



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

ANDERSON BASTOS PIRES

Novos complexos binucleares com o grupo naftaleno para o estudo de segunda esfera de coordenação como modelos miméticos para Fosfatases Ácidas Púrpuras e adsorção da quitosana modificada com o ligante binucleante

Florianópolis

2021

Anderson Bastos Pires

Novos complexos binucleares com o grupo naftaleno para o estudo de segunda esfera de coordenação como modelos miméticos para Fosfatases Ácidas Púrpuras e adsorção da quitosana modificada com o ligante binucleante

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

Coorientador: Prof. Dr. Adailton J. Bortoluzzi

Florianópolis

2021

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

Pires, Anderson Bastos

Novos complexos binucleares com o grupo naftaleno para o estudo de segunda esfera de coordenação como modelos miméticos para Fosfatases Ácidas Púrpuras e adsorção da quitosana modificada com o ligante binucleante / Anderson Bastos Pires ; orientador, Ademir Neves, coorientador, Adailton João Bortoluzzi, 2021.

127 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Química. 2. Hidrólise de ésteres. 3. Complexos binucleares. 4. PAPS. 5. Quitosana. I. Neves, Ademir. II. Bortoluzzi, Adailton João. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Anderson Bastos Pires

Novos complexos binucleares com o grupo naftaleno para o estudo de segunda esfera de coordenação como modelos miméticos para Fosfatases Ácidas Púrpuras e adsorção da quitosana modificada com o ligante binucleante

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

Prof. Dr. Bruno Szpoganicz
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Prof. Dr. Thiago Mouza Aversa.
IF de educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Annelise Casellato.
Universidade Federal do Rio de Janeiro

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

Prof. Dr. Marcus César Mandolesi Sá,
Coordenador do Programa

Prof. Dr. Adailton João Bortoluzzi,
Coorientador

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado à minha esposa Tania Barbieri por estar sempre ao meu lado apesar da distância e aos meus pais Paulo César e Tamara.

AGRADECIMENTOS

É com joelhos dobrados que agradeço a Deus por todo o seu cuidado para comigo no decorrer de todos esses anos de estudos. Embora muitas vezes a caminhada acadêmica se faça solitária; há um Deus, criador dos céus e da terra, que atenda para seus filhos.

Agradeço, aos meus pais Paulo César Bastos Pires e Tamara Moreira por me acompanharem nessa jornada, pelo apoio e cuidados. Agradeceria meu irmão Ramon Moreira, contudo, guardarei meus votos de agradecimento para o encontro nos céus, onde regozijar-me-ei com seu sorriso.

A minha esposa Tania Barbieri, que a despeito da distância, apoiou-me com alegria e serenidade. É certo que, contigo ao meu lado, as coisas foram e serão muito melhores.

Ao meu querido Prof. Ademir Neves pela oportunidade de aprender imensamente, à Professora Rosely Peralta por suas perspicazes correções e ao meu outrora orientador Bruno Szpoganicz, que foi a centelha da minha caminhada dentro do universo da Química. A Professora Neiva Rosso que também fez parte da minha vida acadêmica, fazendo parte de minha banca de mestrado, além de ter me ajudado em atividades de laboratório.

A minha amiga Cláudia Pereira a qual me ensinou muito acerca de Química, ao ilustre Filipy Maranha pelos maltes, a doutora Suélen Amorim pela ajuda no artigo final, aos meus saudosos colegas Carlos Lucecki e Vitinho Weiss por saudáveis discussões político-filosóficas e a todos os meus estimados colegas do LABINC.

Ao Jadir Carminatti e a todos os professores do Departamento de Química e do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, pela acolhida e oportunidade de formação neste centro de excelência.

A todos os meus sinceros votos de alegria.

Que é a ciência senão a lenta e sucessiva cura de nossa cegueira”

A.-D. Sertillanges

RESUMO

O desenvolvimento de metaloenzimas artificiais alcança na atualidade um novo patamar com a inserção e compreensão de efeitos de segunda esfera de coordenação (SEC), ou seja, grupos químicos na estrutura de complexos, que interagem por ligações não covalentes com o substrato aumentando a sua atividade na obtenção de produtos. Na primeira parte, este estudo se dedica à síntese e caracterização de novos ligantes binucleares de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ capazes de produzir efeitos de segunda esfera de coordenação com o escopo de mimetizar enzimas como as PAPs. Os ligantes $\text{L}_1\text{-NAF}$, $\text{L}_1\text{-Et-NAF}$ e $\text{L}_1\text{-Prop-NAF}$ foram sintetizados a partir do ligante L_1 pela introdução do naftaleno tendo como ponte metil-amina, etano-1,2-diamina e Propano-1,3-diamina. Os ligantes e seus respectivos complexos foram caracterizados por análise elementar de C, H e N, RMN ^1H , infravermelho, ESI-MS, condutimetria, espectrofotometria na região do UV-Vis e titulação potenciométrica. Estudos cinéticos com o substrato modelo 2,4-BDNPP mostram que os complexos, quando comparados ao complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1$ tiveram o seu k_{cat} reduzido. Entretanto, apresentaram uma significativa constante de associação (K_{ass}) complexo-substrato. Testes de atividade de clivagem do DNA plasmidial mostraram que os complexos sintetizados são mais efetivos quando comparado ao complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1$ e a outros complexos que possuem apenas a primeira esfera de coordenação atuando em tais processos. O que deixa claro a importância dos efeitos de SEC. Na segunda parte do trabalho, tendo em vista aplicações na remoção de íons metálicos de águas residuais, o ligante binucleante L_1 foi ancorado na quitosana a fim de testar o novo material (Q-L_1) na adsorção de Zn(II) , Cu(II) e Ni(II) . Os modelos de pseudo primeira-ordem, pseudo segunda-ordem e difusão intra-partícula foram testados, sendo o modelo de pseudo segunda-ordem o que proporcionou os melhores resultados para os três íons estudados. As isotermas de adsorção para os íons Zn(II) e Ni(II) obedeceram uma relação linear com aumento da concentração desses íons no meio reacional. Para os íons de Cu(II) na presença Q-L_1 , o modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o modelo de Langmuir.

Palavras chave: Hidrolase. Complexos. PAPs. Quitosana. Adsorção. Biopolímeros.

ABSTRACT

The development of metalloenzymes articulates currently reaches a new level with the insertion and understanding of effects of the second sphere of coordination (SSC), i.e., chemical groups in the structure of complexes, which interact by non-covalent bonds with the substrate increasing their activity in obtaining products. In the first part, this study is dedicated to the synthesis and characterization of new binuclear ligands of $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ capable of producing second sphere of coordination effects with the scope of mimicking enzymes such as PAPs. Ligands L_1 -NAF, L_1 -Et-NAF and L_1 -Prop-NAF were synthesized from the L_1 ligand by the introduction of naphthalene having as methyl-amine, ethane-1,2-diamine and 1,3-propanediamine. The ligands and their respective complexes were and characterized by elemental analysis of C, H and N, ^1H NMR, infrared, ESI-MS, conductimetry, UV-Vis spectrophotometry and potentiometric titration. Kinetic studies with model substrate 2,4-BDNPP show that complexes, when compared to the $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1$ complex had their k_{cat} reduced. However, they presented a significant complex-substrate (K_{ass}) association constant. Plasmid DNA cleavage activity tests showed that synthesized complexes were more effective when compared to the $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1$ complex and other complexes that have only the first sphere of coordination acting in such processes. Which makes clear the importance of SSC effects. In the second part of the work, in view of applications in the removal of metal ions from wastewater, the L_1 binucleant ligand was anchored in chitosan in order to test the new material (Q- L_1) in the adsorption of Zn(II), Cu(II) and Ni(II). The pseudo first-order, pseudo second-order and intraparticle diffusion models were tested, with the pseudo second-order model providing the best results for the three ions studied. Isotherm adsorption for Zn(II) and Ni(II) ions obtained a linear relationship with increased concentration of these ions in the reactionary environment. For Cu(II) ions in the presence Q- L_1 , the model that best adjusted to experimental data was the Langmuir model.

Keywords: Hydrolase. Complexes. PAPs. Chitosan. Adsorption. Biopolymers.

FIGURAS

Figura 1 - Ligante L ₁	29
Figura 2 - Ligantes sintetizados neste trabalho: (A) L ₁ -NAF, (B) L ₁ -Et-NAF e (C) L ₁ -Pro-NAF.	30
Figura 3 - Diagrama de energia de uma reação química.	32
Figura 4 - Representação do sítio ativo de uma PAP do feijão vermelho.	33
Figura 5 - Modelo de mecanismo proposto por Klabunde e colaboradores para hidrólise de éster de fosfato pela ação das PAPs.	34
Figura 6 - Ilustração mostrando a interação por ligação de hidrogênio entre uma a histidina distal (His E7) e a molécula de dióxigênio no grupo HEME, presente na hemoglobina.	36
Figura 7 - Ilustração dos efeitos de segunda esfera de coordenação sobre o cofator e substrato da enzima carboxipeptidase (A) e da Staphylococcal nuclease (B).	37
Figura 8 - Ilustração do efeito da segunda esfera de coordenação no mecanismo da hidrólise de éster fosfato.....	38
Figura 9 - Proposta de mecanismo de hidrólise de fósforo diéster catalisada por complexos de Zn(II) funcionalizados com CDs. A ciclodextrina ajuda posicionar o substrato para facilitar o ataque nucleofílico.....	39
Figura 10 - Proposta de estrutura para o sistema 1-PEI e sua ligação ao diéster de fosfato. ...	40
Figura 11 - Estratégias para ancorar moléculas na estrutura do DNA. Via interação não covalente (a), por meio de ligações covalentes (b) e através do uso de um intercalador (c)....	42
Figura 12 - Complexos sintetizados pelo grupo de Chen e colaboradores (2009). A direita o complexo com dois grupos acridina.	42
Figura 13 - Hidrólise do um substrato modelo (2,4-BDNPP) intermediado cataliticamente por um complexo binuclear levando à formação do cromóforo 2,4-dinitrofenolato e outros produtos de reação.	47
Figura 14 - Espectro de ¹ H NMR (200 MHz) em CDCl ₃ do precursor bpma.	51
Figura 15 - Espectro de ¹ H NMR (200 MHz) em CDCl ₃ do cmff.	52
Figura 16 - Espectro de ¹ H NMR (200 MHz) em CDCl ₃ do bpmamff.	53
Figura 17 - Espectro de ¹ H NMR (200 MHz) em CDCl ₃ do Hpy3.	54
Figura 18 - Espectro de infravermelho do ligante L ₁ em pastilha de KBr.	56
Figura 19 - Espectro de ¹ H NMR (200 MHz) em CDCl ₃ do ligante L ₁	56
Figura 20 - Espectro de infravermelho do ligante L ₁ -NAF em pastilha de KBr.	58
Figura 21 - Espectro de ¹ H NMR (200 MHz) em CDCl ₃ do ligante L ₁ -NAF.....	58

Figura 22 - Espectro de infravermelho do precursor L ₁ -Et em pastilha de KBr.	60
Figura 23 - Espectro de ¹ H NMR(200 MHz) em CDCl ₃ do precursor L ₁ -Et.	60
Figura 24 - Espectro de infravermelho do precursor L ₁ -Et-NAF em pastilha de KBr.	61
Figura 25 - Espectro de ¹ H NMR (200 MHz) em CDCl ₃ do precursor L ₁ -Et-NAF.	62
Figura 26 - Espectro de infravermelho do precursor L ₁ -Prop em pastilha de KBr.	63
Figura 27 - Espectro de ¹ H NMR (200 MHz) em CDCl ₃ do precursor L ₁ -Prop.	63
Figura 28 - Espectro de infravermelho do precursor L ₁ -Prop-NAF em pastilha de KBr.	64
Figura 29 - Espectro de ¹ H NMR (200 MHz) em CDCl ₃ do precursor L ₁ -Prop-NAF.	65
Figura 30 - Comparação entre os espectros de infravermelho (KBr, cm ⁻¹) dos precursores, ligantes e seus respectivos complexos. (a) L ₁ , L ₁ -NAF e complexo 1 ; (b) L ₁ , L ₁ -Et, L ₁ -Et-NAF e complexo 2 ; (c) L ₁ , L ₁ -Prop, L ₁ -Prop-NAF e complexo 3	74
Figura 31 – Espectro eletrônico dos complexos 1, 2 e 3 acetonitrila/água (50:50) e em acetonitrila. Solução - [C] = 4,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	76
Figura 32 – Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para os complexos Fe ^{III} Zn ^{II} L ₁ -NAF (1) Fe ^{III} Zn ^{II} -L ₁ -Et-NAF (2) e Fe ^{III} Zn ^{II} -L ₁ -prop-NAF (3)	78
Figura 33 - Esquema para a reação hidrolítica do substrato modelo 2,4-BDNPP catalisada por complexos analisados neste trabalho.	79
Figura 34. Esquerda: Dependência de V ₀ vs pH para reações de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP catalisadas pelos complexos 1 , 2 e 3 . CH ₃ CN/H ₂ O (1:1); [complexo] = 4,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; [substrato] = 5,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ ; [tampões] = 5,0 x 10 ⁻² mol L ⁻¹ (MES, HEPES, CHES); I = 5,0 x 10 ⁻² mol L ⁻¹ (LiClO ₄). Direita: Ajustes para obtenção dos pK _a s cinéticos nas faixas de pH pré determinadas.....	81
Figura 35 - Dependência da velocidade de hidrólise com a concentração do 2,4-BDNPP para os complexos 1 , 2 e 3 . CH ₃ CN/H ₂ O (1:1); [complexo] = 4,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; [tampões] = 5,0 x 10 ⁻² mol L ⁻¹ (MES, pH = 6,0 e 6,5; CHES, pH = 9,0 e 9,5); I = 5,0 x 10 ⁻² mol L ⁻¹ (LiClO ₄); Temperatura, 25 °C.....	83
Figura 36 - Eletroforese em gel de agarose para clivagem do DNA plasmidial pelo complexo 1 em diferentes concentrações. [DNA] = 330,0 ng, ~ 25,0 μM; [tampão] = MES (10 mM, pH 6,0); [complexo] = 0,0 a 0,5 μM; Temperatura = 50 °C; tempo de incubação = 1,0 h, ao abrigo da luz.	86
Figura 37 - Eletroforese em gel de agarose para clivagem do DNA plasmidial pelos complexos 2 e 3 em diferentes concentrações. [DNA] = 330,0 ng, ~ 25,0 μM; [tampão] = MES (10 mM, pH 6,0); [complexo] = 0,0 a 5,0 μM; Temperatura = 50 °C; tempo de incubação = 1,0 h, ao abrigo da luz.	86

Figura 38 - Representação esquemática da obtenção da quitosana a partir da quitina.....	91
Figura 39 - Ligante HL utilizado por Justi et al. (2005).....	93
Figura 40 - Espectros na região do infravermelho do ligante L ₁ , da quitosana (Q) e de sua respectiva modificação com o ligante L ₁ (Q-L ₁).....	105
Figura 41 - Espectros de ¹³ C NMR no estado sólido do biopolímero Q e Q-L ₁	106
Figura 42 – Análise termogravimétrica para Q, L ₁ e Q-L ₁	108
Figura 43 - Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio (77 K) do adsorvente Q-L ₁	109
Figura 44 - Potencial zeta em função do pH para o Q-L ₁ disperso em água destilada. [Q-L ₁] = 0,1 mg ml ⁻¹	109
Figura 45 - Distribuição de tamanhos de partículas do adsorvente Q-L ₁ disperso em água destilada. [Q-L ₁] = 0,1 mg ml ⁻¹	111
Figura 46 - Cinética de adsorção de Zn(II), Cu(II) e Ni(II) a partir de misturas multicomponentes usando como adsorvente o Q-L ₁ : (a) Zn-Cu; (b) Zn-Ni; e (c) Zn-Cu-Ni. [M (II)] total = 1,5 mmol L ⁻¹ ; pH = 9,0; [Q-L ₁] = 1 g L ⁻¹ ; T = 25,0 ± 1,0 °C.....	113
Figura 47 - Ajuste dos modelos de pseudo primeira ordem e pseudossegunda ordem (PPO e PSO, respectivamente) aos dados experimentais para adsorção de Cu (a), Zn (b) e Ni (c) pelo adsorvente Q-L ₁ no sistema ternário (Cu-Ni-Zn).	116
Figura 48 - Ajuste dos modelos de pseudo primeira ordem e pseudo segunda ordem (PFO e PSO, respectivamente) aos dados experimentais para adsorção de Cu (a) e Zn (b) pelo adsorvente Q-L ₁ no sistema binário (Cu-Zn).	117
Figura 49 - Ajuste do modelo de pseudo primeira e pseudo segunda ordem (PFO e PSO, respectivamente) aos dados experimentais de adsorção de Zn (a) e Ni (b) pelo adsorvente Q-L ₁ no sistema binário (Zn-Ni).	118
Figura 50 - Possíveis interações metal - ligante em Q-L ₁ . M = Cu(II), Ni(II) e Zn(II).....	120
Figura 51 - Isotermas para adsorção de Cu(II), Zn(II) e Ni(II) pelo Q-L ₁ a 25 ° C. Cu(II) e Zn(II) em pH 9,0; e Ni(II) em pH 10,0.	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação da eficiência catalítica entre os sistemas 1-PEI e o complexo Fe(III)/Cu(II).	40
Tabela 2. Porcentagens de C, H e N (calculado/experimental) dos ligantes preparados.	67
Tabela 3. Principais bandas (cm^{-1}) e atribuições dos espectros na região do infravermelho para os precursores sintetizados.	69
Tabela 4. Principais bandas observadas dos espectros na região do infravermelho dos ligantes L ₁ -NAF, L ₁ -Et-NAF e L ₁ -Prop-NAF, em número de onda (cm^{-1}).	69
Tabela 5. Deslocamentos químicos, em ppm, observados nos espectros de ¹ H NMR para os precursores e ligantes.	70
Tabela 6. Porcentagens de C, H e N (calculado/experimental) dos complexos 1 , 2 e 3	71
Tabela 7. Principais bandas e suas respectivas atribuições em cm^{-1} , dos espectros na região do infravermelho para os complexos sintetizados.	72
Tabela 8. Dados de espectroscopia eletrônica para os complexos Fe ^{III} Zn ^{II} -L ₁ -NAF (1), Fe ^{III} Zn ^{II} -L ₁ -Et-NAF (2), Fe ^{III} Zn ^{II} -L ₁ -Prop-NAF (3).	77
Tabela 9. Valores de pK _a s calculados para os complexos sintetizados e do complexo Fe ^{III} Zn ^{II} -L ₁	78
Tabela 10. Valores de pK _a s cinéticos e potenciométricos dos complexos 1 , 2 e 3 na hidrólise o 2,4-BDNPP.	82
Tabela 11. Parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP para os complexos: 1 , 2 e 3	84
Tabela 12. Parâmetros instrumentais para análise dos metais por F AAS.	101
Tabela 13. Análise de CHN da quitosana (Q) e da quitosana modificada (Q-L ₁).	106
Tabela 14. Capacidades de adsorção experimental do Q-L ₁ para Cu(II), Ni(II) e Zn(II) obtidas a partir dos estudos cinéticos com sistemas multicomponentes. [M(II)]= 1.5 mmol L ⁻¹ ; [Q-L ₁]= 1 g L ⁻¹ ; pH= 9.0.	114
Tabela 15. Parâmetros obtidos e estimados para o ajuste dos modelos cinéticos aos dados experimentais de adsorção de Cu(II), Ni(II) e Zn(II) utilizando Q-L ₁	119
Tabela 16. Parâmetros de adsorção dos íons Cu(II), Zn(II) e Ni(II) pelo Q-L ₁ de acordo com os modelos Langmuir e linear.	123
Tabela 17. Comparação dos parâmetros obtidos a partir das isotermas de adsorção de Cu(II), Zn(II) e Ni(II) no Q-L ₁ com outros adsorventes.	123

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

2,4-BDNPP – Fosfato de bis(2,4-dinitrofenila)

λ – Comprimento de onda

Å – Angström

ϵ - Coeficiente de absorvidade molar

ACN – Acetonitrila

bpma - bis(piridilmetil)amina

bpmamff - 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formilfenol

C - Constante do modelo de DI

C_0 – Concentração inicial do metal em solução

C_e – Concentração de equilíbrio

cmff - 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol

C_p concentração do íon metálico na camada limite em torno da partícula adsorvente

C_t - Concentração do íon metálico no tempo t

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)

E_a – Energia do estado de transição

FI – Forma superenovelado do DNA

FII – Forma circular aberta do DNA

FIII – Forma linear do DNA

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

IR – Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

L₁-2 - [N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridil metil)aminometil]fenol

L₁-Et-NAF- 2-(((2-aminoethyl)amino)metil)-6-(((3-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxy -5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol

L₁-Prop-NAF - 2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((3-((naftaleno-1-ilmetil)amino)propil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol

k_1 – Constante de velocidade da adsorção de pseudo primeira -ordem

k_2 – Constante de velocidade de adsorção de pseudo segunda ordem

K_{ass} = Constante de associação

kbPAP- Fosfatase Ácida Púrpura presente no feijão vermelho

k_{cat} – Constante catalítica

k_D – Constante de distribuição q_m – Quantidade máxima de adsorção

K_f – Constante de formação de um complexo

K_L – Constante de equilíbrio de adsorção de Langmuir

K_M – Constante de Michaelis-Menten

MeOH – Metanol

MES – Ácido 2-[N-morfolino]etanosulfônico

q – Quantidade adsorvida

q_e - Quantidade de íon metálico adsorvido em equilíbrio

q_t - Quantidade de íon metálico adsorvido no tempo t (min)

RMN ^1H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RPM – Rotações por minuto

S_N2 – Substituição nucleofílica bimolecular

t – Tempo

THF - Tetrahidrofurano

TMS – Tetrametilsilano

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano

UV-Vis – Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível

V_0 – Velocidade inicial

$V_{\text{máx}}$ – Velocidade máxima

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	28
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E ESTADO DA ARTE	31
2.1	METALOENZIMAS.....	31
2.2	EFEITO SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO	35
2.3	NUCLEASES SINTÉTICAS: MIMETIZANDO ENZIMAS	40
3.	OBJETIVOS.....	44
3.1	OBJETIVO GERAL	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4.	MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO.....	45
4.1	MATERIAIS	45
4.1.1	Reagentes e soluções	45
4.2	MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO	45
4.2.1	Análise Elementar (CHNSO)	45
4.2.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ¹H NMR	46
4.2.3	Espectroscopia no infravermelho – IR	46
4.2.4	Espectroscopia eletrônica UV-Vis	46
4.2.5	Estudos de reatividade	46
4.2.6	Estudos de interação dos complexos com DNA	48
4.2.7	Titulação Potenciométrica	49
4.3	SÍNTESES	50
4.3.1	Síntese dos ligantes	50
4.3.1.1	<i>Síntese do bis(piridilmetil)amina - bpma</i>	<i>50</i>
4.3.1.2	<i>Síntese do 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol – cmff.....</i>	<i>51</i>
4.3.1.3	<i>Síntese do 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formilfenol – bpmamff</i>	<i>52</i>
4.3.1.4	<i>Síntese do 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil]fenol - Hpy3.....</i>	<i>54</i>
4.3.1.5	<i>Síntese do 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol – L₁</i>	<i>55</i>
4.3.1.6	<i>Síntese do 2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-((naftalen-1-ilmetil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol - L₁-NAF.....</i>	<i>57</i>
4.3.1.7	<i>Síntese do 2-(((2-aminoetil)amino)metil)-6-(((3-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metil fenol – L₁-Et-NAF</i>	<i>59</i>

4.3.1.8 Síntese do 2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((3-((naftaleno-1-ilmetil)amino)propil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol – L ₁ -Prop-NAF	62
4.3.2 Síntese dos complexos.....	65
4.3.2.1 Síntese do perclorato de μ -hidroxo-2-((bis(piridin-2-ilmetil) amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((naftaleno-1-ilmetil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol Fe(III) Zn(II) – complexo Fe ^{III} Zn ^{II} -L ₁ -NAF (1)	65
4.3.2.2 Síntese do perclorato μ -hidroxo-2-(((2-aminoetil)amino)metil)-6-(((3-((bis(pyridin-2-yl metil) amino) metil) –2-hidroxi -5- metilbenzil) (piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol Fe ^{III} Zn ^{II} – complexo Fe ^{III} Zn ^{II} -L ₁ -Et-NAF (2)	66
4.3.2.3 Síntese do μ -hidroxo-2-((bis(piridin-2-ylmetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((3-((naftaleno-1-ilmetil) amino) propil) amino) metil) benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol Fe ^{III} Zn ^{II} – Fe ^{III} Zn ^{II} -L ₁ -Prop-NAF (3)	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES.....	67
5.1.1 Análise elementar de C, H e N.....	67
5.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho	68
5.1.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio - ¹ H NMR	70
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS	71
5.2.1 Análise elementar de CHN	71
5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho – IR	72
5.2.3 Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis.....	74
5.2.4 Titulação potenciométrica	77
5.2.5 Estudos de reatividade hidrolítica do substrato modelo	79
5.2.5.1 Efeito do pH na hidrólise do 2,4-BDNPP	80
5.2.5.2 Efeito da concentração do substrato na hidrólise do 2,4-BDNPP.....	82
5.3 ESTUDOS DE REATIVIDADE DOS COMPLEXOS NA PRESENÇA DO DNA PLASMIDIAL	85
5.3.1 Efeito da concentração dos complexos	85
6. INTRODUÇÃO	89
7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E ESTADO DA ARTE	91
7.1 QUITOSANA.....	91
7.2 AGENTES COMPLEXANTES/QUELANTES	92
7.3 MECANISMOS DE ADSORÇÃO	93
7.3.1 Cinética de adsorção.....	94
7.3.2 Isotermas de adsorção	96
7.4 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DOS ÍONS METÁLICOS Zn(II), Cu(II) E Ni(II)..	96

8.	OBJETIVOS	99
8.1	OBJETIVO GERAL.....	99
8.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	99
9.	MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO	100
9.1	MATERIAIS	100
9.1.1	Reagentes e soluções	100
9.2	MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO	100
9.2.1	Análise termogravimétrica (TGA)	100
9.2.2	Caracterização textural.....	100
9.2.3	Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	101
9.2.4	Análise de potencial zeta em função do pH.....	101
9.2.5	Espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS)	101
9.3	EXPERIMENTOS DE ADSORÇÃO	102
9.3.1	Preparação da quitosana modificada (Q-L₁) pela inserção do ligante L₁	102
<i>9.3.1.1</i>	<i>Cinética de Adsorção dos Íons Zn(II), Cu(II) e Ni(II).....</i>	<i>103</i>
<i>9.3.1.2</i>	<i>Isoterma de adsorção individual dos íons Zn(II), Cu(II) e Ni(II)</i>	<i>103</i>
10	RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
10.1	CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA MODIFICADA	104
10.1.1	Espectroscopia na região do infravermelho	104
10.1.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono no estado sólido ¹³ C NMR	105
10.1.3	Análise elementar de C, H e N.....	106
10.1.4	Análise termogravimétrica – TGA.....	107
10.1.5	Caracterização textural.....	108
10.1.6	Potencial zeta em função do pH	109
10.1.7	Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	110
10.2	ESTUDOS DE ADSORÇÃO DE Zn(II), Cu(II) E Ni(II) PELA QUITOSANA MODIFICADA.....	111
10.2.1	Complexação e cinética de adsorção pela quitosana funcionalizada.....	111
10.1.2	Isoterma de adsorção de Zn(II), Cu(II) e Ni(II) pela Q-L ₁	121
11	CONCLUSÕES.....	126
12	PERSPECTIVAS.....	126
	REFERÊNCIAS	128

PARTE I

**NOVOS COMPLEXOS BINUCLEARES COM O GRUPO NAFTALENO PARA O
ESTUDO DE SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO COMO MODELOS
MIMÉTICOS PARA FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS**

1. INTRODUÇÃO

Pesquisadores de todo o mundo buscam mimetizar enzimas como, por exemplo, as Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs), que atuam na hidrólise de ésteres de fosfato. Esta procura é devido ao alto poder catalítico destas enzimas, bem como à sua alta especificidade e seletividade. Desta forma, informações estruturais e eletrônicas com relação ao sítio ativo destas enzimas são cruciais para modelagem correta de moléculas bioinspiradas. Tais modelos são úteis para o desenvolvimento de fármacos e catalisadores industriais.

Portanto, estudos nesta área são determinantes para o desenvolvimento científico e tecnológico de um país, favorecendo a criação de recursos humanos e infraestrutura adequada destinados à pesquisa aplicada. Assim, com uma linha de pesquisa voltada a depreender o mecanismo de funcionamento de enzimas, neste caso as PAPs, o laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC) tornou-se referência no Brasil e no mundo pelo desenvolvimento de complexos biomiméticos para o estudo de atuação das PAPs, no que diz respeito à clivagem de DNA e desenvolvimento de novos fármacos com potencial antitumoral (KARSTEN et al., 2002)(PIOVEZAN et al., 2010)(DAUMANN et al., 2013)(CAMARGO et al., 2015).

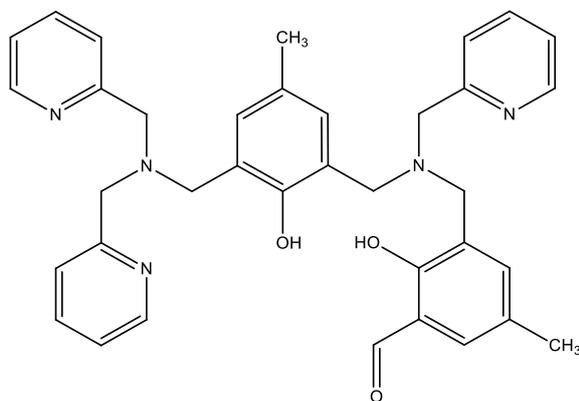
No intuito de melhorar os modelos já sintetizados pelo grupo de Neves e colaboradores, o interesse específico deste trabalho é de ancorar novos grupos químicos ao ligante L_1 (Figura 1) para simulação da segunda esfera de coordenação, com o objetivo de estudar de que maneira tais moléculas influenciam na atividade de hidrólise de ésteres de fosfato e como tais modificações interagem com DNA. Este é um dos campos mais promissores no que diz respeito à mimetização de enzimas, haja vista que fatores intramoleculares – como ligações de hidrogênio, efeitos eletrostáticos e solvatação – atuam de forma sinérgica com o sítio ativo de enzimas, proporcionando assim, alta eficiência catalítica e seletividade.

Efeitos de segunda esfera de coordenação são basicamente gerados a partir da presença de grupos carregados ou moléculas neutras que possam participar de ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas com ligantes presentes na primeira esfera de coordenação de metaloenzimas. Estes efeitos são de vital importância dentro da catálise, de modo que aminoácidos residuais, que não estão diretamente coordenados a íons metálicos, conduzem à estabilização do estado de transição, baixando a energia de ativação (ΔG^\ddagger) e aumentando a velocidade de reação do sistema (ZHAO et al., 2013).

Nesta esteira, a estratégia aqui empregada consistiu em utilizar como referência os complexos de $Fe^{III}Zn^{II}$ e $Fe^{III}Cu^{II}$ formados pelo ligante L_1 (Figura 1), (PIOVEZAN et al., 2010)

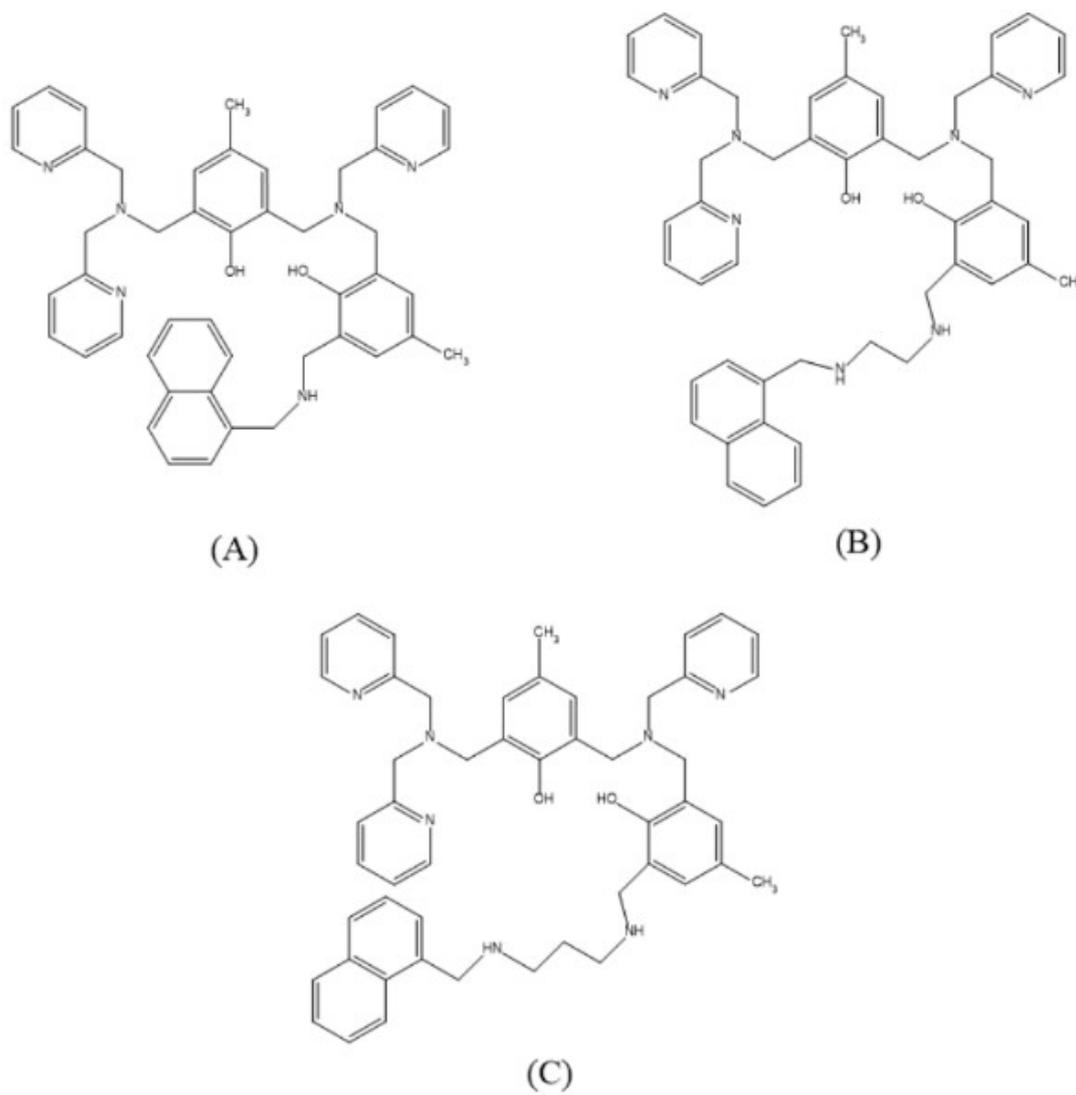
visando testar a influência de grupos naftaleno na eficiência na clivagem das ligações diéster de fosfato do substrato bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP).

Figura 1 - Ligante L₁.



Fonte: o autor

Em razão da reatividade do grupo aldeído presente no fenol terminal do ligante L₁ (Figura 1), um grupo naftaleno intercalado por uma metil-amina, etano-1,2-diamina e propano-1,3-diamina foram ancoradas no ligante L₁ (Figura 2), com o objetivo de estudar a influência da distância do grupo naftaleno ao centro binuclear do complexo e das ligações não covalentes proporcionadas pelos seus anéis aromáticos e aminas, na clivagem do DNA plasmidial e das ligações covalentes do substrato modelo 2,4-BDNPP.

Figura 2 - Ligantes sintetizados neste trabalho: (A) L₁-NAF, (B) L₁-Et-NAF e (C) L₁-Pro-NAF.

Fonte: o autor

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E ESTADO DA ARTE

O presente capítulo traz um pequeno histórico sobre desenvolvimento das metaloenzimas com ênfase nas PAPs juntamente com os recentes avanços no que tange ao efeito de segunda esfera de coordenação. Desse modo, uma revisão bibliográfica fornecerá os alicerces que sustentam o estado da arte em que PAPs e o efeito de segunda esfera de coordenação estão inseridos no atual momento da ciência, justificando a iniciativa de realizar o presente trabalho.

2.1 METALOENZIMAS

Na atualidade, é impossível dissociar a biologia da química inorgânica quando estudamos processos enzimáticos como, por exemplo, reações de hidrólise e reações de transferências de elétrons. Em ambas, a presença de metais é indispensável à formação dos produtos dentro de um espaço de tempo adequado. Assim, a Química Bioinorgânica tem o propósito de compreender a interação entre os processos biológicos e os metais (BEINERT, 2005).

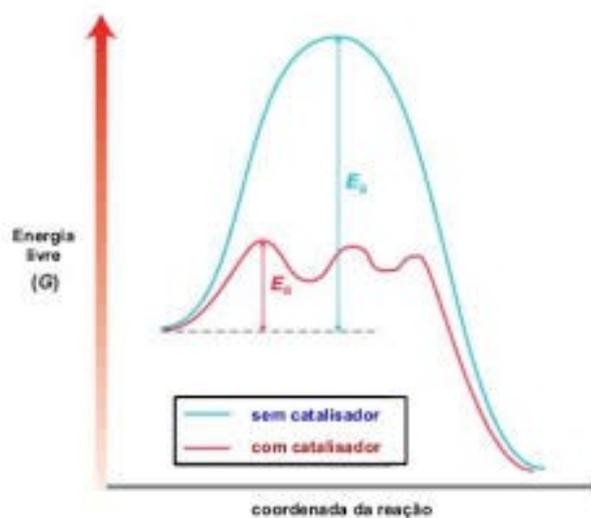
O estudo de enzimas, mais especificamente das metaloenzimas, é um bom exemplo desta conexão entre biologia e química inorgânica. Estas biomoléculas são caracterizadas por serem formadas por cadeias de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas organizadas de forma a criar um arranjo tridimensional que permite compor o sítio ativo da enzima, este podendo ser formado por um ou mais íons metálicos. O estado da arte de uma enzima reside no seu poder de catalisar reações químicas, com velocidades incrivelmente altas, concomitantemente à elevada seletividade. Esta propriedade justifica o imenso interesse no estudo do mecanismo de funcionamento destas metaloenzimas pela comunidade científica (LEWIS, 2013), (VALDEZ et al., 2014).

“Há duas condições fundamentais para a vida. A primeira, é que a entidade viva tem que ser capaz de se autorreplicar; a segunda, o organismo deve ser capaz de catalisar reações químicas eficientemente e seletivamente” (NELSON, 2004).

Um catalisador tem a propriedade de promover um novo caminho para a reação química, proporcionando uma energia livre de ativação (ΔG^\ddagger) inferior ao da reação não

catalisada (Figura 3). Com isso, a velocidade da reação é elevada, mas a constante de equilíbrio permanece inalterada. Exatamente esse o papel que enzimas desempenham nos mais diversos organismos vivos.

Figura 3 - Diagrama de energia de uma reação química.



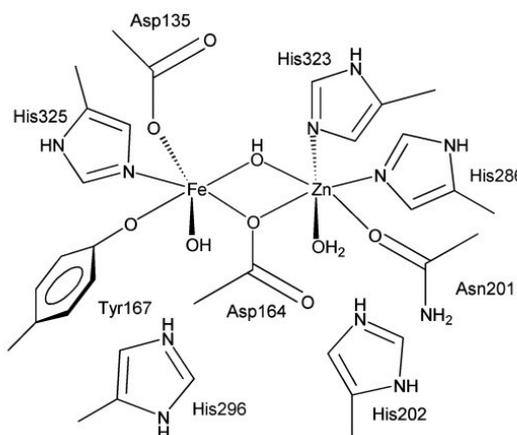
Fonte: o autor

Assim, um exemplo de catalisadores naturais são as metaloenzimas fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) que são compostas de um centro heterobinuclear de Fe(III)M(II) (M = Fe, Zn Mn) (Figura 4), e são capazes de hidrolisar anidridos e ésteres de fosfato na faixa de pH de 4 a 7. Pertencentes à família das metalohidrolases e dotadas de uma bela cor púrpura, como resultado de uma transição de transferência de carga de um átomo de oxigênio, presente no resíduo de aminoácido tirosina, para o íon de Fe(III) localizado no sítio ativo ($O_{Tyr} \rightarrow Fe(III)$, $\lambda = 515-560$ nm), este grupo de enzimas está presente em mamíferos, plantas e ainda, em fungos. Assim, em mamíferos as PAPs possuem um sítio ativo constituído basicamente por um centro binuclear de Fe(III)-Fe(II) e estão associadas a funções como reabsorção óssea, geração de espécies ativas de oxigênio como resposta imunitária e transporte de ferro (MITIC et al., 2014). As PAPs são bifuncionais, ou seja, catalisam tanto reações hidrolíticas como peroxidações. Diferentemente dos mamíferos, em plantas a maioria das PAPs possuem um sítio ativo formado por Fe(III)-Zn(II) ou Fe(III)-Mn(II) e desempenham a função de obtenção de fosfato inorgânico, sendo este essencial para a biossíntese de uma variedade de moléculas (LINDQVIST et al., 1999) (SCHENK et al., 2008) (MCGEARY; SCHENK; GUDDAT, 2014).

Embora as PAPs sejam estudadas há bastante tempo, o mecanismo destas funções ainda não está totalmente esclarecido.

Na década de 90, um salto importante foi dado com a utilização da análise de raios X no estudo da estrutura das PAPs. A primeira estrutura resolvida por difração de raios X foi a enzima do feijão vermelho (kbPAP) por Sträter (1995) e Klabunde (1996). A estrutura obtida mostra um centro binuclear de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ ligados em ponte por meio do carboxilato do grupo Asp-164 (Figura 4). O íon $\text{Fe}(\text{III})$ está coordenado pela tirosina (Tyr-167), pelo átomo de nitrogênio da His-325 e monodentadamente pelo grupo carboxilato do Asp-135. O íon $\text{Zn}(\text{II})$ está coordenado pelo átomo de nitrogênio da His-286, pelo átomo de nitrogênio da His-323 e pelo átomo de oxigênio da amida do Asn-201. Para completar a esfera de coordenação dos íons metálicos, um íon hidróxido está ligado ao $\text{Fe}(\text{III})$, uma ponte hidróxida entre os dois íons e uma molécula de água está coordenada ao $\text{Zn}(\text{II})$. Alguns anos depois, novas estruturas das PAPs foram obtidas a partir de ratos, porcos e batata doce (SCHENK et al., 2005), (FUNHOFF et al., 2005), (SCHENK et al., 2001).

Figura 4 - Representação do sítio ativo de uma PAP do feijão vermelho.



Fonte: Mitić et al. (2006)

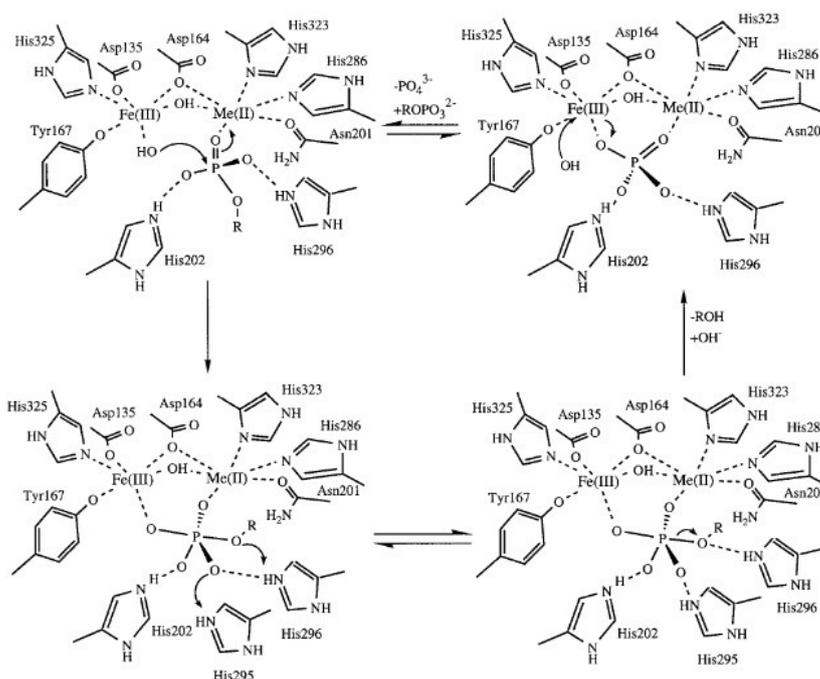
A partir da estrutura cristalina da kbPAP, Klabunde e colaboradores elaboraram de forma elegante o modelo de mecanismo de atuação da enzima, sendo este aceito até os dias de hoje. Conforme os autores, o mecanismo proposto tem a participação do centro binuclear e é do tipo $\text{S}_{\text{N}}2$, (Figura 5) (KLABUNDE et al., 1996).

A participação do metal trivalente, no caso o $\text{Fe}(\text{III})$, é crucial para o efeito catalítico. A ativação de uma molécula de água coordenada ao íon férrico gera um íon hidróxido nucleofílico que ataca o átomo de fósforo do substrato. O papel desempenhado pelo metal

bivalente, neste caso Zn(II), está em orientar o substrato para que ocorra o ataque nucleofílico. Até os dias de hoje, admite-se que todas as PAPs empregam variações deste mecanismo para hidrólise de monoésteres de fosfato (SCHENK et al., 2013) (MOLINA et al., 2015).

A estrutura de raios X também é de grande valor para o desenvolvimento de complexos modelos com o objetivo de mimetizar o sítio ativo das PAPs, pois ela fornece um molde para a construção de novos ligantes bioinspirados. Uma vez que o trabalho de purificação e separação de enzimas é bastante oneroso, tanto financeira como experimentalmente, o design de modelos biomiméticos se torna uma ótima alternativa para obtenção de dados estruturais, propriedades espectroscópicas e possibilita, por consequência, uma melhor compreensão do mecanismo catalítico das PAPs.

Figura 5 - Modelo de mecanismo proposto por Klabunde e colaboradores para hidrólise de éster de fosfato pela ação das PAPs.



Fonte: Klabunde et al. (1996)

Assim, nas últimas décadas, diversos modelos biomiméticos de PAPs foram sintetizados (GAVRILOVA; BOSNICH, 2004), (NEVES et al., 2007) e (BOSCH et al., 2015). O desenvolvimento de ligantes assimétricos, embora apresentem uma rota sintética laboriosa, fornecem um ambiente de coordenação satisfatório quando o objetivo é a mimetização de uma enzima com sítio ativo binuclear de valência mista, nesse caso as PAPs (JARENMARK et al.,

2011). Ao fornecerem dois ambientes de coordenação como resultado da presença de átomos doadores duros e macios – definição de Pearson, é viabilizado a formação de complexos heterobinucleares estáveis. Com este raciocínio, Neves e colaboradores em 2007 reportaram o primeiro complexo heterobinuclear de valência mista com a unidade estrutural [Fe(III)(μ -OH)Zn(II)] com bons resultados quando comparados a enzima em relação a propriedades estruturais e eletrônicas. A estrutura cristalográfica do complexo revela que a ligação entre o íon Fe(III) e uma molécula de água encontra-se em uma posição equivalente ao obtido para o rkbPAP. O modelo apresentou bons resultados com relação a propriedades estruturais e eletrônicas quando comparado a enzima (NEVES et al., 2007).

Os modelos biomiméticos com a característica de simular a primeira esfera de coordenação de enzimas encontram-se atualmente bem estabelecidos com excelente reprodutibilidade de características eletrônicas e estruturais das correspondentes enzimas. Entretanto, a atividade catalítica de uma enzima é ainda muito superior quando comparada à atividade dos complexos biomiméticos sintetizados (KAPHAN et al., 2015).

Tendo em vista estes desafios, o desenvolvimento de modelos biomiméticos reside agora na simulação dos efeitos de segunda esfera de coordenação. Com o objetivo de alcançar resultados mais satisfatórios.

2.2 EFEITO SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO

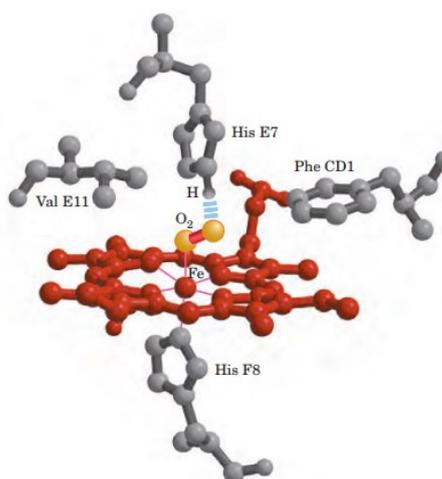
“Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso.” (Albert Einstein)

A compreensão de processos catalíticos enzimáticos vai muito além do estudo do sítio ativo de metaloenzimas. Ou seja, é preciso estudar de forma conjunta o cofator (sítio ativo) com o ambiente a sua volta. Assim, um campo promissor relativamente novo dentro do estudo de catálise enzimática é o entendimento dos efeitos de segunda esfera de coordenação (PORDEA, 2015). Estes efeitos correspondem a interações entre o centro metálico e seus ligantes primários (primeira esfera de coordenação) com grupos residuais de aminoácidos que não fazem parte intimamente do ambiente de coordenação do metal (LEHNERT, 2012). Estes aminoácidos se inter-relacionam com o sítio ativo por meio de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, efeito, forças de van der Waals ou mesmo proporcionando uma cavidade hidrofóbica para a

reação catalítica. Assim, esta sinergia entre as duas esferas de coordenação proporciona a redução de ΔG^\ddagger e como consequência, o aumento da velocidade da reação (ZHAO et al., 2013).

Os efeitos de segunda esfera de coordenação podem atuar de várias formas, à saber: agindo de forma a estabilizar o estado de transição e intermediários, proporcionar uma melhor afinidade e reconhecimento entre enzima-substrato, auxiliar na transferência de prótons além de estabilizar o grupo de saída. Como exemplo, podemos citar a histidina distal (HisE7) que estabiliza, por meio de ligações de hidrogênio, o dioxigênio ligado ao centro metálico de hemoglobina/mioglobina no complexo Hb/Mb-O₂ (Figura 6) (NELSON; COX, 2004). A carboxipeptidase, enzima que catalisa ligações peptídicas, é outro bom exemplo de como o efeito de segunda esfera atua. A tirosina (Tyr248) proporciona especificidade via interações hidrofóbicas enquanto que a Arginina (Arg145) fixa o substrato em uma posição favorável a reação através de ligações de hidrogênio. Concomitantemente, o resíduo de glutamato (Glu270) age como um acceptor de prótons, ajudando na retirada de um próton da água coordenada ao íon Zn(II) facilitando assim o ataque nucleofílico sobre a carbonila (Figura 7) (LEHNERT, 2012).

Figura 6 - Ilustração mostrando a interação por ligação de hidrogênio entre uma a histidina distal (His E7) e a molécula de dioxigênio no grupo HEME, presente na hemoglobina.



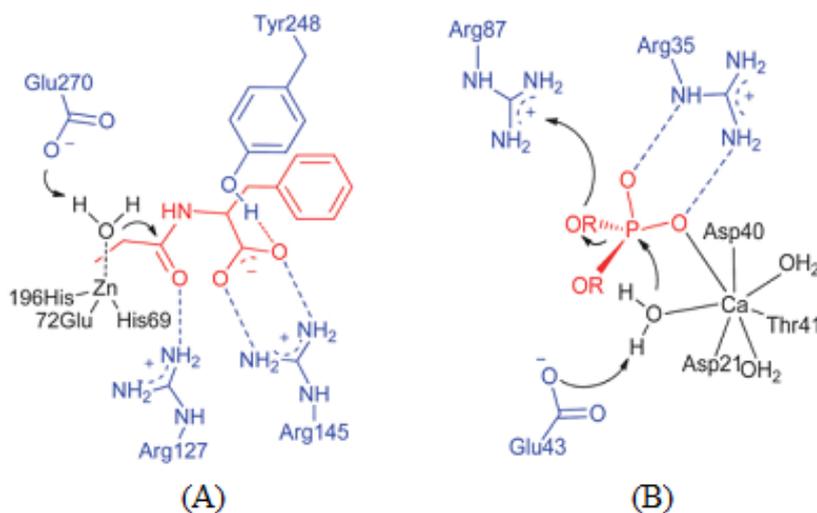
Fonte: Nelson e Cox (2004).

A estabilidade das ligações fosfodiéster no DNA são de tal estabilidade que a constante de velocidade de hidrólise para o processo não é conhecida (DOMINGOS et al., 2003) Entretanto, a enzima *Staphylococcal nuclease* acelera a velocidade de hidrólise do DNA em 10^{16} vezes. Pela correlação entre a estrutura e propriedades conhecidas da enzima, o mecanismo de ação proposto envolve três resíduos: Arg35, Glu43 e Arg87. O carboxilato do grupo Glu43

atua abstraindo um próton de uma água coordenada ao íon Ca(II) (Figura 7) que atua como um nucleófilo, atacando o átomo de fósforo. O grupo Arg35, age por intermédio de ligações de hidrogênio, de forma a favorecer a entrada do substrato no sítio ativo contribuindo para uma melhor afinidade entre enzima substrato. Finalizando o mecanismo, a Arg87 estabiliza o estado de transição e auxilia na liberação do grupo de saída. (COTTON; HAZEN, EDWARD E.; LEGG, 1979)

Desta forma, fica evidente o interesse dentro da química Bioinorgânica de desenvolver complexos biomiméticos que conservem na sua estrutura, grupos com o objetivo de simular efeitos de segunda esfera de coordenação: com o propósito de elevar a seletividade e o poder catalítico dos modelos bioinspirados.

Figura 7 - Ilustração dos efeitos de segunda esfera de coordenação sobre o cofator e substrato da enzima carboxipeptidase (A) e da *Staphylococcal nuclease* (B).

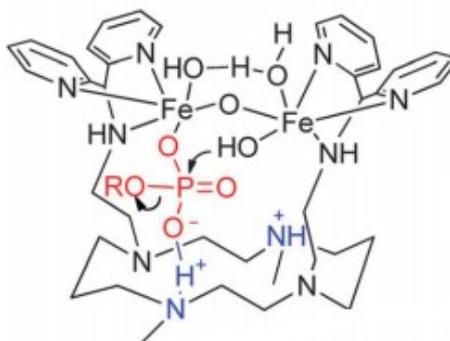


Fonte: Kramer (1999).

Entretanto, até os dias atuais, há poucos exemplos de modelos que integram tais efeitos na literatura. Em complexos metálicos, o efeito de segunda esfera pode ser obtido através da incorporação de determinados grupos químicos na estrutura do complexo. O grupo amino é versátil, pois pode ser protonado, e assim, exercer efeitos eletrostáticos e interagir por ligações de hidrogênio (COMBA et al., 2012). Assim, Krämer e coautores sintetizaram um complexo macrocíclico binuclear de ferro contendo 1,8-Dimetil-1,4,8,11-tetraazaciclodecane com o objetivo de acelerar a hidrólise do 2,4-dinitrofenilfosfato (DNPP). O grupo amino protonado

auxilia na orientação do substrato a coordenar em um dos íons ferro. Uma espécie hidroxilo coordenada ao íon ferro adjacente faz o ataque nucleofílico sobre o átomo de fósforo (ZHAO et al., 2013) (Figura 8).

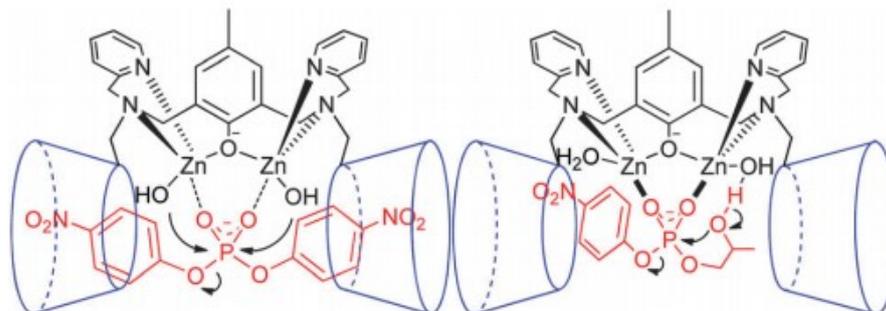
Figura 8 - Ilustração do efeito da segunda esfera de coordenação no mecanismo da hidrólise de éster fosfato.



Fonte: Zhao et al. (2013)

Do mesmo modo, como aminas são empregadas para efeitos de segunda esfera, a utilização de guanidinas propicia à estabilização de aníons devido a sua carga positiva (TJIOE et al., 2012). O grupo guanidíneo presente no resíduo de aminoácido arginina, por exemplo, desempenha um papel chave na estabilização do estado de transição na reação de hidrólise do monoéster de fosfato promovido pela enzima fosfatase alcalina, por intermédio de sua carga positiva (TJIOE et al., 2016). Ácidos carboxílicos que atuam como um acceptor de prótons, ajudam a deslindar o funcionamento de resíduos de aminoácidos em enzimas (SHENG et al., 2007). Elaborados compostos contendo moléculas supramoleculares como ciclodextrinas, calix[n]arenos (Figura 9) tem proporcionado bons modelos para estudos de segunda esfera, sendo que, este tipo de modificação é útil para orientação do substrato (ZHAO et al., 2015).

Figura 9 - Proposta de mecanismo de hidrólise de fósforo diéster catalisada por complexos de Zn(II) funcionalizados com CDs. A ciclodextrina ajuda posicionar o substrato para facilitar o ataque nucleofílico.

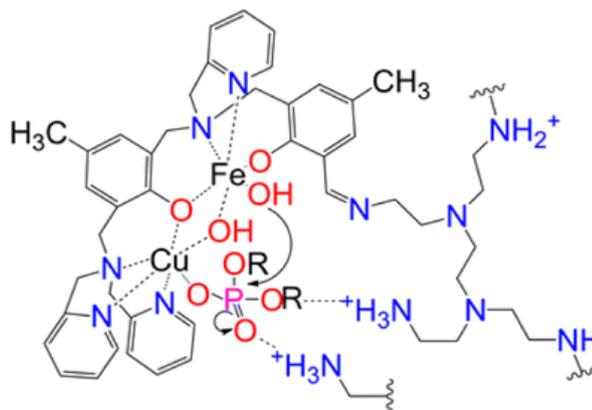


Fonte: Zhao et al. (2015)

Outra estratégia para mimetização de enzimas inclui a funcionalização de polímeros com um determinado catalisador. A possibilidade de inserção de diferentes grupos laterais na sua estrutura proporciona uma característica única, que é a criação de microambientes em torno do sítio ativo, assim, compondo uma série de efeitos de segunda esfera de coordenação que ocorre em enzimas, permitindo um estudo mais aprofundado com relação ao efeito da cadeia proteica na catálise (YIN et al., 2012).

Desta forma, Souza e coautores utilizando a polietilenoimina (PEI) funcionalizada com complexo binuclear de Fe(III)/Cu(II) (1) (Figura 10) obtiveram resultados demonstrando este ser mais eficiente (k_{cat}/K_M) quando comparado ao complexo Fe(III)/Cu(II) na hidrólise do 2,4-BDNPP (Tabela 1).

Figura 10 - Proposta de estrutura para o sistema 1-PEI e sua ligação ao diéster de fosfato.



Fonte: Souza et al. (2013)

Tabela 1 - Comparação da eficiência catalítica entre os sistemas 1-PEI e o complexo Fe(III)/Cu(II).

Catalisador	k_{cat}	K_M	k_{cat}/K_M
Fe(III)/Cu(II)	$6,77 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$	$3,08 \pm 0,03 \text{ mM}$	$2,19 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$
1-PEI	$1,14 \pm 0,09 \text{ h}^{-1}$	$0,40 \pm 0,13 \text{ mM}$	$2,85 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Fonte: Souza et al. (2013).

É importante ressaltar que, o número de *turnover*, ou seja, o número de moléculas de substrato convertidas em produto foi maior para sistema 1-PEI com relação ao complexo Fe(III)/Cu(II). (SOUZA et al., 2013) Sendo este um resultado proeminente haja vista que, o *turnover* é um grande desafio a ser auferido (HOOLEY, 2016).

2.3 NUCLEASES SINTÉTICAS: MIMETIZANDO ENZIMAS

Em que pesem as sucessivas inovações e descobertas no campo da bioquímica, não há na atualidade molécula que fascine gerações de pesquisadores como o DNA (ácido desoxirribonucleico). Desde a publicação de sua estrutura em 1953 por James Watson e Francis Crick esta molécula ainda é objeto de constantes estudos e descobertas, como pode ser observado pelo periódico crescimento no número de publicações em artigos científicos a cada ano no sítio Science Direct (WATSON, J. D.; CRICK, 1953).

Uma das razões de estudo de hidrolases é o seu papel, dentre outros, de atuar na hidrólise de ligações de ácidos nucleicos (DNA e RNA), ganhando o nome de nucleases. Desta maneira, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de nucleases sintéticas é crucial não só para o

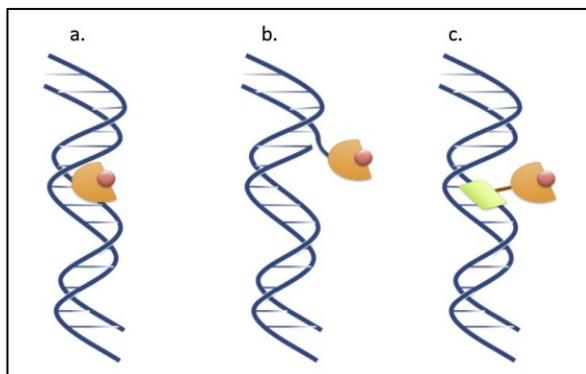
desenvolvimento teórico a respeito do modo de atuação destas enzimas naturais, como também para o desenvolvimento de diversos campos nas áreas da biologia e medicina, como por exemplo, desenvolvimento de fármacos, planejamento de materiais funcionais e ferramentas genéticas moleculares (YU et al., 2016), (MISHRA et al., 2014).

Assim, uma das linhas de pesquisa referentes ao DNA é encarregada de estudar a interação e clivagem deste biopolímero por pequenas moléculas, como complexos metálicos. O grupo de pesquisa de Neves e colaboradores tem desenvolvido uma série de complexos com o propósito de clivar ligações fosfato do DNA, adquirindo experiência sólida nesta área do conhecimento (REY et al., 2007), (MUXEL et al., 2014), (XAVIER; NEVES, 2016).

São conhecidos dois mecanismos de clivagem do DNA: o primeiro ocorre via clivagem oxidativa, que envolve espécies reativas de oxigênio além de requerer agentes externos como luz e espécies oxidativas/reduativas para iniciar o processo de clivagem, sendo que este mecanismo provoca danos irreversíveis ao DNA. O segundo mecanismo é a clivagem hidrolítica e requer a ativação do nucleófilo (OH^-) em uma posição próxima ao éster de fosfato. A vantagem deste processo recai sobre fato de que os produtos podem ser regenerados pela atuação de enzimas. (MASSOUD et al., 2016).

Interações com o DNA podem ser realizadas via ligação covalente (Figura 11), como no caso do complexo cisplatina (*cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]) que ao perder os dois cloretos, adquire a capacidade de formar ligações covalentes com o DNA (HOARAU et al., 2015). Via intercalação, entre moléculas planares poliaromáticas e bases nitrogenadas (Figura 11).

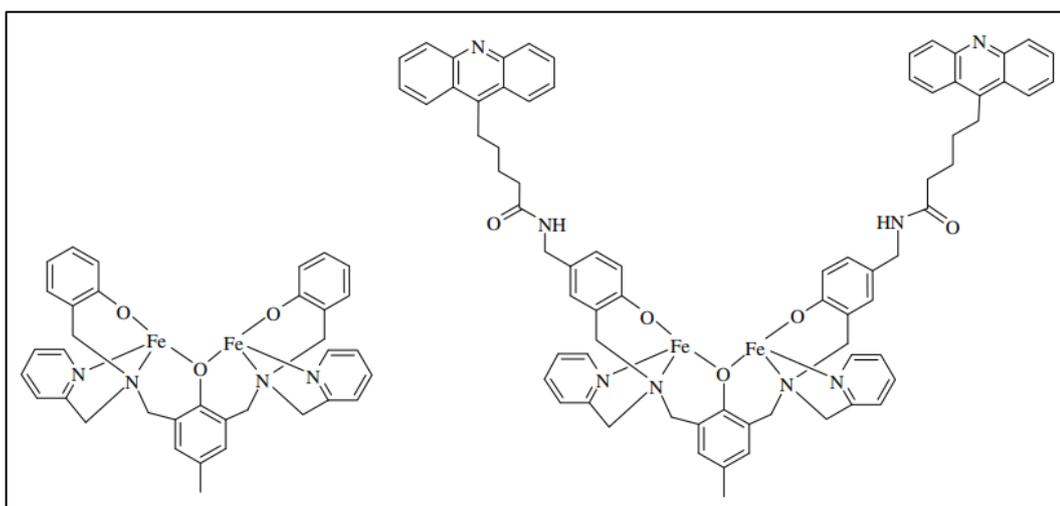
Figura 11 - Estratégias para ancorar moléculas na estrutura do DNA. Via interação não covalente (a), por meio de ligações covalentes (b) e através do uso de um intercalador (c).



Fonte: Hoarau et al. (2015)

Seguindo este raciocínio, Chen e colaboradores, elaboraram um complexo binuclear de Fe(III) com dois grupos acridina (Figura 12). O estudo realizado demonstrou, de forma surpreendente, o aumento em 300 vezes da eficácia da clivagem hidrolítica do DNA plasmidial quando comparado ao complexo sem os dois grupos acridina (CHEN et al., 2009). Por último, interações na região do sulco menor do DNA podem ser realizadas via interações eletrostáticas e através de ligações de hidrogênio (Figura 12) (KEENE; SMITH; COLLINS, 2009) (SLETTEN, 2016).

Figura 12 - Complexos sintetizados pelo grupo de Chen e colaboradores (2009). A direita o complexo com dois grupos acridina.



Fonte: Chen et al. (2009)

À vista disso, é esperado que a inserção do grupo aminoguanidina ($pK_a \approx 13$) no ligante L_1 viabilize interações de predominância eletrostática, uma vez que o DNA é um poliânion (CHEN et al., 2016). Em contrapartida, com a glucosamina/quitosana é esperado que ocorra interações por intermédio de ligações de hidrogênio, dado que as bases nitrogenadas presentes no DNA (adenina, citosina, timina e guanina) possuem átomos adequados para este tipo de interação. Como resultado, é expectável uma constante de associação (K_{ass}) maior (YU et al., 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivos gerais: preparar e caracterizar novos ligantes e seus respectivos complexos binucleares de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$, com a propriedade de atuar como modelos funcionais na clivagem de DNA e ésteres de fosfato.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar, purificar e caracterizar (CHN, ^1H NMR e IR) os ligantes L_1 , $\text{L}_1\text{-NAF}$ e $\text{L}_1\text{-Et-NAF}$;
- Sintetizar e caracterizar os complexos de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ derivados dos novo ligantes por análise elementar, técnicas espectroscópicas (IV e UV-Vis), espectrometria de massas e potenciometria;
- Avaliar a atividade catalítica dos novos complexos na hidrólise do substrato bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (BDNPP), buscando compreender em que medida as modificações aqui inseridas influenciam na catalise;
- Estudar os efeitos dos complexos metálicos na presença do DNA plasmidial com o objetivo de compreender em que medida as modificações aqui propostas interferem no mecanismo de hidrólise;

4. MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Reagentes e soluções

Os seguintes reagentes, materiais, gases e solventes, empregados nas sínteses e análises, foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia: hidróxido de sódio, ácido clorídrico 37 %, sulfato de sódio anidro, hidróxido de potássio, trietilamina, 1,6-hexanodiamina, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, boro-hidreto de sódio, hidróxido de lítio, brometo de potássio grau espectroscópico, cloreto de potássio, tampões biológicos MES, HEPES, CHES, perclorato de lítio, perclorato de ferro (III), perclorato de zinco (II) hexahidratado, perclorato de cobre (II), hexacianoferrato(III) de potássio, perclorato de lítio, argônio 5.0, hidrogênio, nitrogênio 2.0, clorofórmio deuterado, água deuterada, clorofórmio PA, acetonitrila PA, diclorometano PA, isopropanol PA, metanol PA, tetra-hidrofurano PA, etanol absoluto, éter etílico PA, acetona PA, acetonitrila grau espectroscópico. Foram purificados antes de utilizados os seguintes reagentes: 2-piridilcarboxialdeído (destilado à pressão reduzida), 2-(aminometil)piridina (destilada à pressão reduzida), piridina (destilada), 2,4-dinitrofenol (recristalizado em clorofórmio), quitosana com 90% de grau de desacetilação e glutaraldeído PA. O composto bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP) foi sintetizado, purificado e caracterizado de acordo com procedimento descrito na literatura (BUNTON; FARBER, 1969).

4.2 MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

4.2.1 Análise Elementar (CHNSO)

As análises dos teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre foram realizadas em um analisador elementar Perkin-Elmer 2400 com detectores para C, H, N, S e O para determinação da fórmula molecular dos compostos sintetizados, disponibilizado na Central de Análises do Departamento de Química.

4.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ^1H NMR

Os espectros de ^1H NMR dos ligantes foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker FT-NMR 200 MHz, na Central de Análises do Departamento de Química. Os deslocamentos químicos de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ ppm) e clorofórmio deuterado como solvente.

4.2.3 Espectroscopia no infravermelho – IR

Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR-2000, na região de 4000 a 400 cm^{-1} . As amostras foram preparadas por dispersão em KBr de grau espectroscópico e prensadas (~ 8 toneladas), formando pastilhas com cerca de 1 cm de diâmetro e $0,5\text{ mm}$ de espessura. Em seguida, estas pastilhas foram introduzidas diretamente no caminho óptico do equipamento para leitura do percentual de transmitância (%T). Como branco foi utilizado uma pastilha de KBr. As análises foram realizadas no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia.

4.2.4 Espectroscopia eletrônica UV-Vis

Os espectros eletrônicos nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho próximo foram obtidos em um espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia. As análises foram realizadas utilizando-se solventes de grau espectroscópicos e cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

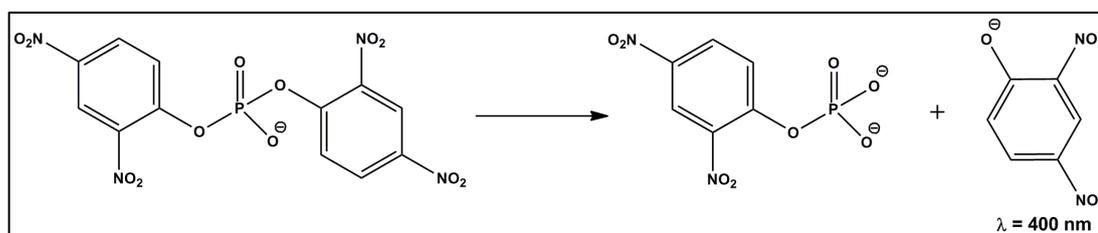
4.2.5 Estudos de reatividade

As atividades catalíticas dos complexos foram avaliadas por meio da reação de hidrólise do substrato bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4- BDNPP) (Figura 13) , o qual foi sintetizado de acordo com o método descrito por Bunton e Farber (1969). Para o estudo, foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostaticado, para acompanhar a variação de absorvância ocorrida em 400 nm ($\text{pH}/\epsilon\text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1} = 3,5/2125; 4,0/3408; 4,5/7182; 5,0/10078; 5,5/11405; 6,0/12004; 6,5-10,0/12100$) (PERALTA et al., 2010) relacionada à liberação do ânion 2,4-dinitrofenolato como

produto da reação de hidrólise. As reações foram monitoradas até 5% de conversão de substrato a produto e os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais. Estas foram obtidas através da inclinação do gráfico de absorvância versus tempo após 10 minutos de reação.

O gráfico das velocidades iniciais (v_0) em função do pH permitiu a obtenção dos valores de pKa para as espécies em equilíbrio e pH ótimo (valor de pH onde a atividade catalítica é máxima). A determinação das velocidades iniciais em função da concentração do substrato foi realizada sob as mesmas condições descritas para o estudo da influência do pH, no pH ótimo, resultando em cinéticas de saturação com comportamento de Michaelis-Menten.

Figura 13 - Hidrólise de um substrato modelo (2,4-BDNPP) intermediado cataliticamente por um complexo binuclear levando à formação do cromóforo 2,4-dinitrofenolato e outros produtos de reação.



Fonte: Bunton e Farber (1969)

A correção da hidrólise espontânea do substrato foi obtida 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 foi descontada da constante total da reação. O tratamento dos dados foi realizado através de uma regressão não linear utilizando o programa Origin 8.0. Assim, permitiu a obtenção direta da velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) e da constante de Michaelis-Menten (K_M). Por meio de simples cálculos chegou-se nos valores da constante catalítica ($k_{\text{cat}} = V_{\text{máx}} / [C]_c$), além do fator catalítico, pré definido somente para a reação de hidrólise, definido pela razão entre a constante catalítica e a constante da reação não catalisada ($f = k_{\text{cat}} / k_{\text{não catalisada}}$), eficiência catalítica ($E = k_{\text{cat}} / K_M$) e constante de associação ($K_{\text{ass}} = 1 / K_M$).

Os estudos em função do pH para a atividade de hidrólise, os quais visam a obtenção do pH ótimo de atividade frente à hidrólise do substrato 2,4-BDNPP e o pKa cinético para cada complexo, foram realizados em uma faixa de pH entre 4,0 e 10,00 a 25 °C para os complexos binucleares. Utilizaram-se cubetas de vidro óptico com capacidade para 4000 μL e caminho óptico de 1 cm, seladas com tampa de teflon, nas quais foram adicionados 1500 μL de solução aquosa (0,1 mol L^{-1}) do tampão (MES, pH 3,50, a 6,50; HEPES, pH 7,00 a 8,50; CHES, pH

9,00 a 10,00) com força iônica mantida constante ($I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, LiClO_4), 200 μL de uma solução em acetonitrila do complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), e 500 μL de acetonitrila. A reação foi iniciada com a adição de 800 μL de uma solução em acetonitrila do substrato ($[\text{S}]_{\text{final}} = 5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

Os experimentos cinéticos sob condições de excesso de substrato foram realizados como descrito a seguir: 1,5 ml de solução aquosa de tampão ($[\text{T}]_{\text{final}} = 5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), 200 μL de uma solução, em acetonitrila, de complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e acetonitrila foram adicionados em cubetas de quartzo ou vidro, com 1 cm de caminho óptico. A reação foi iniciada com a adição de volumes variando de 160 a μL a 1280 μL de solução, em acetonitrila, do substrato 2,4-BDNPP ($[\text{S}]_{\text{final}} = 1 \times 10^{-3} - 8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Em todos os experimentos realizados para a reação de hidrólise, o volume final da mistura reacional na cubeta foi de 3,0 ml. Correções da hidrólise espontânea do substrato 2,4-BDNPP foram realizadas sob condições idênticas, sem a adição do complexo. As velocidades iniciais foram obtidas da inclinação da curva da absorvância *versus* tempo nos primeiros 15 minutos de reação.

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

4.2.6 Estudos de interação dos complexos com DNA

Em colaboração com o Centro de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME), sob direção do Prof. Dr. Hernán Terenzi, a habilidade dos complexos em clivar o DNA foi examinada acompanhando a conversão do DNA plasmidial superenovelado (F1) para o DNA circular (F2) e/ou DNA linear (F3), em meio tamponado. O tempo padrão da reação será estudado de acordo com a atividade a 37 ou 50 °C. Para finalizar as reações de clivagem, serão adicionados às misturas reacionais de tampão de corrida 5X concentrado (EDTA 0,25 mol L^{-1} glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01% - pH 8,0) para evitar reações competitivas entre o EDTA, os íons metálicos e o DNA. Em seguida, as amostras foram armazenadas a 4 °C até serem submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%) para separação dos produtos clivados.

4.2.7 Titulação Potenciométrica

As titulações potenciométricas foram realizadas com um titulador automático Metrohm 848 Titrino Plus acoplado a um eletrodo combinado Ag/AgCl, calibrado na célula de titulação, com soluções diluídas de HCl para a leitura direta do pH ($\text{pH} = -\log \text{H}^+$). As medidas foram obtidas a partir de soluções de 30 ml contendo 0,03 mmol dos complexos para determinação das constantes de protonação (pK_{as}). Os experimentos foram preparados em uma célula de 60 ml de capacidade, refrigerada ($T = 25^\circ\text{C}$) mecanicamente por um banho de circulação termostatizado (Microquímica Ind. Com. Ltda). As soluções experimentais dos complexos foram tituladas com alíquotas de solução de $\text{KOH}_{(\text{aq})}$ ($0,100 \text{ mol L}^{-1}$) isenta de CO_2 previamente padronizada com biftalato de potássio. Todos os experimentos foram realizados com a força iônica constante ($0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$), sob atmosfera inerte, através do fluxo constante de argônio purificado e em triplicata. O pK_{w} da solução de acetonitrila/água (50/50 v/v) contendo $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{KNO}_{3(\text{aq})}$ utilizado para os cálculos foi de 15,40 (HERRADOR; GONZÁLEZ, 2002). Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia.

As constantes de protonação e formação foram calculadas através do programa BEST7 (MARTELL; MOTEKAITIS, 1992) e os diagramas de distribuição de espécies presentes em solução, em função do pH, foram obtidos com o programa SPECIES (MOTEKAITIS, R. J.; MARTELL, 1985). O programa BEST7 utiliza curvas de titulação para determinar as constantes de estabilidade e/ou as constantes de protonação dos ligantes e complexos, bem como a correta concentração do ligante utilizado. A entrada de dados para o programa consiste em fornecer o número de mmol de cada componente, as constantes de equilíbrio inicialmente estimadas de todas as espécies que podem ser formadas a partir dos componentes da solução e o perfil de pH determinado experimentalmente versus a composição da solução ($\text{HCl}_{(\text{aq})}$ adicionado). O programa emprega equações de balanço de massa para todas as espécies presentes a cada incremento de ácido adicionado e resolve a concentração de cada espécie presente. As espécies sugeridas são aquelas adquiridas ou observadas a partir de evidências espectrofotométricas e que podem ser justificadas com base em princípios estabelecidos na química de coordenação em solução. Convencionalmente, este programa emprega constantes globais de protonação e de formação de complexos metálicos, designadas por β . Nos cálculos, deve-se sempre buscar a minimização do desvio padrão (ajuste s) do sistema entre os valores experimentais de pH encontrados na titulação e os calculados. O desvio padrão é calculado

como um fator de peso de modo a aumentar a sensibilidade dos cálculos computacionais nas regiões de tamponamento do sistema, e diminuir a importância das inflexões.

4.3 SÍNTESES

4.3.1 Síntese dos ligantes

Na seção a seguir será apresentada a rota sintética de obtenção dos precursores, já descritos na literatura, bem como a síntese dos ligantes finais que foram preparados neste projeto.

Aqui, cabe ressaltar algumas características semelhantes aos três ligantes empregados nesse trabalho: Os ligantes são compostos assimétricos, contendo um sítio “macio” e um sítio “duro” o que permite a estes ligantes formarem complexos binucleares de valência mista M(III)M(II). Ambos são sintetizados a partir do composto 3-clorometil-5-metilsalicilaldeído (cmff) (KARSTEN et al., 2002). Assim é obtida uma ponte fenolato que une os dois íons metálicos simultaneamente. Pontes fenolato são muito utilizadas para formar ligantes binucleares, pois a posição *orto* do ânion fenolato é suscetível à incorporação de substituintes (GAVRILOVA, 2004).

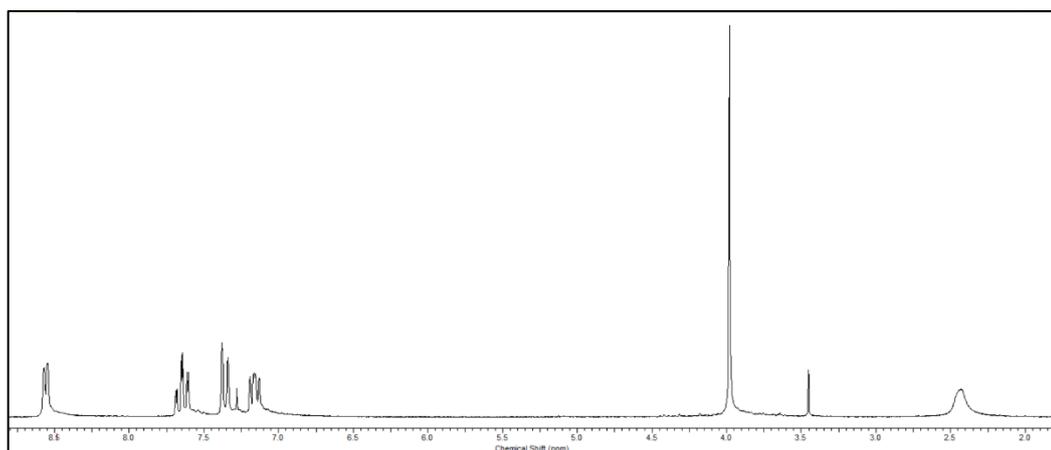
4.3.1.1 Síntese do bis(piridilmetil)amina - bpma

A síntese foi realizada conforme metodologia descrita por Neves et al. (1996). Em um balão de 250 ml contendo uma solução metanólica de 2-(aminometil)piridina (10,8 g, 100 mmol, 108,14 g mol⁻¹) em banho de gelo, foi adicionado gota a gota por meio de um funil de adição o 2-piridilcarboxialdeído (10,7 g, 100 mmol, 107,11 g mol⁻¹). Após a adição, retirou-se o banho de gelo e a reação permaneceu sob agitação por 1 hora. A solução foi então transferida para um recipiente adequado e 1,0 g de paládio/carbono 5% foi adicionado lentamente a essa solução e a mesma foi mantida sob atmosfera de hidrogênio 40 psi e agitação por 15 horas. A mistura foi filtrada para separar o catalisador e o solvente foi evaporado a pressão reduzida a 40 °C. O produto obtido apresentou-se como um óleo amarelo com rendimento de 85% (17,33 g, 87 mmol, 199,26 g mol⁻¹). O espectro de ¹H NMR é apresentado na Figura 14.

IR (KBr) em cm^{-1} : ν (N-H) 3305; ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3060- 2830; ν (C=N e C=C) 1595-1440; ν (C-N) 1148; δ (C-H_{ar}) 758.

^1H NMR(CDCl_3), δ_{H} (ppm): 8.55 (3H); 8.0-7,7 (3H); 7.6-6,75 (18H); 4.20 (2H); 3.96 (2H); 3.73-3.86 (12H); 2.15-2.25 (6H).

Figura 14 - Espectro de ^1H NMR (200 MHz) em CDCl_3 do precursor bpma.



Fonte: o autor

4.3.1.2 Síntese do 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol – cmff

Em um balão de três bocas de 5,0 L, equipado com condensador e agitador mecânico, adicionaram-se 3 L de clorofórmio e 173,71 g de *p*-cresol (1,6 mol, 108,14 g mol⁻¹, 1,034 g ml⁻¹). O balão de três bocas foi colocado em um banho com temperatura controlada entre 56 e 60 °C e, sob agitação, adicionaram-se 480 g de NaOH (12 mol, 40 g mol⁻¹), previamente dissolvidos em 300 ml de água destilada, em pequenas porções durante as 3 primeiras horas de reação (a adição do NaOH deve ser feita de forma lenta e cuidadosa, pois a reação é muito exotérmica). A mistura reacional foi mantida sob agitação e refluxo por mais uma hora e então deixou-se resfriar até a temperatura ambiente. A seguir, adicionou-se cerca de 1,5 L de água destilada e, ainda sob agitação, iniciou-se a acidificação com HCl concentrado até pH = 2. A fase orgânica foi então separada, lavada com água destilada, seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente evaporado à pressão reduzida. O material restante (óleo escuro viscoso) foi destilado à pressão reduzida com auxílio de uma coluna vigreux de 40 cm (55 – 65 °C a 0,1 mmHg).

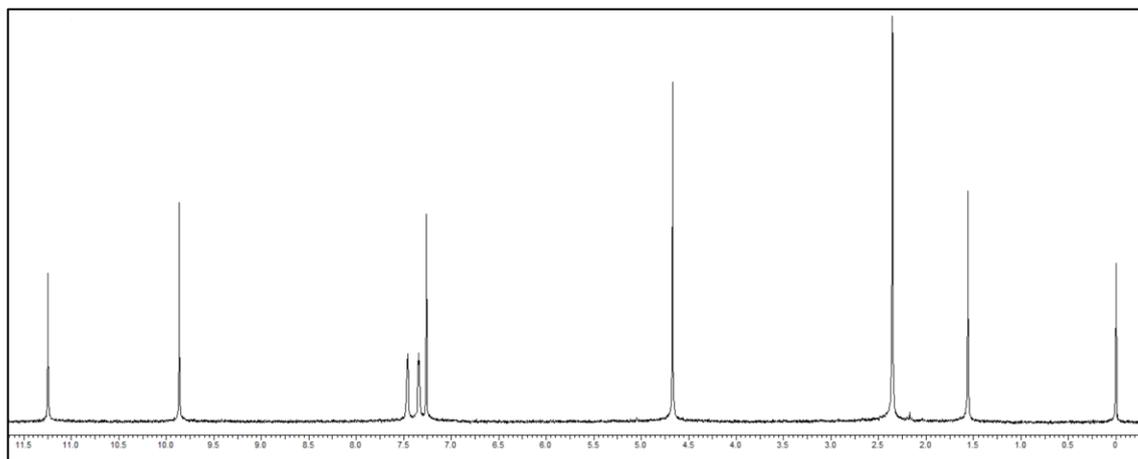
Obteve-se 100,0 g (0,73 mol, 136,15 g.mol⁻¹) de 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído (Hmb) como um sólido branco cristalino com rendimento de 46% em relação ao *p*-cresol. P.F.: 56 °C.

Em seguida, em um balão de 250 ml foram acondicionados 6,4 g de Hmb (47 mmol, 136,15 g.mol⁻¹), 7,5 mL de formaldeído 37% e 25 mL de ácido clorídrico concentrado. Essa mistura foi refluxada durante 30 minutos sob agitação magnética e na sequência transferida para um béquer e resfriada até 0 °C, formando um precipitado compacto, que foi triturado, filtrado sob vácuo e recristalizado em diclorometano. O sólido obtido foi deixado secar em dessecador com sílica sob vácuo por 12 horas e estocado sob argônio a temperatura inferior a -10 °C. Obtiveram-se 5 g do produto 2-clorometil-4-metil-formil-fenol (cmff) (184,62 g mol⁻¹) com 70 % de rendimento. O espectro de ¹H NMR do cmff é apresentado na Figura 15.

IR (KBr) em cm⁻¹: ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3028-2850; ν (CH_{ald}) 2746; ν (C=O) 1663; ν (C=C) 1600-1470; δ (O-H_{fenol}) 1372; ν (C-O_{fenol}) 1256; δ (C-H_{ar}) 703; ν (C-Cl) 612.

¹H NMR (CDCl₃), δ _H (ppm): 11,25 (1H); 9,86 (1H); 7,46 (1H); 7,35 (1H); 4,67 (2H); 2,35 (3H); 2,15-2,25 (6H).

Figura 15 - Espectro de ¹H NMR (200 MHz) em CDCl₃ do cmff.



Fonte: o autor

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

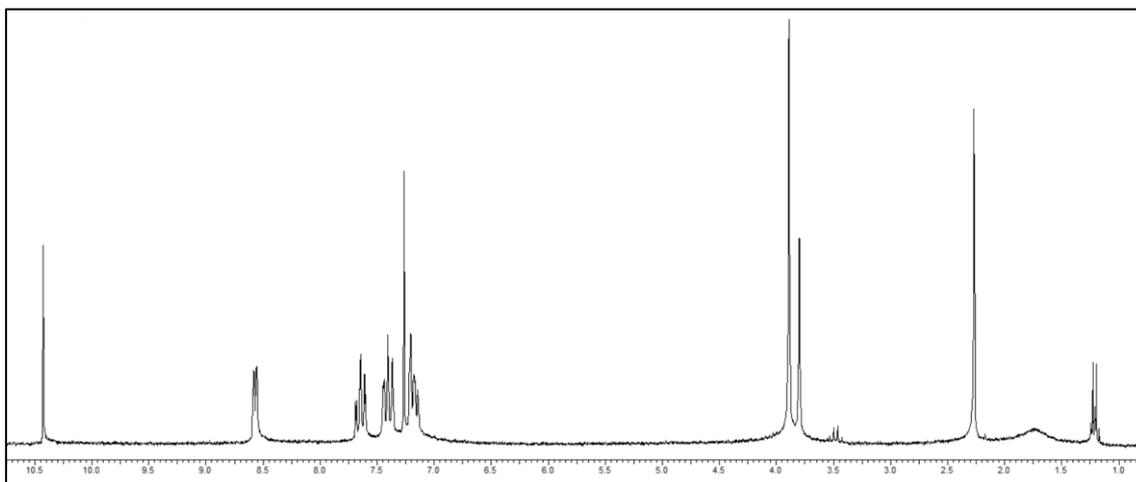
A síntese foi realizada conforme a rota descrita por Karsten e colaboradores. Em um balão de 250 ml, foi adicionado cmff (5,6 g, 30 mmol, 184,62 g mol⁻¹) dissolvido em diclorometano (80 ml). Sob agitação e a 0 °C, foram adicionados lentamente, 80 ml de uma

solução de bpma (6,0 g, 30 mmol, 199,26 g mol⁻¹) em diclorometano. Após completa adição, o banho de gelo foi removido e o sistema permaneceu sob agitação por 3 horas à temperatura ambiente. A solução foi então transferida para um funil de separação e foi lavada com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi separada e seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado sob vácuo a 40 °C e o óleo resultante foi dissolvido em 40 ml de propan-2-ol a quente em um béquer. Após algumas horas formou-se um precipitado cristalino que foi filtrado em funil de placa porosa, lavado com éter gelado e deixado secar. O produto foi obtido na forma de um sólido amarelo com um rendimento de 81 % (8,41 g, 24,2 mmol, 347,42 g mol⁻¹). O espectro de ¹H NMR do bpmamff é mostrado na Figura 16.

IR (KBr) em cm⁻¹: ν (C-H_{Ar} e C-H_{alif}) 3037-2849; ν (C=O) 1680; ν (C=N e C=C) 1595-1438; δ (O-H_{fenol}) 1379; ν (C-O_{fenol}) 1275; ν (C-N)1115; δ (C-H_{Ar}) 773.

¹H NMR(CDCl₃), δ _H (ppm): 10,43 (1H); 8,58 (2H); 7,65 (2H); 7,44 (3H); 7,21 (3H); 3,89 (3H); 3,80 (2H); 2,27 (3H).

Figura 16 - Espectro de ¹H NMR (200 MHz) em CDCl₃ do bpmamff.



Fonte: o autor

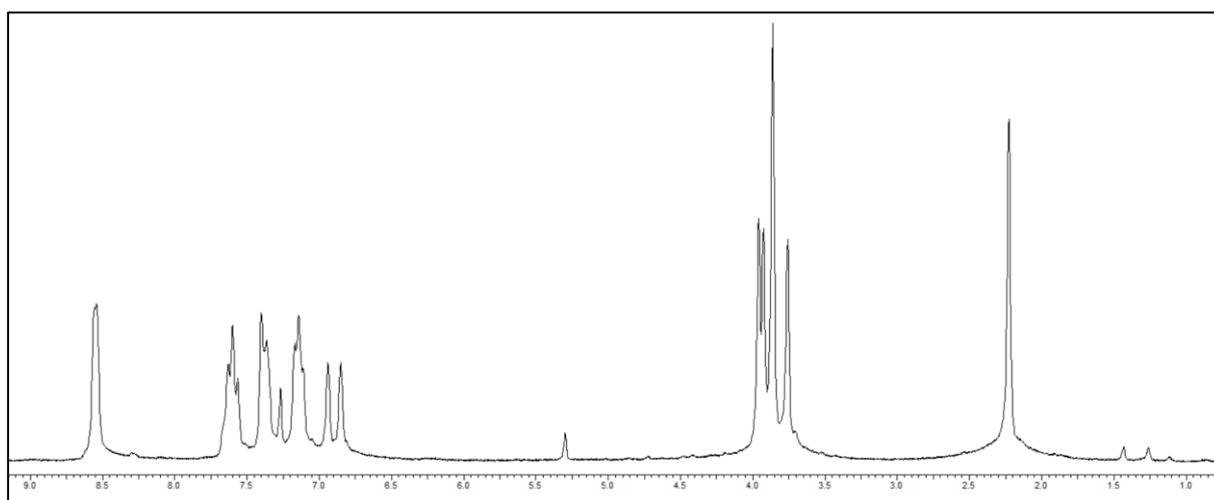
4.3.1.4 Síntese do 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil]fenol - Hpy3

Em um balão de 250 ml dissolveram-se 3,07 g (8,8 mmol, 347,42 g mol⁻¹) em 80 ml de CH₃OH/THF 50% v/v. A esta solução adicionou-se 2-(aminometil)piridina (0,97g, 9,0 mmol, 108,14 g mol⁻¹). A solução permaneceu sob agitação por 1 hora. Após esse período iniciou-se a redução da imina a partir da adição lenta de NaBH₄ (0,38 g, 10 mmol). Ao final da adição a solução apresentava uma coloração amarela pálida. A mistura reacional permaneceu sob agitação por mais 1 hora e então o solvente foi evaporado à pressão reduzida a 40°C. O óleo resultante foi dissolvido em 50 ml de diclorometano. A fase orgânica foi lavada com a mesma solução aquosa (6x50 ml) em um funil de separação, foi então separada, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi retirado a vácuo. O óleo resultante foi deixado à pressão reduzida por 6 horas. Rendimento 95 % (3,6 g, 8,4 mmol, 439,56 g mol⁻¹). O espectro de ¹H NMR do Hpy3 é apresentado na Figura 17.

IR (KBr) em cm⁻¹: ν (C-H_{Ar} e C-H_{alif}) 3061-2825; ν (C=N e C=C)1595-1434; δ (O-Hfenol) 1362; ν (C-O_{fenol}) 1234; ν (C-N) 1151; δ (C-H_{Ar}) 761.

¹H NMR (CDCl₃), δ_H (ppm): 8,53 (2H); 7,60 (2H); 7,36 (3H); 7,16 (3H); 6,94 (1H); 6,88 (1H); 3,94 (4H); 3,86 (4H); 3,73 (2H); 2,22 (3H).

Figura 17 - Espectro de ¹H NMR (200 MHz) em CDCl₃ do Hpy3.



Fonte: o autor

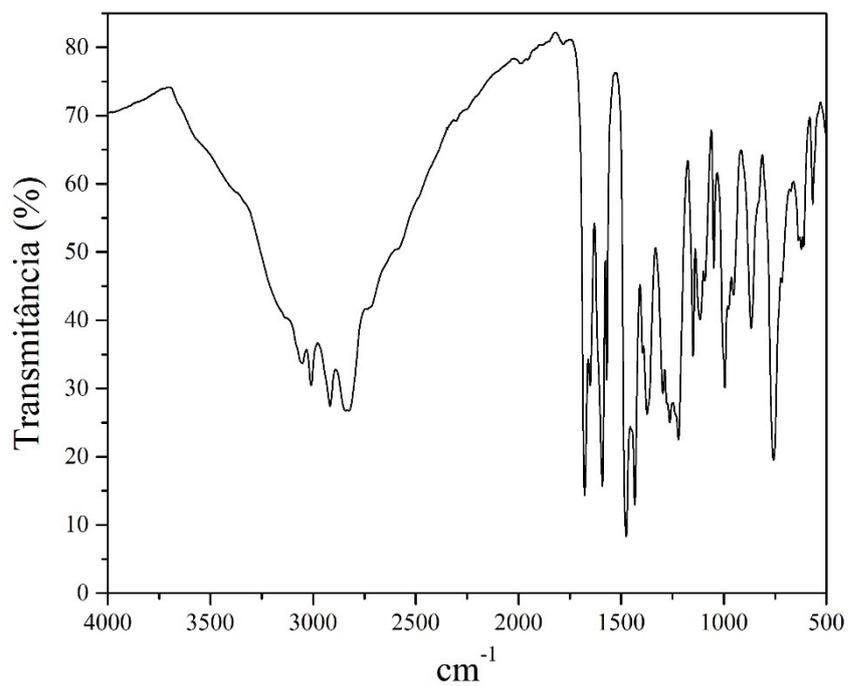
4.3.1.5 Síntese do 2-[N-bis-(2- piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol – L₁

O ligante L₁ foi sintetizado conforme o procedimento descrito por Piovezan e colaboradores (PIOVEZAN et al., 2010).

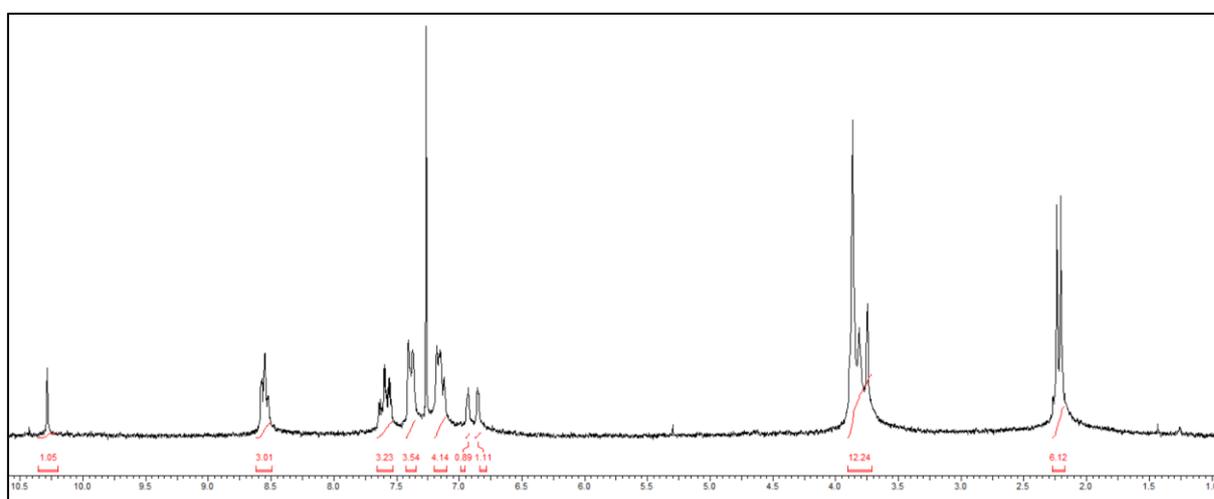
Em um balão de 250 ml, contendo 1,22 g de cmff em 20 ml de diclorometano foi adicionado lentamente uma solução contendo 2,9 g de Hpy3 e trietilamina solubilizados em diclorometano. Após a adição, a solução resultante foi deixada em refluxo por 5-6 dias. A solução foi extraída com NH₄Cl 10% (5 x 25 ml). A camada aquosa foi alcalinizada com uma solução saturada de Na₂CO₃ (pH = 10) e extraída com porções de CH₂Cl₂ (5 x 30 ml). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e concentrada no rota-evaporador. Um sólido amarelo foi obtido. Rendimento 95 % (3,5 g, 8,0 mmol, 587,72 g mol⁻¹). O espectro no infravermelho é apresentado na Figura 18 e o de ¹H NMR é mostrado na Figura 19.

IR (KBr) em cm⁻¹: ν (OH) 3500; (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3065-2856; ν(C=O) 1679, ν (C=N e C=C) 1590-1440; ν (C-O_{fenol}) 1266; δ (C-H_{ar}) 752.

¹H NMR (CDCl₃), δ_H (ppm): 10,28 (1H); 8,55 (2H); 8,53 (1H); 6,85-7,59 (13H); 3,75-3,90 (12H); 2,23 (3H); 2,21 (3H).

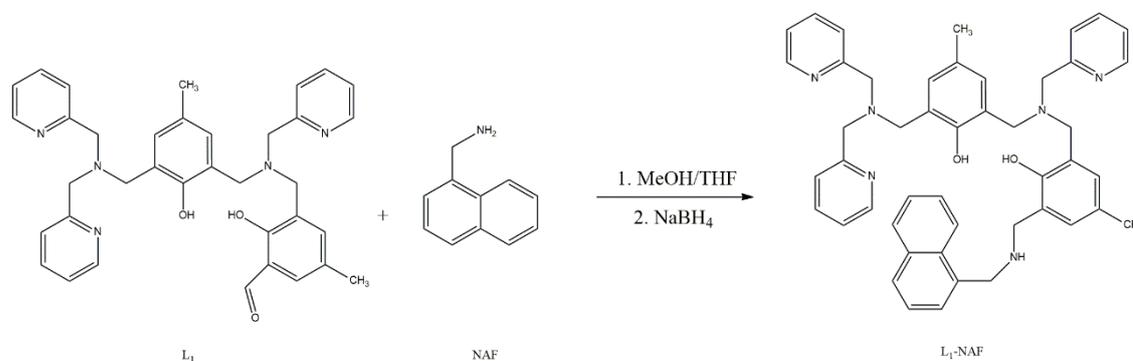
Figura 18 - Espectro de infravermelho do ligante L₁ em pastilha de KBr.

Fonte: o autor

Figura 19 - Espectro de ¹H NMR (200 MHz) em CDCl₃ do ligante L₁.

Fonte: o autor

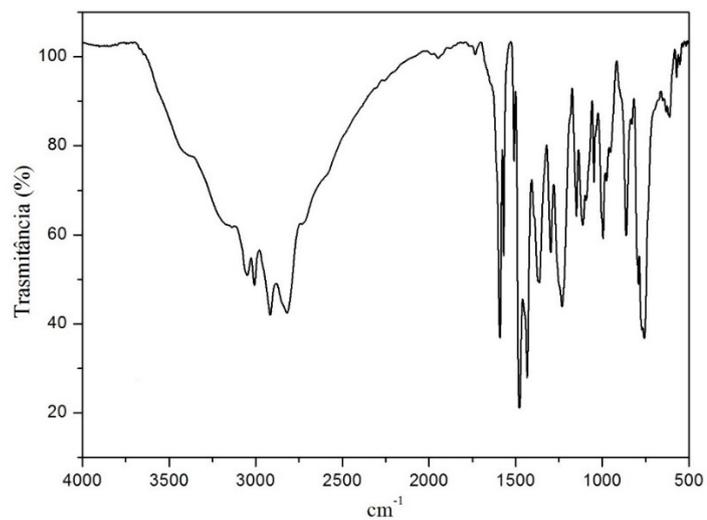
4.3.1.6 Síntese do 2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-((naftalen-1-ilmetil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol - L1-NAF



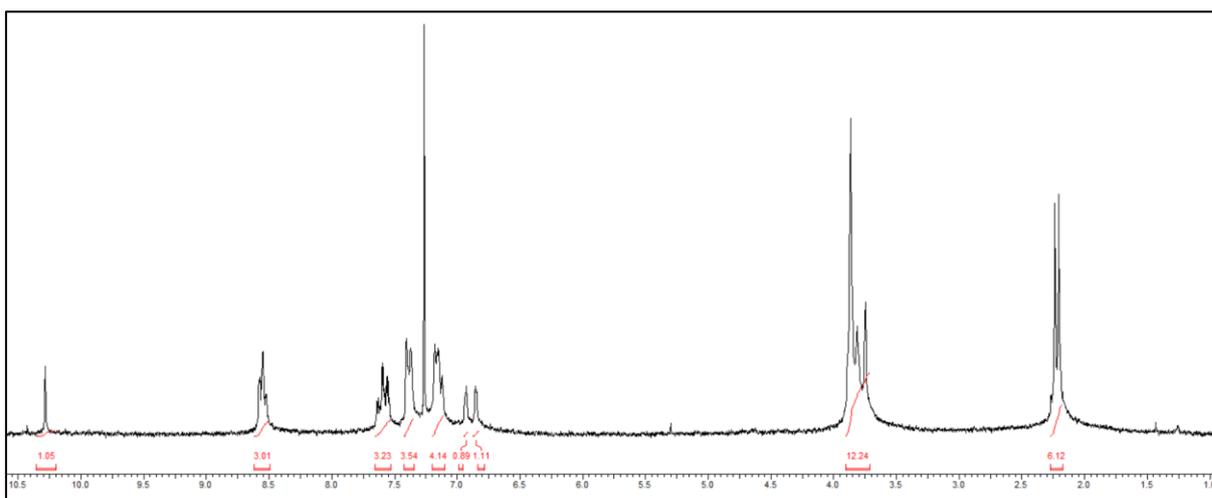
Em 50 ml de metanol foram dissolvidos 1,5 mmol (0,88 g, 587 g.mol⁻¹) do ligante L₁ (PIOVEZAN et al., 2010) e adicionados 1,5 mmol de 1-Naftilmetilamina (NAF) (0,23 g, 157,22 g.mol⁻¹). A reação foi mantida sob agitação por 24 horas e em seguida feita a redução da base de Schiff com 3 mmol de NaBH₄ (0,11 g, 37,83 g.mol⁻¹). Depois de completada a reação, o solvente foi retirado à pressão reduzida resultando em um óleo de cor amarelo pálido. O produto foi extraído com solução aquosa de NaHCO₃ (6 x 40 ml). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrado e o solvente retirado a pressão reduzida, para obtenção de sólido de cor amarelo pálido. Rendimento 87%. O espectro no infravermelho é apresentado na Figura 20 e o de ¹H NMR é mostrado na Figura 21.

IR (KBr), em cm⁻¹: ν(O-H) 3400; ν(N-H) 3190; ν(C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3240-2750; ν(C=N e C=C) 1590-1420; ν(C-O) 1265-1220; δ (O-H_{fenol}) 1369 (C-H_{ar}) 756.

¹H NMR (CDCl₃), δ (ppm): 8,50 (3H); 8,0-7,7 (3H); 7,6-6,75 (18H); 4,20 (2H); 3,96 (2H); 3,73-3,86 (12H); 2,15-2,25 (6H).

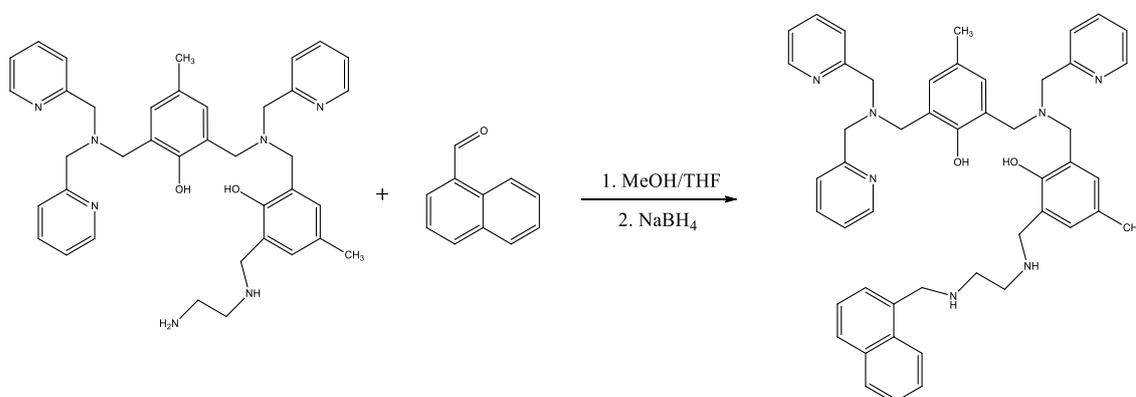
Figura 20 - Espectro de infravermelho do ligante L₁-NAF em pastilha de KBr.

Fonte: o autor

Figura 21 - Espectro de ¹H NMR (200 MHz) em CDCl₃ do ligante L₁-NAF.

Fonte: o autor

4.3.1.7 Síntese do 2-(((2-aminoetil)amino)metil)-6-(((3-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metil fenol – L₁-Et-NAF

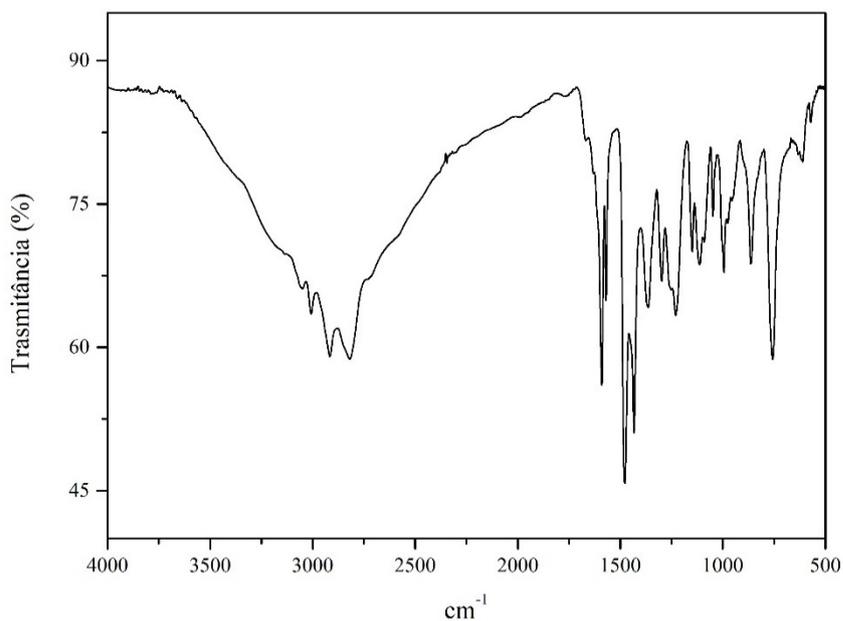


Etapa 1: Em 30 ml de MeOH/THF (1:1) foram adicionados lentamente 2,0 mmol de L₁ (1,17g, 587 g mol⁻¹) a uma solução contendo 4,0 mmol de dietilamina etano-1,2-diamina (0,14g, 60,10 g mol⁻¹). O sistema permaneceu sob agitação por 14 horas; em seguida, em banho de gelo, foi realizada a redução da imina pela adição lenta de 3,5 mmol NaBH₄ (0,11g, 37,83 g mol⁻¹). O produto resultante foi dissolvido em diclorometano e o produto extraído com uma solução aquosa de NaHCO₃ (7x50 ml). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida, resultando em um sólido amarelo pálido (L₁-Et). Rendimento 90%. O espectro no infravermelho é apresentado na Figura 22 e o de ¹H NMR é mostrado na Figura 23.

IR (KBr), em cm⁻¹: ν (O-H) 3400; ν (N-H) 3190; ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3240-2750; ν (C=N e C=C) 1590-1420; ν (C-O) 1265-1220; δ (O-H_{fenol}) 1370; ν (C-H_{ar}) 756.

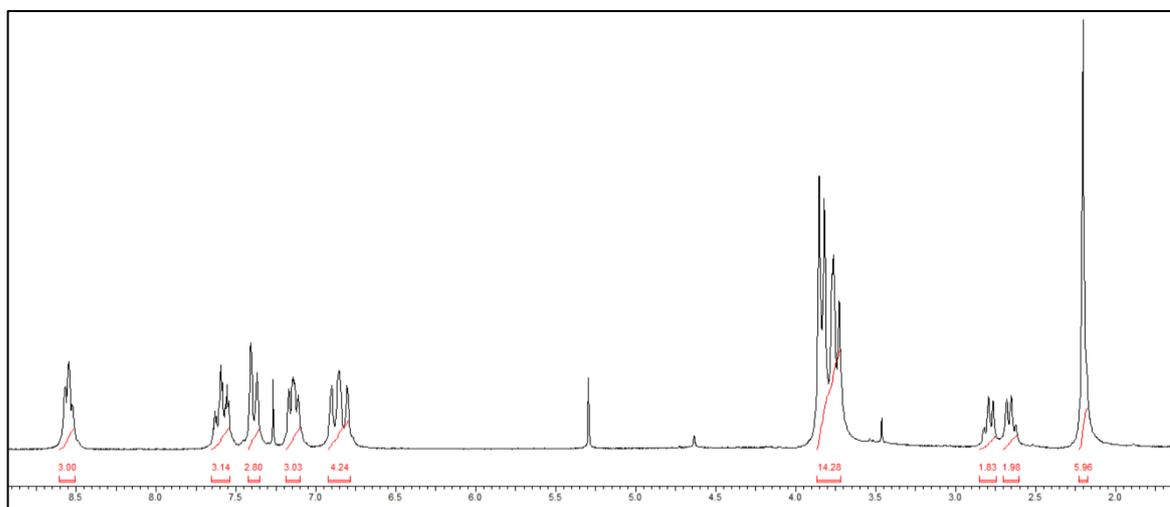
¹H NMR(CDCl₃), δ (ppm): 8,55 (3H); 7,66-7,33 (6H); 7,20-6,78 (7H); 3,87-3,71 (14H); 2,79 (2H); 2,66 (2H); 2,20 (6H).

Figura 22 - Espectro de infravermelho do precursor L₁-Et em pastilha de KBr.



Fonte: o autor

Figura 23 - Espectro de ¹H NMR(200 MHz) em CDCl₃ do precursor L₁-Et.



Fonte: o autor

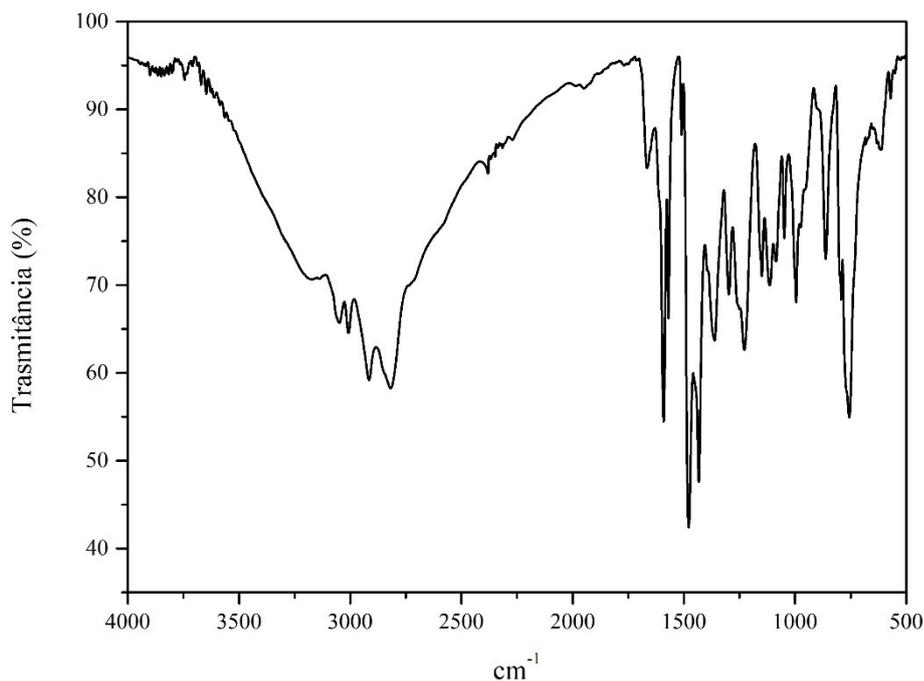
Etapa 2: Em 50 ml de metanol foram dissolvidos 1,5 mmol de L₁-Et (0,95 g, 631,81 g.mol⁻¹) e adicionados 1,5 mmol de 1-Naftaldeído (0,23 g, 156,18 g.mol⁻¹). A reação foi mantida sob refluxo por 24 horas e em seguida feita a redução da base de Schiff com 3 mmol de NaBH₄ (0,11 g, 37,83 g.mol⁻¹). Depois de completada a reação, o solvente foi retirado à pressão reduzida resultando até a formação de um óleo de cor amarelo pálido. O produto foi então dissolvido em 40 ml diclorometano e extraído com solução aquosa de NaHCO₃ (6 x 50

ml). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrado e o solvente retirado à pressão reduzida, para obtenção de sólido de cor amarelo pálido. Em seguida, o composto foi solubilizado em uma pequena quantidade de clorofórmio e “colunado” com uma coluna flash com a adição de CHCl_3 ; depois eluído com uma solução de $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ (1:10). O solvente foi retirado a pressão reduzida e seco em bomba de vácuo. Rendimento 83%. O espectro no infravermelho é apresentado na Figura 24 e o de ^1H NMR é mostrado na Figura 25.

IR (KBr), em cm^{-1} : ν (N-H) 3190; ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3240-2750; ν (C=N e C=C) 1596-1421; ν (C-O) 1265-1220; δ (O-H_{fenol}) 1364; ν (C-O_{fenol}) 1231; ν (C-N) 1120; ν (C-H_{ar}) 754.

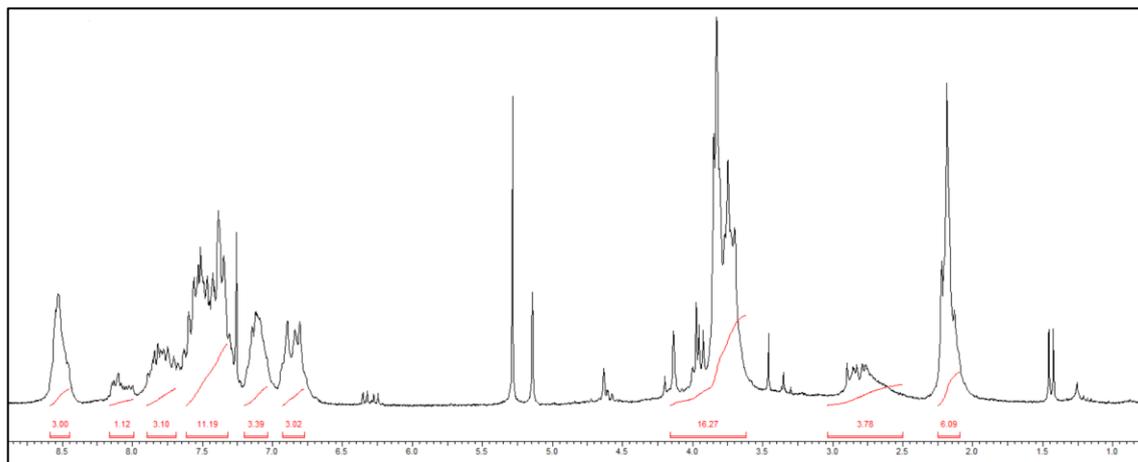
^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm): 8,55 (3H); 8,08 (1H); 7,81 (3H); 7,62-7,31 (11H); 7,11 (3H); 4,15-3,63 (16H); 2,20 (6H).

Figura 24 - Espectro de infravermelho do precursor L₁-Et-NAF em pastilha de KBr.



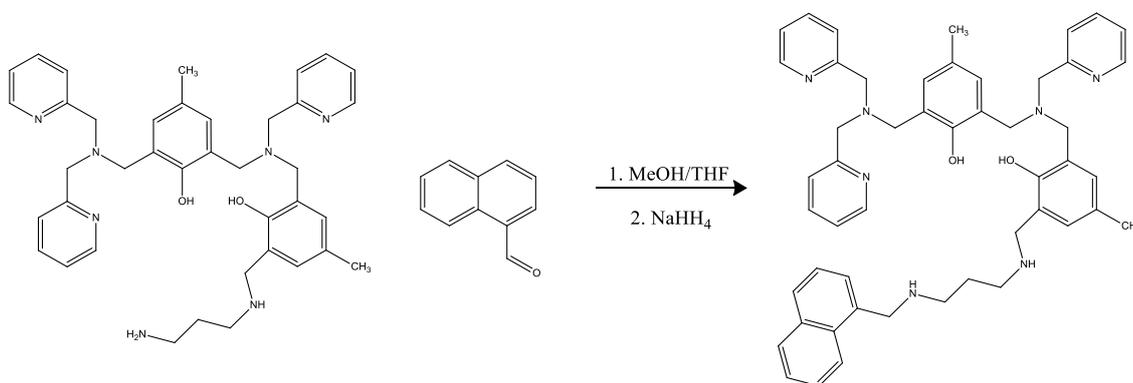
Fonte: o autor

Figura 25 - Espectro de ^1H NMR (200 MHz) em CDCl_3 do precursor $\text{L}_1\text{-Et-NAF}$.



Fonte: o autor

4.3.1.8 Síntese do 2-((bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((3-(naftaleno-1-ilmetil)amino)propil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol – $\text{L}_1\text{-Prop-NAF}$

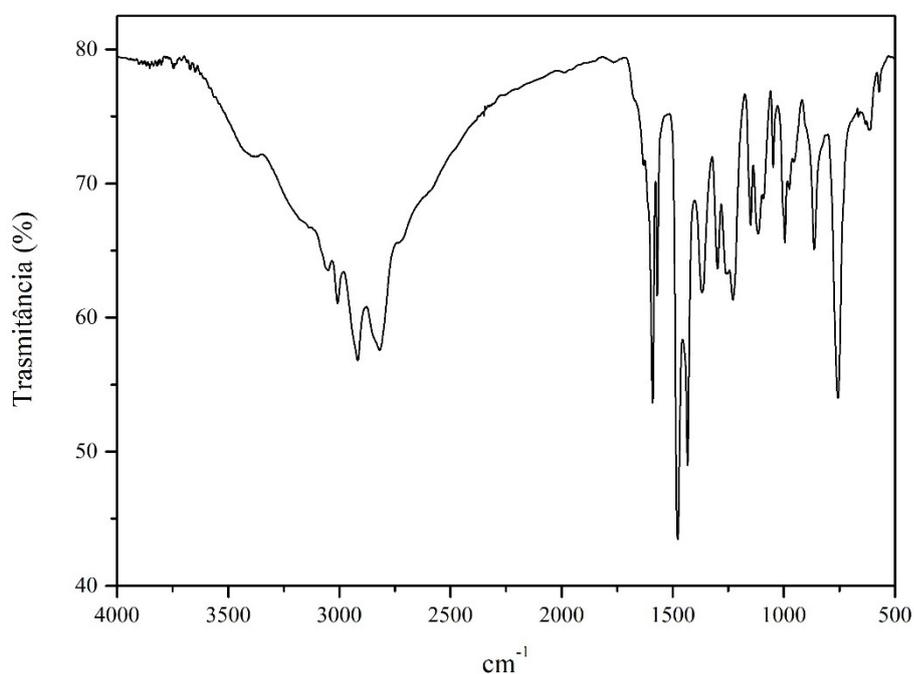


Etapa 1: Foram adicionados lentamente 2,0 mmol de L_1 (1,17g, 587 g mol^{-1}) a uma solução contendo 4,0 mmol de dietilamina propano-1,3-diamina (0,24g, $60,10 \text{ g mol}^{-1}$). O sistema permaneceu sob agitação por 14 horas; em seguida, em banho de gelo, foi realizada a redução da imina pela adição lenta de 5,0 mmol NaBH_4 (0,18g, $37,83 \text{ g mol}^{-1}$). O produto resultante foi dissolvido em diclorometano e o produto extraído com uma solução aquosa de NaHCO_3 (7x50 ml). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 , filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida, resultando em um sólido amarelo pálido ($\text{L}_1\text{-Prop}$). Rendimento 87%. O espectro no infravermelho é apresentado na Figura 26 e o de ^1H NMR é mostrado na Figura 27.

IR (KBr), em cm^{-1} : ν (O-H) 3407; ν (N-H) 3180; ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3090-2752; ν (C=N e C=C) 1592-1419; δ (O-H_{fenol}) 1372 ν (C-O_{fenol}) 1234; δ (C-H_{ar}) 756.

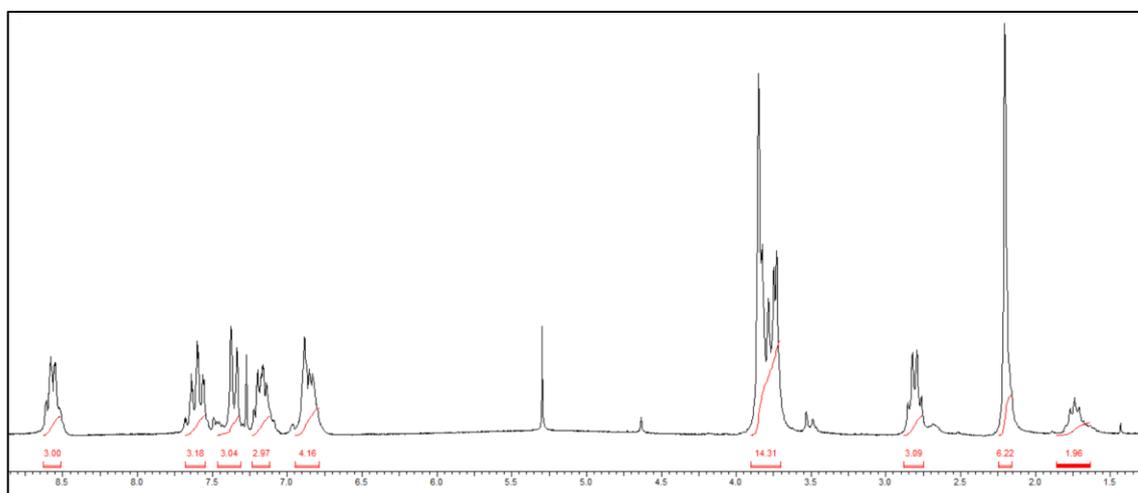
^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm): 8,56 (3H); 7,69-7,31 (6H); 7,24-6,68 (7H); 3,90-3,70 (14H); 2,80 (2H); 2,66 (2H); 2,20 (6H); 1,75 (2H).

Figura 26 - Espectro de infravermelho do precursor L₁-Prop em pastilha de KBr.



Fonte: o autor

Figura 27 - Espectro de ^1H NMR (200 MHz) em CDCl_3 do precursor L₁-Prop.

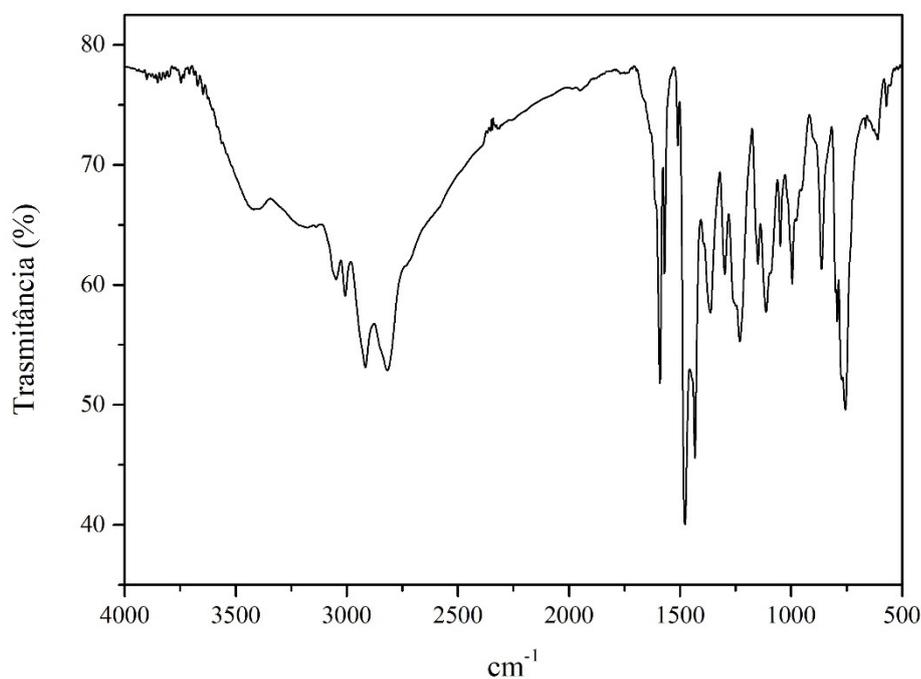


Fonte: o autor

Etapa 2: Em 50 ml de metanol foram dissolvidos 1,5 mmol de L₁-Prop (0,95 g, 631,81 g mol⁻¹) e adicionados 1,5 mmol de 1-Naftalaldeido (0,23 g, 156,18 g mol⁻¹). A reação foi mantida sob refluxo por 24 horas e em seguida feita a redução da base de Schiff com 3 mmol de NaBH₄ (0,11 g, 37,83 g mol⁻¹). Depois de completada a reação, o solvente foi retirado à pressão reduzida resultando até a formação de um óleo de cor amarelo pálido. O produto foi então dissolvido em 40 ml diclorometano e extraído com solução aquosa de NaHCO₃ (6 x 50 ml). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrado e o solvente retirado a pressão reduzida, para obtenção de sólido de cor amarelo pálido. Em seguida, o composto foi solubilizado em uma pequena quantidade de clorofórmio e colunado com uma coluna flash (fase fixa de sílica gel 60G) com a adição de CHCl₃; depois eluído com uma solução de MeOH:CHCl₃ (1:10). O solvente foi retirado a pressão reduzido e seco em bomba de vácuo. Rendimento de 71 %. O espectro no infravermelho é apresentado na Figura 28 e o de ¹H NMR é mostrado na Figura 29.

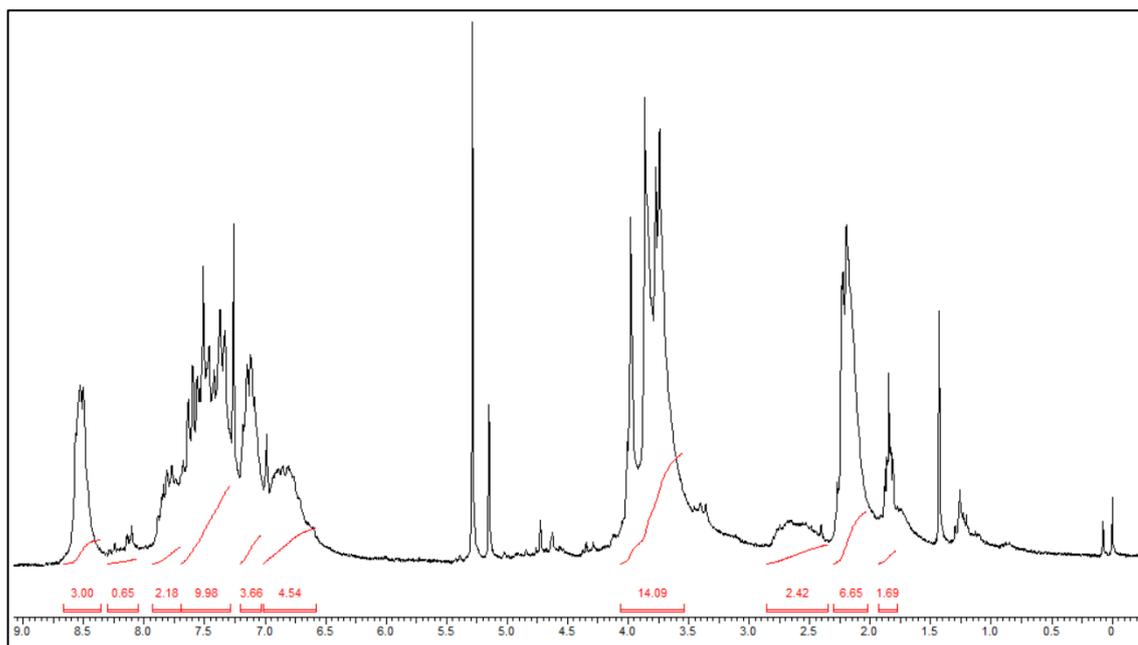
¹H NMR (CDCl₃), δ (ppm): 8,55 (3H); 8,15 (1H); 7,79 (2H); 7,68-7,29 (10H); 7,12 (3H); 4,15-3,55 (14H); 2,60 (2H); 2,28-2,04 (7H); 1,84 (2H).

Figura 28 - Espectro de infravermelho do precursor L₁-Prop-NAF em pastilha de KBr.



Fonte: o autor

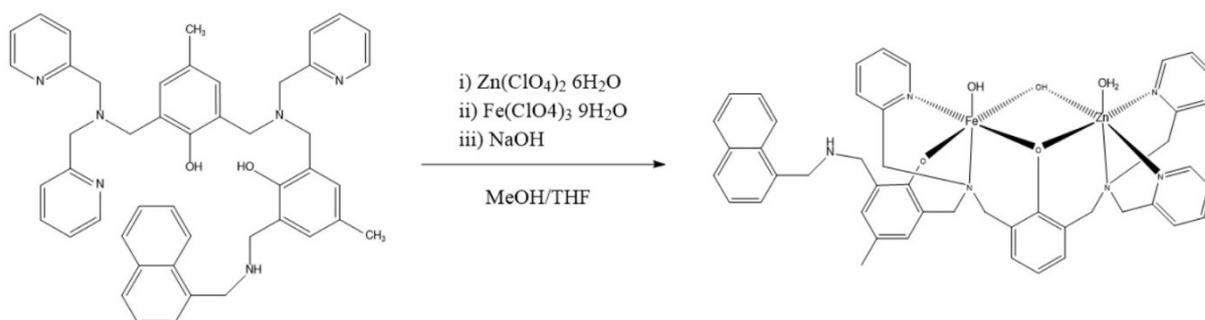
Figura 29 - Espectro de ^1H NMR (200 MHz) em CDCl_3 do precursor $\text{L}_1\text{-Prop-NAF}$.



Fonte: o autor

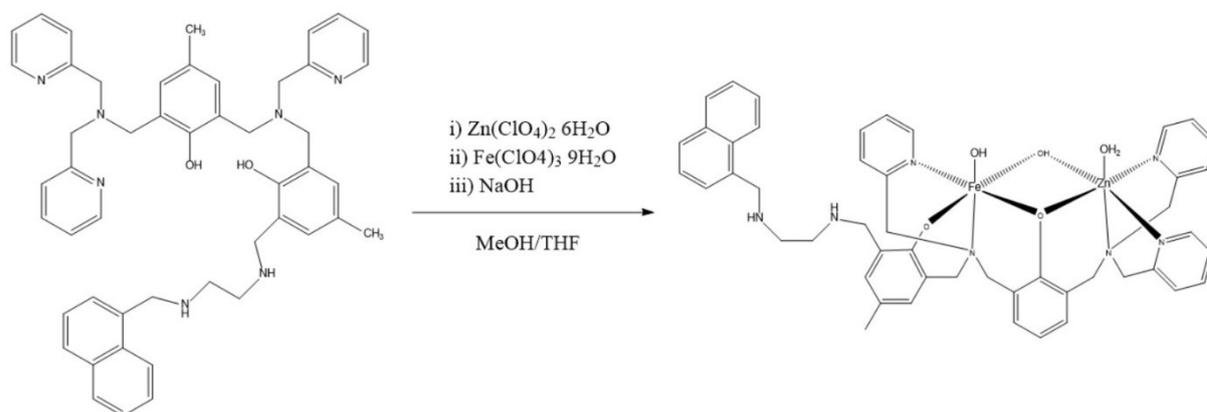
4.3.2 Síntese dos complexos

4.3.2.1 Síntese do perclorato de μ -hidroxo-2-((bis(piridin-2-ilmetil) amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-((naftalen-1-ilmetil)amino)metil)benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ – complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1\text{-NAF}$ (1)



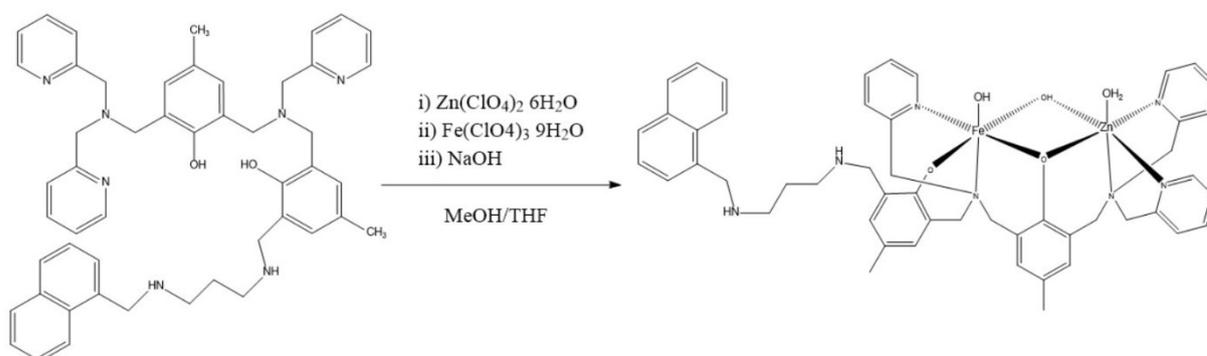
Sobre uma solução metanólica (40 ml) contendo 1 mmol do ligante $\text{L}_1\text{-NAF}$ foram adicionados, sob agitação, 30 ml de uma solução metanólica contendo 1 mmol de $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; após 15 min, foi adicionado, gota a gota, 1 mmol de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ solubilizados em 80 ml de MeOH. Após a adição de 3 equivalentes de $\text{KOH}_{(\text{aq})}$, a solução foi filtrada e deixada sobre repouso para precipitação. Rendimento 62 % baseado no ligante.

4.3.2.2 Síntese do perclorato μ -hidroxo-2-(((2-aminoetil)amino)metil)-6-(((3-((bis(pyridin-2-yl metil) amino) metil) -2-hidroxi -5- metilbenzil) (piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol $Fe^{III}Zn^{II}$ – complexo $Fe^{III}Zn^{II}$ -L₁-Et-NAF (2)



Sobre uma solução metanólica (40 ml) contendo 1 mmol do ligante L₁-Et-NAF foram adicionados, sob agitação, 30 ml de uma solução metanólica contendo 1 mmol de $Zn(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$; após 15 min, foi adicionado, gota a gota, 1 mmol de $Fe(ClO_4)_3 \cdot 9H_2O$ solubilizados em 80 ml de MeOH. Após a adição de 3 equivalentes de $KOH_{(aq)}$, a solução foi filtrada e deixada sobre repouso para precipitação. Rendimento 62% baseado no ligante.

4.3.2.3 Síntese do μ -hidroxo-2-((bis(piridin-2-ylmetil)amino)metil)-6-(((2-hidroxi-5-metil-3-(((3-((naftaleno-1-ilmetil) amino) propil) amino) metil) benzil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-4-metilfenol $Fe^{III}Zn^{II}$ – $Fe^{III}Zn^{II}$ -L₁-Prop-NAF (3)



Sobre uma solução metanólica (40 ml) contendo 1 mmol do ligante L₁-Prop-NAF foram adicionados, sob agitação, 30 ml de uma solução metanólica contendo 1 mmol de $Zn(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$; após 15 min, foi adicionado, gota a gota, 1 mmol de $Fe(ClO_4)_3 \cdot 9H_2O$

solubilizados em 80 ml de MeOH. Após a adição de 3 equivalentes de $\text{KOH}_{(aq)}$, a solução foi filtrada e deixada sobre repouso para precipitação. Rendimento 54% baseado no ligante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão abordadas as discussões referentes as caracterizações dos ligantes e seus respectivos complexos. Em seguida, serão apresentados os resultados e discussões sobre os ensaios de reatividade dos complexos no tocante a clivagem do substrato modelo 2,4-BDNPP e do DNA plasmidial.

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES

Os ligantes L_1 , L_1 -NAF, L_1 -Et-NAF e L_1 -Prop-NAF foram sintetizados com bons rendimentos e pureza adequada para a elaboração de compostos de coordenação. Foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H NMR), análise elementar de C, H e N e espectrometria de massas.

O grupo aldeído do ligante L_1 foi o ponto de partida para a preparação dos ligantes contendo naftaleno em sua estrutura. Por meio de reações de base de Schiff, seguida de uma redução com NaBH_4 , o composto 1-Naftilmetilamina foi adicionado ao ligante L_1 para formar o ligante L_1 -NAF. Seguindo a mesma rota sintética, o ligante L_1 -Et-NAF foi obtido por duas etapas de síntese. Na primeira, o ligante L_1 sofre a adição da etano-1,2-diamina, em seguida a base de Schiff é reduzida. A última etapa consiste na adição do 1-Naftilaldeído, onde o sistema é colocado em refluxo. Após o termino da reação, o composto é submetido a uma nova redução com NaBH_4 .

5.1.1 Análise elementar de C, H e N

Na Tabela 2 são apresentadas as fórmulas moleculares e as porcentagens de C, H e N (calculado/teórico) para os ligantes sintetizados. Ambos os ligantes exibiram boa concordância com as fórmulas propostas.

Tabela 2. Porcentagens de C, H e N (calculado/experimental) dos ligantes preparados.

Ligante	L_1	L_1 -NAF	L_1 -Et-NAF	L_1 -Prop-NAF
Fórmula molecular	$\text{C}_{47}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_2$	$\text{C}_{47}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_2$	$\text{C}_{53}\text{H}_{61}\text{N}_7\text{NaO}_3$	$\text{C}_{52}\text{H}_{60}\text{Cl}_3\text{N}_7\text{O}_3$
Massa Molar (g mol^{-1})	587,71	728,92	867,09	937,44

% C	73,57/73,54	77,44/77,10	73,41/73,38	66,62/66,57
% H	6,35/6,33	6,64/6,59	6,90/6,78	6,45/6,41
% N	11,92/11,93	11,53/11,48	11,20/11,17	11,35/11,28

Fonte: o autor

5.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho (IR) é uma técnica útil em um primeiro momento, para monitorar reações através do acompanhamento de bandas de absorção características de grupos químicos; tais como, álcoois (O-H), carbonilas (C=O), aminas (NH₃), anéis aromáticos, entre outros, presentes em compostos orgânicos. Portanto, os precursores e os ligantes sintetizados foram monitorados por IR e as principais bandas observadas foram devidamente atribuídas (SILVERSTEIN RM, BASSLER GC, 1991) . Nas Tabelas 3 e 4 estão sumarizadas as bandas de absorção dos precursores L₁, L₁-Et e L₁-Prop e dos ligantes finais, respectivamente.

No espectro do ligante L₁ é observado uma banda intensa em 1678 cm⁻¹ atribuída à carbonila do grupo aldeído em posição *orto* ao -OH fenólico. Essa banda foi usada como padrão para verificar a efetividade das reações de aminação redutiva que fornece os precursores L₁-Et, L₁-Prop e o ligante final L₁-NAF. Na região compreendida entre 3070 cm⁻¹ e 2854 cm⁻¹ estão presentes as bandas referentes ao estiramento da ligação C-H presentes em anéis aromáticos e cadeias alifáticas. Entre 1590 cm⁻¹ e 1439 cm⁻¹ despontam os estiramentos das ligações nos anéis aromáticos (C=N e C=C) e em 1368 cm⁻¹ e 1265 cm⁻¹ os estiramentos da ligação C-O, referente aos grupos fenólicos presentes no composto. Em 759 cm⁻¹ é observado a banda de deformação angular dos anéis aromáticos.

Os precursores L₁-Et e L₁-Prop, oriundos do composto L₁, exibiram bandas de absorção semelhantes a este, sendo constatada a ausência da banda em 1678 cm⁻¹ associada a carbonila do grupo aldeído, indicando que a reação de formação dos compostos L₁-Et e L₁-Prop foi efetiva. Em torno de 3200 cm⁻¹ a banda de estiramento da ligação N-H está presente, devido ao ancoramento da etilenodiamina e da propanodiamina (Tabela 3).

Tabela 3. Principais bandas (cm^{-1}) e atribuições dos espectros na região do infravermelho para os precursores sintetizados.

	L ₁	L ₁ -Et	L ₁ -Prop
ν (O-H)	3390	3415	3250
ν (N-H)	-	3207	3200
ν (C-H _{ar} e C-H _{alif})	3070-2854	3070-2800	3070-2854
ν C=O	1678	-	-
ν (C=N e C=C)	1590-1439	1590-1425	1592-1430
δ (O-H _{fenol})	1368	1366	1365
ν (C-O _{fenol})	1225	1230	1230
ν (C-N)	1115	1113	1115
δ (C-H _{ar})	759	756	754

Fonte: o autor

Os ligantes finais L₁-NAF, L₁-Et-NAF e L₁-Prop-NAF, apresentaram bandas de absorção características de seus respectivos precursores e os valores de tais bandas compõem a Tabela 4.

Tabela 4. Principais bandas observadas dos espectros na região do infravermelho dos ligantes L₁-NAF, L₁-Et-NAF e L₁-Prop-NAF, em número de onda (cm^{-1}).

	L ₁ -NAF	L ₁ -Et-NAF
ν (O-H)	3430	-
ν (N-H)	3198	3198
ν (C-H _{ar} e C-H _{alif})	3075-2780	3060-2775
ν (C=N e C=C)	1610-1420	1600-1425
δ (O-H _{fenol})	1368	1367
ν (C-O _{fenol})	1232	1231
ν (C-N)	1117	1120
δ (C-H _{ar})	759	754

Fonte: o autor

O ligante L₁-NAF apresentou bandas típicas do grupo -OH em 3456 cm^{-1} associadas aos fenóis presentes no composto. Em torno de 3196 cm^{-1} a banda de estiramento da ligação N-

H. A banda intensa relacionada a carbonila em 1678 cm^{-1} não foi observada, o que constata que a reação de redução da base de *Schiff* formada, entre o precursor L₁ e o composto 1-Naftilmetilamina foi efetiva. Assim como o ligante L₁, os compostos L₁-Et-NAF e L₁-Prop-NAF apresentaram por volta de 3198 cm^{-1} a banda de estiramento associada à ligação N-H de uma amina secundária. A banda referente à ligação O-H foi observada apenas para o ligante L₁-Prop-NAF em 3446 cm^{-1} .

5.1.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio - ¹H NMR

A espectroscopia de ¹H NMR foi uma técnica eficaz para caracterizar os compostos orgânicos sintetizados nesse trabalho. Com os deslocamentos químicos (δ_{H} em ppm) e a integração dos sinais observados (SILVERSTEIN, 1991) nos espectros de ¹H NMR dos ligantes foi possível determinar o número de átomos de hidrogênio e diferenciá-los de cada ambiente químico dentro da estrutura de cada composto, Tabela 5. Assim, a relação entre o número dos diferentes átomos de hidrogênio permitiu confirmar a obtenção dos ligantes e de seus precursores preparados com grau de pureza adequado

O ligante L₁ apresentou um espectro de ¹H NMR com deslocamentos, integrações em conformidade com a descrição fornecida pela literatura (PIOVEZAN et al., 2010). Nos ligantes L₁-NAF, L₁-Et-NAF, L₁-Prop-NAF e nos pró-ligantes L₁-Et e L₁-Prop foi observado a ausência do pico do aldeído em campo alto, indicando a ocorrência da reação de aminação redutiva.

Os sinais dos hidrogênios dos grupos metilenos da cadeia lateral dos pró-ligantes pode ser observado nos respectivos ligantes finais como um sinal da realização da inserção do grupo naftaleno nesses ligantes.

Ambos os ligantes L₁-NAF, L₁-Et-NAF e L₁-Prop-NAF apresentaram espectros similares como resultado de suas estruturas semelhantes, com sinais referentes aos hidrogênios dos novos grupos metilenos e aromáticos inseridos.

Tabela 5. Deslocamentos químicos, em ppm, observados nos espectros de ¹H NMR para os precursores e ligantes.

	L ₁	L ₁ -NAF	L ₁ -Et	L ₁ -Et-NAF	L ₁ -Prop	L ₁ -Prop-NAF
¹ H aldeído	10,28 (1H)	-	-	-	-	-
¹ H aromáticos	8,55 (2H) 8,52 (1H) 6,86 - 7,59 (13H)	8,50 (3H) 7,7 - 8,0 (3H) 6,75 - 7,6 (18H)	8,55 (3H) 7,59 (3H) 7,39 (3H) 7,15 (3H) 6,86 (3H)	3,5 (3H) 8,17-7,67 (4H) 7,61-7,32 (11H) 7,11 (3H) 6,86 (3H)	8,55 (3H) 7,60-7,39 (6H) 7,15 (3H) 6,66 (3H)	8,55 (3H) 8,17 (1H) 7,93-7,28 (12H) 7,21-6,60 (8H)

¹ H metilenos	3,75 - 3,90 (12H)	3,48 (2H) 3,73 - 3,86 (12H) 3,96 (2H) 4,20 (2H)	3,86 (14H) 2,79 (2H) 2,65 (2H)	4,16-3,63 (16H) 2,80 (4H)	3,89-3,71 (14H) 2,80 (3H) 1,75 (2H)	4,0-3,54 (14H) 2,60 (2H) 1,85 (2H) 1,25 (H)
¹ H Metila	2,24 (3H) 2,21 (3H)	2,15 - 2,25 (6H)	2,20 (6H)	2,18 (6H)	2,19 (6H)	2,18 (6H)

Fonte: o autor

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

Os complexos Fe^{III}Zn^{II}-L₁-NAF (**1**), Fe^{III}Zn^{II}-L₁-Et-NAF (**2**) e Fe^{III}Zn^{II}-L₁-Prop-NAF (**3**) foram caracterizados por técnicas no estado sólido como no estado líquido com o objetivo de esclarecer sua composição química e propriedades ácido-base. Dessa maneira, as espécies ativas na clivagem hidrolítica do substrato e do DNA podem ser mapeadas.

A síntese dos complexos foi baseada numa estequiometria 2:1 (M:L) e preparados em soluções diluídas com o fim de se obter complexos binucleares de valência mista, Fe^{III}Zn^{II}. Após a preparação, as soluções contendo os complexos formados foram deixadas em repouso para precipitação.

5.2.1 Análise elementar de CHN

A análise elementar de C, H e N forneceu resultados que coadunam com as fórmulas propostas. Para os dois complexos (**1**, **2** e **3**) foi observado a presença de água e moléculas de solvente oriundos das soluções empregadas na preparação. Os resultados estão na Tabela 6, onde é mostrado a fórmula molecular, massa molar e as porcentagens de C, H e N.

Tabela 6. Porcentagens de C, H e N (calculado/experimental) dos complexos **1**, **2** e **3**.

Complexos	Forma molecular	Massa Molar g mol ⁻¹	% C	% H	% N
1	C ₄₇ H ₅₅ Cl ₂ FeN ₆ O ₁₅ Zn	1172,13	49,69/49,25	4,88/4,72	7,40/7,58
2	C ₅₀ H ₆₇ C ₁₄ FeN ₇ O ₁₂ Zn	1363,79	49,18/48,98	5,53/5,42	8,03/7,54
3	C ₅₃ H ₆₆ Cl ₅ FeN ₇ O ₁₄ Zn	1395,83	48,09/48,25	5,03/4,87	7,41/7,11
Composições Químicas Propostas					
1	[FeZn-L ₁ -NAF] ₂ (ClO ₄) ₂ . 4H ₂ O				
2	[FeZn-L ₁ -Et-NAF]. (ClO ₄) ₃ . 2(CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH)				
3	[FeZn-L ₁ -Prop-NAF] ₂ (ClO ₄) ₃ . H ₂ O. 3(CH ₃ CH ₂ OH)				

Fonte: o autor

5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho – IR

Como os complexos formados apresentam bandas de infravermelho pertencentes aos seus respectivos ligantes, a técnica espectroscopia de IR desempenha um papel relevante no acompanhamento de sua formação.

Os complexos mostraram bandas na região do infravermelho bastante semelhantes aos seus ligantes livres, assinalando a presença destes nos compostos isolados. Ademais, bandas adicionais referentes ao contraíon, pontes exógenas do tipo μ -hidroxo, moléculas do solvente e alargamentos ou deslocamentos também foram observados. Na Tabela 7 estão apresentadas as principais bandas e atribuições dos complexos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1\text{-NAF}$ (**1**), $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1\text{-Et-NAF}$ (**2**), $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1\text{-Prop-NAF}$ (**3**).

Tabela 7. Principais bandas e suas respectivas atribuições em cm^{-1} , dos espectros na região do infravermelho para os complexos sintetizados.

	1	2	3
ν (O-H)	3475	3475	3500
ν (N-H)	3190	3130	3120
ν (C-H _{ar} e C-H _{alif})	3095-2833	3072-2840	3077-2810
ν (C=N e C=C)	1609-1430	1609-1425	1608-1420
ν (C-O _{fenol})	1263	1264	1259
δ (C-H _{ar})	766	766	765
ν (Cl-O)	1095	1095	1097

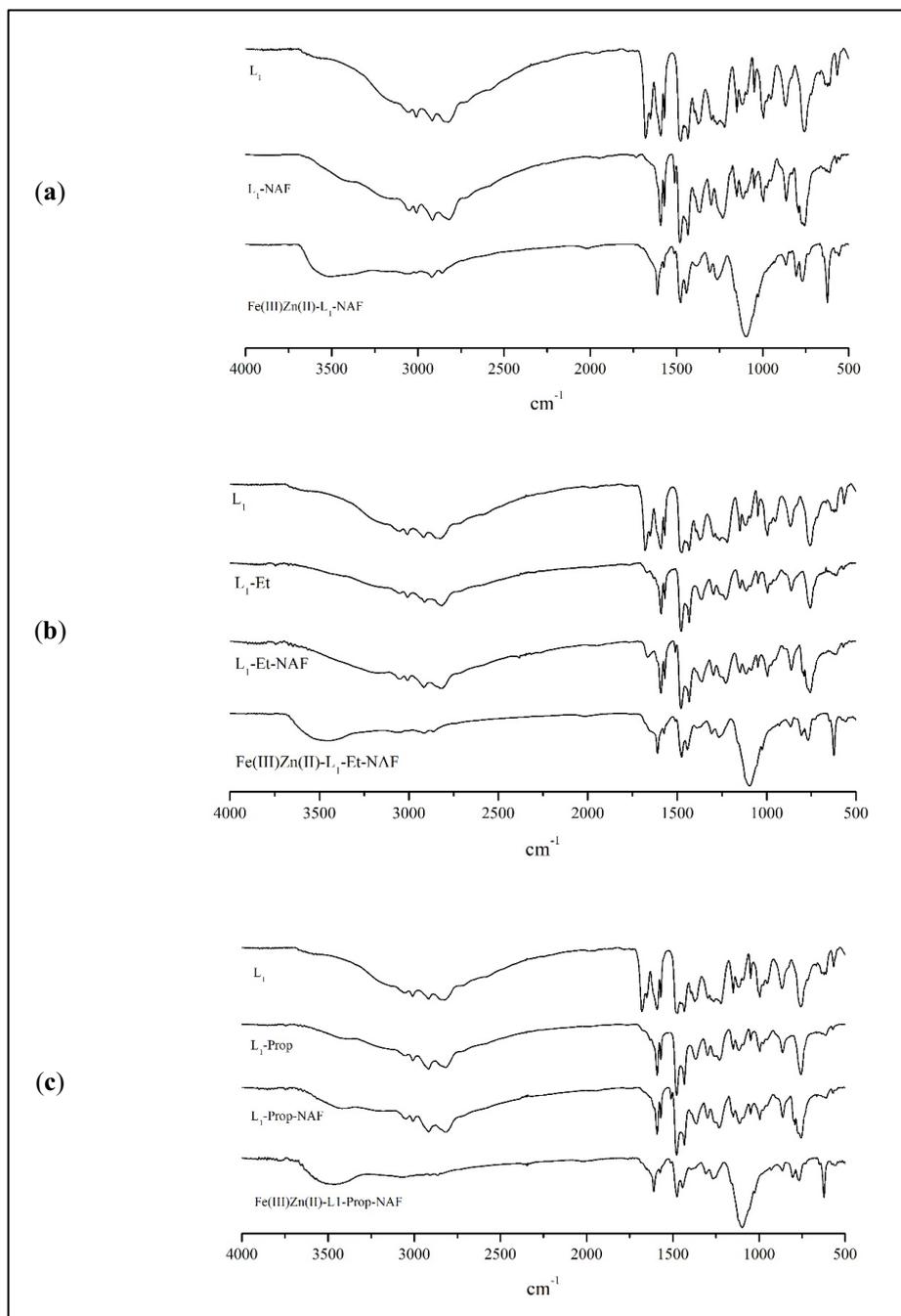
Fonte: o autor

Todos os quatro complexos (Figura 30) apresentaram uma banda alargada de média intensidade entre 3475 cm^{-1} a 3500 cm^{-1} , associada ao estiramento da ligação O-H relativa à presença de moléculas de água, solvente utilizado na síntese e/ou pontes exógenas do tipo μ -hidroxo coordenadas ao centro metálico binuclear. As bandas de absorção em torno de 3095 cm^{-1} a 2810 cm^{-1} referentes ao estiramento da ligação C-H de aromáticos e alifáticos se faz presente no espectro dos complexos. A ausência da banda em 1368 cm^{-1} associada à deformação angular fora do plano da ligação O-H_{fenol} é um sinal importante da complexação dos íons metálicos pelos fenóis na forma desprotonada. As bandas referentes as ligações C=N e C=C de aromáticos entre 1610 cm^{-1} a 1420 cm^{-1} com pequenos deslocamentos, reforçam a reação de

complexação dos íons metálicos por parte dos ligantes. A banda do contraíon perclorato (ClO_4) em 1095 cm^{-1} aparece intensa em todos os espectros dos complexos e é referente ao estiramento axial da ligação Cl-O (NAKAMOTO, 2008).

Na Figura 30 são mostrados os espectros de absorção na região do infravermelho de forma a ilustrar as mudanças nas bandas durante as etapas de obtenção dos complexos e ligantes finais.

Figura 30 - Comparação entre os espectros de infravermelho (KBr, cm^{-1}) dos precursores, ligantes e seus respectivos complexos. **(a)** L_1 , L_1 -NAF e complexo **1**; **(b)** L_1 , L_1 -Et, L_1 -Et-NAF e complexo **2**; **(c)** L_1 , L_1 -Prop, L_1 -Prop-NAF e complexo **3**.



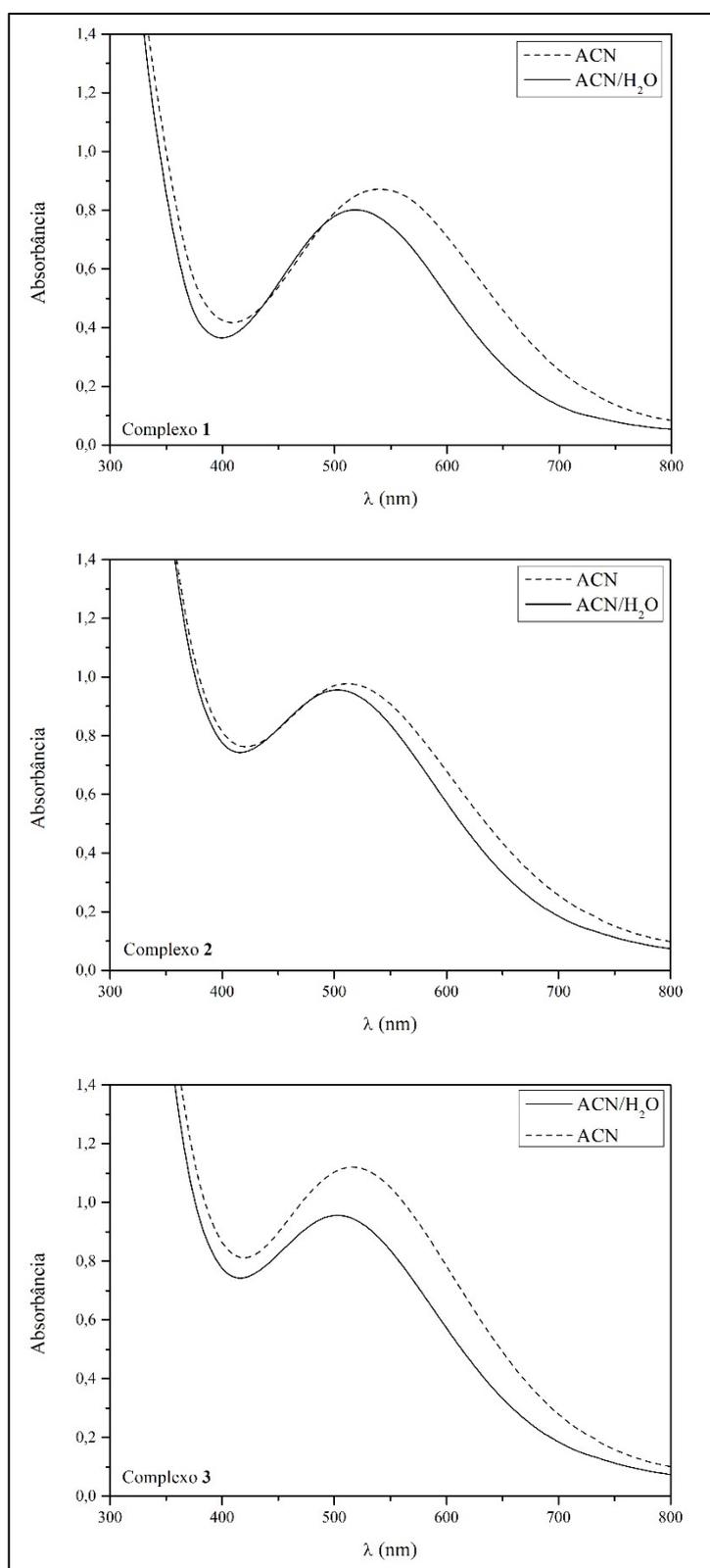
Fonte: o autor

5.2.3 Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis

Os complexos sintetizados foram submetidos a técnica de espectroscopia UV-Vis na região entre 800 a 300 nm utilizando acetonitrila e acetonitrila/água 50% V/V (condições de

reatividade (ver seção 4.5.5), para verificar algum efeito do solvente na banda de transferência de carga. Uma solução de acetonitrila/tampão (tampão HEPES, pH = 7,0) foi também utilizada, para padronizar o meio e comparar os dados dos complexos; uma vez que, em decorrência da síntese dos compostos, a adição de volumes de base ($\text{NaOH}_{(\text{aq})}$) diferentes, acarretam mudanças nos comprimentos de onda. A partir dos espectros eletrônicos obtidos (Figura 31), foram auferidos os comprimentos de onda máximos juntamente com seus respectivos coeficientes de absorção. A Tabela 8 sumariza os resultados de cada complexo nas diferentes soluções.

Figura 31 – Espectro eletrônico dos complexos 1, 2 e 3 acetonitrila/água (50:50) e em acetonitrila.

Solução - $[C] = 4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 

Fonte: o autor

Tabela 8. Dados de espectroscopia eletrônica para os complexos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1\text{-NAF}$ (**1**), $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1\text{-Et-NAF}$ (**2**), $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1\text{-Prop-NAF}$ (**3**).

Complexo	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)/ ϵ ($\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)		
	ACN	ACN/ H_2O (1:1)	ACN/Tampão
1	540/1813	518/1667	496/1479
2	508/1854	502/1729	489/1750
3	513/1854	503/1750	489/1729

Fonte: o autor

Todos os complexos apresentaram uma banda intensa entre 512 a 540 nm, em acetonitrila, associada à transferência de carga ligante→metal (TCLM), isto é, com origem nos orbitais $p\pi$ do fenolato do ligante para os orbitais $d\pi^*$ do íon $\text{Fe}(\text{III})$ (GABER; MISKOWSKI; SPIRO, 2002).

Em solução de acetonitrila/ H_2O (50:50, v/v) todos os complexos apresentaram deslocamento hipsocrômico (deslocamento para regiões de maior energia) quando comparados aos respectivos espectros em acetonitrila. Tabela 8. *Dados de espectroscopia eletrônica para os complexos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1\text{-NAF}$ (**1**), $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1\text{-Et-NAF}$ (**2**), $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1\text{-Prop-NAF}$ (**3**).* Em meio tamponado, os complexos **2** e **3** apresentaram comprimentos de onda deslocados para regiões de maior energia, quando comparados aos complexos **1** e **3**; o mesmo comportamento nos outros solventes. Ainda que essa diferença seja pequena, esses deslocamentos podem ser justificados devido a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos aminos e grupos hidroxilo ligados ao íon $\text{Fe}(\text{III})$ dos complexos. Como esses complexos possuem um grupo etano-1,2-diamina e diaminopropil, que unem o naftaleno ao ligante L_1 , há uma maior facilidade em fazer tais ligações. Esses resultados, de maneira geral, estão em concordância com outros complexos com estrutura semelhante descritos na literatura (SILVA et al., 2017), (PIOVEZAN et al., 2010)(PERALTA et al., 2010), (GAHAN et al., 2009).

5.2.4 Titulação potenciométrica

A determinação dos equilíbrios de protonação dos complexos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1\text{-NAF}$ (**1**), $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1\text{-Et-NAF}$ (**2**), $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1\text{-prop-NAF}$ (**3**) foram determinados via titulação potenciométrica em meio $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50, % v/v). Essa técnica é importante para

determinação de pK_a s de moléculas de água coordenadas ao centro metálico e de grupos amino da cadeia lateral dos respectivos ligantes.

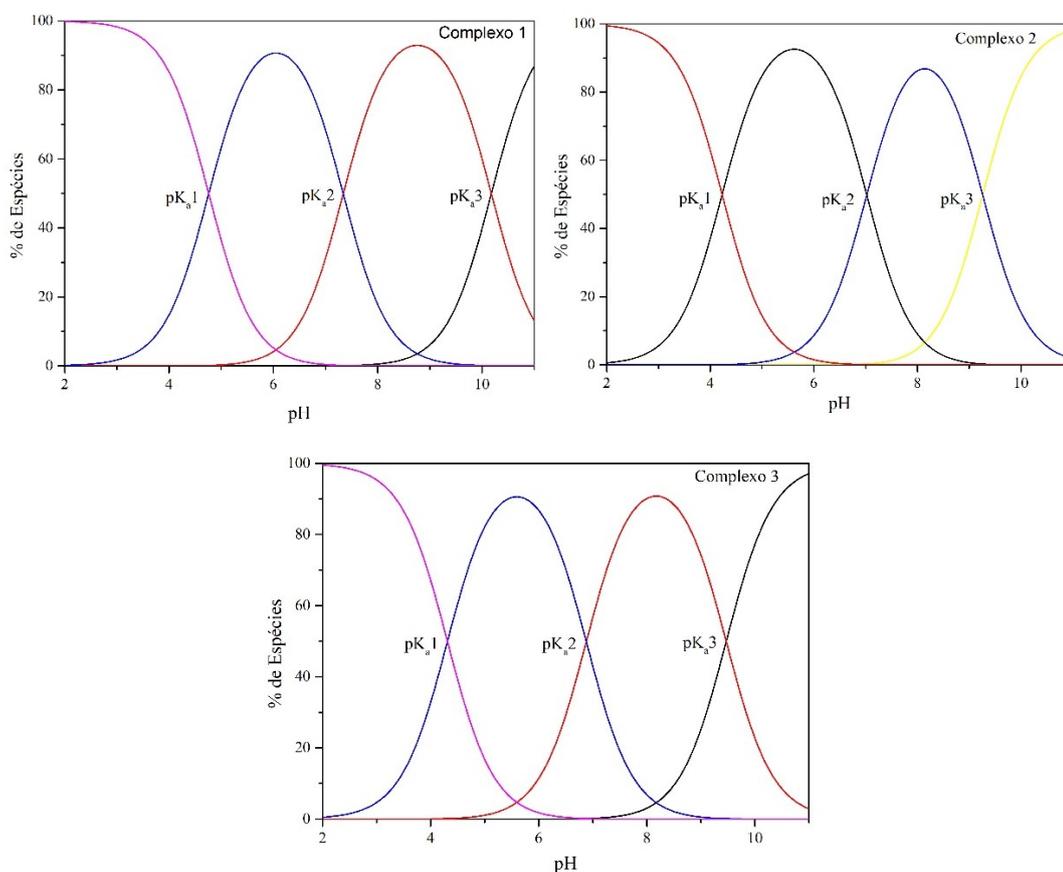
Os resultados auferidos por meio dos estudos potenciométricos estão apresentados na Tabela 9 e comparados com o complexo $Fe^{III}Zn^{II}-L_1$ descrito na literatura (PIOVEZAN et al., 2010). Os gráficos de distribuição das espécies podem ser vistos na figura 32.

Tabela 9. Valores de pK_a s calculados para os complexos sintetizados e do complexo $Fe^{III}Zn^{II}-L_1$.

Complexos	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	pK_{a4}
1	4,76	7,34	10,18	-
2	4,23	7,02	9,26	-
3	4,31	6,88	9,47	-
$Fe^{III}Zn^{II}-L_1$	5,07	8,21	-	-

Fonte: o autor

Figura 32 – Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para os complexos $Fe^{III}Zn^{II}L_1$ -NAF (1) $Fe^{III}Zn^{II}-L_1$ -Et-NAF (2) e $Fe^{III}Zn^{II}-L_1$ -prop-NAF (3)



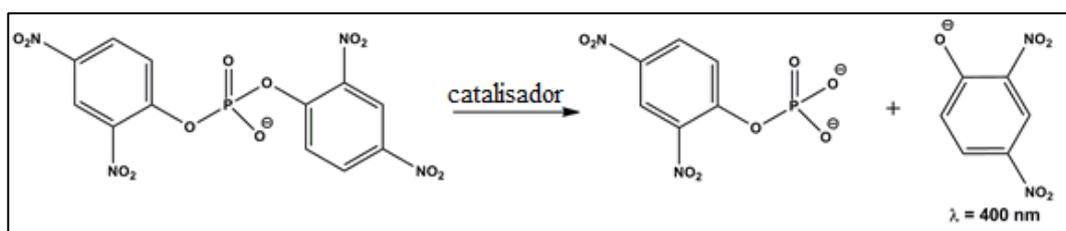
Fonte: O autor

Os valores do primeiro pK_a foram semelhantes pra ambos os complexos e é atribuído à uma molécula de água coordenada ao Fe(III) (SMITH, MARTELL et al. 1995) e está em acordo com outros pK_a s encontrados para complexos com estrutura similar (SILVA et al., 2017), (XAVIER et al., 2009) (SILVA et al., 2017). O segundo pK_a dos complexos é atribuído à desprotonação de uma molécula de água coordenada ao íon Zn(II) enquanto que o terceiro pK_a é atribuída a uma das aminas da cadeia lateral dos complexos. Em relação ao segundo pK_a do complexo $Fe^{III}Zn^{II}-L_1$ os complexos **1**, **2** e **3** apresentaram um valor um pouco mais ácido, o que pode ser resultado da influência dos grupos aminos protonado, ou seja, efeitos de segunda esfera de coordenação. Acima de pH 10,5 foi observado precipitação para o complexo **1** e acima de 10,0 para os complexos **2** e **3**.

5.2.5 Estudos de reatividade hidrolítica do substrato modelo

O emprego de substratos modelo, contendo ligações fosfodiéster, são úteis para estudar mecanismos de clivagem de ácidos nucleicos por pequenas moléculas; visto que, estas ligações, estão presentes no DNA e RNA. Dessa forma, a atividade catalítica dos complexos $Fe^{III}Zn^{II}-L_1-NAF$ (**1**), $Fe^{III}Zn^{II}-Et-L_1-NAF$ (**2**) e $Fe^{III}Zn^{II}-L_1-Prop-NAF$ (**3**) frente à hidrólise da ligação fosfodiéster foram avaliadas por meio da utilização do substrato bis-(2,4-dinitrofenol) (2,4-BDNPP) (Figura 33), sintetizado de acordo com o método descrito por Bunton e Farber (1969).

Figura 33 - Esquema para a reação hidrolítica do substrato modelo 2,4-BDNPP catalisada por complexos analisados neste trabalho.



Fonte: o autor

É consenso na literatura que, complexos metálicos são considerados hidrolases sintéticas quando possuem dois sítios lábeis em posição *cis*, de maneira que, um sítio coordena ao substrato e o sítio adjacente à uma molécula de água, que age como grupo nucleofílico, promovendo o ataque intramolecular em um pH próximo da neutralidade, liberando os produtos em velocidade razoável (KAPHAN et al., 2015).

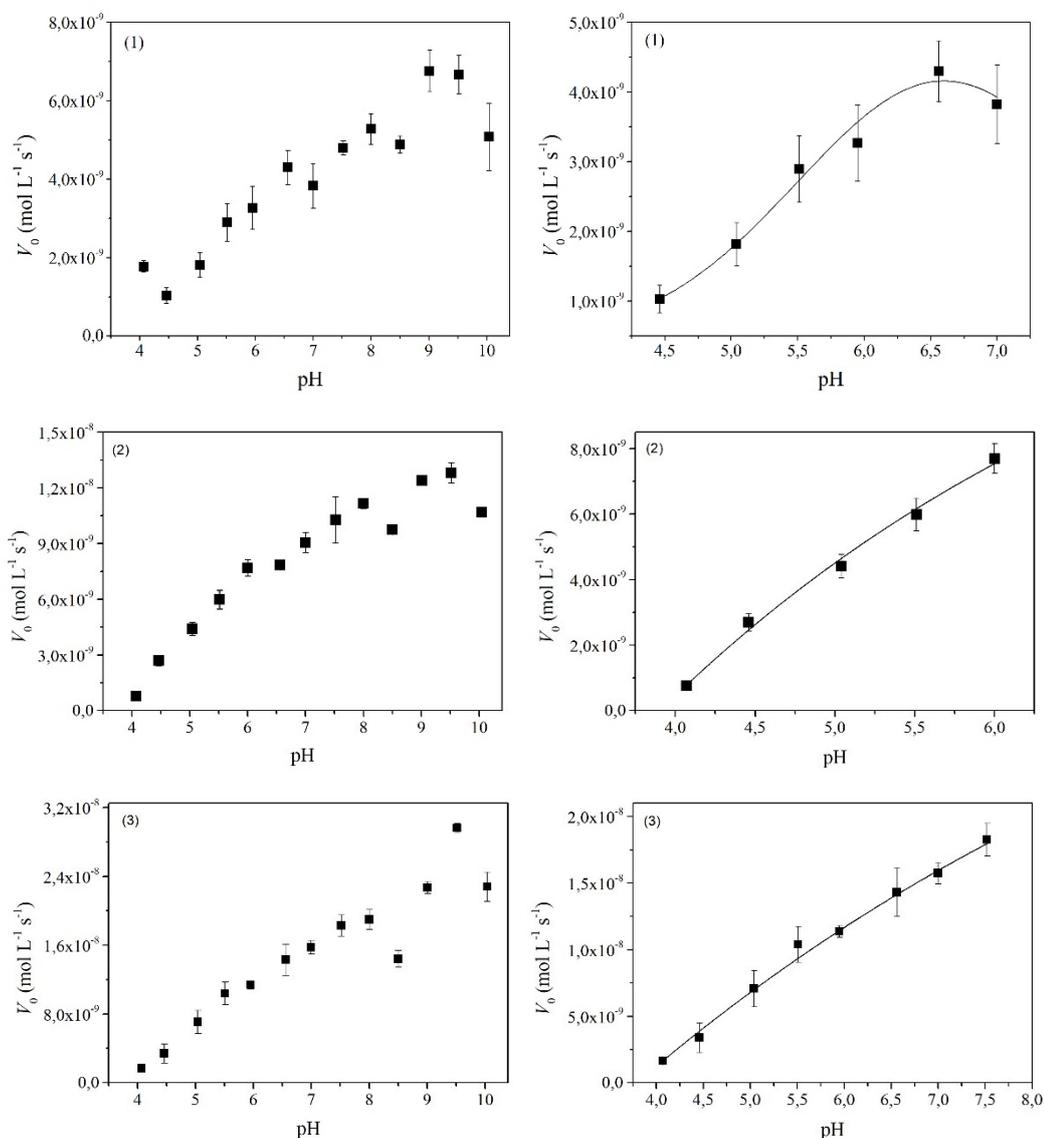
À vista disso, foram realizados estudos sobre influência do pH na atividade catalítica dos complexos nas reações de hidrólise do 2,4-BDNPP, com dois objetivos: 1) de determinar o pH ótimo em que a atividade dos complexos é máxima e; 2) obter valores de pK_a cinético; que, quando comparados a pK_{as} determinados potenciométricamente (Tabela 10), são úteis para estabelecer a espécie responsável pela atividade. Para a determinação de parâmetros cinéticos, foram realizados estudos variando-se a concentração de substrato, em um determinado pH.

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

As atividades dos complexos **1**, **2** e **3** na reação de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP, estudadas na faixa de pH de 4,0 a 10,5, apresentaram forte dependência do pH e maior atividade em pH 9,5 (Figura 34). Em valores de pH ácido, as atividades são relativamente baixas; aumentando, à medida que o pH se torna alcalino. A cima de pH 9,5 a atividade hidrolítica dos complexos decai.

O gráfico V_0 vs pH (Figura 34) para os complexos **1**, **2** e **3** mostram um perfil de curva significativamente diferente do perfil tipo sino apresentado pelo complexo $Fe^{III}Zn^{II}-L_1$ e outros com semelhante estrutura (PIOVEZAN et al., 2010), (KARSTEN et al., 2002). Sendo que, este fato, pode estar associado a uma possível mudança de mecanismo no decorrer da cinética (CAMARGO et al., 2018).

Figura 34. Esquerda: Dependência de V_0 vs pH para reações de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP catalisadas pelos complexos **1**, **2** e **3**. $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1); $[\text{complexo}] = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{substrato}] = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{tampões}] = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (MES, HEPES, CHES); $I = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4). Direita: Ajustes para obtenção dos pK_a s cinéticos nas faixas de pH pré determinadas.



Fonte: o autor

Na Tabela 10 são apresentados os pK_a s cinéticos e potenciométricos para cada complexo obtidos durante hidrólise do substrato e os pHs onde a atividade hidrolítica é máxima.

Pelo perfil dos gráficos (Figura 34) é possível observar duas regiões de máximos de atividade: complexo **1** em pH 6,5 e 9,0, complexo **2** em pH 6,0 e 9,5, complexo **3** em pH 6,5 e 9,5, e complexo **4** em pH 6,0 e 8,0. Na região de pH entre 6,0 e 6,5 os pK_a s cinéticos calculados são atribuídos às moléculas de água coordenadas aos íons metálicos, gerando a espécie ativa

$[(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-hidróxido})\text{M}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})\text{L}_1\text{-X}]$ ($\text{M} = \text{Zn}(\text{II})$ ou $\text{Cu}(\text{II})$; $\text{X} = \text{NAF}$, Et-NAF e Prop-NAF) na hidrólise do substrato. Em regiões abaixo de pH 6,0 a formação da espécie $[(\text{H}_2\text{O})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-hidróxido})\text{M}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})\text{L}_1\text{-X}]$ predomina; conseqüentemente, a atividade diminui pela ausência do nucleófilo hidróxido coordenado ao íon $\text{Fe}(\text{III})$.

Os pK_a s cinéticos calculados foram maiores dos que os pK_a s obtidos potenciométricamente. Isso sugere que a aproximação do substrato ao centro binuclear afasta os grupos aminos protonado da cadeia lateral que podem interagir com as moléculas de água. Ou seja, a influência de uma carga positiva sobre uma molécula de água coordenada ao íon $\text{Fe}(\text{III})$ ocasionando a redução do valor de pK_a potenciométrico em relação ao pK_a cinético. Tal fato, foi também constatado por Camargo e colaboradores em estudos com o ligante L_1 modificado com derivados do pireno (CAMARGO et al., 2018).

Tabela 10. Valores de pK_a s cinéticos e potenciométricos dos complexos **1**, **2** e **3** na hidrólise o 2,4-BDNPP.

Complexos	pK_a cinético	pK_a potenciométrico
1	5,45	4,76
2	5,62	4,23
3	5,10	4,31
* FeZn-L_1	4,90	5,07

*(PIOVEZAN, JOVITO et al. 2010)

Embora mais experimentos necessitem ser realizados, a formação da segunda espécie ativa, em pH alcalino, pode ser consequência dos efeitos de segunda esfera de coordenação sendo atribuída a desprotonação do grupo amino da cadeia lateral de cada complexo correspondente. Isso permite a interação com o substrato, diminuindo a energia do estado de transição (E_a) durante a reação de hidrólise.

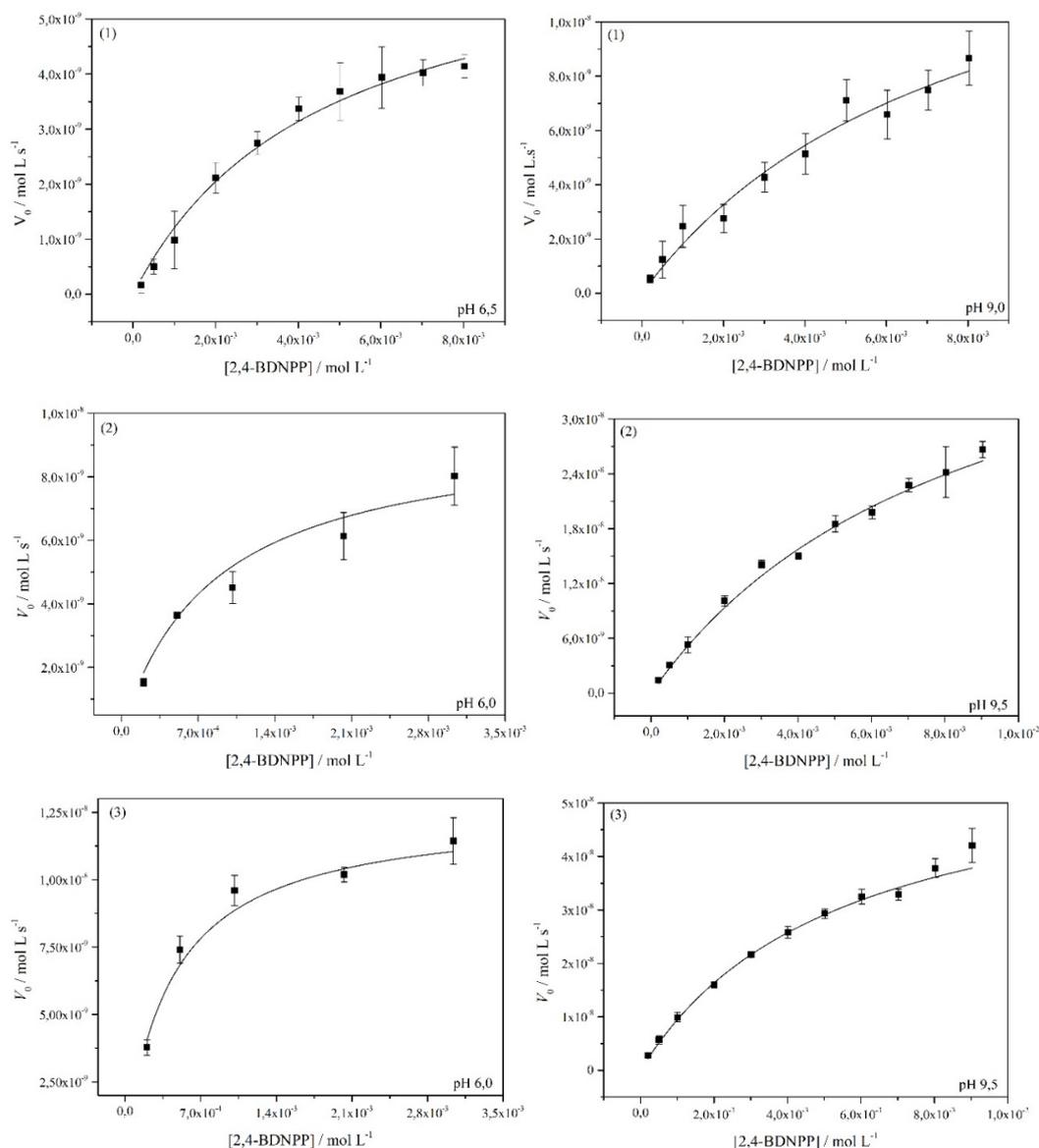
5.2.5.2 Efeito da concentração do substrato na hidrólise do 2,4-BDNPP

O estudo da dependência da velocidade de reações de hidrólise promovida pelos complexos **1**, **2** e **3**, quando a concentração do substrato varia é mostrado na Figura 35 e os dados obtidos estão sumarizados na Tabela 11. Foram feitos experimentos em pH 6,5 e 9,0 para

o complexo **1** e em pH 6,0 e 9,5 para os complexos **2** e **3** com o objetivo de comparar os valores de K_{ass} e constatar efeitos de segunda esfera de coordenação.

Todos os complexos exibiram um comportamento típico de uma curva Michaelis-Mentem, ou seja, há uma dependência linear da velocidade V_0 em baixas concentrações de substrato. Todavia, com o aumento da concentração do 2,4-BDNPP, a curva perde a linearidade e propende para uma curva de saturação. Tal comportamento sugere que a reação de hidrólise do substrato transcorre com a formação de um intermediário complexo-substrato.

Figura 35 - Dependência da velocidade de hidrólise com a concentração do 2,4-BDNPP para os complexos **1**, **2** e **3**. $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1); [complexo] = $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; [tampões] = $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (MES, pH = 6,0 e 6,5; CHES, pH = 9,0 e 9,5); $I = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4); Temperatura, 25 °C.



Fonte: o autor

O complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1\text{-Prop-NAF}$ (**3**), dentre os complexos submetidos ao estudo cinético, foi o que proporcionou maior efetividade na conversão do substrato a produtos com uma eficiência catalítica ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) de 0,72 e 0,28 em pH 6,5 e 9,5, respectivamente. Isso significa quase o dobro da eficiência catalítica com relação ao complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1\text{-Et-NAF}$ (**2**) em ambos os valores de pH. De forma oposta, o complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1\text{-NAF}$ apresentou uma baixa eficiência, não só em relação aos complexos **1** e **2**, mas também em relação ao complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1$, preparado por Piovezan e coautores (Tabela 11) (PIOVEZAN et al., 2010).

Tabela 11. Parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP para os complexos: **1**, **2** e **3**.

	$V_{\text{máx}}$ Mol L ⁻¹ s ⁻¹	k_{cat} (s ⁻¹)	K_{M} (mol L ⁻¹)	K_{ass} (L mol ⁻¹)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	pH
(1)	6,68x10 ⁻⁹	1,57x10 ⁻⁴	1,93x10 ⁻³	518,1	0,08	6,0
(1)	1,64x10 ⁻⁸	3,86x10 ⁻⁴	8,05x10 ⁻³	124,1	0,05	9,0
(2)	9,93x10 ⁻⁹	2,42x10 ⁻⁴	7,0x10 ⁻⁴	1428,6	0,35	6,5
(2)	4,98x10 ⁻⁸	1,21x10 ⁻³	8,66x10 ⁻³	115,5	0,14	9,5
(3)	1,44x10 ⁻⁸	3,59x10 ⁻⁴	5,0x10 ⁻⁴	1997,3	0,72	6,5
(3)	6,04x10 ⁻⁸	1,51x10 ⁻³	5,39x10 ⁻³	185,4	0,28	9,5
(A)*	1,8x10 ⁻⁸	9,0x10 ⁻⁴	3,55x10 ⁻³	281	0,25	7,0

* complexo $\text{L}_1\text{-Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ (PIOVEZAN et al., 2010)

O aumento na eficiência catalítica para complexos na ordem **3**>**2**>**1** pode ser explicada tendo em vista as suas estruturas propostas. Conforme aumenta a cadeia lateral dos complexos, que diminui o impedimento à entrada do substrato na cavidade metálica dos complexos, a eficiência catalítica aumenta.

Outro ponto distinto dos dados da Tabela 11 são os valores das constantes de associação (K_{ass}). O complexo **3** apresentou um K_{ass} maior em relação ao complexo **2** e quase 4 vezes a constante de associação do complexo **1**. O que pode ser um reflexo da presença do grupo amino na cadeia lateral, que interage com o somado a diminuição do impedimento estérico. Em pH 9,0 para o complexo **1** e 9,5 para os complexos **2** e **3**, a K_{ass} diminui drasticamente em relação ao pH anterior o que pode refletir a perda da carga positiva da amina protonada mais próxima ao grupo naftaleno reduzindo a afinidade do substrato pelo complexo. Isso fica evidente quando comparamos a constante de associação dos complexos trabalhados

aqui com o ligante $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1$ ($K_{\text{ass}} = 281$, pH 7,0) que não possui um grupo amino passível de protonação capaz de manifestar efeitos de segunda esfera de coordenação.

O parâmetro k_{cat} , para os complexos de **1** a **3** nos pHs 9,0 e 9,5, aumenta expressivamente quando comparado aos respectivos valores obtidos em pH 6,0 e 6,5. Esta alta reflete uma tendência inversa de quanto menor a K_{ass} maior o k_{cat} . Uma constante de associação elevada salienta uma forte afinidade complexo-substrato; portanto, há uma maior dificuldade na liberação dos produtos, o que é manifestado no valor de k_{cat} .

5.3 ESTUDOS DE REATIVIDADE DOS COMPLEXOS NA PRESENÇA DO DNA PLASMIDIAL

Devido ao bom resultado na clivagem hidrolítica do substrato 2,4-BDNPP pelos complexos **1**, **2** e **3** os novos compostos sintetizados foram submetidos a um estudo preliminar para analisar as suas reatividades frente ao DNA plasmidial.

5.3.1 Efeito da concentração dos complexos

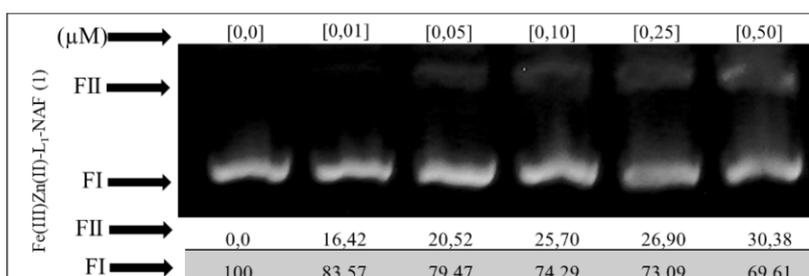
O efeito da concentração dos complexos é um ensaio importante pra determinar o tempo e concentração adequados para observar a clivagem do DNA plasmidial, sem que ocorra interferências expressivas de degradação espontânea do DNA.

Inicialmente, foram utilizadas concentrações de complexos na faixa compreendida entre 5,0 e 250 μM e deixadas reagir por 16 horas incubadas a 37 °C ou 50 °C (dados não mostrados). Devido a alta clivagem do DNA plasmidial por parte dos complexos, as concentrações foram ajustadas para uma faixa de 0,01 a 0,5 μM para o complexo **1** e de 0,25 a 5 μM para os complexos **2** e **3**, com tempo de incubação de 1,0 hora. Os resultados estão são mostrados na Figura 36 e Figura 37.

Nessas concentrações, todos os complexos foram capazes de clivar o DNA de modo concentração-dependente; ou seja, com o aumento da concentração do complexo no meio reacional aumentou também a capacidade de clivar o DNA. Esse perfil de concentração para o complexo **1** somente foi possível reduzindo a concentração de complexo em 10x em relação a concentração dos complexos **2** e **3** (Figura 37). É um resultado peculiar; pois, tal complexo se mostrou o menos efetivo na clivagem hidrolítica do substrato modelo 2,4-BDNPP. Ademais, tendo em vista que o DNA possui carga negativa, a presença de uma carga positiva pertencente

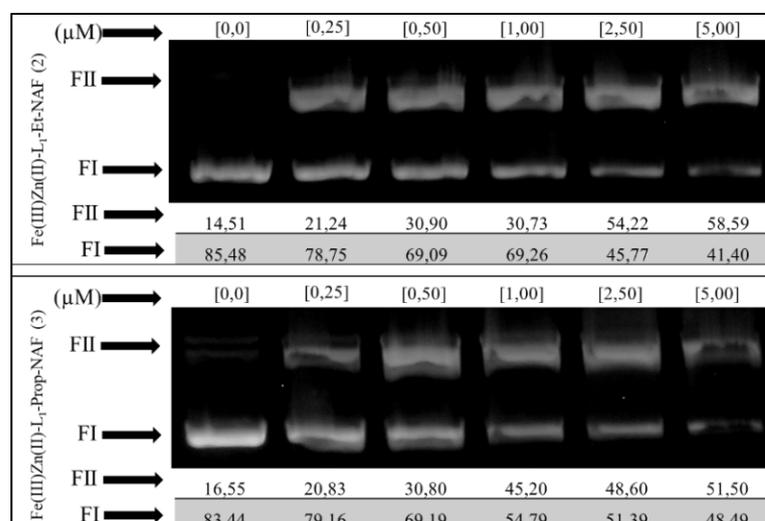
ao grupo amino protonado da cadeia lateral dos complexos **2** e **3** deveria proporcionar a estes dois complexos uma efetividade maior em relação ao complexo **1** neste tipo de reação (Figura 36).

Figura 36 - Eletroforese em gel de agarose para clivagem do DNA plasmidial pelo complexo **1** em diferentes concentrações. [DNA] = 330,0 ng, ~ 25,0 μM ; [tampão] = MES (10 mM, pH 6,0); [complexo] = 0,0 a 0,5 μM ; Temperatura = 50 °C; tempo de incubação = 1,0 h, ao abrigo da luz.



Fonte: o autor

Figura 37 - Eletroforese em gel de agarose para clivagem do DNA plasmidial pelos complexos **2** e **3** em diferentes concentrações. [DNA] = 330,0 ng, ~ 25,0 μM ; [tampão] = MES (10 mM, pH 6,0); [complexo] = 0,0 a 5,0 μM ; Temperatura = 50 °C; tempo de incubação = 1,0 h, ao abrigo da luz.



Fonte: o autor

Assim, o que foi observado é que o aumento no número de carbonos na cadeia lateral não foi equivalente ao aumento da atividade dos complexos na clivagem do DNA plasmidial. Este comportamento foi também observado por Camargo e coautores ao estudar complexos de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$, similares aos empregados neste trabalho, com uma cadeia lateral de 4 a 6 carbonos em

que o grupo amino terminal pode interagir com o nucleófilo reduzindo a atividade dos complexos durante a clivagem do DNA (CAMARGO, 2013), (CAMARGO et al., 2018).

Com a incorporação de efeitos de segunda esfera de coordenação que podem alterar não só a atividade de clivagem, mas também a afinidade dos complexos pelo DNA, ensaios de cinética de clivagem se fazem necessários para avaliar a influência do acréscimo de átomos de carbonos contendo com grupos amino são necessários.

Quando comparadas com a atividade exibida pelo complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{-L}_1$ (PIOVEZAN et al., 2010), as atividades dos complexos **1**, **2** e **3** na clivagem do DNA plasmidial foram superiores. Está proeminência pode ser observada pela alta concentração de complexo utilizada por Piovezan (10,0 a 80,0 μM) no ensaio de clivagem de DNA em relação às concentrações empregadas nesse trabalho (0,01 a 0,50 μM , para o complexo **1** e 0,25 a 5 μM , para o complexo **3**).

PARTE II

**TESTES DE ADSORÇÃO DA QUITOSANA MODIFICADA COM O LIGANTE
BINUCLEANTE L₁**

6. INTRODUÇÃO

A reatividade conferida ao ligante L₁ pela presença do grupo aldeído proporciona uma gama de aplicações, dentro do universo da química, que vão além dos estudos de segunda esfera de coordenação. Assim, neste trabalho o ligante L₁ também foi utilizado para modificar a quitosana, um biopolímero, para realização de estudos de adsorção de íons metálicos em solução aquosa. Com o escopo em aplicações no campo de pré-concentração de íons metálicos, o que pode permitir a redução de interferentes, aumento na concentração e isolamento de analitos a partir da fonte.

Na atualidade a contaminação de ecossistemas por íons metálicos constitui um dos grandes desafios da ciência moderna (SUN et al., 2017a; ZHANG; XU, 2017). A elevada busca por sistemas de alta tecnologia, que vão desde celulares e computadores a turbinas eólicas, exige um alto grau de extração e consumo de metais como cádmio, zinco, níquel, além de lantanídeos, como cério e európio. Somado a isso, ainda temos a produção de efluentes contaminados com metais tóxicos oriundos de indústrias de galvanoplástica e curtumes. Como consequência, uma parcela apreciável de resíduos tóxicos contendo metais são despejados anualmente no meio ambiente. (ASLIBEKIAN; MOLES, 2003; GILLES; LOEHR, 1994; SUN et al., 2017b)

A contaminação do meio ambiente por metais tóxicos está relacionada com diversas doenças em organismos vivos, além de não serem biodegradáveis, influem negativamente na estrutura da flora microbiana mesmo em baixas concentrações de metais. (WU et al., 2017), (CHATTERJEE; SARKAR; BHATTACHARYA, 2014), (TEPANOSYAN et al., 2017), (ZHANG et al., 2017)

Os métodos empregados mais comuns hoje em dia para remoção de metais de efluentes industriais são: precipitação química, troca iônica, filtração, eletroquímica e osmose reversa. Entretanto, muito destas técnicas são dispendiosas e com alto custo, demonstrando em muitos casos, pouca eficiência na remoção de traços de metais. (BAILEY et al., 1999), (YANG et al., 2016), (TURHANEN; VEPSÄLÄINEN; PERÄNIEMI, 2015).

Assim, uma alternativa para remoção de íons metálicos de águas residuais consiste no emprego de biopolímeros com a capacidade de adsorver íons metálicos. (KANMANI et al., 2017) Com boa biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade e passível de ser modificada quimicamente, a quitosana é uma ótima alternativa a ser utilizada com este objetivo. (JOTHIRAMALINGAM; LO; PHANTHI, 2010)

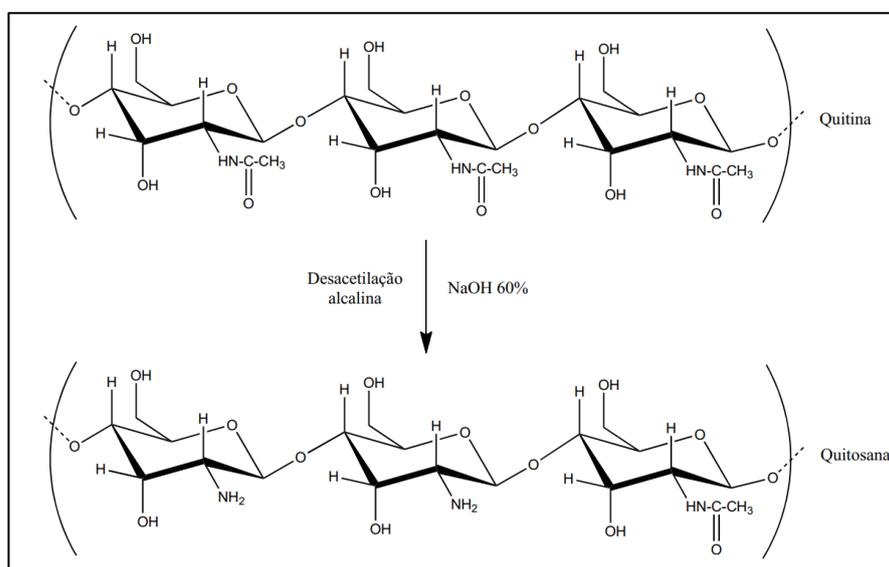
Assim, este trabalho tem também como objetivo, contribuir na área de remoção de íons metálicos com a elaboração de um novo adsorvente a partir do biopolímero, a fim de realizar estudos de equilíbrio de adsorção de Zn(II), Cu(II) e Ni(II) em sistema aquoso.

7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E ESTADO DA ARTE

7.1 QUITOSANA

A quitosana é formada pela D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina sendo majoritariamente obtida a partir da hidrólise alcalina da quitina em altas temperaturas, Figura 38. Nessa reação, grupamentos acetamido são parcialmente convertidos em grupos amino ao longo da cadeia polimérica. (BANO et al., 2017)

Figura 38 - Representação esquemática da obtenção da quitosana a partir da quitina.



Fonte: o autor

Sua eficácia como adsorvente é atribuída à alta flexibilidade da cadeia polimérica associada à presença de grupos amino e hidroxila na sua estrutura atuando como grupos quelantes. Associado a isso, a simples protonação de tais grupos aminos primários, permite à quitosana, via interações iônicas, a incorporação de agentes quelantes aniônicos, com fins de aumentar a seletividade e a adsorção de íons metálicos (BERGER et al., 2004). Tais grupos permitem ainda a inserção de agentes complexantes por meio de modificações químicas; em que as reações de Schiff figuram entre os principais métodos utilizados. Isso demonstra o grande potencial que pode ser agregado à quitosana no tocante a adsorção de íons. (IGBERASE; OSIFO; OFOMAJA, 2017) (JUSTI et al., 2005), (MORROW; PAYNE; SHEN, 2015).

7.2 AGENTES COMPLEXANTES/QUELANTES

Agentes complexantes, também chamados de ionóforos, são moléculas que na sua constituição possuem átomos doadores de pares de elétrons capazes de formar ligações com íons metálicos. A literatura especializada acrescenta a cada ano uma grande variedade de agentes complexantes ancorados na quitosana para fins de adsorção de íons. (ANTONY; ARUN; MANICKAM, 2019) A importância desses agentes fica evidente quando comparamos dados de adsorção da quitosana não modificada com o polissacarídeo funcionalizado, por exemplo: a adsorção de Pd(II), um íon metálico com alto grau de toxicidade, tem uma adsorção de apenas 0,033 mg/g de quitosana nativa. Entretanto, após a modificação com grupos acil, a adsorção é elevada para 1,58 mg/g de adsorvente, em pH 6,0. (SUN; WANG, 2006)

Do ponto de vista analítico, uma das características almejadas dos complexantes é a formação de compostos estáveis com íons metálicos. Em grande parte, compostos aromáticos derivados da amônia com átomos doadores de elétrons em sua estrutura proporcionam elevadas constantes de formação (K_f), como no caso de fenantrolinas. Dentre outros compostos aromáticos, a incorporação de piridinas na matriz da quitosana forma complexos estáveis com Au(III), Pd(II) e Pt(II) sendo empregadas na indústria para remoção desses íons.

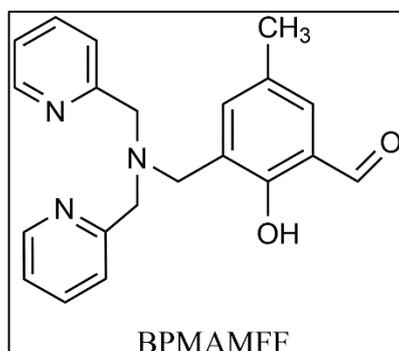
O desafio não reside apenas na obtenção de complexos com boa estabilidade, mas também em perquirir complexantes com alto grau de seletividade. Assim, como cada íon metálico possui um raio atômico específico, o emprego de ésteres coroa, bem como, macrocíclicos formados por poliaminas com cavidades de tamanho particular representam uma estratégia eficaz na tentativa de adsorver seletivamente íons metálicos.

Outro fator importante para seletividade frente a íons metálicos, está vinculado a natureza do ligante, ou seja, na presença de átomos bases ou ácidos “duros” ou “moles”, conforme a definição de Pearson. Destarte, átomos com elevada eletronegatividade (bases duras) tem preferência por cátions com elevada carga e raios atômicos pequenos (ácidos duros) e vice-versa. (GUIBAL, 2004)

O ligante mononucleante bpmamf (HL) detém na sua estrutura piridinas, aminas alifáticas e um grupo fenol apto a coordenar íons metálicos (Figura 39). JUSTI et al. (2005) utilizaram este ligante para funcionalizar a quitosana obtendo um produto com boa seletividade para íons Cu(II) em relação aos íons Ni(II) e Cd(II). Mostrando uma capacidade de adsorção (q_m) na ordem Cu(II)>Cd(II)>Ni(II) em pH 6,0, 2,0 e 3,0, respectivamente. (JUSTI et al., 2005) Este trabalho foi empregado como base de comparação para nossos estudos de adsorção com a

finalidade de analisar o comportamento do ligante binucleante L₁ concernente a cinética e equilíbrio de adsorção.

Figura 39 - Ligante HL utilizado por Justí et al. (2005).



Fonte: o autor

Após a primeira etapa de funcionalização, existe a possibilidade de se obter um produto solúvel em meio ácido. Com a finalidade de contornar isso, uma segunda etapa de reticulação se faz necessária. Esta etapa, também chamada de “cross-linking” se utilizada de agentes reticulantes, como glutaraldeído, para interligar covalentemente duas ou mais cadeias poliméricas por intermédio de uma “ponte”. O mecanismo envolve a formação de uma base de Schiff com o ataque nucleofílico de um átomo de nitrogênio do grupo amino da quitosana sobre um átomo de carbono do grupo aldeído do glutaraldeído formando uma imina. (BERGER et al., 2004) Além de reduzir a solubilidade, pode ocorrer uma perda na capacidade de adsorção. Entretanto, a extensão desta perda está associada ao procedimento usado para realizar a reação de reticulação. (GYANANATH; BALHAL; SCIENCES, 2012; MAITRA; SHUKLA, 2014)

7.3 MECANISMOS DE ADSORÇÃO

Processos de adsorção de diversos materiais, entre eles, íons metálicos é comumente estudado com o escopo no tratamento de águas residuais. E como já mencionado, possui diversas vantagens em relação aos métodos tradicionais de remoção de contaminantes. O estudo consiste em avaliar a cinética e a capacidade de adsorção de solutos em equilíbrio utilizando modelos matemáticos.

Existem dois tipos adsorção: uma química (quimiossorção), onde ocorre a formação de ligações químicas entre o adsorvente e o adsorvato e uma física (fisiossorção), no qual decorre de interações fracas de van der Waals não ocorrendo formação ou quebra de ligações,

mantendo a natureza química do adsorvato preservada. A energia envolvida nesses dois processos varia significativamente, enquanto a quimiossorção pode apresentar valores de 200 kJ mol^{-1} , o processo de fisiossorção ostenta valores na faixa de 20 kJ mol^{-1} .

O mecanismo de adsorção envolve primeiramente a etapa de transferência de moléculas do soluto do seio da solução para a superfície do adsorvente. Em seguida, ocorre a difusão do adsorvato (etapa mais lenta) para o interior dos poros do adsorvente para então culminar na última etapa do processo que é a adsorção do adsorvato na superfície interna do adsorvente. Esta última etapa ocorre em maior velocidade, portanto, a velocidade é determinada principalmente pela etapa de difusão do adsorvente.

O estudo cinético (velocidade de adsorção) bem como a avaliação de capacidade máxima de adsorção são parâmetros importantes para avaliar e aprimorar compostos adsorventes. No estudo cinético, três modelos são comumente empregados: pseudo primeira ordem, pseudossegunda ordem e difusão intrapartícula. A capacidade máxima de adsorção (q_e) é obtida por meio do estudo de isotermas de adsorção, em que os modelos de equações frequentemente empregados são: Langmuir (L), Freundlich (F), Redlich-Peterson (R) e o modelo linear.

7.3.1 Cinética de adsorção

A equação de pseudo primeira ordem, proposta no final do século 19 por Lagergren, é descrita pela equação não reversível:



Sendo S o sítio de adsorção e M o adsorvato.

A velocidade de adsorção pode ser escrita pela equação:

$$dq_t/dt = k_1(q_e - q_t) \quad (2)$$

onde q_e e q_t (ambas em mg g^{-1}) são as quantidades adsorvida no equilíbrio e no tempo t (min), respectivamente e k_1 (min^{-1}) é a constante de velocidade de pseudo primeira ordem. Integrando essa equação nas condições de $q_t = 0$ e $t = 0$ e $q_t = q_t$ e $t = t$, temos:

$$\log (q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2,303} \cdot t \quad (3)$$

O gráfico de $\log (q_e - q_t)$ em função de t fornece os valores k_1 e q_e .

A máxima adsorção corresponde a saturação da monocamada do adsorvente em sua superfície.

O modelo cinético de pseudo segunda ordem, introduzido em meados dos anos 80, é descrito pela equação:



Esse modelo tem a velocidade de adsorção expressa como se segue:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t) \quad (5)$$

onde k_2 ($\text{g mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) é a constante de velocidade de adsorção de pseudo segunda ordem. Integrando a Equação (5), obtemos:

$$\frac{1}{(q_t)} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} \cdot t \quad (6)$$

O coeficiente linear e angular da reta gerada pelo gráfico (t/q_t) vs t permite calcular os valores de k_2 e q_e , respectivamente.

O terceiro modelo cinético usualmente utilizado é o de difusão intrapartícula. Aqui, a velocidade de difusão é obtida pela linearização da curva gerada pela equação abaixo:

$$q_t = k \cdot t^{1/2} \quad (7)$$

Quando a difusão intrapartícula controla o processo cinético de adsorção, o gráfico da Equação 7 proporciona uma reta que passa pela origem.

7.3.2 Isotermas de adsorção

Isoterma de adsorção são equações matemáticas que retratam quantitativamente a capacidade de adsorção de solutos em uma dada temperatura. Está relacionado com a concentração do adsorvato na fase sólida e a sua concentração de equilíbrio na fase aquosa.

A isoterma linear descreve o sistema em que a adsorção do soluto pelo adsorvente é diretamente proporcional a sua concentração em solução.

$$q_e = k_D \cdot C_e \quad (8)$$

onde q_e é a quantidade adsorvida (mg g^{-1}) e C_e é a concentração do adsorvato na solução (mg L^{-1}), ambas em equilíbrio; k_D é a constante de proporcionalidade. Um sistema descrito por esse modelo assinala o envolvimento de processos de fisiossorção e quimiossorção durante a adsorção do soluto. Assim que, a interação entre adsorvato e adsorvente não ocorre de forma específica.

A isoterma de Langmuir descreve o processo de adsorção em monocamada, onde os sítios de adsorção são energeticamente idênticos. A forma linear da equação é representada por:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L q_m} + \frac{C_e}{q_m} \quad (9)$$

onde, K_L é a constante de adsorção de Langmuir (L g^{-1}) e q_m (mg g^{-1}) é a capacidade de adsorção máxima do adsorvente. Por meio do coeficiente angular e linear obtidos do gráfico C_e/q_e em função de C_e encontramos os parâmetros q_m e K_L .

A escolha de um modelo para avaliar o processo de adsorção é baseada no coeficiente de correlação entre dados experimentais e o modelo linearizado.

7.4 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DOS ÍONS METÁLICOS Zn(II), Cu(II) E Ni(II)

Conquanto tenha trazido benefícios, o advento da tecnologia expôs ecossistemas à contaminação por íons metálicos; dos quais figuram, em menor ou maior grau de toxicidade, íons de zinco, cobre e níquel. Destarte, os biomas aquáticos são os mais acometidos por receberem contaminantes provenientes da lixiviação e descarte de águas residuais contaminadas por tais íons.

Íons metálicos existem na natureza em diversos estados de oxidação, não são biodegradáveis e podem permanecer sedimentados por um longo tempo no meio ambiente na forma de complexados com compostos orgânicos ou inorgânicos. A bioacumulação desses contaminantes acentua o problema pois acaba implicando toda uma cadeia alimentar. (CONWAY; JOHN, 2014), (VAKILI et al., 2019)

O zinco está presente em uma série de produtos industriais, e somente no ano de 2008 foram produzidas 11 milhões de toneladas. Os principais produtores desse metal são países asiáticos. Como consequência, a contaminação por zinco de rios e lençóis freáticos nessas zonas é alto. (MEKAPOGU et al., 2018), (CAO et al., 2018)

Íons de zinco são considerados micronutrientes essenciais tanto para mamíferos como para fitoplanctons. Está presente em enzimas que estão associadas ao crescimento de plantas e na regulação da atividade metabólica. Em contrapartida, níveis mais elevados de concentração de Zn(II) possuem efeitos contrários, limitam o crescimento de plantas e fitoplanctons e podem causar distúrbios em seres humanos.

Assim como o zinco, o cobre é amplamente empregado em processos industriais, principalmente em indústrias do setor elétrico, indústria agrícola como fertilizante e defensivo agrícola e mineração. A principal contaminação ambiental advém de efluentes industriais. Com baixa solubilidade em meio aquoso, o cobre é facilmente sedimentado em corpos de água.

Íons de cobre são altamente bioacumulativos e tóxico em concentrações superiores a $1,3 \text{ mg L}^{-1}$. Sua toxicidade advém de seu poder de catalisar a formação de radicais livres. Mais recentemente, concentrações elevadas de Cu(II) estão sendo associadas ao mal de Alzheimer devido a uma possível coordenação desse íon com proteínas envolvidas nas sinapses nervosas. (KEPP; SQUITTI, 2019)

O níquel é utilizado principalmente na manufatura do aço inoxidável e a concentração máxima na água doce deve ser menor ou igual a $0,025 \text{ mg L}^{-1}$. Dos elementos citados aqui, é o menos tóxico embora em quantidades maiores que o recomendado, pode causar danos ao coração e fígado (BAILEY et al., 1999).

Seguramente, o cádmio é um dos metais mais tóxicos entre os íons Zn(II), Cu(II) e Ni(II). A intoxicação por cádmio é associada a diversos tipos de câncer, como câncer de próstata, pâncreas e pulmão, mesmo em pequenas doses. (ZHANG et al., 2017)

Níquel é encontrado naturalmente com minérios de zinco, cobre e chumbo e a principal fonte de contaminação por cádmio está no despejo de efluentes industriais oriundos da metalurgia e mineração.

Portanto, é fundamental a eliminação de íons metálicos de águas contaminadas antes de serem descartadas no meio ambiente. Assim que, a adsorção é um meio viável para exercer a remoção desses poluentes, tanto do ponto de vista econômico como pela eficiência.

8. OBJETIVOS

8.1 OBJETIVO GERAL

Modificar a superfície da quitosana com o ligante L_1 , caracterizar o novo composto e estudar o equilíbrio e a cinética de adsorção na presença de Zn(II), Cu(II) e/ou Ni(II).

8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Inserir na superfície da quitosana o ligante L_1 , por meio de reações de adição entre o aldeído do ligante e grupos amino do biopolímero;
- Caracterizar a quitosana modificada por técnicas espectroscópicas (IV e RMN ^{13}C) e análise termogravimétrica (TGA);
- Reticular com glutaraldeído o derivado da quitosana afim de evitar a solubilidade em meio ácido;
- Realizar experimentos cinéticos para avaliar o modelo (pseudo primeira ordem, pseudossegunda ordem ou intrapartícula) que se ajusta melhor aos dados experimentais;
- Determinar o melhor modelo de isoterma de adsorção que coaduna com valores experimentais e obter os parâmetros de adsorção (q_m e K_{ads}).

9. MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

9.1 MATERIAIS

9.1.1 Reagentes e soluções

Para os ensaios de adsorção, soluções padrão (1000 mg L^{-1}) contendo os íons metálicos foram preparadas a partir da dissolução dos cloretos de zinco (ZnCl_2), níquel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ou cobre ($\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) em água deionizada. Os sais utilizados possuíam grau analítico e foram obtidos a partir de fontes comerciais sem purificação prévia. As soluções utilizadas nos experimentos de adsorção foram preparadas a partir da diluição das soluções padrão usando a solução tampão: $0,10 \text{ mol L}^{-1} \text{ NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{aq})}$ ($\text{pH} = 9,0-10,0$). Todos os outros reagentes usados eram de grau analítico. Para a análise no F AAS, as soluções foram acidificadas com HNO_3 1% (V/V).

9.2 MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

9.2.1 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas em um equipamento modelo TG-50 da Shimadzu, utilizando uma taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ na faixa de temperatura de $25 - 900 \text{ }^\circ\text{C}$, sob atmosfera de nitrogênio na razão $50,0 \text{ ml min}^{-1}$. Os parâmetros cinéticos foram determinados usando o software associado ao TG-50.

9.2.2 Caracterização textural

O método BET foi utilizado para determinar a área superficial, o tamanho e o volume dos poros do adsorvente. Esse método consiste na determinação da quantidade de nitrogênio adsorvido/dessorvido na superfície do sólido a uma temperatura de 77 K . O equipamento utilizado para obter as isotermas de adsorção/dessorção, que relaciona o volume de N_2 adsorvido em equilíbrio com sua pressão parcial na fase gasosa, foi o Autosorb-1 (Quantachrome Instruments).

9.2.3 Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O perfil de distribuição dos tamanhos de partículas do Q-L1 foi obtido através da análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) realizada em um analisador de tamanho de partículas Zetasizer Nanosizer (Malvern). A preparação das amostras consistiu na dispersão das partículas em água ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) utilizando um banho de ultrassom durante 60 min.

9.2.4 Análise de potencial zeta em função do pH

O ponto de carga zero (pHpzc) foi obtido através da análise de espalhamento eletroforético de luz (ELS) realizada em diferentes valores de pH (2,0-11,8) usando um analisador autotitulado MPT-2 (Malvern). A preparação das amostras também consistiu na dispersão das partículas em água ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) utilizando um banho de ultrassom durante 60 min.

9.2.5 Espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS)

A concentração dos metais em meio aquoso foi determinada por espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS), empregando um espectrômetro Varian, modelo SpectrAA 50 equipado com um atomizador de chama ar-acetileno e lâmpadas de cátodo oco HLA 4S para cada metal a ser analisado. Os valores dos parâmetros instrumentais específicos para cada metal usado nas determinações estão na Tabela 12.

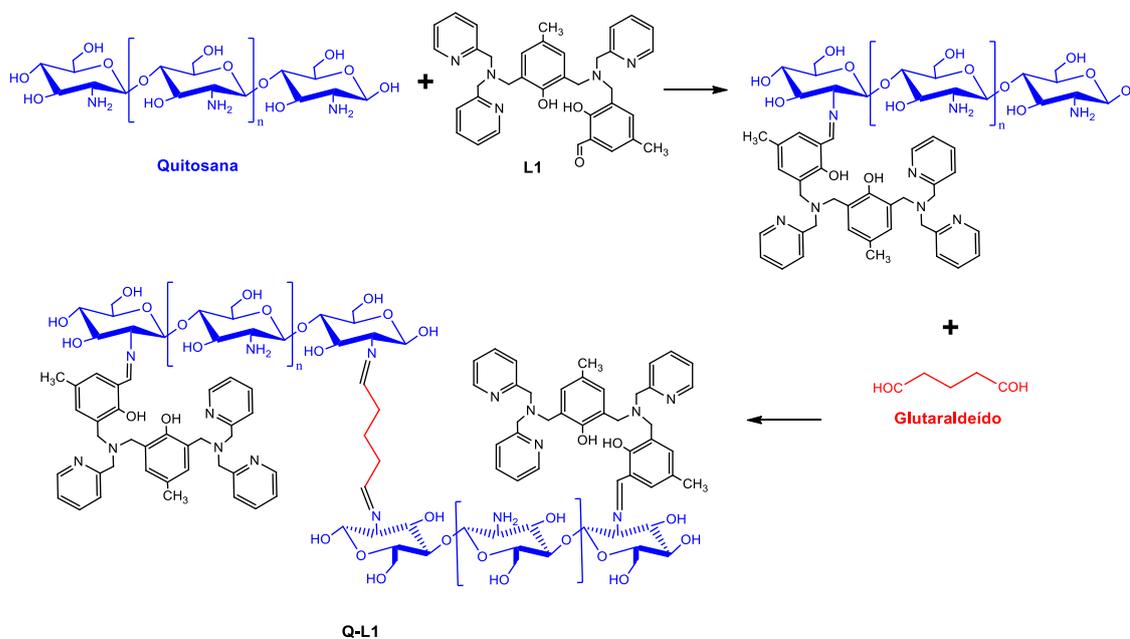
Tabela 12. Parâmetros instrumentais para análise dos metais por F AAS.

Parâmetros	Metais		
	Ni(II)	Zn(II)	Cu(II)
Largura da fenda espectral (nm)	0,2	1	0,5
Corrente da lâmpada (mA)	4	5	4
Comprimento de onda (nm)	232	213,9	324,8
Faixa de calibração externa (mg L^{-1})	0,0 - 5,0	0,0 - 1,0	0,0 - 10,0
Taxa de aspiração (ml min^{-1})	7	7	4,5

Fonte: o autor

9.3 EXPERIMENTOS DE ADSORÇÃO

9.3.1 Preparação da quitosana modificada (Q-L1) pela inserção do ligante L1



A modificação química da quitosana foi realizada por meio da reação de base de Schiff entre os grupos amino da quitosana (Q) e o grupo aldeído do ligante L1. Após a modificação química, o adsorvente Q-L1 foi submetido à reticulação com uma solução de glutaraldeído a 2,5% para formar uma rede tridimensional e aumentar a resistência do adsorvente em soluções ácidas e básicas (Nghah, Endud, & Mayanar, 2002). Para tanto, a quitosana foi dispersa em metanol na proporção de 1,5 mmol de ligante (L1) por mmol de glucosamina e o sistema foi mantido sob agitação e refluxo por 24 h. No final da reação, o produto foi exaustivamente lavado com metanol para remover o excesso de ligante e, em seguida, seco em vácuo. Na etapa seguinte, 5 ml da solução de glutaraldeído (2,5%) foram adicionados gota a gota a 10 ml de solução metanólica de Q-L1 (60 g L⁻¹) e essa mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 4 h. O sólido foi então filtrado, lavado exaustivamente com metanol e seco a vácuo.

9.3.1.1 Cinética de Adsorção dos Íons Zn(II), Cu(II) e Ni(II)

Os experimentos de adsorção com misturas de adsorvato (Cu, Ni ou Zn) foram realizados em frasco fechado contendo 120,0 mg de Q-L1 e 120 ml de solução contendo os íons metálicos. Após tempos de adsorção predefinidos, amostras foram coletadas, centrifugadas (10.000 rpm por 5 min), diluídas e acidificadas (ácido nítrico, 1% v / v) para determinação da concentração de íon metálico residual por F AAS. Para os sistemas binário (Cu-Zn e Ni-Zn) e ternário (Cu-Ni-Zn), as razões molares para o metal dissolvido na fase aquosa foram 1: 1 e 1: 1: 1, respectivamente, e a concentração inicial total de íons era de 1,5 mmol L⁻¹.

A adsorção de metais em condições básicas raramente é estudada. Na verdade, alguns autores propuseram que a adsorção de cobre, zinco e níquel em concentrações de traços é maior em pH 9,0 do que em condições ácidas (Gao, Lee, Oshima, & Motomizu, 2000; Hebeish, Elnagar, Helal, Ragab e Shaaban, 2014; Pivarčiová, Rosskopfová, Galamboš, & Rajec, 2014). Assim, neste estudo, a cinética de adsorção foi realizada em pH 9,0.

As quantidades de cada íon metálico adsorvido em Q-L1 (q_t , mmol g_{Q-L1}⁻¹) no tempo t (min) foram determinadas de acordo com a Equação 10:

$$q_t = \frac{(C_0 - C_t)V}{WM} \quad (10)$$

onde C_0 (mmol L⁻¹) e C_t (mmol L⁻¹) são as concentrações de íons metálicos inicial e no tempo t , respectivamente; V (L) é o volume total da solução de metal, W é a massa Q-L1 e M (mg mmol⁻¹) é o peso atômico do íon metálico correspondente.

9.3.1.2 Isoterma de adsorção individual dos íons Zn(II), Cu(II) e Ni(II)

Nos experimentos de equilíbrio de adsorção com os adsorbatos monocomponentes (Cu, Ni e Zn), 20,0 mg de Q-L1 foram colocados em 30,0 ml de solução tamponada, em pH 9,0 para Cu (II) e Zn (II) e pH 10,0 para Ni (II). Diferentes concentrações do íon metálico (0,1 - 2,0 mmol L⁻¹) foram utilizadas. Após atingir o equilíbrio (48 h), uma alíquota apropriada foi coletada, centrifugada, diluída, acidificada e a concentração dos íons metálicos determinada por F AAS.

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Serão discutidos as modificações realizadas na quitosana por meio da inserção do ligante L_1 e os estudos cinéticos do novo material na presença dos íons metálicos Zn(II), Cu(II) e Ni(II).

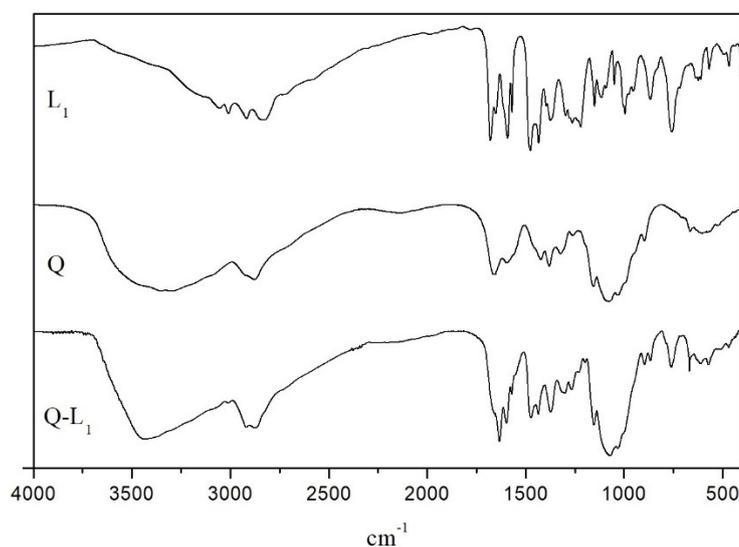
10.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA MODIFICADA

10.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho da quitosana (Q), do ligante L_1 e da $Q-L_1$, estão na Figura 40. No espectro de infravermelho são observadas bandas vibracionais específicas do biopolímero (Q): 1661 cm^{-1} atribuída à absorção de $C=O$ pertencente a estrutura $-NHC=O$, 1599 cm^{-1} referente à deformação do grupo NH_2 , 1075 cm^{-1} atribuído ao estiramento a ligação $C-O$ de álcoois primários e 3372 cm^{-1} relacionado ao estiramento da ligação $O-H$ (MONTEIRO; AIROLDI, 1999). O espectro de infravermelho do composto L_1 (Figura 40) evidencia as principais bandas do espectro vibracional do composto L_1 : 3390 cm^{-1} atribuído ao estiramento da ligação $O-H$ dos fenóis, 1678 cm^{-1} referente a banda de estiramento $C=O$ da carbonila, 1225 cm^{-1} atribuída a banda de estiramento $C-O_{\text{fenol}}$, 1368 cm^{-1} atribuída a banda de deformação angular $O-H$, 759 cm^{-1} referente a banda de deformação angular $C-H_{Ar}$, estas bandas aparecem também no espectro da quitosana modificada (Figura 40, $Q-L_1$).

A ausência da banda em 1678 cm^{-1} ; atribuído ao grupo carbonil do composto L_1 , juntamente com o aparecimento da banda em 1632 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação imina ($C=N$), evidencia a modificação química da quitosana (SILVERSTEIN RM, BASSLER GC, 1991). Comparando os três espectros da Figura 39 também foi possível observar um deslocamento para o vermelho ($\sim 10\text{ cm}^{-1}$) nas bandas de $Q-L_1$ quando comparadas com o polímero livre. Isso pode ser atribuído às ligações de hidrogênio formadas entre o ligante e a quitosana. Além disso, as intensidades dos picos também foram influenciadas pela formação do $Q-L_1$, uma vez que a proporção das ligações foi alterada.

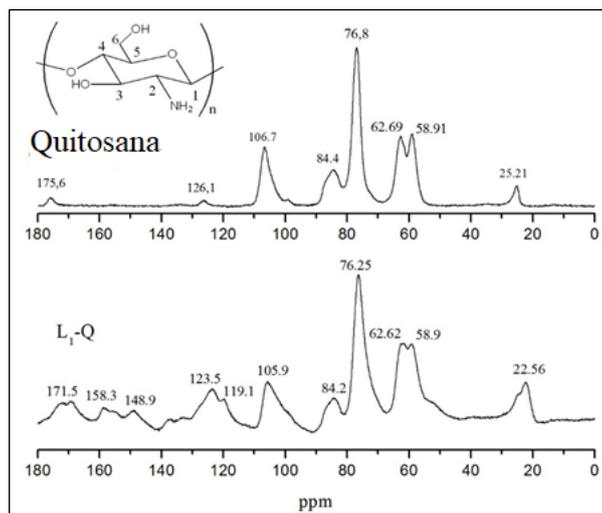
Figura 40 - Espectros na região do infravermelho do ligante L_1 , da quitosana (Q) e de sua respectiva modificação com o ligante L_1 (Q- L_1).



Fonte: o autor

10.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono no estado sólido ^{13}C NMR

A análise do espectro de ^{13}C NMR da quitosana (Figura 41) mostra picos com deslocamento químico em 58,91; 62,69; 76,8; 84,2 e 106,7 ppm, sendo atribuídos aos carbonos C2, C6, C3, C5, C4 e C1, respectivamente, do polissacarídeo (Figura 41). Os dois picos em 25,21 e 175,6 ppm referentes ao grupo metila e carbonila, respectivamente, estão associados aos grupos acetamido em decorrência da incompleta desacetilação da quitina. O espectro de RMN ^{13}C da quitosana modificada (L_1 -Q) mostra picos referentes a quitosana, bem como o aparecimento de novos picos, o que demonstra uma efetiva modificação no polímero (Figura 41).

Figura 41 - Espectros de ^{13}C NMR no estado sólido do biopolímero Q e Q-L₁.

Fonte: o autor

No espectro do Q-L₁ são observados sinais na região entre 119,1 a 158,3 ppm, característicos de compostos aromáticos. O sinal em 158,3 ppm é atribuído aos carbonos fenólicos (C-OH) do ligante L₁, já o sinal em 148,9 ppm é atribuído aos carbonos aromáticos (C=O) das moléculas de piridina. Em 22,56 ppm é observado o sinal das metilas (-CH₃) ligadas aos anéis aromáticos. O sinal em 171,5 ppm pode estar associado ao carbono alifático do grupo imina (C=N).

10.1.3 Análise elementar de C, H e N

A porcentagem de C, H e N da quitosana (Q) e da quitosana modificada (Q-L₁) é dada na Tabela 13. Verificou-se que as modificações químicas aumentaram a porcentagem de átomos de C e N, confirmando a reação do polímero com o ligante L₁.

Tabela 13. Análise de CHN da quitosana (Q) e da quitosana modificada (Q-L₁).

	Composição (%)		
	C	H	N
Q	39,03	7,52	6,95
Q-L ₁	54,21	6,74	8,44

Fonte: o autor

O grau de substituição (*GS*) do grupo -NH₂ da quitosana foi calculado pela Equação 10 (LARANJEIRA et al., 2005).

$$GS = \frac{(aC/N)_m - (C/N)_0}{n} \quad (10)$$

onde $(C/N)_m$ é a razão *C/N* da quitosana modificada; $(C/N)_0$ é a razão *C/N* da quitosana original; *a* e *n* são os números de átomos de nitrogênio e carbono introduzidos após a modificação química, respectivamente. O grau de substituição calculado foi de 0,73.

A capacidade de adsorção de derivados de carboxilato de quitosana para íons de metais pesados parece ser dependente do grau de substituição (*DS*), da força iônica e pH da solução (Sun & Wang, 2006). Além disso, a maior capacidade de adsorção relatada foi de 162,5 mg de Cu (II) por grama de NOCMCS (N, O-carboximetil-quitosana) com um grau de substituição (*DS*) de 0,96 (Sun & Wang, 2006).

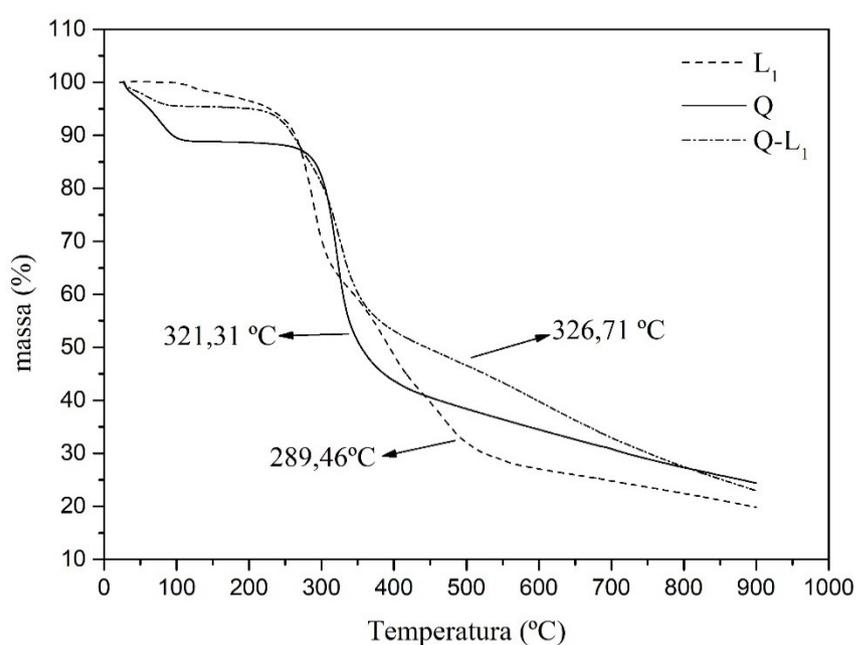
10.1.4 Análise termogravimétrica – TGA

Na Figura 42 é mostrado as curvas de TGA da quitosana (Q), do composto L₁ e da quitosana modificada (Q-L1). O primeiro estágio de perda de massa (Figura 41) para todas as amostras ocorre até 200 °C e pode estar relacionado à eliminação de moléculas de água ou solvente fisicamente adsorvidas ou coordenadas na sua superfície. O perfil termogravimétrico da quitosana (Figura 41) também mostra um segundo estágio de perda de massa de 51% a 321 °C relacionado à decomposição do biopolímero. O ligante L1 (Figura 41) apresentou outra perda de massa de 70% que ocorreu em dois estágios, um a 300 °C e outro a 425 °C, ambos relacionados à sua decomposição térmica. O perfil do Q-L1 (Figura 41) também mostrou uma perda de massa de aproximadamente 70% que ocorreu em dois estágios, a 265 °C e 323 °C.

Este resultado sugere uma melhora na estabilidade térmica da quitosana modificada (Q-L1) em relação à quitosana pura. Essa estabilidade é atribuída à presença de grupos iminas (C=N) e anéis aromáticos fenólicos, resultando em uma estrutura mais rígida (JUSTI et al., 2004) (ALHWAIGE; ISHIDA; QUTUBUDDIN, 2019). A reticulação com glutaraldeído pode reduzir a solubilidade da quitosana em solventes aquosos em uma ampla faixa de pH e aumentar a resistência à degradação química ou degradação biológica de longo prazo (Hsien & Rorrer, 1995; Ngah et al., 2002; Sargin & Arslan, 2016; Varma, Deshpande, & Kennedy, 2004). Apesar

de aumentar a resistência da quitosana em meios ácidos e básicos (reduzindo sua solubilidade), a reticulação da quitosana geralmente reduz sua capacidade de adsorção por dois motivos: reduzindo a flexibilidade da cadeia polimérica dando rigidez à estrutura e reduzindo a capacidade da quitosana para complexar livremente com metais e, principalmente, porque a disponibilidade de sítios amino é reduzida através de sua reação com o agente de reticulação (Nghah et al., 2002; Varma et al., 2004).

Figura 42 – Análise termogravimétrica para Q, L₁ e Q-L₁.

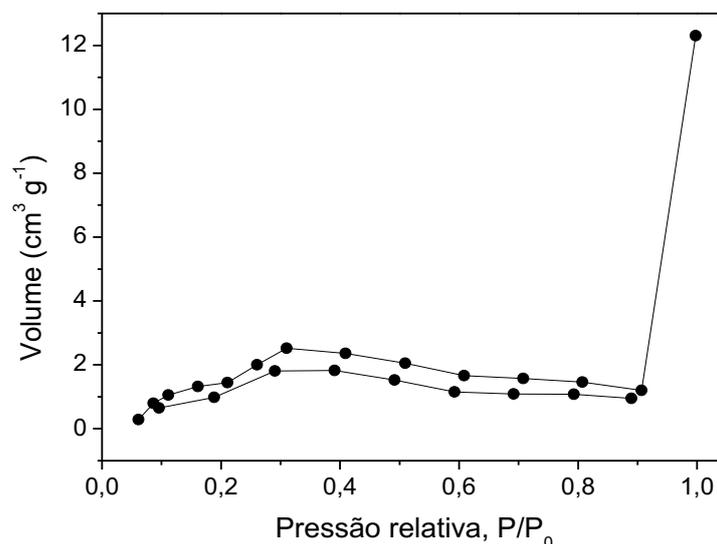


Fonte: o autor

10.1.5 Caracterização textural

As isotermas de adsorção e dessorção de N₂ para o adsorvente Q-L₁, mostradas na Figura 42, correspondem ao tipo IV, que é típico dos adsorventes mesoporosos, de acordo com a classificação IUPAC. O *loop* de histerese fornece um ajuste razoável para o tipo H4, que mostra uma estrutura de poro semelhante a uma fenda (Burwell, 1977). A área superficial BET, o tamanho do poro e o volume dos poros do adsorvente Q-L1 foram 21,21 m² g⁻¹; 3,60 nm e 0,022 cm³ g⁻¹, respectivamente. Como a quitosana geralmente possui uma pequena área superficial (~ 3 m² g⁻¹) (Upadhyay, Sreedhar, Singh, Patel & Anitha, 2021), o valor encontrado neste estudo indica que as modificações no biopolímero podem ter promovido um aumento em sua área de superfície.

Figura 43 - Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio (77 K) do adsorvente Q-L₁.

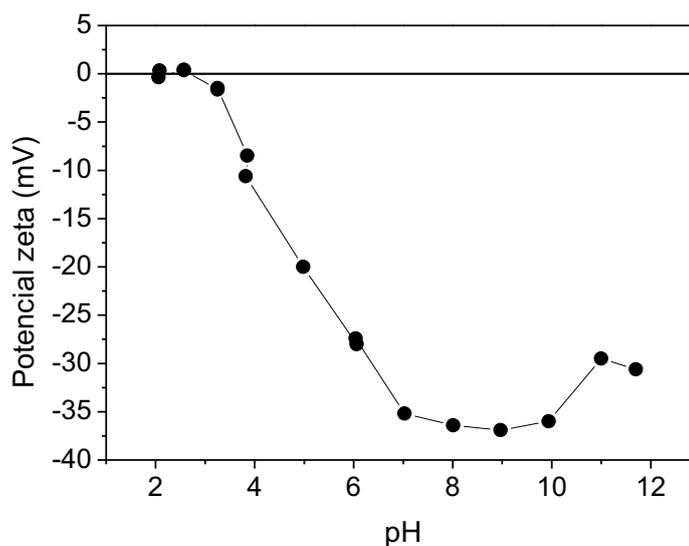


Fonte: o autor

10.1.6 Potencial zeta em função do pH

A curva de titulação do potencial zeta obtida para Q-L₁ (Figura 43) fornece informações sobre a natureza da carga na superfície desse adsorvente quando adicionado em meio aquoso. O pH_{pzc} da quitosana modificada (Q-L₁) ocorreu em pH 2,5 (Figura 43) e, portanto, em todas as condições experimentais de pH aplicadas neste estudo (pH 9,0 e 10,0), a superfície sólida estava carregada negativamente, devido à desprotonação dos grupos fenólicos presentes na estrutura do ligante L₁. A adsorção de cátions é, portanto, favorecida em pH > pH_{pzc}. Por outro lado, em pH abaixo de pH_{pzc}, a protonação das aminas terciárias ocorrerá na estrutura do ligante L₁ e das aminas primárias na estrutura quitosana, tornando a superfície adsorvente carregada positivamente e dificultando a adsorção de íons metálicos (Igberase & Osifo, 2015).

Figura 44 - Potencial zeta em função do pH para o Q-L₁ disperso em água destilada. [Q-L₁] = 0,1 mg ml⁻¹.

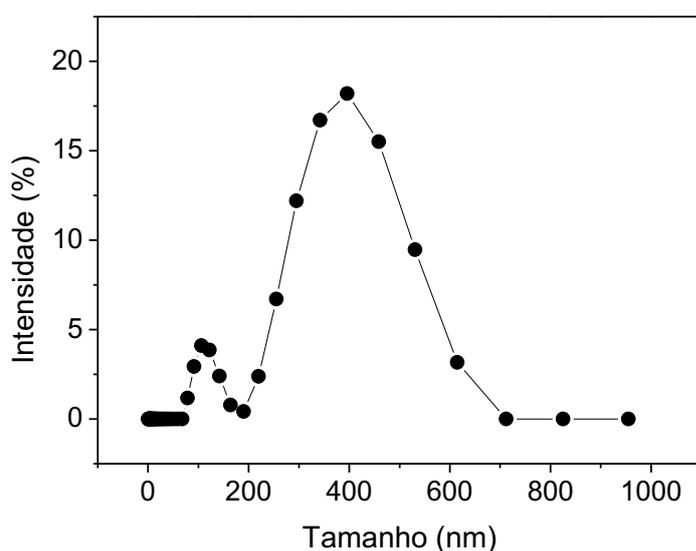


Fonte: o autor

10.1.7 Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A distribuição de tamanhos de partículas obtida para a quitosana modificada é mostrada na Figura 44. As partículas de quitosana modificada têm duas distribuições de tamanho, ambas centradas na faixa característica de partículas micrométricas, ou seja, 100 nm - 100 μ m (Vert et al., 2012). Um pequeno número de partículas (15,6%) na faixa de 50 a 190 nm com pico máximo em 105 nm e a maioria das partículas (84,4%) entre 220 e 715 nm com pico máximo em 400 nm (Figura 44). O tamanho das partículas depende do grau de substituição e do grau de desacetilação da quitosana (Skorik, Petrova, Okatova, Strelina, & Gasilova, 2016). Partículas menores podem estar relacionadas a algumas macromoléculas individuais de quitosana modificada e partículas maiores podem ser formadas pela agregação de pequenas partículas promovidas por reticulação com glutaraldeído.

Figura 45 - Distribuição de tamanhos de partículas do adsorvente Q-L₁ disperso em água destilada. [Q-L₁] = 0,1 mg ml⁻¹.



Fonte: o autor

10.2 ESTUDOS DE ADSORÇÃO DE Zn(II), Cu(II) E Ni(II) PELA QUITOSANA MODIFICADA

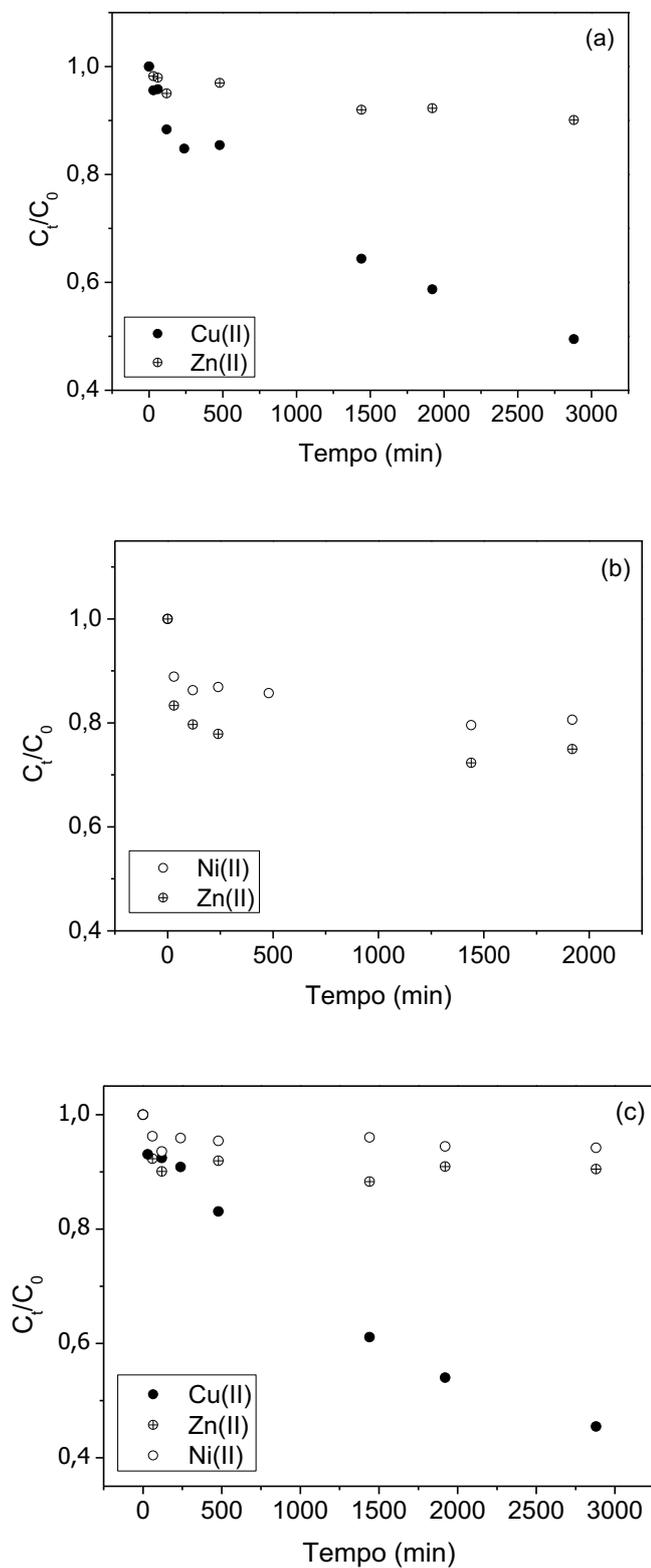
10.2.1 Complexação e cinética de adsorção pela quitosana funcionalizada

O ligante assimétrico L₁ contém duas porções de coordenação potencialmente distintas, o que facilita a geração de complexos homo e heterodinucleares de valência mista. Vários complexos com metais do bloco *d*, como Fe (III) Zn (II), Fe (III) Cu (II) e Mn (III) Mn (II), entre outros, têm sido relatados (Franzoi, Peralta, Neves, & Vieira, 2009; Neves et al., 2007; Peralta et al., 2010). Em estudos anteriores, foi estabelecido que, para todos esses casos, a acidez dos íons metálicos auxilia na desprotonação dos grupos fenol presentes no ligante. A Figura 45 mostra a cinética da adsorção de íons metálicos para sistemas multicomponentes. Pode-se observar que os íons Cu (II) são seletivamente adsorvidos tanto no sistema binário Cu(II)-Zn(II) (Figura 45a) quanto no sistema ternário Cu(II)-Zn(II)-Ni(II) ternário (Figura 45c). Isto está de acordo com outros resultados para adsorção de metal em quitosana modificada (Vold, Vårum, Guibal, & Smidsrød, 2003). Por outro lado, nenhuma seletividade significativa foi observada na ligação de íons no sistema binário Zn(II)-Ni(II) (Figura 45b). Estes resultados

correspondem à ordem do raio iônico hidratado: Cu(II) (2,95 Å) < Ni(II) (4,04 Å) < Zn(II) (4,30 Å).

É importante mencionar que não foi observada precipitação de íons metálicos em pH 9,0. Isso se deve à adição da solução tampão (NH₃/NH₄Cl), à força iônica e ao uso de soluções com baixa concentração desses íons (Krishnapriya & Kandaswamy, 2009). A adição de uma solução tampão contendo amônia promove a formação de complexos de amina com íons metálicos que previnem a formação de hidróxidos metálicos pouco solúveis em pH básico. De acordo com Zhang et al. (2018), o M(NH₃)_m²⁺ formado após a adição da solução de cloreto de amônio tem o efeito de armazenar e liberar o M²⁺ durante a adsorção de íons de cobre, há, portanto, um deslocamento contínuo do equilíbrio dinâmico entre os componentes da solução. Para os sistemas binários ou ternários (Tabela 14), observou-se efeito competitivo entre adsorção de Cu(II), Ni(II) e Zn(II), com adsorção preferencial de Cu(II).

Figura 46 - Cinética de adsorção de Zn(II), Cu(II) e Ni(II) a partir de misturas multicomponentes usando como adsorvente o Q-L1: (a) Zn-Cu; (b) Zn-Ni; e (c) Zn-Cu-Ni. $[M(II)]_{\text{total}} = 1,5 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{pH} = 9,0$; $[\text{Q-L1}] = 1 \text{ g L}^{-1}$; $T = 25,0 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$.



Fonte: o autor

Tabela 14. Capacidades de adsorção experimental do Q-L₁ para Cu (II), Ni(II) e Zn(II) obtidas a partir dos estudos cinéticos com sistemas multicomponentes. [M(II)]= 1.5 mmol L⁻¹; [Q-L₁]= 1 g L⁻¹; pH= 9.0.

Razão molar Cu:Ni:Zn	q _e (mmol g _{Q-L1} ⁻¹)			
	Cu(II)	Ni(II)	Zn(II)	Total*
1:0:1	0,398	-	0,072	0,470
0:1:1	-	0,149	0,196	0,345
1:1:1	0,278	0,027	0,053	0,358

*q_{e,Total} é a quantidade total de íons metálicos adsorvidos por unidade de massa do Q-L₁, onde q_{e,Total}= q_{e,Cu} + q_{e,Zn} + q_{e,Ni}.

Neste estudo, modelos cinéticos não lineares foram aplicados aos dados de adsorção experimental para investigar a etapa que limita a velocidade do processo (Nascimento Júnior, Silva, & Vieira, 2019). Os modelos de pseudo primeira ordem (PPO – Equação 11), pseudo segunda ordem (PSO – Equação 12) e difusão intrapartícula (DI – Equação 13) foram ajustados aos dados experimentais por análise de regressão não linear usando Software OriginPro® 8.0. O modelo de resistência de transferência de massa externa (RTME – Equações 14 e 15) foi ajustado aos dados experimentais utilizando o software MATLAB ®2013a, seguindo a abordagem de Robazza, Teleken, Galvão, Miorelli, & Stolf (2017), Inukai et al. (1998).

$$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \quad (11)$$

$$q_t = \frac{q_e^2 k_2 t}{q_e k_2 t + 1} \quad (12)$$

$$q_t = k_{ID} t^{1/2} + C \quad (13)$$

$$\frac{dC_t}{dt} = -k_{MT}(C_t - C_p) \quad (14)$$

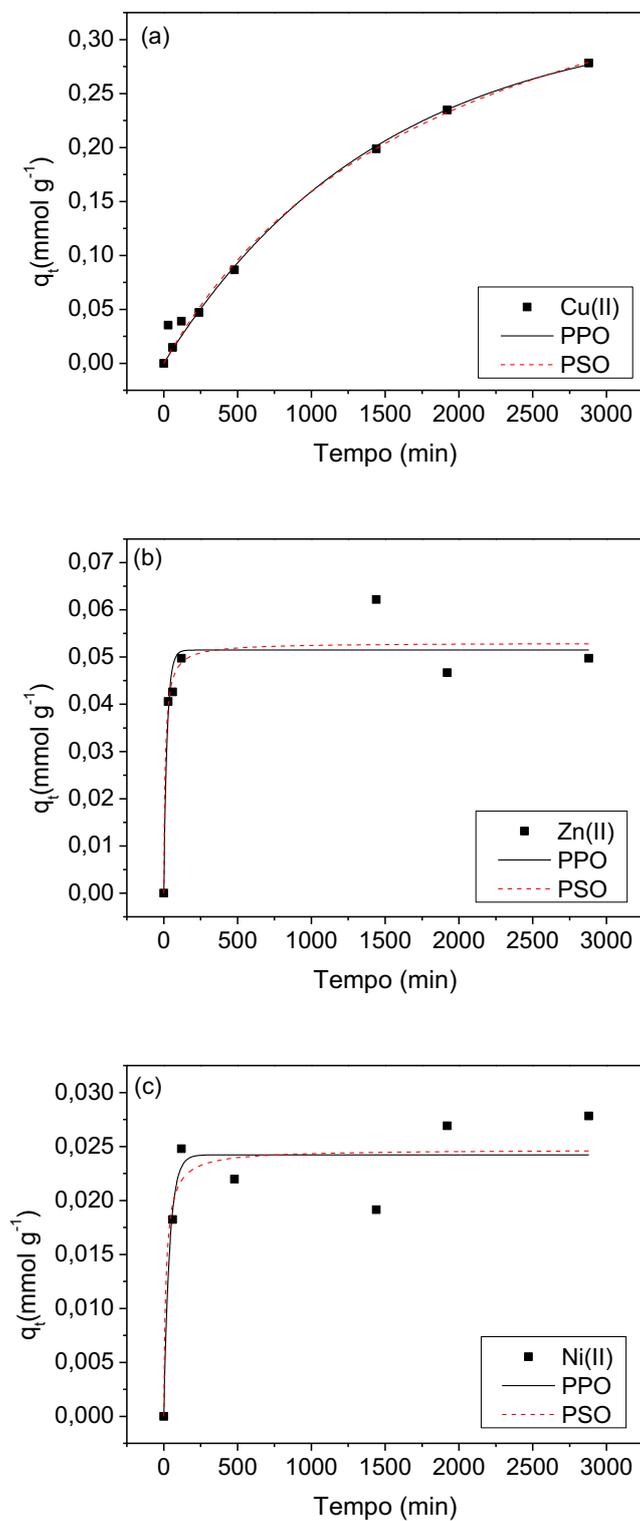
$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{k_{MT}V}{Wq_m k_L} (1 + k_L C_p)^2 (C_t - C_p) \quad (15)$$

onde k₁ (min⁻¹) e k₂ (g_{Q-L1} mmol⁻¹ min⁻¹) são as constantes da taxa de adsorção dos modelos PPO e PSO, respectivamente; k_{ID} (mmol g_{Q-L1}⁻¹ min^{-1/2}) é a constante de taxa do modelo de DI; k_{MT} (min⁻¹) é a constante de taxa de transferência de massa externa; q_t (mmol g_{Q-L1}⁻¹) é a quantidade de íon metálico adsorvido no tempo t (min); q_e (mmol g_{Q-L1}⁻¹) denota a quantidade

de íon metálico adsorvido em equilíbrio; C ($\text{mmol g}_{\text{Q-L1}}^{-1}$) é uma constante do modelo de DI; C_t (mmol L^{-1}) é a concentração do íon metálico no tempo t ; C_p (mmol L^{-1}) é a concentração do íon metálico na camada limite em torno da partícula adsorvente; k_L (L mmol^{-1}) é a constante de afinidade de Langmuir; e q_m ($\text{mmol g}_{\text{Q-L1}}^{-1}$) é a capacidade máxima de adsorção do adsorvente.

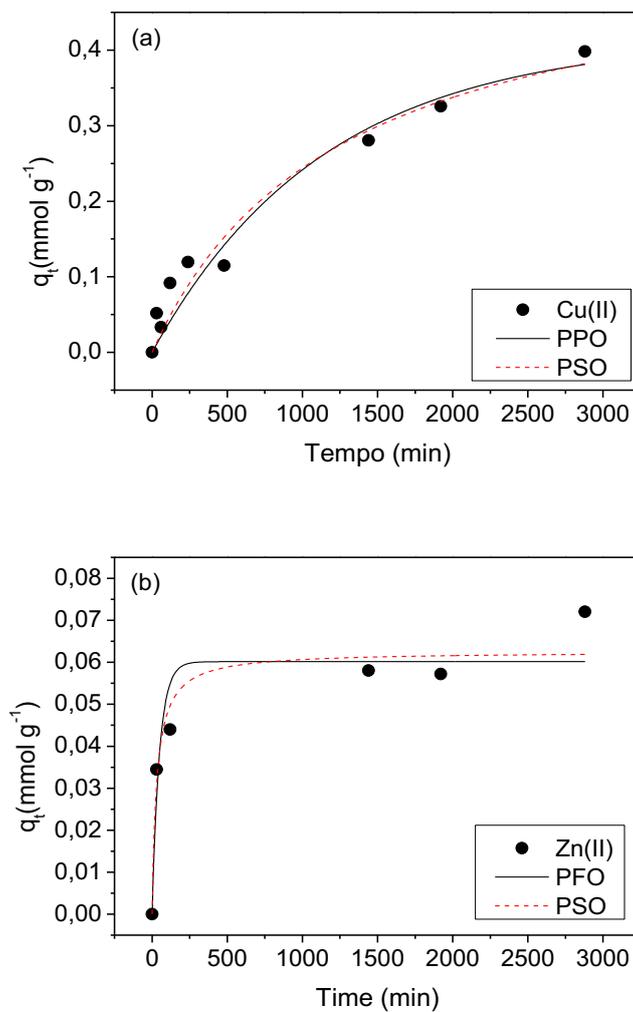
O ajuste dos modelos de PPO e PSO aos dados experimentais sobre a adsorção de íons metálicos pelo adsorvente Q-L₁ nos sistemas binário (Cu-Zn e Zn-Ni) e ternário (Cu-Ni-Zn) pode ser visto nas Figuras 46-48. Os parâmetros cinéticos obtidos para todos os modelos são mostrados na Tabela 15.

Figura 47 - Ajuste dos modelos de pseudo primeira ordem e pseudossegunda ordem (PPO e PSO, respectivamente) aos dados experimentais para adsorção de Cu (a), Zn (b) e Ni (c) pelo adsorvente Q-L₁ no sistema ternário (Cu-Ni-Zn).



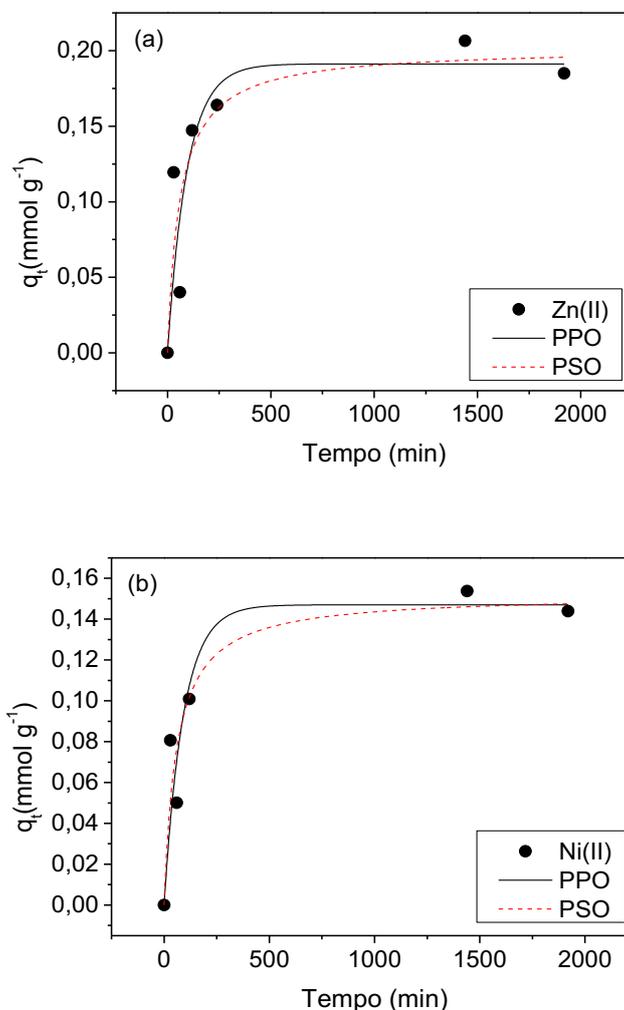
Fonte: o autor

Figura 48 - Ajuste dos modelos de pseudo primeira ordem e pseudo segunda ordem (PFO e PSO, respectivamente) aos dados experimentais para adsorção de Cu (a) e Zn (b) pelo adsorvente Q-L₁ no sistema binário (Cu-Zn).



Fonte: o autor

Figura 49 - Ajuste do modelo de pseudo primeira e pseudo segunda ordem (PFO e PSO, respectivamente) aos dados experimentais de adsorção de Zn (a) e Ni (b) pelo adsorvente Q-L₁ no sistema binário (Zn-Ni).



Fonte: o autor

Os modelos DI e RTME não descreveram adequadamente os dados experimentais conforme ilustrado na Tabela 15 pelos baixos valores de R^2_α . Tal resultado indica que os fenômenos de transferência de massa não são o principal fator limitante no processo de adsorção de níquel e zinco. O modelo RTME apresentou boa concordância com os dados experimentais apenas no caso dos perfis cinéticos de cobre, indicando que a etapa limitante da velocidade é a difusão para o filme líquido próximo às partículas do biosorvente.

Tabela 15. Parâmetros obtidos e estimados para o ajuste dos modelos cinéticos aos dados experimentais de adsorção de Cu(II), Ni(II) e Zn(II) utilizando Q-L₁.

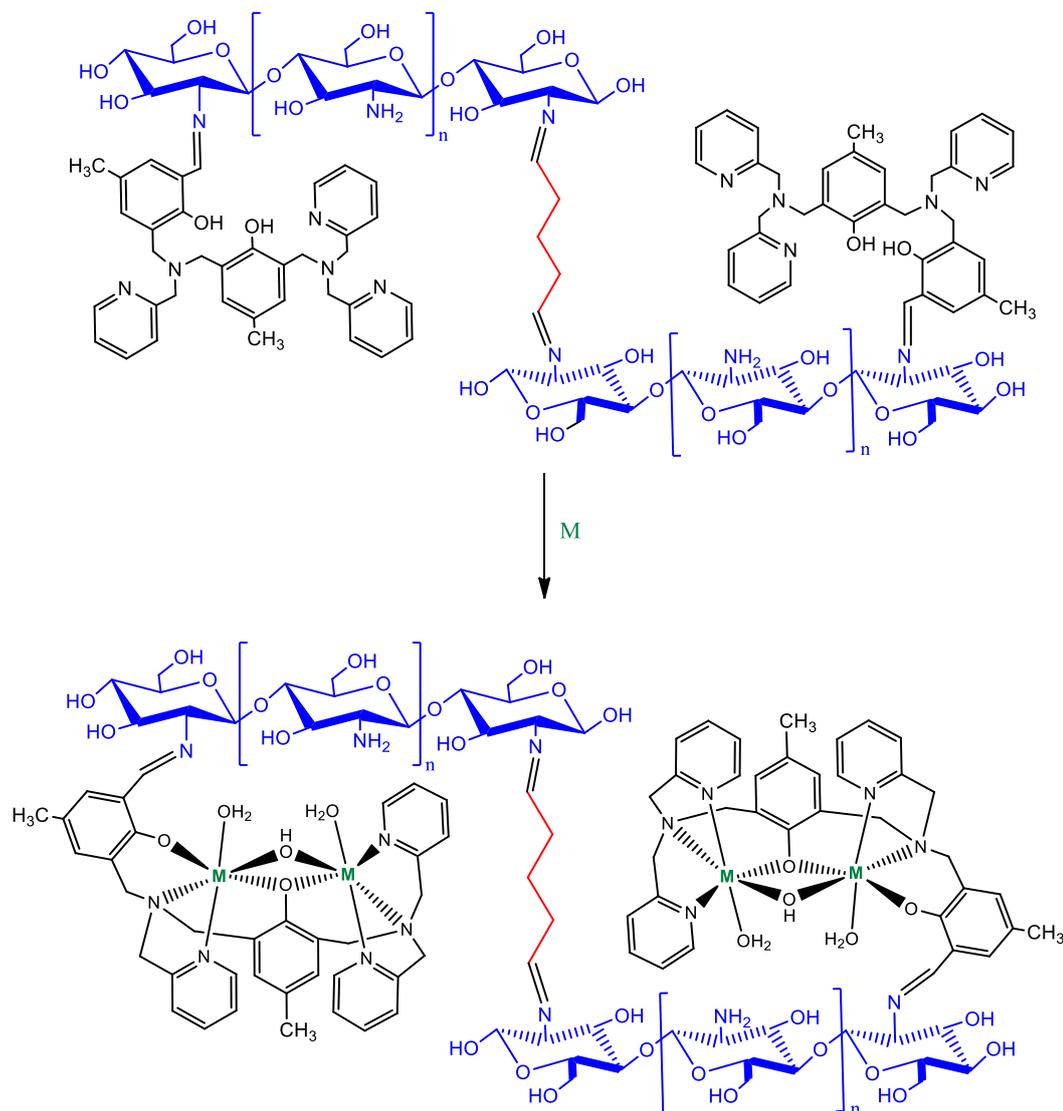
Modelo	Parâmetros	Cobre		Níquel		Zinco		
		Cu-Zn	Cu-Ni-Zn	Ni-Zn	Cu-Ni-Zn	Cu-Zn	Ni-Zn	Cu-Ni-Zn
	$q_{e,exp}$ (mmol/g)	0,398	0,278	0,149	0,027	0,072	0,196	0,053
	q_e (mmol/g)	0,414	0,322	0,147	0,024	0,060	0,191	0,051
PPO	k_1 (min ⁻¹)	$8,74 \times 10^{-4}$	$6,82 \times 10^{-4}$	0,011	0,025	0,020	0,010	0,044
	R^2_α	0,9467	0,9865	0,8453	0,8786	0,8733	0,7424	0,9078
	q_e (mmol/g)	0,547	0,467	0,152	0,025	0,063	0,202	0,053
PSO	k_2 (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)	$1,47 \times 10^{-3}$	$1,10 \times 10^{-3}$	0,111	2,570	0,513	0,082	1,820
	R^2_α	0,9551	0,9871	0,8781	0,8693	0,9298	0,7654	0,9242
RTME	k_{TM} (min ⁻¹)	$4,56 \times 10^{-4}$	$4,22 \times 10^{-4}$	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	R^2_α	0,9349	0,9823					

* R^2_α = coeficiente de determinação ajustado.

**n.a. = não aplicável se $R^2_\alpha < 0,70$.

Pode-se observar também na Tabela 15 que as constantes cinéticas de pseudo segunda ordem para sistemas binários ou ternários diminuem na ordem Cu(II) \gg Ni(II) \sim Zn(II). É consenso que a seletividade adsortiva aumenta com a redução do raio iônico hidratado para cátions de mesma valência (Costa, Silva, & Vieira, 2018). Além disso, embora o número de membros do anel quelato favoreça a coordenação com metais maiores (Figura 49), a distorção Jahn-Teller do íon cobre aumenta as constantes de equilíbrio para este metal (Justi, Fávere, Laranjeira, Neves, & Peralta, 2005). Por outro lado, a quelação de metais também pode ocorrer por meio de grupos hidroxila e amina presentes na superfície da quitosana modificada (Brião, Andrade, Silva, & Vieira, 2020; Hebeish et al., 2014).

Figura 50 - Possíveis interações metal - ligante em Q-L₁. M = Cu(II), Ni(II) e Zn(II).



Fonte: o autor

A cinética de adsorção de cátions na quitosana funcionalizada é frequentemente descrita de acordo com o modelo de pseudo segunda ordem (ABDELRAHMAN; HEGAZEY, 2019; JUSTI et al., 2005; WAN NGAH; TEONG; HANAFIAH, 2011), sendo o processo controlado pela reação de adsorção na interface líquido sólido do adsorvente (Pignatello & Xing, 1996).

10.2.2 Isoterma de adsorção de Zn(II), Cu(II) e Ni(II) pela Q-L₁

As isotermas de adsorção para Cu(II), Zn(II) e Ni(II) em Q-L₁ são mostradas na Figura 50. A relação entre a quantidade de íons Cu(II) adsorvidos na superfície adsorvente e a concentração de íons Cu(II) na fase aquosa em equilíbrio mostra que a capacidade de adsorção na superfície Q-L₁ aumenta com a concentração de íons metálicos, até a saturação do adsorvente. Um dos modelos mais simples que podem ser usados para descrever a adsorção de equilíbrio é a equação de Langmuir, Equação 16 (Pignatello & Xing, 1996).

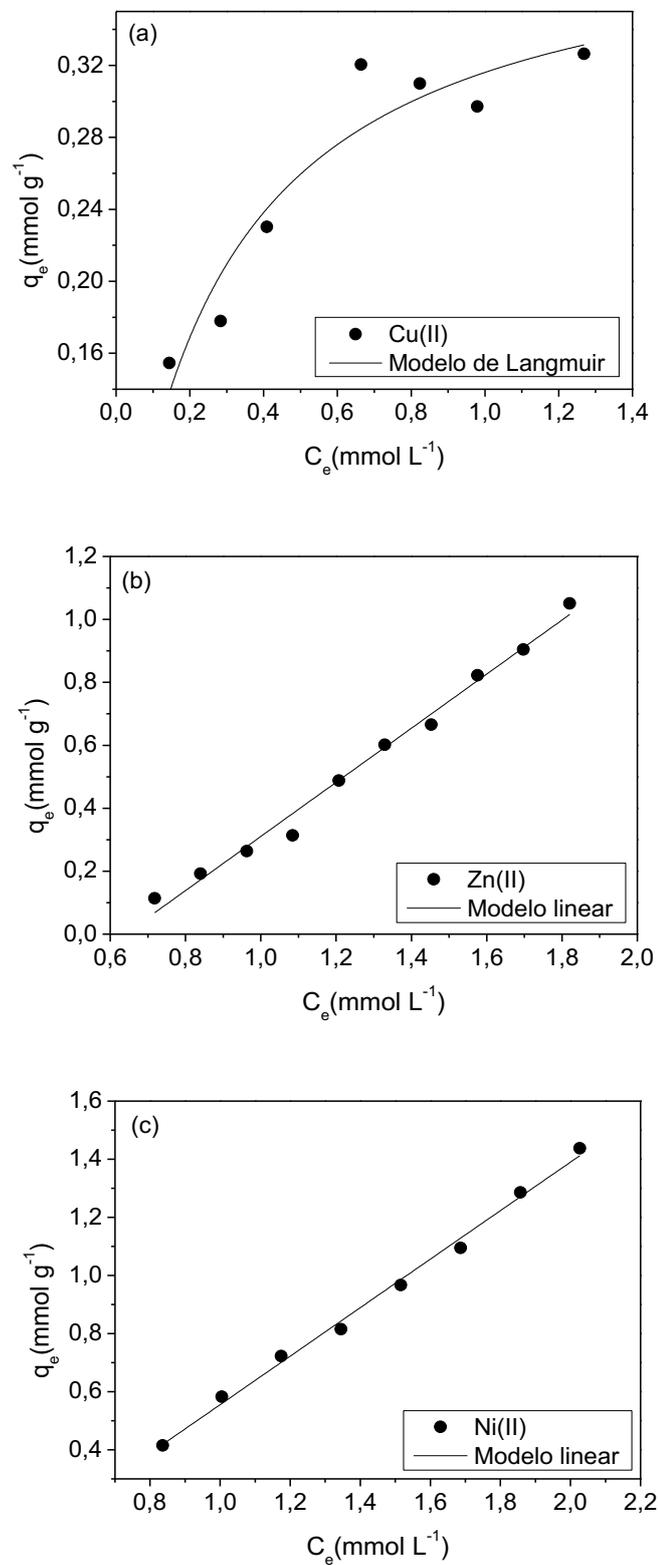
$$q_e = \frac{q_m K_L C_e}{(1 + K_L C_e)} \quad (16)$$

onde q_e (mmol g⁻¹) é a quantidade adsorvida no equilíbrio, q_m (mmol g⁻¹) é a capacidade máxima de adsorção do adsorvente, K_L (L mmol⁻¹) é a constante de adsorção de Langmuir e C_e (mmol L⁻¹) é a concentração de adsorbato em equilíbrio na solução. Os parâmetros K_L e q_m do modelo de Langmuir para a isoterma de adsorção de Cu(II) foram obtidos a partir da análise de regressão não linear usando o software OriginPro® 8.0 e são mostrados na Tabela 16. Este modelo forneceu o ajuste ideal para os dados experimentais em pH 9.0 (Figura 50a), sugerindo um processo de adsorção em monocamada (Sun, Zhang, & Tao, 2019). Por outro lado, a quantidade de íons Zn(II) e Ni(II) adsorvidos na superfície do Q-L₁ em equilíbrio com os íons da fase aquosa mostraram uma relação linear (Figura 50b e c). Nestes casos, o modelo de isoterma linear pode ser usado (Equação 17):

$$q_e = K_D C_e \quad (8)$$

onde q_e e C_e são a quantidade adsorvida (mmol g_{Q-L₁}⁻¹) e a concentração de adsorbato (mmol L⁻¹) no equilíbrio e K_D (L g_{Q-L₁}⁻¹) é a constante de distribuição (Gharaibeh, Abu-el-sha 'r, & Al-Kofahi, 1998). Os íons Zn(II) e Ni(II) apresentaram valores de K_D semelhantes (Tabela 16), indicando afinidade semelhante pelo adsorvente. Esta relação linear das isotermas de adsorção para a adsorção de Zn(II) e Ni(II) pelo adsorvente Q-L₁ sugere uma combinação de processos de fisissorção e/ou quimissorção (Arıcan, Gokcay, & Yetis, 2002).

Figura 51 - Isotermas para adsorção de Cu(II), Zn(II) e Ni(II) pelo Q-L₁ a 25 ° C. Cu(II) e Zn(II) em pH 9,0; e Ni(II) em pH 10,0.



Fonte: o autor

Tabela 16. Parâmetros de adsorção dos íons Cu(II), Zn(II) e Ni(II) pelo Q-L1 de acordo com os modelos Langmuir e linear.

Íon metálico	Langmuir		Linear	R ²
	K_L (L mmol ⁻¹)	q_m (mmol g ⁻¹)	K_D (L g ⁻¹)	
Cu(II)	3,588	0,404	1,450*	0,9113
Zn(II)	-	-	0,860	0,9875
Ni(II)	-	-	0,835	0,9942

* $K_D=K_L \cdot q_m$

Foi realizada uma comparação entre os modelos isotérmicos para a adsorção de metais pelo adsorvente sintetizado e outros adsorventes descritos na literatura, incluindo quitosana pura (Tabela 17). A maioria dos estudos foi realizada considerando sistemas monocomponente e experimentos de adsorção em pH na faixa de 5,0- ,0 para Ni(II) e 5,0-7,0 para Cu(II) e Zn(II) (Tabela 17). A capacidade de adsorção de cobre, zinco e níquel em quitosana pura está na faixa de 0,002 - 2,8 mmol g⁻¹ (Tabela 17), mas é importante ressaltar que os sistemas de adsorção multicomponente podem ser afetados por efeitos competitivos e/ou sinérgicos.

Tabela 17. Comparação dos parâmetros obtidos a partir das isotermas de adsorção de Cu(II), Zn(II) e Ni(II) no Q-L₁ com outros adsorventes.

Metal	Adsorvente	Modelo	pH	q_m (mmol g ⁻¹)	K_D (L g ⁻¹)	Ref.
Cu(II)	Quitosana comercial	Langmuir	4.7-5.4	2.75	10.532 ^a	(Wu, Tseng, & Juang, 1999)
	Quitosana em pó	-	5.0	0.712	-	(Huang, Chung, & Liou, 1996)
	Quitosana pura	Langmuir	6.0	0.290	0.140	(Saiano, Ciofalo, Olga Cacciola, & Ramirez, 2005)
	Quitosana em flocos	Langmuir	7.0	0.319	970	(Bassi, Prasher, & Simpson, 2000)
	Quitosana – casca de camarão	Langmuir	6.0	0.266	0.050 ^a	(Chu, 2002)
	Esferas de quitosana	Langmuir	6.0	0.510	74.63 ^a	(Ngah, Kamari, & Koay, 2004)
	Quitosana modificada com glutaraldeído	Langmuir	5.8	0.78	8.1	(Vasconcelos, Guibal, Laus, Vitali, & Fávère, 2009)
	Quitosana funcionalizada com HL ^b	Langmuir	5.5	1.722	2.933 ^a	(Justi, Laranjeira, Neves, Mangrich, & Fávère, 2004)
	Quitosana funcionalizada com L ^c	Langmuir	8.5	1.300	31.982 ^a	(Krishnapriya & Kandaswamy, 2009)
	Quitosana funcionalizada com AB ^d	Langmuir	5.0	2.880	10.685 ^a	(Igberase, Osifo, & Ofomaja, 2017)
	Quitosana - revestida com PVC	Langmuir	4.0-5.0	1.383	0.967 ^a	(Popuri, Vijaya, Boddu, & Abburi, 2009)
	Quitosana – fibras de algodão	Langmuir	6.5	0.285	2.593 ^a	(Zhang et al., 2008)
	Lignina	Langmuir	5.5	0.360	9.857 ^a	(Guo, Zhang, & Shan, 2008)
	Copolímeros de enxerto de celulose	Langmuir	-	0.19-0.24	1.42-2.25 ^a	(Okieimen, Sogbaike, & Ebhoaye, 2005)
Fibras lignocelulósicas (juta)	Langmuir	5.5	0.132	0.42 ^a	(Shukla & Pai, 2005)	

	Compósitos de Si/Fe e quitosana	Langmuir	-	0.72-1.15	4.99-30.29 ^a	(Abdelrahman & Hegazey, 2019)	
	Quitosana funcionalizada com L ₁	Langmuir	9.0	0.404	1.450 ^a	Este trabalho	
Zn(II)	Quitosana	Langmuir	7.0	0.018	170.3	(Karthikeyan, Anbalagan, & Andal, 2004)	
	Quitosana pura	Langmuir	6.0	0.135	0.030	(Saiano et al., 2005)	
	Quitosana em flocos	Langmuir	7.0	0.178	530	(Bassi et al., 2000)	
	Quitosana modificada com glutaraldeído	Langmuir	7.0	0.171	296	(Vitali, Laranjeira, Gonçalves, & Fávere, 2008)	
	Quitosana reticulada com complexo de metal	Langmuir	5.0	0.231	3730	(Chen, Yang, Chen, Chen, & Chen, 2009)	
	Casca carbonizada de <i>Acacia nilotica</i>	Langmuir	4.0	0.492	25.613 ^a	(Telkapalliwar & Shivankar, 2018)	
	Fibras lignocelulósicas (juta)	Langmuir	5.9	0.122	0.173 ^a	(Shukla & Pai, 2005)	
	Quitosana funcionalizada com AB ^d	Langmuir	6.0	1.760	1.514 ^a	(Igberase et al., 2017)	
	Lignina	Langmuir	5.5	0.173	2.301 ^a	(Guo et al., 2008)	
	Quitosana funcionalizada com L ₁	Linear	9.0	-	0.860	Este trabalho	
Ni(II)	Quitosana	Langmuir	5.0	2.714	67.301 ^a	(Pivarčiová, Rosskopfová, Galamboš, & Rajec, 2014)	
	Quitosana pura	Langmuir	6.0	0.103	0.030	(Saiano et al., 2005)	
	Quitosana – casca de camarão	-	9.0	0.0016	-	(Pradhan, Shukla, & Dorris, 2005)	
	Quitosana reticulada com complexo de metal	Langmuir	5.0	0.645	1130	(Chen et al., 2009)	
	Quitosana funcionalizada com HL ^b	Langmuir	3.0	0.164	7.296 ^a	(Justi, Fávere, Laranjeira, Neves, & Peralta, 2005)	
	Quitosana funcionalizada com L ^c	Langmuir	8.5	0.756	4.133 ^a	(Krishnapriya & Kandaswamy, 2009)	
	Quitosana - revestida com PVC	Langmuir	4.0-5.0	2.053	4.217 ^a	(Popuri et al., 2009)	
	Fibras lignocelulósicas (juta)	Langmuir	6.6	0.095	0.52 ^a	(Shukla & Pai, 2005)	
	Quitosana funcionalizada com AB ^d	Langmuir	7.0	2.800	3.724 ^a	(Igberase et al., 2017)	
	Quitosana – fibras de algodão	Langmuir	6.5	0.145	0.214 ^a	(Zhang et al., 2008)	
	Lignina	Langmuir	5.5	0.102	1.503 ^a	(Guo et al., 2008)	
	Compósitos de Si/Fe e quitosana	Langmuir	-	0.80-1.31	5.30-27.98 ^a	(Abdelrahman & Hegazey, 2019)	
		Quitosana funcionalizada com L ₁	Linear	10.0	-	0.835	Este trabalho

q_m (mg g⁻¹) – capacidade máxima de adsorção do adsorvente

K_D (L g⁻¹) – constante de distribuição

^a $K_D = K_L \cdot q_m$

^b HL - 2 [-bis-(piridilmetil)aminometil]4-metil-6- formil-fenol

^c L - 6,6'-piperazina-1,4-diildimetilenobis(4-metil-2-formil)fenol

^d AB - Ácido 4-aminobenzoico

No caso dos íons Cu(II), o modelo de Langmuir foi usado em todos os casos. O valor q_m para Q-L₁ não é o mais alto na Tabela 17, mas é maior do que aqueles relatados para muitos adsorventes baseados em celulose, lignocelulose, lignina e fibra de algodão revestida com quitosana. Em relação à quitosana funcionalizada, especialmente com HL (2 [-bis-(piridilmetil)aminometil]4-metil-6- formil-fenol) (Justi et al., 2005), o valor de q_m para a adsorção de íons

de Cu(II) pelo Q-L₁ foi menor. Isso pode ser devido ao maior efeito estérico produzido pela planaridade dos grupos fenol e piridina do ligante empregado neste estudo (Figura 49), limitando o número de moléculas que podem ser ancoradas na quitosana. Também pode estar associado ao fato de que as constantes de formação, entre os íons metálicos e o ligante, são menores quando a complexação do ligante envolve um segundo íon metálico, e um complexo binuclear é formado. Além disso, como o grupo imina foi mantido, houve diminuição dos sítios de coordenação do material em relação ao HL.

No caso da adsorção de íons Zn(II) e Ni(II) por diferentes adsorventes, o modelo de Langmuir também predomina (Tabela 17) enquanto os resultados de Q-L₁ seguiram o modelo linear para esses metais. De acordo com as isotermas, q pode atingir valores próximos a 1,0 e 1,4 mmol g⁻¹ para Zn (II) e Ni(II), respectivamente. Esses valores são superiores aos relatados para a maioria dos adsorventes citados.

11 CONCLUSÕES

Tanto os pró-ligantes como os novos ligantes contendo o grupo naftaleno e o ligante L₁ foram caracterizados por IV, RMN ¹H e CHN e auferidos bons rendimentos com grau de pureza adequados para a obtenção de compostos de coordenação descritos neste trabalho.

A segunda esfera de coordenação foi observada nos estudos cinéticos de hidrólise do substrato modelo 2,4-bdnpp. Os complexos **2** e **3** contendo uma cadeia lateral com maior número de carbonos se mostraram mais efetivos na hidrólise do substrato. Em contra partida, o complexo **1** foi o mais ativo nos testes com DNA comparados aos dois anteriores. Quando comparados ao complexo Fe^{III}Zn^{II}-L₁ o complexo **1** se mostrou menos efetivo na clivagem hidrolítica do substrato. Os complexos **2** e **3** mostram valores de *K_m* significativamente maiores o que sugere que os grupos amino dos complexos exercem efeitos de segunda esfera de coordenação.

A modificação química do biopolímero quitosana com o agente quelante L₁ originou um novo material adequado para a adsorção dos íons metálicos Zn (II), Cu (II) e Ni (II). Esta modificação química da quitosana, seguida de reticulação com glutaraldeído, produziu uma rede tridimensional com maior resistência em soluções ácidas e básicas e estabilidade térmica. O p*H*_{pcz} do sólido é 2,5 e, portanto, Q-L₁ é um adsorvente potencialmente útil para a remoção de espécies catiônicas dissolvidas em água em uma grande faixa de p*H* (p*H* > 2,5). O mecanismo indicado pela cinética de adsorção foi aquele associado ao modelo de pseudo segunda ordem para todos os sistemas estudados, pois este proporcionou a melhor correlação com os dados experimentais. Os modelos de isoterma de adsorção que apresentaram melhor correlação com os dados experimentais foram o modelo de Langmuir para os íons Cu (II) e o modelo linear para os íons Zn (II) e Ni (II). Em soluções aquosas binárias ou ternárias, Cu (II) é preferencialmente adsorvido em Q-L₁ na presença de íons Zn (II) ou Ni (II).

12 PERSPECTIVAS

Para uma melhor caracterização dos complexos podem ser realizados experimentos de ESI (*electrospray ionization*) que podem fornecer dados importantes com relação às espécies em solução. Experimentos de eletroquímica (voltametria cíclica e onda quadrada) também serão úteis para caracterizar as espécies ativas na hidrólise do substrato.

Como os complexos aqui sintetizados apresentaram uma forte atividade na clivagem do DNA plasmidial, outros experimentos como o experimento do efeito do pH para caracterizar a atividade dos complexos. Efeito da força iônica para medir a magnitude das interações eletrostáticas entre os complexos e DNA plasmidial.

Por fim, nos estudos de adsorção, como o material utilizado não foi reduzido; ou seja, a ligação entre a quitosana e o ligante L_1 foi mantida na forma de imina, abre a possibilidade para estudar o comportamento do novo material na forma reduzida (amina) e medir em que extensão essas mudanças afeta a adsorção dos íons $Zn(II)$, $Ni(II)$ e $Cu(II)$.

REFERÊNCIAS

- ABDELRAHMAN, E. A.; HEGAZEY, R. M. Exploitation of Egyptian insecticide cans in the fabrication of Si/Fe nanostructures and their chitosan polymer composites for the removal of Ni(II), Cu(II), and Zn(II) ions from aqueous solutions. **Composites Part B: Engineering**, v. 166, n. December 2018, p. 382–400, 2019.
- ALHWAIGE, A. A.; ISHIDA, H.; QUTUBUDDIN, S. Poly(benzoxazine-f-chitosan) films: The role of aldehyde neighboring groups on chemical interaction of benzoxazine precursors with chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 209, p. 122–129, 2019.
- ANTONY, R.; ARUN, T.; MANICKAM, S. T. D. A review on applications of chitosan-based Schiff bases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 615–633, 2019.
- ARICAN, B.; GOKCAY, C. F.; YETIS, U. Mechanistics of nickel sorption by activated sludge. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1307–1315, 2002.
- ASLIBEKIAN, O.; MOLES, R. Environmental Risk Assessment of Metals Contaminated Soils At Silvermines Abandoned. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 25, p. 247–266, 2003.
- BAILEY, S. E. et al. A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. **Water Research**, v. 33, n. 11, p. 2469–2479, 1999.
- BANO, I. et al. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 380–383, 2017.
- BEINERT, H. Bioinorganic Chemistry : A New Field or Discipline ? Words , Meanings , and Reality. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 277, n. 41, p. 37967–37972, 2005.
- BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. v. 57, p. 19–34, 2004.
- BOSCH, S. et al. Asymmetric mono- and dinuclear GaIII and ZnII complexes as models for purple acid phosphatases. **Journal of Inorganic Biochemistry**, p. 1–13, 2015.
- BUNTON, C. A; FARBER, S. J. The Hydrolysis of Bis (2,4=dinitrophenyl) Phosphate 1. **THE JOURNAL OF Organic Chemistry**, v. 34, n. 4, 1969.
- CAMARGO, T. P. et al. Synthesis, characterization, hydrolase and catecholase activity of a dinuclear iron(III) complex: Catalytic promiscuity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 146, p. 77–88, 2015.
- CAMARGO, T. P. 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.
- CAO, Y. et al. Contamination and ecological risks of toxic metals in the Hai River, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, p. 210–218, 30 nov. 2018.
- CHATTERJEE, S.; SARKAR, S.; BHATTACHARYA, S. **Toxic metals and autophagy**. [s.l: s.n.]. v. 27
- CHEN, W.-X. et al. **Ru(II) complexes bearing guanidinium ligands as potent anticancer**

agents. [s.l.] Elsevier B.V., 2016. v. 164

CHEN, X. et al. Bisintercalator-containing dinuclear iron(III) complex: An efficient artificial nuclease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 15, p. 4139–4142, 2009.

COMBA, P. 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.

CONWAY, T. M.; JOHN, S. G. The Global Biogeochemical Cycles isotopes in the North Atlantic Ocean. **Global Biogeochemical Cycles RESEARCH**, p. 1111–1128, 2014.

COTTON, F. A.; HAZEN, EDWARD E., J.; LEGG, M. J. Staphylococcal nuclease: proposed mechanism of action based on structure of enzyme-thymidine 3',5'-bisphosphate-calcium ion complex at 1.5-Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 6, p. 2551–2555, 1979.

DAUMANN, L. J. et al. Asymmetric zinc(II) complexes as functional and structural models for phosphoesterases. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, v. 42, p. 9574–9584, 2013.

DE SOUZA, B. et al. Second-Coordination-Sphere Effects Increase the Catalytic Efficiency of an Extended Model for Fe. **Inorg. Chem.**, v. 52, p. 3594–3596, 2013.

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

FUNHOFF, E. G. et al. Substrate positioning by His92 is important in catalysis by purple acid phosphatase. **FEBS Journal**, v. 272, n. 12, p. 2968–2977, 2005.

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. 2002.

GAHAN, L. R. et al. Phosphate Ester Hydrolysis: Metal Complexes As Purple Acid Phosphatase and Phosphotriesterase Analogues. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2009, n. 19, p. 2745–2758, 1 jul. 2009.

GAVRILOVA, A. L.; BOSNICH, B. Principles of Mononucleating and Binucleating Ligand Design. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 2, p. 349–383, 2004.

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.

GILLES, D. G.; LOEHR, R. C. Waste Generation and Minimization in Semiconductor Industry. **Journal of Environmental Engineering**, v. 120, n. 1, p. 72–86, 1 jan. 1994.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents : a review. v. 38, n. August 2003, p. 43–74, 2004.

GYANANATH, G.; BALHAL, D. K.; SCIENCES, L. REMOVAL OF LEAD (II) FROM

AQUEOUS SOLUTIONS BY ADSORPTION ONTO CHITOSAN BEADS. v. 46, n. II, p. 121–124, 2012.

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

HOARAU, M. et al. Coordination complexes and biomolecules: A wise wedding for catalysis upgrade. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 308, p. 445–459, 2015.

HOOLEY, R. J. Biomimetic catalysis: Taking on the turnover challenge. **Nature Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 202–204, 2016.

IGBERASE, E.; OSIFO, P. Equilibrium, kinetic, thermodynamic and desorption studies of cadmium and lead by polyaniline grafted cross-linked chitosan beads from aqueous solution. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 26, p. 340–347, 2015.

IGBERASE, E.; OSIFO, P.; OFOMAJA, A. The Adsorption of Pb, Zn, Cu, Ni, and Cd by Modified Ligand in a Single Component Aqueous Solution: Equilibrium, Kinetic, Thermodynamic, and Desorption Studies. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2017, 2017.

INUKAI, Y. et al. Selective separation of germanium(IV) by 2,3-dihydroxypropyl chitosan resin. **Analytica Chimica Acta**, v. 371, p. 187–193, 1998.

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.

JOTHIRAMALINGAM, R.; LO, S. L.; PHANTHI, L. A. Chitosan-type bioadditive-modified electronic industry waste sludge for heavy metal stabilization with assistance of microwave heating. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 6, p. 2557–2561, 2010.

JUSTI, K. C. et al. Chitosan functionalized with 2[-bis-(pyridylmethyl) aminomethyl]4-methyl-6-formyl-phenol: Equilibrium and kinetics of copper (II) adsorption. **Polymer**, v. 45, n. 18, p. 6285–6290, 2004.

JUSTI, K. C. et al. Kinetics and equilibrium adsorption of Cu(II), Cd(II), and Ni(II) ions by chitosan functionalized with 2[-bis-(pyridylmethyl)aminomethyl]-4-methyl-6-formylphenol. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 291, n. 2, p. 369–374, 2005.

KANMANI, P. et al. Environmental applications of chitosan and cellulosic biopolymers: A comprehensive outlook. **Bioresource Technology**, 2017.

KAPHAN, D. M. et al. Strategy for Transition Metal Catalysis. **Science**, v. 350, n. 6265, p. 1235–1238, 2015.

KARSTEN, P. et al. Synthesis, Structure, Properties, and Phosphatase-Like Activity of the First

Heterodinuclear Fe III Mn II Complex with the Unsymmetric Ligand H 2 BPBPMP as a Model for the PAP in Sweet Potato. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 18, p. 4624–4626, 2002.

KEENE, F. R.; SMITH, J. A.; COLLINS, J. G. Metal complexes as structure-selective binding agents for nucleic acids. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, n. 15–16, p. 2021–2035, 2009.

KEPP, K. P.; SQUITTI, R. Copper imbalance in Alzheimer's disease: Convergence of the chemistry and the clinic. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 397, p. 168–187, 15 out. 2019.
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.

KRAMER, R. Bioinorganic models for the catalytic cooperation of metal ions and functional groups in nuclease and peptidase enzymes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 182, p. 243–261, 1999.

LARANJEIRA, M. C. M. et al. Synthesis and Characterization of Modified Chitosan Through Immobilization of Complexing Agents. p. 203–207, 2005.

LEHNERT, N. Elucidating second coordination sphere effects in heme proteins using low-temperature magnetic circular dichroism spectroscopy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 110, p. 83–93, 2012.

LEWIS, J. C. Artificial Metalloenzymes and Metallopeptide Catalysts for Organic Synthesis. **Artificial Metalloenzymes and Metallopeptide Catalysts for Organic Synthesis**, v. 3, n. 12, p. 2954–2975, 2013.

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 center¹. **Journal of Molecular Biology**, v. 291, n. 1, p. 135–147, 1999.

MAITRA, J.; SHUKLA, V. K. Cross-linking in Hydrogels - A Review. v. 4, n. 2, p. 25–31, 2014.

MARTELL, A. E.; MOTEKAITIS, R. J. **Determination and use of stability constants**. [s.l.] VCH, 1992.

MASSOUD, S. S. et al. Dinuclear metal(II)-acetato complexes based on bicompartamental 4-chlorophenolate: syntheses, structures, magnetic properties, DNA interactions and phosphodiester hydrolysis. **Dalton Trans.**, v. 45, n. 32, p. 12933–12950, 2016.

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

MEKAPOGU, M. et al. A study on zinc speciation of Tungabhadra River sediments, Kurnool, south India: A tool in metal pollution monitoring. **International Journal of Sediment Research**, v. 33, n. 4, p. 510–517, 2018.

MISHRA, M. et al. Synthesis, structural investigation, DNA and protein binding study of some 3d-metal complexes with N,N'-bis(phenyl-pyridin-2-yl-methylene)-thiophene-2-carboxylic acid hydrazide. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 132, p. 452–464, 2014.

MITIĆ, N. et al. Catalytic mechanisms of metallohydrolases containing two metal ions. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 97, n. C, p. 49–81, 2014.

MITIĆ, N. et al. The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 8, p. 3338–3363, 2006.

MOLINA, R. et al. Visualizing phosphodiester-bond hydrolysis by an endonuclease. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 22, n. 1, p. 65–72, 2015.

MONTEIRO, O. A. C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, n. 2–3, p. 119–128, 1999.

MORROW, B. H.; PAYNE, G. F.; SHEN, J. pH-responsive self-assembly of polysaccharide through a rugged energy landscape. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 40, p. 13024–13030, 2015.

MOTEKAITIS, R. J.; MARTELL, A. E. A new program for rigorous calculation of equilibrium parameters of complex multicomponent systems. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 82, p. 299–308, 1985.

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

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008.

NGAH, W. S. W., ENDUD, C. S., MAYANAR, R. Removal of copper(II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads. **Reactive and Functional Polymers**, 50(2), 181–190, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. Fourth Edition. [s.l.] W. H. Freeman; 4th edition (April 23, 2004), 2004.

NEVES, A. et al. An unprecedented Fe(III)(μ -OH)Zn(II) complex that mimics the structural and functional properties of purple acid phosphatases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 24, p. 7486–7487, 2007.

PERALTA, R. A. et al. Electronic structure and spectro-structural correlations of Fe(III)Zn(II) biomimetics for purple acid phosphatases: Relevance to DNA cleavage and cytotoxic activity. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 24, p. 11421–11438, 2010.

PIOVEZAN, C. et al. Heterodinuclear FeIII ZnII-bioinspired complex supported on 3-aminopropyl silica. Efficient hydrolysis of phosphate diester bonds. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2580–2582, 2010.

PORDEA, A. Metal-binding promiscuity in artificial metalloenzyme design. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 25, p. 124–132, 2015.

REY, N. A. et al. Catalytic promiscuity in biomimetic systems: Catecholase-like activity, phosphatase-like activity, and hydrolytic DNA cleavage promoted by a new dicopper(II) hydroxo-bridged complex. **Inorganic Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 348–350, 2007.

SCHENK, G. et al. A Purple Acid Phosphatase from Sweet Potato Contains an Antiferromagnetically Coupled Binuclear Fe-Mn Center. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 22, p. 19084–19088, 2001.

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 of the United States of America**, v. 102, n. 2, p. 273–278, 2005.

SCHENK, G. et al. Crystal structures of a purple acid phosphatase, representing different steps of this enzyme's catalytic cycle. **BMC structural biology**, v. 8, n. 1, p. 6, 2008.

SCHENK, G. et al. Purple acid phosphatase: A journey into the function and mechanism of a colorful enzyme. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 2, p. 473–482, 2013.

SHENG, X. et al. Synthesis, DNA-binding, cleavage, and cytotoxic activity of new 1,7-dioxo-4,10-diazacyclododecane artificial receptors containing bisguanidinoethyl or diaminoethyl double side arms. **Chemistry - A European Journal**, v. 13, n. 34, p. 9703–9712, 2007.

SILVA, G. A. D. 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.

SILVERSTEIN RM, BASSLER GC, M. T. **Spectrometric identification of organic compounds**. 5. ed. New York: Wiley, 1991.

SLETTEN, E. Metal binding to nucleic acids - A journey from the beginning. **Inorganica Chimica Acta**, v. 452, p. 273–278, 2016.

SUN, P.; ZHANG, L.; TAO, S. Preparation of hybrid chitosan membranes by selective laser sintering for adsorption and catalysis. **Materials & Design**, p. 107780, 2019.

SUN, Q. et al. Postsynthetically Modified Covalent Organic Frameworks for Efficient and Effective Mercury Removal. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, n. 7, p. 2786–2793, 2017a.

SUN, S.; WANG, A. Adsorption properties of N-succinyl-chitosan and cross-linked N-succinyl-chitosan resin with Pb(II) as template ions. **Separation and Purification Technology**, v. 51, n. 3, p. 409–415, 2006.

SUN, Z. et al. Toward Sustainability for Recovery of Critical Metals from Electronic Waste:

The Hydrochemistry Processes. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 1, p. 21–40, 2017b.

SWENSON, H.; STADIE, N. P. Langmuir's Theory of Adsorption: a Centennial Review. **Langmuir**, 2019.

TEPANOSYAN, G. et al. Heavy metals pollution levels and children health risk assessment of Yerevan kindergartens soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, n. August 2016, p. 257–265, 2017.

TIAGO PACHECO DE CAMARGO. **Desenvolvimento de complexos heterobinucleares de FeIII-ZnII a partir de ligantes contendo o grupo pireno para estudo de interação com ésteres de fosfatos e ácidos nucleicos**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

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.

TJIOE, L. et al. Synthesis and phosphate ester cleavage properties of copper(II) complexes of guanidinium-bridged bis(1,4,7-triazacyclononane) ligands. **Polyhedron**, v. 120, p. 11–17, 2016.

TURHANEN, P. A.; VEPSÄLÄINEN, J. J.; PERÄNIEMI, S. Advanced material and approach for metal ions removal from aqueous solutions. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8992, 2015.

VAKILI, M. et al. Regeneration of chitosan-based adsorbents used in heavy metal adsorption: A review. **Separation and Purification Technology**, v. 224, n. May, p. 373–387, 2019.

VALDEZ, C. E. et al. Mysteries of Metals in Metalloenzymes. **Accounts of Chemical Research**, v. 47, n. 10, p. 3110–3117, 21 out. 2014.

WAN NGAH, W. S.; TEONG, L. C.; HANAFIAH, M. A. K. M. Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1446–1456, 2011.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids. **Nature**, v. 171, p. 737–738, 1953.

WU, W. et al. Ecological effects of soil properties and metal concentrations on the composition and diversity of microbial communities associated with land use patterns in an electronic waste recycling region. **Science of The Total Environment**, v. 601, p. 57–65, 2017.

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.

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

YANG, R. et al. A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment. **Water Research**, v. 95, p. 59–89, 2016.

YIN, Y. et al. Biomimetic catalysts designed on macromolecular scaffolds. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 11, p. 1476–1509, 2012.

YU, L. et al. Development of the aza-crown ether metal complexes as artificial hydrolase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 154, p. 89–102, 2016.

ZHANG, H.; XU, E. An evaluation of the ecological and environmental security on China's terrestrial ecosystems. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 811, 2017.

ZHANG, M. et al. Geographic distribution of cadmium and its interaction with the microbial community in the Longjiang River: risk evaluation after a shocking pollution accident. **Scientific Reports**, n. 2, p. 1–12, 2017.

ZHAO, M. et al. Insights into metalloenzyme microenvironments: biomimetic metal complexes with a functional second coordination sphere. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 21, p. 8360–75, 2013.

ZHAO, M. et al. Phosphate ester hydrolysis catalyzed by a dinuclear cobalt(II) complex equipped with intramolecular β -cyclodextrins. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 396, p. 346–352, 2015.