



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO COMPLEXO DE COBRE COM
LIGANTE FACIAL N-DOADOR COMO POSSÍVEL MODELO
BIOINSPIRADO PARA CATECOL OXIDASE E
HIDROLASES/NUCLEASES**

CAROLINA CROCETA BOMBAZAR

Florianópolis, julho de 2016

Carolina Croceta Bombazar

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO COMPLEXO DE COBRE COM
LIGANTE FACIAL N-DOADOR COMO POSSÍVEL MODELO
BIOINSPIRADO PARA CATECOL OXIDASE E
HIDROLASES/NUCLEASES**

Projeto de Estágio Supervisionado II (QMC 5512)
apresentado ao Departamento de Química da
Universidade Federal de Santa Catarina

Orientador: Ademir Neves

Florianópolis, julho de 2016

Carolina Croceta Bombazar

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO COMPLEXO DE COBRE COM
LIGANTE FACIAL N-DOADOR COMO POSSÍVEL MODELO
BIOINSPIRADO PARA CATECOL OXIDASE E
HIDROLASES/NUCLEASES**

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize

Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ademir Neves

Orientador

Prof. Dr. Bernardo de Souza

Prof. Dr. José Roberto Bertolino

Florianópolis, julho de 2016

AGRADECIMENTOS

À minha família que, apesar de todas as dificuldades, sempre esteve ao meu lado e apoiou minha decisão de ingressar no curso de Química, mesmo tão longe de casa: Nada disto seria possível sem vocês. Obrigada por todos os conselhos e por serem tão presentes na minha vida. Mãe, pai e mano, vocês são as pessoas mais guerreiras e obstinadas que eu já conheci, obrigada por me ensinarem a importância do trabalho duro.

À Gra, minha “madrinha científica”, que provavelmente não faz ideia do quão maravilhosa é: Muito obrigada por fazer parte da minha vida. Não existem palavras que descrevam o quanto você tem sido essencial. Obrigada por ser sempre tão paciente e por me ensinar tanto. Obrigada pelos puxões de orelha, que me ajudaram a amadurecer. Não existe tempo que possa me fazer esquecer de você.

Aos professores Ademir Neves e Rosely A. Peralta, muito obrigada por terem me dado a oportunidade de fazer parte de sua equipe e de aprender tanto. Serei eternamente grata por todo o tempo que ambos ofereceram para me ensinar.

A todos os amigos do LABINC, em especial Sari, Bru e André: Obrigada por me ajudarem tanto e fazerem dos meus dias mais leves e animados. À Cacau, que me acompanhou em toda a minha trajetória no LABINC e sempre foi tão solícita quando precisei de ajuda: Obrigada por toda a paciência e por todas as risadas. É incrível como o simples fato de conviver diariamente com pessoas tão inteligentes pode nos impulsionar a estudar e aprender mais.

Às minhas amigas Mônica, Rai, Thayse, Angela e Bia, que me aguentaram recusando vários convites para sair por ter que estudar ou escrever este TCC: Obrigada por não desistirem de mim, vocês são demais e parte fundamental da minha vida!

A todos que não foram mencionados por nome, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho, deixo aqui meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA..... | 13 |
| 2.1. Química Bioinorgânica..... | 13 |
| 2.2. Metaloenzimas..... | 13 |
| 2.3. Metaloenzimas de cobre..... | 15 |
| 2.4. Promiscuidade enzimática..... | 15 |
| 2.5. Nucleases..... | 16 |
| 2.6. Catecol oxidase..... | 17 |
| 2.7. A importância dos análogos sintéticos..... | 19 |
| 3. OBJETIVOS..... | 22 |
| 3.1. Objetivo geral..... | 22 |
| 3.2. Objetivos específicos..... | 22 |
| 4. METODOLOGIA..... | 23 |
| 4.1. Materiais e reagentes..... | 23 |
| 4.2. Sínteses..... | 23 |
| 4.2.1. Síntese do complexo de Cu(II) – Dicloro(1,4-diisopropil-1,4,7-triazaciclononano)Cobre(II) – [Cu(tacn ⁱ Pr ₂)Cl ₂]..... | 25 |
| 4.3. Caracterizações..... | 26 |
| 4.3.1. Espectroscopia na região do infravermelho (IV)..... | 26 |
| 4.3.2. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H)..... | 26 |
| 4.3.3. Difratometria de raios X..... | 26 |
| 4.3.4. Espectrometria de massas (ESI-MS)..... | 27 |
| 4.3.5. Condutimetria..... | 27 |
| 4.3.6. Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e do visível (UV-Vis)..... | 27 |
| 4.3.7. Eletroquímica..... | 28 |

| | |
|---|----|
| 4.3.8. Testes iniciais de reatividade | 28 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 28 |
| 5.3. Caracterização do ligante tacn¹Pr₂ | 30 |
| 5.3.1. Espectroscopia na região do infravermelho (IV) | 30 |
| 5.3.2. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) | 32 |
| 5.3.3. Espectrometria de massas | 34 |
| 5.4. Caracterização do complexo de Cu(II) | 35 |
| 5.4.1. Espectroscopia na região do infravermelho (IV) | 35 |
| 5.4.2. Difratomia de raios X | 37 |
| 5.4.3. Espectrometria de massas | 39 |
| 5.4.4. Condutimetria | 40 |
| 5.4.5. Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e do visível (UV-Vis) | 40 |
| 5.4.6. Eletroquímica | 43 |
| 5.4.7. Testes iniciais de reatividade | 45 |
| 5.4.7.1. Estudos de reatividade frente ao substrato modelo 2,4-bdnpp | 45 |
| 5.4.7.1.1. Efeito do pH na reação de hidrólise do 2,4-bdnpp..... | 46 |
| 5.4.7.1.2. Efeito da concentração do substrato na reação de hidrólise do 2,4-bdnpp..... | 48 |
| 5.4.7.1.3. Efeito da concentração do complexo na reação de hidrólise do 2,4-bdnpp..... | 50 |
| 5.4.7.2. Estudos de reatividade frente ao substrato modelo 3,5-dtbc | 53 |
| 5.4.7.2.1. Efeito do pH na reação de oxidação do 3,5-dtbc..... | 54 |
| 5.4.7.2.2. Efeito da concentração do substrato na reação de oxidação do 3,5-dtbc..... | 55 |
| 6. CONCLUSÕES | 58 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 59 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Reação de oxidação catalisada pela enzima catecol oxidase..... | 17 |
| Figura 2 - Estrutura cristalina do sítio ativo da forma oxidada da catecol oxidase. ... | 17 |
| Figura 3 - Mecanismo proposto para a reação de oxidação de <i>o</i> -difênóis promovida pela enzima catecol oxidase. | 18 |
| Figura 4 - Complexos mononucleares de cobre reportados por (a) Westrup e (b) Panda <i>et al.</i> | 20 |
| Figura 5 – Complexos mononucleares de cobre reportados por Scarpellini <i>et al.</i> | 20 |
| Figura 6 – Representação do modo de coordenação de íons metálicos ao ligante facial tacn. | 21 |
| Figura 7 - Rota sintética do ligante tacn ⁱ Pr ₂ | 24 |
| Figura 8 - Rota sintética do complexo de Cu(II) com o ligante tacn ⁱ Pr ₂ | 25 |
| Figura 9 - Espectro de IV do ligante tacn ⁱ Pr ₂ | 32 |
| Figura 10 - RMN ¹ H do ligante tacn ⁱ Pr ₂ | 34 |
| Figura 11 - Espectro de massas do ligante tacn ⁱ Pr ₂ em CH ₃ CN. | 35 |
| Figura 12 - Espectro de IV do complexo de Cu (II) | 36 |
| Figura 13 - Representação da estrutura molecular do complexo [Cu(tacn ⁱ Pr ₂)Cl ₂], com esquema de numeração dos átomos..... | 38 |
| Figura 14 - Espectro de massas experimental do complexo de Cu (II) em CH ₃ CN. . | 39 |
| Figura 15 - Espectros eletrônicos do complexo..... | 40 |
| Figura 16 - Desdobramento dos orbitais d em função do campo ligante. | 43 |
| Figura 17 - Voltamogramas cíclicos registrados para o complexo [Cu(tacn ⁱ Pr ₂)Cl ₂]. | 44 |
| Figura 18 - Voltamogramas cíclicos registrados para o complexo [Cu(tacn ⁱ Pr ₂)Cl ₂]. | 45 |
| Figura 19 - Representação esquemática da hidrólise do 2,4-bdnpp na presença de um caatalisador. | 46 |
| Figura 20 - Dependência da velocidade de reação do complexo tanc ⁱ Pr ₂ -Cu-Cl ₂ com o substrato modelo 2,4-bdnpp sobre o pH. | 47 |
| Figura 21 - Dependência da velocidade da reação de hidrólise com a concentração do substrato 2,4-bdnpp..... | 48 |
| Figura 22 - Formação do estado de transição com anel de quatro membros proposto para a reação de hidrólise de substratos modelos. | 50 |
| Figura 23 - Dependência da velocidade da reação de hidrólise do 2,4-bdnpp com a concentração do complexo tacn ⁱ Pr ₂ -Cu-Cl ₂ | 51 |
| Figura 24 - Dependência da taxa de hidrólise (<i>k</i> _{obs}) do 2,4-bdnpp com a concentração do complexo..... | 53 |
| Figura 25 - Oxidação do 3,5-dtbc na presença de O ₂ | 54 |
| Figura 26 - Dependência da velocidade de reação do complexo tanc ⁱ Pr ₂ -Cu-Cl ₂ com o substrato modelo 3,5-dtbc sobre o pH..... | 55 |
| Figura 27 - Dependência da velocidade da reação de oxidação com a concentração do substrato 2,4-bdnpp..... | 56 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Principais bandas observadas nos espectros de IV do ligante tacn ⁱ Pr ₂ e seus precursores, em número de onda (cm ⁻¹)..... | 31 |
| Tabela 2 - Deslocamentos químicos, número de hidrogênios e atribuições dos espectros de RMN ¹ H do ligante tacn ⁱ Pr ₂ e seus precursores..... | 33 |
| Tabela 3 - Principais bandas e suas respectivas atribuições em cm ⁻¹ , dos espectros no infravermelho do ligante BPM3F e seu complexo de Cu(II) | 36 |
| Tabela 4 - Dados cristalográficos obtidos para o complexo de Cu (II). | 37 |
| Tabela 5 - Principais comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação para o complexo [Cu(tacn ⁱ Pr ₂)Cl ₂]. | 38 |
| Tabela 6 – Comparação dos parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do 2,4-bdnpp pelo complexo [Cu(tacn ⁱ Pr ₂)Cl ₂] com outros complexos da literatura. | 48 |
| Tabela 7 - Correlação dos ângulos de ligação X-M-X com complexos análogos..... | 50 |
| Tabela 8 - Parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do 2,4-bdnpp pelo complexo tacn ⁱ Pr ₂ -Cu-Cl ₂ em pH 9,0, obtidos a partir de estudos de efeito da concentração do complexo na velocidade de reação..... | 51 |
| Tabela 9 - Comparação dos parâmetros cinéticos para a reação de oxidação do 3,5-dtbc pelo complexo [Cu(tacn ⁱ Pr ₂)Cl ₂] com outros complexos da literatura. | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------------------|--|
| ϵ | Coeficiente de absorvidade molar |
| ν | Estiramento (IV) |
| δ | Deformação angular |
| λ | Comprimento de onda |
| $E_{1/2}$ | Potencial de meia onda |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensageiro |
| ENH | Eletrodo normal de hidrogênio |
| 3,5-dtbc | 3,5-di- <i>terc</i> -butilcatecol |
| tacnⁱPr₂ | 1,4-diisopropil-1,4,7-triazaciclononano |
| 2,4-bdnpp | <i>Bis</i> (2,4-dinitrofenil)fosfato |
| HISMINA | [(2-imidazol-4-il)etil](1-metilimidazol-2-il)metil]amina |
| HISMIMI | [(2-imidazol-4-il)etil](1-metilimidazol-2-il)metil]imina |
| Hbpaa-CH₃ | (2-((2-hidróxi-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)amina |
| Hbpaa-H | (2-((2-hidróxibenzil)(2-piridilmetil)amina |
| <i>k</i> | Constante de velocidade |
| K_{ass} | Constante de associação |
| k_{cat} | Constante catalítica |
| K_M | Constante de Michaelis-Menten |
| pH | Potencial hidrogeniônico |

| | |
|--|---|
| pK_a | Constante de dissociação ácida em escala logarítmica |
| v₀ | Velocidade inicial |
| v_{máx} | Velocidade máxima |
| [9]aneN₃ | 1,4,7-triazaciclononano |
| [10]aneN₃ | 1,4,7-triazaciclododecano |
| [11]aneN₃ | 1,4,7-triazacicloudodecanane |
| AAZ | 6-amino-6-metilperhidro-1,4-diazepina |
| daza | 1,4-diazepan-6-amino |
| IV | Infravermelho |
| UV-Vis | Ultravioleta e visível |
| RMN ¹H | Ressonância magnética nuclear de hidrogênio |
| eg-ts₂ | 1,2-bis(p-toluenosulfonil)etilenoglicol |
| deta-ts₃ | N,N',N''-tris(p-toluenosulfonil)-dietilenotriamina |
| tacn-ts₃ | 1,4,7-tris-(p-toluenosulfonil)-1,4,7-triazaciclononano |
| tacn-ts | 1-(p-toluenosulfonil)-1,4,7-triazaciclononano |
| tacnⁱPr₂-ts | 1,4-diisopropil-7-(p-toluenosulfonil)-1,4,7-triazaciclononano |
| Et₃N | Trietilamina |
| Et₂O | Éter dietílico |
| EtOH | Etanol |
| ESI-MS | Espectrometria de massas com ionização via eletrospray |
| tacn | 1,4,7-triazaciclononano |

RESUMO

As enzimas são estruturas absolutamente necessárias para o desenvolvimento da vida. Na ausência delas, as reações ocorridas em organismos vivos (até o mais simples deles) aconteceriam em velocidades pouco significativas. Porém, apesar de sua importância, grande parte dos seus mecanismos de reação catalítica ainda são desconhecidos, não tendo sido totalmente compreendidos. Na busca pela elucidação da atividade dessas estruturas, foram feitos estudos de atividade catalítica de análogos sintéticos contendo cobre, os quais têm gerado grande interesse na identificação dos mecanismos de ação nesses sistemas. Em vista disto, neste projeto foi sintetizado um ligante N-doador, o 1,4-diisopropil-1,4,7-triazaclononano ($\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2$), tendo em mente a preparação de um complexo de Cobre (II) que possa vir a ser utilizado como nuclease sintética ou modelo sintético para a enzima catecol oxidase, sendo que o mesmo apresenta promiscuidade catalítica. O ligante foi caracterizado via espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e espectrometria de massas, obtendo-se a pureza adequada para a preparação do complexo. Após sintetizado, o complexo foi caracterizado por espectrometria de massas, eletroquímica, condutimetria, difração de raios X, espectroscopia na região do infravermelho e do ultravioleta e visível. Constatou-se a formação de um complexo mononuclear de Cobre(II) em equilíbrio com seu dímero (binuclear), o qual foi submetido a testes cinéticos frente aos substratos modelo 3,5-di-*tert*-butilcatecol (oxidação) e *bis*(2,4-dinitrofenil)fosfato (hidrólise), tendo em vista a observação de sua atividade catalítica frente a diferentes pHs e concentrações de substrato. Testes de reatividade mostraram que o complexo obtido pode ser um possível modelo funcional para as enzimas em questão.

Palavras-chave: bioinorgânica; complexo de cobre; catecolase; nuclease.

1. INTRODUÇÃO

Cada célula viva possui centenas de enzimas diferentes, que catalisam reações essenciais à manutenção da vida. Mesmo os organismos vivos mais simples possuem grande variedade destas estruturas. A principal função das enzimas é aumentar a velocidade dessas reações para tornar a vida possível, uma vez que na ausência delas as reações metabólicas não ocorreriam a velocidades significativas em condições fisiológicas.

Considerando as suas características excepcionais – dentre as quais se encontra uma alta especificidade reacional, a qual não só economiza energia celular, mas também evita a produção de subprodutos metabólicos potencialmente tóxicos – há a necessidade de entender sua atuação no sistema biológico, suas propriedades físico-químicas e seus mecanismos de reação.

O campo de estudo das enzimas encontra-se numa fase bastante propícia de desenvolvimento. Com o avanço recente de tecnologias mais sensíveis e técnicas mais especializadas, as quais permitem sondar mais profundamente as estruturas eletrônicas e cristalinas, cada vez mais metalobiomoléculas vêm sendo isoladas e purificadas. Com tais informações à disposição, têm sido realizados estudos com compostos modelo de baixa massa molecular, visando mimetizar as propriedades estruturais e/ou funcionais de enzimas.

Neste contexto, descobertas recentes de atividade catalítica de complexos metálicos, capazes de mimetizar a atividade enzimática, têm gerado grande interesse na utilização desses compostos para a elucidação de propriedades ainda desconhecidas das enzimas. Um exemplo disto é a atividade de catecolase já apresentada por complexos mono, bi e trinucleares de cobre (II).

Além de sua aplicação no estudo das propriedades de metaloenzimas, a descoberta de análogos eficientes que possam ser utilizados na química sintética (ou seja, em processos em que as enzimas não estão naturalmente envolvidas, ambos em laboratório ou em escala industrial) pode representar um grande avanço tecnológico para a humanidade, tanto no âmbito do desenvolvimento de processos químicos industriais mais eficazes e rápidos, como também na elaboração de fármacos e diagnósticos de melhor funcionalidade e especificidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Química Bioinorgânica

Com os compostos orgânicos sendo considerados os “blocos de construção” da origem da vida, acreditou-se por muito tempo que a química inorgânica, como seu nome sugere, não possuía importância ou aplicação nos sistemas orgânicos. No entanto, com a evolução das pesquisas relacionadas, foi possível observar a presença de alguns metais em processos essenciais – como o cálcio nos ossos e o ferro como constituinte da hemoglobina –, abrindo assim as portas para o estudo destes compostos nos sistemas vivos. O estudo destas espécies, porém, só pôde ser aprofundado após o desenvolvimento de técnicas espectroscópicas e analíticas sensíveis o suficiente para detectar suas baixas concentrações nos organismos vivos^[1,2].

O estudo de metais de ocorrência natural e também sua introdução nos sistemas vivos faz parte de uma área crescente da Química, que permeia por numerosas disciplinas – incluindo Química Inorgânica, Bioquímica, Biologia Molecular, Microbiologia, entre outras – chamada Química Bioinorgânica^[3].

Apenas após o ano de 1960, impulsionada pelo primeiro congresso científico na área (o *Gordon Research Conference on Metals in Biology*), a Química Bioinorgânica tornou-se uma área de pesquisa interdisciplinar, uma vez que se tornou clara a bioessencialidade dos metais. A química bioinorgânica estuda as funções e os modos de ação dessas espécies, com grande ênfase em como funcionam *in vivo*^[3,4].

Dentre as grandes conquistas desta área estão compostos metálicos que vêm sendo utilizados em tratamentos e diagnósticos de doenças. O mecanismo de ação de fármacos antitumorais compostos por platina, antiartríticos contendo ouro e radiofarmacêuticos de tecnécio são alguns exemplos de tópicos de investigação^[3].

2.2. Metaloenzimas

Em 1895, Friedrich Wilhelm Ostwald, físico-químico alemão ganhador do Prêmio Nobel em 1909, definiu catalisador como “uma substância que altera a velocidade de uma reação química sem participar da mesma, diminuindo sua energia de ativação”,

definição pouco alterada até os dias atuais. Nesta época o desenvolvimento de estudos relacionados se mostrava cada vez mais crescente, na medida em que se descobriam novas e proveitosas aplicações para catalisadores, principalmente na área industrial^[5,6].

Enquanto os químicos lapidavam o seu conhecimento sobre catálise, os bioquímicos chegavam à conclusão de que as reações essenciais para o funcionamento de organismos vivos também dependem de catalisadores, ainda mais eficientes que os produzidos em laboratório: as enzimas. Consideradas o centro de todo processo bioquímico, estas estruturas agem catalisando as inúmeras reações biológicas, que degradam nutrientes, conservam e transformam energia química, entre outras funções necessárias para o desenvolvimento da vida^[7,8].

As enzimas são formadas por sequências de aminoácidos que se organizam formando um ambiente químico favorável às reações de catálise. Estas reações ocorrem em um sítio específico da enzima, chamado de sítio ativo, o qual é revestido por resíduos de aminoácidos contendo grupos substituintes que se ligam ao substrato e catalisam a sua transformação química^[8].

Mais de um quarto de todas as enzimas conhecidas necessitam de cátions metálicos para exercer sua plena atividade catalítica. Elas podem ser divididas em dois grupos: enzimas ativadas por metal e metaloenzimas. As enzimas ativadas por metal têm uma necessidade absoluta de adição de íons metálicos ou são estimuladas por essa adição. Já as metaloenzimas têm íons metálicos firmemente ligados a seus sítios ativos, mais comumente metais de transição como o cobre. Íons metálicos que se ligam fortemente às enzimas são em geral necessários à catálise. O sítio ativo de uma metaloenzima consiste de: um ou mais íons metálicos, a cadeia lateral da proteína, pontes exógenas e ligantes terminais que compõem a primeira esfera de coordenação do metal^[9].

As metaloenzimas são classificadas a partir do tipo de reação que catalisam, podendo ser: transferases (reações de transferência de grupos substituintes), oxirredutases (reações de transferência de elétrons), hidrolases (reações de hidrólise), liases, (adição de grupos a duplas ligações ou formação de duplas ligações pela remoção de grupos), isomerases (reações de isomerização) e ligases (formação de ligações C-C, C-S, C-N e C-O)^[8,9].

2.3. Metaloenzimas de cobre

O cobre é um elemento muito importante em processos biológicos. Várias enzimas contêm íons cobre e cumprem diferentes funções fisiológicas, incluindo o transporte de elétrons e de O_2 , assim como processos de oxidação e oxigenação. O cobre em complexos mono e oligonucleares é comumente encontrado no meio biológico ligado a resíduos de histidinas, cisteínas e metioninas, ocorrência corroborada pelo princípio de dureza e maciez.

Os centros de cobre nos sistemas vivos foram divididos inicialmente em três grupos, sendo eles: tipo I, tipo II e tipo III, e sua diferenciação é baseada em suas características espectroscópicas^[10].

As enzimas de cobre do tipo I, cuja função catalítica é promover a transferência de elétrons, são também chamadas de enzimas de cobre azuis e apresentam centros mononucleares de cobre(II) com geometria tetraédrica distorcida contendo uma ligação cobre-cisteína que resulta em um espectro eletrônico característico com um máximo em 600 nm^[10,11].

As enzimas de cobre do tipo II, também chamadas de enzimas normais de cobre, contém centros mononucleares de cobre(II) e apresentam esfera de coordenação quadrado planar, devido ao efeito Jahn-Teller, e mostram comportamento espectroscópico com baixos valores de absorvidade molar, típicas de transições d-d de Cu(II)^[10].

Diferentemente desses dois tipos de centros, o tipo III contém dois átomos de cobre. Proteínas com centros do tipo III atuam ou como enzimas oxidases (catecol oxidase e tirosinase) ou como proteínas de transporte de oxigênio molecular (hemocianina)^[7].

2.4. Promiscuidade Enzimática

O processo evolutivo resultou num grande aumento da especialização das enzimas que conhecemos atualmente. Entretanto, alguns exemplos destes catalisadores naturais chamam atenção por apresentarem mais de uma função biológica, ou “promiscuidade enzimática”^[11].

O interesse nesses compostos se concentra principalmente no entendimento de como um sítio ativo, que seria aparentemente específico para uma determinada

função, pode apresentar atividade promíscua. O tipo de promiscuidade enzimática geralmente é definido de acordo com as características funcionais das enzimas, tais com: (i) Promiscuidade de condição: as diferentes atividades acontecem em condições reacionais diferentes (como temperaturas e pH extremos); (ii) promiscuidade de substrato: quando a enzima apresenta uma ampla especificidade de substratos; e (iii) promiscuidade catalítica: capacidade em catalisar diferentes transformações químicas com estados de transição diferentes^[12].

Apesar de intrigante, a promiscuidade enzimática pode ser danosa em meio biológico, pois ao realizar reações secundárias pode levar à formação de produtos tóxicos para o organismo. Entretanto, um ponto positivo do estudo desta característica é a possível compreensão de como e por que ocorre a evolução enzimática, considerando que a origem da promiscuidade catalítica pode estar relacionada com a evolução de uma espécie a outra ainda mais específica ou de diferente função. A habilidade de evoluir e se adaptar demonstra a importância da compreensão de seus mecanismos^[13].

2.5. Nucleases

Dentro da classe das hidrolases estão as nucleases, que têm como principal característica a sua capacidade de clivar ligações fosfodiéster presentes nas estruturas do DNA e do RNA. Suas principais funções nos sistemas biológicos são a degradação dos ácidos nucleicos, a reparação do DNA e a defesa viral. Os metais mais comumente encontrados no sítio ativo da maioria das nucleases são Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} , os quais em muitos casos participam de forma direta da etapa catalítica^[14].

Embora já sejam conhecidos numerosos tipos de nucleases de ocorrência natural, o desenvolvimento de modelos sintéticos seria de grande utilidade, não só na elucidação mais aprofundada dos mecanismos de reação de tais enzimas, mas também visando a criação de uma enzima de restrição artificial, a qual poderia ser útil não só para biólogos moleculares na tentativa de clivar o DNA em locais não reconhecidos por enzimas de restrição conhecidas, mas também no estudo de sequenciamento do genoma humano^[15].

2.6. Catecol oxidase

A catecol oxidase é uma metaloenzima de cobre do tipo III. Essa metaloproteína possui centros binucleares de cobre, com geometria pirâmide trigonal, estando cada cobre coordenado por três átomos de nitrogênio de resíduos de histidinas e um grupo hidróxido fazendo ponte entre os dois centros metálicos. É responsável pela catálise da reação de oxidação de uma variedade de *o*-difenois (catecóis) às suas correspondentes *o*-quinonas (Figura 1), sem apresentar atividade de tirosinase. As quinonas resultantes são altamente reativas e podem se autopolimerizar formando o pigmento escuro melanina, que protege tecidos danificados contra agentes patógenos ou insetos. A catecol oxidase foi isolada pela primeira vez em 1938 e, em 1998, as estruturas cristalinas das suas formas oxidada e reduzida (isoladas da batata doce) foram determinadas por difratometria de raios X (Figura 2)^[7,16,17].

Figura 1 - Reação de oxidação catalisada pela enzima catecol oxidase.

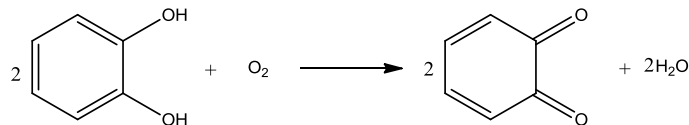
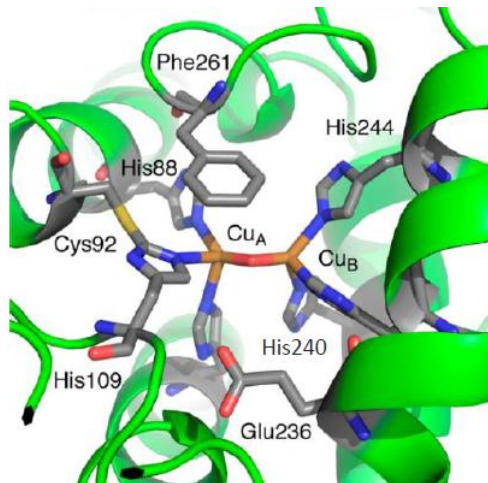


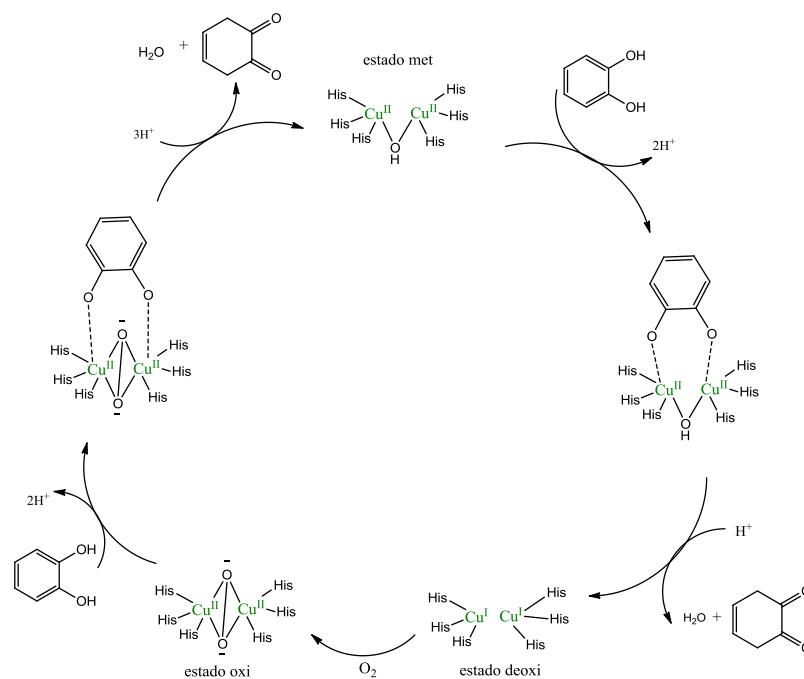
Figura 2 - Estrutura cristalina do sítio ativo da forma oxidada da catecol oxidase^[17].



O ciclo catalítico da catecol oxidase ainda não foi completamente elucidado, sendo que o mecanismo mais aceito é o proposto por Solomon em 1996. Tal mecanismo sugere que o substrato coordena-se à enzima de forma bidentada, tanto

na forma oxidada quanto na reduzida, formando duas moléculas da respectiva quinona e água (Figura 3). O mecanismo inicia-se com a catecol oxidase em seu estado *met* ou *oxi*. O substrato *o*-difenoil liga-se ao estado *met* da catecol oxidase de forma bidentada, seguido da reação de oxidação, resultando no produto *o*-quinona e na formação do estado reduzido (*deoxi*) da enzima. O estado *deoxi* liga-se a uma molécula de O_2 , gerando um estado *oxi*, o qual sofre um ataque de uma segunda molécula de substrato. A oxidação desta segunda molécula de *o*-difenoil regenera a forma catalítica da enzima (estado *oxi*) e o ciclo catalítico pode ser reiniciado^[18,19].

Figura 3 - Mecanismo proposto para a reação de oxidação de *o*-difenois promovida pela enzima catecol oxidase^[18].



Numa tentativa de se elucidar a geometria do sítio ativo e as propriedades eletrônicas da metaloenzima, bem como mimetizar sua reatividade catalítica, tem sido reportada grande variedade de compostos modelo de baixa massa molecular. Além de sua função natural, o interesse nas reações de catecol oxidase abrange aplicações médicas na dosagem de catecolaminas hormonais, como adrenalina e dopamina^[7,18].

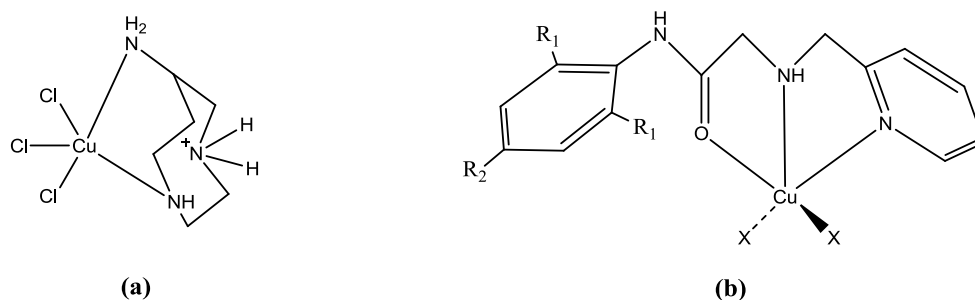
2.7. A importância dos análogos sintéticos

A inerente complexidade das enzimas representa grande dificuldade nos estudos detalhados de seus mecanismos. Com isto em mente, químicos bioinorgânicos têm se inspirado nos sítios ativos das metaloenzimas e planejado análogos sintéticos visando simular propriedades estruturais, espectroscópicas e de reatividade dos sistemas biológicos. Estes estudos são apropriados para sistemas que possuem detalhes principalmente estruturais já descritos na literatura, mas que não são totalmente conhecidos^[1,19].

O planejamento e posterior desenvolvimento de compostos modelo iniciam-se a partir da caracterização da enzima que se deseja modelar. Deste modo, a Bioinorgânica conta com a colaboração de bioquímicos que realizam as etapas de isolamento, purificação e análise detalhada de propriedades (físico-químicas e estruturais) do sítio catalítico em questão. Somente a partir destas informações será possível iniciar o processo de projeção de ligantes com funções químicas semelhantes aos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima. A obtenção dos compostos de coordenação se dá logo após a caracterização (e consequente constatação de pureza) do ligante. A comparação das propriedades físico-químicas, estruturais e catalíticas do composto de coordenação sintético com as propriedades da metaloenzima de interesse permitem considerá-los (ou não) bons modelos sintéticos para tal enzima^[1,20].

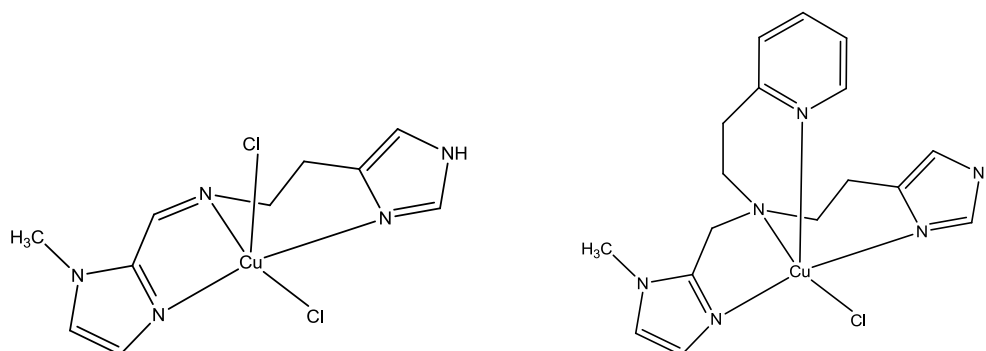
Com inúmeros mecanismos de diferentes modelos binucleares de catecol oxidases sendo reportados, a investigação de seus equivalentes mononucleares continua escassa, embora sendo tão promissora quanto. A Figura 4 apresenta alguns complexos mononucleares considerados modelos para a enzima catecol oxidase, como os complexos reportados por Westrup (a), com ligantes triamínicos cíclicos e outros reportados por Panda *et al* (b), os quais possuem uma unidade piridínica e outra benzênica tri-substituída, com variações em seus substituintes^[21,22].

Figura 4 - Complexos mononucleares de cobre reportados por (a) Westrup e (b) Panda *et al* [21,22].



Os compostos miméticos de cobre têm demonstrado importância não só na compreensão dos processos biomoleculares de ocorrência natural, mas seus estudos também podem ser extrapolados para outras funções. Por exemplo, a falta de nucleases naturais de cobre não invalida o uso destes compostos nos estudos de mecanismo, de criação de medicamentos ou como ferramentas biotecnológicas de clivagem de DNA. De fato, o cobre tem provado ser um metal valioso no desenvolvimento de sistemas artificiais de nuclease, como reportado em recentes publicações. Na Figura 5 encontram-se alguns complexos de cobre considerados modelos para nucleases, reportados por Scarpellini *et al*, ambos contendo ligantes N-doadores [23,24].

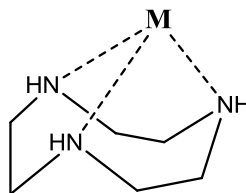
Figura 5 – Complexos mononucleares de cobre reportados por Scarpellini *et al* [21].



Em trabalhos recentes destaca-se a investigação de complexos biomiméticos contendo ligantes triaminas cíclicas de coordenação facial, principalmente análogos ao 1,4,7-triazaciclononano (tacn), como modelos estruturais e/ou funcionais para o sítio ativo de metaloenzimas. Tais ligantes cíclicos são interessantes nestes estudos pois, em contraste com os seus análogos alifáticos, os seus modos de coordenação

restritos e bem definidos permitem a coordenação do centro metálico diretamente a uma esfera de coordenação específica (Figura 6). Dispondo de ligantes mais organizados e fortemente quelantes, os complexos coordenados a ligantes faciais costumam apresentar, em solução, propriedades estruturais e de estabilidade melhores correlacionadas do que sistemas contendo ligantes de cadeia aberta. Além disso, os grupos amino presentes no tacn podem ser moldados de forma que contenham diferentes substituintes que possam auxiliar nas propriedades de catálise do composto^[25,26].

Figura 6 – Representação do modo de coordenação de íons metálicos ao ligante facial tacn.



3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este projeto tem como objetivo a síntese e caracterização de um novo ligante facial N-doador e seu respectivo complexo de Cu(II), afim de realizar testes iniciais de reatividade frente ao substrato modelo para reações de oxidação 3,5-di-*terc*-butilcatecol (3,5-dtbc) e ao substrato modelo para reações de hidrólise de ésteres de fosfato *bis*(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-bdnpp). Visa-se analisar os resultados obtidos a fim de esclarecer se o composto sintetizado pode ser considerado um modelo funcional para a oxidação de catecóis e a hidrólise de ésteres de fosfato.

3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar o ligante 1,4-diisopropil-1,4,7-triazacliclononano ($\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2$);
- Caracterizar o ligante $\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2$ por espectroscopia na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e espectrometria de massas;
- Sintetizar um complexo de Cu(II) utilizando o ligante sintetizado;
- Caracterizar o complexo de Cu(II) por espectrometria de massas, espectroscopia no infravermelho (IV) e na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), difratometria de raios X, condutimetria e eletroquímica;
- Realizar testes cinéticos iniciais de atividade de catecolase do complexo frente ao substrato modelo para reações de oxidação de catecóis 3,5-di-*terc*-butilcatecol (3,5-dtbc);
- Realizar testes cinéticos iniciais de atividade de nuclease frente ao substrato modelo para reações de hidrólise de ésteres de fosfato, *bis*(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-bdnpp);
- Analisar os resultados obtidos a fim de esclarecer se o composto sintetizado pode ser considerado um modelo funcional para a oxidação de catecóis e a hidrólise de ésteres de fosfato.

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais e Reagentes

Os seguintes reagentes, gases, materiais e solventes utilizados nos processos de sínteses e análises foram adquiridos de fontes comerciais, com grau de pureza compatível com a utilização, sem prévia purificação: cloreto de tosila (Aldrich), etilenoglicol (Ridel), dietilenotriamina (Aldrich), hidróxido de sódio (Vetec), acetona PA (Vetec), fenol (Merck), metanol espectrométrico (Tedia), carbonato de sódio (Lafan), ácido bromídrico 33% em ácido acético glacial (Aldrich), éter dietílico PA (Vetec), carbonato de céσιο (Aldrich), etanol PA (Vetec), clorofórmio PA (Vetec), sulfato de sódio anidro (Vetec), 2-bromopropano (Aldrich), ácido sulfúrico (Nuclear), carvão ativado (Vetec), acetonitrila espectrométrica (Tedia), cloreto de cobre(II) (Vetec), argônio 5.0 (White-Martins), brometo de potássio (Vetec), clorofórmio deuterado (Sigma-Aldrich), nitrogênio 2.0 (White-Martins), di-*terc*-butil-catecol (Sigma-Aldrich). Os tampões HEPES, CHES E MES (Sigma-Aldrich) serão utilizados nas devidas faixas de tamponamento (pH entre 4,0 e 10,0) e sem purificação prévia.

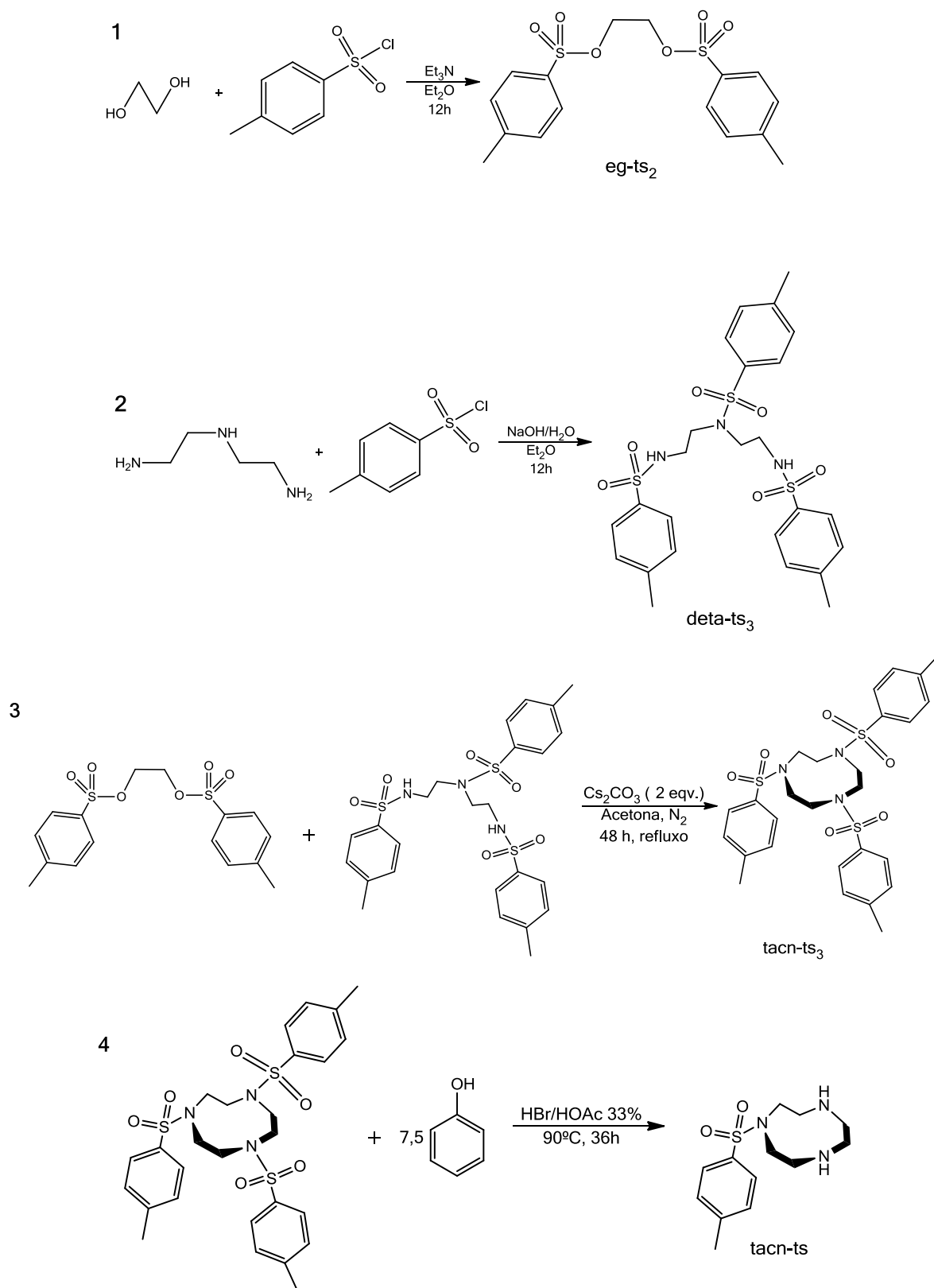
O reagente trietilamina (Vetec) foi obtido de forma comercial e previamente purificado através de destilação simples a pressão reduzida. Será utilizada também acetonitrila seca com peneira molecular 4Å.

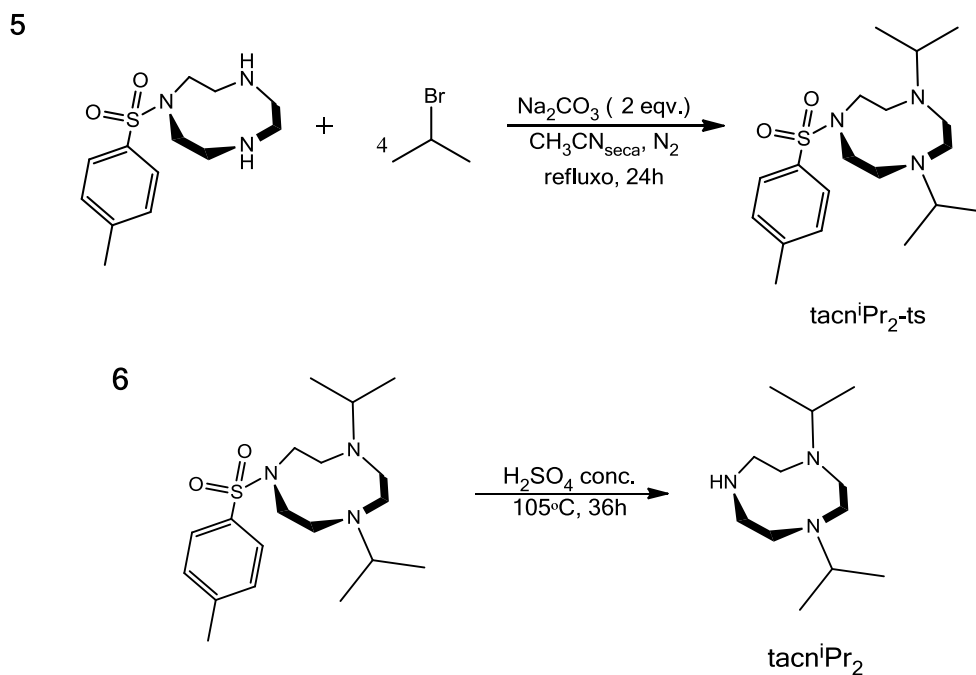
4.2. Sínteses

A síntese do ligante 1,4,7-triazaciclononano ($\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2$) foi realizada passando por 5 ligantes precursores, sendo eles: 1,2-bis(*p*-toluenosulfonil)etilenoglicol (eg-ts_2); N,N',N''-tris(*p*-toluenosulfonil)-dietilenotriamina (deta-ts_3); 1,4,7-tris-(*p*-toluenosulfonil)-1,4,7-triazaciclononano (tacn-ts_3); 1-(*p*-toluenosulfonil)-1,4,7-triazaciclononano (tacn-ts); 1,4-diisopropil-7-(*p*-toluenosulfonil)-1,4,7-triazaciclononano ($\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2\text{-ts}$). O ligante e seus precursores foram sintetizados segundo a literatura^[27], sendo ambos caracterizados via espectroscopia na região do infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H). O ligante final foi caracterizado também via espectrometria de massas. A rota sintética do ligante $\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2$ pode ser observada na Figura 7. Os rendimentos obtidos foram de: 58% para o precursor eg-ts_2 , 60% para o deta-ts_3 , 55% para o tacn-ts_3 , 48% para

o tacn-ts, 61% para o tacnⁱPr₂-ts e, por fim, o ligante final tacnⁱPr₂ foi obtido com 60% de rendimento.

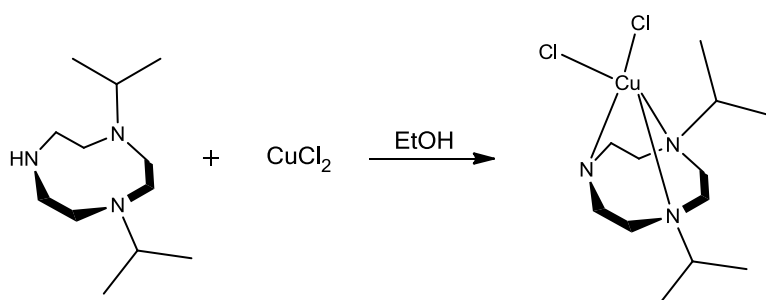
Figura 7 - Rota sintética do ligante tacnⁱPr₂.





4.2.1. Síntese do complexo de Cu(II) – Dicloro(1,4-diisopropil-1,4,7-triazaciclononano)Cobre(II) – [Cu(tacnⁱPr₂)Cl₂]

Figura 8 - Rota sintética do complexo de Cu(II) com o ligante tacnⁱPr₂



A uma solução etanólica de tacnⁱPr₂ (0,21 g; 1,00 mmol; 213,36 g mol⁻¹) sob agitação constante, adicionou-se lentamente 0,17 g de cloreto de cobre(II) (1,00 mmol; 170,48 g mol⁻¹) solubilizados em cerca de 15 mL de etanol, com o auxílio de uma pipeta de pasteur. Deixou-se a mistura reacional reagir por 30 minutos, em temperatura ambiente e sob agitação. Em seguida, deixou-se a solução em repouso

para precipitação do complexo de Cu(II). Foi obtido um rendimento de 78% (0,15 g; 0,78 mmol, 346,81 g mol⁻¹).

4.3. Caracterizações

4.3.1. Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)

Os espectros das amostras foram adquiridos na região do IV em um espectrofotômetro de infravermelho com Transformada de Fourier e com acessório de Refletância Total Atenuada Horizontal (FTIR – ATR) da Perkin-Elmer Spectrophotometer Spectrum 100, com cristal de ZnSe (45 °) e um detector TGS (*triglycine sulfate*) do Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. As amostras foram colocadas diretamente no aparelho sobre o cristal, com média de 18 varreduras no intervalo 4000 - 530 cm⁻¹ e resolução de 4 cm⁻¹. As medidas das amostras foram corrigidas pelo espectro do branco que foi registrado somente com o background que foi feito com ar ambiente, ou seja, sem nada sobre o cristal e posteriormente subtraído do espectro da amostra. A temperatura ambiente da sala encontrava-se em torno de 23 °C.

4.3.2. Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (RMN ¹H)

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

4.3.3. Difractometria de Raios X

A análise por difração de raios X do complexo foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC. Os dados foram coletados em um

difratômetro Bruker APEX II DUO equipado com um tubo de molibdênio (MoK α λ = 0,71073 Å) e monocromador de grafite. A estrutura cristalina foi resolvida através dos métodos diretos e parcialmente refinada pelo método dos mínimos quadrados com matriz completa, utilizando-se os programas SIR-97 (ALTOMARE *et al.*, 1999) e SHELXL-97 (SHELDRICK, 1997) respectivamente.

4.3.4. Espectrometria de Massas (ESI-MS)

Os compostos obtidos foram analisados em um espectrômetro de massas com ionização via eletrospray (ESI – MS) Amazon – IonTrap – MS do Centro de Biologia Molecular (CEBIME) – UFSC. As análises foram realizadas em soluções com solventes de grau espectroscópico, com concentração em torno de 500 ppb e fluxo de 180 $\mu\text{L min}^{-1}$.

4.3.5. Condutimetria

As medidas de condutividade molar do complexo foram realizadas no aparelho Metrohm 856, do Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. O complexo foi analisado tendo como solvente a acetonitrila, com concentração $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O aparelho foi calibrado com uma solução padrão de KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ cuja condutividade é de 100 $\mu\text{S/cm}$ em água a 25°C.

4.3.6. Espectroscopia eletrônica na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

Os espectros eletrônicos na região UV-Vis foram obtidos em um UV-Vis Varian Cary 50 BIO do Laboratório de Química Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. As análises foram realizadas em cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,00 cm e 1,50 mL de capacidade. Os complexos estudados foram solubilizados em acetonitrila seca de grau espectroscópico com concentração de $2,30 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (estoque) e em metanol de grau espectroscópico com concentração de $3,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (estoque).

4.3.7. Eletroquímica

O comportamento redox do complexo foi investigado por voltametria cíclica em um potenciostato/galvanostato modelo Epsilon do Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. Os experimentos foram realizados em acetonitrila seca e metanol de grau espectroscópico com concentração de $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e sob atmosfera de argônio. Foi utilizado como eletrólito suporte hexafluorofosfato de tetrabutílamônio com concentração de $1,00 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. Foram empregados os eletrodos de Ag/Ag^+ (referência); carbono vítreo (trabalho) e platina (auxiliar). Para a correção do eletrodo de referência foi utilizado o par ferroceno/ferrocínio como referência interna.

4.3.8. Testes iniciais de reatividade

A atividade catalítica dos complexos foram avaliadas através da reação de oxidação do substrato 3,5-di-*terc*-butilcatecol (3,5-dtbc) e da reação de hidrólise do substrato modelo bis- (2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-bdnpp), o qual foi sintetizado de acordo com o método descrito por Bunton^[28]. Os testes para avaliar a reatividade foram realizados sob condições de excesso de substrato ou de complexo monitorando-se, em um espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostatizado, a variação de absorvância ocorrida em 400 nm ($\epsilon = 1645 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para a reatividade de oxidação devido à formação da 3,5-di-*terc*-butilquinona e também em 400 nm ($\epsilon = 12100 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), relacionada à liberação do ânion 2,4-dinitrofenolato como produto da reação de hidrólise^[29]. As reações foram monitoradas até 5% de conversão de substrato a produtos, quando em excesso de substrato, e os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais. Já as reações com excesso de complexo foram monitoradas até o término da reação de hidrólise. As velocidades iniciais foram obtidas diretamente do gráfico da concentração de substrato *versus* o tempo. A dependência da velocidade de clivagem do 2,4-bdnpp foi estudada em função do pH, da concentração do complexo e do substrato, já para o substrato 3,5-dtbc foi estudada a dependência em função do pH e substrato.

Nos testes iniciais de catecolase e hidrolase utilizaram-se cubetas de vidro óptico com capacidade para 4,00 mL e caminho óptico de 1 cm, fechadas com

tampa de teflon. Nas medidas de atividade de catecolase foram adicionados 100 μL de solução aquosa ($[\text{T}]_{\text{final}} = 6,67 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) dos tampões (MES pH 4,0 a 6,5 e TRIS pH 7,0 a 10,0), 1050 a 1300 μL de metanol saturado com oxigênio e 25 a 150 μL de uma solução metanólica do substrato ($[\text{S}]_{\text{final}} = 5,00 \times 10^{-4} - 3,00 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ para o efeito da concentração do substrato e $[\text{S}]_{\text{final}} = 3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para o efeito do pH). Para a verificação do efeito do pH, a reação foi iniciada com a adição de 50 μL de uma solução metanólica do complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 3,33 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e para os testes de efeito da concentração do substrato a reação foi iniciada com a adição de 25 μL de solução metanólica do complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 1,67 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), sendo que ambos os testes foram monitorados durante 15 minutos. Em todos os experimentos, o volume final da mistura reacional na cubeta foi de 1,50 mL. Correções da oxidação espontânea do substrato 3,5-dtbc foram realizadas sob condições idênticas, sem a adição do complexo.

Nas medidas de atividade de hidrolase foram adicionados 100 μL de solução aquosa ($[\text{T}]_{\text{final}} = 6,67 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) dos tampões (MES pH 6,0 e 6,5, TRIS pH 7,0 a 10,5), 1050 a 1300 μL de acetonitrila e 25 a 150 μL de uma solução do substrato em acetonitrila ($[\text{S}]_{\text{final}} = 2,00 \times 10^{-4} - 8,00 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ na análise do efeito da concentração do substrato e $[\text{S}]_{\text{final}} = 3,33 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para o efeito da concentração do complexo e $[\text{S}]_{\text{final}} = 2,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para o efeito do pH). Para a verificação do efeito do pH, a reação foi iniciada com a adição de 50 μL de uma solução do complexo em acetonitrila ($[\text{C}]_{\text{final}} = 6,67 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), para os testes de efeito da concentração do substrato a reação foi iniciada com a adição de 25 μL de solução do complexo em acetonitrila ($[\text{C}]_{\text{final}} = 1,67 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e para o efeito da concentração do complexo a reação foi iniciada com a adição de 25 μL de uma solução de complexo em acetonitrila ($[\text{C}]_{\text{final}} = 1,67 \times 10^{-4} - 7,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), sendo que ambos os testes foram monitorados durante 15 minutos. Em todos os experimentos, o volume final da mistura reacional na cubeta foi de 1,50 mL. Correções da hidrólise espontânea do substrato 2,4-bdnpp foram realizadas sob condições idênticas, sem a adição do complexo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Caracterização do ligante tacn^iPr_2

A caracterização do ligante tacn^iPr_2 e de seus precursores foi realizada através de espectroscopia na região do infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), sendo o ligante final caracterizado também por espectrometria de massas.

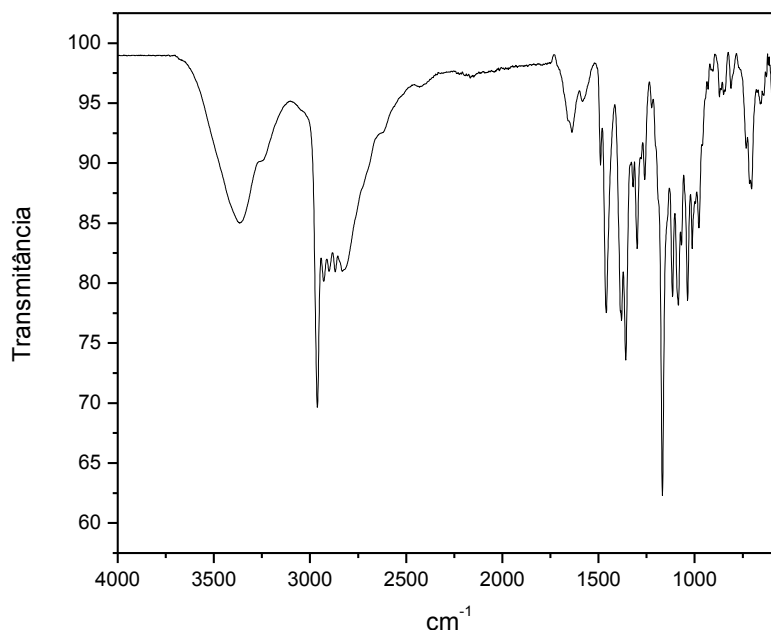
5.1.1. Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

A espectroscopia no IV consiste numa análise qualitativa, a qual foi utilizada na verificação da formação de cada ligante nas etapas de síntese. Com os compostos sendo conhecidos na literatura, a atribuição das principais bandas foi feita com base em semelhança, sendo então utilizadas para observar a formação de cada composto pelo acompanhamento da presença ou ausência de determinadas bandas. Na Tabela 1 encontram-se as principais bandas observadas nos espectros na região do IV do ligante e de seus precursores. As bandas de estiramentos e deformações angulares correspondentes a ligações C-H_{ar} , C-H_{alif} , $\text{C}=\text{C}$, O-S-O e S-O-C são comuns em todos os precursores e encontram-se em valores de número de onda bastante parecidos no espectro. A formação de cada composto pode ser acompanhada pela presença ou pela ausência da banda de estiramento característica da ligação N-H . Além disso, no espectro de IV do ligante final não aparecem bandas correspondentes a ligações C-H_{ar} , $\text{C}=\text{C}$, O-S-O e S-O-C , enquanto que aparecem bandas características de deformações axiais e angulares de ligações C-H_{terc} de carbonos terciários provenientes dos grupamentos isopropila, indicando que o ligante foi formado. A absorção resultante da vibração de deformação axial de ligações C-H_{terc} geralmente se confunde com outras absorções do tipo C-H_{ar} e C-H_{alif} ($\sim 2890 \text{ cm}^{-1}$), o que pode explicar a sua ausência no espectro do $\text{tacn}^i\text{Pr}_2\text{-ts}$, que tem uma densidade muito maior de ligações C-H_{ar} e C-H_{alif} . Na Figura 9 é possível observar o espectro de IV do ligante final.

Tabela 1 - Principais bandas observadas nos espectros de IV do ligante tacn^IPr₂ e seus precursores, em número de onda (cm⁻¹).

| Atribuições | eg-ts ₂ | deta-ts ₃ | tacn-ts ₃ | tacn-ts | tacn ^I Pr ₂ - ts | tacn ^I Pr ₂ |
|---|--------------------|----------------------|----------------------|-----------|---|-----------------------------------|
| ν (N-H) | - | 3290 | - | 3382 | - | 3368-3235 |
| ν (C-H _{terc}) | - | - | - | - | - | 2963 |
| ν (C-H _{ar} /C-H _{alif}) | 3040-2858 | 3090-2840 | 3090-2840 | 3098-2789 | 3070-2873 | 2980-2757 (somente alifático) |
| ν (C=C) | 1596 | 1588 | 1596 | 1596 | 1595 | - |
| ν_s (O-S-O) | 1362 | 1338 | 1330 | 1320 | 1335 | - |
| δ (C-H _{terc}) | - | - | - | - | 1384-1377 | 1387-1380 |
| ν_{ass} (O-S-O) | 1179 | 1162 | 1154 | 1157 | 1156 | - |
| ν (S-O-C) | 1053-881 | 1070-862 | 1070-845 | 1062-896 | 1072-870 | - |
| ν (C-N) | - | 1087 | 1095 | 1087 | 1093 | 1098 |
| δ (C-H _{ar}) | 767 | 812 | 812 | 820 | 815 | - |

Figura 9 - Espectro de IV do ligante tacn^iPr_2 .



5.1.2. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)

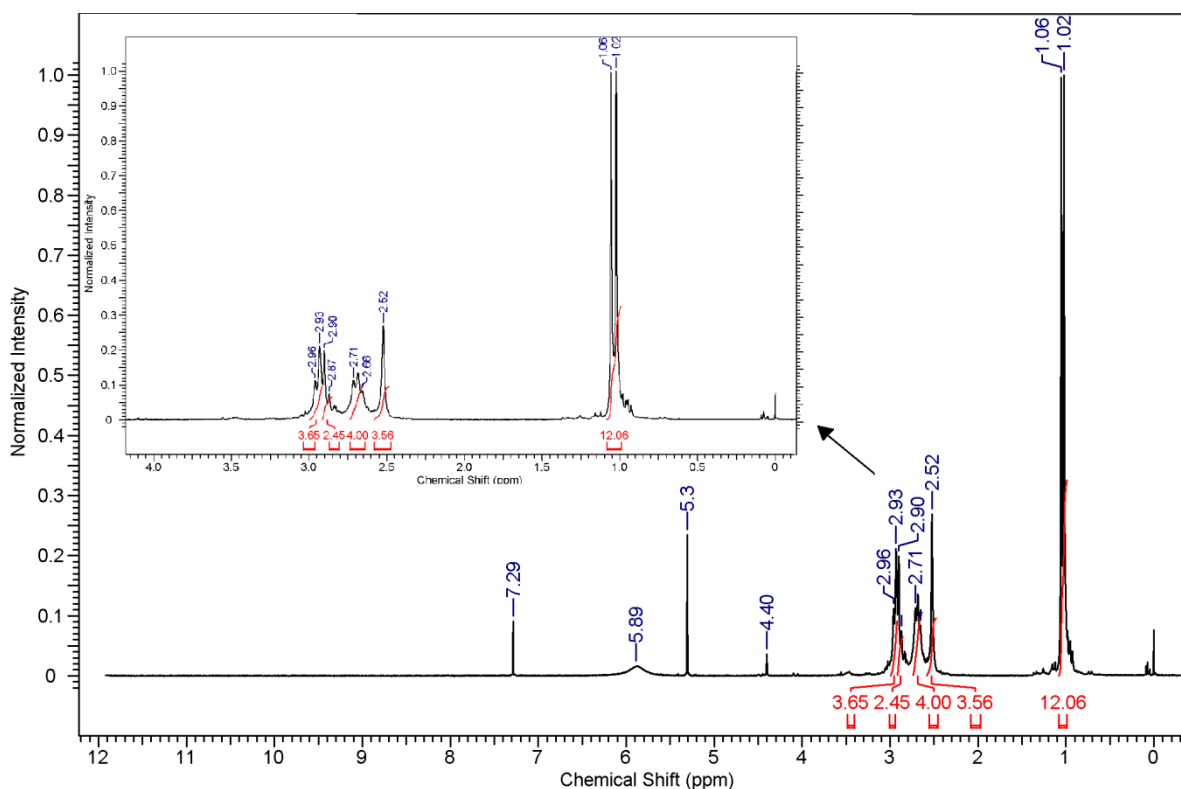
A ressonância magnética nuclear de hidrogênio é um dos métodos de determinação estrutural mais utilizados pelos químicos e foi bastante útil na caracterização dos compostos e, especialmente, na definição de sua pureza. Ao integrar os sinais registrados nos espectros de RMN ^1H , considerando também seus deslocamentos químicos, é possível distinguir entre átomos de hidrogênio metílicos, alifáticos, aromáticos, etc. e também o número de hidrogênios em cada composto. Estas informações levaram a uma confirmação de que os precursores e o ligante final foram obtidos com pureza adequada para a continuação do trabalho. A Tabela 2 apresenta os valores de deslocamento químico (δ_{H}), o número de hidrogênios correspondentes e as atribuições dos sinais, onde a comparação direta permite acompanhar a presença dos grupos protetores através de sinais de hidrogênios aromáticos e metílicos em alguns compostos e a ausência destes no ligante final. Além disso, o aparecimento de prótons alifáticos e metílicos nos espectros dos compostos diisopropilados ($\text{tacn}^i\text{Pr}_2\text{-ts}$ e tacn^iPr_2) também confirmam que o ligante

final foi obtido. O espectro correspondente ao ligante $\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2$ está apresentado na Figura 10.

Tabela 2 - Deslocamentos químicos, número de hidrogênios e atribuições dos espectros de RMN ^1H do ligante $\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2$ e seus precursores

| Atribuições | eg-ts ₂ | deta-ts ₃ | tacn-ts ₃ | tacn-ts | $\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2$ - ts | $\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2$ |
|-------------------|---|---|---|---|--|--|
| CH ₃ | 2,46 (s, 6H) | 2,43 (s, 9H) | 2,43 (s, 9H) | 2,42 (s, 3H) | 0,96-0,92 (d, 12H); 2,42 (s, 3H) | 1,06-1,02 (d, 12H) |
| CH ₂ | 4,19 (s, 4H) | 3,17 (s, 8H) | 3,42 (s, 12H) | 2,90 (s, 4H); 3,11-3,06 (m, 4H); 3,22-3,17 (m, 4H) | 2,47 (s, 4H); 2,89-2,84 (m, 4H); 3,32-3,28 (m, 4H) | 2,52 (s, 4H); 2,71-2,66 (t, 4H); 2,96- 2,93 (m, 4H) |
| CH _{iPr} | - | - | - | - | 2,82-2,72 (h, 2H) | 2,90-2,87 (m, 2H) |
| NH | - | 5,29 (s, 2H) | - | 2,19 (s, 2H) | - | - |
| CH _{ar} | 7,36-7,32 (d, 4H); 7,76-7,72 (d, 4H) | 7,33-7,29 (d, 6H); 7,64-7,60 (d, 2H) 7,78-7,74 (d, 4H) | 7,34-7,30 (d, 6H); 7,72-7,68 (d, 6H) | 7,33-7,28 (d, 2H); 7,71-7,66 (d, 2H) | 7,31-7,27 (d, 2H); 7,71-7,66 (d, 2H) | - |

Figura 10 - RMN¹H do ligante tacn¹Pr₂ em CDCl₃.

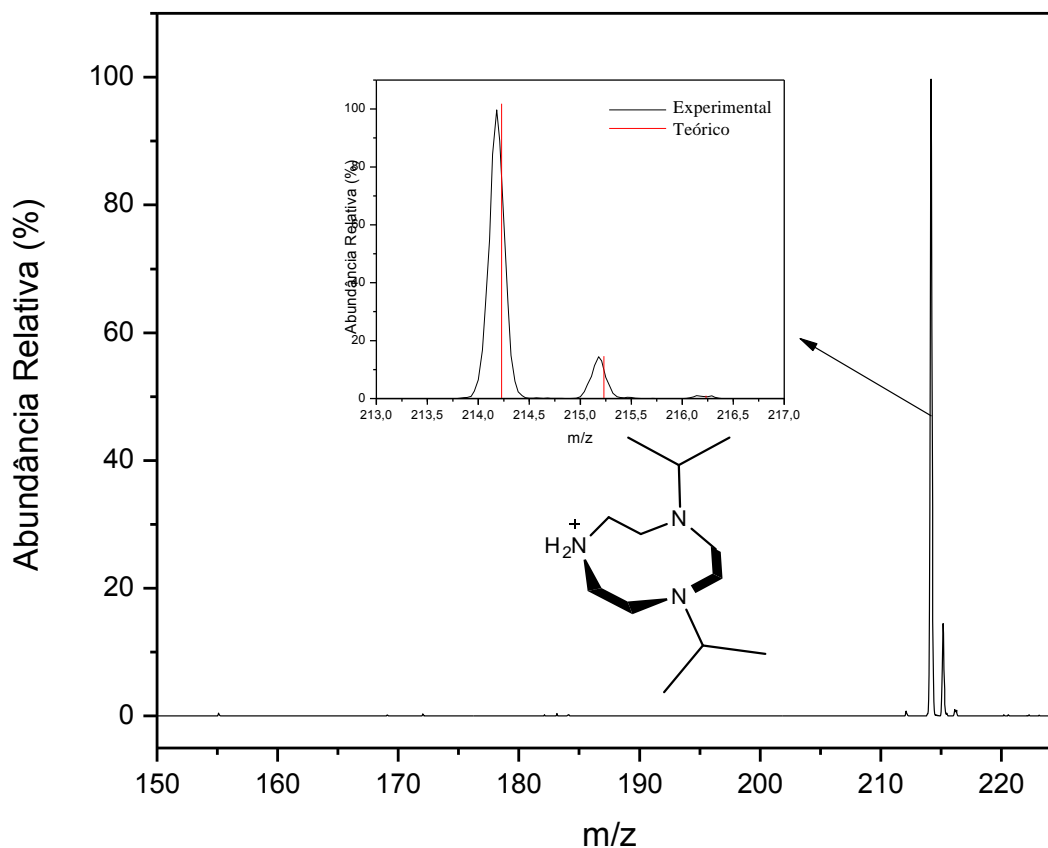


5.1.3. Espectrometria de massas (ESI-MS)

Um dos instrumentos mais importantes na caracterização de compostos, a espectrometria de massas é uma técnica de impacto de elétrons que resulta em um espectro dos íons da molécula separados com base na razão massa/carga (m/z). O evento mais comumente observado em um espectro de massas é a remoção de um elétron da molécula isolada, formando o íon molecular.

A medida do ESI-MS do ligante tacn¹Pr₂ foi realizada em acetonitrila e foi observado um pico de maior intensidade com razão $m/z = [214,17]^+$, correspondente ao íon da espécie protonada. Não foram observados isótopos de menor abundância. A distribuição isotópica do ligante foi simulada pelo software “*Mmass*” e os picos foram coincidentes com os valores experimentais, apresentando um valor de erro aceitável para o método utilizado (Figura 11).

Figura 11 - Espectro de massas do ligante tacn¹Pr₂ em CH₃CN.



5.2. Caracterização do complexo de Cu(II)

5.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

A interpretação do espectro na região do IV se mostrou bastante útil no acompanhamento inicial da formação do complexo. Correlacionando o espectro do ligante livre e do complexo, foi possível observar as principais bandas e seus respectivos deslocamentos quando da formação do complexo de Cu(II). Na Tabela 3 são observadas as principais bandas e atribuições para o complexo e o ligante, enquanto que na Figura 12 encontra-se o espectro. O principal indício de que houve a formação do complexo é o aparecimento de novas bandas abaixo de 1500 cm⁻¹ e

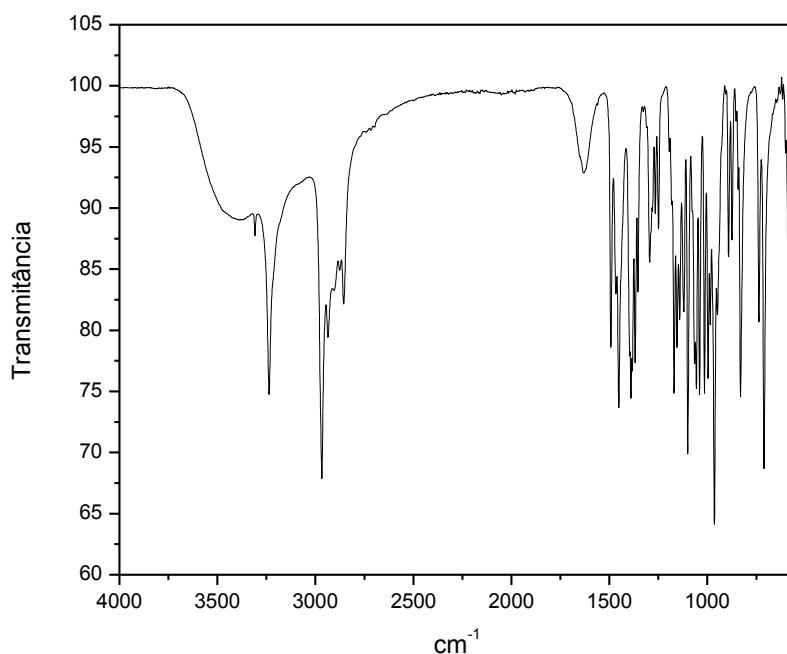
o deslocamento das bandas em comum com o ligante, resultantes da nova interação entre o ligante e o metal.

Observa-se a ocorrência de um deslocamento da banda referente ao estiramento da ligação N-H, onde ocorre a coordenação do metal, para um valor menor de energia, pois o metal é um ácido de Lewis e diminui a densidade eletrônica das ligações no ligante.

Tabela 3 - Principais bandas e suas respectivas atribuições em cm^{-1} , dos espectros no infravermelho do ligante $\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2$ e seu complexo de Cu(II).

| Atribuição | $\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2$ | Complexo Cu(II) |
|---------------------------------|---|------------------------|
| ν (N-H) | 3365 | 3237 |
| ν (C-H _{terc}) | 2963 | 2967 |
| δ (N-H) | 1651 | 1640 |
| ν (C-H _{ar}) | 2980-2757 | 2940-2855 |
| δ (C-H _{terc}) | 1387-1380 | 1393-1380 |
| ν (C-N) | 1098 | 1102 |

Figura 12 - Espectro de IV do complexo de Cu (II)



5.2.2. Difractometria de Raios-X

A estrutura cristalina do complexo foi obtida através da análise de difração de raios X por monocristal. Os dados cristalográficos obtidos estão sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados cristalográficos obtidos para o complexo de Cu (II).

| | |
|------------------------------|----------------------------|
| Temperatura (K) | 200(2) |
| Sistema cristalino | Monoclínico |
| Grupo espacial | P21/n |
| a | 12.6887(5) Å |
| b | 7.1522(3) Å |
| c | 18.9367(9) Å |
| α | 90° |
| β | 102.238(2)° |
| γ | 90° |
| Volume, Å³ | 1679.49(13) Å ³ |

O complexo cristaliza na forma de monocristais verdes, sendo que sua estrutura cristalina corresponde ao complexo mononuclear de carga neutra [Cu(tacn⁺Pr₂)Cl₂]. Os principais comprimentos e ângulo são apresentados na Tabela 5.

A análise revelou que o íon Cu (II) encontra-se pentacoordenado a três átomos de nitrogênio do ligante e dois ânions cloreto em uma geometria pirâmide de base quadrada (Figura 13). Para confirmar o tipo de geometria, foi empregada a equação descrita por Addison *et al*, aplicável a complexos pentacoordenados, a qual define um índice estrutural $\tau = (\beta - \alpha)/60$, onde τ representa o grau de trigonalidade da geometria, β é o maior ângulo e α o segundo maior ângulo na esfera de coordenação do metal. Segundo esta equação, uma geometria pirâmide de base quadrada perfeita é caracterizada por $\tau = 0$ e uma bipirâmide trigonal perfeita por $\tau = 1$. O complexo possui $\tau = 0,20$, concordante com uma geometria pirâmide de base

quadrada distorcida. A distorção observada na estrutura do complexo ocorre em função de um pronunciado efeito Jahn-Teller observado em sistemas d^9 como o do Cu (II)^[30].

Figura 13 - Representação da estrutura molecular do complexo [Cu(tacn^IPr₂)Cl₂], com esquema de numeração dos átomos.

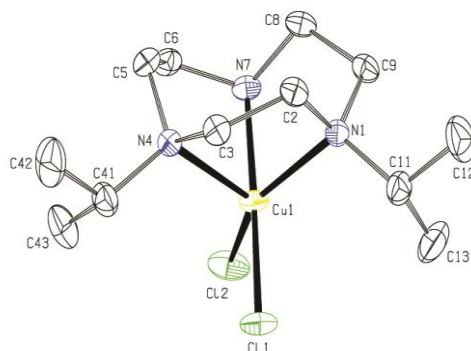


Tabela 5 - Principais comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação para o complexo [Cu(tacn^IPr₂)Cl₂].

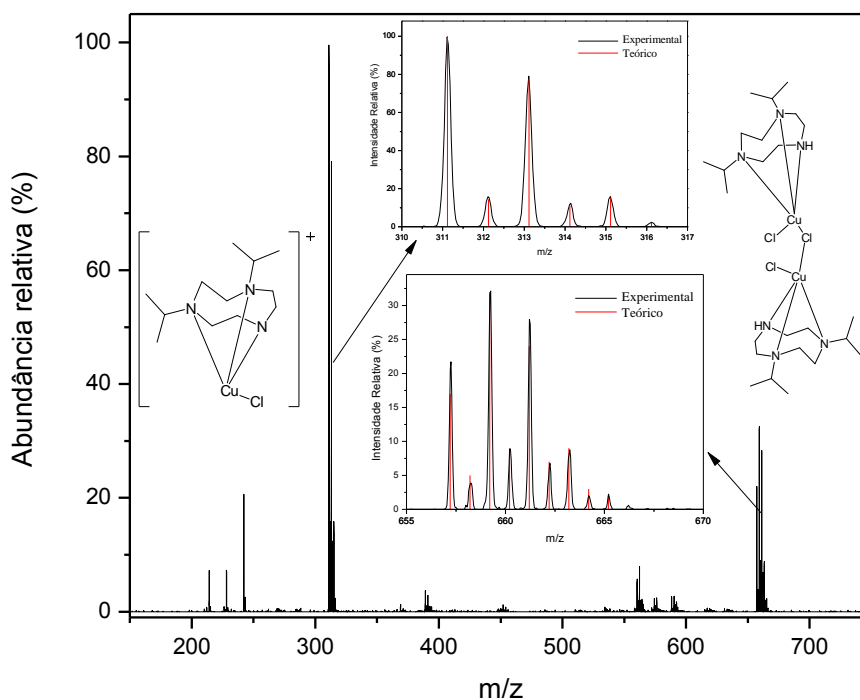
| | |
|-------------------|------------|
| Cu(1)-N(7) | 2,0252(18) |
| Cu(1)-N(1) | 2,1772(18) |
| Cu(1)-N(4) | 2,2179(17) |
| Cu(1)-Cl(1) | 2,2667(6) |
| Cu(1)-Cl(2) | 2,3028(6) |
| | |
| N(7)-Cu(1)-N(1) | 82,13(7) |
| N(7)-Cu(1)-N(4) | 82,74(7) |
| N(1)-Cu(1)-N(4) | 85,82(6) |
| N(7)-Cu(1)-Cl(1) | 176,08(6) |
| N(1)-Cu(1)-Cl(1) | 96,50(5) |
| N(4)-Cu(1)-Cl(1) | 93,51(5) |
| N(7)-Cu(1)-Cl(2) | 87,94(6) |
| N(1)-Cu(1)-Cl(2) | 145,55(5) |
| N(4)-Cu(1)-Cl(2) | 125,63(5) |
| Cl(1)-Cu(1)-Cl(2) | 95,20(2) |

5.2.3. Espectrometria de massas (ESI-MS)

A principal característica observada no espectro de massas é a pequena fragmentação, a qual permite identificar o íon molecular e as espécies mais estáveis frente a processos de ionização.

O espectro de massas experimental do complexo e sua respectiva distribuição isotópica simulada estão apresentados na Figura 14. O pico de maior intensidade representa o pico base (100%), possui razão $m/z = [311,11]^+$, e este valor é atribuído ao complexo $[C_{12}H_{26}ClCuN_3]^+$. O espectro de massas mostra também isótopos de menor abundância, dentre eles um pico com uma abundância relativa de 32% e razão $m/z = 659,60$, indicando a presença de uma espécie dimérica de fórmula $C_{24}H_{54}Cl_3Cu_2N_6$. O espectro de massas mostrou também que, na espécie dimérica, aconteceu a redução de um dos cobres ($Cu(II) \rightarrow Cu(I)$), resultando num composto de carga neutra. As distribuições isotópicas, tanto do monômero quanto do dímero, foram simuladas pelo software "Mmass" e todos os picos foram coincidentes com os valores experimentais.

Figura 14 - Espectro de massas experimental do complexo de Cu (II) em CH_3CN .



5.2.4. Condutimetria

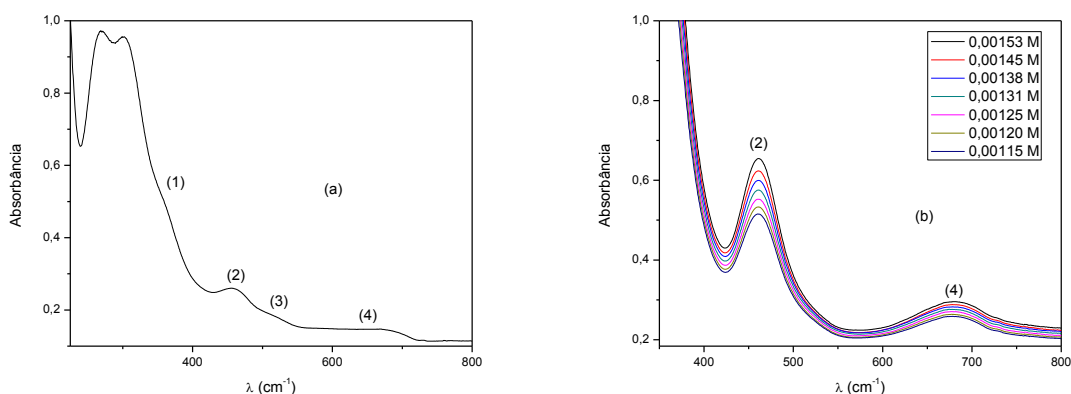
A condutividade elétrica tem sido usada na caracterização de compostos de coordenação em solventes orgânicos, sempre se levando em consideração propriedades como viscosidade e constante dielétrica do solvente. A condutividade, que é o inverso da resistência, depende da concentração e da natureza das várias espécies químicas presentes na solução.

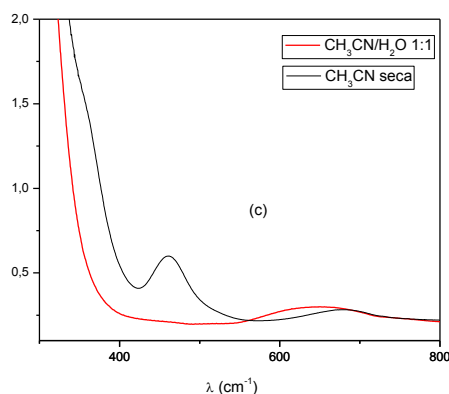
A medida de condutividade molar do complexo foi efetuada a partir de uma solução de concentração $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, a 25°C , em acetonitrila. O valor obtido para a condutividade molar (Λ_m) foi de $26,84 \Omega^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^2$. No entanto, nada se pode concluir, pois o valor obtido pode ser referente a uma mistura das espécies dimérica e monomérica^[18].

5.2.5. Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e do visível (UV-Vis)

O comportamento espectroscópico na região do UV-Vis do complexo foi estudado utilizando-se como solventes acetonitrila seca e acetonitrila/água 1:1. Os espectros eletrônicos obtidos estão mostrados na Figura 15.

Figura 15 - Espectros eletrônicos do complexo: (a) Medida em CH_3CN seca; $[\text{complexo}] = 2,30 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. (b) Variação da concentração de complexo para cálculo de absorvidade molar (ϵ), em CH_3CN seca. (c) Medida em CH_3CN seca versus $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1; $[\text{complexo}] = 3,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.





As transições eletrônicas ocorridas em complexos de metais de transição podem ser de diferentes tipos: transições internas d-d, transições de transferência de carga ligante-metal ou metal-ligante e, ainda, podem ocorrer transições do tipo intra-ligante, que pertencem aos grupos orgânicos cromóforos do ligante. Cada transição possui valores característicos de absorvidade molar (ϵ) e, por exemplo, fica muito fácil distinguir entre uma banda de transição d-d (pequeno ϵ) e uma banda de transferência de carga (grande ϵ)^[32].

As intensidades relativas das bandas de absorção são governadas por uma série de regras de seleção. Com base na simetria e na multiplicidade de spin de estados eletrônicos fundamentais e excitados, duas dessas regras se destacam: (i) a regra de seleção de Laporte ou de paridade, a qual afirma que transições de estados de mesma paridade (orbitais de mesma simetria) são proibidas; e (ii) a regra de multiplicidade de spin, que diz que transições entre estados de diferentes multiplicidades de spin não são permitidas. Essas regras parecem excluir a maioria das transições eletrônicas para complexos de metais de transição, no entanto, existem alguns mecanismos pelos quais tais regras podem ser relaxadas, como por exemplo: (i) as ligações em complexos de metais de transição, assim como todas as ligações químicas, são submetidas a vibrações que podem alterar temporariamente a sua simetria e, como consequência, a regra de seleção de Laporte pode ser relaxada (este fenômeno é chamado de acoplamento vibrônico); e (ii) através do acoplamento spin-órbita, que tem o efeito de “misturar os estados”, a regra de seleção de multiplicidade de spin pode ser parcialmente relaxada^[32].

As propriedades eletrônicas dos complexos de Cu(II) são fortemente influenciadas pela estereoquímica e muito se pode inferir a respeito da esfera de coordenação e da geometria da molécula a partir de espectros eletrônicos. O íon

livre Cu(II) possui configuração d^9 , com nove elétrons distribuídos em cinco orbitais d degenerados que, quando submetidos à influência de um campo ligante, sofrem desdobramento em diferentes níveis de energia (Figura 16). A energia de desdobramento desses orbitais é fortemente influenciada pela natureza dos ligantes (série espectroquímica) e pela geometria de coordenação do centro metálico^[33].

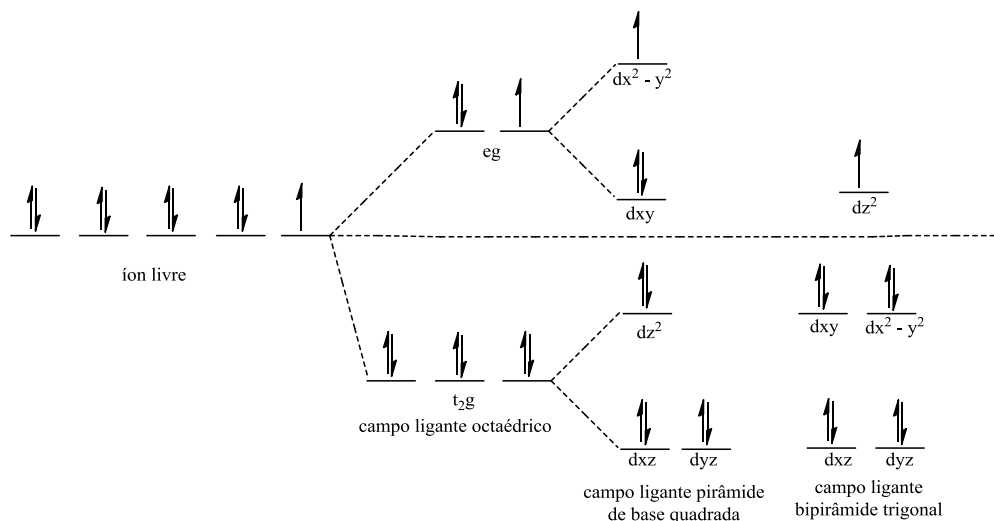
Complexos de Cu(II) em ambiente octaédrico normalmente apresentam estereoquímicas altamente distorcidas, característica de moléculas não lineares com estados eletrônicos degenerados, que tendem a sofrer distorção com o intuito de diminuir a simetria da molécula e reduzir a degenerescência (distorção Jahn Teller). Nesses casos, os espectros eletrônicos podem apresentar até três transições, as quais muitas vezes aparecem encobertas em uma única transição alargada na região de 600-700 nm. Complexos de Cu(II) pentacoordenados normalmente encontram-se em duas categorias de geometria: piramidal de base quadrada e bipirâmide trigonal. Os espectros eletrônicos de complexos piramidais de base quadrada mostram tipicamente uma banda de absorção mais intensa em alta energia (menor λ) e uma menos intensa (ombro) em menor energia. De maneira contrária, os espectros de complexos bipirâmides trigonais são caracterizados por uma banda menos intensa em mais alta energia e uma outra de maior intensidade em menor energia^[32,35].

Como pode ser observado na Figura 15, o espectro do complexo em solução de acetonitrila seca é caracterizado por apresentar duas bandas bem definidas em $\lambda_{\text{máx.}} = 680 \text{ nm}$ ($\epsilon = 96,491 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e $\lambda_{\text{máx.}} = 460 \text{ nm}$ ($\epsilon = 366,48 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), ambas atribuídas a transições do tipo $d-d$. Além disso, o espectro mostra uma banda em $\lambda_{\text{máx.}} = 350 \text{ nm}$, que aparece na forma de um ombro parcialmente encoberto por bandas intra-ligante ($\sim 280 \text{ nm}$) e outra banda (também na forma de ombro) em $\lambda_{\text{máx.}} = 515 \text{ nm}$. Estes resultados são compatíveis com a estrutura de raios X obtida para este complexo, a qual apresenta o centro de Cu(II) em um ambiente pirâmide de base quadrada.

Na figura 15c observa-se também uma sobreposição dos espectros obtidos utilizando os solventes acetonitrila seca e acetonitrila/água 1:1. Nota-se que em meio aquoso vê-se apenas uma transição alargada em $\lambda_{\text{máx.}} = 650 \text{ nm}$, indicando uma geometria tetragonal, pirâmide de base quadrada ou octaédrica. Devido à labilidade dos íons cloreto, quando em solução o complexo sofre influência do

solvente e moléculas de água passam a ocupar as posições de coordenação livres no Cu(II), inferindo-se que uma a três moléculas de água devem estar completando a esfera de coordenação do metal.

Figura 16 - Desdobramento dos orbitais d em função do campo ligante.



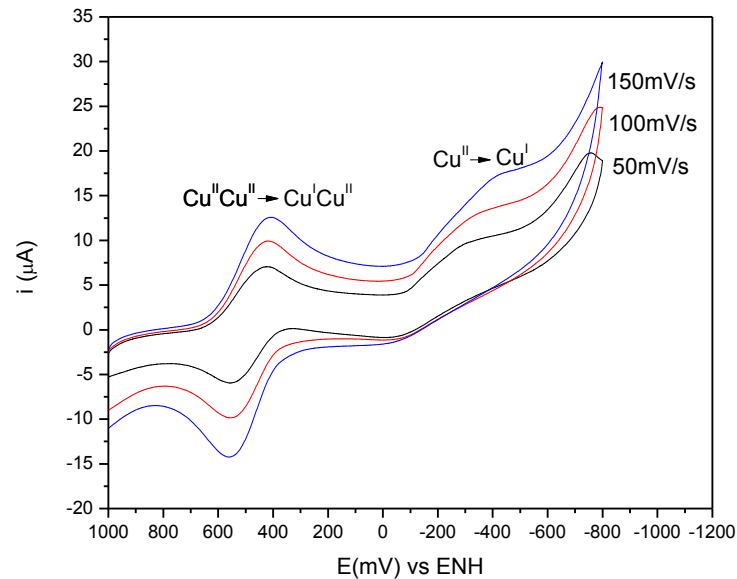
5.2.6. Eletroquímica

O comportamento eletroquímico do complexo foi investigado através da técnica de voltametria cíclica. Os potenciais redox foram referenciados ao eletrodo normal de hidrogênio (ENH) pelo uso do eletrodo de referência Ag/Ag⁺.

Os voltamogramas cíclicos para o complexo de cobre foram realizados em acetonitrila seca e em metanol, buscando observar o comportamento redox da espécie em diferentes solventes.

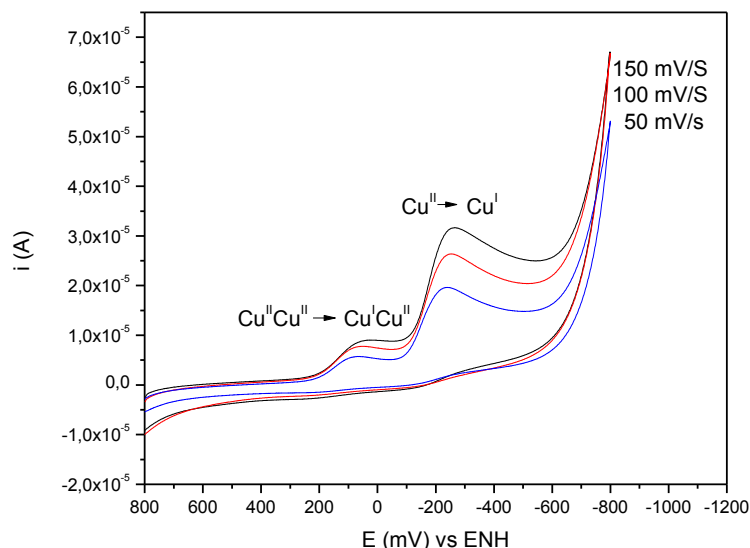
Nas medidas realizadas em acetonitrila seca (Figura 17) observou-se primeiramente a presença de um processo *semi*-reversível com $E_{1/2} = +484$ mV, atribuído tentativamente à redução Cu(II)Cu(II) → Cu(I)Cu(II) da espécie dimérica, a qual aparece com um dos centros metálicos reduzidos no espectro de massas. Além disso, aparece também um processo *quasi*-reversível em -402 mV, o qual foi atribuído por comparação com a literatura, ao processo redox Cu(II) → Cu(I) da espécie monomérica^[24].

Figura 17 – Voltamogramas cíclicos registrados para o complexo $[\text{Cu}(\text{tacn}^1\text{Pr}_2)\text{Cl}_2]$. $[\text{Complexo}] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo; eletrodo auxiliar: platina; eletrodo de referência: Ag/AgCl; eletrólito de suporte: TBAPF₆. Solvente: CH₃CN seca. pH aparente = 7,0.



Já nos voltamogramas obtidos em solução de metanol (Figura 18), observa-se dois processos irreversíveis: o primeiro em +60 mV, atribuído tentativamente ao processo $\text{Cu}(\text{II})\text{Cu}(\text{II}) \rightarrow \text{Cu}(\text{I})\text{Cu}(\text{II})$ da espécie dimérica; e o segundo em -257 mV atribuído por comparações com a literatura ao processo redox $\text{Cu}(\text{II}) \rightarrow \text{Cu}(\text{I})$ da espécie monomérica $[\text{Cu}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})(\text{H}_2\text{O})]$, formada após a troca dos ligantes cloreto por ligantes aquo em solução de metanol^[22,24].

Figura 18 - Voltamogramas cíclicos registrados para o complexo $[\text{Cu}(\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2)\text{Cl}_2]$. $[\text{Complexo}] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo; eletrodo auxiliar: platina; eletrodo de referência: Ag/AgCl; eletrólito de suporte: TBAPF6. Solvente: MeOH.



5.2.7. Testes iniciais de reatividade

Com o objetivo de verificar uma possível atividade catalítica análoga às catecol oxidases e nucleases, foram realizados alguns estudos cinéticos iniciais frente a substratos modelos de hidrólise e oxidação, cujos resultados serão apresentados nesta seção. Considerando que os testes são apenas iniciais, sem a realização de triplicatas, não serão calculados os respectivos erros experimentais.

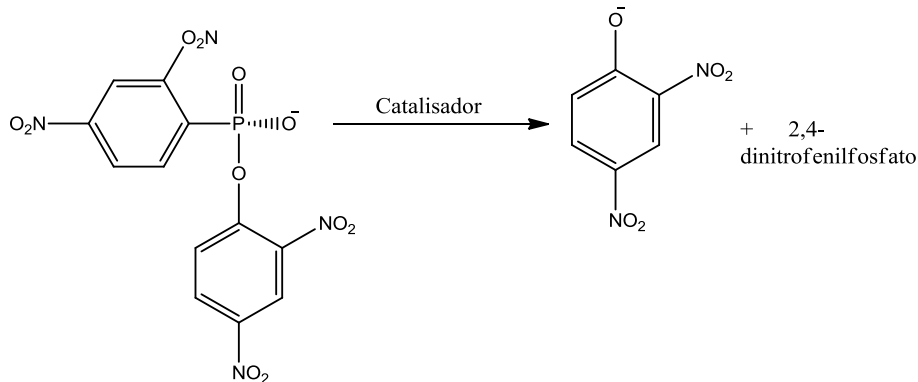
5.2.7.1. Estudos de reatividade frente ao substrato modelo 2,4-bdnpp

A ligação fosfodiéster apresenta-se como uma das ligações mais estáveis encontradas na natureza, fato este que faz com que os estudos relacionados à catálise biomimética dessas ligações recebam grande atenção. A obtenção de uma melhor compreensão da função específica dos íons metálicos em sistemas sintéticos pode não só ajudar no desenvolvimento de hidrolases sintéticas mais eficientes, mas também proporcionar um conhecimento mais profundo do papel dos metais em nucleases naturais e peptidases^[35,36].

Hendry *et al* propuseram algumas bases para o desenvolvimento de complexos metálicos capazes de agir como hidrolases na clivagem das ligações P-O, sendo elas: (i) dois sítios lábeis *cis*-orientados; (ii) redução do pK_a das moléculas de água; (iii) ativação do substrato através do ataque nucleofílico e/ou estabilização do estado de transição; e (iv) liberação dos produtos em uma velocidade razoável. Tendo em vista tais requisitos, o complexo de cobre obtido com o ligante tacn^IPr_2 apresenta-se como um potencial catalisador desta reação, sendo que os íons cloreto aparecem *cis*-orientados na molécula^[37].

O diéster 2,4-bdnpp foi escolhido como substrato para esses estudos por tratar-se de um fosfato bastante reativo, devido à presença de grupos substituintes NO_2 nas posições 2 e 4 dos anéis fenílicos (Figura 19). Substratos ativados têm sido empregados pelo fato de que diésteres de fosfato simples (não ativados), em geral, são extremamente pouco reativos devido às reações de hidrólise serem altamente sensíveis à basicidade do grupo abandonador^[38].

Figura 19 - Representação esquemática da hidrólise do 2,4-bdnpp na presença de um catalisador.



5.2.7.1.1. Efeito do pH na reação de hidrólise do 2,4-bdnpp

Com o intuito de encontrar o pH de máxima atividade e o pK_a cinético, foram realizados estudos do efeito do pH para a reação de hidrólise do substrato 2,4-bdnpp promovida pelo complexo $[\text{Cu}(\text{tacn}^I\text{Pr}_2)\text{Cl}_2]$.

A atividade hidrolítica do complexo foi investigada em uma faixa de pH entre 6,0 – 10,5 para um sistema com excesso de complexo. Levando em consideração a presença da espécie dimérica em solução, a qual não é cataliticamente ativa em reações de hidrólise, a presença de excesso de complexo na reação foi uma

tentativa de anular o efeito que a espécie inativa pode causar ao estudo cinético, considerando estudos já reportados na literatura onde os testes sem o excesso de complexo se mostraram pouco conclusivos^[22]. A Figura 20 mostra o gráfico das velocidades iniciais (v_0) em função dos diferentes valores de pH, onde é possível observar duas regiões onde a velocidade praticamente independe do pH e uma região intermediária a qual sofre forte influência do aumento do pH. Considerando o perfil sigmoidal dos dados obtidos, eles foram tratados pelo modelo de Boltzmann, de maneira que o ponto de inflexão da curva deve fornecer o pK_a cinético, que neste caso teve um valor de 8,5.

Normalmente considera-se o pK_a cinético como o pH onde metade das espécies monoméricas contêm uma água coordenada e um hidróxido coordenado, ou seja, a espécie cataliticamente ativa (Equação 1) formada a partir da troca dos ligantes cloreto (bastante lábeis) por ligantes aquo em solução aquosa. No entanto, deve ser levado em consideração que devido à presença do equilíbrio monômero-dímero, o pK_a cinético obtido não é exatamente relacionado à desprotonação da primeira molécula de água. Este valor é resultante dos múltiplos equilíbrios dependentes do pH envolvendo a espécie mononuclear e a espécie binuclear^[39].

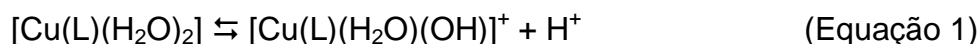
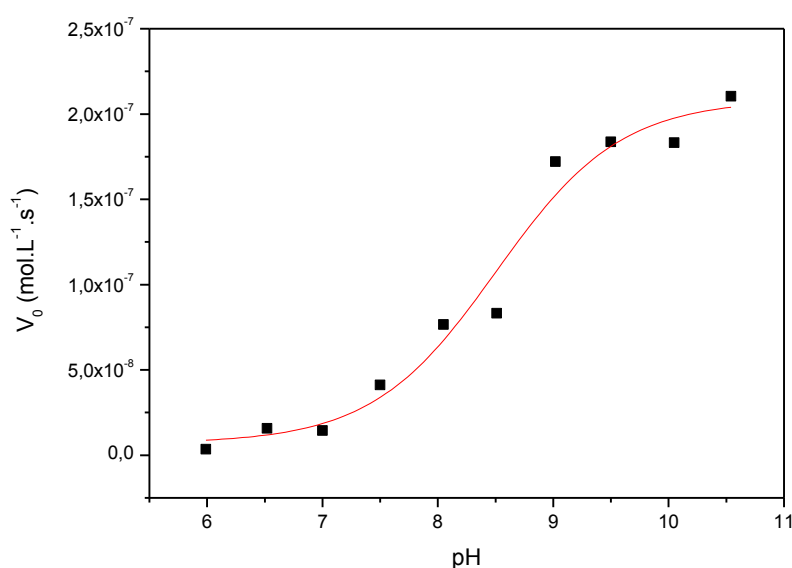


Figura 20 - Dependência da velocidade de reação do complexo $\text{tanc}^{\text{I}}\text{Pr}_2\text{-Cu-Cl}_2$ com o substrato modelo 2,4-bdnpp sobre o pH. Condições: $[\text{Complexo}] = 6,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[2,4\text{-bdnpp}] = 2,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Tampões}] = 6,67 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $T = 50^\circ\text{C}$; solução de CH_3CN .



5.2.7.1.2. Efeito da concentração do substrato na reação de hidrólise do 2,4-bdnpp

A dependência da velocidade de reação de hidrólise do 2,4-bdnpp promovida pelo complexo $[\text{Cu}(\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2)\text{Cl}_2]$ com a concentração do substrato foi investigada em pH 9,0. Os dados foram tratados de acordo com o modelo de Michaelis-Menten, uma vez que a curva apresentou um perfil de saturação, o qual pode ser observado na Figura 21. Pode-se observar que inicialmente a velocidade de clivagem aumenta de forma linear com o aumento da concentração de 2,4-bdnpp, mas gradualmente desvia da linearidade e tende a atingir uma curva de saturação. Os parâmetros cinéticos foram obtidos a partir do tratamento não linear da curva e estes encontram-se na Tabela 6, juntamente com parâmetros de complexos reportados na literatura como possíveis modelos para nucleases/hidrolases.

Figura 21 - Dependência da velocidade da reação de hidrólise com a concentração do substrato 2,4-bdnpp. Condições: $[\text{Complexo}] = 1,67 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{2,4-bdnpp}] = 2,00 \times 10^{-4}$ a $8,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Tampão}] = 6,67 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $T = 50^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 9,0$; solução de CH_3CN .

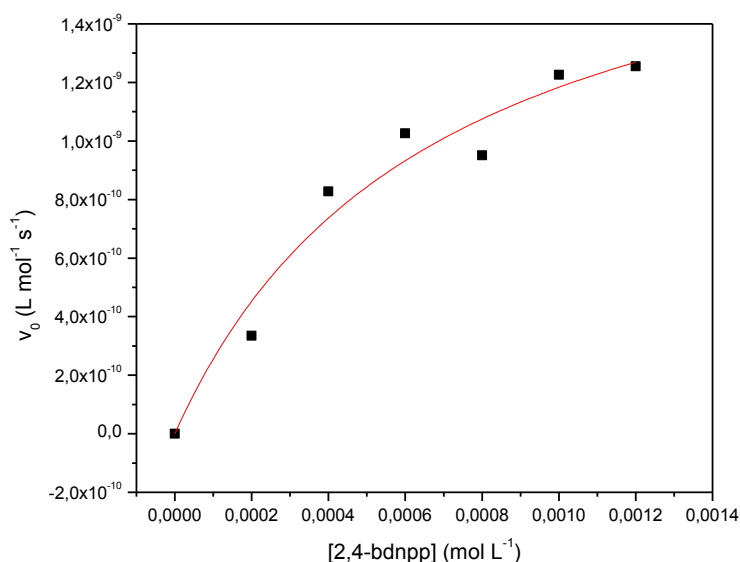


Tabela 6 – Comparação dos parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do 2,4-bdnpp pelo complexo $[\text{Cu}(\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2)\text{Cl}_2]$ com outros complexos da literatura reportados por Scarpellini *et al.*

| Complexo | $V_{\text{máx}}$ ($\text{L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) | K_M (mol L^{-1}) | k_{cat} (s^{-1}) | E_c ($\text{L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) | K_{ass} ($\text{mol}^{-1} \text{ L}$) |
|---|--|----------------------------------|---|---|---|
| $[\text{Cu}(\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2)\text{Cl}_2]$ | $1,99 \times 10^{-9}$ | $6,78 \times 10^{-4}$ | $1,19 \times 10^{-4}$ | 0,18 | 1.475 |

| | | | | | |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------|-----|
| $[\text{Cu}(\text{HISMIMI})\text{Cl}_2]^{[24]}$ | $1,64 \times 10^{-8}$ | $1,73 \times 10^{-2}$ | $3,28 \times 10^{-4}$ | 0,02 | 58 |
| $[\text{Cu}(\text{HISMIMA})\text{Cl}_2]^{[24]}$ | $7,02 \times 10^{-9}$ | $3,03 \times 10^{-3}$ | $1,40 \times 10^{-4}$ | 0,05 | 330 |

Ao correlacionar os parâmetros cinéticos obtidos para a reação de hidrólise do 2,4-bdnpp pelo $[\text{Cu}(\text{tacn}^i\text{Pr}_2)\text{Cl}_2]$ com alguns complexos mononucleares de cobre já reportados, é possível observar que o complexo contendo o ligante facial (tacn^iPr_2) apresentou eficiência catalítica maior que os compostos reportados por Scarpellini *et al.* Neste sentido, os ligantes faciais apresentam uma estrutura mais favorável para acomodar o centro metálico de forma a estabilizar o estado de transição de anel de quatro membros gerado pelo ataque nucleofílico intramolecular (Figura 22). Além disso, levando-se em consideração o valor elevado da constante de associação (K_{ass}) do complexo com o ligante tacn^iPr_2 quando comparada com os valores obtidos para os complexos reportados por Scarpellini *et al.*, é possível perceber que o complexo $[\text{Cu}(\text{tacn}^i\text{Pr}_2)\text{Cl}_2]$ apresenta maior afinidade pelo substrato 2,4-bdnpp^[24].

Com base em resultados obtidos a partir de vários complexos de Co(III), foi proposto por Chin *et al.* que quanto maior o ângulo X-M-X (onde X = átomo *cis*-orientados), maior será a estabilidade do estado de transição com um anel de quatro membros, o qual é formado na reação de hidrólise pelo ataque intramolecular do hidróxido ligado ao metal (Figura 22). Portanto, quanto menor o ângulo X-M-X, melhor seria a eficiência catalítica do complexo, devido à proximidade do nucleófilo ao sítio de ataque^[13,40].

Levando-se em consideração tal proposta e outros complexos com ligantes conhecidos na literatura, pode-se observar que ligantes com coordenação facial (daza, AAZ e tacn) diminuem o ângulo entre os dois íons halogênio na molécula quando comparado com ligantes de coordenação no plano equatorial (HISMIMI e HISMIMA). Nesse caso, espera-se que complexos com ligantes faciais tenham maiores atividades catalíticas, como pode-se observar na Tabela 7^[22].

No entanto, foi reportada uma falta de correlação deste efeito por Hegg *et al.* e Scarpellini *et al.* ao estudarem uma série de complexos de Cu(II) com ligantes macrocíclicos. Foi racionalizado que o núcleo X-M-X é significativamente mais fácil de ser deformado em complexos de Cu(II) do que em complexos de Co(III). Além disso, foi proposto que o equilíbrio dímero-monômero deve ter um papel chave, embora não de responsabilidade direta, pelas diferenças de reatividade desses

compostos, atuando em conjunto com outros fatores (acidez de Lewis, geometria e flexibilidade conformacional do complexo), corroborando a ideia de que mudanças sutis nas estruturas dos complexos podem influenciar diretamente nas suas atividades catalíticas^[24,41].

Figura 22 - Formação do estado de transição com anel de quatro membros proposto para a reação de hidrólise de substratos modelos^[13].

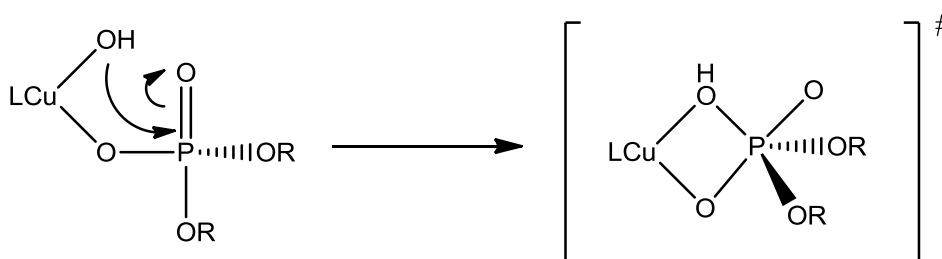


Tabela 7 - Correlação dos ângulos de ligação X-M-X com complexos análogos.

| Complexo | Cl-M-Cl (Å) |
|--|-------------|
| [Cu(tacn)Pr ₂ Cl ₂] | 95,20 |
| [Cu(AAZ)Cl ₂] ^[41] | 94,83 |
| [Cu(Hdaza)Cl ₂] ^[22] | 95,54 |
| [Cu([9]aneN ₃)Cl ₂] ^{(a)[40]} | 94,23 |
| [Cu(HISMIMI)Cl ₂] ^[24] | 103,22 |
| [Cu(HISMIMA)Cl ₂] ^[24] | 100,23 |

^(a) aneN₃ = tacn

5.2.7.1.3. Efeito da concentração do complexo na reação de hidrólise do 2,4-bdnpp

Com o intuito de determinar a ordem da reação em relação ao complexo, foram realizados estudos cinéticos de dependência da velocidade com a concentração do complexo. O experimento foi realizado em pH 9,0 e os dados de v_0 versus concentração do complexo foram tratados utilizando o modelo de Michaelis-Menten (Figura 23) e os parâmetros cinéticos obtidos podem ser observados na Tabela 8.

Figura 23 - Dependência da velocidade da reação de hidrólise do 2,4-bdnpp com a concentração do complexo $\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2\text{-Cu-Cl}_2$. Condições: : [Complexo] = $1,67 \times 10^{-4}$ a $7,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; [2,4-bdnpp] = $3,33 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹; [Tampão] = $6,67 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; T = 50°C; pH = 9,0; solução de CH₃CN.

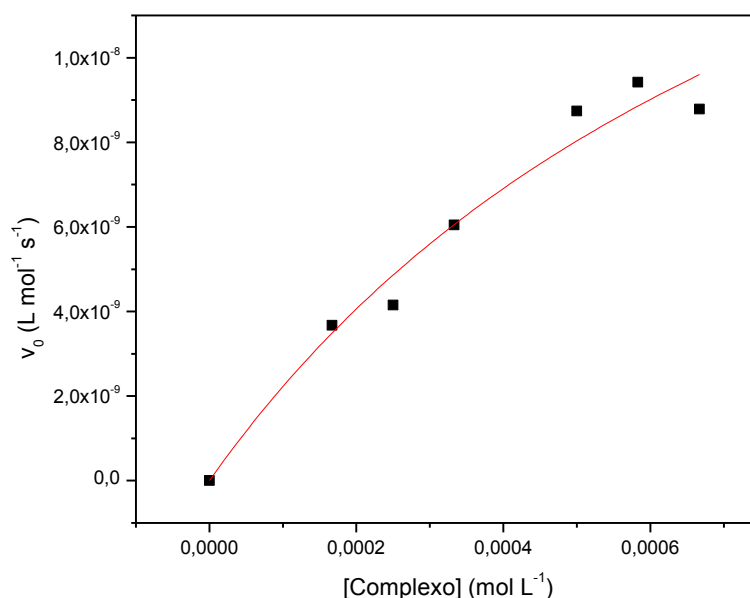
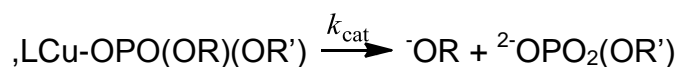
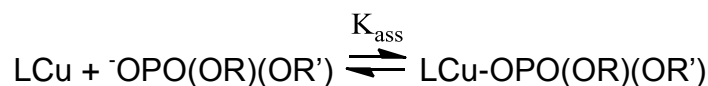


Tabela 8 - Parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do 2,4-bdnpp pelo complexo $\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2\text{-Cu-Cl}_2$ em pH 9,0, obtidos a partir de estudos de efeito da concentração do complexo na velocidade de reação.

| $v_{\text{máx}}$ (L mol ⁻¹ s ⁻¹) | K_{M} (mol L ⁻¹) | $k_{1/2}$ (mol ^{-1/2} L ^{1/2} s ⁻¹) | E_{c} (L mol ⁻¹ s ⁻¹) | K_{ass} (mol ⁻¹ L) |
|--|--|--|--|---|
| $2,43 \times 10^{-8}$ | $9,58 \times 10^{-4}$ | $1,20 \times 10^{-1}$ | 7,62 | 1.044 |

O gráfico da constante de velocidade (k_{obs}) em função da concentração do complexo (Figura 24) mostra um comportamento não-linear, onde foi obtida uma curva com perfil de saturação. Tal comportamento não-linear tem sido observado para outros complexos mononucleares de Cu(II) e demonstrado ser referente à existência de um equilíbrio monômero-dímero, onde o monômero $[\text{Cu}(\text{L})(\text{OH}_2)(\text{OH})]^+$ é a espécie cataliticamente ativa. Este comportamento tem sido tratado como uma dependência de meia-ordem da velocidade da reação de hidrólise com relação ao complexo^[13,40,43].

Os dados foram linearizados através do gráfico de k_{obs} versus a raiz quadrada da concentração do complexo. Uma equação de velocidade de meia-ordem (Equação 2) foi deduzida por Deal *et al* para esse tipo de sistema^[39]:



$$[\text{LCu}] = \frac{[\text{LCu}] = (-0,5 + (2K_f [\text{Cu}_T])^{1/2}}{2K_f}$$

$$v = \frac{d[\text{OR}]}{dt} = k \cdot \left[\frac{(-0,5 + (2K_f [\text{Cu}_T])^{1/2}}{2K_f} \right] \quad (\text{Equação 2})$$

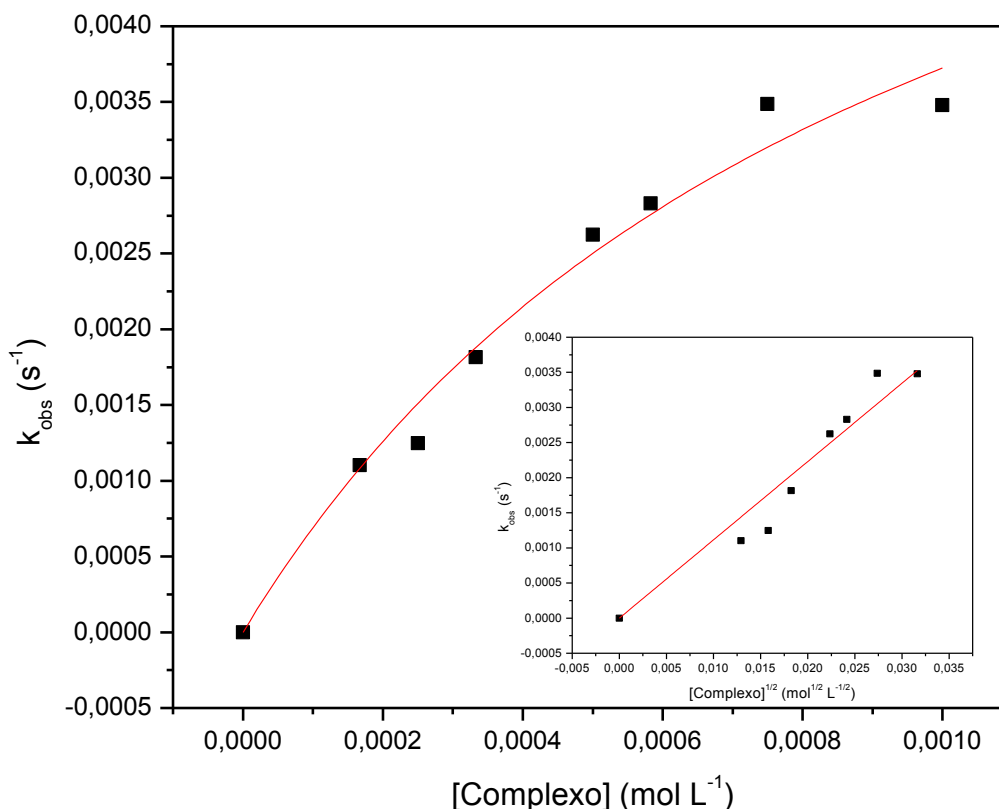
$$k = k_{\text{cat}} \cdot K_{\text{ass}} \cdot [\text{OPO(OR)(OR')}]$$

Onde $[\text{LCu}]$ = concentração do monômero reativo, $[\text{Cu}_T]$ = concentração total de cobre e K_f = constante de equilíbrio monômero-dímero.

A partir dessa equação é possível encontrar uma constante de formação do dímero (K_f) e uma constante de primeira ordem (k) a partir dos dados cinéticos. Foi obtido um valor de 1601 L mol^{-1} para a constante de formação do dímero (K_f) e uma constante de primeira ordem de $2,54 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (k).

Hegg *et al* concluíram, ao estudar diferentes ligantes triaminas cíclicas ($\text{Cu}([\text{9}] \text{aneN}3)$, $\text{Cu}([\text{10}] \text{aneN}3)$ e $\text{Cu}([\text{11}] \text{aneN}3)$), que existe uma correlação entre o valor de K_f e a constante k , indicando que o equilíbrio monômero-dímero é um fator determinante na velocidade de hidrólise do 2,4-bdnpp. A velocidade da reação de hidrólise aumenta na medida em que K_f diminui (e maior é a concentração do monômero reativo). Além disso, foi observada uma relação inversa entre o pK_a cinético registrado e a constante de formação, de forma que quanto maior a constante de formação, menor seria o pK_a ^[41].

Figura 24 - Dependência da taxa de hidrólise (k_{obs}) do 2,4-bdnpp com a concentração do complexo. Condições: $[\text{Complexo}] = 1,67 \times 10^{-4}$ a $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[2,4\text{-bdnpp}] = 3,33 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Tampão}] = 6,67 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $T = 50^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 9,0$; solução de CH_3CN .



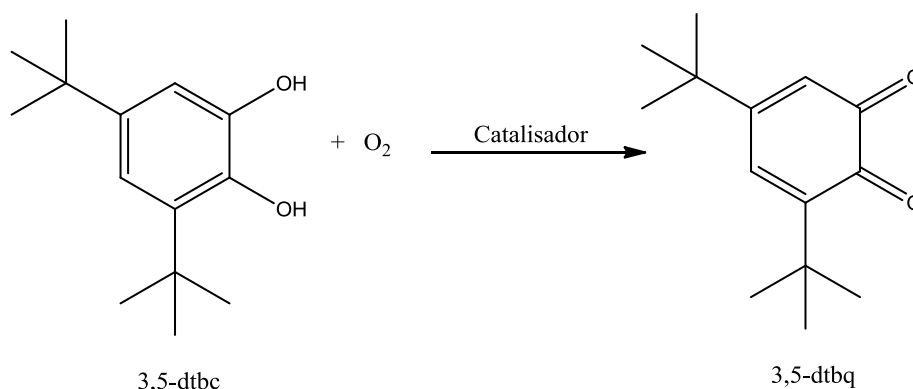
5.2.7.2. Estudos de reatividade frente ao substrato modelo 3,5-dtbc

Com o intuito de compreender como um sítio ativo, aparentemente específico para uma determinada função, poderia apresentar atividade promíscua, têm sido reportados uma série de estudos sobre complexos que apresentam esta atividade multifuncional. No entanto, tais experimentos ainda são escassos na literatura. Um exemplo de complexo com comprovada promiscuidade catalítica é o $[\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})_2\text{Fe}^{\text{II}}](\text{ClO}_4)\cdot\text{H}_2\text{O}$, reportado por Neves *et al*, o qual apresenta atividade de clivagem de ligações fosfodiéster em substratos modelo (como o 2,4-bdnpp) e no DNA, além de apresentar atividade frente à reação de oxidação do substrato 3,5-dtbc^[12,29].

Assim, experimentos cinéticos foram realizados para investigar a capacidade do complexo $[\text{Cu}(\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2)\text{Cl}_2]$ de promover a oxidação do substrato modelo 3,5-di-

tert-butilcatecol (3,5-dtbc). A reação de oxidação deste substrato apresenta como produto a 3,5-di-*tert*-butilquinona (3,5-dtbq), a qual apresenta uma banda de $\epsilon = 1645 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ em 400 nm (Figura 25). Este substrato é considerado adequado para o estudo por apresentar um baixo potencial redox, o que facilita a formação da 3,5-dtbq, além dos seus substituintes volumosos impedirem que ocorram reações como a abertura do anel formado durante a reação^[21,43,44].

Figura 25 - Oxidação do 3,5-dtbc na presença de O₂.

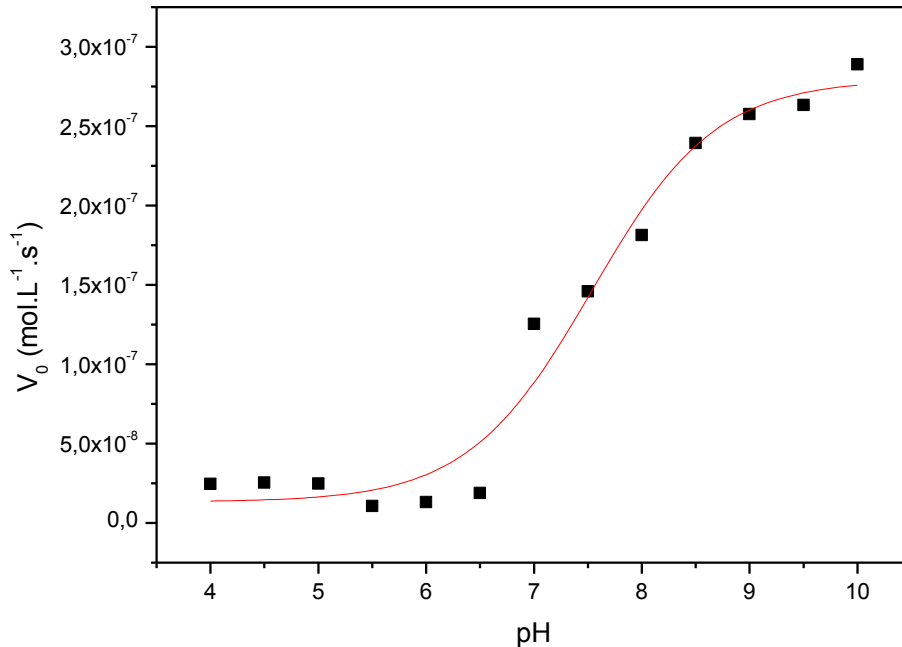


5.2.7.2.1. Efeito do pH na reação de oxidação do 3,5-dtbc

Assim como nos estudos de reação de hidrólise, o estudo do efeito do pH na reação de oxidação é realizado com o intuito de determinar o pH ótimo da reação, bem como obter o valor do pK_a cinético.

O estudo foi realizado em uma faixa de pH entre 4,0 – 10,0 e o gráfico obtido a partir dos dados de velocidade *versus* pH apresenta duas regiões onde a velocidade praticamente independe do pH e uma região fortemente influenciada pelo aumento do pH (Figura 26). Os dados foram tratados com o modelo de Boltzmann, de maneira que o ponto de inflexão da curva fornece o pK_a cinético da reação, que neste caso tem valor 7,5. Neste caso o pK_a cinético obtido pode ser resultante dos múltiplos equilíbrios dependentes do pH envolvendo a espécie mononuclear e a espécie binuclear ou estar relacionado com a desprotonação do substrato 3,5-dtbc.

Figura 26 - Dependência da velocidade de reação do complexo $\text{tanc}^{\text{I}}\text{Pr}_2\text{-Cu-Cl}_2$ com o substrato modelo 3,5-dtbc sobre o pH. Condições: $[\text{Complexo}] = 3,33 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{3,5-dtbc}] = 3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Tampões}] = 6,67 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $T = 25^\circ\text{C}$; solução de MeOH.



5.2.7.2.2. Efeito da concentração do substrato na reação de oxidação do 3,5-dtbc

Uma vez que a reação de oxidação do substrato modelo 3,5-dtbc pelo complexo estudado se mostrou dependente do pH, foram realizados estudos cinéticos no pH ótimo da reação (8,5), com o intuito de obter os parâmetros cinéticos da reação.

Na Figura 27 encontra-se o gráfico das velocidades iniciais (v_0) em função da concentração de substrato, cujos valores foram tratados com o modelo de Michaelis-Menten devido ao perfil de saturação apresentado pela curva. Os parâmetros cinéticos obtidos encontram-se na Tabela 9.

Figura 27 - Dependência da velocidade da reação de oxidação com a concentração do substrato 2,4-bdnpp. Condições: [Complexo] = $1,67 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; [3,5-dtbc] = $5,00 \times 10^{-4}$ a $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; [Tampão] = $6,67 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; T = 25°C; pH = 8,5; solução de MeOH.

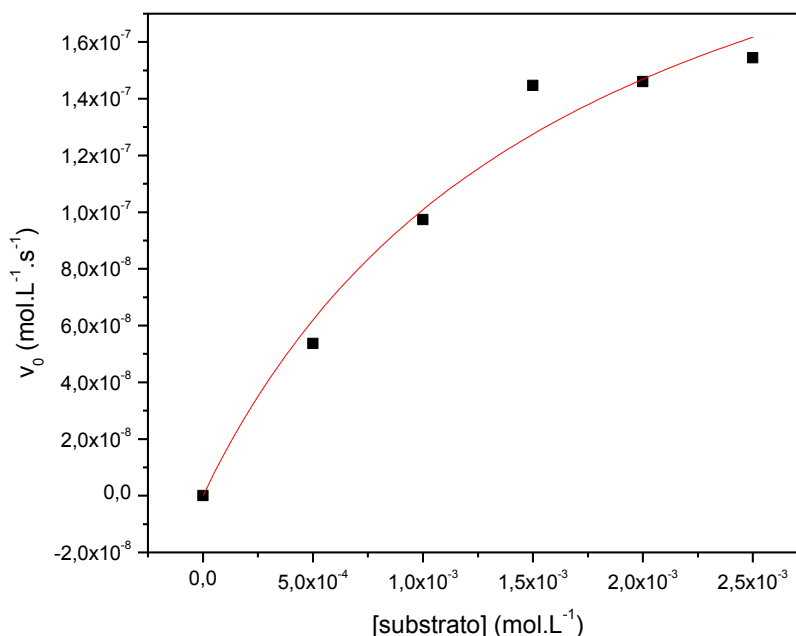


Tabela 9 - Comparação dos parâmetros cinéticos para a reação de oxidação do 3,5-dtbc pelo complexo [Cu(tacn^IPr₂)Cl₂] com outros complexos da literatura.

| Complexo | V _{máx} (L mol ⁻¹ s ⁻¹) | K _M (mol L ⁻¹) | k _{cat} (s ⁻¹) | E _c (L mol ⁻¹ s ⁻¹) | K _{ass} (mol ⁻¹ L) |
|---|--|--|--|--|---|
| [Cu(tacn ^I Pr ₂)Cl ₂] | $1,61 \times 10^{-7}$ | $1,68 \times 10^{-3}$ | $9,64 \cdot 10^{-3}$ | 5,74 | 595,24 |
| [Cu(Hbpaa-CH ₃)Cl] ⁺ [22] | (9,18 ± 0,58) x 10 ⁻⁷ | (3,50 ± 0,33) x 10 ⁻³ | 0,031 ± 0,21 | 8,95 ± 0,98 | 288,3 ± 27,18 |
| [Cu(Hbpaa-H)Cl] ⁺ [22] | (9,99 ± 0,15) x 10 ⁻⁷ | (4,56 ± 0,75) x 10 ⁻³ | 0,034± 0,05 | 7,63± 1,15 | 225,4± 37 |
| [Cu ₂ (HL ₁)(μ-OAc)] ^[45] | $5,58 \times 10^{-7}$ | $2,66 \times 10^{-3}$ | 0,023 | 8,75 | 375,23 |

Os parâmetros cinéticos obtidos (Tabela 9) mostraram uma boa reatividade do complexo frente à reação de oxidação do substrato 3,5-dtbc, apresentando uma eficiência catalítica de $5,74 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Ao correlacionar o complexo em estudo com

complexos de cobre reportados na literatura como possíveis modelos para catecol oxidase, é possível perceber que o $[\text{Cu}(\text{tacn}^{\text{I}}\text{Pr}_2)\text{Cl}_2]$ apresenta boa eficiência catalítica, mas não melhor do que outros complexos mononucleares reportados por Chaves e o complexo binuclear reportado por Osório. Esta diferença na reatividade pode estar relacionada com a presença do equilíbrio monômero-dímero, que já provou ser fator determinante também na catálise hidrolítica de ligações P-O^[18,46].

Considerando os resultados obtidos na eletroquímica, a provável espécie cataliticamente ativa para a reação de oxidação é a espécie dimérica, que apresentou maior facilidade de redução de um dos centros metálicos. No entanto, qualquer proposta neste sentido torna-se bastante especulativa devido à pouca investigação realizada neste trabalho com relação à reação de oxidação e ao fato de que a espécie dimérica não foi isolada. Além disso, os valores de potencial redox nas medidas de voltametria cíclica foram atribuídos tentativamente com base em sistemas análogos encontrados na literatura, não sendo, portanto, inegavelmente corretos. Mais estudos devem ser realizados com o intuito de ajudar a esclarecer qual é de fato a espécie cataliticamente ativa, tais como experimentos de efeito da concentração do complexo na velocidade da reação e estudos de EPR em solução na presença do substrato 3,5-dtbc.

6. CONCLUSÕES

Os ligantes precursores eg-ts₂, deta-ts₃, tacn-ts₃ e tacn-ts, assim como o ligante final tacnⁱPr₂, foram sintetizados com a obtenção de bons rendimentos e com o grau de pureza adequado. A formação do ligante e de seus precursores foi constatada através da caracterização por espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e, no caso do ligante final, também por espectrometria de massas.

A partir do ligante tacnⁱPr₂ sintetizou-se um complexo de Cu(II), [Cu(tacnⁱPr₂)Cl₂], o qual teve sua estrutura de raios X resolvida e foi caracterizado por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas. A geometria de coordenação observada para o complexo obtido foi de pirâmide de base quadrada distorcida. As análises de espectrometria de massas e voltametria cíclica indicaram a presença de um equilíbrio entre as espécies monomérica e dimérica em solução.

Estudos iniciais de reatividade do complexo [Cu(tacnⁱPr₂)Cl₂] frente à hidrólise do substrato 2,4-bdnpp registraram um pK_a cinético de 8,5 ao ser analisado o efeito do pH na velocidade de reação. Este pK_a não diz respeito exatamente ao pK_a de desprotonação de uma água coordenada ao metal, mas resulta de múltiplos equilíbrios dependentes do pH envolvendo a espécie mononuclear e a espécie binuclear. Foi observada nesses estudos de reatividade uma dependência de meia-ordem com relação ao complexo e de primeira ordem com relação ao substrato. Constatou-se, a partir de experimentos iniciais de reatividade, que o complexo [Cu(tacnⁱPr₂)] apresenta boa eficiência catalítica na clivagem da ligação P-O e também maior afinidade com o substrato quando comparado com complexos de ligantes abertos reportados na literatura.

Os resultados obtidos pelo complexo em estudos iniciais de oxidação do substrato 3,5-dtbc demonstraram que o composto apresenta promiscuidade catalítica, apresentando boa atividade ($E_c = 5,74 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) também na catálise oxidativa de catecóis. No entanto, é bastante difícil definir qual a espécie responsável por esta reação, considerando o equilíbrio dímero-monômero presente em solução.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ KAIM, W.; SCHWEDERSKI, B. **Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life – an introduction and guide**. Chichester: John Wiley & Sons, 1994, 400 p.

² BARAN, E. J. **Metales esenciales para la vida**. *Ciencia Hoy*, v.2, 1990. p. 50-57.

³ LIPPARD, S. J.; BERG, J. M. **Principles of Bioinorganic Chemistry**. Mill Valley, CA: University Science Books, 1994, 411 p.

⁴ GRAY, H. B. Biological inorganic chemistry at the beginning of the 21st century. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 7, 2003. p. 3563-3568.

⁵ WISNIAK, J. The history of catalysis. From the beginning to Nobel prizes. **Educ. Quím.**, v. 21, 2010. p. 60-69.

⁶ LINDSTRÖM, B.; PETTERSON, L. J. A brief history of catalysis. **CATTECH**, v. 7, n. 4, 2003. p. 130-138.

⁷ KOVAL, I. A., GAMEZ, P., BELLE, C., SELMECZI, K., REEDIJK, J. Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies. **Chemical Society Reviews**, v. 35, 2006. p. 814-840.

⁸ LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. New York: Worth Publishers, 2000. 1302 p.

⁹ MORAN, L. A.; HORTON, H. R.; SCRIMGEOUR, K. G.; PERRY, M. D. **Bioquímica**. 5. ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2013, 792 p.

¹⁰ KAIM, W.; RALL, J. Copper – A “modern” bioelement. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 35, 1996. p. 43-60.

¹¹ KHERSONSKY, O.; ROODVELDT, C.; TAWFIK, D. S. Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. **Current Opinion in Chemical Biology**, 2006, v. 10, p. 498-508.

¹² HULT, K.; BERGLUND, P. Enzyme promiscuity: mechanisms and applications. **Trends in Biotechnology**, 2007, v. 25, n. 5, p.231-238.

¹³ CARBONI-OERLEMANS, C.; et al. Hydrolase-catalysed synthesis of peroxycarboxylic acids: Biocatalytic promiscuity for practical applications. **Journal of Biotechnology**, 2006, v. 126, p. 140-151.

¹⁴ SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, V. M.; MACHONKIN, T. E. Multicopper oxidases and oxygenases. **Chemical Reviews**, v.96, 1996. p. 2563-2605.

¹⁵ KRÄMER, R. Bioinorganic models for the catalytic cooperation of metal ions and functional groups in nuclease and peptidase enzymes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 182, 1999, p. 243–261.

¹⁶ BELLE, C.; SELMECZI, K.; TORELLI, S.; PIERRE, L. J. Chemical tools for mechanistic studies related to catechol oxidase activity. **Comptes Rendus Chimie**, 2006. 272 p.

¹⁷ KLABUNDE, T.; EICKEN, C.; SACCHETTINI, J. C.; KREBS, B. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. **Nature America**, v. 5, n. 12, 1998. p. 1084-1090.

¹⁸ CHAVES, C. C. V. **Síntese, caracterização e atividade de catecolase de complexos de cobre com ligantes tripodais**. Florianópolis, 2014. 106 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

¹⁹ NEVES, A. **Química bioinorgânica**. Florianópolis: LED, 2001. 139p.

²⁰ OSÓRIO, R. E-H. M. B. **Síntese e Caracterização de Novos Ligantes Macrocíclicos ou Intercalantes e Seus Respective Complexos Trinucleares de Cobre(II) e/ou Binucleares de Ferro(III) como Modelos Miméticos para Hidrolases/Nucleases Sintéticas**. Florianópolis, 2012. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

²¹ PANDA, M. K., SHAIKH, M. M., BUTCHER, R. J., GHOSH, P. Functional mimics of catechol oxidase by mononuclear copper complexes of sterically demanding [NNO] ligands. **Inorganica Chimica Acta**, 2011, v. 372, p. 145-151.

²² WESTRUP, K. C. M. **Síntese, Caracterização e Estudo da Reatividade de Complexos Mononucleares de Cobre(II) como Sistemas Modelos para Hidrolases/Nucleases e Catecolases**. Florianópolis, 2011. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

²³ FERNANDES, C.; *et al.* Synthesis, crystal structure, nuclease and in vitro antitumor activities of a new mononuclear copper(II) complex containing a tripodal N₃O ligand. **Inorganica Chimica Acta**, 2006, v. 359, p.3167-3176.

²⁴ SCARPELLINI, M. *et al.* Phosphate diester hydrolysis and DNA damage promoted by new *cis*-aqua/hydroxy copper(II) complexes containing tridentate imidazole-rich ligands. **Inorganic Chemistry**, 2003, v. 42, p. 8353-8365.

²⁵ PAULY, J. W.; *et al.* The coordination chemistry of *cis*-3,5-diaminopiperidine and substituted derivatives. **Chemistry European Journal**, 2000, v. 6, n. 15, p. 2830-2846.

²⁶ ROMBA, J.; *et al.* The coordination Chemistry of 1,4- Diazepan-6-amine. **European Journal of Inorganic Chemistry**, 2006, p. 314-328.

²⁷ XAVIER, F. R. **Desenvolvimento de complexos heterobinucleares a partir de ligantes binucleantes contendo braços macrocíclicos, piridínicos e fenólicos como modelos de hidrolases/nucleases químicas.** Florianópolis, 2010. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

²⁸ BUNTON, C. A.; FARBER, S. J. The hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenil)phosphate. **The Journal of Organic Chemistry**, 1969, v. 34, n. 4, p. 767-772.

²⁹ NEVES, A. *et al.* Catalytic Promiscuity: Catecholase-like Activity and Hydrolytic DNA Cleavage Promoted by a Mixed-Valence Fe^{III}Fe^{II} Complex. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2010, v. 21, n. 7, p. 1201-1212.

³⁰ ADDISON, A. W.; *et al.* Synthesis, structure, and spectroscopic properties of copper(II) compounds containing nitrogen-sulfur donor ligands: the crystal and molecular structure of aqua[1,7-*bis*(N-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane]copper(II) perchlorate. **Journal Chemistry Society**, 1984, Dalton Transactions, p. 1349-1346.

³¹ GEARY, W.J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds. **Coordination Chemical Reviews**, 1971, v.7, p. 81-122.

³² MIESSLER, G. L., TARR, D. A. **Química inorgânica.** São Paulo: Pearson, 2014, 5ª ed., 702 p.

³³ LEVER, A. B. P. **Inorganic electronic spectroscopy.** Amsterdam: Elsevier, 1984, v. 1, 420 p.

³⁴ HUHEEY, J. E. **Inorganic chemistry: principles of structure and reactivity.** New York: Harper Collins, 1993, 4ª ed., 964 p.

³⁵ HEGG, E. L.; BURSTYN, J. N. Toward the development of metal-based synthetic nucleases and peptidases: a rationale and progress report in applying the principles of coordination chemistry. **Coordination Chemistry Reviews**, 1998, v. 173, p. 133-165.

³⁶ WOLFENDEN, R.; SNIDER, M. J. The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. **Accounts of Chemical Research**, 2001, v. 34, n. 12, p. 938-945.

³⁷ HENDRY, P.; SARGESON, A. M. Metal ion promoted phosphate ester hydrolysis. Intramolecular attack of coordination hydroxide ion. **Journal of the American Chemical Society**, 1989, v. 111, p. 2521-2527.

³⁸ KIRBY, A. J.; YOUNAS, M. The reactivity of phosphate esters. Diester hydrolysis. **Journal of the Chemical Society**, 1970, p. 510-513.

³⁹ DEAL, K. A.; BURSTYN, J. N. Mechanistic studies of dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-catalyzed phosphate diester hydrolysis. **Inorganic Chemistry**, 1996, v. 35, p. 2792-2798.

⁴⁰ CHIN, J.; BANASZCZYK, M.; JUBIAN, V.; ZOU, X. Co(III) Complex Promoted Hydrolysis of Phosphate Diesters: Comparison in Reactivity of Rigid *cis*-Diaquotetraazacobalt(III) Complexes. **Journal of the American Chemical Society**, 1989, v. 111, p.186-190.

⁴¹ HEGG, E. L. *et al.* Structure-reactivity studies in copper(II)-catalyzed phosphodiester hydrolysis. **Inorganic Chemistry**, 1999, v. 38, p. 2961-2968.

⁴² TERRA, G. G.. **Síntese, Caracterização e Ensaio Cinéticos de Novos Complexos com o Ligantes 6-amino-6-metilperhidro-1,4-diazepina (AAZ)**. Florianópolis, 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós Graduação em Química.

⁴³ YOUNG, M. J. *et al.* Reactivity of copper(II) hydroxides and copper(II) alkoxides for cleaving an activated phosphate diester. **Journal of the American Chemical Society**, 1995, v. 117, p. 9441-9447.

⁴⁴ BANU, K. S. *et al.* Catechol Oxidase Activity of a Series of New Dinuclear Copper(II) Complexes with 3,5-DTBC and TCC as Substrates: Syntheses, X-Ray Crystal Structures, Spectroscopic Characterization of the Adducts and Kinetics Studies. **Inorganic Chemistry**, 2008, v. 47, p. 7083-7093.

⁴⁵ MARION, R., *et al.* Rate enhancement of the catechol oxidase activity of a series of biomimetic monocopper(II) complexes by introduction of non-coordinating groups in N-tripodal ligands. **New Journal of Chemistry**, Royal Society of Chemistry, 2012, 36, pp.1828-1835.

⁴⁶ OSÓRIO, B. M. E. R. **Novos ligantes e complexos binucleares de cobre(II) promíscuos: modelos miméticos para as enzimas catecol oxidases e hidrolases/nucleases sintéticas.** Florianópolis, 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós Graduação em Química.