CH₂Cl₂ (20 × 40 mL). O CH₂Cl₂ foi seco com MgSO₄ anidro e removido por evaporação rotativa para obter-se 4,45 g (22,5 mmol; 198,22 g mol⁻¹) de 4-metil-2,2'-bipiridina-4-carboxialdeído (Esquema 2) como um sólido branco (BUSCHE *et al.*, 2010). Rendimento: 45%, em relação à 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina.

IV (ATR) em cm⁻¹: ν (C-H)_{ar} e (C-H)_{alif} 3070-2735; ν (C-H)_{ald} 2729; ν (C=O) 1720; ν (C=N) e (C=C) 1598-1362; δ (CH)_{3 as} 1460; δ (C-H)_{ar} 819 e 749; δ (C=C) 666.

RMN de ^1H , δ/H (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,46 (s, 3 H, CH_3); 7,20 (dd, 1 H, CH_{ar}); 7,71 (dd, 1 H, CH_{ar}); 8,27 (s, 1 H, CH_{ar}); 8,57 (d, 1 H, CH_{ar}); 8,82 (m, 1 H, CH_{ar}); 8,89 (d, 1 H, CH_{ar}); 10,18 (s, 1 H, CH_{ald}).

3.3.1.3 Síntese da 4-metil-2,2'-bipiridina-4-carbaldoxima (bipyNOH)

Esquema 3 – Esquema de síntese da 4-metil-2,2'-bipiridina-4-carbaldoxima (bipyNOH)



Fonte: O autor.

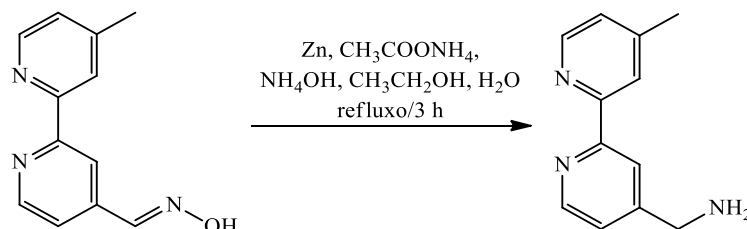
Em um balão de fundo redondo de 250 mL, uma solução aquosa de 4,70 g (67,5 mmol; $69,49 \text{ g mol}^{-1}$) de cloridrato de hidroxilamina e 12,45 g (90,1 mmol; $138,21 \text{ g mol}^{-1}$) de K_2CO_3 em H_2O (30 mL) foram adicionados à uma solução de 4,45 g (22,5 mmol; $198,22 \text{ g mol}^{-1}$) de 4-metil-2,2'-bipiridina-4-carboxaldeído em metanol (30 mL). A mistura reacional foi mantida sob refluxo por 1 hora. Após arrefecimento até temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, a mistura foi vertida em 100 mL de H_2O destilada gelada. Um precipitado branco foi formado, filtrado, lavado com 20 mL de H_2O destilada gelada e seco sob vácuo em um dessecador. Assim, foram obtidos 4,13 g ($19,4 \text{ mmol}$; $213,23 \text{ g mol}^{-1}$) de um sólido branco (Esquema 3) (BUSCHE *et al.*, 2010). Rendimento: 86%, em relação ao 4-metil-2,2'-bipiridina-4-carboxaldeído.

IV (ATR) em cm^{-1} : ν (O-H) 3160; ν (C-H) $_{\text{ar}}$ e (C-H) $_{\text{alif}}$ 3075-2747; ν (C=N) $_{\text{oxima}}$ 1598; ν (C=N) e (C=C) 1606-1370; δ (CH) $_3$ as 1464; ν (N-O) 977; δ (C-H) $_{\text{ar}}$ 824 e 749; δ (C=C) 665.

RMN de ^1H , δ/H (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,46 (s, 3 H, CH_3); 7,20 (m, 1 H, CH_{ar}); 7,41 (dd, 1 H, CH_{ar}); 8,20 (s, 1 H, CH_{ar}); 8,54 (d, 1 H, CH_{ar}); 8,71 (m, 1 H, CH_{ar}); 8,75 (m, 1 H, CH_{ar}); 11,51 ppm (s, 1 H, CH_{oxima}).

3.3.1.4 Síntese da 4-metil-4'-aminometil-2,2'-bipiridina (bipyNH₂)

Esquema 4 – Esquema de síntese da 4-metil-4'-aminometil-2,2'-bipiridina (bipyNH₂)



Fonte: O autor.

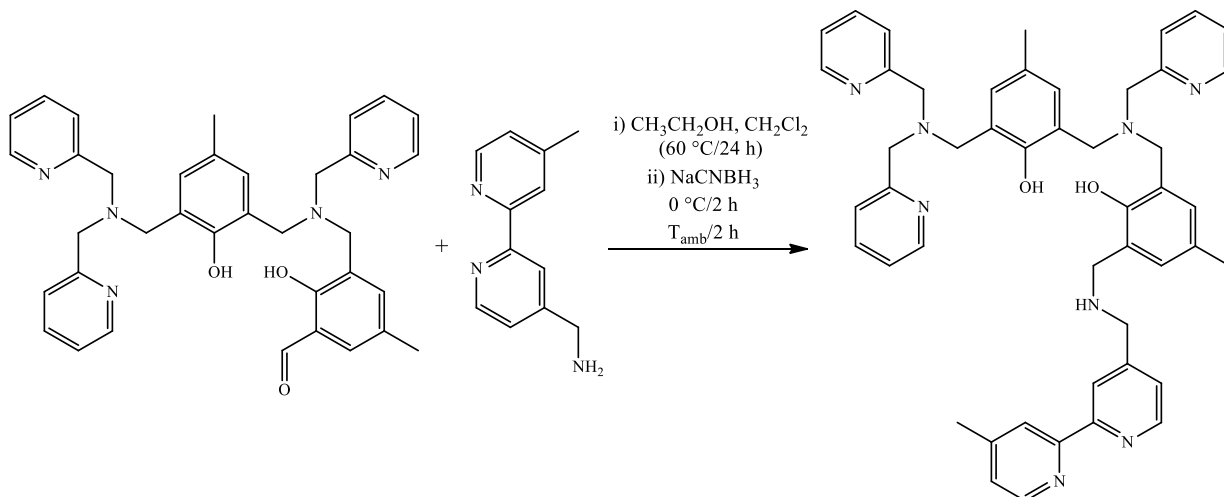
Em um balão de fundo redondo de 250 mL, uma mistura contendo 4,13 g (19,4 mmol; 213,23 g mol⁻¹) de 4-metil-2,2'-bipiridina-4-carbaldoxima, 3,74 g (52 mmol; 72,08 g mol⁻¹) de acetato de amônio, 60 mL de NH₄OH, 40 mL de etanol e 40 mL de água destilada foi mantida sob refluxo por 1 hora. Após esse período, adicionou-se zinco em pó (6,34 g; 97 mmol; 65,38 g mol⁻¹) em pequenas alíquotas e em um período de 30 min. Em seguida, a mistura reacional foi mantida sob refluxo por 3 horas, arrefecida à 25 °C e filtrada para remover o resíduo de zinco. O etanol da mistura reacional foi removido em evaporador rotativo resultando em uma mistura aquosa no balão. Foi adicionado NaOH (13,6 g) para formar um precipitado branco que mudou para uma mistura ligeiramente turva. A mistura foi extraída com CH₂Cl₂ (3 × 100 mL). Após secagem do solvente com MgSO₄ anidro, o mesmo foi removido em evaporação rotativa para obter-se 3,1 g do produto (Esquema 4) como um sólido branco (199,25 g mol⁻¹) (FANG *et al.*, 2013). Rendimento: 75%, em relação à 4-metil-2,2'-bipiridina-4-carbaldoxima.

IV (ATR) em cm⁻¹: ν (N-H) 3356; ν (C-H)_{ar} e (C-H)_{alif} 3187-2850; δ (N-H) 1593; ν (C=N) e (C=C) 1545-1360; δ (CH)_{3 as} 1461; ν (C-N) 999; δ (C-H)_{ar} 824 e 749; δ (C=C) 668.

RMN de ¹H, δ /H (200 MHz; CDCl₃), em ppm: 2,43 (s, 3 H, CH₃); 3,97 (s, 2 H, CH₂); 7,13 (d, 1 H, CH_{ar}); 7,28 (d, 1 H, CH_{ar}); 8,23 (s, 1 H, CH_{ar}); 8,33 (s, 1 H, CH_{ar}); 8,52 (s, 1 H, CH_{ar}); 8,60 (d, 1 H, CH_{ar}).

3.3.2 Síntese do ligante 2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-((4'-metil-[2,2'-bipiridin]-4-il)metil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol - H₂L_{bipy}

Esquema 5 – Esquema de síntese do ligante H₂L_{bipy}



Fonte: O autor.

Em um balão de fundo redondo de 250 mL, 1,17 g (2,0 mmol; 587,74 g mol⁻¹) do ligante H₂py₃mff (PIOVEZAN *et al.*, 2010) foram dissolvidos em 60 mL de etanol. Na etapa seguinte, 60 mL de uma solução com 40 mL de etanol e 40 mL de CH₂Cl₂ contendo 0,40 g de 4-metil-4'-aminometil-2,2'-bipiridina (2,0 mmol; 199,25 g mol⁻¹) foram adicionados lentamente com o auxílio de um funil de adição. A mistura reacional foi mantida à 60 °C durante 24 h (sistema de refluxo). Subsequentemente, a mistura foi resfriada a 0 °C em um banho de gelo e pequenas porções de NaCNBH₃ (0,13 g; 2,0 mmol; 62,84 g mol⁻¹) foram adicionadas diretamente à mistura reacional e sob agitação constante. A solução foi agitada por mais 2 h em banho de gelo e 2 h em temperatura ambiente (25 °C), durante as quais foi observado a descoloração amarelada da mistura reacional. Uma solução de HCl de concentração 6,0 mol L⁻¹ foi então adicionada em pequenas porções para ajustar o pH a 6,0, e o solvente foi removido por evaporação rotativa. Ao óleo resultante foram adicionados 80 mL de CH₂Cl₂ e a solução foi extraída com solução aquosa saturada de NaHCO₃ (5 × 30 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi removido em evaporação rotativa. Como resultado (Esquema 5), foram obtidos 1,36 g de uma espuma amarela clara (1,76 mmol; 770,41 g mol⁻¹). Rendimento: 88%, em relação ao ligante H₂py₃mff.

IV (ATR) em cm^{-1} : ν (C-H)_{ar} 3059-2714; δ (N-H) 1595; ν (C=N; C=C) 1566-1372; δ (CH)₃ as 1467; δ (O-H)_{fenol} 1370; ν (C-O)_{fenol} 1232; ν (C-N) 995; δ (C-H)_{ar} 860-820; δ (C-H)_{ar} 754.

RMN de ^1H , δ/H (400 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,17 (s, 3 H, CH_3); 2,21 (s, 3 H, CH_3); 2,41 (s, 3 H, CH_3); 3,80 (m, 16 H, CH_2); 6,85 (m, 4 H, CH_{ar}); 7,10 (m, 4 H, CH_{ar}); 7,35 (m, 3 H, CH_{ar}); 7,55 (m, 4 H, CH_{ar}); 8,20 (s, 1 H, CH_{ar}); 8,28 (s, 1 H, CH_{ar}); 8,52 (m, 5 H, CH_{ar}).

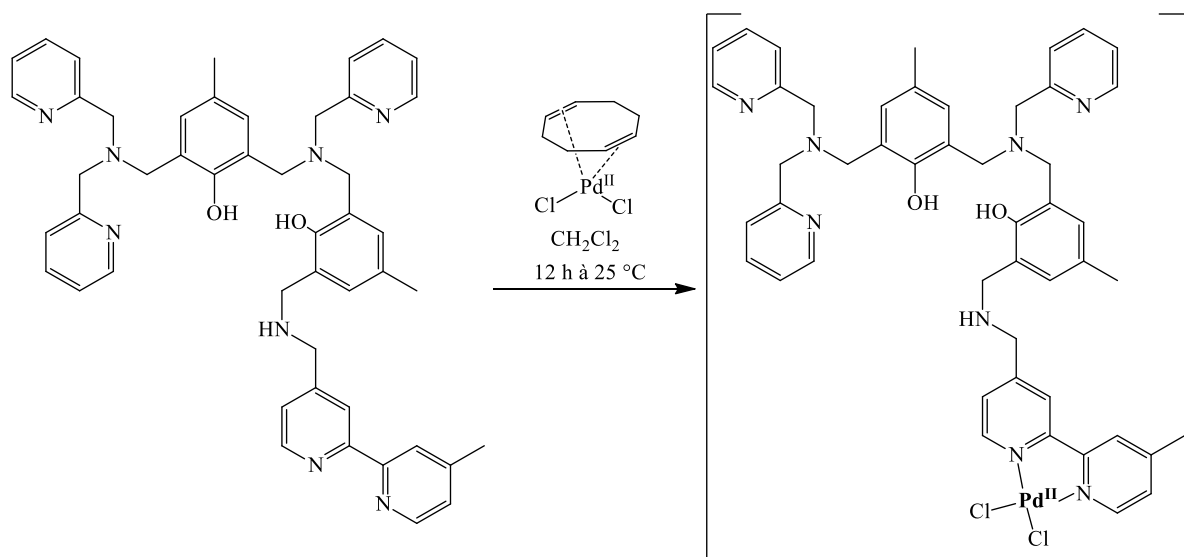
RMN de ^{13}C , δ/C (100 MHz; CDCl_3), em ppm: 20,43; 21,16; 49,39; 51,71; 53,69; 56,37; 56,84; 59,21; 59,36; 120,72; 121,96; 122,00; 122,10; 122,58; 122,90; 123,06; 123,11; 123,32; 123,42; 124,42; 127,32; 127,59; 129,41; 129,69; 130,31; 131,17; 136,36; 136,65; 148,00; 148,72; 148,84; 148,91; 149,16; 153,71; 153,96; 155,93; 156,18; 158,26; 158,40; 158,49.

% CHN calculado para $(\text{C}_{48}\text{H}_{50}\text{N}_8\text{O}_2)$ ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$): C, 73,50; H, 6,91; N, 13,71. Encontrado: C, 73,43; H, 6,60; N, 12,76.

3.4 SÍNTESE DOS COMPLEXOS

3.4.1 Síntese do complexo $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}})](\text{Cl})_2$ – (1)

Esquema 6 – Esquema de síntese do complexo (1)



Fonte: O autor.

O complexo (1) (Esquema 6) foi sintetizado com pequenas modificações em relação ao trabalho publicado por (YANG, F.; FANWICK; KUBIAK, 1999). Em um frasco Schlenk de 100 mL, 0,68 g (1 mmol; $770,41 \text{ g mol}^{-1}$) de $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$ foram dissolvidos em 10 mL de CH_2Cl_2 seco em peneira molecular. Esta solução foi desgaseificada em pressão e temperatura reduzidas.

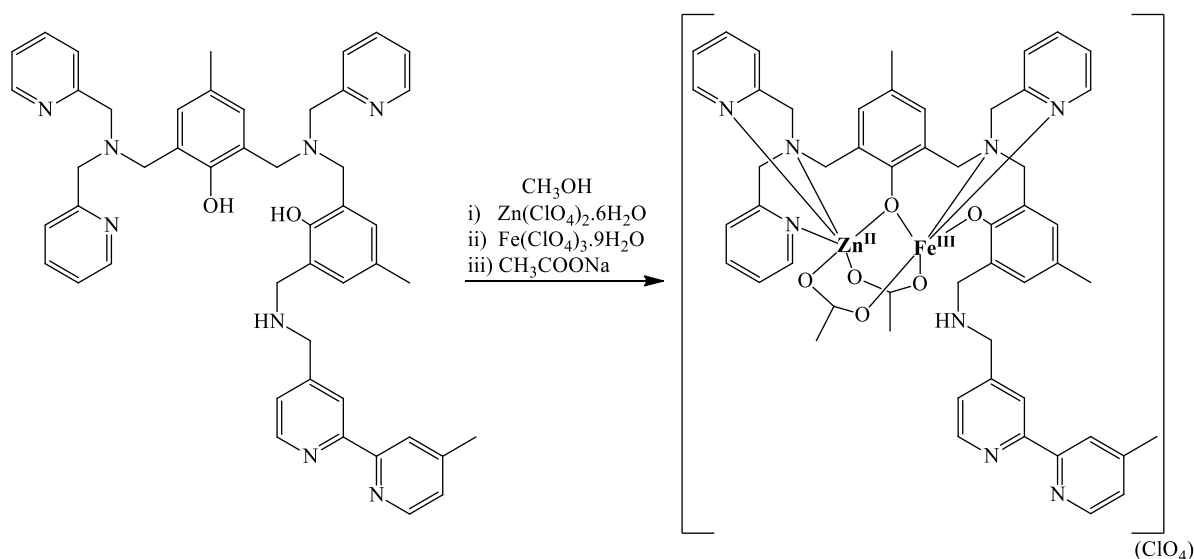
Na solução congelada, foram adicionados 0,29 g (1 mmol; 285,51 g mol⁻¹) de dicloreto de (1,5-ciclooctadieno)paládio(II) e a mistura foi agitada em temperatura de 25 °C e sob atmosfera de nitrogênio por 12 h. Em seguida, o solvente foi removido em evaporador rotativo e o sólido resultante foi lavado com hexano e éter dietílico e seco sob pressão reduzida para obter-se um sólido amarelo (0,48 g; 0,51 mmol; 948,29 g mol⁻¹. Rendimento: 60%, em relação ao ligante H₂py₃mf.

IV (ATR) em cm⁻¹: ν (O-H), ν (N-H) e ν (H₂O) 3364; ν (C-H)_{ar} e (C-H)_{alif} 3050-2821; δ (N-H)_{sec} 1609; ν (C=N) e (C=C) 1595-1377; δ (O-H)_{fenol} 1372; ν (C-O)_{fenol} 1232; ν (C-N) 997; δ (C-H)_{ar} 854-758.

% CHN calculado para [H₂L_{bipy}Pd^{II}Cl₂](C₈H₁₂)(CH₃OH)(CH₂Cl₂): C, 59,37; H, 5,84; N, 9,55. Encontrado: C, 60,08; H, 6,01; N, 9,53

3.4.2 Síntese do complexo [Fe^{III}(μ-OAc)₂Zn^{II}(L_{bipy})](ClO₄)₂ – (2)

Esquema 7 – Esquema de síntese do complexo (2)



Fonte: O autor.

O complexo (2) (Esquema 7) foi sintetizado de modo similar à trabalhos anteriores do grupo (BATISTA *et al.*, 2003; HORN *et al.*, 2005; NEVES *et al.*, 1995). Em um béquer de 150 mL e sob agitação magnética, 0,280 g (0,5 mmol; 559,80 g mol⁻¹) do ligante H₂L_{bipy} foram dissolvidos em 30 mL de metanol e à esta solução adicionaram-se 0,186 g (0,5 mmol; 372,36 g mol⁻¹) de Zn(ClO₄)₂·6H₂O. Após 20 minutos, 50 mL de uma solução metanólica contendo 0,260 g (0,5 mmol; 516,20 g mol⁻¹) de Fe(ClO₄)₃·9H₂O foram gotejados lentamente e então a

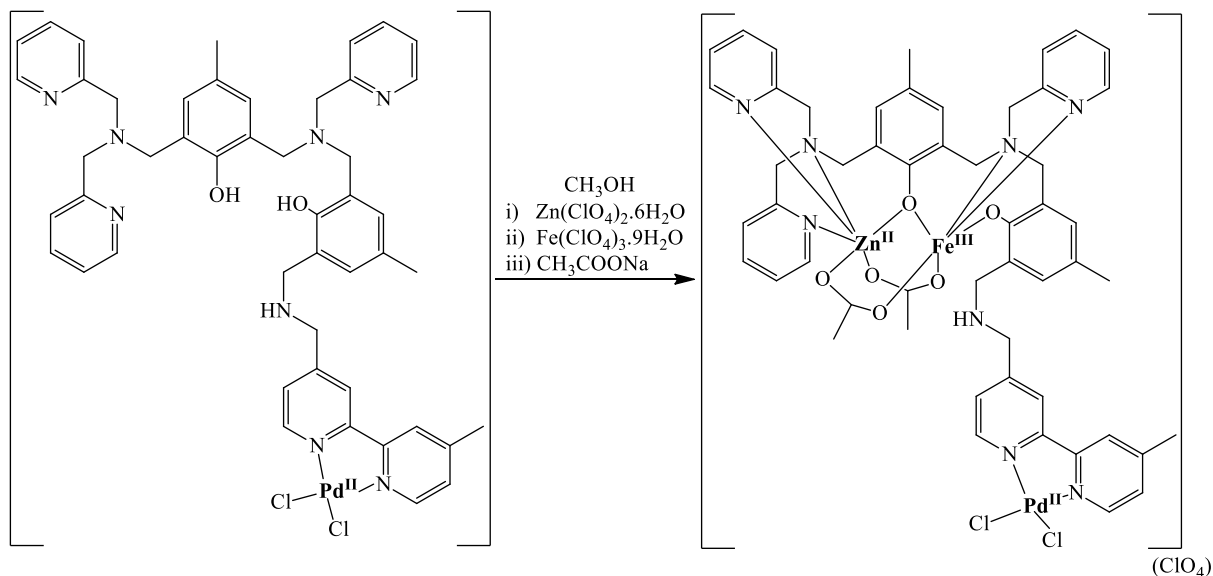
solução tornou-se intensamente púrpura. Por fim, foram adicionados 0,164 g (2,0 mmol; 82,03 g mol⁻¹) de acetato de sódio. A agitação foi mantida por mais 10 minutos e então, a solução foi filtrada e deixada em repouso. Após evaporação do solvente, um precipitado de coloração roxa foi obtido, filtrado e lavado com água deionizada, CH₂Cl₂ e éter etílico gelados. Rendimento: 50%, em relação ao ligante H₂L_{bipy}.

IV (ATR) em cm⁻¹: ν (O-H), ν (N-H) e ν (H₂O) 3558; ν (C-H)_{ar} e (C-H)_{alif} 3092-2855; δ (N-H)_{sec} 1604; ν (C=N) e (C=C) 1563-1429; ν (O-C-O)_{ass} 1575; ν (O-C-O)_{sim} 1473; ν (C-O)_{fenol} 1257; ν (Cl-O) 1088 e 625; δ (C-H)_{ar} 864-752.

% CHN calculado para [Fe^{III}(μ-OAc)₂Zn^{II}L_{bipy}](ClO₄)·(CH₂Cl₂)₃·(H₂O)₂: C, 47,17; H, 4,75; N, 8,00. Encontrado: C, 47,06; H, 4,49; N, 8,31.

3.4.3 Síntese do complexo [Fe^{III}(μ-OAc)₂Zn^{II}(L_{bipy})Pd^{II}Cl₂](ClO₄)₂ – (3)

Esquema 8 – Esquema de síntese do complexo (3)



Fonte: O autor.

O complexo (3) (Esquema 8) foi sintetizado de modo similar ao complexo (2) (BATISTA *et al.*, 2003; HORN *et al.*, 2005; NEVES *et al.*, 1995). Em um béquer de 150 mL e sob agitação magnética, 0,43 g (0,37 mmol; 1171,53 g mol⁻¹) do complexo 1 foram dissolvidos em 50 mL CH₂Cl₂. Em seguida, foram adicionados 0,11 g (0,30 mmol; 372,38 g mol⁻¹) de Zn(ClO₄)₂·6H₂O dissolvidos em 20 mL de CH₃OH. À mistura reacional, 50 mL de uma solução metanólica contendo 0,150 g (0,30 mmol; 516,33 g mol⁻¹) de Fe(ClO₄)₃·9H₂O foram gotejados lentamente e então a solução tornou-se intensamente púrpura. Por fim, foram adicionados 0,164

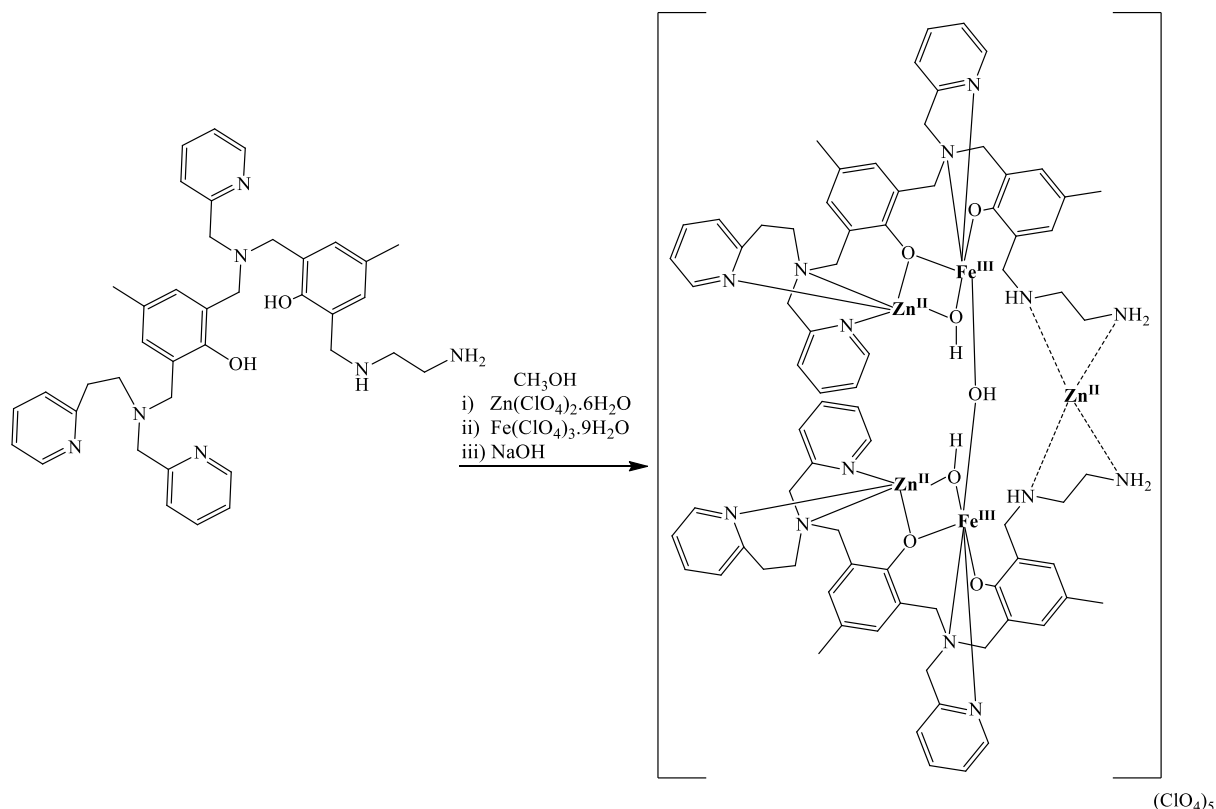
g (2,0 mmol; 82,03 g.mol⁻¹) de NaOAc. A agitação foi mantida por mais 10 minutos e então, a solução foi filtrada e deixada em repouso. Após evaporação do solvente, um precipitado de coloração roxa foi obtido, filtrado e lavado com água deionizada, CH₂Cl₂ e éter etílico gelados. Rendimento: 53%, em relação ao ligante H₂py₃mff.

IV (ATR) em cm⁻¹: ν (O-H), ν (N-H) e ν (H₂O) 3529; ν (C-H)_{ar} e (C-H)_{alif} 3114-2862; δ (N-H)_{sec} 1607; ν (C=N) e (C=C) 1564-1421; ν (O-C-O)_{ass} 1571; ν (O-C-O)_{sim} 1473; ν (C-O)_{fenol} 1257; ν (Cl-O) 1070 e 625; δ (C-H)_{ar} 854-764.

% CHN calculado para [Fe^{III}(μ -OAc)₂Zn^{II}L_{bipy}Pd^{II}Cl₂](ClO₄)·(CH₂Cl)₂·(H₂O): C, 43,97; H, 4,24; N, 7,60. Encontrado: C, 43,79; H, 4,19; N, 7,83.

3.4.4 Síntese do complexo [Fe^{III}(μ -OH)₃Zn₃^{II}(L²-et)₂](ClO₄)₅ – (4)

Esquema 9 – Esquema de síntese do complexo (4)



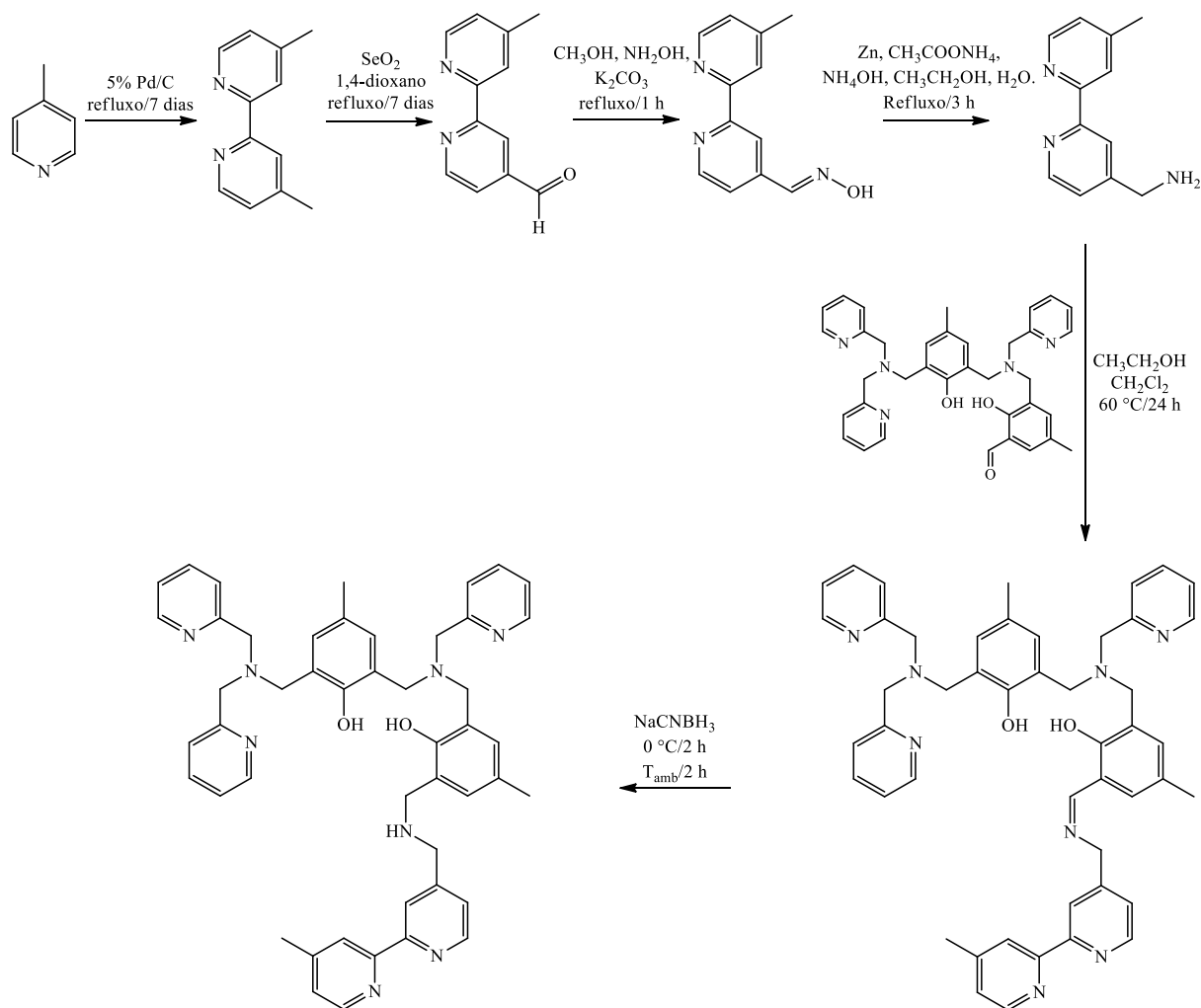
Fonte: O autor.

O complexo (4) (Esquema 9) foi sintetizado de modo similar ao trabalho de Silva (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017). Em um béquer de 150 mL e sob agitação magnética, 64,6 mg (0,1 mmol, 645,84 g mol⁻¹) do ligante H₂L²-et foram dissolvidos em 30 mL de CH₃OH. Em

seguida foram adicionados 74,5 mg (0,2 mmol, 372,38 g mol⁻¹) de Zn(ClO₄)₂·6H₂O. À mistura reacional, 30 mL de uma solução metanólica contendo 51,6 mg (0,1 mmol, 516,33 g mol⁻¹) de Fe(ClO₄)₃·9H₂O foram gotejados lentamente e então a solução tornou-se levemente púrpura. Em seguida, 119,9 mg (3 mmol, 39,99 g mol⁻¹) de NaOH dissolvidos em 10 mL de água deionizada foram adicionados. A agitação foi mantida por mais 15 minutos e NaClO₄ (122,4 mg, 1 mmol, 122,44 g mol⁻¹) foi adicionado. A mistura reacional foi filtrada e deixada em repouso. Após evaporação do solvente, um precipitado de coloração roxa claro foi obtido, filtrado e lavado com água deionizada, CH₂Cl₂ e éter etílico gelados. Rendimento: 20%, em relação ao ligante H₂L²-et. Monocristais adequados para análise de difração de raios X foram obtidos após recristalização de 5 μmol do precipitado com 5 μmol de óxido de trifenilfosfina em 2 mL de uma solução CH₃CN/CH₃OH/tolueno (0,1/0,9/1,0; v/v) (ETTER; BAURES, 1988). IV (ATR) em cm⁻¹: ν (OH) 3554; ν (C-H)_{ar} (C-H)_{alif} 2959-2867; ν (C=N; C=C)_{ar} 1610-1444; ν(C-O)_{fenol} 1276; ν(Cl-O) 1075 e 625; ν (C-N) 1160; δ(C-H)_{ar} 763. % CHN calculado para [Fe₂^{III}(μ-OH)₃Zn₃^{II}(L²-et)₂](ClO₄)₅·(CH₃OH)₂·(H₂O)₅: C, 41,81; H, 4,87; N, 8,53. Encontrado: C, 41,64; H, 4,61; N, 8,17.

magnética nuclear de hidrogênio e de carbono e espectrometria de massas. O ligante H_2L^{2-} -et foi obtido a partir do trabalho da Dra. Graciela Aparecida dos Santos Silva e as caracterizações do mesmo encontram-se em sua Tese de Doutorado (SILVA, 2017).

Esquema 10 – Rota sintética para obtenção do ligante H_2L_{bipy}



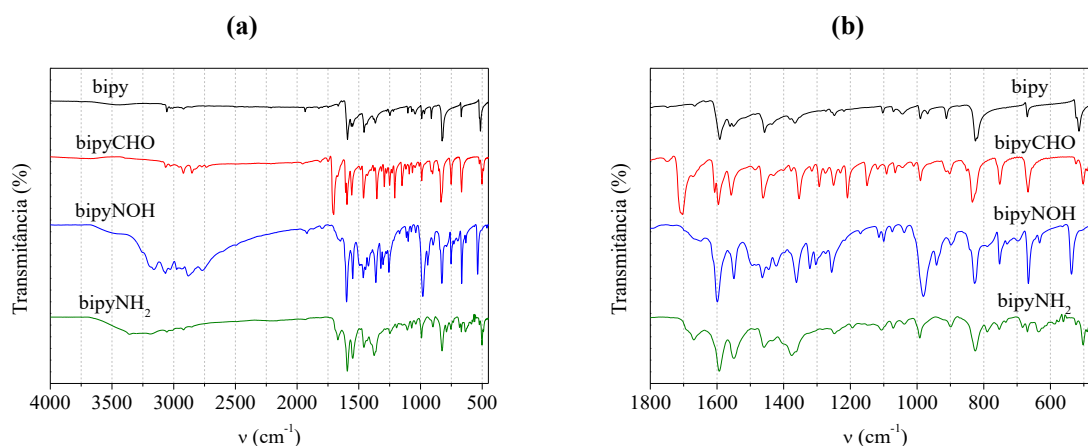
Fonte: O autor.

4.1.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Todos os ligantes precursores e ligante final foram caracterizados por espectroscopia vibracional na região do infravermelho e as principais bandas foram atribuídas (NAKAMOTO, KAZUO, 2008; PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009; ROBERT MILTON SILVERSTEIN *et al.*, 2015) com base em semelhança, de modo a serem utilizadas para acompanhar a formação dos compostos em cada etapa.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho dos ligantes precursores bipy, bipyCHO, bipyNOH e bipyNH₂ podem ser observados na Figura 9, dos quais as bandas mais relevantes foram sumarizadas na Tabela 1.

Figura 9 – Sobreposição dos espectros vibracionais na região do infravermelho (a) e região padrão de absorção característico (“*fingerprint*”) (b) dos precursores



Fonte: O autor.

Tabela 1 – Modos vibracionais e números de onda (cm⁻¹) atribuídos aos precursores e ligantes H₂py₃mff e H₂L_{bipy}

	bipy	bipyCHO	bipyNOH	bipyNH ₂	H ₂ py ₃ mff	H ₂ L _{bipy}
v (N-H)	-	-	-	3356	-	-
v (O-H)	-	-	3160	-	3573	-
v (C-H) _{ar} e (C-H) _{alif}	3069-2851	3070-2735	3075-2747	3187-2850	3059-2714	3059-2714
v (C-H) _{ald}	-	2729	-	-	2711	-
v (C=O)	-	1720	-	-	1678	-
δ (N-H)	-	-	-	1593	-	1595
v (C=N) _{oxima}	-	-	1598	-	-	-
v (C=N e C=C)	1600-1370	1598-1362	1606-1370	1545-1360	1590-1372	1566-1372
δ (CH) ₃ as	1458	1460	1464	1461	1478	1467
δ (O-H) _{fenol}	-	-	-	-	1368	1370
v (C-O) _{fenol}	-	-	-	-	1224	1232
v (N-O)	-	-	977	-	-	-
v (C-N)	-	-	-	999	992	995
δ (C-H) _{ar}	826	819 e 749	824 e 749	824 e 749	862	860-820
δ (C=C)	670	666	665	668	757	754

Fonte: O autor.

Para o precursor bipy observam-se, na região de 3069-2851 cm⁻¹, estiramentos das ligações C-H de aromáticos e de grupos metilas. Bandas de estiramentos de ligações aromáticas C=N e C=C (1600-1370 cm⁻¹) também estão presentes. Uma banda de deformação angular assimétrica em 1458 cm⁻¹ indica a presença de grupos metila no composto.

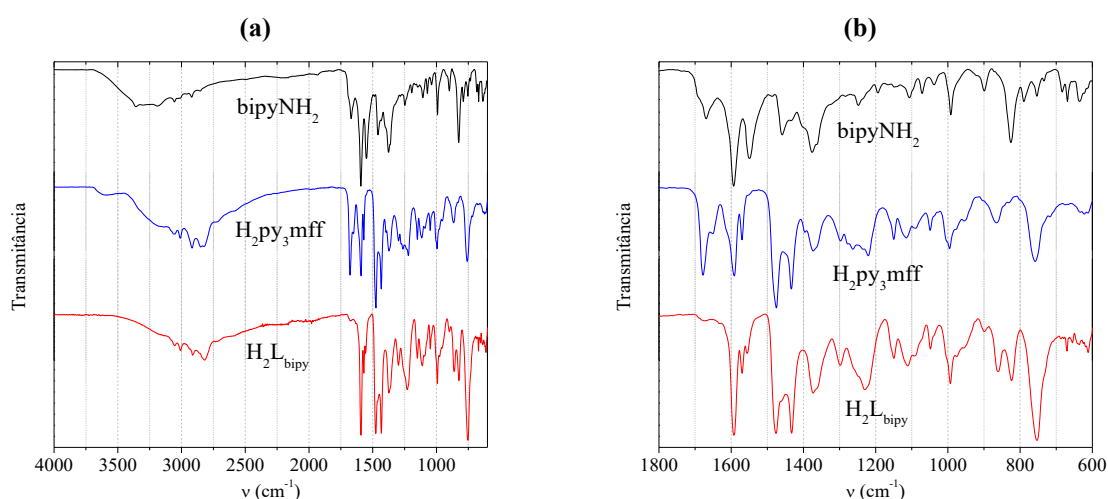
Os espectros dos precursores bipyCHO, bipyNOH e bipyNH₂ apresentaram modos vibracionais similares no que diz respeito aos grupos aromáticos, diferenciando-se na presença

de modos vibracionais dos grupos funcionais característicos de cada precursor. Em 2729 e 1720 cm^{-1} , foi possível atribuir estiramentos de ligações C-H (aldeído) e C=O, respectivamente. Para o precursor bipyNOH, foi observada a ausência das bandas do grupo funcional aldeído e a presença da banda de estiramento de ligação C=N de oxima (1598 cm^{-1}), O-H (3160 cm^{-1}) e N-O (999 cm^{-1}).

A confirmação da reação de formação do ligante precursor final, bipyNH₂, foi concluída com a ausência das bandas características dos grupos funcionais dos precursores anteriores e com a presença das bandas de estiramentos de ligação N-H (3356 e 1593 cm^{-1}) e C-N (999 cm^{-1}). Além disto, a presença e a pequena diminuição de intensidade relativa da banda de deformação angular assimétrica do grupo metila, no decorrer das etapas de síntese, indicam a reação de formação de uma amina primária em apenas um dos grupos piridina.

Para a síntese do ligante H₂L_{bipy}, fez-se necessário a síntese do ligante H₂py₃mff conforme procedimento publicado por Piovezan (PIOVEZAN *et al.*, 2010). O mesmo foi caracterizado por espectroscopia vibracional na região do infravermelho para comparação com o ligante H₂L_{bipy}, como pode ser observado na sobreposição dos espectros na região do infravermelho apresentado na Figura 10.

Figura 10 – Sobreposição dos espectros vibracionais na região do infravermelho (a) e região padrão de absorção característico (“*fingerprint*”) (b) do ligante precursor bipyNH₂ e dos ligantes H₂py₃mff e H₂L_{bipy}



Fonte: O autor.

O ligante H₂L_{bipy} apresentou bandas similares aos seus precursores H₂py₃mff e bipyNH₂ (Tabela 1) como, por exemplo, bandas entre 1569 e 1375 cm^{-1} , características dos estiramentos das ligações C=N e C=C dos anéis aromáticos. Bandas características de deformação angular fora do plano de ligação O-H e de estiramento de ligação C-O de fenol

também foram notadas em 1370 e 1224 cm^{-1} , respectivamente. Além disto, a confirmação da redução do grupamento aldeído do ligante $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$, formando a respectiva imina e reduzindo-se em amina secundária com adição de NaCNBH_3 , pode ser observada pela ausência dos modos vibracionais do grupo aldeído ($\nu \text{C}=\text{O}$, 1678 cm^{-1}) e do grupo amina primária ($\nu \text{N-H}$, 3356 cm^{-1}).

4.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear representa uma técnica importante na determinação da estrutura de compostos orgânicos em solução. O método é rápido e não destrutivo e é capaz de promover, em muitos casos, a análise e interpretação completa do espectro. Os deslocamentos químicos e a integração dos sinais observados nos espectros de RMN de ^1H permitiram determinar o número de átomos de hidrogênio presentes em cada composto, assim como suas distinções em: i) hidrogênio de grupo metila (CH_3), ii) hidrogênios de grupo metileno (CH_2), iii) hidrogênios de grupo grupos CH de aromático (CH_{ar}), de aldeído (CH_{ald}) e de oxima (CH_{oxima}). (PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009; ROBERT MILTON SILVERSTEIN *et al.*, 2015). Os valores obtidos estão sumarizados na Tabela 2.

Os cálculos referentes às constantes de acoplamento (J) não foram efetuados devido à sobreposição de sinais ao longo do espectro e, para tal, técnicas mais elaboradas de análise bidimensional teriam que ser utilizadas, fugindo então do escopo do presente trabalho.

Tabela 2 – Deslocamentos químicos (ppm), multiplicidade e integração observados nos espectros de RMN de ^1H para o ligante $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$ e seus ligantes precursores

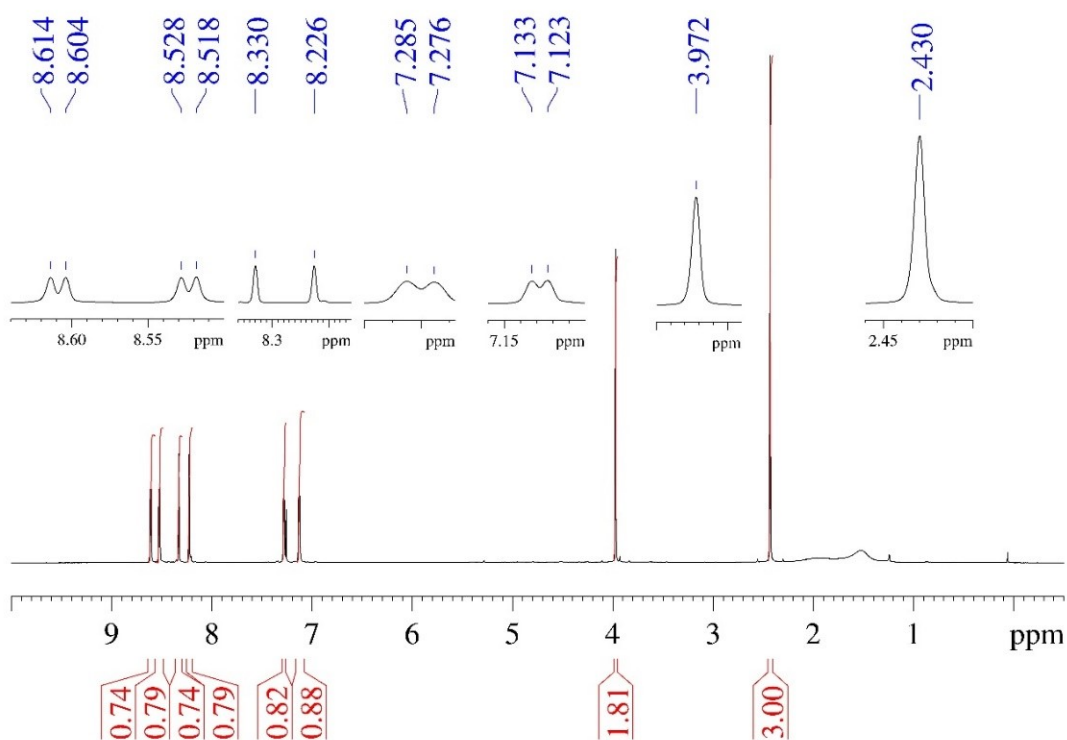
	bipy^{a}	$\text{bipyCHO}^{\text{a}}$	$\text{bipyNOH}^{\text{a}}$	$\text{bipyNH}_2^{\text{a}}$	$\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}^{\text{a}}$	$\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}^{\text{b}}$
CH_3	2,40 (s, 6H)	2,46 (s, 3H)	2,46 (s, 3H)	2,43 (s, 3H)	2,22 (s, 6H)	2,17 (s, 3H) 2,21 (s, 3H) 2,41 (s, 3H)
CH_2				3,97 (s, 2H)	3,84 (m, 12H)	3,80 (m, 16H)
CH_{ar}	7,10 (d, 2H) 8,20 (d, 2H) 8,51 (d, 2H)	7,20 (dd, 1H) 7,71 (dd, 1H) 8,27 (s, 1H) 8,57 (d, 1H) 8,82 (m, 1H) 8,89 (d, 1 H)	7,20 (m, 1H) 7,41 (dd, 1H) 8,20 (s, 1H) 8,54 (d, 1H) 8,71 (m 1H) 8,75 (m, 1H)	7,13 (d, 1H) 7,28 (d, 1H) 8,23 (s, 1H) 8,33 (s, 1H) 8,52 (s, 1H) 8,60 (d, 1H)	6,90 (m, 2H) 7,16 (m, 4H) 7,40 (m, 3H) 7,60 (m, 3H) 8,55 (m, 3H)	6,85 (m, 4H) 7,10 (m, 4H) 7,35 (m, 3H) 7,55 (m, 4H) 8,20 (s, 1H) 8,28 (s, 1H) 8,52 (m, 5H)
CH_{ald}		10,18 (s, 1H)			10,25 (m, 1H)	
CH_{oxima}			11,51 (s, 1H)			

Notas: ^a em 200 MHz; ^b em 400 MHz.

Os ligantes precursores sintetizados apresentam espectros característicos com deslocamentos químicos, multiplicidades e integração compatíveis com seus procedimentos já descritos na literatura (BUSCHE *et al.*, 2010; FANG *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2008). As Figura 45, 46 e 47 (APENDICE A) representam os espectros de RMN de ^1H (200 MHz) dos ligantes precursores bipy, bipyCHO e bipyNOH em CDCl_3 , respectivamente. Todos as atribuições de deslocamentos químicos foram em relação à 0,00 ppm relativo ao TMS.

Em todos os espectros de RMN de ^1H foi possível verificar a formação do produto. Sinais característicos foram identificados como, por exemplo, o hidrogênio do carbono do grupo aldeído e do grupo oxima. Além disto, o ligante precursor bipyNH₂ (Figura 11) não apresenta nenhum destes sinais, anteriormente citados. Além disto, o aparecimento do sinal de hidrogênio de grupo metileno (CH_2) em 3,972 ppm, também indica o sucesso da síntese.

Figura 11 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) do ligante precursor bipyNH₂ em CDCl_3

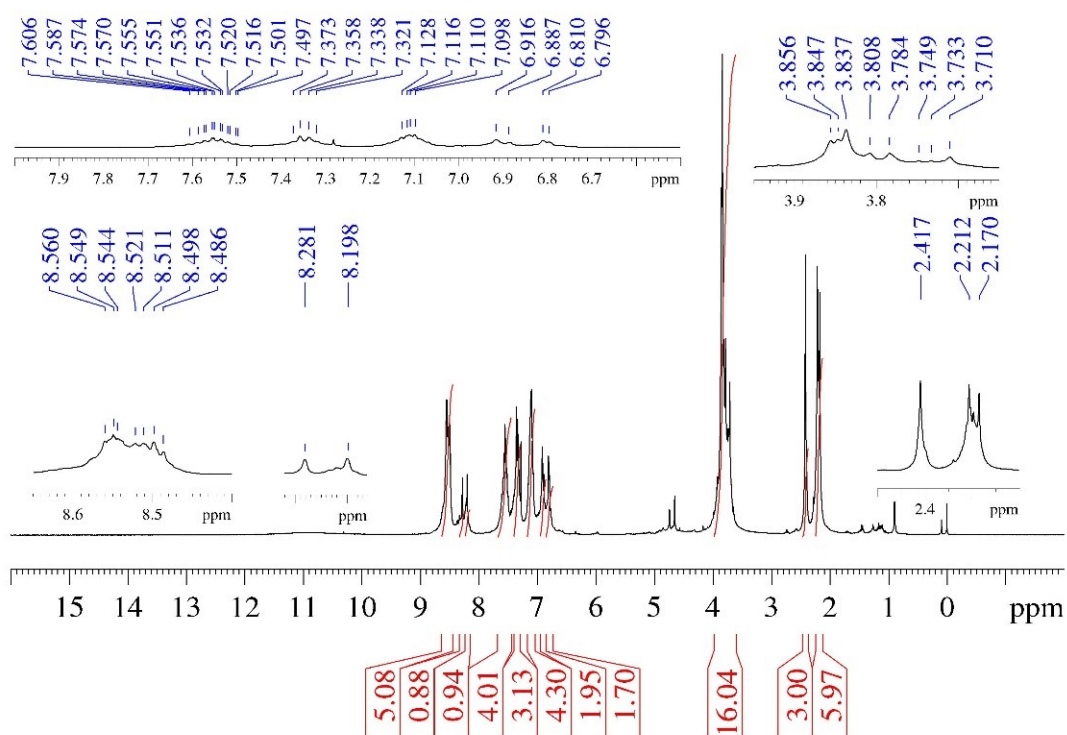


Fonte: O autor.

O espectro do ligante $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$ (Figura 12) revela que os procedimentos de síntese e purificação geram o composto pois são encontrados todos os sinais de ressonância dos átomos de hidrogênio presentes na molécula.

Os espectros dos ligantes H_2L_{bipy} (Figura 12) e H_2py_3mff (Figura 48 – APENDICE A) apresentam muitas similaridades, uma vez que seus respectivos arranjos estruturais são semelhantes. Os sinais de ressonância ficam ligeiramente agrupados em três campos característicos de: maior blindagem (2,00 a 2,50 ppm) os hidrogênios de grupos metila; de blindagens intermediárias (3,70 a 4,00 ppm) os hidrogênios de grupos metileno e, por fim, de menor blindagem (6,00 a 9,00 ppm) os hidrogênios de grupos aromáticos.

Figura 12 – Espectro de RMN de 1H (400 MHz) do ligante H_2L_{bipy} em $CDCl_3$

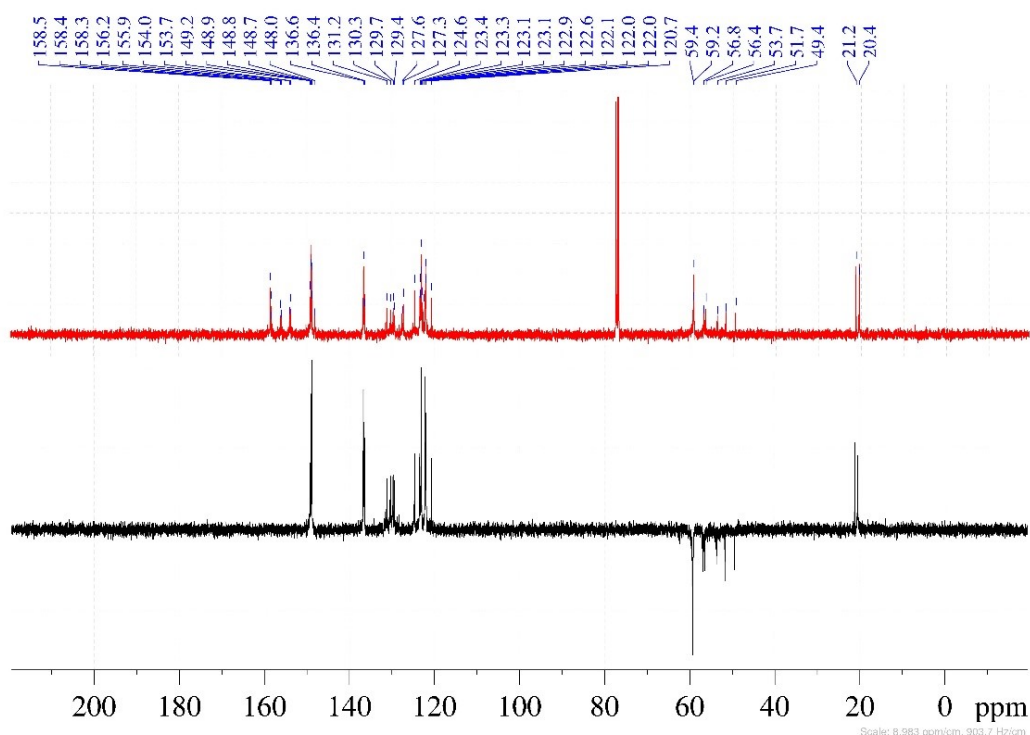


Fonte: O autor.

Uma comparação direta entre os espectros de RMN de 1H do ligante H_2L_{bipy} com o espectro do precursor H_2py_3mff permite observar a ausência do sinal característico de grupo aldeído, em 10,25 ppm, corroborando com o resultado obtido na espectroscopia vibracional na região do infravermelho (Seção 4.1.1). Além disto, para confirmar a reação entre o ligante precursor $bipyNH_2$ e H_2py_3mff , com a respectiva formação de amina secundária fez-se o uso da espectroscopia de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de ^{13}C (Figura 13) para avaliar a presença de oito grupos CH_2 na molécula final. No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar a presença de 7 sinais, entre 49,4 e 59,4 ppm, de carbonos de grupos CH_2 sendo que, o sinal em 59,2 ppm

representa o deslocamento químico de carbonos quimicamente equivalentes. Por fim, os padrões de sinais negativos, observados no espectro de RMN de DEPT-135 de ^{13}C , também comprovam a presença de oito grupos CH_2 no ligante $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$. O que permite, dessa maneira, evidenciar o sucesso nas etapas de síntese do ligante assimétrico $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$.

Figura 13 – Espectros de RMN de ^{13}C (acima) e de DEPT-135 de ^{13}C (abaixo) do ligante $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$ em CDCl_3 (100 MHz)



Fonte: O autor.

4.1.3 Análise elementar de C, H e N

O ligante $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$ sintetizado foi caracterizado por análise elementar de CHN e o resultado obtido apresentou uma boa correlação entre os valores calculados e teóricos. Foi observado a presença de molécula de solvente etanol adsorvida na amostra, proveniente da síntese do ligante. A Tabela 3 mostra a fórmula molecular, massa molar e as porcentagens de C, H e N (calculada/encontrada) para o ligante.

Tabela 3 – Porcentagens de C, H e N (calculada/encontrada) para o ligante $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$

Fórmula molecular	Massa molar (g mol^{-1})	Composição química proposta	%C	%H	%N
$\text{C}_{50}\text{H}_{56}\text{N}_8\text{O}_3$	817,03	$\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}} \cdot \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	73,50/73,43	6,91/6,60	13,71/12,76

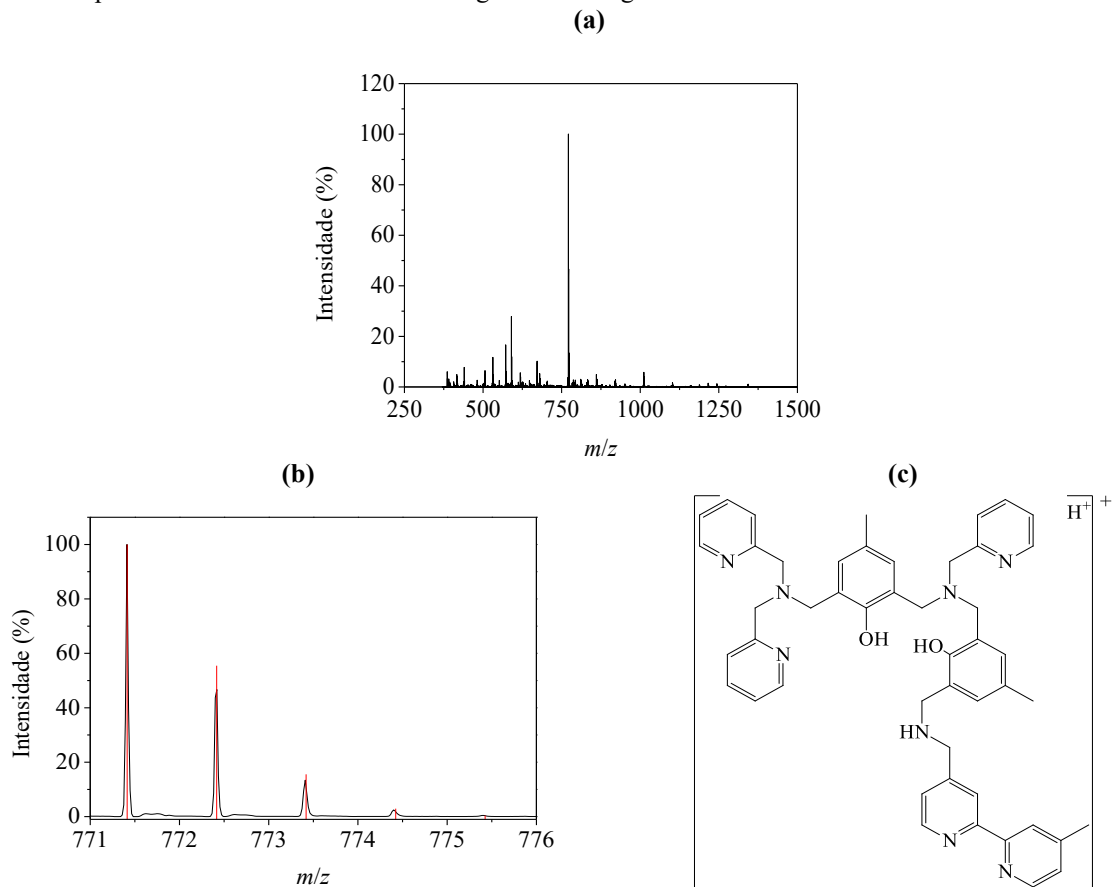
Fonte: O autor.

4.1.4 Espectrometria de massas

O ligante H_2L_{bipy} também foi caracterizado por espectrometria de massas usando um espectrômetro do tipo ESI-QTOF-MS de alta resolução e no modo de ionização positiva a partir de solução do ligante em metanol (Figura 14a).

Esta técnica, ao produzir íons moleculares gasosos do ligante, possibilitou obter informações qualitativas acerca das espécies carregadas existentes neste sistema. Desta forma foi possível determinar a presença do íon molecular para o ligante final H_2L_{bipy} , confirmando sua obtenção e estabilidade química em solução. Um grupo principal de picos observados na razão $m/z = 771,4115$ com carga +1 foi encontrado e atribuído à espécie contendo uma unidade do ligante protonado $[C_{48}H_{50}N_8O_2 + H^+]^+$ (Figura 14b). A partir da massa molecular calculada ($m/z = 771,4129$) e experimental ($m/z = 771,4115$) foi possível obter um valor de 1,84 ppm de erro de massa.

Figura 14 – Espectro de massa ESI-QTOF-MS de alta resolução no modo de ionização positivo do ligante H_2L_{bipy} em metanol (a), o perfil de distribuição isotópica referente à espécie $[H_2L_{bipy} + H^+]^+$ e razão $m/z = 771,4115$ (experimental – em preto) e $m/z = 771,4129$ (simulado – em vermelho) (b) e a estrutura da espécie proposta (c). Os outros picos são todos relacionados aos fragmentos do ligante.

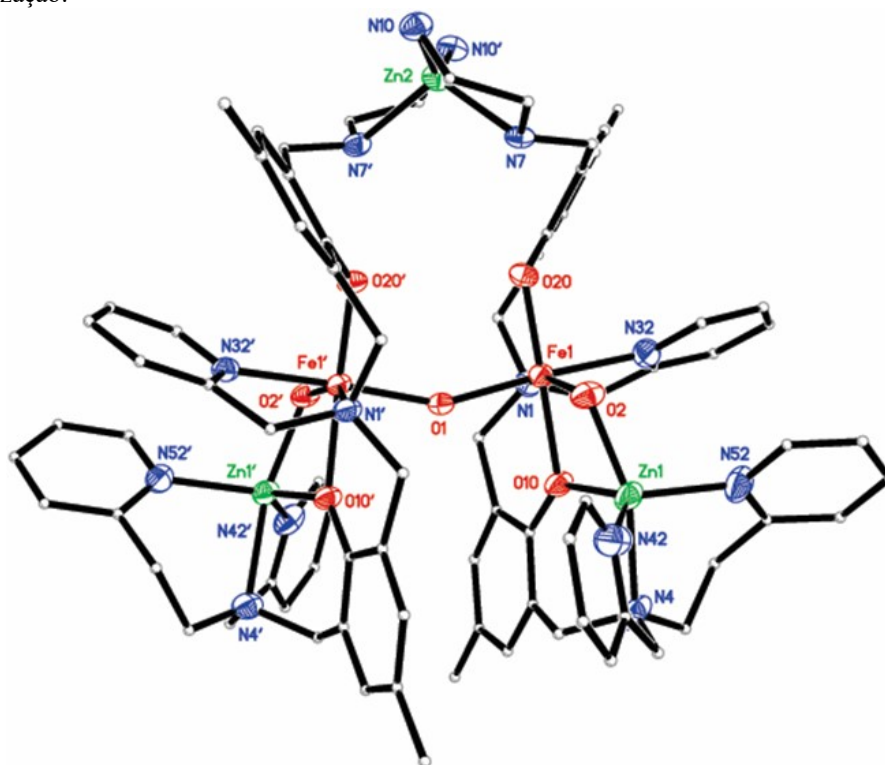


4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

4.2.1 Cristalografia de raios X

A reação entre o ligante $H_2L^2\text{-et}$ (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017) e quantidades estequiométricas de $Zn(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ e $Fe(ClO_4)_3 \cdot 6H_2O$, na presença de seis equivalentes de NaOH e dois equivalentes de $NaClO_4$, em metanol leva à formação do complexo binuclear $[Fe^{III}(\mu\text{-OH})Zn^{II}(L^2\text{-et})](ClO_4)_2$ (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017). Este complexo, foi obtido e caracterizado por métodos espectroscópicos, ESI-MS, análise elementar, voltametria de onda quadrada e estudos de reatividade, no trabalho de doutorado da Dra. Graciela Aparecida dos Santos Silva. Interessantemente, ao aumentarmos a quantidade de $Zn(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$, o complexo pentanuclear $[Fe_2^{III}Zn_3^{II}(\mu\text{-OH})_3(L^2\text{-et})_2](ClO_4)_5$ (**4**) foi obtido, em que uma coordenação não-usual de um terceiro Zn^{II} nos grupos 1,2-etanodiamina de duas unidades do ligante $H_2L^2\text{-et}$ foi formada (Figura 15).

Figura 15 – ORTEP do ambiente de coordenação do complexo (**4**). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.



Fonte: O autor.

Para obtenção de cristais, quantidades estequiométricas do sólido formado e óxido de trifenilfosfina foram misturados em uma solução de CH_3CN/CH_3OH /tolueno (0.1/0.9/1; v/v).

Após 24 horas em repouso, monocristais de coloração púrpura foram obtidos para análise de difração de raios X (Figura 15). Vale ressaltar que o óxido de trifenilfosfina foi fundamental para a obtenção desses monocristais, não sendo obtidos sem a presença do mesmo até em diferentes condições de técnicas e solventes. O óxido de trifenilfosfina é um reagente muito comum na indução da cristalização de compostos orgânicos. A sua rigidez estrutural e a alta basicidade do oxigênio tornam-no muito aplicável na recristalização de moléculas de difícil obtenção de cristais. Sua utilização é bastante difundida e aplicável à moléculas que contenham átomos capazes de fazerem interações intermoleculares de ligação de hidrogênio como, por exemplo, grupos fenóis e aminas primária e secundária (ETTER; BAURES, 1988).

A estrutura cristalina do complexo (4) foi resolvida a partir de seu monocristal pelo método da difratometria de raios X. Os dados cristalográficos e do refinamento da estrutura para o mesmo estão apresentados nas Tabela 4 e 5.

Tabela 4 – Dados cristalográficos da estrutura de refinamento do complexo (4)

Fórmula empírica	$C_{87}H_{107}Cl_5Fe_2N_{15}O_{28,50}Zn_3$
Massa molar ($g\ mol^{-1}$)	2303,93
Temperatura	150(2) K
Comprimento de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Monoclinic
Grupo espacial	$P\ 2_1/n$
Dimensões da cela unitária	a = 14,4012(15) Å b = 44,515(5) Å c = 16,5153(17) Å $\beta = 111,2860(10)^\circ$
Volume	9865,2(18) Å ³
Z	4
Densidade (calculada)	1,551 Mg m ⁻³
Coefficiente de absorção	1,226 mm ⁻¹
F(000)	4756
Dimensões do cristal	0,260 × 0,240 × 0,040 mm ³
Intervalo de θ (coleta)	1,585 to 25,407°
Intervalos de coleta hkl	-13 ≤ h ≤ 17; -53 ≤ k ≤ 52; -19 ≤ l ≤ 19
Reflexões coletadas	75370
Reflexões únicas	18147 ($R_{int} = 0.0279$)
Completeness to theta = 25.242°	100,0 %
Correção por absorção	Semi-empirical from equivalents
Fatores de transmissão máx. e mín.	0,7452 and 0,6634
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F^2
Dados / restrições / parâmetros	18147 / 184 / 1282
Goodness-of-fit on F^2	1,121
Índices finais R [$I > 2\sigma(I)$]	$R1 = 0,0617$, $wR2 = 0,1391$
Índices R (todos os dados)	$R1 = 0,0740$, $wR2 = 0,1450$
Coefficiente de extinção	n/a
Densidade eletrônica residual	1,376 and -0,895 e Å ⁻³

Fonte: O autor.

Tabela 5 – Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação para o complexo (4)

Fe1-O20	1,904(3)	O20-Fe1-O2	103,59(13)	O2'-Fe1'-O10'	78,19(12)
Fe1-O2	1,935(3)	O20-Fe1-O1	95,53(13)	O1-Fe1'-O10'	84,35(12)
Fe1-O1	1,971(3)	O2-Fe1-O1	100,41(14)	O20'-Fe1'-N32'	87,16(13)
Fe1-O10	2,067(3)	O20-Fe1-O10	177,98(13)	O2'-Fe1'-N32'	91,07(14)
Fe1-N1	2,195(4)	O2-Fe1-O10	78,42(13)	O1-Fe1'-N32'	169,76(14)
Fe1-N32	2,200(4)	O1-Fe1-O10	84,21(13)	O10'-Fe1'-N32'	93,46(13)
Fe1-Zn1	3,0967(9)	O20-Fe1-N1	94,04(14)	O20'-Fe1'-N1'	92,73(13)
Fe1-Fe1'	3,8327(9)	O2-Fe1-N1	156,04(14)	O2'-Fe1'-N1'	156,92(14)
Zn1-O2	1,984(3)	O1-Fe1-N1	93,79(14)	O1-Fe1'-N1'	93,19(13)
Zn1-N52	2,044(4)	O10-Fe1-N1	83,98(14)	O2'-Zn1'-N52'	104,24(14)
Zn1-O10	2,067(3)	O20-Fe1-N32	88,63(14)	O2'-Zn1'-N42'	102,64(16)
Zn1-N42	2,071(5)	O2-Fe1-N32	88,48(15)	N52'-Zn1'-N42'	108,33(16)
Zn1-N4	2,175(4)	O1-Fe1-N32	168,97(14)	O2'-Zn1'-O10'	77,72(12)
Fe1'-O20'	1,915(3)	O10-Fe1-N32	91,27(14)	N52'-Zn1'-O10'	120,25(15)
Fe1'-O2'	1,937(3)	N1-Fe1-N32	75,69(15)	N42'-Zn1'-O10'	129,91(14)
Fe1'-O1	1,962(3)	O2-Zn1-N52	107,08(16)	O2'-Zn1'-N4'	164,71(13)
Fe1'-O10'	2,109(3)	O2-Zn1-O10	77,33(12)	N52'-Zn1'-N4'	88,20(16)
Fe1'-N32'	2,183(4)	N52-Zn1-O10	117,92(16)	N42'-Zn1'-N4'	81,31(17)
Fe1'-N1'	2,204(4)	O2-Zn1-N42	98,44(17)	O10'-Zn1'-N4'	88,39(13)
Fe1'-Zn1'	3,0951(8)	N52-Zn1-N42	109,90(18)	N10'-Zn2-N10	137,33(16)
Zn1'-O2'	2,008(3)	O10-Zn1-N42	131,15(16)	N10'-Zn2-N7	119,05(16)
Zn1'-N52'	2,037(4)	O2-Zn1-N4	160,82(15)	N10-Zn2-N7	86,65(15)
Zn1'-N42'	2,046(4)	N52-Zn1-N4	90,88(19)	N10'-Zn2-N7'	86,41(15)
Zn1'-O10'	2,063(3)	O10-Zn1-N4	88,48(15)	N10-Zn2-N7'	116,33(16)
Zn1'-N4'	2,190(4)	N42-Zn1-N4	81,1(2)	N7-Zn2-N7'	112,44(14)
Zn2-N10'	2,010(4)	O20'-Fe1'-O2'	106,25(13)	Fe1'-O1-Fe1	153,97(17)
Zn2-N10	2,019(4)	O20'-Fe1'-O1	94,25(13)	Fe1-O2-Zn1	104,40(14)
Zn2-N7	2,087(4)	O2'-Fe1'-O1	98,25(13)	Fe1'-O2'-Zn1'	103,34(14)
Zn2-N7'	2,088(4)	O20'-Fe1'-O10'	175,51(12)		

Fonte: O autor.

A estrutura cristalina do complexo (4) foi obtida a partir de monocristais púrpuras pertencentes ao sistema cristalino monoclinico com grupo espacial $P 2_1/n$.

Os dados fornecidos pela resolução da estrutura revelam a formação do cátion complexo pentanuclear (4) a partir de duas unidades binuclear de $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}^2\text{-et})]$ (SILVA *et al.*, 2017). Estas unidades são, então, conectadas a partir de uma ponte $\mu\text{-OH}$ entre dois centros de Fe^{III} enquanto que um terceiro Zn^{II} é coordenado pelos grupos pendentes 1,2-etanodiamina do ligante $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$. Até o presente momento, este complexo representa o primeiro exemplo de um complexo heteropentanuclear de unidade $[\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{Zn}_3^{\text{II}}(\mu\text{-OH})_3(\text{L}^2\text{-et})_2]^{5+}$ e estrutura assimétrica.

Na estrutura do complexo (4), os centros de Fe(1) e Fe(1') mostram uma esfera de coordenação do tipo N_3O_2 . Para os centros de Zn^{II} , na primeira esfera de coordenação, apresentam geometrias distorcidas intermediárias entre a pirâmide quadrada e a bipirâmide trigonal com parâmetros de Addison (τ) iguais a 0,49 e 0,58 para o Zn(1) e Zn(1'), respectivamente (ADDISON *et al.*, 1984). O terceiro zinco, Zn(2), apresenta um ambiente de coordenação com geometria tetraédrica distorcida do tipo N_4 .

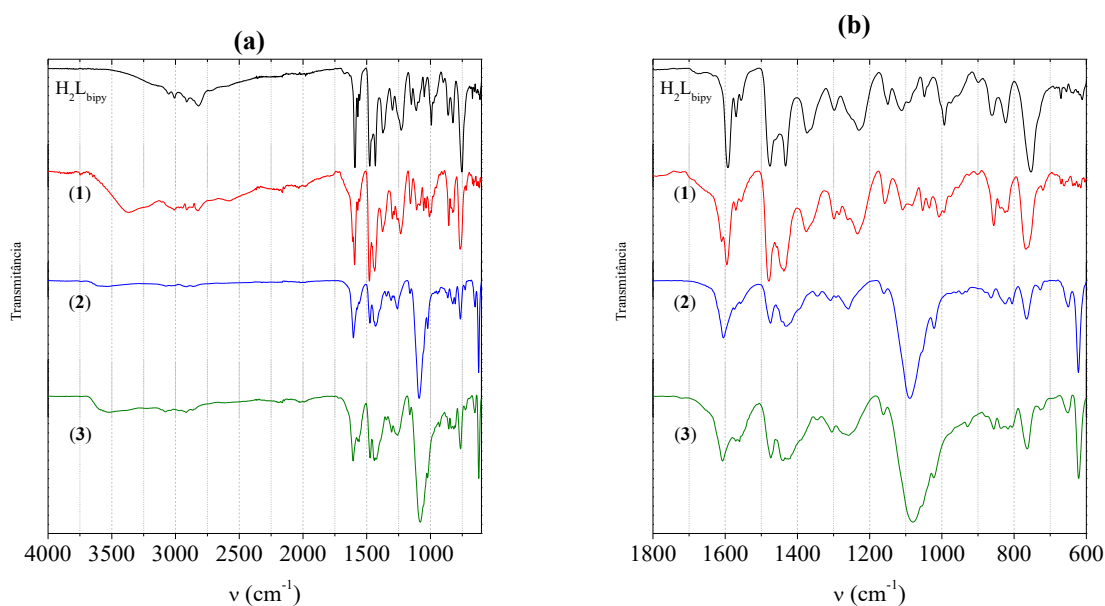
Em cada metade do cátion $[[\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{Zn}_3^{\text{II}}(\mu\text{-OH})_3(\text{L}^2\text{-et})_2]^{5+}$, os íons Fe(1) e Fe(1') são coordenados facialmente pelo ligante tridentado na porção dura do ligante $\text{L}^2\text{-et}^{2-}$ contendo os átomos de amina terciária (N1, N1') e nitrogênio da piridina (N32, N32') e átomos de oxigênio de fenolato (O20, O20'). Já os íons Zn(1) e Zn(1') são coordenados pela porção macia do ligante $\text{L}^2\text{-et}^{2-}$ através dos átomos de nitrogênio de amina terciária (N4, N4') e piridina (N42, N52, N42', N52'). Os átomos de oxigênio dos grupos fenolato em ponte (O10, O10') e hidroxila em ponte (O2, O2') completam o arranjo da bipirâmide trigonal distorcida na esfera de coordenação N_3O_2 dos íons Zn(1) e Zn(1') enquanto que, a geometria octaédrica distorcida no ambiente de coordenação N_2O_4 dos íons Fe(1) e Fe(1') é complementada pelos oxigênios dos grupos fenolato em ponte (O10, O10') e hidroxila em ponte (O2, O2' e O1). O íon Zn(2) exibe uma geometria tetraédrica distorcida 4 grupos N-doadores fornecidos por dois átomos de N de amina secundária (N7, N7') e dois átomos de N de amina primária (N10, N10'), do grupo 1,2-etanodiamina pertencente a cada unidade do ligante $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$. As distâncias de ligação Fe- μ -OH (Fe(1)-O(2) = 1,935(3) Å; Fe(1)-O(1) = 1,971(3) Å; Fe(1')-O(2') = 1,937(3) Å; Fe(1')-O(1) = 1,962(3) Å) e Zn- μ -OH (Zn(1)-O(2) = 1,984(3) Å; Zn(1')-O(2') = 2,008(3) Å; Zn(1')-O(2') = 1,937(3) Å; Zn(1')-O(1) = 1,962(3) Å) no complexo (4) são um pouco menores se comparadas com a correspondente distância metal- μ -OH na enzima rkbPAP, obtidas com distância entre 2.0 and 2.2 Å. Além disto, as distâncias Fe^{III}...Zn^{II} (Fe(1)-Zn(1) = 3,0967(9) Å e Fe(1')-Zn(1') = 3,0951(8) Å) são mais curtas, mas são comparáveis à distância de 3,20 Å encontrada na rkbPAP (FEDER *et al.*, 2019; KLABUNDE *et al.*, 1996; STRÄTER, NORBERT *et al.*, 2005) e de 3,459 Å do complexo de $\{\text{L}[\text{Zn}^{\text{II}}(\mu\text{-OAc})_2\text{Fe}^{\text{III}}]\}$ (PATHAK *et al.*, 2018).

Finalizando, o comprimento médio de ligação Fe-O_{fenolato} em torno dos centros de Fe^{III} (1,9513 Å) no complexo (4) é similar aos observados em complexos com ambiente de coordenação análoga de Fe^{III}Zn^{II} (1,934 Å) (NEVES *et al.*, 2007), Fe^{III}Zn^{II} (2,048 Å) (LANZNASTER *et al.*, 2002), Fe^{III}Cu^{II} (2,055 Å) (LANZNASTER *et al.*, 2005), Fe^{III}Mn^{II} (2,049 Å) (KARSTEN *et al.*, 2002), Fe^{III}Co^{II} (2,045 Å) (XAVIER *et al.*, 2009), (XAVIER, 2009), Fe^{III}Ni^{II} (2,045 Å) (BATISTA *et al.*, 2003), Fe^{III}Zn^{II} (1,952 Å) (JARENMARK *et al.*, 2011), Fe^{III}₄ (2,027 Å) (DUTTA *et al.*, 2018), Fe^{III}Zn^{II} (2,033 Å) (PATHAK *et al.*, 2018), Fe^{III}Zn^{II} (1,982 Å) (PATHAK *et al.*, 2017). Para o comprimento médio de ligação Zn-O_{fenolato} (1,9728 Å), compara-se à dos complexos isoestruturais de Fe^{III}Zn^{II} (2,132 Å) (LANZNASTER *et al.*, 2002), Fe^{III}Zn^{II} (1,966 Å) (NEVES *et al.*, 2007), Fe^{III}Zn^{II} (2,137 Å) (JARENMARK *et al.*, 2011), Zn^{II}₄ (1,953 Å) (DUTTA *et al.*, 2018), Fe^{III}Zn^{II} (2,049 Å) (PATHAK *et al.*, 2018), Zn^{II}Zn^{II} (2,034 Å) (PATHAK *et al.*, 2018), Fe^{III}Zn^{II} (2,091 Å) (PATHAK *et al.*, 2017).

4.2.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho foi utilizada para caracterizar a formação preliminar dos complexos. Este processo é realizado a partir da análise da presença de bandas características dos ligantes e de bandas adicionais referentes ao contra-íon, ligantes exógenos em ponte e/ou moléculas de solvente. Além disto, alargamento, deslocamento e mudança de intensidade relativa nas bandas também podem ser observadas devido aos efeitos de coordenação dos metais no ligante. A Figura 16 mostra a sobreposição dos espectros na região do infravermelho dos complexos (1), (2) e (3) em relação ao ligante H_2L_{bipy} . As principais bandas e atribuições estão sumarizadas na Tabela 6 (NAKAMOTO, KAZUO, 2008; PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009; ROBERT MILTON SILVERSTEIN *et al.*, 2015).

Figura 16 – Sobreposição dos espectros vibracionais na região do infravermelho (a) e região padrão de absorção característico (“*fingerprint*”) (b) dos complexos (1), (2) e (3) com o ligante H_2L_{bipy}



Fonte: O autor.

Os complexos (1), (2) e (3) apresentaram bandas características do ligante com intensidades relativas similares confirmando, assim, a presença dos ligantes na formação dos complexos.

No complexo (1) não foram observadas variações de energia significativas para maiores ou menores números de onda em comparação ao ligante H_2L_{bipy} (Figura 16). Devido a faixa de operação do aparelho instrumental, não foi possível observar bandas de estiramento de

ligações Pd-Cl ($360\text{-}287\text{ cm}^{-1}$) e Pd-N ($528\text{-}436\text{ cm}^{-1}$) (DURIG *et al.*, 1965). Tendo como base nos dados obtidos de espectroscopia de RMN de ^1H (Seção 4.1.2) Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio da presença das bandas de média intensidade, características de grupos fenólicos, em aproximadamente 1372 (δ O-H) e 1232 (ν C-O) cm^{-1} , pode-se inferir que o Pd^{II} está coordenado no grupo lateral bipyridina.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho para os complexos **(2)** e **(3)** (Figura 16) são muito similares e com estiramentos característicos do ligante. Estiramentos simétrico e assimétrico das ligações O-C-O dos ânions acetatos, ligantes exógenos em ponte entre os centros metálicos Fe^{III} e Zn^{II} , foram observados nestes complexos. Para o complexo **(2)**, os estiramentos assimétrico e simétrico são em 1575 e 1473 cm^{-1} , respectivamente. No complexo **(3)**, em 1571 e 1473 . Valores de $\Delta_{\text{vas-vs}}$ dos complexos **(2)** (102 cm^{-1}) e **(3)** (98 cm^{-1}) indicam que o modo de coordenação dos ânions acetato seja em ponte entre os íon Fe^{III} e Zn^{II} (NAKAMOTO, KAZUO, 2008). Complexos com ânions acetatos em ponte também apresentaram bandas em frequências semelhantes, como por exemplo, os complexos $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\text{IPCPMP})(\text{OAc})_2(\text{CH}_3\text{OH})]$ (ν (O-C-O)_{ass} = 1607 cm^{-1} e ν (O-C-O)_{sim} = 1419 cm^{-1}) (JARENMARK *et al.*, 2011), $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2]$ (ν (O-C-O)_{ass} = 1577 cm^{-1} e ν (O-C-O)_{sim} = 1435 cm^{-1}) (NEVES *et al.*, 1995) e $\{\text{L}[\text{Zn}^{\text{II}}(\mu\text{-OAc})_2\text{Fe}^{\text{III}}]\}$ (ν (O-C-O)_{ass} = 1606 cm^{-1} e ν (O-C-O)_{sim} = 1419 cm^{-1}) (PATHAK *et al.*, 2017).

A ausência da banda em 1370 cm^{-1} (δ O-H_{fenol}) e o deslocamento da banda de estiramento da ligação C-O, de 1232 para 1252 cm^{-1} em relação ao ligante, sugerem que os fenóis estejam coordenados de forma desprotonada aos metais, coordenando como fenolato terminal, além da ponte fenoxo nos complexos. Resultados análogos de ν (C-O)_{fenol} foram obtidos para os complexos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-et}$ (1267 cm^{-1}) (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017), $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})\text{L-R}]$ (R = CH_3 , Br e NO_2 ; 1276 , 1282 e 1292 cm^{-1} , respectivamente) (PERALTA *et al.*, 2010), $[(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})(\text{L}_1\text{bpea-amig})]$ (1265 cm^{-1}) (PEREIRA *et al.*, 2019), $[(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})(\text{L}_1\text{bpea-apur})]$ (1262 cm^{-1}) (PEREIRA *et al.*, 2019).

Os intensos estiramentos nos complexo **(2)** (1088 ; 625 cm^{-1}) e **(3)** (1070 ; 625 cm^{-1}) podem ser atribuídos ao modo vibracional do ânion perclorato livre, ou seja, como contra-íon (LEWIS; ESTES; HODGSON, 1975) e estão de acordo com complexos publicados anteriormente (CAMARGO *et al.*, 2018; PATHAK *et al.*, 2017; PERALTA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2017). A banda alargada na região de 3500 cm^{-1} pode ser atribuída à molécula de água (ν O-H), utilizada na lavagem dos complexos formados na síntese.

Tabela 6 – Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) atribuídos ao ligante $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$ e aos complexos (1), (2) e (3)

	$\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$	(1)	(2)	(3)
ν (O-H); (N-H) e (H_2O)	3153	3364	3558	3529
ν (C-H) _{ar} e (C-H) _{alif}	3059-2714	3050-2821	3092-2855	3114-2862
δ (N-H) _{sec}	1595	1609	1604	1607
ν (C=N, C=C) _{ar}	1566-1372	1595-1377	1563-1429	1564-1421
ν (O-C-O) _{ass}	-	-	1575	1571
ν (O-C-O) _{sim}	-	-	1473	1473
δ (O-H) _{fenol}	1370	1372	-	-
ν (C-O) _{fenol}	1232	1232	1257	1257
ν (Cl-O)	-	-	1088 e 625	1070 e 625
ν (C-N)	995	997	-	-
δ (C-H) _{ar}	862-748	854-758	864-752	854-764

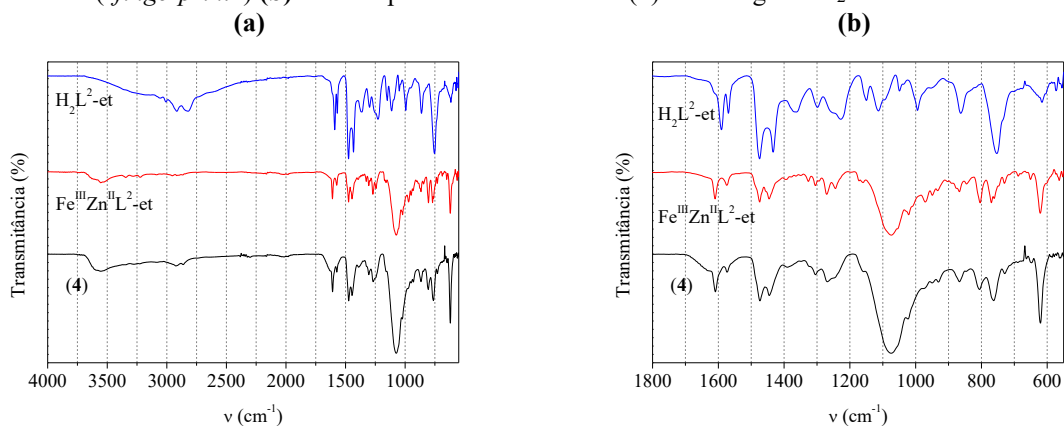
Fonte: O autor.

Para o complexo (4), foi possível observar bandas similares ao ligante $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$ e ao complexo binuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-et}$ (Figura 17) (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017). Os valores referentes aos estiramentos e deformações angulares de ligações C=C, C=N, C-H e C-O estão presentes no ligante e no complexo (4) (Tabela 7). Não foi possível visualizar a banda atribuída à deformação angular fora do plano da ligação O-H do grupo fenol, em 1369 cm^{-1} . Pode-se observar a presença e deslocamento, para maior número de onda, da banda relativa ao estiramento axial da ligação C-O_{fenol}. O valor (típico) de número de onda ficou compreendido em 1276 cm^{-1} para o complexo (4), contra 1219 e 1267 cm^{-1} para o ligante $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$ e o complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-et}$, respectivamente (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017). Estas observações corroboram com a coordenação dos fenóis na forma desprotonada entre os centros Fe^{III} e Zn^{II} . Valores de número de onda próximos a 1270 cm^{-1} são tipicamente atribuídos à coordenação de centros metálicos à grupos fenol de complexos biomiméticos de PAPs (JARENMARK *et al.*, 2011; PATHAK *et al.*, 2018; PERALTA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2017).

Ao comparar o complexo pentanuclear (4) com o binuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-et}$, foi possível observar um pequeno aumento na intensidade de absorção do estiramento da ligação O-H devido à presença de moléculas de água e/ou das três pontes exógenas do tipo μ -hidroxo coordenadas aos centros metálicos. De forma análoga, também foi observado um intenso estiramento atribuído ao modo vibracional do contra íon perclorato em 1073 cm^{-1} , assim como em 626 cm^{-1} . Este aumento de intensidade relativa pode ser atribuído a presença de cinco grupos ClO_4^- como contra-íon para o complexo (4), contra dois grupos para o complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-et}$ (1074 e 625 cm^{-1}). Além disto, os resultados de cristalografia de raios X (Seção 4.2.1) e da análise elementar de C, H e N (Seção 4.2.4) são consistentes com esta proposta.

Por fim, os resultados obtidos pela espectroscopia vibracional na região do infravermelho para os complexos (1), (2), (3) e (4) são semelhantes à complexos análogos reportados na literatura (CAMARGO *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2019; SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017).

Figura 17 – Sobreposição dos espectros vibracionais na região do infravermelho (a) e região padrão de absorção característico (“*fingerprint*”) (b) dos complexos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-et}$ e (4) com o ligante $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$



Fonte: O autor.

$\text{L}^2\text{-et} = \text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$: 2-(((2-aminoetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((2-(piridin-2-il)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino) metil)-4-metilfenol (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017).

Tabela 7 – Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) atribuídos ao ligante $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$ e aos complexos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-et}$ (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017) e (4).

	$\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$	$\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-et}$	(4)
ν (O-H)	-	3547	3554
ν (C-H) _{ar} e (C-H) _{alif}	3059-2834	3200-2856	2959-2867
δ (N-H) _{sec}	-	1610	1612
ν (C=N, C=C) _{ar}	1614-1433	1609-1447	1610-1444
δ (O-H) _{fênol}	1369	-	-
ν (C-O) _{fênol}	1219	1267	1276
ν (Cl-O)	-	1075; 624	1074; 625
ν (C-N)	1150	1158	1160
δ (C-H) _{ar}	758	765	763

Fonte: O autor.

$\text{L}^2\text{-et} = \text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$: 2-(((2-aminoetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((2-(piridin-2-il)etil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino) metil)-4-metilfenol (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017).

4.2.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio

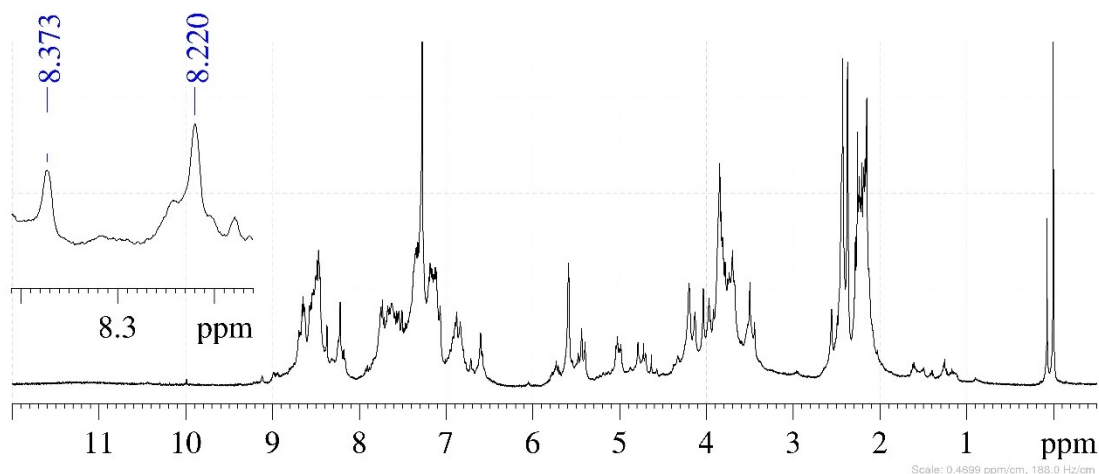
A análise de RMN de ^1H para o complexo (1) foi utilizada para avaliar a coordenação do metal Pd^{II} no ligante $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$. Com a configuração eletrônica d^8 do Pd^{II} , tetracoordenado, a possibilidade de formação de complexos quase que invariavelmente será quadrado planar (COTTON, 2008; HUHEEY *et al.*, 2013). Além disto, a coordenação com ligantes que podem

formar retroligações π pela aceitação de elétrons do átomo metálico, como a bipyridina, são favorecidas.

O espectro de RMN de ^1H para o complexo (**1**) é apresentado na Figura 18. Apesar de inúmeras tentativas de mudança nas metodologias de síntese, não foi possível obter multiplicidades e integração compatíveis com o ligante $\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$. A presença, possivelmente, de resíduo de ciclo-octadieno do sal de paládio pode ter resultado em interferências de sinais.

Contudo, dois sinais na região dos aromáticos foram passíveis de análise. Os sinais em 8,198 e 8,281 ppm ($\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}}$) dos hidrogênios próximos aos nitrogênios dos anéis da bipyridina, são deslocados para 8,220 e 8,373 ppm quando coordenados com o metal Pd^{II} , indicando a coordenação deste metal ao ligante pendente bipyridina.

Figura 18 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do complexo (**1**) em CDCl_3



Fonte: O autor.

4.2.4 Análise Elementar de C, H e N

Os complexos sintetizados foram caracterizados por análise elementar de CHN e os resultados obtidos apresentaram uma boa correlação entre os valores calculados e teóricos. Foi observado a presença de moléculas de solventes adsorvidas nas amostras, provenientes das sínteses dos complexos ou dos ligantes. A Tabela 8 mostra a fórmula molecular, massa molar e as porcentagens de C, H e N (calculada/encontrada) para os complexos.

Tabela 8 – Porcentagens de C, H e N (calculada/encontrada) para os complexos (1), (2), (3) e (4)

	Fórmula molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	%C	%H	%N
(1)	C ₅₈ H ₆₈ Cl ₄ N ₈ O ₃ Pd	1173,44	59,37/60,08	5,84/6,01	9,55/9,53
(2)	C ₅₅ H ₆₆ Cl ₇ N ₈ O ₁₂ FeZn	1379,04	47,17/47,06	4,75/4,49	8,00/8,31
(3)	C ₅₄ H ₆₂ Cl ₅ N ₈ O ₁₁ FeZnPd	1454,58	43,97/43,79	4,24/4,19	7,60/7,83
(4)	C ₈₀ H ₁₁₁ Cl ₅ N ₁₄ O ₃₄ Fe ₂ Zn ₃	2297,91	41,81/41,64	4,87/4,61	8,53/8,17
Composição química proposta					
(1)	[H ₂ LbipyPd ^{II} Cl ₂](C ₈ H ₁₂)(CH ₃ OH)(CH ₂ Cl ₂)				
(2)	[Fe ^{III} (μ-OAc) ₂ Zn ^{II} L ² bipy](ClO ₄)(CH ₂ Cl ₂) ₃ (H ₂ O) ₂				
(3)	[Fe ^{III} (μ-OAc) ₂ Zn ^{II} L ² bipyPd ^{II} Cl ₂](ClO ₄)(CH ₂ Cl) ₂ (H ₂ O)				
(4)	[Fe ₂ ^{III} (μ-OH) ₃ Zn ₃ ^{II} (L ² -ct) ₂](ClO ₄) ₅ (CH ₃ OH) ₂ (H ₂ O) ₅				

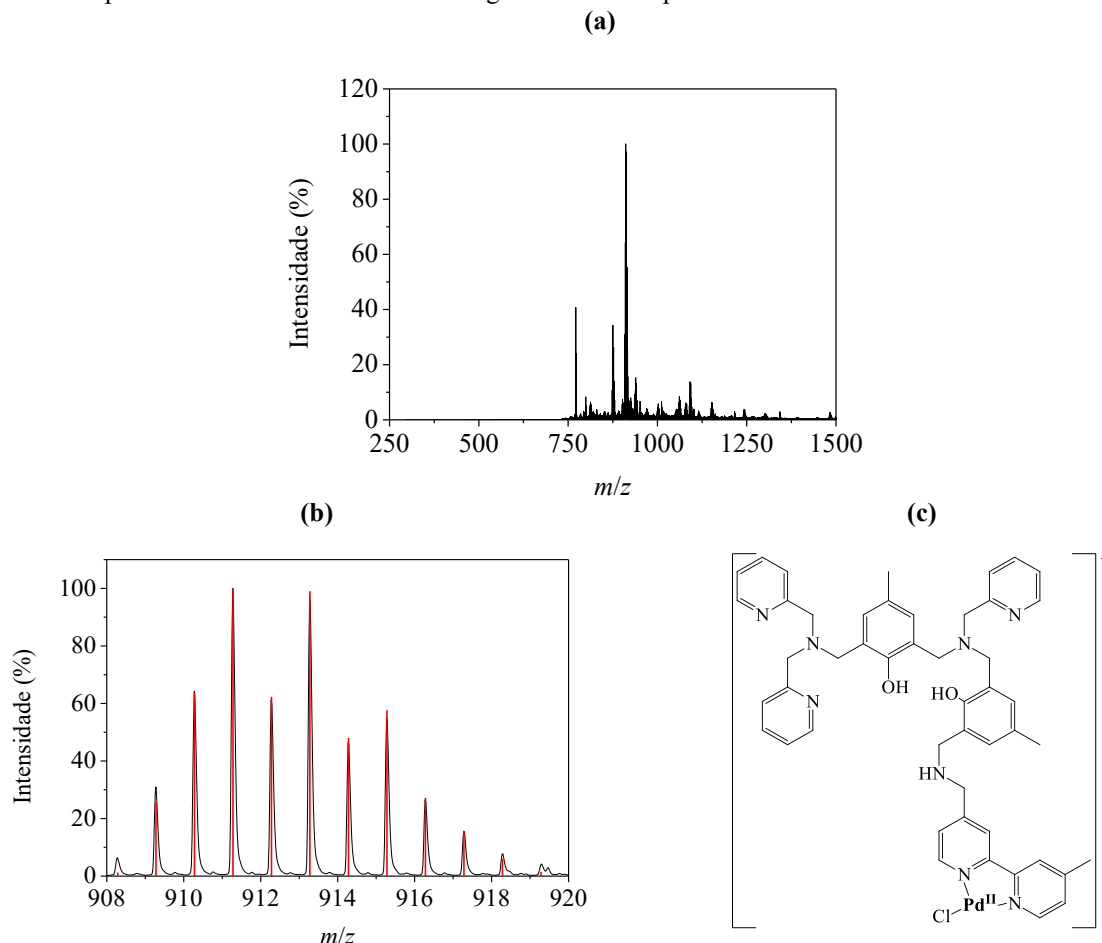
Fonte: O autor.

4.2.5 Espectrometria de massas

As medidas de ESI-QTOF-MS para o complexo (1) foi realizada em metanol devido a baixa solubilidade em acetonitrila, água e acetonitrila/água (1:1; v/v). Para os complexos (2), (3) e (4) foram realizadas em soluções de acetonitrila/água (1:1; v/v) para se igualar as condições utilizadas nos experimentos cinéticos assegurando, assim, estar se tratando das mesmas espécies quando em solução.

Para o complexo (1), um grupo principal de picos observados na razão $m/z = 911,2726$ com carga 1+ foi encontrado (Figura 19a) e atribuído à espécie $[C_{48}H_{50}N_8O_2Pd^{II}Cl]^+$ (Figura 19b), indicando que o ligante H₂L_{bipy} permanece intacto ao se coordenar ao átomo de Pd^{II} no grupo lateral bipyridina, como pode ser visto no perfil isotópico detectado no espectro de massa e nos dados obtidos por espectroscopia na região do infravermelho (Seção 4.1.1) e de RMN de ¹H (Seção 4.1.2).

Figura 19 – Espectro de massa ESI-QTOF-MS de alta resolução no modo de ionização positivo do complexo (1) em metanol (a), o perfil de distribuição isotópica referente à espécie $[H_2L_{bipy}Pd^{II}Cl]^+$ e razão $m/z = 911,2726$ (experimental – em preto) e $m/z = 911,2780$ (simulado – em vermelho) (b) e a estrutura da espécie proposta (c). Os outros picos são todos relacionados aos fragmentos do complexo

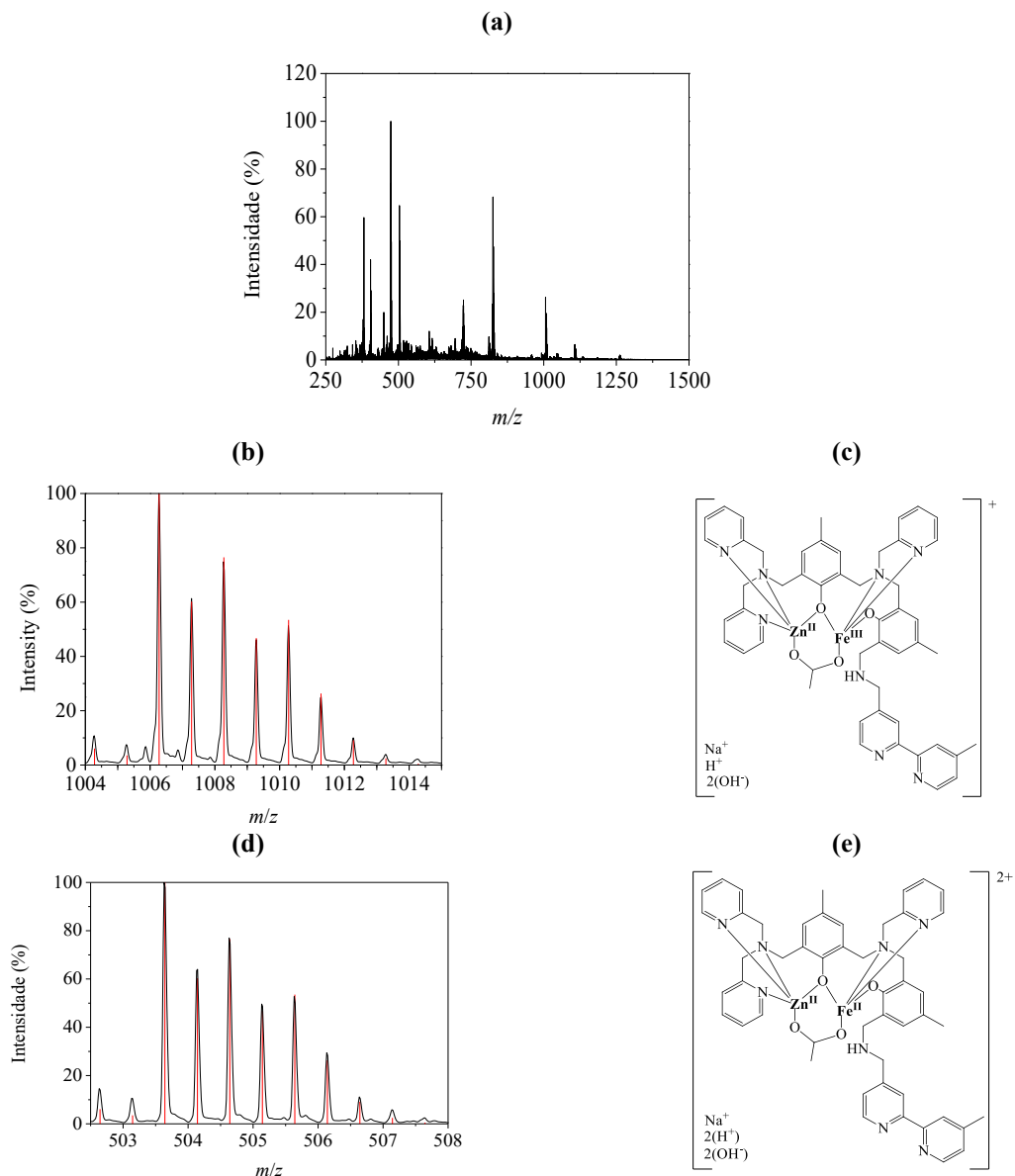


Fonte: O autor.

O complexo (2) apresentou dois grupos de picos na razão $m/z = 1006,2707$ e $503,6315$. O grupo de picos em $m/z = 1006,2707$ pode ser atribuído a espécie $[Fe^{III}(\mu-OAc)Zn^{II}(L_{bipy})(H^+)(OH^-)_2(Na^+)]^+$ (Figura 20b), contendo uma unidade do ligante com um dos grupos fenóis coordenado de maneira desprotonada, um átomo de zinco e um átomo de ferro. O aduto formado com alguns íons como Na^+ , K^+ , Li^+ e NH_4^+ ocorre comumente em experimentos de espectrometria de massa que, provavelmente, oriunda da linha de injeção da amostra ou de recipientes de vidro usados no preparo das amostras (HOFFMANN, EDMOND; STROOBANT, VINCENT, 2007).

O segundo grupo de picos na razão $m/z = 503,6315$ é semelhante ao anterior e refere-se à espécie $[Fe^{II}(\mu-OAc)Zn^{II}(L_{bipy})(H^+)_2(OH^-)_2(Na^+)]^{2+}$ (Figura 20d) contendo uma unidade do ligante com os dois grupos fenolato, um átomo de zinco e um átomo de ferro, sendo que o átomo de ferro sofreu redução de Fe^{III} para Fe^{II} no momento da ionização.

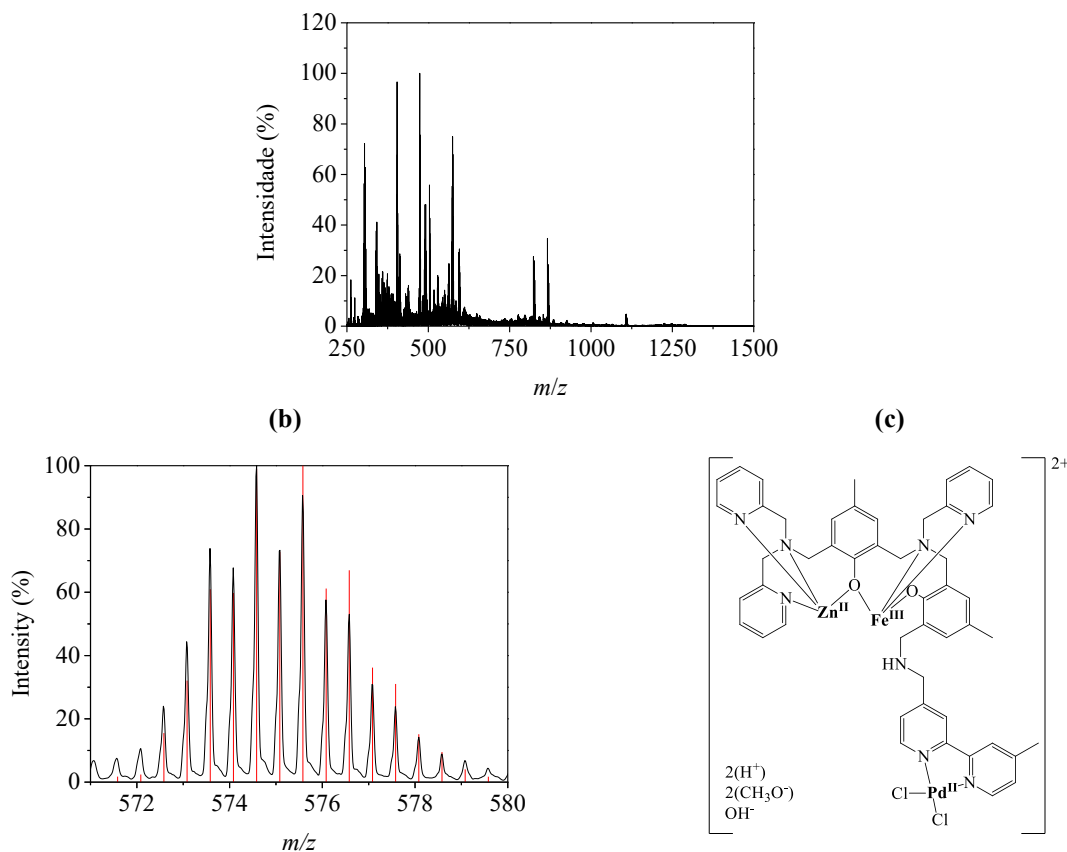
Figura 20 – Espectro de massa ESI-QTOF-MS de alta resolução no modo de ionização positivo do complexo **(2)** em acetonitrila/água (1:1; v/v) **(a)**, o perfil de distribuição isotópica referente à espécie $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}_{\text{bipy}})(\text{H}^+)(\text{OH})_2(\text{Na}^+)]^+$ e $m/z = 1006,2707$ (experimental – em preto) e $m/z = 1006,2728$ (simulado – em vermelho) **(b)** e a estrutura da espécie proposta **(c)**, o perfil de distribuição isotópica referente à espécie $[\text{Fe}^{\text{II}}(\mu\text{-OAc})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}_{\text{bipy}})(\text{H}^+)_2(\text{OH})_2(\text{Na}^+)]^{2+}$ e $m/z = 503,6315$ (experimental – em preto) e $m/z = 503,6425$ simulado – em vermelho) **(d)** e a estrutura da espécie proposta **(e)**. Os outros picos são todos relacionados aos fragmentos do complexo



Fonte: O autor.

Para o complexo **(3)** um grupo de picos na razão $m/z = 572,5716$ com carga $2+$ foi encontrado e atribuído à espécie $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}_{\text{bipy}})(\text{H}^+)_2(\text{CH}_3\text{O}^-)_2(\text{OH}^-)\text{Pd}^{\text{II}}(\text{Cl})_2]^{2+}$ (Figura 21b) contendo uma unidade do ligante com dois grupos fenolato coordenados ao Fe^{III} ou Zn^{II} e dois ânions cloretos coordenados ao metal Pd^{II} .

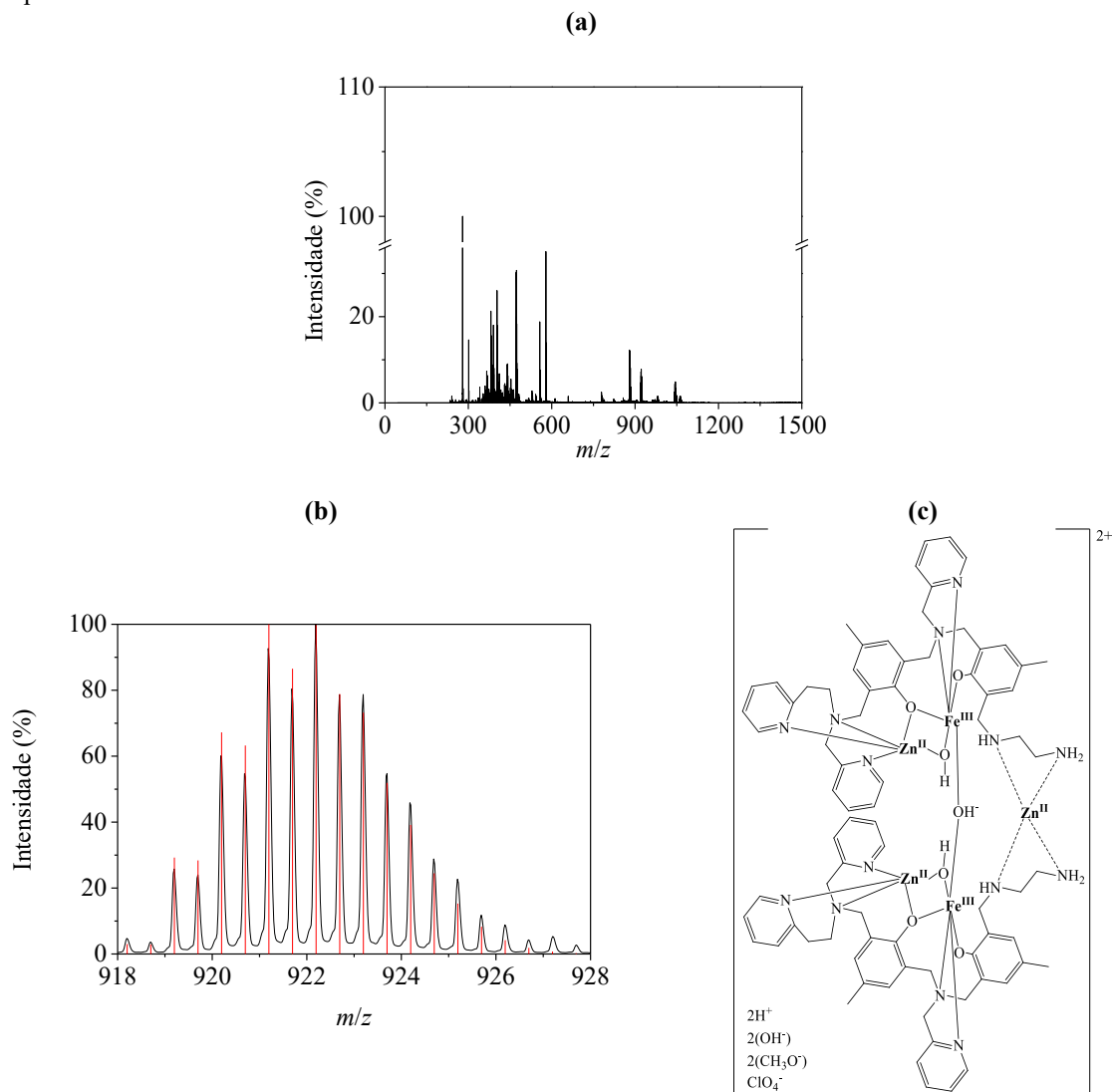
Figura 21 – Espectro de massa ESI-QTOF-MS de alta resolução no modo de ionização positivo do complexo **(3)** em acetonitrila/água (1:1; v/v) **(a)**, o perfil de distribuição isotópica referente à espécie $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}_{\text{bipy}})(\text{H}^+)_2(\text{CH}_3\text{O}^-)_2(\text{OH}^-)\text{Pd}^{\text{II}}(\text{Cl})_2]^{2+}$ e razão $m/z = 572,5716$ (experimental – em preto) e $m/z = 572,5747$ (simulado – em vermelho) **(b)** e a estrutura da espécie proposta **(c)**. Os outros picos são todos relacionados aos fragmentos do complexo



Fonte: O autor.

O complexo **(4)** apresentou um grupo de picos na razão $m/z = 919,1967$ com carga $2+$ atribuída à espécie $[\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{Zn}_3^{\text{II}}(\mu\text{-OH})_3(\text{L}^2\text{-et})_2(\text{CH}_3\text{O})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)]^{2+}$, que corresponde o seu íon molecular (Figura 22b). Grupos de picos correspondendo à fragmentação do complexo pentanuclear também foram observados, incluindo grupos de picos na razão $m/z = 470,1142$, $879,1726$ e $1041,1607$ atribuídos às espécies binucleares $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}^2\text{-et})(\text{H}_2\text{O})_3(\text{Li})(\text{ClO}_4)]^{2+}$, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}^2\text{-et})(\text{ClO}_4)]^+$ e trinuclear $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}^2\text{-et})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{CH}_3\text{O})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)]^+$, respectivamente. Além disso, grupos de picos atribuídos à fragmentos do ligante ($[\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}]^+$, $m/z = 279.1160$; $[\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_3\text{Na}]^+$, $m/z = 579.2957$) também estão presentes.

Figura 22 – Espectro de massa ESI-QTOF-MS de alta resolução no modo de ionização positivo do complexo (4) em acetonitrila/água (1:1; v/v) (a), o perfil de distribuição isotópica referente à espécie $[\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{Zn}_3^{\text{II}}(\mu\text{-OH})_3(\text{L}^2\text{-et})_2(\text{CH}_3\text{O})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)]^{2+}$ e razão $m/z = 919,1967$ (experimental – em preto) e $m/z = 919,1975$ (simulado – em vermelho) (b) e a estrutura da espécie proposta (c). Os outros picos são todos relacionados aos fragmentos do complexo.



Fonte: O autor.

A Tabela 9 mostra os dados obtidos e faz uma comparação entre a massa teórica e a massa obtida para os íons moleculares dos complexos. Os picos de fragmentação observados nos espectros confirmam as estruturas e a estabilidade dos complexos em solução, corroborando com os demais estudos e aplicações reportados neste trabalho.

Tabela 9 – Razões m/z calculadas (calc.) e obtidas (exp.) por espectrometria de massas usando um espectrômetro de massas ESI-QTOF-MS de alta resolução no modo de ionização positivo.

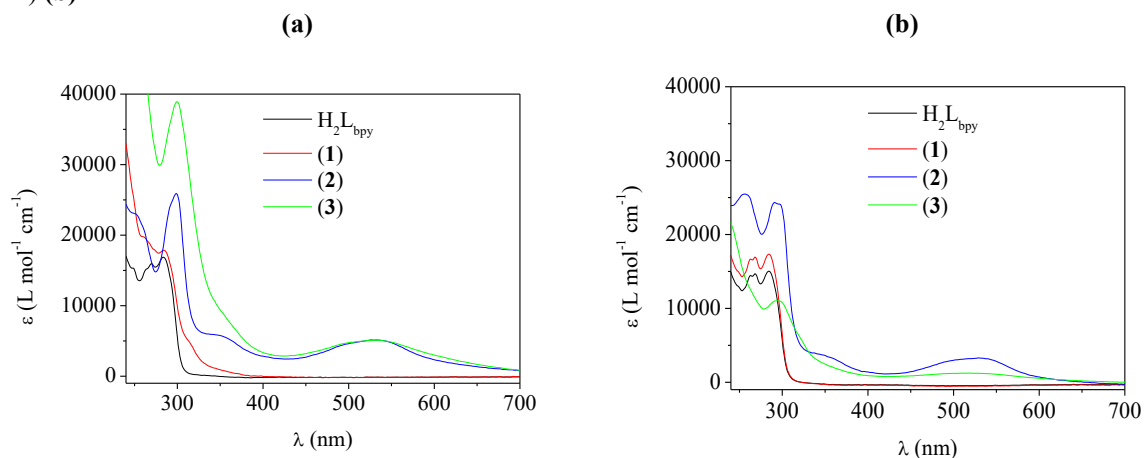
Complexo	Espécie	Carga	m/z (exp.)	m/z (calc.)	Erro (ppm)
(1)	$[H_2L_{bipy}Pd^{II}Cl]$	1+	911,2726	911,2780	5,92
(2)	$[Fe^{III}(\mu-OAc)Zn^{II}(L_{bipy})(H^+)(OH)_2(Na^+)]$	1+	1006,2707	1006,2728	2,09
	$[Fe^{II}(\mu-OAc)Zn^{II}(L_{bipy})(H^+)_2(OH)_2(Na^+)]$	2+	503,6315	503,6425	21,8
(3)	$[Fe^{II}(\mu-OAc)Zn^{II}(L_{bipy})(H^+)_2(OH)_2(Na^+)]$	2+	572,5716	572,5747	5,41
(4)	$[Fe_2^{III}Zn_3^{II}(\mu-OH)_3(L^2-et)_2(CH_3O)_2(H_2O)_2(ClO_4)]$	2+	919,1967	919,1975	0,87
	$[Fe^{III}(\mu-OH)Zn^{II}(L^2-et)(H_2O)_3(Li)(ClO_4)]$	2+	470,1142	470,1127	3,19
	$[Fe^{III}(\mu-OH)Zn^{II}(L^2-et)(ClO_4)]$	1+	879,1726	879,1783	6,48
	$[Fe^{III}(\mu-OH)Zn^{II}(L^2-et)Zn^{II}(CH_3O)_2(H_2O)_2(ClO_4)]$	1+	1041,1607	1041,1653	4,42
	$[C_{15}H_{16}N_2O_2Na]$	1+	279,1160	279,1109	18,3
	$[C_{32}H_{40}N_6O_3Na]$	1+	579,2957	579,3054	16,7

Fonte: O autor.

4.2.6 Espectroscopia na região do ultravioleta e visível

Os espectros eletrônicos de absorção na região do ultravioleta e visível dos complexos (1), (2) e (3) foram investigados na região entre 240 e 700 nm em soluções de acetonitrila e acetonitrila/água (1:1; v/v). Da mesma maneira, o comportamento do ligante H_2L_{bipy} também foi analisado. Os espectros eletrônicos em solução estão apresentados na Figura 23 sendo que, os gráficos foram plotados em função dos valores de seus coeficientes de absorção ($\epsilon / L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para facilitar a comparação entre os mesmos. Os resultados dos dados obtidos estão sumarizados nas Tabelas 10 e 11.

Figura 23 – Espectros eletrônicos do ligante H_2L_{bipy} ($3,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e dos complexos (1) ($2,70 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), (2) ($2,80 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e (3) ($2,60 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em solução de acetonitrila (a) e de acetonitrila/água (1/1; v/v) (b)



Fonte: O autor.

Tabela 10 – Dados de espectroscopia na região do ultravioleta e visível para o ligante H₂L_{bipy} e os complexos (1), (2) e (3)

	$\lambda_{\text{máx}}$ nm (ϵ ; L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	
	CH ₃ CN	CH ₃ CN/H ₂ O (1/1; v/v)
H ₂ L _{bipy}	249 (15.919) 264 (15.603) 270 (16.371) 284 (17.122)	262 (17.180) 268 (17.783) 284 (17.867)
(1)	263 (19.065) 270 (19.386) 284 (19.641) 314 (5.011)	262 (19.826) 268 (20.521) 284 (20.619)
(2)	251 (23.503) 299 (26.518) 351 (6.230) 532 (5.560)	255 (29.461) 290 (27.477) 297 (27.467) 347 (6.137) 531 (5.130)
(3)	299 (36.150) 528 (5.149)	295 (22.477) 514 (3.390)

Fonte: O autor.

O espectro eletrônico, em acetonitrila, para o complexo (1) apresentou bandas intensas de absorção em 263, 270 e 284 atribuídas a transições intraligantes do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis piridínicos e fenólicos, semelhantes ao ligante H₂L_{bipy} livre (COE; PEERS; SCRUTTON, 2015; GABER; MISKOWSKI; SPIRO, 1974; KREBS *et al.*, 1994; LAI *et al.*, 2000). Existe uma faixa de energia moderadamente intensa entre 300 a 360 nm com um ombro em $\lambda \approx 314$ nm. O valor em 314 nm apresenta coeficiente de absorção de 5.011 L mol⁻¹ cm⁻¹ e, tentativamente, pode-se atribuir essa banda para uma transição permitida por rotação do tipo $4d(\text{Pd}) \rightarrow \pi^*(\text{H}_2\text{L}_{\text{bipy}})$, ou seja, um processo de transferência de carga do tipo metal \rightarrow ligante (TCLM) (LAI *et al.*, 2000). Em espectros eletrônicos para complexos análogos do tipo $[\text{M}(\text{bipy})_2]^{+2}$ (M = Pd ou Pt) em acetonitrila, bandas de absorção na faixa de 300 a 400 nm também foram atribuídas às transições TCML (MAESTRI *et al.*, 1988).

Em soluções de acetonitrila, para os complexos contendo centros metálicos Fe^{III}Zn^{II} (2) e (3), se observou intensas bandas de absorção com λ_{max} em 532 ($\epsilon = 5.560$ L mol⁻¹ cm⁻¹) e 514 ($\epsilon = 3.390$ L mol⁻¹ cm⁻¹) nm, respectivamente. Estas bandas de absorção podem ser atribuídas às transições de transferência de carga do tipo fenolato \rightarrow Fe^{III}, envolvendo elétrons dos orbitais p_π do oxigênio fenólico para os orbitais d_{π^*} do Fe^{III} (KREBS *et al.*, 1994). Este fato indica fortemente a coordenação de um fenolato terminal e o fenolato ponte ao centro de Fe^{III} (CAMARGO *et al.*, 2018; KARSTEN *et al.*, 2002; MITIĆ *et al.*, 2006; NEVES *et al.*, 2007;

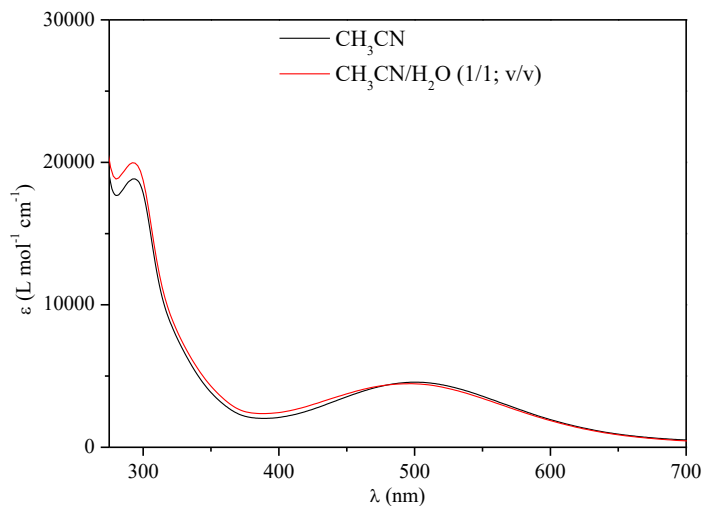
PEREIRA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2017), sendo que, a contribuição ao valor do coeficiente de absorção dado por cada fenolato coordenado a um átomo de Fe^{III} é da ordem de 1000 a 2000 L mol⁻¹ cm⁻¹ (GABER; MISKOWSKI; SPIRO, 1974).

Um segundo processo de TCLM, porém mais energético, ocorre em 351 nm ($\epsilon = 6.320$ L mol⁻¹ cm⁻¹) para o complexo (2). Esta banda de absorção é atribuída às transições eletrônicas dos orbitais p_{π} , também dos grupos fenolato, para os orbitais d_{σ^*} do Fe^{III}. Devido às transições intraligantes do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis piridínicos e fenólicos (GABER; MISKOWSKI; SPIRO, 1974; KREBS *et al.*, 1994), esta banda aparece sob a forma de um ombro parcialmente encoberta. Totalmente coberta, foi observada para o complexo (3) (Figura 23a). Bandas intensas de absorção em 251 ($\epsilon = 23.503$ L mol⁻¹ cm⁻¹) e 299 ($\epsilon = 26.518$ L mol⁻¹ cm⁻¹), para o complexo (2), e 295 ($\epsilon = 22.477$ L mol⁻¹ cm⁻¹) para o complexo (3), podem ser atribuídas a transições intraligantes do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis piridínicos e fenólicos (GABER; MISKOWSKI; SPIRO, 1974; KREBS *et al.*, 1994).

Quando os complexos (2) e (3) são dissolvidos em solução de acetonitrila/água (1:1; v/v), um pequeno deslocamento hipsocrômico pode ser observado quando comparado aos respectivos espectros em acetonitrila (Tabela 10). Este deslocamento pode ser atribuído às interações do complexo com água como solvente (50% em volume), das quais as duas pontes μ -acetato são facilmente trocadas por moléculas de água ou hidróxido. Este tipo de interação também muda significativamente o valor do coeficiente de absorção nas transições eletrônicas dos orbitais p_{π} do oxigênio fenólico para os orbitais d_{π^*} do Fe^{III} ($\lambda_{\text{máx}} \approx 530$ nm) devido, provavelmente, ao aumento da doação de carga, do ligante hidróxido ou água, seguido da redução da acidez de Lewis do Fe^{III}, aumentando a energia dos orbitais t_{2g} (LANZNASTER *et al.*, 2005). Portanto, ocorre um aumento de energia dos mesmos e conseqüentemente resulta numa absorção em maior energia. Estes dados estão em concordância com os obtidos por compostos análogos binucleares de Fe^{III}Zn^{II} (CAMARGO *et al.*, 2018; LANZNASTER *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2017).

Uma pequena mudança é observada no coeficiente de absorção entre os complexos (2) e (3), em acetonitrila. Apesar de não ter ocorrido um deslocamento significativo na banda de $\lambda_{\text{máx}} \approx 530$ nm, pode-se inferir que a densidade eletrônica sobre o Fe^{III}, no complexo (3), seja maior do que a densidade eletrônica sobre o Fe^{III} do complexo (2). Deste modo, o Pd^{II} pode ocasionar um mínimo efeito de doação de elétrons, aumentando a densidade eletrônica dos orbitais d do Fe^{III}. Semelhantemente, tal fato também foi observado quando utilizado solvente acetonitrila/água (1/1; v/v).

Figura 24 – Espectros eletrônicos do ligante do complexo (4) ($1,25 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em solução de acetonitrila e de acetonitrila/água (1/1; v/v)



Fonte: O autor.

O complexo (4) em solução de acetonitrila e de acetonitrila/água (1/1; v/v) (Figura 24), em comparação com o complexo Fe^{III}Zn^{II}L²-et (Tabela 11) (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017), apresentou uma banda intensa em $\lambda_{\text{máx}} = 292$ nm ($\epsilon = 19.968$ L mol⁻¹ cm⁻¹), atribuídas a transições intraligantes nos anéis de piridina e fenólicos (GABER; MISKOWSKI; SPIRO, 1974). Uma banda de transição eletrônica, em $\lambda_{\text{máx}} = 496$ nm ($\epsilon = 4.462$ L mol⁻¹ cm⁻¹), foi atribuída a TCLM do tipo p_{π} dos grupos fenolato para os orbitais d_{π^*} do íon Fe^{III} sendo que, em comparação ao complexo binuclear Fe^{III}Zn^{II}L²-et (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017), um deslocamento hipsocrômico (≈ 30 nm) foi observado. Acredita-se que a ligação intermolecular Fe^{III}- μ -OH-Fe^{III} no complexo (4) e em compostos similares causem o deslocamento, das bandas de absorção eletrônica, para maiores energias (400-500 nm) em decorrência do aumento das interações das ligações π entre os átomos de Fe^{III} e oxigênio da ponte μ -OH (BOUDALIS *et al.*, 2007; REEM *et al.*, 1989; WERNER *et al.*, 2001).

As bandas correspondentes das transições $d-d$ para os complexos (2), (3) e (4) não foram observadas. Isto ocorre pois em um campo cristalino octaédrico os íons Fe^{III}, alto spin, mostram bandas de transições $d-d$ muito fracas pois todas as transições são proibidas por spin (HUHEEY *et al.*, 2013). Além disto, estas bandas são encobertas pela banda de TCLM que ocorre entre 500 e 600 nm.

Tabela 11 – Dados de espectroscopia na região do ultravioleta e visível para o complexos (4) e Fe^{III}Zn^{II}L²-et (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017)

	$\lambda_{\text{máx}} \text{ nm } (\epsilon; \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1})$	
	CH ₃ CN	CH ₃ CN/H ₂ O (1/1; v/v)
Fe ^{III} Zn ^{II} L ² -et	258 (35.888)	258 (25.539)
	291 (25.620)	291 (18.715)
	501 (1.619)	490 (1.304)
(4)	295 (18.837)	292 (19.968)
	500 (4.570)	496 (4.462)

Fonte: O autor.

4.2.7 Titulação potenciométrica e espectrofotométrica

Os estudos de titulação potenciométrica dos complexos (1), (2) e (3) foram realizados em solução de CH₃CN/H₂O (1/1; v/v) para se igualar as condições utilizadas nos experimentos cinéticos assegurando, assim, estar se tratando das mesmas espécies quando em solução. Para realizar uma comparação direta com os resultados obtidos para o complexo binuclear Fe^{III}Zn^{II}L²-et (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017), optou-se por realizar a titulação espectrofotométrica para o complexo (4). Os objetivos destes experimentos foram determinar os valores de pK_a para as moléculas de água coordenadas aos centros metálicos e as possíveis espécies presentes em solução. Os resultados obtidos estão contidos na Tabela 12.

Uma proposta para os equilíbrios observados em solução para o complexo (1) pode ser vista na Figura 25. Devido à labilidade dos cloretos ligados ao Pd^{II}, os quais podem ser hidrolisados gerando aquo-complexo, sugere-se que o pK_{a1} e o pK_{a2} refiram-se à desprotonação de duas moléculas de água coordenada a este metal.

Tabela 12 – Valores de pK_a correspondentes à desprotonação de moléculas de água coordenadas, para os complexos (1), (2) e (3)

	Complexo		
	(1)	(2)	(3)
pK _{a1}	3,95 ± 0,18	5,04 ± 0,12	4,05 ± 0,05
pK _{a2}	8,29 ± 0,22	6,38 ± 0,17	4,80 ± 0,15
pK _{a3}	9,35 ± 0,11	8,32 ± 0,08	5,79 ± 0,23
pK _{a4}	10,24 ± 0,28	9,08 ± 0,21	7,98 ± 0,06
pK _{a5}	10,98 ± 0,15		8,44 ± 0,19
pK _{a6}			9,18 ± 0,20

Fonte: O autor.

Os valores de pK_{a1} e pK_{a2} foram de 3,95 e 8,29, respectivamente, e são relativamente inferiores aos valores correspondentes de complexos similares de Pd^{II} (Tabela 13). Isto pode ser atribuído ao aumento de carga positiva no íon Pd^{II}, devido ao caráter indutivo negativo de

elétrons dos anéis piridínicos coordenados ao metal quando comparados, por exemplo, ao complexos com 1,2-etilenodiamina e 1,2-diaminopropano (SHEHATA, 2001). Para o pK_{a3} , em 9,35, foi atribuído à desprotonação da amina secundária presente no complexo (1) e está de acordo com os valores para aminas em solução (COX, 2013). Para os grupos fenol livres, pode-se atribuir os valores de $pK_{a4} = 10,24$ e $pK_{a5} = 10,98$ (AKTAŞ; ŞANLI; PEKCAN, 2006). O diagrama de distribuição de espécies para o complexo (1) está disposto na Figura 26.

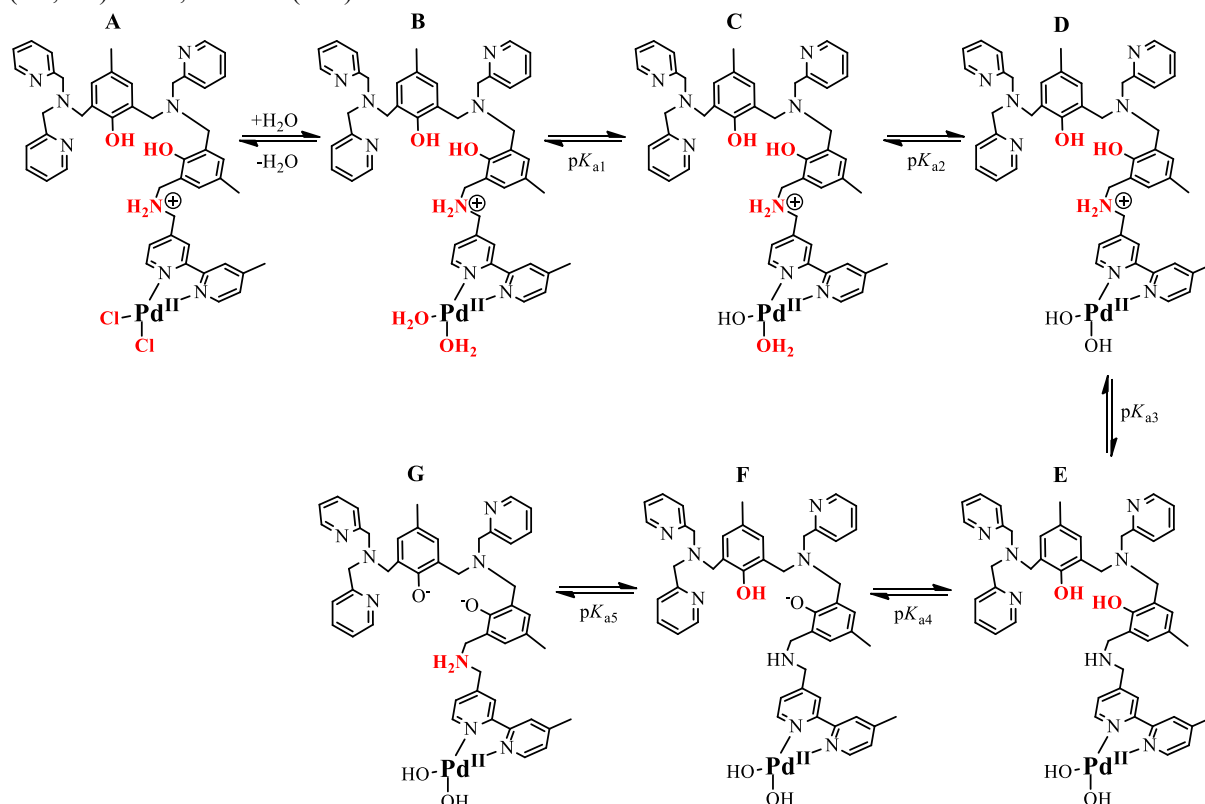
Tabela 13 – Comparação de valores de pK_a de desprotonação de moléculas de água coordenadas ao Pd^{II} no complexo (1) com o de sistemas similares

	pK_{a1}	pK_{a2}	Referência
$[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$	5,6	7,3	(HOHMANN; VAN ELDIK, 1990)
$[Pd(dap)(H_2O)_2]^{2+}$	5,62	9,35	(SHOUKRY <i>et al.</i> , 1999)
$[Pd(pic)(H_2O)_2]^{2+}$	4,43	8,64	(RAU; SHOUKRY; VAN ELDIK, 1997)
$[Pd(2,2\text{-bipy})(H_2O)_2]^{2+}$	3,91	8,39	(SHEHATA, 2001)
(1)	3,95	8,29	Este trabalho

Fonte: O autor.

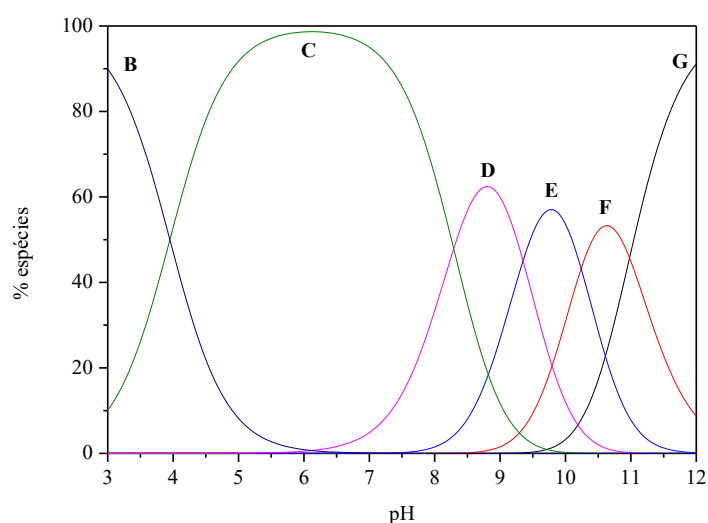
en, dap, pic e 2,2-bipy representam a 1,2-etilenodiamina, 1,2-diaminopropano, 2-(aminometil)piridina e 2,2'-bipiridina, respectivamente.

Figura 25 – Proposta para os equilíbrios e espécies (A-G) observados no complexo (1) em solução CH_3CN/H_2O (1/1; v/v). $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl) à 25 °C



Fonte: O autor.

Figura 26 – Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o complexo (1).

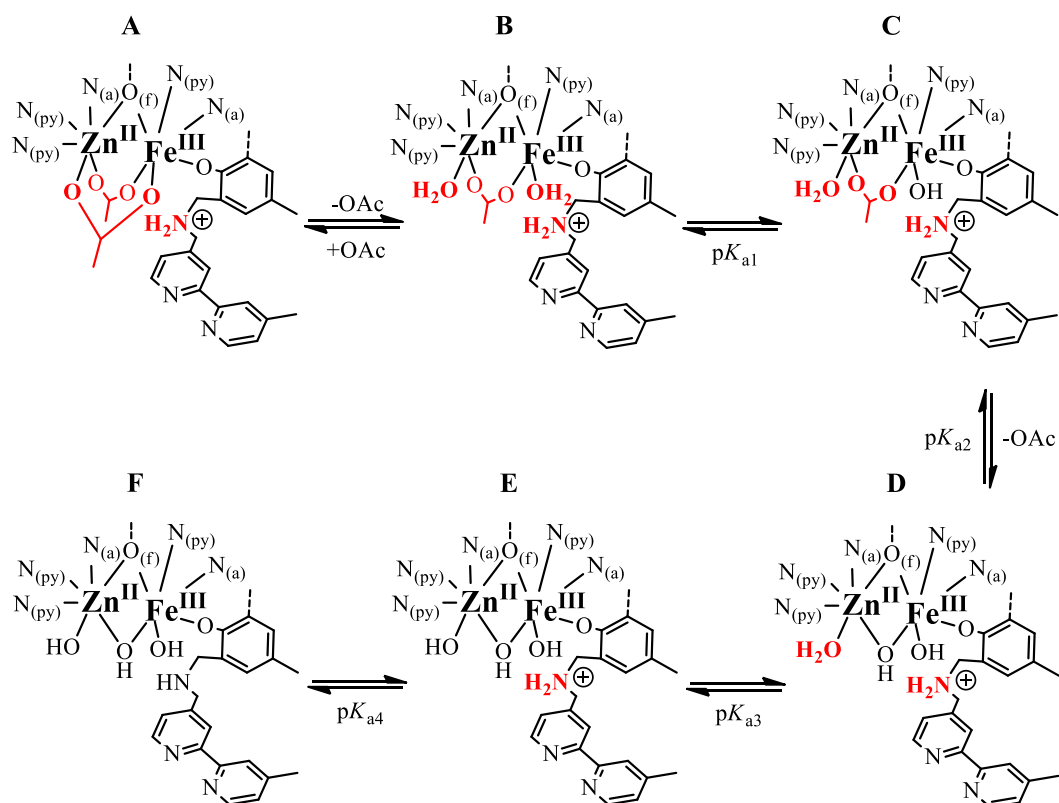


Fonte: O autor.

Nota: As estruturas das espécies B-G podem ser observadas na Figura 25.

Para o complexo (2), segundo o esquema apresentado na Figura 27, inicialmente é observado a liberação de uma das pontes acetato e coordenação de uma molécula de água em cada centro metálico Fe^{III} e Zn^{II} . Deste modo, o primeiro $\text{p}K_{\text{a}}$ pode ser atribuído a desprotonação de uma molécula de água coordenada ao Fe^{III} . Em seguida, ocorre a liberação da segunda ponte $\mu\text{-OAc}$ e a consequente formação de uma ponte $\mu\text{-OH}$, proveniente de uma molécula de água desprotonada presente no meio reacional. Esta espécie pode ser considerada a espécie ativa em solução frente aos testes de reatividade com o substrato 2,4-BDNPP. O terceiro $\text{p}K_{\text{a}}$ pode ser atribuído à desprotonação da molécula de água ligada ao íon metálico Zn^{II} ($\text{p}K_{\text{a}3} = 8,32$) e, por último, foi observado um $\text{p}K_{\text{a}}$ em 9,08 atribuído à protonação/desprotonação da amina secundária.

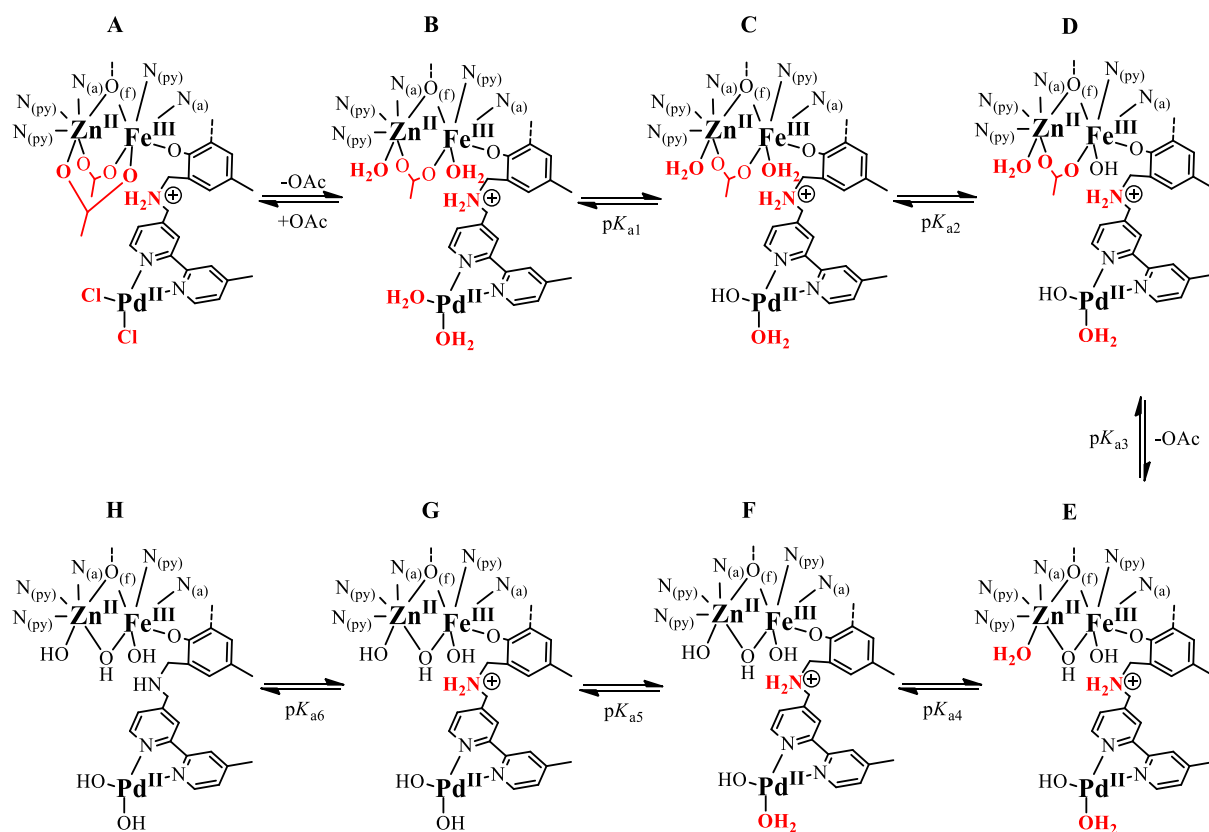
Figura 27 – Proposta para os equilíbrios e espécies (A-F) observados no complexo (2) em solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1; v/v). $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl) à 25°C



Fonte: O autor.

Uma proposta para os equilíbrios observados em solução para o complexo (3) pode ser observada na Figura 28. Do mesmo modo que ocorre no complexo (2), sugere-se que inicialmente, apenas uma das pontes $\mu\text{-OAc}$ é hidrolisada, formando a espécie B. Observa-se o primeiro $\text{p}K_{\text{a}}$ em 4,05, atribuído à desprotonação de uma molécula de água coordenada ao Pd^{II} . O $\text{p}K_{\text{a}2}$ corresponde à desprotonação de uma molécula de água ligada ao íon Fe^{III} , com a formação da espécie D. O terceiro é observado em 5,79, atribuído a desprotonação de uma molécula de água para a formação da ponte $\mu\text{-OH}$, imediatamente após a saída da segunda ponte acetato, correspondendo à espécie E ativa frente a hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP. A quarta constante de dissociação ($\text{p}K_{\text{a}4} = 7,98$), corresponde à desprotonação da outra molécula de água ligada ao Zn^{II} , onde a espécie F é formada. Por fim, o $\text{p}K_{\text{a}5}$ e o $\text{p}K_{\text{a}6}$ correspondem, respectivamente, à desprotonação da segunda molécula de água ligada ao Pd^{II} e à desprotonação da amina secundária.

Figura 28 – Proposta para os equilíbrios e espécies (A-H) observados no complexo (3) em solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1; v/v). $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl) à $25 \text{ }^\circ\text{C}$



Fonte: O autor.

Para os complexos (2) e (3), os valores dos $\text{p}K_a$ encontrados para a molécula de água ligada ao Fe^{III} (5,04 e 4,80, respectivamente) são semelhantes aos valores obtidos para sistemas similares já reportados na literatura (Tabela 14). O menor valor deste $\text{p}K_a$ para o complexo (3), em relação ao (2), indica um aumento na acidez da água ligada ao Fe^{III} , corroborando com o comportamento observado pela espectroscopia na região do ultravioleta e visível e na eletroquímica. Deste modo, este aumento de acidez desloca a banda do tipo TCLM para comprimento de onda menor e altera o potencial redox $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$, provocando um deslocamento anódico de 0,048 V (ver Seção 4.2.9). Outra explicação relevante no maior valor do $\text{p}K_a$ da água ligada ao Fe^{III} para o complexo (2) está no fato de o mesmo possuir um ligante pendente com grupos piridínicos livres. Wall *et al.* (1999) notaram que o nitrogênio da piridina tende a aumentar o valor de $\text{p}K_a$ da molécula de água ligada ao metal, devido ao fato de agir como receptor de ligação de hidrogênio.

Tabela 14 – Comparação de valores de pK_a de desprotonação de moléculas de água coordenadas ao Fe^{III} e ao Zn^{II} dos complexos (2) e (3) com o de sistemas similares

	pK _a Fe ^{III} -OH ₂	pK _a Zn ^{II} -OH ₂	Referência
(2)	5,04	8,32	Este trabalho
(3)	4,80	7,98	
FeZn(enzima)	5,4	7,1	(MERKX; AVERILL, 1998)
[Fe ^{III} (μ-OH)Zn ^{II} (L ¹)]	5,07	8,21	(PIOVEZAN <i>et al.</i> , 2010)
[Fe ^{III} Zn ^{II} (μ-OH)(H ₂ O)L-NO ₂]	5,0	8,3	(PERALTA <i>et al.</i> , 2010)
[Fe ^{III} Zn ^{II} (μ-OH)(H ₂ O)L-CH ₃]	5,5	8,7	(PERALTA <i>et al.</i> , 2010)
[(OH)Fe ^{III} (μ-OH)Zn ^{II} (H ₂ O)(L ₁ bpea-amig)]	5,67	8,06	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2019)
[(OH)Fe ^{III} (μ-OH)Zn ^{II} (H ₂ O)(L ₁ bpea-apur)]	6,06	7,43	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2019)
FeZnLAB	4,08	7,61	(CAMARGO <i>et al.</i> , 2018)
FeZnLP1	4,21	6,85	(CAMARGO <i>et al.</i> , 2018)
[Fe ^{III} Zn ^{II} (BPPMP)(μ-OAc) ₂]	4,86	7,22	(LANZMASTER <i>et al.</i> , 2002)

L1 = H₂L¹: 2-bis[{(2-piridilmetil)aminometil}-6- {(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)} aminometil]-4-metilfenol
 L-NO₂ = H₂L-NO₂: 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)(2-hidroxi-5-nitrobenzil)aminometil]fenol

L-CH₃ = H₂L-CH₃: 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)(2-hidroxi-5-metilbenzil)aminometil]phenol

L₁bpea-amig = H₂L₁bpea-amig: 2-(3-(((3-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridina 2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzilideno) hidrazinacarboximidamida

L₁bpea-apur = H₂L₁bpea-apur: 2-((2-(9H-purin-6-ilamino)etilamino)metil)-6-(((3-((bis(2-(piridin-2-il)etil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol

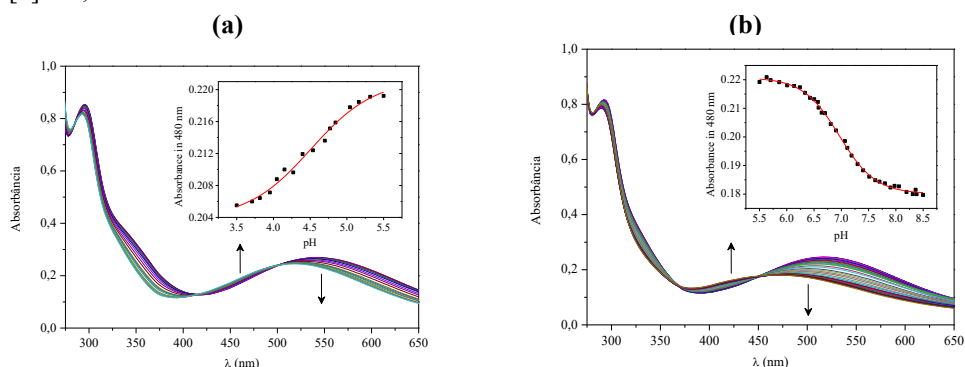
LAB = H₂LAB: 2-(((3-(((4-aminobutil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilfenil)metil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol

LP1 = H₂LP1: 2-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-6-[[{(2-hidroxi-5-metil-3-[(4-[(piren-1-ilmetil)amino]butil)amino]metil)fenil}metil)(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol

BPPMP = H₂BPPMP: 2-bis[{(2-piridilmetil)-aminometil}-6- {(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)}-aminometil]-4-metilphenol

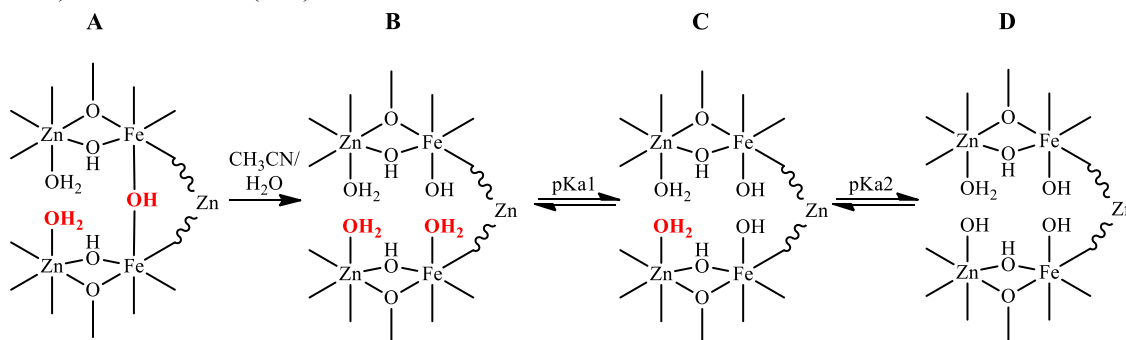
A determinação dos valores das constantes de desprotonação (pK_a) das moléculas de água coordenadas aos centros metálicos para o complexo (4) também foi realizada através do método espectrofotométrico na região do ultravioleta e visível em solução de CH₃CN/H₂O (1/1; v/v), para realizar uma comparação direta com os resultados obtidos para o complexo binuclear Fe^{III}Zn^{II}L²-et (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017). A partir da variação do espectro eletrônico para o complexo (4) (Figura 29) foi possível obter dois valores de pK_a.

Figura 29 – Titulação espectrofotométrica do complexo (4) nas faixas de pH de 3,5-5,5 (a) e 5,5-8,5 (b). Adições de 0,1 mol L⁻¹ de solução de NaOH em uma solução do complexo (4) em CH₃CN/H₂O (1/1; v/v) com I = 0,1 mol L⁻¹ (KCl). [4] = 5,4 × 10⁻⁴ mol L⁻¹



Uma proposta para os equilíbrios observados em solução para o complexo (4) pode ser observada na Figura 30. Sugere-se que inicialmente, a ponte $\mu\text{-OH}$ entre os dois centros de Fe^{III} é hidrolisada, formando a espécie $[(\text{H}_2\text{O})\text{Zn}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH}_2)\text{-(HO)Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)]$. Em pH 4,52 observa-se o primeiro $\text{p}K_{\text{a}}$, correspondente à desprotonação de uma molécula de água coordenada ao Fe^{III} , formando a espécie $[(\text{H}_2\text{O})\text{Zn}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH})\text{-(HO)Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)]$. O aumento do valor deste $\text{p}K_{\text{a}}$, em relação ao complexo binuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-et}$ ($\text{p}K_{\text{a}1} = 4,15$) (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017), pode estar relacionado com um possível acoplamento do tipo antiferromagnético entre os $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Fe}^{\text{III}}$, onde a acidez do íon Fe^{III} seria então diminuída. O segundo $\text{p}K_{\text{a}2}$ pode ser atribuído a desprotonação de uma molécula de água coordenada ao Zn^{II} em pH 6,96, onde é formada a espécie $[(\text{HO})\text{Zn}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH})\text{-(HO)Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)]$.

Figura 30 – Proposta para os equilíbrios e espécies (A-D) observados no complexo (4) em solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1; v/v). $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl) à 25 °C



Fonte: O autor.

Analisando os resultados obtidos pelas titulações potenciométrica ((2) e (3)) e espectrofotométrica (4), foi possível inferir que estes complexos possuem grupos hidroxila para atuar como nucleófilos em condições brandas de pH (4 a 9). Os valores encontrados à desprotonação de uma molécula de água ligada ao íon Fe^{III} encontram-se dentro do esperado para complexos similares já descritos na literatura, onde a variação de grupos substituintes ligados ao fenolato terminal alteram de forma considerável o valor da constante. Para os valores de $\text{p}K_{\text{a}}$ correspondentes à desprotonação da outra molécula de água ligada ao Zn^{II} , apresentaram-se consideravelmente mais ácidos. Esta diminuição nos valores é consistente com efeitos de segunda esfera de coordenação, como relatado anteriormente, em que os autores justificam que a presença dos grupos amino carregados (protonados) afetam a constante de protonação do íon divalente (CAMARGO *et al.*, 2018; DE SOUZA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2019; SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017).

No presente estudo, acreditamos que a influência de segunda esfera de coordenação deve-se não a presença de aminas protonadas e sim, pela influência de um terceiro metal da segunda esfera de coordenação do complexo. Isto pode ser evidenciado ao compararmos os valores de pK_a , correspondentes à desprotonação da molécula de água ligada ao Zn^{II} , entre os complexos (2) e (3). Deste modo, a presença do metal Pd^{II} , na segunda esfera de coordenação, diminui significativamente a acidez do Zn^{II} . O mesmo é observado pela presença de um terceiro Zn^{II} no complexo pentanuclear (4), em comparação ao complexo binuclear $Fe^{III}Zn^{II}L^2$ -et) (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017).

4.2.8 Condutimetria

As medidas de condutividade molar (Λ_M) para os complexos (2) e (3) foram efetuadas em soluções recém preparadas em acetonitrila espectroscópica com concentrações $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} a 25 °C. Foram encontrados os valores de condutividade molar de 159 e 157 $\mu S\ cm^{-1}$ aos complexos (2) e (3), respectivamente. Valores de condutividade molar na faixa de 120-160 $\mu S\ cm^{-1}$ são típicos de soluções de eletrólito 1:1 em acetonitrila a 25 °C e em concentração $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} (GEARY, 1971). O complexo (1) apresentou valor de condutividade molar de 9 $\mu S\ cm^{-1}$ indicando que se comporta como um não eletrólito.

Deste modo, pode-se constatar que os complexos (2) e (3) apresentam-se como cátions complexos monovalentes (carga líquida 1+) e um ânion perclorato como contra-íon. Esta análise foi fundamental para a comprovação da desprotonação dos anéis aromáticos dos grupos fenólicos terminais, também confirmado pela espectroscopia na região do infravermelho (vide seção 4.2.3) e pelas análises elementares de CHN (Seção 4.2.4).

Para o complexo (4) não foi possível obter uma resposta conclusiva, devido à possibilidade de mistura de espécies protonada e desprotonada, mesmo o meio sendo em solvente aprótico.

4.2.9 Eletroquímica

O comportamento eletroquímico dos complexos (1), (2), (3) e (4) foi investigado por voltametria de onda quadrada. Os voltamogramas de onda quadrada para os complexos foram obtidos em solução de acetonitrila. Apesar da alteração de diversos parâmetros, não foi possível obter respostas eletroquímicas razoáveis utilizando solvente em condições de reatividade

(acetonitrila/água (1/1; v/v)) e nem utilizando a técnica de voltametria cíclica, para os complexos aqui estudados.

Os processos eletroquímicos observados referem-se à redução dos íons Fe^{III} e Pd^{II} , uma vez que o íon Zn^{II} é inativo eletroquimicamente na faixa de potencial utilizada. Os voltamogramas dos complexos (1), (2) e (3) são apresentados na Figura 31, e o do complexo (4) é apresentado na Figura 32. Todos os potenciais redox estão resumidos na Tabela 15. Os valores foram referenciados ao eletrodo normal de hidrogênio, para permitir a comparação entre os potenciais determinados em meio orgânico e aquoso, a partir do uso do padrão interno ferroceno ($E_{1/2} = 0,400 \text{ V vs NHE}$) (GAGNE; KOVAL; LISENSKY, 1980).

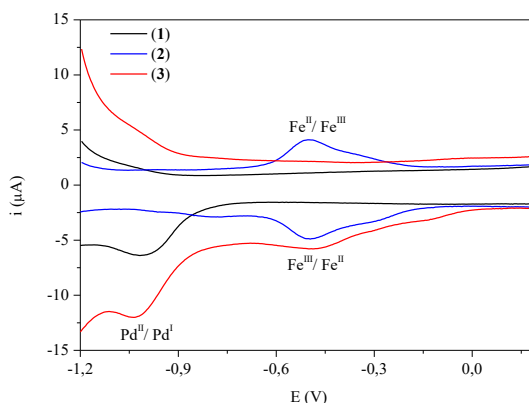
Tabela 15 – Potenciais redox (em V, relativo ao padrão interno NHE determinados através de voltametria de onda quadrada para os complexos (1), (2), (3) e (4) em solução de acetonitrila e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de $n\text{-Bu}_4\text{NPF}_6$ como eletrólito suporte

Complexo	E (V) vs NHE			
	E_{pc}^1	E_{pa}^1	E_{pc}^2	E_{pa}^2
(1)	-		-980	
(2)	-496	-492		
(3)	-446		-994	
(4)	-472	-466	-964	-964

Fonte: O autor.

O voltamograma de onda quadrada do complexo (1), mostra a presença de um processo redox irreversível. No potencial de $-0,980 \text{ V vs NHE}$ ($-1,380 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$) aparece uma única onda catódica irreversível, relacionada ao processo de redução do tipo $\text{Pd}^{\text{II}} + e^- \rightleftharpoons \text{Pd}^{\text{I}}$. Este valor está de acordo com o determinado para o complexo $[(\text{bipy})\text{PdCl}_2]$ ($-1,320 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$) (ZVIRZDINAITE *et al.*, 2017), apresentando um deslocamento catódico de $0,060 \text{ V vs ENH}$. Este comportamento pode ser explicado pela presença do substituinte metil na posição *para* ao nitrogênio bipyridina, que realiza um efeito indutivo positivo ao metal paládio dificultando, portanto, o processo de redução. Efeito semelhante foi observado na variação de substituinte na posição *para* ao oxigênio fenólico terminal do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L-R})]$ ($\text{R} = -\text{CH}_3, -\text{H}, -\text{Br}, -\text{NO}_2$). Assim, o efeito indutivo positivo exercido pelo substituinte metila resultou em uma maior estabilização do estado de oxidação 3+ do centro Fe^{III} (PERALTA *et al.*, 2010).

Figura 31 – Voltamogramas de onda quadrada para os complexos (1), (2) e (3) ($[(1), (2) \text{ e } (3)] = 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em solução de acetonitrila e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de $n\text{-Bu}_4\text{NPF}_6$ como eletrólito suporte



Fonte: O autor.

Nota: Eletrodo de trabalho: eletrodo de carbono vítreo; eletrodo auxiliar: fio de platina; eletrodo de referência: Ag/AgCl; passo de varredura: 4 mV; amplitude: 25 mV; frequência: 15 Hz. O par Fc^+/Fc foi utilizado como padrão interno para todos os experimentos.

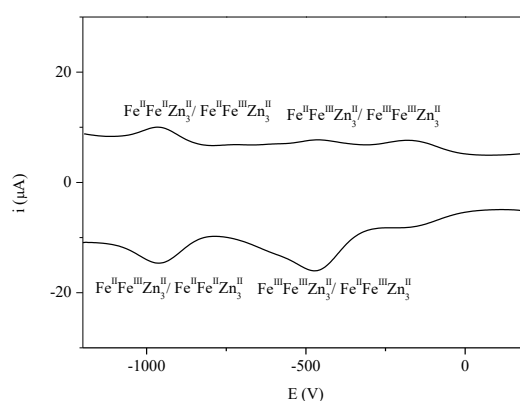
Para o complexo (2) foi observado apenas um processo redox *quasi*-reversível, que pode ser atribuído à transferência de um elétron do par redox $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{II}}\text{Zn}^{\text{II}}$. Este valor está de acordo com o processo redox do par $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{II}}\text{M}^{\text{II}}$ observado em complexos análogos para $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{II}}\text{Zn}^{\text{II}}$ ($[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})(\mu\text{-OAc})_2]^+$, $-0,910 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$) (LANZNASTER *et al.*, 2002) e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{II}}\text{Mn}^{\text{II}}$ ($[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})(\mu\text{-OAc})_2]^+$, $-0,870 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$) (KARSTEN *et al.*, 2002). A presença de pontes adicionais $\mu\text{-OAc}$ pode alterar o potencial redox e provocar um deslocamento catódico dos potenciais de redução pois, com a diminuição da densidade eletrônica sobre o íon Fe^{III} , há maior dificuldade na retirada de elétron do mesmo, aumentando o seu caráter ácido. Isto não é verificado em complexos análogos contendo ponte $\mu\text{-OH}$ que tendem a potenciais anódicos, tais como os complexos $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{bpbmpCH}_3)]^{2+}$ ($-0,197 \text{ vs ENH}$) (PERALTA *et al.*, 2010) e $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{py}_3\text{mff})^{2+}$ (JOVITO, 2010).

O voltamograma de onda quadrada do complexo (3) (Figura 31), mostra a presença de dois processos redox irreversíveis. O potencial de $-0,446 \text{ V vs ENH}$ ($-0,846 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$) para o primeiro processo redox observado, é deslocado anodicamente ($0,048 \text{ V}$), quando comparado com o potencial redox do complexo (2). Esta observação está de acordo com os dados obtidos pela espectroscopia na região do ultravioleta e visível (Seção 4.2.6), a qual mostrou um deslocamento da banda do tipo TCLM dos orbitais p_π dos grupos fenolato para os orbitais d_{π^*} do íon Fe^{III} , para comprimento de onda menor. Em $-0,994 \text{ V vs ENH}$ ($-1,394 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$) aparece o segundo potencial, relacionada ao processo de redução do tipo $\text{Pd}^{\text{II}} + e^- \rightleftharpoons \text{Pd}^{\text{I}}$. Valor em acordo com o determinado para o complexo (1) e o complexo $[(\text{bipy})\text{PdCl}_2]$ (Tabela 15).

Embora os ambientes de primeira esfera de coordenação sejam idênticos para os complexos (2) e (3), os potenciais para a redução do par $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ encontrados diferem entre si significativamente. A presença do Pd^{II} , na segunda esfera de coordenação, pode ter interferido consideravelmente na interação com a molécula de água terminal ligada ao íon Fe^{III} , mudando a densidade eletrônica de modo a diferenciar os potenciais eletroquímicos.

Para o complexo (4), dois processos redox *quasi-reversíveis* são observados no voltamograma de onda quadrada (Figura 32): $E_{1/2}^1 = -0.468$ e $E_{1/2}^2 = -0.964$ V vs ENH (-1,364 V vs Fc^+/Fc) que podem ser atribuídos aos pares redox $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}_3^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}_3^{\text{II}}$ e $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}_3^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}\text{Zn}_3^{\text{II}}$, respectivamente. Estes valores são similares aos obtidos para os complexos de Fe_2^{III} com o ligante BBPMP, os quais apresentaram valores essencialmente idênticos com $E_{1/2}^1 = -0.570$ e $E_{1/2}^2 = -1,150$ V vs Fc^+/Fc (NEVES *et al.*, 1995). Assim, pode-se inferir que em solução pura de acetonitrila a unidade estrutural $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Fe}^{\text{III}}]$ seja mantida conforme observado na estrutura de raios X do complexo (4). No entanto, deve-se enfatizar aqui que o comportamento eletroquímico de (4) se torna muito mais difícil de interpretar quando voltamogramas de onda quadrada são obtidos em solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (não mostrado), provavelmente devido aos equilíbrios propostos na Figura 30 (Seção 4.2.7, p. 80).

Figura 32 – Voltamogramas de onda quadrada para o complexo (4) ($[(4)] = 1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}) em solução de acetonitrila e 0,1 mol L^{-1} de $n\text{-Bu}_4\text{NPF}_6$ como eletrólito suporte. O par Fc^+/Fc foi utilizado como padrão interno para todos os experimentos



Fonte: O autor.

Nota: Eletrodo de trabalho: eletrodo de carbono vítreo; eletrodo auxiliar: fio de platina; eletrodo de referência: Ag/AgCl ; passo de varredura: 4 mV; amplitude: 25 mV; frequência: 15 Hz. O par Fc^+/Fc foi utilizado como padrão interno para todos os experimentos.

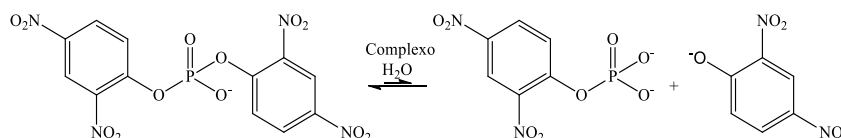
4.3 ESTUDO DE REATIVIDADE

Tendo sido devidamente caracterizados e com a especiação discutida, é importante notar que os complexos (2), (3) e (4) possuem os recursos necessários para o desenvolvimento de biomiméticos das PAPs: (i) moléculas de água lábeis para coordenar o substrato e fornecer uma molécula de H₂O ou OH⁻ como nucleófilos e, (ii) um baixo valor de pK_a para molécula de H₂O coordenada ao centro de Fe^{III}, gerando um bom nucleófilo sob condições brandas de pH (PERALTA *et al.*, 2010). Esta última característica está presente nestes três complexos sendo que, nos complexos (3) e (4), ela é fortemente influenciada pelos metais adicionais na segunda esfera de coordenação, como observado nos valores obtidos de pK_a (Seção 4.2.7).

Os complexos (2), (3) e (4) foram testados quanto às suas propriedades catalíticas como hidrolases sintéticas, envolvendo o substrato modelo bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP) (BUNTON; FARBER, 1969). Para o complexo (1), foi avaliado o efeito de pH na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP e, como resultado, não foi observado nenhuma atividade catalítica, Deste modo, nenhum estudo adicional de reatividade foi realizado para o mesmo.

A atividade catalítica dos complexos (2), (3) e (4) foi avaliada sob condições de excesso de substrato a 25 °C. Para obtenção dos parâmetros cinéticos utilizou-se o método das velocidades iniciais (PISZKIEWICZ, 1977). As reações foram monitoradas por método espectrofotométrico a partir da conversão do 2,4-BDNPP ao íon 2,4-dinitrofenolato (2,4-DNP) como produto, conforme ilustrado na Figura 33, pelo acompanhamento do incremento da absorbância em 400 nm (BATISTA *et al.*, 2003; PERALTA *et al.*, 2010).

Figura 33 – Esquema ilustrativo para a reação hidrolítica do substrato modelo 2,4-BDNPP catalisada pelos complexos (2), (3) e (4).



Fonte: O autor.

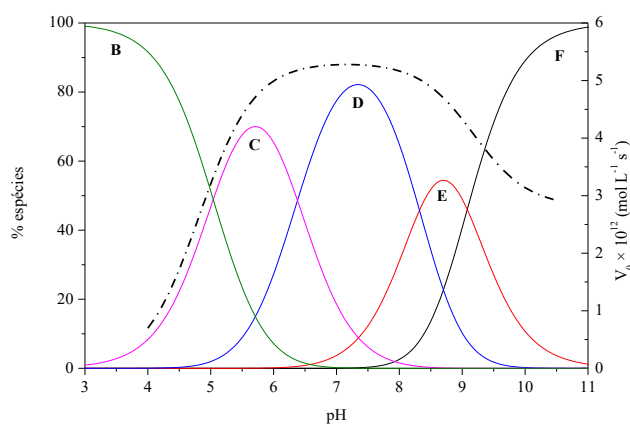
A concentração de 2,4-DNP foi calculada com base nos valores obtidos de absorbância e do coeficiente de absorção em cada pH (pH's/ $\epsilon_{400 \text{ nm}}$, mol L⁻¹ cm⁻¹: 3,5/2.125; 4,0/3.410; 4,5/7.180; 5,0/10.080; 5,5/11.400; 6,0/12.000; 6,5-10,0/12.100) (BATISTA *et al.*, 2003; PERALTA *et al.*, 2010). A contribuição devido à hidrólise não catalisada do substrato foi

compensada através da diferença direta de uma reação sob condições idênticas na ausência do catalisador.

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

O primeiro estudo de reatividade realizado com os complexos (2), (3) e (4) foi verificar o efeito do pH na atividade catalítica. Estes experimentos são importantes não só para analisar o pH no qual a atividade é máxima, mas também no sentido de discutir a especiação do sistema na catálise. As velocidades iniciais da atividade catalítica dos complexos para a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP mostrou uma forte dependência de pH. Os gráficos gerados pelas variações das velocidades iniciais (V_0) em função do pH (Figuras 34, 35 e 36) forneceram curvas em forma de “sino” para todos os complexos e com atividade máxima em pH 7,0. Esse comportamento é semelhante aos resultados relatados anteriormente para outros complexos análogos de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ (CAMARGO *et al.*, 2018; LANZNASTER *et al.*, 2002; MITIĆ *et al.*, 2006; PERALTA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2017) e para as enzimas equivalentes (BECK *et al.*, 1986; MITIĆ *et al.*, 2006; PEDROSO, MARCELO M. *et al.*, 2016; SELLECK *et al.*, 2017).

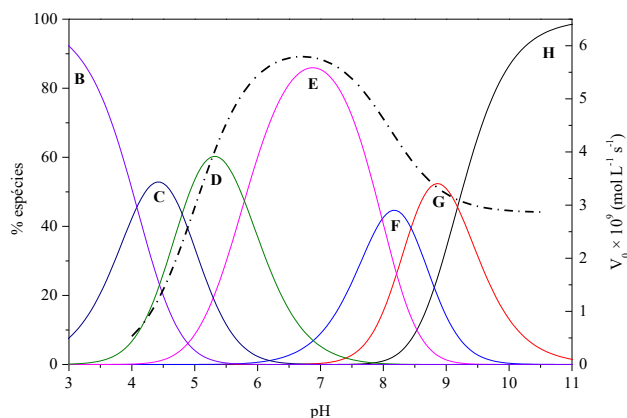
Figura 34 – Dependência das velocidades iniciais em função do pH na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada pelo complexo (2) $[(2)]_{\text{final}} = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[2,4\text{-BDNPP}]_{\text{final}} = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{tampões } 4,0\text{-}10,5]_{\text{final}} = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1; v/v) à 25 °C (linha pontilhada). As distribuições das espécies correspondentes são mostradas em linhas sólidas



Fonte: O autor.

Nota: As estruturas das espécies B-F podem ser observadas na Figura 27 – p. 77.

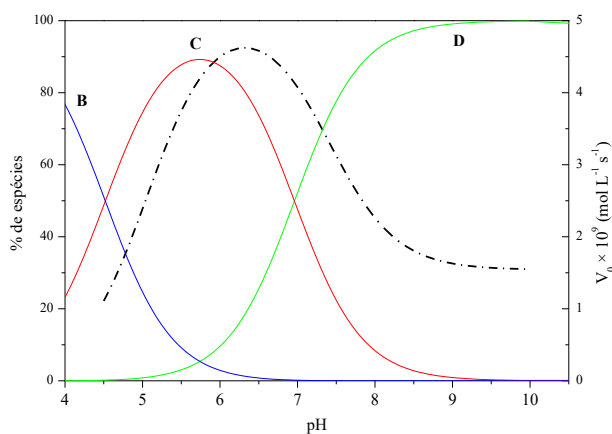
Figura 35 – Dependência das velocidades iniciais em função do pH na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada pelo complexo (3) $[(3)]_{\text{final}} = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[2,4\text{-BDNPP}]_{\text{final}} = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{tampões } 4,0\text{-}10,5]_{\text{final}} = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1; v/v) à 25 °C (linha pontilhada). As distribuições das espécies correspondentes são mostradas em linhas sólidas



Fonte: O autor.

Nota: As estruturas das espécies B-H podem ser observadas na Figura 28 – p. 78.

Figura 36 – Dependência das velocidades iniciais em função do pH na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada pelo complexo (4) $[(4)]_{\text{final}} = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[2,4\text{-BDNPP}]_{\text{final}} = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{tampões } 4,0\text{-}10,5]_{\text{final}} = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em solução de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1; v/v) à 25 °C (linha pontilhada). As distribuições das espécies correspondentes são mostradas em linhas sólidas



Fonte: O autor.

Nota: As estruturas das espécies B-D podem ser observadas na Figura 30 – p. 80.

Estes resultados e os propostos na Seção 4.2.7 são indicativos de que, para os complexos estudados, a espécie ativa contém, em solução, uma molécula de água ligada ao Zn^{II} e um íon hidróxido ligado ao metal Fe^{III} , ou seja, a velocidade da reação é máxima no pH onde prevalece a maior concentração da espécie $\{(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)\}$. Em pH entre 4 e 6,5

ocorre a formação do íon hidróxido ligado ao Fe^{III}, responsável pelo ataque nucleofílico, o que se reflete no aumento do valor de V₀. Em pH alcalino, ocorre a desprotonação da molécula de água do Zn^{II} gerando a espécie completamente desprotonada [(HO)Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II}(OH)], o que dificulta a coordenação do substrato devido a labilidade do hidróxido em relação à água.

Os dados obtidos foram ajustados de acordo com a Equação 1 (KANTACHA *et al.*, 2011) e os valores de pK_a cinéticos obtidos a partir deste ajuste estão resumidos na Tabela 16. Para os complexos (2) e (3) o primeiro pK_a cinético pode ser atribuído a desprotonação da molécula de água ligada ao íon Fe^{III}, gerando o nucleófilo responsável pelo ataque ao átomo de fósforo do substrato modelo 2,4-BDNPP. O segundo pK_a cinético se refere a desprotonação da molécula de água ligada ao Zn^{II}. O aumento no pK_a cinético, em relação ao potenciométrico, pode ser justificado pela menor influência do grupo lateral pendente sobre a molécula de água coordenada ao Fe^{III}.

$$V = V_0 \frac{1 + \gamma K_{a2}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} + \frac{K_{a2}}{[H^+]}} \quad \text{Equação 1}$$

Tabela 16 – Correlação entre os valores de pK_a cinéticos e pK_a potenciométricos para os complexos (2) e (3). As constantes com índices subscritos 1 e 2 refletem a coordenação da molécula de água ao Fe^{III} e ao Zn^{II}, respectivamente

Complexo	Cinético		Potenciométrico	
	pK _{a1}	pK _{a2}	pK _{a1}	pK _{a2}
(2)	5,42 ± 0,21	8,55 ± 0,15	5,04 ± 0,12	8,32 ± 0,08
(3)	5,15 ± 0,27	8,18 ± 0,19	4,80 ± 0,15	7,98 ± 0,06

Fonte: O autor.

A diminuição do valor do pK_{a1} cinético do complexo (4) em relação ao complexo binuclear Fe^{III}Zn^{II}L²-et [11,21], pode estar relacionado com a possibilidade de não ocorrer mais o acoplamento do tipo antiferromagnético entre os Fe^{III}-Fe^{III}, onde a acidez do íon Fe^{III} seria então aumentada. Os valores encontrados de pK_a cinéticos do complexo (4) estão sumarizados na Tabela 17 e, a distribuição de espécies mostrada na Figura 36, reforçam a ideia de que o comportamento do complexo pentanuclear é semelhante ao de complexos binucleares de Fe^{III}Zn^{II}.

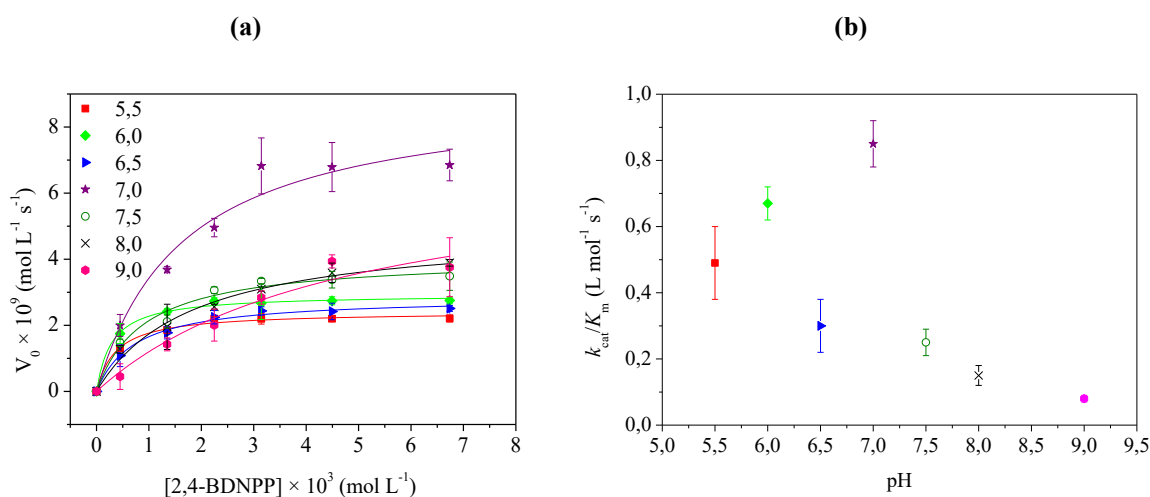
Tabela 17 – Correlação entre os valores de pK_a cinéticos e pK_a potenciométricos para os complexos $Fe^{III}Zn^{II}L^2$ -et e (4). As constantes com índices subscritos 1 e 2 refletem a coordenação da molécula de água ao Fe^{III} e ao Zn^{II} , respectivamente

Complexo	pK_{a1} Cinético	pK_{a2}	pK_{a1} Espectrofotométrico	pK_{a2}
$Fe^{III}Zn^{II}L^2$ -et (SILVA <i>et al.</i> , 2017)	$5,95 \pm 0,09$	$7,81 \pm 0,06$	$4,15 \pm 0,03$	$7,31 \pm 0,06$
(4)	$4,88 \pm 0,27$	$7,57 \pm 0,21$	$4,52 \pm 0,15$	$6,96 \pm 0,12$

4.3.2 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 na reação de hidrólise, promovida pelos complexos (2) e (3) foi investigada nos valores de pH 5,5 a 9,0. Para o complexo (4), somente foi avaliado o efeito da concentração do substrato em pH 7,0. As Figura 37 e 38 apresentam a dependência da velocidade da reação de hidrólise em função de cada pH e da variação da concentração do substrato 2,4-BDNPP catalisada pelos complexos (2) e (3), respectivamente. A curva de dependência da velocidade da reação de hidrólise na variação da concentração do substrato 2,4-BDNPP catalisada pelo complexo (4) pode ser observada na Figura 39.

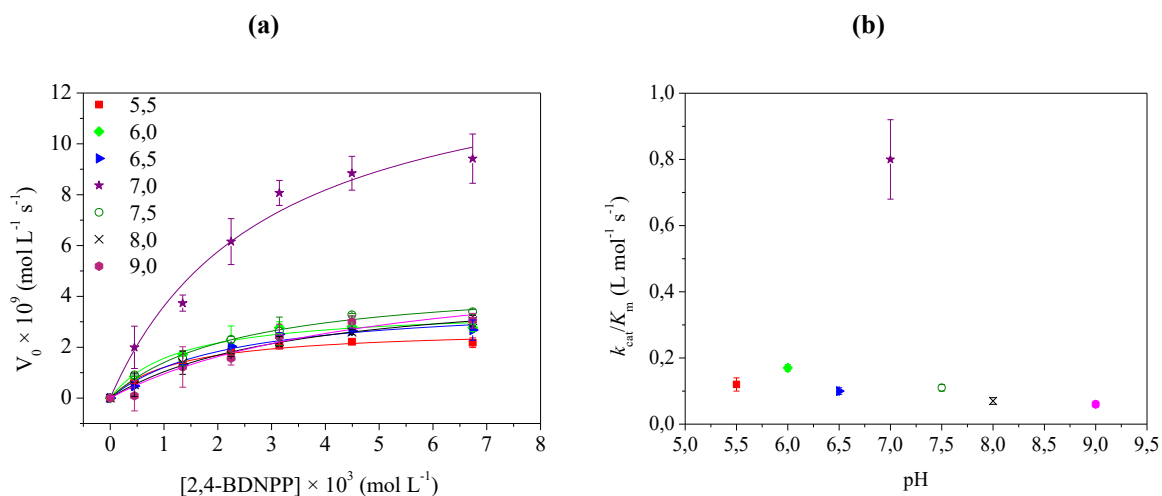
Figura 37 – Curvas da dependência da velocidade da reação de hidrólise, em diversos valores de Ph (5,5 – 9,0), em função da variação da concentração do substrato 2,4-BDNPP (a) e dependência da eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) obtida em cada valor de pH (5,5 – 9,0) para o complexo (2) (b)



Fonte: O autor.

Condições: solução CH_3CN/H_2O (1/1; v/v); [(2)] = $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; [2,4-BDNPP] = $0,12$ a $6,74 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; [tampão] = $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (MES pH 5,5 – 6,5; HEPES pH 7,0 – 8,0 e CHES pH 9,0); $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($LiClO_4$) a $25^\circ C$.

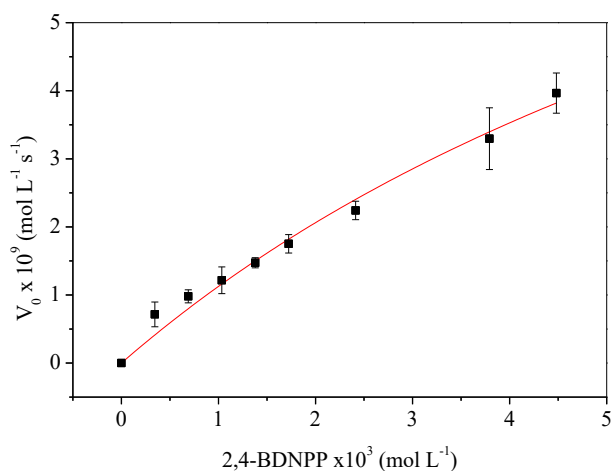
Figura 38 – Curvas da dependência da velocidade da reação de hidrólise, em diversos valores de pH (5,5 – 9,0), em função da variação da concentração do substrato 2,4-BDNPP (a) e dependência da eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) obtida em cada valor de pH (5,5 – 9,0) para o complexo (3) (b)



Fonte: O autor.

Condições: solução CH₃CN/H₂O (1/1; v/v); [(3)] = $1,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; [2,4-BDNPP] = 0,12 a $6,74 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; [tampão] = 0,05 mol L⁻¹ (MES pH 5,5 – 6,5; HEPES pH 7,0 – 8,0 e CHES pH 9,0); I = 0,05 mol L⁻¹ (LiClO₄) a 25 °C.

Figura 39 – Curva da dependência da velocidade da reação de hidrólise na variação da concentração do substrato 2,4-BDNPP catalisada pelo complexo (4)



Fonte: O autor.

Condições: solução CH₃CN/H₂O (1/1; v/v); [(4)] = $1,25 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; [2,4-BDNPP] = 0,35 a $4,48 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; [tampão] = 0,05 mol L⁻¹ (HEPES pH 7,0); I = 0,05 mol L⁻¹ (LiClO₄) a 25 °C.

Para ambos os complexos, pode-se observar que as velocidades iniciais seguem uma tendência de saturação com o aumento da concentração do substrato 2,4-BDNPP. Este tipo de perfil é característico de sistemas enzimáticos, onde há um pré-equilíbrio de associação do catalisador com o substrato (intermediário complexo-substrato).

Deste modo, o modelo de Michaelis-Menten pôde ser aplicado para os sistemas testados. Os dados foram ajustados pela equação não-linear de Michaelis-Menten (Equação 2), a qual forneceu os parâmetros cinéticos K_m e k_{cat} . As constantes obtidas pelo ajuste da equação às curvas e a eficiência catalítica estão listadas na Tabela 18.

$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad \text{Equação 2}$$

Conforme se observa na Tabela 18 e nas Figura 37 e 38, fica comprovado que os complexos (2) e (3) apresentaram atividade máxima em pH 7,0, assim como observado na análise do efeito do pH na hidrólise do 2,4-BDNPP (Seção 4.3.1). Estes complexos apresentaram atividade catalítica semelhantes que é ocasionada pela formação da espécie ativa em valores próximos de pH, ou seja, resulta numa similaridade na força do nucleófilo nos complexos (PERALTA *et al.*, 2010).

Tabela 18 – Parâmetros cinéticos obtidos e calculados na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada pelos complexos (2), (3) e (4)

Complexo	pH	$V_{max} \times 10^9$ (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	$K_m \times 10^3$ (mol L ⁻¹)	$k_{cat} \times 10^4$ (s ⁻¹)	$E = k_{cat}/K_m$ (L mol ⁻¹ s ⁻¹)
(2)	5,5	2,19 ± 0,15	0,26 ± 0,07	1,21 ± 0,08	0,49 ± 0,11
	6,0	2,78 ± 0,09	0,23 ± 0,11	1,55 ± 0,05	0,67 ± 0,05
	6,5	2,48 ± 0,12	0,48 ± 0,14	1,38 ± 0,07	0,30 ± 0,08
	7,0	7,01 ± 0,12	0,35 ± 0,03	2,92 ± 0,05	0,85 ± 0,07
	7,5	4,10 ± 0,21	0,93 ± 0,19	2,28 ± 0,12	0,25 ± 0,04
	8,0	4,95 ± 0,42	1,87 ± 0,48	2,75 ± 0,23	0,15 ± 0,03
	9,0	7,08 ± 0,26	4,96 ± 0,96	3,93 ± 0,15	0,08 ± 0,01
	(3)	5,5	2,78 ± 0,21	1,32 ± 0,32	1,54 ± 0,11
6,0		3,34 ± 0,12	1,11 ± 0,08	1,86 ± 0,06	0,17 ± 0,01
6,5		3,87 ± 0,62	2,24 ± 0,68	2,15 ± 0,34	0,10 ± 0,01
7,0		9,81 ± 0,72	0,69 ± 0,16	5,45 ± 0,40	0,80 ± 0,12
7,5		4,71 ± 0,02	2,37 ± 0,16	2,62 ± 0,01	0,11 ± 0,01
8,0		4,59 ± 0,25	3,44 ± 0,45	2,55 ± 0,14	0,07 ± 0,01
9,0		5,74 ± 0,10	5,04 ± 0,21	3,19 ± 0,06	0,06 ± 0,01
(4)	7,0	12,2 ± 0,69	9,85 ± 0,58	8,60 ± 0,49	0,09 ± 0,01

Condições: solução CH₃CN/H₂O (1/1; v/v); [(2)] = [(3)] = 1,8 × 10⁻⁵ mol L⁻¹; [(4)] = 1,25 × 10⁻⁵ mol L⁻¹; [2,4-BDNPP] = 0,12 a 6,74 × 10⁻³ mol L⁻¹; [tampão] = 0,05 mol L⁻¹ (MES pH 5,5 – 6,5; HEPES pH 7,0 – 8,0 e CHES pH 9,0); I = 0,05 mol L⁻¹ (LiClO₄) a 25 °C.

Notas: $k_{cat} = V_{max}/[(\text{complexo})]$; $E = k_{cat}/K_m$.

Como pode ser observado na Tabela 19, a derivatização do ligante H₂py₃mff (PIOVEZAN *et al.*, 2010), através da adição do grupo biperidínico, acarretou em uma diminuição no valor de K_m quando comparado com o complexo C (Tabela 19). Sendo que, a

diminuição do valor de K_m é um indicativo do aumento da afinidade do substrato pelo catalisador. O mesmo pode ser observado ao se comparar complexos com cadeia lateral contendo grupos diaminas. Deste modo, os complexos **(2)** e **(3)** contribuem basicamente na melhoria da afinidade do substrato pelo complexo, como observado nos altos valores da constante de associação, em comparação com demais modelos análogos que abordam a primeira e segunda esfera de coordenação. Um maior valor de (K_{ass}) para o complexo **(2)**, em comparação ao **(3)**, pode ser tentativamente atribuído a presença do grupo bipyridina livre. A presença deste grupo estaria gerando uma região hidrofóbica onde o nucleófilo teria uma liberdade maior para fazer o ataque ao átomo de fósforo, o que reflete em um ligeiro aumento na eficiência catalítica. Apesar dessas semelhanças, é possível notar que o complexo **(3)** apresentou uma aceleração de 3030 vezes, contra 1620 para o complexo **(2)**, frente à velocidade de hidrólise da reação não catalisada ($k_{nc} = 1,8 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$).

Além disto, um aumento significativo no k_{cat} em relação aos complexos **A** e **B** (Tabela 19), indicam um efeito positivo no aumento da atividade catalítica em complexos com efeitos de segunda esfera de coordenação. Os menores valores de k_{cat} em relação ao complexo **C** pode ser resultado de um fator organizacional do sistema pela mobilidade da cadeia lateral (DE SOUZA *et al.*, 2015).

Deste modo, pode-se inferir que o efeito de segunda esfera de coordenação se torna mais efetivo quando o complexo contém Pd^{II} coordenado na bipyridina lateral aumentando em, aproximadamente, 50% na conversão de reagentes a produtos na reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP, estando de acordo com o objetivo proposto do trabalho.

Por fim, os maiores valores de K_{ass} para os complexos **(2)** e **(3)** em relação aos complexos que não possuem efeitos de segunda esfera de coordenação podem ser atribuídos às estabilizações das cargas originadas na hidrólise do substrato por interações predominantes do tipo π -stacking e ligações de hidrogênio nos complexos **(2)** e **(3)**, respectivamente.

Tabela 19 – Parâmetros cinéticos obtidos e calculados em função do pH ótimo na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada pelos complexos (2), (3) e (4).

Complexo	pH	$V_{\text{máx}} \times 10^9$ (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	$K_m \times 10^3$ (mol L ⁻¹)	$k_{\text{cat}} \times 10^4$ (s ⁻¹)	$E = k_{\text{cat}}/K_m$ (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	K_{ass} (mol ⁻¹ L)	$f \times 10^3$
(2)	7,0	7,01 ± 0,12	0,35 ± 0,03	2,92 ± 0,05	0,85 ± 0,07	2857	1,62
(3)	7,0	9,81 ± 0,72	0,69 ± 0,16	5,45 ± 0,40	0,80 ± 0,12	1449	3,03
A	6,0		0,82	1,6	0,20	1220	0,18
B	6,5		2,22	2,02	0,09	450	1,12
C	7,0	18,5	3,55	9,02	0,25	282	5,01

Condições: solução CH₃CN/H₂O (1/1; v/v); [(2)] = [(3)] = 1,8 × 10⁻⁵ mol L⁻¹; [2,4-BDNPP] = 0,12 a 6,74 × 10⁻³ mol L⁻¹; [tampão] = 0,05 mol L⁻¹ (MES pH 5,5 – 6,5; HEPES pH 7,0 – 8,0 e CHES pH 9,0); I = 0,05 mol L⁻¹ (LiClO₄) a 25 °C.

Notas: $k_{\text{cat}} = V_{\text{máx}}/[(\text{complexo})]$; $E = k_{\text{cat}}/K_m$; $K_{\text{ass}} = 1/K_m$; $f = K_{\text{cat}}/k_{\text{nc}}$. $K_{\text{nc}} = 1,80 \times 10^{-7}$ s⁻¹.

A - FeZnLAB - H₂LAB = 2-({[(3-{{[(4-aminobutil)amino]metil}-2-hidroxi-5-metilfenil)metil](piridin-2-ilmetil)amino}metil]-6-{{[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil}-4-metilfenol (CAMARGO, 2013).

B - FeZnH₂LHex - H₂LHex = 2-({[(3-{{[(6-aminohexil)amino]metil}-2-hidroxi-5-metilfenil)metil](piridin-2-ilmetil)amino}metil]-6-{{[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil}-4-metilfenol (HEYING, 2014).

C [Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II}(py₃mff)] - H₂py₃mff = 2-[N-bis-(2-piridilmetil)-aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil] fenol (PIOVEZAN *et al.*, 2010).

Para o complexo (4), como pode ser observado na Tabela 20, a constante catalítica encontrada é magnitude semelhante se comparado ao complexo análogo binuclear [Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II}(L²-et)] com o mesmo ligante (H₂L²-et) e aos complexos D e E, com ligantes diferentes. De fato, o alto valor de K_m (baixa associação do substrato) diminui significativamente a eficiência catalítica em valores de pH semelhantes. Outro fator interessante é diminuição da constante de associação, o que indica que a entrada do substrato é então prejudicada. De acordo com a estrutura proposta na Seção 4.2.1, o complexo (4) apresenta um arranjo pentanuclear bastante distinto e assim, possivelmente a falta de orientação espacial adequada entre o substrato e o nucleófilo de cada uma das unidades diméricas ou restrições estéricas na estrutura podem interferir nos aspectos catalíticos.

Um fato interessante a comentar é que na ausência do terceiro Zn^{II}, o valor de K_M é de 1,61 × 10⁻³ mol L⁻¹ (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017) enquanto que a partir da formação do complexo pentanuclear e da presença do terceiro Zn^{II}, o valor de K_m aumenta para 9.85 × 10⁻³ mol L⁻¹. A este respeito, a metalohidrolase Rv805 é totalmente ativa no centro binuclear “convencional”, mas a presença de um terceiro metal, o Ca^{II}, atua como um modulador da atividade enzimática da Rv805. O Ca^{II} pode se ligar em um local distinto na enzima, mas próximo ao centro binuclear, podendo alterar o nível de sua reatividade com a ausência ou presença do mesmo (PEDROSO, MARCELO M. *et al.*, 2016). Embora tenha sido especulado que a presença do terceiro Zn^{II} possa ter um reflexo na atividade catalítica no caso do complexo (4), esse metal pode exercer influência estrutural e relevância catalítica na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP, com valores mais altos de K_m e mais baixos de k_{cat}/K_m . Entretanto, o complexo (4)

apresenta maiores valores de k_{cat} e k_{cat}/K_m quando comparado com o complexo tetranuclear de Zn^{II} (complexo F), em que o mesmo substrato e valor de pH ótimo igual a 8,5 são empregados (MENDES *et al.*, 2016).

Tabela 20 – Parâmetros cinéticos obtidos e calculados em função do pH ótimo na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada pelos complexos (4) e similares

Complexo	pH	$V_{m\acute{a}x} \times 10^9$ (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	$K_m \times 10^3$ (mol L ⁻¹)	$k_{cat} \times 10^4$ (s ⁻¹)	$E = k_{cat}/K_m$ (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	K_{ass} (mol ⁻¹ L)	$f \times 10^3$
(4)	7,0	12,2 ± 0,69	9,85 ± 0,58	8,60 ± 0,49	0,087	102	4,78
[Fe ^{III} (μ-OH)Zn ^{II} (L ² -et)]	7,0		1,61 ± 0,19	11,2 ± 0,56	0,696	621	6,22
D	6,5		4,20	9,13	0,217	238	5,07
E	6,5		7,4 ± 0,6	16 ± 0,2	0,216	135	9,06
F	8,5		4,4 ± 1	1,28	0,029	227	0,71

Condições: solução CH₃CN/H₂O (1/1; v/v); [(4)] = 1,25 × 10⁻⁵ mol L⁻¹; [2,4-BDNPP] = 0,35 a 4,48 × 10⁻³ mol L⁻¹; [tampão] = 0,05 mol L⁻¹ (HEPES pH 7,0); I = 0,05 mol L⁻¹ (LiClO₄) a 25 °C.

Notas: $k_{cat} = V_{m\acute{a}x}/[(4)]$; $E = k_{cat}/K_m$; $K_{ass} = 1/K_m$; $f = K_{cat}/k_{nc}$. $K_{nc} = 1,80 \times 10^{-7}$ s⁻¹.

[Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II}(L²-et)] - L²-et = 2-(((2-aminoetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((2-(piridin-2-il)etil)(pyridin-2-ilmetil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017)

D - [L(OH₂)Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II}]²⁺ - (H₂L) = 2-bis[{{(2-piridilmetil)-aminometil}-6-{{(2-hidroxibenzil)-(2-piridil metil)}}aminometil} -4-metilfenol (NEVES *et al.*, 2007).

E - [Fe^{III}(HPBA)₂(μ-OAc)₂(μ-O)-(μ-OH)(OH₂)₂]²⁺ - H₃HPBA = ácido 2-((2-hidroxi-5-metil-3-((piridin-2-ilmetil amino)metil)benzil)(2-hidroxibenzil)amino)acético (KANTACHA *et al.*, 2011).

F - [Zn^{II}(TPPNOL)₂(OAc)₃]³⁺ - HTPPNOL = N,N,N'-tris-(2-piridilmetil)-1,3-diaminopropan-2-ol (MENDES *et al.*, 2016).

4.3.3 Efeito da temperatura sobre a velocidade de hidrólise do 2,4-BDNPP

Consideráveis observações a respeito do comportamento químico e cinético foram obtidas dos complexos a 25 °C. Com o intuito de esclarecer ainda mais os dados já obtidos, foram realizadas medidas das constantes catalíticas em várias temperaturas. Diante disso, um estudo da influência da temperatura na velocidade da reação de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP foi realizado na presença dos complexos (2) e (3) em pH 7, para variações de temperatura entre 25 e 50 °C. Este estudo não foi avaliado para o complexo (4) por considerarmos que o efeito da segunda esfera de coordenação seja diminuto.

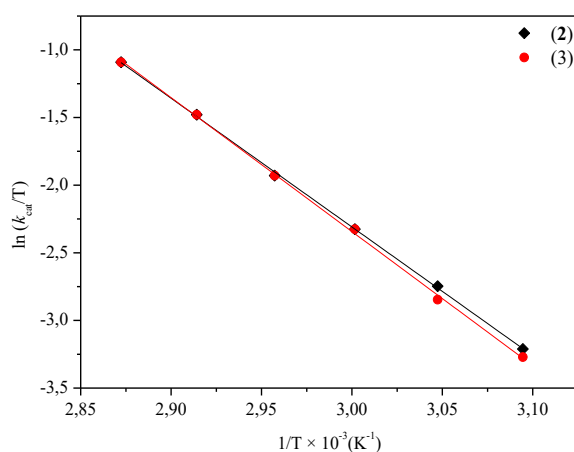
As constantes, ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger , foram obtidas a partir do gráfico de $\ln k_{cat}/T$ versus $1/T$ e com o auxílio da equação de Eyring (Equação 3) (ATKINS; SMITH; DE PAULA, 2017).

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \quad \text{Equação 3}$$

sendo $k = k_{\text{cat}}$, $k_B =$ constante de Boltzman ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), $h =$ constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J s}$), $\Delta H^\ddagger =$ entalpia de ativação, $\Delta S^\ddagger =$ entropia de ativação, $R =$ constante dos gases ideais ($8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e $T =$ temperatura (K). A energia livre de ativação, ΔG^\ddagger , foi obtida mediante a relação termodinâmica: $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$.

O gráfico de $\ln k_{\text{cat}}/T$ versus $1/T$ está na Figura 40 e os valores obtidos para os complexos (2) e (3) foram então comparados com os valores obtidos por Bunton para o substrato 2,4-BDNPP (BUNTON; FARBER, 1969) (Tabela 21).

Figura 40 – Variação da constante k_{cat} em função da temperatura e ajustada segundo a equação de Eyring para os complexos (2) e (3)



Fonte: O autor.

Condições: solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1; v/v); [(2)] = [(3)] = $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; [2,4-BDNPP] = 0,12 a $6,74 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; [tampão] = 0,05 mol L^{-1} (MES pH 5,5 – 6,5; HEPES pH 7,0 – 8,0 e CHES pH 9,0); $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4) a 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C.

Tabela 21 – Parâmetros de ativação para as hidrólises do 2,4-BDNPP pelos complexos (2) e (3).

	ΔH^\ddagger (kJ mol^{-1})	$T\Delta S^\ddagger$ (kJ mol^{-1})	ΔG^\ddagger^a (kJ mol^{-1})
Bunton	79,4	-34,4	113,8
(2)	$64,8 \pm 1,4$	$-24,9 \pm 1,2$	$89,7 \pm 2,6$
(3)	$70,1 \pm 2,9$	$-29,0 \pm 2,6$	$99,1 \pm 5,5$
G	$48,6 \pm 0,5$	$-49,6 \pm 0,3$	$98,2 \pm 0,6$
H	$48,7 \pm 0,3$	$-45,8 \pm 0,2$	$94,5 \pm 0,4$

Fonte: O autor.

^a $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$, onde $T = 298,15 \text{ K}$ (25 °C).

G – $\text{FeZnLP1} - \text{H}_2\text{LP1} = 2\text{-}\{[\text{bis}(\text{piridin-2-ilmetil})\text{amino}]\text{metil}\}\text{-6-}\{[(\{2\text{-hidroxi-5-metil-3-}[(\{4\text{-}[(\text{piren-1-ilmetil})\text{amino}]\text{butil}]\text{amino})\text{metil}]\text{fenil}\}\text{metil})(\text{piridin-2-ilmetil})\text{amino}\}\text{metil}\}\text{-4-metilfenol}$ (CAMARGO *et al.*, 2018).

H – $\text{FeZnLP2} - \text{H}_2\text{LP2} = 2\text{-}\{[(\{3\text{-}[(\{4\text{-}[\text{bis}(\text{piren-1-ilmetil})\text{amino}]\text{butil}]\text{amino})\text{metil}\}\text{-2-hidroxi-5-metilfenil}\}\text{metil})(\text{piridin-2-ilmetil})\text{amino}\}\text{metil}\}\text{-6-}\{[\text{bis}(\text{piridin-2-ilmetil})\text{amino}]\text{metil}\}\text{-4-metilfenol}$ (CAMARGO *et al.*, 2018).

A influência da segunda esfera de coordenação na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP pode ser considerada pelos parâmetros de ativação entálpico e entrópico. Nos dois casos, a $\Delta S^\ddagger < 0$ indica uma organização e estabilização das espécies reativas no estado de transição. Paralelamente, $\Delta H^\ddagger > 0$ reflete na formação de ligações no complexo ativado. Ao compará-los com a reação não catalisada, percebe-se uma pequena influência nos valores de ΔS^\ddagger sendo que, valores similares de $T\Delta S^\ddagger$, entre os complexos (2) e (3) indicam uma organização estrutural análoga para os estados de transição (CAMARGO *et al.*, 2018; GREATTI *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2019).

O aumento de ΔG^\ddagger indica que a barreira de ativação para o complexo (3) é maior do que a do complexo (2), de acordo com a eficiência catalítica diminuída de (3) para (2) (Tabela 19). Este resultado pode ser relacionado a uma mudança de entropia desfavorável no processo, tal como foi observado em complexos com ligantes modificados na segunda esfera de coordenação (CAMARGO *et al.*, 2018; DE SOUZA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2019).

Em resumo, esses resultados demonstram que interações adequadas entre a primeira e a segunda esfera de coordenação do complexo são necessárias para alcançar maior atividade catalítica (CAMARGO *et al.*, 2018). Nota-se, contudo, que a presença do Pd^{II} na segunda esfera de coordenação no complexo (3) reduz o impacto negativo de ΔS^\ddagger , possivelmente pela introdução de um grau de assimetria entre o complexo e o substrato no estado de transição.

4.3.4 Proposta de mecanismo para a hidrólise do 2,4-BDNPP

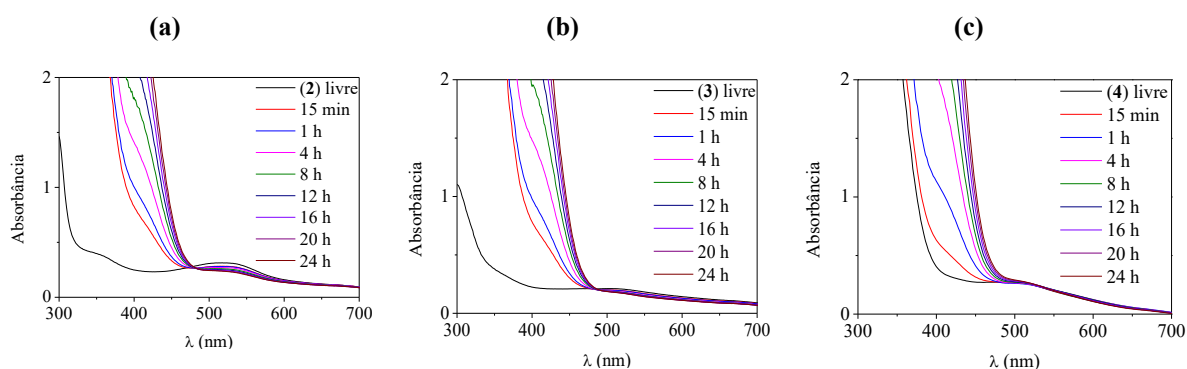
A partir do conjunto de informações obtidas ao longo dos experimentos realizados neste trabalho, é importante avaliar o mecanismo pelo qual o processo catalítico ocorre, e se esse mecanismo é similar ao proposto para a enzima alvo. Apesar de não terem sido realizados estudos detalhados sobre o mecanismo de reação, a partir de evidências experimentais foi possível inferir o caminho pelo qual a reação ocorre.

Com o intuito de elucidar o modo de interação entre o 2,4-BDNPP e os complexos (2), (3) e (4), foi analisada a alteração no espectro na região do ultravioleta e visível a partir da reação com excesso de substrato em pH 7,0, durante um período de 24 horas a 25 °C (Figura 41). Foi possível observar que as intensidades das bandas de absorção atribuídas às transições de transferência de carga do tipo fenolato \rightarrow Fe^{III} em λ_{max} igual a 514 e 490 nm para os complexos (3) e (4), respectivamente, não foram afetadas indicando que as moléculas de substrato não estão interagindo com os centros de Fe^{III}. Deste modo, pode-se fortemente sugerir

que o modo de coordenação do substrato 2,4-BDNPP ocorra de maneira monodentada no centro metálico Zn^{II} . Por outro lado, a absorção em aproximadamente 400 nm continua a aumentar devido à formação do produto 2,4-dinitrofenolato (2,4-DNP).

No caso complexo (2), é possível a coordenação do substrato de maneira bidentada aos centros metálicos, uma vez que ocorreu a mudança da intensidade da banda de transferência de carga do tipo fenolato $\rightarrow Fe^{III}$ em λ_{max} igual a 531. Vale lembrar que as constantes de associação encontradas para os complexos (2) e (3) são pouco similares (2857 e 1449 $mol^{-1} L$, respectivamente), o que reforça a ideia de que se pode ter diferentes espécies ativas em solução. Estudos de raios X em solução (EXAFS) poderiam revelar se o complexo (2) apresenta a formação da espécie Fe^{III} pentacoordenada e, portanto, possibilitar a coordenação do substrato de maneira bidentada.

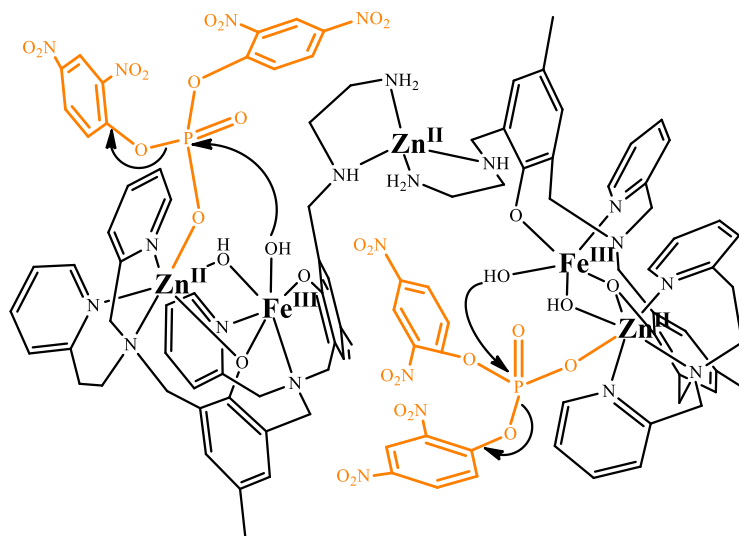
Figura 41 – Mudança espectral durante a hidrólise do 2,4-BDNPP catalisado por (1) (a), (2) (b) e (3) (c) em pH 7,0



Condições: Solução CH_3CN/H_2O (1/1; v/v); [tampão] = 0,05 $mol L^{-1}$ MES; $I = 0,05 mol L^{-1}$ ($LiClO_4$) a 25 °C; [(2)] = [(3)] = $4,0 \times 10^{-5} mol L^{-1}$ e [2,4-BDNPP] = $2,0 \times 10^{-3} mol L^{-1}$; [(4)] = $1,0 \times 10^{-4} mol L^{-1}$; [2,4-BDNPP] = $1,0 \times 10^{-3} mol L^{-1}$. $\lambda_{max}(2) = 531$ ($5130 mol^{-1} L cm^{-1}$); $\lambda_{max}(3) = 531$ ($5130 mol^{-1} L cm^{-1}$) e $\lambda_{max}(4) = 531$ ($5130 mol^{-1} L cm^{-1}$).

Visando avaliar se um ou os dois grupos 2,4-DNP do substrato estariam sendo hidrolisados, realizou-se uma reação em proporção estequiométrica entre os complexos (2), (3) e (4) e o substrato 2,4-BDNPP. Após um período de 24 horas, os complexos conseguiram hidrolisar apenas um grupo fenolato, atuando apenas como diasterease. O complexo (4) liberou duas moléculas de 2,4-DNP no mesmo período, podendo ser tentativamente correlacionado com a hidrólise de uma molécula de 2,4-BDNPP por unidade binuclear (Figura 42). Sugere-se também que este resultado indique atividade de monoesterase porém, como discutido a seguir, isto não foi observado.

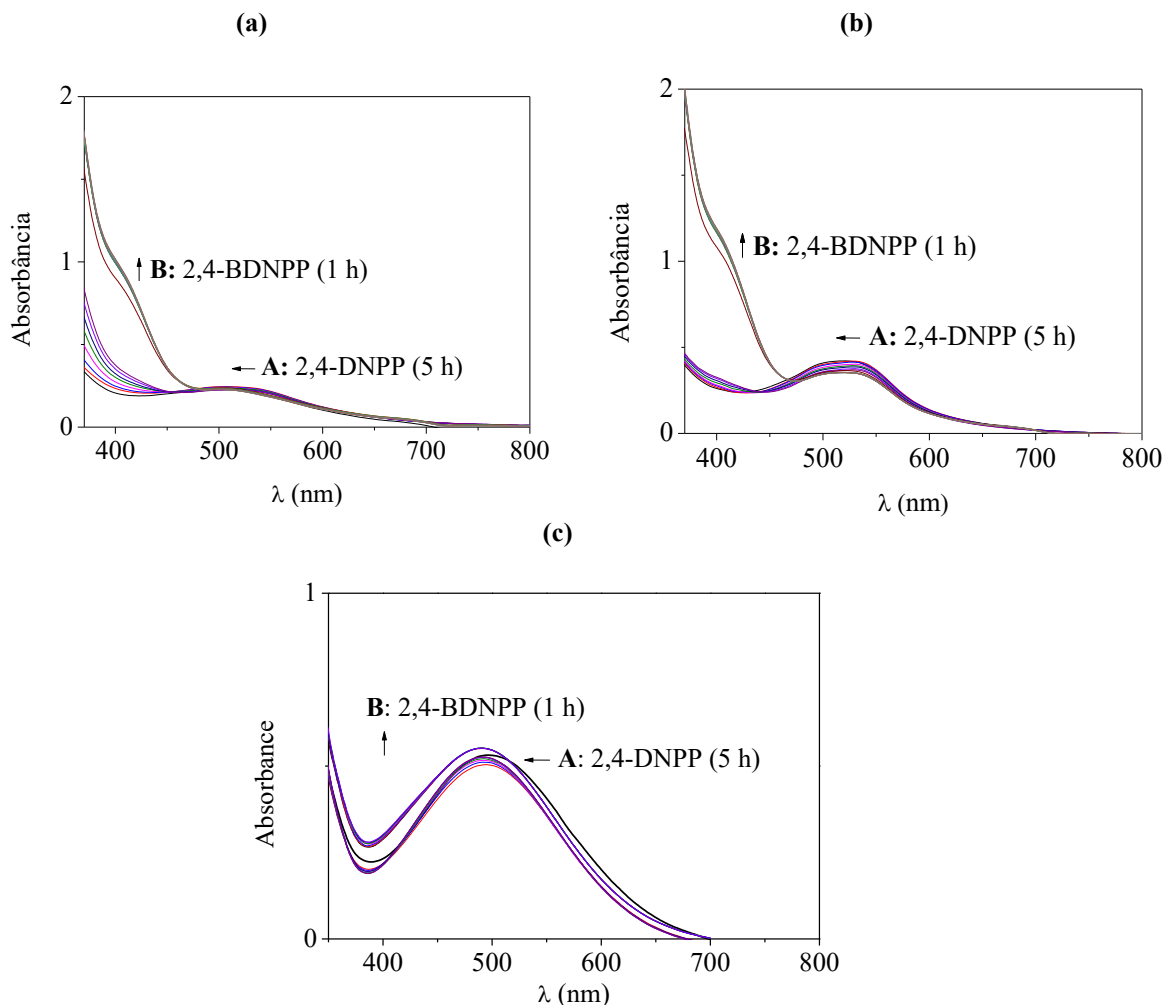
Figura 42 – Proposta da hidrólise simultânea de duas moléculas de substrato 2,4-BDNPP promovida pelo complexo (4).



Fonte: O autor.

Para confirmar a não atividade de monoesterase dos complexos (2), (3) e, principalmente do (4), também foi avaliada a reatividade na presença do substrato monoéster (2,4-DNPP) com adições sucessivas ao meio reacional de 1, 2, 4, 8 e 10 equivalentes de 2,4-DNPP (Figura 43). Após um período de 5 horas de reação, apenas a auto-hidrólise foi observada. Não foi observado o deslocamento das bandas de absorção atribuídas às transições de transferência de carga do tipo fenolato \rightarrow Fe^{III}. Após este período, o substrato 2,4-BDNPP foi adicionado ao meio reacional e, imediatamente, a absorbância em 400 nm começou a aumentar devido a formação do produto 2,4-DNP, indicando que apenas o diéster pode ser hidrolisado. Com base nestes experimentos, pode-se afirmar que nenhum destes complexos apresentou capacidade de hidrólise para o substrato 2,4-DNPP, confirmando que atuam somente como fosfodiesterases.

Figura 43 – **A**: Deslocamento espectral observado pela adição consecutiva de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 equivalentes do monoéster 2,4-DNPP em uma solução dos complexos (2) **(a)**, (3) **(b)** e (4) **(c)**. **B**: Adição de 4 equivalentes de diéster 2,4-BDNPP no meio reacional após 5 horas de acompanhamento do monoéster 2,4-DNPP

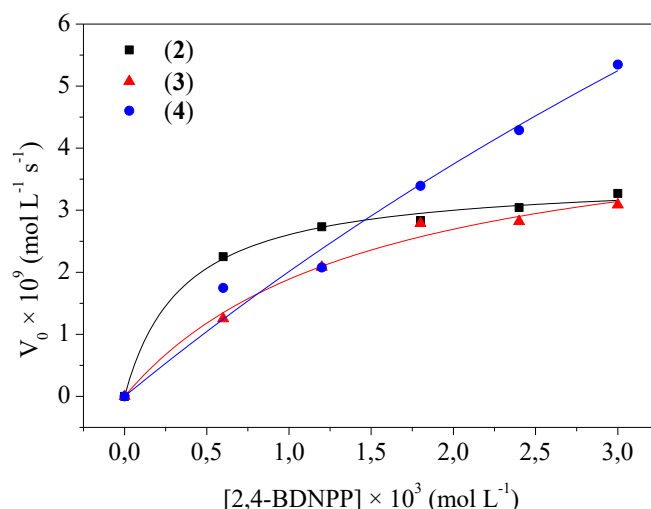


Fonte: O autor.

Deste modo, foi possível calcular o número de ciclos catalíticos de fosfodiesterase para os complexos (2), (3) e (4). Ao realizar o experimento com uma estequiometria de 50:1, entre o substrato e os complexos, observou-se que, após um período de 24 horas a 25 °C, os complexos (2), (3) e (4) catalisaram a hidrólise de 2, 3 e 9 moléculas de substrato, respectivamente. Estes valores obtidos para os complexos (2) e (3) estão relativamente menores se comparados à complexos similares com efeito de segunda esfera de coordenação já relatados, dos quais a tendência é de catalisar em torno de 10 moléculas de substrato (CAMARGO *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2019). É importante ressaltar que o complexo pentanuclear (4) catalisou 4 moléculas de substrato a mais que o respectivo análogo binuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L}^2\text{-et}$ (5 moléculas liberadas) (SILVA, 2017; SILVA *et al.*, 2017).

Por fim, foram realizados estudos para avaliar se o ataque nucleofílico ao átomo de fósforo do substrato seria intramolecular ou se estaria havendo uma transferência de próton (catálise básica geral). Para isto, foi empregado o efeito isotópico de deutério para a clivagem hidrolítica do substrato catalisada por estes compostos, em pH de atividade máxima (Figura 44). Para uma razão entre as velocidades de duas reações de hidrólise, realizadas sob as mesmas condições em H₂O e D₂O (k_H/k_D), estiver entre 0,80 e 1,50 indicam que não há transferência de próton durante a etapa determinante da reação (DEAL; HENGGE; BURSTYN, 1996). Para os complexos (2), (3) e (4) foram encontrados valores da razão k_H/k_D de 1,13, 1,40 e 0,80, respectivamente. Estes resultados sustentam a ideia de um ataque nucleofílico intramolecular do grupo hidróxido, ligado ao Fe^{III}, na reação de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP (CAMARGO *et al.*, 2018; LANZNASTER *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2017).

Figura 44 – Efeito isotópico de deutério na clivagem hidrolítica do substrato 2,4-BDNPP em D₂O para os complexos (2), (3) e (4)



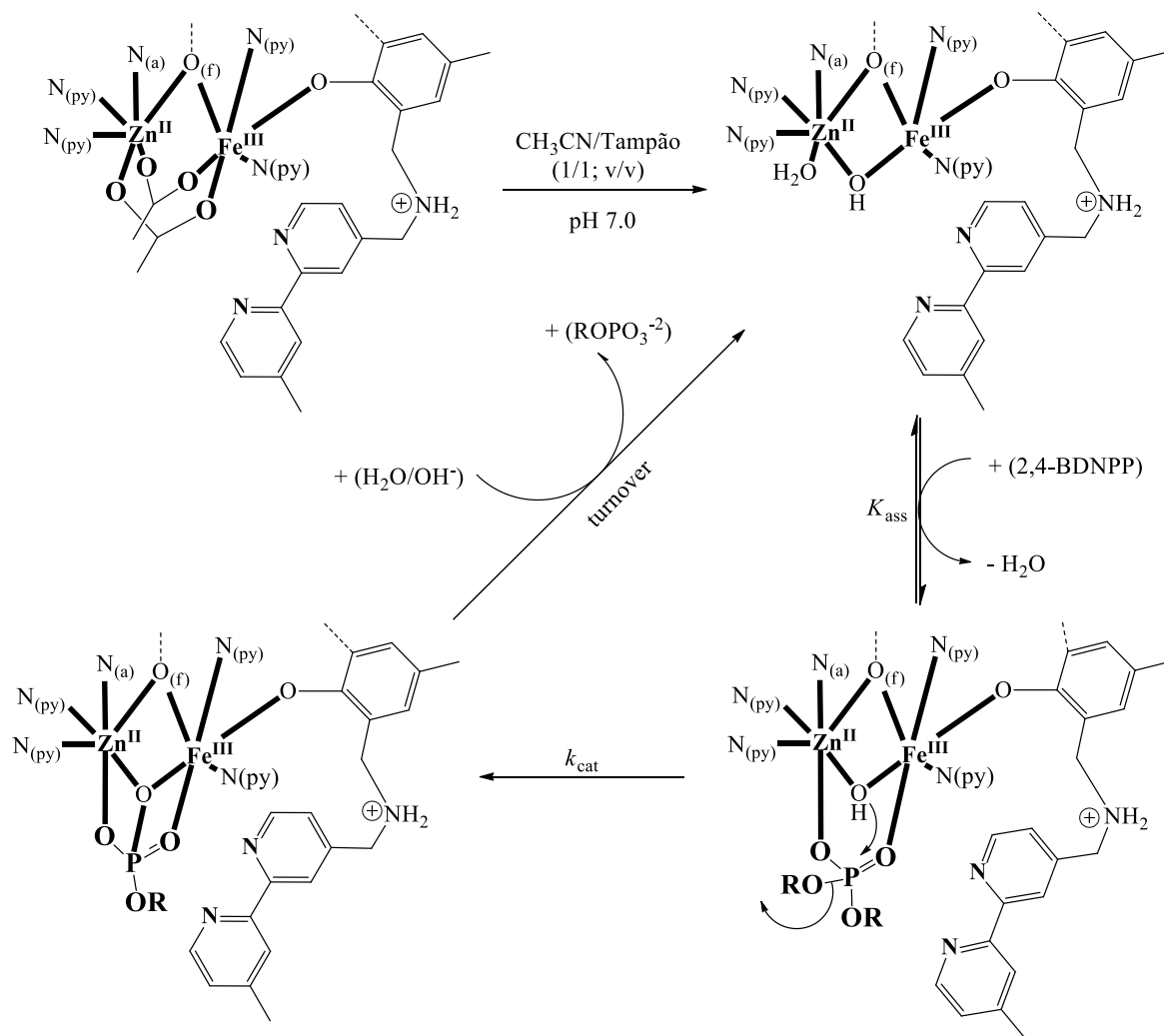
Fonte: O autor.

Com base nos dados apresentados, as propostas do mecanismo de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP pelos complexos (2) e (3) são apresentadas nos Esquemas 11 e 12, respectivamente. Além disto, através de titulação potenciométrica em solução de CH₃CN/H₂O (1/1; v/v), foi fornecido dados fundamentais para avaliarmos a labilidade dos grupos μ -OAc em ponte.

No mecanismo proposto para o complexo (2), a espécie ativa seria o [Fe^{III}(μ -OH)Zn^{II}(OH₂)(L_{bipy})]. Inicialmente o substrato coordena-se de maneira bidentada ao Fe^{III} e Zn^{II}

em uma etapa rápida. A seguir ocorreria o ataque nucleofílico, pela ponte $\mu\text{-OH}$, ao átomo de fósforo do substrato, ocorrendo então a clivagem da ligação fosfodiéster e a consequente liberação do 2,4-DNP. O monoéster, 2,4-DNPP, permanece coordenado ao complexo, podendo ser deslocado pela presença de excesso do substrato 2,4-BDNPP, reiniciando o processo catalítico.

Esquema 11 – Proposta de mecanismo para a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovida pelo complexo (2)

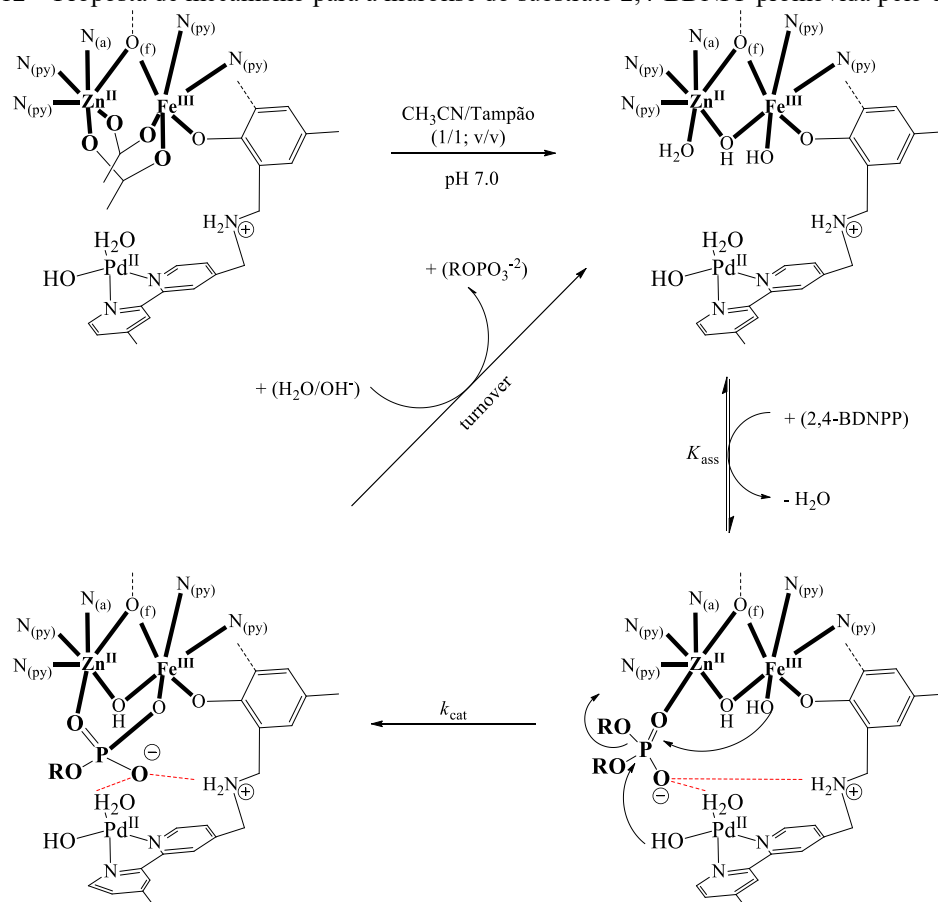


Fonte: O autor.

Para o complexo (3), a espécie ativa seria o $[(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)(\text{L}_{\text{bipy}})]$. inicialmente o substrato coordena-se ao Zn^{II} pelo deslocamento de uma molécula de água, em uma etapa rápida. A seguir, os íons hidróxidos terminal coordenados no Fe^{III} ou Pd^{II} atuam como nucleófilos, atacando o átomo de fósforo do substrato, ocorrendo então a clivagem da ligação fosfodiéster e a consequente liberação do 2,4-DNP. O monoéster, 2,4-DNPP,

permanece coordenado ao complexo, podendo ser deslocado pela presença de excesso do substrato 2,4-BDNPP, reiniciando o processo catalítico.

Esquema 12 – Proposta de mecanismo para a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovida pelo complexo (3)



Fonte: O autor.

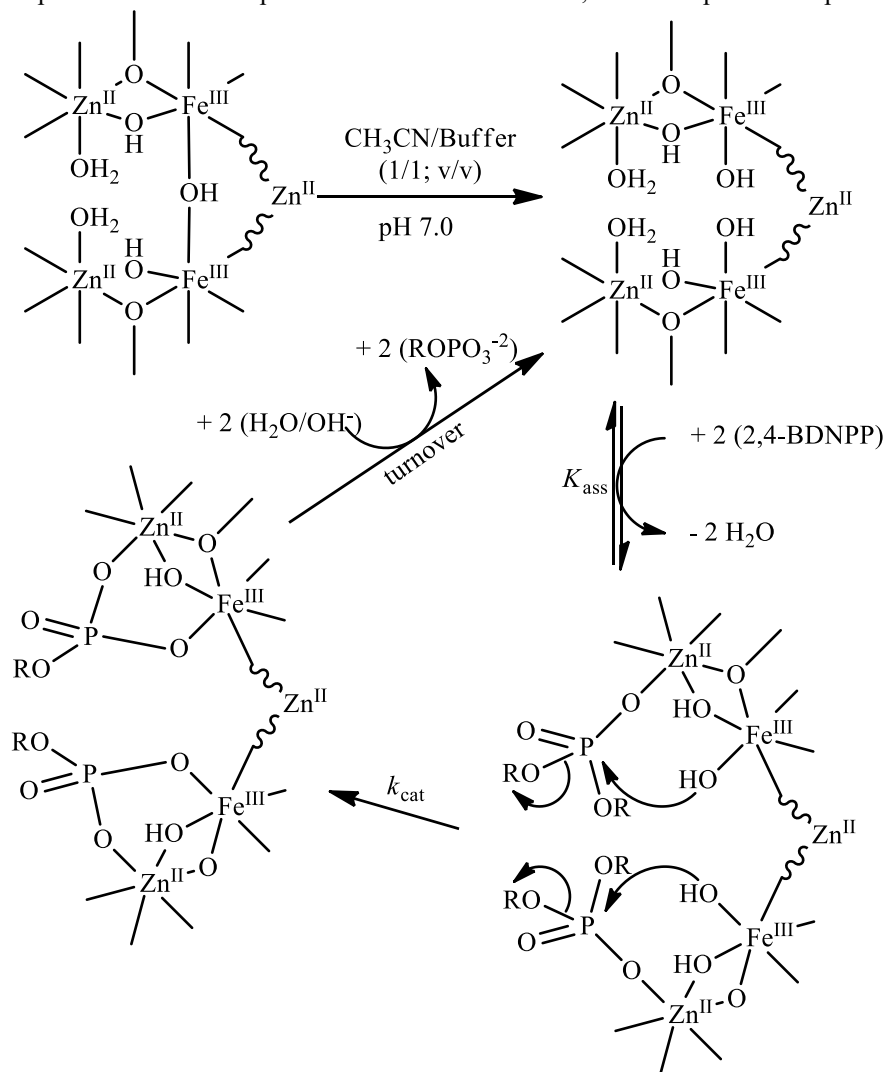
Algumas observações corroboram para as diferentes propostas de mecanismos para os complexos (2) e (3): i) o íon hidróxido em ponte $\mu\text{-OH}$ é menos nucleofílico do que quando ligado de maneira terminal ao Fe^{III} (KLABUNDE *et al.*, 1996), estando de acordo com o menor valor de k_{cat} para o complexo (2); ii) a cooperação dos dois íons hidróxidos terminais coordenados nos metais Fe^{III} e Pd^{II} atuando como nucleófilos também podem estar correlacionados com o aumento da constante catalítica para o complexo (3); iii) os grupos amino protonado e água terminal coordenada ao Pd^{II} no complexo (3) favorecem a estabilização das cargas formadas no estado de transição por ligações de hidrogênio, refletindo na melhor formação de ligações no complexo ativado (maior valor de ΔH^\ddagger ; ver Tabela 21, p. 95); iv) apesar do menor valor de K_{ass} para o complexo (3), relacionado a algum fator organizacional dos sistema pela menor mobilidade da cadeia lateral (efeitos estéricos e maior rigidez da

estrutura molecular), os efeitos de segunda esfera de coordenação na estabilização das cargas formadas no substrato resultam em maiores velocidade de hidrólise e liberação de produto (Tabela 19, p. 93)

Ressalta-se ainda que, para comprovar os mecanismos propostos nos complexos (2) e (3) é de suma importância realizar o EXAFS.

Para o complexo (4), além dos estudos em solução, também nos baseamos na estrutura de raios X (Seção 4.2.1) para elucidar o mecanismo da hidrólise do 2,4-BDNPP. No mecanismo proposto em solução de CH₃CN/H₂O (1/1; v/v) e pH 7,0, o complexo pentanuclear é composto por duas unidades binucleares ativas de composição [(HO)Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II}(H₂O)(L²-et)], conectadas por um terceiro Zn^{II} coordenado pelos grupos pendentes 1,2-etanodiamina. Deste modo, o mecanismo pode ser descrito de maneira análoga aos propostos para complexos binucleares já descritos na literatura (ERXLEBEN, 2019; KLABUNDE *et al.*, 1996; MITIĆ *et al.*, 2006; NEVES *et al.*, 2007; PERALTA *et al.*, 2010), sendo que as duas unidades [(HO)Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II}(H₂O)(L²-et)] são responsáveis pela hidrólise de duas moléculas de 2,4-BDNPP (Figura 42). Fato, este, observado na reação em proporção estequiométrica entre os complexos e o substrato. Sendo assim, a proposta do mecanismo de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP pelo complexo (4) é apresentada no Esquema 13. Em resumo, o substrato coordena-se ao Zn^{II} de maneira monodentada a partir do deslocamento de uma molécula de água. Em seguida, o íon hidróxido presente no Fe^{III} atua como nucleófilo, atacando o átomo de fósforo do substrato, ocorrendo então a clivagem da ligação fosfodiéster e a consequente liberação do 2,4-DNP. O monoéster coordenado ao complexo é deslocado pela presença de excesso do substrato 2,4-BDNPP, reiniciando o processo catalítico.

Esquema 13 – Proposta de mecanismo para a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovida pelo complexo (4)



Fonte: O autor.

5 CONCLUSÕES

Foi sintetizado o ligante H_2py_3mff , já descrito na literatura, com grau de pureza adequado (PIOVEZAN *et al.*, 2010). O ligante H_2L^2-et foi utilizado em colaboração com o trabalho de Doutorado de Graciela Aparecida dos Santos Silva (SILVA, 2017). Foi sintetizado e caracterizado por IV, análise elementar de CHN, espectrometria de massas e RMN de 1H e ^{13}C o ligante inédito H_2L_{bipy} . O mesmo e seus precursores foram obtidos com bons rendimentos e grau de pureza adequado à síntese dos complexos descritos ao longo deste trabalho.

Partindo-se do ligante H_2L_{bipy} , foram sintetizados três novos complexos: um mononuclear $[Pd^{II}(H_2L_{bipy})(Cl)_2] - (1)$, um binuclear $[Fe^{III}(\mu-OAc)_2Zn^{II}(L_{bipy})](ClO_4)_2 - (2)$ e um trinuclear $[Fe^{III}(\mu-OAc)_2Zn^{II}(L_{bipy})Pd^{II}Cl_2](ClO_4)_2 - (3)$. Estes complexos foram caracterizados por: i) espectroscopia vibracional na região do infravermelho, de onde foi possível identificar as bandas provenientes do ligante e de contra-íon; ii) análise elementar de CHN, para poder se encontrar suas fórmulas mínimas; iii) espectrometria de massas, para obter informações qualitativas acerca das espécies carregadas existentes neste sistema; iv) espectroscopia na região do ultravioleta e visível, de onde se atribuíram bandas de transferência de carga; v) titulação potenciométrica, cujos experimentos forneceram valores de pK_a para as moléculas de água coordenadas aos centros metálicos e as possíveis espécies presentes em solução; vi) condutimetria, que forneceu as cargas dos cátions complexos, vii) eletroquímica, em que foi obtido valores de potenciais redox.

Com o ligante H_2L^2-et foi obtido um novo complexo pentanuclear $[Fe_2^{III}(\mu-OH)_3Zn_3^{II}(L^2-et)_2](ClO_4)_5 - (4)$. O mesmo foi caracterizado como os anteriores, diferenciando na titulação espectrofotométrica, para comparação direta com o complexo binuclear $[Fe^{III}(\mu-OH)Zn^{II}(L^2-et)](ClO_4)_2$ (SILVA, 2017). Além disto, o complexo (4) teve estrutura cristalina resolvida por difração de raios X.

Os complexos (2), (3) e (4) foram testados quanto às suas propriedades catalíticas como hidrolases sintéticas, envolvendo o substrato modelo 2,4-BDNPP sendo que, o complexo (1) não apresentou nenhuma atividade catalítica. Estes estudos revelaram que os complexos (2), (3) e (4) possuem capacidade catalítica frente à hidrólise do 2,4-BDNPP, com acelerações de 1620, 3030 e 4780 vezes, respectivamente, em relação à reação não catalisada. Sendo que, os complexos (2) e (3) podem ser considerados de mesma eficiência catalítica e mais efetivos na conversão do substrato a produtos se comparados ao complexo (4). Os complexos (2) e (3)

conduziram a um aumento significativo da afinidade de ligação (K_{ass}) para o substrato modelo 2,4-BDNPP.

A obtenção dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos para complexos (2) e (3) permitiu verificar a influência positiva do metal Pd^{II} na segunda esfera de coordenação em sua constante e capacidade catalíticas. Além disto, por efeitos ainda não elucidados, a presença do Pd^{II} pode interferir tanto na cooperação de nucleófilos (OH) presentes nos metais Fe^{III} e Pd^{II} quanto no ciclo catalítico de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP. Em ambos complexos, foi possível elucidar mecanismos por ataques nucleofílicos intramoleculares.

A partir dos dados estruturais, espectroscópicos, eletroquímicos, cinéticos e de titulação espectrofotométrica foi possível propor um ciclo catalítico para a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP mediada pelo complexo (4) via ataque nucleofílico intramolecular. A presença do Zn^{II} na segunda esfera de coordenação pode ter exercido uma influência estrutural e relevância catalítica na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP, com valores mais altos de K_m e mais baixos de k_{cat}/K_m em relação ao complexo binuclear [Fe^{III}(μ -OH)Zn^{II}(L²-et)](ClO₄)₂ (SILVA, 2017).

Em relação aos efeitos ocasionados por metais na segunda esfera de coordenação, pode-se inferir que os mesmos atuam como moduladores da atividade catalítica. Fato este, também observado nas enzimas PhoA, PhoX e PhoD, em que a presença de um terceiro metal atua como um modulador da atividade enzimática (PEDROSO, MARCELO M. et al., 2016; PEDROSO, MARCELO MONTEIRO et al., 2017; RODRIGUEZ et al., 2014; YONG et al., 2014).

6 PERSPECTIVAS

Pouco se tem estudo sobre a influência de metais na segunda esfera de coordenação de biomiméticos das PAPs. Estudos complementares a este trabalho seria a obtenção das estruturas cristalinas dos complexos sintetizados. Com o conhecimento das propriedades físico-químicas e das estruturas cristalinas, a discussão sobre as propostas de mecanismos para a hidrólise de substratos modelo teria um melhor suporte.

Outros experimentos como a marcação isotópica da molécula de água ligada aos sítios metálicos trivalentes com $^{18}\text{OH}_2$ e utilização do complexo marcado na reação de hidrólise de ésteres de fosfato podem ser realizados, revelando o local de ligação do oxigênio marcado após a hidrólise.

O acompanhamento de testes de hidrólise do 2,4-BDNPP através de RMN de ^{31}P poderia detectar o modo de coordenação do substrato ao complexo e auxiliar na identificação de produtos.

Estudos teóricos (computacionais) podem representar uma importante ferramenta para auxílio no entendimento de vários processos bioinorgânicos, consistindo em simulações computacionais dos possíveis mecanismos, estados de transição e espécies cataliticamente ativas dos complexos (2), (3) e (4) na hidrólise do 2,4-BDNPP.

A síntese direta e a obtenção de estruturas cristalinas com pontes $\mu\text{-OH}$ ao invés de pontes do tipo $\mu\text{-OAc}$ também são de grande interesse, o que poderia diminuir a influência inibitória dos íons acetato e maior similaridade estrutural em termos de modelo mimético para as PAP.

Estudos de raios X em solução (EXAFS) podem revelar se os complexos (2) e (3) apresentam a formação da espécie Fe^{III} pentacoordenada ou hexacoordenada. O EXAFS também pode nos fornecer dados mais conclusivos acerca da possibilidade de interação do complexo (1) com o substrato 2,4-BDNPP.

Por fim, estudos de interação com o DNA e a promissora ação dos complexos (1), (2) e (3) como nucleases já estão sendo realizados no Centro de Biologia Molecular Estrutural da UFSC em colaboração com o trabalho do doutorando Philippe Gabriel, sob a orientação do Prof. Dr. Hernán Terenzi.

REFERÊNCIAS

ADDISON, A. W. et al. Synthesis, structure, and spectroscopic properties of copper(II) compounds containing nitrogen–sulphur donor ligands; the crystal and molecular structure of aqua[1,7-bis(N-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane]copper(II) perchlorate. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 7, p. 1349–1356, 1984. <http://dx.doi.org/10.1039/DT9840001349>.

AKTAŞ, A. H.; ŞANLI, N.; PEKCAN, G. Spectrometric determination of pK_a values for some phenolic compounds in acetonitrile – water mixture. **Acta Chimica Slovenica**, p. 5, 2006.

ANTANAITIS, B. C.; AISEN, P.; LILIENTHAL, H. R. Physical characterization of two-iron uteroferrin. Evidence for a spin-coupled binuclear iron cluster. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 5, p. 3166–3172, 1983.

MARTELL, A. E.; MOTEKAITIS, R. J. **Determination and use of stability constants**. 2. ed. New York: Wiley-vch, 1992. 200 p.

ATKINS, P. W.; SMITH, D.; DE PAULA, J. **Elements of physical chemistry**. 7 ed. Oxford: Oxford University Press, 2017.

AVERILL, B. A. et al. Spectroscopic and magnetic studies of the purple acid phosphatase from bovine spleen. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, n. 12, p. 3760–3767, 1987. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00246a039>.

BATISTA, S. C. et al. Highly efficient phosphate diester hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical FeIII NiII model complex. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 6, n. 8, p. 1161–1165, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S1387-7003\(03\)00219-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1387-7003(03)00219-3).

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

BERG, J. M. et al. **Biochemistry**. 7. ed. New York: Palgrave Macmillan, 2011. 1026 p.

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, 2015. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b00628>.

BONOMI, R. et al. Phosphate diester and DNA hydrolysis by a multivalent, nanoparticle-based catalyst. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 47, p. 15744–15745, 2008. <http://dx.doi.org/10.1021/ja801794t>.

BORTOLUZZI, A. J.; NEVES, A.; REY, N. A. 2-[[Bis(2-pyridylmethyl)amino]-methyl]-6-[(2-hydroxy-anilino)-methyl]-4-methyl-phenol: a novel binucleating asymmetric ligand as a precursor to synthetic models for metalloenzymes. **Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications**, v. 63, n. 2, p. o84–o86, 2007. <http://dx.doi.org/10.1107/S0108270106050517>.

BOUDALIS, A. K. et al. Synthesis and characterization of the tetranuclear iron(III) complex of a new asymmetric multidentate ligand. A structural model for purple acid phosphatases. **Dalton Transactions**, n. 44, p. 5132, 2007. <http://dx.doi.org/10.1039/b709293h>.

BRUKER. Bruker APEX2, SAINT and SADABS, version 2011.8-0; Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.

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, 1969. <http://dx.doi.org/10.1021/jo01256a001>.

BUSCHE, C. et al. Novel RuII complexes with bispidine-based bridging ligands: luminescence sensing and photocatalytic properties. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2010, n. 8, p. 1295–1302, 2010. <http://dx.doi.org/10.1002/ejic.200901058>.

CAMARGO, T. P. de. **DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXOS HETEROBINUCLEARES DE FeIII ZnII A PARTIR DE LIGANTES CONTENDO O GRUPO PIRENO PARA ESTUDO DE INTERAÇÃO COM ÉSTERES DE FOSFATO E ÁCIDOS NUCLÉICOS**. 2013. 117 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Centro de Ciências Física e Matemática, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/122699>>.

CAMARGO, T. P. de. et al. Second-Sphere Effects in Dinuclear FeIII ZnII hydrolase biomimetics: tuning binding and reactivity properties. **Inorganic Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 187–203, 2018. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b02384>.

CLARK, S. A. et al. Ultrastructural localization of tartrate-resistant, purple acid phosphatase in rat osteoclasts by histochemistry and immunocytochemistry. **Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 4, n. 3, p. 399–405, 1989. <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.5650040315>.

COE, B. J.; PEERS, M. K.; SCRUTTON, N. S. Syntheses and electronic and optical properties of complexes of the bis(2,2'-bipyrazyl)ruthenium unit. **Polyhedron**, v. 96, p. 57–65, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2015.04.028>.

COMBA, P.; GAHAN, L. R.; HANSON, G. R. et al. Monoesterase activity of a purple acid phosphatase mimic with a cyclam platform. **Chemistry – A European Journal**, v. 18, n. 6, p. 1700–1710, 2012. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201100229>.

COMBA, P.; GAHAN, L. R.; MEREACRE, V. et al. Spectroscopic characterization of the active Fe^{III}Fe^{III} and Fe^{III}Fe^{II} forms of a Purple Acid Phosphatase model system. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 12195–12209, 2012. <http://dx.doi.org/10.1021/ic301347t>.

COTTON, F. A. **Advanced inorganic chemistry**: a comprehensive text. New York: Interscience Publishers, 1966. 1136 p.

COWAN, J. A. Chemical nucleases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 6, p. 634–642, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S1367-5931\(01\)00259-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1367-5931(01)00259-9).

COX, B. G. **Acids and Bases**: solvent effects on acid-base strength. Oxford: Oxford University Press, 2013. 160 p.

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, 1996. <http://dx.doi.org/10.1021/ja952306p>.

DURIG, J. R. et al. Far infrared spectra of palladium compounds - I. The influence of ligands upon the palladium chloride stretching frequency. **Spectrochimica Acta**, v. 21, n. 8, p. 1367–1378, 1965. [http://dx.doi.org/10.1016/0371-1951\(65\)80046-7](http://dx.doi.org/10.1016/0371-1951(65)80046-7).

DURMUS, A. et al. The active site of purple acid phosphatase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*). **European Journal of Biochemistry**, v. 260, n. 3, p. 709–716, 1999. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00230.x>.

DUTTA, N. et al. Phosphatase-like activity of tetranuclear iron(III) and zinc(II) complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 57, n. 17, p. 10802–10820, 2018. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01441>.

ERXLEBEN, A. Mechanistic studies of homo- and heterodinuclear zinc phosphoesterase mimics: What has been learned? **Frontiers in Chemistry**, v. 7, 2019. <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2019.00082>.

ETTER, M. C.; BAURES, P. W. Triphenylphosphine oxide as a crystallization aid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 2, p. 639–640, 1988. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00210a076>.

FANG, Z. et al. Atom transfer radical polymerization preparation and photophysical properties of polypyridylruthenium derivatized polystyrenes. **Inorganic Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 8511–8520, 2013. <http://dx.doi.org/10.1021/ic400520m>.

FEDER, D. et al. The binding mode of an ADP analogue to a metallohydrolase mimics the likely transition state. **ChemBioChem**, v. 20, n. 12, p. 1536–1540, 2019. <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201900077>.

FENTON, D. E. **Biocoordination chemistry**. Oxford; New York: Oxford University Press, 2008. 91 p.

FIFE, T. H.; BRUICE, 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, 1961. <http://dx.doi.org/10.1021/j100824a525>.

FUERTES, M. A.; ALONSO, C.; PÉREZ, J. M. Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: Enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 3, p. 645–662, 2003. <http://dx.doi.org/10.1021/cr020010d>

GABER, B. P.; MISKOWSKI, V.; SPIRO, T. G. Resonance Raman scattering from iron(III)- and copper(II)-transferrin and an iron(III) model compound. Spectroscopic interpretation of the transferrin binding site. **Journal of the American Chemical Society**, v. 96, n. 22, p. 6868–6873, 1974. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00829a010>.

GAGNE, R. R.; KOVAL, C. A.; LISENSKY, G. C. Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements. **Inorganic Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 2854–2855, 1980. <http://dx.doi.org/10.1021/ic50211a080>.

GEARY, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 81–122, 1971. [http://dx.doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80009-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80009-0).

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, 2008. <http://dx.doi.org/10.1021/ic702132t>.

GUDDAT, L. W. et al. Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase. **Structure**, v. 7, n. 7, p. 757–767, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80100-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80100-2).

HAAS, K. L.; FRANZ, K. J. Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 10, p. 4921–4960, 2009. <http://dx.doi.org/10.1021/cr900134a>.

HAYMAN, A. R.; COX, T. M. Purple acid phosphatase of the human macrophage and osteoclast. Characterization, molecular properties, and crystallization of the recombinant di-iron-oxo protein secreted by baculovirus-infected insect cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 2, p. 1294–1300, 1994. ISSN: 0021-9258.

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, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00607-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00607-5).

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. New York: NY John Wiley & Sons, 2007. 502 p.

HOHMANN, H.; VAN ELDIK, R. Rate and equilibrium data for substitution reactions of diaqua(ethylenediamine)palladium(II) with chloride in aqueous solution. **Inorganica Chimica Acta**, v. 174, n. 1, p. 87–92, 1990. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)80282-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-1693(00)80282-0).

HOLM, R. H.; KENNEPOHL, P.; SOLOMON, E. I. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2239–2314, 1996. <http://dx.doi.org/10.1021/cr9500390>.

HORN, A. et al. Synthesis, crystal structure and properties of dinuclear iron(III) complexes containing terminally coordinated phenolate/H₂O/OH⁻ groups as models for purple acid phosphatases: efficient hydrolytic DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, n. 2, p. 339–351, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2004.09.021>.

HUHEEY, J. E. et al. **Inorganic chemistry: principles of structure and reactivity**. New Delhi: Pearson, 2013. 808 p.

JARENMARK, M. et al. Synthesis, characterization, and reactivity studies of heterodinuclear complexes modeling active sites in purple acid phosphatases. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 3866–3887, 2011. <http://dx.doi.org/DOI: 10.1021/ic1020324>.

SOUZA, R. J.. **SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PROMISCUIDADE CATALÍTICA DE COMPLEXOS BINUCLEARES BIOINSPIRADOS**. 2010. 108 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Centro de Ciências Física e Matemática, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010. Disponível em: <<http://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/106712>>.

KAIJA, H. et al. Phosphatase and oxygen radical-generating activities of mammalian Purple Acid Phosphatase are functionally independent. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 292, n. 1, p. 128–132, 2002. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2002.6615>.

KANTACHA, A. et al. Phosphate ester cleavage promoted by a tetrameric iron(III) complex. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 25–32, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-010-0696-0>.

KARSTEN, P. et al. Synthesis, structure, properties, and phosphatase-like activity of the first heterodinuclear FeIII-MnII complex with the unsymmetric ligand H₂BPBMP as a model for the pap in sweet potato. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 18, p. 4624–4626, 2002. <http://dx.doi.org/10.1021/ic025674k>.

KETCHAM, C. M. et al. The type 5, acid phosphatase from spleen of humans with hairy cell leukemia. Purification, properties, immunological characterization, and comparison with porcine uteroferrin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 9, p. 5768–5776, 1985. ISSN: 0021-9258.

KLABUNDE, T. et al. Mechanism of Fe(III) – Zn(II) Purple Acid Phosphatase based on crystal structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 259, n. 4, p. 737–748, 1996. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1996.0354>.

KREBS, B. et al. Model Compounds for the oxidized uteroferrin-phosphate complex with novel dinucleating ligands containing phenolate and pyridine donors. **Inorganic Chemistry**, v. 33, n. 9, p. 1907–1914, 1994. <http://dx.doi.org/10.1021/ic00087a029>.

LAI, S.-W. et al. Luminescent mononuclear and binuclear cyclometalated palladium(II) complexes of 6-phenyl-2,2'-bipyridines: spectroscopic and structural comparisons with platinum(II) analogues. **Inorganic Chemistry**, v. 39, n. 2, p. 255–262, 2000. <http://dx.doi.org/10.1021/ic991089g>.

LANZMASTER, M. et al. New FeIII-ZnII complex containing a single terminal Fe–O_{phenolate} bond as a structural and functional model for the active site of red kidney bean purple acid phosphatase. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 22, p. 5641–5643, 2002. <http://dx.doi.org/10.1021/ic025892d>.

LANZMASTER, M. et al. A new heterobinuclear FeIIICuII complex with a single terminal FeIII–O(phenolate) bond. Relevance to purple acid phosphatases and nucleases. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 319–332, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-005-0635-7>.

LASSILA, J. K.; ZALATAN, J. G.; HERSCHLAG, D. Biological phosphoryl-transfer reactions: understanding mechanism and catalysis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 669–702, 2011. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-060409-092741>.

LEWIS, D. L.; ESTES, E. D.; HODGSON, D. J. The infrared spectra of coordinated perchlorates. **Journal of Crystal and Molecular Structure**, v. 5, n. 1, p. 67–74, 1975. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01202553>.

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

LIPPARD, S. J.; BERG, J. M. **Principles of bioinorganic chemistry**. California: University Science Books, 1994. 411 p.

MAESTRI, M. et al. Absorption spectra and luminescence properties of isomeric platinum(II) and palladium(II) complexes containing 1,1'-biphenyldiyl, 2-phenylpyridine, and 2,2'-bipyridine as ligands. **Helvetica Chimica Acta**, v. 71, n. 5, p. 1053–1059, 1988. <http://dx.doi.org/10.1002/hlca.19880710516>.

MCCLEVERTY, J. A.; MEYER, T. J. **Comprehensive coordination chemistry II from biology to nanotechnology**. Amsterdam: Elsevier, Pergamon, 2004.

MENDES, L. L. et al. Metallohydrolase biomimetics with catalytic and structural flexibility. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 46, p. 18510–18521, 2016. <http://dx.doi.org/10.1039/C6DT03200A>.

MERKX, M.; AVERILL, B. A. Ga³⁺ as a functional substitute for Fe³⁺: preparation and characterization of the Ga³⁺Fe²⁺ and Ga³⁺Zn²⁺ forms of bovine spleen purple acid phosphatase. **Biochemistry**, v. 37, n. 23, p. 8490–8497, 1998. <http://dx.doi.org/10.1021/bi972929a>.

MERKX, M. et al. Probing the role of the trivalent metal in phosphate ester hydrolysis: preparation and characterization of purple acid phosphatases containing AlIII ZnII and InIII ZnII active sites, including the first example of an active aluminum enzyme. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 28, p. 6683–6689, 1999. <http://dx.doi.org/10.1021/ja9837147>.

MERKX, M.; PINKSE, M. W. H.; AVERILL, B. A. Evidence for nonbridged coordination of *p*-nitrophenyl phosphate to the dinuclear Fe(III)–M(II) center in bovine spleen Purple Acid Phosphatase during enzymatic turnover. **Biochemistry**, v. 38, n. 31, p. 9914–9925, 1999. <http://dx.doi.org/10.1021/bi9904454>.

MITIĆ, N. et al. The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 8, p. 3338–3363, 2006. <http://dx.doi.org/10.1021/cr050318f>.

NAKAMOTO, KAZUO. **Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds: Part A - Theory and applications in inorganic chemistry**. 6 ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd, 2008. 419 p.

NEVES, A. et al. A new asymmetric N5O2-donor binucleating ligand and its first FeIIFeIII complex as a model for the redox properties of uteroferrin. **Inorganica Chimica Acta**, v. 237, n. 1, p. 131–135, 1995. [http://dx.doi.org/10.1016/0020-1693\(95\)04678-3](http://dx.doi.org/10.1016/0020-1693(95)04678-3).

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, 2007. I <http://dx.doi.org/10.1021/ja071184l>.

PATHAK, C. et al. Modeling the Active site of the purple acid phosphatase enzyme with heterodinuclear mixed valence M(II)–Fe(III) [M = Zn, Ni, Co, and Cu] complexes supported over a [N6O] unsymmetrical ligand. **ACS Omega**, v. 2, n. 8, p. 4737–4750, 2017. <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.7b00671>.

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

PATHAK, C.; GANGWAR, M. K.; GHOSH, P. Homodinuclear [Fe(III)–Fe(III)] and [Zn(II)–Zn(II)] complexes of a binucleating [N4O3] symmetrical ligand with purple acid phosphatase (PAP) and zinc phosphoesterase like activity. **Polyhedron**, v. 145, p. 88–100, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2018.01.029>.

PEDROSO, M. M. et al. CaII binding regulates and dominates the reactivity of a transition-metal-ion-dependent diesterase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemistry – A European Journal**, v. 22, n. 3, p. 999–1009, 2016. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201504001>.

PEDROSO, M. M. et al. Reaction mechanism of the metallohydrolase CpsB from *Streptococcus pneumoniae*, a promising target for novel antimicrobial agents. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 39, p. 13194–13201, 2017. <http://dx.doi.org/10.1039/C7DT01350G>.

PERALTA, R. A. et al. Electronic structure and spectro-structural correlations of FeIII ZnII biomimetics for purple acid phosphatases: relevance to DNA cleavage and cytotoxic activity. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 24, p. 11421–11438, 2010. <http://dx.doi.org/10.1021/ic101433t>.

PEREIRA, C. et al. Guanidine- and purine-functionalized ligands of Fe^{III}Zn^{II} complexes: effects on the hydrolysis of DNA. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 675–691, 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-019-01680-3>.

PIOVEZAN, C. et al. Heterodinuclear Fe^{III}Zn^{II}-bioinspired complex supported on 3-aminopropyl silica. Efficient hydrolysis of phosphate diester bonds. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2580–2582, 2010. <http://dx.doi.org/10.1021/ic902489j>.

PISZKIEWICZ, D. **Kinetics of chemical and enzyme-catalyzed reactions**. Oxford: Oxford University Press, 1977. 264 p.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; BADERTSCHER, M. **Structure determination of organic compounds: tables of spectral data**. 4 ed. Verlag-Berlin-Heidelberg: Springer, 2009. 433 p.

QUE, L.; TRUE, A. E. Dinuclear iron- and manganese-oxo sites in biology. **Progress in Inorganic Chemistry**. John Wiley & Sons, Ltd, 2007. p. 97–200. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470166390.ch3>.

RAU, T.; SHOUKRY, M.; ELDIK, R. VAN. Complex formation and ligand substitution reactions of (2-picolyamine)palladium(II) with various biologically relevant ligands. characterization of (2-picolyamine)(1,1-cyclobutanedicarboxylato)palladium(II). **Inorganic Chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1454–1463, 1997. <http://dx.doi.org/10.1021/ic961192v>.

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, 1981. <http://dx.doi.org/10.1021/jo00319a032>.

REEM, R. C. et al. Spectroscopic studies of the coupled binuclear ferric active site in methemerythrins and oxyhemerythrin: the electronic structure of each iron center and the iron-oxo and iron-peroxide bonds. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 13, p. 4688–4704, 1989. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00195a024>.

REINHOLT, F. P. et al. Osteopontin-a possible anchor of osteoclasts to bone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 12, p. 4473–4475, 1990. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.12.4473>.

SILVERSTEIN, R. M. et al. **Spectrometric identification of organic compounds**. 8 ed. New York: John Wiley & Sons, cop., 2015. 502 p.

RODRIGUEZ, F. et al. Crystal structure of the bacillus subtilis phosphodiesterase PhoD reveals an iron and calcium-containing active site. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 45, p. 30889–30899, 2014. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.604892>.

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, 1999. <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1999.1407>.

SCHENK, G. et al. Phosphate forms an unusual tripodal complex with the Fe–Mn center of sweet potato purple acid phosphatase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 2, p. 273–278, 2005. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0407239102>.

SCHENK, G. et al. Probing the role of the divalent metal ion in uteroferrin using metal ion replacement and a comparison to isostructural biomimetics. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 139–155, 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-007-0305-z>.

SCHERLIS, D. A.; ESTRIN, D. A. Hydrogen bonding and O₂ affinity of hemoglobins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 34, p. 8436–8437, 2001. <http://dx.doi.org/10.1021/ja015665v>.

SELLECK, C. et al. Visualization of the reaction trajectory and transition state in a hydrolytic reaction catalyzed by a metalloenzyme. **Chemistry – A European Journal**, v. 23, n. 20, p. 4778–4781, 2017. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201700866>.

SHEHATA, M. R. Mixed ligand complexes of diaquo (2,2'-bipyridine)palladium(II) with cyclobutane-1,1-dicarboxylic acid and DNA constituents. **Transition Metal Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 198–204, 2001. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1007114128293>.

SHELDRICK, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. **Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 3–8, 2015. <http://dx.doi.org/10.1107/S2053229614024218>.

SHOUKRY, M. M. et al. Equilibrium studies of mixed ligand complexes involving (1,2-diaminopropane)-palladium(II) and some bioligands. **Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly**, v. 130, n. 3, p. 409–423, 1999. <http://dx.doi.org/10.1007/PL00010222>.

SILVA, G. A. S. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TAMANHO DO ANEL QUELATO E DA SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO NA HIDRÓLISE DO FOSFATO DE BIS(2,4-DINITROFENILA) E ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO CATALISADA POR COMPOSTOS DE FeIII ZnII. 2017. 168 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/188990>>.

SILVA, G. A. S. et al. Synthesis and characterization of FeIII(μ-OH)ZnII complexes: effects of a second coordination sphere and increase in the chelate ring size on the hydrolysis of a

phosphate diester and DNA. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 34, p. 11380–11394, 2017. <http://dx.doi.org/10.1039/C7DT02035J>.

SMITH, S. J. et al. The reaction mechanism of the Ga(III)Zn(II) derivative of uteroferrin and corresponding biomimetics. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 1207–1220, 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-007-0286-y>.

SMITH, S. J. et al. Spectroscopic and catalytic characterization of a functional FeIII/FeII biomimetic for the active site of uteroferrin and protein cleavage. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 2065–2078, 2012. <http://dx.doi.org/10.1021/ic201711p>.

SMOUKOV, S. K. et al. Electron–nuclear double resonance spectroscopic evidence for a hydroxo-bridge nucleophile involved in catalysis by a dinuclear hydrolase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 11, p. 2595–2603, 2002. <http://dx.doi.org/10.1021/ja003169l>.

SOUZA, B. de 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, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcata.2014.11.006>.

STRÄTER, N. et al. Crystal structure of a purple acid phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active site. **Science**, v. 268, n. 5216, p. 1489–1492, 1995. <http://dx.doi.org/10.1126/science.7770774>.

STRÄTER, N. et al. Crystal Structures of recombinant human purple acid phosphatase with and without an inhibitory conformation of the repression loop. **Journal of Molecular Biology**, v. 351, n. 1, p. 233–246, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2005.04.014>.

STROHALM, M. et al. mMass 3: A Cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 11, p. 4648–4651, 2010. <http://dx.doi.org/10.1021/ac100818g>.

TANG, W. et al. Cooperative catalysis through noncovalent interactions. **Angewandte Chemie**, v. 52, n. 6, p. 1668–1672, 2013. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201208774>.

TJIOE, L. et al. Phosphodiester cleavage properties of copper(II) complexes of 1,4,7-triazacyclononane ligands bearing single alkyl guanidine pendants. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 939–953, 2012. <http://dx.doi.org/10.1021/ic2019814>.

TRUE, A. E. et al. EXAFS studies of uteroferrin and its anion complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 10, p. 4246–4255, 1993. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00063a047>.

TWITCHETT, M. B.; SYKES, A. G. Structure, properties and reactivity of the FeII/FeIII and ZnII/FeIII Purple Acid Phosphatases. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 1999, n. 12, p. 2105–2115, 1999. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0682\(199912\)1999:12<2105::AID-EJIC2105>3.0.CO;2-2](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-0682(199912)1999:12<2105::AID-EJIC2105>3.0.CO;2-2).

UPPENBERG, J. et al. Crystal structure of a mammalian purple acid phosphatase. **Journal of Molecular Biology**, v. 290, n. 1, p. 201–211, 1999. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1999.2896>.

WANG, D. L. et al. Electrochemical properties of the diiron core of uteroferrin and its anion complexes. **Biochemistry**, v. 30, n. 33, p. 8187–8194, 1991. <http://dx.doi.org/10.1021/bi00247a014>.

WERNER, R. et al. Magnetostructural correlations in exchange coupled phenoxo-, alkoxo-, and hydroxo-bridged dinuclear iron(III) compounds. **Inorganica Chimica Acta**, v. 326, n. 1, p. 78–88, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-1693\(01\)00604-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-1693(01)00604-1).

WILCOX, D. E. Binuclear metallohydrolases. **Chemical Reviews**, v. 96, n° 7, p. 2435–2458, 1996. <http://dx.doi.org/10.1021/cr950043b>.

WILLIAMS, N. H. et al. Structure and nuclease activity of simple dinuclear metal complexes: quantitative dissection of the role of metal ions. **Accounts of Chemical Research**, v. 32, n. 6, p. 485–493, 1999. <http://dx.doi.org/10.1021/ar9500877>.

WU, X.-H. et al. Enhanced energy conversion efficiency of La³⁺-modified nanoporous TiO₂ electrode sensitized with a ruthenium complex. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 1939–1943, 2008. <http://dx.doi.org/10.1002/cjoc.200890348>.

XAVIER, F. R. et al. Unsymmetrical FeIII/CoII and GaIII/CoII Complexes as chemical hydrolases: biomimetic models for Purple Acid Phosphatases (PAPs). **Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 16, p. 7905–7921, 2009. <http://dx.doi.org/10.1021/ic900831q>.

YANG, F.; FANWICK, P. E.; KUBIAK, C. P. Synthesis of 1-(9-Anthracene)phosphirane and Novel Intramolecular π -Stacking of 1-(9-Anthracene)phosphirane ligands in a cis-platinum(II) complex. **Organometallics**, v. 18, n. 20, p. 4222–4225, 1999. <http://dx.doi.org/10.1021/om990008l>.

YANG, Y.-S.; MCCORMICK, J. M.; SOLOMON, E. I. Circular dichroism and magnetic circular dichroism studies of the mixed-valence binuclear non-heme iron active site in uteroferrin and its anion complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 49, p. 11832–11842, 1997. <http://dx.doi.org/10.1021/ja971896j>.

YONG, S. C. et al. A complex iron-calcium cofactor catalyzing phosphotransfer chemistry. **Science**, v. 345, n. 6201, p. 1170–1173, 2014. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1254237>.

ZAMBONELLI, C.; CASALI, M.; ROBERTS, M. F. Mutagenesis of putative catalytic and regulatory residues of streptomyces chromofuscus Phospholipase D differentially modifies phosphatase and phosphodiesterase activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 52, p. 52282–52289, 2003. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M310252200>.

ZHAO, M. et al. Insights into metalloenzyme microenvironments: biomimetic metal complexes with a functional second coordination sphere. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 21, p. 8360–8375, 2013. I <http://dx.doi.org/10.1039/C3CS60162E>.

ZVIRZDINAITE, M. et al. Palladium(II) complexes of ambidentate and potentially cyclometalating 5-aryl-3-(2'-pyridyl)-1,2,4-triazine ligands. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2017, n. 13, p. 2011–2022, 2017. <http://dx.doi.org/10.1002/ejic.201601530>.

APÊNDICE A – Espectros de RMN de ^1H dos ligantes precursores bipy, bipyCHO, bipyNH₂OH e H₂py₃mff

Figura 45 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) do ligante precursor bipy em CDCl₃

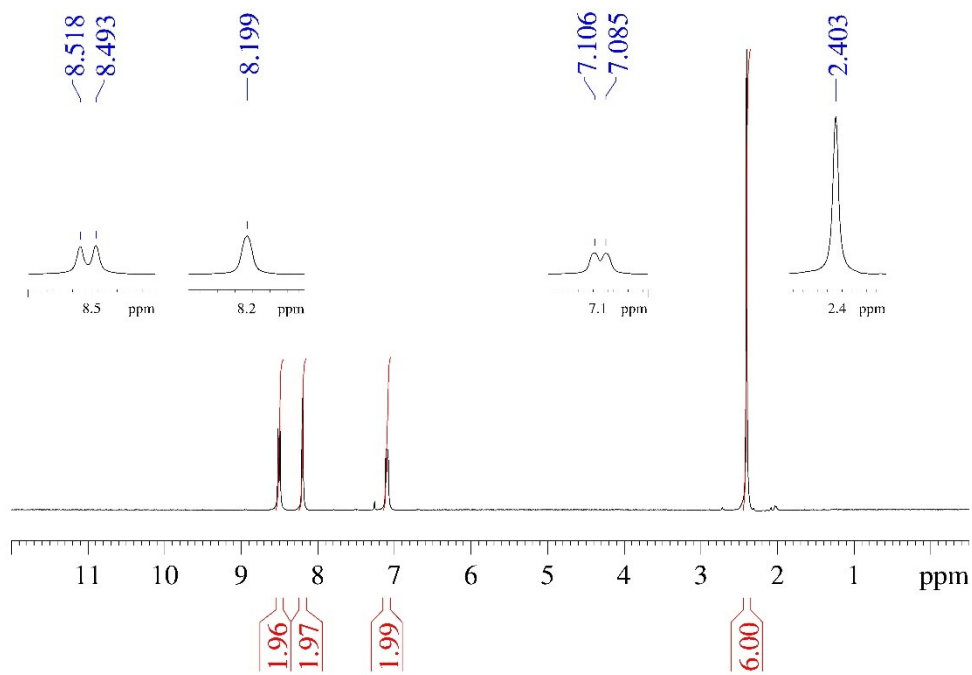


Figura 46 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) do ligante precursor bipyCHO em CDCl₃

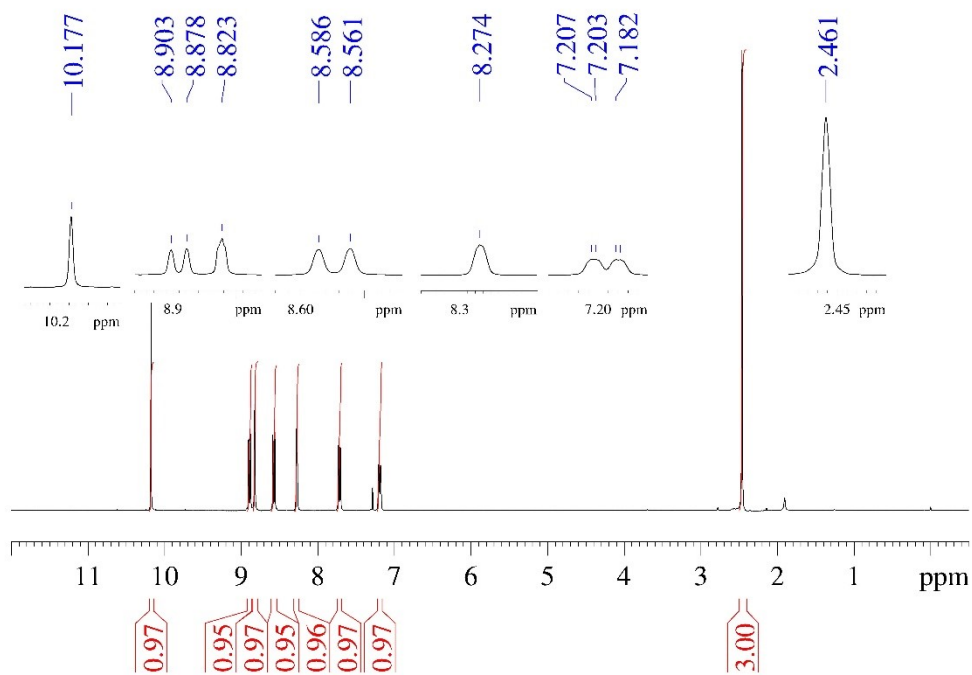


Figura 47 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) do ligante precursor bipyNH₂OH em CDCl₃

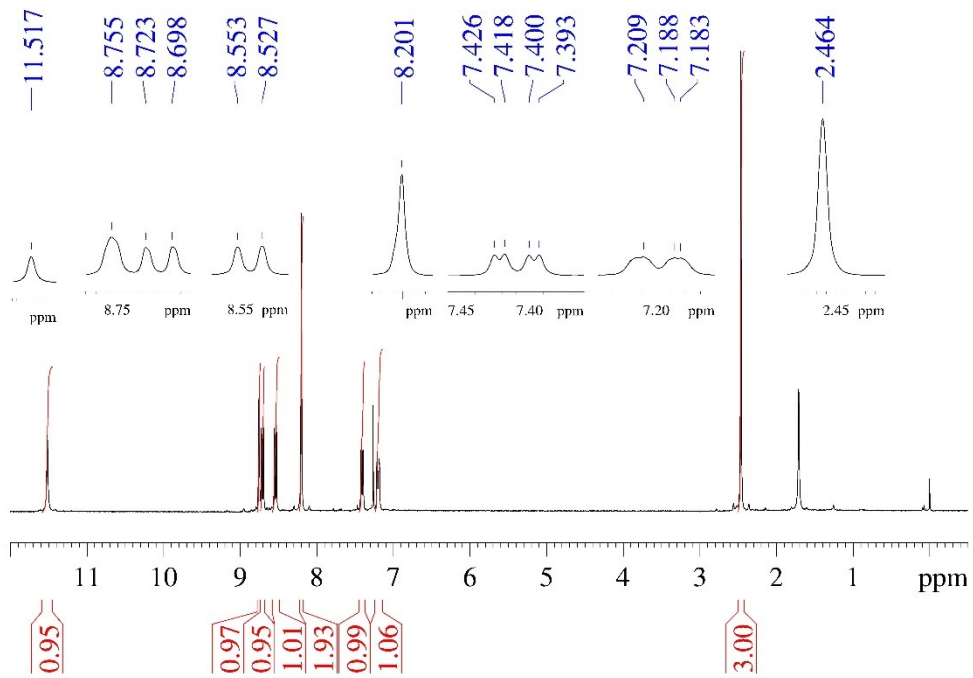
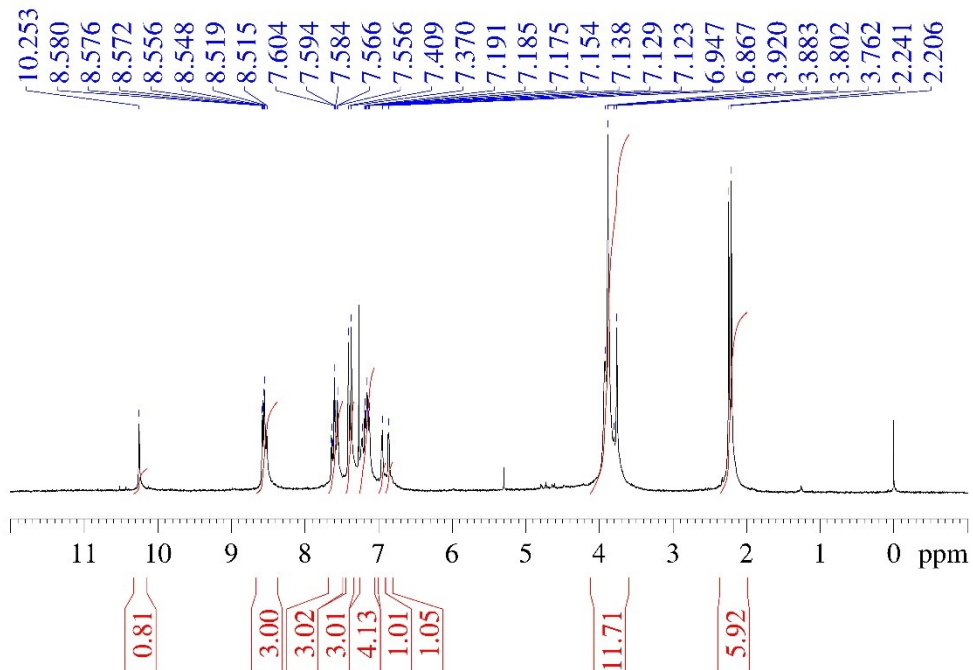


Figura 48 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) do ligante H₂py₃mff em CDCl₃



TRABALHO PUBLICADO

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119280>

ARTICLE IN PRESS

Inorganica Chimica Acta xxx (xxxx) xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Inorganica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ica

Research paper

A new heteropentanuclear complex containing the $[\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{Zn}_3^{\text{II}}(\mu\text{-OH})_3]$ structural motif as a model for purple acid phosphatases

Filipy Gobbo Maranhã^a, Graciela Aparecida dos Santos Silva^a, Adailton J. Bortoluzzi^a,
Ebbe Nordlander^b, Rosely A. Peralta^{a,*}, Ademir Neves^{a,*}

^a Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia - LABINC, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

^b Inorganic Chemistry Research Group, Chemical Physics, Center for Chemistry and Chemical Engineering, Lund University, Box 124, SE-221 00 Lund, Sweden

ARTICLE INFO

Keywords:
Pentanuclear complex
Hydrolase
Diesterase

ABSTRACT

Herein, we describe the synthesis and X-ray structure of a new heteropentanuclear complex (2) containing a $[\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{Zn}_3^{\text{II}}(\mu\text{-OH})_3]$ structural unit and the unsymmetrical ligand $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$. The molecular structure of (2) shows that it is formed by a basic dinuclear $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}^2\text{-et})]$ unit that is connected to a second dinuclear $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}^2\text{-et})]$ unit through a hydroxo bridge while a third Zn^{II} ion is coordinated by the pendant 1,2-ethanediamine groups of $\text{H}_2\text{L}^2\text{-et}$, resulting in the pentanuclear complex. Kinetic studies on the hydrolysis of the substrate 2,4-BDNPP (bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate) reveal that (2) shows diesterase activity. While the kinetic activity is comparable to the corresponding dinuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ complex containing the same ligand, the association with 2,4-BDNPP is significantly decreased.

1. Introduction

There is considerable research interest concerned with systems inspired by the active site of the metalloenzymes purple acid phosphatases (PAPs) [1–8]. PAPs participate in numerous biological functions, including the bone turnover [1,3,9], and iron transport [10].

PAPs belong to the family of dinuclear metallohydrolases ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-M}^{\text{II}}$, where $\text{M} = \text{Fe}$, Zn , or Mn) and catalyze the hydrolysis of a variety of phosphoester bonds under acidic conditions. They are the only dinuclear metallohydrolases where the requirement of a mixed-valence form as the hydrolytically active site for catalysis has been clearly established [1].

To date, the crystal structures of PAPs originating from red kidney bean (rkbPAP) [7,8], rats [5,6], pigs [3,11], humans [7], and sweet potato [12] have been reported. In plant PAPs, the metal ion composition is predominantly $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-M}^{\text{II}}$ ($\text{M} = \text{Zn}$ or Mn) centers [4,13–15]. In the structure of rkbPAP, the Zn^{II} ion is coordinated by two nitrogen atoms from histidine side-chains and one oxygen atom from an asparagine, and the Fe^{II} ion is coordinated by an oxygen atom from a tyrosine residue, a nitrogen atom from a histidine, and an aspartate. The $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-M}^{\text{II}}$ ions are bridged by two oxygen atoms, one from the carboxylate group of an aspartate and the other from a modeled μ -hydroxo group. Two oxygen atoms from a μ -1,3 phosphate group complete the

coordination spheres of the Zn^{II} and Fe^{II} ions [16,17]. The two subunits in the plant PAPs are linked via a disulfide bridge [1]. Furthermore, metallohydrolases with a catalytic centre that accommodates more than two metal ions, while uncommon, were recently identified (i.e. PhoX and Rv0805). The enzyme PhoX is an extra-cytoplasmic alkaline phosphatase which contains five metal ions in its active site, comprising two antiferromagnetically coupled Fe^{II} ions and three Ca^{II} ions [18–20]. The diesterase Rv0805 from *Mycobacterium tuberculosis* contains as many as four metal ions in the active site, one similar to that of the other dinuclear metallohydrolases, and a Ca^{II} -specific one, which can bind in a site distinct from but close to the location that accommodates the transition metal ions and acts as an activator of the enzymatic activity [19,20].

The synthesis of small transition metal coordination complexes models (biomimetics) of the active site of PAPs has been pursued as a benchmark for the study of this system. Such biomimetics can potentially serve as structural and/or functional models aimed at gaining a better understanding of the structure and the action mode of the active site. In this regard many symmetrical [21–25] and unsymmetrical [16,24,26–32] ligands containing a bridging phenoxide moiety and different N/O donor atoms have been reported in the literature. Although much of the reactivity studies of the PAPs system have been performed with mixed-valence hetero-dinuclear complexes, we decided

* Corresponding authors.

E-mail addresses: rosely.peralta@ufsc.br (R.A. Peralta), ademir.neves@ufsc.br (A. Neves).

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119280>

Received 2 August 2019; Received in revised form 10 October 2019; Accepted 12 November 2019

Available online 13 November 2019

0020-1693/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: Filipy Gobbo Maranhã, et al., Inorganica Chimica Acta, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119280>