



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

CLÁUDIA CRISTINE VIDAL CHAVES

**HIDROLASES SINTÉTICAS DE Ni(II) COM EFEITO DE SEGUNDA ESFERA
DE COORDENAÇÃO: CORRELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE**

FLORIANÓPOLIS

2020

Cláudia Cristine Vidal Chaves

**HIDROLASES SINTÉTICAS DE Ni(II) COM EFEITO DE SEGUNDA ESFERA DE
COORDENAÇÃO: CORRELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE**

Tese submetido(a) ao Programa de Pós-
Graduação em Química da Universidade
Federal de Santa Catarina para a obtenção do
título de Doutor em Química
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosely A. Peralta
Coorientador: Prof. Dr. Ademir Neves

Florianópolis

2020

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

Chaves, Cláudia Cristine Vidal

Hidrolases sintéticas de Ni(II) com efeito de segunda esfera de coordenação: correlação estrutura-atividade / Cláudia Cristine Vidal Chaves ; orientadora, Rosely Aparecida Peralta, coorientador, Ademir Neves, 2020. 181 p.

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

Inclui referências.

1. Química. 2. Complexos de Ni(II). 3. Hidrolase. 4. Segunda esfera de coordenação. I. Peralta, Rosely Aparecida. II. Neves, Ademir. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Cláudia Cristine Vidal Chaves

**Hidrolases sintéticas de Ni(II) com efeito de segunda esfera de coordenação:
correlação estrutura-atividade**

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

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

Prof. Dr. Thiago Ferreira da Conceição
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Juliana Paula da Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Rozangela Curi Pedrosa
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Prof. Marcus Cesar Mandolesi Sá, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

Prof^a. Dr^a. Rosely A. Peralta
Orientadora

Florianópolis, 08 de junho de 2020.

Para minha mãe Sandra e meu marido Eduardo, pelo apoio e amor que me dedicam.

AGRADECIMENTOS

Quando damos os primeiros passos em nossa jornada como aspirantes a cientistas, não somos capazes de imaginar até onde o caminho nos levará. Para chegar até esta etapa pude contar, felizmente, com o apoio, compreensão, carinho e amizade de vários companheiros de estrada. Sem a ajuda de todos que me acompanharam nestes anos, mesmo que por pouco tempo, teria sido muito mais difícil percorrer este caminho. Agradeço à minha mãe Sandra por me apoiar sempre, por ser um exemplo que me orgulho de seguir, por ter me guiado nos primeiros passos e por me deixar seguir adiante. Se pude confiar nos passos que dei até aqui foi porque você me fez acreditar que eu era capaz. Agradeço ao meu marido Eduardo, pelo amor, pela amizade, pelo companheirismo, pela compreensão nos momentos difíceis, e por trilharmos juntos esta estrada, sempre apoiando um ao outro. À Vó Odilla e à Vó Landa, à minha irmã Clara, ao meu pai Marcos e ao meu padrasto Chico, obrigada pelo apoio durante todos esses anos, pelo amor, carinho e pela compreensão. Aos meus sogros Lilian e Eduardo, e aos meus cunhados João Pedro e Gabriel, obrigada pelo carinho, apoio e por terem me acolhido como parte da família desde o início.

Agradeço aos Professores que foram meus guias, e que tanto me ensinaram, não só sobre ciência, mas também sobre como enfrentar os obstáculos que porventura encontrasse no caminho. Ao Professor Adailton Bortoluzzi pelos ensinamentos e conselhos ao longo de todos esses anos. Ao Professor Ademir Neves pela confiança, e por dividir sempre seu entusiasmo pela ciência. Ao Professor Bernardo de Souza pela colaboração e contribuições. À Professora Jane Mikcha pela colaboração e realização dos testes de atividade antibacteriana.

À Professora Rosely Peralta, por ter me guiado desde o começo desta jornada. Pela orientação, contribuições, ensinamentos e conselhos, que contribuíram para que eu me tornasse mais forte e capaz. Obrigada por tudo.

Aos companheiros de laboratório, que fizeram de cada dia uma nova aventura, muito obrigada. Agradeço ao Professor Tiago Pacheco, à Claudia, Filipy, Vitor, Luana, Alana, Vinícius, Pedro, Gili, Jéssica Toigo, Letícia, Dani, Giovana e Sarita pela ajuda, pelas conversas e momentos de descontração. Ao Gili ainda pela realização dos cálculos. Ao Joaquim pelas conversas literárias. À Brubs, que trilhou boa parte deste caminho junto comigo, à Suélen, Bruna Gracioli e Herculy, obrigada pela amizade, discussões e companheirismo. Ao Giovanni, pelo entusiasmo

contagiante e à Sheilinha, pelo bom humor e por sempre me fazer rir. À Edinara, companheira de bancada, e ao Carlos, pelas conversas, trocas de ideia, discussões e pelas risadas.

Aos amigos Marquito, por me acompanhar desde o início, por toda ajuda, por ter sido companheiro nos momentos bons e ruins, pelas discussões, ideias, por compartilhar o estresse e mais importante, as risadas. Ao André, por ser quem você é, por me inspirar a querer ser melhor e a aprender mais, pela amizade, por me ensinar tanto, mesmo sem saber, obrigada. À Rê, companheira de todas as horas e irmã gêmea que descobri no meio do caminho, pelo apoio, ajuda, pela amizade constante, por dividir as alegrias e o estresse, por sempre tentar ver o lado positivo de tudo, pelo otimismo contagiante, obrigada por tudo. À Gra, irmã de coração, companheira em todos os momentos, sua força e perseverança sempre me inspiraram a seguir em frente. Obrigada por me ensinar a nunca desistir.

Aos membros da banca pelas contribuições.

À Central de análises do Departamento de Química pelas análises de CHN e de RMN e ao CEBIME, pelas análises de ESI-MS.

Ao Departamento de Química e aos órgãos de fomento, CAPES (pela bolsa de doutorado), INCT-Catálise e CNPq pela oportunidade de poder realizar esta pesquisa.

The Man in The Glass

*When you get what you want in your struggle for pelf,
And the world makes you King for a day,
Then go to the mirror and look at yourself,
And see what that guy has to say.
For it isn't your Father, or Mother, or Wife,
Who judgement upon you must pass.
The feller whose verdict counts most in your life
Is the guy staring back from the glass.
He's the feller to please, never mind all the rest,
For he's with you clear up to the end,
And you've passed your most dangerous, difficult test
If the guy in the glass is your friend.
You may be like Jack Horner and "chisel" a plum,
And think you're a wonderful guy,
But the man in the glass says you're only a bum
If you can't look him straight in the eye.
You can fool the whole world down the pathway of years,
And get pats on the back as you pass,
But your final reward will be heartaches and tears
If you've cheated the guy in the glass.*

(Dale Wimbrow)

*"A creative man is motivated by the desire to achieve, not
by the desire to beat others."
(Ayn Rand)*

RESUMO

Alguns complexos binucleares de Ni^{II} podem apresentar melhor atividade frente à hidrólise de ésteres de fosfato do que complexos com íons metálicos mais comumente utilizados para mimetizar esta reação, como Fe^{III/II}, Zn^{II} e Mn^{II}. Ainda, nos últimos anos o papel desempenhado pela segunda esfera de coordenação na atividade catalítica de metaloenzimas têm atraído o interesse de diversos pesquisadores, de modo que compostos modelo contendo grupos capazes de mimetizar estes efeitos têm sido reportados na literatura. Neste trabalho foram sintetizados três novos complexos binucleares de Ni^{II}, [Ni₂(H₂LEt)(μ-OAc)₂(H₂O)]BPh₄·ClO₄ (**1**), [Ni₂(H₂LProp)(μ-OAc)₂(H₂O)](ClO₄)₂ (**2**) e [Ni₂(LBut)(μ-OAc)₂(H₂O)]·2HCl (**3**) a partir de três novos ligantes binucleantes contendo grupos amino em sua cadeia lateral, H₂LEt, H₂LProp e H₂LBut, visando mimetizar a segunda esfera de coordenação presente em metaloenzimas. Os ligantes foram caracterizados através das técnicas de CHN, infravermelho, ¹H NMR, ¹³C NMR e ESI-MS e os complexos foram caracterizados através das técnicas de CHN, infravermelho, espectroscopia UV-Vis, ESI-MS, eletroquímica, absorção atômica e titulação potenciométrica. Também foram realizados cálculos de estrutura eletrônica visando um melhor entendimento das estruturas moleculares e eletrônicas destes complexos. Os três complexos tiveram sua atividade hidrolítica avaliada frente ao substrato modelo bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato de piridínio – 2,4-BDNPP. Os complexos **1**, **2** e **3** apresentaram acelerações de 126,7 × 10³, 90,00 × 10³ e 81,50 × 10³ vezes, respectivamente, em relação à reação não catalisada para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP sendo, portanto, considerados modelos funcionais para fosfohidrolases. O complexo **2** apresentou o maior valor de eficiência catalítica (*k_{cat}/K_M*) dentre os três complexos, possivelmente devido à maior interação com o substrato observada para este complexo. Os três complexos tiveram sua atividade antibacteriana testada através dos métodos de concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC), utilizando cepas bacterianas gram-positivas e gram-negativas e o complexo **2** apresentou atividade frente a todas as cepas bacterianas testadas.

Palavras-chave: Complexos de níquel(II). Hidrolase. Segunda esfera de coordenação.

ABSTRACT

Some dinuclear Ni^{II} complexes may present better activity against the hydrolysis of phosphate esters than complexes with some of the most commonly metal ions used to mimic this reaction, such as Fe^{III}, Zn^{II} and Mn^{II}. Also, in recent years, the role played by the second coordination sphere in the catalytic activity of metalloenzymes has attracted the interest of several researchers, so that model compounds containing groups that are able to mimic these effects have been reported in the literature. Here in, we report the synthesis and characterization of three new dinuclear Ni(II) complexes, [Ni₂(H₂LEt)(μ-OAc)₂(H₂O)]BPh₄·ClO₄ (**1**), [Ni₂(H₂LProp)(μ-OAc)₂(H₂O)](ClO₄)₂ (**2**) and [Ni₂(LBut)(μ-OAc)₂(H₂O)]·2HCl (**3**) from three new binuclear ligands H₂LEt, H₂LProp and H₂LBut containing amino groups as side chains, in order to mimic the second coordination sphere present in metalloenzymes. The ligands were characterized by CHN, infrared, ¹H NMR, ¹³C NMR and ESI-MS techniques and the complexes were characterized by CHN, infrared and UV-VIS spectroscopy, ESI-MS, electrochemistry, FAAS and potentiometric titration. Density functional theory (DFT) was also performed in order to better understand the electronic and molecular structure of these complexes. The three complexes had their hydrolytic activity evaluated against the model substrate bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate – 2,4-BDNPP. Complexes **1**, **2** and **3** presented accelerations rates of 126.7 × 10³, 90.00 × 10³ and 81.50 × 10³ times, respectively, regarding the non-catalyzed reaction of the 2,4-BDNPP, and can, therefore, be considered functional models for phosphohydrolases. Complex **2** presented the highest catalytic efficiency (*k*_{cat}/*K*_M) of the three complexes, possibly due to the greater interaction with the substrate observed for **2**. The three complexes were also screened for their antibacterial activities using both gram-positive and gram-negative bacterial strains by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) methods and complex **2** presented activity against all tested bacterial strains.

Keywords: Nickel(II) complexes. Hydrolase. Second coordination sphere.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação de uma unidade da enzima urease do feijão-de-porco (<i>Canavalia ensiformis</i>).	28
Figura 2 Diversidade de mecanismos propostos para metalohidrolases binucleares. (A) Fosfatase ácida púrpura, (B) urease, (C) leucina amino-peptidase, (D) fosfatase alcalina, (E) 3'-5' exonuclease, (F) inositol monofosfatase, (G) fosfotriesterase, e (H) Eco RV endonuclease.....	31
Figura 3 Primeira esfera de coordenação e diferentes íons metálicos de algumas metalohidrolases binucleares. (A) Fosfatase ácida purpura contendo íons Fe ^{III} /Zn ^{II} ; (B) Urease da <i>Sporosarcina pasteurii</i> (SPU) contendo dois íons Ni ^{II} /Ni ^{II} ; (C) Metalo-β-Lactamase do <i>Bacillus cereus</i> contendo dois íons Zn ^{II} /Zn ^{II}	32
Figura 4 A) Ligações fosfodiéster presentes nas moléculas de DNA e RNA. B) Grupo éster de fosfato presente em fosfolipídios de membranas plasmáticas.	33
Figura 5 Alguns compostos organofosforados utilizados como defensivos agrícolas e agentes neurotóxicos.	35
Figura 6 Alguns ligantes simétricos e não simétricos utilizados na síntese de compostos modelo para fosfohidrolases como PAPs (H ₂ BPBPMP, H ₂ L ¹), urease (BCIMP, bdptz) e fosfodiesterases (HBPMB, IPCPMP).	37
Figura 7 Exemplos de complexos binucleares como modelo para hidrolases. A) Complexo de Fe ^{III} Zn ^{II} , modelo para hidrólise de fosfodiésteres; B) Complexo de Cu ^{II} , modelo para hidrólise de fosfodiésteres e catecol oxidases; C) Complexo de Fe ^{III} Zn ^{II} , modelo para hidrólise de fosfodiésteres.	38
Figura 8 Compostos de Ni ^{II} reportados na literatura com atividade de fosfodiesterase.	39
Figura 9 Ligante HBPMP e seu derivado HL ⁴ contendo grupos amino.	42
Figura 10 A) Complexo reportado por Silva <i>et al.</i> contendo uma unidade diamina. B) Complexo reportado por Camargo <i>et al.</i> contendo uma unidade pireno.	43
Figura 11 Alguns compostos utilizados como agentes antibacterianos.	46
Figura 12 A) Ligante H ₂ bppamff; B) Complexo A reportado por Piovezan e colaboradores.	49
Figura 13 Ligantes não simétricos utilizados neste trabalho.	49
Figura 14 Espectro de IR do bpa (ATR).	63

Figura 15 Espectro de ^1H NMR do bpa em CDCl_3 - 200 MHz.	64
Figura 16 Espectro de IR do bpamff (ATR).	65
Figura 17 Espectro de ^1H NMR do bpamff em CDCl_3 - 200 MHz.	66
Figura 18 Espectro de IR do bpapyff (ATR).	67
Figura 19 Espectro de ^1H NMR do bpapyff em CDCl_3 - 200 MHz.....	68
Figura 20 Espectro de IR do $\text{H}_2\text{bppamff}$ (ATR).	70
Figura 21 Espectro de ^1H NMR do $\text{H}_2\text{bppamff}$ em CDCl_3 - 400 MHz.....	71
Figura 22 Espectro de IR do H_2LEt (ATR).	73
Figura 23 Espectro de ^1H NMR do H_2LEt em CDCl_3 - 400 MHz.	74
Figura 24 Espectro de ^{13}C NMR do ligante H_2LEt em CDCl_3 – 100 MHz.....	75
Figura 25 Espectro de IR do H_2LProp (ATR).	77
Figura 26 Espectro de ^1H NMR do H_2LProp em CDCl_3 - 200 MHz.	78
Figura 27 Espectro de ^{13}C NMR do ligante H_2LProp em CDCl_3 – 100 MHz.	79
Figura 28 Espectro de IR do H_2LBut (ATR).	81
Figura 29 Espectro de ^1H NMR do H_2LBut em CDCl_3 - 200 MHz.	82
Figura 30 Espectro de ^{13}C NMR do ligante H_2LBut em CDCl_3 – 100 MHz.....	83
Figura 31 Espectros no IR dos precursores bpa (preto), bpamff (vermelho) e bpapyff (azul) (ATR).	88
Figura 32 Espectros no IR dos ligantes $\text{H}_2\text{bppamff}$ (preto), H_2LEt (vermelho), H_2LProp (azul) e H_2LBut (verde) (ATR).	89
Figura 33 Deslocamentos químicos (δ_{C}) para os espectros de ^{13}C observados para os ligantes H_2LEt , H_2LProp e H_2LBut	93
Figura 34 Espectro de ESI-MS do ligante $\text{H}_2\text{bppamff}$ e respectiva simulação da distribuição isotópica (vermelho) em m/z 587,29. [$\text{H}_2\text{bppamff} + 1\text{H}$] $^+$	94
Figura 35 Espectro de ESI-MS do ligante H_2LEt e respectiva simulação da distribuição isotópica (vermelho) em m/z 631,35. [$\text{H}_2\text{LEt} + 1\text{H}$] $^+$	94
Figura 36 Espectro de ESI-MS do ligante H_2LProp e respectiva simulação da distribuição isotópica (vermelho) em m/z 645,46. [$\text{H}_2\text{LProp} + 1\text{H}$] $^+$	95
Figura 37 Espectro de ESI-MS do ligante H_2LBut e respectiva simulação da distribuição isotópica (vermelho) m/z 659. [$\text{H}_2\text{LBut} + 1\text{H}$] $^+$	95
Figura 38 Espectro de ESI-MS do ligante H_2LBut no modo negativo e respectiva simulação da distribuição isotópica (vermelho) m/z 693,48. [$\text{H}_2\text{LBut} + 1\text{Cl}$] $^-$	96
Figura 39 Sobreposição dos espectros no IR do complexo 1 (preto) e do ligante H_2LEt (vermelho) (ATR).	101

Figura 40 Sobreposição dos espectros no IR do complexo 2 (preto) e do ligante H ₂ LProp (vermelho) (ATR).	101
Figura 41 Sobreposição dos espectros no IR do complexo 3 (preto) e do ligante H ₂ LBut (vermelho) (ATR).	102
Figura 42 Geometrias no estado fundamental otimizadas para os complexos 1 – 3 utilizando BP86/DEF2-TZVP (metais) ou DEF2-SVP (outros átomos). Alguns átomos foram omitidos para maior clareza.	103
Figura 43 Numeração dos átomos presentes na Tabela 10 acima.	104
Figura 44 Sobreposição dos espectros de infravermelho experimental (preto) e teórico (vermelho) para o complexo 1	105
Figura 45 Sobreposição dos espectros de infravermelho experimental (preto) e teórico (vermelho) para o complexo 2	105
Figura 46 Sobreposição dos espectros de infravermelho experimental (preto) e teórico (vermelho) para o complexo 3	106
Figura 47 Espectro eletrônico do complexo 1 em CH ₃ CN ([C] = 2,50 × 10 ⁻² mol L ⁻¹) e no estado sólido (inserido).	108
Figura 48 Espectro eletrônico do complexo 2 em CH ₃ CN ([C] = 2,50 × 10 ⁻² mol L ⁻¹) e no estado sólido (inserido).	109
Figura 49 Espectro eletrônico do complexo 3 em CH ₃ CN ([C] = 2,50 × 10 ⁻² mol L ⁻¹) e no estado sólido (inserido).	109
Figura 50 Espectro eletrônico dos complexos 1 – 3 mostrando as bandas em aproximadamente 300 nm. [C] = 2,00 × 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ (1); [C] = 8,00 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ (2); [C] = 2,33 × 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ (3).	110
Figura 51 Orbitais de fronteira calculados para os complexos 1, 2 e 3	111
Figura 52 Espectro de absorção experimental para o complexo 1 em CH ₃ CN e espectro de absorção teórico (inserido) convoluído com gaussianas de 0,35 eV de largura.	112
Figura 53 Espectro de absorção experimental para o complexo 2 em CH ₃ CN e espectro de absorção teórico (inserido) convoluído com gaussianas de 0,35 eV de largura.	112
Figura 54 Espectro de absorção experimental para o complexo 3 em CH ₃ CN e espectro de absorção teórico (inserido) convoluído com gaussianas de 0,35 eV de largura.	113

Figura 55 Espécies propostas para o complexo 1 a) m/z 460,15, carga +2 e b) m/z 803,31, carga +1 relativas às espécies encontradas na espectrometria de massas.	114
Figura 56 Espectro de ESI-MS do complexo 1 em m/z 460,15 (carga +2) e respectiva simulação da espécie isotópica.....	115
Figura 57 Espectro de ESI-MS do complexo 1 em m/z 803,31 (carga +1) e respectiva simulação da espécie isotópica.....	115
Figura 58 Espécies propostas para o complexo 2 a) m/z 467,11, carga +2 e b) m/z 817,32, carga +1 relativas às espécies encontradas na espectrometria de massas.	116
Figura 59 Espectro de ESI-MS do complexo 2 em m/z 817,32 (carga +1) e respectiva simulação da espécie isotópica.....	116
Figura 60 Espectro de ESI-MS do complexo 2 em m/z 467,11 (carga +2) e respectiva simulação da espécie isotópica.....	117
Figura 61 Espécies propostas para o complexo 3 . a) m/z 1007,32, carga +1 e b) m/z 831,36, carga +1 relativas às espécies encontradas na espectrometria de massas.	118
Figura 62 Espectro de ESI-MS do complexo 3 em m/z 1007,32 (carga +1) e respectiva simulação da espécie isotópica.....	118
Figura 63 Espectro de ESI-MS do complexo 3 em m/z 831,36 (carga +1) e respectiva simulação da espécie isotópica.....	119
Figura 64 Voltamogramas cíclicos em acetonitrila seca: A, B e C) complexo 1 ; D) ligante H ₂ LEt.	121
Figura 65 Voltamograma de onda quadrada para o complexo 1 em acetonitrila seca. (pulso = 20 mV e frequência = 15 Hz).....	122
Figura 66 Voltamogramas cíclicos em acetonitrila seca: A, B e C) complexo 2 ; D) ligante H ₂ LProp.....	122
Figura 67 Voltamograma de onda quadrada para o complexo 2 em acetonitrila seca. (pulso = 25 mV e frequência = 15 Hz).....	123
Figura 68 Voltamogramas cíclicos em acetonitrila seca: A, B e C) complexo 3 ; D) ligante H ₂ LProp.....	123
Figura 69 Voltamograma de onda quadrada para o complexo 3 em acetonitrila seca. (pulso = 20 mV e frequência = 15 Hz).....	124

Figura 70 Curvas de distribuição de espécies para o complexo 1 em função do pH. CH ₃ CN/H ₂ O 50% v/v, <i>I</i> = 0,1 mol L ⁻¹ (KCl).	128
Figura 71 Curvas de distribuição de espécies para o complexo 2 em função do pH. CH ₃ CN/H ₂ O 50% v/v, <i>I</i> = 0,1 mol L ⁻¹ (KCl).	128
Figura 72 Curvas de distribuição de espécies para o complexo 3 em função do pH. CH ₃ CN/H ₂ O 50% v/v, <i>I</i> = 0,1 mol L ⁻¹ (KCl).	129
Figura 73 <i>k</i> _{obs} versus pH para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo 1 , juntamente com as curvas de distribuição de espécies. Inserido, a representação da espécie mais ativa na reação de hidrólise.	131
Figura 74 Proposta de equilíbrio mostrando as espécies E, F e G para os complexos 2 e 3	133
Figura 75 <i>k</i> _{obs} versus pH para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo 2 , juntamente com as curvas de distribuição de espécies.	133
Figura 76 <i>k</i> _{obs} versus pH para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo 3 , juntamente com as curvas de distribuição de espécies.	134
Figura 77 Eficiência catalítica (<i>k</i> _{cat} / <i>K</i> _M) vs pH para os complexos 1 – 3	135
Figura 78 Dependência da velocidade de reação (<i>v</i> ₀) com a concentração do substrato 2,4-BDNPP para a reação de hidrólise promovida pelos complexos 1 , 2 e 3 . Condições: [complexo] = 4,00 × 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ para os complexos 1 e 2 e [complexo] = 5,18 × 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ para o complexo 3 ; [tampão] = 50,00 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹ (CHES, pH = 9,00); <i>I</i> = 50,00 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹ (LiClO ₄) em CH ₃ CN/H ₂ O (1:1) a 25 °C.	136
Figura 79 Geometrias no estado fundamental otimizadas para os conjugados fosfato dos complexos 1 , 2 e 3 utilizando BP86/DEF2-TZVP (metais) ou DEF2-SVP.	139
Figura 80 Dependência da velocidade (<i>v</i> ₀) com relação a concentração do substrato 2,4-DNPP. Condições: [complexo] = 4,00 × 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ (1 e 2) e [complexo] = 5,18 × 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ (3); [tampão] = 50,00 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹ (CHES, pH = 9,00); <i>I</i> = 50 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹ (LiClO ₄) em CH ₃ CN/H ₂ O (1:1), a 25 °C.	141
Figura 81 Linearizações de <i>k</i> _{cat} observadas para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP na presença dos complexos 1 – 3 a pH = 9,00 em função da temperatura. A) Equação de Arrhenius, B) Equação de Eyring.	144

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 Síntese do núcleo básico 3-(clorometil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído – cmff.....	61
Esquema 2 Proposta de atribuição do equilíbrio de protonação observado para os complexos 1 – 3 em solução.....	127
Esquema 3 Reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP.	130
Esquema 4 Mecanismo proposto para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelos complexos 1 e 3 (em cima) e 2 (embaixo).	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Materiais, reagentes e solventes utilizados nas sínteses e análises.....	59
Tabela 2 Porcentagens de C, H e N para os ligantes sintetizados via análise elementar.	86
Tabela 3 Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) observados para precursores bpa, bpamff e bpapyff.	88
Tabela 4 Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) observados para os ligantes $\text{H}_2\text{bppamff}$, H_2LEt , H_2LProp e H_2LBut	90
Tabela 5 Deslocamentos químicos, em ppm (multiplicidade e integração), observados nos espectros de ^1H NMR para os precursores bpa, bpamff e bpapyff.	91
Tabela 6 Deslocamentos químicos, em ppm (multiplicidade e integração), observados nos espectros de ^1H NMR para os ligantes $\text{H}_2\text{bppamff}$, H_2LEt , H_2LProp e H_2LBut . ..	92
Tabela 7 Porcentagens de C, H e N para os complexos 1 – 3 via análise elementar.	97
Tabela 8 Concentração de níquel determinada por FAAS para os complexos 1 – 3	98
Tabela 9 Atribuições de bandas no IR para os complexos 1, 2 e 3	99
Tabela 10 Comprimentos de ligação selecionados para os complexos calculados e alguns dados cristalográficos para comparação.....	104
Tabela 11 Atribuições das bandas no infravermelho para os complexos 1 – 3 (experimental e calculado).	106
Tabela 12 Dados de espectroscopia eletrônica dos complexos 1 – 3	107
Tabela 13 Resultados da condutividade molar para os complexos 1, 2 e 3 em CH_3CN	114
Tabela 14 Dados eletroquímicos para os complexos 1 – 3 , a $25\text{ }^\circ\text{C}$	121
Tabela 16 Valores das constantes de desprotonação para os complexos 1 – 3	125
Tabela 17 Parâmetros cinéticos obtidos para os complexos 1 – 3 na reação de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP, e de outros complexos para comparação.	137
Tabela 18 Parâmetros cinéticos obtidos para os complexos 1 – 3 frente à reação de hidrólise do substrato 2,4-DNPP.	140
Tabela 19 Parâmetros de ativação para a hidrólise do 2,4-BDNPP.	144

Tabela 20	Concentrações inibitórias e concentrações bactericidas mínimas dos complexos 1 – 3 em pH 7,20.....	148
Tabela 21	Dados de excitação de TD-DFT/TDA para os complexos 1 – 3	166
Tabela 22	Parâmetros cinéticos para o complexo 1 na hidrólise do 2,4-BDNPP em valores de pH entre 5,00 e 9,50.	167
Tabela 23	Parâmetros cinéticos para o complexo 2 na hidrólise do 2,4-BDNPP em valores de pH entre 5,00 e 9,00.	167
Tabela 24	Parâmetros cinéticos para o complexo 3 na hidrólise do 2,4-BDNPP em valores de pH entre 5,00 e 9,50.	168
Tabela 25	Coordenadas cartesianas calculadas para o complexo 1	169
Tabela 26	Coordenadas cartesianas calculadas para o complexo 2	172
Tabela 27	Coordenadas cartesianas calculadas para o complexo 3	175

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-BDNPP	bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato de piridínio
2,4-DNPP	2,4-dinitrofenilfosfato
2,4-DNP	2,4-dinitrofenolato
ATR	Reflectância total atenuada, do inglês, <i>attenuated total reflectance</i>
ϵ	Coefficiente de absorção
δ	Deformação angular no infravermelho
ν	Estiramento no infravermelho
δ	Deslocamento químico na ressonância magnética nuclear
λ	Comprimento de onda
Å	Ångström
AcOEt	Acetato de etila
CHES	Ácido 2-[N-cicloexilamino]etanossulfônico
Cmff	3-(clorometil)2-hidroxi-5-metilbenzaldeído
DFT	Teoria do funcional da densidade
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
$E_{1/2}$	Potencial de meia onda
E_a	Energia de ativação
EROs	Espécies reativas de oxigênio
E_p	Potencial de pico
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
ESI-MS	Espectrometria de massa por ionização via eletrospray, do inglês <i>electrospray ionisation mass spectrometry</i>
Et_3N	Trietilamina
EtOH	Etanol

f	Fator catalítico
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
H ₂ LEt	2-[(<i>N</i> -benzil- <i>N</i> -2-piridilmetilamina)]-4-metil-6-[<i>N</i> -(2-piridilmetil)aminometil)]-6-((2-aminoetil)amino)metilfenol
H ₂ LProp	2-[(<i>N</i> -benzil- <i>N</i> -2-piridilmetilamina)]-4-metil-6-[<i>N</i> -(2-piridilmetil)aminometil)]-6-((2-aminopropil)amino) metilfenol
H ₂ LBut	2-[(<i>N</i> -benzil- <i>N</i> -2-piridilmetilamina)]-4-metil-6-[<i>N</i> -(2-piridilmetil)aminometil)] 6-((2-aminobutil)amino)metilfenol
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazino]-etanossulfônico
I	Força iônica
I%	Intensidade relativa
IR	Infravermelho, do inglês <i>infrared</i>
K_{ass}	Constante de associação
k_{cat}	Constante catalítica
K_M	Constante de Michaelis-Menten
k_{obs}	Constante observada
k_{unc}	Constante da reação não catalisada
MBC	Concentração bactericida mínima, do inglês <i>minimum bactericidal concentration</i>
MeOH	Metanol
MES	Ácido 2-[<i>N</i> -morfolino]etanossulfônico
MIC	Concentração inibitória mínima, do inglês <i>minimum inhibitory concentration</i>
NHE	Eletrodo normal de hidrogênio, do inglês <i>normal hydrogen electrode</i>
NMR	Ressonância magnética nuclear, do inglês <i>nuclear magnetic resonance</i>
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PAPs	Fosfatases ácidas púrpuras, do inglês, <i>purple acid phosphatases</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina
T%	Transmitância
TD-DFT	Teoria do funcional da densidade dependente do tempo com aproximação Tamm-Dancoff
TMS	Tetrametilsilano
TRIS	Tris(hidróximetil)aminometano
UV-Vis	Ultravioleta-visível
v_0	Velocidade inicial
$V_{máx}$	Velocidade máxima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1	METALOENZIMAS	29
2.1.1	Metalohidrolases	30
2.1.2	Fosfohidrolases	32
2.2	COMPOSTOS MODELO.....	35
2.2.1	Complexos biomiméticos de Ni^{II}	38
2.3	SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO.....	40
2.4	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	43
2.4.1	Um breve histórico	44
2.4.2	Compostos metálicos com atividade antibacteriana	46
2.5	JUSTIFICATIVA DESTE TRABALHO.....	47
3	OBJETIVOS	50
3.1	OBJETIVO GERAL.....	50
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	51
4.1	MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO.....	51
4.1.1	Análise elementar de CHN	51
4.1.2	Absorção atômica	51
4.1.3	Espectroscopia na região do infravermelho (IR)	51
4.1.4	Cálculos de estrutura eletrônica	52
4.1.5	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio ¹H NMR e de carbono ¹³C NMR	52
4.1.6	Espectroscopia eletrônica	53
4.1.7	Condutividade Molar	53
4.1.8	Espectrometria de massas	53
4.1.9	Eletroquímica	54

4.1.10	Titulação Potenciométrica	54
4.1.11	Avaliação da atividade catalítica frente à reação de hidrólise do substrato modelo bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato de piridínio – 2,4-BDNPP	55
4.1.11.1	Efeito do pH na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP	56
4.1.11.2	Efeito da concentração do substrato na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP 56	
4.1.12	Testes biológicos	57
4.1.12.1	Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima	57
4.2	Materiais	59
4.3	síntese e caracterização	61
4.3.1	Síntese e caracterização dos ligantes	61
4.3.1.1	Síntese do cmff – 3-(clorometil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído	61
4.3.1.2	Síntese do bpa – <i>N</i> -benzil- <i>N</i> -2-piridilmetilamina	62
4.3.1.3	Síntese do bpamff – 3-(<i>N</i> -benzil- <i>N</i> -2-piridilmetilamina)-5-metil-2-hidroxibenzaldeído	65
4.3.1.4	Síntese do bpapyff – 2-[(<i>N</i> -benzil- <i>N</i> -2-piridilmetilamina)]-4-metil-6-[<i>N</i> -(2-piridilmetil)aminometil)]fenol	67
4.3.1.5	Síntese do H ₂ bppamff – 2-[(<i>N</i> -benzil- <i>N</i> -2-piridilmetilamina)]-4-metil-6-[<i>N</i> -(2-piridilmetil)aminometil)]-4-metil-6-formilfenol	69
4.3.1.6	Síntese do H ₂ LEt – 2-[(<i>N</i> -benzil- <i>N</i> -2-piridilmetilamina)]-4-metil-6-[<i>N</i> -(2-piridilmetil)aminometil)]-6-((2-aminoetil)amino)metilfenol	72
4.3.1.7	Síntese do H ₂ LProp – 2-[(<i>N</i> -benzil- <i>N</i> -2-piridilmetilamina)]-4-metil-6-[<i>N</i> -(2-piridilmetil)aminometil)]-6-((2-aminopropil)amino)metilfenol	76
4.3.1.8	Síntese do H ₂ LBut – 2-[(<i>N</i> -benzil- <i>N</i> -2-piridilmetilamina)]-4-metil-6-[<i>N</i> -(2-piridilmetil)aminometil)]-6-((2-aminobutil)amino)metilfenol	80
4.3.2	Síntese dos complexos	84
4.3.2.1	Síntese do complexo [Ni ₂ (H ₂ LEt)(μ-OAc) ₂ (H ₂ O)](ClO ₄)(BPh ₄) (1)	84
4.3.2.2	Síntese do complexo [Ni ₂ (H ₂ LProp)(μ-OAc) ₂ (H ₂ O)](ClO ₄) ₂ (2)	84

4.3.2.3	Síntese do complexo $[\text{Ni}_2(\text{LBut})(\mu\text{-OAc})_2(\text{H}_2\text{O})] \cdot (\text{HCl})_2$ (3).....	85
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	86
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES	86
5.1.1	Análise elementar de C, H e N	86
5.1.2	Espectroscopia no infravermelho (IR)	87
5.1.3	Ressonância magnética nuclear de ^1H NMR e ^{13}C NMR	90
5.1.4	Espectrometria de massas	93
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS	96
5.2.1	Análise elementar de CHN	97
5.2.2	Absorção atômica	97
5.2.3	Espectroscopia no infravermelho – IR.....	98
5.2.4	Cálculos de estrutura eletrônica	102
5.2.5	Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível.....	106
5.2.6	Condutividade molar.....	113
5.2.7	Espectrometria de massas	114
5.2.8	Eletroquímica.....	119
5.2.9	Titulação potenciométrica	124
5.2.10	Medidas de reatividade na atividade de hidrólise do substrato modelo bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato de piridinium – 2,4-BDNPP	129
5.2.10.1	Efeito do pH na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP	130
5.2.10.2	Efeito da concentração do substrato na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP 136	
5.2.10.3	Estudos de atividade de monoesterase para os complexos 1 – 3	139
5.2.10.4	Estudos visando a proposta de um mecanismo de ação para os complexos 1 – 3	142
5.2.10.4.1	<i>Efeito da temperatura sobre a velocidade de hidrólise do 2,4-BDNPP</i>	143
5.2.10.5	Mecanismo de reação proposto para a hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelos complexos 1 – 3	145

5.2.11	Atividade antibacteriana	147
6	CONCLUSÕES	149
	REFERÊNCIAS	151
	APÊNDICE A – Dados de TD-DFT/TDA para os complexos 1 – 3	166
	Apêndice B – Parâmetros cinéticos em vários valores de pH para os complexos 1 – 3	167
	Apêndice C - Coordenadas cartesianas calculadas para os complexos 1 – 3	169

1 INTRODUÇÃO

A química, como toda ciência, evoluiu através de experimentos e teorias, buscando incessantemente sanar as necessidades da sociedade como um todo, não só ao tentar entender como a matéria interage entre si, mas principalmente, ao utilizar tais interações a seu favor.

A química está presente em cada aspecto da nossa vida, somos movidos através de diversas reações químicas que nos permitem respirar, andar, pensar, comer; que nos permitem raciocinar e nos reproduzir, que permitem que nossos genes – aquilo de mais valioso que temos a oferecer para que possamos continuar evoluindo como espécie – sejam replicados e que nossa bagagem genética possa ser passada de geração em geração.

Por esse motivo, é natural que os químicos tenham voltado seu interesse não só em melhorar as condições de vida dos seres humanos, como também em tentar entender como tais reações se desenvolvem, o efeito que produzem em nosso organismo, e assim, encontrar uma maneira de usar tal entendimento em favor da sociedade como um todo. Um exemplo é o estudo de novos fármacos, os quais são utilizados para tratar os mais variados tipos de enfermidades que afligem o ser humano, como o câncer, Alzheimer, osteoporose, entre outras.

Para garantir o bom funcionamento do organismo é necessário que as reações metabólicas ocorram de maneira rápida econômica e eficaz, uma vez que qualquer impedimento ou subproduto indesejado pode levar ao mau funcionamento da célula e o desenvolvimento de doenças, como as exemplificadas acima. Deste modo, o metabolismo utiliza de catalisadores naturais, denominados enzimas, para garantir que a célula funcione de forma eficiente.

Enzimas, com exceção das Ribozimas e DNA catalítico, são macromoléculas que possuem em sua estrutura aminoácidos ligados através de ligações peptídicas, estão presentes em todos os organismos vivos e possuem como principal característica a capacidade de acelerar reações químicas. Quase um terço de todas as enzimas conhecidas requer a presença de íons metálicos para sua atividade catalítica, sendo assim denominadas de metaloenzimas. As metaloenzimas consistem tipicamente de um sítio ativo relativamente pequeno contendo um ou mais íons

metálicos, sendo este cercado por uma esfera de coordenação exterior, a qual é composta de aminoácidos existentes no esqueleto proteico. Dentre a vasta gama de metaloenzimas existentes, as hidrolases, que têm como função hidrolisar uma série de ligações químicas – como as ligações fosfodiéster presentes na estrutura do DNA – têm sido alvo de estudo de vários grupos de pesquisa nos últimos anos. Nesse ínterim, a utilização de compostos modelo capazes de mimetizar o sítio ativo de metaloenzimas responsáveis pela hidrólise de ligações P-O tem como objetivo não só elucidar a estrutura e mecanismo de ação destas enzimas, como também a utilização dos mesmos no desenvolvimento de novos fármacos, que possam ser empregados no combate à diversas doenças, podendo agir também como agentes antibacterianos e antifúngicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

“The specificity of an enzyme (the lock) for its substrate (the key) arises from their geometrically complementary shapes.”

Emil Fischer, 1894 – in his lock-and-key- hypothesis

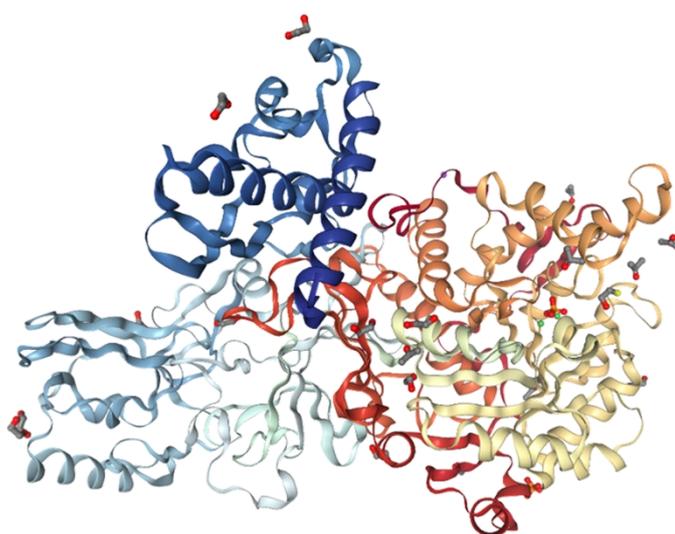
O organismo de qualquer ser vivo é mantido por meio de diversas reações químicas, que tem como finalidade promover o seu desenvolvimento, crescimento, manutenção e reprodução. Esse conjunto de reações químicas é denominado metabolismo, e uma de suas principais funções é a conversão de nutrientes em energia necessária para executar os diversos processos celulares. Para que os organismos sejam capazes de operar eficientemente é necessário que essas reações químicas ocorram rapidamente e de maneira eficaz, uma vez que qualquer impedimento ou subproduto indesejado pode levar ao mau funcionamento da célula, o que pode causar o desenvolvimento de doenças. Assim, o metabolismo nos seres vivos utiliza catalisadores naturais para garantir que a célula possa funcionar normalmente – as enzimas (Voet, D., Voet, J. G., 2010).

Praticamente todos os processos biológicos necessários para o funcionamento e manutenção dos seres vivos são mediados por enzimas, as quais após diversos processos de seleção natural e evolução dos organismos vivos, desenvolveram três importantes características que as diferenciam dos demais catalisadores (Voet, D., Voet, J. G., 2010; Dürrenberger, M., Ward, T. R., 2014):

- I. As velocidades das reações catalisadas por enzimas são tipicamente de 10^6 a 10^{12} vezes mais rápidas do que as reações correspondentes não catalisadas.
- II. Reações catalisadas por enzimas geralmente ocorrem sob condições relativamente brandas de temperatura e pressão.
- III. Enzimas possuem um elevado grau de especificidade de reação com relação a substrato e produto se comparado com outros catalisadores, isto é, reações enzimáticas raramente produzem subprodutos.

Apesar de seu papel vital nos processos metabólicos, a descoberta da existência de substâncias capazes de agir como catalisadores nos organismos vivos se deu somente no final do século XIX, em meio a pesquisas acerca de fermentação e digestão, sendo que muito pouco se sabia a respeito dessas macromoléculas, como sua estrutura e composição química. Foi somente em 1926, quando James Sumner resolveu pela primeira vez a estrutura cristalina de uma enzima – a urease do feijão-de-porco (Figura 1) – que sua estrutura proteica foi descoberta (Voet, D., Voet, J. G., 2010).

Figura 1 Representação de uma unidade da enzima urease do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*).



Fonte: Begum, A., Banumathi, S., Choudhary, M. I., Betzel, C., 2012; disponível em [protein data bank - 4GY7](https://www.rcsb.org/structure/4GY7). Rose A. S., Bradley, A. R., Valasatava, Y., Duarte, J. M., Prlić, A., Rose, P. W., 2018.

Hoje sabe-se que enzimas são geralmente proteínas – com exceção do DNA catalítico e RNA catalítico – possuem estruturas complexas e agem através de uma variada gama de forças intermoleculares presentes nos grupos funcionais que constituem seu sítio ativo, de modo que seu arranjo espacial e reatividade permitam a interação com um determinado substrato a uma orientação ótima para que a reação de catálise ocorra, baixando a barreira de energia de ativação da reação, e assim aumentando a sua velocidade (Cox, M. M., Nelson, D. L., 2011; Berg, J. M. *et al*, 2002).

Enquanto algumas enzimas não necessitam de outros grupos químicos para sua atividade catalítica além dos resíduos de aminoácidos que constituem sua estrutura, outras requerem a presença de um componente químico adicional denominado “cofator”, que podem ser um ou mais íons metálicos como Fe^{II} , Mg^{II} , Ni^{II} ,

Cu^{II} ou Zn^{II} ou uma molécula orgânica ou metalorgânica complexa, denominada coenzima. Quase um terço de todas as enzimas conhecidas requer a presença de íons metálicos para sua atividade catalítica e por isso são chamadas de metaloenzimas (Cox, M. M., Nelson, D. L., 2011; Lippard, S. J., Berg, J. M., 1994; Pratt, C. W., *et al*, 2008; Mitić, N. *et al*, 2014).

2.1 METALOENZIMAS

As metaloenzimas pertencem a uma subclasse das metaloproteínas e consistem tipicamente de um sítio ativo relativamente pequeno contendo um ou mais íons metálicos, estes encontram-se cercados por uma esfera de coordenação exterior, a qual é composta de aminoácidos presentes no esqueleto proteico (Ginovska-Pangovska, B. *et al.*, 2014).

O papel dos íons metálicos nas metaloproteínas geralmente pode ser dividido em duas categorias: estrutural e funcional. Íons metálicos que desempenham um papel estrutural são necessários para que a proteína se dobre de maneira apropriada. Um exemplo são as *zinc finger proteins* (proteínas dedo de zinco), em que o íon Zn^{II} tem como função transformar um polipeptídeo não estruturado em um domínio proteico adequadamente dobrado, capaz de se ligar como ácido nucleico-proteína ou proteína-proteína. Íons metálicos funcionais são encontrados no sítio ativo de metaloenzimas, sendo responsáveis por vários processos como transferência eletrônica, reconhecimento/ligação com o substrato e atividade catalítica. Quando um íon metálico funcional auxilia na catálise, a metaloproteína é denominada de metaloenzima (Laity, J. H., *et al.*, 2001; Solomon, E. I., *et al.*, 2014; Chen, A. Y., *et al.*, 2019).

Dentre os centros metálicos presentes nas metaloenzimas, os metais de transição são de especial relevância devido à sua atividade redox e à sua elevada densidade de carga, que permite a polarização dos substratos. Os íons metálicos participam dos processos catalíticos principalmente de três formas (Voet, D., Voet, J. G., 2010):

- I. Ligando-se ao substrato para orientá-lo de maneira apropriada para que a reação de catálise ocorra.

- II. Mediando reações de oxidação-redução através de mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico.
- III. Através da estabilização eletrostática ou protegendo cargas negativas.

Além disso, os íons metálicos agem como ácidos de Lewis e com isso tendem a aumentar a reatividade tanto do substrato quanto dos reagentes, e podem atuar tanto na estabilização do estado de transição da reação, quanto na estabilização do grupo de saída (Livieri, M. *et al.*, 2007).

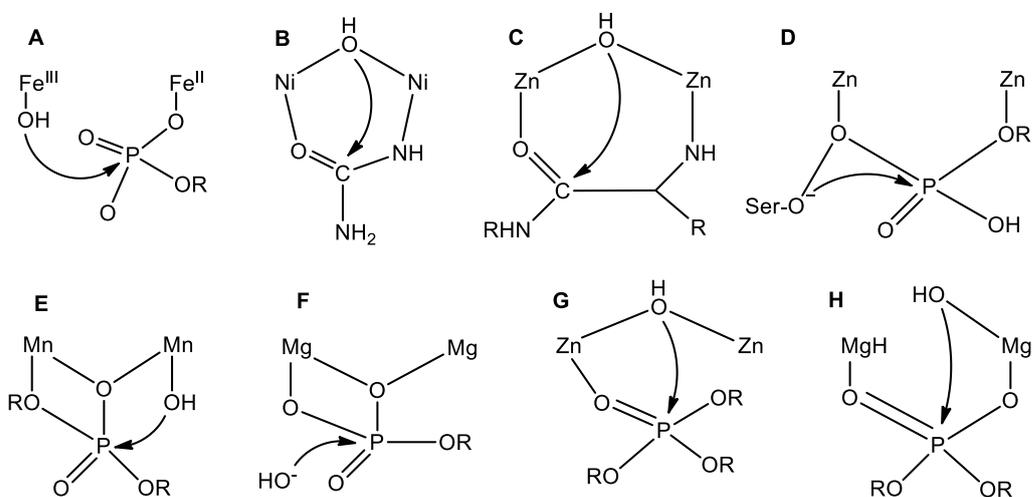
Dentre a vasta gama existente de enzimas encontram-se aquelas que tem como função hidrolisar uma série de ligações químicas, tais como: amidas, ésteres, éteres, nitrilas entre outras, sendo classificadas como hidrolases. As hidrolases catalisam a clivagem hidrolítica de ligações C-O, C-N, C-C, incluindo ligações anidrido fosfórico (Cox, M. M., Nelson, D. L., 2011).

2.1.1 Metalohidrolases

Hidrolases que possuem íons metálicos em seu sítio ativo (metalohidrolases) fazem parte de uma classe de enzimas que desempenham um papel central em inúmeros processos metabólicos, os quais incluem metabolismo energético, biossíntese e remodelação óssea. As metalohidrolases utilizam de uma variedade de estruturas, grupos funcionais e mecanismos para acelerar as reações de hidrólise. Metalohidrolases que possuem dois centros metálicos em seu sítio ativo são uma classe muito estudada de metaloenzimas, conhecidas como metalohidrolases binucleares e constituem um grupo estruturalmente diverso de enzimas capazes de hidrolisar amidas e ésteres de ácidos carboxílicos e fosfóricos (Mitić, N. *et al.*, 2006; Daumann, L. J. *et al.*, 2014; Selleck, C. *et al.*, 2017).

Apesar da versatilidade estrutural e de variações na especificidade dos íons metálicos, metalohidrolases binucleares empregam variantes de um mecanismo básico bastante similar, em que primeiro tem-se a coordenação do substrato a um dos centros metálicos, seguido do ataque de um nucleófilo, que pode estar ligado ao outro centro metálico, ou então formando uma ponte entre os dois metais, como pode ser visto na Figura 2 (Wilcox, D. E., 1996; Mitić, N. *et al.*, 2006; Schenk, G. *et al.*, 2012).

Figura 2 Diversidade de mecanismos propostos para metalohidrolases binucleares. (A) Fosfatase ácida púrpura, (B) urease, (C) leucina amino-peptidase, (D) fosfatase alcalina, (E) 3'-5' exonuclease, (F) inositol monofosfatase, (G) fosfotriesterase, e (H) Eco RV endonuclease.

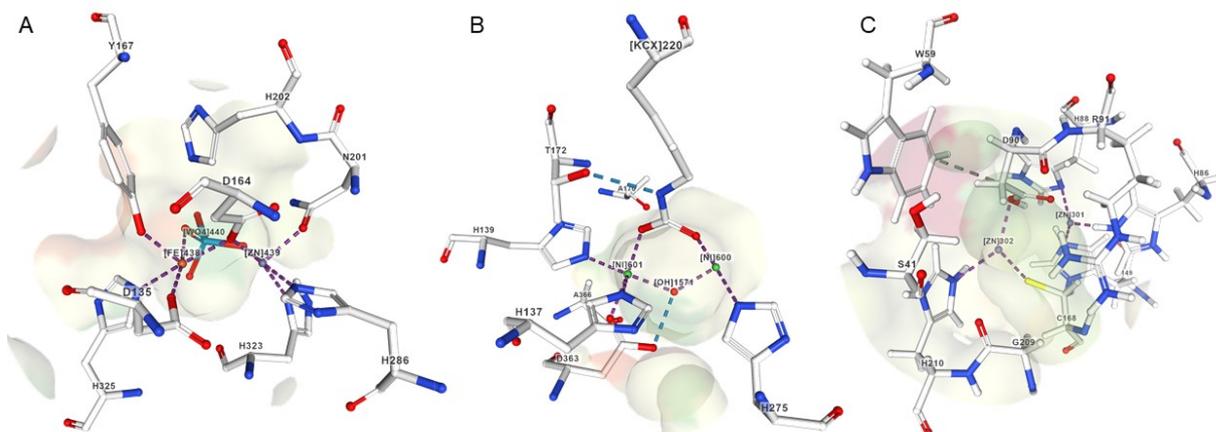


Fonte: Adaptado de Mitić, N. *et al.*, 2006.

Outra característica partilhada por estas enzimas reside na primeira esfera de coordenação, que apresenta similaridades em toda a família destas metaloenzimas, como a presença de resíduos de histidina, lisina e aspartato, além de água/hidróxido terminal ou ligado em ponte, como ilustrado na Figura 3. Porém, nos modelos propostos para catálise, a identidade do nucleófilo, a estabilização dos intermediários de reação e a contribuição relativa dos íons metálicos podem variar substancialmente (Wilcox, D. E., 1996; Mitić, N. *et al.*, 2006; Schenk, G. *et al.*, 2012; Daumann, L. J. *et al.*, 2014).

Assim, a presença de dois centros metálicos traz diversas vantagens para a catálise enzimática, incluindo a diminuição da força motriz para reações redox devido à deslocalização da carga, o abaixamento da barreira de ativação para a reorganização de solventes e enzimas, além de uma orientação mais efetiva do substrato, facilitando o alcance da ativação eletrostática do mesmo (Daumann, L. J. *et al.*, 2014; Mitić, N. *et al.*, 2014; Zhao, M. *et al.*, 2015).

Figura 3 Primeira esfera de coordenação e diferentes íons metálicos de algumas metalohidrolases binucleares. (A) Fosfatase ácida purpura contendo íons $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Zn}^{\text{II}}$; (B) Urease da *Sporosarcina pasteurii* (SPU) contendo dois íons $\text{Ni}^{\text{II}}/\text{Ni}^{\text{II}}$; (C) Metalo- β -Lactamase do *Bacillus cereus* contendo dois íons $\text{Zn}^{\text{II}}/\text{Zn}^{\text{II}}$.



Fonte: A) Kidney bean purple acid phosphatase (Klabunde, T. *et al.*, 1996 – PDB entry: [3KBP](#)); B) Native *Sporosarcina pasteurii* urease (Benini, S., Cianci, M., Ciurli, S., 2014 – PDB entry: [4CEU](#)); C) *Bacillus cereus* metalo- β -lactamase (Karsisiotis, A. I., Damblon, C. F., Roberts, G. C. K., 2013 – PDB entry: [2M5C](#)); Rose, A. S. *et al.*, 2018.

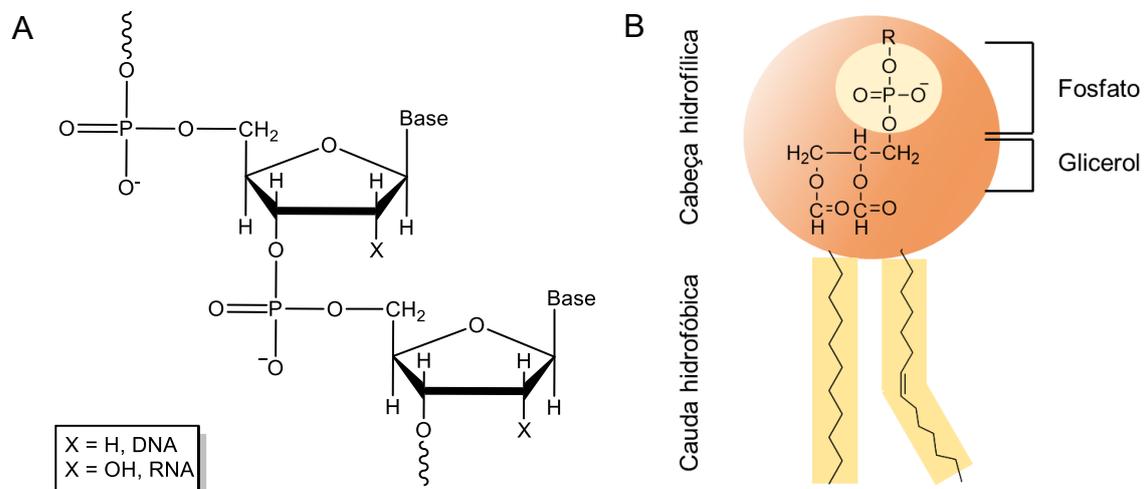
Deste modo, a versatilidade de íons metálicos, mecanismos propostos, nucleófilos e substratos utilizados faz com que metalohidrolases tenham relevância em várias áreas, como biotecnologia (nucleases), remediação ambiental (fosfoesterases) e medicina (metalo- β -lactamases) (Dalle, K. E., Meyer, F., 2015). Como exemplo, podemos citar ainda as fosfohidrolases, enzimas capazes de hidrolisar ligações P-O de fosfomono-, di- ou triésteres e que desempenham um papel importante em diversos processos biológicos, o que as torna alvo de estudos na elaboração de agentes terapêuticos contra uma variedade de doenças, como osteoporose, câncer, resistência a antibióticos e biorremediação (Erxleben, A., 2019; Daumann, L. J. *et al.*, 2014; Schenk, G. *et al.*, 2012).

2.1.2 Fosfohidrolases

Ésteres de fosfato compõem a estrutura dos ácidos desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA), em que se apresentam na forma de diésteres de fosfato, ligando as unidades de nucleotídeos nestes polímeros, como pode ser visto na Figura 4A. Além disso, compõem a “cabeça” do grupo hidrofílico de fosfolipídios (um dos principais componentes das membranas celulares) (Figura 4B), e são também encontrados em várias moléculas pequenas que estão envolvidas no processo metabólico, como ATP, coenzima A e cAMP (Cox, M. M., Nelson, D. L., 2011; Xavier,

F. R., Neves, A., 2016). Diversos destes processos metabólicos envolvem a clivagem hidrolítica das ligações ésteres de fosfato, como bio-sinalização e o reparo de DNA, além de desempenhar um papel relevante na decomposição do material ósseo pelos osteoclastos em mamíferos, e na absorção e mobilização de fósforo nas plantas (Desbois, D., *et al.*, 2012; Xavier, F. R., Neves, A., 2016; Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., 2010; Erxleben, A., 2019).

Figura 4 A) Ligações fosfodiéster presentes nas moléculas de DNA e RNA. B) Grupo éster de fosfato presente em fosfolípidios de membranas plasmáticas.



Fonte: A) Adaptado de Hegg, E., Burstyn, N. J., 1998. B) Adaptado de Rye, C. *et al.*, 2017.

Um dos motivos pelos quais ésteres de fosfato são tão eficazes como parte da composição do esqueleto de moléculas como o DNA é que sob condições fisiológicas as ligações P-O são altamente resistentes à hidrólise, ou seja, a hidrólise não catalisada destas ligações é termodinamicamente favorecida e cineticamente muito vagarosa. Estudos estimam que a meia vida das ligações fosfodiéster presentes no DNA é de centenas a milhares de milhões de anos (Williams, N. II. *et al.*, 1999; Schroeder, G. K. *et al.*, 2006; Erxleben, A., 2019). No entanto, algumas enzimas evoluíram de modo que a hidrólise destas ligações pudesse ser catalisada, deste modo levando de segundos a minutos para ocorrer (Erxleben, A., 2019).

Enzimas capazes de clivar ligações ésteres de fosfato de maneira hidrolítica são conhecidas como fosfodiolases, entre elas estão as nucleases, também conhecidas como fosfodiesterases, que são capazes de acelerar a velocidade de hidrólise de ligações P – O específicas por fatores de 10^{15} vezes se comparado com

a reação não catalisada. O sítio ativo da maioria das nucleases contém cátions divalentes, tais quais Mg^{II} , Ca^{II} , Mn^{II} ou Zn^{II} , no entanto, a necessidade exata do tipo e do número de íons metálicos varia consideravelmente de uma nuclease para outra. O papel biológico destas inclui a degradação ou digestão de polímeros, modificação de ácidos nucleicos, defesa viral, além de possuir um papel fundamental no reparo do DNA, cuja manutenção estrutural é de grande relevância para uma atividade celular correta e também para a transmissão de genoma de uma célula para sua prole (Hegg, E. L., Burstyn, J. N., 1998; Desboius, D. *et al.*, 2012; Piovezan, C. *et al.*, 2012).

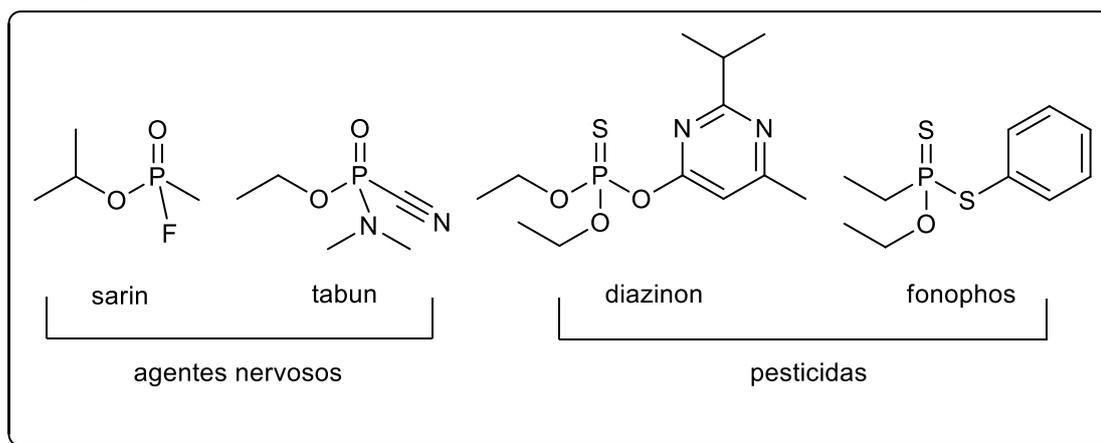
Outro exemplo de metaloenzimas são as fosfatases ácidas púrpuras (PAPs). Estas enzimas catalisam a hidrólise de ésteres de fosfato em valores de pH ácidos (pH ótimo de 4,9 a 6,0), estão presentes tanto em plantas quanto em animais e é sugerido que estejam envolvidas no transporte de ferro, na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) como resposta imune, no metabolismo energético e na reabsorção óssea (Wilcox, D. E., 1996; Schenk, G. *et al.*, 2012). As PAPs são as únicas metalohidrolases conhecidas que necessitam de um centro metálico dinuclear heterovalente na forma de $Fe^{III}-M^{II}$ (em que $M = Fe, Zn$ ou Mn) para que sejam cataliticamente ativas. Uma característica das PAPs é sua cor púrpura, resultado de uma transferência de carga entre um resíduo de aminoácido tirosina e o centro de Fe^{III} , presentes no sítio ativo da enzima (ver Figura 3, seção 2.2.1) (Wilcox, D. E., 1996; Schenk, G. *et al.*, 2012; Selleck, C. *et al.*, 2017).

Ésteres de fosfato estão presentes também na estrutura de diversos agentes neurotóxicos e defensivos agrícolas (Figura 5), e o uso extensivo destes compostos nas últimas décadas fez com que algumas enzimas aparentemente evoluíssem de modo recente, adquirindo a capacidade de degradar compostos organofosforados, como a enzima OpdA (*organophosphatedegrading agent*), presente na bactéria *Agrobacterium radiobacter*, e a GpdQ (*glycerophosphodiesterase*), presente na *Enterobacter aerogenes*. Foi proposto que estas enzimas fornecem nutrientes essenciais às bactérias que vivem no solo, como fosfato, ao hidrolisar os defensivos agrícolas (Daumann, L. J. *et al.*, 2014).

O substrato natural das GpdQ é o glicerol fosfoetanolamina, no entanto, estas enzimas exibem promiscuidade catalítica e são capazes de hidrolisar substratos que não são naturais à sua atuação, como fosfo-mono-, di- e triésteres, como nitrofenil fosfato, bis-(4-nitrofenil)fosfato e 4-nitrofenilfosfato numa ampla faixa de pH. Como os

substratos das GpdQ incluem vários defensivos agrícolas e agentes neurotóxicos organofosforados como sarin, demeton e VX, esta enzima possui um potencial considerável para ser utilizado em biorremediação e como agente antiguerra (Hadler, K. S. *et al.*, 2010; Daumann, L. J. *et al.*, 2014; Sharma, G. *et al.*, 2019; Sharma, G. *et al.*, 2020).

Figura 5 Alguns compostos organofosforados utilizados como defensivos agrícolas e agentes neurotóxicos.



Fonte: Adaptado de Daumann, L. J. *et al.*, 2014.

Tendo em vista a importância destas enzimas tanto no que concerne à saúde, funcionamento e manutenção dos organismos vivos, quanto à sua atuação no meio ambiente, diversos grupos de pesquisa voltaram sua atenção para o estudo das propriedades físico-químicas e mecanismos de catálise destas, e de outras metalohidrolases. No entanto, devido ao alto custo e à dificuldade de se isolar e cristalizar enzimas em geral, uma alternativa encontrada pelos pesquisadores foi a utilização de compostos sintéticos que, na sua elaboração, possuam grupos funcionais e íons metálicos na sua estrutura que sejam capazes de mimetizar características físico-químicas e espectroscópicas das metaloenzimas de interesse.

2.2 COMPOSTOS MODELO

Devido à sua extraordinária eficiência catalítica e seu alto grau de especificidade, diversos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de se explicar as altas velocidades de catálise das metaloenzimas no metabolismo. No entanto, devido à alta complexidade estrutural destas biomoléculas, o entendimento aprofundado de sua eficiência catalítica tem sido um grande desafio. Uma alternativa

é a síntese de compostos de baixa massa molecular que apresentem semelhanças com as metaloenzimas de interesse, sendo estes denominados de compostos biomiméticos ou compostos modelo (Berg, J. M. *et al.*, 2002).

O termo biomimético refere-se a compostos que sejam capazes de mimetizar propriedades estruturais, funcionais e/ou espectroscópicas de uma determinada enzima, levando a um entendimento das reações enzimáticas. Geralmente poucos aspectos são alcançados em um sistema modelo, além de apresentarem uma atividade catalítica substancialmente baixa quando comparada com a da enzima (Gahan, L. R. *et al.*, 2009; Daumann, L. J. *et al.*, 2014).

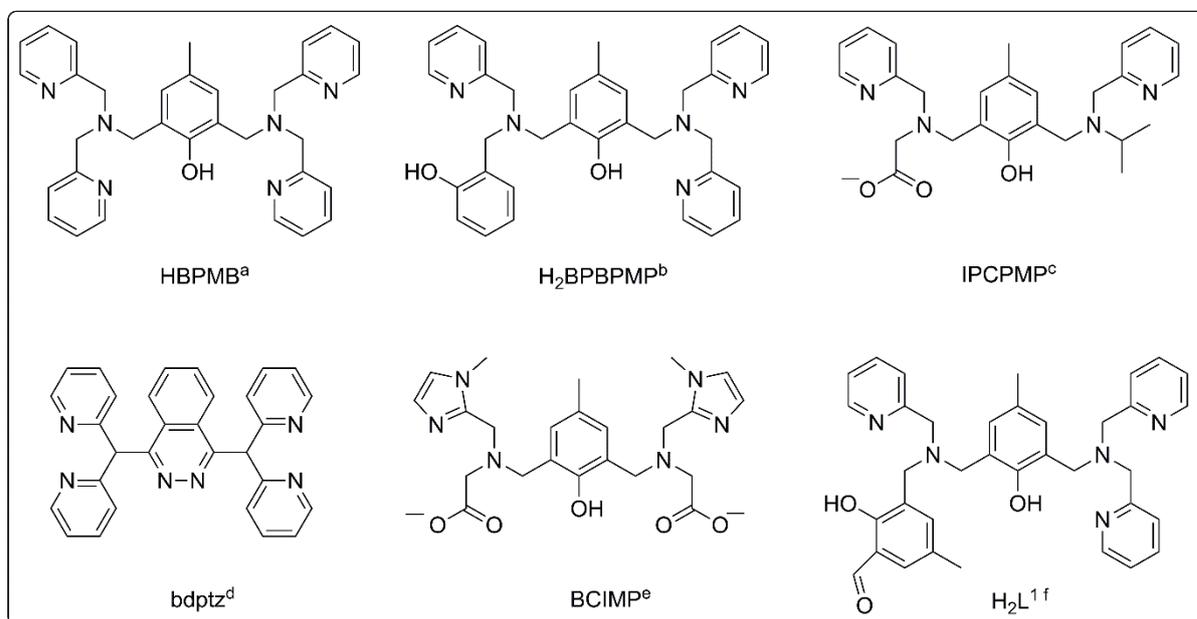
No entanto, compostos modelo possuem certas vantagens com relações às enzimas, tendo em vista que tais complexos são geralmente mais estáveis que seu equivalente enzimático, podem ser rapidamente cristalizados, além de fornecer informações estruturais facilmente acessíveis sobre a coordenação do íon metálico (Daumann, L. J. *et al.*, 2014).

Além disso, compostos modelo são consideravelmente menos complexos, o que reflete em uma análise de dados cinéticos e espectroscópicos mais simplificada, podendo levar à elucidação do mecanismo de ação e de características estruturais, sendo estes posteriormente relacionados à metaloenzima de interesse (Gahan, L. R. *et al.*, 2009; Osório, R. E. *et al.*, 2012; Daumann, L. J. *et al.*, 2014).

O planejamento de ligantes e complexos em compostos modelo é diverso, mas normalmente segue alguns conceitos gerais: a) os íons metálicos empregados geralmente são os mesmos presentes nas enzimas de interesse, como por exemplo Ni^{II} para os modelos de ureases e Cu^{II} para as catecol oxidases; b) piridina, imidazol ou pirazol são geralmente utilizados para mimetizar os resíduos de histidina nas enzimas; fenol, carboxilato, pirazolato ou moléculas de água são utilizados para mimetizar resíduos de ponte, como aspartato, lisina ou água/hidroxo; e c) tipicamente são utilizados ligantes binucleantes para aproximar os dois centros metálicos (Gahan, L. R. *et al.*, 2009; Daumann, L. J. *et al.*, 2014).

Alguns ligantes binucleantes utilizados na síntese de miméticos para fosfohidrolases como PAPs, urease e fosfodiesterases estão apresentados na Figura 6 (Selmeczi, K., *et al.* 2007; Karsten, P. *et al.*, 2002; Jarenmark, M. *et al.*, 2010; Barrios, A. M., Lippard, S. J., 1999; Carlsson, H. *et al.*, 2004; Piovezan, C. *et al.*, 2010).

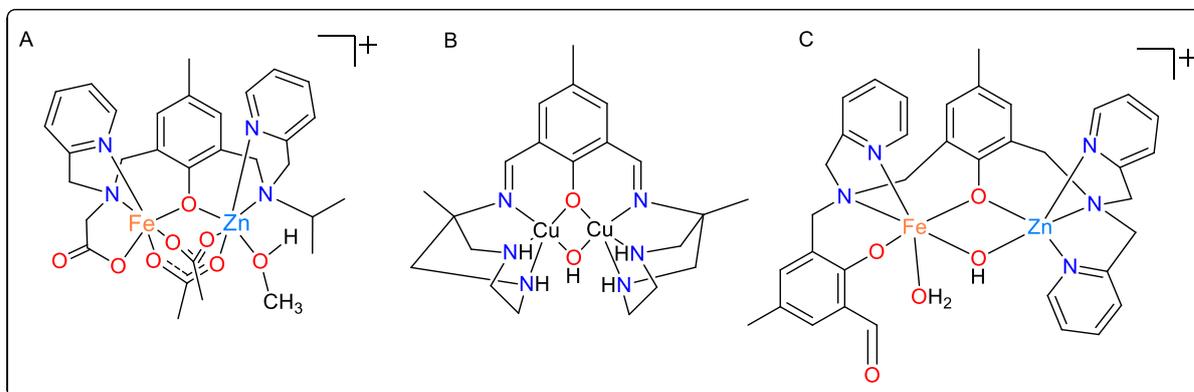
Figura 6 Alguns ligantes simétricos e não simétricos utilizados na síntese de compostos modelo para fosfohidrolases como PAPs ($H_2BPBPMP$, H_2L^1), urease (BCIMP, bdptz) e fosfodiesterases (HBPMB, IPCPMP).



Fonte: Adaptado de ^a Selmeczi, K. *et al.*, 2007; ^b Karsten, P. *et al.*, 2002; ^c Jarenmark, M. *et al.*, 2010; ^d Barrios, A. M., Lippard, S. J., 1999; ^e Carlsson, H., *et al.*, 2004; Jarenmark, M. *et al.*, 2010; ^f Piovezan, C. *et al.*, 2010.

Com o intuito de se obter compostos miméticos estruturalmente mais relevantes para metalohidrolases binucleares, nos últimos anos tem-se notado um aumento no número de ligantes não simétricos reportados na literatura, uma vez que estes ligantes são considerados mais adequados para se mimetizar o ambiente de coordenação não simétrico encontrado em diversas enzimas. Segundo Jarenmark *et al.*, complexos não simétricos são modelos funcionais não somente mais apropriados para o sítio ativo de fosfoesterases, como também exibem uma atividade catalítica mais elevada se comparado com seus análogos simétricos (Jarenmark, M. *et al.*, 2008; Jarenmark, M. *et al.*, 2010; Daumann, L. J. *et al.*, 2014). A Figura 7 traz alguns exemplos de complexos binucleares miméticos para hidrolases reportados na literatura.

Figura 7 Exemplos de complexos binucleares como modelo para hidrolases. A) Complexo de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$, modelo para hidrólise de fosfodiésteres; B) Complexo de Cu^{II} , modelo para hidrólise de fosfodiésteres e catecol oxidases; C) Complexo de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$, modelo para hidrólise de fosfodiésteres.



Fonte: Adaptado de A) Jarenmark, M. *et al.*, 2011; B) Esteves, L. F., Rey, N. A., Santos, H. F., Costa, L. A. S., 2016; C) Piovezan, C. *et al.*, 2010.

Além disso, do ponto de vista de aplicabilidade, compostos biomiméticos que sejam capazes de clivar ésteres de fosfato despertam interesse devido ao potencial que estes apresentam no desenvolvimento de agentes terapêuticos, que possam atuar como antitumorais, antivirais, antibacterianos, e como agentes em biorremediação.

2.2.1 Complexos biomiméticos de Ni^{II}

O níquel, assim como ferro, cobre, zinco e manganês é um elemento da primeira série de transição da tabela periódica. O níquel pode ser encontrado em vários estados de oxidação (de 0 a +4), sendo que o mais comum é o estado +2 ($3d^8$) (Ragsdale S. W., 2011).

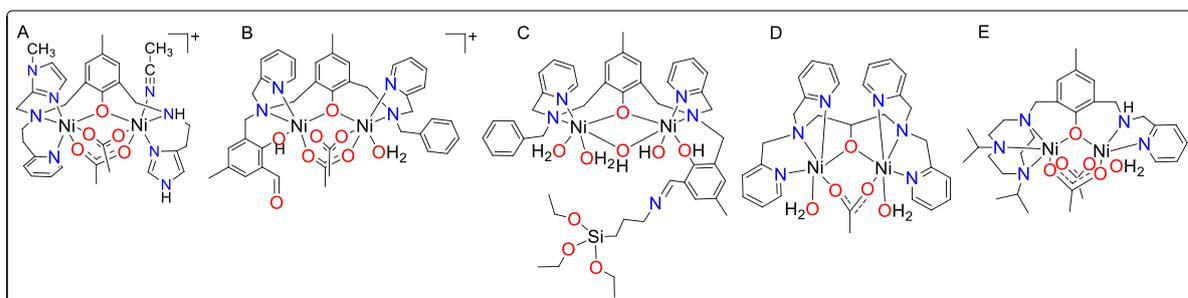
Até o presente momento, dez diferentes tipos de enzimas contendo níquel foram reportadas, possuindo diversas funções biológicas que incluem o uso e/ou produção de gases, reações de oxirredução, hidrólise, isomerização e racemização. Acredita-se que um dos motivos pelos quais o níquel está presente nestas enzimas é devido à flexibilidade que este apresenta na geometria de coordenação, uma vez que Ni^{II} pode adotar as geometrias de octaedro distorcido, octaedro tetragonalmente distorcido, quadrado-planar e tetraédrica (Ragsdale S. W., 2011). Dentre os estados de oxidação mais comuns do níquel, somente Ni^{I} , Ni^{II} e Ni^{III} estão envolvidos em sistemas biológicos, os quais encontram-se coordenados a grupos S-, N-, O-doadores e dentre as enzimas em que este se encontra presente, hidrolases como as

ureases utilizam somente Ni^{II} (Halcrow, M., Christou, G., 1994; Ragsdale, S. W., 1998; Ragsdale S. W., 2011; Siegbahn, P. E. M., Chen, S. L., Liao, R. Z., 2019).

Complexos de Ni^{II} geralmente são reportados na literatura como miméticos para a enzima urease, no entanto alguns complexos contendo Ni^{II} apresentam atividade catalítica significativa frente à hidrólise de ésteres de fosfato. A Figura 8 traz alguns exemplos destes compostos, como o complexo de Ni^{II} reportado por Greatti e colaboradores com um ligante não simétrico contendo uma unidade imidazol, que foi capaz de hidrolisar o substrato bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato de piridinium (2,4-BDNPP) aproximadamente um milhão de vezes mais rápido que a reação não catalisada (Greatti, A. *et al.*, 2008). Horn Jr. e colaboradores reportaram um complexo de Ni^{II} com um ligante contendo quatro unidades piridina e como mimético para fosfodiesterases, apresentando uma eficiência catalítica de 2,5 L mol⁻¹ s⁻¹ frente à hidrólise do substrato 2,4-BDNPP (Horn Jr., A. *et al.*, 2018). Também Xavier e Neves reportaram um complexo de Ni^{II}, mimético para fosfohidrolases, com um ligante não simétrico contendo o anel macrociclo triazaciclononano em sua estrutura, e apresentando um valor de eficiência catalítica de 3,70 L mol⁻¹ s⁻¹ frente à hidrólise do substrato 2,4-BDNPP (Xavier, F. R., Neves, A., 2016).

Outro exemplo é o complexo reportado por Piovezan e colaboradores, em que o ligante utilizado possui uma unidade aldeído em sua estrutura que foi utilizada para ancorar o complexo de Ni^{II} à sílica. O complexo ancorado à sílica foi capaz de catalisar a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP cem mil vezes mais rápido que a reação não catalisada, apresentando uma eficiência catalítica aproximadamente 2 vezes maior que a observada para o complexo não ancorado à sílica (Piovezan, C. *et al.*, 2012).

Figura 8 Compostos de Ni^{II} reportados na literatura com atividade de fosfodiesterase.



Fonte: Adaptado de: A) Greatti, A. *et al.*, 2008; B e C) Piovezan, C. *et al.*, 2012; D) Horn Jr., A. *et al.*, 2018; E) Xavier, F. R., Neves, A., 2016.

O complexo reportado por Piovezan (Figura 8C) é um exemplo de composto que tem como finalidade simular a chamada *segunda esfera de coordenação*, com o intuito de aprimorar a eficiência destes compostos ao adicionar em suas estruturas grupos que não estejam coordenados aos centros metálicos, mas que exercem um papel essencial na catálise promovida por metaloenzimas.

2.3 SEGUNDA ESFERA DE COORDENAÇÃO

Estudos no campo da engenharia de proteínas tem revelado que mutações em alguns resíduos de aminoácidos não coordenados ao centro metálico de algumas metaloenzimas levam a uma perda considerável na sua atividade ou seletividade. Com base nestes estudos e visando aprimorar cada vez mais a atividade de catálise de compostos modelo, os pesquisadores passaram a planejar compostos contendo grupos que possam mimetizar a função que alguns resíduos de aminoácidos exercem nas metaloenzimas. Os aminoácidos que não se encontram envolvidos diretamente na coordenação do metal, mas que são indispensáveis para a atividade enzimática recebem a denominação de “segunda esfera de coordenação”. O papel destes na atividade das enzimas está relacionado com interações não covalentes, tais como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, efeitos hidrofóbicos e forças de van der Waals (Chen, X. Q. *et al.* 2008; Zhao, M. *et al.*, 2013).

Alguns fatores que levam a participação de aminoácidos na segunda esfera de coordenação a auxiliar a reação de catálise são: a) a participação destes resíduos leva à ativação de espécies; b) substratos naturais como oxigênio molecular, peróxidos, peptídeos e ésteres de fosfato possuem estados de transição ricos em elétrons, já metaloenzimas possuem resíduos catiônicos, que se ligam fortemente a estes substratos no estado de transição, fazendo com que a barreira de ativação energética diminua consideravelmente, levando à estabilização do estado de transição; c) aumento de especificidade, uma vez que uma variedade de interações não covalentes faz com que o sítio ligante adote somente reagentes específicos, que possuam forma, quiralidade e perfil eletrônico específicos; d) promoção da liberação do produto. A natureza fraca e reversível das ligações não covalentes garante a restauração da segunda esfera de coordenação após um ciclo catalítico (Zhao, M. *et al.* 2013; Dalle, K. E., Meyer, F., 2015; Ginovska-Pangovska, B. *et al.*, 2014).

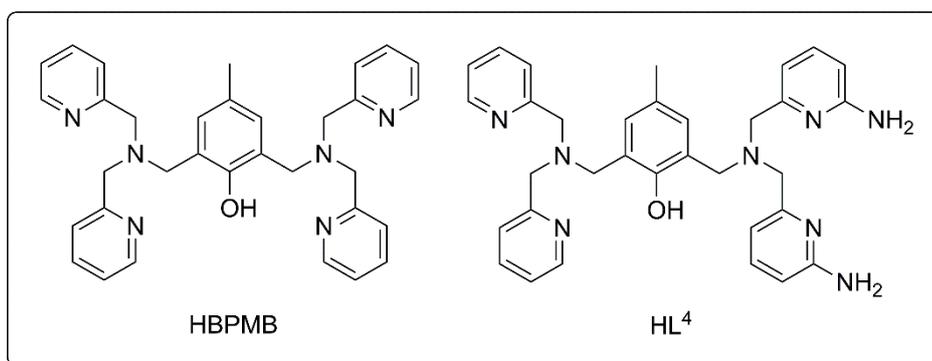
Uma das principais funções da segunda esfera de coordenação em metalohidrolases é a ativação do nucleófilo, sendo este efeito documentado em

diversos estudos. Assim, uma possibilidade é o uso de amins alifáticas no estudo de efeitos de segunda esfera de coordenação, uma vez que estas tendem a sofrer protonação quando em solução, tornando-se positivamente carregadas, o que lhes garante uma contribuição eletrostática (Zhao, M. *et al.*, 2013). Um fator observado por Wall *et al.* é a tendência de grupos contendo amins aromáticas em reduzir o valor de pK_a da molécula de água coordenada ao metal, devido à sua atuação como doador de ligação de hidrogênio (Wall, M. *et al.*, 1999). Também Mareque-Rivas e colaboradores observaram que os valores de pK_a dos nucleófilos tendem a diminuir quanto mais grupamentos amins atuam como doadores de ligações de hidrogênio (Mareque-Rivas, J. C., Prabakaran, R., De Rosales, R. T. M., 2004).

Uma vez que a influência dos íons metálicos e da primeira esfera de coordenação foi e tem sido estudada detalhadamente por diversos grupos de pesquisa e para várias metaloenzimas e seus compostos modelo, é natural que o próximo passo dado no objetivo de se compreender e mimetizar as propriedades catalíticas de metaloenzimas seja o estudo dos efeitos da segunda esfera de coordenação, incorporando aos ligantes já descritos na literatura grupos como amins, amidas e guanidina próximos ao centro metálico com o intuito de se mimetizar as ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas presentes nas metaloenzimas (Bosch, S., Comba, P., Gahan, L. R., Schenk, G., 2014).

Um exemplo é o estudo reportado por Bosch e colaboradores, que desenvolveram ligantes derivados dos já conhecidos HBPMP e H₂BPBPMP (ver Figura 6, seção 2.2) incorporando a estes grupos amina e pivaloilamido (Figura 9). O complexo de Zn(II) com o ligante HL⁴ contendo grupos amina (derivado do HBPMP) apresentou uma eficiência catalítica três vezes maior na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP se comparado ao complexo de Zn(II) com o ligante HBPMP (Bosch, S., Comba, P., Gahan, L. R., Schenk, G., 2014).

Figura 9 Ligante HBPMB e seu derivado HL⁴ contendo grupos amino.

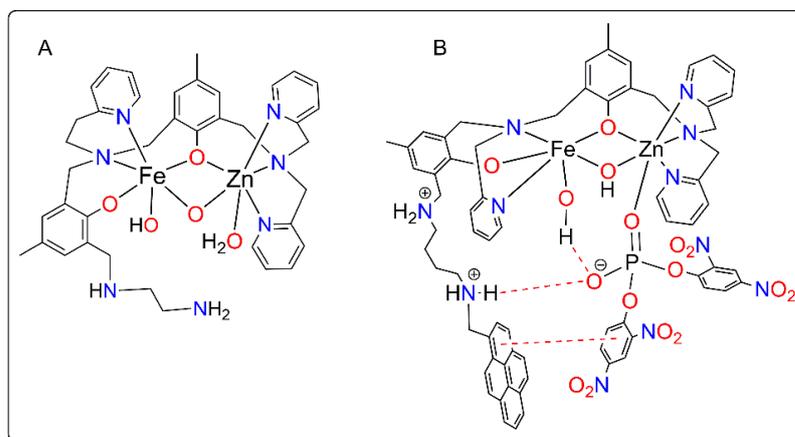


Fonte: Adaptado de Bosch, S., Comba, P., Gahan, L. R., Schenk, G., 2014.

Outro exemplo do efeito da segunda esfera de coordenação em compostos modelo foi reportado por Silva e colaboradores, que sintetizaram três complexos de Fe^{III}Zn^{II} como miméticos para as PAPs, um contendo uma unidade aldeído, o qual serviu para a derivatização deste ligante através da adição de grupos diamina na cadeia lateral (Figura 10A). O complexo contendo o grupo diamina apresentou um valor de k_{cat} 3,2 vezes maior que o complexo contendo a unidade aldeído e uma eficiência catalítica sete vezes maior que seu precursor. Segundo os autores, uma explicação para esses resultados seriam as interações eletrostáticas resultantes da protonação do grupo amino, que pode levar a uma maior afinidade com o substrato (Silva, G. A. S. *et al.*, 2017).

Camargo e colaboradores recentemente reportaram um complexo de Fe^{III}Zn^{II} contendo um grupo pireno incorporado à cadeia lateral do já conhecido ligante H₂L¹ (ver Figura 6, seção 2.2) através de espaçadores diamina. O complexo contendo a unidade pireno apresentou uma diminuição no valor de pK_a para molécula coordenada ao centro de ferro em aproximadamente uma unidade de pH se comparado ao complexo de Fe^{III}Zn^{II} contendo apenas a unidade aldeído, previamente reportado por Piovezan e colaboradores (ver Figura 7, seção 2.2). O complexo contendo a unidade pireno também apresentou um valor de constante de associação aproximadamente seis vezes maior que o complexo reportado por Piovezan com respeito à hidrólise do substrato 2,4-BDNPP, provavelmente devido à interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre o substrato e a cadeia lateral (Figura 10B) (Camargo, T. P. *et al.*, 2018; Piovezan, C. *et al.*, 2010).

Figura 10 A) Complexo reportado por Silva *et al.* contendo uma unidade diamina. B) Complexo reportado por Camargo *et al.* contendo uma unidade pireno.



Fonte: Adaptado de: A) Silva, G. A. S. *et al.*, 2017; B) Camargo, T. P. *et al.*, 2018.

Nos últimos anos, uma das propostas do nosso grupo de pesquisa tem sido a síntese e caracterização de compostos modelo capazes de mimetizar as propriedades físico-químicas de catecolases, catalases e hidrolases, além de propor, através de estudos cinéticos, mecanismos de ação para as enzimas de interesse. Tendo em vista o grande número de trabalhos reportados e mecanismos propostos envolvendo a primeira esfera de coordenação para metalohidrolases, dentre outras enzimas, uma das propostas mais recentes do grupo tem sido o estudo dos efeitos da segunda esfera de coordenação de compostos modelo, de maneira a aprimorar o estudo das propriedades catalíticas de enzimas como as fosfatases ácidas púrpuras, fosfodiesterases e catecol oxidases.

Outro objetivo do nosso grupo de pesquisa visa a questão da aplicabilidade dos compostos estudados, de modo que nos últimos anos, em parceria com outros centros e com outras universidades, já foram realizados testes *in vitro* com o objetivo de se verificar se os compostos sintetizados apresentam atividade frente à hidrólise de DNA, e mais recentemente, estão sendo propostos estudos para averiguar se estes compostos apresentam atividade antibacteriana.

2.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Doenças infecciosas causadas por bactérias chamam a atenção no mundo todo e são consideradas uma séria ameaça à saúde humana, com repercussões tanto sociais quanto econômicas. Um aumento nos surtos e infecções de cepas

patogênicas, resistência a antibióticos, surgimento de novas mutações bacterianas e infecções hospitalares são ameaças à saúde global, principalmente em crianças. Por exemplo, a contaminação de água e alimentos pela bactéria *Shigella flexneri* provocando infecções são a causa de 1,5 milhões de mortes anualmente (Kotloff, K. L. *et al.*, 1999; Sirelkhatim, A. *et al.*, 2015; Liu, J. *et al.*, 2018).

Além da *Shigella flexneri*, bactérias como a *Staphylococcus aureus* tem chamado a atenção de pesquisadores na área de imunologia, principalmente após a identificação em 1960 de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (ou SARM), um antibiótico pertencente ao grupo das penicilinas, como um patógeno e causa de infecções hospitalares, podendo causar infecções na corrente sanguínea, pele, tecidos moles e trato respiratório inferior (De Jong, N. W. M., Kessel, K. P. M. V., Strijp, J. A. G. V., 2019).

A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) divulgou um relatório em 2018, o qual prediz que 2,4 milhões de pessoas na Europa, América do Norte e Austrália irão morrer de doenças infecciosas nos próximos 30 anos com um custo de US\$ 3,5 bilhões por ano. No Brasil e na Rússia, 40-60% das infecções já são causadas por microrganismos resistentes a antibióticos e estima-se que a resistência deve aumentar de 4-7 vezes mais rápido nestes países que em outros países membros da OCDE (Hofer, U., 2019).

2.4.1 Um breve histórico

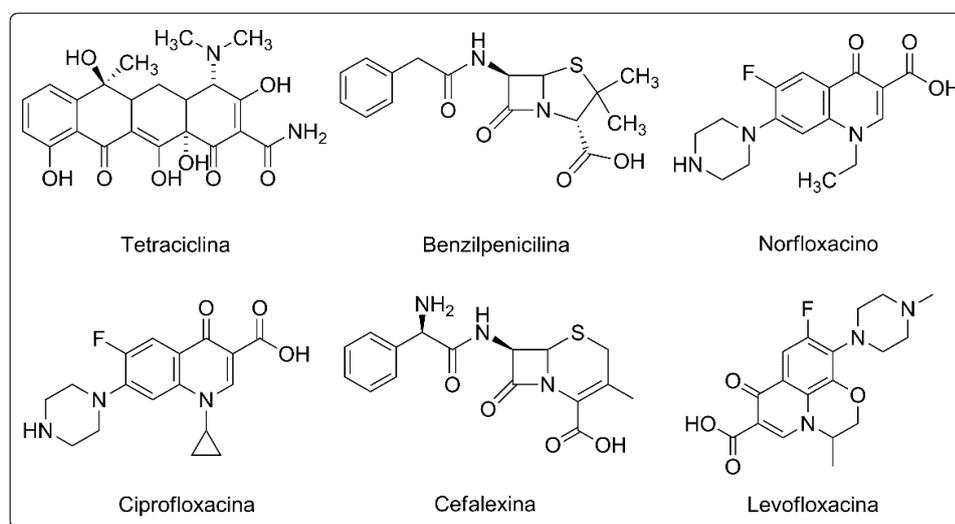
Muito antes da chamada “era dos antibióticos” os seres humanos já faziam uso de agentes capazes de combater infecções causadas por bactérias. Evidências de traços de tetraciclina – um grupo de antibióticos utilizados no tratamento de bactérias gram-positivas, gram-negativas, alguns protozoários e alguns fungos – foram encontrados em restos de esqueletos antigos da Núbia datando dos anos 350 a 550 (Basset, E. J., Keith, M. S., Armelagos, G. J., Martin, D. L., 1980; Aminov R. I., 2010). Outro exemplo são os medicamentos utilizados na medicina tradicional chinesa, como o quinghaosu (artemisinina), um fármaco antimalárico extraído da planta *Artemisia* em 1970, e já sendo utilizado pelos chineses por centenas de anos como tratamento para várias doenças. Mel, ervas e até mesmo fezes de animais eram utilizadas com este intuito, assim como pão mofado (Aminov R. I., 2010; Gould, K., 2016).

Em 1676 Antonie van Leeuwenhoek descobriu a existência de “pequenas criaturas vivas” utilizando um microscópio e dando início ao estudo da bacteriologia. Em 1880, Robert Koch e Louis Pasteur estabeleceram a associação entre espécies individuais de bactérias e doenças. A propagação de gonorreia e sífilis induziu mais experimentos com possíveis tratamentos, e metais pesados como arsênico, bismuto e mercúrio foram utilizados como possíveis tratamentos, mas apesar de se notar uma melhora nos sintomas, a administração e os efeitos colaterais se mostraram piores do que a doença em si (Aminov R. I., 2010; Gould, K., 2016).

Em 1870, Sir John Scott Burdon-Sanderson descreveu como um fluido de cultura coberto de mofo foi capaz de inibir o crescimento de bactérias, em 1871 Joseph Lister fazia experimentos com *Penicillium glaucium*, demonstrando seus efeitos antibacterianos em tecidos humanos e em 1897 Ernest Duchesne utilizou *Penicillium notatum* no tratamento de febre tifoide em porquinhos-da-índia. Finalmente, em 1928 Alexander Fleming fez sua descoberta com a penicilina, mas só em 1945 ela passou a ser produzida e distribuída em massa (Aminov R. I., 2010; Gould, K., 2016).

Inicialmente, a melhor fonte de agentes antibacterianos provinha de outros microrganismos, o que levou a uma busca ao redor do globo por outros agentes capazes de combater doenças infecciosas. Por volta de 1950, a resistência aos antibióticos já conhecidos se tornou aparente, e pesquisadores voltaram sua atenção em buscar novas maneiras de aprimorar os compostos já existentes. A Figura 11 traz alguns antibióticos utilizados ainda hoje (Aminov R. I., 2010; Gould, K., 2016).

Figura 11 Alguns compostos utilizados como agentes antibacterianos.



Fonte: Autor.

A corrida entre o desenvolvimento de novos antibióticos e bactérias adquirindo resistência aos compostos lançados no mercado continua acirrada, e novas abordagens no desenvolvimento de antibióticos se fazem necessárias. Uma alternativa que tem demonstrado bons resultados é a complexação de metais em compostos que apresentam atividade antibacteriana, e algumas pesquisas têm demonstrado que a atividade do complexo em relação ao composto sem o íon metálico aumenta significativamente.

2.4.2 Compostos metálicos com atividade antibacteriana

Segundo Chohan e Kausar, compostos de níquel são capazes de penetrar as células microbianas, inativando suas enzimas e atuando como compostos antimicrobianos (Chohan, Z. H., Kausar, S., 2000). Vários autores já reportaram complexos de Ni^{II} apresentando atividade antibacteriana, como o estudo reportado por Kulkarni e colaboradores, em que os autores utilizaram bases de Schiff derivadas da cumarina para sintetizar complexos de Co^{II}, Ni^{II} e Cu^{II}. Todos os complexos apresentaram uma maior porcentagem de inibição de crescimento da bactéria *Escherichia coli* em relação aos ligantes utilizados na concentração de 25 µg mL⁻¹ (Kulkarni, A. *et al.*, 2009). Outro estudo, reportado por Özdemir e colaboradores utilizando ligantes derivados do ácido metanossulfônico para sintetizar complexos de Ni^{II}, Pd^{II} e Pt^{II} mostrou que os complexos apresentaram maior atividade contra as bactérias testadas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas*

aeruginosa e *Escherichia coli*) em relação aos ligantes utilizados. Ainda, os complexos de Pd^{II} e Pt^{II} com o ligante o-vanmsh (2-hidroxi-3-metoxibenzaldeidometanosulfonilhidrazona) apresentaram maior atividade contra a *Staphylococcus aureus* do que o sulfisoxazol, o antibiótico padrão utilizado contra esta bactéria (Özdemir, Ü. Ö., Akkaya, N., Özbek, N., 2013).

Os íons metálicos são absorvidos pelas paredes celulares dos microrganismos, causando um distúrbio no processo de respiração da célula e bloqueando a síntese de proteínas necessárias para o crescimento destes organismos. De acordo com o conceito de Overton da permeabilidade da célula, a membrana lipídica somente favorece a passagem de matérias lipossolúveis, o que torna a lipofilicidade um fator importante no que concerne atividade antimicrobiana. Através da quelação a polarizabilidade do íon metálico é reduzida devido a sobreposição dos orbitais do ligante e o compartilhamento parcial da carga positiva do íon metálico com os grupos doadores. Além disso, o aumento da deslocalização dos elétrons π sobre todo o anel quelato aumenta a lipofilicidade do complexo. Estes efeitos combinados podem levar também à desativação de várias enzimas que desempenham um papel vital nos processos metabólicos destes microrganismos. No entanto, a variedade na efetividade de diferentes compostos contra diferentes organismos depende tanto da impermeabilidade das células microbianas quanto da diferença dos ribossomos das células (Al-Amiery, A. A., Kadhum. A. A. H., Mohamed, A. B., 2012; El-Sawaf, A. K., Azzam, M. G., Abdou, A. M., Anouar, E. H., 2018).

2.5 JUSTIFICATIVA DESTE TRABALHO

Compostos biomiméticos têm sido muito utilizados como forma de se estudar as propriedades físico-químicas e estruturais de diversas metaloenzimas, assim como o desenvolvimento de complexos mono e binucleares com atividade catalítica de metalohidrolases têm sido reportados como exemplos de sistemas bioinspirados, podendo atuar como catalisadores, fármacos, antibióticos e mesmo como agentes capazes de clivar áreas específicas de DNA e RNA.

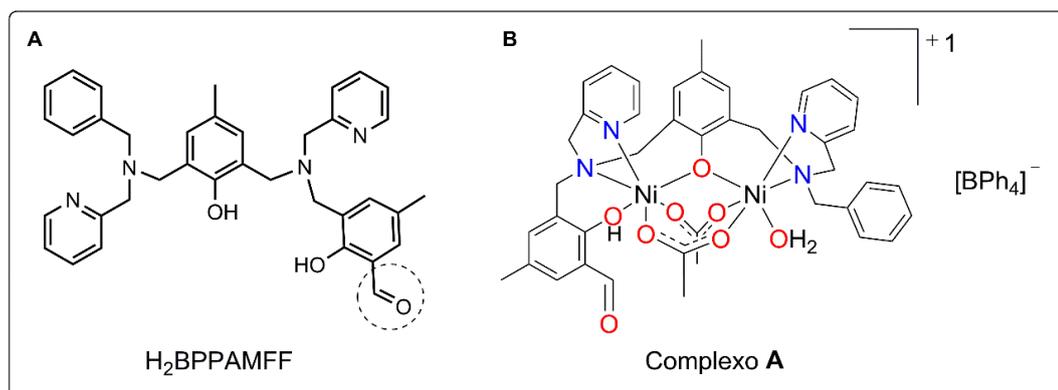
Nos últimos anos, muitos compostos modelo capazes de clivar ligações fosfodiésteres e/ou DNA têm sido reportados. Dentre os íons metálicos utilizados pode-se citar complexos contendo Cu^{II}, Zn^{II}, Co^{II}, Fe^{II}, Mn^{II} e alguns lantanídeos.

Entretanto, em comparação com estes íons metálicos poucos complexos de níquel(II) têm sido reportados como miméticos na hidrólise de ésteres de fosfato (De Rosch, M. A., Trogler, W. C., 1990; Yamaguchi, K. *et al.*, 2001; Greatti, A. *et al.*, 2008; Piovezan, C. *et al.*, 2012; Horn Jr., A. *et al.*, 2018). Recentemente, Chakraborty e colaboradores reportaram quatro complexos de Ni^{II} apresentando atividade de fosfatase contra o substrato 4-nitrofenilfosfato (4-NPP), sendo que um destes complexos apresentou ainda atividade de catecolase contra o substrato 3,5-di-*tert*-butilcatecol (3,5-DTBC) (Chakraborty, T. *et al.*, 2019). Também Desbois e colaboradores publicaram um artigo de revisão sobre vários complexos de Cu^{II}, Zn^{II} e Ni^{II} capazes de mimetizar nucleases (Desbois, D. *et al.*, 2012).

Como mencionado anteriormente (seção 2.2.1), Piovezan e colaboradores reportaram a síntese de um ligante binucleante contendo uma unidade aldeído, posteriormente utilizada para ancorar sílica ao complexo de Ni^{II} (ver Figura 8, seção 2.2.1). O complexo sem a sílica funcionalizada teve sua atividade avaliada em pH 9,0 e mostrou bons resultados como mimético na hidrólise de ésteres de fosfato, apresentando valores significativos tanto na eficiência catalítica, quanto no fator de aceleração da reação de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP. Deste modo, o mesmo ligante, apresentado na Figura 12, pode ser funcionalizado com grupos amino na cadeia lateral, no intuito de se estudar os efeitos que estes grupos teriam na hidrólise de ésteres de fosfato, uma vez que a inserção destes grupos pode levar a uma maior interação com o substrato, e ainda levar a uma diminuição no pK_a das moléculas de água coordenadas aos centros metálicos, o que é de grande interesse no ponto de vista de aplicações biológicas.

Para modo de comparação, e para facilitar a compreensão dos resultados a serem discutidos, o complexo reportado por Piovezan *et al.* será denominado de complexo **A** neste trabalho.

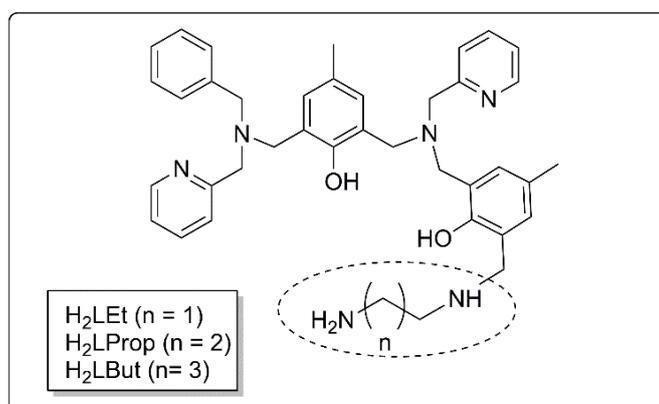
Figura 12 A) Ligante H₂bppamff; B) Complexo **A** reportado por Piovezan e colaboradores.



Fonte: Adaptado de Piovezan, C. *et al.*, 2012.

Levando em consideração os tópicos abordados anteriormente, e tendo em vista a lacuna existente de estudos referentes à complexos de níquel como modelos para fosfoesterases, em comparação à diversidade de complexos de cobre, zinco e ferro reportados para os mesmos fins, o presente trabalho propõe a síntese de novos ligantes binucleares não simétricos derivados do ligante H₂bppamff. Para isto, pretende-se funcionalizar o aldeído presente no fenol lateral do ligante H₂bppamff (Figura 12) com grupos diamina alifáticos, além de se estudar o efeito causado na atividade de hidrolase dos respectivos complexos através do aumento da cadeia carbônica dos grupos amino e o estudo da atividade antibacteriana contra as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Listeria innocua* e *Staphylococcus aureus*. A Figura 13 apresenta um esquema dos ligantes sintetizados neste trabalho.

Figura 13 Ligantes não simétricos utilizados neste trabalho.



Fonte: Autor.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo sintetizar complexos binucleares de Ni(II) com ligantes não simétricos contendo grupos diamina alifáticos que possam atuar como segunda esfera de coordenação, visando o estudo da atividade de hidrólise de ésteres de fosfato, assim como o estudo da atividade antibacteriana destes complexos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar e caracterizar o ligante H₂bppamff e seus derivados H₂LEt, H₂LProp e H₂LBut via análise elementar (CHN), espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono e espectrometria de massa;
2. Sintetizar e caracterizar os complexos de Ni(II) com os ligantes H₂LEt, H₂LProp e H₂LBut através de análise elementar (CHN), análises espectroscópicas (infravermelho, ultravioleta-visível), espectrometria de massa, absorção atômica, análises eletroquímicas (voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada), condutividade molar, titulação potenciométrica e estudos teóricos;
3. Investigar a reatividade dos complexos obtidos frente à hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP, assim como o efeito da segunda esfera de coordenação na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP;
4. Investigar a atividade antibacteriana dos complexos frente a seis diferentes cepas bacterianas, tanto gram-positivas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria innocua* e *Staphylococcus aureus*) quanto gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, e *Aeromonas hydrophila*).

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os ligantes e complexos sintetizados neste trabalho foram caracterizados através de diversas técnicas espectroscópicas, espectrometria de massas, análises eletroquímicas, entre outras. A seguir estão listados tanto as técnicas quanto os equipamentos utilizados durante a elaboração deste trabalho.

4.1 MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

4.1.1 Análise elementar de CHN

As medidas para a determinação dos percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio para os ligantes H₂LEt, H₂LProp e H₂LBut e para os complexos **1**, **2** e **3** foram realizados em um analisador elementar CHNS/O CE Instruments (Modelo EA 1110 CHNS-O) acoplado com balança PerkinElmer (Modelo – Autobalance AD 6000). Gás de arraste: Hélio grau 5.0 e combustão: Oxigênio grau 6.0, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC.

4.1.2 Absorção atômica

A espectrometria de absorção atômica foi utilizada para verificar a quantidade de Ni presente nos complexos, utilizando-se um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, modelo ContrAA 700 (Analytik Jena, Jena, Alemanha), equipado com atomizadores de forno de grafite e chama, no Laboratório de Espectrometria Atômica, Departamento de Química - UFSC. O comprimento de onda selecionado foi de 232,003 nm. Uma mistura de ar (oxidante) e acetileno (combustível) foi utilizado com um fluxo contínuo de 55 L h⁻¹. A altura do queimador foi de 6 mm. As soluções dos complexos foram preparadas com aproximadamente 3,00 mg de complexo solubilizados em 20 mL de HCl 4 mol L⁻¹.

4.1.3 Espectroscopia na região do infravermelho (IR)

Os espectros das amostras foram adquiridos na região do IR em um espectrofotômetro de infravermelho com Transformada de Fourier e com acessório de Refletância Total Atenuada Horizontal (FTIR – ATR) da Perkin-Elmer Spectrophotometer Spectrum 100, com cristal de ZnSe (45 °) e um detector TGS (triglycine sulfate). As amostras sólidas foram colocadas diretamente no aparelho

sobre o cristal quando por refletância total atenuada, com média de 18 varreduras no intervalo 4000 - 550 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} . As medidas das amostras foram corrigidas pelo espectro do branco que foi registrado somente com o background feito com ar ambiente. As amostras oleosas foram analisadas diretamente no aparelho e medidas por refletância total atenuada.

4.1.4 Cálculos de estrutura eletrônica

Os cálculos de otimização das estruturas dos complexos **1**, **2** e **3** foram realizados no nível da teoria do funcional da densidade (DFT) no vácuo, utilizando o software Orca 4.0.1 (Neese, F., 2017) e o funcional BP86 (Becke, A. D., 1988; Perdew, J. P., 1986). Os estudos foram feitos em parceria com o Professor Bernardo de Souza e realizados pelo doutorando Giliandro Farias. O conjunto de bases escolhido foi Def2-TZVP para os átomos de níquel e Def2-SVP para os outros átomos (Schäfer, A., Horn, H., Ahlrichs, R., 1992; Schäfer, A., Huber, C., Ahlrichs, R., 1994; Weigend, F., Ahlrichs, R., 2005). Os cálculos também incluíram correção de dispersão Grimme (D3) com *damping* de Becke-Johnson (BJ) (Grimme, S., Antony, J., Ehrlich, S., Krieg, H., 2010; Grimme, S., Ehrlich, S., Goerigk, J., 2011). As frequências vibracionais para os complexos **1** – **3** não apresentaram frequências imaginárias. Os conjugados fosfato também foram otimizados, e as frequências vibracionais apresentaram apenas uma pequena frequência negativa devido à rotação dos anéis aromáticos. No intuito de simular os espectros de absorção, foi empregada teoria do funcional da densidade dependente do tempo com aproximação Tamm-Dancoff (TD-DFT/TDA) para obter 50 excitações, utilizando os mesmos protocolos de cálculo, sendo a única diferença o funcional, que neste caso foi PBE0 (Perdew, J. P., Burke, K., Ernzerhof, M., 1996; Perdew, J. P., Burke, K., Ernzerhof, M., 1997), e o conjunto de bases para os átomos coordenados foi o mesmo utilizado para os átomos de níquel, Def2-TZVP. As representações 3D dos complexos foram obtidas utilizando o programa Chemcraft (Zhurko, G. A., 2005).

4.1.5 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio ^1H NMR e de carbono ^{13}C NMR

Os espectros de ^1H NMR foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker -AC 200, em 200 MHz, ou em um espectrofotômetro Bruker Ascend 400 FT-NMR, em 400 MHz e os espectros de ^{13}C NMR foram obtidos com um espectrofotômetro Bruker

Ascend 400 FT-NMR, em 100 MHz, na Central de análises do Departamento de Química – UFSC. Os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono foram registrados em ppm utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ ppm) e como solvente CDCl_3 .

4.1.6 Espectroscopia eletrônica

Os espectros eletrônicos na região do ultravioleta, visível e infravermelho próximo foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo Lambda-750, para as análises no estado sólido, e em um espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostaticado para as análises em solução, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. As análises em solução foram realizadas numa região de 250-1100 nm, utilizando-se como solvente CH_3CN de grau espectroscópico em cubetas de quartzo com capacidade para 1 mL e 1 cm de caminho óptico e seladas com tampa de teflon. Experimentos no estado sólido (refletância difusa) foram realizados utilizando-se um módulo acoplável, em que as amostras foram dispersas em pastilha de KBr espectroscópico, e as análises foram realizadas numa região de 250-800 nm.

4.1.7 Condutividade Molar

As análises de condutividade molar para todos os complexos foram efetuadas em um condutivímetro Metrohm 900 Touch Control, utilizando-se como solvente CH_3CN (grau espectroscópico) e concentrações de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ das espécies a serem analisadas, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. As análises foram realizadas após a calibração do equipamento com solução padrão de KCl ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; $\Lambda_M = 1408 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) (Lide, D. R., 2000) a temperatura de $25,00 \pm 0,05 \text{ }^\circ\text{C}$. Os complexos foram solubilizados em CH_3CN espectroscópica com concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

4.1.8 Espectrometria de massas

Os compostos sintetizados (ligantes e complexos) foram caracterizados via espectrometria de massas com ionização via eletrospray (ESI-MS). Os espectros foram medidos no equipamento Amazon-Ion Trap MS do Centro de Biologia Molecular

Estrutural – UFSC. A análise foi realizada a partir das soluções dos ligantes e complexos em CH₃CN grau MS com concentração de aproximadamente 500 ppb e fluxo de 180 µL min⁻¹. A temperatura do capilar foi mantida entre 180 e 200 °C e a voltagem do capilar entre -400 e -500 V. O espectro simulado (teórico) foi calculado utilizando-se o software Mmass (Strohalm, M. *et al.*, 2010).

4.1.9 Eletroquímica

O comportamento redox dos complexos foi investigado por voltametria cíclica e de onda quadrada em um potenciostato/galvanostato modelo BAS Epsilon, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, do Departamento de Química – UFSC. Os experimentos foram feitos com soluções dos complexos sob atmosfera de argônio, utilizando-se hexafluorofosfato de tetrabutylamônio (0,1 mol L⁻¹) como eletrólito de suporte. Foi utilizada uma célula eletrolítica contendo um eletrodo de pseudo-referência de Ag/Ag⁺, um eletrodo de trabalho de carbono vítreo e um eletrodo auxiliar de platina e ferroceno (par Fc⁺/Fc) como padrão interno para correção do eletrodo de referência (Gagné, R.R., Koval, C. A., Lisensky, G. C., 1980).

A reversibilidade dos processos eletroquímicos foi analisada considerando os seguintes pontos:

Processos reversíveis: o módulo da diferença entre os potenciais de pico catódico e anódico ($\Delta E_p = |E_{pc} - E_{pa}|$) deve ser de 59 mV para processos reversíveis que transferem apenas 1 elétron. A razão I_{pc} e I_{pa} deve ser aproximadamente igual a 1, sendo I_{pc} a corrente máxima catódica e I_{pa} a corrente máxima anódica.

Processos *quasi*-reversíveis: os potenciais de pico (E_p) aumentam com o aumento da velocidade de varredura. Os valores de ΔE_p variam de maneira pronunciada de acordo com a velocidade de varredura de potenciais.

Processos irreversíveis: ao efetuar varreduras em diferentes velocidades, os potenciais deslocam-se sempre para sentidos anódicos (E_{pa}) ou catódicos (E_{pc}) não se observando, geralmente, o pico de retorno.

4.1.10 Titulação Potenciométrica

As constantes de protonação para os ligantes e para os complexos foram determinadas por titulação potenciométrica no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e fervida para eliminar a presença de CO₂

dissolvido. Os experimentos foram realizados em solução de CH₃CN/H₂O (1:1 v/v) devido à baixa solubilidade dos complexos em água.

Foi utilizado o titulador automático Metrohm 848 Titrino Plus acoplado a um eletrodo de vidro combinado (Ag/AgCl) e uma solução aquosa de KOH (~0,10 mol L⁻¹), como titulante, padronizado a partir do padrão primário biftalato de potássio (em triplicata e previamente seco em estufa a 110 °C por 4 horas). As análises foram realizadas em uma faixa de pH de 3,00 a 12,00 através da adição de alíquotas de 0,025 mL de base a uma solução de 50 mL de CH₃CN/H₂O 1:1 (pK_w = 15,40) (Herrador, M. A., González, A. G., 2002) contendo 0,025 mmol de complexo, e a força iônica foi mantida constante em 0,10 mol L⁻¹ com a adição de KCl. As medidas foram realizadas em duplicata para o complexo **1** e em triplicata para os complexos **2** e **3**. As análises foram realizadas em uma célula termostaticada a 25,00±0,05 °C, sob fluxo de argônio para eliminar a presença de CO₂ atmosférico.

As constantes de equilíbrio foram calculadas com o programa BEST7 (Martell, A. E., Motekaitis, R. J., 1992) a partir do valor de pK_w de 15,40 (Herrador, M. A., González, A. G., 2002) referente à solução CH₃CN/H₂O (1:1 v/v) e os diagramas de distribuição das espécies, presentes em solução em função do pH, foram obtidos com o programa SPECIES.

4.1.11 Avaliação da atividade catalítica frente à reação de hidrólise do substrato modelo bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato de piridínio – 2,4-BDNPP

A atividade catalítica dos complexos foi avaliada através da reação de hidrólise do substrato modelo bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato de piridínio – 2,4-BDNPP (Bunton, C. A., Farber, S. J., 1969). Os experimentos cinéticos foram realizados em triplicata sob condições de excesso de substrato, sendo monitorado espectrofotometricamente a variação de absorvância ocorrida em 400 nm, relativa à liberação do ânion 2,4-dinitrofenolato como produto da reação de hidrólise. A velocidade inicial foi medida em tempo real em diversos valores de pH entre 5,00 e 9,50 (os tampões utilizados foram 0,10 mol L⁻¹ MES, pH 5,00 – 6,50, HEPES, pH 7,00 – 8,50 a CHES, pH 9,00 – 9,50) como força iônica foi utilizado LiClO₄ 0,10 mol L⁻¹. A concentração de 2,4-dinitrofenolato foi calculada a partir da absorvidade molar em 400 nm (pH/ε L mol⁻¹ cm⁻¹ = 5,00/10078; 5,50/11405; 6,00/12004; 6,50-9,50/12100)

(Batista, S. C. et al., 2003; Peralta, R. A. et al., 2010). As reações foram monitoradas até 5% de conversão de substrato a produto e os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais, obtidas diretamente do gráfico da concentração de 2,4-dinitrofenolato versus o tempo.

4.1.11.1 Efeito do pH na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP

Os estudos em função do pH para os complexos, os quais visam a obtenção do pH ótimo de atividade e pKa cinético para os mesmos, foram realizados em uma faixa de pH entre 5,00 e 9,50 para os complexos **1** e **3** e entre 5,00 e 9,00 para o complexo **2**, a 25,00 °C. Foram utilizadas cubetas de vidro óptico com capacidade para 4 mL e caminho óptico de 1,00 cm com tampa de teflon. A dependência da velocidade de acordo com o pH foi investigada utilizando-se concentrações fixas de substrato ($[S]_{\text{final}} = 5,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para **1**; $[S]_{\text{final}} = 3,33 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para **2** e $[S]_{\text{final}} = 6,66 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para **3** e complexos $[C]_{\text{final}} = 1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para **1**; $[C]_{\text{final}} = 3,33 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para **2** e $[C]_{\text{final}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para **3** a 25,00 ± 0,50°C.

4.1.11.2 Efeito da concentração do substrato na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP

Os experimentos em função da concentração do substrato foram realizados a 25,00 °C ($[S]_{\text{final}} = 2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} - 4,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e foram medidos numa faixa de pH de 5,00 – 9,50 para os complexos **1** e **3** e de 5,00 – 9,00 para o complexo **2**. Os dados foram tratados utilizando-se a equação de Michaelis-Menten através de regressão não-linear (Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., 2002). Correções da hidrólise espontânea do substrato 2,4-BDNPP foram realizadas sob condições idênticas, sem a adição de complexo.

A determinação do número de moléculas de substrato hidrolisadas por molécula de complexo foi realizada pelo acompanhamento espectrofotométrico em 445 nm ($\epsilon = 3600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) na condição de 50 vezes de excesso do substrato ($[S]_{\text{final}} = 2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para **1** e **2** e $[S]_{\text{final}} = 3,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para **3**) com relação ao complexo ($[C]_{\text{final}} = 4,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para **1** e **2** e $[C]_{\text{final}} = 6,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para **3**), em pH 9,00 e 25,00 °C. Também foi realizado o acompanhamento da reação estequiométrica em 400 nm entre os complexos e o substrato 2,4-BDNPP ($1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em pH 9,00 a 25 °C.

O estudo do efeito isotópico de deutério na hidrólise do 2,4-BDNPP pelos complexos foi realizado em função da concentração do substrato, em que as soluções

de tampão (tampão CHES pH, pD = 9,00) foram previamente preparadas em H₂O e D₂O ($[S]_{\text{final}} = 2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} - 3,06 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para **1**, $[C]_{\text{final}} = 4,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[S]_{\text{final}} = 2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} - 2,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para **2** e **3**, $[C]_{\text{final}} = 4,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Correções da hidrólise espontânea do substrato 2,4-BDNPP foram realizadas sob condições idênticas, sem a adição de complexo.

O efeito da temperatura na velocidade de reação foi investigado numa faixa de 20 – 40 °C em pH 9,00 para todos os complexos e nas mesmas condições utilizadas para o efeito da concentração do substrato. As análises foram realizadas em triplicata para todos complexos. Correções da hidrólise espontânea do substrato 2,4-BDNPP foram realizadas sob condições idênticas, sem a adição de complexo.

4.1.12 Testes biológicos

Os complexos tiveram sua atividade antibacteriana testada através dos métodos de ágar seletivo e diferencial. Foram utilizados os seguintes isolados bacterianos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (ATCC 14028), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Listeria innocua* (ATCC 33090). As diferentes culturas foram mantidas em *Tryptic Soy Broth* (TSB, Difco, Le Pont-de-Claix, França) suplementado com 20% de glicerol a – 20 °C. Uma alíquota da cultura foi semeada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco, Le Pont-de-Claix, França), e incubada por 24 h a 35 °C. As suspensões bacterianas foram semeadas em ágar seletivo e diferencial, e incubadas por 24 h a 35 °C para todas as bactérias, com exceção de *S. aureus* que foram 48 h. Os testes foram realizados em parceria com a Professora Jane Mikcha, da Universidade Estadual de Maringá e foram realizados pela aluna Maíra D. Formagio.

4.1.12.1 Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima

A Concentração Inibitória Mínima (MIC) e a Concentração Bactericida Mínima (MBC) foram determinadas de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Wayne, P. A., 2015), utilizando o método de microdiluição em caldo em

microplacas de 96 poços (TTP, Trasadingen, Switzerland). Os compostos foram diluídos em caldo Mueller Hinton (MHB, Difco, Le Pont-de-Claix, França) contendo acetonitrila na concentração final de 2% e adicionados nas microplacas em concentrações variando de 0,97 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As culturas bacterianas cultivadas em MHB foram padronizadas de acordo com a escala de Mc Farland 0,5 e diluídas para obter 5×10^6 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) mL^{-1} ; 10 μL foram adicionados aos poços das microplacas e incubadas a 35 °C por 24 h. A MIC foi determinada visualmente identificando a menor concentração na qual não foi observado crescimento bacteriano. Dos poços em que não foi observado crescimento bacteriano, uma alíquota de 10 μl foi inoculada em placas contendo ágar seletivo diferencial que foram incubadas a 35 °C por 24h para determinar a MBC. A MBC foi determinada como sendo a menor concentração na qual não foi observado crescimento bacteriano. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram obtidos a partir de três experimentos.

Como controles foram adicionados meio de cultura, sem a adição de antimicrobianos e inóculo (controle negativo), meio de cultura com adição do inóculo bacteriano (controle positivo) e controle do solvente acetonitrila (2% v/v) com adição do inóculo.

4.2 MATERIAIS

Os seguintes reagentes empregados nas sínteses e análises foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados com purificação previa: 2-(2-aminometil)piridina (destilado sob pressão reduzida); 2,6-lutidina (destilado sob pressão reduzida); 1,2-etilenodiamina (destilado sob pressão reduzida); 1,3-propanodiamina (destilado sob pressão reduzida); 1,4-butanodiamina (destilado sob pressão reduzida); benzaldeído (destilado sob pressão reduzida) e trietilamina (destilado sob pressão reduzida). Os demais reagentes foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia, e encontram-se listados na Tabela 1.

Tabela 1 Materiais, reagentes e solventes utilizados nas sínteses e análises.

Reagentes/Solventes	Pureza	Marca
Acetato de sódio tri hidratado	99,8%	Merck
Acetona P.A.	99,5%	Lafan
Acetonitrila P.A.	99,8%	Vetec
Acetonitrila UV/HPLC	99,9%	Tedia
Acetato de etila		Panreac
Acetato de níquel(II)		Aldrich
Ácido clorídrico	37,0%	Lafan
Ácido sulfúrico	98,0%	Vetec
Água deuterada	99,8%	Acros
Argônio	5.0 Analítico	White Martins
Benzoato de sódio		Vetec
Bicarbonato de sódio	99,7%	Vetec
Borohidreto de sódio	99,0%	Aldrich
Carbonato de sódio		Lafan

Cloreto de sódio		Nuclear
Clorofórmio deuterado	99,0%	Aldrich
Clorofórmio P.A.	99,8%	Quimis
Diclorometano P.A.	99,5%	Quimis
Diclorometano UV/HPLC		Tedia
Etanol P.A.	98,0%	Neon
Éter Etílico P.A.	99,0%	Vetec
Ferroceno		Aldrich
Glicerina P.A.	99,5%	Vetec
Hexano P.A.		Vetec
Isopropanol P.A.	99,5%	Vetec
Metanol P.A.	99,8%	Neon
Metanol UV/HPLC	99,9%	Tedia
Perclorato de níquel(II)		Aldrich
Perclorato de sódio		Acros
Sulfato de sódio anidro		Aldrich
Tetrafenilborato de sódio		Aldrich

4.3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

A partir dos princípios utilizados para a síntese de compostos modelo bioinspirados já descritos anteriormente (seção 2.2), neste trabalho foram desenvolvidos ligantes adequados que possam mimetizar os sítios ativos e os resíduos de aminoácidos presentes na estrutura de fosfohidrolases.

Após a caracterização dos precursores e dos ligantes finais, foram sintetizados e caracterizados os respectivos complexos de níquel(II).

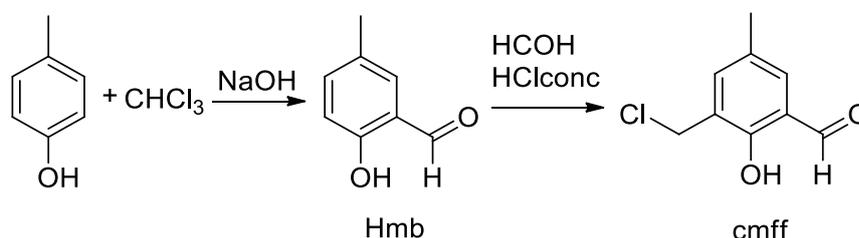
A seguir, foram realizados estudos de reatividade frente ao substrato modelo 2,4-BDNPP, de modo a avaliar a capacidade catalítica dos complexos sintetizados, na tentativa de contribuir para a elucidação do mecanismo pelo qual a clivagem hidrolítica se processa, além de investigar os efeitos que grupos amino presentes nas cadeias laterais dos ligantes tiveram sobre a atividade de catálise destes complexos.

4.3.1 Síntese e caracterização dos ligantes

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

O núcleo básico 3-(clorometil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído – cmff, foi sintetizado conforme descrito na literatura, como mostra o Esquema 1 (Firmo, R. N. *et al.*, 2016). Na primeira etapa, o 2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (Hmb) foi obtido através de uma reação de formilação do *p*-cresol (Thoer, A., Denis, G., Delmas, M., Gaset, A., 1988) e, na segunda etapa, o cmff foi obtido pela reação de clorometilação do Hmb com formaldeído e ácido clorídrico.

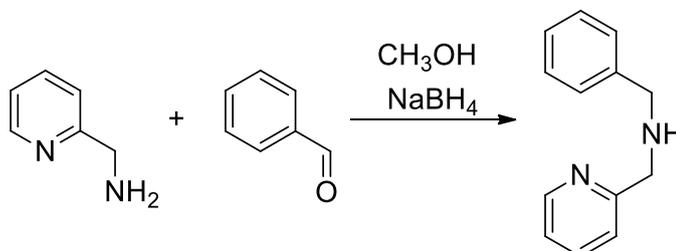
Esquema 1 Síntese do núcleo básico 3-(clorometil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído – cmff.



IR (KBr), em cm^{-1} : ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3048-2852; ν (C-H_{ald}) 2749; ν (C=O_{ald}) 1664; ν (C=C) 1600-1470; δ (O-H_{fenol}) 1378; ν (C-O_{fenol}) 1257; δ (C-H_{ar}) 703; ν (C-Cl) 613.

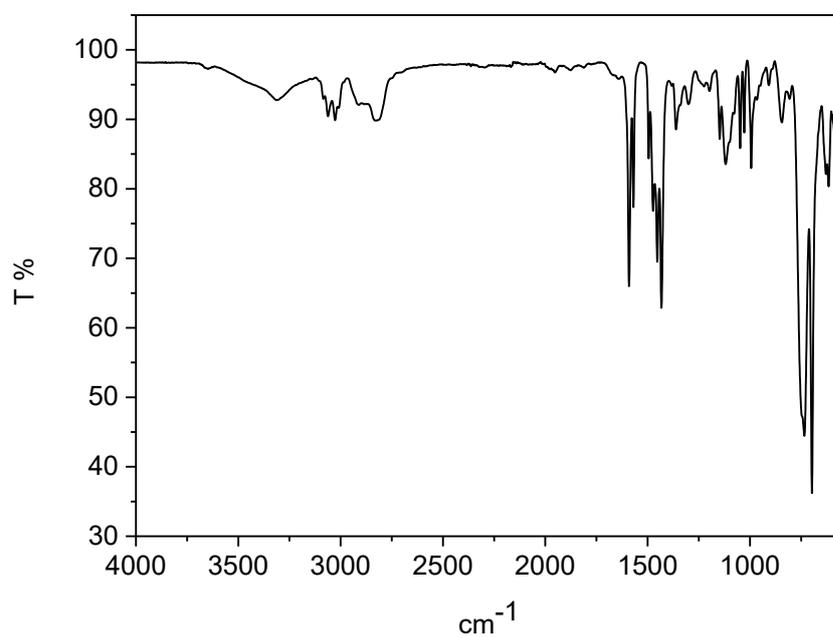
^1H NMR, δ_{H} (200 MHz; CDCl_3) em ppm: 2,35 (s, 3 H, CH_3); 4,67 (s, 2 H, CH_2); 7,35 (s, 1 H, CH_{ar}); 7,46 (s, 1 H, CH_{ar}); 9,86 (s, 1 H, CH_{ald}); 11,25 (s, 1 H, OH_{fenol}).

4.3.1.2 Síntese do bpa – *N*-benzil-*N*-2-piridilmetilamina



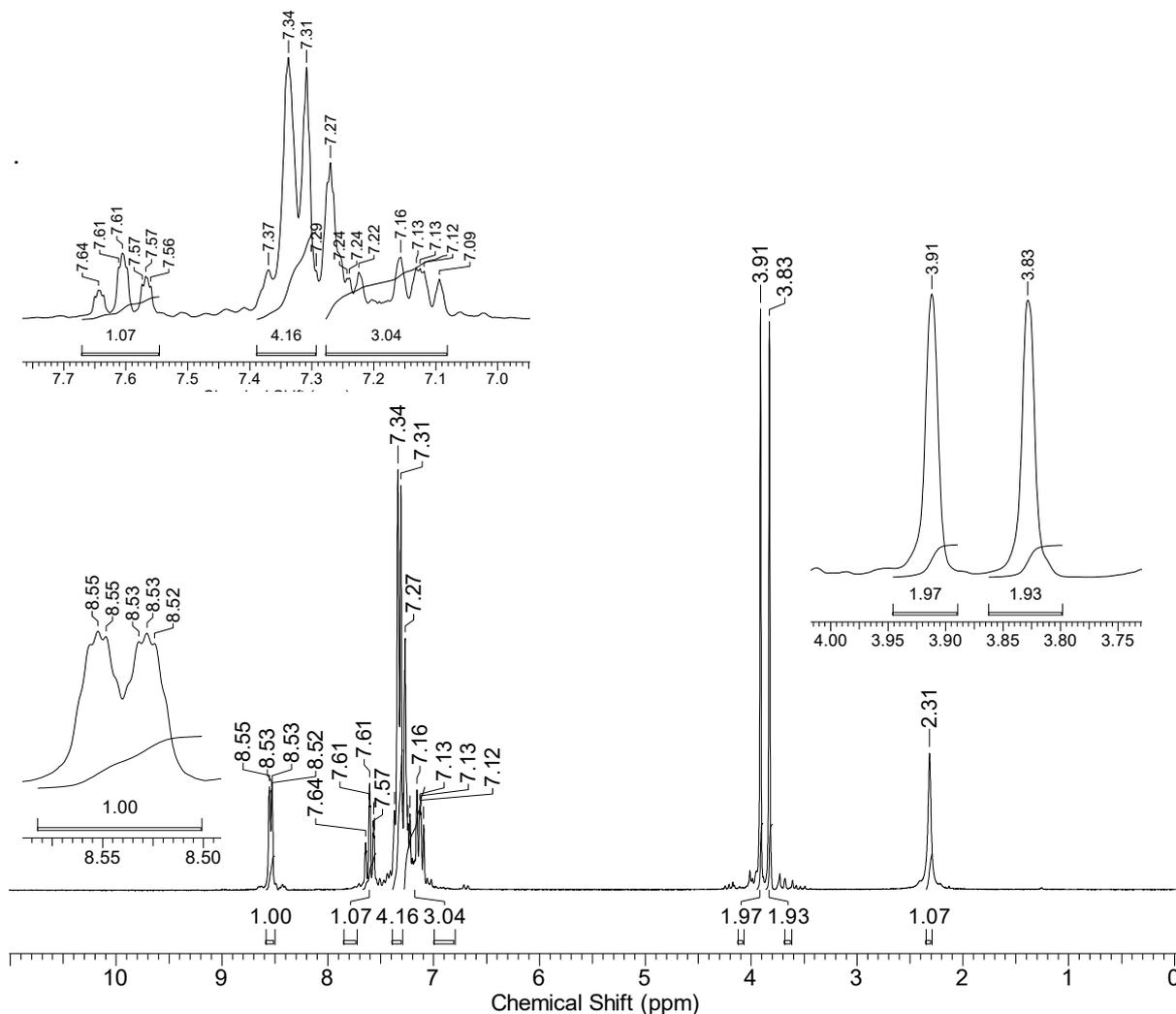
Esta amina foi sintetizada de modo similar ao descrito na literatura (Yajima, T. *et al.*, 2002). Em um balão de 125 mL contendo 20 mL de metanol, foram adicionados 0,54 g de 2-(aminometil)piridina (5 mmol; $108,14 \text{ g mol}^{-1}$; $1,049 \text{ g mL}^{-1}$) e a solução foi mantida a 0°C . Uma solução metanólica de 0,64 g de benzaldeído (6 mmol; $106,12 \text{ g mol}^{-1}$; $1,045 \text{ g mL}^{-1}$) foi adicionada gota-a-gota sob agitação. Após o sistema foi mantido sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas e então adicionou-se 0,38 g de NaBH_4 (10 mmol; $37,83 \text{ g mol}^{-1}$) em pequenas porções durante 1 hora a 0°C . Após retirou-se o banho de gelo e o sistema ficou sob agitação a temperatura ambiente por 4 horas. O solvente foi retirado em rotaevaporador e em seguida adicionou-se 20 mL de HCl 2 mol L^{-1} . Após a fase aquosa foi lavada com $5 \times 10 \text{ mL}$ de CHCl_3 . A fase aquosa foi recolhida e alcalinizada com Na_2CO_3 até pH 10. Após, a fase aquosa foi lavada com $3 \times 20 \text{ mL}$ de CHCl_3 . A fase orgânica foi recolhida e seca com Na_2SO_4 e o solvente foi retirado em rotaevaporador. Um óleo amarelo palha foi obtido com rendimento de 94% em relação à 2-(aminometil)piridina. O bpa foi caracterizado por IR e ^1H NMR.

Figura 14 Espectro de IR do bpa (ATR).



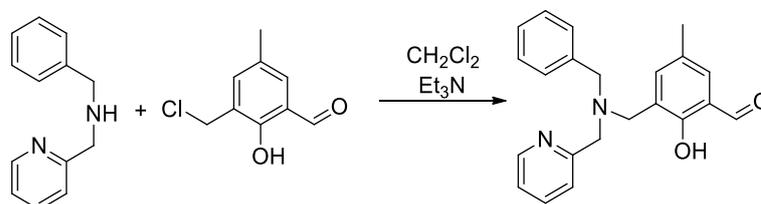
IR em cm^{-1} : ν (N-H) 3300; ν (C-H_{alif} e C-H_{ar}) 3060-2820; ν (C=N e C=C) 1596-1429; δ (C-H_{ar}) 750-696.

Figura 15 Espectro de ^1H NMR do bpa em CDCl_3 - 200 MHz.



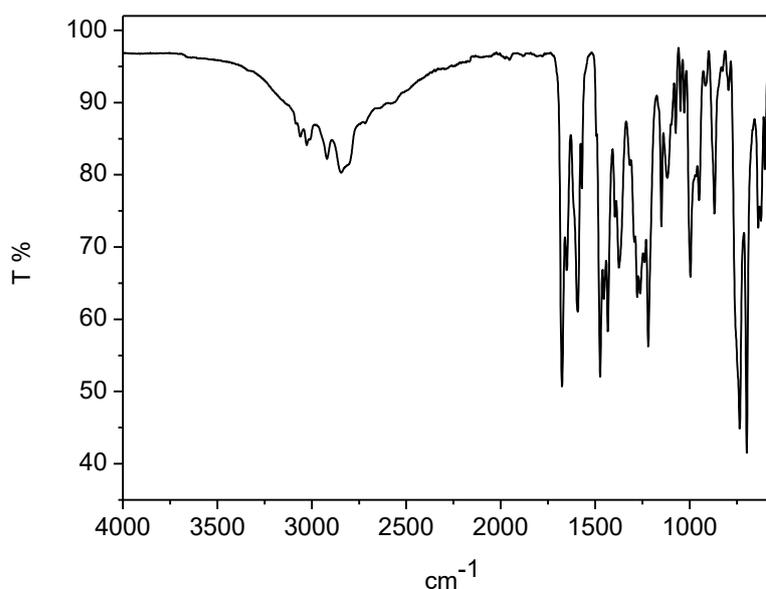
^1H NMR, δ_{H} (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,31 (s, 1H_{amina}); 3,83 (s, 2H_{CH_2}); 3,91 (s, 2H_{CH_2}); 7,09 – 7,27 (m, 3H_{ar}); 7,29 – 7,37 (m, 4H_{ar}); 7,61 (m, 1H_{ar}); 8,54 (m, 1H_{py}).

4.3.1.3 Síntese do bpamff – 3-(*N*-benzil-*N*-2-piridilmetilamina)-5-metil-2-hidroxibenzaldeído



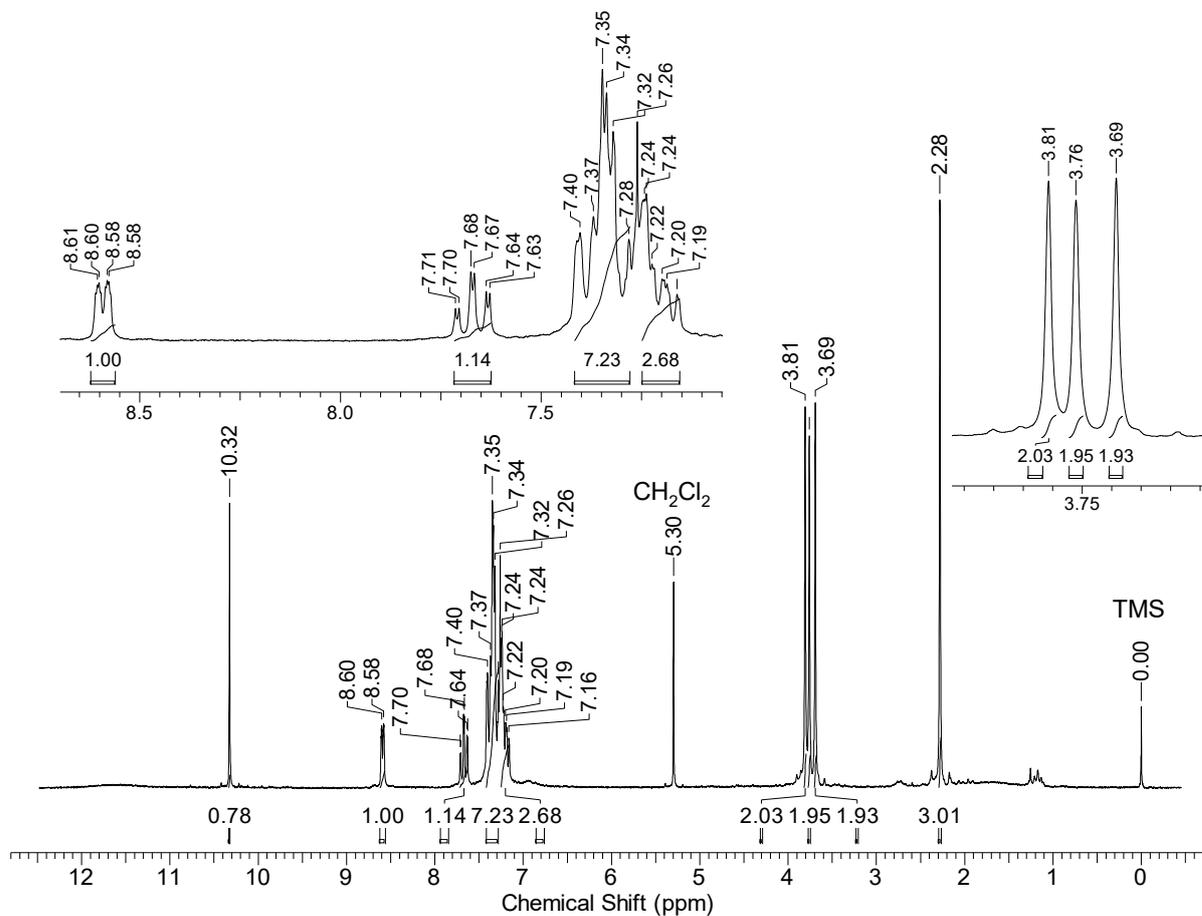
O precursor bpamff foi sintetizado conforme descrito na literatura (Piovezan, C., *et al.*, 2012). Em um balão de 125 mL contendo uma solução de 0,79 g de bpa (4mmol; 198,26 g mol⁻¹) em 20 mL de CH₂Cl₂, foram adicionados 0,81 g de Et₃N (8 mmol; 101,19 g mol⁻¹; 0,726 g mL⁻¹) sob agitação e banho de gelo. Após foram adicionados lentamente 0,74 g de 3-(clorometil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (4 mmol; 184,62 g mol⁻¹) dissolvidos em 20 mL de CH₂Cl₂. Após a adição de 3-(clorometil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído o sistema permaneceu sob agitação a temperatura ambiente durante 24 h. O composto desejado foi lavado com 8 × 20 mL de Na₂CO₃ e 1 × 15 mL com NaHCO₃. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente foi retirado em rotaevaporador. Um óleo amarelo foi obtido com rendimento de 90% em relação ao bpa. O bpamff foi caracterizado por IR e ¹H NMR.

Figura 16 Espectro de IR do bpamff (ATR).



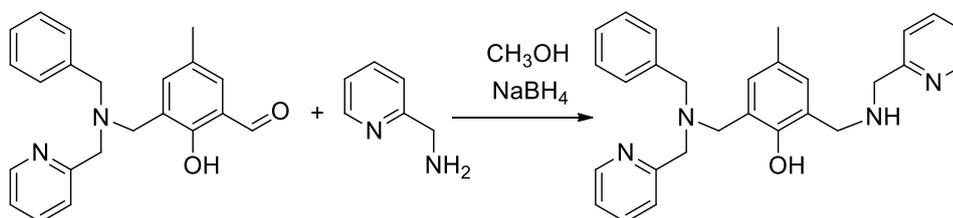
IR em cm⁻¹: ν (C-H_{alif} e C-H_{ar}) 3060-2820; ν (C=O_{ald}) 1675; ν (C=N e C=C) 1596-1429; δ (O-H_{fenol}) 1370; ν (C-O_{fenol}) 1218; δ (C-H_{ar}) 760-697.

Figura 17 Espectro de ^1H NMR do bpmff em CDCl_3 - 200 MHz.



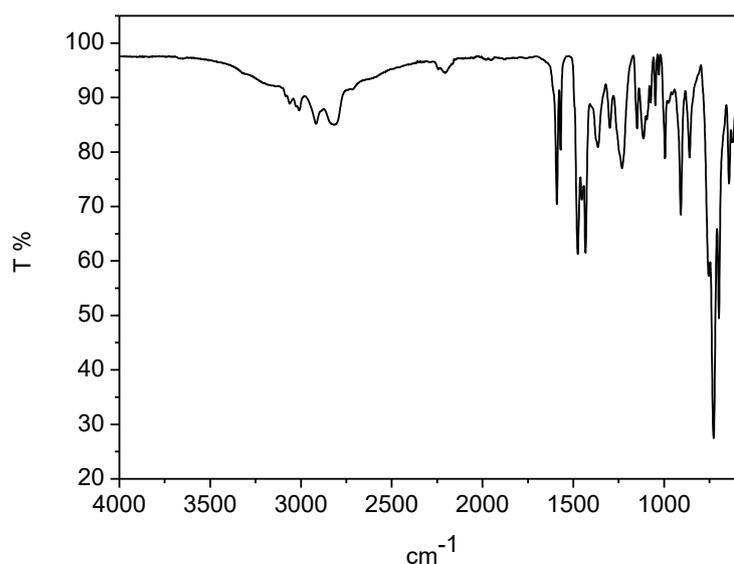
^1H NMR, δ_{H} (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,28 (s, 3H_{CH_3}); 3,69 (s, 2H_{CH_2}); 3,76 (s, 2H_{CH_2}); 3,81 (s, 2H_{CH_2}); 7,16 – 7,24 (m, 3H_{ar}); 7,28 – 7,40 (m, 7H_{ar}); 7,67 (m, 1H_{ar}); 8,59 (m, 1H_{py}); 10,32 (s, $1\text{H}_{\text{aldeído}}$).

4.3.1.4 Síntese do bpapyff – 2-[(N-benzil-N-2-piridilmetilamina)]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil]fenol



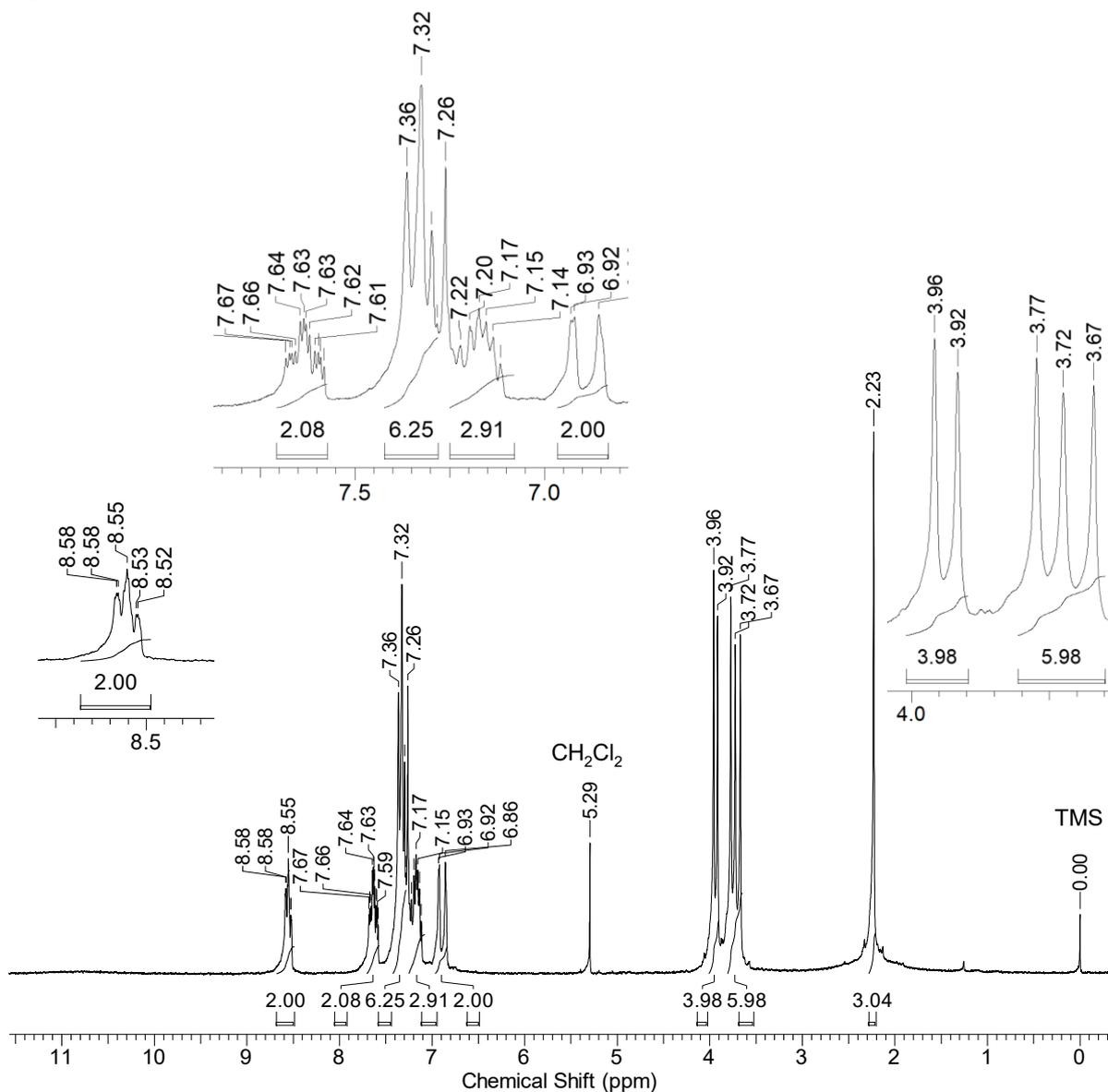
O precursor bpapyff foi sintetizado conforme descrito na literatura (Piovezan, C., *et al.*, 2012). Em um balão de 125 mL contendo 1,23 g de bpamff (3,55 mmol; 346,42 g mol⁻¹) diluídos em 20 mL de MeOH foram adicionados lentamente 0,38 g de 2-(aminometil)piridina (3,55 mmol; 108,14 g mol⁻¹; 1,049 g mL⁻¹) diluídos em 20 mL de MeOH a 0° C. A mistura reacional foi agitada durante 4 h a temperatura ambiente. Após o solvente foi retirado em rotaevaporador e em seguida foram adicionados 25 mL de HCl 2 mol L⁻¹. A fase aquosa foi lavada com 5 × 10 mL de CH₂Cl₂ para remover o excesso de bpamff. A fase aquosa foi então alcalinizada com Na₂CO₃ (pH 10) e lavada com 4 × 10 mL de CH₂Cl₂. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente foi retirado em rotaevaporador. Um óleo amarelo foi obtido com rendimento de 75% em relação ao bpamff. O bpapyff foi caracterizado por IR e ¹H NMR.

Figura 18 Espectro de IR do bpapyff (ATR).



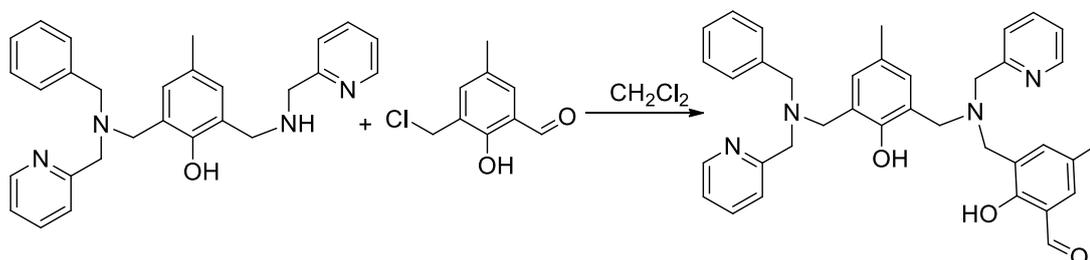
IR em cm^{-1} : ν (C-H_{alif} e C-H_{ar}) 3063-2812; ν (C=N e C=C) 1590-1432; δ (O-H_{fenol}) 1372; ν (C-O_{fenol}) 1234; δ (C-H_{ar}) 761-694.

Figura 19 Espectro de ^1H NMR do bpapyff em CDCl_3 - 200 MHz.

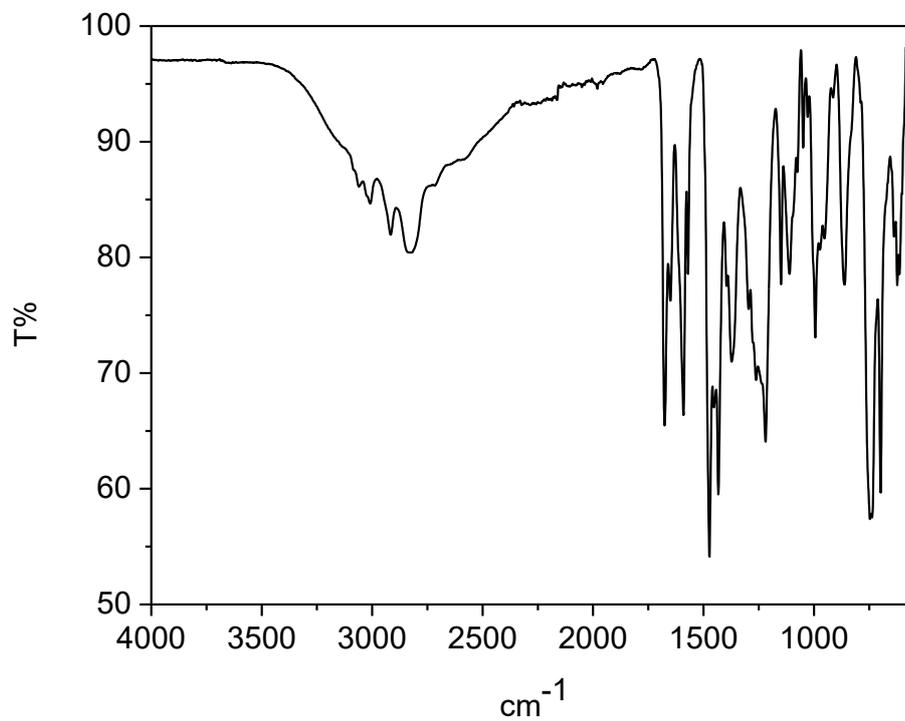


^1H NMR, δ_{H} (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,23 (s, 3H_{CH₃}); 3,67 (s, 2H_{CH₂}); 3,72 (s, 2H_{CH₂}); 3,77 (s, 2H_{CH₂}); 3,92 (s, 2H_{CH₂}); 3,96 (s, 2H_{CH₂}); 6,86 – 6,93 (m, 2H_{ar}); 7,14 – 7,17 (m, 3H_{ar}); 7,28 – 7,36 (m, 6H_{ar}); 7,63 – 7,71 (m, 2H_{ar}); 8,52 – 8,58 (m, 2H_{py}).

4.3.1.5 Síntese do H₂bppamff – 2-[(N-benzil-N-2-piridilmetilamina)]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formilfenol

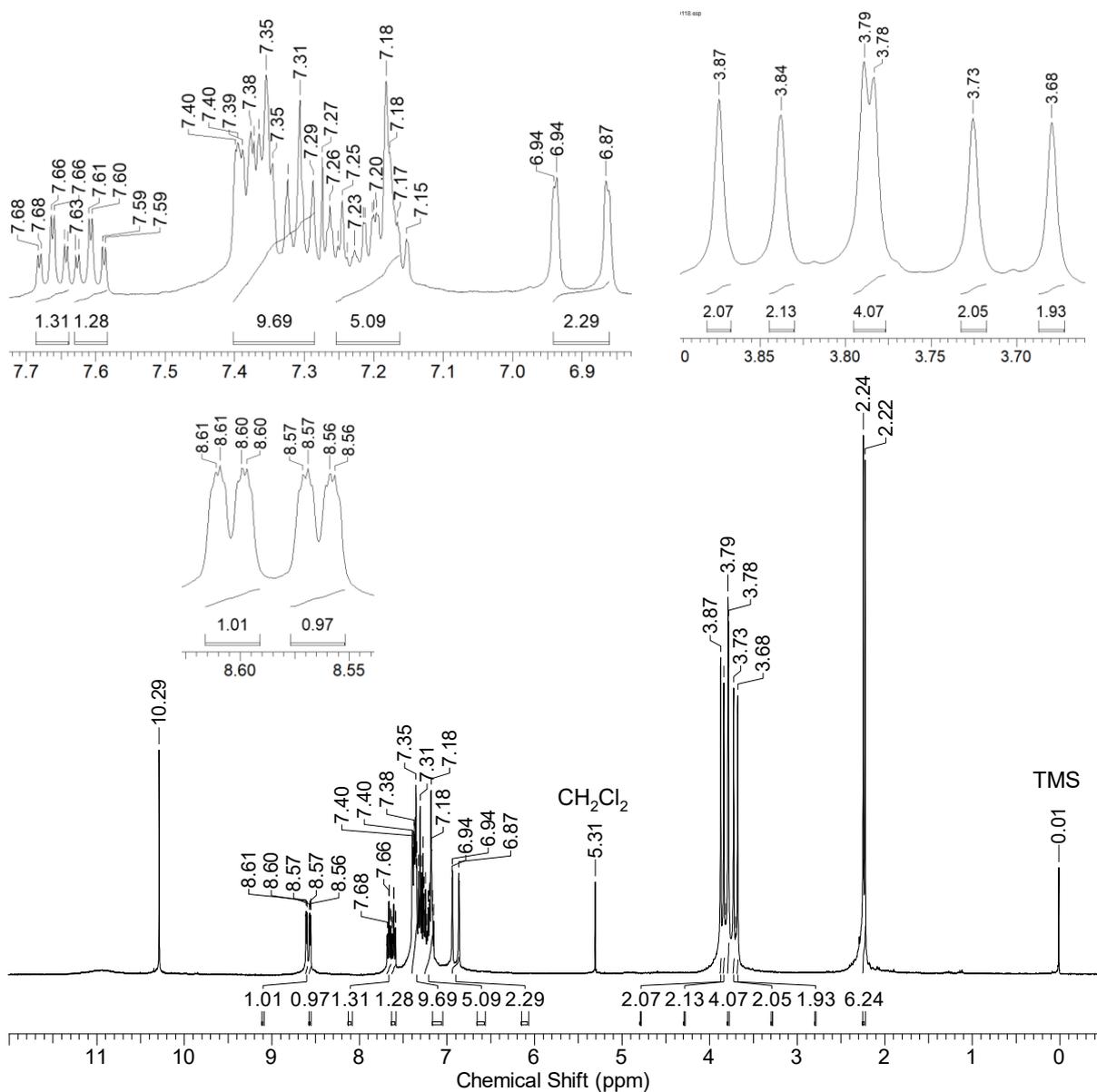


O ligante H₂bppamff foi sintetizado conforme descrito na literatura (Piovezan, C., *et al.*, 2012). Em um balão de 125 mL contendo uma solução de 1,16 g de bpapyff (2,65 mmol; 438,56 g mol⁻¹) dissolvidos em 15 mL de CH₂Cl₂, foram adicionados, sob agitação e banho de gelo, 0,25 g de Et₃N (2,65 mmol; 101,18 g mol⁻¹; 0,726 g mL⁻¹). Após, ainda sob agitação e banho de gelo, foram adicionados 0,49 g de 3-(clorometil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (2,65 mmol; 184,62 g mol⁻¹) dissolvidos em 20 mL de CH₂Cl₂ com funil de adição. O sistema foi deixado sob agitação em temperatura ambiente por aproximadamente 24 h. Após o composto foi lavado com 6 × 15 mL de NaHCO₃. A fase orgânica foi então seca com Na₂SO₄ e o solvente foi retirado em rotaevaporador. Uma espuma sólida amarela foi obtida com rendimento de 77% em relação ao bpapyff. O H₂bppamff foi caracterizado por IR, ¹H NMR e ESI-MS ([H₂bppamff]⁺ + 1H⁺, *m/z* = 587,29).

Figura 20 Espectro de IR do H₂bppamff (ATR).

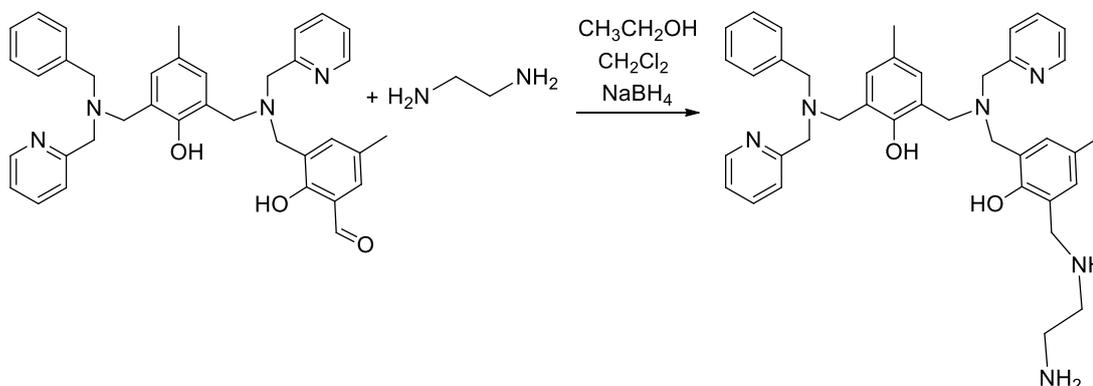
IR em cm⁻¹: ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}) 3087-2825; ν (C=O_{Ald}) 1677; ν (C=N e C=C) 1596-1475; δ (O-H_{fenol}) 1370; ν (C-O_{Ald}) 1219; δ (C-H_{Ar}) 788-735.

Figura 21 Espectro de ^1H NMR do $\text{H}_2\text{bppamff}$ em CDCl_3 - 400 MHz.

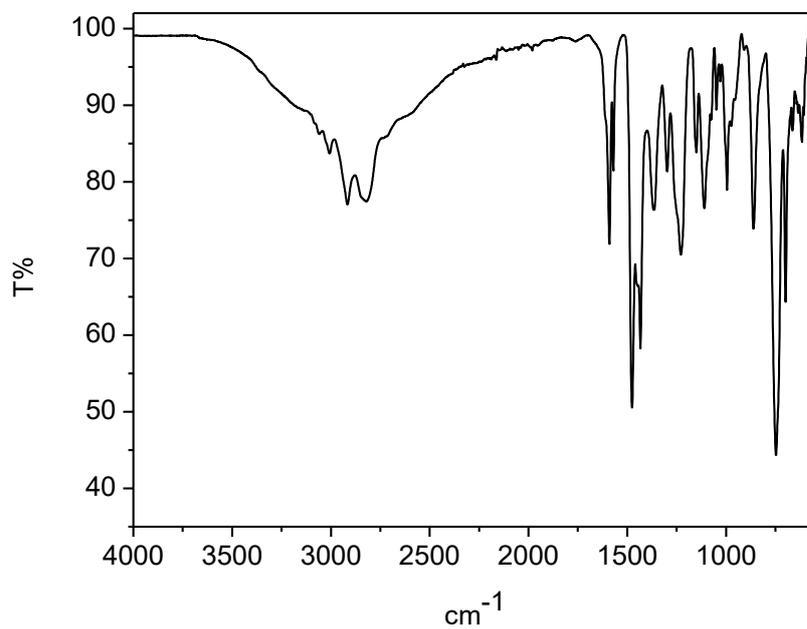


^1H NMR, δ_{H} (400 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,22 (s, 3H_{CH_3}); 2,24 (s, 3H_{CH_3}); 3,68 (s, 2H_{CH_2}); 3,73 (s, 2H_{CH_2}); 3,78, 3,79 (s, 4H_{CH_2}); 3,84 (s, 2H_{CH_2}); 3,87 (s, 2H_{CH_2}); 6,87 – 6,94 (m, 2H_{ar}); 7,15 – 7,26 (m, 4H_{ar}); 7,29 – 7,40 (m, 7H_{ar}); 7,61 (m, 1H_{ar}); 7,66 (m, 1H_{ar}); 8,56 (m, 1H_{py}); 8,60 (m, 1H_{py}); 10,29 (s, $1\text{H}_{\text{aldeído}}$).

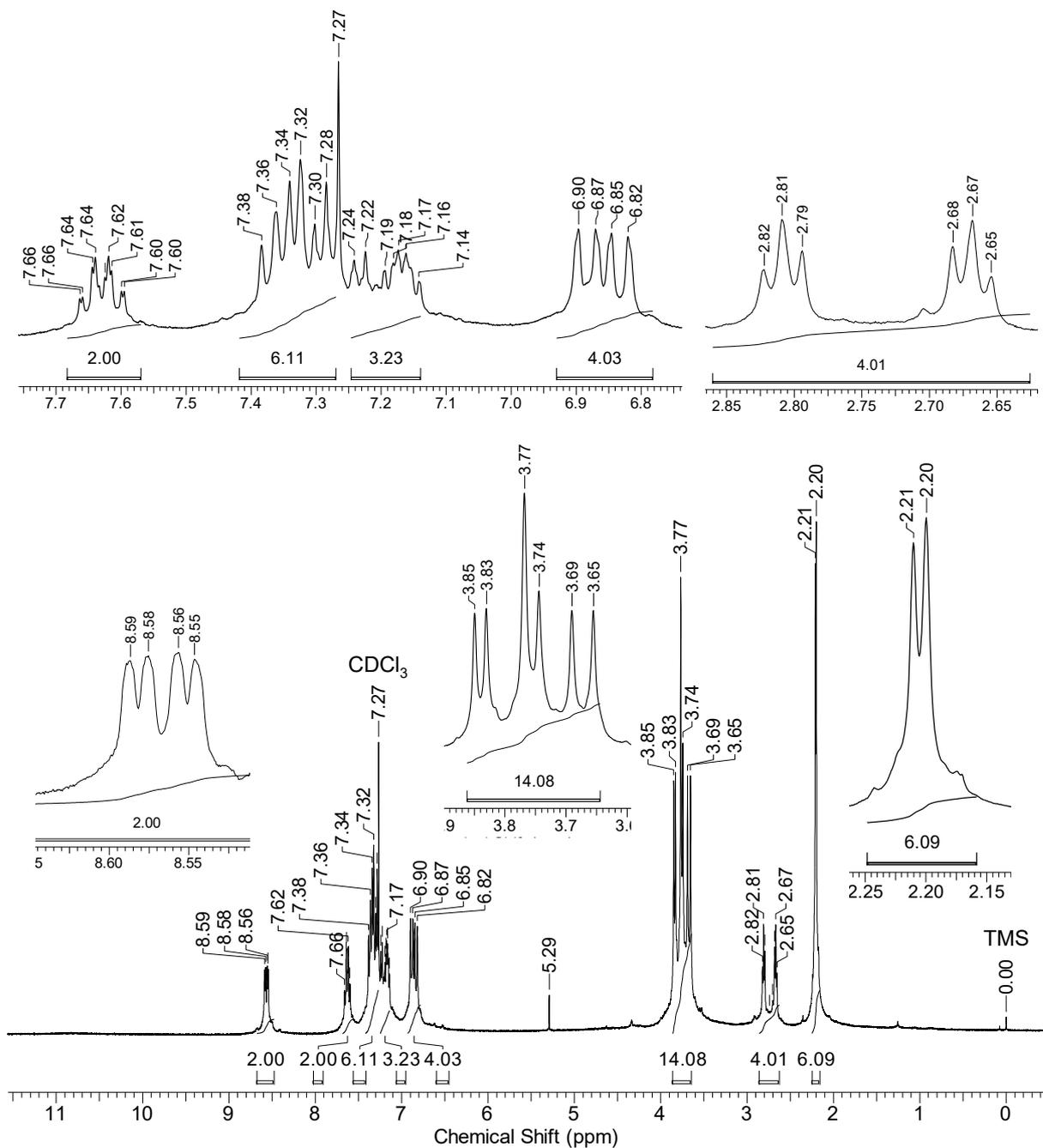
4.3.1.6 Síntese do H₂LEt – 2-[(N-benzil-N-2-piridilmetilamina)]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil]-6-((2-aminoetil)amino)metilfenol



Em um balão de 500 mL contendo uma solução de 4,20 g (70 mmol; 60,10 g mol⁻¹; 0,899 g mL⁻¹) de etilenodiamina em 150 mL de EtOH/CH₂Cl₂ (2:1) foi adicionada uma solução de 4,10 g (7 mmol; 586,72 g mol⁻¹) de H₂bppamff dissolvidos em 50 mL de EtOH com funil de adição. A solução permaneceu sob agitação a temperatura ambiente *overnight*. Após foram adicionados 3,18 g (84 mmol; 37,83 g mol⁻¹) de NaBH₄ em pequenas porções durante aproximadamente uma hora, e o sistema permaneceu sob agitação a temperatura ambiente durante 2 horas. Adicionou-se HCl 6 mol L⁻¹ até pH 5, e então o solvente foi retirado em rotaevaporador. Foram adicionados 30 mL de CHCl₃ e o produto foi lavado com NaHCO₃ (sat) (2 × 25 mL) e NaCl (sat) (3 × 15 mL). Após a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente foi retirado em rotaevaporador. Uma espuma sólida rosa claro foi obtida com rendimento de 93% em relação ao H₂bppamff. Anal. calc. (experimental) para C_{39,5}H₄₉ClN₆O₃: C, 68,63 (68,97); H, 7,14 (7,26); N, 12,16 (12,15). O ligante H₂LEt também foi caracterizado por IR, ¹H NMR, ¹³C NMR e ESI-MS ([H₂LEt] + 1H⁺, m/z = 631,35).

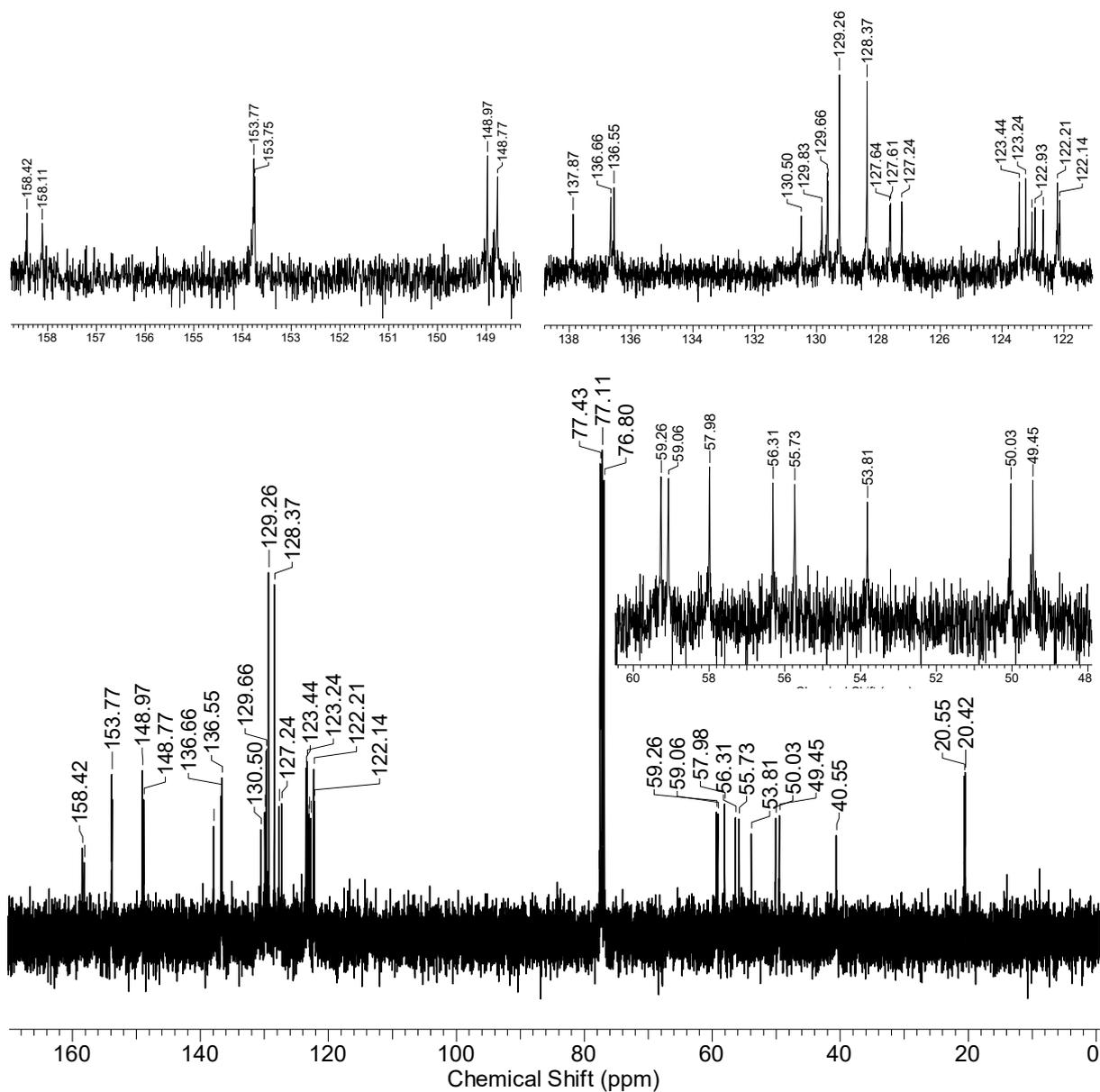
Figura 22 Espectro de IR do H₂LEt (ATR).

IR em cm⁻¹: ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}) 3066-2825; ν (C=N e C=C) 1589-1432; δ (O-H_{fenol}) 1365; ν (C-O_{fenol}) 1228; δ (C-H_{Ar}) 746-698.

Figura 23 Espectro de ^1H NMR do H_2LEt em CDCl_3 - 400 MHz.

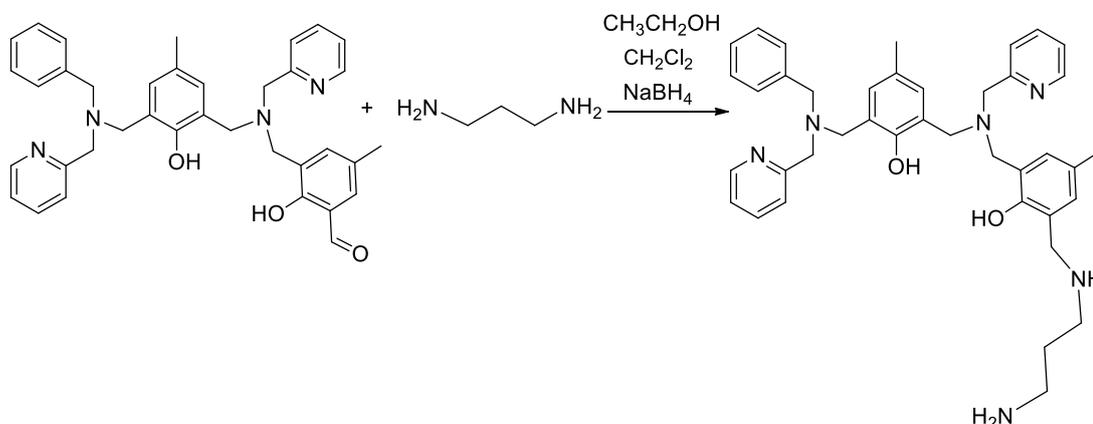
^1H NMR, δ_{H} (400 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,20 (s, 3H_{CH_3}); 2,21 (s, 3H_{CH_3}); 2,65 – 2,68 (2H_{CH_2} , t, $J = 5,7$ Hz); 2,81 (2H_{CH_2} , t, $J = 5,7$ Hz); 3,65 (s, 2H_{CH_2}); 3,69 (s, 2H_{CH_2}); 3,74 (s, 2H_{CH_2}); 3,77 (s, 4H_{CH_2}); 3,83 (s, 2H_{CH_2}); 3,85 (s, 2H_{CH_2}); 6,82 – 6,90 (m, 4H_{ar}); 7,14 – 7,24 (m, 3H_{ar}); 7,28 – 7,38 (m, 6H_{ar}); 7,60 – 7,66 (m, 2H_{ar}); 8,55 – 8,59 (d, 2H_{py}).

Figura 24 Espectro de ^{13}C NMR do ligante H_2LEt em CDCl_3 – 100 MHz.

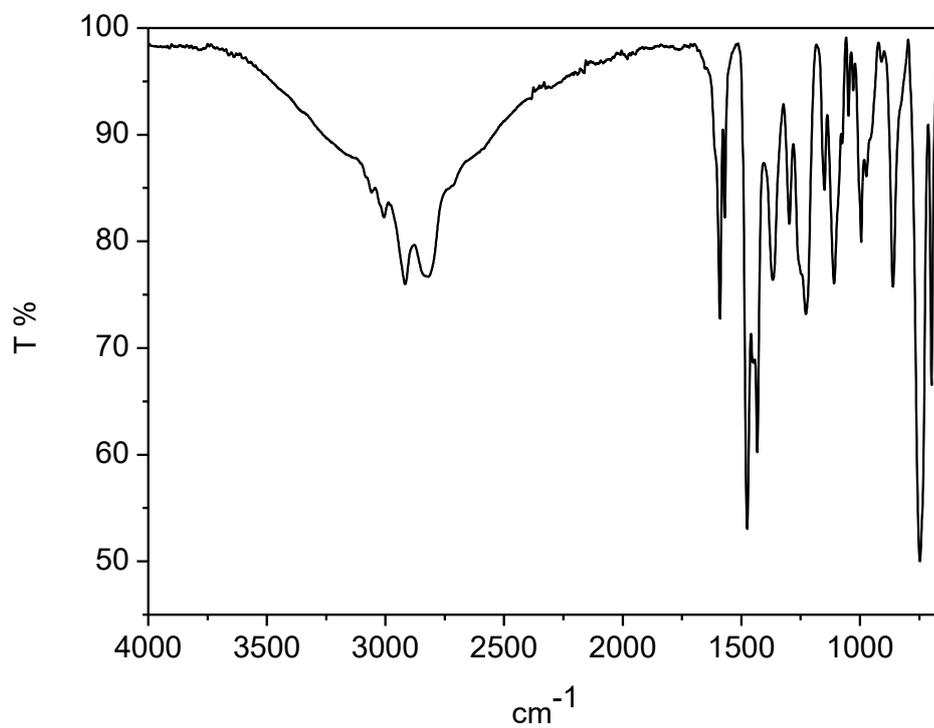


^{13}C NMR – δ_{C} (100 MHz; CDCl_3), em ppm: 20,42; 20,55; 40,55; 49,45; 50,03; 53,81; 55,73; 56,31; 57,98; 59,06; 59,26; 122,14; 122,21; 122,67; 122,93; 123,04; 123,24; 123,44; 123,44; 127,24; 127,61; 127,64; 128,37; 128,37; 129,26; 129,26; 129,64; 129,66; 129,83; 130,50; 136,55; 136,66; 137,87; 148,77; 148,97; 153,75; 153,77; 158,11; 158,42.

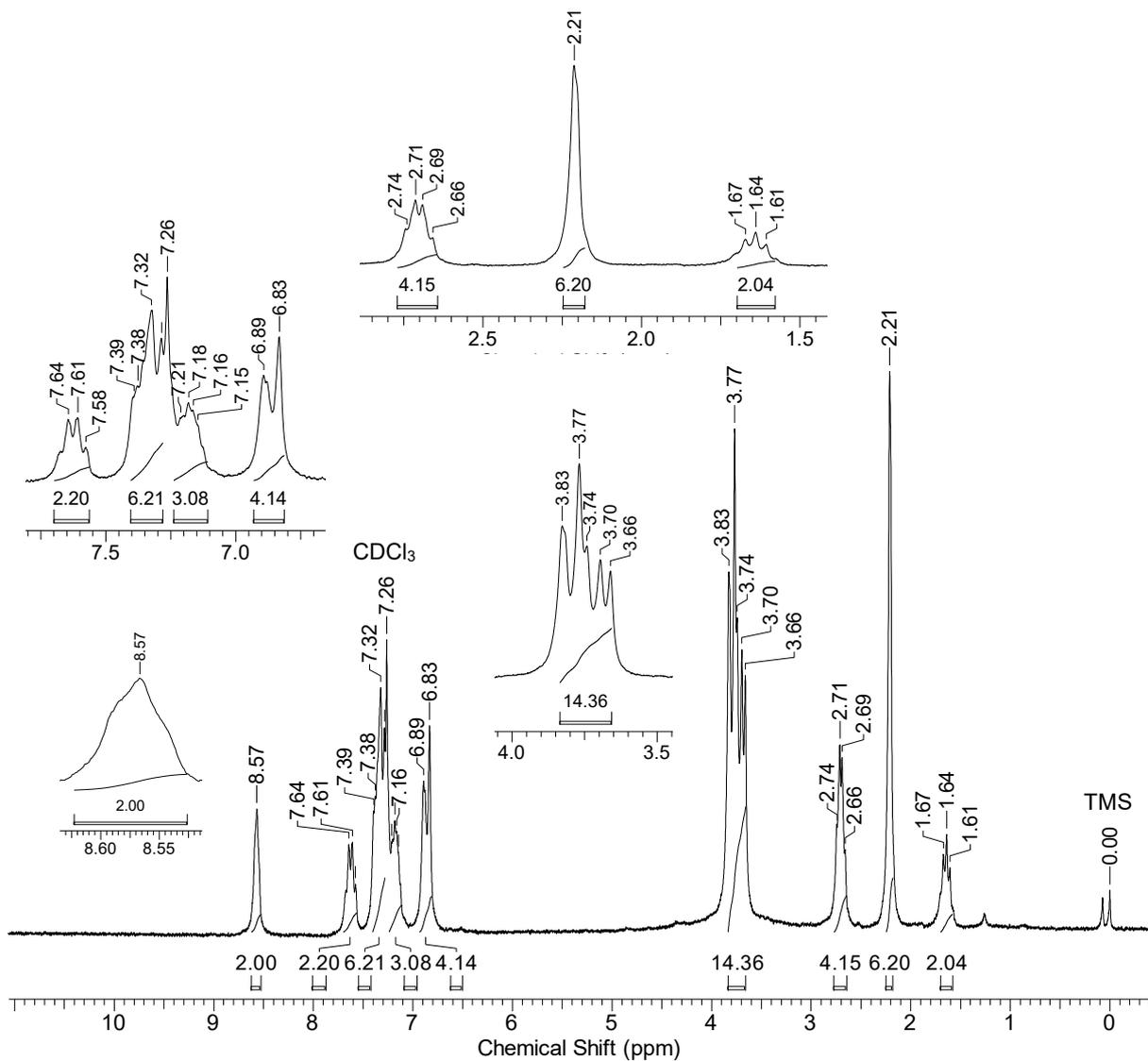
4.3.1.7 Síntese do H₂LProp – 2-[(N-benzil-N-2-piridilmetilamina)]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil]-6-((2-aminopropil)amino)metilfenol



Em um balão de 500 mL foram adicionados 5,20 g (70 mmol; $74,13 \text{ g mol}^{-1}$; $0,886 \text{ g mL}^{-1}$) de 1,3-propanodiamina a uma solução de 150 mL de EtOH/ CH_2Cl_2 (2:1) sob agitação e banho de gelo. Em seguida foram adicionados 4,10 g (7 mmol; $586,72 \text{ g mol}^{-1}$) do ligante H₂bbpamff dissolvidos em 50 mL de EtOH, com funil de adição. O sistema permaneceu sob agitação a temperatura ambiente *overnight*. Após, sob agitação e banho de gelo foram adicionados 3,17 g (84 mmol; $37,83 \text{ g mol}^{-1}$) de NaBH_4 em pequenas porções durante aproximadamente 1 hora. Em seguida o sistema permaneceu sob agitação em temperatura ambiente por 4 h. Após foram adicionados $\text{HCl } 4 \text{ mol L}^{-1}$ até pH 5. O solvente foi removido em rotaevaporador e foram adicionados 30 mL de CHCl_3 ao balão e o produto foi lavado com NaHCO_3 (sat) ($3 \times 15 \text{ mL}$) e com NaCl ($2 \times 15 \text{ mL}$). Após a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e o solvente foi retirado em rotaevaporador. Obteve-se uma espuma sólida branca com rendimento de 64% em relação ao H₂bbpamff. Anal. calc. (experimental) para $\text{C}_{41}\text{H}_{52}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_3$: C, 65,85 (65,62); H 7,01 (6,97); N, 11,24 (11,15). O H₂LProp também foi caracterizado por IR, $^1\text{H NMR}$ $^{13}\text{C NMR}$ e ESI-MS ($[\text{H}_2\text{LProp}] + 1\text{H}^+$, $m/z = 645,46$).

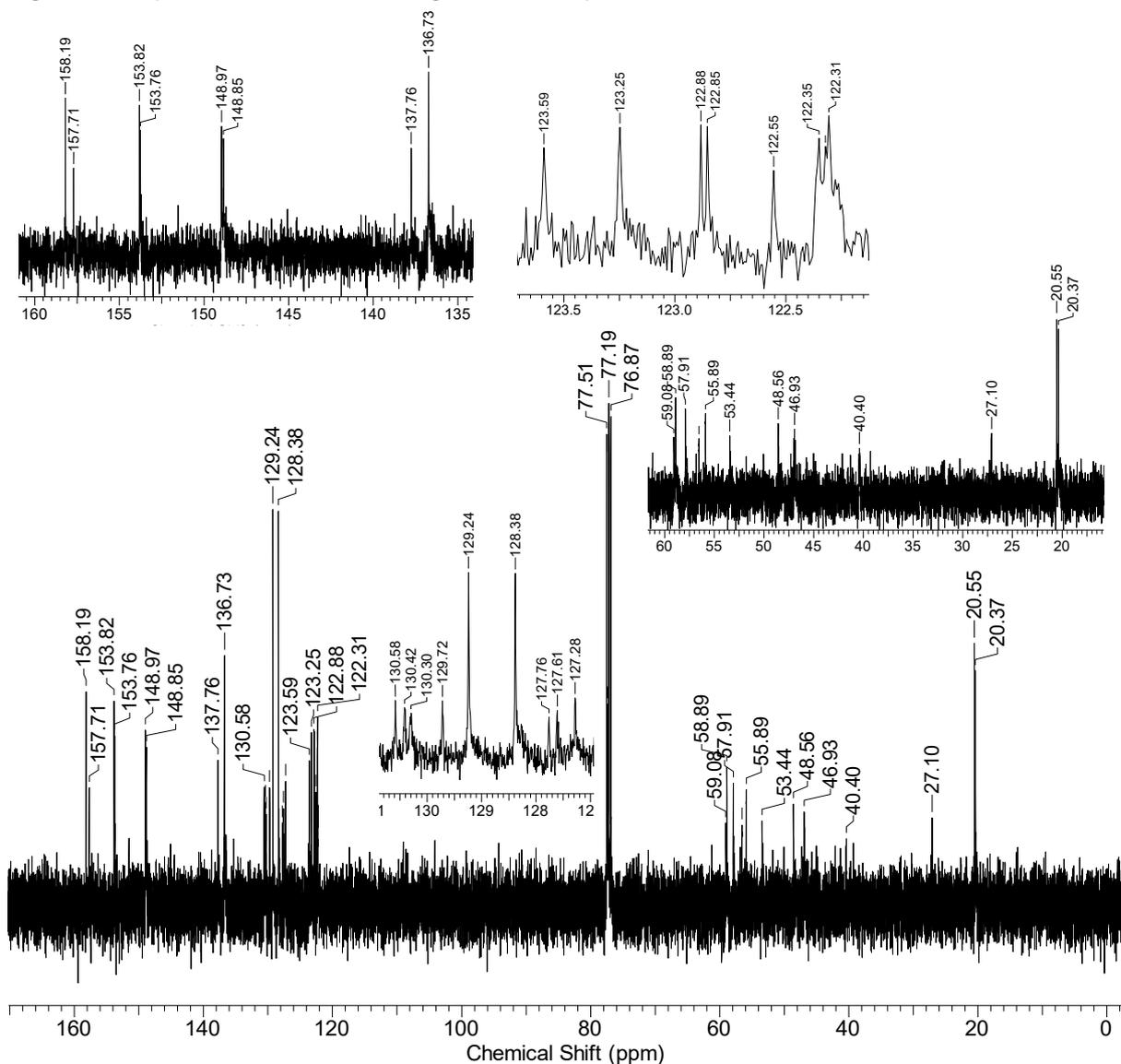
Figura 25 Espectro de IR do H₂LProp (ATR).

IR em cm⁻¹: ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}) 3061-2825; ν (C=N e C=C) 1588-1433; δ (O-H_{fenol}) 1365; ν (C-O_{fenol}) 1229; δ (C-H_{Ar}) 748-697.

Figura 26 Espectro de ^1H NMR do H_2LProp em CDCl_3 - 200 MHz.

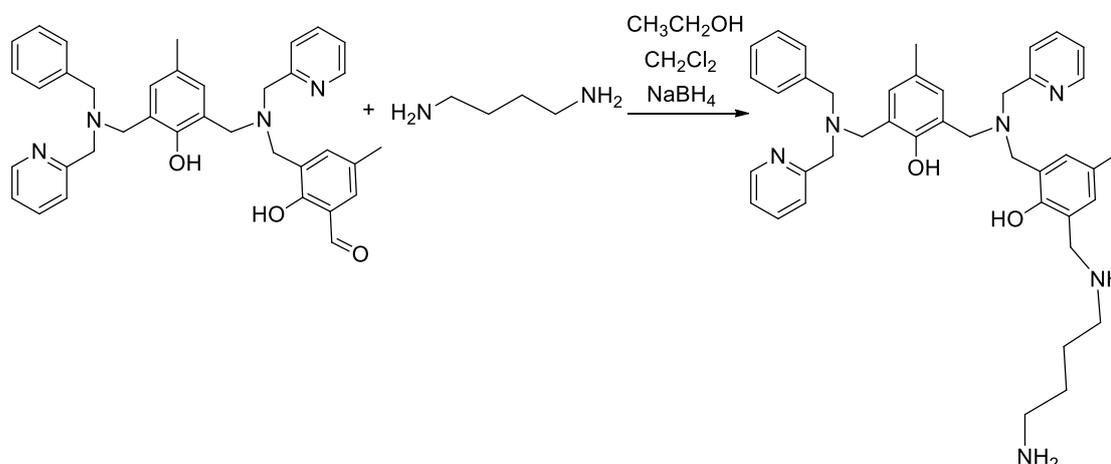
^1H NMR, δ_{H} (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 1,61 – 1,67 (m, 2H_{CH_2}); 2,21 (s, 6H_{CH_3}); 2,66 – 2,74 (m, 4H_{CH_2}); 3,66 – 3,83 (m, 14H_{CH_2}); 6,83 – 6,89 (m, 4H_{ar}); 7,15 – 7,21 (m, 3H_{ar}); 7,29 – 7,39 (m, 6H_{ar}); 7,58 – 7,64 (m, 2H_{ar}); 8,57 (m, 2H_{py}).

Figura 27 Espectro de ^{13}C NMR do ligante H_2LProp em CDCl_3 – 100 MHz.

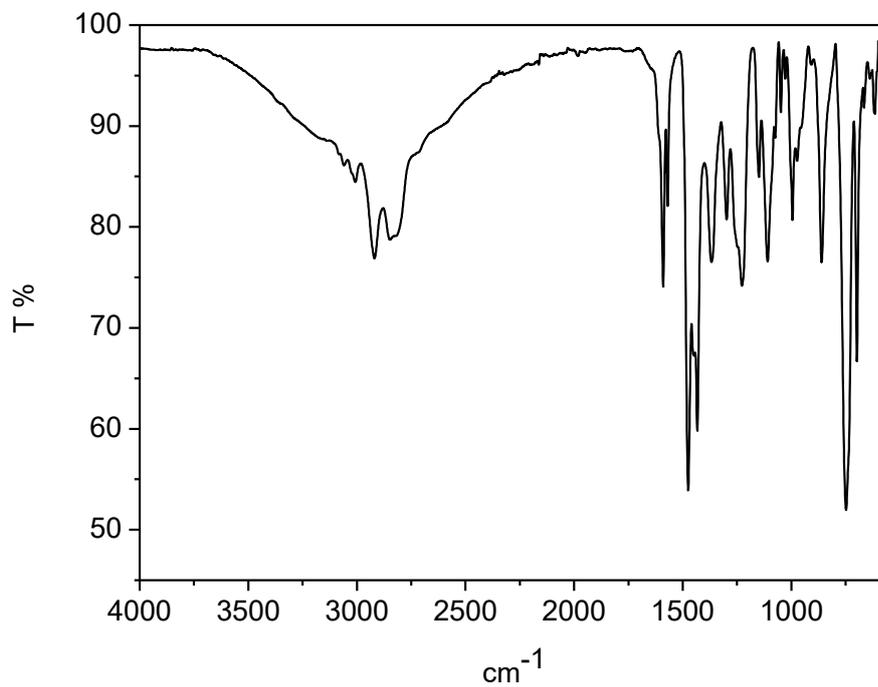


^{13}C NMR – δ_{C} (100 MHz; CDCl_3), em ppm: 20,37; 20,55; 27,10; 40,40; 46,93; 48,56; 53,44; 55,89; 56,55; 57,91; 58,89; 59,08; 122,31; 122,32; 122,35; 122,55; 122,85; 122,88; 123,25; 123,59; 127,28; 127,61; 127,76; 128,38; 128,38; 129,24; 129,24; 129,72; 130,30; 130,42; 130,58; 136,73; 136,76; 137,76; 148,85; 148,97; 153,76; 153,82; 157,71; 158,19.

4.3.1.8 Síntese do H₂LBut – 2-[(*N*-benzil-*N*-2-piridilmetilamina)]-4-metil-6-[*N*-(2-piridilmetil)aminometil]-6-((2-aminobutil)amino)metilfenol

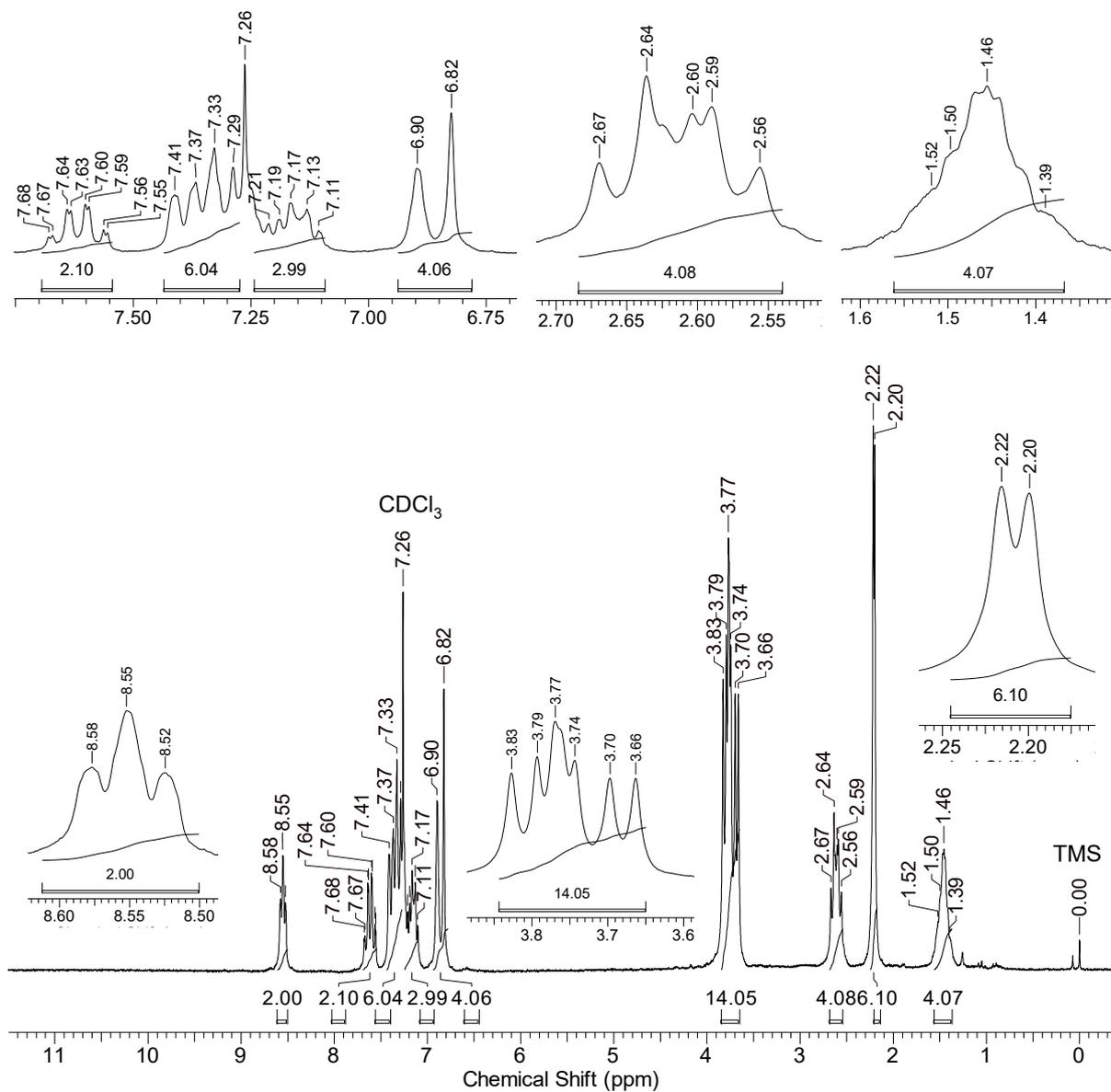


Em um balão de 500 mL contendo 7,05 g (80 mmol; 88,15 g mol⁻¹; 0,877 g mL⁻¹) de 1,4-butanodiamina solubilizados em 150 mL de EtOH/CH₂Cl₂ (2:1), sob agitação e banho de gelo, foram adicionados 4,69 g (8 mmol; 586,72 g mol⁻¹) do ligante H₂bppamff dissolvidos em 50 mL de EtOH com funil de adição. O sistema permaneceu sob agitação a temperatura ambiente *overnight*. Após, sob agitação e banho de gelo foram adicionados 3,63 g (96 mmol; 37,83 g mol⁻¹) de NaBH₄ em pequenas porções durante aproximadamente 1 hora. Em seguida o sistema permaneceu sob agitação em temperatura ambiente por 4 h. Após foram adicionados HCl 6 mol L⁻¹ até pH 5. O solvente foi removido em rotaevaporador e foram adicionados 30 mL de CHCl₃ ao balão e o produto foi lavado com NaHCO_{3(sat)} (4 × 15 mL) e com NaCl_(sat) (3 × 15 mL). Após a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente foi retirado em rotaevaporador. Obteve-se uma espuma sólida branca com rendimento de 98% em relação ao H₂bppamff. Anal. calc. (experimental) para C₄₁H₅₆Cl₂N₆O₄: C, 64,13 (64,15); H 7,35 (7,20); N 10,95 (10,73). O H₂LBut também foi caracterizado por IR, ¹H NMR, ¹³C NMR e ESI-MS ([H₂LBut]⁺ + 1H⁺, *m/z* = 659,45).

Figura 28 Espectro de IR do H₂LBut (ATR).

IR em cm⁻¹: ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}) 3088-2825; ν (C=N e C=C) 1592-1432; δ (O-H_{fenol}) 1367; ν (C-O_{fenol}) 1227; δ (C-H_{Ar}) 748-696.

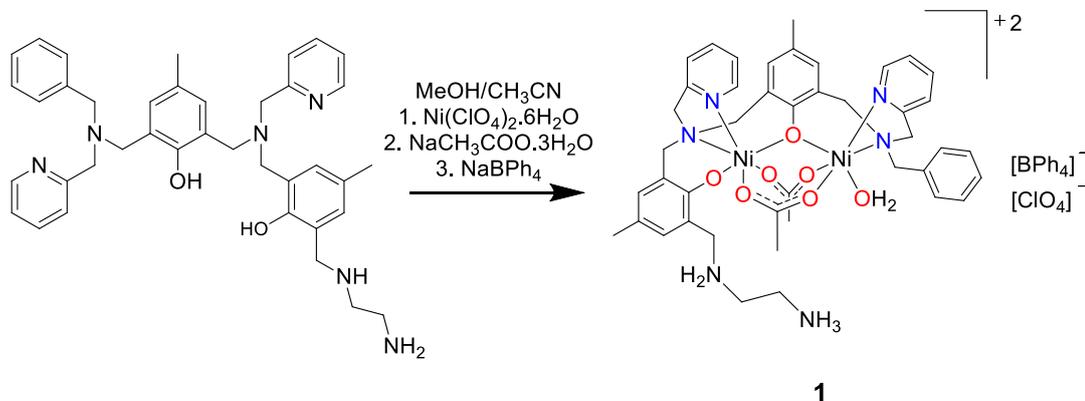
Figura 29 Espectro de ^1H NMR do H_2LBut em CDCl_3 - 200 MHz.



^1H NMR, δ_{H} (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 1,39 – 1,52 (m, 4H_{CH_2}); 2,20 – 2,22 (s, 6H_{CH_3}); 2,56 – 2,67 (m, 4H_{CH_2}); 3,66 – 3,83 (m, 14H_{CH_2}); 6,82 (s, 2H_{ar}); 6,90 (s, 2H_{ar}); 7,11 – 7,21 (m, 3H_{ar}); 7,29 – 7,41 (m, 6H_{ar}); 7,55 – 7,68 (m, 2H_{ar}); 8,55 (m, 2H_{py}).

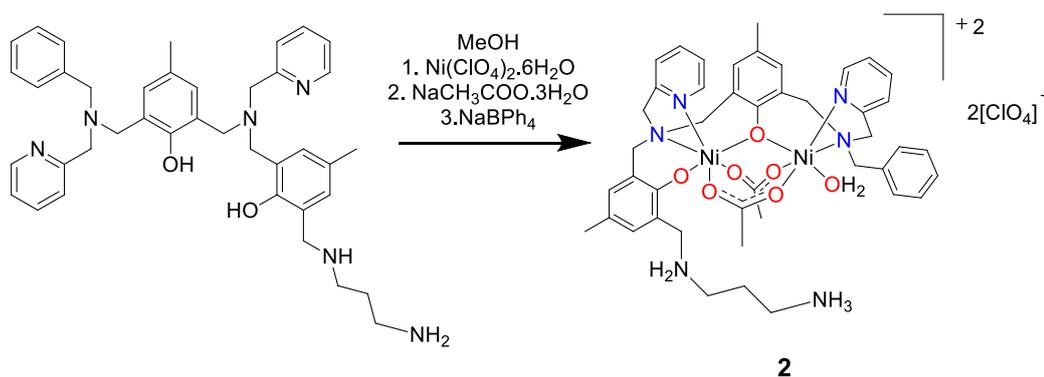
4.3.2 Síntese dos complexos

4.3.2.1 Síntese do complexo $[\text{Ni}_2(\text{H}_2\text{LEt})(\mu\text{-OAc})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)(\text{BPh}_4)$ (**1**)



Em um béquer de 100 mL foram solubilizados 0,37 g de $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol; 365 g mol^{-1}) em 10 mL de metanol sob agitação e leve aquecimento ($55 \text{ }^\circ\text{C}$), após foram adicionados 0,32 g de H_2LEt (0,5 mmol; $630,82 \text{ g mol}^{-1}$) solubilizados em $\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{CN}$ (2:1 v/v). Após foram adicionados 0,14 g de $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol; $136,08 \text{ g mol}^{-1}$) seguido de 0,17 g de NaBPh_4 (0,5 mmol; $342,22 \text{ g mol}^{-1}$). Após recristalização em uma solução 1:1 (v/v) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Hexano}$, um pó verde foi obtido com rendimento de 68% com relação ao H_2LEt . m/z : 803,31. Anal. calc. (experimental) para $\text{Ni}_2\text{C}_{68}\text{H}_{78}\text{BCl}_3\text{N}_6\text{O}_{12}$: C, 58,09 (57,76); H, 5,59 (5,70); N, 5,98 (6,35). Absorção atômica, em mg L^{-1} (teórico): Ni = $2,97 \pm 0,0034$ (3,07).

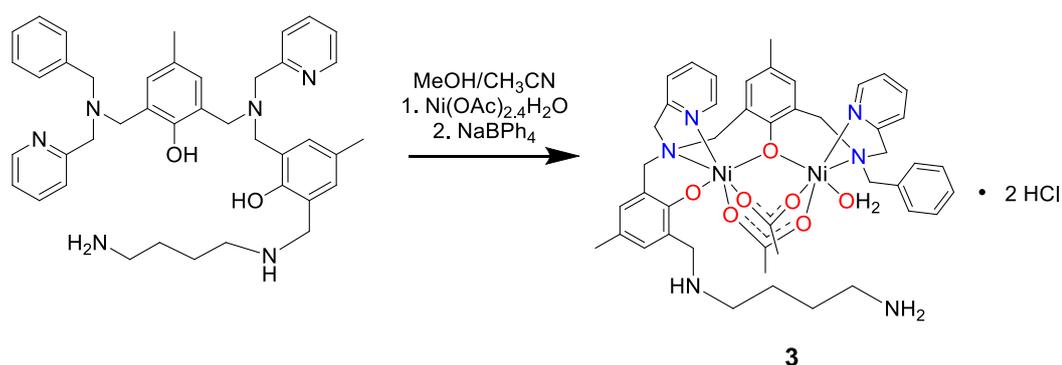
4.3.2.2 Síntese do complexo $[\text{Ni}_2(\text{H}_2\text{LProp})(\mu\text{-OAc})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ (**2**)



Em um béquer de 150 mL foram solubilizados 0,32 g de H_2LProp (0,5 mmol; $644,82 \text{ g mol}^{-1}$) em 10 mL de MeOH sob agitação e leve aquecimento ($40 \text{ }^\circ\text{C}$), após foram adicionados 0,37 g de $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol; $365,70 \text{ g mol}^{-1}$). Após foram adicionados 0,14 g de $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol; $136,08 \text{ g mol}^{-1}$) seguido de 0,17 g

de NaBPh₄ (0,5 mmol; 342,22 g mol⁻¹). Após recristalização em uma solução 1:1 (v:v) AcOEt/Acetona, um pó verde foi obtido com rendimento de 57% com relação ao H₂LProp. *m/z* 877,37. Anal. calc. (experimental) para Ni₂C₅₇H₆₈B_{0.5}Cl₄N₆Na_{0.5}O₁₅: C, 50,59 (50,68); H, 5,06 (5,08); N, 6,21 (6,20). Absorção atômica, em mg L⁻¹ (teórico): Ni = 2,77±0,0171 (3,04).

4.3.2.3 Síntese do complexo [Ni₂(LBut)(μ-OAc)₂(H₂O)]·(HCl)₂ (**3**)



Em um béquer de 100 mL foram solubilizados 0,33 g de H₂LBut (0,5 mmol; 658,82 g mol⁻¹) em 10 mL de MeOH/CH₃CN (2:1 v/v) sob agitação e leve aquecimento (40 °C), após foram adicionados 0,25 g de Ni(OAc)₂·4H₂O (1 mmol; 248,86 g mol⁻¹). Após foram adicionados 0,34 g de NaBPh₄ (1 mmol; 342,22 g mol⁻¹). Após duas semanas obteve-se um pó verde com rendimento de 94% com relação ao H₂LBut. *m/z* 1007,32. Anal. calc. (experimental) para Ni₂C₉₃H₉₈B₂Cl₂N₆Na₂O₇: C, 66,98 (66,67); H, 5,92 (5,91); N, 5,04 (5,54). Absorção atômica, em mg L⁻¹ (teórico): Ni = 3,36±0,0114 (3,02).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção serão apresentadas as caracterizações e respectivas discussões relativas às sínteses dos ligantes e complexos, bem como os estudos de reatividade dos complexos frente ao substrato modelo 2,4-BDNPP.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES

Os precursores e os ligantes sintetizados neste trabalho foram obtidos com grau de pureza adequados e com bons rendimentos. Os precursores e os ligantes foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia IR e ^1H NMR, sendo também utilizada a técnica de ^{13}C NMR, espectrometria de massas e de análise elementar de CHN para a caracterização dos ligantes finais.

5.1.1 Análise elementar de C, H e N

Os ligantes sintetizados foram caracterizados por análise elementar de CHN, uma técnica utilizada para determinar as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio em uma amostra, possibilitando assim avaliar a composição química destes. Os resultados foram concordantes com as fórmulas moleculares propostas, apresentando uma boa correlação entre os valores calculados e experimentais e encontram-se listados na Tabela 2. Para o ligante H_2LEt foi proposta a fórmula molecular $\text{C}_{39,5}\text{H}_{49}\text{ClN}_6\text{O}_3$, referente à espécie $[\text{H}_2\text{LEt} + 0,5 \text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O}]$. Para o ligante H_2LProp foi proposta a fórmula molecular $\text{C}_{41}\text{H}_{52}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_3$, referente à espécie $[\text{H}_2\text{LProp} + \text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O}]$, e para o ligante H_2LBut foi proposta a fórmula molecular $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4$, referente à espécie $[\text{H}_2\text{LBut} + 2 \text{HCl} + 2 \text{H}_2\text{O}]$.

Tabela 2 Porcentagens de C, H e N para os ligantes sintetizados via análise elementar.

Ligante	H_2LEt	H_2LProp	H_2LBut
%C	68,97/68,63	65,62/65,85	64,15/64,13
%H	7,26/7,14	6,97/7,01	7,20/7,35
%N	12,15/12,16	11,15/11,24	10,73/10,95
Fórmula Molecular	$\text{C}_{39,5}\text{H}_{49}\text{ClN}_6\text{O}_3$	$\text{C}_{41}\text{H}_{52}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_3$	$\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4$

5.1.2 Espectroscopia no infravermelho (IR)

Os precursores e os ligantes foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho e as principais bandas foram atribuídas (Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., 2007; Pavia, D. L. *et al.*, 2010) pois, com a comparação dessas bandas, foi possível acompanhar a formação dos compostos em cada etapa a partir da presença ou ausência das mesmas.

A Figura 31 apresenta a sobreposição dos espectros IR dos precursores bpa, bpamff e bpapyff. Pode-se observar, para o bpa, o estiramento referente às ligações N-H (3300 cm^{-1}) e a ausência de uma banda de estiramento C=O, indicando que o produto bpa foi formado. São observadas também bandas de deformação axial das ligações C-H aromáticas ($3060 - 3000\text{ cm}^{-1}$) e C=C (1596 cm^{-1}). Na região de 2916 a 2820 cm^{-1} estão presentes bandas de deformação axial C-H referentes aos grupos metilênicos e, na região de 750 a 696 cm^{-1} , observa-se a presença de duas bandas de deformação angular fora do plano, referente às ligações C-H provenientes dos anéis aromáticos. Para o precursor bpamff, observa-se a presença de uma banda referente ao estiramento da ligação C=O do grupo aldeído em 1675 cm^{-1} , indicando que o produto bpamff foi formado. São observadas também bandas de deformação axial das ligações C-H aromáticas ($3060 - 3000\text{ cm}^{-1}$) e C=C (1594 cm^{-1}). Na região de 2920 a 2800 cm^{-1} estão presentes bandas de deformação axial C-H referentes aos grupos metilênicos e, na região de 760 a 697 cm^{-1} , observa-se a presença de duas bandas de deformação angular fora do plano, referente às ligações C-H provenientes dos anéis aromáticos. Na região do espectro entre 1400 e 1200 cm^{-1} é possível também observar bandas de estiramento referentes às ligações C-O e de deformação das ligações O-H do fenol, ausentes no espectro do bpa. Já para o bpapyff é possível observar a ausência da banda de estiramento da ligação C=O e, assim como para o bpamff, a presença de bandas de estiramento das ligações C-O e de deformação das ligações O-H referentes ao fenol do núcleo básico cmff na região de 1400 a 1200 cm^{-1} , além dos modos vibracionais similares aos anteriores no que diz respeito aos grupos aromáticos e alifáticos.

Na Tabela 3 estão sumarizadas as bandas relevantes dos precursores bpa, bpamff e bpapyff.

Figura 31 Espectros no IR dos precursores bpa (preto), bpamff (vermelho) e bpapyff (azul) (ATR).

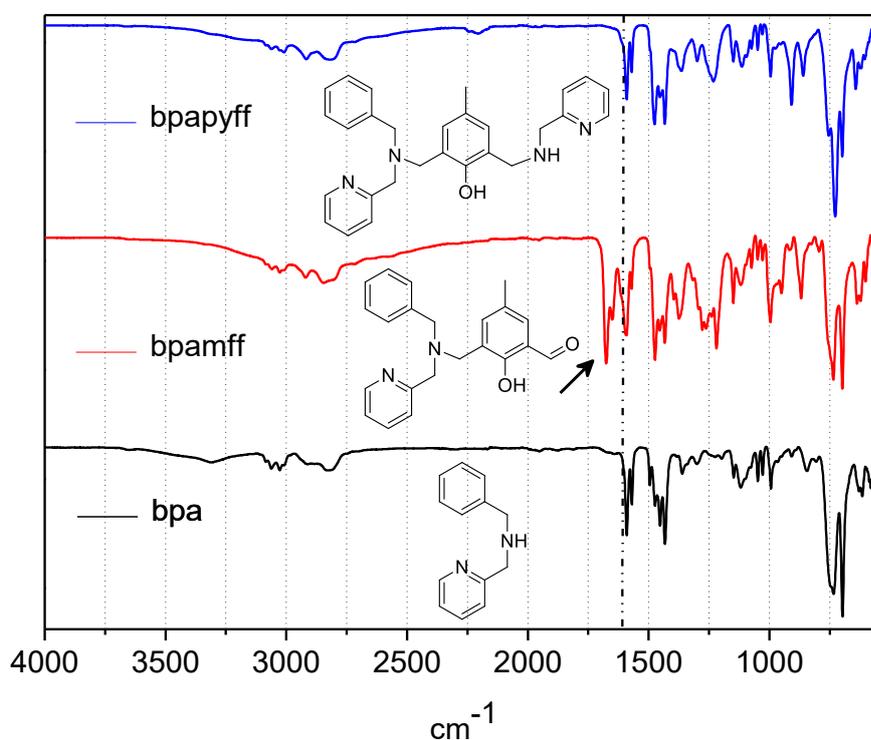


Tabela 3 Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) observados para precursores bpa, bpamff e bpapyff.

	bpa	bpamff	bpapyff
ν (N-H)	3300		
ν (C-H _{ar})	3060-3000	3060-3000	3063-3000
ν (C-H _{alif})	2916-2820	2920-2800	2917-2812
ν (C=O)		1675	
ν (C=N e C=C)	1596-1429	1594-1429	1590-1432
δ (O-H _{fenol})		1370	1372
ν (C-O _{fenol})		1218	1234
δ (C-H _{ar})	750-696	760-697	761-694

A Figura 32 apresenta a sobreposição dos espectros de IR do ligante H₂bppamff e dos ligantes finais H₂LEt, H₂LProp e H₂LBut, em que pode-se observar a presença de uma banda de estiramento da ligação C=O do grupo aldeído para o ligante H₂bppamff em 1677 cm^{-1} , sendo que para os demais ligantes esta banda não está presente, indicando assim que os ligantes com grupamentos amino na cadeia

lateral foram obtidos, apesar de não se observar bandas na região de $3500 - 3200 \text{ cm}^{-1}$, referentes ao estiramento das ligações N-H das aminas. Observa-se ainda que, afóra a presença do estiramento da carbonila para o ligante contendo o grupo aldeído, os espectros de todos os ligantes apresentam modos vibracionais similares referentes aos estiramentos da ligação C-H aromáticas ($3070 - 3030 \text{ cm}^{-1}$), à deformação axial C-H referentes aos grupos metilênicos ($2930 - 2820 \text{ cm}^{-1}$), às bandas de estiramento referentes às ligações C-O e de deformação referentes às ligações O-H do fenol ($1220 - 1400 \text{ cm}^{-1}$) e bandas de deformação angular fora do plano, referente às ligações C-H provenientes dos anéis aromáticos ($695 - 740 \text{ cm}^{-1}$). A Tabela 4 apresenta as bandas relevantes dos ligantes binucleantes $\text{H}_2\text{bppamff}$, H_2LEt , H_2LProp e H_2LBut .

Figura 32 Espectros no IR dos ligantes $\text{H}_2\text{bppamff}$ (preto), H_2LEt (vermelho), H_2LProp (azul) e H_2LBut (verde) (ATR).

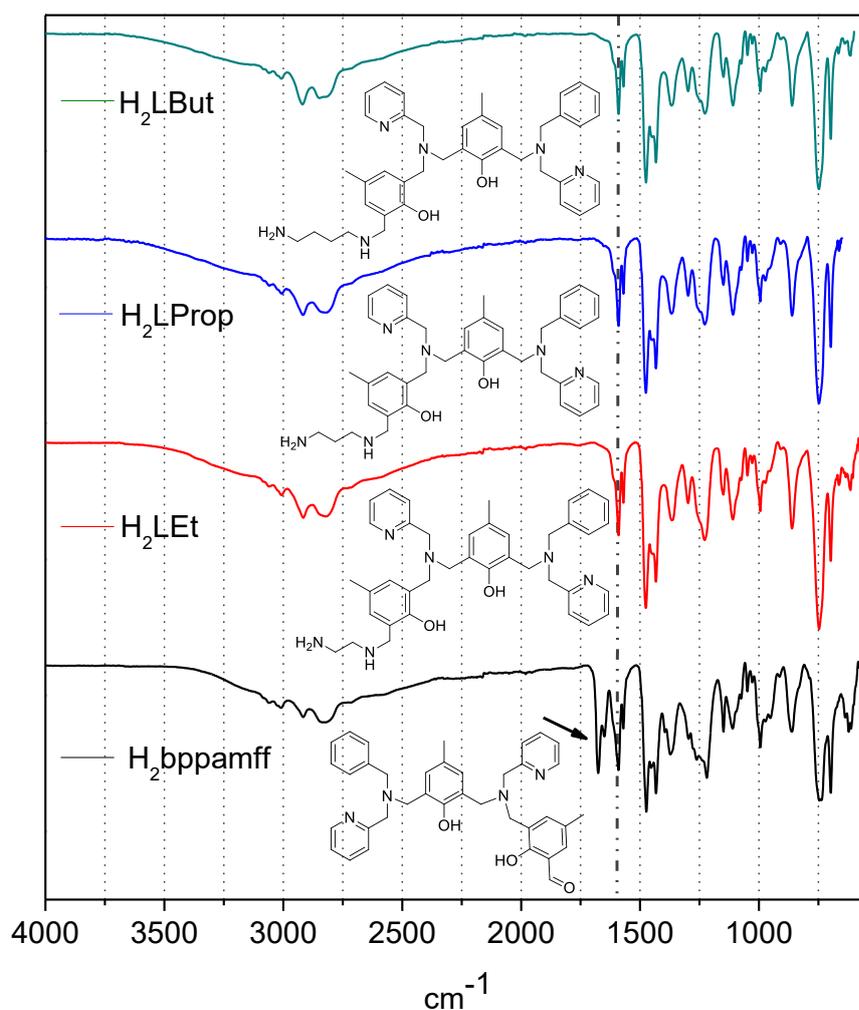


Tabela 4 Modos vibracionais e números de onda (cm^{-1}) observados para os ligantes $\text{H}_2\text{bppamff}$, H_2LEt , H_2LProp e H_2LBut .

	$\text{H}_2\text{bppamff}$	H_2LEt	H_2LProp	H_2LBut
ν (C-H_{ar})	3087	3066	3061	3088
ν (C-H_{alif})	2947-2825	2947-2825	2947-2825	2947-2825
ν (C=O)	1677			
ν (C=N e C=C)	1596-1475	1589-1432	1588-1433	1592-1432
δ ($\text{O-H}_{\text{fenol}}$)	1370	1365	1365	1367
ν ($\text{C-O}_{\text{fenol}}$)	1219	1228	1229	1227
δ (C-H_{ar})	788-735	746-698	748-697	748-696

5.1.3 Ressonância magnética nuclear de ^1H NMR e ^{13}C NMR

A espectroscopia de ^1H NMR é uma técnica bastante útil para a caracterização de compostos orgânicos, uma vez que os deslocamentos químicos e a integração dos sinais observados permitem determinar o número de átomos de hidrogênio presentes em cada composto.

Os valores de deslocamento químico (δ_{H} em ppm), o número de prótons correspondentes e as atribuições dos sinais obtidos, tanto para os precursores quanto para os ligantes finais, estão sumarizados nas Tabelas 5 e 6.

Os precursores bpa, bpamff e bpapyff apresentaram espectros característicos com deslocamentos e integração compatíveis com os já descritos na literatura, assim como o ligante $\text{H}_2\text{bppamff}$ (Piovezan, C. *et al.*, 2012). Pode-se notar, dessa forma, a presença dos sinais referentes aos átomos de hidrogênio das metilas do núcleo básico cmff, nos espectros do bpamff e bpapyff, ausentes no espectro do bpa, assim como a presença do sinal referente ao átomo de hidrogênio do grupo aldeído no espectro do bpamff, ausente nos espectros do bpa e bpapyff.

Tabela 5 Deslocamentos químicos, em ppm (multiplicidade e integração), observados nos espectros de ^1H NMR para os precursores bpa, bpamff e bpapyff.

	bpa	bpamff	bpapyff
CH_3		2,28 (s, 3H)	2,23 (s, 3H)
			3,67 (s, 2H)
		3,69 (s, 2H)	3,72 (s, 2H)
CH_2	3,83 (s, 2H)	3,76 (s, 2H)	3,77 (s, 2H)
	3,91 (s, 2H)	3,81 (s, 2H)	3,92 (s, 2H)
			3,96 (s, 2H)
	7,09 – 7,27 (m, 3H)	7,16 – 7,24 (m, 3H)	6,86 – 6,93 (d, 2H)
	7,29 – 7,37	7,28 – 7,40 (m, 7H)	7,14 – 7,17 (m, 3H)
CH_{arom}	(m, 4H)	7,67 (m, 1H)	7,28 – 7,36 (m, 6H)
	7,61 (m, 1H)	8,59 (m, 1H)	7,63 – 7,71 (m, 2H)
	8,54 (m, 1H)	10,32 (s, 1H _{aldeído})	8,52 – 8,58 (m, 2H)

O espectro de ^1H NMR do ligante $\text{H}_2\text{bppamff}$ apresentou os deslocamentos químicos e integração condizentes com os valores reportados na literatura (Piovezan, C. *et al.*, 2012), sendo possível destacar o sinal em 10,27 ppm, referente ao átomo de hidrogênio presente no grupo aldeído. Comparando-se o espectro do $\text{H}_2\text{bppamff}$ com o do ligante H_2LEt , nota-se a ausência deste sinal, assim como a presença de sinais entre 2,50 e 3,00 ppm, referentes aos átomos de hidrogênio dos metilenos da cadeia lateral contendo o grupo amina. O mesmo é observado quando comparamos o espectro do ligante contendo o grupo aldeído com os espectros dos ligantes H_2LProp e H_2LBut , em que nota-se a ausência de sinal na região entre 9,00 e 11,00 ppm, além da presença de um multiplete na região de 1,50 ppm e de um multiplete na região de 2,50 a 3,00 ppm, referentes aos átomos de hidrogênio dos metilenos da cadeia lateral.

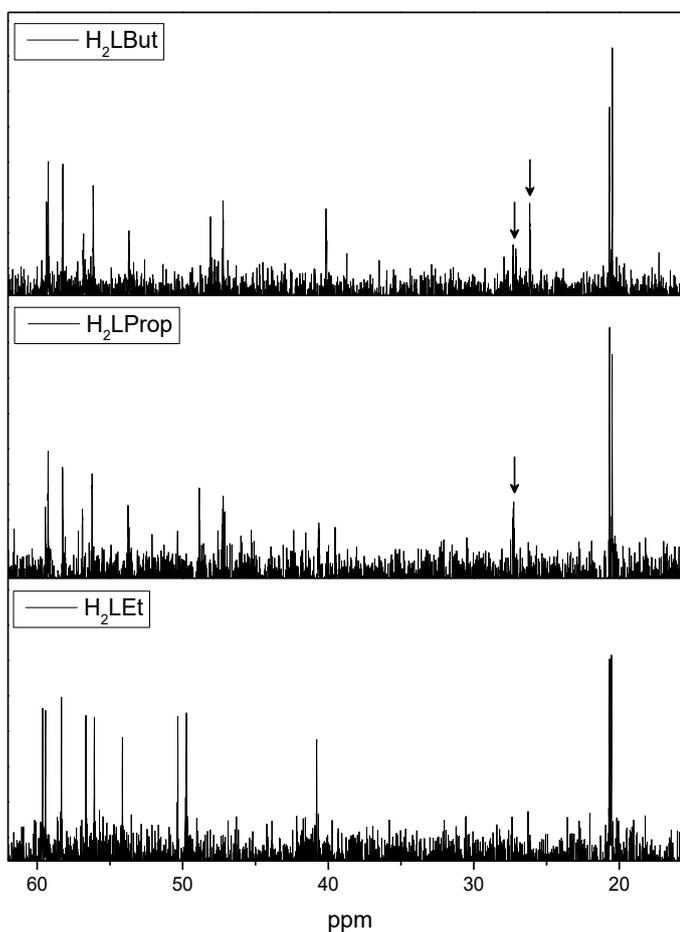
A ausência do sinal referente ao átomo de hidrogênio do grupo aldeído no espectro dos ligantes contendo o grupo amina, assim como a presença dos sinais referentes aos grupos metilênicos da cadeia lateral, juntamente com a integração destes mesmos sinais, são indicativos de que os produtos esperados foram obtidos.

Tabela 6 Deslocamentos químicos, em ppm (multiplicidade e integração), observados nos espectros de ^1H NMR para os ligantes $\text{H}_2\text{bppamff}$, H_2LEt , H_2LProp e H_2LBut .

	$\text{H}_2\text{bppamff}$	H_2LEt	H_2LProp	H_2LBut	
CH_3	2,22 (s, 3H)	2,20 (s, 3H)	2,21 (s, 6H)	2,21 – 2,22 (s, 6H)	
	2,24 (s, 3H)	2,21 (s, 3H)			
CH_2		2,65 – 2,68 (t, 2H, $J = 5,7 \text{ Hz}$)			
		2,81 (t, 2H, $J = 5,7 \text{ Hz}$)	1,61 – 1,67 (m, 2H)	1,39 – 1,52 (m, 4H)	
		3,68 (s, 2H)			
		3,73 (s, 2H)			
		3,78, 3,79 (s, 4H)	3,65 (s, 2H)	2,69 – 2,74 (m, 4 H)	2,56 – 2,67 (m, 4H)
		3,84 (s, 2H)	3,69 (s, 2H)		
		3,87 (s, 2H)	3,74 (s, 2H)	3,66 – 3,83 (m, 14H)	3,66 – 3,83 (m, 14H)
CH_{arom}		3,77 (s, 4H)			
		3,83 (s, 2H)			
		3,85 (s, 2H)			
		6,87 – 6,94 (m, 2H)	6,82 – 6,90 (m, 4H)	6,83 – 6,89 (m, 4H)	6,82 (s, 2H)
		7,15 – 7,26 (m, 4H)	7,14 – 7,24 (m, 3H)	7,15 – 7,21 (m, 3H)	6,90 (s, 2H)
		7,29 – 7,40 (m, 7H)	7,28 – 7,38 (m, 6H)	7,29 – 7,39 (m, 6H)	7,11 – 7,21 (m, 3H)
		7,61 (m, 1H)	7,60 – 7,66 (m, 2H)	7,58 – 7,64 (m, 2H)	7,29 – 7,41 (m, 6H)
		7,66 (m, 1H)			7,55 – 7,68 (m, 2H)
		8,56 (m, 1H)	8,55 – 8,59 (d, 2H)	8,57 (s, 2H)	
		8,60 (m, 1H)			8,55 (m, 2H)
		10,27 (s, 1H)			

Através da técnica de ^{13}C NMR é possível verificar a formação dos ligantes derivados do $\text{H}_2\text{bppamff}$ com a inserção de diaminas na cadeia lateral. Comparando-se os espectros de ^{13}C NMR dos três ligantes finais H_2LEt , H_2LProp e H_2LBut , pode-se notar o incremento de um sinal conforme o aumento da cadeia carbônica na região entre 20 e 50 ppm, como pode ser visto na Figura 33.

Figura 33 Deslocamentos químicos (δ_C) para os espectros de ^{13}C observados para os ligantes H_2LEt , H_2LProp e H_2LBut .



5.1.4 Espectrometria de massas

Os espectros de massas dos ligantes $\text{H}_2\text{bppamff}$, H_2LEt , H_2LProp e H_2LBut foram realizados em uma solução de CH_3CN (grau espectroscópico LC-MS). Todos os espectros apresentaram um pico de maior intensidade referente ao pico base. Nas Figuras 34 a 37 são apresentados os espectros de massas dos ligantes $\text{H}_2\text{bppamff}$, H_2LEt , H_2LProp e H_2LBut , respectivamente, mostrando os perfis isotópicos experimentais e teóricos para cada ligante.

Figura 34 Espectro de ESI-MS do ligante $H_2bppamff$ e respectiva simulação da distribuição isotópica (vermelho) em m/z 587,29. $[H_2bppamff + 1H]^+$.

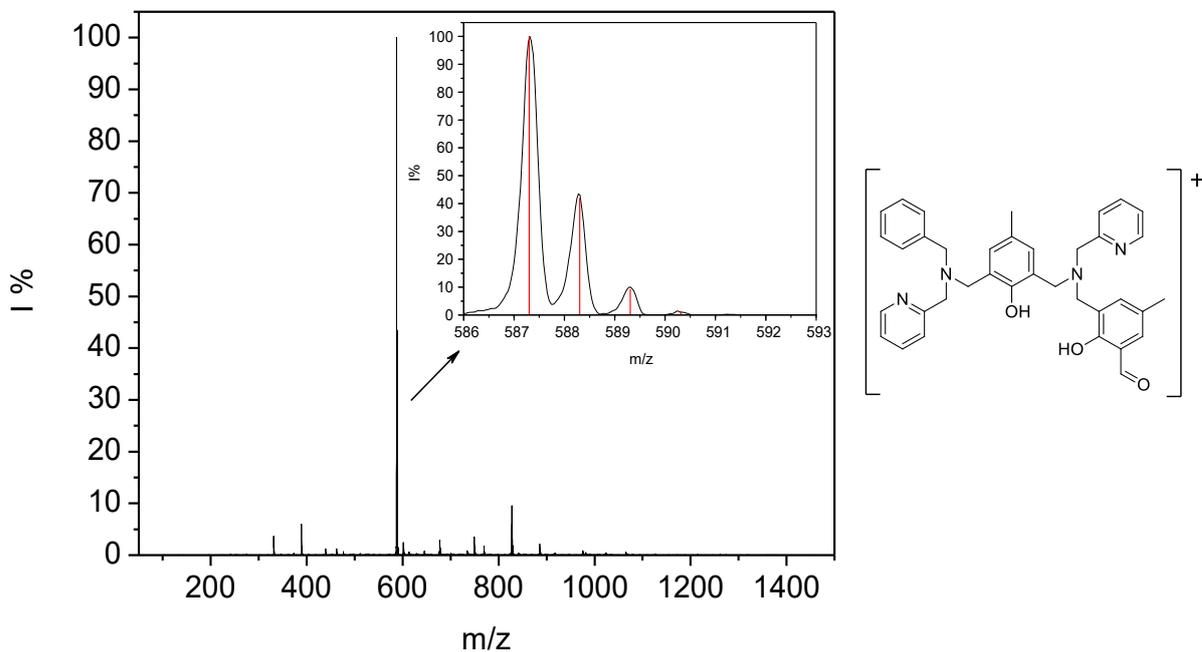


Figura 35 Espectro de ESI-MS do ligante H_2LEt e respectiva simulação da distribuição isotópica (vermelho) em m/z 631,35. $[H_2LEt + 1H]^+$.

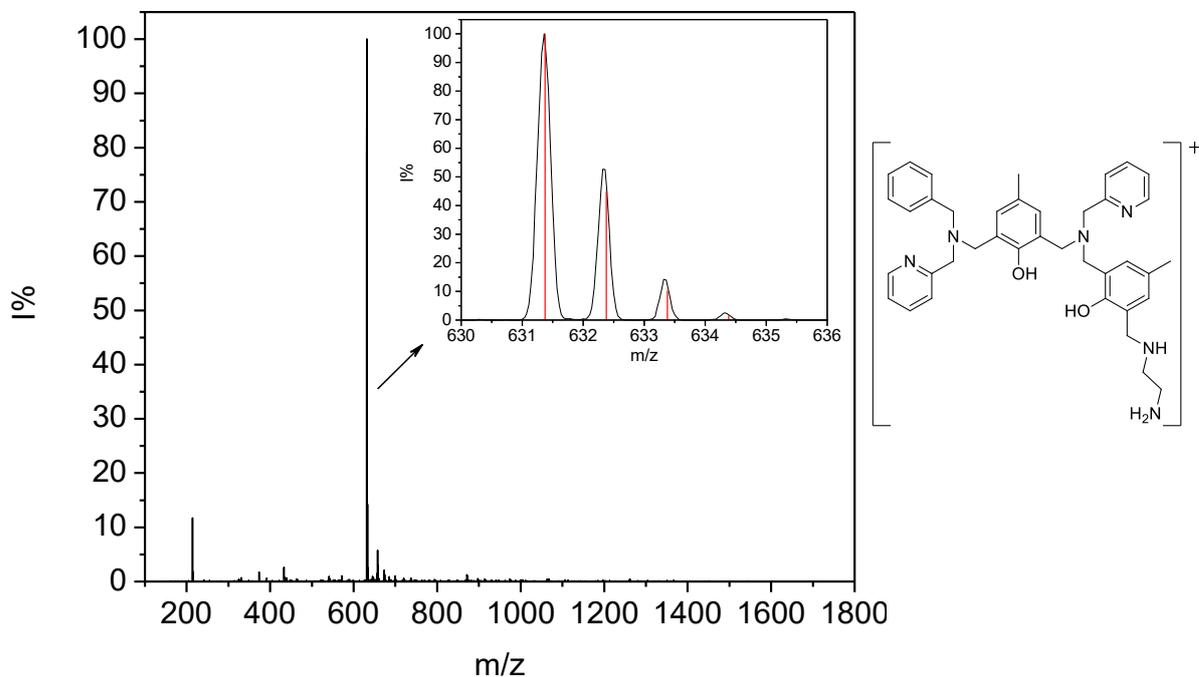


Figura 36 Espectro de ESI-MS do ligante H₂LProp e respectiva simulação da distribuição isotópica (vermelho) em m/z 645,46. [H₂LProp + 1H]⁺.

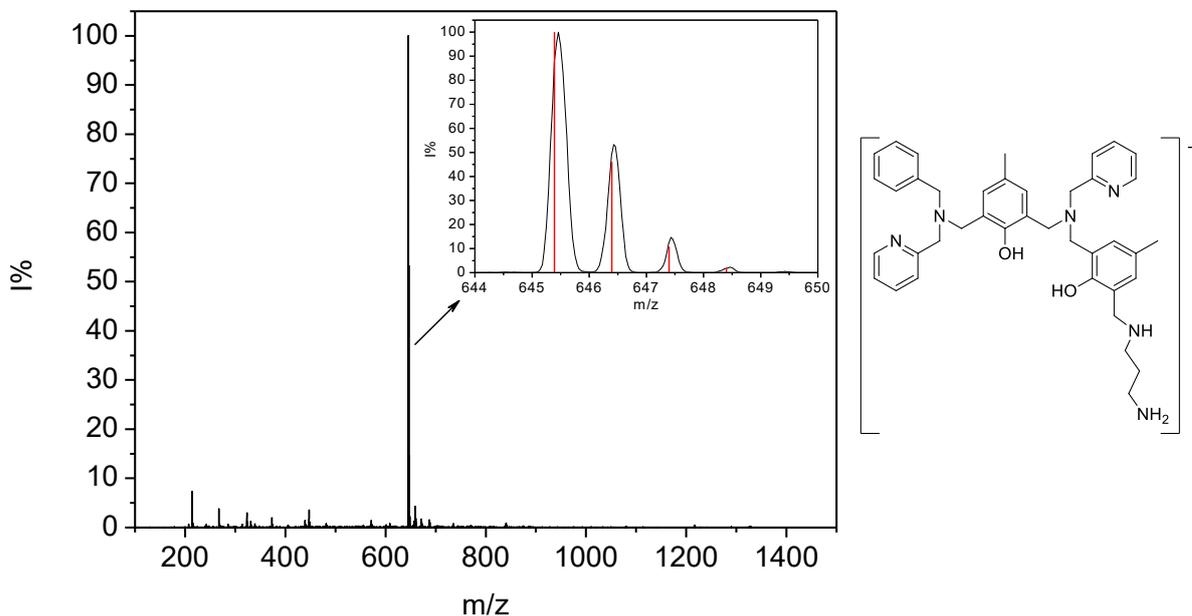
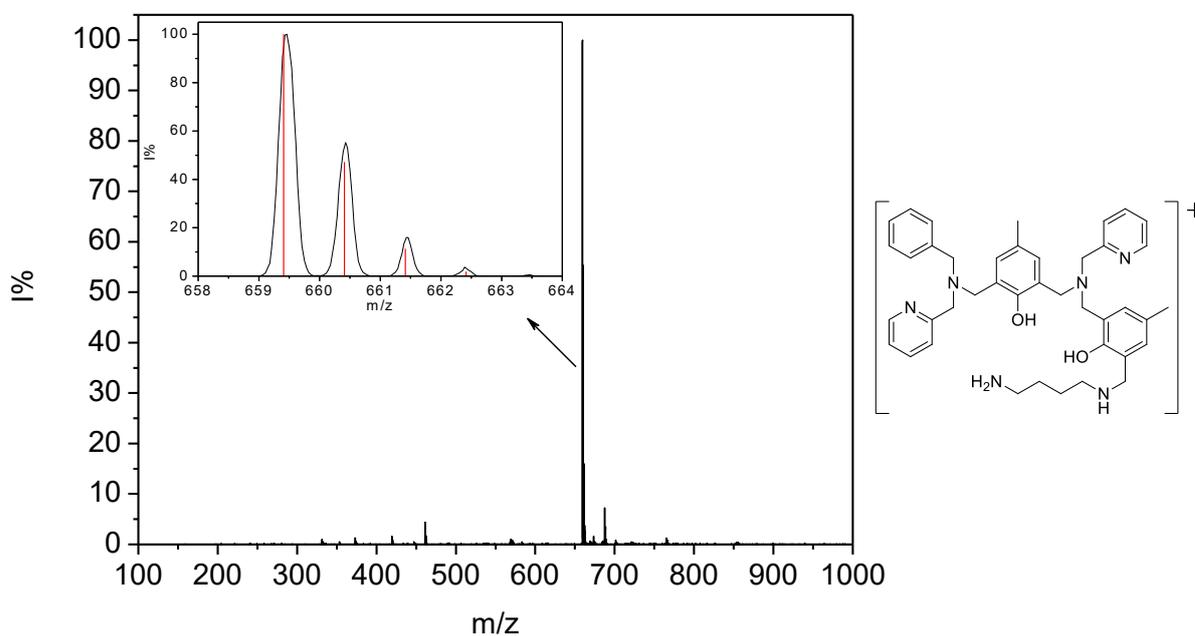


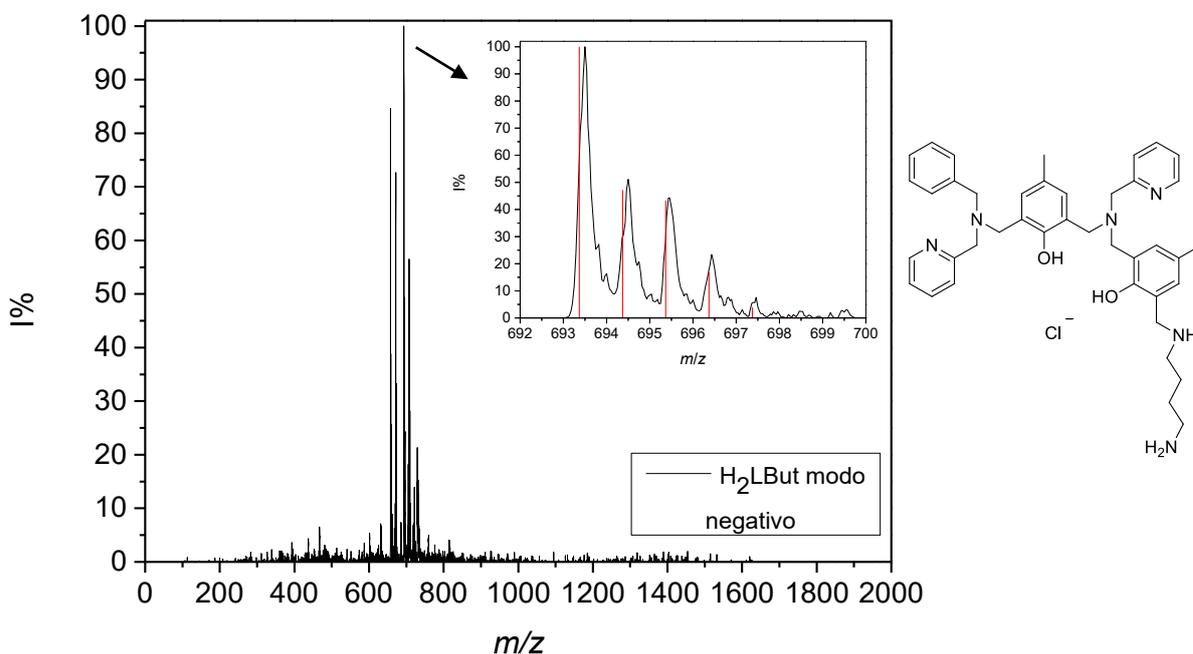
Figura 37 Espectro de ESI-MS do ligante H₂LBut e respectiva simulação da distribuição isotópica (vermelho) m/z 659. [H₂LBut + 1H]⁺.



Para o ligante H₂LBut a análise de espectrometria de massas também foi realizada no modo negativo, uma vez que o perfil isotópico apresentado pelo complexo **3** foi compatível com uma espécie contendo íon cloreto (seção 6.2.6), e como na síntese do complexo não foi utilizado nenhum sal contendo este íon, acredita-

se que este seja proveniente de alguma impureza do ligante. A análise de CHN do complexo **3** também foi compatível com a presença de cloreto em sua estrutura (seção 5.2.1). Como um dos solventes utilizados na síntese do ligante é o diclorometano, acredita-se que na síntese tenha se formado a espécie cloridrato. A Figura 38 traz o espectro de massas do ligante H₂LBut no modo negativo, assim como a simulação da distribuição isotópica.

Figura 38 Espectro de ESI-MS do ligante H₂LBut no modo negativo e respectiva simulação da distribuição isotópica (vermelho) m/z 693,48. [H₂LBut + 1Cl⁻].



5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

Os complexos **1**, **2** e **3** foram caracterizados tanto em seu estado sólido (análise elementar de CHN, infravermelho, UV-Vis no estado sólido), quanto em solução (condutividade molar, UV-Vis, eletroquímica, espectrometria de massas, absorção atômica e potenciometria), além de estudos teóricos utilizando a teoria do funcional de densidade (DFT). A utilização das técnicas descritas acima tem como objetivo auxiliar na elucidação da composição química, arranjo estrutural e propriedades ácido-base destes complexos, possibilitando assim a identificação da espécie ativa no processo de hidrólise de ésteres de fosfato.

5.2.1 Análise elementar de CHN

Os complexos sintetizados foram caracterizados por análise elementar de CHN, uma técnica utilizada para determinar as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio em uma amostra, possibilitando assim avaliar a composição química dos complexos sintetizados. Para o complexo **1** foi proposta a fórmula molecular $\text{Ni}_2\text{C}_{68}\text{H}_{78}\text{BCl}_3\text{N}_6\text{O}_{12}$, referente à espécie $[\text{Ni}_2(\text{H}_2\text{LEt})(\mu\text{-OAc})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{BPh}_4 \cdot \text{ClO}_4 + \text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O}$. Para o complexo **2** foi proposta a fórmula molecular $\text{Ni}_2\text{C}_{57}\text{H}_{68}\text{B}_{0,5}\text{Cl}_4\text{N}_6\text{Na}_{0,5}\text{O}_{15}$, referente à espécie $[\text{Ni}_2(\text{H}_2\text{LProp})(\mu\text{-OAc})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 + 0,5 \text{ NaBPh}_4 + \text{CH}_2\text{Cl}_2$, e para o complexo **3** foi proposta a fórmula molecular $[\text{Ni}_2(\text{LBut})(\mu\text{-OAc})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{HCl})_2 + 2 \text{ NaBPh}_4$. Os resultados obtidos foram concordantes com as fórmulas moleculares propostas, apresentando uma boa correlação entre os valores calculados e experimentais e encontram-se listados na Tabela 7.

Tabela 7 Porcentagens de C, H e N para os complexos **1** – **3** via análise elementar.

Complexo	1	2	3
%C	57,76/58,09	50,68/50,59	66,67/66,98
%H	5,70/5,59	5,08/5,06	5,91/5,92
%N	6,35/5,98	6,20/6,21	5,54/5,04
Fórmula Molecular	$\text{Ni}_2\text{C}_{68}\text{H}_{78}\text{BCl}_3\text{N}_6\text{O}_{12}$	$\text{Ni}_2\text{C}_{57}\text{H}_{68}\text{B}_{0,5}\text{Cl}_4\text{N}_6\text{Na}_{0,5}\text{O}_{15}$	$\text{Ni}_2\text{C}_{93}\text{H}_{98}\text{B}_2\text{Cl}_2\text{N}_6\text{Na}_2\text{O}_7$

5.2.2 Absorção atômica

Análises via absorção atômica foram realizadas para os complexos **1** – **3**, com o intuito de verificar a quantidade de níquel existente nos complexos sintetizados. Como os valores teóricos foram calculados para um sistema binuclear de níquel, de acordo com os valores obtidos pode-se inferir que as amostras analisadas possuem uma concentração total de níquel concordante com os valores esperados, e ajudam a corroborar as estruturas propostas para os complexos. Os resultados obtidos encontram-se listados na Tabela 8.

Tabela 8 Concentração de níquel determinada por FAAS para os complexos **1** – **3**.

Complexo	[Ni]_{experimental} (ppm)	[Ni]_{calculado} (ppm)
1	2,97±0,0034	3,07
2	2,77±0,0171	3,04
3	3,36±0,0114	3,02

5.2.3 Espectroscopia no infravermelho – IR

A espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada como uma análise preliminar, mostrando-se muito útil na caracterização inicial dos complexos, uma vez que pôde-se observar variações nas frequências de absorção dos complexos em relação aos ligantes livres (Nakamoto, K., 1977; Silverstein, R. M. *et al.*, 2007). Bandas adicionais, referentes ao contra íon e ligantes exógenos em ponte, também foram observadas. A Tabela 9 mostra as atribuições das principais bandas para os complexos **1** – **3**, bem como para o complexo **A**, reportado por Piovezan e colaboradores (Piovezan, C. *et al.*, 2012), o qual contém uma unidade aldeído no fenol terminal e para o complexo **B**, reportado por Greatti e colaboradores, que possui três unidades piridina coordenadas aos centros de Ni^{II} (Greatti, A. *et al.*, 2008).

Tabela 9 Atribuições de bandas no IR para os complexos **1**, **2** e **3**.

Atribuições, cm ⁻¹	A ^a	B ^b	1	2	3
ν (O-H)	-	3400-3300	3511	3496	-
ν (C-H _{alif} e C-H _{ar})	3057-2922	3054-2838	3055-2912	3058-2854	3055-2859
ν_{ass} (COO ⁻)	1554	1574	1554	1574	1577
ν_{s} (COO ⁻)	1427	1444	1427	1437	1439
ν (C=N e C=C)	1606-1479	1602-1420	1605-1445	1606-1422	1603-1412
δ (O – H _{fenol})	1317	-	-	-	-
ν (C-O _{fenol})	1263	1278	1267	1272	1273
ν (Cl-O)	-	1095	1090	1081	-
δ (C-H _{ar})	734-705	761	735-703	759-703	757-701

^a [Ni₂(HBPPAMFF)(μ -AcO)₂(H₂O)]BPh₄ (Piovezan, C. *et al.*, 2012); ^b [Ni₂(L1)(CH₃COO)₂(H₂O)]ClO₄·H₂O, L1 = 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil]fenol (Greatti, A. *et al.*, 2008).

Os espectros de IR dos complexos e dos ligantes livres apresentaram semelhanças entre si, indicando a presença dos mesmos nestes compostos, o que pode ser observado pela sobreposição dos espectros de IR de ligantes e complexos, como pode ser visto nas Figuras 39 a 41. Os ligantes apresentam bandas referentes ao estiramento das ligações C=N e C=C dos anéis aromáticos na região entre 1590 e 1450 cm⁻¹. Estas bandas são também observadas nos complexos, no entanto observa-se um alargamento dessas bandas, provavelmente devido à presença de grupos acetato coordenados aos centros metálicos, uma vez que nota-se a presença de bandas na região entre 1554-1577 cm⁻¹ e em 1427-1439 cm⁻¹ referentes aos estiramentos ν_{ass} (COO⁻) e ν_{s} (COO⁻), respectivamente, dos grupos acetato. Estes estiramentos apresentam um Δ entre 127 e 138 cm⁻¹, indicando a coordenação de pelo menos um grupo carboxilato formando ponte entre os centros metálicos (Nakamoto, K., 1977). É possível notar também um deslocamento do estiramento referente à ligação C-O_{fenol} para regiões de menor frequência em relação aos ligantes

livres. Estes deslocamentos para regiões de menor frequência, juntamente com a ausência da banda δ ($O-H_{\text{fenol}}$), observada nos espectros dos ligantes na região de 1370 cm^{-1} , são indicativos da formação de uma ponte fenoxo entre os centros metálicos, assim como da desprotonação do fenol terminal, indicando a coordenação do mesmo ao centro metálico. A presença da banda em 1317 cm^{-1} no complexo **A** no entanto, indica que o fenol terminal permanece protonado mesmo estando coordenado ao metal, fato concordante com a estrutura cristalina reportada para este complexo (Piovezan, C. *et al.*, 2012).

Os espectros dos complexos **1** e **2** também apresentam uma banda em 1090 cm^{-1} e 1081 cm^{-1} , respectivamente, referentes ao estiramento Cl-O do perclorato. Para o complexo **1**, pode-se observar que a banda referente ao íon perclorato apresenta aproximadamente a mesma intensidade que as bandas presentes na região de “impressão digital” do espectro, enquanto para o complexo **2** a intensidade da banda referente ao íon perclorato é praticamente o dobro da intensidade das bandas presentes na região de “impressão digital”, o que é condizente com a proposta feita a partir das análises de CHN, em que o complexo **1** possui apenas um íon perclorato, e o complexo **2** possui dois íons perclorato. Não foi utilizado sal de perclorato na síntese do complexo **3** e, portanto, não há a presença da banda referente ao estiramento Cl-O em seu espectro de IR. O complexo **1** apresenta também o ânion tetrafenilborato como contra-íon, sendo que as absorções deste se referem aos estiramentos e deformações das ligações C=C e C-H dos anéis aromáticos, os quais também estão presentes no ligante livre. Como pode ser visto na Tabela 8, os complexos **1** – **3** apresentaram valores de estiramentos muito semelhantes aos observados para os complexos binucleares de Ni^{II} **A** e **B**.

Figura 39 Sobreposição dos espectros no IR do complexo **1** (preto) e do ligante H₂LEt (vermelho) (ATR).

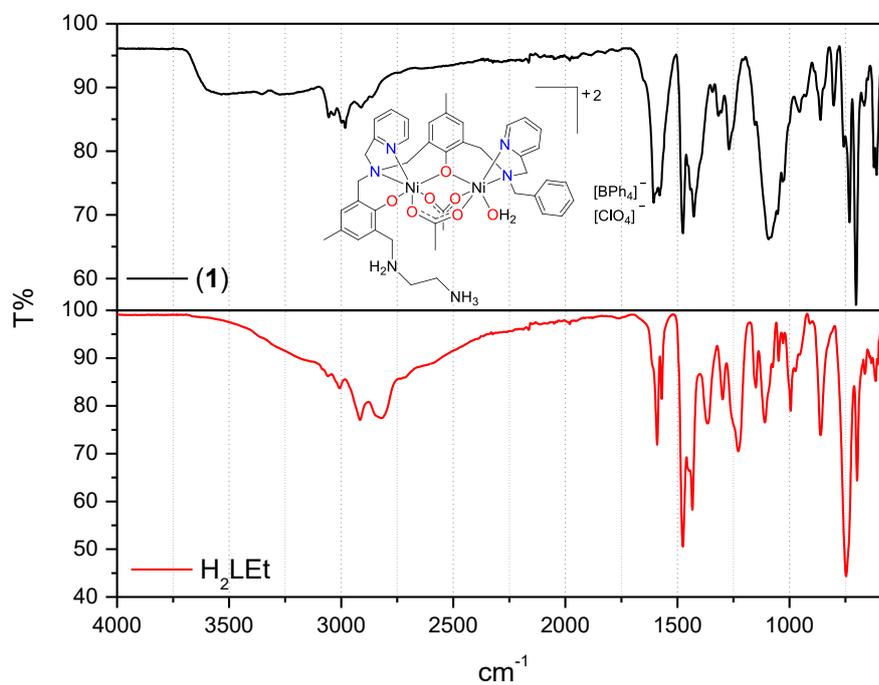


Figura 40 Sobreposição dos espectros no IR do complexo **2** (preto) e do ligante H₂LProp (vermelho) (ATR).

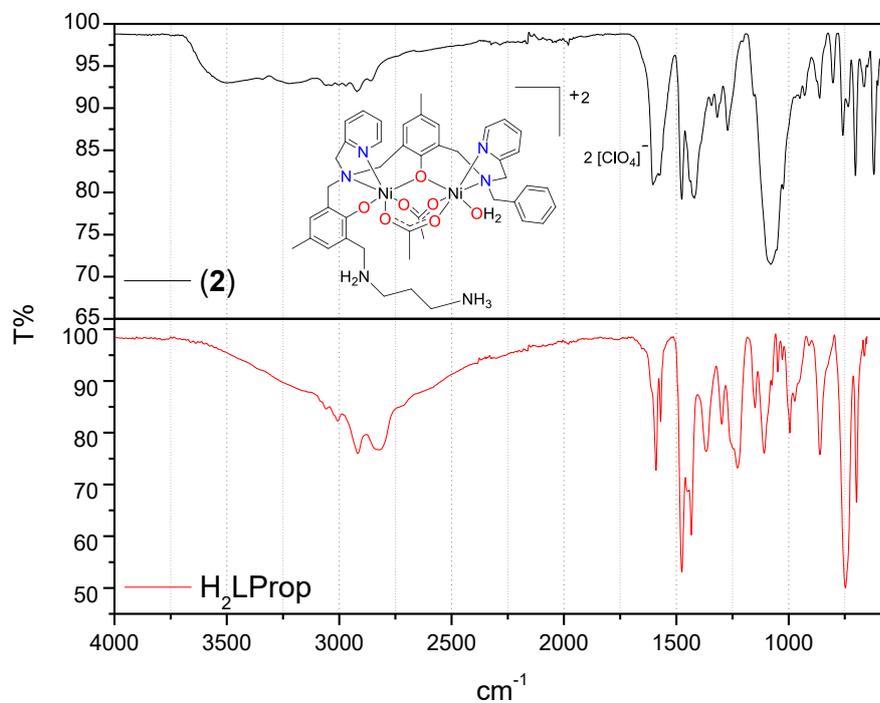
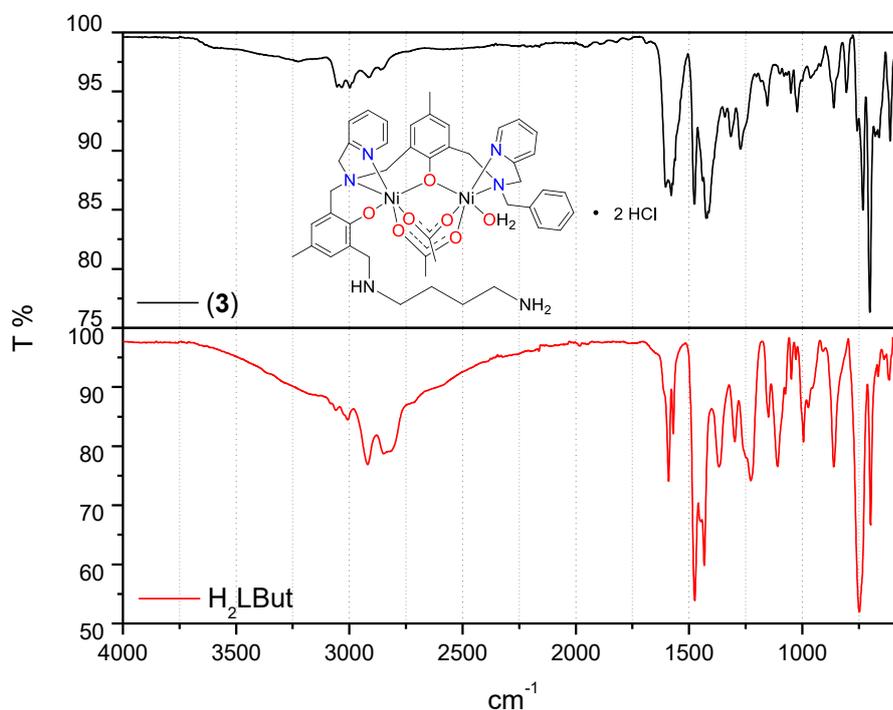


Figura 41 Sobreposição dos espectros no IR do complexo **3** (preto) e do ligante H₂LBut (vermelho) (ATR).



5.2.4 Cálculos de estrutura eletrônica

Como não foi possível a obtenção de monocristais para os complexos **1 – 3**, cálculos utilizando a teoria do funcional de densidade (DFT) foram realizados a fim de auxiliar na elucidação das estruturas dos complexos e conjugados fosfato, assim como no melhor entendimento dos dados experimentais.

A otimização das estruturas para os três complexos foi realizada somente para as espécies predominantes no valor de pH ótimo cinético (pH 9,00). Os cálculos foram realizados com um grupo hidróxido terminal ligado ao centro de níquel na porção macia do ligante e uma molécula de água ligada ao centro de níquel na porção dura do ligante. O spin do íon Ni^{II} foi definido como sendo igual a 1, como previamente reportado por Piovezan e colaboradores (Piovezan, C. *et al.*, 2012). Como pode ser visto na Figura 44, todos os centros de níquel exibem uma geometria pseudo-octaédrica, o que é esperado para estes complexos tendo como base estudos prévios com sistemas similares (Piovezan, C. *et al.*, 2012). A Tabela 10 apresenta os comprimentos de ligação calculados selecionados para os três complexos e dados cristalográficos do complexo **A** para comparação, e a Figura 45 traz a numeração dos átomos presentes na tabela, para melhor compreensão.

As intensidades e frequências vibracionais calculadas foram comparadas com os espectros de IR experimentais, apresentados nas Figuras 44 a 46, e se mostraram concordantes. Para os cálculos de estrutura não foram incluídos ânions perclorato, por isso a ausência da banda intensa em aproximadamente 1100 cm^{-1} nos espectros teóricos para os complexos **1** e **2**. Na Tabela 11 estão apresentadas as atribuições das bandas no infravermelho para os complexos **1** – **3** (experimentais e teóricas).

Figura 42 Geometrias no estado fundamental otimizadas para os complexos **1** – **3** utilizando BP86/DEF2-TZVP (metais) ou DEF2-SVP (outros átomos). Alguns átomos foram omitidos para maior clareza.

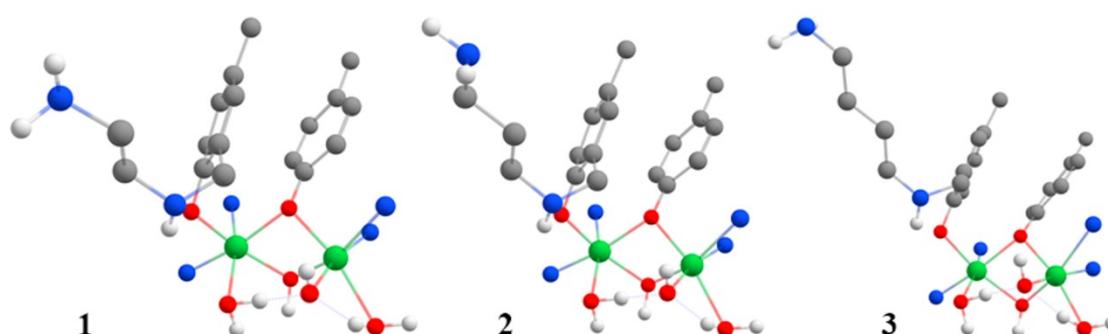


Tabela 10 Comprimentos de ligação selecionados para os complexos calculados e alguns dados cristalográficos para comparação.

Teórico	1	2	3	A ^a
Ni ₁ -Ni ₂	3,089	3,089	3,089	3,396
Ni ₁ -O ₁	2,162	2,162	2,161	-
Ni ₁ -O ₂	2,005	2,006	2,006	2,175
Ni ₁ -N ₁	2,164	2,164	2,163	2,119
Ni ₁ -N ₂	2,031	2,031	2,031	2,067
Ni ₁ -O ₃	2,103	2,102	2,102	1,997
Ni ₁ -O ₄	2,089	2,090	2,089	-
Ni ₂ -O ₃	2,014	2,013	2,104	2,038
Ni ₂ -O ₄	2,103	2,104	2,014	-
Ni ₂ -O ₅	2,070	2,070	2,070	-
Ni ₂ -O ₆	2,254	2,254	2,254	-
Ni ₂ -N ₃	2,033	2,033	2,032	2,086
Ni ₂ -N ₄	2,340	2,340	2,340	2,183

^a Piovezan, C. *et al.*, 2012.

Figura 43 Numeração dos átomos presentes na Tabela 10 acima.

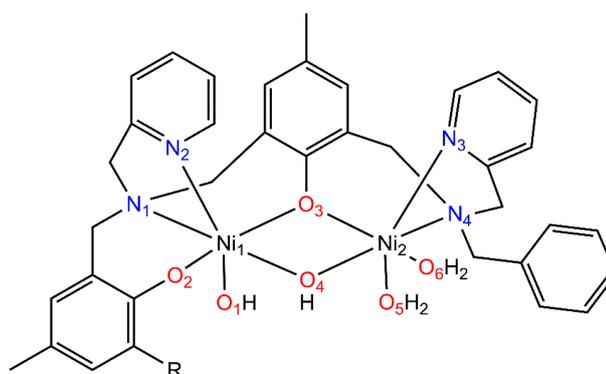


Figura 44 Sobreposição dos espectros de infravermelho experimental (preto) e teórico (vermelho) para o complexo 1.

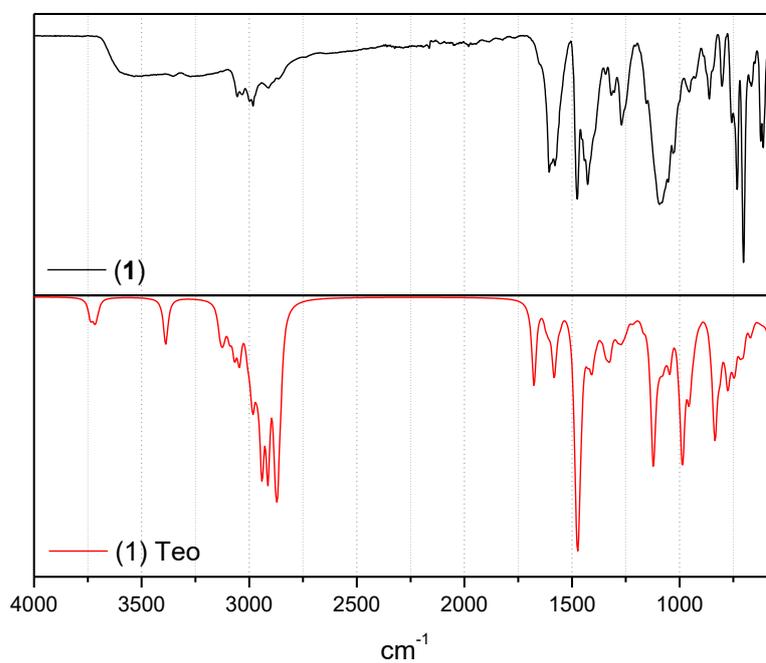


Figura 45 Sobreposição dos espectros de infravermelho experimental (preto) e teórico (vermelho) para o complexo 2.

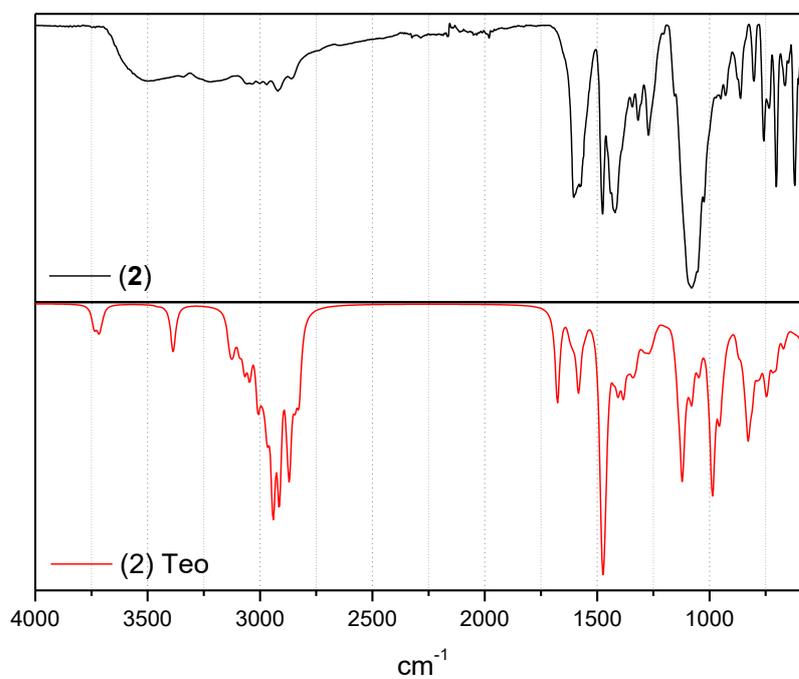


Figura 46 Sobreposição dos espectros de infravermelho experimental (preto) e teórico (vermelho) para o complexo **3**.

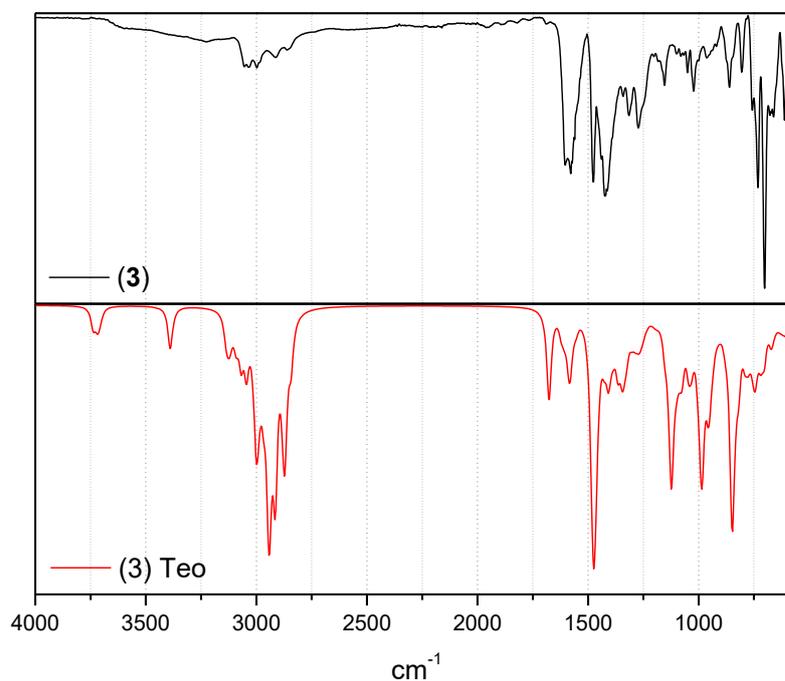


Tabela 11 Atribuições das bandas no infravermelho para os complexos **1** – **3** (experimental e calculado).

Atribuições	1 Exp.	1 Calc.	2 Exp.	2 Calc.	3 Exp.	3 Calc.
$\nu(\text{N-H})$	-	3717	-	3717	-	3728
$\nu(\text{O-H})$	3511	3385	3496	3388	-	3390
$\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ e $\text{C-H}_{\text{alif}})$	3055 - 2912	3128 - 2872	3058 - 2854	3128 - 2868	3055 - 2859	3127 - 2875
$\nu(\text{C=N e C=C})$	1605 - 1445	1679 - 1407	1606 - 1422	1675 - 1383	1603 - 1412	1673 - 1344
$\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$	735 - 703	834 - 710	759 - 703	830 - 746	757 - 701	846 - 743
$\nu(\text{Cl-O})$	1090	-	1081	-	-	-

5.2.5 Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível

O comportamento eletrônico dos complexos **1**, **2** e **3** foi investigado no intervalo entre 250 – 1100 nm em solução utilizando acetonitrila como solvente, e entre

250 – 800 nm por reflectância difusa em pastilha de KBr. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 12 e os espectros apresentados nas Figuras 47 a 49.

Em geral, complexos de Ni^{II} em ambientes octaédricos apresentam três transições *d-d* permitidas por spin nas regiões entre 1250-900, 670-520, e 500-370 nm com valores de coeficiente de absorção menores que 30 L mol⁻¹ cm⁻¹. Estas bandas são atribuídas às transições ³A_{2g} → ³T_{2g} (F), ³A_{2g} → ³T_{1g} (F), ³A_{2g} → ³T_{1g} (P). Bandas proibidas por spin também podem ser observadas, e são atribuídas à transição ³A_{2g} (F) → ¹E_g (D), que pode se encontrar próxima à primeira ou segunda transição permitida por spin (Lever, A. B. P., 1984).

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

Complexo	Sólido (KBr)	CH ₃ CN
	λ _{máx} (nm)	λ _{máx} , nm (ε, L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
A^a	-	308 (4300); 390 (4700); 604(20)
1	317; 614; 775	303 (10020); 609 (14); 780 (12); 1004 (33)
2	322; 622; 770	305 (6152); 616 (15); 769 (11); 1022 (27)
3	320; 628; 773	308 (538); 626 (23); 771 (7); 1030 (26)
C^b	-	298 (3611); 621 (20); 790 (9); 1005 (27)

^a[Ni₂(HBPPAMFF)(μ-OAc)₂(H₂O)]BPh₄ (Piovezan, C. *et al.*, 2012); ^b[Ni₂(L)(μ-OAc)₂(H₂O)]BPh₄·H₂O (Xavier, F. R., Neves, A., 2016).

Os espectros eletrônicos dos complexos **1 – 3** na faixa de 400 – 1100 nm são consistentes com um ambiente octaédrico para os centros de Ni^{II}. Os complexos apresentam duas bandas largas observadas nas regiões entre 600 e 770 nm, tanto no estado sólido quanto em solução, o que indica que os complexos **1 – 3** não sofrem influência do solvente e que sua integridade estrutural é mantida em solução. As bandas em regiões próximas a 600 e 1000 nm podem ser atribuídas às transições ³A_{2g} → ³T_{2g} (F), ³A_{2g} → ³T_{1g} (F), respectivamente. A banda de menor intensidade observada na região de 770 nm para os complexos **2** e **3** e em 780 nm para o

complexo **1** pode ser atribuída à transição proibida por spin $^3A_{2g}(F) \rightarrow ^1E_g(D)$. O comportamento eletrônico dos complexos **1** – **3** mostrou ser consistente com o de outros complexos de Ni^{II} descritos na literatura (Uozumi, S. *et al.*, 1998; Piovezan, C. *et al.*, 2012; Xavier, F. R., Neves, A., 2016; Greatti, A. *et al.*, 2008; Bhardwaj, V. K., Singh, A., 2014; Massoud, S. S. *et al.*, 2016; Horn Jr., A. *et al.*, 2018; Sanyal, R. *et al.*, 2016).

Além das transições mencionadas acima, também se observou uma banda em aproximadamente 300 nm para todos complexos (Figura 50), e que pode ser atribuída à transferência de carga envolvendo os orbitais do Ni^{II} e do ligante piridina, sendo essas também observadas em outros complexos de Ni^{II} reportados na literatura (Uozumi, S. *et al.*, 1998; Piovezan, C. *et al.*, 2012; Xavier, F. R., Neves, A., 2016; Greatti, A. *et al.*, 2008; Bhardwaj, V. K., Singh, A., 2014).

Figura 47 Espectro eletrônico do complexo **1** em CH₃CN ([C] = 2,50 × 10⁻² mol L⁻¹) e no estado sólido (inserido).

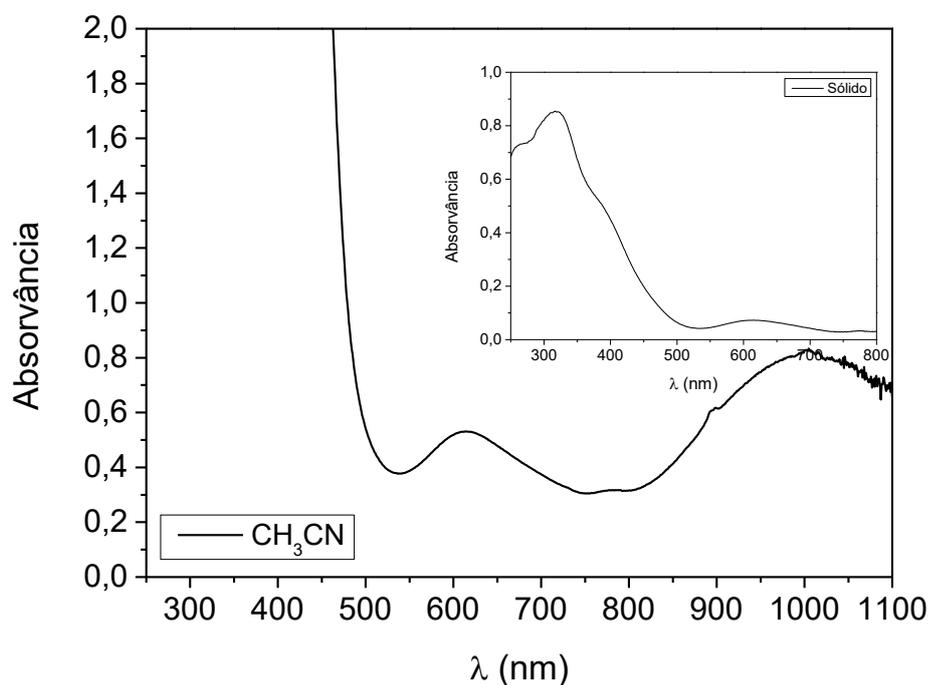


Figura 48 Espectro eletrônico do complexo **2** em CH₃CN ([C] = 2,50 × 10⁻² mol L⁻¹) e no estado sólido (inserido).

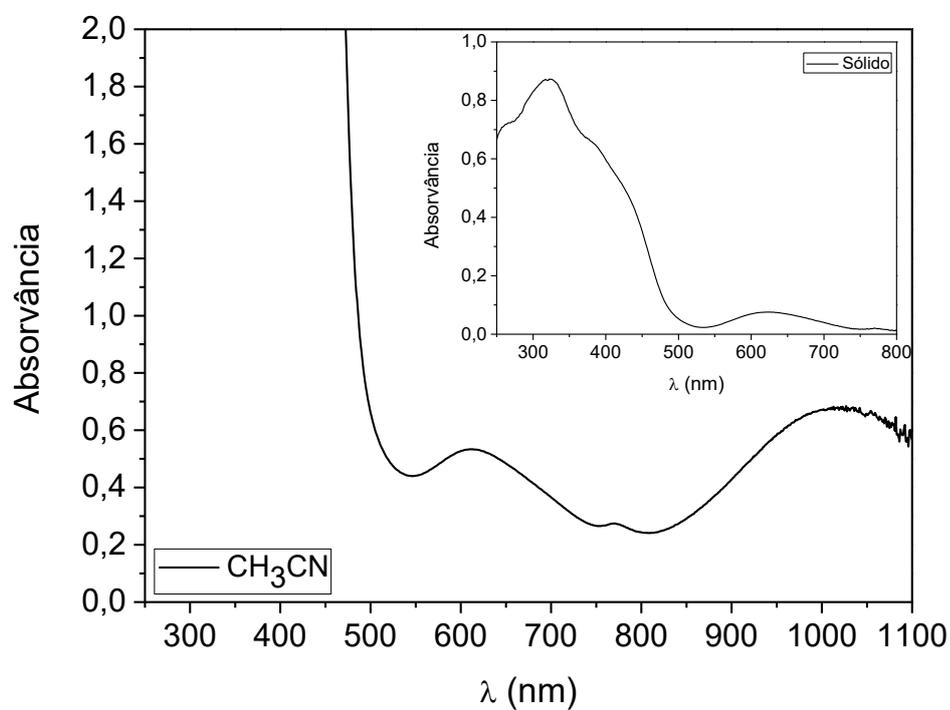


Figura 49 Espectro eletrônico do complexo **3** em CH₃CN ([C] = 2,50 × 10⁻² mol L⁻¹) e no estado sólido (inserido).

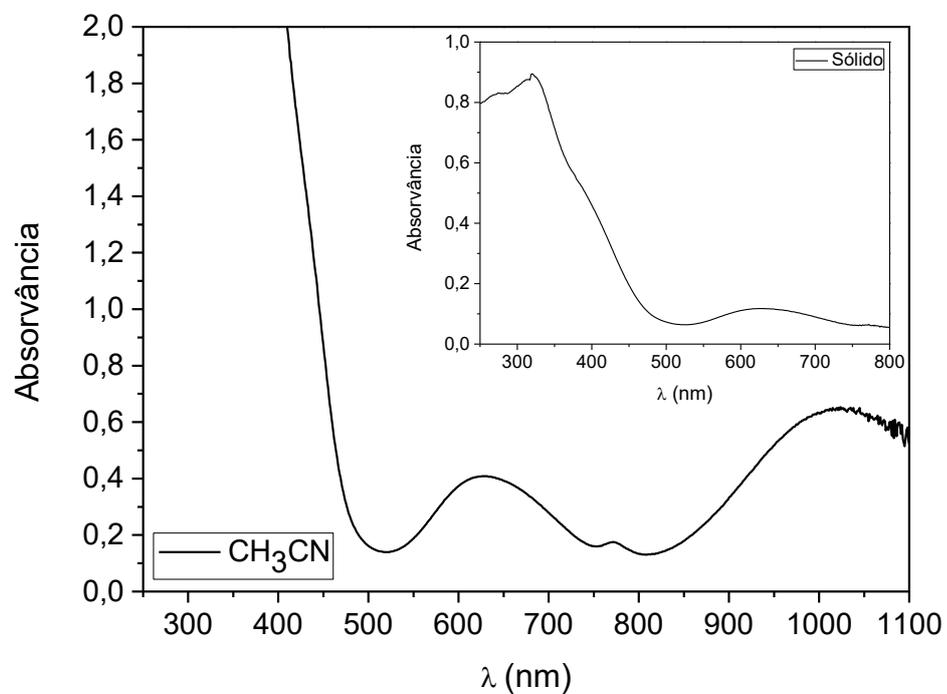
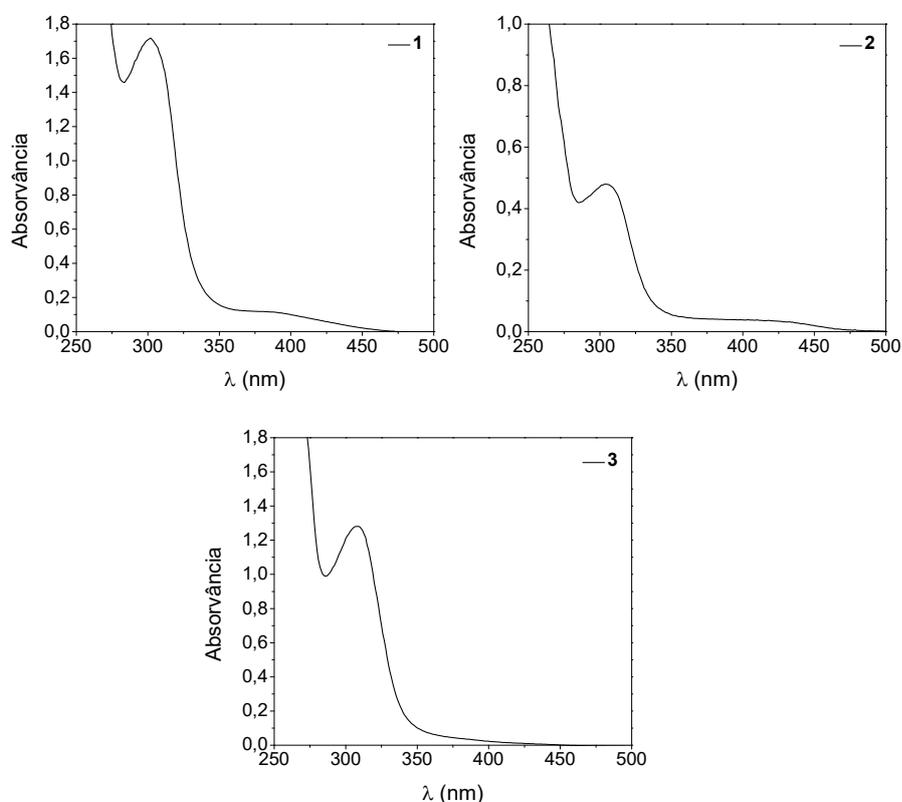


Figura 50 Espectro eletrônico dos complexos **1** – **3** mostrando as bandas em aproximadamente 300 nm. $[C] = 2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (**1**); $[C] = 8,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (**2**); $[C] = 2,33 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (**3**).



Os orbitais de fronteira calculados para os complexos **1** – **3** estão apresentados na Figura 51. Pode-se observar que para todos os complexos os últimos orbitais alfa e beta ocupados encontram-se espalhados sobre a unidade fenol substituída do ligante com uma pequena contribuição dos orbitais $d\pi$ do centro de Ni^{II} , sem apresentar influência significativa dos grupos laterais. Os primeiros orbitais desocupados encontram-se localizados sobre a unidade piridina coordenada ao mesmo centro de níquel, apresentando uma pequena contribuição dos orbitais $d\pi$ do Ni^{II} . O cálculo de DFT dependente do tempo (TD-DFT) foi utilizado para simular os espectros de absorção e para auxiliar no entendimento das atribuições dos espectros experimentais, e podem ser vistos nas Figuras 52 a 54. Com base nestes cálculos, as bandas em regiões de mais baixa energia ($\sim 550 - 900 \text{ nm}$) dos complexos **1** – **3** podem ser resolvidas em algumas excitações, todas relacionadas a transições $d-d$, em que os orbitais moleculares doadores possuem uma pequena contribuição dos átomos de oxigênio coordenados e os orbitais moleculares aceptores possuem uma pequena contribuição das unidades fenol. As transições envolvendo a maioria dos orbitais de fronteira descritos acima estão localizados nas regiões entre $550 - 400 \text{ nm}$.

As demais transições em regiões de mais alta energia do espectro podem ser atribuídas à transições $\pi - \pi^*$, com uma pequena contribuição de transições de transferência de carga envolvendo o centro de Ni^{II}.

Figura 51 Orbitais de fronteira calculados para os complexos 1, 2 e 3.

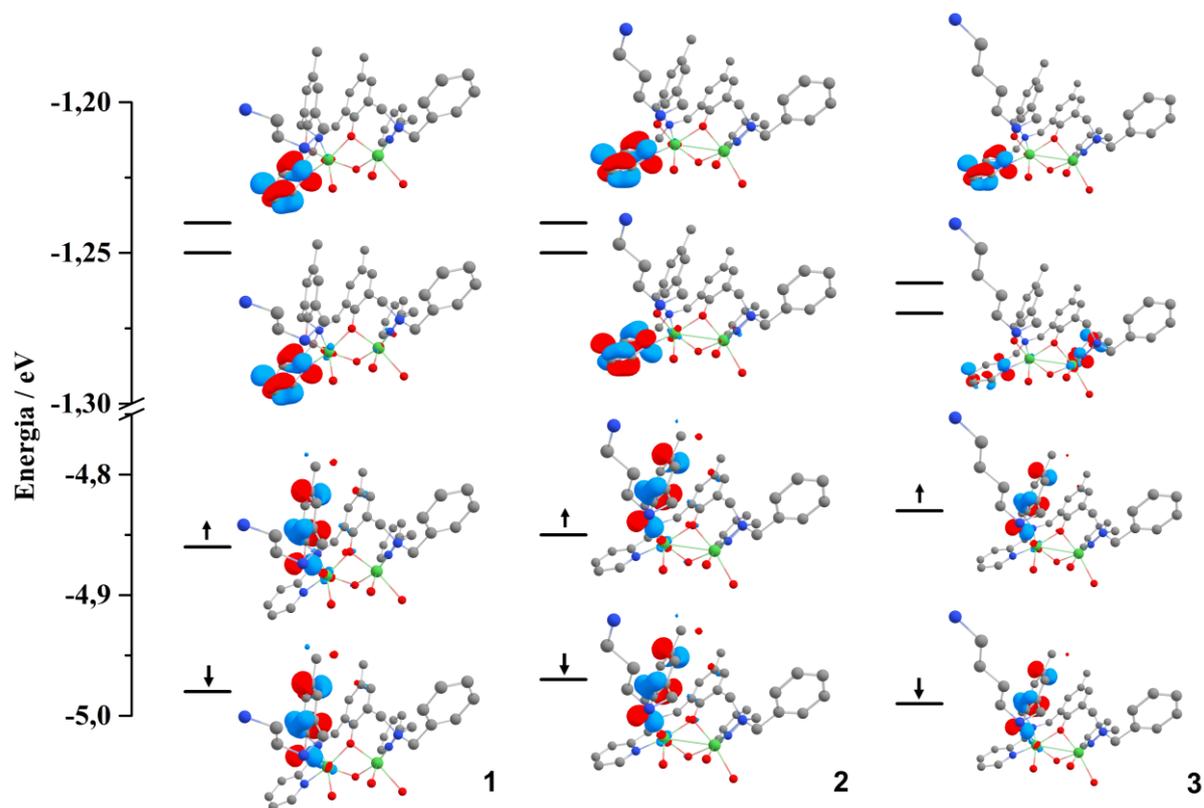


Figura 52 Espectro de absorção experimental para o complexo **1** em CH₃CN e espectro de absorção teórico (inserido) convoluído com gaussianas de 0,35 eV de largura.

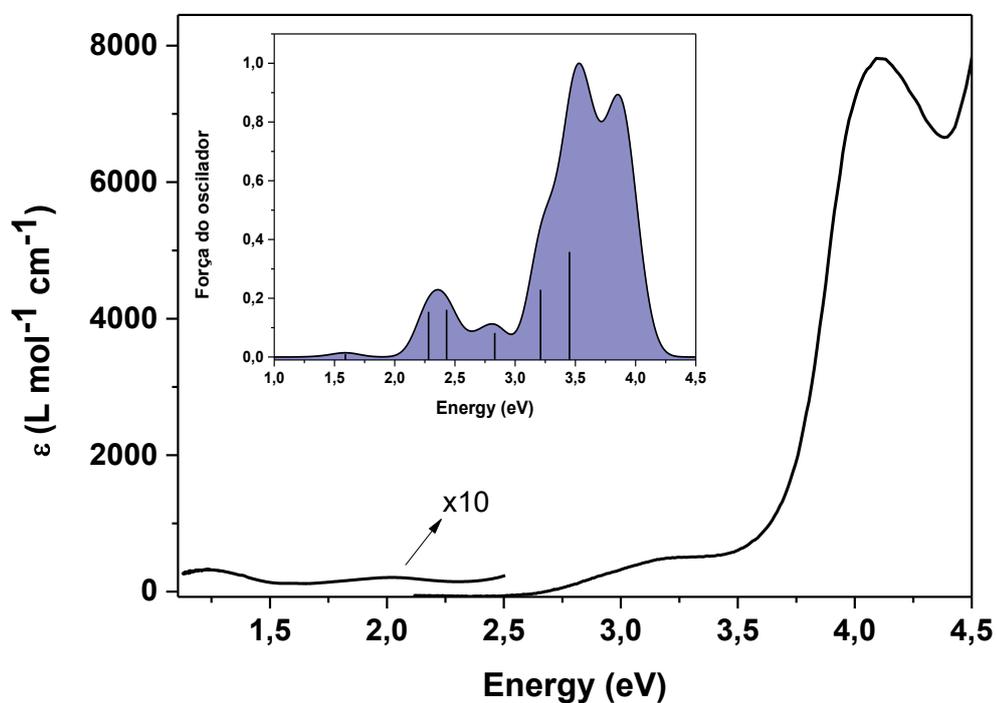


Figura 53 Espectro de absorção experimental para o complexo **2** em CH₃CN e espectro de absorção teórico (inserido) convoluído com gaussianas de 0,35 eV de largura.

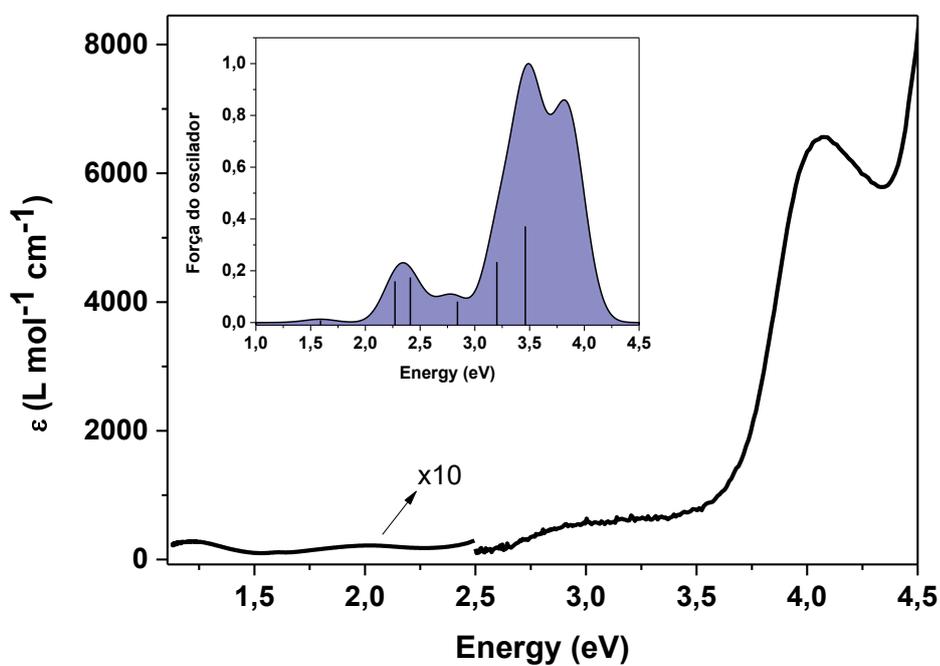
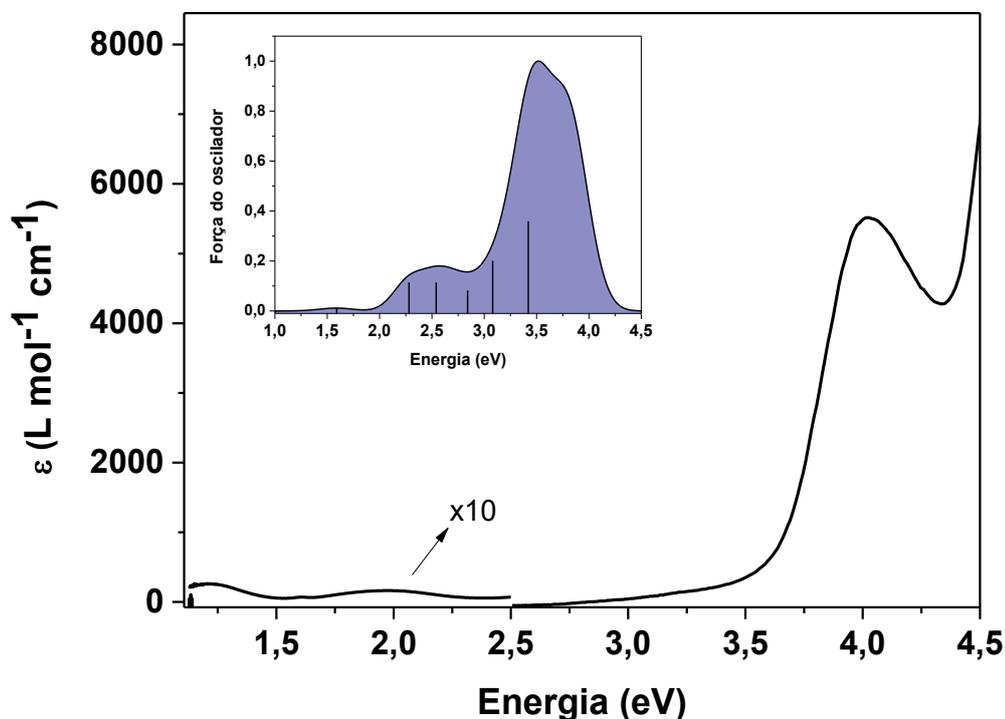


Figura 54 Espectro de absorção experimental para o complexo **3** em CH₃CN e espectro de absorção teórico (inserido) convoluído com gaussianas de 0,35 eV de largura.



5.2.6 Condutividade molar

Medidas de condutividade molar foram efetuadas em soluções de CH₃CN espectroscópica recém preparadas dos complexos com concentrações de 1×10^{-3} mol L⁻¹, a 25 °C. Os resultados de condutividade molar (Λ_M) para os complexos **1**, **2** e **3** são apresentados na Tabela 13. Para os complexos **1** e **2** os valores obtidos foram inconclusivos, uma vez que podem ser atribuídos à eletrólitos do tipo 1:1, o que não está de acordo com os resultados obtidos pela análise de CHN e também de infravermelho para estes complexos, em que é sugerido que os complexos **1** e **2** possuam 2 moléculas de contra-íon. Estudos em diferentes solventes, como acetona ou nitrometano, poderiam auxiliar no estudo da condutividade molar destes complexos, ou ainda deixar a solução de complexo preparada incubando durante um determinado período de tempo antes de realizar o experimento. Já o valor obtido para o complexo **3** indica que o mesmo permanece neutro em solução (Geary, W. J., 1971),

o que está de acordo com os resultados obtidos para este complexo pela análise de CHN.

Tabela 13 Resultados da condutividade molar para os complexos **1**, **2** e **3** em CH₃CN.

Complexo	Δ_M (S mol ⁻¹ cm ²)
1	121
2	140
3	36

5.2.7 Espectrometria de massas

A análise de espectrometria de massas para os complexos **1** – **3** foi realizada utilizando-se uma solução de CH₃CN.

Para o complexo **1**, foi encontrado um pico base em $m/z = 460,15$, relativo à espécie [Ni^{II}Ni^{II}(μ -CH₃COO)(HLEt)]+CH₃OH+CH₂Cl₂ com carga +2, em que o complexo se encontra com uma ponte acetato, além de uma molécula de metanol e uma molécula de diclorometano (proveniente da recristalização). Também foi encontrado um conjunto de picos em $m/z = 803,31$, referente à espécie [Ni^{II}Ni^{II}(μ -CH₃COO)(LEt)] em que o complexo se encontra com uma ponte acetato e carga +1, como pode ser visto na Figura 55. As Figuras 56 e 57 mostram o espectro de massas do complexo **1**, bem como os respectivos espectros simulados.

Figura 55 Espécies propostas para o complexo **1** a) m/z 460,15, carga +2 e b) m/z 803,31, carga +1 relativas às espécies encontradas na espectrometria de massas.

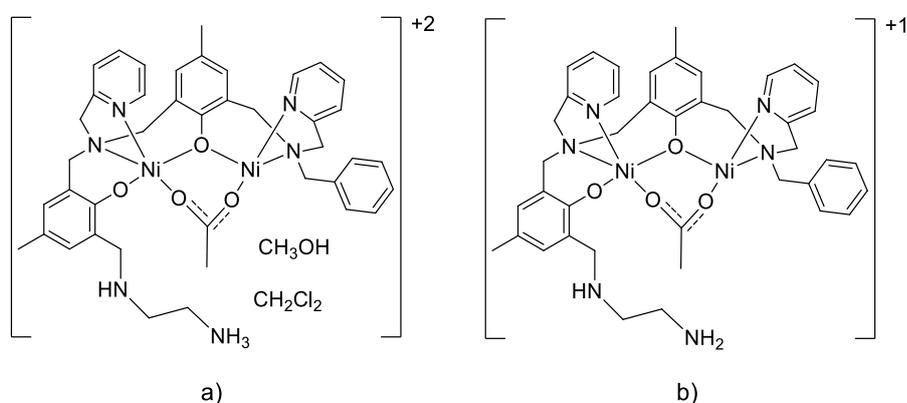


Figura 56 Espectro de ESI-MS do complexo **1** em m/z 460,15 (carga +2) e respectiva simulação da espécie isotópica.

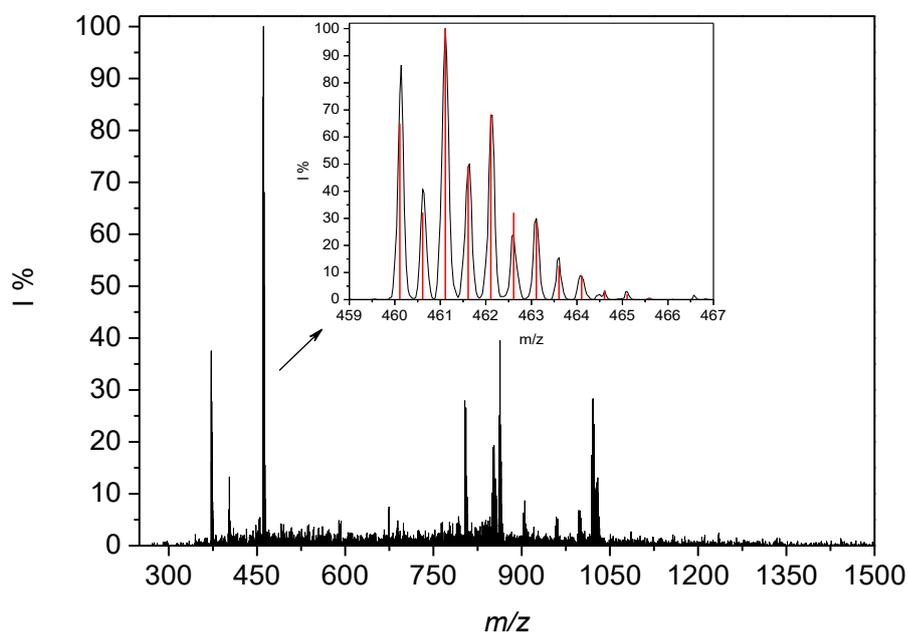
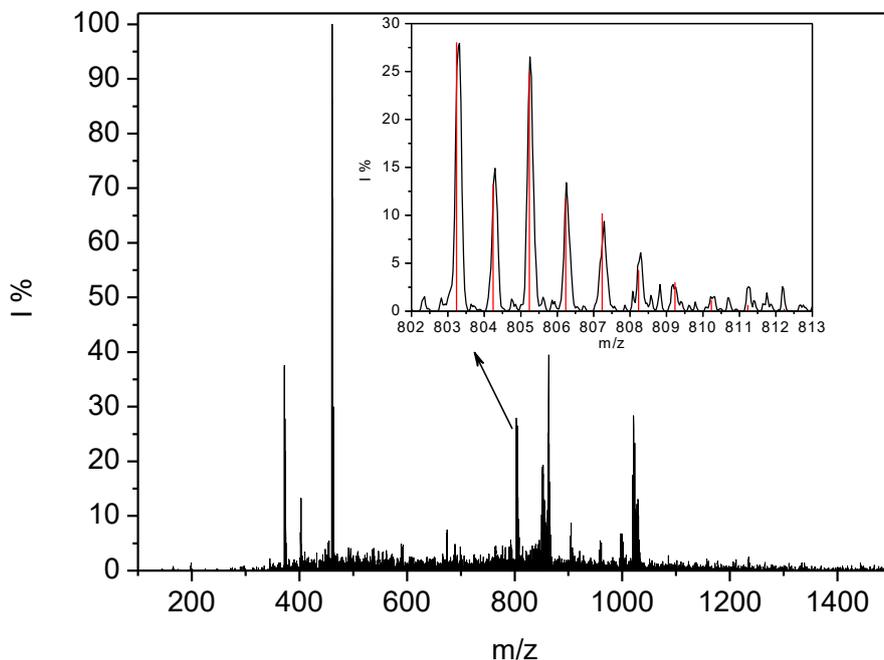


Figura 57 Espectro de ESI-MS do complexo **1** em m/z 803,31 (carga +1) e respectiva simulação da espécie isotópica.



Já para o complexo **2**, foi encontrado um conjunto de picos em $m/z = 817,32$ referente à espécie $[\text{Ni}^{\text{II}}\text{Ni}^{\text{II}}(\mu\text{-CH}_3\text{COO})(\text{LProp})]$ com carga +1, em que o complexo se encontra com uma ponte acetato. Também foi encontrado o pico base em $m/z =$

467,11, referente à espécie $[\text{Ni}^{\text{II}}\text{Ni}^{\text{II}}(\mu\text{-CH}_3\text{COO})(\text{HLPProp})]+\text{CH}_3\text{OH}+\text{CH}_2\text{Cl}_2$ em que o complexo se encontra com uma ponte acetato e carga +2, além de uma molécula de metanol e uma molécula de diclorometano (proveniente da recristalização) como pode ser visto na Figura 58. As Figuras 59 e 60 mostram o espectro de massas do complexo **2**, bem como os respectivos espectros simulados.

Figura 58 Espécies propostas para o complexo **2** a) m/z 467,11, carga +2 e b) m/z 817,32, carga +1 relativas às espécies encontradas na espectrometria de massas.

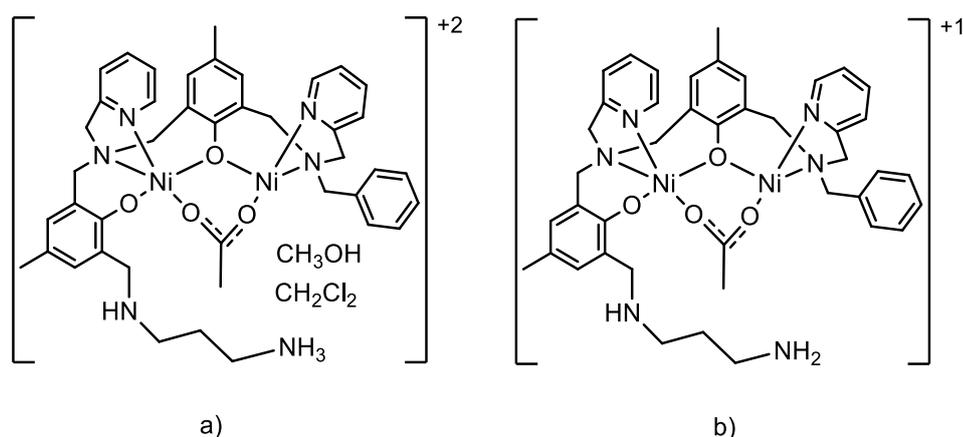


Figura 59 Espectro de ESI-MS do complexo **2** em m/z 817,32 (carga +1) e respectiva simulação da espécie isotópica.

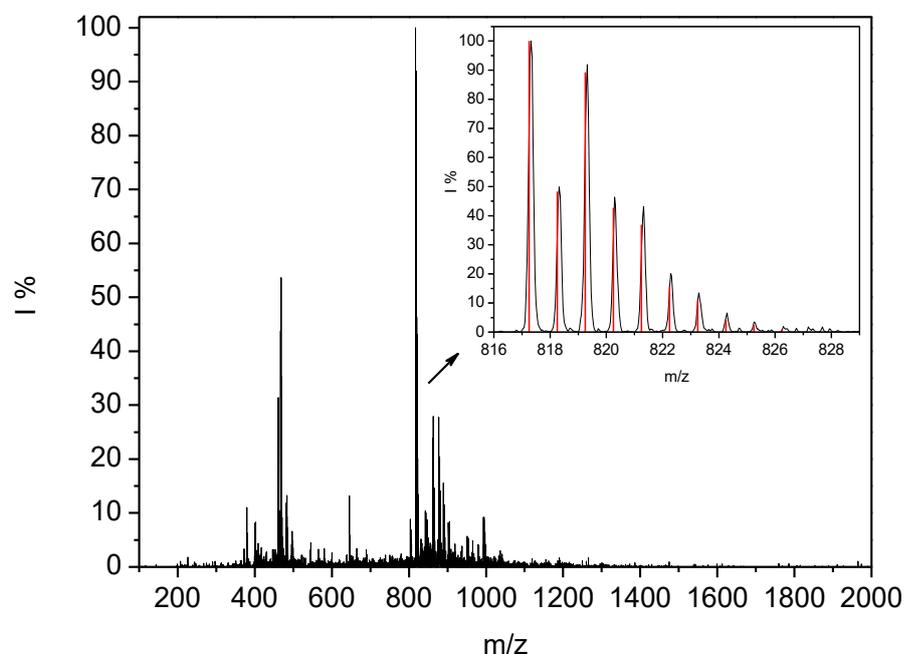
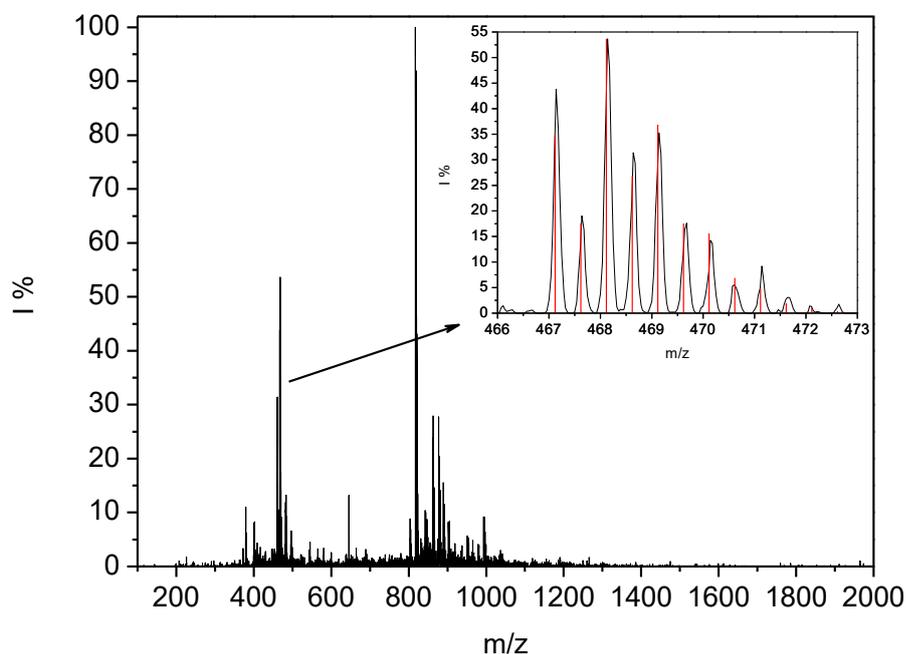


Figura 60 Espectro de ESI-MS do complexo **2** em m/z 467,11 (carga +2) e respectiva simulação da espécie isotópica.



Para o complexo **3**, foi encontrado um pico base em $m/z = 1007,32$ referente à espécie $[\text{Ni}^{\text{II}}\text{Ni}^{\text{II}}(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_2(\text{HLBut})]+2\text{Na}^++2\text{Cl}^-$ com carga +1, em que o complexo se encontra com duas pontes acetato, dois íons cloreto e dois íons sódio. Apesar de não ter sido utilizado nenhum sal contendo cloro na síntese do complexo, a presença do cloreto pode ser explicada pela utilização de diclorometano na síntese do ligante. Para suportar esta hipótese foi feita uma análise de espectrometria de massas do ligante no modo negativo, em que foi encontrado um conjunto de picos em $m/z = 693,49$, que corresponde à uma espécie contendo um ligante e um cloreto (Figura 39, seção 5.1.4). Também foi encontrado um conjunto de picos em $m/z = 831,36$, referente à espécie $[\text{Ni}^{\text{II}}\text{Ni}^{\text{II}}(\mu\text{-CH}_3\text{COO})(\text{LBut})]$ em que o complexo se encontra com uma ponte acetato e carga +1, como pode ser visto na Figura 61. As Figuras 62 e 63 mostram o espectro de massas do complexo **3**, bem como os respectivos espectros simulados.

Figura 61 Espécies propostas para o complexo **3**. a) m/z 1007,32, carga +1 e b) m/z 831,36, carga +1 relativas às espécies encontradas na espectrometria de massas.

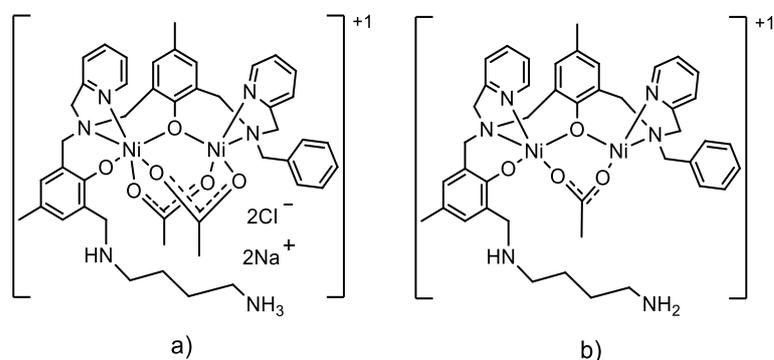


Figura 62 Espectro de ESI-MS do complexo **3** em m/z 1007,32 (carga +1) e respectiva simulação da espécie isotópica.

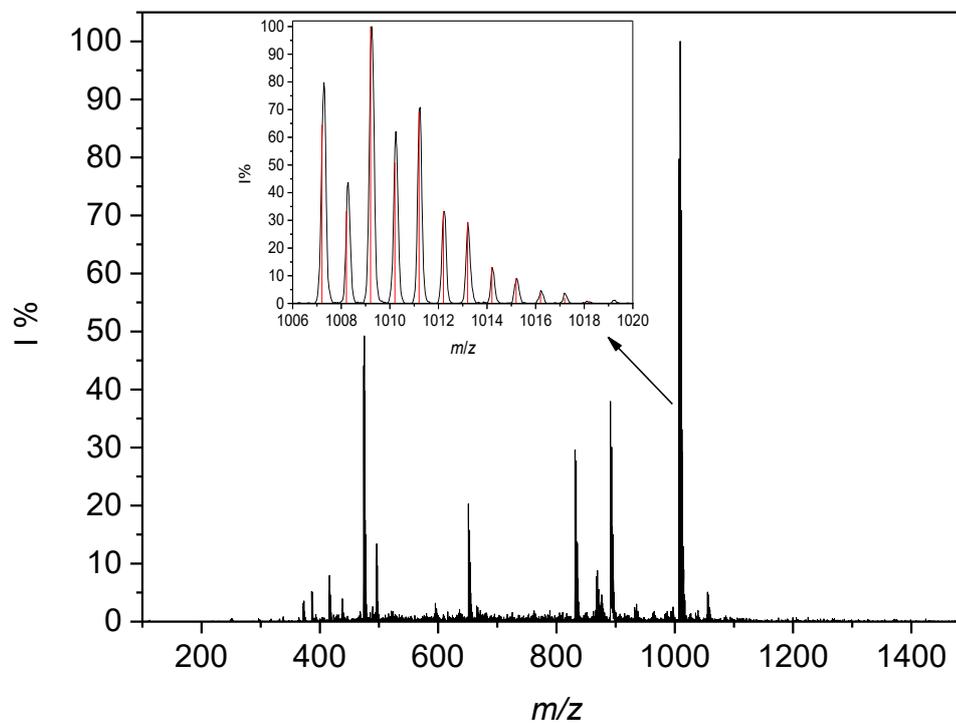
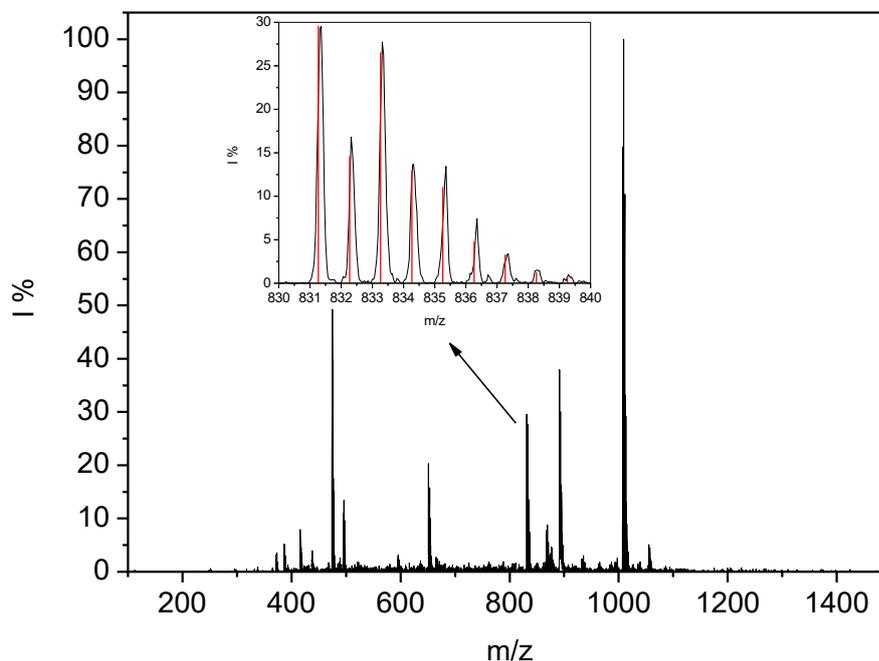


Figura 63 Espectro de ESI-MS do complexo **3** em m/z 831,36 (carga +1) e respectiva simulação da espécie isotópica.



5.2.8 Eletroquímica

O comportamento redox dos complexos **1** – **3** foi investigado por voltametria cíclica e de onda quadrada utilizando-se como solução acetonitrila espectroscópica seca, na faixa de potencial de -2,0 a +2,0 V *versus* NHE, utilizando-se $[\text{NBu}_4][\text{PF}_6]$ como eletrólito suporte e ferroceno como padrão interno ($E_{1/2} = 0,40$ V vs NHE) (Gagné, R. R., Koval, C. A., Lisensky, G. C., 1980). Foi utilizado carbono vítreo como eletrodo de trabalho, um fio de platina como contra eletrodo e um pseudo-eletrodo de Ag/Ag^+ como referência. Os voltamogramas cíclicos dos complexos **1** – **3** apresentam uma onda irreversível na região catódica (Figuras 64A, 66A e 68A) que pode ser atribuída ao processo de transferência de um elétron $\text{Ni}^{\text{III}}/\text{Ni}^{\text{II}}$.

Na região anódica foram observadas duas ondas para o complexo **1** (Figura 64B), em que a onda em +1,11 V pode ser atribuída ao processo de oxidação do centro de Ni^{II} ($\text{Ni}^{\text{III}}/\text{Ni}^{\text{IV}}$) e a onda em +1,65 V pode ser atribuída à oxidação do ligante H_2LEt (Figura 64C). Já para os complexos **2** e **3** foram observadas três ondas na região anódica (Figuras 66B e 68B), em que as ondas em aproximadamente +0,50 V podem ser atribuídas ao processo de oxidação $\text{Ni}^{\text{III}}/\text{Ni}^{\text{IV}}$ e as ondas em

aproximadamente +1,00 V podem ser atribuídas ao processo de oxidação $\text{Ni}^{\text{II/III}}/\text{Ni}^{\text{III/IV}}$. Já as ondas em +1,60 V e +1,59 V podem ser atribuídas ao processo de oxidação dos ligantes H_2LProp e H_2LBut , respectivamente (Figuras 66D e 68D).

Os voltamogramas de onda quadrada para os complexos **1** e **3** apresentaram um comportamento *quasi*-reversível (Figuras 65 e 69), que pode ser atribuído ao processo de transferência de um elétron $\text{Ni}^{\text{III/II}}/\text{Ni}^{\text{III}}$ e $\text{Ni}^{\text{III/II}}/\text{Ni}^{\text{III}}$, enquanto para o complexo **2** somente uma onda na região catódica foi observada (Figura 67). O perfil *quasi*-reversível dos voltamogramas de onda quadrada para os complexos **1** e **3** sugere que uma reorganização estrutural ocorre quando do processo de redução, mas sem a fragmentação da estrutura molecular (Zanello, P., 2003).

Dos valores listados na Tabela 14 é possível perceber um deslocamento anódico dos valores de E_{pc} comparando-se os valores de potencial observados para o complexo **A** com os valores observados para os complexos **1**, **2** e **3**, sendo que o complexo **2** apresentou o valor de potencial mais positivo se comparado com os outros complexos. Os valores de potenciais de redução dos complexos **1** – **3** também mostraram-se mais positivos se comparado com outros complexos de Ni^{II} descritos na literatura, como o complexo reportado por Xavier e Neves, contendo o macrociclo triazaciclonoano, que apresentou valores de potencial de redução muito próximos dos observados para o complexo **A** (Piovezan, C. *et al.*, 2012; Greatti, A. *et al.*, 2008; Xavier, F. R., Neves, A., 2016). Este comportamento pode ser explicado pelas interações entre o grupamento amino e uma molécula de água terminal coordenada ao centro de Ni^{II} (vide titulação potenciométrica, seção 5.2.9), que pode causar uma diminuição na densidade eletrônica do centro metálico, favorecendo sua redução (Bhardwaj, V. K., Singh, A., 2014; Silva, G. A. S. *et al.*, 2017; Poornima, S., Gunasekaran, K., Kandaswamy, M., 2015; Anbu, S. *et al.*, 2009).

Tabela 14 Dados eletroquímicos para os complexos 1 – 3, a 25 °C.

Complexo	E_{pc} , (V vs NHE)	E_{pa} , (V vs NHE)
CH ₃ CN		
A	-1,27 -1,64	-
1	-0,960/-0,974 ^a	1,11 1,65
2	-0,850 ^a	0,51 1,09 1,60
3	-0,943/-0,916 ^a	0,507 1,07 1,59
C	-1,29 -1,66	1,00 1,40

^a Valores obtido através da voltametria de onda quadrada; [C] = 1×10^{-3} mol L⁻¹ (**1**, **2** e **3**); **A** = [Ni₂(HBPPAMFF)(μ-OAc)₂(H₂O)]BPh₄ (Piovezan, C. *et al.*, 2012); **C** = [Ni^{II}Ni^{II}(L)(μ-CH₃COO)₂(OH₂)]BPh₄·H₂O, L = 2-[(4,7-diisopropil-1,4,7-triazonan-1-il)metil]-4-metil-6-[(piridina-2-il-metilamino)metil]fenolato (Xavier, F. R., Neves, A., 2016).

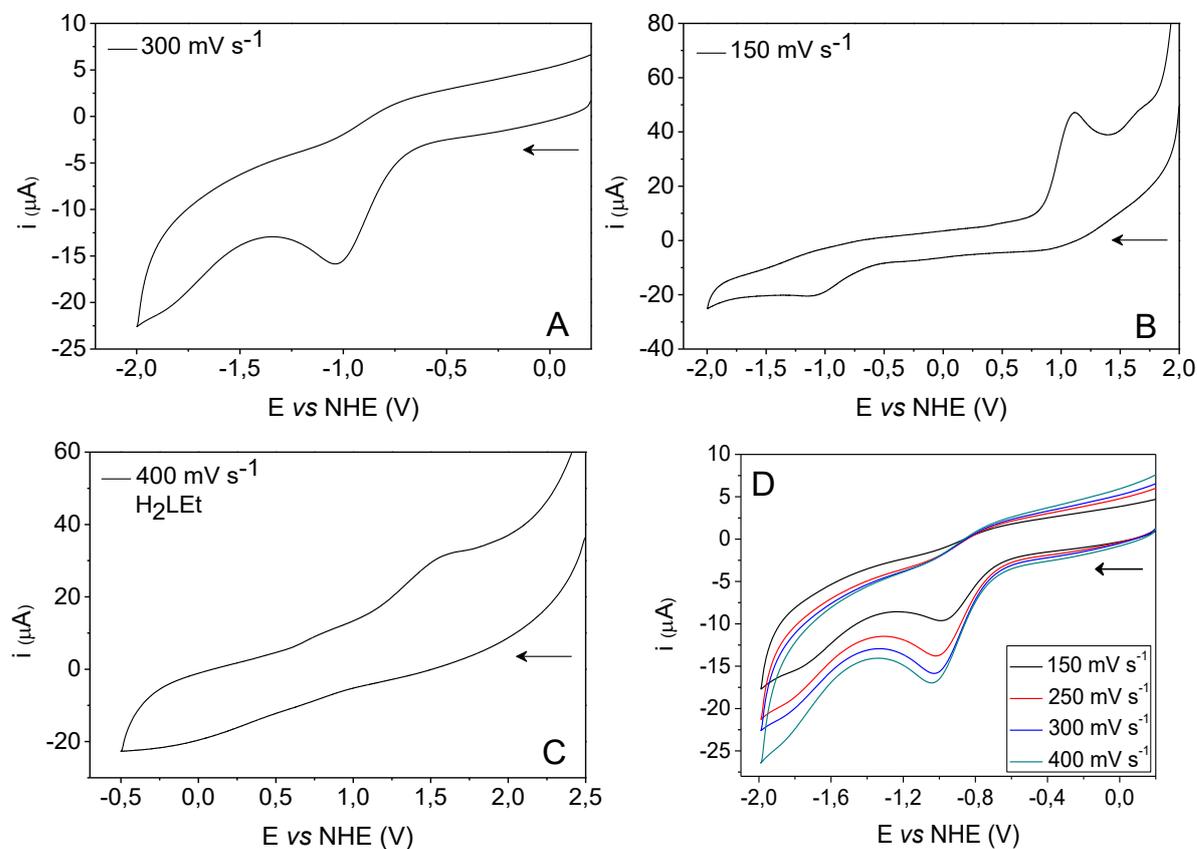
Figura 64 Voltamogramas cíclicos em acetonitrila seca: A, B e C) complexo 1; D) ligante H₂LEt.

Figura 65 Voltamograma de onda quadrada para o complexo **1** em acetonitrila seca. (pulso = 20 mV e frequência = 15 Hz).

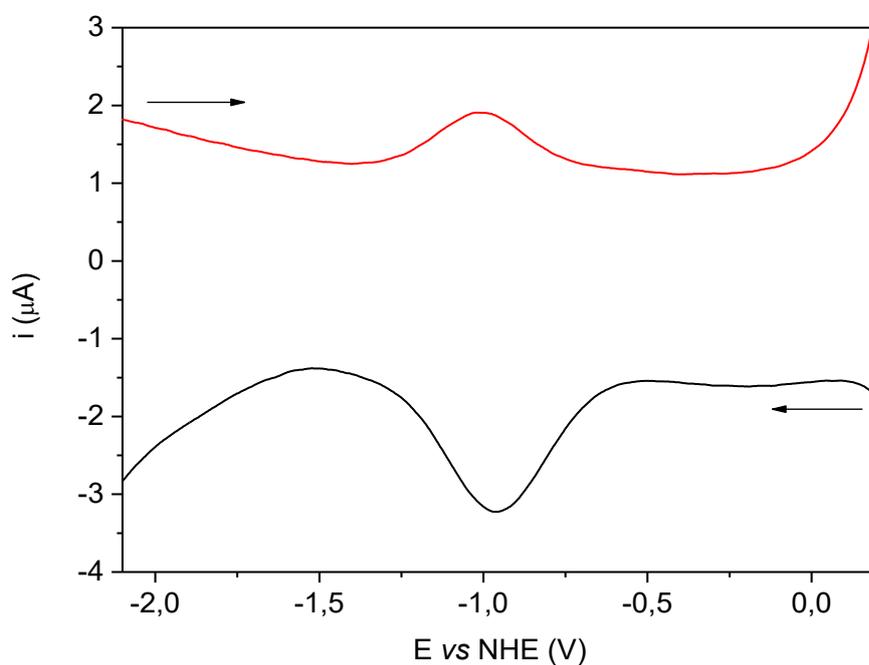


Figura 66 Voltamogramas cíclicos em acetonitrila seca: A, B e C) complexo **2**; D) ligante H₂LProp.

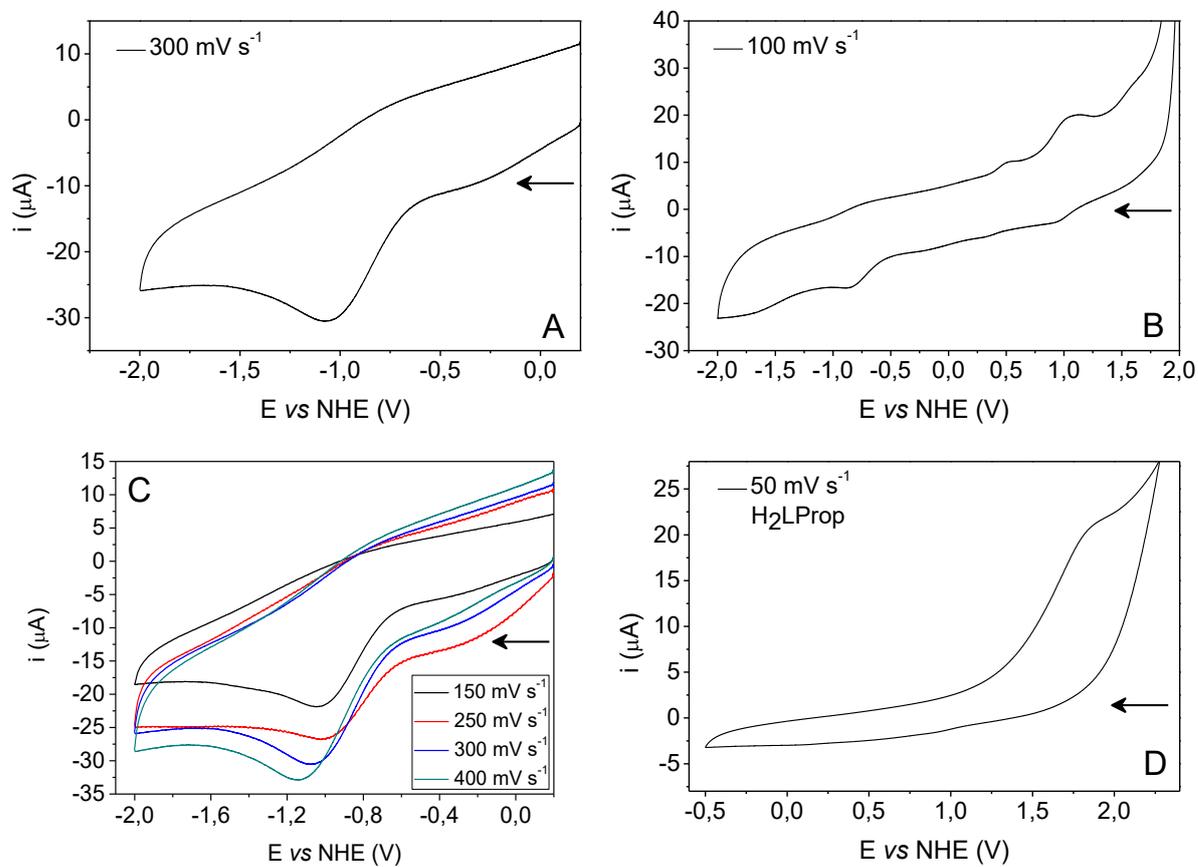


Figura 67 Voltamograma de onda quadrada para o complexo **2** em acetonitrila seca. (pulso = 25 mV e frequência = 15 Hz).

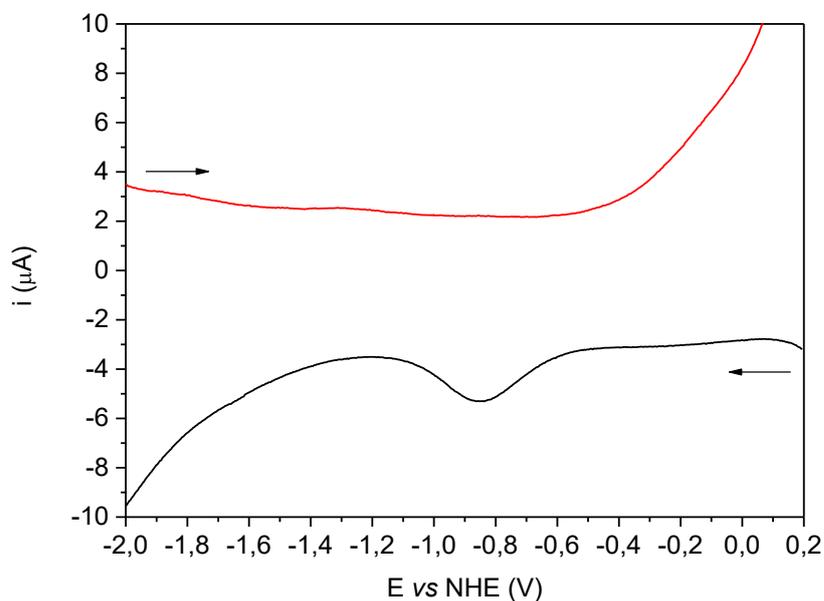


Figura 68 Voltamogramas cíclicos em acetonitrila seca: A, B e C) complexo **3**; D) ligante H₂LProp.

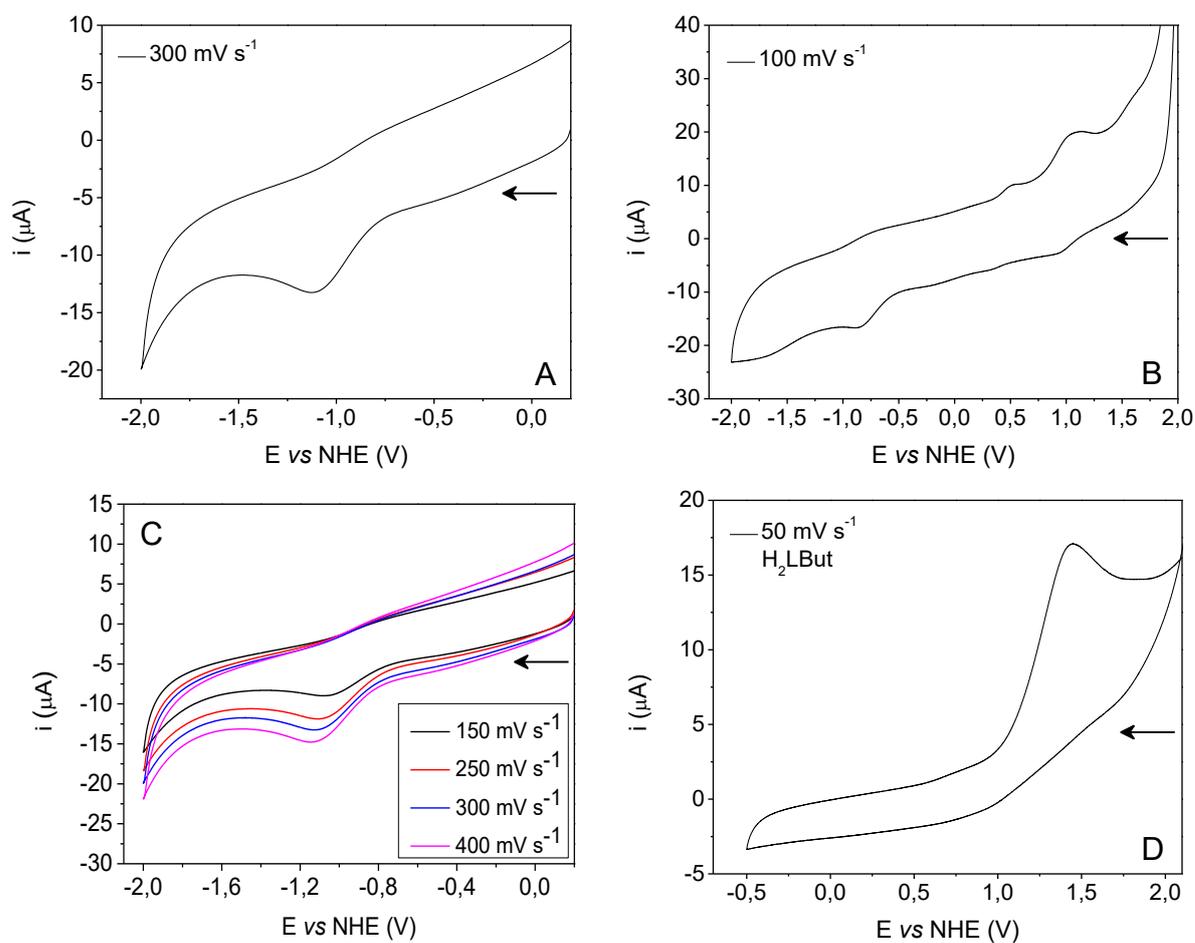
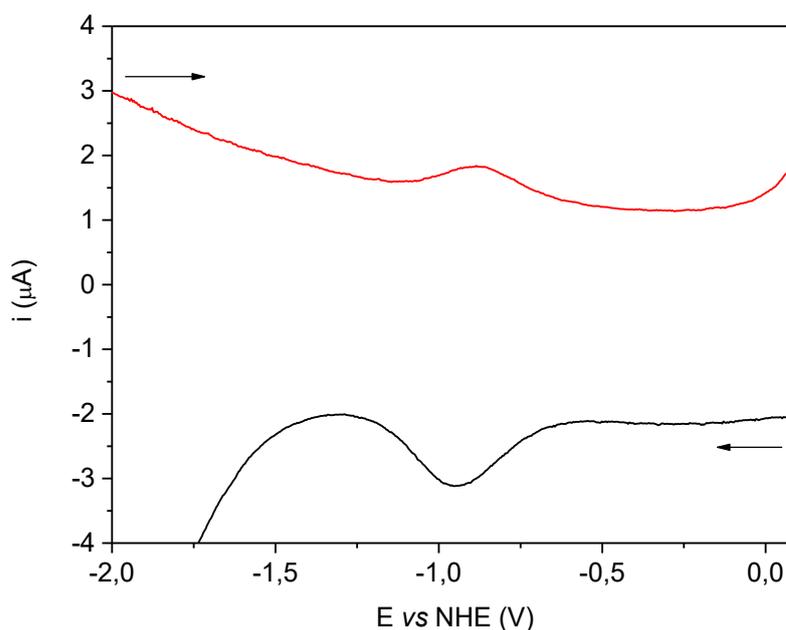


Figura 69 Voltamograma de onda quadrada para o complexo **3** em acetonitrila seca. (pulso = 20 mV e frequência = 15 Hz).



5.2.9 Titulação potenciométrica

Os estudos de titulação potenciométrica para os complexos **1** – **3** foram realizados em solução $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1). Esses experimentos foram realizados para avaliar a presença de moléculas de água coordenadas aos centros metálicos, uma vez que a labilidade das pontes acetato é facilitada com o aumento do pH da solução (Gahan, L. R., Smith, S. J., Neves, A., Schenk, G., 2009; Mitić, N. *et al.*, 2006; Lanznaster, M. *et al.*, 2005; Batista, S. C. *et al.*, 2003), gerando assim aquo-complexos. Os resultados indicam a neutralização de 7 mols de hidróxido de potássio por mol de complexo numa faixa de pH de 3,00 a 12,00. Os valores de pK_a correspondentes encontram-se listados na Tabela 16 e as atribuições de espécies correspondentes aos equilíbrios observados para os complexos **1** – **3** podem ser vistos no Esquema 2. Os gráficos de distribuição de espécies em função do pH para os complexos **1** – **3** estão apresentados nas Figuras 70 a 72.

Tabela 15 Valores das constantes de desprotonação para os complexos 1 – 3.

pK_a	A ^a	1	2	3
pK_{a1}	3,91	5,09±0,02	5,07±0,17	5,27±0,15
pK_{a2}	6,16	5,62±0,04	5,83±0,11	5,69±0,03
pK_{a3}	9,75	5,92±0,09	6,99±0,13	6,80±0,19
pK_{a4}	-	6,35±0,17	7,31±0,09	7,99±0,06
pK_{a5}	-	7,67±0,30	9,08±0,24	8,64±0,14
pK_{a6}	-	9,38±0,16	10,65±0,09	10,24±0,15
pK_{a7}	-	10,93±0,11	11,51±0,21	11,01±0,17

^a(Piovezan, C. *et al.*, 2012).

Para o complexo **A**, a primeira constante é atribuída à desprotonação do fenol lateral coordenado ao centro metálico, uma vez que para este complexo o fenol encontra-se protonado (Piovezan, C. *et al.*, 2012).

Para os complexos **1 – 3**, primeiramente ocorre a liberação das pontes acetato e a formação de ácido acético, de forma que o primeiro valor de pK_a pode ser atribuído à desprotonação de um HOAc e à formação da espécie $[(H_2O)_2Ni^{II}(\mu-CH_3COO)Ni^{II}(OH_2)]$. O segundo valor de pK_a pode ser atribuído à desprotonação da segunda molécula de HOAc gerada, levando à formação da espécie $[(H_2O)_3Ni^{II}Ni^{II}(OH_2)]$. Estas atribuições são consistentes com valores reportados para outro complexo de Ni^{II} apresentando pontes acetato em sua estrutura (Xavier, F. R., Neves, A., 2016). A desprotonação de uma molécula de água coordenada ao centro metálico leva à formação de uma ponte $\mu-OH$, gerando a espécie $[(OH_2)_2Ni^{II}(\mu-OH)Ni^{II}(OH_2)]$. Esta atribuição é consistente também com o valor reportado para o complexo **A** (pK_{a2} , Tabela 16) e outros complexos de Ni^{II} descritos na literatura (Piovezan, C. *et al.*, 2012; Xavier, F. R., Neves, A., 2016; Greatti, A. *et al.*, 2008).

Os valores de pK_{a4} e pK_{a5} podem ser atribuídos à desprotonação de moléculas de água coordenadas aos centros metálicos e podem ser tentativamente atribuídas às espécies $[(OH_2)(OH)Ni^{II}(\mu-OH)Ni^{II}(OH_2)] \rightleftharpoons [(OH_2)(OH)Ni^{II}(\mu-OH)Ni^{II}(OH)]$. Estas atribuições são condizentes com complexos de Ni^{II} previamente descritos na literatura

(Mitić, N., *et al.* 2006; Xavier, F. R., Neves, A., 2016; Greatti, A. *et al.*, 2008, Piovezan, C. *et al.*, 2012; Barman, S. K., Lloret, F., Mukherjee, R., 2016) e os valores de pK_a mais baixos obtidos para os pK_{a4} e pK_{a5} podem estar relacionados com interações entre os grupamentos amino presentes na cadeia lateral dos complexos, e moléculas de água coordenadas aos centros metálicos (Camargo, T. P. *et al.*, 2018; Silva, G. A. S. *et al.*, 2017). Neste caso, pode-se fazer a correlação da atribuição do quinto pK_a observado para os complexos **1** – **3** com o terceiro pK_a observado para o complexo **A** (Tabela 16). Acredita-se que para o complexo **A** não tenha sido possível a obtenção de mais constantes justamente pelo alto valor de pH em que elas ocorreriam, uma vez que este complexo não possui as interações apresentadas pelos complexos **1**, **2** e **3**, que levam a um aumento da acidez das moléculas de água coordenadas aos centros de Ni^{II} .

As duas últimas constantes de desprotonação (pK_{a6} e pK_{a7}) podem ser atribuídas à protonação/desprotonação dos grupos amina presentes na cadeia lateral dos complexos **1** – **3**, o que está de acordo com os valores de pK_a reportados para aminas livres em solução (Cox, B. G., 2013; Camargo, T. P. *et al.*, 2018).

De acordo com a proposta de equilíbrio apresentada para os complexos **1** – **3**, pode se observar que após o quarto pK_a já ocorre a formação da espécie $[(OH_2)(OH)Ni^{II}(\mu-OH)Ni^{II}(OH_2)]$, que contém uma molécula de água coordenada a um dos centros metálicos, e um grupo hidróxido coordenado ao outro centro metálico (espécie E, Esquema 2), condição necessária para que a reação de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP aconteça. Para o complexo **1** esta espécie tem seu máximo em pH 7,00 (69%) (Figura 70), enquanto a espécie $[(OH_2)(OH)Ni^{II}(\mu-OH)Ni^{II}(OH)]$ (espécie F, Esquema 2) tem seu máximo em pH 8,50 (78%) (Figura 70), sendo esta a espécie a apresentar maior atividade na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP.

Para o complexo **2**, a espécie E tem seu máximo em pH 8,00 (78%) (Figura 71), enquanto a espécie F tem seu máximo em pH 9,80 (75%) (Figura 71), sugerindo-se assim que provavelmente exista uma mistura de espécies na reação de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovida por **2**, uma vez que para este complexo o quinto pK_a tem o valor de 9,08, ou seja, o pH considerado ótimo para a reação de hidrólise para este complexo. Já para o complexo **3** a espécie E tem seu máximo em pH 8,33 (51%) (Figura 72), enquanto a espécie F tem seu máximo em pH 9,46 (75%) (Figura 72), sugerindo-se assim que esta seja a espécie responsável pela hidrólise do

substrato 2,4-BDNPP em pH 9,00, ou seja o pH considerado ótimo para a reação de hidrólise para este complexo.

Esquema 2 Proposta de atribuição do equilíbrio de protonação observado para os complexos **1** – **3** em solução de CH₃CN/H₂O (1:1); $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl), 25 °C.

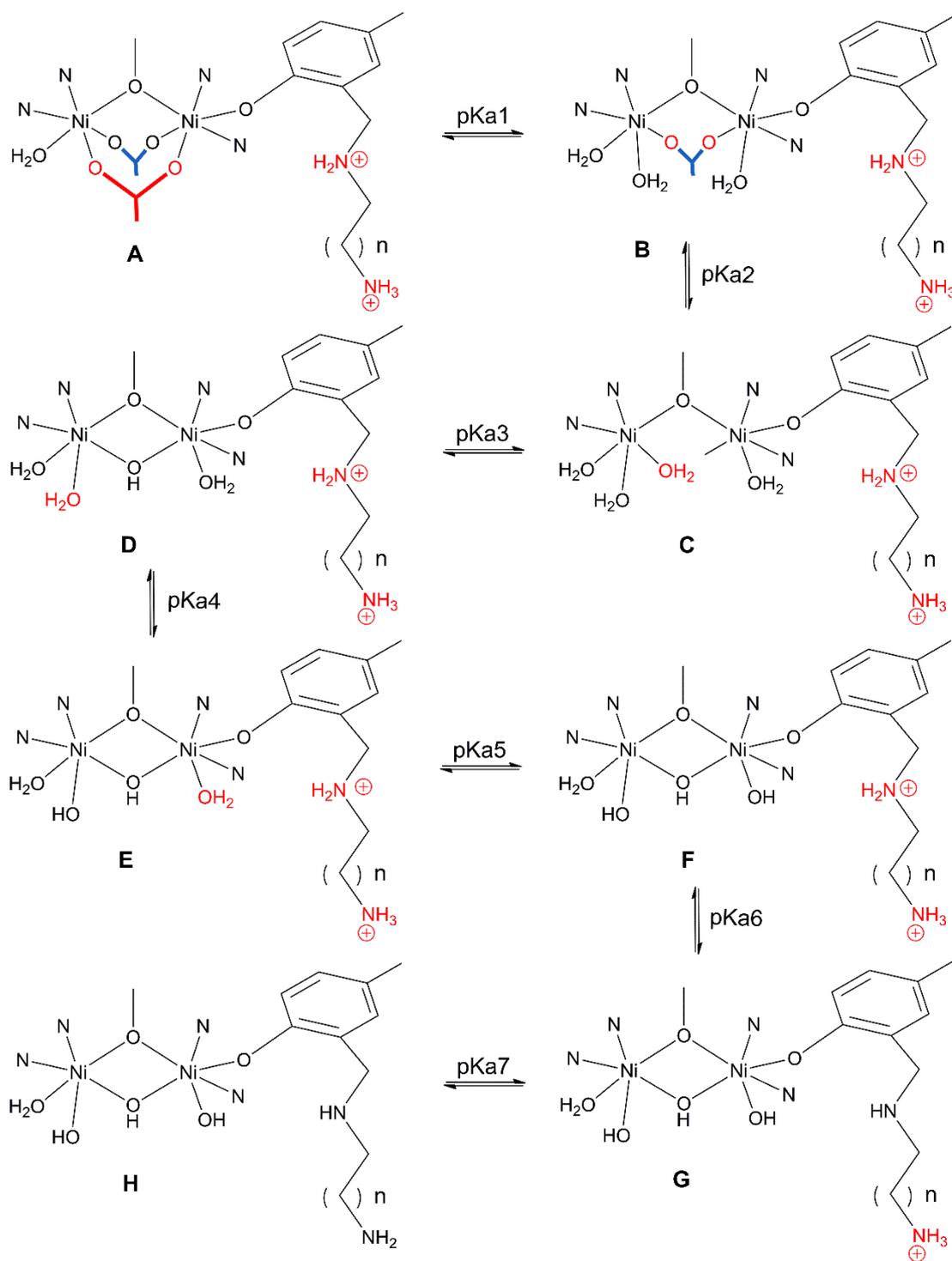
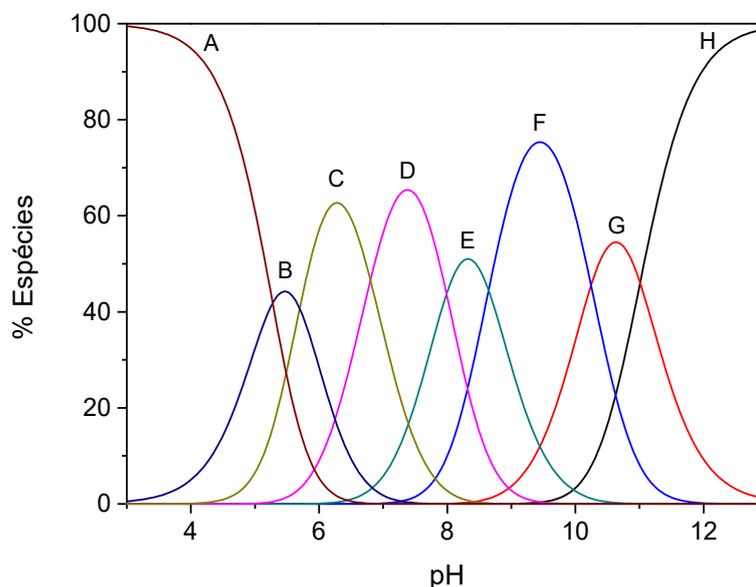


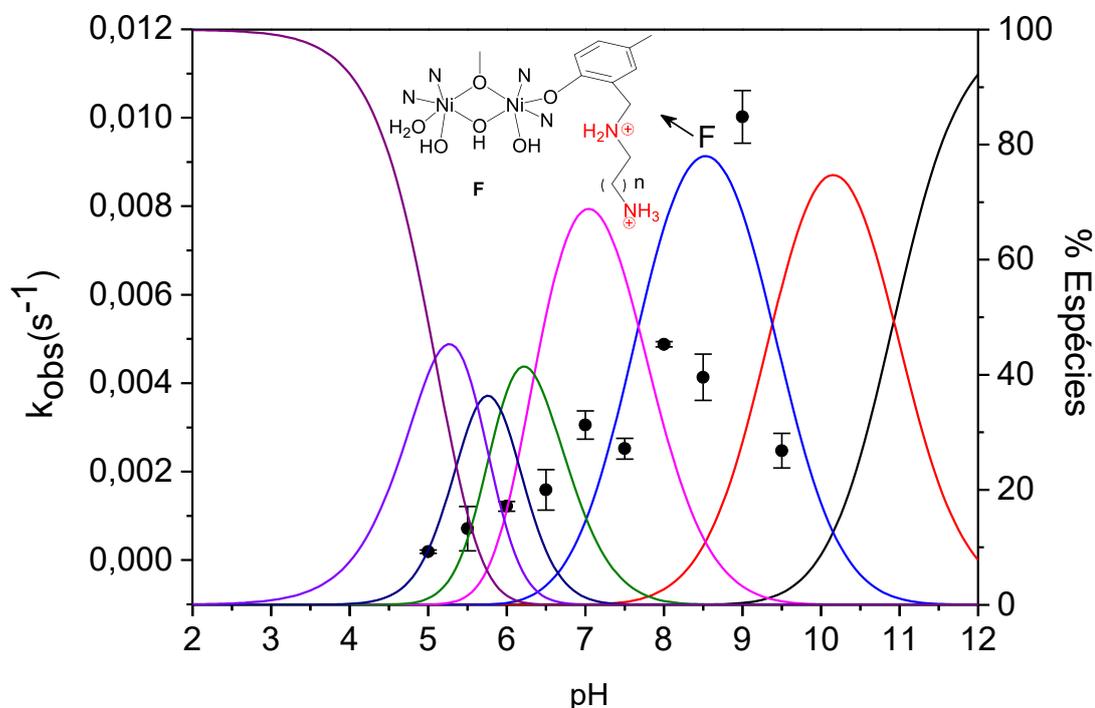
Figura 72 Curvas de distribuição de espécies para o complexo **3** em função do pH. CH₃CN/H₂O 50% v/v, *I* = 0,1 mol L⁻¹ (KCl).



5.2.10 Medidas de reatividade na atividade de hidrólise do substrato modelo bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato de piridinium – 2,4-BDNPP

De acordo com o que foi exposto a respeito da racionalização e síntese de compostos modelo (seção 2.2) que possam servir como catalisadores na hidrólise de ésteres de fosfato, e tendo em vista que os requisitos para que complexos metálicos sejam considerados potenciais hidrolases sintéticas sejam: a presença de um sítio lábil que garanta a coordenação do substrato ao centro metálico, a capacidade de reduzir o pK_a de uma molécula de água coordenada ao centro metálico e assim fornecer um nucleófilo ligado ao metal, e a ativação do substrato frente ao ataque nucleofílico e/ou a estabilização do estado de transição para que ocorra a liberação dos produtos (Hendry, P., Sargeson, A. M., 1989), pode-se concluir que os complexos sintetizados neste trabalho apresentam as características necessárias para serem considerados hidrolases sintéticas (vide titulação potenciométrica, seção 5.2.9). Sendo assim, experimentos cinéticos foram realizados no intuito de se investigar a capacidade dos complexos **1** – **3** de promover a hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP, assim como avaliar a influência de interações eletrostáticas e/ou ligações de hidrogênio na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP.

Figura 73 k_{obs} versus pH (●) para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo **1**, juntamente com as curvas de distribuição de espécies. Inserido, a representação da espécie mais ativa na reação de hidrólise.



Tendo em vista os valores de pK_a obtidos para o complexo **1**, assim como o que foi previamente exposto na discussão sobre a análise de titulação potenciométrica para este complexo, pode se observar que a partir de pH 6,00 este complexo já apresenta atividade frente à hidrólise do 2,4-BDNPP. Para este complexo o terceiro pK_a tem o valor de 5,92, gerando a espécie D $[(OH_2)_2Ni^{II}(\mu-OH)Ni^{II}(OH_2)]$ (Esquema 2), que apresenta moléculas de água coordenadas aos centros metálicos, um dos requisitos necessários para que ocorra a coordenação do substrato ao centro metálico e posterior ataque nucleofílico. Este argumento é válido também até valores de pH 6,50, quando então ocorre a desprotonação de duas moléculas de água coordenadas aos centros metálicos ($pK_{a5} = 7,67$), o que leva à formação da espécie F $[(OH_2)(OH)Ni^{II}(\mu-OH)Ni^{II}(OH)]$, ou seja, a partir de pH 8,00 supõe-se que ocorra uma ligação de hidrogênio entre um hidróxido coordenado ao centro metálico e a amina lateral.

A posterior transferência de próton da amina para o hidróxido geraria então uma molécula de água coordenada ao centro metálico e com isso um sítio lábil, necessário para a coordenação do substrato ao centro metálico. O sexto pK_a tem o

valor de 9,38, quando então ocorre a desprotonação da amina lateral, gerando a espécie G (Esquema 2), e sugere-se que não ocorra mais uma ligação de hidrogênio entre a amina lateral e o hidróxido coordenado ao centro metálico, o que explicaria a baixa atividade apresentada para este complexo em valores de pH acima de 9,00.

Para o complexo **2** observa-se que a partir de pH 6,5, este já começa a apresentar atividade frente à reação de hidrólise do 2,4-BDNPP. A partir do terceiro pK_a (6,99) é gerada a espécie D $[(OH_2)_2Ni^{II}(\mu-OH)Ni^{II}(OH_2)]$ (Esquema 2), e do mesmo modo que para o complexo **1** esta espécie apresenta um dos requisitos necessários para que a reação de hidrólise ocorra. A espécie E (Figura 74) é gerada após o quarto pK_a (7,31), tendo seu máximo em pH 8,00, e para este complexo observa-se um aumento na atividade de hidrólise até este valor de pH. A espécie F (Figura 74) é gerada após o quinto pK_a (9,08), e pelo gráfico apresentado na Figura 75 pode-se perceber que este complexo apresenta atividade máxima em pH 9,00, um valor muito próximo do pK_a . Portanto sugere-se que a mistura das espécies E e F seja responsável pela atividade máxima de catálise deste complexo.

Foram realizadas tentativas de se avaliar a atividade de hidrólise frente o substrato 2,4-BDNPP em valores de pH acima de 9,00, e o complexo se mostrou ativo. No entanto, como o gráfico de k_{obs} vs pH (Figura 75) foi obtido a partir dos experimentos de efeito da concentração do substrato frente à atividade de hidrólise, e para este complexo não foi possível se observar um perfil de saturação (ou de se atingir o valor de K_M), não foi possível a obtenção dos parâmetros cinéticos para este complexo acima de pH 9,00. Porém, este comportamento pode ser explicado ao se comparar os valores de pK_a obtidos para os complexos **1** e **2**, em que acima de pH 9,00 o complexo **1** apresenta uma diminuição na atividade, pois o valor de pK_{a6} (desprotonação da amina lateral) é de 9,38. Já para o complexo **2** este valor é de 10,65 (Figura 74), ou seja, até valores de pH acima de 10,50 as aminas laterais continuam protonadas para o complexo **2**, portanto as interações entre a cadeia lateral e a molécula de hidróxido ainda são possíveis nestes valores de pH.

Figura 74 Proposta de equilíbrio mostrando as espécies E, F e G para os complexos **2** e **3**.

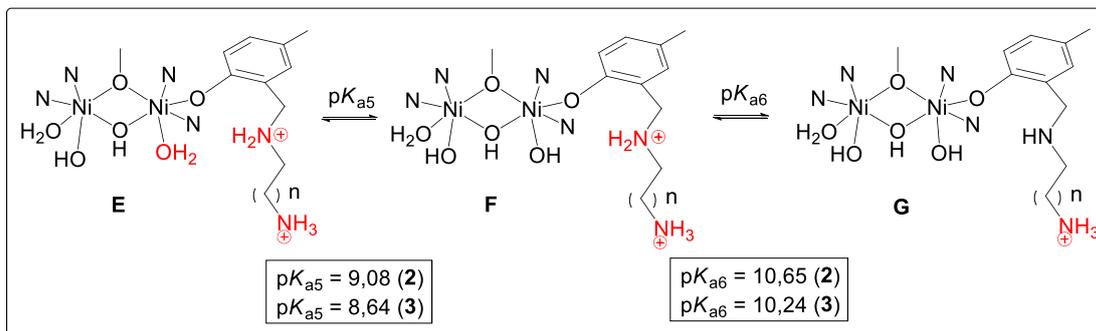
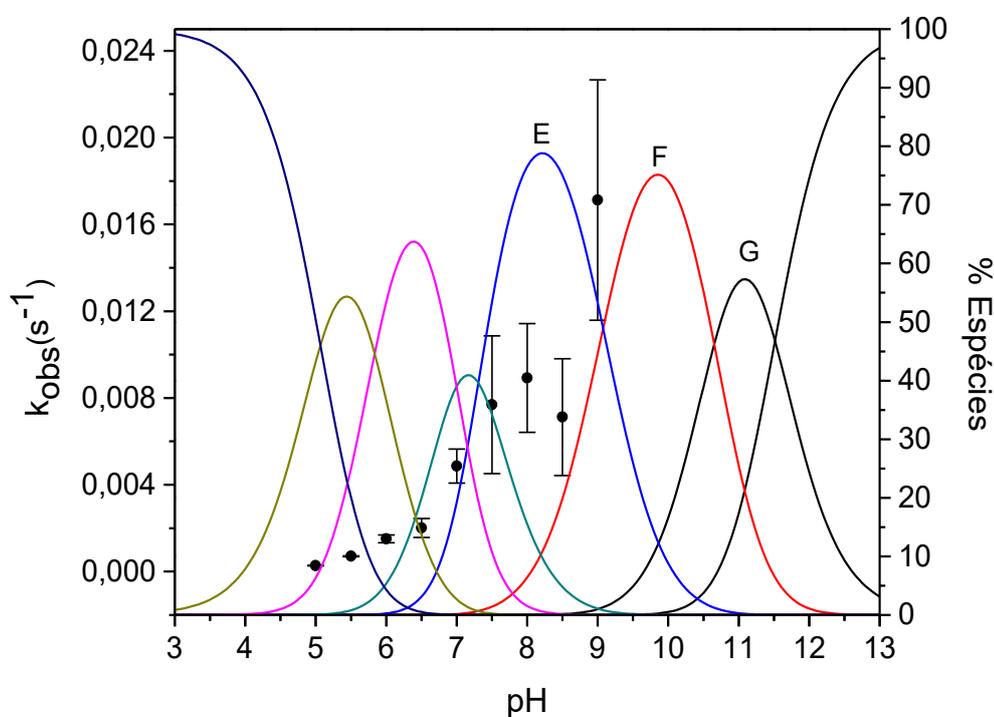


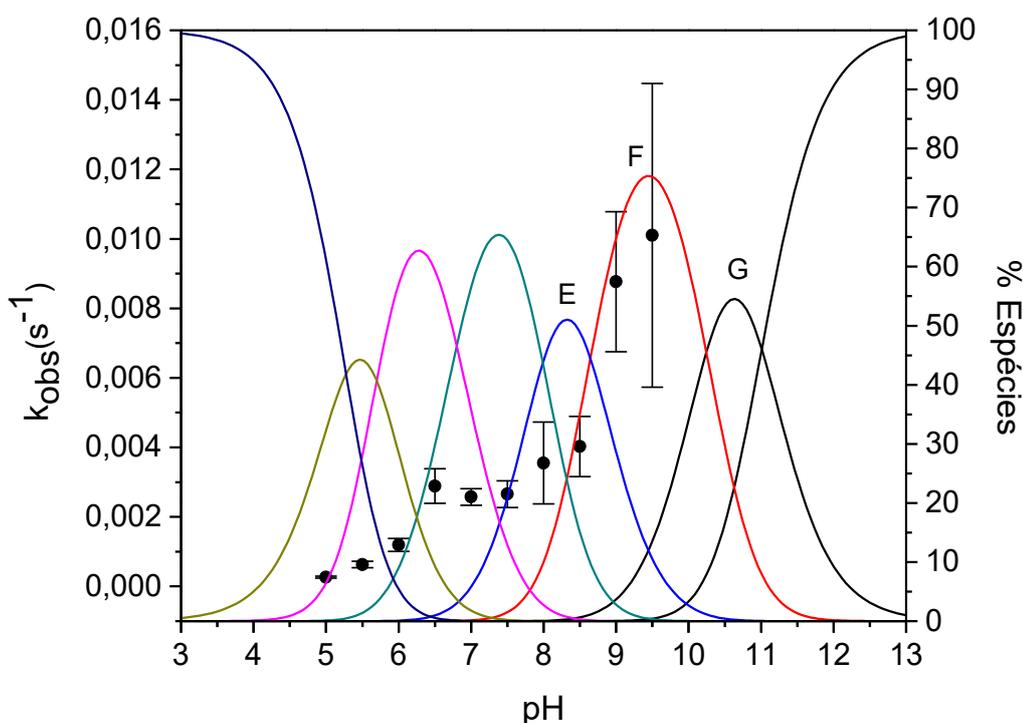
Figura 75 k_{obs} versus pH (●) para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo **2**, juntamente com as curvas de distribuição de espécies.



O complexo **3** apresentou atividade na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP a partir de pH 6,50, assim como o complexo **2**. Estes complexos possuem valores de pK_{a3} muito próximos (6,99 para **2** e 6,80 para **3**), e assim como para o complexo **2** a partir deste pK_a é gerada a espécie D $[(OH_2)_2Ni^{II}(\mu-OH)Ni^{II}(OH_2)]$ (Esquema 2), que apresenta um dos requisitos necessários para que a reação de hidrólise ocorra. A partir de pH 8,00 percebe-se um aumento na atividade, e para o complexo **3** a espécie E (Figura 74) é gerada após o quarto pK_a (7,99), tendo seu máximo em pH 8,33 e representando 51% das espécies neste pH, enquanto que para o complexo **2** a

espécie E representa 78% das espécies nestes valores de pH, o que explica a maior atividade de **2** em pH 8,00 quando comparado com o complexo **3**. Propõe-se que a espécie mais ativa para este complexo, assim como para o complexo **1**, seja a espécie F (Figura 74), que tem seu máximo em pH 9,46 (75%). Acima de pH 9,00 o complexo **3** apresenta o mesmo comportamento apresentado pelo complexo **2**, em que estes se mostram ativos frente à reação de hidrólise do 2,4-BDNPP em valores de pH acima de 9,50, devido às interações entre a cadeia lateral e grupos hidróxido coordenados ao centro metálico, em que para **3** a espécie G (amina desprotonada) é gerada após o sexto pK_a , com valor de 10,24.

Figura 76 k_{obs} versus pH (●) para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo **3**, juntamente com as curvas de distribuição de espécies.



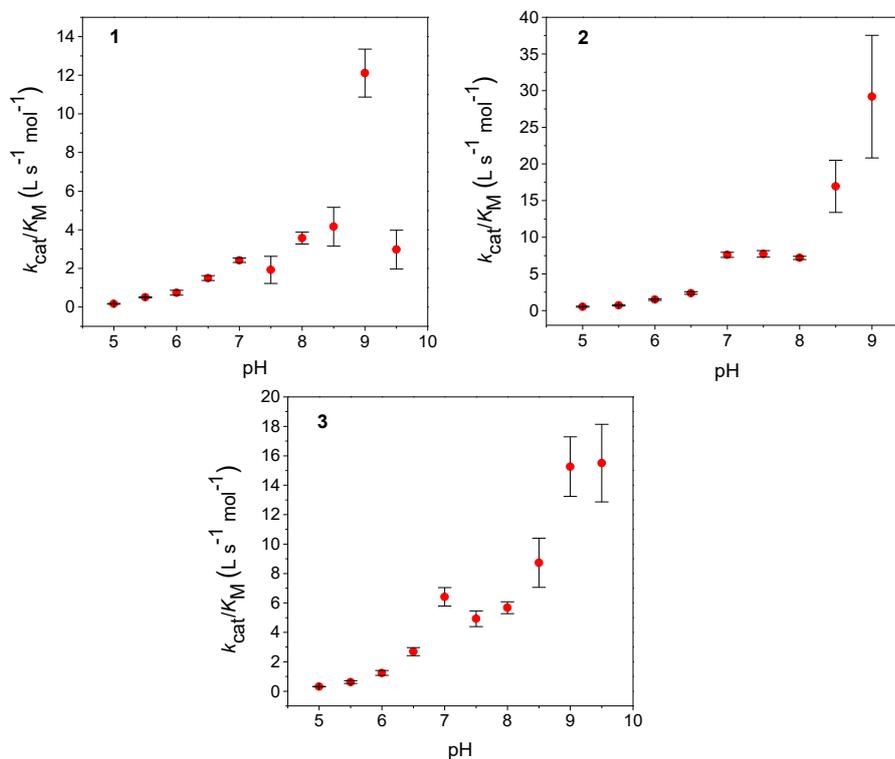
Deste modo, o valor de pH ótimo para a reação de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP foi considerado como sendo 9,00, para modo de comparação não somente entre os complexos deste trabalho, como também com outros complexos descritos na literatura que desenvolveram seus estudos neste mesmo valor de pH.

Ainda com relação aos estudos de efeito de pH, para estes complexos observou-se um perfil de sino em valores de pH entre 5,00 e 7,50 – para **1** e **3** – e entre 5,00 e 8,50 – para **2** – e um salto em pH 9,00. Em comparação, o complexo **A** reportado por Piovezan apresenta um perfil exponencial, com seu máximo de atividade em pH 9,00. Outros complexos de Ni^{II} reportados na literatura apresentando

atividade de hidrolase apresentam ainda um perfil sigmoide (Greatti, A. *et al.*, 2008; Xavier, F. R., Neves, A., 2016; Bhardwaj, V. K. *et al.*, 2014; Horn Jr., A. *et al.*, 2018), de modo que os mesmos não apresentam atividade significativa em valores de pH mais baixos. Assim, é possível perceber a influência que o grupo lateral amina exerce não somente nas propriedades físico-químicas dos complexos, como também na sua reatividade.

Os gráficos mostrando a dependência da eficiência catalítica *versus* pH para os complexos **1** – **3** podem ser vistos na Figura 77. Os três complexos apresentaram um perfil de eficiência catalítica vs pH muito parecido com o perfil obtido para a dependência de k_{obs} vs pH, sendo possível se inferir por meio dos gráficos abaixo que os complexos **1** – **3** apresentam máxima eficiência catalítica em pH 9,00, sendo que o complexo **3** apresenta valores de eficiência catalítica muito próximos em pH 9,00 e 9,50 (15,3 L s⁻¹ mol⁻¹ e 15,5 L s⁻¹ mol⁻¹, respectivamente).

Figura 77 Eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) vs pH para os complexos **1** – **3**.



5.2.10.2 Efeito da concentração do substrato na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP

A dependência da velocidade de reação com relação à concentração do substrato 2,4-BDNPP foi investigada para cada valor de pH, na faixa de 5,00 – 9,50 para os complexos **1** e **3** e de 5,00 – 9,00 para o complexo **2** (Apêndice B). A partir do gráfico apresentado na Figura 78 pode-se observar que para todos os complexos ocorre uma dependência linear da velocidade em baixas concentrações de substrato, e posterior desvio da linearidade conforme o aumento da concentração do mesmo, por fim atingindo uma curva de saturação. Esta dependência da velocidade com a concentração do substrato sugere que ocorra a formação de um intermediário enzima-substrato na reação de hidrólise. Deste modo o modelo de Michaelis-Menten (Piszkiewicz, D., 1977) foi aplicado para todos os sistemas. Os parâmetros cinéticos obtidos para os complexos **1** – **3**, juntamente com os parâmetros obtidos para outros complexos descritos na literatura, estão apresentados na Tabela 17.

Figura 78 Dependência da velocidade de reação (v_0) com a concentração do substrato 2,4-BDNPP para a reação de hidrólise promovida pelos complexos **1**, **2** e **3**. Condições: [complexo] = $4,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para os complexos **1** e **2** e [complexo] = $5,18 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para o complexo **3**; [tampão] = $50,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (CHES, pH = 9,00); $I = 50,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4) em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) a 25 °C.

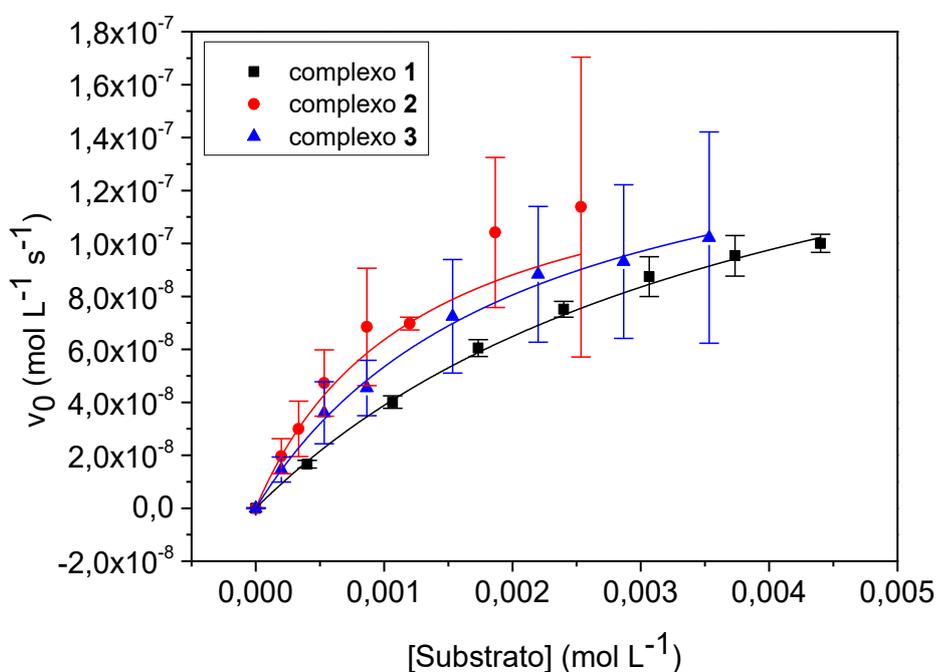


Tabela 16 Parâmetros cinéticos obtidos para os complexos **1** – **3** na reação de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP, e de outros complexos para comparação.

Complexo	$v_{\max} \times 10^7$ (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	$K_M \times 10^3$ (mol L ⁻¹)	$k_{\text{cat}} \times 10^2$ (s ⁻¹)	K_{ass} (L mol ⁻¹)	k_{cat}/K_M (L s ⁻¹ mol ⁻¹)	$f \times 10^{-4}$	pH
A^a	5,37	1,57	5,37	637,0	34,20	13,84	9,00
1	1,97±0,11	4,06±0,35	4,92±0,27	246,3	12,11±1,24	12,67	9,00
1	0,30±0,01	2,03±0,16	0,30±0,01	492,6	1,47±0,12	1,55	6,50
2	1,40±0,18	1,20±0,31	3,50±0,45	833,3	29,18±8,35	9,02	9,00
2	0,31±0,009	1,30±0,07	0,31±0,01	769,2	2,38±0,15	1,60	6,50
3	1,64±0,12	2,07±0,23	3,16±0,23	483,1	15,30±2,03	8,15	9,00
3	0,64±0,03	1,38±0,12	0,37±0,02	724,6	2,69±0,27	1,92	6,50
B^b	0,58	1,19	3,42	840,3	28,82	8,84	9,00
C^c	1,33	3,44	1,26	291	3,70	3,25	9,00
D^d		0,21	0,28	4762	0,01		7,00
E^e	0,34	27,8	0,07	36,0	0,02	2,11	6,50
F^f		3,07	0,194	325	0,63	1,00	6,50

^a [Ni₂(HBPPAMFF)(μOAc)₂(H₂O)]BPh₄ (Piovezan, C. *et al.*, 2012); ^b [Ni₂(L1)(OAc)₂(H₂O)]ClO₄·H₂O (Greatti, A. *et al.*, 2008); ^c [Ni^{II}Ni^{II}(L)(μ-CH₃COO)₂(OH₂)]BPh₄·H₂O (Xavier, F. R., Neves, A., 2016); ^d [Ni₂(L^{ClO}O)(μ-OAc)₂](PF₆)·3H₂O (Massoud, S. S. *et al.*, 2016); ^e [FeZn(IPCPMP)(OAc)₂(CH₃OH)]PF₆ (Jarenmark, M. *et al.*, 2011); ^f [FeZn(L₁bpea-apur)(μ-OH)(H₂O)]ClO₄ (Pereira, C. *et al.*, 2019); $f = k_{\text{cat}}/k_{\text{unc}}$ (fator catalítico), em que $k_{\text{unc}} = 3,88 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ a 25 °C e pH = 9,00; $k_{\text{unc}} = 1,93 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ a 25 °C e pH = 6,50 (Bunton, C. A., Farber, S. J., 1969).

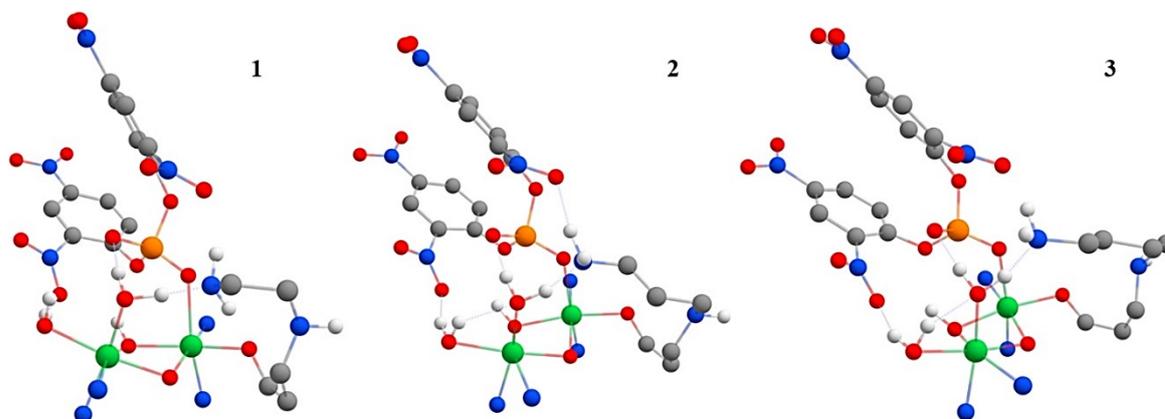
De acordo com a Tabela 17, observa-se que a derivatização do ligante H₂bppamff com grupos amino para os complexos **1** e **3** provocou um aumento nos valores de K_M , em pH 9,00, quando comparado com o valor obtido pelos complexos **A**, **B** (apresentando em sua estrutura três unidades piridina coordenadas aos centros metálicos, Figura 8A, seção 2.2.1) e **D** (apresentando em sua estrutura quatro unidades piridina coordenadas aos centros metálicos, Figura 7A, seção 2.2). Observa-se também uma diminuição no valor de K_{ass} , juntamente com o valor de k_{cat} , levando a valores de eficiência catalítica mais baixos para estes complexos quando comparado com os complexos **A** e **B**, sendo que o complexo **1** apresentou o maior

valor de K_M entre os três complexos, ou seja, menor afinidade pelo substrato. Um comportamento similar ao apresentado para os complexos **1** e **3** foi observado para o complexo **C**, reportado por Xavier e Neves, contendo o anel macrociclo triazaciclono-nano em sua estrutura. No entanto, a reação de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovida pelo complexo **1** mostrou ser 126.700 vezes mais rápida que a reação não catalisada ($k_{unc} = 3,88 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ em pH 9,00 e 25 °C), sendo este valor comparável ao apresentado pelo complexo **A**.

O complexo **2** apresentou o maior valor de eficiência catalítica entre os três complexos ($k_{cat}/K_M = 29,18$), sendo este valor de eficiência próximo ao obtido para os complexos **A** e **B**, e foi capaz de acelerar a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP em 90.200 vezes em relação à reação não catalisada. Este complexo apresentou também uma diminuição nos valores de K_M e k_{cat} se comparado ao complexo **A**, apresentando deste modo maior afinidade pelo substrato quando comparado com os complexos **A**, **1** e **3**. O complexo **2** também apresentou um valor de potencial de redução mais positivo se comparado com os complexos **A**, **1** e **3**, indicando uma menor densidade eletrônica sobre o metal, e conseqüentemente maior acidez de Lewis, o que pode explicar a maior afinidade pelo substrato apresentada para este complexo.

Estudos teóricos foram realizados com o intuito de se aprimorar o entendimento do processo catalítico para estes complexos, em que os conjugados fosfato dos complexos **1** – **3** foram otimizados, e podem ser vistos na Figura 79. Como pode ser visto, uma estrutura de energia mínima foi encontrada para todos os conjugados fosfato após uma transferência de próton entre a amina protonada e um grupo hidróxido coordenado ao centro de níquel. Pela figura abaixo é possível perceber que o complexo **2** apresenta uma interação relevante entre a amina e um átomo de oxigênio presente na molécula de substrato, e acredita-se que esta interação adicional com o substrato possa explicar a maior atividade catalítica, como também o menor valor de K_M , apresentados por este complexo.

Figura 79 Geometrias no estado fundamental otimizadas para os conjugados fosfato dos complexos **1**, **2** e **3** utilizando BP86/DEF2-TZVP (metais) ou DEF2-SVP.



Ainda com relação aos dados apresentados na Tabela 17, pode-se observar que os complexos **1** – **3** apresentam valores de eficiência catalítica mais elevados se comparado com os valores apresentados por complexos análogos de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ nos mesmos valores de pH, ou seja, pH 6,50. O complexo **F**, reportado por Pereira e colaboradores, contém um grupo aminopurina na cadeia lateral do ligante e apresentou efeitos de segunda esfera significativos com relação à reação de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP, enquanto o complexo **E**, utilizando o ligante IPCPMP (Figura 6, seção 2.2), reportado por Jarenmark e colaboradores não apresenta efeitos de segunda esfera. Pelos valores listados na Tabela 17 observa-se um aumento nos valores de $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ e k_{cat} apresentados pelos complexos contendo Ni^{II} com relação aos complexos **E** e **F**, assim como no fator de aceleração destes complexos. A reação de hidrólise catalisada pelos complexos **1** – **3** mostrou ser entre 1,50 e 2,00 vezes mais rápida que a reação catalisada pelo complexo **F** em pH 6,50, indicando que mesmo em valores de pH mais baixos (Tabelas 22 a 24 Apêndice B) os complexos **1** – **3** apresentam maior atividade frente à reação de hidrólise do 2,4-BDNPP que outros complexos análogos descritos na literatura que apresentam atividade de fosfoesterase.

5.2.10.3 Estudos de atividade de monoesterase para os complexos **1** – **3**

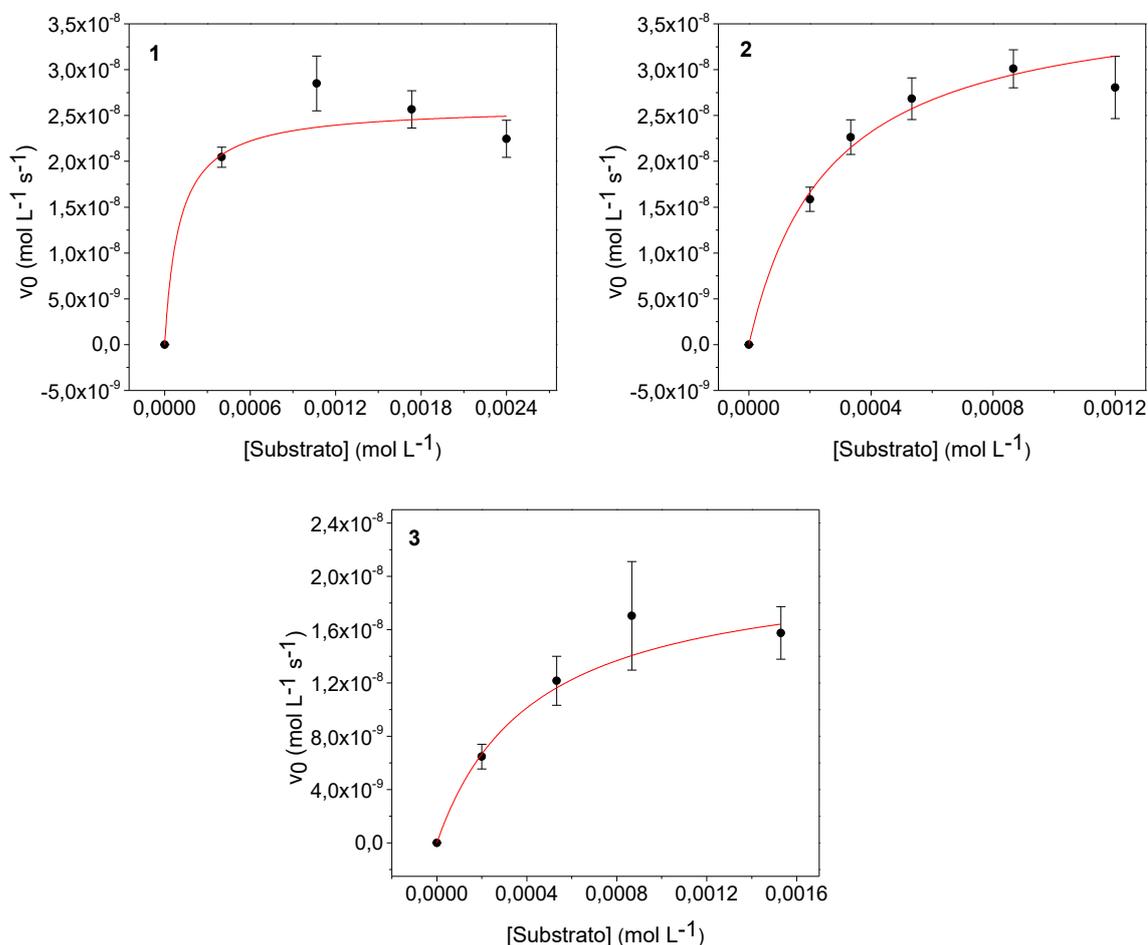
Com o objetivo de avaliar se os complexos **1** – **3** promovem a hidrólise do produto 2,4-DNPP durante a reação de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP, ou seja, se

estes complexos apresentam também atividade de monoesterase, foram monitoradas reações estequiométricas entre os complexos **1 – 3** e o substrato 2,4-BDNPP a 25 °C. Observou-se que 2 equivalentes do produto 2,4-DNP (Esquema 1) foram liberados após um período de 40 h, o que indica a hidrólise de ambos mono- e diéster. De acordo com esta informação, e assumindo que a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP leva à formação de um intermediário (provavelmente o monoéster coordenado ao complexo), a atividade dos complexos **1 – 3** foi também investigada frente à hidrólise do substrato 2,4-DNPP. Os estudos de dependência da velocidade com relação a concentração do substrato 2,4-DNPP foram realizados em pH 9,00, a 25 °C, sob as mesmas condições descritas anteriormente para o estudo do efeito da concentração do substrato 2,4-BDNPP. A determinação das velocidades iniciais em função da concentração do substrato apresentou um perfil de saturação, e o modelo de Michaelis-Menten (Piszkiewicz, D., 1977) foi aplicado para todos os sistemas (Figura 80). A Tabela 18 traz os parâmetros cinéticos obtidos para os complexos **1 – 3** para a reação de hidrólise do substrato 2,4-DNPP.

Tabela 17 Parâmetros cinéticos obtidos para os complexos **1 – 3** frente à reação de hidrólise do substrato 2,4-DNPP.

Complexo	$v_{\text{máx}} \times 10^8$ (mol L⁻¹ s⁻¹)	$K_M \times 10^4$ (mol L⁻¹)	$k_{\text{cat}} \times 10^3$ (s⁻¹)	K_{ass} (L mol⁻¹)	k_{cat}/K_M (L s⁻¹ mol⁻¹)
1	2,59±0,23	1,02±0,61	6,50±0,58	9815,37	63,75±38,53
2	3,83±0,28	2,61±0,50	9,60±0,70	3833,34	36,73±7,56
3	2,10±0,19	4,30±0,86	3,50±0,48	2323,26	8,14±1,38

Figura 80 Dependência da velocidade (v_0) com relação a concentração do substrato 2,4-DNPP. Condições: [complexo] = $4,00 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ (**1** e **2**) e [complexo] = $5,18 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ (**3**); [tampão] = $50,00 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ (CHES, pH = 9,00); $I = 50 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ (LiClO $_4$) em CH $_3$ CN/H $_2$ O (1:1), a 25 °C.



De acordo com a Tabela 18 pode-se observar que o complexo **2** apresentou maior valor de k_{cat} dentre os três complexos, sendo mais efetivo na conversão de substrato em produtos. No entanto, o complexo **1** apresentou valor de eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) aproximadamente duas vezes maior se comparado com o complexo **2**, e oito vezes maior se comparado ao complexo **3**, apresentando também o maior valor de K_{ass} . Comparando-se estes resultados com os obtidos para o substrato 2,4-BDNPP, nota-se que para o complexo **1** a constante de associação com o monoéster é aproximadamente 40 vezes maior, enquanto o valor de k_{cat} é 75 vezes menor. O complexo **1** apresentou um comportamento similar ao reportado pelos complexos **A** e **B** frente à reação de hidrólise do 2,4-DNPP. Já para os complexos **2** e **3** observou-se

um aumento no valor da constante de associação de 4 e 5 vezes, respectivamente, em relação à reação com o substrato 2,4-BDNPP, e valores de k_{cat} 3,60 e 9,00 vezes menores para **2** e **3**, respectivamente. Deste modo sugere-se que nucleófilos distintos sejam responsáveis pela hidrólise dos substratos mono- e diéster. Uma vez que a hidrólise espontânea do substrato 2,4-DNPP é cerca de 50 vezes maior que a apresentada pelo substrato 2,4-BDNPP sob condições experimentais idênticas (Bunton, C. A., Farber, S. J., 1969), e que no caso dos complexos **1** – **3** um comportamento oposto foi observado, pode-se supor que um nucleófilo mais pobre esteja atuando na reação de hidrólise do monoéster.

5.2.10.4 Estudos visando a proposta de um mecanismo de ação para os complexos **1** – **3**

Em um sistema catalítico eficiente, o catalisador deve ser capaz de regenerar sua forma ativa após um ciclo catalítico, para conseguinte repetição do processo. Para verificar se os complexos **1** – **3** apresentam esta característica, foram realizados experimentos em que a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP ($[\text{substrato}] = 2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) promovida pelos complexos **1** – **3** ($[\text{complexo}] = 4,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) foi acompanhada espectrofotometricamente em 445 nm, em pH = 9,00 a 25 °C. Observou-se que o complexo **1** foi capaz de hidrolisar 42 moléculas de substrato em 24 h, o complexo **2** foi capaz de hidrolisar 58 moléculas de substrato em 12 h e o complexo **3** foi capaz de hidrolisar 41 moléculas de substrato em 8 h. O complexo **B**, reportado por Greatti e colaboradores, foi capaz de hidrolisar 22 moléculas de substrato em 22 h.

Outro estudo realizado visando um maior entendimento de como os complexos **1** – **3** promovem a catálise do substrato 2,4-BDNPP foi a avaliação do nucleófilo responsável pela reação de catálise, ou seja, se o ataque ao átomo de fósforo estaria sendo realizado pelo íon hidróxido terminal ou através de uma catálise básica geral. Deste modo realizou-se um experimento para avaliar o efeito isotópico do deutério sobre a velocidade de hidrólise do 2,4-BDNPP. As razões $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ obtidas para os complexos **1**, **2** e **3** foram 5,22, 4,22 e 7,02 respectivamente, indicando que ocorra uma transferência de próton na etapa determinante da reação ($k_{\text{H}}/k_{\text{D}} > 2$) (Bunton, C. A., Farber, S. J., 1969), e que esta ocorra via catálise básica geral.

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

O efeito da temperatura sobre a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP foi investigado sob condições idênticas às descritas na seção 6.2.10.2 nas temperaturas de 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Os parâmetros de ativação E_a , ΔH^\ddagger , $T\Delta S^\ddagger$ e ΔG^\ddagger para a reação de hidrólise catalisada pelos complexos **1** – **3** foram obtidos através das equações de Arrhenius e Eyring (Wilkins, R. G., 2002).

A partir da equação de Arrhenius é possível de se expressar, de uma forma geral, o efeito da temperatura na velocidade de uma reação química, sendo possível de se obter a energia de ativação de determinada reação, conforme a Equação 1:

$$k = A \exp(-E_a/RT) \quad (1)$$

em que k = constante de velocidade, A = fator de frequência das colisões, E_a = energia de ativação, R = constante dos gases ideais ($8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e T = temperatura, em Kelvin. A partir da linearização da expressão acima, ou seja, a partir do gráfico de $\ln k$ versus $1/T$, pode-se calcular o coeficiente angular, que corresponde a $-E_a/R$ e o coeficiente linear igual a $\ln A$. Uma relação similar pode ser também obtida a partir da equação de Eyring (Equação 2):

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \quad (2)$$

em que k_B = constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), h = constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J s}$), ΔH^\ddagger = entalpia de ativação e ΔS^\ddagger = entropia de ativação. Através do gráfico linear obtido a partir de $\ln(k/T)$ versus $1/T$ é possível de se obter pelo coeficiente angular ΔH^\ddagger , e pelo coeficiente linear ΔS^\ddagger . A energia livre de ativação pode ser então obtida mediante a relação termodinâmica: $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$. Os parâmetros de ativação obtidos para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelos complexos **1** – **3** estão listados na Tabela 19. A Figura 81 apresenta as linearizações de k_{cat} para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelos complexos **1** – **3**.

Figura 81 Linearizações de k_{cat} observadas para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP na presença dos complexos **1** – **3** a pH = 9,00 em função da temperatura. **A**) Equação de Arrhenius, **B**) Equação de Eyring.

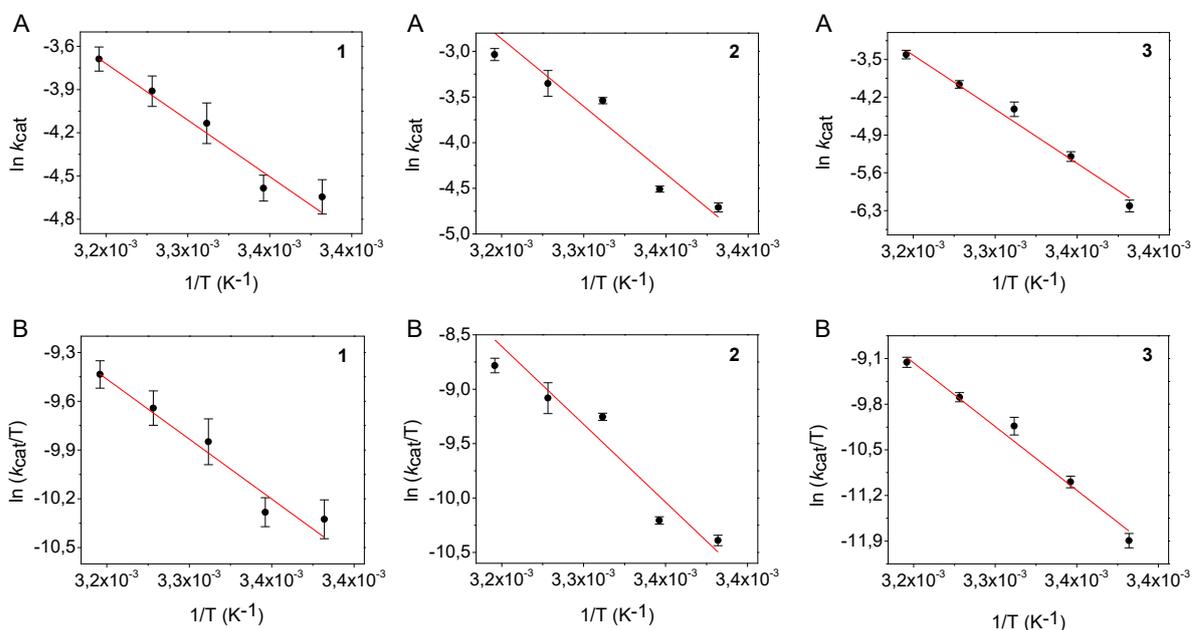


Tabela 18 Parâmetros de ativação para a hidrólise do 2,4-BDNPP.

Complexo	E_a (kJ.mol ⁻¹)	ΔH^\ddagger (kJ.mol ⁻¹)	$T\Delta S^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹) ^a	ΔG^\ddagger (kJ mol ⁻¹)
1	39,44	36,93	-47,07	84,00
2	68,86	66,34	-17,23	83,57
3	106,17	103,66	17,43	86,23
H₂O^c		79,00	-34,40	113,8

^a 298,15 K, ^b [Ni₂(L1)(OAc)₂(H₂O)]ClO₄·H₂O (Greatti, A., *et al.*, 2008), ^c (Bunton, C. A., Farber, S. J., 1969)

Como pode ser visto nos dados listados na tabela acima, para os complexos **1** e **2** ocorre a organização das espécies reativas no estado de transição (TS), uma vez que estes complexos apresentaram valores de $\Delta S^\ddagger < 0$, enquanto o complexo **3** apresentou valor de $\Delta S^\ddagger > 0$, indicando que a espécie reativa torna-se menos estruturada no TS. Todos os complexos apresentaram valores de $\Delta H^\ddagger > 0$, indicando que ocorre quebra de ligação no complexo ativado. Para os conjugados fosfato calculados, houve um aumento na distância da ligação de hidrogênio entre a amina lateral e a molécula de água coordenada de 1,474 Å para 1,617 Å comparando-se do

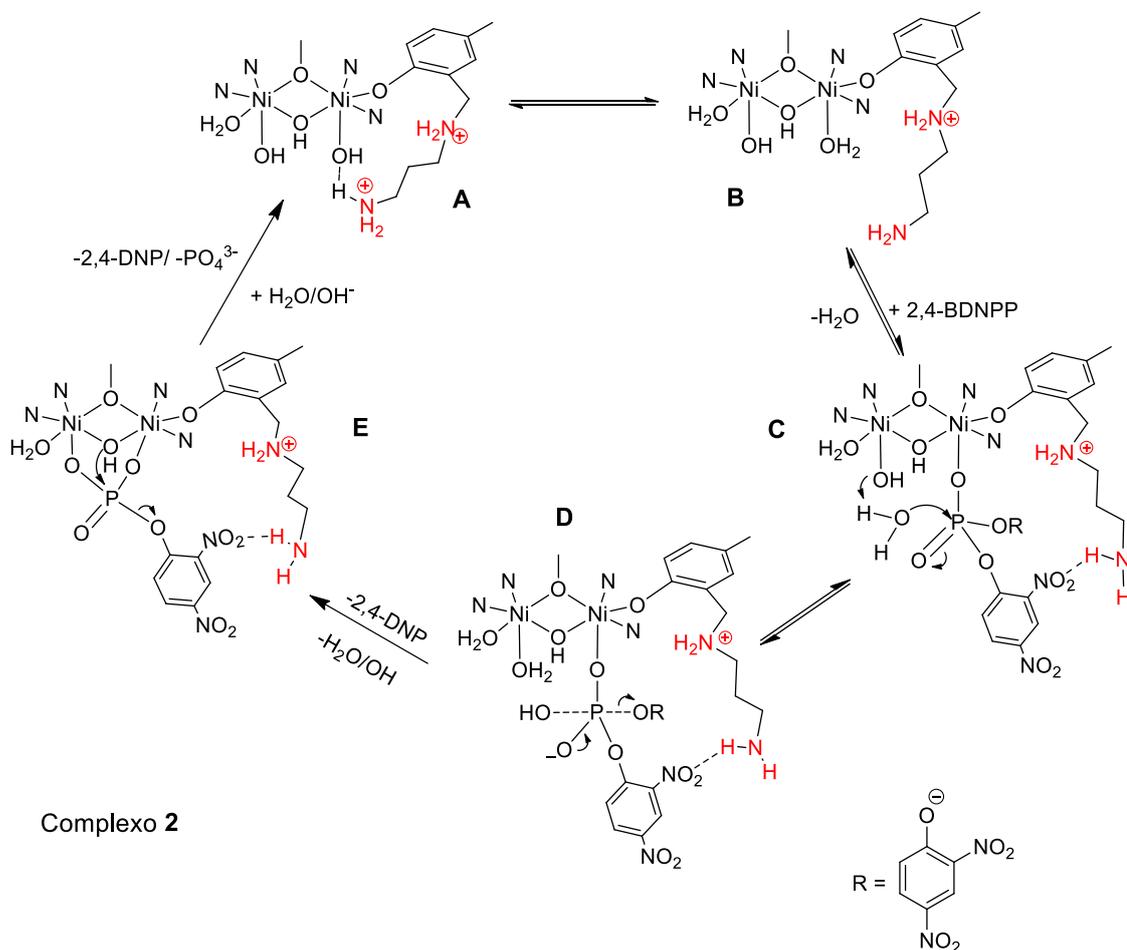
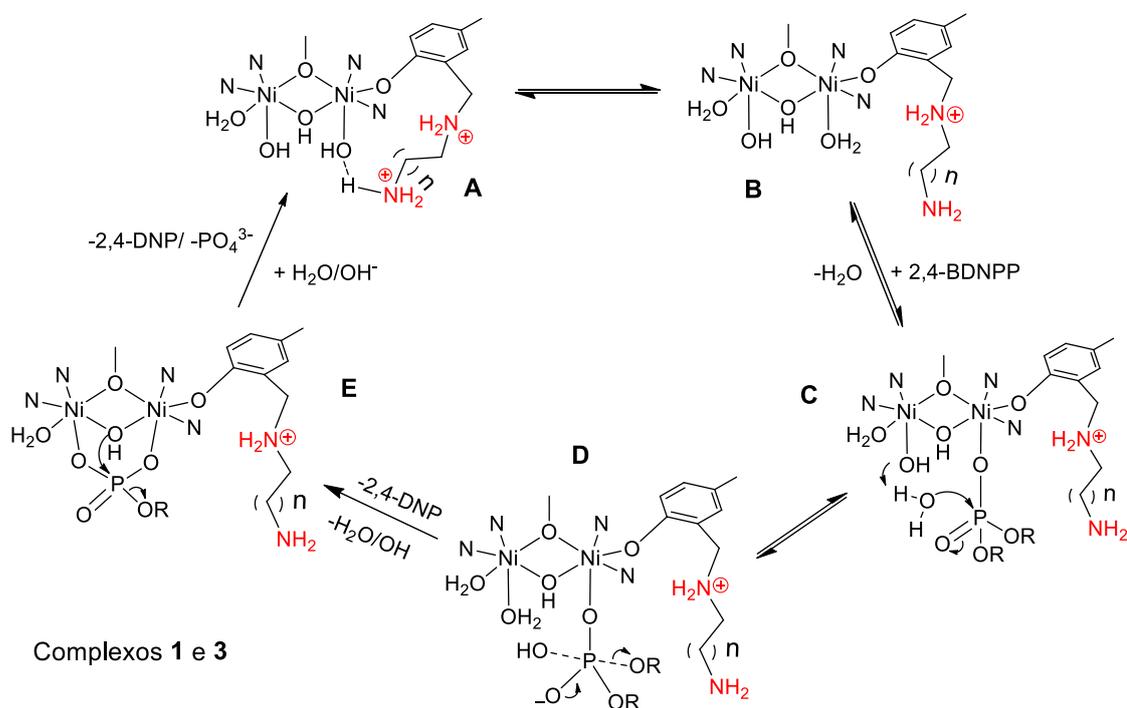
complexo **1** para o complexo **3** e, como obtido através dos gráficos de Eyring, a contribuição entálpica para a barreira de ativação também aumentou de **1** para **3**. O efeito entrópico elevado causado pela alongação da cadeia carbônica, que causa uma perda de graus de liberdade quando ocorre a ligação, também pode ser observado comparando-se de **1** a **3**, o que está de acordo com a variação na entropia de $-47,07 \text{ kJ mol}^{-1}$ (complexo **1**) para $17,43 \text{ kJ mol}^{-1}$ (complexo **3**).

5.2.10.5 Mecanismo de reação proposto para a hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelos complexos **1 – 3**

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, o Esquema 4 apresenta o mecanismo de reação proposto para a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovida pelos complexos **1 – 3**. Primeiramente, a amina protonada transfere um próton para o hidróxido coordenado ao centro metálico na parte mais dura do complexo (A), gerando a espécie $[(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})\text{Ni}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})\text{Ni}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})]$ (B). O substrato então coordena-se de maneira monodentada ao centro de Ni^{II} no sítio lábil, deslocando a molécula de água (C). Para o complexo **2** se propõe que exista uma interação entre a amina lateral e o substrato. Para os três complexos sugere-se um mecanismo em que o hidróxido coordenado ao centro de Ni^{II} faça uma ligação de hidrogênio com uma molécula de água do meio (C), uma vez que o efeito isotópico mostrou que o mecanismo se dá através de uma catálise básica geral. A ligação de hidrogênio entre o hidróxido e a molécula de água leva à ativação desta, que passa a agir como o nucleófilo que dá início à reação de hidrólise ao atacar o átomo de fósforo do 2,4-BDNPP, com a liberação concomitante do grupo de saída 2,4-DNP (D). Uma vez que reações estequiométricas entre os complexos **1 – 3** e 2,4-BDNPP levaram à liberação de 2 equivalentes de 2,4-DNP, propõem-se que após a liberação do primeiro 2,4-DNP um ataque intramolecular da ponte $\mu\text{-OH}$ seja responsável pela hidrólise do monoéster coordenado a ambos os centros de Ni^{II} (E). O fosfato remanescente seria então deslocado por uma molécula de água em excesso, regenerando o centro catalítico.

Para o complexo **2** a interação entre a amina lateral e o um átomo de oxigênio presente na molécula do substrato leva a uma maior proximidade entre este e o complexo, o que pode explicar o maior valor de eficiência catalítica obtido para **2** quando comparado com os complexos **1 – 3**.

Esquema 4 Mecanismo proposto para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelos complexos **1** e **3** (em cima) e **2** (embaixo).



5.2.11 Atividade antibacteriana

Dentre as análises utilizadas para se determinar a atividade de determinados compostos como potenciais agentes antimicrobianos foram utilizadas neste estudo as análises de concentração inibitória mínima (MIC), a qual é estipulada como sendo a concentração do agente antimicrobiano necessária para inibir o crescimento bacteriano, de forma que quanto menor o valor de MIC apresentada pelo composto, maior sua potência, e também a análise de concentração bactericida mínima (MBC), que é estipulada como sendo a concentração mínima necessária de um agente antimicrobiano para causar a morte de determinada bactéria (French, G. L., 2006).

Os valores obtidos para as concentrações inibitórias mínimas e concentrações bactericidas mínimas dos compostos frente aos isolados bacterianos testados estão apresentados na Tabela 20. Neste estudo, verificou-se que o complexo **2** apresentou atividade antibacteriana *in vitro* contra as bactérias gram-positivas e gram-negativas testadas. Destaca-se a atividade inibitória ($7,81 \mu\text{g mL}^{-1}$) e bactericida ($31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) frente a *S. aureus* observada para este complexo em baixas concentrações.

Os complexos **1** e **3** também apresentaram atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, porém em concentrações maiores se comparado ao complexo **2**, mas ainda de acordo com os valores reportados na literatura para outros compostos metálicos com atividade antibacteriana (Anacona, J. R., Salazar, R., Santaella, J., Celis, F., 2018; Özdemir, Ü. Ö., Akkaya, N., Özbek, N., 2013; Kulkarni, A. *et al.*, 2009; Gomathi, V., Selvameena, R., 2018; Galini, M. *et al.*, 2017; Salehi, M., Rahimifar, F., Kubicki, M., Asadi, A., 2016; Özdemir, Ü. Ö., Güvenç, P., Şahin, E., Hamurcu, F., 2009).

Tabela 19 Concentrações inibitórias e concentrações bactericidas mínimas dos complexos 1 – 3 em pH 7,20.

Complexos	1		2		3	
	MIC $\mu\text{g mL}^{-1}$	MBC $\mu\text{g mL}^{-1}$	MIC $\mu\text{g mL}^{-1}$	MBC $\mu\text{g mL}^{-1}$	MIC $\mu\text{g mL}^{-1}$	MBC $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Salmonella</i>	> 1000	> 1000	62,50	62,50	> 1000	> 1000
<i>Typhimurium</i>						
<i>Pseudomonas</i>	> 1000	> 1000	125	250	> 1000	> 1000
<i>aeruginosa</i>						
<i>Escherichia coli</i>	> 1000	> 1000	62,50	62,50	> 1000	> 1000
<i>Staphylococcus</i>	31,25	125	7,81	31,25	7,81	31,25
<i>aureus</i>						
<i>Aeromonas</i>	> 1000	> 1000	62,50	250	> 1000	> 1000
<i>hydrophila</i>						
<i>Listeria innocua</i>	> 1000	> 1000	62,50	250	> 1000	> 1000

6 CONCLUSÕES

Os novos ligantes H₂LEt, H₂LProp e H₂LBut foram sintetizados e caracterizados por IR, CHN, NMR e ESI-MS obtendo-se rendimento satisfatório e pureza adequada para a realização das sínteses dos complexos binucleares de Ni^{II} **1**, **2** e **3**.

Os três novos complexos **1**, **2** e **3** foram caracterizados por: CHN, sendo possível se propor a fórmula molecular destes complexos; infravermelho, sendo possível identificar as bandas provenientes dos ligantes e contra íons; por espectroscopia eletrônica, sendo possível atribuir as bandas *d-d* características de complexos de Ni^{II} num ambiente octaédrico; eletroquímica, cujos experimentos forneceram os valores dos potenciais de redução, os quais se mostraram mais positivos se comparado com os valores reportados para o complexo **A** e por titulação potenciométrica, em que foi possível se propor as espécies presentes em solução e a obtenção de valores mais baixos de *pK_a* das moléculas de água coordenadas aos centros metálicos, provavelmente devido à interações entre as aminas protonadas presentes na cadeia lateral dos ligantes e moléculas de água/hidróxido coordenadas ao centro metálico.

Os resultados obtidos para os complexos **1** – **3** pelas análises eletroquímicas e de titulação potenciométrica evidenciam o efeito de segunda esfera de coordenação apresentado para estes complexos pela derivatização do ligante H₂BPPAMFF com grupos diamina alifáticos.

Cálculos de estrutura eletrônica foram realizados e foram observadas semelhanças com a estrutura do complexo **A**, previamente descrito na literatura. Ainda, os espectros de infravermelho e de UV-Vis experimentais e teóricos mostraram-se similares.

Estudos de reatividade dos complexos **1**, **2** e **3** frente à reação de hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP revelaram que estes podem ser considerados como modelos funcionais para fosfohidrolases, apresentando acelerações de 126.700, 90.200 e 81.500 vezes para **1**, **2** e **3**, respectivamente, em relação à reação não catalisada, sendo que o complexo **2** apresentou maior afinidade pelo substrato, o que pode ser explicado através dos resultados dos cálculos, em que o complexo com o

conjugado fosfato apresentou uma interação da amina presente na cadeia lateral com um átomo de oxigênio do substrato.

Ainda, a partir dos estudos de reatividade, efeito da temperatura e cálculos de estrutura eletrônica realizados para os complexos **1 – 3**, foi possível se observar que o complexo **2** apresentou o comprimento ideal de cadeia hidrocarbônica na cadeia lateral para que ocorresse uma interação com o substrato, o que ficou evidente no valor de K_M mais baixo apresentado para este complexo quando comparado com os valores de K_M obtidos para os complexos **1** e **3**.

Os complexos **1 – 3** também apresentaram atividade frente à reação de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP em valores de pH próximos do fisiológico, além de apresentarem valores de eficiência catalítica comparáveis e até mesmo maiores em comparação com outros complexos contendo diferentes centros metálicos reportados na literatura.

A partir dos dados espectroscópicos, eletroquímicos, cinéticos e de titulação potenciométrica foi possível propor um ciclo catalítico para a reação de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovida pelos complexos **1, 2 e 3**.

Testes visando avaliar a atividade antibacteriana dos complexos **1 – 3** foram realizados e o complexo **2** se mostrou ativo frente à todas as cepas bacterianas estudadas, enquanto os complexos **1** e **3** apresentaram atividade somente frente à bactéria *Staphylococcus aureus*.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARY, J., *et al.* Role of electronegative atom present on ligand backbone and substrate binding mode on catecholase- and phosphatase-like activities of dinuclear Ni^{II} complexes: A theoretical support. **ChemistrySelect**, 3, n. 5, p. 1445-1454, 2018, <https://doi.org/10.1002/slct.201702861>
- AL-AMIERY, A. A., KADHUM, A. A. H., MOHAMED, A. B. Antifungal and antioxidant activities of pyrrolidone thiosemicarbazone complexes. **Bioinorg. Chem. Appl.**, v. 2012, 6p., 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/795812>
- AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. **Front. Microbiol.**, v. 1, 134, 2010. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- ANACONA, J. R., SALAZAR, R., SANTAELLA, J., CELIS, F. Synthesis and characterization of transition metal complexes with a Schiff base derived from cephalixin and 1,2-diaminobenzene. Antibacterial activity. **Inorg. Nano-Met. Chem.**, v. 48, p. 404-411, 2018. <https://doi.org/10.1080/24701556.2019.1569681>
- ANBU, S., KANDASWAMY, M., SUTHAKARAN, P., MURUGAN, V., VARGHESE, B., J. Structural, magnetic, electrochemical, catalytic, DNA binding and cleavage studies of new macrocyclic binuclear copper(II) complexes. **Inorg. Biochem.**, v. 103, p. 401-410, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.12.013>
- BARMAN, S. K., LLORET, F., MUKHERJEE, R. A bioinspired dinickel(II) hydrolase: solvent vapor-induced hydrolysis of carboxyesters under ambient conditions. **Inorg. Chem.**, v. 55, p. 12696-12706, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b01895>
- BARONE, G., *et al.* DNA-binding of nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes: Structure-affinity relationships. **Coord. Chem. Rev.**, v. 257, p. 2848-2862, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.02.023>

BARRIOS, A. M., LIPPARD, S. J. Amide hydrolysis effected by a hydroxo-bridged dinickel(II) complex: Insights into the mechanism of urease. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 121, n. 50, p. 11751-11757, 1999.

<https://doi.org/10.1021/ja992447h>

BASSETT, E. J., KEITH, M. S., ARMELAGOS, G. J., MARTIN, D. L., VILLANUEVA, A. R. Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). **Science**, v. 209, n. 4464, p. 1532-1534, 1980.

<https://doi.org/10.1126/science.7001623>

BATISTA, S. C. *et al.* Highly efficient phosphate diester hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical Fe^{III}Ni^{II} model complex. **Inorg. Chem. Commun.**, v. 6, n. 8, p. 1161-1165, 2003.

[https://doi.org/10.1016/s1387-7003\(03\)00219-3](https://doi.org/10.1016/s1387-7003(03)00219-3)

BECKE, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **Phys. Rev. A**, v. 38, p. 3098–3100, 1988.

<https://doi.org/10.1103/PhysRevA.38.3098>

BEGUM, A., BANUMATHI, S., CHOUDHARY, M. I., BETZEL, C., 2012; disponível em <http://www.rcsb.org/structure/4GY7>. Acessado em: 20 fev. 2020.

<https://doi.org/10.2210/pdb4gy7/pdb>

BENINI, S., CIANCI, M., MAZZEI, L., CIURLI, S. Fluoride inhibition of *Sporosarcina pasteurii* urease: Structure and thermodynamics. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 19, p. 1243-1261, 2014.

<https://doi.org/10.1007/s00775-014-1182-x>

BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L. **Biochemistry**. New York, New York, W.H. 2002.

BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L. **Biochemistry**. 7^a ed. New York, NY: W. H. Freeman and Co. 2010.

BHARDWAJ, V. K., SINGH, A. Comparative DNA binding abilities and phosphatase-like activities of mono-, di-, and trinuclear Ni(II) complexes: The influence of ligand denticity, metal–metal distance, and coordinating solvent/anion on kinetics studies. **Inorg. Chem.**, v. 53, p. 10731-10742, 2014.

<https://doi.org/10.1021/ic501961d>

BOSCH, S., COMBA, P., GAHAN, L. R., SCHENK, G. Dinuclear zinc(II) complexes with hydrogen bond donors as structural and functional phosphatase models. **Inorg. Chem.**, v. 53, p. 9036-9051, 2014.

<https://doi.org/10.1021/ic5009945>

BUNTON, C. A., FARBER, S. J. Hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate. **J. Org. Chem.**, v. 34, n. 4, p. 767-772, 1969.

<https://doi.org/10.1021/jo01256a001>

CAMARGO, T. P. *et al.* Second-sphere effects in dinuclear Fe^{III}Zn^{II} hydrolase biomimetics: Tuning binding and reactivity properties. **Inorg. Chem.**, v. 57, p. 187-203, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b02384>

CARLSSON, H. *et al.* Nickel complexes of carboxylate-containing polydentate ligands as models for the active site of urease. **Inorg. Chem.**, v. 43, p. 8252-8262, 2004. <https://doi.org/10.1021/ic049048u>

CHAKRABORTY, T. *et al.* Anion-mediated bio-relevant catalytic activity of dinuclear nickel(II) complexes derived from an end-off compartmental ligand. **Dalton Trans.**, v. 48, p. 2772-2784, 2019. <https://doi.org/10.1039/c8dt04631j>

CHEN, A. Y., *et al.* Targeting metalloenzymes for therapeutic intervention. **Chem. Rev.**, v. 119, p. 1323-1455, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00201>

CHEN, X. Q. *et al.* Synthesis and DNA cleavage activity of diiron(III) complex bearing pyrene group. **Chin. Chem. Lett.**, v. 19, n. 3, p. 342-344, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2007.12.028>

CHOHAN, Z. H., KAUSAR, S. Synthesis, characterization and biological properties of tridentate NNO, NNS and NNN donor thiazole-derived furanyl, thiophenyl and pyrrolyl Schiff bases and their Co(II), Cu(II), Ni(II) and Zn(II) metal chelates. **Met. Based Drugs**, v. 7, p. 17-22, 2000. <https://doi.org/10.1155/mbd.2000.17>

COX, B. G. **Acids and bases: solvent effects on acid-base strength**. OUP Oxford, 2013.

COX, M. M., NELSON, D. L. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed. 2011.

DALLE, K. E., MEYER, F. Modelling binuclear metallobiosites: Insights from pyrazole-supported biomimetic and bioinspired complexes. **Eur. J. Inorg. Chem.**, v. 21, p. 3391-3405, 2015. <https://doi.org/10.1002/ejic.201500185>

DAUMANN, L. J. *et al.* Spectroscopic and mechanistic studies of dinuclear metallohydrolases and their biomimetic complexes. **Dalton Trans**, v. 43, n. 3, p. 910-928, 2014. <https://doi.org/10.1039/c3dt52287c>

DE JONG, N. W. M., VAN KESSEL, K. P. M., VAN STRIJP, J. A. G. Immune evasion by *Staphylococcus aureus*. **Gram-Positive Pathogens**. 3^a ed. Wiley Online Library, 2019. Cap. 39, p. 618-639. <https://doi.org/10.1128/9781683670131.ch39>

DE ROSCH, M. A., TOGLER, W. C. Hydrolysis of phosphodiesteres with nickel(II), copper(II), zinc(II), palladium(II), and platinum(II) complexes. **Inorg. Chem.**, v. 29, n. 13, p. 2409-2416, 1990. <https://doi.org/10.1021/ic00338a006>

DESBOIUS, D. *et al.* Copper(II), zinc(II) and nickel(II) complexes as nuclease mimetics. **Coord. Chem. Rev.**, v. 256, n. 11-12, p. 897-937, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.12.005>

DÜRRENBARGER, M., WARD, T. R. Recent achievements in the design and engineering of artificial metalloenzymes. **Curr. Op. Chem. Bio.**, v. 18, p. 99-106, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cpbpa.2014.01.018>

EL-SAWAF, A. K., AZZAM, M. A., ABDU, A. M., ANOUAR, E. H. Synthesis, spectroscopic characterization, DFT and antibacterial studies of newly synthesized cobalt(II,III), nickel(II) and copper(II) complexes with salicylaldehyde N(4)-antipyrinylthiosemicarbazone. **Inorganica Chim. Acta**, v. 483, p. 116-128, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.08.013>

ERXLEBEN, A. Mechanistic studies of homo- and heterodinuclear zinc phosphoesterase mimics: What has been learned? **Front. Chem.**, v. 7, n. 82, 2019. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00082>

ESTEVEZ, L. F., REY, N. A., SANTOS, H. F., COSTA, L. A. Theoretical proposal for the whole phosphate diester hydrolysis mechanism promoted by a

catalytic promiscuous dinuclear copper(ii) complex. **Inorg. Chem.**, v. 55, n. 6, p. 2806-2818, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b02604>

FRENCH, G. L. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections – the potential role of daptomycin. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 58, p. 1107-1117, 2006. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl393>

FIRMO, R. N. *et al.* A new ligand H₄Lox and its iron(III) complex as a platform for the development of heterotrimetallic complexes. **Polyhedron**, v. 117, p. 604-611, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2016.06.022>

GAGNE, R. R., KOVAL, C. A., LISENSKY, G. C. Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements. **Inorg. Chem.**, v. 19, n. 9, p. 2854-2855, 1980. <https://doi.org/10.1021/ic50211a080>

GAHAN, L. R. *et al.* Phosphate Ester Hydrolysis: Metal Complexes As Purple Acid Phosphatase and Phosphotriesterase Analogues. **Eur. J. Inorg. Chem.**, v. 2009, n. 19, p. 2745-2758, 2009. <https://doi.org/10.1002/ejic.200900231>

GALINI, M. *et al.* Structural characterization and electrochemical studies of Co(II), Zn(II), Ni(II) and Cu(II) Schiff base complexes derived from 2-((*E*)-(2-methoxyphenylimino)methyl)-4-bromophenol; Evaluation of antioxidant and antibacterial properties. **Inorganica Chim. Acta**, v. 461, p. 167-173, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.02.001>

GEARY, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds. **Coord. Chem. Rev.**, v. 7, n. 1, p. 81-122, 1971. [https://doi.org/10.1016/s0010-8545\(00\)80009-0](https://doi.org/10.1016/s0010-8545(00)80009-0)

GINOVSKA-PANGOVSKA, B. *et al.* Beyond the active site: the impact of the outer coordination sphere on electrocatalysts for hydrogen production and oxidation. **Acc. Chem. Res.**, v. 47, n. 8, p. 2621-2630, 2014. <https://doi.org/10.1021/ar5001742>

GOMATHI, V., SELVAMEENA, R. Spectroscopic investigation, fluorescence quenching, *in vitro* antibacterial and cytotoxicity assay of Co(II) and Ni(II) complexes containing 4-((3-ethoxy-2-hydroxybenzylidene)amino)-*N*-(pyridin-2-

yl)benzenesulfonamide. **Inorganica Chim. Acta**, v. 480, p. 42-46, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.05.007>

GOULD, K. Antibiotics: From prehistory to the present day. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 71, p. 572-575, 2016. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv484>

GREATTI, A. *et al.* Synthesis, structure, and physicochemical properties of dinuclear NiII complexes as highly efficient functional models of phosphohydrolases. **Inorg. Chem.**, v. 47, n. 3, p. 1107-1119, 2008. <https://doi.org/10.1021/ic702132t>

GRIMME, S., ANTONY, J., EHRLRICH, S., KRIEG, H. A consistent and accurate *ab initio* parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. **J. Chem. Phys.**, v. 132, p. 154104, 2010. <https://doi.org/10.1063/1.3382344>

GRIMME, S., EHRLRICH, S., GOERIGK, J. Effect of the damping function in dispersion corrected density functional theory. **Comput. Chem.**, v. 32, p. 1456-1465, 2011. <https://doi.org/10.1002/jcc.21759>

HADLER, K. S. *et al.* Electronic structure analysis of the dinuclear metal center in the bioremediatory glycerophosphodiesterase (GpdQ) from *Enterobacter aerogenes*. **Inorg. Chem.**, v. 49, p. 2727-2734, 2010. <https://doi.org/10.1021/ic901950c>

HALCROW, M. A., CHRISTOU, G. Biomimetic chemistry of nickel. **Chem Rev.**, v. 94, n. 8, p. 2421-2481, 1994. <https://doi.org/10.1021/cr00032a008>

HEGG, E. L., BURSTYN, J. N. Toward the development of metal-based synthetic nucleases and peptidases: a rationale and progress report in applying the principles of coordination chemistry. **Coord. Chem. Rev.**, v. 173, n. 1, p. 133-165, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(98\)00157-X](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(98)00157-X)

HENDRY, P., SARGESON, A. M. Metal ion promoted phosphate ester hydrolysis. Intramolecular attack of coordinated hydroxide ion. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 111, p. 2521 – 2527, 1989. <https://doi.org/10.1021/ja00189a025>

HERRADOR, M. A., GONZÁLEZ, A. G. Potentiometric titrations in acetonitrile–water mixtures: Evaluation of aqueous ionization constant of ketoprofen.

Talanta, v. 56, n. 4, p. 769-775, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0039-9140\(01\)00607-5](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(01)00607-5)

HOFER, U. The cost of antimicrobial resistance. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 17, p. 3, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0125-x>

HORN JR. *et al.* Synthesis, magnetic properties, and catalytic properties of a nickel(II)-dependent biomimetic of metallohydrolases. **Front. Chem.**, v. 6, p. 441, 2018. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00441>

JARENMARK, M. *et al.* Symmetrical and unsymmetrical dizinc complexes as models for the active sites of hydrolytic enzymes. **Dalton Trans.**, n. 8, p. 993-6, 2008. <https://doi.org/10.1039/B713664A>

JARENMARK, M. *et al.* Unsymmetrical dizinc complexes as models for the active sites of phosphohydrolases. **Dalton Trans.**, v. 39, n. 35, p. 8183-8194, 2010. <https://doi.org/10.1039/b925563j>

JARENMARK, M. *et al.* Synthesis, characterization, and reactivity studies of heterodinuclear complexes modeling active sites in purple acid phosphatases. **Inorg. Chem.**, v. 50, p. 3866-3887, 2011. <https://doi.org/10.1021/ic1020324>

KARSISIOTIS, A. I., DAMBLON, C. F., ROBERTS, G. C. K. Solution structures of the *Bacillus cereus* metallo- β -lactamase BclI and its complex with the broad spectrum inhibitor *R*-thiomandelic acid. **Biochem. J.**, v. 456, n. 3, p. 397-407, 2013. <https://doi.org/10.1042/BJ20131003>

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. **Inorg. Chem.**, v. 41, p. 4624-4626, 2002. <https://doi.org/10.1021/ic025674k>

KIRBY, A. J., YOUNAS, M. The reactivity of phosphate esters. Diester hydrolysis. **J Chem. Soc. (B)**, p. 510-513, 1970. <https://doi.org/10.1039/j29700001165>

KLABUNDE, T., *et al.* Mechanism of Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase based on crystal structures. **J. Mol. Biol.**, v. 259, p. 737-748, 1996.

<https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0354>

KOTLOFF, K. L. *et al.* Global burden of *Shigella* infections: Implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 8, p. 651-666, 1999.

KULKARNI, A. *et al.* Synthesis, spectral, electrochemical and biological studies of Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes with Schiff bases of 8-formyl-7-hydroxy-4-methyl coumarin. **J. Coord. Chem.**, v. 62, n. 3, p. 481-492, 2009.

<https://doi.org/10.1080/00958970802226387>

LAITY, J. H., LEE, B. M., WRIGHT, P. E. Zinc Finger Proteins: New Insights into Structural and Functional Diversity. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 11, p. 39 – 46, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00167-6](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00167-6)

LANZMASTER, M. *et al.* A new heterobinuclear Fe^{III}Cu^{II} complex with a single terminal Fe^{III}-O(phenolate) bond. Relevance to purple acid phosphatases and nucleases. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 10, p. 319-332, 2005.

<https://doi.org/10.1007/s00775-005-0635-7>

LEVER, A. B. P. **Inorganic electronic spectroscopy**. Elsevier Science Publishers B. V.: Amsterdam. 2^a ed. 1984.

LIDE, D. R. **Handbook of Inorganic Chemistry and Physics**, 81st ed. CRS Press, 2000 (seção 5-91).

LIPPARD, S. J., BERG, J. M. **Principles of bioinorganic chemistry**. University Science Books, 1994.

LIU, J. *et al.* Direct detection of *Shigella* in stool specimens by use of a metagenomic approach. **J. Clin. Microbiol.**, v. 56, n. 2, e01374-17, 2018.

<https://doi.org/10.1128/JCM.01374-17>

LIVIERI, M. *et al.* Mimicking enzymes: Cooperation between organic functional groups and metal ions in the cleavage of phosphate diesters. **Chem. Eur. J.**, v. 13, n. 8, p. 2246-2256, 2007.

<https://doi.org/10.1002/chem.200600672>

MAREQUE-RIVAS, J. C., PRABAHARAN, R., DE ROSALES, R. T. M. Relative importance of hydrogen bonding and coordinating groups in modulating the zinc–water acidity. **Chem. Commun.**, n. 1, p. 76-77, 2004.

<https://doi.org/10.1039/b310956a>

MARTELL, A. E., MOTEKAITIS, R. J. **Determination and use of stability constants**. VCH publishers, 1992.

MASSOUD, S. S. *et al.* Dinuclear metal(II)-acetato complexes based on bicompartamental 4-chlorophenolate: Syntheses, structures, magnetic properties, DNA interactions and phosphodiester hydrolysis. **Dalton. Trans.**, v. 45, p. 12933-12950, 2016. <https://doi.org/10.1039/c6dt02596j>

MITIĆ, N. *et al.* Catalytic mechanisms of metallohydrolases containing two metal ions. **Adv. Protein Chem. Struct. Biol.**, v. 97, p. 49-81, 2014. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.07.002>

MITIĆ, N. *et al.* The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. **Chem. Rev.**, v. 106, n. 8, p. 3338-3363, 2006. <https://doi.org/10.1021/cr050318f>

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds**. Wiley, 1977.

NEESE, F., **Software update: the ORCA program system, version 4.0**. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, v. 8, e1327, 2017. <https://doi.org/10.1002/wcms.1327>

OSÓRIO, R. E. *et al.* Synthesis, magnetostructural correlation, and catalytic promiscuity of unsymmetric dinuclear copper(II) complexes: Models for catechol oxidases and hydrolases. **Inorg. Chem.**, v. 51, n. 3, p. 1569-1589, 2012. <https://doi.org/10.1021/ic201876k>

ÖZDEMİR, Ü. Ö., AKKAYA, N., ÖZBEK, N. New nickel(II), palladium(II), platinum(II) complexes with aromatic methanesulfonylhydrazone based ligands. Synthesis, spectroscopic characterization and *in vitro* antibacterial evaluation. **Inorganica Chim. Acta**, v. 400, p. 13-19, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2013.01.031>

ÖZDEMİR, Ü. Ö., GÜVENÇ, P., ŞAHİN, E., HAMURCU, F. Synthesis, characterization and antibacterial activity of new sulfonamide derivatives and their nickel(II), cobalt(II) complexes. **Inorganica Chim. Acta**, v. 362, p. 2613-2618, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2008.11.029>

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PERALTA, R. A. *et al.* Electronic structure and spectro-structural correlations of Fe^{III}Zn^{II} biomimetics for purple acid phosphatases: Relevance to DNA cleavage and cytotoxic activity. **Inorg. Chem.**, v. 49, p. 11421-11438, 2010. <https://doi.org/10.1021/ic101433t>

PERDEW, J. P. Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. **Phys. Rev. B**, v. 33, p. 8822–8824, 1986. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.33.8822>

PERDEW, J. P., BURKE, K., ERNZERHOF, M. Generalized gradient approximation made simple. **Phys. Rev. Lett.**, v. 77, p. 3865-3868, 1996. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.77.3865>

PERDEW, J. P., BURKE, K., ERNZERHOF, M. Generalized gradient approximation made simple [Phys. Rev. Lett. 77, 3865 (1996)]. **Phys. Rev. Lett.**, v. 78, p. 1396, 1997. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.78.1396>

PEREIRA, C. *et al.* Guanidine- and purine-functionalized ligands of Fe^{III}Zn^{II} complexes: effects on the hydrolysis of DNA. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 24, p. 675-691, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00775-019-01680-3>

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

PIOVEZAN, C. *et al.* Design of a dinuclear nickel(II) bioinspired hydrolase to bind covalently to silica surfaces: Synthesis, magnetism, and reactivity studies. **Inorg. Chem.**, v. 51, n. 11, p. 6104-15, 2012. <https://doi.org/10.1021/ic300018t>

PISZKIEWICZ, D. **Kinetics of Chemical and Enzyme-Catalyzed Reactions**. Oxford University Press: New York, 1977, pp 81-106

- POORNIMA, S., GUNASEKARAN, K., KANDASWAMY, M. Nuclease activity and interaction studies of unsymmetrical binuclear Ni(II) complexes with CT-DNA and BSA. **Dalton Trans.**, v. 44, p. 16361-16371, 2015. <https://doi.org/10.1039/c4dt01744g>
- PRATT, C. W., VOET, D., VOET, J. G. **Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level**. John Wiley and Sons, 2008.
- RAGSDALE, S. W. Nickel biochemistry. **Curr. Op. Chem. Bio.**, v. 2, p. 208-215, 1998. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(98\)80062-8](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(98)80062-8)
- RAGSDALE, S. W. Nickel enzymes & cofactors. **Encyclopedia of inorganic and bioinorganic chemistry**. 2011. 16p. <https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc0139>
- ROSE, A. S. *et al.* NGL viewer: Web-based molecular graphics for large complexes. **Bioinformatics**, v. 34, n. 21, p. 3755–3758, 2018. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty419>
- RYE, C. *et al.* **Book OpenStax: Biology**. Rice University, Texas, 2017. 1480p. Disponível para download em: <https://openstax.org/details/books/biology>
- SALEHI, M., RAHIMIFAR, F., KUBICKI, M., ASADI, A. Structural, spectroscopic, electrochemical and antibacterial studies of some new nickel(II) Schiff base complexes. **Inorganica Chim. Acta**, v. 443, p. 28-35, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2015.12.016>
- SANYAL, R. *et al.* Role of *para*-substitution in controlling phosphatase activity of dinuclear Ni^{II} complexes of Mannich-base ligands: experimental and DFT studies. **RSC Adv.**, v. 6, p. 73534-73546, 2016. <https://doi.org/10.1039/c6ra08705a>
- SCHÄFER, A., HORN, H., AHLRICHS, R. Fully optimized contracted Gaussian basis sets for atoms Li to Kr. **J. Chem. Phys.**, v. 97, p. 2571, 1992. <https://doi.org/10.1063/1.463096>

SCHÄFER, A., HUBER, C., AHLRICHS, R. Fully optimized contracted Gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr. **J. Chem. Phys.**, v. 100, p. 5829, 1994. <https://doi.org/10.1063/1.467146>

SCHENK, G. *et al.* Binuclear metallohydrolases: complex mechanistic strategies for a simple chemical reaction. **Acc. Chem. Res.**, v. 45, n. 9, p. 1593-1603, 2012. <https://doi.org/10.1021/ar300067g>

SCHROEDER, G. K. *et al.* The time required for water attack at the phosphorus atom of simple phosphodiester and of DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, p. 4052-4055, 2006. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510879103>

SELMECZI, K. *et al.* Structural, kinetic, and theoretical studies on models of the zinc-containing phosphodiesterase active center: Medium-dependent reaction mechanisms. **Chem. Eur. J.**, v. 13, n. 32, p. 9093–9106, 2007. <https://doi.org/10.1002/chem.200700104>

SELLECK, C. *et al.* visualization of the reaction trajectory and transition state in a hydrolytic reaction catalyzed by a metalloenzyme. **Chem. Eur. J.**, v. 23, n. 20, p. 4778-4781, 2017. <https://doi.org/10.1002/chem.201700866>

SHARMA, G. *et al.* Investigating coordination flexibility of glycerophosphodiesterase (GpdQ) through interactions with mono-, di-, and triphosphoester (NPP, BNPP, GPE, and paraoxon) substrates. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 21, p. 5499-5509, 2019. <https://doi.org/10.1039/C8CP07031H>

SHARMA, G. *et al.* Effect of chemically distinct substrates on the mechanism and reactivity of a highly promiscuous metallohydrolase. **ACS Catal.**, v. 10, n. 6, p. 3684-3696, 2020. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b04847>

SIEGBAHN, P. E. M., CHEN, S. L., LIAO, R. Z. Theoretical studies of nickel-dependent enzymes. **Inorganics.**, v. 7, n. 95, 29p., 2019. <https://doi.org/10.3390/inorganics7080095>

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 Trans.**, v. 46, p. 11380-11394, 2017. <https://doi.org/10.1039/c7dt02035j>

SILVERSTEIN, R. M. WEBSTER, F. X. KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Ltc, 2007.

SIRELKHATIM, A. *et al.* Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. **Nano-Micro Lett.**, v. 7, p. 219-242, 2015. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>

SOLOMON, E. I. *et al.* Copper active sites in biology. **Chem. Rev.**, v. 114, n. 7, p. 3659 – 3853, 2014. <https://doi.org/10.1021/cr400327t>

STROHALM, M., KAVAN, D., NOVÁK, P., VOLNÝ, M., HAVLÍČEK, V., mMass 3: A cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. **Anal. Chem.**, v. 82, p. 4648-4651, 2010.

THOER, A., DENIS, G., DELMAS, M., GASET, A. The Reimer-Tiemann reaction in slightly hydrated solid-liquid medium: A new method for the synthesis of formyl and diformyl phenols. **Synthetic Commun.**, v. 18, p. 16-17, 1988. <https://doi.org/10.1080/00397918808068278>

UOZUMI, S. *et al.* Dinuclear nickel(II) complexes of an unsymmetric “End-Off” compartmental ligand: Conversion of urea into cyanate at a dinuclear nickel core. **Inorg. Chem.**, v. 37, n. 24, p. 6281-6287, 1998. <https://doi.org/10.1021/ic9807689>

VOET, D., VOET, J. G. **Biochemistry**. 4th ed. New York, John Wiley & Sons, Inc., 2010. 1428p.

WALL, M. *et al.* Rapid hydrolysis of 2',3'-cAMP with a Cu(II) complex: Effect of intramolecular hydrogen bonding on the basicity and reactivity of a metal-bound hydroxide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 121, n. 19, p. 4710-4711, 1999. <https://doi.org/10.1021/ja981227l>

WAYNE, P. A. **Clinical and laboratory standards institute (CLSI) M07-A10. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. approved standard-tenth edition, 2015.

WEIGEND, F., AHLRICHS, R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment

of accuracy. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 7, p. 3297-3305, 2005. <https://doi.org/10.1039/b508541a>

WILCOX, D. E. Binuclear metallohydrolases. **Chem. Rev.**, v. 96, n. 7, p. 2435-2458, 1996. <https://doi.org/10.1021/cr950043b>

WILKINS, R. G. **Kinetics and mechanism of reactions of transition metal complexes**. 2nd ed: VCH: Weinheim, 2002.

WILLIAMS, N. II. *et al.* Structure and nuclease activity of simple dinuclear metal complexes: Quantitative dissection of the role of metal ions. **Acc. Chem. Res.**, v. 32, p. 485-493, 1999. <https://doi.org/10.1021/ar9500877>

XAVIER, F. R., NEVES, A. Synthesis, physicochemical properties and in vitro catalytic activity of a dinuclear nickel(II) complex with a N₅O-hexadentate ligand: A functional model for phosphohydrolases. **Polyhedron**, v. 109, p. 59-66, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2016.02.013>

YAJIMA, T. *et al.* Conformational preference of the side chain aromatic ring in Cu(II) and Pd(II) complexes of 2N1O-donor ligands. **Inorganica Chim. Acta**, v. 337, p. 193-202, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(02\)01034-4](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(02)01034-4)

YAMAGUCHI, K. *et al.* Hydrolysis of phosphodiester with hydroxo- or carboxylate-bridged dinuclear Ni(II) and Cu(II) complexes. **Chem. Commun.**, n. 4, p. 375-376, 2001. <https://doi.org/10.1039/b008994j>

ZANELLO, P. **Inorganic Electrochemistry: Theory, practice and application**. The Royal Society of Chemistry, 2003. 634p.

ZHAO, M. *et al.* Insights into metalloenzyme microenvironments: biomimetic metal complexes with a functional second coordination sphere. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 21, p. 8360-8375, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3cs60162e>

ZHAO, M. *et al.* Phosphate ester hydrolysis catalyzed by a dinuclear cobalt(II) complex equipped with intramolecular β -cyclodextrins. **J. Mol. Catal. A: Chemical**, v. 396, p. 346-352, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2014.10.020>

ZHURKO G. A. Chemcraft - graphical program for visualization of quantum chemistry computations. Ivanovo, Russia, 2005. <https://chemcraftprog.com>

APÊNDICE A – Dados de TD-DFT/TDA para os complexos 1 – 3

Tabela 20 Dados de excitação de TD-DFT/TDA para os complexos 1 – 3.

Estado	Energia		Complexo	<i>f</i>	Atribuição
	eV	nm			
1					
S₅	1,59	780		0,0002	<i>d-d</i>
S₁₃	2,28	544		0,0050	$\pi-\pi^*$
S₁₄	2,43	510		0,0053	$\pi-\pi^*$
S₁₉	2,83	438		0,0025	$\pi-\pi^*$
S₂₂	3,21	386		0,0076	$\pi-\pi^*$
S₂₄	3,45	358		0,0118	$\pi-\pi^*$
2					
S₅	1,59	780		0,0002	<i>d-d</i>
S₁₃	2,27	547		0,0051	$\pi-\pi^*$
S₁₄	2,41	515		0,0055	$\pi-\pi^*$
S₁₉	2,84	437		0,0026	$\pi-\pi^*$
S₂₂	3,20	388		0,0075	$\pi-\pi^*$
S₂₄	3,45	358		0,0118	$\pi-\pi^*$
3					
S₅	1,60	778		0,0002	<i>d-d</i>
S₁₃	2,28	544		0,0051	$\pi-\pi^*$
S₁₄	2,54	489		0,0048	$\pi-\pi^*$
S₁₉	2,84	436		0,0027	$\pi-\pi^*$
S₂₂	3,08	402		0,0062	$\pi-\pi^*$
S₂₄	3,42	363		0,0113	$\pi-\pi^*$

APÊNDICE B – Parâmetros cinéticos em vários valores de pH para os complexos 1 – 3

Tabela 21 Parâmetros cinéticos para o complexo 1 na hidrólise do 2,4-BDNPP em valores de pH entre 5,00 e 9,50.

pH	$v_{\text{máx}}$	K_M	k_{cat}	E_c	K_{ass}	$f \times 10^{-4a}$
5	$5,80 \times 10^{-9}$	0,0018	$2,90 \times 10^{-4}$	0,16	561,8	0,16
5,5	$2,30 \times 10^{-8}$	0,0023	$1,15 \times 10^{-3}$	0,49	425,5	0,94
6	$5,20 \times 10^{-8}$	0,0035	$2,60 \times 10^{-3}$	0,74	284,9	
6,5	$2,99 \times 10^{-8}$	0,0020	$2,99 \times 10^{-3}$	1,47	492,6	1,55
7	$9,08 \times 10^{-8}$	0,0018	$4,54 \times 10^{-3}$	2,42	534,7	2,4
7,5	$5,88 \times 10^{-8}$	0,0031	$5,87 \times 10^{-3}$	1,92	326,8	3,22
8	$6,36 \times 10^{-8}$	0,0029	$1,06 \times 10^{-2}$	3,56	336,7	
8,5	$8,29 \times 10^{-8}$	0,0019	$8,29 \times 10^{-3}$	4,16	502,5	
9	$1,97 \times 10^{-7}$	0,0040	$4,91 \times 10^{-2}$	12,11	246,3	12,65
9,5	$6,75 \times 10^{-8}$	0,0056	$1,68 \times 10^{-2}$	2,98	176,6	

^aBunton, C. A., Farber, S. J., 1969.

Tabela 22 Parâmetros cinéticos para o complexo 2 na hidrólise do 2,4-BDNPP em valores de pH entre 5,00 e 9,00.

pH	$v_{\text{máx}}$	K_M	K_{cat}	E_c	K_{ass}	$f \times 10^{-4a}$
5	$3,33 \times 10^{-9}$	$6,26 \times 10^{-4}$	$3,33 \times 10^{-4}$	0,53	1597,4	0,18
5,5	$1,19 \times 10^{-8}$	0,0016	$1,19 \times 10^{-3}$	0,73	613,5	0,97
6	$2,53 \times 10^{-8}$	0,0017	$2,53 \times 10^{-3}$	1,49	591,7	
6,5	$3,10 \times 10^{-8}$	0,0013	$3,10 \times 10^{-3}$	2,38	769,2	1,60
7	$6,57 \times 10^{-8}$	$8,63 \times 10^{-4}$	$6,57 \times 10^{-3}$	7,61	1158,2	3,47
7,5	$1,43 \times 10^{-7}$	0,0018	$1,43 \times 10^{-2}$	7,71	540,5	7,86
8	$1,89 \times 10^{-7}$	0,0026	$1,89 \times 10^{-2}$	7,19	380,2	
8,5	$4,01 \times 10^{-8}$	$7,08 \times 10^{-4}$	$1,20 \times 10^{-2}$	17,0	1412,1	
9	$1,40 \times 10^{-7}$	0,0012	$3,50 \times 10^{-2}$	29,2	833,3	9,02

^aBunton, C. A., Farber, S. J., 1969.

Tabela 23 Parâmetros cinéticos para o complexo **3** na hidrólise do 2,4-BDNPP em valores de pH entre 5,00 e 9,50.

pH	v_{máx}	K_M	k_{cat}	E_c	K_{ass}	f × 10^{-4a}
5	8,02 × 10 ⁻⁹	0,0015	4,63 × 10 ⁻⁴	0,30	662,2	0,26
5,5	1,73 × 10 ⁻⁸	0,0016	1,00 × 10 ⁻³	0,62	621,1	0,82
6	3,39 × 10 ⁻⁸	0,0015	1,96 × 10 ⁻³	1,24	632,9	
6,5	6,43 × 10 ⁻⁸	0,0013	3,72 × 10 ⁻³	2,69	724,6	1,92
7	1,96 × 10 ⁻⁸	5,89 × 10 ⁻⁴	3,77 × 10 ⁻³	6,41	1468,4	2,28
7,5	3,60 × 10 ⁻⁸	0,0014	6,94 × 10 ⁻³	4,92	709,2	3,81
8	7,47 × 10 ⁻⁸	0,0025	1,44 × 10 ⁻²	5,67	393,7	
8,5	3,67 × 10 ⁻⁸	8,11 × 10 ⁻⁴	7,07 × 10 ⁻³	8,72	1233,1	
9	1,64 × 10 ⁻⁷	0,0020	3,16 × 10 ⁻²	15,3	483,1	8,15
9,5	2,75 × 10 ⁻⁷	0,0034	0,053	15,5	292,4	

^aBunton, C. A., Farber, S. J., 1969.

APÊNDICE C - Coordenadas cartesianas calculadas para os complexos 1 – 3

Tabela 24 Coordenadas cartesianas calculadas para o complexo 1.

Ni	2,74531293280889	4,66762630129773	9,48333531871859
Ni	2,88738124770990	6,89628180865457	11,61795172136034
O	2,90749451774639	6,30143839506735	8,22189326283829
O	3,74387198518955	7,92493358815965	9,91915550563380
O	4,05508158305017	5,27127061889719	11,01487000953890
O	4,27442807076212	4,25029174106934	7,87959435025859
O	1,48867096406548	8,33365722635958	11,65138358895046
O	1,48507233907243	5,58523473506910	10,75870880853203
N	2,58334537088394	2,82631283763867	10,33116063418105
N	4,06663852951687	8,08023457117484	12,77402337480460
N	0,82508876626893	3,88339906357131	8,39831359693446
N	2,24650775922699	6,19036111039042	13,56092759418465
C	-3,62138083645599	6,03318244631935	12,66036780834303
C	-2,28113457240777	6,68522891833315	12,42208516257364
C	-1,27399966498434	6,68176837394971	13,39991932928234
C	-1,96301469700099	7,24505627845219	11,15985280191077
C	-2,42186103685075	2,14634513674077	13,06347233126901
C	-2,56934706475888	4,10605447627273	5,25478211447076
C	-2,59551610811017	2,80083707855176	4,73526799868544
C	-1,48220652549776	1,96027883212498	4,90599093265800
C	-1,43889860436795	4,56327798866002	5,95034142935322
C	-0,35372324965785	2,42215445535600	5,60214464143699
C	-0,31948691994252	3,72516963122942	6,14143415972644
C	0,86723820725261	4,20848017372259	6,95022805211648
C	1,04512393539723	1,03692333994358	10,79176274888040
C	1,76608981634127	0,70639782084193	11,94695688458630
C	2,92510690125931	1,43397263892029	12,25901609008863
C	3,29329457898218	2,49968747712259	11,42998008322617
C	1,49382679521841	2,09717756142976	9,99009232260032

C	0,87283040404682	2,43382436788791	8,65400837866155
C	4,57400521020981	8,57394092541338	15,07621913528260
C	5,06521017553621	9,83644471433201	14,70648987162152
C	5,01890944067556	10,21049050883912	13,35386176929631
C	4,50278271892469	9,30512382121955	12,41727653024072
C	4,07845917567858	7,72017474297231	14,08062670911459
C	3,48850814621453	6,35858157537613	14,34190587234386
C	-0,71424840877566	7,80495516378408	10,87732382091648
C	0,29466910694958	7,83430746496242	11,89413039033393
C	0,00141924424874	7,21498332811629	13,14675200177223
C	1,15338530486789	7,07376280751869	14,09721629505432
C	-0,28496849199146	3,51542197456282	13,22017137961164
C	-1,34808963169511	3,00837946733295	12,44497628717578
C	-1,38420924385658	3,36465281515906	11,08439429705770
C	-0,42071860693120	4,21777561999858	10,52645945551173
C	0,60961616912738	4,77463585817313	11,33460328027094
C	0,69129362256969	4,37768822085043	12,69914541639803
C	-0,36245259607966	4,51640788272223	9,05853749703699
C	1,88191017966619	4,75995163323409	13,53555015654048
H	3,36769911020404	7,32149912037023	9,13834230211344
H	4,67138905528920	7,62398797654037	9,94892153159834
H	2,03664870855377	6,61997039014694	7,92194747432462
H	4,94084658362915	5,50020891469662	10,67777293444530
H	1,42490311640521	-0,11204152305744	12,59866477242949
H	-1,46935019986342	6,20039441821500	14,37336989445238
H	-2,71917404392224	7,21085858414593	10,35420104912918
H	-4,46684506363006	6,70174295088967	12,39109236306494
H	-3,73056718338882	5,11037851920429	12,04867492866564
H	-3,74863412424635	5,74179417160149	13,72235090417832
H	3,82727764170330	5,13925588953546	7,63466029829790
H	3,96376743095693	3,60890346518873	7,21526316733194
H	-2,17881242019066	2,95964995314471	10,43459594018005
H	-2,02312268310346	1,51351333209045	13,88307760431491

H	-3,23526967631282	2,76632509182014	13,50176879085348
H	-2,89516455852285	1,47775304795680	12,31557396601381
H	-3,48081032517871	2,44140813204118	4,18879609604670
H	-1,49031976724227	0,94226517814897	4,48780342175331
H	-1,41691054913166	5,59021143554364	6,34860715679824
H	-3,43268553113689	4,77421359051289	5,11349798400484
H	0,52141140628320	1,76369192147066	5,72114297091579
H	0,95200245401692	5,30936019318076	6,86981504766212
H	1,80959345286934	3,78582294777377	6,54695281888681
H	0,13082704945470	0,49362231036728	10,51546777015901
H	3,52454534546064	1,20168371622422	13,15096895266979
H	4,13301960308636	3,18484998136655	11,63478598425653
H	-0,12520041163607	1,95049298661345	8,55822126945257
H	1,52298433883330	1,97968140570937	7,87456052769234
H	4,55953478538468	8,25205956816994	16,12811732143182
H	5,45753974423162	10,52720392562792	15,46782010216740
H	5,36716990811511	11,19927205141449	13,02260518459470
H	4,40449286826213	9,53980874501886	11,34613149306619
H	3,32021770097751	6,19886747941052	15,43378921136573
H	4,20008344570333	5,58347382502161	13,98487531065347
H	0,82162655376244	6,67444443035575	15,08446289118771
H	1,62655196090517	8,06496166508274	14,26179779801275
H	-0,21296549227265	3,22684632348233	14,28288112306399
H	-0,26658211377889	5,60847744672201	8,89604611850179
H	-1,29350736324553	4,16176128423904	8,56346489212829
H	2,77718824559332	4,24129758856562	13,13244914031070
H	1,72360804257226	4,39058815786388	14,57927010006534
C	-0,31257689481221	8,26567066179170	9,48960788642176
H	-1,17474311365356	8,14936070760876	8,79490284758911
H	0,48077906253313	7,56618591500576	9,13665875796001
N	0,25597845562137	9,61156316257446	9,37564457174988

H	1,11971577107616	9,57877301493327	9,93746263963962
C	-0,59958586989232	10,67005436444233	9,90525739299084
H	-0,98597433382171	10,47078507709061	10,93709394425731
H	0,01819971190491	11,59407503802975	9,97575398990929
C	-1,79792945822077	10,96169766200228	8,99642714202710
H	-1,41232994804396	11,06721467869512	7,94877751084016
H	-2,47422410411358	10,07883475459360	8,99021766852786
N	-2,56172213762756	12,10429396045935	9,50585977474022
H	-3,39419355274177	12,25862567468590	8,92316538809524
H	-1,99765757376216	12,96043721789463	9,40520067562481

Tabela 25 Coordenadas cartesianas calculadas para o complexo 2.

Ni	2,74970234543401	4,66326441531998	9,48315811903793
Ni	2,90278947354551	6,88223093175377	11,62744656685309
O	2,90707871722983	6,30322857251523	8,22888637470454
O	3,75170217957492	7,91779672232168	9,92982731611812
O	4,06769901667427	5,25992620879835	11,01148355552490
O	4,27108932577185	4,25256855915196	7,87023530980645
O	1,50202430509594	8,31839281652980	11,67315279623796
O	1,49693116776058	5,57490446591372	10,76978707844103
N	2,59210273788298	2,81787568212608	10,32165147350429
N	4,08454204503842	8,06374390993819	12,78316807856227
N	0,82363428893668	3,88605254678056	8,40448898458668
N	2,27031247580970	6,16781756226333	13,57027804300846
C	-3,60170854038363	6,00556072966640	12,68538796247557
C	-2,26297444978300	6,66052740768479	12,44639159172717
C	-1,25304493956556	6,65376318376349	13,42145511811514
C	-1,94914975953559	7,22580710739484	11,18536019926867
C	-2,39330738580180	2,11967738504067	13,07825447255962
C	-2,59488314068189	4,14278796646291	5,29182441007150
C	-2,63180683355880	2,84081861954499	4,76481336331237
C	-1,52084299036558	1,99418818607714	4,92010041466784
C	-1,45601718718267	4,59057790703252	5,97970756730125

C	-0,38392900903511	2,44657701275497	5,60877323223994
C	-0,33889224117463	3,74604752084386	6,15566329996357
C	0,85638809885855	4,21910522293483	6,95781546686404
C	1,05883490371166	1,02347429660485	10,77853241525365
C	1,78637770087113	0,68631918596581	11,92765053614463
C	2,94579993247948	1,41371713581625	12,23867736921230
C	3,30824249774018	2,48518997882519	11,41462107978721
C	1,50154255588005	2,08985781896126	9,98160721742915
C	0,87187537028262	2,43491927939565	8,65162036032435
C	4,59814012142914	8,55192324488906	15,08516491818498
C	5,08664613889992	9,81605105802048	14,71738999322404
C	5,03590430965288	10,19364460676005	13,36588780513555
C	4,51815130604067	9,29014401972245	12,42839962881954
C	4,10077063008062	7,70014998000827	14,08874316199050
C	3,51408737352982	6,33675496499243	14,34813495356112
C	-0,70124394611492	7,78728862069120	10,90152280736432
C	0,31016310824952	7,81427232391559	11,91603747083525
C	0,02125130981994	7,18913976712107	13,16690504315212
C	1,17629283811261	7,04588480010363	14,11353353804746
C	-0,25665592991920	3,48970147390542	13,23025973539697
C	-1,32396424192612	2,98634088275437	12,45855764218743
C	-1,36885918022442	3,35085857185918	11,10035363993606
C	-0,40956091701451	4,20812863773386	10,54165749278280
C	0,62553655170953	4,76048869979614	11,34666532420681
C	0,71573202592194	4,35580101704765	12,70828701205282
C	-0,35989171135035	4,51578130563887	9,07530829945925
C	1,90983470995526	4,73635822815477	13,54024412854482
H	3,37083887295080	7,31887291917513	9,14754981785929
H	4,67872132101999	7,61474173807689	9,95350948892853
H	2,03471861516235	6,62162798011322	7,93312710597349
H	4,95212923258005	5,48962290887889	10,67141085328724

H	1,44997387921750	-0,13710624316235	12,57554025650933
H	-1,44502665997525	6,16792089771208	14,39334495289735
H	-2,70797592696248	7,19584507961054	10,38215819752648
H	-4,44854031533736	6,66898113589555	12,40816954874476
H	-3,70564740212776	5,07827497466097	12,07962075952218
H	-3,73144211430663	5,72089482223428	13,74893742686105
H	3,82348006188221	5,14306878548260	7,63195923385162
H	3,95488941641927	3,61442298800515	7,20539505821184
H	-2,16722057020253	2,94924878993289	10,45310237208581
H	-1,99036832504471	1,48699496765780	13,89587247230607
H	-3,20778558805626	2,73625661709334	13,51937075412920
H	-2,86626382364870	1,45069216861134	12,33048780972030
H	-3,52376230630226	2,48870825457015	4,22447843576581
H	-1,53738881767264	0,97879392171805	4,49579172682630
H	-1,42606198384057	5,61491045966675	6,38407213278881
H	-3,45636051172741	4,81578023163251	5,16275115700106
H	0,48922980561133	1,78326921289483	5,71506089024130
H	0,94472845531662	5,32011905085351	6,88289236318147
H	1,79404677117053	3,79492368847800	6,54523204428694
H	0,14399133280435	0,48046638081945	10,50343582982312
H	3,55011888387984	1,17650316727906	13,12604462726731
H	4,14814551633605	3,17013752277434	11,61947673797257
H	-0,12727432826545	1,95309773830451	8,56008789168294
H	1,51614802978712	1,98458480466804	7,86509980862558
H	4,58750957997115	8,22707255061519	16,13618994983871
H	5,48056167641187	10,50517125126024	15,47939748070471
H	5,38222936521136	11,18361946525289	13,03614984429172
H	4,41646302726338	9,52737344104082	11,35812805166032
H	3,34916209009666	6,17401850578221	15,44008795030103
H	4,22635544373750	5,56392725038491	13,98751684050861
H	0,84836482552856	6,64120528188754	15,09989728034665
H	1,64775267025289	8,03739604559907	14,28144668473766
H	-0,17789677589295	3,19494503563945	14,29077550533537

H	-0,26480630245089	5,60886985018533	8,91900568167998
H	-1,29377761035052	4,16446994885514	8,58345164383533
H	2,80471880690793	4,22218479392059	13,13048653833819
H	1,75766173645331	4,36195288447163	14,58308270678392
C	-0,30706095434489	8,26537878620064	9,51745233027688
H	-1,16890536930288	8,14736426739496	8,82315122838202
H	0,49634060190057	7,58227475637250	9,15604972505776
N	0,24087446044775	9,62172278389737	9,42137346207745
H	1,11072027774523	9,59135666741884	9,97396965811198
C	-0,62596010660437	10,65368544324090	9,98637221336115
H	-0,97579028545678	10,40980630549814	11,02466384538174
H	-0,02241996837429	11,58423845670427	10,07509081551824
C	-1,85051649113189	10,93641668357831	9,11220871835671
H	-1,50019241578874	11,16860168609149	8,08044334525530
H	-2,48840532478891	10,03096589248866	9,02743566057985
C	-2,71888086287111	12,07764522838805	9,64193586297798
N	-3,90007214846170	12,27817307116238	8,79526745186097
H	-2,07546702044970	12,99048666098422	9,76544721108645
H	-3,06852432799050	11,81843437970521	10,66624019649831
H	-3,59285648049587	12,59284439111050	7,86378220322772
H	-4,46429079620256	13,05415272993341	9,16717779176401

Tabela 26 Coordenadas cartesianas calculadas para o complexo **3**.

Ni	2,76102756531174	4,65263642813089	9,47891622846304
Ni	2,91234702747086	6,86529164257898	11,63001700323636
O	2,91336010541374	6,29538796991290	8,22752823366630
O	3,74771307635131	7,91072304633747	9,93273917692076
O	4,08000755657603	5,24934618799966	11,00596588918785
O	4,28271169690418	4,24834346160104	7,86498081040359
O	1,50774084050196	8,29747828873233	11,68990997984911
O	1,50737302976380	5,55907770282724	10,76963513091586

N	2,61088162227498	2,80480992619464	10,31316361051177
N	4,09705343533914	8,04340940153073	12,78600037500763
N	0,83555449365663	3,87238347349872	8,40188968533131
N	2,29141875837844	6,13895801734973	13,57143243674200
C	-3,58259503749650	5,96349639140467	12,72147896673591
C	-2,24754656152619	6,62414912414404	12,47756906310323
C	-1,23212153744849	6,61701274798085	13,44691178530668
C	-1,94260309253664	7,19670556932157	11,21762565408000
C	-2,36432909770178	2,08003504951282	13,07391675123789
C	-2,58629195685848	4,11852845463991	5,29136973223313
C	-2,61869821401753	2,81660668479344	4,76398294448854
C	-1,50445548514150	1,97413149422926	4,91832559679608
C	-1,44871870172110	4,57026817024561	5,97881512801830
C	-0,36881547315156	2,43054259151255	5,60641164021198
C	-0,32832461626210	3,72992643577458	6,15388895680135
C	0,86566830966943	4,20719105179038	6,95550481152957
C	1,08572025636774	1,00306429619985	10,76804224216426
C	1,81851903730221	0,66387279252366	11,91322010321935
C	2,97654347370866	1,39398659707775	12,22305436529898
C	3,33220214617878	2,47016180318862	11,40211554727970
C	1,52191725743380	2,07414126280379	9,97379703710498
C	0,88718504270888	2,42089842494758	8,64673031686636
C	4,62629325150787	8,51623303133981	15,08753082829453
C	5,11062089058325	9,78347401887906	14,72497660726365
C	5,04973940695828	10,17047315407989	13,37654665573346
C	4,52648102174708	9,27274189397845	12,43657022261511
C	4,12282764984912	7,67073543395219	14,08881494856818
C	3,53967499177818	6,30474611986248	14,34290522448676
C	-0,69852830178967	7,76451725336067	10,92956476414763
C	0,31892287312945	7,78983677761205	11,93814897872771
C	0,03872564198778	7,15823067368964	13,18784116934417
C	1,19989988865334	7,01258674410857	14,12647788306603
C	-0,23254260403630	3,45745253347617	13,22601736660254

C	-1,30033212573527	2,95387771937793	12,45515144601410
C	-1,34999235477372	3,32383606608748	11,09857009784027
C	-0,39503233564241	4,18670358869499	10,54103959900148
C	0,64012938166892	4,73958545552737	11,34570196744728
C	0,73555636074322	4,32913864285228	12,70530597871329
C	-0,34837669611040	4,49845289574571	9,07540964151162
C	1,93177648992789	4,70746774656830	13,53547385058005
H	3,37096055792588	7,31091031603122	9,14901305340562
H	4,67783470795255	7,61715720572344	9,95296857614831
H	2,04059773607049	6,61027758375743	7,92953159492718
H	4,96230705464378	5,48360328708595	10,66347626744400
H	1,48755659031013	-0,16350366927570	12,55886415190606
H	-1,41636054541094	6,12502693585987	14,41716063246554
H	-2,70488809923134	7,16546487025043	10,41746618600654
H	-4,43449734061502	6,63878577055458	12,49129809463388
H	-3,70366291150159	5,06093180436947	12,08270665758795
H	-3,68719220458714	5,63770227487684	13,77576775326578
H	3,83376775944782	5,13845522964838	7,62834483150109
H	3,96846198283449	3,61099206887854	7,19846135612916
H	-2,14837392191156	2,92168436388282	10,45167416211814
H	-1,95594510047191	1,44400581232479	13,88621660368103
H	-3,17917883784422	2,69108638921649	13,52181206526419
H	-2,83784817093998	1,41377645162357	12,32409653859817
H	-3,50958256410157	2,46140226928437	4,22392550292903
H	-1,51741251062601	0,95887544675849	4,49360864231579
H	-1,42201552563687	5,59468498380851	6,38319357616080
H	-3,45025139686721	4,78838722650237	5,16255557647487
H	0,50686466438625	1,77045497689829	5,71176924106827
H	0,94930035506725	5,30866886748729	6,88156897148707
H	1,80477050269005	3,78738447059251	6,54178358532864
H	0,17211562311136	0,45751781038310	10,49379679786801

H	3,58507427005515	1,15510393141875	13,10709160652189
H	4,17063735678932	3,15694532923017	11,60664682461084
H	-0,11147159289922	1,93768100979069	8,55785759467285
H	1,52936416479446	1,97282452083417	7,85726446992895
H	4,62379045682709	8,18417131479827	16,13632017129914
H	5,50923108838149	10,46775019293842	15,48889890513593
H	5,39251044478831	11,16314117516412	13,05128492151344
H	4,41701806975539	9,51739361716009	11,36876660473276
H	3,38140990139773	6,13491737535050	15,43472261446464
H	4,25098915485281	5,53528823888523	13,97321339341805
H	0,87919947420992	6,60233534169545	15,11292908755907
H	1,67071012890663	8,00404001838854	14,29636344747546
H	-0,14940511438736	3,15774290742145	14,28479616168586
H	-0,25525742495484	5,59211008058762	8,92154006624505
H	-1,28217541261588	4,14650720266950	8,58376148382816
H	2,82573936571293	4,19589726319549	13,12065495259188
H	1,78322659374669	4,32803069190780	14,57698269690084
C	-0,31346896558588	8,24991056772662	9,54548118641418
H	-1,17935428665104	8,13276118514119	8,85566545572058
H	0,48822090433186	7,56965428161048	9,17548028967777
N	0,23245655362975	9,60724827589462	9,45164119214225
H	1,11409407083030	9,57203713979099	9,98463434762074
C	-0,61969780010042	10,63442084679069	10,04627878214965
H	-0,93923797988477	10,38600473447179	11,09334427099080
H	-0,01714776913511	11,56673678071443	10,12092849248019
C	-1,87031984432499	10,92181951074618	9,21047889942804
H	-1,55442710975029	11,15347945757976	8,16866246116688
H	-2,49271101978571	10,00150986913469	9,14424217694072
C	-2,72794299599622	12,05860705426285	9,77349299955294
C	-3,98818096984213	12,35707670210507	8,94571807019784
H	-2,11698823371781	12,98899368719822	9,84773846621944
H	-3,03054599184706	11,81432450621473	10,81828278327024
H	-3,68996055120206	12,60240682915641	7,90138781424173

N	-4,85335569530921	13,43333215675455	9,43730596712860
H	-4,59984099767891	11,42988608345030	8,86600398904008
H	-4,30103515698967	14,29983376456810	9,51153958824053
H	-5,13423387894302	13,22101937075076	10,40546091340707