

Alana da Maia Homrich

**NOVOS COMPLEXOS BINUCLEARES DE COBRE(II):
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE BIOMIMÉTICA
DE CATECOLASE E ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM DNA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Rosely A. Peralta

Coorientador: Prof. Dr. Hernán F. Terenzi

Florianópolis
2019

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

Homrich, Alana da Maia

Novos complexos binucleares de cobre(II):
síntese, caracterização, atividade biomimética de
catecolase e estudos de interação com DNA / Alana da
Maia Homrich ; orientadora, Rosely Aparecida
Peralta, coorientador, Hernán Francisco Terenzi,
2019.

157 p.

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

Inclui referências.

1. Química. 2. Complexos de cobre. 3. Compostos
biomiméticos. 4. Catecol oxidase. 5. Clivagem de
DNA. I. Peralta, Rosely Aparecida. II. Terenzi,
Hernán Francisco. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química.
IV. Título.

Alana da Maia Homrich

**NOVOS COMPLEXOS BINUCLEARES DE COBRE(II):
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE BIOMIMÉTICA
DE CATECOLASE E ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM O DNA**

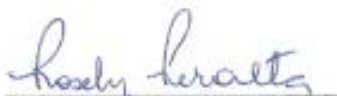
Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Química” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química.

Florianópolis, 19 de fevereiro de 2019.

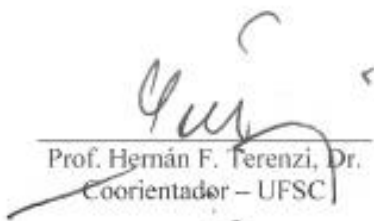


Prof. Vanderlei Gageiro Machado, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



Prof.^a Rosely A. Peralta, Dr.^a
Orientadora – UFSC



Prof. Hermán F. Terenzi, Dr.
Coorientador – UFSC



Prof. Bernardo de Souza, Dr.
Departamento de Química
UFSC



Prof.^a Rószangela C. Pedrosa, Dr.^a
Departamento de Bioquímica
UFSC

Dedico este trabalho aos meus pais,
pelo amor e compreensão infindáveis.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Simone e Paulo, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo amor que transborda.

Aos meus amigos, pelo incentivo constante, por serem parceiros nos bons momentos e um refúgio nos dias ruins. Ao Lucas, à Nicolle e às meninas da casa (Géssica, Marcela, Juslaine, Kah e Bianca): vocês foram essenciais para este trabalho.

Aos colegas do Labinc e do Cebime, por todas as reflexões (sejam elas científicas ou não), pelas toneladas de café e pelas comidinhas nada saudáveis. Obrigada por me aturarem! Em especial, agradeço à Cacau, ao André Boss e à Luana, pelas conversas e cafés de manhã cedo no Labinc. Ao André Roos e à Sarita, pela parceria nos turnos noturnos. À Claudia Pereira, por toda a contribuição na síntese dos ligantes. À Renata e ao Marcos, pelas conversas sobre as cinéticas de catecolase e sobre a química, de modo geral. À Beatriz, por tornar minhas manhãs no Cebime as mais animadas possíveis. À Karliane, ao Tomás, à Ruthênia, à Fabi, ao Philipe e à Nat, por todas as risadas e por me aceitarem como cebimete.

À professora Rosely Peralta, agradeço pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação e pelos bordões inesquecíveis.

Agradeço também ao professor Hernán Terenzi, por me acolher no Cebime e possibilitar que eu chegasse mais longe do que imaginava.

Aos membros da banca, pelas sugestões de melhoria no trabalho.

Aos funcionários da UFSC, do Departamento de Química e do Programa de Pós-Graduação em Química pela infraestrutura fornecida.

Ao CNPq pela bolsa concedida, à CAPES e ao INCT-Catálise pelos recursos financeiros.

Por fim, agradeço especialmente ao Governo Federal que oportunizou a minha formação em uma universidade pública, gratuita e de qualidade.

“What we know is a drop, what we don’t
know is an ocean.”

(Isaac Newton)

RESUMO

Este trabalho consiste na síntese, caracterização e estudos de atividade de três novos complexos binucleares de cobre(II) como modelos biomiméticos e como agentes de clivagem de DNA. Os complexos foram sintetizados a partir de ligantes que se diferenciam pela quantidade de átomos de carbono, sendo estes ligantes caracterizados via RMN de ^1H , espectroscopia de IV e espectrometria de massas. Os complexos foram caracterizados por espectroscopia na região do UV-Vis e IV, espectrometria de massas, absorção atômica, voltametria de onda quadrada e titulação espectrofotométrica. Estudos cinéticos de oxidação do 3,5-di-*terc*-butilcatecol na presença dos complexos evidenciaram que estes mimetizam a ação da catecol oxidase por meio de um mecanismo distinto do realizado pela enzima. Ensaio com DNA plasmidial e CT-DNA elucidaram que os complexos interagem com o DNA via atração eletrostática e ligação pelos sulcos e que a clivagem é realizada por uma via preferencialmente oxidativa. Os parâmetros cinéticos da oxidação do 3,5-di-*terc*-butilcatecol e da clivagem do DNA plasmidial foram determinados e auxiliaram a compreender que as alterações no número de membros dos anéis quelatos dos complexos influenciam na sua atividade frente aos substratos estudados, sendo a alteração no lado macio dos complexos a mais significativa.

Palavras-chave: Complexos de cobre. Compostos biomiméticos. Catecol oxidase. Clivagem de DNA.

ABSTRACT

Herein we show the synthesis, characterization and evaluation of the activity of three new binucleating copper(II) complexes, both as biomimetic models and as DNA-cleaving agents. The complexes were synthesized using ligands that have different number of carbon atoms as spacer groups. The ligands were characterized by ^1H NMR and IR spectroscopies and mass spectrometry. The complexes were characterized by UV-Vis and IR spectroscopies, mass spectrometry, atomic absorption spectroscopy, square wave voltammetry and spectrophotometric titration. Oxidative kinetic studies of the substrate 3,5-di-*tert*-butylcatechol in the presence of the complexes evidenced that the compounds act as catechol oxidase mimetics by a distinct mechanism of the enzyme. Assays using plasmid DNA and CT-DNA helped to elucidated that the complexes interact electrostatically, binding by the grooves, and the cleavage occurs mainly by an oxidative pathway. The oxidation kinetic parameters of the 3,5-di-*tert*-butylcatechol and of the plasmid DNA cleavage were determined and helped to gain insight in how the modifications in the chelate ring members of the complexes influenced in the activity of these substrates, with the most significant differences detected in the softer moiety.

Keywords: Copper complexes. Biomimetic Compounds. Catechol Oxidase. DNA cleavage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da oxidação do catecol pelo oxigênio molecular catalisada pela catecol oxidase.	36
Figura 2 – Estrutura tridimensional da CO extraída da batata doce <i>Ipomoeas batatas</i> . Átomos de cobre estão representados em laranja, α hélices em azul, folhas β em verde e ligações dissulfeto em amarelo... 37	37
Figura 3 – Representação esquemática do sítio ativo da CO extraída da batata doce <i>Ipomoeas batatas</i> na forma <i>met</i> . Átomos de cobre estão representados em laranja, oxigênio em vermelho e nitrogênio em azul.38	38
Figura 4 – Principais propostas do mecanismo da CO.	39
Figura 5 – Estruturas dos ligantes mencionados na Tabela 1.	41
Figura 6 – Exemplos de ligantes utilizados na síntese de biomiméticos da CO.	42
Figura 7 – Estrutura do ligante H_2py_3mff	43
Figura 8 – Estrutura dos ligantes $H_2L1bpea$ (à esquerda) e $H_2L2bpea$ (à direita), destacando as modificações em relação ao H_2py_3mff	43
Figura 9 – Rota sintética para a obtenção dos precursores e ligante H_2py_3mff	50
Figura 10 – Esquema da síntese do $cmff$	50
Figura 11 – Espectro de IV (ATR) do $cmff$	52
Figura 12 – Espectro de RMN de 1H do $cmff$ em $CDCl_3$	52
Figura 13 – Esquema da síntese do $bpma$	53
Figura 14 – Espectro de IV (ATR) do $bpma$	54
Figura 15 – Espectro de RMN de 1H do $bpma$ em $CDCl_3$	54
Figura 16 – Esquema da síntese do $bpmamff$	55
Figura 17 – Espectro de IV (ATR) do $bpmamff$	56
Figura 18 – Espectro de RMN de 1H do $bpmamff$ em $CDCl_3$	56
Figura 19 – Esquema da síntese do Hpy_3	57
Figura 20 – Espectro de IV (ATR) do Hpy_3	58
Figura 21 – Espectro de RMN de 1H do Hpy_3 em $CDCl_3$	58
Figura 22 – Esquema da síntese do H_2py_3mff	59
Figura 23 – Espectro de IV (ATR) do H_2py_3mff	60
Figura 24 – Espectro de RMN de 1H do H_2py_3mff em $CDCl_3$	60
Figura 25 – Rota sintética para a obtenção dos precursores e ligante $H_2L1bpea$	61
Figura 26 – Esquema da síntese do $bpea$	62
Figura 27 – Espectro de IV (ATR) do $bpea$	63
Figura 28 – Espectro de RMN de 1H do $bpea$ em $CDCl_3$	63
Figura 29 – Esquema da síntese do $bpeamff$	64
Figura 30 – Espectro de IV (ATR) do $bpeamff$	65

Figura 31 – Espectro de RMN de ^1H do bpeamff em CDCl_3	65
Figura 32 – Esquema da síntese do bpeamffmety.....	66
Figura 33 – Espectro de IV (ATR) do bpeamffmety.	67
Figura 34 – Espectro de RMN de ^1H do bpeamffmety em CDCl_3	67
Figura 35 – Esquema da síntese do $\text{H}_2\text{L1bpea}$	68
Figura 36 – Espectro de IV (ATR) do $\text{H}_2\text{L1bpea}$	69
Figura 37 – Espectro de RMN de ^1H do $\text{H}_2\text{L1bpea}$	69
Figura 38 – Rota sintética para a obtenção dos precursores e ligante $\text{H}_2\text{L2bpea}$	70
Figura 39 – Esquema da síntese do bpeamffety.....	71
Figura 40 – Espectro de IV (ATR) do bpeamffety.....	72
Figura 41 – Espectro de RMN de ^1H do bpeamffety em CDCl_3	72
Figura 42 – Esquema da síntese do $\text{H}_2\text{L2bpea}$	73
Figura 43 – Espectro de IV (ATR) do $\text{H}_2\text{L2bpea}$	74
Figura 44 – Espectro de RMN de ^1H do $\text{H}_2\text{L2bpea}$ em CDCl_3	74
Figura 45 – Esquema de síntese dos complexos 1, 2 e 3.	75
Figura 46 – Representação geral dos compostos precursores sintetizados.....	80
Figura 47 – Espectro de ESI-MS do $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ em CH_3CN	81
Figura 48 – Ampliação do conjunto de sinais com $m/z = 588,30$ do espectro de ESI-MS do $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$. Em vermelho, a simulação da distribuição isotópica para a espécie proposta.	82
Figura 49 – Espectro de ESI-MS do ligante $\text{H}_2\text{L1bpea}$ em CH_3CN	82
Figura 50 – Ampliação do conjunto de sinais com $m/z = 616,38$ do espectro de ESI-MS do $\text{H}_2\text{L1bpea}$. Em vermelho, a simulação da distribuição isotópica para a espécie proposta.	83
Figura 51 – Espectro de ESI-MS do $\text{H}_2\text{L2bpea}$ em CH_3CN	84
Figura 52 – Ampliação do conjunto de sinais com $m/z = 630,38$ do espectro de ESI-MS do $\text{H}_2\text{L2bpea}$. Em vermelho, a simulação da distribuição isotópica para a espécie proposta.	84
Figura 53 – Espectros de IV do complexo 1 e ligante $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ em ATR.	85
Figura 54 – Espectros de IV do complexo 2 e ligante $\text{H}_2\text{L1bpea}$ em ATR.	86
Figura 55 – Espectros de IV do complexo 3 e ligante $\text{H}_2\text{L2bpea}$ em ATR.	86
Figura 56 – Espectro de ESI-MS do complexo 1 em MeOH e ampliação do pico base, com simulação da distribuição isotópica em vermelho... ..	88
Figura 57 – Espectro de ESI-MS do complexo 2 em CH_3CN e ampliação do pico base, com simulação da distribuição isotópica em vermelho.	89

Figura 58 – Espectro de ESI-MS do complexo 3 em MeOH e ampliação do pico base, com simulação da distribuição isotópica em vermelho. ...	89
Figura 59 – Estruturas propostas para os fragmentos de m/z 742,15 (complexo 1), m/z 756,17 (complexo 2) e m/z 784,20 (complexo 3). ...	90
Figura 60 – Espectros eletrônicos do complexo 1 em solução de metanol (a) e diclorometano (b).....	92
Figura 61 – Espectros eletrônicos do complexo 2 em solução de metanol (a) e diclorometano (b).....	92
Figura 62 – Espectros eletrônicos do complexo 3 em solução de metanol (a) e diclorometano (b).....	93
Figura 63 – Ampliação da região entre 500-850 nm dos espectros eletrônicos do complexo 1 em solução de metanol (a) e diclorometano (b).....	94
Figura 64 – Ampliação da região entre 500-800 nm dos espectros eletrônicos do complexo 2 em solução de metanol (a) e diclorometano (b).....	95
Figura 65 – Ampliação da região entre 500-800 nm dos espectros eletrônicos do complexo 3 em solução de metanol (a) e diclorometano (b).....	95
Figura 66 – Voltamogramas de onda quadrada (pulso = 25 mV, frequência = 15 Hz) para os complexos 1, 2 e 3 em MeOH. Condições: [Complexos] = 1×10^{-3} mol L ⁻¹ ; [NaClO ₄] = 0,1 mol L ⁻¹ ; Eletrodos: trabalho – carbono vítreo; referência – Ag/Ag ⁺ ; auxiliar – platina.	96
Figura 67 – Titulação espectrofotométrica do complexo 1 em MeOH:H ₂ O (1:1, % v/v) na faixa de pH entre 2,5-9,0.....	98
Figura 68 – Titulação espectrofotométrica do complexo 2 em MeOH:H ₂ O (1:1, % v/v) na faixa de pH entre 3,0-8,0.....	98
Figura 69 – Titulação espectrofotométrica do complexo 3 em MeOH:H ₂ O (1:1, % v/v) na faixa de pH entre 2,5-8,5.....	99
Figura 70 – Proposta para os equilíbrios observados em solução para os complexos 1, 2 e 3.....	100
Figura 71 – Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o complexo 1.....	101
Figura 72 – Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o complexo 2.....	101
Figura 73 – Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o complexo 3.....	102
Figura 74 – Equação química da oxidação do 3,5-DTBC pelo O ₂	102
Figura 75 – Dependência de V ₀ com o pH do meio reacional na presença dos complexos 1, 2 e 3. Condições: [1] = 18 μmol L ⁻¹ ; [2] = [3] = 25	

$\mu\text{mol L}^{-1}$; [3,5-DTBC] = 5 mmol L^{-1} ; [Tampões] = 30,3 mmol L^{-1} ; solução MeOH/ H_2O (32:1) à 25 °C.....	103
Figura 76 – Dependência de V_0 com a concentração do substrato na presença dos complexos 1, 2 e 3. Condições: [1] = [2] = [3] = 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [S] = $4,90 \times 10^{-4}$ – $1,45 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} ; [T] = 30,3 mmol L^{-1} (TRIS, pH 9,0); MeOH/ H_2O (32:1) à 25 °C.	104
Figura 77 – Proposta mecanística para a oxidação do 3,5-DTBC catalisada pelos complexos 1, 2 e 3.	106
Figura 78 – Estrutura de um dodecâmero na forma B-DNA.	109
Figura 79 – Variantes estruturais comuns do DNA.	110
Figura 80 – DNA plasmidial. (A) Esquema da estrutura do DNA superenovelado. (B) Micrografia eletrônica com ordem crescente de enovelamento.	111
Figura 81 – Representação dos modos de interação com o DNA: (1) interação pelo sulco maior; (2) interação pelo sulco menor; (3) atração eletrostática e (4) intercalação. Em vermelho, o esqueleto açúcar-fosfato do DNA e em cinza, os pares de bases nitrogenadas.	114
Figura 82 – Ilustração das três formas do DNA plasmidial (A) e suas diferentes mobilidades eletroforéticas em gel de agarose (B).....	118
Figura 83 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 1 em diferentes valores de pH. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [1] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.	123
Figura 84 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 2 em diferentes valores de pH. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [2] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.	123
Figura 85 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 3 em diferentes valores de pH. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [3] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.	124
Figura 86 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 1 em diferentes concentrações de complexo. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [1] = 0-10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz. ..	125
Figura 87 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 2 em diferentes concentrações de complexo. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [2] = 0-5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz. ..	125

Figura 88 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 3 em diferentes concentrações de complexo. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [3] = 0-2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz....	126
Figura 89 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 1 na presença de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [1] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); [NaCl] = 15-125 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.	127
Figura 90 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 2 na presença de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [2] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); [NaCl] = 15-125 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.	128
Figura 91 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 3 na presença de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [3] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); [NaCl] = 15-125 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.	128
Figura 92 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 1 na presença de LiClO_4 . Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [1] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); [LiClO_4] = 15-125 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.	129
Figura 93 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 2 na presença de LiClO_4 . Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [2] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); [LiClO_4] = 15-125 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.	129
Figura 94 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 3 na presença de LiClO_4 . Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [3] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); [LiClO_4] = 15-125 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.	130
Figura 95 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos na presença de ligantes dos sulcos do DNA. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Complexos] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); [Netropsina] = 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Verde de metila] = 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz....	131

Figura 96 – Espectro de CD do CT-DNA na presença de concentrações crescentes do complexo 1. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [1] = 0 – 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); Temperatura = 37°C.....	132
Figura 97 – Espectro de CD do CT-DNA na presença de concentrações crescentes do complexo 2. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [2] = 0 – 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); Temperatura = 37°C.....	133
Figura 98 – Espectro de CD do CT-DNA na presença de concentrações crescentes do complexo 3. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [3] = 0 – 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); Temperatura = 37°C.....	133
Figura 99 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II em atmosfera de argônio. Da esquerda para a direita: controle, [Fe(EDTA)] ⁺ , complexo 1, complexo 2 e complexo 3. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [1] = [2] = [3] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); Temperatura = 50°C; Tempo = 2h ao abrigo de luz.....	134
Figura 100 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II em atmosfera de oxigênio. Da esquerda para a direita: controle, [Fe(EDTA)] ⁺ , complexo 1, complexo 2 e complexo 3. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [1] = [2] = [3] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); Temperatura = 50°C; Tempo = 2h ao abrigo de luz...	134
Figura 101 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 1 na presença de sequestradores de ERO. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [1] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); [Etanol] = 0,4 mmol L^{-1} ; [KI] = [NaN ₃] = 0,5 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.....	135
Figura 102 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 2 na presença de sequestradores de ERO. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [2] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); [Etanol] = 0,4 mmol L^{-1} ; [KI] = [NaN ₃] = 0,5 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.....	136
Figura 103 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 3 na presença de sequestradores de ERO. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [3] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); [Etanol] = 0,4 mmol L^{-1} ; [KI] = [NaN ₃] = 0,5 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.....	136
Figura 104 – Gráfico de k_{obs} versus concentração de complexo 1, 2 ou 3. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [1] = [2] = 1 –	

15 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [3] = 0,5-10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); Temperatura = 50 °C; Tempo = 0 – 4 h ao abrigo de luz..... 137

Figura 105 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos na presença de um agente redutor. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Complexos] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); [Ascorbato de sódio] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; Temperatura = 37 °C; Tempo = 1 h ao abrigo de luz..... 139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Constantes catalíticas de biomiméticos com diferentes centros metálicos frente à oxidação do substrato ativado 3,5-DTBC em metanol.....	41
Tabela 2 – Principais bandas e atribuições dos espectros de IV do H ₂ py ₃ mff e de seus precursores.....	76
Tabela 3 – Principais bandas e atribuições dos espectros de IV do H ₂ L1bpea e seus precursores.....	77
Tabela 4 – Principais bandas e atribuições dos espectros de IV do H ₂ L2bpea e seus precursores.....	77
Tabela 5 – Deslocamentos químicos e atribuições dos espectros de RMN de ¹ H dos precursores do H ₂ py ₃ mff.....	78
Tabela 6 – Deslocamentos químicos e atribuições dos espectros de RMN de ¹ H dos precursores do H ₂ L1bpea e do H ₂ L2bpea.....	79
Tabela 7 – Deslocamentos químicos dos espectros de RMN de ¹ H dos ligantes finais.	80
Tabela 8 – Principais bandas (cm ⁻¹) e atribuições dos espectros de IV do complexo 1 e ligante H ₂ py ₃ mff.	87
Tabela 9 – Principais bandas (cm ⁻¹) e atribuições dos espectros de IV do complexo 2 e ligante H ₂ L1bpea.	87
Tabela 10 – Principais bandas (cm ⁻¹) e atribuições dos espectros de IV do complexo 3 e ligante H ₂ L2bpea.	87
Tabela 11 – Concentração de cobre determinada por F AAS para os complexos 1 , 2 e 3	91
Tabela 12 – Dados de espectroscopia eletrônica dos complexos 1 , 2 e 3	93
Tabela 13 – Dados eletroquímicos dos complexos 1 , 2 e 3	97
Tabela 14 – Valores de pK _a dos complexos 1 , 2 e 3	99
Tabela 15 – Parâmetros cinéticos dos complexos 1 , 2 e 3 e de alguns complexos da literatura.	105
Tabela 16 – Comparação da inibição de clivagem do DNA plasmidial pelos complexos 1 , 2 e 3 na presença de 125 mmol L ⁻¹ de NaCl ou de LiClO ₄	130
Tabela 17 – Parâmetros cinéticos da clivagem de DNA plasmidial catalisada pelos complexos 1 , 2 e 3 e por alguns complexos da literatura	138
Tabela 18 – Comparação entre constantes de velocidade observadas (<i>k</i> _{obs}) da reação de clivagem do DNA pelos complexos 1 , 2 e 3 (10 μmol L ⁻¹) em diferentes condições reacionais.	140

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 3,5-DTBC – 3,5-di-*terc*-butilcatecol
3,5-DTBQ – 3,5-di-*terc*-butilquinona
 δ – Deformação angular da ligação química
 δ_H – Deslocamento químico
 ϵ – Coeficiente de absorção
 $\lambda_{\text{máx}}$ – Comprimento de onda na absorção máxima
 ν – Estiramento da ligação química
d – Duplete
m – Multiplete
s – Simpleto
t – Tripleto
AcOH – Ácido acético
ATR – Reflectância total atenuada (do inglês, *attenuated total reflectance*)
bpea – bis(2-piridiletil)amina
bpeamff – 2-[*N*-bis-(2-piridiletil)aminometil]-4-metil-6-formilfenol
bpeamffetpy – 2-[*N*-bis-(2-piridiletil)aminometil]-4-metil-6-[*N*-(2-piridiletil)aminometil]fenol
bpeamffmetpy – 2-[*N*-bis-(2-piridiletil)aminometil]-4-metil-6-[*N*-(2-piridilmetil)aminometil]fenol
bpma – bis(piridilmetil)amina
bpmamff – 2-[*N*-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formilfenol
CAPS – Ácido *N*-ciclohexil-3-aminopropanosulfônico
CD – Dicroísmo circular (do inglês, *circular dichroism*)
CHES – Ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfônico
cmff – 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol
CO – Catecol oxidase
CT-DNA – DNA de timo de bezerro (do inglês, *calf thymus DNA*)
DNA – ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)
DTT – Ditioneitol
 $E_{1/2}$ – potencial de meia-onda
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
ENH – Eletrodo normal de hidrogênio
ERO – Espécies reativas de oxigênio
ESI-MS – Espectrometria de massas com ionização por electrospray (do inglês, *electrospray ionization mass spectrometry*)
Et₃N – Trietilamina
F I – Forma superenovelada do DNA
F II – Forma circular aberta do DNA

F III – Forma linear do DNA

[Fe(EDTA)]⁻ - etilenodiaminotetraacetato ferrato(III)

H₂py₃mff – 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol

HEPES – Ácido 4-(2-hidroxi-1-piperazino)etanosulfônico

HMB - 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído

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

IV – Infravermelho

K_{ass} – Constante de associação

k_{cat} – Constante catalítica

K_M – Constante de Michaelis-Menten

L1bpea – 2-[N-bis-(2-piridiletil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol

L2bpea – 2-[N-bis-(2-piridiletil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridiletil)aminometil]fenol

MeOH – Metanol

MES – Ácido 2-[N-morfolino]etanossulfônico

MG – Verde de metila (do inglês, *metil green*)

NET – Netropsina

pBSK-II – Plasmídeo pBlueScript II

pH – Potencial hidrogeniônico

ppb – Partes por bilhão

ppm – Partes por milhão

PPOs – Polifenóis oxidases

RMN de ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

TBE – Tampão Tris/Borato/EDTA

TCLM – Transferência de carga do ligante para o metal

TCML – Transferência de carga do metal para o ligante

TMS – Tetrametilsilano

TRIS – Tris(hidroxi)metilaminometano

UV-Vis – Ultravioleta-visível

V₀ – Velocidade inicial

V_{máx} – Velocidade máxima

SUMÁRIO

1	JUSTIFICATIVA.....	31
2	SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOMIMÉTICA DOS COMPLEXOS	33
2.1	A QUÍMICA BIOMIMÉTICA	33
2.1.1	Metaloenzimas e a modelagem biomimética.....	33
2.2	A BIOINORGÂNICA DO COBRE.....	35
2.2.1	Catecol oxidase	36
2.2.1.1	Modelos para a catecol oxidase.....	40
2.3	OBJETIVOS	44
2.3.1	Objetivo geral	44
2.3.2	Objetivos específicos	44
2.4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
2.4.1	Reagentes, solventes e soluções	45
2.4.2	Caracterização dos ligantes e complexos	45
2.4.2.1	Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	45
2.4.2.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹ H).....	45
2.4.2.3	Espectrometria de massas (ESI-MS).....	46
2.4.2.4	Espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS).....	46
2.4.2.5	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).....	46
2.4.2.6	Voltametria de onda quadrada	46
2.4.2.7	Titulação espectrofotométrica.....	47
2.4.3	Estudos de atividade de catecolase	47
2.4.3.1	Efeito do pH.....	47
2.4.3.2	Efeito da concentração de substrato.....	48
2.4.3.3	Oxidação do 3,5-DTBC em atmosfera inerte.....	48
2.4.3.4	Investigação de H ₂ O ₂ no ciclo catalítico	49
2.4.4	Síntese dos ligantes.....	49
2.4.4.1	Ligante H ₂ py ₃ mff – 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol.....	50
2.4.4.1.1	<i>Precursor cmff – 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol.....</i>	<i>50</i>
2.4.4.1.2	<i>Precursor bpma – bis(piridilmetil)amina</i>	<i>53</i>
2.4.4.1.3	<i>Precursor bpmamff – 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formilfenol</i>	<i>55</i>

2.4.4.1.4	Precursor Hpy_3 – 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil]fenol.....	57
2.4.4.1.5	Ligante H_2py_3mff – 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol.....	59
2.4.4.2	Ligante $H_2L1bpea$ – 2-[N-bis-(2-piridiletil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol	61
2.4.4.2.1	Precursor $bpea$ – bis(2-piridiletil)amina.....	62
2.4.4.2.2	Precursor $bpeamff$ – 2-[N-bis-(2-piridiletil)aminometil]-4-metil-6-formilfenol.....	64
2.4.4.2.3	Precursor $bpeamffmetpy$ – 2-[N-bis-(2-piridiletil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil]fenol.....	66
2.4.4.2.4	Ligante $H_2L1bpea$ – 2-[N-bis-(2-piridiletil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol.....	68
2.4.4.3	Ligante $H_2L2bpea$ – 2-[N-bis-(2-piridiletil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridiletil)aminometil]fenol.....	70
2.4.4.3.1	Precursor $bpeamffetpy$ – 2-[N-bis-(2-piridiletil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridiletil)aminometil]fenol	71
2.4.4.3.2	Ligante $H_2L2bpea$ – 2-[N-bis-(2-piridiletil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridiletil)aminometil]fenol.....	73
2.4.5	Síntese dos complexos.....	75
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	76
2.5.1	Caracterizações dos ligantes	76
2.5.1.1	Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	76
2.5.1.2	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de 1H (RMN de 1H).....	78
2.5.1.3	Espectrometria de massas (ESI-MS)	81
2.5.2	Caracterizações dos complexos.....	85
2.5.2.1	Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	85
2.5.2.2	Espectrometria de massas (ESI-MS)	88
2.5.2.3	Espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS).....	91
2.5.2.4	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) ..	91
2.5.2.5	Voltametria de onda quadrada	96
2.5.2.6	Titulação espectrofotométrica.....	97
2.5.3	Atividade de catecolase.....	102

2.5.3.1	Efeito do pH.....	103
2.5.3.2	Efeito da concentração de substrato.....	104
2.5.3.3	Proposta mecanística.....	105
2.6	CONSIDERAÇÕES PARCIAIS.....	108
3	ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM DNA.....	109
3.1	REVISÃO DA LITERATURA.....	109
3.1.1	O ácido desoxirribonucleico (DNA).....	109
3.1.1.1	Propriedades estruturais e biológicas do DNA.....	109
3.1.1.2	Tipos de DNA utilizados em biologia molecular.....	111
3.1.1.2.1	<i>DNA plasmidial</i>	111
3.1.1.2.2	<i>CT-DNA</i>	112
3.1.2	A INTERAÇÃO ENTRE COMPLEXOS E DNA.....	113
3.2	OBJETIVOS.....	116
3.2.1	Objetivo geral.....	116
3.2.2	Objetivos específicos.....	116
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	117
3.3.1	Obtenção, purificação e quantificação do DNA plasmidial	117
3.3.2	Procedimento geral das reações de clivagem.....	117
3.3.2.1	Ensaio inicial.....	118
3.3.2.2	Efeito do pH e da concentração dos complexos.....	119
3.3.2.3	Efeito da força iônica.....	119
3.3.2.4	Efeito dos ligantes de sulco.....	119
3.3.2.5	Ensaio em atmosfera de argônio.....	120
3.3.2.6	Efeito dos sequestradores de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	120
3.3.2.7	Cinética de clivagem do DNA plasmidial.....	120
3.3.2.8	Modulação da clivagem do DNA plasmidial.....	121
3.3.3	Dicroísmo circular (CD).....	121
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	122
3.4.1	Efeito do pH e da concentração dos complexos.....	122
3.4.2	Análise das formas de interação.....	127
3.4.2.1	Efeito da força iônica.....	127
3.4.2.2	Efeito dos ligantes de sulco.....	131
3.4.2.3	Dicroísmo circular (CD).....	132

3.4.3	Avaliação do mecanismo de clivagem	134
3.4.3.1	Ensaio em atmosfera de argônio	134
3.4.3.2	Efeito dos sequestradores de ERO	135
3.4.4	Ensaio cinéticos.....	137
3.4.5	Modulação da clivagem do DNA plasmidial.....	139
3.5	CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	141
4	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	143
	REFERÊNCIAS.....	145

1 JUSTIFICATIVA

Grande parte da história da bioquímica envolve pesquisas sobre enzimas. Apesar dos vários avanços nessa área, ainda nos dias atuais o mecanismo de atuação de diversas enzimas não é totalmente elucidado. Os estudos com as enzimas nativas são dificultados por alguns fatores como a sua purificação e preço, por exemplo. Sendo assim, para viabilizar estudos que contribuam para a compreensão do mecanismo das mesmas, é de grande interesse sintetizar compostos inspirados nas enzimas que consigam mimetizar a sua ação catalítica.

Além de auxiliar na resolução da ação enzimática, vários compostos bioinspirados também conseguem acelerar a degradação do DNA, sendo considerados nucleases sintéticas. As nucleases sintéticas são utilizadas tanto em pesquisas de biologia molecular quanto no desenvolvimento de novos fármacos, por exemplo. Atualmente, há uma busca por compostos que consigam clivar o DNA de forma específica e que possuam efeitos colaterais menores do que os antitumorais usualmente utilizados em tratamentos de doenças com origens genéticas.

Nesse sentido, a proposta deste trabalho envolve o desenvolvimento de uma série de complexos bioinspirados e o estudo destes como modelos biomiméticos da catecol oxidase e como agentes de clivagem do DNA. A síntese, caracterização e atividade de catecolase dos complexos são apresentadas e discutidas na **Seção 2** do trabalho e os estudos de interação e clivagem do DNA são reportados na **Seção 3**.

2 SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOMIMÉTICA DOS COMPLEXOS

2.1 A QUÍMICA BIOMIMÉTICA

Há uma grande interface entre a Química e a Biologia, o que pode ser constatado pela diversidade de pesquisas envolvendo essas áreas. Conhecimentos químicos auxiliam significativamente na compreensão de vários processos biológicos, como a respiração celular e o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Por sua vez, a Biologia também pode ser de grande valia para os químicos em diversas situações como, por exemplo, no planejamento de compostos sintéticos inéditos. Muitas vezes, este planejamento é inspirado em biomoléculas, haja vista que geralmente as reações biológicas são altamente eficientes.

A Química Biomimética pode ser vista como uma área que permeia a Química e a Biologia, pois envolve o *design* de novos compostos que possam mimetizar macromoléculas biológicas, seja estruturalmente e/ou funcionalmente (BRESLOW, 2009). Os materiais biologicamente inspirados possuem potencial para serem aplicados em vários setores da indústria, podendo atuar como catalisadores, biosensores, fármacos, etc. (ARTERO, 2017; SCOGNAMIGLIO *et al.*, 2015; WEGST *et al.*, 2015).

Uma das maiores áreas de foco da Química Biomimética é o desenvolvimento de catalisadores sintéticos que possuam a eficiência e a seletividade das enzimas, visto que estas têm algumas limitações, como a degradação em temperaturas elevadas e a baixa estabilidade em solventes orgânicos e valores extremos de pH (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008). Além de aplicações industriais, os biomiméticos enzimáticos podem ser utilizados para auxiliar na resolução de propriedades físico-químicas e/ou mecânicas das enzimas de interesse. Estudos com modelos sintéticos foram utilizados para compreender a clivagem específica de ligações C=C da β -caroteno 15,15'-monooxigenase, por exemplo, uma enzima de ferro não-heme que atua na biocobertura de carotenoides (WOGGON, 2005).

2.1.1 Metaloenzimas e a modelagem biomimética

As enzimas são moléculas complexas que catalisam diferentes tipos de reações necessárias para a manutenção dos organismos vivos (NELSON; COX, 2014). As principais características de uma enzima são a alta especificidade pelos substratos e o elevado poder catalítico.

Algumas nucleases, por exemplo, catalisam a hidrólise da ligação fosfodiéster do DNA em até 10^{12} vezes (SIGMAN; MAZUMDER; PERRIN, 1993).

Do ponto de vista estrutural, todas as enzimas – com exceção da RNase – são proteínas (biopolímeros compostos por aminoácidos) e algumas destas necessitam de um cofator para possuir atividade catalítica. O cofator pode ser uma molécula orgânica, uma coenzima ou um íon metálico (NELSON; COX, 2014). As enzimas que apresentam um ou mais íons metálicos como grupo prostético são denominadas de metaloenzimas. O Quadro 1 apresenta alguns exemplos de metaloenzimas.

Quadro 1 – Enzimas contendo diferentes íons metálicos como cofatores.

Enzima	Cofator	Classificação¹
Citocromo c oxidase	Cu^{2+} e Fe^{2+}	Oxidoredutase
Piruvato quinase	Mg^{2+} e K^+	Transferase
Fosfatase ácida púrpura	Fe^{3+} e Mn^{2+} , Fe^{2+} ou Zn^{2+}	Hidrolase
Anidrase carbônica	Zn^{2+}	Liase

Fonte: RCSB protein data bank (ROSE *et al.*, 2017).

Diversas metaloenzimas possuem caracterizações descritas na literatura – principalmente estruturais – porém ainda restam dúvidas sobre seus mecanismos catalíticos. Desta forma, estudos com compostos sintéticos de baixa massa molar que imitem a ação enzimática são de grande valia, visto que constituem sistemas menos complexos, o que facilita a interpretação dos dados experimentais, podendo auxiliar na elucidação do mecanismo da enzima (DAUMANN *et al.*, 2014).

As estratégias para desenvolver modelos biomiméticos são variadas, porém geralmente são utilizados ligantes que possuem funções químicas semelhantes às dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico da enzima de interesse, bem como são usados íons metálicos existentes nos sistemas nativos (DAUMANN *et al.*, 2014). A comparação das propriedades físico-químicas e catalíticas destes compostos com as da enzima possibilita classificá-los como bons ou maus modelos estruturais e/ou funcionais desta.

Estudos correlacionando a estrutura e atividade de biomiméticos fornecem escopo para a melhoria do *design* de modelos futuros, a fim de

¹ As enzimas são divididas em seis grandes grupos, de acordo com a reação que catalisam: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (NELSON; COX, 2014).

construir sistemas que se aproximem mais da atividade catalítica da enzima mimetizada.

2.2 A BIOINORGÂNICA DO COBRE

O cobre está presente em uma grande quantidade de enzimas, participando de vários processos bioquímicos, principalmente envolvendo reações de transferência de elétrons e o transporte e ativação de oxigênio e de outras pequenas moléculas, como óxidos de nitrogênio, metano e monóxido de carbono (SOLOMON *et al.*, 2014).

Os estados de oxidação mais comuns encontrados para o cobre em sistemas biológicos são +1 e +2 e os sítios de coordenação deste metal em proteínas são dominados por resíduos de histidinas, cisteínas e metioninas, concordando com a maciez do Cu^{I} e o caráter intermediário do Cu^{II} pela teoria de Pearson. Há uma preferência por aminoácidos que possuam nitrogênio ou enxofre como átomos doadores, como os citados acima, em relação a aminoácidos com cadeias laterais compostas por hidroxilas, carboxilas ou aminas primárias, como serina, asparagina, glutamina e arginina, por exemplo (RUBINO; FRANZ, 2012).

Historicamente, as proteínas de cobre são divididas em grupos, de acordo com a composição dos ligantes e geometria dos centros metálicos: tipo 1, tipo 2 e tipo 3 (RUBINO; FRANZ, 2012).

As proteínas do tipo 1, conhecidas como proteínas azuis de cobre, possuem um centro mononuclear de cobre(II) com geometria tetraédrica distorcida, que está coordenado à uma cisteína resultando em um espectro eletrônico com $\lambda_{\text{máx}}$ em 600 nm ($\epsilon > 2000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) referente à transferência de carga da cisteína para o cobre(II). Estão presentes neste grupo enzimas que promovem a transferência de elétrons, como a plastocianina e a azurina.

As proteínas do tipo 2, denominadas de proteínas normais de cobre, também apresentam centros mononucleares de cobre(II), porém com geometria quadrado planar. Em seu estado oxidado, apresentam uma fraca coloração azul devido às transições *d-d* do centro metálico. Pertencem a este grupo enzimas como a galactose oxidase e a superóxido dismutase.

Diferenciando-se das proteínas do tipo 1 e do tipo 2, as proteínas de cobre do tipo 3 apresentam centros binucleares de cobre em seus sítios ativos, acoplados antiferromagneticamente. Uma característica destas proteínas é a ponte entre os centros metálicos, que auxilia na ligação reversível dos íons Cu^{II} ao oxigênio molecular em condições ambientes (SOLOMON *et al.*, 2014). Pertencente a este grupo,

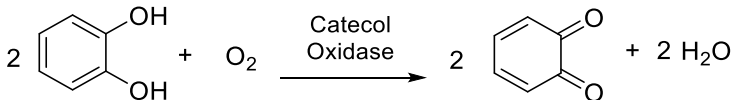
destacam-se a proteína hemocianina, que é responsável pelo transporte de O_2 em alguns moluscos e artrópodes, e as enzimas tirosinase e catecol oxidase que catalisam a reação de oxidação em aerobiose de substratos fenólicos a catecóis.

Além das enzimas englobadas nesta classificação, existem enzimas com centros binucleares de cobre que apresentam propriedades espectroscópicas distintas das do tipo 3, como a citocromo c oxidase; enzimas com centros trinucleares de cobre, como a ascorbato oxidase; e enzimas com centros tetranucleares, como a N_2O redutase (RUBINO; FRANZ, 2012).

2.2.1 Catecol oxidase

A catecol oxidase (CO), também denominada de *o*-difenoil oxidase ou polifenol oxidase, possui um sítio ativo do tipo 3 e está presente em uma gama diversificada de plantas, insetos e crustáceos (SOLOMON *et al.*, 2014). Esta enzima catalisa reações de oxidação de catecóis (*o*-difenois) a *o*-quinonas, reduzindo oxigênio à água neste processo (Figura 1).

Figura 1 – Esquema da oxidação do catecol pelo oxigênio molecular catalisada pela catecol oxidase.

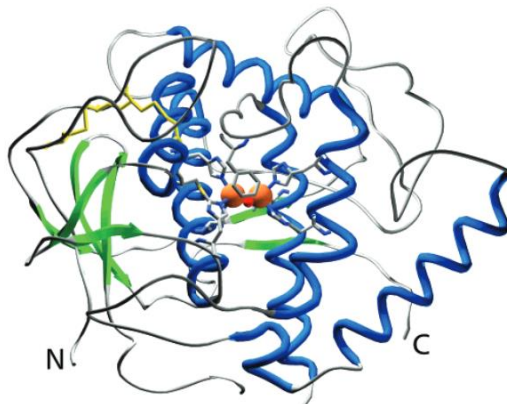


Tal ação catalítica é denominada atividade de catecolase. Outras enzimas também possuem atividade de catecolase, como a tirosinase, por exemplo, que se diferencia da CO por também catalisar a oxidação de monofenóis às quinonas (MESSERSCHMIDT, 2010). As polifenóis oxidases (PPOs) são as principais responsáveis pelo escurecimento enzimático de alimentos, por causa da autopolimerização das quinonas resultantes, formando melanina. Pesquisas relatam que a melanina de frutas e vegetais está relacionada à proteção de tecidos danificados de patógenos e insetos (MARTÍNKOVÁ *et al.*, 2016; SOLEM; TUCZEK; DECKER, 2016).

A CO foi isolada pela primeira vez em 1937, mas apenas em 1998 teve sua estrutura cristalina determinada (OPPENHEIMER; GÜNTER, 2013; KLABUNDE *et al.*, 1998). Tridimensionalmente, a

CO extraída da *Ipomoeas batatas* (batata doce) possui uma forma elipsoidal com dimensões de 55 x 45 x 45 Å e apresenta uma estrutura secundária dominada por regiões de α hélices (Figura 2).

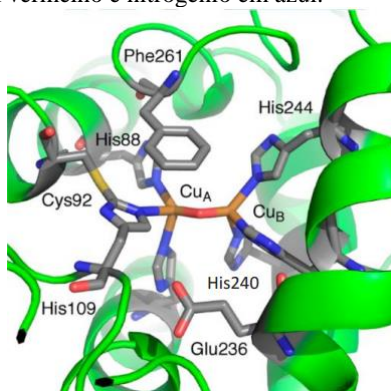
Figura 2 – Estrutura tridimensional da CO extraída da *Ipomoeas batatas* (batata doce). Átomos de cobre estão representados em laranja, α hélices em azul, folhas β em verde e ligações dissulfeto em amarelo.



Fonte: GERDEMANN; EICKEN; KREBS (2002).

O sítio ativo da enzima apresenta, assim como as outras proteínas do tipo 3, dois centros metálicos de cobre. Em sua forma oxidada (forma *met*), os átomos de cobre estão no estado de oxidação +2 e em sua forma reduzida (*deoxi*), o estado de oxidação destes é +1. A Figura 3 apresenta o sítio catalítico da CO na forma oxidada.

Figura 3 – Representação esquemática do sítio ativo da CO extraída da batata doce *Ipomoeas batatas* na forma *met*. Átomos de cobre estão representados em laranja, oxigênio em vermelho e nitrogênio em azul.



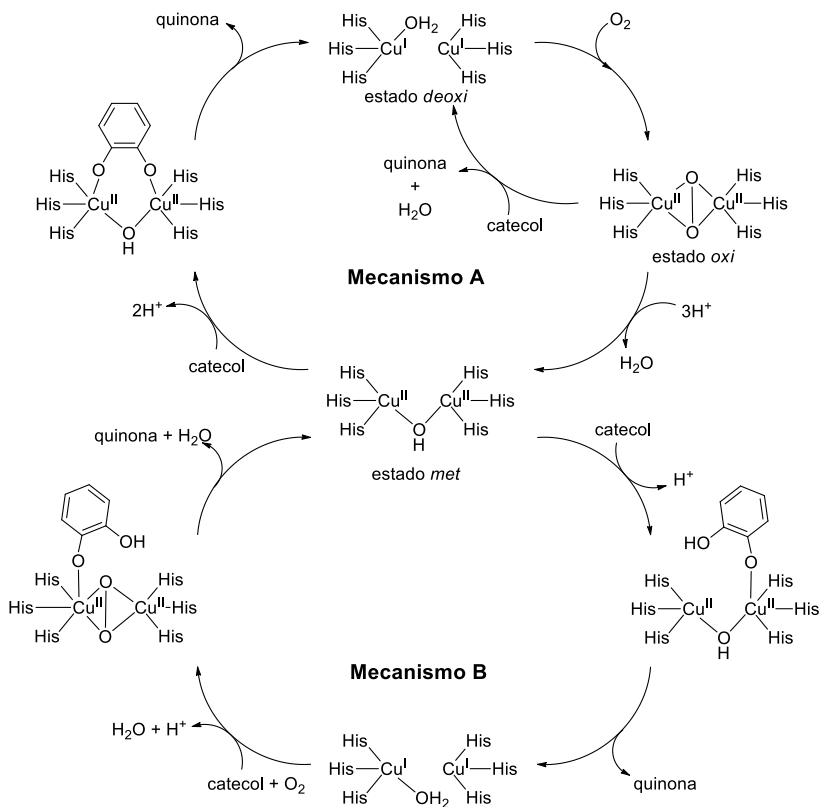
Fonte: SOLOMON *et al.* (2014).

Em sua forma *met*, os centros de cobre estão separados por 2,9 Å e coordenados a um grupo hidróxido que atua como ponte entre estes, determinado pelo mapa de densidade eletrônica ($\text{Cu}_A\text{-O}$ 1,9 Å e $\text{Cu}_B\text{-O}$ 1,8 Å). Além disso, cada Cu^{II} está coordenado a três nitrogênios histidínicos, formando uma geometria piramidal trigonal, sendo que os resíduos His109 e His240 estão na posição apical dos centros metálicos Cu_A e Cu_B , respectivamente (KLABUNDE *et al.*, 1998).

A estrutura da CO também foi resolvida em sua forma reduzida (*deoxi*) e coordenada ao inibidor feniltiouréia (KLABUNDE *et al.*, 1998). Na forma *deoxi*, a distância entre os centros metálicos aumenta para 4,4 Å e não há uma ponte $\mu\text{-OH}$ entre os centros de Cu^{I} . O número de coordenação do Cu_A permanece 4, estando este coordenado a três resíduos histidínicos e uma molécula de água, e o número de coordenação do Cu_B se torna 3, coordenado apenas aos resíduos histidínicos, podendo sua geometria ser descrita como quadrado planar com um local de coordenação ausente.

Em geral, há duas propostas mecanísticas que se destacam para a ação de catecolase da CO (DEY; MUKHERJEE, 2016), esquematizadas na Figura 4.

Figura 4 – Principais propostas do mecanismo da CO.



Adaptado de: DEY; MUKHERJEE (2016).

O mecanismo A, proposto por Solomon, Sundaram e Machonkin (1996), sugere que o substrato se coordena de forma bidentada aos centros de Cu^{II} na forma *met* ou *oxi* da enzima. Considerando a forma *met* como inicial, ocorre a oxidação do substrato à quinona e formação do estado *deoxi* da CO. A coordenação de O_2 reoxida os centros metálicos e outra molécula de substrato é oxidada pela forma *oxi* da enzima, gerando a forma *met* e reiniciando o ciclo catalítico.

Por sua vez, o mecanismo B, proposto por Klabunde *et al.* (1998), sugere a coordenação simultânea do substrato – de forma monodentada – e de O_2 – como ponte peróxido $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ – aos centros de Cu^{II} . Na sequência, dois elétrons podem ser transferidos do substrato para o peróxido, seguido da protonação deste grupo e clivagem da

ligação O-O, resultando na formação da *o*-quinona e água. A ponte entre os centros metálicos é protonada pelo solvente e outra molécula de catecol pode ser oxidada, reduzindo a enzima ao estado *deoxi*, que se coordena a um catecol reiniciando a catálise.

Sendo assim, os caminhos mecanísticos mais aceitos se diferem na forma de coordenação do substrato. A coordenação monodentada do substrato ao Cu_B da forma *met* é sugerida pela estrutura cristalina do complexo contendo a CO e o inibidor feniltiouréia, porém a ligação bidentada ainda não foi descartada pelas pesquisas. Após a coordenação do catecol à forma *met*, um equivalente da quinona é formado mesmo na ausência de oxigênio, excluindo a forma *oxi* como forma inicial do ciclo catalítico. A forma *oxi* da CO é evidenciada experimentalmente após adição de H₂O₂ à forma *met* (ROMPEL *et al.*, 1999), observada via espectroscopia UV-Vis e espectroscopia Raman. Os dados obtidos através destas técnicas estão em concordância com o modo de ligação do O₂ como $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ assim como é observado na hemocianina, também uma proteína do tipo 3 (LING *et al.*, 1994).

Diversos são os dados bioquímicos, espectroscópicos e estruturais que auxiliam na proposta de um mecanismo para a CO. Siegbahn (2004) propõe um terceiro mecanismo, através de cálculos empregando DFT, que se inicia com a forma *deoxi* e há a formação de uma ponte superóxido entre os centros metálicos. Ou seja, o mecanismo de atuação da CO ainda é objeto de estudos, principalmente relacionados à coordenação do O₂ ao sítio ativo da enzima.

2.2.1.1 Modelos para a catecol oxidase

Há mais de 250 modelos estruturais ou funcionais da catecol oxidase reportados na literatura (DEY; MUKHERJEE, 2016). Apesar dos avanços no *design* de modelos, as maiores constantes catalíticas (k_{cat}) estão na faixa de 10^{-2} a 10^{-3} s⁻¹ na oxidação de substratos ativados, enquanto a enzima apresenta constantes entre 100-200 s⁻¹ na oxidação do substrato não ativado (HAMMES; BENKOVIC; HAMMES-SCHIFFER, 2011). A atividade dos modelos não é comparável à da CO, porém as discussões dos mecanismos destes podem prover *insights* sobre o mecanismo da enzima.

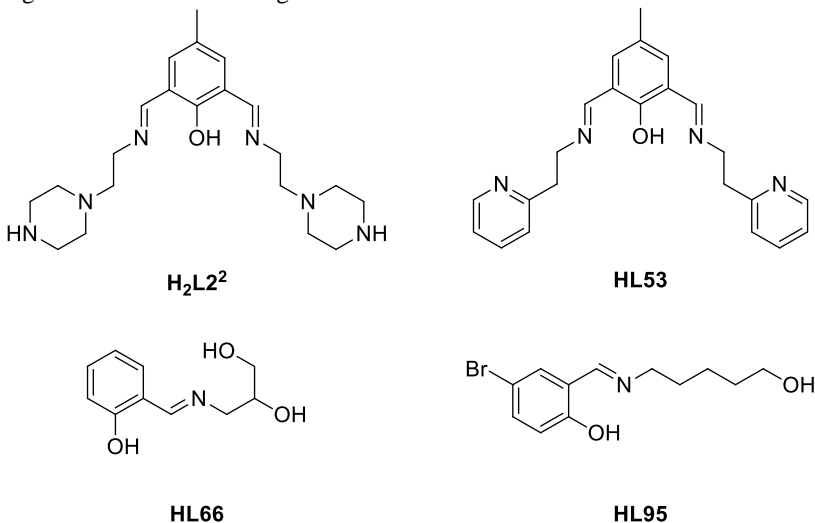
Como o sítio ativo da CO apresenta dois centros de cobre(II), muitos modelos contendo uma unidade binuclear de cobre(II) são projetados para mimetizar a sua ação de catecolase. Geralmente, complexos binucleares apresentam atividade catalítica superior aos similares mononucleares (DEY; MUKHERJEE, 2016). Miméticos

contendo outros centros metálicos (p. ex., Ni, Mn, Co, Zn) também foram reportados ao longo dos anos, sendo que alguns possuem atividade semelhante aos binucleares de cobre, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Constantes catalíticas de biomiméticos com diferentes centros metálicos frente à oxidação do substrato ativado 3,5-DTBC em metanol.

Complexo	$k_{cat} \times 10^4$ (h^{-1})	$K_M \times 10^{-3}$ ($mol L^{-1}$)	Referência
$[Cu_2(H_2L2^2)(OH)(H_2O)(NO_3)]^{3+}$	3,24	2,3	BANU <i>et al.</i> (2008)
$[Mn^{II}(HL53)(H_2O)_3]^{2+}$	2,16	1,8	GUHA <i>et al.</i> (2011)
$[Co^{III}Co^{II}(HL66)_2(H_2O)(EtOH)]^+$	2,14	8,82	MODAK <i>et al.</i> (2013).
$[Ni_2(HL95)_4(H_2O)]$	1,79	8,13	MODAK <i>et al.</i> (2014)

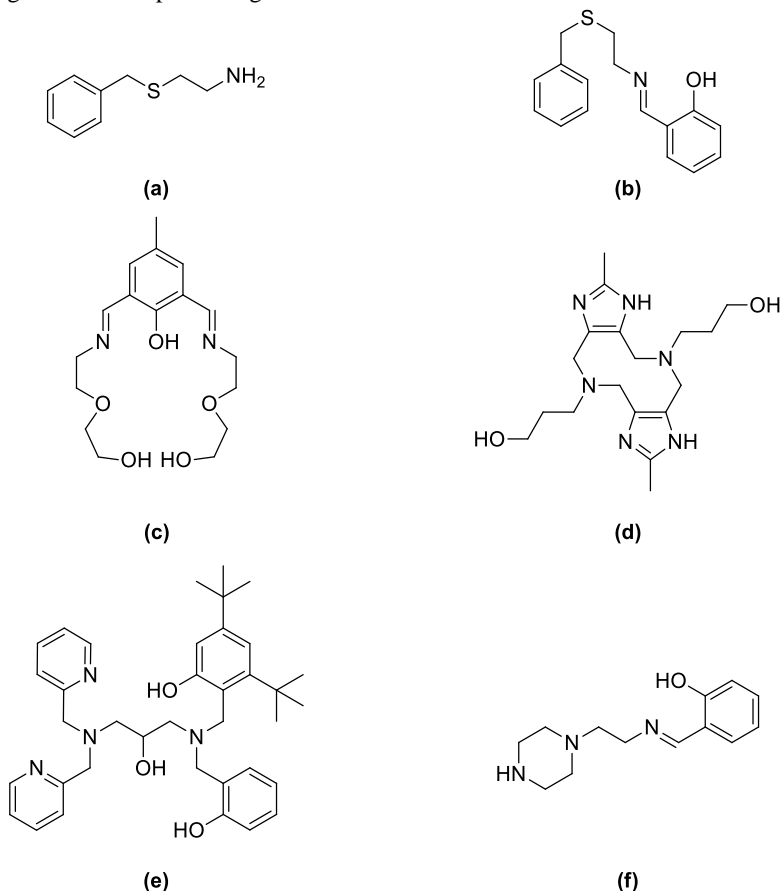
Figura 5 – Estruturas dos ligantes mencionados na Tabela 1.



A atividade de catecolase dos complexos é afetada por diferentes fatores, como a separação entre os centros metálicos, para o caso de modelos multinucleares, as propriedades eletroquímicas e a influência da estrutura dos ligantes (DEY; MUKHERJEE, 2016). Uma grande variedade de ligantes simétricos e não-simétricos têm sido preparada

para sintetizar os catalisadores, geralmente contendo N, O ou S como sítios de coordenação. Exemplos recentes incluem ligantes visando o desenvolvimento de sistemas mononucleares e multinucleares contendo anéis benzênicos, fenólicos, pirídínicos e/ou imidazólicos, como apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Exemplos de ligantes utilizados na síntese de biomiméticos da CO.



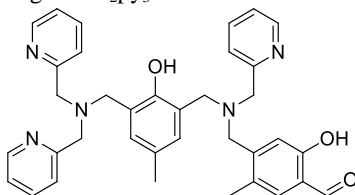
Fontes: (a) MONDAL *et al.* (2019); (b) GHOSH *et al.* (2018); (c) DAS *et al.* (2019); (d) ZERÓN *et al.* (2017); (e) OSÓRIO *et al.* (2012); (f) GUHA *et al.* (2013).

De acordo com os artigos de revisão de Dey e Mukherjee (2016) e de Koval *et al.* (2006), a presença de pontes fenoxo e hidroxu entre os

centros metálicos contribui para a eficiência dos modelos, possivelmente por dificultar a dissociação do metal após sua redução, auxiliando a estabilizar os estados oxidado e reduzido dos catalisadores.

Neste trabalho, é utilizado o ligante H_2py_3mff , desenvolvido por Piovezan *et al.* (2010), que possui dois grupos fenólicos, sendo que o fenol central pode atuar como ponte na formação de complexos binucleares (Figura 7).

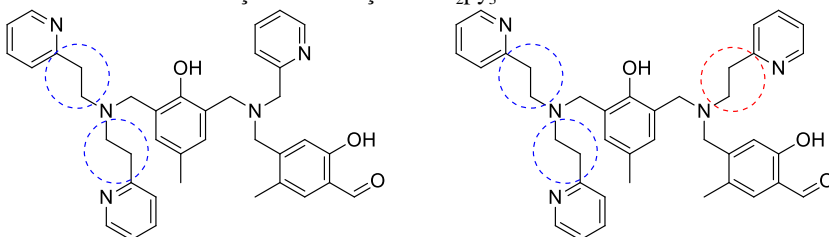
Figura 7 – Estrutura do ligante H_2py_3mff .



Complexos formados por este ligante com diferentes centros binucleares ($Fe^{III}Zn^{II}$, $Fe^{III}Cu^{II}$, $Ga^{III}Cu^{II}$, p. ex.) já foram testados frente à hidrólise de ésteres de fosfato, atuando como modelos para as fosfatases ácidas púrpuras (SOUZA *et al.*, 2013; SOUZA, 2013; PIOVEZAN *et al.*, 2010). Silva *et al.* (2017) mostraram que a alteração na flexibilidade do H_2py_3mff , variando o número de carbonos alifáticos do lado macio deste, modifica a eficiência catalítica do biomimético de $Fe^{III}Zn^{II}$ como hidrolase.

Neste viés, para mimetizar a CO, o presente trabalho desenvolve complexos de $Cu^{II}Cu^{II}$ com o H_2py_3mff e com ligantes similares mais flexíveis (Figura 8), visando averiguar se a flexibilidade dos ligantes facilita a coordenação do substrato aos centros metálicos durante a catálise.

Figura 8 – Estrutura dos ligantes $H_2L1bpea$ (à esquerda) e $H_2L2bpea$ (à direita), destacando as modificações em relação ao H_2py_3mff .



2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo geral

- Desenvolver novos complexos binucleares de cobre(II) com ligantes que confirmem diferentes tamanhos de anéis quelatos na coordenação com os centros metálicos e avaliar suas atividades frente à oxidação de catecóis.

2.3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar, purificar e caracterizar os ligantes e compostos precursores necessários para a obtenção dos complexos de interesse.
- Sintetizar os complexos binucleares de cobre(II).
- Caracterizar os complexos através de técnicas espectroscópicas, espectrométricas e métodos eletroanalíticos.
- Avaliar a atividade dos complexos como modelos biomiméticos da catecol oxidase através de estudos cinéticos com o substrato modelo 3,5-di-*tert*-butilcatecol (3,5-DTBC).

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1 Reagentes, solventes e soluções

A maior parte dos reagentes e solventes utilizados para a obtenção e purificação dos ligantes e complexos foi obtida de fontes comerciais e empregada sem purificação prévia. Como exceções, os reagentes 2-(aminometil)piridina, 2-(aminoetil)piridina, 2-piridilcarboxialdeído e 2-vinilpiridina foram destilados à pressão reduzida antes de serem utilizados.

O substrato 3,5-di-*tert*-butilcatecol foi obtido da Sigma-Aldrich e utilizado após recristalização em éter de petróleo. As soluções dos complexos e substrato foram preparadas com solventes de grau UV/HPLC e os gases utilizados nos ensaios foram argônio de grau analítico 5.0 e oxigênio de grau analítico 2.8.

2.4.2 Caracterização dos ligantes e complexos

2.4.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros na região do IV foram obtidos com um espectrofotômetro FTIR – Spectrum 100 da Perkin Elmer. Todas as amostras foram analisadas via refletância total atenuada (ATR), através da utilização de um acessório de refletância total atenuada horizontal (ZnSe, 45°) e um detector de sulfato de triglicina.

As amostras foram colocadas diretamente sobre o cristal de seleneto de zinco e foram realizadas 8 varreduras no intervalo de 4000-500 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . Para a correção das medidas das amostras, o branco utilizado foi o próprio cristal.

2.4.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em um espectrômetro Bruker AC 200, na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, com frequência de 200 ou 400 MHz.

Os deslocamentos químicos de hidrogênio foram registrados em ppm, utilizando-se o tetrametilsilano (TMS), que possui $\delta = 0,00$ ppm, como referência interna. Todos os espectros foram obtidos em solução de CDCl_3 .

2.4.2.3 Espectrometria de massas (ESI-MS)

Os espectros de massas dos ligantes e complexos foram obtidos no Centro de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME) da UFSC, através da espectrometria de massas com ionização via eletrospray (ESI-MS). As leituras foram realizadas no equipamento Amazon – Ion Trap MS através da análise de soluções com a concentração de aproximadamente 500 ppb e fluxo de $180 \mu\text{L min}^{-1}$. Os solventes utilizados foram MeOH ou CH_3CN de grau MS. A temperatura do capilar foi mantida entre 180 e 200 °C e a voltagem, na faixa entre -3500 e -4500 V.

2.4.2.4 Espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS)

As análises de absorção atômica foram realizadas no Laboratório de Espectrometria Atômica e de Massa (LEMA), do Departamento de Química da UFSC. Para determinação do elemento Cu foi empregada a técnica de absorção atômica em modo chama, através de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, modelo ContrAA 700 (Analytik Jena, Jena, Alemanha).

As soluções dos complexos foram preparadas em água milli-Q contendo 1% de HCl. O comprimento de onda selecionado para as análises foi de 324 nm. Os gases utilizados foram mistura de ar e acetileno na vazão de 60 L/h.

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

Os espectros eletrônicos na região do UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro da Perkin-Elmer, modelo Lambda 750. As análises em solução foram realizadas utilizando-se solventes de grau espectroscópico e cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm e capacidade para 1,5 mL.

2.4.2.6 Voltametria de onda quadrada

Os voltamogramas foram obtidos em um potenciostato/galvanostato modelo Epsilon, utilizando uma célula eletrolítica contendo três eletrodos: Ag/Ag⁺ (referência), platina (auxiliar) e carbono vítreo (trabalho). Para correção do potencial vs eletrodo de referência, utilizou-se o ferroceno (par Fc⁺/Fc) como padrão ($E_{1/2}$ vs ENH = 400 mV) (GAGNÉ; KOVAL; LISENKY, 1980).

Os experimentos foram realizados em metanol de grau espectroscópico sob atmosfera de argônio, com soluções de 1 mmol L^{-1} dos complexos, contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de perclorato de sódio como eletrólito de suporte.

2.4.2.7 Titulação espectrofotométrica

As titulações espectrofotométricas foram realizadas com soluções de aproximadamente $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ dos complexos em MeOH/H₂O (1:1, % v/v) – $pK_w = 14,30$ (TOMOIAIA-COTISEL *et al.*, 1999), sendo a força iônica do meio ajustada com a adição de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os experimentos foram realizados em uma célula termoequilibrada a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ por um banho da Visomes Plus.

As leituras de pH foram realizadas com um pHmetro Oakton pH 2700, e a adição de base (KOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foi feita manualmente. A cada alteração de aproximadamente 0,1 no valor de pH, foi retirado aproximadamente 1 mL da solução e o espectro de UV-Vis da alíquota foi obtido em um espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 750. Após a leitura, a alíquota foi devolvida para a solução que estava sendo titulada.

Os dados obtidos foram ajustados com curvas sigmoidais e os valores de pK_a foram obtidos a partir do ponto de inflexão destas. Os diagramas de espécies presentes na solução em função do pH foram obtidos com o programa SPECIES.

2.4.3 Estudos de atividade de catecolase

A atividade catalítica dos complexos foi investigada frente à oxidação do substrato modelo 3,5-di-*terc*-butilcatecol (3,5-DTBC). O acompanhamento das reações catalisadas pelos complexos foi realizado através de um espectrômetro UV-Vis Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostaticado, monitorando-se uma banda centrada em 400 nm referente ao produto da reação, a 3,5-di-*terc*-butilquinona (3,5-DTBQ). O meio cinético utilizado em todas as reações foi uma mistura de MeOH:H₂O (32:1, v/v), no qual o coeficiente de absorção da quinona formada é de $1645 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 400 nm (CHAVES, 2015).

2.4.3.1 Efeito do pH

Inicialmente, foram realizados os estudos cinéticos variando-se o pH do meio reacional. As soluções tampão utilizadas foram os tampões MES (pH 5,5 a 6,5) e TRIS (pH 7,0 a 9,0).

Em um experimento típico, foram utilizadas cubetas de vidro com caminho óptico de 1 cm, nas quais foram adicionados 50 μL de solução aquosa do tampão ($[\text{T}]_{\text{final}} = 30,3 \text{ mmol L}^{-1}$), 50 μL de solução metanólica do complexo ($[1]_{\text{final}} = 59 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$; $[2]_{\text{final}} = 16 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$; $[3]_{\text{final}} = 27 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) e 1450 μL de metanol saturado com oxigênio. Após 10 minutos de incubação, foram adicionados 100 μL de solução metanólica do substrato 3,5-DTBC ($[\text{S}]_{\text{final}} = 5 \text{ mmol L}^{-1}$), totalizando 1650 μL .

As reações foram monitoradas por 15 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$, e correções da oxidação espontânea do 3,5-DTBC foram realizadas através do monitoramento de reações nas mesmas condições na ausência dos complexos.

2.4.3.2 Efeito da concentração de substrato

Para os estudos do efeito da concentração de 3,5-DTBC, foram utilizadas cubetas de vidro com caminho óptico de 1 cm, nas quais foram adicionados 50 μL de solução aquosa do tampão TRIS pH 9,0 ($[\text{T}]_{\text{final}} = 30,3 \text{ mmol L}^{-1}$) e 100 μL de solução metanólica do complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 60 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$). Após 10 minutos de incubação, foram adicionadas alíquotas da solução metanólica de substrato ($[\text{S}]_{\text{final}} = 4,90 \times 10^{-4} - 1,45 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e metanol saturado com oxigênio, totalizando 1650 μL .

As velocidades iniciais das reações foram obtidas através da inclinação do gráfico de absorbância em função do tempo nos primeiros minutos da reação. Correções da oxidação espontânea do substrato foram realizadas descontando-se os valores obtidos no monitoramento de reações nas mesmas condições sem a adição dos complexos.

2.4.3.3 Oxidação do 3,5-DTBC em atmosfera inerte

As soluções utilizadas nos experimentos sob atmosfera inerte foram preparadas em metanol espectroscópico saturado com argônio. Em uma cubeta com fluxo constante de argônio, foram adicionados 100 μL de solução aquosa de tampão TRIS pH 9,0 ($[\text{T}]_{\text{final}} = 30,3 \text{ mmol L}^{-1}$), 100 μL de solução metanólica do complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 50 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) e 2900 μL de metanol saturado com argônio. Após 10 minutos de incubação, foram adicionados 200 μL de solução metanólica do substrato 3,5-DTBC ($[\text{S}]_{\text{final}} = 200 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$), totalizando 3300 μL .

Ao término das adições, a cubeta foi fechada com uma tampa de teflon e vedada com parafilme. Após 20 minutos de reação, purgou-se oxigênio na cubeta a fim de evidenciar possíveis alterações espectrais. Correções da possível oxidação espontânea do 3,5-DTBC foram realizadas através do monitoramento de reações nas mesmas condições na ausência dos complexos.

2.4.3.4 Investigação de H₂O₂ no ciclo catalítico

A investigação da presença de H₂O₂ nas reações de oxidação catalisadas pelos complexos foi realizada através de uma modificação do método da iodometria (CAMARGO *et al.*, 2015). Uma mistura reacional foi preparada adicionando-se, em uma cubeta, 100 µL de solução aquosa de tampão TRIS pH 9,0 ($[T]_{\text{final}} = 30,3 \text{ mmol L}^{-1}$), 100 µL de solução metanólica do complexo ($[C]_{\text{final}} = 50 \text{ µmol L}^{-1}$) e 3000 µL de metanol saturado com oxigênio. Após 10 minutos de incubação, foram adicionados 100 µL de solução metanólica do substrato 3,5-DTBC ($[S]_{\text{final}} = 60 \text{ mmol L}^{-1}$), totalizando 3300 µL.

Após uma hora de reação, adicionou-se igual volume de água e a 3,5-DTBC foi extraída com diclorometano até a fase orgânica ficar transparente. A camada aquosa foi acidificada com ácido sulfúrico até pH ≈ 2 , retirou-se uma alíquota de 2 mL da mesma e adicionou-se 1 mL de solução aquosa de iodeto de potássio $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ a esta.

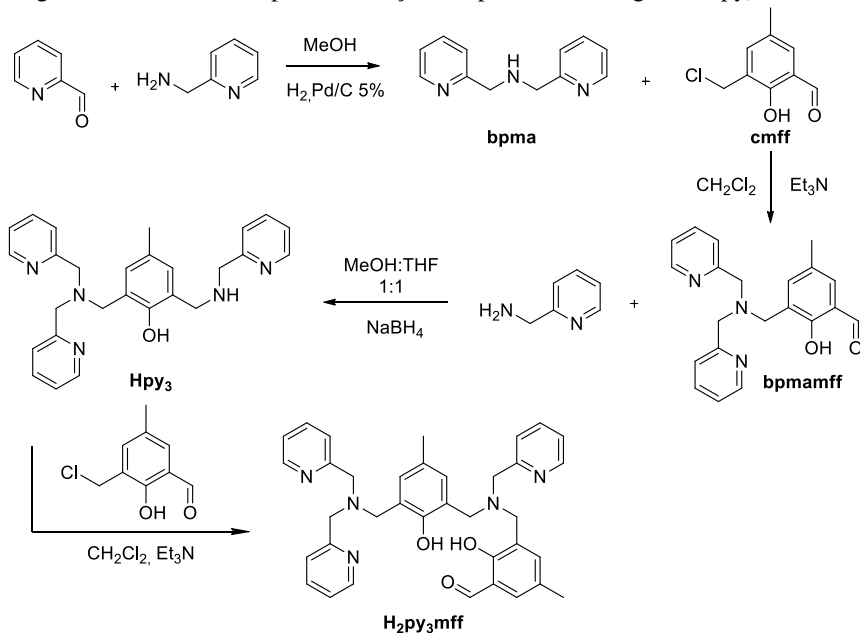
Havendo peróxido de hidrogênio na fase aquosa, ocorre a seguinte reação: $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{I}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{I}_2$. O excesso de iodeto no meio reacional gera o íon tri-iodeto ($\text{I}_{2(\text{aq})} + \text{I}^- \rightarrow \text{I}_3^-$), que pode ser monitorado espectrofotometricamente devido ao surgimento de uma banda intensa ($\epsilon = 26000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em 353 nm (ACKERMANN *et al.*, 2002).

2.4.4 Síntese dos ligantes

Neste trabalho, foram sintetizados e caracterizados três ligantes, denominados de H₂py₃mff, H₂L1bpea e H₂L2bpea. Para a obtenção destes, foi necessário sintetizar também compostos precursores. As rotas sintéticas são apresentadas nas Figuras 9, 25 e 38.

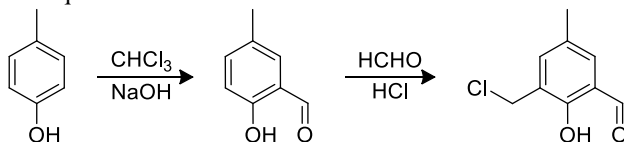
2.4.4.1 Ligante H_2py_3mff – 2-[*N*-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[*N*-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol

Figura 9 – Rota sintética para a obtenção dos precursores e ligante H_2py_3mff .



2.4.4.1.1 Precursor *cmff* – 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol

Figura 10 – Esquema da síntese do *cmff*.



Primeiramente sintetizou-se o 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído (HMB) através de uma formilação do *p*-cresol (THOER *et al.*, 1988). Inicialmente, acoplou-se um balão de 3 bocas de 5000 mL em um agitador mecânico e um condensador. Adicionou-se ao balão 21,6 g de *p*-cresol (200 mmol; $108,14 \text{ g mol}^{-1}$) e 1,5 L de clorofórmio. Esta solução permaneceu sob agitação e em temperatura controlada (56-60 °C). Durante 3 horas, adicionou-se em pequenas porções o total de 60 g

de hidróxido de sódio (15 mmol; 40,00 g mol⁻¹) "dissolvidos" em 100 mL de água destilada. Após o término da adição, a reação permaneceu sob agitação por mais 1 hora e então o sistema reacional foi resfriado à temperatura ambiente.

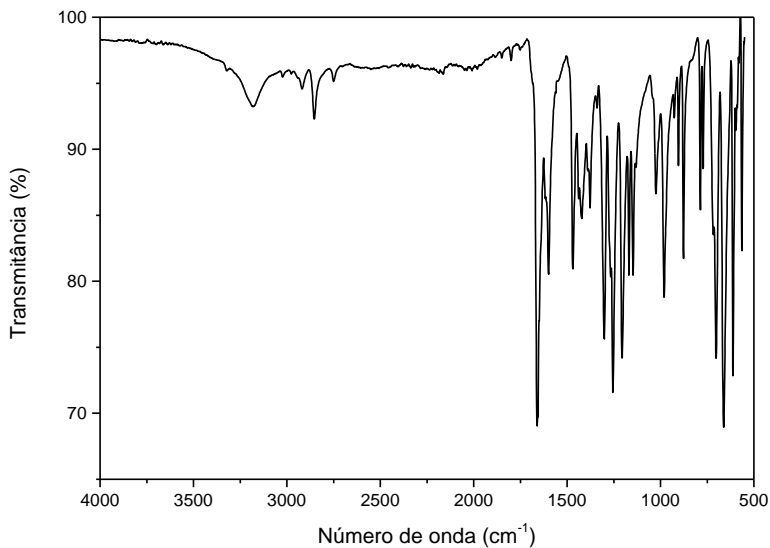
Na sequência, adicionou-se aproximadamente 500 mL de água destilada ao sistema reacional e, sob agitação, este foi acidificado com ácido clorídrico concentrado até o pH estar próximo de 2. Então, a fase orgânica foi separada, lavada com água destilada, seca com sulfato de sódio anidro, e o solvente foi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

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

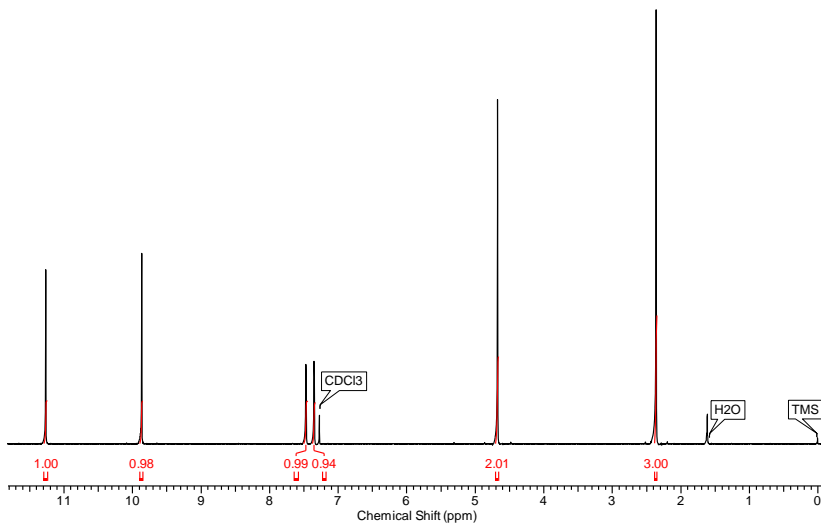
Para a síntese do cmff, adicionou-se em um balão de 500 mL 6,4 gramas de HMB (47 mmol; 136,15 g mol⁻¹), 3,81 g de formaldeído 37% (94 mmol; 30,03 g mol⁻¹) e 25 mL de ácido clorídrico concentrado. O sistema reacional foi mantido sob refluxo e agitação por 30 minutos, e, em seguida, foi resfriado à 0 °C.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

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

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



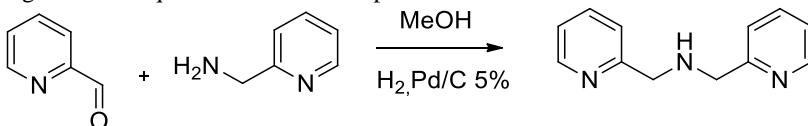
IV (ATR) em cm^{-1} : ν (C-H_{ar}, C-H_{alif} e C-H_{ald}) 3180-2865; ν (C=O) 1659; ν (C=N e C=C) 1600-1470; δ (C-H_{ar}) 750; ν (C-Cl) 613.

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

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

2.4.4.1.2 Precursor bpma – bis(piridilmetil)amina

Figura 13 – Esquema da síntese do bpma.

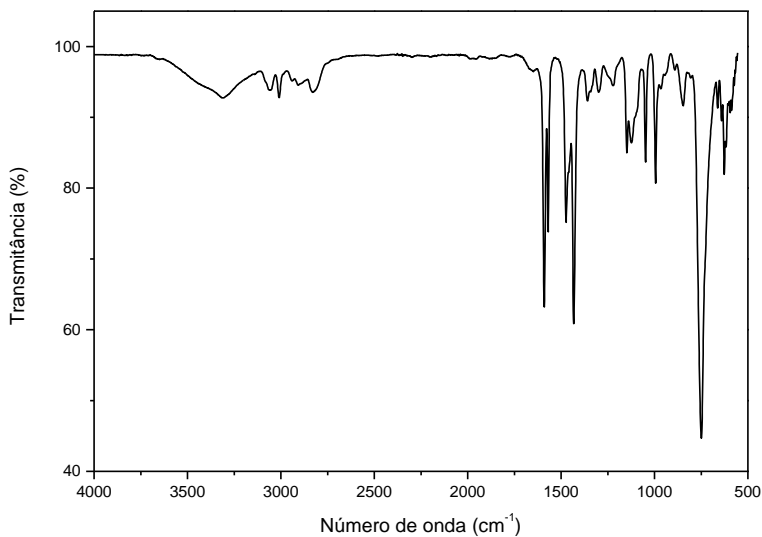


O bpma foi sintetizado através de uma reação de aminação redutiva entre a 2-(aminometil)piridina e o 2-piridilcarboxialdeído, descrita por Neves *et al.* (1996).

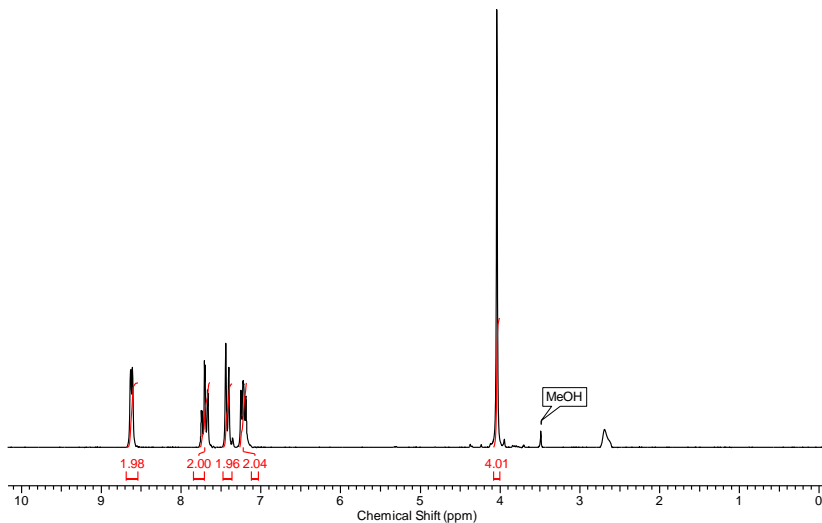
Em um balão de 250 mL, adicionou-se 10,8 g da 2-(aminometil)piridina (100 mmol; $108,14 \text{ g mol}^{-1}$) e metanol. Sob banho de gelo, adicionou-se lentamente a esta solução 9,51 mL de 2-piridilcarboxialdeído (100 mmol; $107,11 \text{ g mol}^{-1}$; $1,12 \text{ g mL}^{-1}$) com o auxílio de um funil de adição. Após o término da adição, o banho de gelo foi retirado e o sistema reacional permaneceu sob agitação por 1 hora.

Na sequência, a solução foi transferida para um frasco de hidrogenação e adicionou-se 1 g de catalisador paládio/carbono 5% a este. O sistema permaneceu sob agitação e atmosfera de hidrogênio a 40 psi por 15 horas. Em seguida, a mistura foi filtrada em um funil de Büchner para separar o catalisador e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Obteve-se um óleo amarelo com rendimento quantitativo.

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



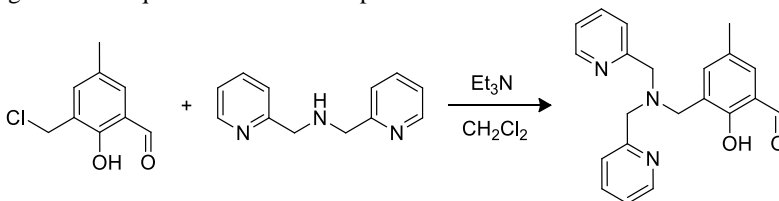
IV (ATR) em cm^{-1} : ν (N-H) 3313; ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3057-2828; ν (C=N e C=C) 1590-1432; ν (C-N) 1148; δ (C-H_{ar}) 750.

Figura 15 – Espectro de RMN de ^1H do bpma em CDCl_3 .

RMN de ^1H (200 MHz; CDCl_3), δ em ppm: 2,69 (s, 1 H, NH); 4,04 (s, 4 H, CH_2); 7,21 (dd, 2 H, CH_{ar}); 7,42 (d, 2 H, CH_{ar}); 7,70 (td, 2 H, CH_{ar}); 8,62 (d, 2 H, CH_{ar}).

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

Figura 16 – Esquema da síntese do bpmamff.



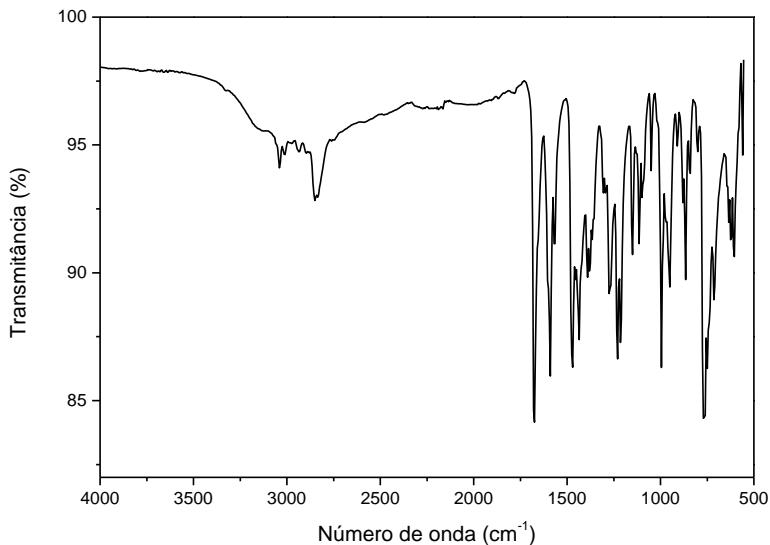
O procedimento para a síntese do bpmamff foi realizado de acordo com a rota descrita por Karsten *et al.* (2002).

Em um balão de 250 mL, adicionou-se 5,6 g de cmff (30 mmol; $184,62 \text{ g mol}^{-1}$) dissolvidos em 80 mL de diclorometano. À esta solução, adicionou-se lentamente, com um funil de adição, 80 mL de uma solução de bpma (6,0 g; 30 mmol; $199,26 \text{ g mol}^{-1}$) também dissolvido em diclorometano. A adição foi realizada sob agitação e em banho de gelo. Após o término desta, o sistema reacional permaneceu sob agitação por mais 3 horas, em temperatura ambiente.

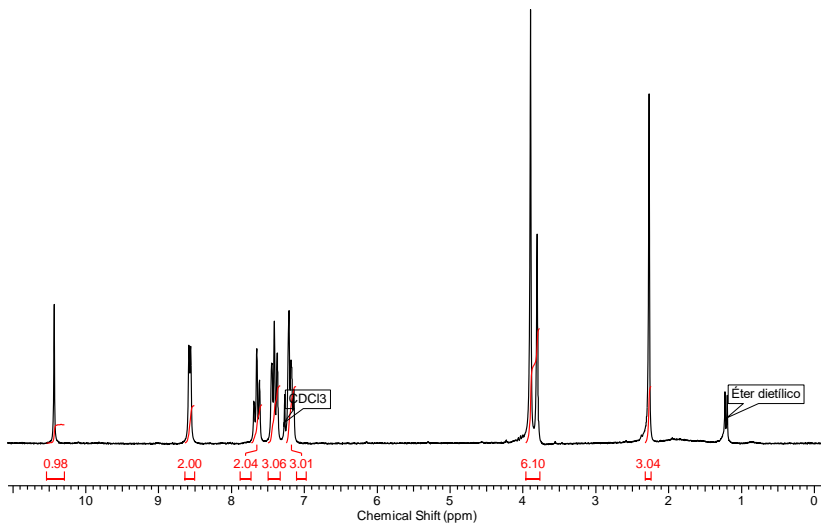
Em seguida, transferiu-se a solução para um funil de separação, no qual foi lavada uma vez com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio. As fases orgânica e aquosa foram separadas, sendo que então adicionou-se Na_2SO_4 anidro à fase orgânica e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida.

O óleo resultante foi recristalizado em 2-propanol quente. No outro dia, filtrou-se o precipitado cristalino formado em um funil de placa porosa, lavando-o com éter gelado. O produto obtido ao final foi um sólido amarelo, com rendimento de 74%.

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



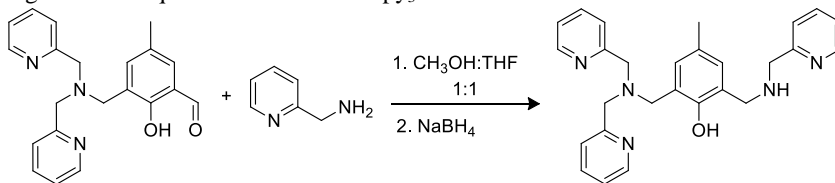
IV (ATR) em cm^{-1} : ν (C-H_{ar} , C-H_{alif} e C-H_{ald}) 3040-2834; ν (C=O) 1677; ν (C=N e C=C) 1590-1435; ν (C-N) 1150; δ (C-H_{ar}) 765.

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

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

2.4.4.1.4 Precursor Hpy_3 – 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil]fenol

Figura 19 – Esquema da síntese do Hpy_3 .

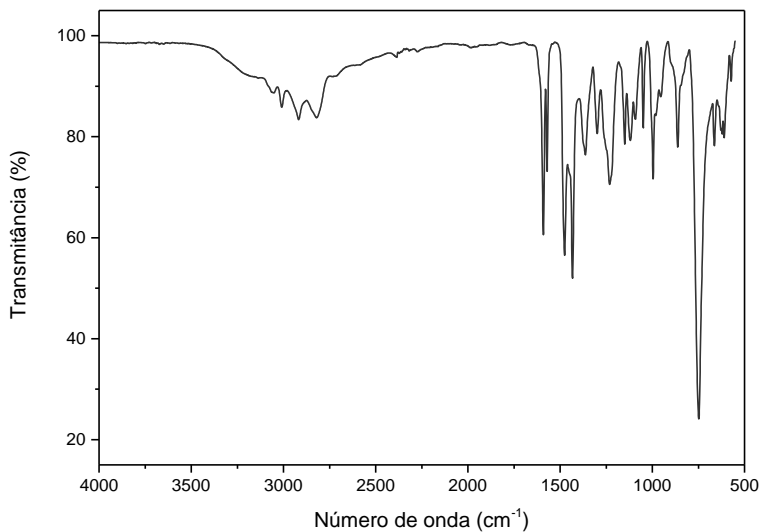


A síntese do Hpy_3 foi realizada de acordo com o procedimento experimental descrito por Greatti *et al.* (2008).

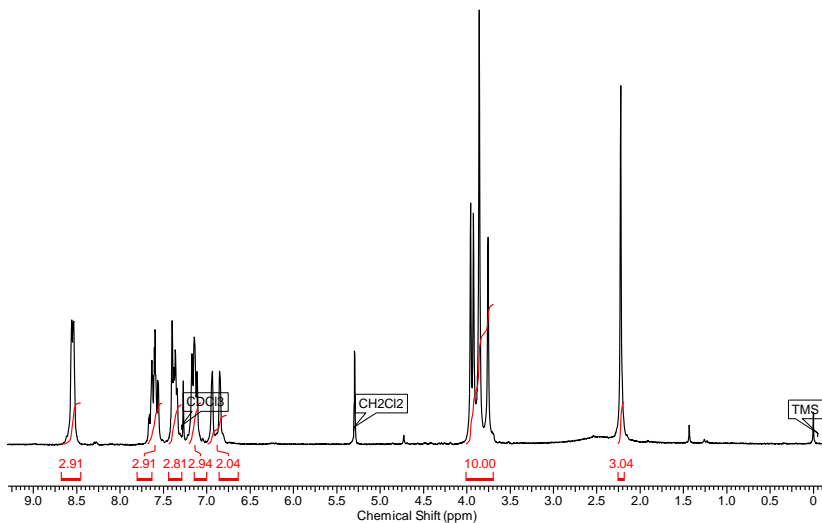
Em um balão de 250 mL, foram adicionados 2,78 g de bpmamff (8 mmol; $347,42 \text{ g mol}^{-1}$) e 80 mL de uma mistura de $\text{CH}_3\text{OH}/\text{THF}$ (1:1, v/v). Após a solubilização do aldeído, acrescentou-se ao sistema 0,85 mL de 2-(aminometil)piridina (8,2 mmol; $108,14 \text{ g mol}^{-1}$; $1,049 \text{ g mL}^{-1}$) e o mesmo permaneceu sob agitação por 1 hora.

Terminado este tempo, adicionou-se lentamente 0,31 g de borohidreto de sódio (8,2 mmol; $37,83 \text{ g mol}^{-1}$) para reduzir a imina formada. Ao final da adição, a reação permaneceu sob agitação por mais 1 hora e, em seguida, o solvente foi evaporado à pressão reduzida.

O óleo resultante foi dissolvido em 60 mL de diclorometano e adicionou-se 60 mL de uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio, sendo que esta mistura permaneceu sob agitação por 15 minutos. Na sequência, a mistura foi colocada em um funil de separação, e a fase orgânica foi lavada mais 5 vezes com 50 mL de solução de bicarbonato de sódio saturada. Ao término, a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente foi retirado à pressão reduzida, restando um óleo claro, com rendimento de 90%.

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

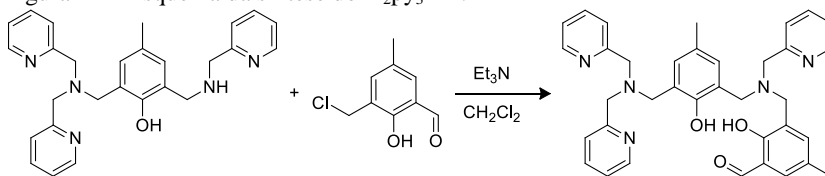
IV (ATR) em cm⁻¹: ν (N-H) 3213; ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3013-2818; ν (C=N e C=C) 1591-1433; ν (C-N) 1148; δ (C-H_{ar}) 746.

Figura 21 – Espectro de RMN de ¹H do Hpy₃ em CDCl₃.

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

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

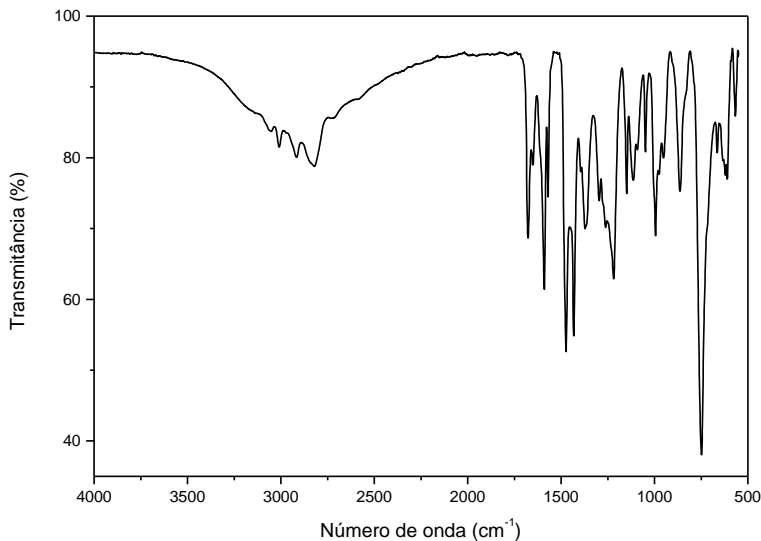
Figura 22 – Esquema da síntese do $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$.



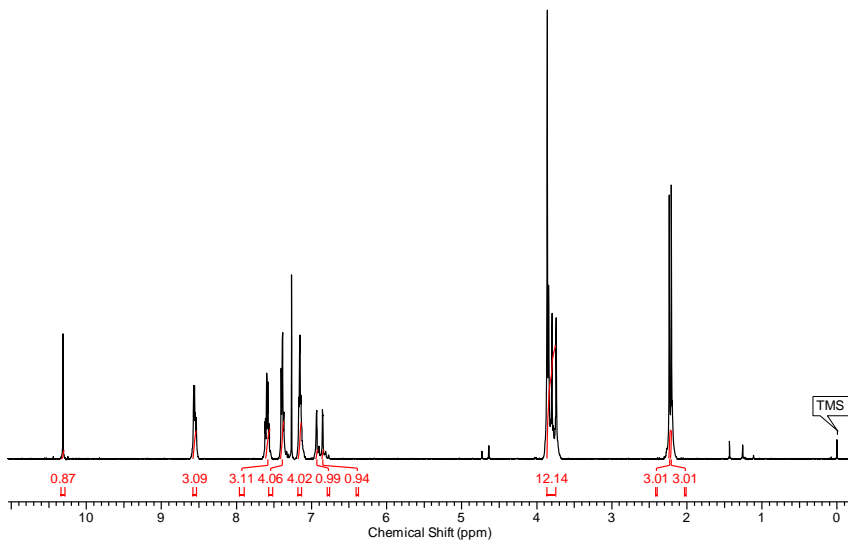
O ligante foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Piovezan *et al.* (2010).

Em um balão de 250 mL, adicionaram-se 4,39 g de Hpy_3 (10 mmol; $439,56 \text{ g mol}^{-1}$), 1,7 mL de trietilamina (12 mmol; $101,19 \text{ g mol}^{-1}$) e 80 mL de diclorometano. À solução formada, adicionou-se 1,85 g de cmff também solubilizado em diclorometano (10 mmol; $184,62 \text{ g mol}^{-1}$). O sistema reacional permaneceu sob refluxo e agitação durante 5 dias.

Ao término deste período, a solução foi extraída com uma solução aquosa 10% de cloreto de amônio (5 x 40 mL), a fase aquosa foi então separada da fase orgânica e alcalinizada com uma solução saturada de carbonato de sódio até $\text{pH} = 10$. Esta fase aquosa foi extraída em seguida com diclorometano (5 x 30 mL), sendo ao final a fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida. Foi obtido um sólido amarelo, com rendimento de 87%.

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

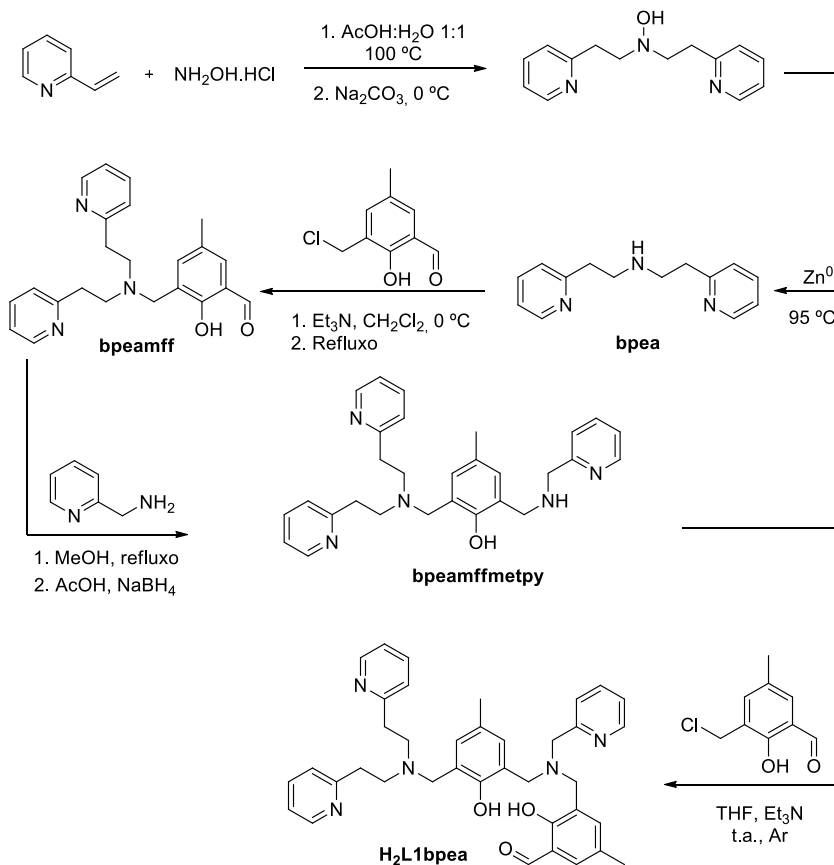
IV (ATR) em cm⁻¹: ν (C-H_{ar}, C-H_{alif} e C-H_{ald}) 3055-2830; ν (C=O) 1677; ν (C=N e C=C) 1592-1433; ν (C-N) 1149; δ (C-H_{ar}) 748.

Figura 24 – Espectro de RMN de ¹H do H₂py₃mff em CDCl₃.

RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3), δ em ppm: 2,21 (s, 3 H, CH_3); 2,24 (s, 3 H, CH_3); 3,75-3,87 (m, 12 H, CH_2); 6,86 (s, 1 H, CH_{ar}); 6,94 (s, 1 H, CH_{ar}); 7,15-7,18 (m, 4 H, CH_{ar}); 7,38-7,41 (m, 4 H, CH_{ar}); 7,57-7,63 (m, 3 H, CH_{ar}); 8,54-8,58 (m, 3 H, CH_{ar}); 10,32 (s, 1 H, CH_{ald}).

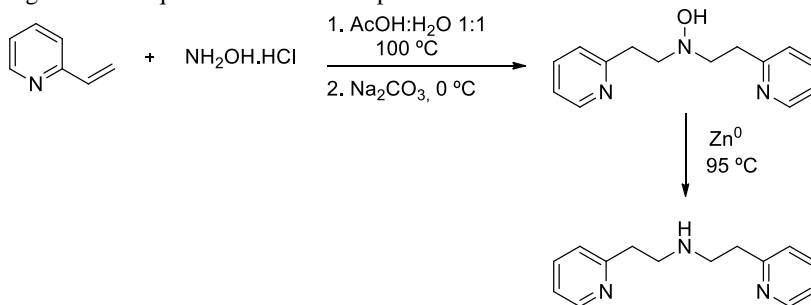
2.4.4.2 Ligante $\text{H}_2\text{L1bpea}$ – 2-[*N*-bis-(2-piridiletil)aminometil]-4-metil-6-[*N*-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol

Figura 25 – Rota sintética para a obtenção dos precursores e ligante $\text{H}_2\text{L1bpea}$.



2.4.4.2.1 Precursor bpea – bis(2-piridiletíl)amina

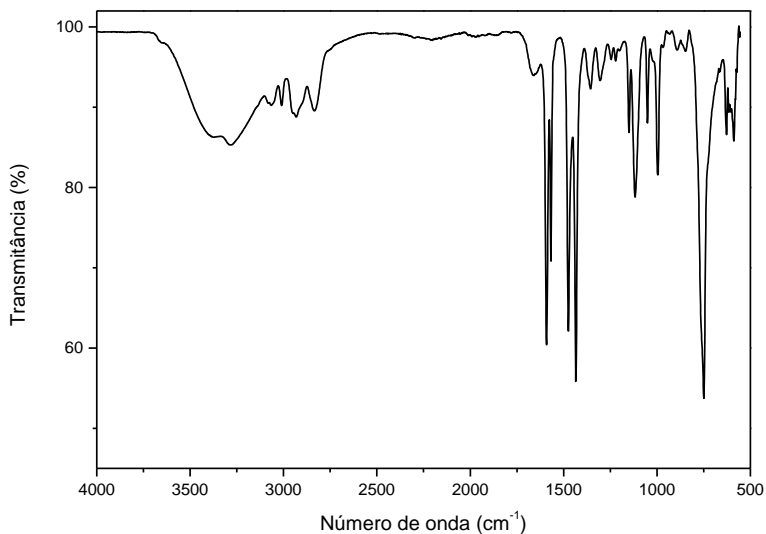
Figura 26 – Esquema da síntese do bpea.



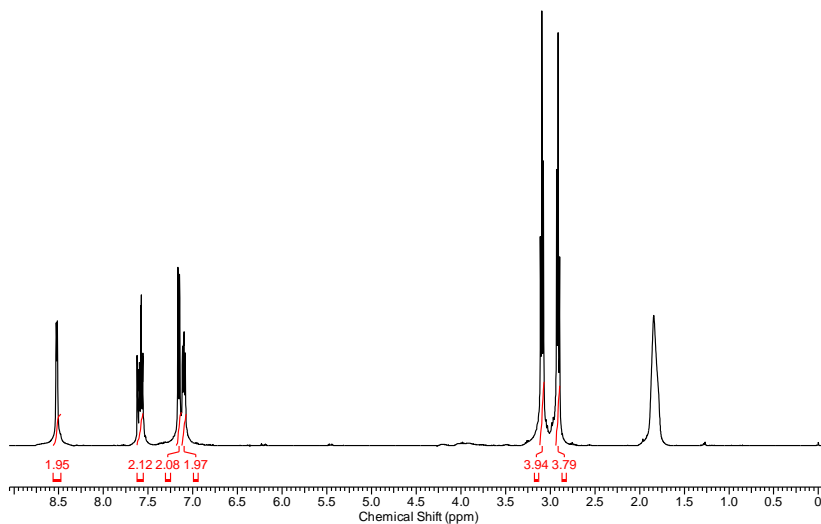
A síntese da bis(2-piridiletíl)amina foi realizada modificando a metodologia descrita por Mundinger *et al.* (2012). Em um balão de 125 mL, adicionou-se 7,00 g de hidroxilamina (100 mmol ; $69,49\text{ g mol}^{-1}$) solubilizados em 50 mL de ácido acético 50%. A esta solução, adicionou-se 21,56 mL de 2-vinilpiridina destilada (200 mmol ; $105,14\text{ g mol}^{-1}$; $0,975\text{ g mL}^{-1}$) e deixou-se a mistura reacional em aquecimento à $100\text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se 32,00 g de carbonato de sódio ($301,92\text{ mmol}$; $105,99\text{ g mol}^{-1}$) sob banho de gelo. O sólido obtido, proveniente da neutralização pelo carbonato de sódio, foi filtrado em um funil de placa porosa e lavado com acetona. O filtrado resultante foi concentrado sob pressão reduzida e, em seguida, solubilizado em uma quantidade mínima de uma mistura de benzeno e éter de petróleo (5:3, v/v). A solução permaneceu em repouso por 24 horas em baixa temperatura. Após este período, foram obtidos cristais amarelados do ligante hidroxilado, que foram filtrados em funil de placa porosa e lavados com éter gelado. O rendimento desta etapa foi de 60%.

Para a segunda parte da reação, foi necessário ativar previamente o zinco metálico: manteve-se 3,92 g de zinco metálico (60 mmol ; $65,38\text{ g mol}^{-1}$) sob agitação em uma solução de HCl 2% durante cinco minutos. Após este tempo, o zinco foi filtrado, seco e macerado até se obter um pó fino. A redução do ligante hidroxilado ($14,59\text{ g}$; 60 mmol ; $243,14\text{ g mol}^{-1}$) foi realizada aquecendo-o com o zinco metálico previamente ativado em uma solução de HCl 2 N à $95\text{ }^\circ\text{C}$ por 1,5 hora. Após o resfriamento desta solução, ajustou-se o pH da mesma para 10 com uma solução aquosa de cloreto de amônio e, depois, extraiu-se com diclorometano. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida, obtendo-se um óleo amarelado com rendimento de 60% em relação ao ligante hidroxilado.

Figura 27 – Espectro de IV (ATR) do bpea.



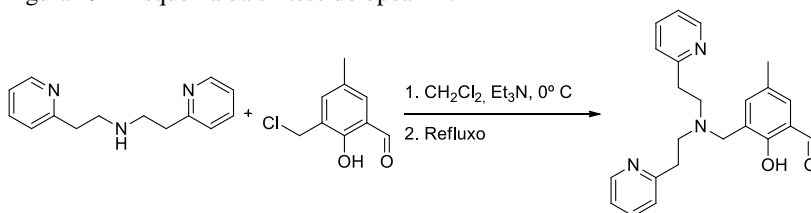
IV (ATR) em cm⁻¹: ν (N-H) 3283-3373; ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3080-2835; ν (C=N e C=C) 1590-1434; ν (C-N) 1150; δ (C-H_{ar}) 749.

Figura 28 – Espectro de RMN de ¹H do bpea em CDCl₃.

RMN de ^1H (200 MHz; CDCl_3), δ em ppm: 1,84 (s, 1 H, NH); 2,91 (t, 4 H, CH_2); 3,09 (t, 4 H, CH_2); 7,10 (t, 2 H, CH_{ar}); 7,16 (d, 2 H, CH_{ar}); 7,56-7,62 (m, 2 H, CH_{ar}); 8,52 (d, 2 H, CH_{ar}).

2.4.4.2.2 Precursor bpeamff – 2-[N-bis-(2-piridiletil)aminometil]-4-metil-6-formilfenol

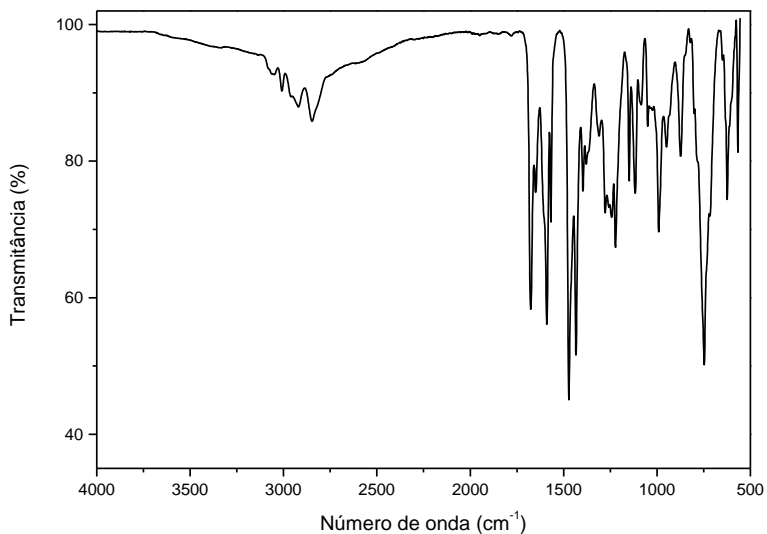
Figura 29 – Esquema da síntese do bpeamff.



Em um balão de 125 mL, solubilizou-se 0,92 g de cmff (5 mmol; $184,62\text{ g mol}^{-1}$) em aproximadamente 50 mL de diclorometano. Adicionou-se, sob banho de gelo, 1,13 g do bpea (5 mmol; $227,14\text{ g mol}^{-1}$) e trietilamina destilada com 30% de excesso, retirando-se o banho de gelo em seguida. A mistura reacional permaneceu em refluxo a 45°C por 6 dias.

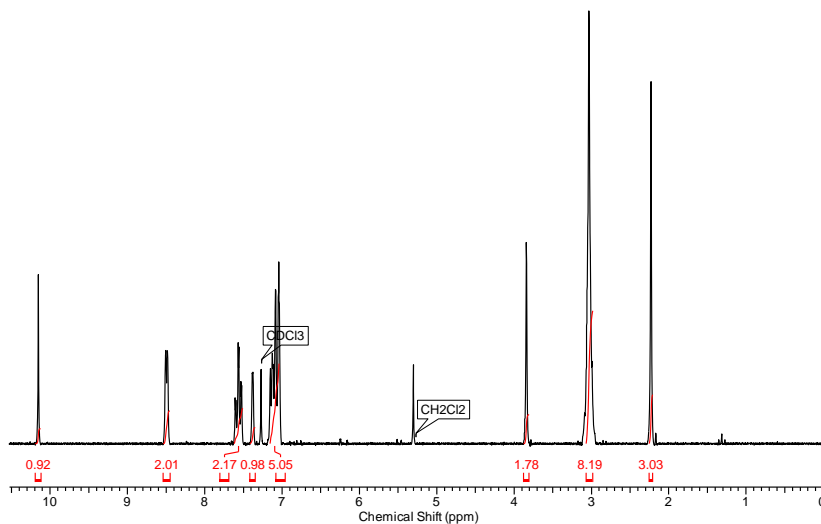
Após este período, a mistura foi transferida para um funil de separação e a fase orgânica foi lavada com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (5 x 20 mL). Em seguida, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente retirado em pressão reduzida. Obteve-se um óleo castanho claro com rendimento de 81% em relação ao bpea.

Figura 30 – Espectro de IV (ATR) do bpeamff.



IV (ATR) em cm^{-1} : ν (C-H_{ar}, C-H_{alif} e C-H_{ald}) 3057-2847; ν (C=O) 1675; ν (C=N e C=C) 1590-1434; ν (C-N) 1149; δ (C-H_{ar}) 747.

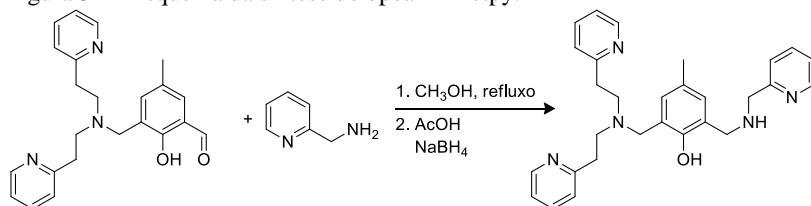
Figura 31 – Espectro de RMN de ^1H do bpeamff em CDCl_3 .



RMN de ^1H (200 MHz; CDCl_3), δ em ppm: 2,23 (s, 3 H, CH_3); 3,03 (s, 8 H, CH_2); 3,84 (s, 2 H, CH_2); 7,04-7,15 (m, 5 H, CH_{ar}); 7,38 (s, 1 H, CH_{ar}); 7,67 (td, 2 H, CH_{ar}); 8,49 (d, 2 H, CH_{ar}); 10,15 (s, 1 H, CH_{ald}).

2.4.4.2.3 Precursor bpeamffmetpy – 2-[N-bis-(2-piridiletil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil]fenol

Figura 32 – Esquema da síntese do bpeamffmetpy.

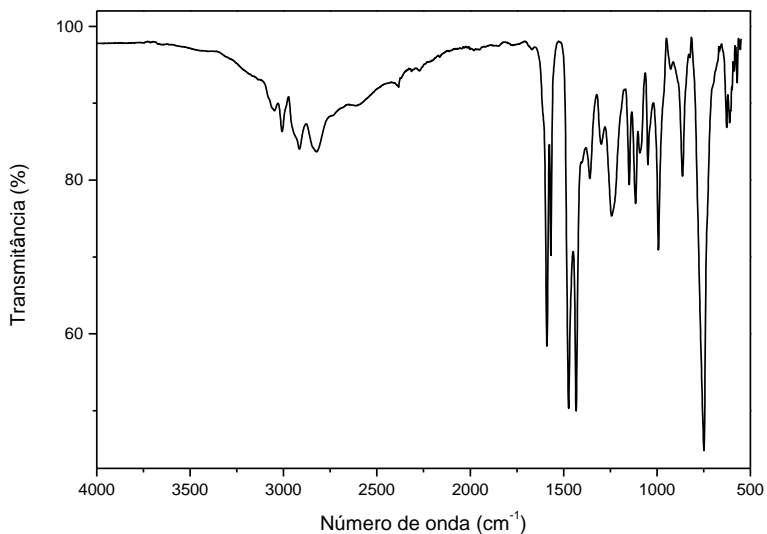


Em um balão de 250 mL, solubilizou-se 2,25 g do precursor bpeamff (6 mmol; $375,19 \text{ g mol}^{-1}$) em metanol. Em seguida, adicionou-se a 2-aminometilpiridina com 10% de excesso (0,7 mL; 6,90 mmol; $108,07 \text{ g mol}^{-1}$; $1,065 \text{ g mL}^{-1}$) e o sistema reacional permaneceu em refluxo por 4 dias.

Após este período, o sistema foi colocado em banho de gelo e, passados 20 minutos, se adicionou 1 equivalente de ácido acético (0,4 mL; 6 mmol; $60,05 \text{ g mol}^{-1}$; $1,05 \text{ g mL}^{-1}$). Na sequência, também foi adicionado 3 equivalentes de borohidreto de sódio (18 mmol; $37,83 \text{ g mol}^{-1}$), em pequenas porções, por aproximadamente 1 hora. O sistema reacional foi mantido sob banho de gelo e em agitação por 1 hora.

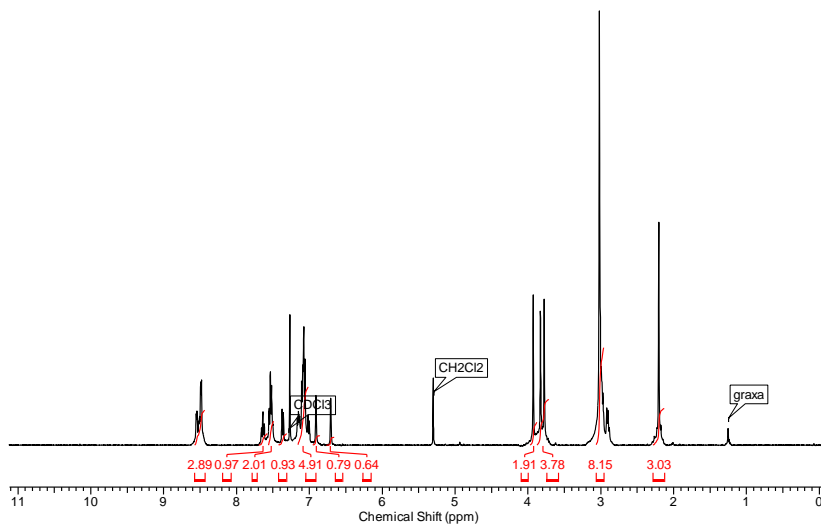
Posteriormente, retirou-se o banho de gelo e manteve-se a agitação por mais 1 hora. Em seguida, o solvente foi removido sob pressão reduzida e o óleo resultante foi solubilizado em água. O pH da solução foi ajustado até 7 com a adição de HCl 1 mol L^{-1} em banho de gelo. Após a neutralização, adicionou-se diclorometano e extraiu-se com cloreto de amônio saturado. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi rotaevaporado. Ao final, obteve-se um óleo marrom com rendimento de 72%.

Figura 33 – Espectro de IV (ATR) do bpeamffmety.



IV (ATR) em cm^{-1} : ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3048-2824; ν (C=N e C=C) 1589-1433; ν (C-N) 1149; δ (C-H_{ar}) 748.

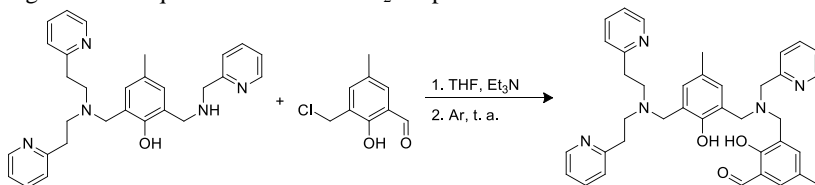
Figura 34 – Espectro de RMN de ^1H do bpeamffmety em CDCl_3 .



RMN de ^1H (200 MHz; CDCl_3), δ em ppm: 2,20 (s, 3 H, CH_3); 3,02 (m, 8 H, CH_2); 3,80 (d, 4 H, CH_2); 3,93 (s, 2 H, CH_2); 6,71 (s, 1 H, CH_{ar}); 6,91 (s, 1 H, CH_{ar}); 7,00-7,17 (m, 5 H, CH_{ar}); 7,37 (d, 1 H, CH_{ar}); 7,50-7,56 (m, 2 H, CH_{ar}); 7,64 (td, 1 H, CH_{ar}); 8,48-8,55 (m, 3 H, CH_{ar}).

2.4.4.2.4 Ligante $\text{H}_2\text{L1bpea}$ – 2-[*N*-bis-(2-piridiletíl)aminometil]-4-metil-6-[*N*-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol

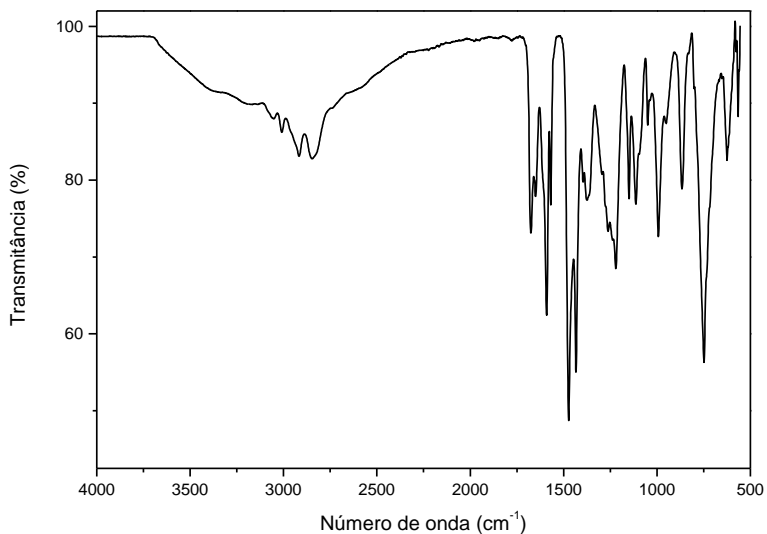
Figura 35 – Esquema da síntese do $\text{H}_2\text{L1bpea}$.



Solubilizou-se 0,49 g do precursor bpeamffmetpy (1,06 mmol, $467,27 \text{ g mol}^{-1}$) em aproximadamente 10 mL de tetraidrofurano seco e deixou-se em agitação sob argônio. Em seguida, adicionou-se 0,146 mL de trietilamina (1,06 mmol, $101,19 \text{ g mol}^{-1}$, $0,73 \text{ g mL}^{-1}$). A mistura foi mantida em agitação e resfriada a $0 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho de gelo por 15 minutos. Após este período, adicionou-se 0,195 g de cmff (1,06 mmol, $184,04 \text{ g mol}^{-1}$) solubilizado em tetraidrofurano. O banho de gelo foi retirado e a mistura reacional permaneceu em agitação à temperatura ambiente.

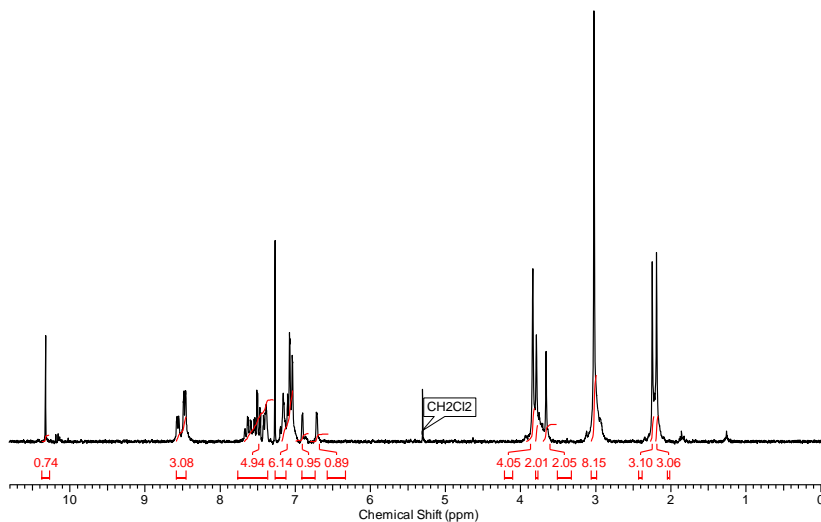
Após 50 horas, retirou-se o solvente sob pressão reduzida e o óleo resultante foi solubilizado em diclorometano e lavado com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (6 x 40 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi retirado em rotaevaporador. Foi obtido um óleo amarelo, com rendimento de 84%.

Figura 36 – Espectro de IV (ATR) do H₂L1bpea.



IV (ATR) em cm^{-1} : ν (C-H_{ar}, C-H_{alif} e C-H_{ald}) 3052-2843; ν (C=O) 1675; ν (C=N e C=C) 1591-1434; ν (C-N) 993; δ (C-H_{ar}) 748.

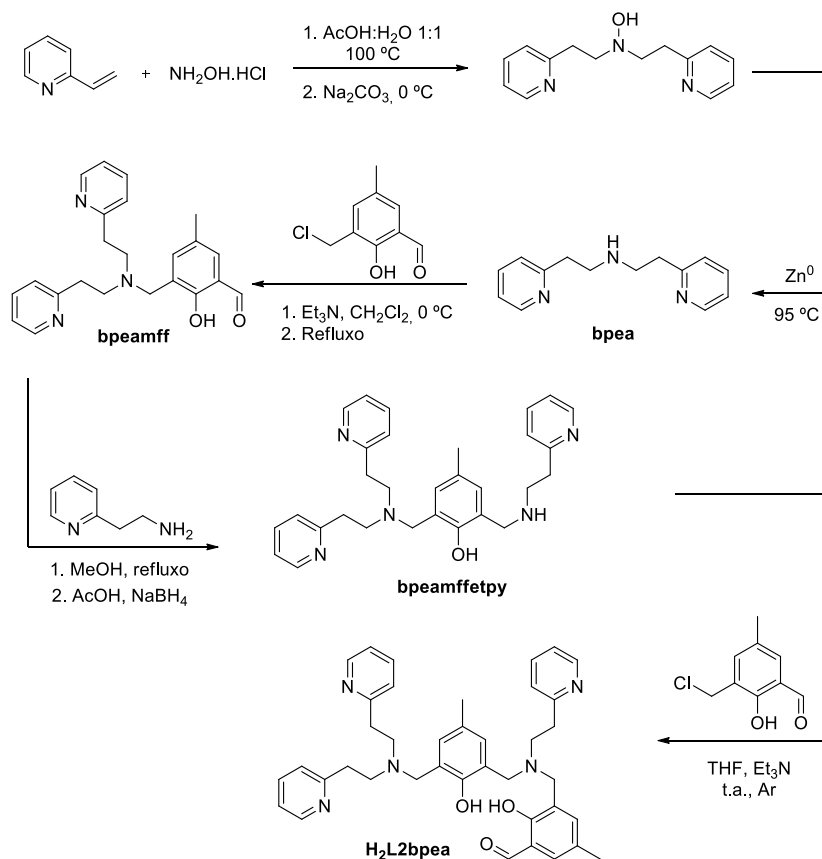
Figura 37 – Espectro de RMN de ¹H do H₂L1bpea.



RMN de ^1H (200 MHz; CDCl_3), δ em ppm: 2,19 (s, 3 H, CH_3); 2,25 (s, 3 H, CH_3); 2,81-3,02 (m, 8 H, CH_2); 3,66 (s, 2 H, CH_2); 3,79 (s, 2 H, CH_2); 3,84 (s, 4 H, CH_2); 6,72 (s, 1 H, CH_{ar}); 6,91 (s, 1 H, CH_{ar}); 7,16 (m, 6 H, CH_{ar}); 7,46-7,63 (m, 5 H, CH_{ar}); 8,48-8,55 (m, 3 H, CH_{ar}); 10,32 (s, 1 H, CH_{ald}).

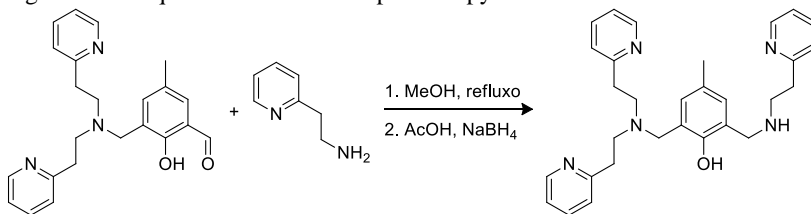
2.4.4.3 Ligante $\text{H}_2\text{L2bpea}$ – 2-[*N*-bis-(2-piridiletil)aminometil]-4-metil-6-[*N*-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridiletil)aminometil]fenol

Figura 38 – Rota sintética para a obtenção dos precursores e ligante $\text{H}_2\text{L2bpea}$.



2.4.4.3.1 Precursor bpeamffetpy – 2-[N-bis-(2-piridiletil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridiletil)aminometil]fenol

Figura 39 – Esquema da síntese do bpeamffetpy.

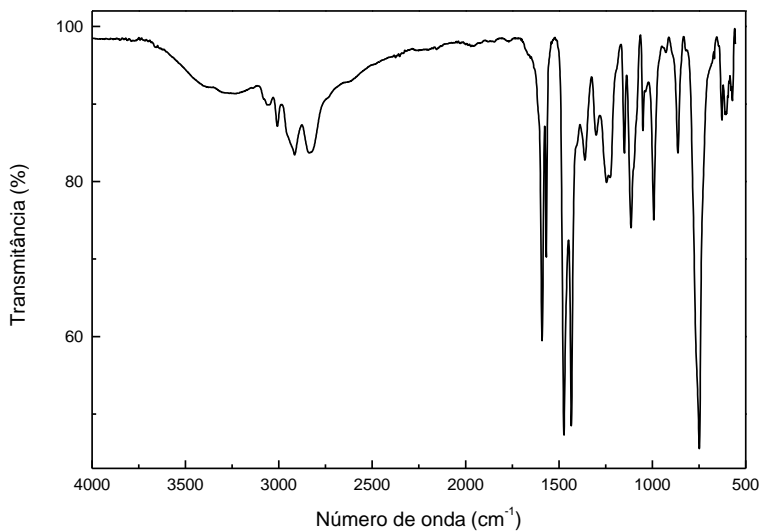


Em um balão de 250 mL, solubilizou-se 1,88 g de bpeamff (5 mmol; 375,19 g mol⁻¹) em metanol. Em seguida, adicionou-se a 2-aminoetilpiridina com 10% de excesso (0,7 mL; 5,85 mmol; 122,08 g mol⁻¹; 1,021 g mL⁻¹) e o sistema permaneceu em refluxo por 4 dias.

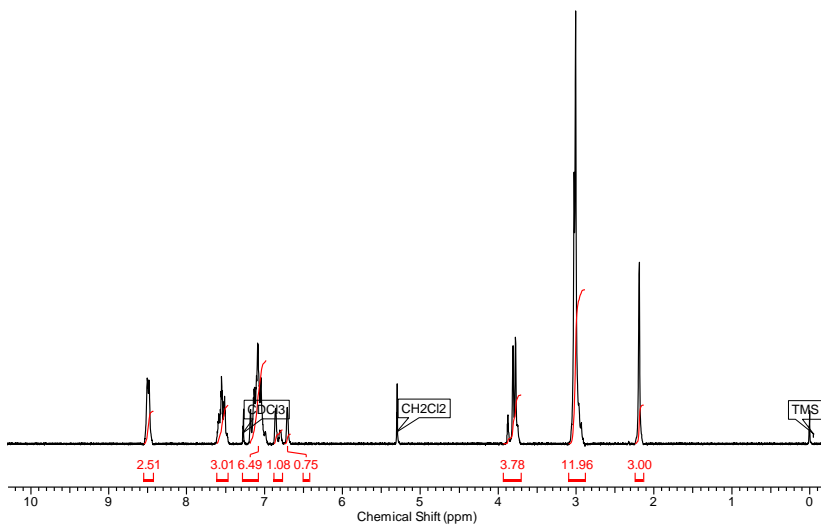
Após este período, o sistema foi colocado em banho de gelo e, passados 20 minutos, se adicionou 1 equivalente de ácido acético (0,3 mL; 5 mmol; 60,05 g mol⁻¹; 1,05 g mL⁻¹). Na sequência, também foi adicionado 3 equivalentes de borohidreto de sódio (15 mmol; 37,83 g mol⁻¹), em pequenas porções, por aproximadamente 1 hora. O sistema reacional foi mantido sob banho de gelo e em agitação por 1 hora.

Posteriormente, retirou-se o banho de gelo e manteve-se a agitação por mais 1 hora. Em seguida, o solvente foi removido sob pressão reduzida e o óleo resultante foi solubilizado em água. O pH da solução foi ajustado até 7 com a adição de HCl 1 mol L⁻¹ em banho de gelo. Após a neutralização, adicionou-se diclorometano e extraiu-se com cloreto de amônio saturado. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi rotaevaporado. Ao final, obteve-se um óleo marrom com rendimento de 82%.

Figura 40 – Espectro de IV (ATR) do bpeamffetpy.



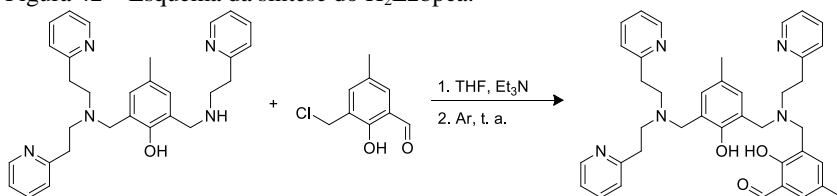
IV (ATR) em cm^{-1} : ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3058-2832; ν (C=N e C=C) 1590-1434; ν (C-N) 991; δ (C-H_{ar}) 747.

Figura 41 – Espectro de RMN de ^1H do bpeamffetpy em CDCl_3 .

RMN de ^1H (200 MHz; CDCl_3), δ em ppm: 2,19 (s, 3 H, CH_3); 3,01 (m, 12 H, CH_2); 3,78-3,87 (m, 4 H, CH_2); 6,71 (s, 1 H, CH_{ar}); 6,80 (s, 1 H, CH_{ar}); 6,99-7,18 (m, 6 H, CH_{ar}); 7,61-7,47 (m, 3 H, CH_{ar}); 8,48-8,51 (m, 3 H, CH_{ar}).

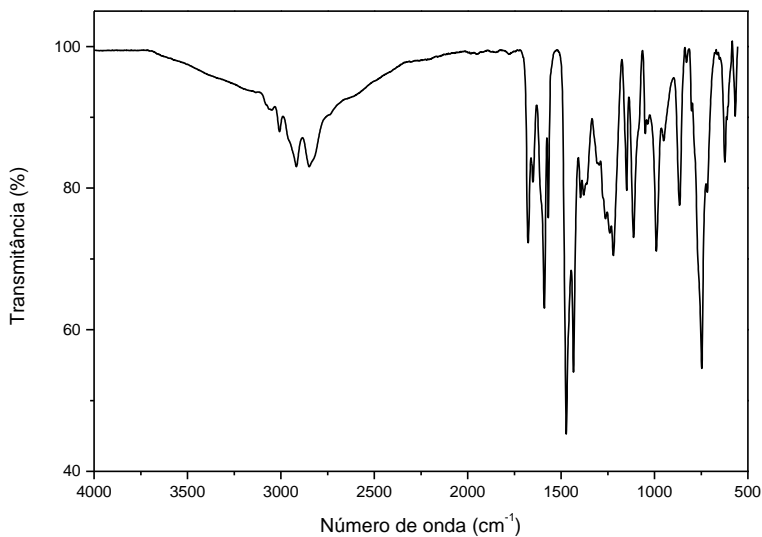
2.4.4.3.2 Ligante $\text{H}_2\text{L2bpea}$ – 2-[N-bis-(2-piridiletíl)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridiletíl)aminometil]fenol

Figura 42 – Esquema da síntese do $\text{H}_2\text{L2bpea}$.

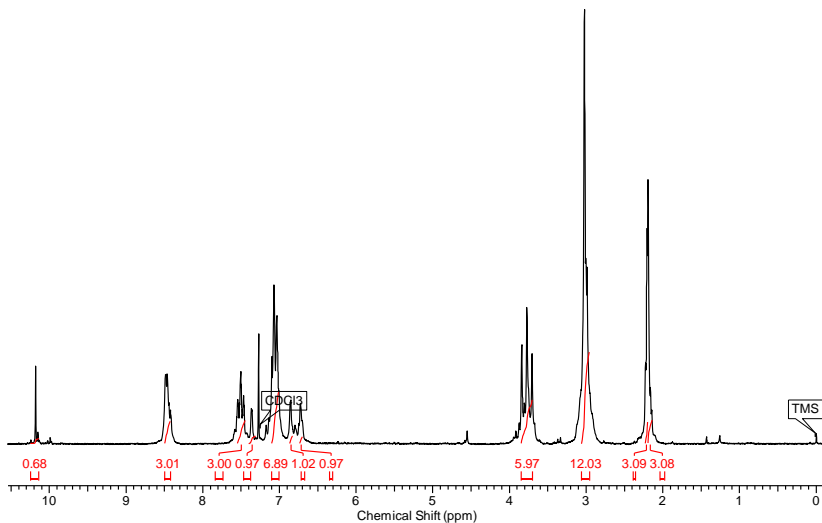


Solubilizou-se 0,51 g do precursor bpeamffetpy (1,06 mmol, $481,28 \text{ g mol}^{-1}$) em aproximadamente 10 mL de tetraidrofurano seco e deixou-se em agitação sob argônio. Em seguida, adicionou-se 0,146 mL de trietilamina (1,06 mmol, $101,19 \text{ g mol}^{-1}$, $0,73 \text{ mL}^{-1}$). A mistura foi mantida em agitação e resfriada a $0 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho de gelo por 15 minutos. Após este período, adicionou-se 0,195 g do cmff (1,06 mmol, $184,04 \text{ g mol}^{-1}$) solubilizado em tetraidrofurano. O banho de gelo foi retirado e a mistura reacional permaneceu em agitação à temperatura ambiente.

Após 50 horas, retirou-se o solvente e o sólido resultante foi solubilizado em diclorometano e lavado com uma solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi retirado em rotaevaporador, obtendo-se um óleo amarelo escuro com rendimento de 79%.

Figura 43 – Espectro de IV (ATR) do H₂L2bpea.

IV (ATR) em cm^{-1} : ν (C-H_{ar}, C-H_{alif} e C-H_{ald}) 3056-2843; ν (C=O) 1677; ν (C=N e C=C) 1589-1433; ν (C-N) 988; δ (C-H_{ar}) 747.

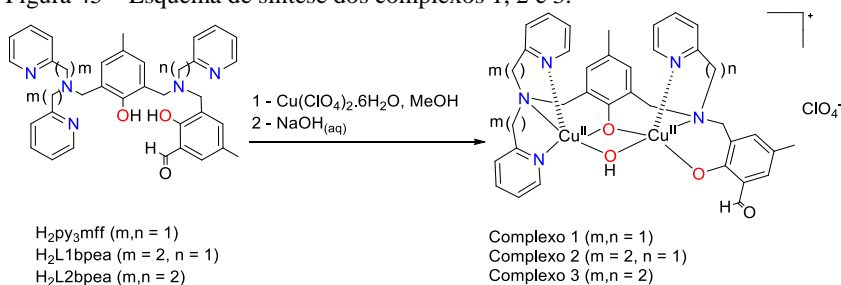
Figura 44 – Espectro de RMN de ¹H do H₂L2bpea em CDCl₃.

RMN de ^1H (200 MHz; CDCl_3), δ em ppm: 2,14 (s, 3 H, CH_3); 2,22 (s, 3 H, CH_3); 2,99-3,02 (m, 12 H, CH_2); 3,71-3,92 (m, 6 H, CH_2); 6,73 (s, 1 H, CH_{ar}); 6,86 (s, 1 H, CH_{ar}); 7,01-7,10 (m, 7 H, CH_{ar}); 7,36 (s, 1 H, CH_{ar}); 7,46-7,59 (m, 3 H, CH_{ar}); 8,42-8,48 (m, 3 H, CH_{ar}); 10,18 (s, 1 H, CH_{ald}).

2.4.5 Síntese dos complexos

Todos os complexos foram sintetizados através da metodologia esquematizada na Figura 45.

Figura 45 – Esquema de síntese dos complexos 1, 2 e 3.



Em um béquer de 100 mL, solubilizou-se 0,5 mmol do ligante ($\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$, $\text{H}_2\text{L1bpea}$ ou $\text{H}_2\text{L2bpea}$) em metanol e, sob agitação, adicionou-se 1 mmol de perclorato de cobre(II) hexahidratado (0,37 g; $370,54 \text{ g mol}^{-1}$) também solubilizado em metanol. Às soluções resultantes, adicionou-se 0,5 mL de $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ 1 mol L^{-1} .

Na sequência, as soluções foram filtradas e permaneceram em repouso à temperatura ambiente para que houvesse a evaporação lenta do solvente. Após recristalização em água, obtiveram-se sólidos esverdeados, que foram lavados com isopropanol e éter gelados, e caracterizados através de diferentes técnicas, conforme apresentado na próxima subseção.

Rendimentos: 1. 75 %; 2. 72 %; e 3. 78 %.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.5.1 Caracterizações dos ligantes

Os ligantes H₂py₃mff, H₂L1bpea e H₂L2bpea e seus precursores forem caracterizados através da espectroscopia no IV, RMN de ¹H e espectrometria de massas.

2.5.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Durante todas as etapas necessárias para a síntese dos ligantes, foram obtidos espectros na região do infravermelho dos compostos obtidos. Esta técnica foi utilizada como uma caracterização inicial para evidenciar que as reações de fato ocorreram.

A Tabela 2 apresenta as principais bandas observadas nos espectros de IV do ligante H₂py₃mff e de seus precursores.

Tabela 2 – Principais bandas e atribuições dos espectros de IV do H₂py₃mff e de seus precursores. Atribuições de acordo com Silverstein e Webster (2000).

Atribuições	cmff	bpma	bpmamff	Hpy ₃	H ₂ py ₃ mff
v (N-H)	-	3310	-	3213	-
v (C-H _{ar} e C-H _{alif})	3180-2865	3057-2828	3040-2834	3013-2818	3055-2830
v (C=O)	1659	-	1677	-	1677
v (C=N e C=C)	1600-1470	1590-1432	1590-1435	1591-1433	1592-1433
v (C-N)	-	1148	1150	1148	1149
δ (C-H _{ar})	702	749	765	746	748
v (C-Cl)	613	-	-	-	-

As bandas e atribuições realizadas estão de acordo com trabalhos anteriores do grupo (MELLER, 2018; HEYING, 2014; GREATTI *et al.*, 2008). Conforme observado acima, ao se comparar os espectros de IV de reagentes e produtos de cada reação, as principais diferenças encontradas consistem na presença ou ausência da banda de estiramento da ligação C=O, e na ausência da banda C=O, e no desaparecimento da banda de estiramento da ligação C-Cl, presente no espectro do cmff, que é um reagente utilizado em todas as reações (com exceção da reação de formação do bpma).

Para os ligantes H₂L1bpea e H₂L2bpea, as principais bandas encontradas e suas atribuições foram semelhantes às do H₂py₃mff, o que é esperado devido às semelhanças estruturais entre estes compostos. As Tabelas 3 e 4 apresentam as atribuições referentes às sínteses do H₂L1bpea e do H₂L2bpea, respectivamente.

Tabela 3 – Principais bandas e atribuições dos espectros de IV do H₂L1bpea e seus precursores. Atribuições de acordo com Silverstein e Webster (2000).

Atribuições	cmff	bpea	bpeamff	Bpeamffmetpy	H₂L1bpea
v (N-H)	-	3283- 3373	-	-	-
v (C-H _{ar} e C-H _{alif})	3180- 2865	3080- 2835	3057- 2847	3048-2822	3052-2843
v (C=O)	1659	-	1675	-	1677
v (C=N e C=C)	1600- 1470	1590- 1434	1590- 1434	1589-1433	1591-1434
v (C-N)	-	1150	1149	1149	1150
δ (C-H _{ar})	702	749	747	748	748
v (C-Cl)	613	-	-	-	-

Tabela 4 – Principais bandas e atribuições dos espectros de IV do H₂L2bpea e seus precursores. Atribuições de acordo com Silverstein e Webster (2000).

Atribuições	cmff	bpea	bpeamff	Bpeamffetpy	H₂L2bpea
v (N-H)	-	3283- 3373	-	-	-
v (C-H _{ar} e C-H _{alif})	3180- 2865	3080- 2835	3057- 2847	3058-2832	3056-2843
v (C=O)	1659	-	1675	-	1676
v (C=N e C=C)	1600- 1470	1590- 1434	1590- 1434	1590-1434	1589-1433
v (C-N)	-	1150	1149	1150	1149
δ (C-H _{ar})	702	749	747	747	746
v (C-Cl)	613	-	-	-	-

Ressalta-se que para os três ligantes, evidenciou-se, em relação ao seu precursor imediato, o aparecimento de uma banda de média intensidade aproximadamente em 1675 cm⁻¹, referente à ligação C=O do aldeído formado. Caracterizando, desta forma, que ocorreram as sínteses dos compostos esperados.

2.5.1.2 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H)

Além dos espectros na região do IV, foram obtidos espectros de RMN de ^1H para todos os precursores e ligantes. Os deslocamentos químicos dos precursores estão sumarizados nas Tabelas 5 e 6.

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

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

Tabela 6 – Deslocamentos químicos e atribuições dos espectros de RMN de ^1H dos precursores do $\text{H}_2\text{L1bpea}$ e do $\text{H}_2\text{L2bpea}$.

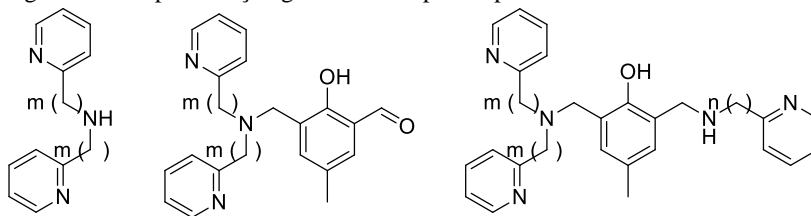
Atribuições	bpea	bpeamff	bpeamffmetpy	bpeamffetpy
CH_3	-	2,23 (3 H)	2,20 (3 H)	2,19 (3 H)
CH_2	2,91 (4 H) 3,09 (4 H)	3,03 (8 H) 3,84 (2 H)	3,02 (8 H) 3,80 (4 H) 3,93 (2 H)	3,01 (12 H) 3,78-3,87 (4 H)
C-H_{ar}	7,10 (2 H) 7,16 (2 H) 7,56-7,62 (2 H) 8,52 (2 H)	7,04-7,15 (5 H) 7,38 (1 H) 7,67 (2 H) 8,49 (2 H)	6,71 (1 H) 6,91 (1 H) 7,00-7,17 (5 H) 7,37 (1 H) 7,50-7,56 (2 H) 7,64 (1 H) 8,48-8,55 (3 H)	6,71 (1 H) 6,80 (1 H) 6,99-7,18 (6 H) 7,61-7,47 (3 H) 8,48-8,51 (3 H)
C-H_{ald}	-	10,15 (1 H)	-	-

A partir da observação da região em que há a presença dos sinais no espectro de RMN de ^1H e das integrações realizadas, foi possível diferenciá-los em metílicos, metilênicos e aromáticos, e confirmar a quantidade de átomos de hidrogênio presentes nas moléculas (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Para os compostos já caracterizados em outros trabalhos, as atribuições realizadas estão de acordo com o apresentado na literatura (MELLER, 2018; HEYING, 2014; PIOVEZAN *et al.*, 2010; GREATTI *et al.*, 2008). Os espectros do bpmamff e do bpma claramente se diferenciam pelo surgimento do sinal dos átomos de hidrogênios metílicos em 2,27 ppm e do sinal em 10,43 ppm, referente ao hidrogênio do aldeído.

No caso dos ligantes $\text{H}_2\text{L1bpea}$ e $\text{H}_2\text{L2bpea}$, a comparação dos espectros dos precursores segue a mesma lógica, visto que estruturalmente os compostos são semelhantes, alterando-se apenas o número de carbonos alifáticos (Figura 46).

Figura 46 – Representação geral dos compostos precursores sintetizados.



Precursores do H_2py_3mff : $m = n = 1$

Precursores do $H_2L1bpea$: $m = 2, n = 1$

Precursores do $H_2L2bpea$: $m = n = 2$

Assim como para o $bpmamff$ e para o $bpma$, as alterações entre os espectros do $bpea$ e do $bpeamff$ referem-se à presença de um sinal do H do grupo aldeído (em 10,15 ppm), além da integração dos hidrogênios metilênicos e surgimento de hidrogênios metílicos (em 2,23 ppm). As sínteses do $bpeamffmetpy$ e do $bpeamffetpy$ são confirmadas pela integração dos sinais presentes na região aromática e alifática.

Os deslocamentos químicos dos espectros de RMN de 1H dos ligantes finais estão sumarizados na Tabela abaixo.

Tabela 7 – Deslocamentos químicos dos espectros de RMN de 1H dos ligantes finais.

Atribuições	H_2py_3mff	$H_2L1bpea$	$H_2L2bpea$
CH_3	2,21 (3 H)	2,19 (3 H)	2,14 (3 H)
	2,24 (3 H)	2,25 (3 H)	2,22 (3 H)
CH_2	3,75-3,87 (12 H)	2,81-3,02 (8 H)	2,99-3,02 (12 H)
		3,66 (2 H)	3,71-3,92 (6 H)
		3,79 (2 H)	
		3,84 (4 H)	
CH_{ar}	6,86 (1 H)	6,72 (1 H)	6,73 (1 H)
	6,94 (1 H)	6,91 (1 H)	6,86 (1 H)
	7,15-7,18 (4 H)	7,16 (6 H)	7,01-7,10 (7 H)
	7,38-7,41 (4 H)	7,46-7,63 (5 H)	7,36 (1 H)
	7,57-7,63 (3 H)	8,48-8,55 (3 H)	7,46-7,59 (3 H)
	8,54-8,58 (3 H)		8,42-8,48 (3 H)
CH_{ald}	10,32 (1 H)	10,32 (1 H)	10,18 (1 H)

O espectro do ligante H_2py_3mff , em relação ao do Hpy_3 , apresenta o dobro de hidrogênios metílicos na integração, bem como um número maior de hidrogênios metilênicos e aromáticos, além de um sinal em 10,32 ppm referente ao aldeído. A mesma situação ocorre para o ligante $H_2L1bpea$ em relação ao precursor $bpeamffmetpy$ e para o $H_2L2bpea$ em relação ao $bpeamffetpy$.

2.5.1.3 Espectrometria de massas (ESI-MS)

A espectrometria de massas foi utilizada como mais uma forma de caracterização dos ligantes finais. Os espectros dos ligantes H_2py_3mff e $H_2L1bpea$ possuem como pico base a espécie $[M+H]^+$, conforme apresentado a seguir:

Figura 47 – Espectro de ESI-MS do H_2py_3mff em CH_3CN .

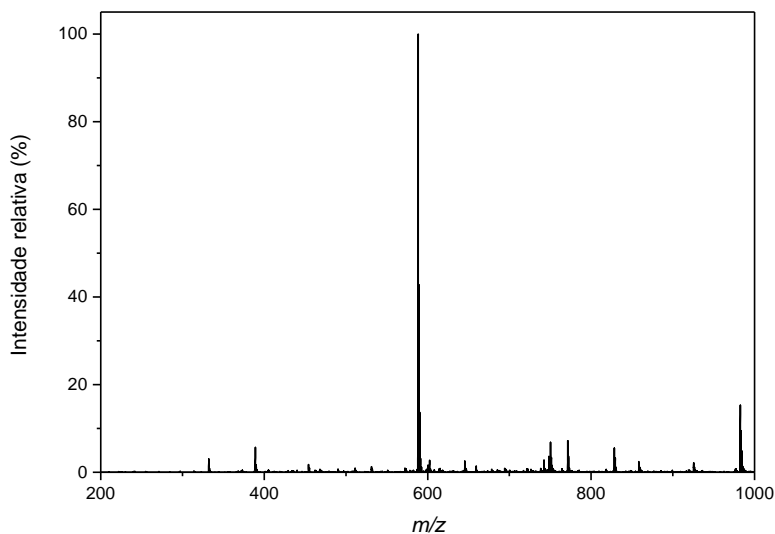


Figura 48 – Ampliação do conjunto de sinais com $m/z = 588,30$ do espectro de ESI-MS do H_2py_3mf . Em vermelho, a simulação da distribuição isotópica para a espécie proposta.

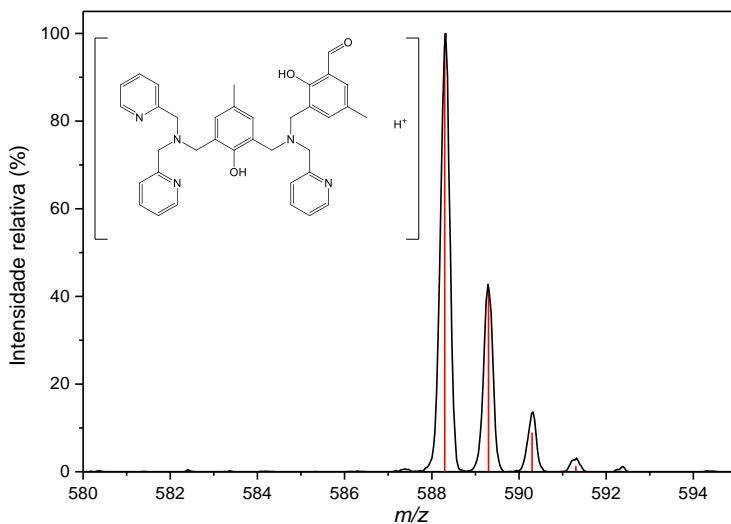


Figura 49 – Espectro de ESI-MS do ligante $H_2L1bpea$ em CH_3CN .

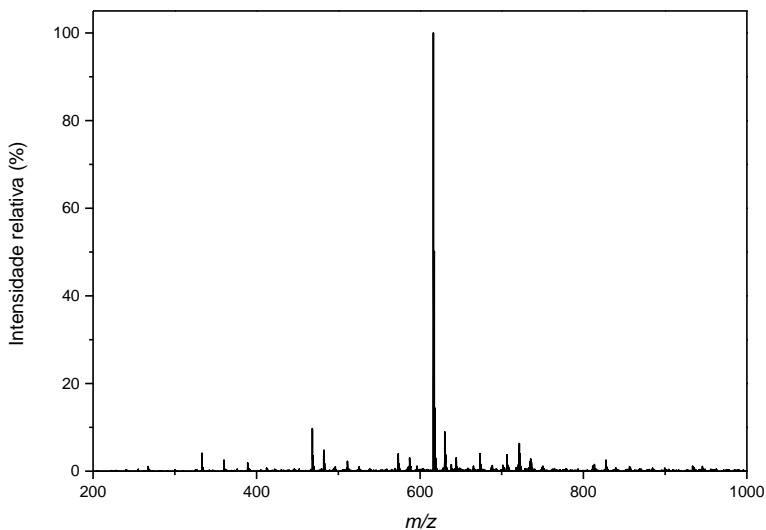
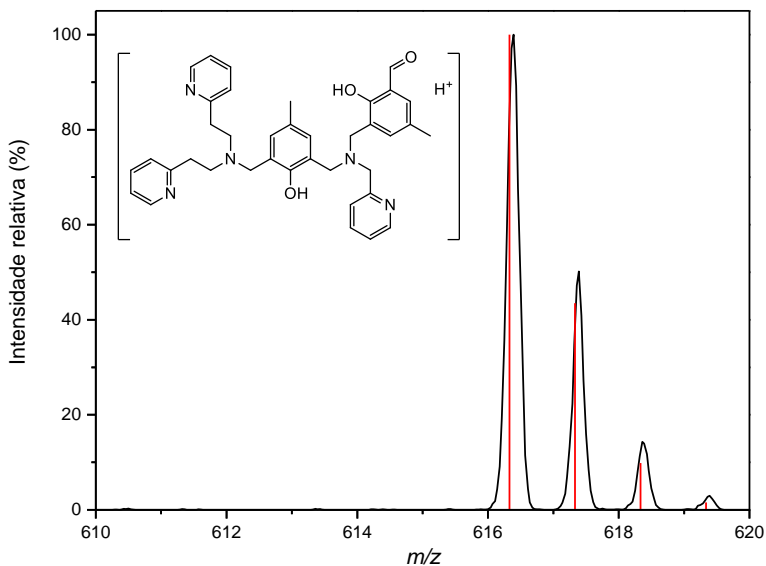
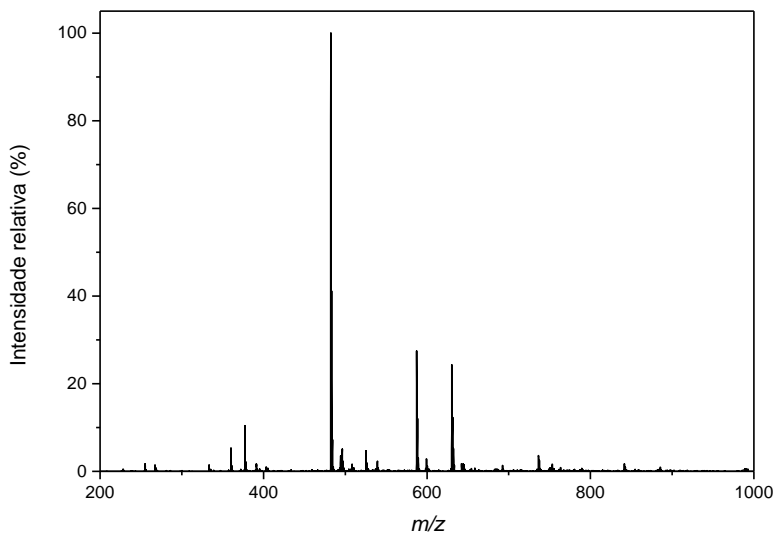
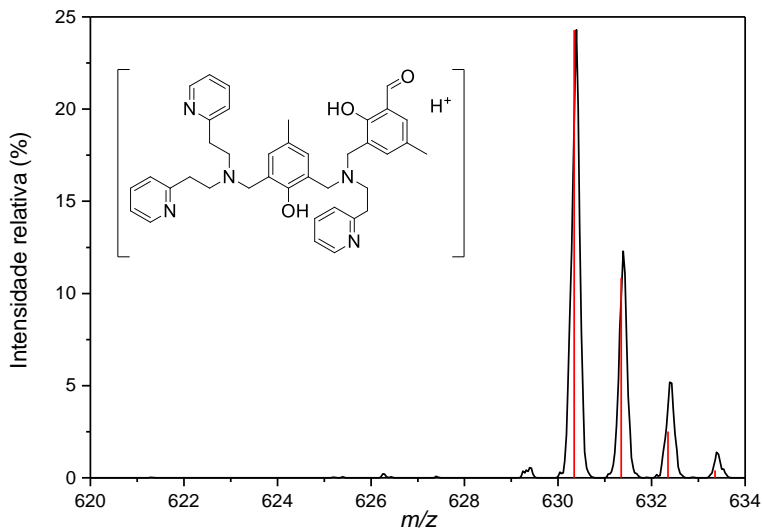


Figura 50 – Ampliação do conjunto de sinais com $m/z = 616,38$ do espectro de ESI-MS do $H_2L1bpea$. Em vermelho, a simulação da distribuição isotópica para a espécie proposta.



O espectro de ESI-MS do $H_2L2bpea$ está apresentado na Figura 51. O pico base deste corresponde ao fragmento $[bpeamffetpy+H^+]$ e a espécie $[M+H^+]$ também aparece em menor intensidade (Figura 52).

Figura 51 – Espectro de ESI-MS do H₂L2bpea em CH₃CN.Figura 52 – Ampliação do conjunto de sinais com $m/z = 630,38$ do espectro de ESI-MS do H₂L2bpea. Em vermelho, a simulação da distribuição isotópica para a espécie proposta.

A clivagem α de aminas, originando o pico base do espectro do $H_2L2bpea$, é uma das fragmentações mais comuns em espectros de massas usando ionização por *electrospray* (DEMARQUE *et al.*, 2016).

Através das caracterizações realizadas, portanto, considerou-se que os ligantes foram sintetizados com grau de pureza adequado para serem utilizados na síntese dos complexos de interesse.

2.5.2 Caracterizações dos complexos

2.5.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Inicialmente, os complexos foram caracterizados via espectroscopia na região do IV. Os espectros dos complexos **1**, **2** e **3** e respectivos ligantes estão sobrepostos nas figuras abaixo.

Figura 53 – Espectros de IV do complexo **1** e ligante H_2py_3mff em ATR.

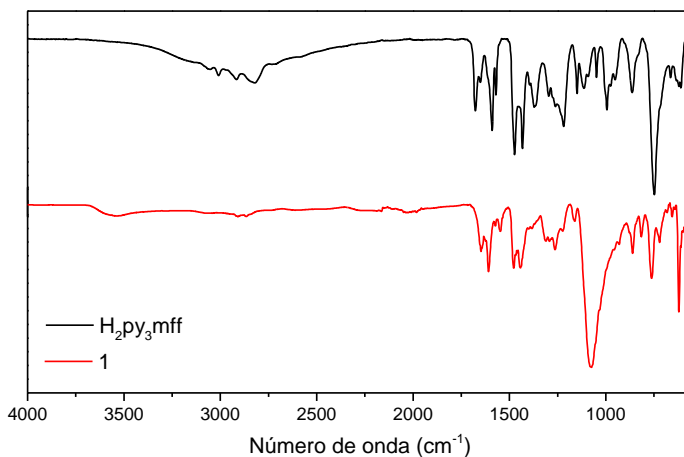
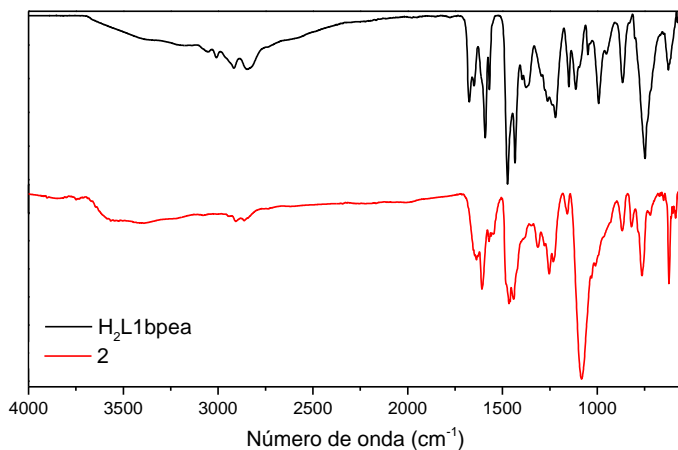
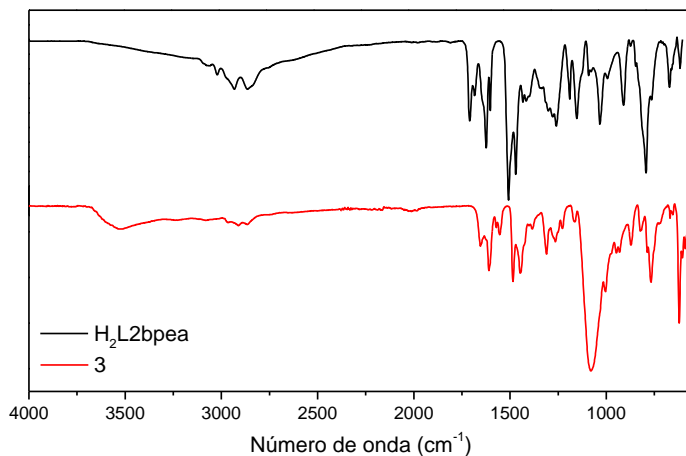


Figura 54 – Espectros de IV do complexo **2** e ligante H₂L1bpea em ATR.Figura 55 – Espectros de IV do complexo **3** e ligante H₂L2bpea em ATR.

A comparação entre os espectros de IV dos complexos com os ligantes fornece indícios de que as reações de complexação de fato ocorreram. Os espectros dos complexos isolados apresentam bandas características dos ligantes, com algumas variações nas frequências de absorção destas. As Tabelas 8, 9 e 10 apresentam as principais bandas atribuídas para os complexos **1**, **2** e **3** e respectivos ligantes.

Tabela 8 – Principais bandas (cm^{-1}) e atribuições dos espectros de IV do complexo **1** e ligante $\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$.

Atribuição	1 (cm^{-1})	$\text{H}_2\text{py}_3\text{mff}$ (cm^{-1})
v O-H	3534	-
v C-H _{ar} , C-H _{alif} e C-H _{ald}	3080-2864	3055-2830
v C=O	1648	1677
v C=C e C=N	1609-1444	1592-1433
δ O-H	1382	-
v Cl-O _{perclorato}	1070	-
δ C-H _{ar}	769	748
δ C-H _{py}	616	620

Tabela 9 – Principais bandas (cm^{-1}) e atribuições dos espectros de IV do complexo **2** e ligante $\text{H}_2\text{L1bpea}$.

Atribuição	2 (cm^{-1})	$\text{H}_2\text{L1bpea}$ (cm^{-1})
v O-H	3567	-
v C-H _{ar} , C-H _{alif} e C-H _{ald}	3080-2858	3052-2843
v C=O	1637	1675
v C=C e C=N	1609-1441	1591-1434
δ O-H	1352	-
v Cl-O _{perclorato}	1084	-
δ C-H _{ar}	764	748
δ C-H _{py}	622	624

Tabela 10 – Principais bandas (cm^{-1}) e atribuições dos espectros de IV do complexo **3** e ligante $\text{H}_2\text{L2bpea}$.

Atribuição	3 (cm^{-1})	$\text{H}_2\text{L2bpea}$ (cm^{-1})
v O-H	3520	-
v C-H _{ar} , C-H _{alif} e C-H _{ald}	3079-2862	3056-2843
v C=O	1654	1677
v C=C e C=N	1608-1445	1589-1433
δ O-H	1385	-
v Cl-O _{perclorato}	1083	-
δ C-H _{ar}	763	746
δ C-H _{py}	620	623

Além das bandas que evidenciam a presença dos ligantes, os espectros dos complexos apresentam uma banda larga em cerca de 3500 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação O-H decorrente de moléculas de água e/ou metanol provenientes das sínteses. Há também uma banda muito intensa em aproximadamente 1080 cm^{-1} , característica do estiramento da ligação Cl-O do contra-íon perclorato (NAKAMOTO, 1977). Os valores de número de onda referentes aos ligantes variam ligeiramente por causa da reorganização de suas estruturas após as complexações.

2.5.2.2 Espectrometria de massas (ESI-MS)

Os espectros de massas dos complexos e suas respectivas simulações de distribuição isotópica são apresentados nas Figuras 56, 57 e 58.

Figura 56 – Espectro de ESI-MS do complexo **1** em MeOH e ampliação do pico base, com simulação da distribuição isotópica em vermelho.

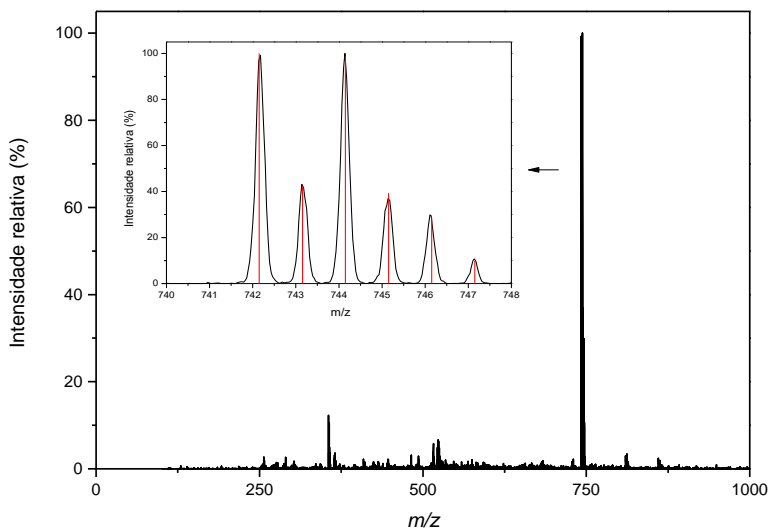


Figura 57 – Espectro de ESI-MS do complexo **2** em CH₃CN e ampliação do pico base, com simulação da distribuição isotópica em vermelho.

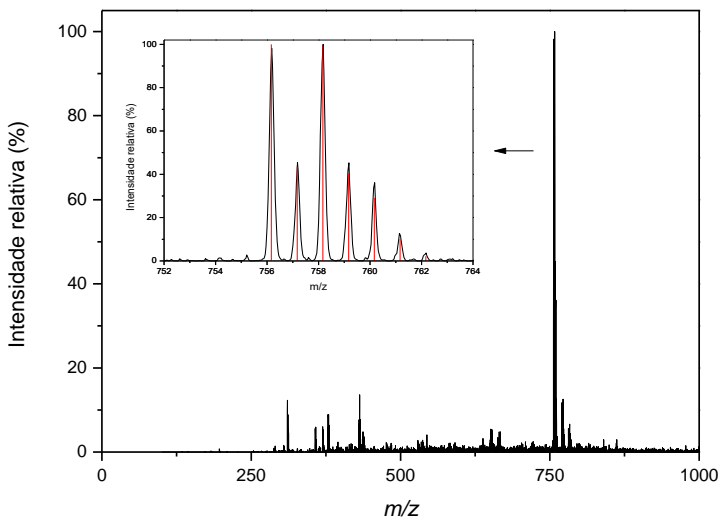
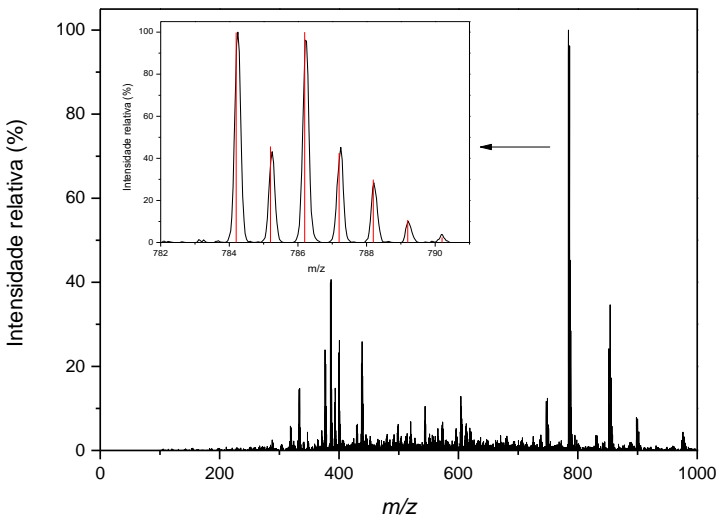
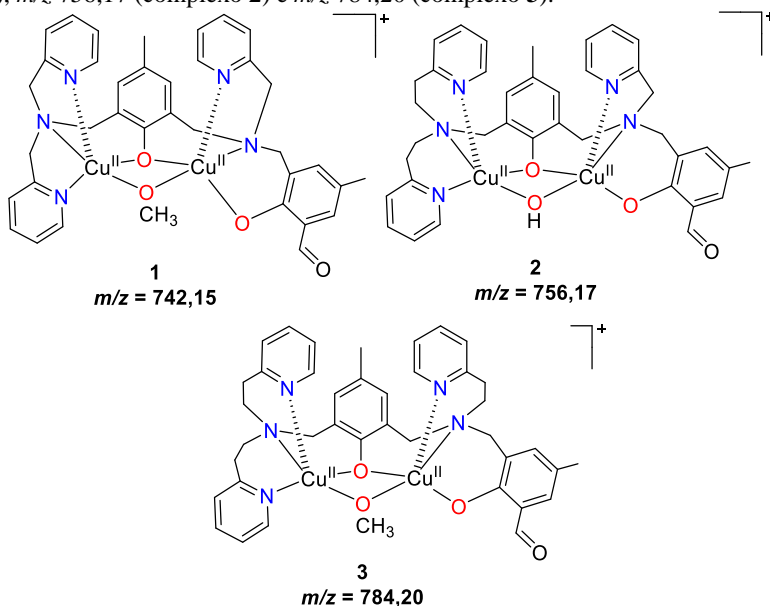


Figura 58 – Espectro de ESI-MS do complexo **3** em MeOH e ampliação do pico base, com simulação da distribuição isotópica em vermelho.



Os espectros de massas estão de acordo com a composição esperada para os complexos **1**, **2** e **3**. Em todos os casos, há apenas um conjunto de sinais com alta intensidade relativa, que apresenta um distanciamento entre os picos de uma unidade, indicando uma espécie monovalente. A Figura 59 apresenta as estruturas propostas para tais espécies.

Figura 59 – Estruturas propostas para os fragmentos de m/z 742,15 (complexo **1**), m/z 756,17 (complexo **2**) e m/z 784,20 (complexo **3**).



Nota-se que a presença do ânion metóxido ou hidróxido nas estruturas se correlaciona ao solvente e diluente utilizados nas análises. Para os complexos **1** e **3** foi utilizado metanol de grau MS, e observou-se a presença de um ânion metóxido no pico base, enquanto que para o complexo **2** usou-se acetonitrila de grau MS, havendo a presença de um íon hidróxido no pico base.

Além do pico base, o espectro do complexo **3** apresenta dois outros conjuntos de sinais com intensidade relativa acima de 30%: com m/z de 385,12 há a espécie divalente referente ao complexo sem ponte e com uma molécula de água e, com m/z de 852,22 há uma espécie monovalente referente ao complexo com ponte μ -metoxo, duas moléculas de metanol e uma de água.

2.5.2.3 Espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS)

Análises de absorção atômica foram realizadas para os três complexos, com o intuito de verificar a quantidade de cobre existente em amostras dos complexos sintetizados. Os resultados estão presentes na Tabela 11.

Tabela 11 – Concentração de cobre determinada por F AAS para os complexos 1, 2 e 3.

Complexo	[Cu]_{experimental} (ppm)	[Cu]_{calculada} (ppm)
1	3,057 ± 0,017	3,017
2	3,294 ± 0,027	3,076
3	2,616 ± 0,006	2,704

De acordo com estes valores, pode-se inferir que as amostras analisadas possuem uma concentração total de cobre concordante com o esperado. Como os valores teóricos foram calculados para sistemas binucleares, os resultados obtidos corroboram com as estruturas propostas para os complexos.

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

Os espectros eletrônicos dos complexos 1, 2 e 3 foram investigados em solução, utilizando-se metanol e diclorometano como solventes (Figuras 60, 61 e 62). A Tabela 12 apresenta um resumo dos dados obtidos.

Figura 60 – Espectros eletrônicos do complexo **1** em solução de metanol (a) e diclorometano (b).

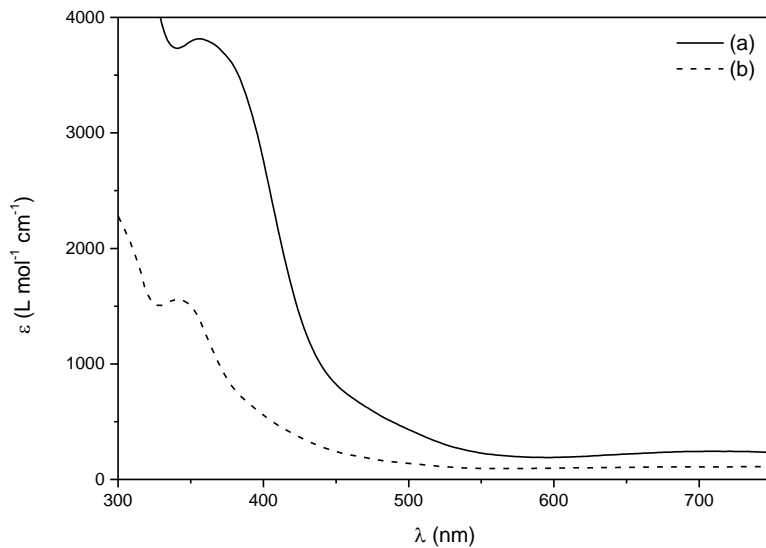


Figura 61 – Espectros eletrônicos do complexo **2** em solução de metanol (a) e diclorometano (b).

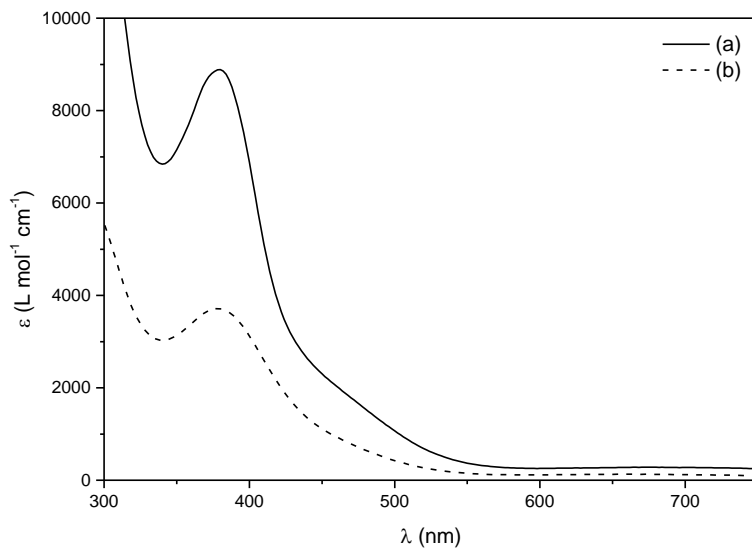


Figura 62 – Espectros eletrônicos do complexo **3** em solução de metanol (a) e diclorometano (b).

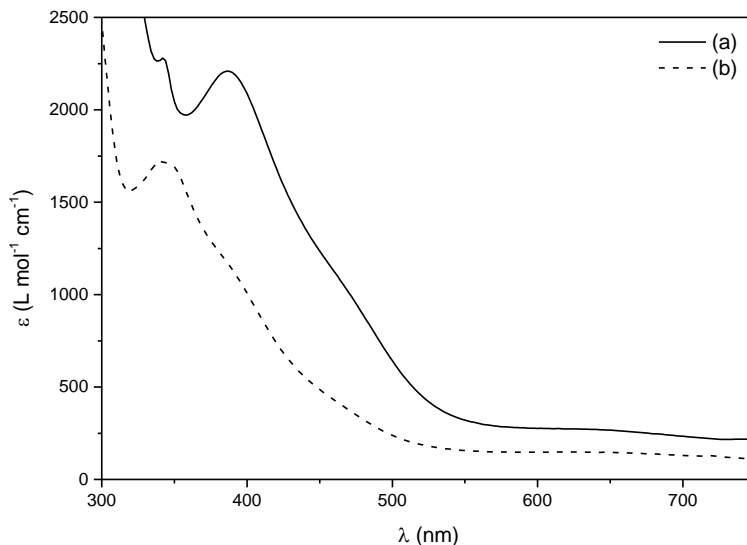


Tabela 12 – Dados de espectroscopia eletrônica dos complexos **1**, **2** e **3**.

Complexo	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) (ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹))	
	MeOH	CH ₂ Cl ₂
1	700 (166); 358 (3802)	845 (149); 660 (ombro); 341 (1560)
2	656 (265); 460 (ombro); 379 (8890)	672 (182); 378 (3717)
3	600 (247); 450 (ombro); 387 (2202)	622 (154); 340 (1718)

Os espectros eletrônicos dos complexos apresentam uma banda na região entre 340-390 nm, que pode ser atribuída ao somatório de transições intraligantes e transferências de carga dos fenolatos para os centros metálicos (TCLM), como observado para outros complexos com ligação Cu^{II}-fenolato (CAMARGO *et al.*, 2013; PERALTA *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2010; GHOSH *et al.*, 2008). Diferenças na orientação do fenolato em relação ao Cu^{II} devem estar relacionadas com a alteração na probabilidade de ocorrência da TCLM dos complexos (GHOSH *et al.*, 2008).

Além da TCLM, em meio metanólico, os complexos **2** e **3** também possuem uma banda em aproximadamente 450 nm referente à transferência de carga do metal para o ligante (TCML), que ocorre entre os centros de Cu^{II} e as piridinas (ÜNVER, HAYVALI, 2010).

Na região entre 600-850 nm, há também uma banda com menor absortividade molar, característica de transições *d-d* dos íons Cu^{II} (Figuras 63-65).

Figura 63 – Ampliação da região entre 500-850 nm dos espectros eletrônicos do complexo **1** em solução de metanol (a) e diclorometano (b).

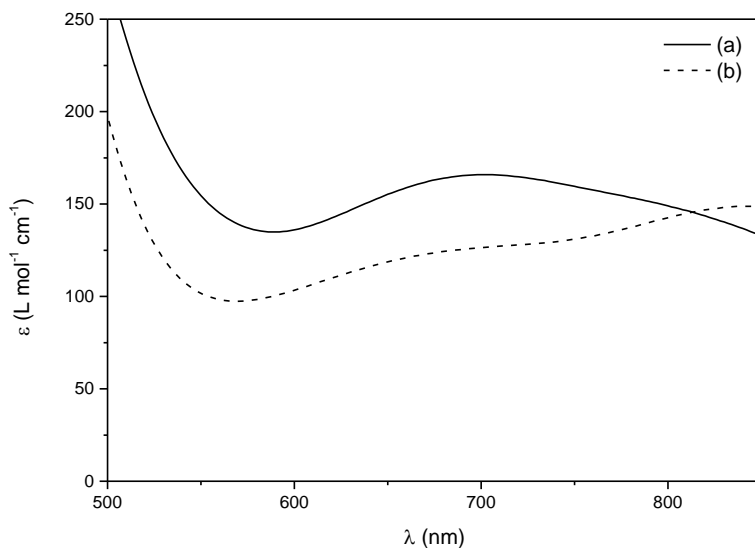


Figura 64 – Ampliação da região entre 500-800 nm dos espectros eletrônicos do complexo **2** em solução de metanol (a) e diclorometano (b).

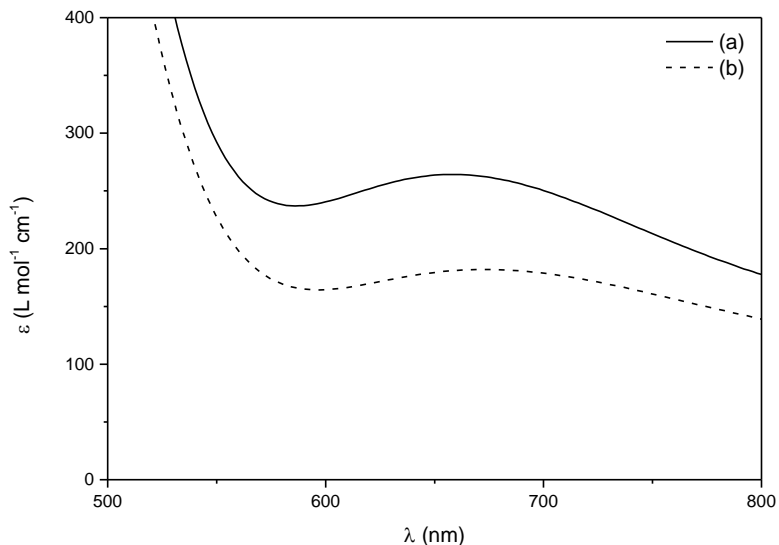
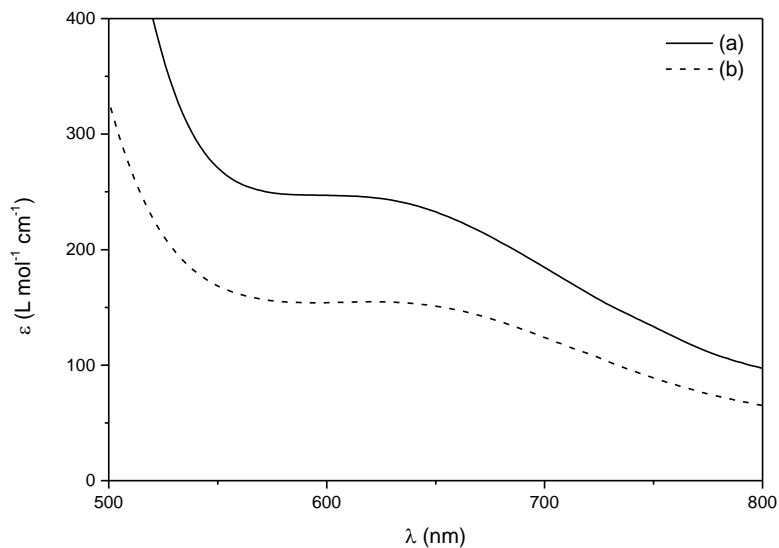


Figura 65 – Ampliação da região entre 500-800 nm dos espectros eletrônicos do complexo **3** em solução de metanol (a) e diclorometano (b).



O espectro eletrônico do complexo **1** em diclorometano se diferencia dos demais por apresentar duas bandas nesta região, sugerindo que os centros metálicos estão pentacoordenados neste meio (HATHAWAY; BILLING, 1970). Em metanol, há apenas uma banda larga referente à transição *d-d*, indicando que moléculas de água ou do solvente se coordenam aos centros de Cu^{II} . Os espectros dos complexos **2** e **3** indicam um ambiente hexacoordenado em ambos os solventes.

2.5.2.5 Voltametria de onda quadrada

O comportamento redox dos complexos **1**, **2** e **3** foi investigado em metanol via voltametria de onda quadrada (Figura 66). Os dados eletroquímicos estão sumarizados na Tabela 13.

Figura 66 – Voltamogramas de onda quadrada (pulso = 25 mV, frequência = 15 Hz) para os complexos **1**, **2** e **3** em MeOH. Condições: [Complexos] = 1×10^{-3} mol L^{-1} ; $[\text{NaClO}_4] = 0,1$ mol L^{-1} ; Eletrodos: trabalho – carbono vítreo; referência – Ag/Ag^+ ; auxiliar – platina.

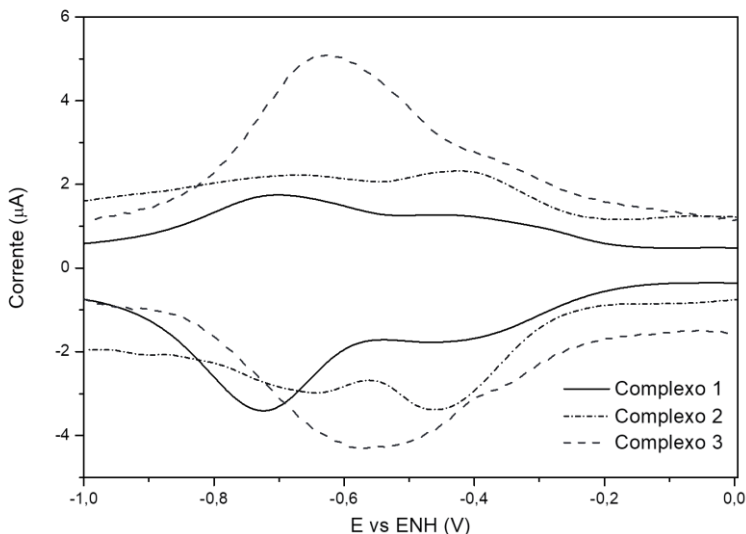


Tabela 13 – Dados eletroquímicos dos complexos **1**, **2** e **3**.

Complexo	E_{ox} vs	E_{red} vs	$E_{1/2}$ vs
	ENH (V)	ENH (V)	ENH (V)
1	-0,70	-0,73	-0,72
	-0,38	-0,46	-0,42
2	-0,67	-0,65	-0,66
	-0,43	-0,46	-0,45
3	-0,62	-0,55	-0,59
	-0,35	-0,35	-0,35

Os voltamogramas dos complexos **1**, **2** e **3** apresentaram dois processos redox, atribuídos aos processos $Cu^{II}Cu^{II}/Cu^{II}Cu^I$ e $Cu^{II}Cu^I/Cu^ICu^I$. Os valores de $E_{1/2}$ estão de acordo com os reportados para complexos binucleares de cobre(II) com ligantes N,O-doadores similares (PERALTA *et al.*, 2010; PERALTA *et al.*, 2006).

O comportamento eletroquímico dos complexos é influenciado pela flexibilidade do ligante, havendo um deslocamento anódico na medida em que se aumenta o tamanho dos anéis quelatos. Os valores de $E_{1/2}$ indicam que os centros metálicos do complexo **3** são mais fáceis de reduzir em comparação aos dos outros complexos, o que é esperado devido à alteração de geometria preferencial entre Cu^{II} e Cu^I . Centros de Cu^{II} tendem a possuir geometrias hexacoordenadas octaédricas, enquanto centros de Cu^I exibem predominantemente geometrias tetraédricas (AMBUNDO *et al.*, 1999). Sendo assim, a maior flexibilidade do complexo **3** favorece que as alterações geométricas ocorram mais facilmente.

A mesma tendência foi observada por Schatz *et al.* (2001) para complexos de cobre contendo ligantes tripoidais com anéis piridínicos, nos quais os sistemas cujos anéis quelatos eram de cinco membros estabilizavam mais a espécie Cu^{II} do que os similares de seis membros. Deste modo, os complexos mais flexíveis conseguem reduzir mais facilmente os centros de Cu^{II} .

2.5.2.6 Titulação espectrofotométrica

Os equilíbrios químicos entre as espécies dos complexos presentes em solução foram determinados via titulação espectrofotométrica (Figuras 67, 68 e 69). A Tabela 14 apresenta as constantes de desprotonação dos complexos **1**, **2** e **3**.

Figura 67 – Titulação espectrofotométrica do complexo **1** em MeOH:H₂O (1:1, % v/v) na faixa de pH entre 2,5-9,0.

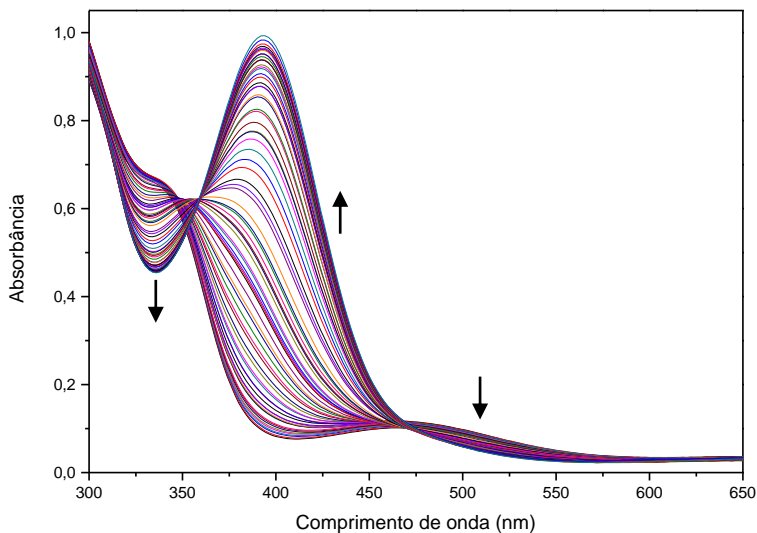


Figura 68 – Titulação espectrofotométrica do complexo **2** em MeOH:H₂O (1:1, % v/v) na faixa de pH entre 3,0-8,0.

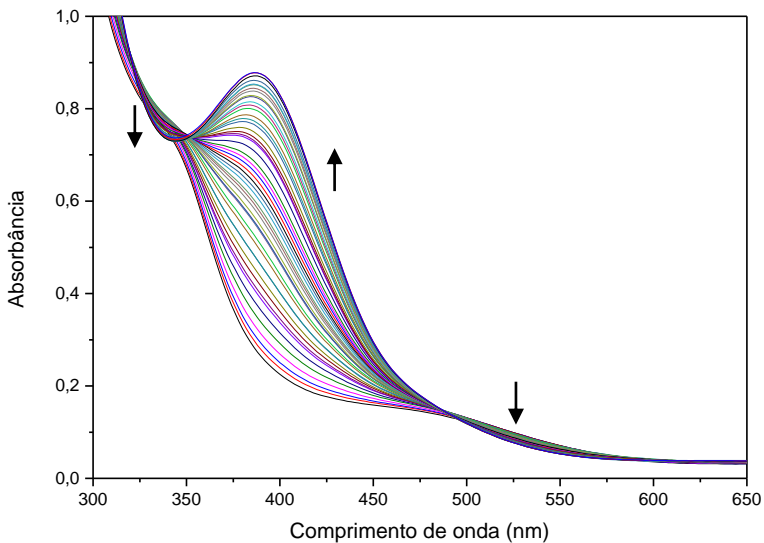


Figura 69 – Titulação espectrofotométrica do complexo **3** em MeOH:H₂O (1:1, % v/v) na faixa de pH entre 2,5-8,5.

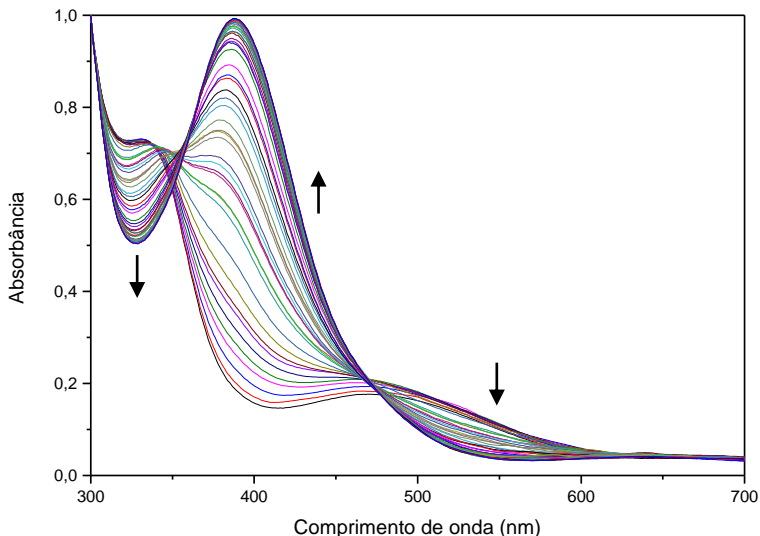


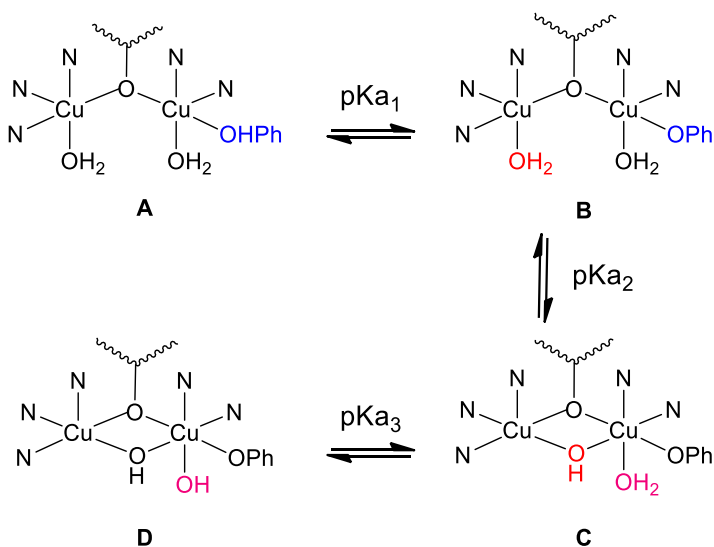
Tabela 14 – Valores de pKa dos complexos **1**, **2** e **3**.

Complexo	pKa₁	pKa₂	pKa₃
1	4,73±0,01	6,66±0,1	7,86±0,2
2	4,41±0,02	6,42±0,1	7,54±0,1
3	4,23±0,04	5,80±0,03	7,41±0,1

Em todos os casos, foram determinadas três constantes de desprotonação, sendo que os valores destas se relacionam com o incremento no tamanho dos anéis quelatos dos complexos, seguindo a ordem **1>2>3**.

A partir dos valores de pKa observados para complexos binucleares de cobre(II) com ligantes similares (PERALTA *et al.*, 2010; PERALTA *et al.*, 2006; ROSSI *et al.*, 2002) e dos gráficos das titulações espectrofotométricas, faz-se a seguinte proposta para os equilíbrios (Figura 70):

Figura 70 – Proposta para os equilíbrios observados em solução para os complexos **1**, **2** e **3**.



O pKa_1 corresponde à desprotonação do fenol lateral, gerando a espécie **B**, visto que a primeira modificação observada nas titulações é o surgimento de uma banda em aproximadamente 400 nm referente à transferência de carga do fenolato para os centros de cobre(II). Os valores determinados e a atribuição concordam com o evidenciado por Peralta *et al.* (2010) para complexos semelhantes. O segundo pKa pode ser atribuído à formação da ponte $\mu\text{-OH}$ (espécie **C**) entre os centros metálicos, em concordância com o pKa_2 de 6,32 do complexo $[\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{HBTTPNOL})]^{2+}$ (ROSSI *et al.*, 2002). Por fim, o terceiro pKa se refere à desprotonação da água coordenada a um dos centros de Cu^{II} , formando a espécie **D** (PERALTA *et al.*, 2010; PERALTA *et al.*, 2006).

Os diagramas de distribuição das espécies em solução são apresentados nas Figuras 71, 72 e 73.

Figura 71 – Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o complexo 1.

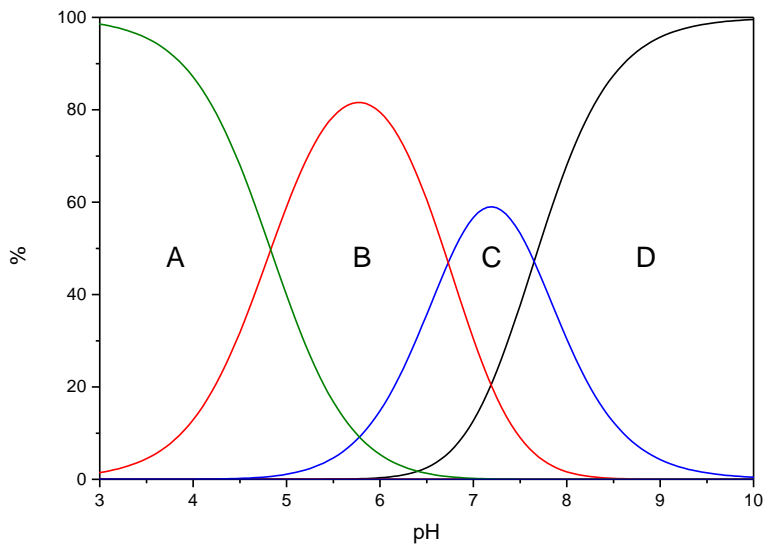


Figura 72 – Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o complexo 2.

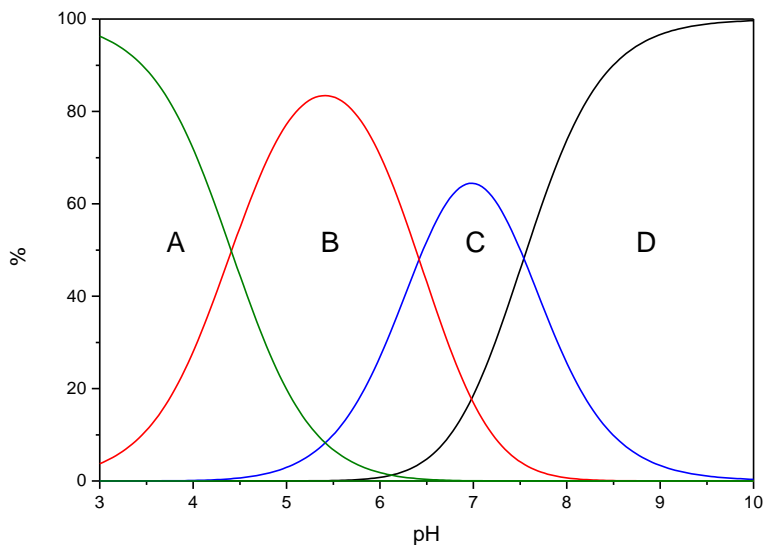
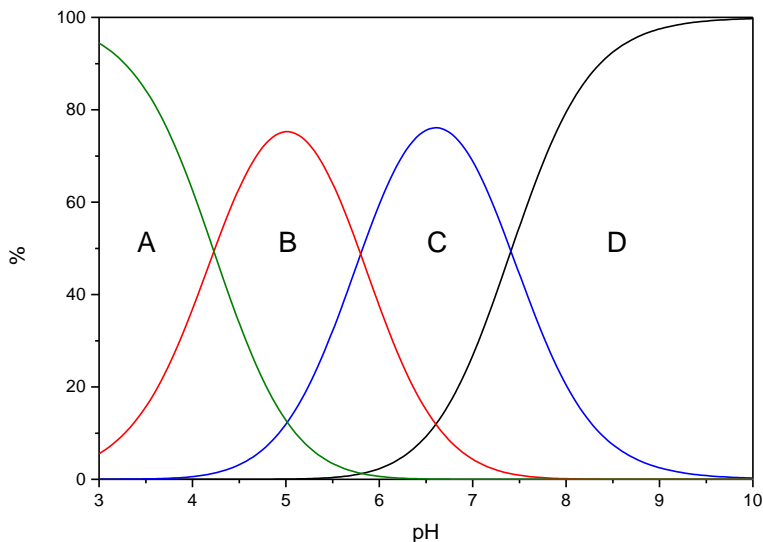


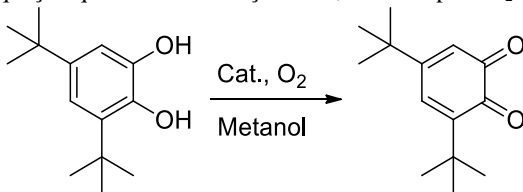
Figura 73 – Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o complexo **3**.



2.5.3 Atividade de catecolase

Diferentes experimentos cinéticos foram realizados a fim de testar a reatividade dos complexos **1**, **2** e **3** frente à reação de oxidação do substrato modelo 3,5-di-*tert*-butilcatecol (3,5-DTBC) (Figura 74).

Figura 74 – Equação química da oxidação do 3,5-DTBC pelo O₂.

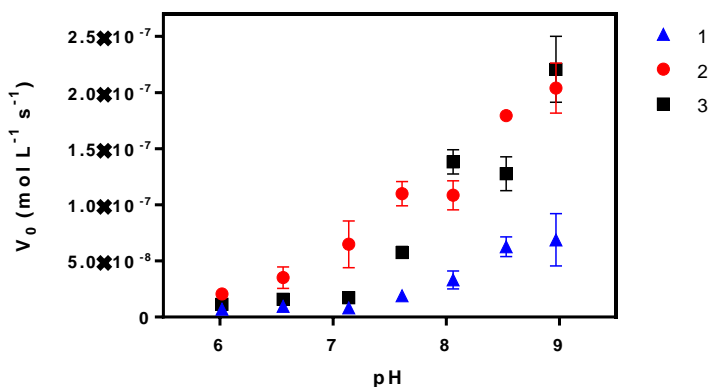


O 3,5-DTBC foi escolhido como substrato por ter um baixo potencial redox, facilitando a formação da *o*-quinona correspondente, além de possuir substituintes volumosos que impedem a ocorrência de outras reações, como a abertura do anel (CHATTERJEE *et al.*, 2018).

2.5.3.1 Efeito do pH

Inicialmente, foram realizados experimentos para averiguar a influência do pH na atividade catalítica dos complexos (Figura 75).

Figura 75 – Dependência de V_0 com o pH do meio reacional na presença dos complexos **1**, **2** e **3**. Condições: $[1] = 18 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[2] = [3] = 25 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[3,5\text{-DTBC}] = 5 \text{mmol L}^{-1}$; $[\text{Tampões}] = 30,3 \text{mmol L}^{-1}$; solução MeOH/H₂O (32:1) à 25 °C.



A alteração no pH do meio reacional é acompanhada por mudanças estruturais nos complexos, o que pode influenciar no comportamento catalítico destes. De acordo com o gráfico acima, na faixa de pH investigada, a atividade máxima dos três complexos ocorre em pH 9,0.

Segundo os dados espectrofotométricos, neste pH há uma predominância da espécie $[\text{Cu}(\mu\text{-OH})\text{Cu}(\text{OH})]$ (espécie D, subseção 2.5.2.6) para todos os complexos. Ensaios com outros complexos biomiméticos indicam que grupos hidróxidos coordenados aos centros de cobre auxiliam na desprotonação do substrato, facilitando a sua coordenação, o que corrobora com o perfil evidenciado acima (OSÓRIO *et al.*, 2012; TORELLI *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2001).

Em pHs ácidos, nota-se que a velocidade inicial da reação é independente do pH, sendo que alterações significativas ocorrem apenas após pH 7,0, de forma que se pode considerar a atividade catalítica das espécies A, B e C insignificante.

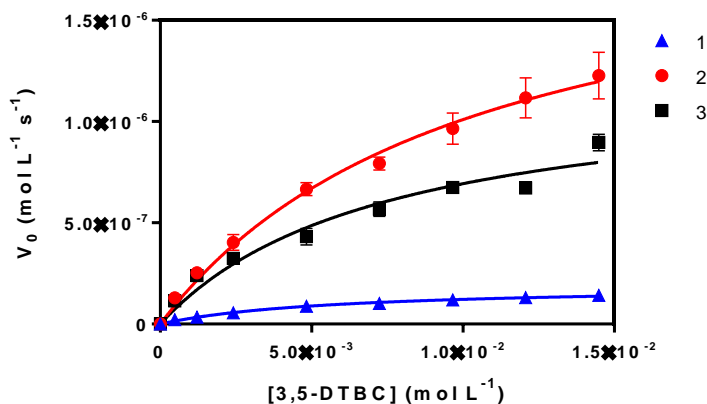
2.5.3.2 Efeito da concentração de substrato

Com o intuito de determinar os parâmetros cinéticos da reação de oxidação do 3,5-DTBC catalisada pelos complexos, foram realizados estudos para analisar a influência da concentração do substrato na velocidade inicial da reação.

Esses experimentos foram realizados em pH 9,0 por ser o pH no qual todos os complexos se mostraram mais ativos no intervalo investigado.

A Figura 76 apresenta a dependência da velocidade inicial da reação com a concentração de 3,5-DTBC na presença dos complexos **1**, **2** e **3**.

Figura 76 – Dependência de V_0 com a concentração do substrato na presença dos complexos **1**, **2** e **3**. Condições: $[1] = [2] = [3] = 60 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[S] = 4,90 \times 10^{-4} - 1,45 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $[T] = 30,3 \text{ mmol L}^{-1}$ (TRIS, pH 9,0); MeOH/H₂O (32:1) à 25 °C.



Observa-se que há uma dependência hiperbólica entre V_0 e $[S]$, sugerindo uma cinética do tipo Michaelis-Menten. Os parâmetros obtidos pelo tratamento dos dados estão presentes na Tabela 15, juntamente com os parâmetros cinéticos de outros complexos reportados na literatura com fins de comparação.

Tabela 15 – Parâmetros cinéticos dos complexos **1**, **2** e **3** e de alguns complexos da literatura. Referência: ^a(PERALTA *et al.*, 2010); ^b(ROSSI *et al.*, 2002).

Complexo	$k_{\text{cat}} \times 10^{-3}$ (s^{-1})	$K_{\text{M}} \times 10^3$ (mol L^{-1})	K_{ass} (L mol^{-1})	$E =$ $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)
1	3,17±0,23	5,77±0,60	173,31±0,10	0,60±0,08
2	34,08±3,50	10,26±1,50	97,47±0,15	3,40±0,61
3	20,12±2,97	7,42±1,44	134,77±0,19	2,86±0,70
A ^a	5,83	8,93	112	0,65
B ^b	2,80	0,86	1200	3,26

O complexo **1** é o menos eficiente (E) da série reportada neste trabalho, apesar de possuir a maior constante de associação (K_{ass}). As constantes catalíticas (k_{cat}) dos complexos **2** e **3** são, respectivamente, cerca de 6 e 11 vezes maiores do que a do complexo **1**, indicando que o aumento do número de membros dos anéis quelatos no lado macio favorece a catálise desta reação. As constantes catalíticas dos complexos **2** e **3** também se destacam em comparação a biomiméticos reportados na literatura com ligantes N,O-doadores semelhantes (complexos A e B).

Ao comparar os complexos **2** e **3**, nota-se que a alteração de cinco para seis membros no anel quelato envolvendo a piridina do lado duro do complexo facilita a associação complexo-substrato, conforme esperado. Porém o complexo **2** possui k_{cat} 1,7 vezes maior do que a do complexo **3**, apresentando a maior eficiência catalítica da série.

2.5.3.3 Proposta mecanística

Com a finalidade de esclarecer como é o mecanismo de catálise dos complexos na oxidação do 3,5-DTBC, foram realizados ensaios para detectar a existência de peróxido de hidrogênio durante a reação. Nestes, foi possível averiguar que há a presença de H_2O_2 durante o ciclo catalítico, identificada pela reação do peróxido com iodeto de potássio, gerando a espécie I_3^- . Sendo assim, o mecanismo pelo qual os complexos **1**, **2** e **3** atuam se aproxima do de diversos biomiméticos da catecol oxidase, que também geram peróxido de hidrogênio ao invés de

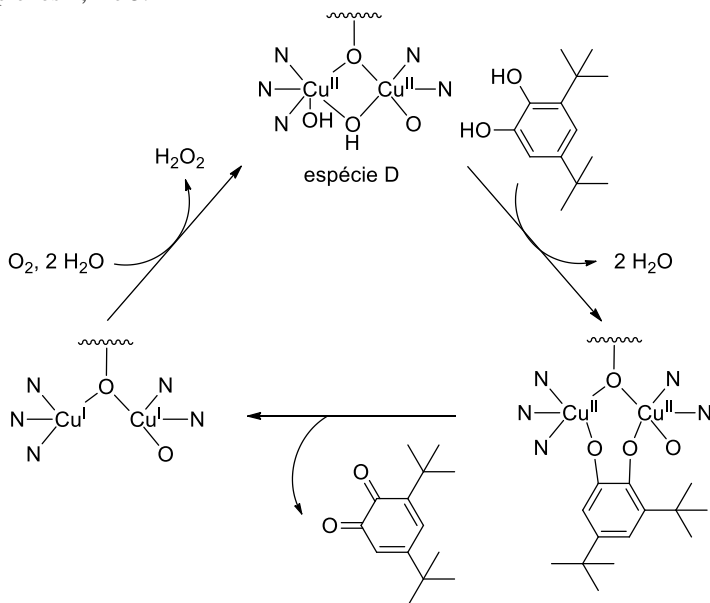
água durante a catálise (JOY *et al.*, 2019; CAGLAR *et al.*, 2014; ZHENG *et al.*, 2014; ADHIKARY *et al.*, 2013; OSÓRIO *et al.*, 2012).

Na presença dos complexos, a estequiometria da reação de oxidação do substrato modelo é $3,5\text{-DTBC} + \text{O}_2 \rightarrow 3,5\text{-DTBQ} + \text{H}_2\text{O}_2$. Desta forma, o mecanismo dos complexos **1**, **2** e **3** se afasta do proposto para a catecol oxidase, no qual não há a geração de peróxido de hidrogênio durante a catálise, somente de água.

Reações de oxidação do substrato 3,5-DTBC catalisadas pelos complexos em condições de excesso de substrato também foram realizadas em atmosfera inerte e a comparação entre a absorbância decorrente do produto formado nestas condições com a dos ensaios em solução saturada com O_2 indicam que a presença de oxigênio é fundamental para que haja uma geração significativa de 3,5-DTBQ. Neste sentido, o oxigênio molecular deve estar envolvido diretamente no ciclo catalítico, reoxidando os centros de Cu^{I} e propiciando o incremento na formação da *o*-quinona.

Baseando-se nestes experimentos e nos ensaios de efeito de pH, propõe-se o seguinte mecanismo catalítico para os complexos:

Figura 77 – Proposta mecanística para a oxidação do 3,5-DTBC catalisada pelos complexos **1**, **2** e **3**.



A catálise ocorre de forma significativa na presença da espécie D dos complexos, que possui dois grupos hidróxido para auxiliar na desprotonação do substrato, que se coordena formando um aduto complexo-substrato. Após a coordenação do 3,5-DTBC, os centros metálicos são reduzidos para $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{I}}$ e há a geração de um equivalente de 3,5-DTBQ. Em seguida, o oxigênio molecular reoxida os centros metálicos, reestabelecendo a forma inicial do catalisador e liberando peróxido de hidrogênio durante este processo.

2.6 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

- Os ligantes e compostos precursores foram caracterizados via IV e RMN de ^1H , além de ESI-MS para os ligantes finais. Todos os compostos apresentaram rendimento e pureza satisfatórios para prosseguir com as sínteses desejadas.
- Os complexos **1**, **2** e **3** foram sintetizados e caracterizados através de diferentes técnicas (espectroscopia no IV e UV-Vis, espectrometria de massas, voltametria cíclica, absorção atômica e titulação espectrofotométrica), as quais indicam que a alteração no número de membros dos anéis quelatos gera diferenças significativas nas propriedades destes compostos.
- Testes de reatividade dos complexos frente ao substrato modelo 3,5-DTBC mostram que estes podem ser considerados biomiméticos da catecol oxidase, sendo que o complexo **2** apresenta a maior eficiência catalítica da série, apesar de possuir a menor constante de associação.

3 ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM DNA

Nesta seção, são reportados os resultados dos ensaios biológicos com o DNA envolvendo os complexos **1**, **2** e **3**, cujas sínteses e caracterizações foram apresentadas na **Seção 2**.

3.1 REVISÃO DA LITERATURA

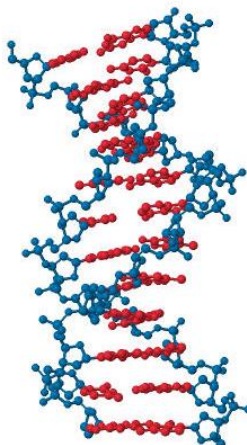
3.1.1 O ácido desoxirribonucleico (DNA)

3.1.1.1 Propriedades estruturais e biológicas do DNA

O DNA (do inglês, *deoxyribonucleic acid*) é uma macromolécula pertencente aos ácidos nucleicos de extrema importância no meio biológico, pois é responsável pela manutenção, adaptação e repasse das características genéticas entre os seres vivos (TRAVERS; MUSKHELISHVILI, 2014).

Em 1953, Watson e Crick elucidaram de forma elegante a estrutura tridimensional do DNA, explicando as descobertas realizadas previamente por outros pesquisadores (WATSON; CRICK, 1953). Neste artigo, foram enfatizados os princípios de complementaridade das bases nitrogenadas nas duas fitas e a natureza de dupla-hélice do polímero. A Figura 78 apresenta a forma B do DNA, também conhecida como estrutura de Watson e Crick.

Figura 78 – Estrutura de um dodecâmero na forma B-DNA.

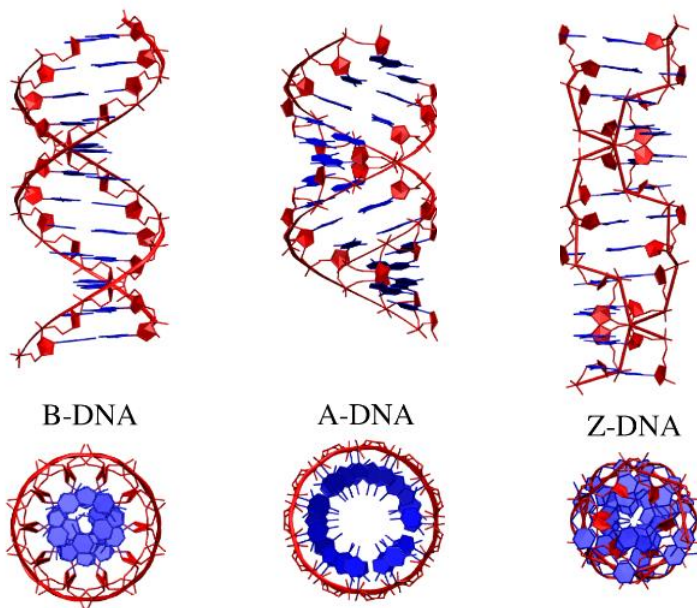


Fonte: DREW *et al.* (1981).

A complementariedade das bases explica as descobertas de Avery, McCarty e Macleod de transferência de material genético entre diferentes cepas de bactérias, além de confirmar a equivalência observada por Chargaff entre as quantidades de adenina e timina e de guanina e citosina da dupla-fita do DNA (WATSON; CRICK, 1953).

O DNA é extremamente flexível, sendo possível que as ligações do esqueleto açúcar-fosfato rotacionem de diferentes formas. O B-DNA é a variação mais estável de uma sequência aleatória de DNA em condições fisiológicas, sendo esta a estrutura de referência em estudos de interação do DNA com proteínas ou pequenos compostos (PAGES *et al.*, 2015). Outras conformações comuns são a forma A, favorecida em cristalizações, e a forma Z, que pode ser encontrada em células procarióticas e eucarióticas, geralmente sendo observada em regiões de codificação de proteínas, podendo desempenhar um papel na regulação e expressão gênica (PAGES *et al.*, 2015; ROGERS, 2011; ZHOU; ZHOU; XU, 2009; WANG; VASQUEZ, 2007). A Figura 79 apresenta as diferenças entre as formas A, B e Z do DNA.

Figura 79 – Variantes estruturais comuns do DNA.



Adaptado de: TRABUCO; VILLA (2015).

Assim como o B-DNA, as formas A e Z também são organizadas em dupla-hélice. O A-DNA se aproxima da forma B por possuir rotação helicoidal à direita, porém as hélices possuem maior número de pares de bases por volta, sendo mais largas. Além disso, o A-DNA possui o sulco maior mais aprofundado e o sulco menor mais superficial. O Z-DNA, por sua vez, apresenta como principal característica a rotação helicoidal à esquerda. Nesta forma, o sulco maior é pouco visível e o sulco menor é estreito e profundo (NELSON; COX, 2014).

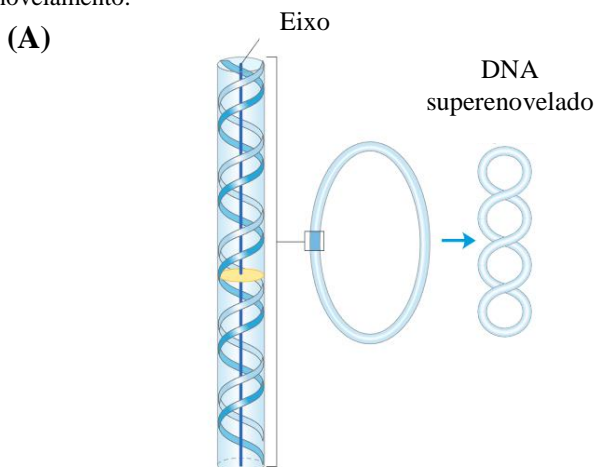
3.1.1.2 Tipos de DNA utilizados em biologia molecular

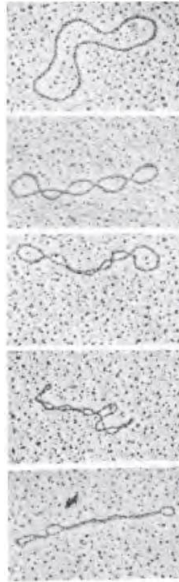
3.1.1.2.1 DNA plasmidial

O DNA plasmidial é o material genético extracromossomal encontrado em muitas bactérias. Este tipo de DNA é amplamente utilizado em processos biotecnológicos (BLACKBURN *et al.*, 2006), visto que pode ser facilmente extraído intacto e pode ser clonado ou modificado geneticamente (GREEN; SAMBROOK, 2018; HEINZE *et al.*, 2018).

Os plasmídeos são pequenas cadeias de DNA de dupla-hélice que possuem as extremidades terminais ligadas entre si, formando um DNA circular, o que confere a este super-helicidade (Figura 80).

Figura 80 – DNA plasmidial. (A) Esquema da estrutura do DNA superenovelado. (B) Micrografia eletrônica com ordem crescente de enovelamento.



(B)

Adaptado de: NELSON; COX (2014).

A super-helicidade, ou superenovelamento, é decorrente da torção da dupla-hélice do plasmídeo várias vezes sob um eixo. O DNA superenovelado é altamente compacto e ocupa um espaço mínimo nas células, conforme observado no item B.

Muitas moléculas de DNA permanecem altamente superenoveladas mesmo após serem extraídas e purificadas. O DNA superenovelado é altamente tensionado, de forma que perturbações químicas ou físicas no ambiente podem causar o relaxamento desta estrutura, retornando para a forma circular (e aberta) original (WITZ; STASIAK, 2010). Desta forma, os plasmídeos consistem em um modelo de fácil interpretação para avaliar as clivagens que pequenos compostos podem induzir ao DNA.

3.1.1.2.2 CT-DNA

O DNA de timo de bezerro (CT-DNA, do inglês *calf thymus deoxyribonucleic acid*) é um DNA dupla-fita genômico linear amplamente utilizado em estudos com agentes cancerígenos e agentes que modulem a sua estrutura e função (ZHOU; ZHANG; PAN, 2015;

BANTI *et al.*, 2012). As propriedades bioquímicas e físico-químicas do CT-DNA são bem conhecidas, facilitando a discussão dos ensaios de interação.

3.1.2 A INTERAÇÃO ENTRE COMPLEXOS E DNA

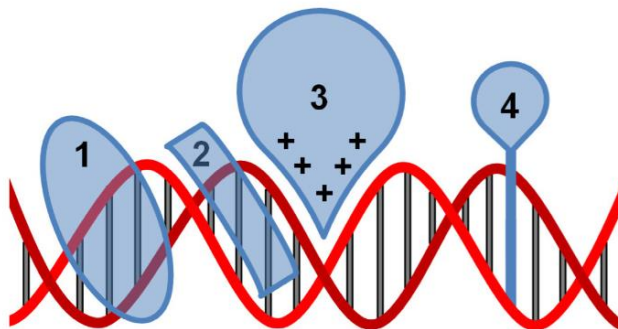
Doenças como o câncer possuem origem genética, sendo uma grande parte dos tratamentos baseada em estratégias de alterações no DNA (JOYNER; REICHFIELD; COWAN, 2011). A cisplatina, utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer, por exemplo, se liga covalentemente ao DNA, inibindo a sua replicação e induzindo a apoptose (LU, 2007; ISHIDA *et al.*, 2002). Os efeitos colaterais característicos do tratamento com a cisplatina e suas limitações clínicas – como a resistência adquirida – são vistos como motivações para o desenvolvimento de novos complexos com atividade antitumoral (DEO *et al.*, 2018). Neste sentido, há um grande interesse no desenvolvimento de nucleases artificiais, especialmente visando à clivagem seletiva de sequências genéticas associadas a doenças.

Artigos de revisão recentes sumaziram uma elevada quantidade de complexos que atuam como nucleases artificiais, sendo as formas de interação destes com o DNA e os mecanismos pelo qual o clivam muito abrangentes (YU; COWAN, 2018; MANCIN; SCRIMIN; TECILLA, 2012).

Assim como a cisplatina, outros complexos com este centro metálico atuam se ligando covalentemente ao DNA (TULLIUS *et al.*, 1983). Por sua vez, compostos contendo grupos policíclicos aromáticos como acridina, etídio e pireno geralmente interagem através de intercalação entre os pares de base (ALMAQWASHI *et al.*, 2016). Outras formas de interação comuns consistem em ligações através dos sulcos maior ou menor do DNA e atrações eletrostáticas, principalmente com o esqueleto açúcar-fosfato (PAGES *et al.*, 2015).

A interação de complexos com DNA geralmente ocorre por uma combinação das formas citadas. Silva *et al.* (2017), por exemplo, reportam três complexos binucleares de ferro e zinco que se aproximam por atração eletrostática e acessam os sulcos do DNA, nos quais também ocorre a clivagem do DNA pelos complexos. A Figura 81 esquematiza os modos de interação abordados.

Figura 81 – Representação dos modos de interação com o DNA: (1) interação pelo sulco maior; (2) interação pelo sulco menor; (3) atração eletrostática e (4) intercalação. Em vermelho, o esqueleto açúcar-fosfato do DNA e em cinza, os pares de bases nitrogenadas.



Adaptado de: ALMAQWASHI *et al.* (2016).

Além de interagir com o DNA, alguns pequenos compostos são capazes de clivá-lo de forma hidrolítica e/ou oxidativa (WANG *et al.*, 2014). Os fragmentos gerados pela quebra hidrolítica do DNA são vantajosos por poderem ser religados por ligases, mas estudos oxidativos visando o controle e seletividade da quebra oxidativa também são de grande interesse. Geralmente a via oxidativa é observada para centros metálicos redox conhecidos, como Cu^{II} e Fe^{III} , na presença de coreagentes como H_2O_2 , oxigênio molecular ou agentes redutores (MANCIN; SCRIMIN; TECILLA, 2012). Entretanto, nos últimos anos estão sendo reportados complexos que clivam o DNA de forma oxidativa na ausência de coreagentes (MCGIVERN *et al.*, 2018).

Pesquisas envolvendo a interação de complexos de cobre com o DNA são realizadas visando diferentes aplicações biológicas, como a sua atuação como agentes anticancerígenos e agentes de clivagem e DNA *footprinting* (ERXLEBEN, 2018). Em relação à função anticancerígena, muitos complexos de cobre são ativos em células tumorais resistentes aos medicamentos de platina, além de apresentarem atividade *in vitro* maior que fármacos clássicos (MCGIVERN *et al.*, 2018). Diferentemente da platina, complexos de cobre predominantemente interagem com o DNA via intercalação, atrações eletrostáticas ou ligações ao sulco maior ou menor (ERXLEBEN, 2018; MCGIVERN *et al.*, 2018).

Majoritariamente, os complexos de cobre em estudos com DNA possuem centro de cobre com estado de oxidação +2, sendo suas

atividades biológicas distinguíveis de acordo com os ligantes. Ligantes usualmente coordenados com o cobre envolvem compostos orgânicos bioativos, como medicamentos anti-inflamatórios, produtos naturais e agentes antitumorais conhecidos, além de moléculas que conseguem ou direcionar a alvos específicos além do DNA ou mimetizar sítios biológicos (SANTINI *et al.*, 2014).

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo geral

- Analisar a interação e clivagem do DNA por três complexos binucleares de cobre(II), de forma a investigar a influência do tamanho dos anéis quelatos destes em sua atividade.

3.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a clivagem de DNA plasmidial pelos complexos em diferentes condições reacionais, variando fatores como pH, temperatura, tempo reacional e concentração de complexo.
- Averiguar como ocorre a interação entre os complexos e o DNA através de ensaios com DNA plasmidial com o aumento da força iônica no meio reacional e na presença de ligantes de sulco, bem como através de dicroísmo circular com o CT-DNA.
- Investigar o mecanismo de clivagem do DNA plasmidial pelos complexos, realizando reações em atmosfera de argônio e utilizando sequestradores de radicais livres.
- Determinar e comparar os parâmetros cinéticos (k_{cat} e K_M) da clivagem do DNA plasmidial pelos complexos.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os tipos de DNA utilizados neste trabalho foram o DNA plasmidial pBSK-II e CT-DNA (*calf thymus*) tipo XV, sendo o CT-DNA obtido da Sigma-Aldrich. Os reagentes e soluções utilizados nos ensaios com DNA possuíam grau de biologia molecular, sendo que todas as soluções foram preparadas com água ultrapura Milli-Q (resistividade a 25 °C de no mínimo 18,2 MΩ cm a 25 °C, com teor de carbono orgânico total < 10 ppb) obtida pelo sistema Milli-Q Synergy (Millipore, USA). As soluções foram previamente esterilizadas, utilizando-se filtros de membrana tipo Millex de 0,22 μmol (Millipore, USA) para evitar contaminações bacterianas. Solventes orgânicos, como acetonitrila e etanol, possuíam grau comercial.

3.3.1 Obtenção, purificação e quantificação do DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído do plasmídeo pBSK-II (Stratagene, USA) dupla fita e superenovelado com 2961 pares de base. O plasmídeo foi amplificado a partir da transformação em células competentes da bactéria *Escherichia coli DH5-α*, de acordo com o protocolo de Ausubel *et al.* (2003). Após a multiplicação das culturas, estas foram centrifugadas e o DNA foi extraído e purificado usando o protocolo do kit de extração e purificação *HiSpeed Plasmid Maxi* (Qiagen).

O pBSK-II extraído foi quantificado via espectroscopia UV-Vis, utilizando-se o valor de coeficiente de absorção de 13200 L mol⁻¹ cm⁻¹ para leitura em 260 nm, e a sua integridade foi verificada através da proporção entre a absorbância em 260 nm e em 280 nm bem como via eletroforese em gel de agarose (CSEKE; HERDY, 2012).

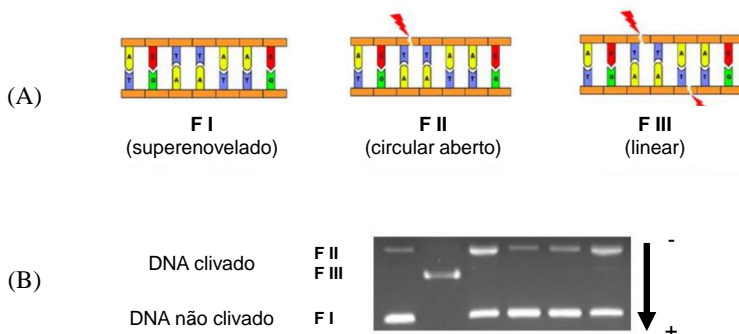
3.3.2 Procedimento geral das reações de clivagem

Em um experimento típico, adicionou-se em um microtubo tipo *ependorf* de 1,5 mL, 2 μL de DNA pBSK-II (superenovelado) contendo 330 ng ~ 25 μmol L⁻¹, 2 μL de tampão biológico, 5 μL de solução de complexo e 11 μL de água milli-Q autoclavada, totalizando 20 μL de reação. Após 4 horas a 50 °C, a reação foi finalizada pela adição de 5 μL de tampão de corrida (EDTA 0,25 mol L⁻¹ em pH 8,0, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01%).

Em seguida, as amostras dos experimentos foram aplicadas em gel de agarose (1%) contendo $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ de brometo de etídio e submetidas à eletroforese por 100 min a 90 V em tampão TBE 0,5X (TRIS $44,5 \text{ mmol L}^{-1}$, ácido bórico $44,5 \text{ mmol L}^{-1}$, EDTA 1 mmol L^{-1} em pH 8,0). Após as corridas, os géis foram fotografados utilizando o sistema de fotodocumentação DigiDoc-It (UVP, USA) e as frações de cada forma do DNA plasmidial foram quantificadas por densitometria, utilizando o software KODAK Molecular Imaging Software 5.0 (Carestream Health, USA).

Como o brometo de etídio se intercala de maneira menos eficiente com a forma superenovelada do DNA plasmidial (F I), há uma menor emissão de fluorescência pela F I do DNA em relação às demais, de modo que os valores encontrados para esta forma foram multiplicados por 1,47 e os valores obtidos para as demais formas foram corrigidos por proporcionalidade (JIN *et al.*, 2007). A quantidade de DNA clivado (%) foi considerada como sendo a soma das frações de DNA na forma circular aberta (F II) e linear (F III), enquanto a fração ou quantidade de DNA intacto (%) foi considerada como a fração de DNA na forma superenovelada (F I) (Figura 82).

Figura 82 – Ilustração das três formas do DNA plasmidial (A) e suas diferentes mobilidades eletroforéticas em gel de agarose (B).



Adaptado de: BORTOLOTTO (2015).

3.3.2.1 Ensaios iniciais

Inicialmente, diferentes combinações de temperatura (37°C e 50°C), tempos reacionais (4 h, 8 h e 16 h) e concentrações de complexos ($0\text{-}200 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram testadas em pH 7,0 a fim de determinar os

melhores parâmetros para os experimentos posteriores. Após estes ensaios, a condição geral utilizada foi de 4 horas de reação a 50 °C.

3.3.2.2 Efeito do pH e da concentração dos complexos

O procedimento geral descrito no item 3.3.2 foi realizado em diferentes pHs e tampões: MES (pH 6,0), HEPES (pH 7,0 e 8,0), CHES (pH 9,0) e CAPS (pH 10,0), na presença de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos complexos. Após 4 h a 50 °C, as reações foram interrompidas pela adição de 5 μL do tampão de corrida e submetidas à eletroforese em gel de agarose. Foram realizados controles nas mesmas condições reacionais na ausência dos complexos.

No pH de maior atividade dos complexos, foram realizadas reações com diferentes concentrações destes para determinar a concentração a ser utilizada nos experimentos posteriores.

3.3.2.3 Efeito da força iônica

O efeito da força iônica do meio reacional foi averiguado pela substituição de 5 μL de água do procedimento descrito no item 3.3.2 por 5 μL de soluções com concentrações crescentes de NaCl ou de LiClO_4 ($[\text{Sal}]_{\text{final}} = 15, 30, 75 \text{ e } 125 \text{ mmol L}^{-1}$). Após 4 h a 50 °C, as reações foram interrompidas pela adição do tampão de corrida e submetidas à eletroforese em gel de agarose.

3.3.2.4 Efeito dos ligantes de sulco

As reações foram realizadas de acordo com o procedimento geral (item 3.3.2), porém com a substituição de 4 μL de água por 4 μL de soluções estoque dos ligantes de sulco ($[\text{Ligante}]_{\text{final}} = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$). Os compostos utilizados para se ligar ao sulco maior e menor do DNA foram, respectivamente, o verde de metila e a netropsina (KIM; NÓRDEN, 1993; VAN DYKE; HERTZBERG; DERVAN, 1982).

Os ligantes foram incubados com o DNA em pH 6,0 por 30 minutos na ausência de luz antes da adição de soluções 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos complexos. Reações nas mesmas condições sem a presença dos complexos foram realizadas como controle.

3.3.2.5 Ensaios em atmosfera de argônio

Para manter um ambiente livre de oxigênio, todos os procedimentos experimentais foram realizados em uma *glove bag*, a qual foi submetida ao vácuo e inflada com argônio.

As misturas reacionais foram preparadas conforme descrito no item 3.3.2 em pH 6,0 e a concentração final dos complexos no meio reacional foi de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. As reações permaneceram sob temperatura constante a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ em um dessecador a vácuo, durante 3 h em uma estufa.

Para estes ensaios, foram realizados dois controles: um com CH_3CN substituindo a solução de complexo, como controle negativo de clivagem, e outro contendo $2 \mu\text{L}$ de solução de FeEDTA ($1 \text{ mmol L}^{-1}/2 \text{ mmol L}^{-1}$) e $2 \mu\text{L}$ de DTT (10 mmol L^{-1}) em substituição à solução de complexo, como controle positivo na presença de oxigênio.

3.3.2.6 Efeito dos sequestradores de espécies reativas de oxigênio (ERO)

As reações foram realizadas em pH 6,0 na presença de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ dos complexos, seguindo o procedimento descrito no item 3.3.2, porém com a substituição de $4 \mu\text{L}$ de água por $4 \mu\text{L}$ de soluções contendo diferentes sequestradores de ERO. Os sequestradores utilizados foram: etanol ($[\text{EtOH}]_{\text{final}} = 0,4 \text{ mmol L}^{-1}$), iodeto de potássio ($[\text{KI}]_{\text{final}} = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e azida de sódio ($[\text{NaN}_3]_{\text{final}} = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$). Todos os sequestradores foram testados nas mesmas condições na ausência dos complexos como controle.

3.3.2.7 Cinética de clivagem do DNA plasmidial

Em um experimento típico para a cinética de clivagem do DNA plasmidial por um complexo, foram utilizados 5 tubos do tipo *ependorf*, no qual em cada tubo adicionou-se $14 \mu\text{L}$ de DNA pBSK-II ($[\text{DNA}] \approx 25 \mu\text{mol L}^{-1}$), $14 \mu\text{L}$ de tampão MES 6,0 (10 mmol L^{-1}), $77 \mu\text{L}$ de água e $35 \mu\text{L}$ de diferentes concentrações de complexo, totalizando $140 \mu\text{L}$.

Alíquotas de $20 \mu\text{L}$ dos sistemas reacionais foram retiradas no início das reações e após transcorridas 1, 2, 3 e 4 horas a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Após a retirada de cada alíquota, adicionou-se $5 \mu\text{L}$ de tampão de corrida à mesma para finalizar a reação de clivagem. Em seguida, as amostras

foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. Controles nas mesmas condições reacionais na ausência dos complexos foram realizados para monitorar a degradação espontânea do DNA plasmidial.

A constante de velocidade observada (k_{obs}) foi calculada para cada concentração de complexo, considerando a reação de clivagem como de pseudo primeira-ordem. O valor de k_{obs} foi obtido diretamente do coeficiente angular da regressão linear originada do plot entre o logaritmo natural da quantidade de forma intacta de DNA ($\ln F I$) em função do tempo de reação. Por fim, os valores foram corrigidos pela subtração do valor de k_{obs} do controle e foram plotados gráficos de variação de k_{obs} em relação à concentração de complexo utilizada.

A cinética de todos os complexos foi realizada em pH 6,0 por 4 horas a 50 °C. As concentrações de complexo foram: [1] = [2] = 1, 2,5, 5, 10 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [3] = 0,05, 1, 2,5, 5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

3.3.2.8 Modulação da clivagem do DNA plasmidial

Os ensaios foram realizados na presença de ascorbato de sódio ($[\text{C}]_{\text{final}} = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$). As misturas reacionais foram realizadas conforme descrito no item 3.3.2, porém substituindo 10 μL de água por uma solução estoque do agente redutor. As reações ocorreram em pH 6,0, na presença de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos complexos, por 1 hora a 37 °C ou por 4 horas a 50 °C. Experimentos nas mesmas condições reacionais foram realizados na ausência dos complexos como controle.

3.3.3 Dicroísmo circular (CD)

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos com o espectropolarímetro de CD JASCO J-815 (Jasco, USA). Os experimentos foram realizados com uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 2 mm, na qual foram adicionados 40 μL de tampão MES pH 6,0 ($[\text{Tampão}]_{\text{final}} = 10 \text{ mmol L}^{-1}$), 80 μL de solução estoque de CT-DNA ($[\text{CT-DNA}]_{\text{final}} = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 280 μL de água.

O CT-DNA foi titulado com uma solução 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos complexos nas proporções $[\text{Complexo}]/[\text{DNA}]$ de 0,05 até 1. Os espectros de CD foram obtidos em triplicata, sendo que cada varredura foi resultante da acumulação de três espectros. Espectros na ausência de CT-DNA e de complexo foram utilizados como branco.

Espectros dos complexos na ausência de DNA também foram determinados e não apresentaram sinais significativos.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Diferentes ensaios foram realizados para determinar como ocorre a interação e clivagem do DNA pelos complexos. Inicialmente, foram realizados ensaios de clivagem de DNA plasmidial pelos complexos **1**, **2** e **3** em pH 7,0, em diferentes concentrações de complexo (0 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$), tempos reacionais (4 h, 8 h e 16 h) e temperaturas (37 °C e 50 °C). Estes experimentos visaram a determinação da melhor condição para os estudos posteriores.

A partir dos resultados obtidos (dados não mostrados), foi possível observar que todos os complexos são capazes de clivar o DNA plasmidial em diferentes concentrações, porém acima de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ houve a precipitação das amostras nos poços dos géis, dificultando a avaliação da clivagem. O tempo reacional selecionado para os ensaios posteriores foi de 4 h, pois os complexos já apresentavam uma clivagem considerável da forma I do DNA para a forma II neste período. Acerca da temperatura, as reações em 50 °C tiveram um incremento de aproximadamente 1,5 vezes na clivagem em relação às que ocorreram em 37 °C. Portanto, as condições padrão utilizadas foram de 4 h a 50 °C.

3.4.1 Efeito do pH e da concentração dos complexos

A fim de investigar o efeito do pH na clivagem do DNA plasmidial pelos complexos, foram realizados ensaios em uma faixa de pH entre 6 e 10, conforme Figuras 83, 84 e 85.

Figura 83 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **1** em diferentes valores de pH. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [**1**] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.

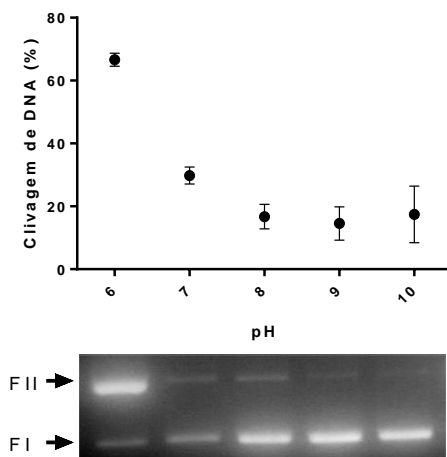


Figura 84 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **2** em diferentes valores de pH. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [**2**] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.

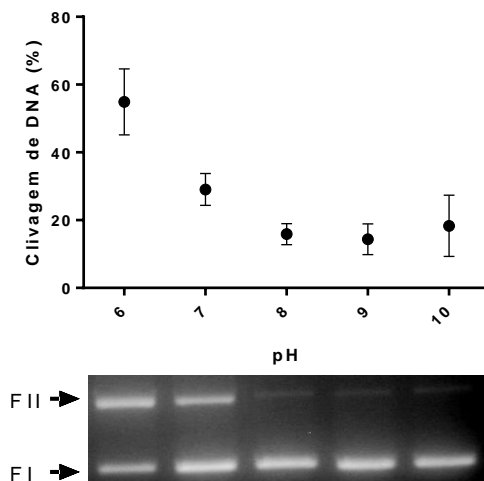
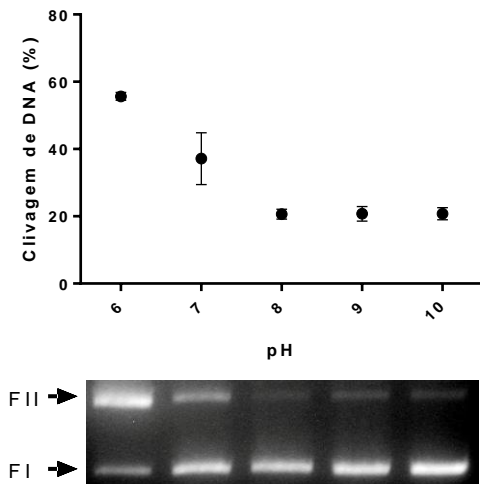


Figura 85 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **3** em diferentes valores de pH. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [3] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.



De acordo com estes dados, a clivagem do DNA superenovelado pelos complexos apresenta diferenças significativas com a alteração no pH, sendo o pH 6,0 o melhor para a realização dos ensaios posteriores. Através do perfil obtido para os três casos, nota-se que a forma diaqu dos complexos **1**, **2** e **3** apresenta atividade superior às demais, conforme os estudos de titulação espectrofotométrica.

Para determinar a concentração dos complexos a ser utilizada nos outros experimentos, também foram realizados testes de clivagem do DNA plasmidial em diferentes concentrações de complexo (Figuras 86, 87 e 88).

Figura 86 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 1 em diferentes concentrações de complexo. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [1] = 0-10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.

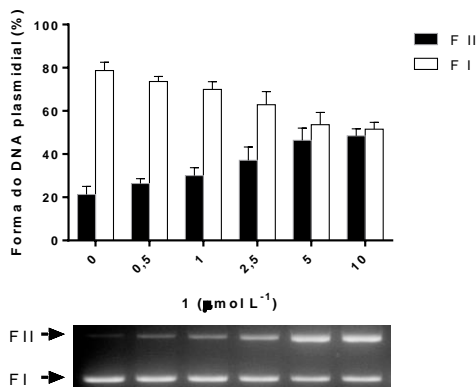


Figura 87 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo 2 em diferentes concentrações de complexo. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [2] = 0-5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.

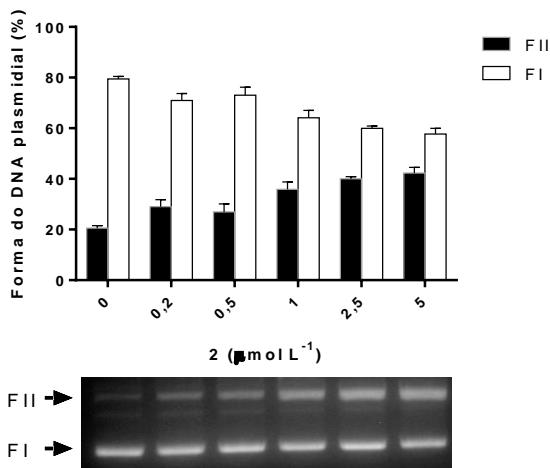
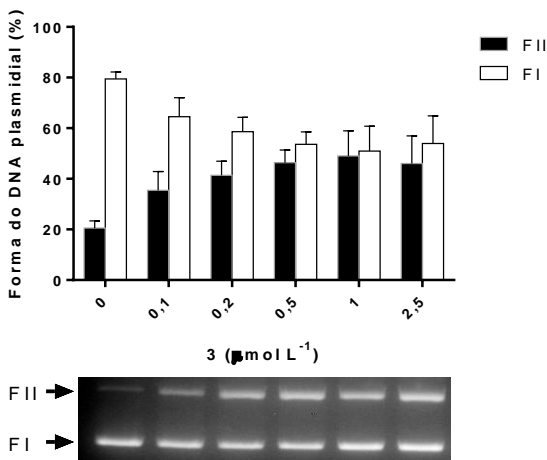


Figura 88 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **3** em diferentes concentrações de complexo. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [**3**] = 0-2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.



Conforme apresentado, a clivagem aumenta de acordo com o incremento na concentração de complexo no meio reacional, sendo a quebra do DNA plasmidial realizada de forma concentração-dependente.

Os complexos **1**, **2** e **3** conseguiram promover a clivagem da forma superenovelada (FI) para a circular aberta (FII) em pH 6,0, não havendo a presença da forma linear (FIII) do DNA plasmidial. Nota-se que existe uma diferença significativa de atividade entre os complexos estudados, sendo que o complexo **3** consegue clivar cerca de 50% do DNA com uma concentração de apenas 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ enquanto que esta clivagem é alcançada pelos outros complexos somente na concentração de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

O incremento da atividade na clivagem do DNA plasmidial corresponde ao aumento do tamanho dos anéis quelatos dos complexos, o que pode estar relacionado a uma maior flexibilidade do complexo **3**, facilitando a aproximação deste ao DNA. Mais estudos, porém, são necessários para afirmar este comportamento.

3.4.2 Análise das formas de interação

3.4.2.1 Efeito da força iônica

Uma das formas de interação mais comuns entre pequenos compostos e o DNA é através de interações eletrostáticas (PAGES *et al.*, 2015). Sendo assim, foram realizadas reações de clivagem do DNA pelos complexos na presença de concentrações crescentes de diferentes sais: NaCl e LiClO₄. Os resultados dos experimentos são apresentados nas Figuras 89-94, sendo que os poços contêm, da esquerda para a direita: i) controle com acetonitrila; ii) controle com complexo; iii) complexo e 15 mmol L⁻¹ de sal; iv) complexo e 30 mmol L⁻¹ de sal; v) complexo e 75 mmol L⁻¹ de sal; e vi) complexo e 125 mmol L⁻¹ de sal.

Figura 89 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **1** na presença de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μmol L⁻¹; [**1**] = 5 μmol L⁻¹; [Tampão] = 10 mmol L⁻¹ (MES pH 6,0); [NaCl] = 15-125 mmol L⁻¹; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.

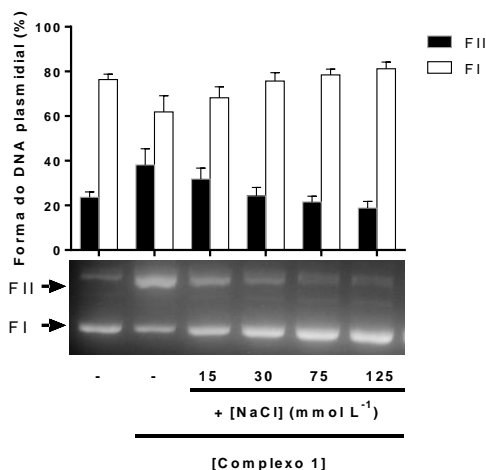


Figura 90 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **2** na presença de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [**2**] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); [NaCl] = 15-125 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.

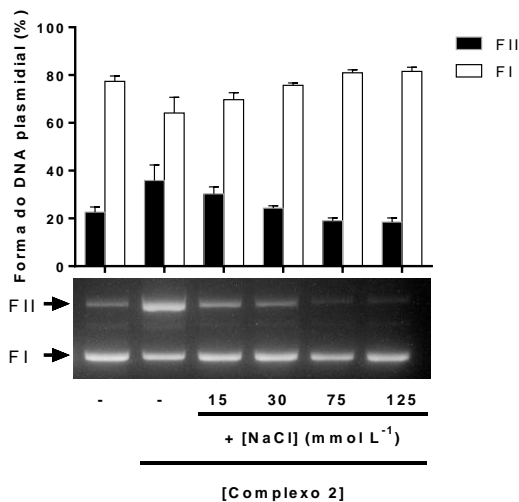


Figura 91 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **3** na presença de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [**3**] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); [NaCl] = 15-125 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.

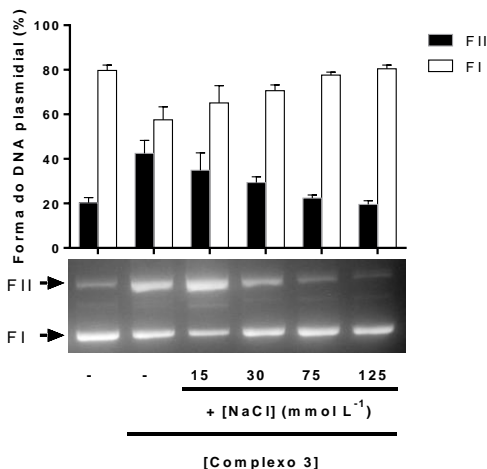


Figura 92 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **1** na presença de LiClO_4 . Condições reacionais: $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng}$, $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\mathbf{1}] = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{Tampão}] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ (MES pH 6,0); $[\text{LiClO}_4] = 15\text{-}125 \text{ mmol L}^{-1}$; Temperatura = 50°C ; Tempo = 4h ao abrigo de luz.

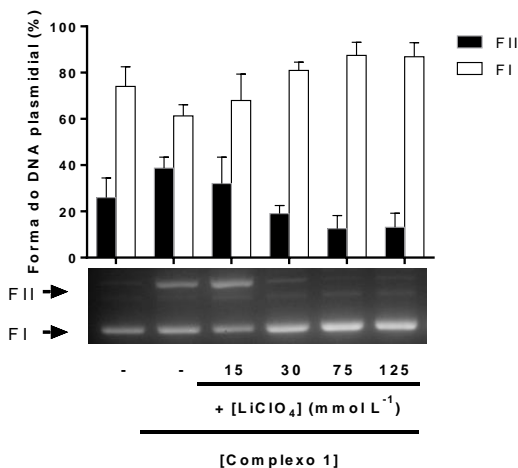


Figura 93 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **2** na presença de LiClO_4 . Condições reacionais: $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng}$, $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\mathbf{2}] = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{Tampão}] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ (MES pH 6,0); $[\text{LiClO}_4] = 15\text{-}125 \text{ mmol L}^{-1}$; Temperatura = 50°C ; Tempo = 4h ao abrigo de luz.

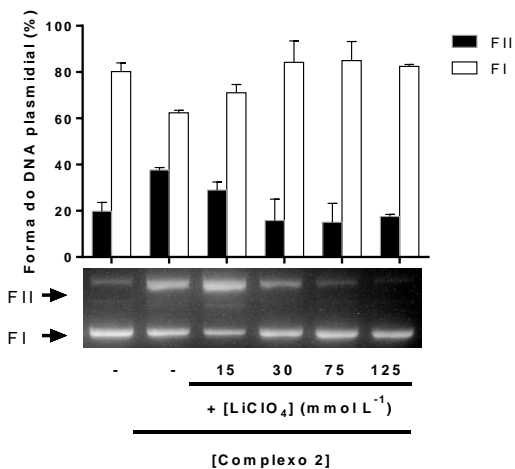
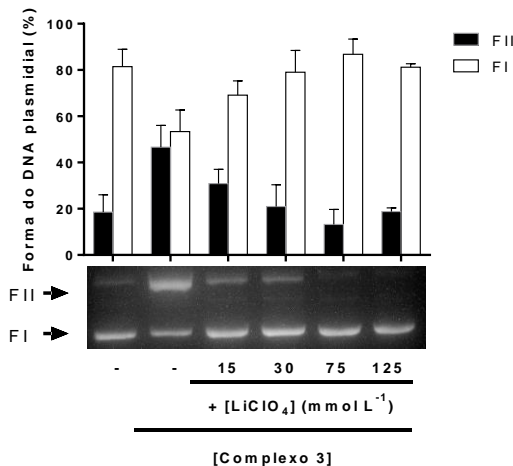


Figura 94 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **3** na presença de LiClO_4 . Condições reacionais: $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng}$, $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\mathbf{3}] = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{Tampão}] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ (MES pH 6,0); $[\text{LiClO}_4] = 15\text{-}125 \text{ mmol L}^{-1}$; Temperatura = 50°C ; Tempo = 4h ao abrigo de luz.



Nota-se que, com o aumento gradativo da concentração de cloreto de sódio ou de perclorato de lítio no meio reacional, há uma diminuição significativa da clivagem do DNA em todos os casos. Isto indica que a interação entre o DNA e os complexos possui um forte componente eletrostático, visto que neste pH os grupos fosfato do DNA estão carregados negativamente e ao se adicionar íons Na^+ ou Li^+ há uma modulação expressiva da clivagem devido à competição entre a parte catiônica do complexo e o cátion proveniente do sal adicionado. A Tabela 16 compara a inibição da clivagem na presença dos sais.

Tabela 16 – Comparação da inibição de clivagem do DNA plasmidial pelos complexos **1**, **2** e **3** na presença de 125 mmol L^{-1} de NaCl ou de LiClO_4 .

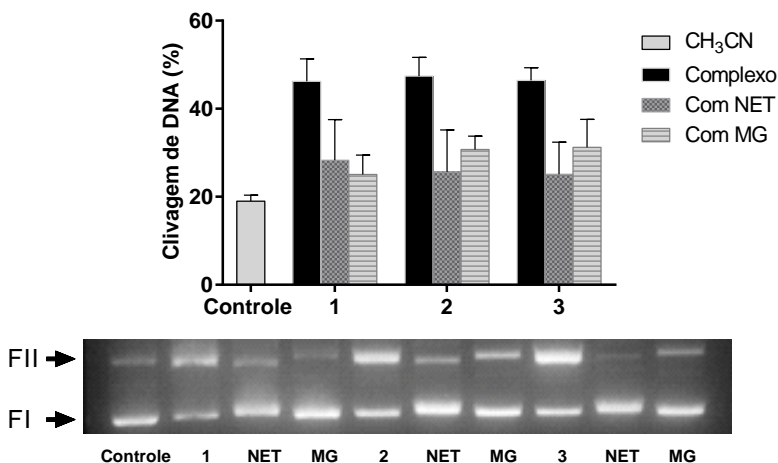
Complexo	Inibição da clivagem por NaCl (%)	Inibição da clivagem por LiClO_4 (%)
1	53 ± 3	66 ± 5
2	49 ± 4	53 ± 1
3	55 ± 4	60 ± 5

Os resultados sumarizados acima indicam que não há diferença significativa na inibição utilizando-se NaCl ou de LiClO₄ como forma de alterar a força iônica do meio. Comportamento similar já foi observado para outros complexos contendo ligantes N,O-doadores semelhantes aos utilizados (SILVA *et al.*, 2017; GABRIEL, 2016; CAMARGO *et al.*, 2015).

3.4.2.2 Efeito dos ligantes de sulco

A forma B do DNA apresenta sulcos em sua superfície, que se distinguem pelo tamanho: o sulco maior possui 11,7 Å de largura e 8,8 Å de profundidade, enquanto o sulco menor possui 5,7 Å de largura e 7,5 Å de profundidade (NELSON; COX, 2014). A fim de averiguar se os complexos interagem com o DNA através destes, foram realizados ensaios na presença de netropsina – ligante do sulco menor – e de verde de metila – ligante do sulco maior (KIM; NÓRDEN, 1993; VAN DYKE; HERTZBERG; DERVAN, 1982). Os resultados estão expressos na Figura 95.

Figura 95 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos **1**, **2** e **3** na presença de ligantes dos sulcos do DNA. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μmol L⁻¹; [Complexos] = 5 μmol L⁻¹; [Tampão] = 10 mmol L⁻¹ (MES pH 6,0); [Netropsina] = 50 μmol L⁻¹; [Verde de metila] = 50 μmol L⁻¹; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.



Os ensaios na presença dos ligantes de sulco indicam que todos os complexos interagem com a forma B do DNA através dos sulcos, porém não há preferência pelo sulco maior ou menor. Em conjunto, estes experimentos e aqueles envolvendo a variação de força iônica do meio reacional apontam para uma aproximação dos complexos ao DNA através de atrações eletrostáticas e ligações aos sulcos maior e menor do B-DNA.

3.4.2.3 Dicroísmo circular (CD)

Foram realizados estudos de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) do CT-DNA na presença dos complexos **1**, **2** e **3**, visto que tal técnica é amplamente utilizada para monitorar a estrutura secundária de ácidos nucleicos em solução (MICSONAI *et al.*, 2015).

A adição de concentrações crescentes dos complexos à solução de CT-DNA provocou alterações estruturais na forma B deste, conforme observado nas Figuras 96, 97 e 98.

Figura 96 – Espectro de CD do CT-DNA na presença de concentrações crescentes do complexo **1**. Condições reacionais: $[\text{CT-DNA}] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\mathbf{1}] = 0 - 200 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{Tampão}] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ (MES pH 6,0); Temperatura = 37°C .

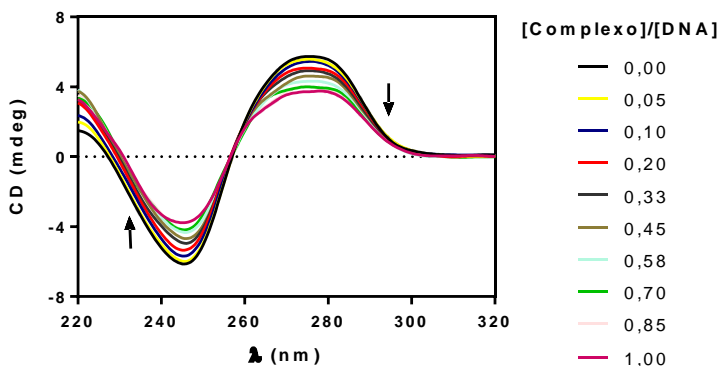


Figura 97 – Espectro de CD do CT-DNA na presença de concentrações crescentes do complexo 2. Condições reacionais: $[CT-DNA] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[2] = 0 - 200 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[Tamp\tilde{a}o] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ (MES pH 6,0); Temperatura = 37°C .

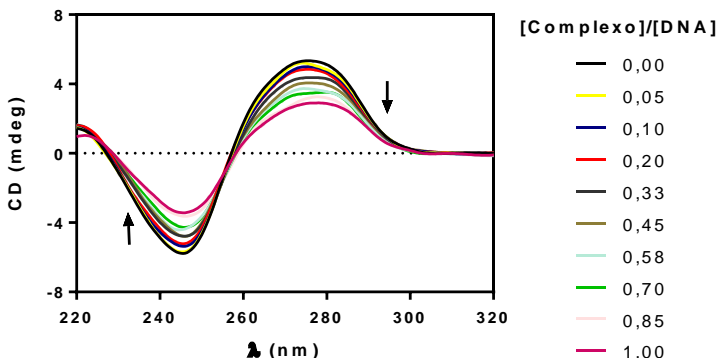
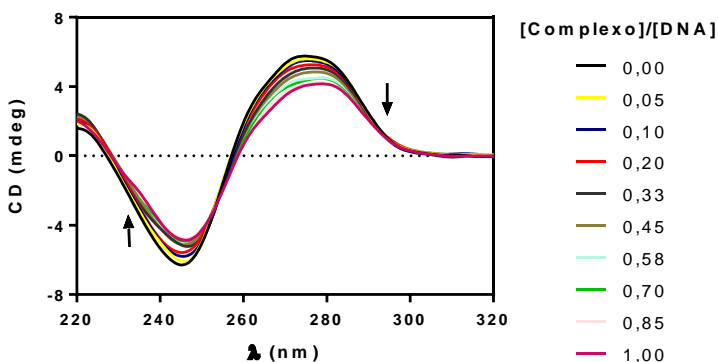


Figura 98 – Espectro de CD do CT-DNA na presença de concentrações crescentes do complexo 3. Condições reacionais: $[CT-DNA] = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[3] = 0 - 200 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[Tamp\tilde{a}o] = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ (MES pH 6,0); Temperatura = 37°C .



O espectro de CD do B-DNA mostra uma banda positiva em 275 nm devido ao empilhamento das bases e uma negativa em 245 nm por causa da helicidade (BEROVA, NAKANISHI, WOODY, 2000). Na presença dos complexos, houve uma considerável redução na intensidade destas bandas, indicando que ocorrem mudanças na

estrutura helicoidal do DNA e no emparelhamento das bases quando este interage com os complexos (JUMBRI *et al.*, 2016).

Diferentemente do observado para intercalantes clássicos como o brometo de etídeo (PARODI; NICOLINI, 1975) e azul de metileno (NORDEN, 1982), os complexos **1**, **2** e **3** diminuem a intensidade das bandas típicas do B-DNA. Moléculas intercalantes tendem a aumentar o sinal de ao menos uma destas (TAVAKOLYANPOUR *et al.*, 2016), sugerindo que os complexos **1**, **2** e **3** não interagem através de intercalação.

3.4.3 Avaliação do mecanismo de clivagem

3.4.3.1 Ensaio em atmosfera de argônio

Experimentos de clivagem do DNA plasmidial pelos complexos **1**, **2** e **3** também foram realizados em uma *glovebag* inflada com argônio, a fim de averiguar a influência de oxigênio molecular na reação. As Figuras 99 e 100 apresentam, respectivamente, a clivagem do DNA plasmidial na presença de argônio e na presença de oxigênio nas mesmas condições reacionais.

Figura 99 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II em atmosfera de argônio. Da esquerda para a direita: controle, [Fe(EDTA)], complexo **1**, complexo **2** e complexo **3**. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [**1**] = [**2**] = [**3**] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); Temperatura = 50°C; Tempo = 2h ao abrigo de luz.

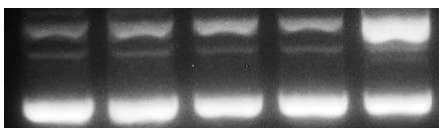
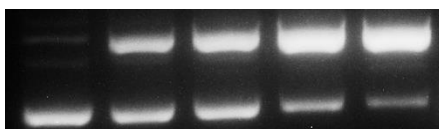


Figura 100 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II em atmosfera de oxigênio. Da esquerda para a direita: controle, [Fe(EDTA)], complexo **1**, complexo **2** e complexo **3**. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [**1**] = [**2**] = [**3**] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); Temperatura = 50°C; Tempo = 2h ao abrigo de luz.



A diferença na clivagem do controle positivo [FeEDTA]/DTT (poço 2) nos dois ensaios indica que há uma diminuição de oxigênio molecular no experimento sob atmosfera de argônio. A comparação dos experimentos mostra uma supressão significativa de clivagem do DNA pelos complexos **1**, **2** e **3** na presença de argônio, sugerindo que a quebra da dupla fita ocorre através de um mecanismo com caráter oxidativo.

3.4.3.2 Efeito dos sequestradores de ERO

Após os resultados observados sob atmosfera de argônio, a clivagem do DNA plasmidial pelos complexos foi realizada na presença de diferentes sequestradores de ERO, conforme Figuras 101, 102 e 103.

Figura 101 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **1** na presença de sequestradores de ERO. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [**1**] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); [Etanol] = 0,4 mmol L^{-1} ; [KI] = [NaN₃] = 0,5 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.

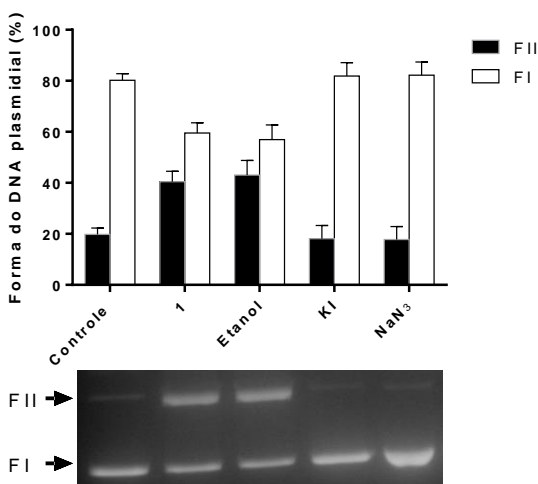


Figura 102 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **2** na presença de sequestradores de ERO. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [**2**] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); [Etanol] = 0,4 mmol L^{-1} ; [KI] = [NaN₃] = 0,5 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.

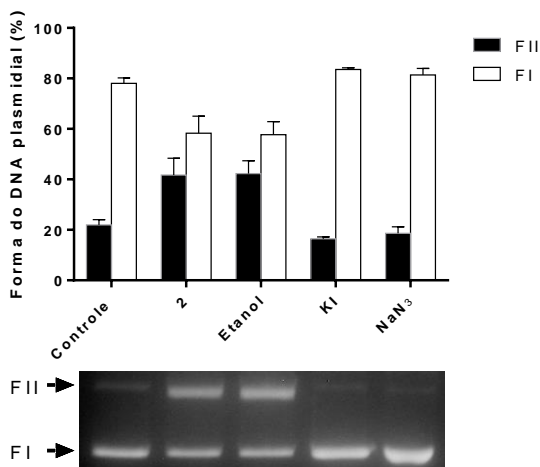
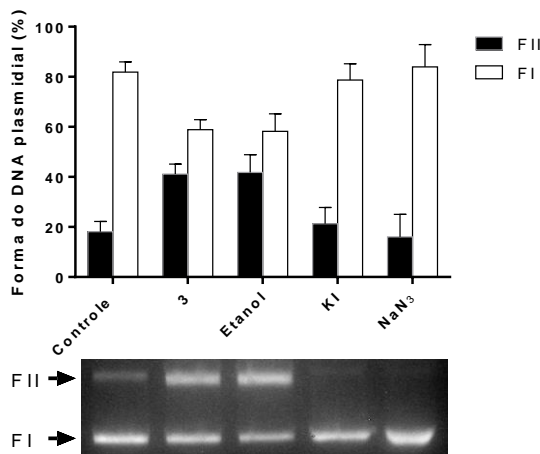


Figura 103 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo **3** na presença de sequestradores de ERO. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [**3**] = 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); [Etanol] = 0,4 mmol L^{-1} ; [KI] = [NaN₃] = 0,5 mmol L^{-1} ; Temperatura = 50°C; Tempo = 4h ao abrigo de luz.

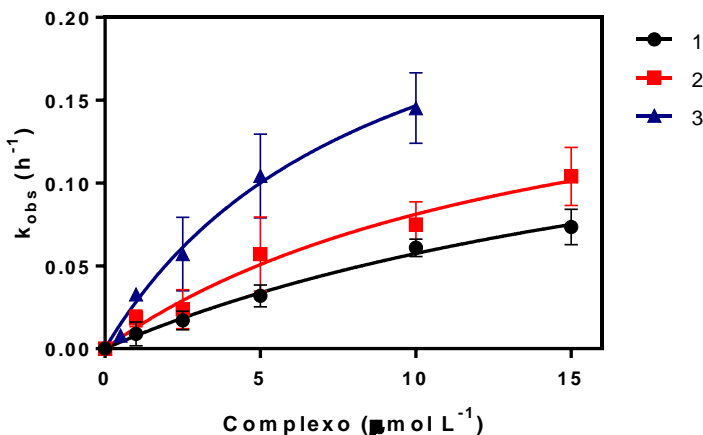


Conforme observado, o iodeto de potássio e a azida de sódio foram capazes de inibir consideravelmente a clivagem do DNA pelos complexos **1**, **2** e **3**. Por sua vez, a adição de etanol aos sistemas reacionais não exerceu influência na reação. Os resultados indicam, portanto, que os complexos clivam o DNA plasmidial com a geração de espécies do tipo R-O-OH e $^1\text{O}_2$. Importante ressaltar que grande parte dos estudos envolvendo complexos de cobre(II) são realizados na presença de coreagentes, a fim de forçar a geração de ERO (SANTINI *et al.*, 2014). No caso dos complexos **1**, **2** e **3**, há atividade oxidativa frente ao DNA mesmo na ausência de coreagentes.

3.4.4 Ensaios cinéticos

Para avaliar os parâmetros cinéticos da clivagem do DNA plasmidial pelos complexos **1**, **2** e **3**, foram realizados ensaios variando-se a concentração de catalisador a partir dos quais foram determinadas as constantes de velocidade observadas (k_{obs}) da reação em relação ao tempo (até 4 horas). A partir destes resultados, foi possível estabelecer o perfil cinético da clivagem do DNA pelos complexos através do gráfico entre k_{obs} e concentração de catalisador utilizada (Figura 104).

Figura 104 – Gráfico de k_{obs} versus concentração de complexo **1**, **2** ou **3**. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$; [**1**] = [**2**] = 1 – 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [**3**] = 0,5-10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); Temperatura = 50 °C; Tempo = 0 – 4 h ao abrigo de luz.



O tratamento dos dados foi realizado com a equação de Michaelis-Menten, admitindo-se uma condição de pseudo-primeira ordem devido ao excesso de substrato presente nas reações. Os perfis resultantes são considerados do tipo pseudo-Michaelis-Menten (MOLINA *et al.*, 2015), visto que houve a variação da concentração de catalisador ao invés da de substrato, conforme usualmente realizado em ensaios de catálise enzimática.

Os parâmetros obtidos, k_{cat} (constante catalítica) e K_M (constante de Michaelis), estão sumarizados na Tabela 17. Nesta, também estão presentes dados de outros complexos cujos ensaios cinéticos foram realizados da mesma forma.

Tabela 17 – Parâmetros cinéticos da clivagem de DNA plasmidial catalisada pelos complexos **1**, **2** e **3** e por alguns complexos da literatura. Fontes: ^a(SAIBERT, 2015); ^b(OSÓRIO *et al.*, 2012). ^c $k_{unc} = 1,5 \times 10^{-7} \text{ h}^{-1}$ (ALLENTOFT *et al.*, 2012).

Complexo	1	2	3	A ^a	B ^b
$k_{cat} (\text{h}^{-1})$	0,1936 ± 0,0653	0,2014 ± 0,0544	0,2742 ± 0,0624	0,0611 ± 0,0060	0,12
$K_M \times 10^{-6}$ (mol L ⁻¹)	23,72 ± 8,75	14,84 ± 6,81	8,715 ± 3,50	18,02 ± 4,16	12,0
$k_{cat}/K_M \times$ 10^3 (L mol ⁻¹ h ⁻¹)	8,162	13,571	31,463	3,394	1,0
k_{cat}/k_{unc}^c $\times 10^6$	1,291	1,343	1,828	0,407	3,4
$t_{1/2} (\text{h})$	3,58	3,44	2,53	11,34	5,8

Como pode ser observado, a eficiência catalítica do complexo **3** (k_{cat}/K_M) é maior que a de **1** e **2**, concordando com a ordem de atividade evidenciada nos ensaios de efeito da concentração. Em relação à clivagem do DNA, portanto, o anel de seis membros no lado duro do complexo favoreceu tanto o aumento da constante catalítica quanto o decréscimo da constante de Michaelis.

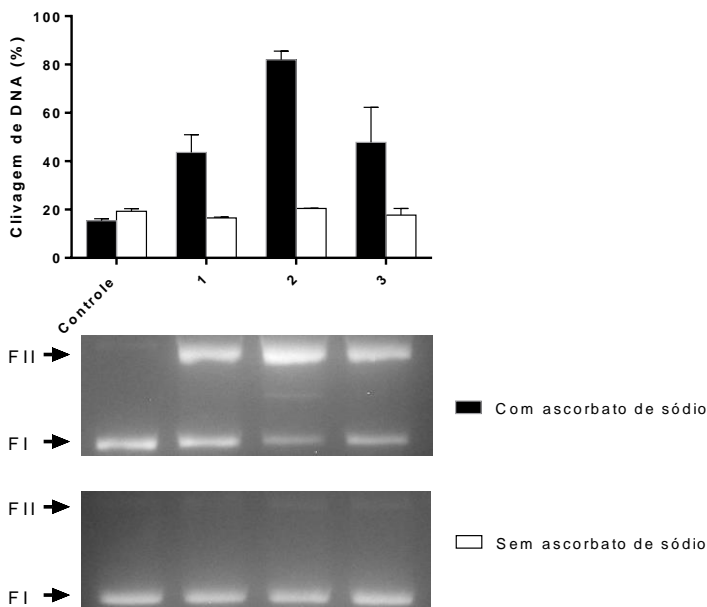
Ao comparar a atividade destes complexos com outros complexos de cobre presentes na literatura, nota-se que os mesmos apresentam um

acréscimo significativo nos valores de k_{cat} , enquanto que os valores de K_M se mantêm na mesma ordem de grandeza. Ou seja, a afinidade dos complexos com o DNA é similar, porém o número de ciclos catalíticos por unidade de tempo é maior para os complexos **1**, **2** e **3**, de modo que estes constituem modelos catalíticos mais eficientes. Os três complexos conseguem acelerar a quebra do DNA em mais de um milhão de vezes.

3.4.5 Modulação da clivagem do DNA plasmidial

Após obter resultados que indicam um mecanismo oxidativo de clivagem, investigou-se como a quebra do DNA pelos complexos poderia ser modulada adicionando-se um coreagente. As reações foram realizadas na presença de ascorbato de sódio, por 1 h a 37 °C (Figura 105).

Figura 105 – Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos na presença de um agente redutor. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Complexos] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; [Tampão] = 10 mmol L^{-1} (MES pH 6,0); [Ascorbato de sódio] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; Temperatura = 37 °C; Tempo = 1 h ao abrigo de luz.



A Figura acima mostra que é possível incrementar a clivagem do DNA pelos complexos **1**, **2** e **3** com a adição de um agente redutor. A presença de ascorbato de sódio no meio reacional induz a redução dos centros de Cu^{II} para Cu^{I} , favorecendo a geração de radicais hidroxila através de reações do tipo Fenton.

Na literatura, encontram-se diversos trabalhos nos quais os estudos com complexos de cobre(II) são realizados apenas na presença de coreagentes para garantir a geração de ERO (KATHIRESAN *et al.*, 2016; LIAN *et al.*, 2016). Por sua vez, os complexos **1**, **2** e **3** já são capazes de clivar o DNA plasmidial na ausência de coreagentes, conforme observado nos ensaios anteriores, porém em períodos de incubação de 4 h a 50 °C. Com a adição de ascorbato de sódio, além de reduzir o tempo e temperatura do sistema reacional, observa-se um aumento de 2 até 9 vezes na clivagem do DNA plasmidial (Tabela 18).

Tabela 18 – Comparação entre constantes de velocidade observadas (k_{obs}) da reação de clivagem do DNA pelos complexos **1**, **2** e **3** ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) em diferentes condições reacionais.

Complexo	$k_{\text{obs}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	
	37 °C por 1 hora (com ascorbato de sódio)	50 °C por 4 horas (sem ascorbato de sódio)
1	$0,54 \pm 0,06$	$0,061 \pm 0,005$
2	$0,60 \pm 0,18$	$0,075 \pm 0,014$
3	$0,30 \pm 0,06$	$0,145 \pm 0,021$

Além de espécies do tipo peróxido e oxigênio singlete identificadas na clivagem do DNA pelos complexos sem ascorbato de sódio (seção 3.4.3.2), na presença deste agente redutor também são gerados radicais hidroxila, o que contribui para o aumento na clivagem do DNA. Desta forma, evidencia-se que a adição do agente redutor aumenta a clivagem do DNA plasmidial em todos os casos.

É de grande interesse que a atividade dos complexos possa ser modulada pela adição de coreagentes para o emprego dos mesmos como medicamentos, visando à aplicação destes em células com ambientes mais ou menos redutores. Ressalta-se que os experimentos controles evidenciam que, na ausência dos complexos, o ascorbato de sódio não cliva significativamente o DNA plasmidial nestas condições reacionais.

3.5 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

- Os complexos clivaram o DNA plasmidial de forma concentração-dependente, seguindo a ordem de eficiência catalítica $3 > 2 > 1$. As constantes catalíticas destes evidenciam uma aceleração de mais de um milhão de vezes em relação à clivagem espontânea do DNA.
- Os resultados de CD, efeito de força iônica e efeito de bloqueadores de sulco, sugerem que a atividade catalítica dos complexos está relacionada à alteração na conformação do DNA após a aproximação entre catalisador e substrato via atração eletrostática e por ligação aos sulcos maior e menor do B-DNA.
- Os ensaios de efeito de pH, efeito de ERO e as reações em atmosfera de argônio, indicam que todos os complexos clivam o DNA plasmidial através de um mecanismo predominantemente oxidativo, envolvendo a geração de espécies reativas do tipo peróxido e oxigênio singlete.
- A clivagem do DNA plasmidial pelos complexos **1**, **2** e **3** pode ser modulada através da adição de ascorbato de sódio como coreagente, indicando a possibilidade de incrementar a atividade de catálise com a inserção de agentes externos à reação, demonstrando uma interessante ação destes complexos como possíveis agentes terapêuticos.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Três complexos binucleares de cobre(II) inéditos foram sintetizados a partir de ligantes que se diferenciam pela quantidade de carbonos alifáticos, sendo um dos ligantes já descrito anteriormente pelo grupo de pesquisa. A alteração no número de membros dos anéis quelatos dos complexos influenciou na acidez das águas coordenadas aos centros metálicos, bem como nas propriedades eletrônicas e $E_{1/2}$ dos compostos.

Os complexos atuam como modelos biomiméticos da catecol oxidase, porém a catálise ocorre através de um mecanismo distinto do proposto para a enzima, gerando peróxido de hidrogênio ao invés de água durante o ciclo. Frente ao 3,5-DTBC, o complexo **2** apresenta a maior atividade catalítica e eficiência da série. Por sua vez, em relação ao DNA plasmidial, o complexo **3** é o mais eficiente. A alteração de cinco para seis membros nos anéis quelatos do lado macio do complexo contribuiu positivamente para ambos os casos. A modificação no lado duro, formando mais um anel quelato de seis membros, influenciou no decréscimo de K_M , porém o k_{cat} variou de forma distinta para as reações.

A interação entre os complexos **1**, **2** e **3** e o DNA ocorre através de atração eletrostática e ligação pelos sulcos maior e menor, alterando o empilhamento das bases nitrogenadas e a helicidade da forma B. A clivagem do DNA ocorre por um mecanismo oxidativo ainda que na ausência de coreagentes, sendo que todos os complexos conseguem catalisar a quebra do DNA mais de 10^6 vezes. A atividade dos complexos pode ser modulada pela adição de um agente redutor, aumentando de 2 a 9 vezes a catálise mesmo em uma temperatura mais branda e em menor tempo reacional.

Uma das principais perspectivas deste trabalho é a obtenção de monocristais adequados à difratometria de raios-X e a realização de cálculos das estruturas eletrônicas dos complexos com modelos de solvatação. Em conjunto, tais informações podem fornecer suporte para propostas de distância e geometria dos centros metálicos, aspectos significativos para melhorar a caracterização estrutural e eletrônica dos complexos. Além disso, a determinação dos parâmetros termodinâmicos das reações catalisadas é importante para compreender mais detalhadamente a influência do tamanho dos anéis quelatos nestas. Em relação ao DNA, as perspectivas também incluem a determinação dos sítios de ligação dos complexos via *footprinting*, a realização de estudos de *docking* com DNA e o acompanhamento dos produtos de oxidação gerados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, J. *et al.* Tuning the activity of catechol oxidase model complexes by geometric changes of the dicopper core. **Chemistry - A European Journal**, v. 8, n. 1, p. 247-258, 2002.

ADHIKARY, J. *et al.* A combined experimental and theoretical investigation on the role of halide ligands on the catecholase-like activity of mononuclear nickel(II) complexes with a phenol-based tridentate ligand. **Inorganic Chemistry**, v. 52, n. 23, p. 13442-13452, 2013.

ALLENTOFT, M. E. *et al.* The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, p. 4724-4733, 2012.

ALMAQWASHI, A. A. *et al.* Mechanisms of small molecule-DNA interactions probed by single-molecule force spectroscopy. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 9, p. 3971-3988, 2016.

AMBUNDO, E. A. *et al.* Influence of coordination geometry upon Copper(II/I) redox potentials. Physical Parameters for twelve copper tripodal ligand complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 38, n. 19, p. 4233-4242, 1999.

ARTERO, V. Bioinspired catalytic materials for energy-relevant conversions. **Nature**, v. 2, n. 9, p. 17131, 2017.

AUSUBEL, F. M. B. *et al.* **Current Protocols in Molecular Biology**. Wiley & Sons Inc, 2003.

BANTI, C. N. *et al.* Mixed ligand–silver(I) complexes with anti-inflammatory agents which can bind to lipoxygenase and calf-thymus DNA, modulating their function and inducing apoptosis. **Metallomics**, v. 4, p. 545-560, 2012.

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 kinetic studies. **Inorganic Chemistry**, v. 47, p. 7083-7093, 2008.

BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. W. **Circular dichroism: principles and applications**. 2. ed. Wiley-VCH, 2000. 912 p.

BLACKBURN, G. M. *et al.* **Nucleic Acids in Chemistry and Biology**. 3. ed. RSC Publishing, 2006. 503 p.

BORTOLOTTO, T. **Interação e clivagem de DNA por novos complexos mononucleares de Cu(II) e binucleares de Fe(III)Zn(II)**. 2015. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BRESLOW, R. Biomimetic chemistry: biology as an inspiration. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 3, p. 1337-1342, 2009.

CAGLAR, S. *et al.* Mono and dinuclear copper(II) naproxenato complexes containing 3-picoline and 4-picoline: synthesis, structure, properties, catechol oxidase, and antimicrobial activities. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 67, p. 670-683, 2014.

CAMARGO, T. P. *et al.* New mononuclear copper(II) complex based on a salen derivative ligand with an unusual coordination and its catecholase activity. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 37, p. 34-38, 2013.

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

CHATTERJEE, A. *et al.* Tyrosinase and catecholase-like activities of a dinuclear Cu(II) complex. **Polyhedron**, v. 141, p. 140-146, 2018.

CHAVES, C. C. V. **Síntese, caracterização e atividade de catecolase de complexos de cobre com ligantes tripodais**. 2015. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CSEKE, L. J.; HERDY, J. R. Extraction/Characterization of DNA. **Laboratory Methods in Cell Biology**, p. 1-32, 2012.

DAS, M. *et al.* Thioether sulfur-bound [Cu₂] complexes showing catechol oxidase activity and DNA cleaving behaviour. **Dalton Transactions**, advance article, 2019.

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

DEMARQUE, D. P. *et al.* Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, p. 432-455, 2016.

DEO, K. M. *et al.* Platinum coordination compounds with potent anticancer activity. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 375, p. 148-163, 2018.

DEY, S. K.; MUKHERJEE, A. Catechol oxidase and phenoxazinone synthase: biomimetic functional models and mechanistic studies. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 310, p. 80-115, 2016.

DREW, H. R. *et al.* Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, p. 2179-2183, 1981.

ERXLEBEN, A. Interactions of copper complexes with nucleic acids. **Coordination Chemistry Reviews**, n. 360, p. 92-121, 2018.

FERNANDES, C. *et al.* A new dinuclear unsymmetric copper(II) complex as model for the active site of catechol oxidase. **Inorganica Chimica Acta**, v. 320, p. 12-21, 2001.

GABRIEL, P. **Efeito da alteração na segunda esfera de coordenação de complexos binucleares de Fe^{III}Zn^{II} e Fe^{III}Cu^{II} como modulador da atividade de clivagem e interação com DNA.** 2016. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GAGNÉ, R. R.; KOVAL, C. A.; LISENSKY, G. C. Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements. **Inorganic Chemistry**, 1980, v. 19, p. 2854-2855.

GERDEMANN, C.; EICKEN, C.; KREBS, B. The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, p. 183-191, 2002.

GHOSH, A. K. *et al.* Synthesis, structural and magnetic characterizations of a dinuclear copper(II) complex with an (N,S,O) donor ligand: catecholase and phenoxazinone synthase activities. **Inorganica Chimica Acta**, v. 474, p. 156-163, 2018.

GHOSH, S. *et al.* Spectroscopic and electronic structure studies of phenolate Cu(II) complexes: phenolate ring orientation and activation related to cofactor biogenesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 48, p.16262-16273, 2008.

GREATTI, A. *et al.* Synthesis, structure, and physicochemical properties of dinuclear Ni^{II} complexes as highly efficient functional models of phosphohydrolases. **Inorganic Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 1107-1119, 2008.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with sodium dodecyl sulfate: Maxipreps. **Cold Spring Hard Protocols**, v. 1, 2018.

GUHA, A. *et al.* A series of mononuclear nickel(II) complexes of Schiff-base ligands having N,N,O- and N,N,N-donor sites: syntheses, crystal structures, solid state thermal property and catecholase-like activity. **Polyhedron**, v. 52, p. 669-678, 2013.

GUHA, A. *et al.* Bio-relevant manganese(II) compartmental ligand complexes: syntheses, crystal structures and studies of catalytic activities. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 338, p. 51-57, 2011.

HAMMES, G. G.; BENKOVIC, S. J.; HAMMES-SCHIFFER, S. Flexibility, diversity, and cooperativity: pillars of enzyme catalysis. **Biochemistry**, v. 50, n. 48, p. 10422-10430, 2011.

HATHAWAY, B. J.; BILLING, D. E. The electronic properties and stereochemistry of mono-unclear complexes of the copper(II) ion. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 5, p. 143-207, 1970.

HEINZE, S. *et al.* Transmating: conjugative transfer of a new broad host range expression vector to various *Bacillus* species using a single protocol. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 56, 2018.

HEYING, R. S. **Síntese, caracterização e atividade diesterase de novos modelos biomiméticos com efeitos de segunda esfera de coordenação para fosfatases ácidas púrpuras**. 2014. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ISHIDA, S. *et al.* Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 22 p. 14298-14302, 2002.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization - aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1019-1032, 2008.

JIN, Y. *et al.* Influence of stereochemistry and redox potentials on the single- and double-strand DNA cleavage efficiency of Cu(II) and Ni(II) Lys-Gly-His-Derived ATCUN Metallopeptides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 263, p. 8353-8361, 2007.

JOVANOVIC, S. V.; KÓNYA, K.; SCAIANO, J. C. Redox reactions of 3,5-di-tert-butyl-1,2-benzoquinone. Implications for reversal of paper yellowing. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 73, p. 1803-1810, 1995.

JOY, S. R. U. *et al.* An unexpected μ 4-oxido-bridged tetranuclear Cu(II) inverse coordination complex of a heptadentate bis(pyrazolyl)methane-based ligand: Synthesis, structure, spectroscopic properties, and catecholase activity. **Inorganica Chimica Acta**, v. 485, p. 190-199, 2019.

JOYNER, J. C.; REICHFIELD, J.; COWAN, J. A. Factors influencing the DNA nuclease activity of iron, cobalt, nickel, and copper chelates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 39, p. 15613-15626, 2011.

JUMBRI, K. *et al.* Binding energy and biophysical properties of ionic liquid-DNA complex: Understanding the role of hydrophobic

interactions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 223, p. 1197-1203, 2016.

KARSTEN, P. *et al.* Synthesis, structure, properties, and phosphatase-like activity of the first heterodinuclear Fe^{III}Mn^{II} complex with the unsymmetric ligand H₂BPBPMP as a model for the PAP in sweet potato. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 18, p. 4624-4626, 2002.

KATHIRESAN, S. *et al.* Mixed-ligand copper(II)-phenolate complexes: structure and studies on DNA/protein binding profile, DNA cleavage, molecular docking and cytotoxicity. **RSC Advances**, v. 6, n. 3, p. 1810-1825, 2016.

KIM, S. K.; NÓRDEN, B. Methyl green: A DNA major-groove binding drug. **FEBS Letters**, v. 315, n. 1, p. 61-64, 1993.

KLABUNDE, T. *et al.* Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. **Nature Structural Biology**, v. 5, n. 12, p. 1084-1090, 1998.

KOVAL, I. E. *et al.* Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 9, p. 814-840, 2006.

LIAN, W. *et al.* Mixed-ligand copper(II) Schiff base complexes: the role of co-ligand in DNA binding, DNA cleavage, protein binding and cytotoxicity. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 22, p. 9073-9087, 2016.

LING, J. *et al.* Common oxygen binding site in hemocyanins from arthropods and mollusks. Evidence from raman spectroscopy and normal coordinate analysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 17, p. 7682-7691, 1994.

LU, Q. B. Molecular reaction mechanisms of combination treatments of low-dose cisplatin with radiotherapy and photodynamic therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 2601-2604, 2007.

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

MARTÍNKOVÁ, L. *et al.* Biodegradation of phenolic compounds by *Basidiomycota* and its phenol oxidases: a review. **Chemosphere**, v. 149, p. 373-382, 2016.

MARTINS, L. R. *et al.* Binuclear Cu^{II} complexes as catalysts for hydrocarbon and catechol oxidation reactions with hydrogen peroxide and molecular oxygen. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1218-1229, 2010.

MCGIVERN, T. J. P. *et al.* Copper complexes as artificial DNA metallonucleases: from Sigman's reagent to next generation anti-cancer agent? **Inorganica Chimica Acta**, n. 472, p. 12-39, 2018.

MELLER, S. L. **Síntese, caracterização e atividade de hidrolase de novos compostos de coordenação: efeito da cadeia lateral e da unidade ferroceno ancorada**. 2018. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MESSERSCHMIDT, A. Copper metalloenzymes. In: MANDER, L.; LIU, H. B. (Ed). **Comprehensive natural products II: chemistry and biology**. Oxford: Elsevier, 2010. p. 489–545.

MICSONAI, A. *et al.* Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 24, p. 3095-3103, 2015.

MODAK, R. *et al.* Syntheses, crystal structures and catecholase activity of new dinuclear and cyclic trinuclear mixed valence cobalt (II,III) complexes. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 37, p. 193-196, 2013.

MODAK, R. *et al.* Syntheses, crystallographic characterization, catecholase activity and magnetic properties of three novel aqua bridged dinuclear nickel(II) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 416, p. 122-134, 2014.

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

MONDAL, D. *et al.* Synthesis and structural characterization of a dinuclear copper(II) complex with a (N,S) donor ligand: catecholase and phenoxazinone synthase activities. **Inorganica Chimica Acta**, n. 486, p. 719-723, 2019.

MUNDINGER, S. *et al.* Modification and optimization of the bis-picolylamide-based relay protection for carboxylic acids to be cleaved by unusual complexation with Cu^{2+} salts. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, p. 8968-8979, 2012.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds**. 3. ed. New York: Wiley-Interscience, 1977. 317 p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEVES, A. *et al.* $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ and $\text{Fe}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{III}}$ complexes as synthetic analogues for the oxidized and reduced forms of purple acid phosphatases. **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 8, p. 2360-2368, 1996.

NORDEN, B. T., F. Structure of methylene blue-DNA complexes studied by linear and circular dichroism spectroscopy. **Biopolymers**, v. 21, p. 1713-1734, 1982.

OPPENHEIMER, C. H.; STERN, K. G. **Biological oxidation**. Springer, 2013. 317 p.

OSÓRIO, R. E. H. M. B. *et al.* Synthesis, magnetostructural correlation, and catalytic promiscuity of unsymmetric dinuclear copper (II) complexes: models for catechol oxidases and hydrolases. **Inorganic Chemistry**, v. 51, p. 1569-1589, 2012.

PAGES, B. J. *et al.* Metal complex interactions with DNA. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 8, p. 3505-3526, 2015.

PARODI, S. K., F.; NICOLINI, C. A clarification of the complex spectrum observed with the ultraviolet circular dichroism of ethidium bromide bound to DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 2, p. 477-486, 1975.

PERALTA, R. A. *et al.* Catecholase and DNase activities of copper (II) complexes containing phenolate-type ligands. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 1000-1013, 2010.

PERALTA, R. A. *et al.* New unsymmetric dinuclear Cu^ICu^{II} complexes and their relevance to copper(II) containing metalloenzymes and DNA cleavage. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, p. 992-1004, 2006.

PIOVEZAN, C. *et al.* Heterodinuclear Fe^{III}Zn^{II}-bioinspired complex supported on 3-aminopropyl silica. Efficient hydrolysis of phosphate diester bonds. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2580-2582, 2010.

ROGERS, S. O. **Integrated Molecular Evolution**. 1 ed. CRC Press, 2011. 391 p.

ROMPEL, A. *et al.* Purification and spectroscopic studies on catechol oxidases from *Lycopus europaeus* and *Populus nigra*: evidence for a dinuclear copper center of type 3 and spectroscopic similarities to tyrosinase and hemocyanin. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 56-63, 1999.

ROSE, P. W. *et al.* The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. 271-281, 2017.

ROSSI, L. M. *et al.* Catecholase activity of a series of dicopper(II) complexes with variable Cu-OH(phenol) moieties. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 7, p. 1788-1794, 2002.

RUBINO, J. T.; FRANZ, K. J. Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 107, p. 129-143, 2012.

SAIBERT, C. **Interação e clivagem de DNA por complexos binucleares de cobre(II) com ligantes contendo o grupo triazina e cadeias laterais funcionalizadas**. 2015. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- SANGEETHA, G. K. R. *et al.* Mechanism of DNA Binding and Cleavage. **Biomedicine and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2014.
- SANTINI, C. *et al.* Advances in copper complexes as anticancer agents. **Chemical Reviews**, n. 114, p. 815-862, 2014.
- SCHATZ, M. *et al.* Copper(I) complexes, copper(I)/O₂ reactivity, and copper(II) complex adducts, with a series of tetradentate tripyridylalkylamine tripodal ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 40, n. 10, p. 2312-2322, 2001.
- SIEGBAHN, P. E. M. The catalytic cycle of catechol oxidase. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 9, n. 5, p. 577-590, 2004.
- SIGMAN, D. R.; MAZUMDER, A.; PERRIN, D. M. Chemical nucleases. **Chemical Reviews**, 1993, v. 93, p. 2295-2316.
- SILVA, G. A. S. *et al.* Synthesis and characterization of Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II} complexes: effects of a second coordination sphere and increase in the chelate ring size on the hydrolysis of a phosphate diester and DNA. **Dalton Transactions**, n. 46, v. 34, p. 11380-11394, 2017.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.
- SOLEM, E.; TUCZEK, F.; DECKER, H. Tyrosinase versus catechol oxidase: one asparagine makes the difference. **Angewandte Chemie**, v. 55, p. 2884-2888, 2016.
- SOLOMON, E. I. *et al.* Copper active sites in biology. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 3659-3853, 2014.
- SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKIN, T. E. Multicopper oxidases and oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2563-2606, 1996.
- SOUZA, B. **Estudo de novos catalisadores biomiméticos com efeitos de segunda esfera de coordenação: síntese, caracterização e catálise**. 2013. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SOUZA, B. *et al.* Second-coordination-sphere effects increase the catalytic efficiency of an extended model for Fe^{III}M^{II} purple acid phosphatases. **Inorganic Chemistry**, v. 52, p. 3594-3596, 2013.

TAVAKOLYANPOUR, F. *et al.* Complexes of Co(II) and Cu(II) with nonsteroidal anticancer drug Letrozole and their interaction with DNA and BSA by spectroscopic methods and cytotoxic activity. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 13, n. 11, p. 2121-2133, 2016.

TRABUCO, L.; VILLA, E. **Case study: DNA**. 2015. Disponível em: www.ks.uiuc.edu/Training/CaseStudies. Acesso em: 08 nov. 2018.

THOER, A. *et al.* The Reimer-Tiemann reaction in slightly hydrated solid-liquid medium: a new method for the synthesis of formyl and diformyl phenols. **Synthetic Communications**, v. 18, n. 16-17, p. 2095-2101, 1988.

TOMOAIA-COTISEL, M. *et al.* Acid dissociation constants of diphytanylglycerolphosphorylglycerol-methylphosphate, and diphytanylglycerolphosphorylglycerophosphate and its deoxy analog. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 100, p. 41-54, 1999.

TORELLI, S. *et al.* Substrate binding in catechol oxidase activity: biomimetic approach. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 15, p. 3983-3989, 2002.

TRAVERS, A.; MUSKHELISHVILI, G. DNA structure and function. **The FEBS Journal**, v. 282, p. 2279-2295, 2015.

TULLIUS, T. D. *et al.* Structural chemistry of platinum-DNA adducts. In: LIPPARD, S. J. (Ed). **Platinum, Gold, and Other Metal Chemotherapeutic Agents**. v. 209. American Chemical Society, 1983. p. 51-74.

ÜNVER, H.; HAYVALI, Z. Synthesis, spectroscopic studies and structures of square-planar nickel(II) and copper(II) complexes derived from 2-((Z)-[furan-2-ylmethyl]imino)methyl}-6-methoxyphenol. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 75, p. 782-788, 2010.

VAN DYKE, M. W.; HERTZBERG, R. P.; DERVAN, P. B. Map of distamycin, netropsin, and actinomycin binding sites on heterogeneous DNA: DNA cleavage-inhibition patterns with methidiumpropyl-EDTA.Fe(II). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, p. 5470-5474, 1982.

WANG, G.; VASQUEZ, K. M. Z-DNA, an active element in the genome. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 4424-4438, 2007.

WANG, M. *et al.* *In vitro* selection of DNA-cleaving deoxyribozyme with site-specific thymidine excision activity. **Nucleic Acids Research**, 2014, v. 42, n. 14, p. 9262-9269, 2014.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, p. 737-738, 1953.

WEGST, U. G. K. *et al.* Bioinspired structural materials. **Nature Materials**, 2015, v. 14, p. 23-36.

WITZ, G.; STASIAK, A. DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting. **Nucleic Acids Research**, v., 38, p. 2119-2133, 2010.

WOGGON, W. Metalloporphyrines as active site analogues - lessons from enzymes and enzyme models. **Accounts of Chemical Research**, v. 38, p. 127-136, 2005.

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

ZERÓN, P. *et al.* Dinuclear copper(II) complexes with distant metal centers: weaker donor groups increase catecholase activity. **European Journal of Inorganic Chemistry**, p. 56-62, 2017.

ZHENG, B. *et al.* Effect of coordination sphere of the copper center and Cu-Cu distance on catechol oxidase and nuclease activities of the copper complexes. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 28, p. 372-378, 2014.

ZHOU, C.; ZHOU, F.; XU, Y. Comparative analyses of distributions and functions of Z-DNA in Arabidopsis and rice. **Genomics**, v. 93, p. 383-391, 2009.

ZHOU, X.; ZHANG, G.; PAN, J. Groove binding interaction between daphnetin and calf thymus DNA. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 74, p. 185-194, 2015.