



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

BRUNA BARRIQUEL SEGAT

Investigação espectroscópica e via Ressonância Paramagnética Eletrônica da atividade antioxidante de compostos de coordenação de cobre, ferro e manganês, frente a EROs

Florianópolis – SC
2022

BRUNA BARRIQUEL SEGAT

Investigação espectroscópica e via Ressonância Paramagnética Eletrônica da atividade antioxidante de compostos de coordenação de cobre, ferro e manganês, frente a EROs

Exame de Dissertação submetido ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito final para obtenção do Título de Mestre em Química
Orientadora: Profa. Dra. Christiane Fernandes Horn

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

Segat, Bruna
Investigação espectroscópica e via Ressonância
Paramagnética Eletrônica da atividade antioxidante de
compostos de coordenação de cobre, ferro e manganês, frente
a EROs / Bruna Segat ; orientadora, Christiane Fernandes
Horn, 2022.
88 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Química. 2. Atividade antioxidante de compostos de
coordenação. 3. Espécies reativas de oxigênio. 4.
Ressonância paramagnética eletrônica. I. Fernandes Horn,
Christiane. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Investigação espectroscópica e via Ressonância Paramagnética Eletrônica da atividade antioxidante de compostos de coordenação de cobre, ferro e manganês, frente a EROs

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

Prof. Dr. André Oliveira Guimarães
Universidade Estadual do Norte Fluminense

Prof. Dr. Nicolás Adrian Rey
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Florianópolis, 08 de fevereiro de 2022.

Prof^ª. Dr^ª. Christiane Fernandes Horn – Orientadora
Departamento de Química – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Dr. Giovanni Finoto Caramori – Coordenador do PPGQMC – UFSC
Departamento de Química – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Ivanio e Marilú, por sempre me apoiarem, me incentivarem e acreditarem no meu melhor.

Gostaria de agradecer à minha orientadora Prof. Christiane Fernandes Horn, pela excelente orientação. Estando sempre presente e envolvida no trabalho, ajudando quando necessário e guiando o trabalho de forma a atingir os melhores resultados.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Lucas B. Menezes, Samuel de M. Rocha e Ana Paula Cardoso, pela companhia, amizade e toda a ajuda durante esse processo. Um agradecimento especial ao Lucas, pela paciência, convívio e companheirismo.

Agradeço ao Prof. Adolfo Horn Junior, do Departamento de Química-UFSC, pela realização dos estudos de EPR, discussão dos resultados e pela parceria estabelecida.

Agradeço ao técnico Nilton César Pereira, do Departamento de Química- UFSC pelo auxílio na realização das análises de IV e EPR, pela disponibilidade e eficiência.

Agradeço à Prof. Roberta Cargnelutti, do Departamento de Química- UFSM, pela obtenção dos dados de difração de RX e pela eficiente colaboração.

Ao Professores André Oliveira Guimarães (LCFIS-UENF) e Nicolás A. Rey (Departamento de Química- PUC-Rio), pela participação como membros avaliadores dessa dissertação.

À CAPES pela bolsa de estudos.

"The only way to deal with an unfree world is to become so absolutely free that your very existence is an act of rebellion."

- Albert Camus

Lista de Figuras

Figura 1. Diagrama de orbital molecular simplificado para a molécula de O ₂ e as EROs geradas via reduções sucessivas. Adaptado pelo autor. ²	3
Figura 2. Representação do processo de regulação de EROs na mitocôndria. ²⁹	6
Figura 3. Esquema das reações catalisadas pelas metaloenzimas SOD e CAT e a relação entre as duas. ¹⁹	6
Figura 4. Representação dos sítios ativos da: a) MnSOD e b) Cu-ZnSOD. ³⁰	7
Figura 5. Representação da estrutura molecular do ligante SALEN e seus respectivos compostos de coordenação contendo centro metálico de Mn ^{III} , registrados sob a patente EUK-8 e EUK-134. ¹¹	8
Figura 6. Equação química de redução do radical DPPH• (à esquerda). Um antioxidante (representado por A–H) captura o elétron desemparelhado reduzindo o DPPH• (violeta) para DPPH–H (amarelo). A mudança de coloração permite o estudo via espectroscopia eletrônica. A formação de uma espécie diamagnética permite o estudo via EPR. ³⁹	9
Figura 7. Espectros de EPR dos adutos radicalares DMPO-SO ₄ e DMPO-OH respectivamente. Figura adaptada da referência 44. ⁴⁴	10
Figura 8. Representação genérica dos compostos de coordenação de Fe ^{II} , Co ^{II} e Ni ^{II} e dos compostos de Ru ^{II} e Pd ^{II} sintetizados por Bingöl e Turan. ⁴⁶	12
Figura 9. Espectros de EPR dos adutos DMPO-OOH• (a), DMPO-OH• (b) e DMPO-OOR• (c) em tampão fosfato (PBS), respectivamente. ⁴³	13
Figura 10. Estrutura molecular do composto de Mn ^{II} com o ligante HPCINOL (A), do intermediário formado (B), espectro eletrônico da interação entre o composto de Mn ^{II} com H ₂ O ₂ (C) e espectro de EPR do composto sozinho (a) e interação com o H ₂ O ₂ (b) e (c) (D). ⁴⁵	15
Figura 11. Estrutura do composto de coordenação de Fe ^{III} com o ligante HPCINOL (a) e estrutura de raios-X obtida para este composto (b). ¹³	16
Figura 12. Estrutura dos compostos de Cu ^{II} , Fe ^{III} e Mn ^{II} reportadas por Ribeiro e colaboradores. ¹⁴	17
Figura 13. Gráficos mostrando os efeitos dos compostos de coordenação estudados na sobrevivência das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mutantes deficientes em SOD e CAT (a e b respectivamente) expostas ao estresse oxidativo. Figura adaptada da referência 14.	17
Figura 14. Efeito dos compostos miméticos à CAT e à SOD na peroxidação lipídica de células que passaram por um processo de envelhecimento. Choque térmico foi utilizado como controle positivo. ¹⁵	18
Figura 15. Estrutura molecular do ligante H ₂ L ₂ e do composto binuclear de valência mista Mn ^{II} Mn ^{III} e espectros de EPR para o ânion radical O ₂ ⁻ (a), para o composto (b), interação do composto com o O ₂ ⁻ (c) e após 1 h de interação do composto com o O ₂ ⁻ (d). ¹⁶	19
Figura 16. Estrutura molecular dos compostos de Fe e Cu com o ligante H ₂ L ₂ estudados por Guerreiro e colaboradores. ⁴⁹	19
Figura 17. Esquema de síntese do ligante HL1.	24
Figura 18. Esquema de síntese do ligante H ₂ L ₂	25
Figura 19. Esquema de síntese do ligante SALEN.	25
Figura 20. Esquema de síntese para os compostos (1) – (3).	27
Figura 21. Esquema de síntese para os compostos (4) – (6).	28
Figura 22. Esquema de síntese do composto de referência [Mn(SALEN)Cl].	28
Figura 23. Espectro ¹ H RMN para o ligante HL1, obtido em CDCl ₃ e 400 Hz	37
Figura 24. Espectro de ¹ H RMN para o ligante H ₂ L ₂ , obtido em Metanol D ₄ e 400 Hz ...	37
Figura 25. Espectros na região do infravermelho para o ligante HL1 e seus respectivos compostos de coordenação (1) – (3), obtidos em pastilha de KBr.	38

Figura 26. Voltamogramas cíclicos para os compostos (1), (2) e (3) obtidos em DMSO à 50 mVs ⁻¹	40
Figura 27 Espectros eletrônicos para os compostos (1), (2) e (3) obtidos em DMSO. As setas indicam aumento da concentração do composto em solução.	42
Figura 28. Representação da estrutura cristalina obtida por DRX para o composto (3).....	43
Figura 29 Espectros na região do infravermelho para o ligante H ₂ L2 e seus respectivos compostos de coordenação (4) – (6), obtidos em pastilhas de KBr e filme de KBr (H ₂ L2).....	47
Figura 30. Voltamogramas cíclicos para os compostos (4), (5) e (6) obtidos em DMSO e voltamograma cíclico para o composto (6) obtido em acetonitrila.	48
Figura 31. Espectros eletrônicos dos compostos de coordenação (4) – (6), obtidos em DMSO. As setas indicam aumento da concentração do composto em solução.	50
Figura 32. Espectros na região do infravermelho para o ligante SALEN e composto de referência [Mn(SALEN)Cl], obtidos em pastilhas de KBr.	52
Figura 33. Voltamograma cíclico para o composto de referência [Mn(SALEN)Cl], obtido em DMSO.	53
Figura 34. Médias de valores de RSA% (considerando as concentrações empregadas no ensaio: 5, 25, 50, 75 e 100 µM), para os compostos de coordenação (1) – (6), sais metálicos, ligantes e o composto de referência [Mn(SALEN)Cl].....	55
Figura 35. Espectros de EPR para o radical DPPH e reação com os compostos (1) – (6) e [Mn(SALEN)Cl] em etanol após 30 min (à esquerda) e 60 min (à direita) de reação. Proporção empregada no estudo: 2:1 (composto de coordenação: DPPH).....	57
Figura 36. Espectros de EPR para o radical DPPH e reação com os compostos (1) – (6) e [Mn(SALEN)Cl] em acetonitrila após 30 min (à esquerda) e 60 min (à direita) de reação. Proporção empregada no estudo: 2:1 (composto de coordenação: DPPH).....	58
Figura 37. Espectro eletrônico e de EPR para o composto (1) e resultados da interação com H ₂ O ₂ , monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e por EPR (à direita) em função do tempo.....	61
Figura 38. Espectro eletrônico e de EPR para o composto (2) e resultados da interação com H ₂ O ₂ , monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e por EPR (à direita), em função do tempo.....	62
Figura 39. Espectro eletrônico e de EPR para o composto (3) e resultados da interação com H ₂ O ₂ , monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e por EPR (à direita), em função do tempo.....	63
Figura 40. Espectro eletrônico e de EPR para o composto de coordenação (4) e resultados de interação com H ₂ O ₂ monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e por EPR (à direita), em função do tempo.....	64
Figura 41. Espectro eletrônico e de EPR para o composto de coordenação (5) e interação com H ₂ O ₂ monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e por EPR (à direita), em função do tempo.....	65
Figura 42. Espectro eletrônico e de EPR para o composto (6) e resultados da interação com H ₂ O ₂ , monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e por EPR (à direita), em função do tempo.....	66
Figura 43. Espectro eletrônico e de EPR para o composto de referência [Mn(SALEN)Cl] e resultados da interação com H ₂ O ₂ , monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e por EPR (à direita), em função do tempo.	67
Figura 44. Espectro eletrônico e de EPR para a reação entre o composto de coordenação (1) e interação com diferentes proporções de O ₂ ^{•-} em DMSO, monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e EPR (à direita).....	69

Figura 45. Espectros eletrônico e de EPR para a reação entre o composto de coordenação (4) e interação com diferentes proporções de $O_2^{\cdot-}$ em DMSO, monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e EPR (à direita).....	69
Figura 46. Espectro eletrônico e de EPR para a reação entre o composto de coordenação (2) e interação com diferentes proporções de $O_2^{\cdot-}$ em DMSO, monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e EPR (à direita).....	70
Figura 47. Espectro eletrônico e de EPR para a reação entre o composto de coordenação (3) e interação com diferentes proporções de $O_2^{\cdot-}$ em DMSO, monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e EPR (à direita).....	71
Figura 48. Espectro eletrônico e de EPR para a reação entre o composto de coordenação (5) e interação com diferentes proporções de $O_2^{\cdot-}$ em DMSO, monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e EPR (à direita).....	72
Figura 49. Espectro eletrônico e de EPR para a reação entre o composto de coordenação (6) e interação com diferentes proporções de $O_2^{\cdot-}$ em DMSO, monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e EPR (à direita).....	74
Figura 50. Espectro eletrônico e de EPR para a reação entre o composto de referência [Mn(SALEN)] e interação com diferentes proporções de $O_2^{\cdot-}$ em DMSO, monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e EPR (à direita).	75
Figura 51. Espectros eletrônicos para os compostos (1) – (6), resultantes da interação destes com uma alíquota única de 100 μ L de KO_2 (2mM), em função do tempo, em DMSO.	76
Figura 52. Espectros eletrônicos dos compostos (1) – (6) e resultados da interação com o radical $\cdot OH$ (gerado por reação de fenton) em tampão PBS em função do tempo.....	77
Figura 53. Regressão logarítma da concentração versus RSA% dos compostos (3) (azul), (6) (rosa) e composto de referência [Mn(SALEN)Cl] (roxo). A concentração para o composto de referência [Mn(SALEN)Cl] foi dividida por 10 para ficar na mesma faixa de concentração dos compostos de coordenação estudados.	79
Figura 54. Espectros de EPR resultantes da interação entre os compostos de coordenação (3), (6) e composto de referência [Mn(SALEN)Cl], com o radical $\cdot OH$, em função da concentração do composto de coordenação. O radical hidroxil foi obtido através da reação de fenton e estabilizado com adição de “spin trap” DMPO, mantendo-se a proporção DMPO:H ₂ O ₂ :Fe ³⁺ de 100:1:0,1, de acordo com metodologia descrita por Scalzo e colaboradores. ⁴² A concentração dos compostos de coordenação foi variada de acordo com a Tabela 15. Sinal do aduto radicalar DMPO-OH em água (linhas pretas), sinal do aduto radicalar DMPO-OH após interação com a última concentração adicionado do composto (3) (75 μ M, linha azul), sinal do aduto radicalar DMPO-OH após interação com a última concentração adicionado do composto (6) (100 μ M linha rosa), sinal do aduto radicalar DMPO-OH após interação com a última concentração adicionado do composto de referência [Mn(SALEN)Cl] (750 μ M, linha roxa).	80
Figura 55. Estrutura molecular do spin trap DMPO e aduto radicalar DMPO-OH, respectivamente. ⁶³	81

Lista de Equações

Equações 1 e 2. Reações químicas da formação de diferentes EROs em sistemas biológicos. A Equação 1 ocorre na presença de oxidorredutase (NADPH oxidase). A Equação 2 é catalisada pela enzima Superóxido Dismutase (SOD). ¹⁸	3
Equações 3, 4 e 5. Representação das equações da reação de Fenton (Equação 3), reação química do íon de Fe ^{III} disponível com o ânion O ₂ ⁻ (Equação 4), e a reação líquida de Haber-Weiss (Equação 5). ^{20,21}	4
Equações 6 e 7. Equação representando a reação do NO [•] com o O ₂ ⁻ . ³	4
Equações 8 e 9. Reação de dismutação do O ₂ ⁻ catalisada pela SOD (Equação 8) e reação de redução do H ₂ O ₂ catalisada pela CAT (Equação 9). ¹	6
Equações 10, 11, 12, 13. Reações representando o mecanismo de ação dos compostos de Mn ^{III} EUK-8 e EUK-134 frente as EROS O ₂ ⁻ (10 e 11) e H ₂ O ₂ (12 e 13). ⁸	8
Equação 14. Determinação do número de linhas no espectro de EPR para cada espécie paramagnética. ⁴²	10
Equação 15. Equação para determinar a porcentagem da capacidade de redução (RSA%) dos compostos de Ga ^{III} frente ao DPPH [•] . ³⁹	11
Equações 16, 17 e 18. Proposta de interação entre o composto (2) e o H ₂ O ₂	62
Equação 19, 20 e 21. Proposta de interação entre o composto (3) e o H ₂ O ₂	63
Equações 22, 23 e 24. Proposta de interação entre o composto (5) e o H ₂ O ₂	65
Equações 25, 26 e 27. Proposta de interação entre o composto (6) e o H ₂ O ₂	66
Equações 28, 29, 30. Proposta de interação entre o composto de referência [Mn(SALEN)Cl] e o H ₂ O ₂	67
Equações 31, 32, 33 e 34. Proposta de interação entre o composto (1) e o O ₂ ⁻	69
Equações 35, 36, 37 e 38. Proposta de interação entre o composto (2) e o O ₂ ⁻	70
Equações 39, 40, 41 e 42. Proposta de interação entre o composto (3) e o O ₂ ⁻	71
Equações 43, 44, 45 e 46. Proposta de interação entre o composto (5) e o O ₂ ⁻	72
Equações 47, 48, 49, 50 e 51. Proposta completa da interação entre o composto (6) com o O ₂ ⁻	74
Equações 52, 53, 54, 55. Proposta para a interação entre o composto de referência [Mn(SALEN)Cl] e O ₂ ⁻	75

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados cinéticos e de IC ₅₀ da atividade antioxidante dos compostos de Cu ^{II} e Fe ^{III} com o ligante H2L2 estudados por Guerreiro e colaboradores. ⁴⁹	20
Tabela 2. Informações gerais de caracterização dos ligantes orgânicos HL1 e H2L2	34
Tabela 3. Atribuição de grupos funcionais para as principais bandas de absorção na região do infravermelho, para os ligantes orgânicos HL1 e H2L2 . Os dados obtidos são comparados com valores relatados na literatura. ^{52,53}	35
Tabela 4. Valores encontrados para os sinais nos espectros de ¹ H RMN, para os ligantes HL1 e H2L2 (δ ppm) e comparações com dados disponíveis na literatura. (Solvente empregado: CDCl ₃ para o HL1 e MeOH D4 para o H2L2) ^{52,53}	36
Tabela 5. Dados gerais de caracterização para os compostos de coordenação (1) – (3) , obtidos pelas técnicas de análise elementar e p.f. ou decomposição.....	38
Tabela 6. Principais bandas de absorção na região do infravermelho para os compostos (1) – (3) e comparação com os valores relatados na literatura para estes compostos. ^{50,51}	39
Tabela 7. Dados, parâmetros cristalográficos e refinamento de estrutura obtida via difração de raios-X de monocristal para o composto (3)	44
Tabela 8. Principais comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação para o composto (3)	44
Tabela 9. Dados gerais de caracterização para os compostos (4) – (6)	46
Tabela 10 Principais bandas presentes nos espectros de absorção na região do infravermelho para os compostos de coordenação (4) – (6) e comparação com os dados relatados na literatura. ^{53,54,16}	47
Tabela 11. Dados gerais de caracterização para o ligante SALEN e para o composto de referência [Mn(SALEN)Cl]	51
Tabela 12. Principais valores de absorção na região do infravermelho para o ligante SALEN e para o composto de referência [Mn(SALEN)Cl] e comparação com a literatura. ⁵⁶ ..	52
Tabela 13. Valores de RSA% obtidos para os compostos (1) – (6) , seus respectivos cloretos e ligantes e para o composto de referência [Mn(SALEN)Cl] , em concentrações de 5, 25, 50, 75 e 100 μM respectivamente.	55
Tabela 14. Valores de h ₀ (altura do pico central do radical DPPH, tempo zero, sem interação com composto), h _x (altura do pico central do radical DPPH, após reação com os compostos de coordenação: 30 ou 60 min) e % RSA para os compostos (1) – (6) e para o composto de referência [Mn(SALEN)Cl] . Os estudos foram conduzidos em etanol e acetonitrila. Proporção empregada no estudo: 2:1 (composto de coordenação: DPPH).	58
Tabela 15. Dados de %RSA do radical [•] OH, obtidos para os compostos (3) , (6) e para o composto de referência [Mn(SALEN)Cl] , obtidos por EPR em meio aquoso, onde h ₀ = 9,642. 78	
Tabela 16. Dados obtidos através do estudo da interação entre o radical [•] OH com os compostos (3) , (6) e [Mn(SALEN)Cl] , pela técnica de EPR.	79

Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

- (1) – [Cu(HL1)Cl₂]
(2) – [Fe₂(HL1)₂Cl₂]
(3) – [Mn(HL1)₂Cl₂]Cl•H₂O
(4) – [Cu(HL2)Cl]Cl•2H₂O
(5) – [Fe(HL2)Cl₂]•0,5H₂O
(6) – [Mn₂(HL2)Cl₂]nClO₄•3H₂O
- ¹H RMN – Ressonância magnética nuclear a de Hidrogênio
ACN - Acetonitrila
AD – Doença de Alzheimer
ARP – Anti radicalar
AsA – Ácido Ascórbico
ATP – Adenosina Trifosfato
BMPO – 5-terc-(butoxicarbonil)-5-metil-1-pirrolina-*N*-óxido
CAT – Catalase
CGA – Ácido clorogênico
CHN – Análise Elementar de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio
Cys – cisteína
DEPMPO – 5-(Dietoxifosforil)-5-metil-1-pirrolina-*N*-óxido
DMPO – 5,5-dimetil-1-pirrolina-*N*-óxido
DMSO – Dimetil sulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DRX – Difração de raios – X
ELA – Esclerose Lateral Amilofísica
EPR – Ressonância Paramagnética Eletrônica
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
EtOH – Etanol
FTIR – Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier
GPX – Glutathione peroxidase
h₀ – Altura inicial
H₂L2 – *N*-(2-hidroxibenzil)-*N*-(2-piridilmetil)-3-cloro-2-hidroxi-propano
HL1 – *N*-(2-hidroxibenzil)-*N*-(2-piridilmetil)amina
HPCINOL – 1-(bis-piridin-2-il-metilamina)-3-cloropropan-2-ol
hx – Altura final
Kae – Kaempferol
KO₂ – Superóxido de potássio
LMCT – Transferência de carga ligante - metal
MeOH – metanol
NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaEDTA – Etilenodiamin tetra acetato de sódio
NBT – nitrazul de tetrazólio
PBS – Tampão bifosfato
RMN – Ressonância Magnética Eletrônica
RSA% - Radical Scavengin Activity
SALEN – *N,N'*-bis(salicideno)etan-1,2-diamina
SOD – Superóxido dismutase
VC – Voltametria Cíclica
ε – Coeficiente de absorvidade molar

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Geração de EROs	3
2.2 Metaloenzimas e sistema de defesa antioxidante	5
2.3 Compostos da classe EUK	8
2.4 Estudo da capacidade antioxidante de diversos compostos por métodos colorimétricos e espectroscópicos	8
2.5 Estudos prévios da atividade antioxidante de compostos de coordenação de Cu ^{II} , Fe ^{III} e Mn ^{II} Mn ^{III}	14
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral:	22
3.2 Objetivos específicos:	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
5. PARTE EXPERIMENTAL	24
5.1. Síntese dos ligantes orgânicos HL1 , H₂L2 e SALEN	24
5.1.1 Síntese do ligante <i>N</i> -(2-hidroxibenzil)- <i>N</i> -(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2- hidroxil)-amina(HL1)	24
5.1.2 Síntese do ligante <i>N</i> -(2-hidroxibenzil)- <i>N</i> -(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2- hidroxil)-propano (H ₂ L2)	24
5.1.3 Síntese do ligante <i>N,N'</i> -bis(salicideno)etan-1,2-diamina (SALEN)	25
5.2. Síntese dos compostos de coordenação de Cu ^{II} , Fe ^{III} e Mn ^{II} Mn ^{III} (1) – (6) e do composto de referência CONTENDO O LIGANTE SALEN	25
5.2.1 Síntese dos compostos de Cu ^{II} , Fe ^{III} e Mn ^{III} com o ligante HL1 (compostos 1 - 3)	26
5.2.2 Síntese dos compostos de Cu ^{II} , Fe ^{III} e Mn ^{II} Mn ^{III} com o ligante H ₂ L2 (compostos (4)-(6))	27
5.2.3 Síntese do composto de referência [Mn(SALEN)Cl]	28
5.3 Caracterização dos ligantes HL1, H ₂ L2 e salen e dos compostos de coordenação (1) – (6) e composto de referência [mn(salen)cl]	29
5.3.1 Ponto de Fusão	29
5.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	29
5.3.3 Espectroscopia Eletrônica na região do Ultravioleta-Visível.	29
5.3.4 Voltametria Cíclica	29
5.3.5 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio	30
5.3.6 Ressonância Paramagnética eletrônica	30
5.3.7 Difração de raios-X	30

5.4 Estudos Espectroscópicos	30
5.4.1 Estudo do potencial de captura de radical via método colorimétrico empregando-se o radical DPPH.....	30
5.4.2 Estudo da atividade mimética funcional à CAT empregando-se espectroscopia eletrônica	31
5.4.3 Estudo da atividade mimética funcional à SOD empregando-se espectroscopia eletrônica	31
5.4.4 Estudo da capacidade de captura do radical $\cdot\text{OH}$ empregando-se espectroscopia eletrônica	32
5.5 Estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	32
5.5.1 Estudo da capacidade de captura do radical DPPH via EPR.....	32
5.5.2 Estudo da atividade mimética funcional à CAT via EPR	33
5.5.3 Estudo da atividade mimética funcional à SOD via EPR.....	33
5.5.4 Estudo da capacidade de captura do $\cdot\text{OH}$ via EPR	33
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6.1. Dados de caracterização para os ligantes orgânicos.....	34
6.1.1 Dados de caracterização para os ligantes HL1 e H ₂ L2	34
6.2. Dados de caracterização para os compostos de coordenação (1) – (6)	38
6.2.1 Dados de caracterização para os compostos de coordenação obtidos com o ligante HL1 (compostos (1) – (3))	38
6.2.3 Dados de caracterização para o ligante SALEN e composto de referência [Mn(SALEN)Cl]	51
6.3. Estudos de reatividade dos compostos de coordenação (1)–(6) frente ao radical DPPH e As EROs H ₂ O ₂ , O ₂ ^{•-} e $\cdot\text{OH}$ por técnicas espectroscópicas e EPR e comparação com o composto de referência [Mn(SALEN)Cl]	54
6.3.1 Avaliação da atividade antioxidante dos compostos de coordenação (1) – (6) e do [Mn(SALEN)Cl] empregando-se o método colorimétrico 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)	54
6.3.2 Avaliação da supressão do radical DPPH pelos compostos de coordenação via EPR.....	57
6.3.3 Estudo atividade mimética funcional à CAT via espectroscopia eletrônica dos compostos de coordenação (1) – (6) e do composto de referência [Mn(SALEN)Cl]	59
6.3.4 Estudo da atividade mimética funcional à SOD dos compostos de coordenação (1) – (6) e do composto de referência [Mn(SALEN)Cl], monitorada por espectroscopia eletrônica	67
6.3.5 Estudo da supressão do sinal do radical $\cdot\text{OH}$ promovida pelos compostos de coordenação (1)-(6) e monitorado por espectroscopia eletrônica.....	76
6.3.6 Estudo da capacidade de supressão do sinal do radical $\cdot\text{OH}$ promovida pelos compostos de coordenação (3) e (6) e monitorada por EPR	78
7. CONCLUSÃO	82

8. PERSPECTIVAS PARA ESTUDOS FUTUROS.....	83
9- REFERÊNCIAS	84

Resumo

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são geradas principalmente na mitocôndria, durante a fosforilação oxidativa, e desempenham diversas funções relevantes (sinalização redox, modulação do sistema imune, entre outras). Entretanto, o excesso de EROs está relacionado ao estresse oxidativo, condição promotora de diversas patologias, como isquemia, câncer, doenças inflamatórias e neurodegenerativas. As metaloenzimas desempenham papel vital na homeostase redox, regulando os níveis de EROs nos organismos, sendo a linha de frente no combate à condição de estresse oxidativo. Visando a obtenção de compostos miméticos funcionais às metaloenzimas antioxidantes CAT (Catalase) e SOD (Superóxido Dismutase), seis compostos de coordenação foram sintetizados e caracterizados: $[\text{Cu}(\text{HL1})\text{Cl}_2]$ (**1**), $[\text{Fe}_2(\text{L1})_2\text{Cl}_2]$ (**2**), $[\text{Mn}(\text{L1})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**3**), $[\text{Cu}(\text{HL2})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**4**), $[\text{Fe}(\text{HL2})\text{Cl}_2]\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (**5**), $[\text{Mn}_2(\text{HL2})(\text{L2})\text{Cl}_2]_n\text{ClO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**6**), onde HL1= *N*-(2-hidroxibenzil)-*N*-(2-piridilmetil)amina e H₂L2= *N*-(2-hidroxibenzil)-*N*-(2-piridilmetil)-3-cloro-2-hidroxi-propano. Desses, cinco compostos já foram relatados na literatura previamente, pelo nosso grupo de pesquisa, e um composto inédito de Mn^{III}Mn^{II} foi obtido e caracterizado por difração de raios-X de monocristal. As atividades antioxidantes dos mesmos foram avaliadas *in vitro* frente a diversas EROs, (H₂O₂, O₂^{•-} e [•]OH), além do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). As atividades antioxidantes desses compostos foram estudadas por métodos espectroscópicos e via Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR). Os compostos apresentaram atividade mimética às metaloenzimas CAT e SOD, dismutando o radical O₂^{•-} e decompondo o H₂O₂, com exceção do composto de Cu^{II} (**4**), que não apresentou atividade mimética à CAT, apenas à SOD. Adicionalmente, os compostos de manganês (**3**) e (**6**), foram eficientes na captura do radical [•]OH, resultando em valores de IC₅₀ de 14,51 e 7,97 μM, respectivamente. Conclui-se que os compostos exibem atividades antioxidantes relevantes, atuando tanto por mecanismo redox quanto por transferência de hidrogênio (HT, do inglês *hydrogen transfer*), motivando futuros estudos e aplicações destes como potenciais metalofármacos com ação antioxidante.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are generated mostly in mitochondria during the oxidative phosphorylation process and perform several relevant functions (redox signalization, immune system modulation, and others). However, the excess of ROS is related to oxidative stress, a condition that promotes several pathologies, like ischemia, cancer, inflammatory and neurodegenerative diseases. The metalloenzymes perform vital role in redox homeostasis, regulating ROS levels in the organisms, being the front line in the combat of oxidative stress. Viewing the obtention of functional mimetic compounds of metalloenzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), six coordination compounds were synthesized and characterized: [Cu(HL1)Cl₂] (**1**), [Fe₂(L1)₂Cl₂] (**2**), [Mn(L1)₂Cl₂]Cl•H₂O (**3**), [Cu(HL2)Cl]Cl•2H₂O (**4**), [Fe(HL2)Cl₂]•0,5H₂O (**5**), [Mn₂(HL2)(L2)Cl₂]nClO₄•3H₂O (**6**), where HL1= *N*-(2-hydroxybenzyl)-*N*-(2-pyridylmethyl)amine e H₂L2= *N*-(2-hydroxybenzyl)-*N*-(2-pyridylmethyl)-3-chloro-2-hydroxy-propane. From those, five compounds were previously stated in literature by our research group and one unpublished compound of Mn^{II}Mn^{III} was obtained and characterized by monocrystal X-Ray diffraction. The antioxidant activities of these compounds was evaluated with several ROS (H₂O₂, O₂^{•-} e [•]OH), besides the DPPH radical (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). The antioxidant activities of the compounds were studied through spectroscopic methods and through Electron Paramagnetic Resonance (EPR). The compounds presented mimetic activity to the metalloenzymes CAT and SOD, dismuting the O₂^{•-} radical and decomposing the H₂O₂, with exception of Cu^{II} compound (4), which did not present mimetic activity to CAT, only SOD. Additionally, the manganese compounds (3) and (6), were efficient scavenging the [•]OH radical, resulting in IC₅₀ values of 14,51 and 7,97 μM, respectively. It is concluded that the compounds exhibit relevant antioxidant activities, acting through redox mechanism and through hydrogen transfer (HT), motivating further investigations and application as antioxidants and metallopharmacs.

1. INTRODUÇÃO

O termo espécies reativas de oxigênio (EROs) é aplicado a moléculas e radicais livres derivados do oxigênio molecular (O_2), sendo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxil ($\cdot OH$) seus representantes mais conhecidos. As EROs são essenciais para seres aeróbios desempenhando funções importantes no organismo, agindo como mediadoras de reações de transferência de elétrons, participando da geração de ATP durante a fosforilação oxidativa, ativação de genes e de mecanismos de defesa durante processos infecciosos.^{1,2} Porém, quando em excesso, as EROs podem ser prejudiciais. Dessa forma, organismos aeróbios possuem sistemas de defesa antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, visando regular a quantidade de EROs no organismo, mantendo o equilíbrio que é chamado de homeostase redox. Quando há um desbalanço entre espécies oxidantes e antioxidantes, tem-se a condição chamada de estresse oxidativo.^{1,3,4}

O excesso de EROs e a condição de estresse oxidativo pode levar à oxidação de lipídios, proteínas e DNA, estando associados a diversas patologias como isquemia, doenças inflamatórias, câncer e doenças neurodegenerativas, como Alzheimer (AD), Parkinson, doença de Huntington, esquizofrenia e esclerose lateral amiotrófica (ELA).⁵ Recentemente, também foram associados a neurodivergências, como o autismo.⁶ Desde que Helmut Sies introduziu o conceito de estresse oxidativo na área da bioquímica redox, no ramo medicinal, em 1985, houve um crescimento nas pesquisas envolvendo o papel do estresse oxidativo em diversas doenças e conseqüentemente o estudo de tratamentos antioxidantes.⁷

Dentro desse contexto, destaca-se o estudo e *design* de compostos de baixo peso molecular com propriedades miméticas às metaloenzimas antioxidantes, como os compostos da série EUK, conhecidos por suas propriedades antioxidantes e já comercializados como medicamentos antioxidantes.⁸ Entre estes está incluso o composto de Mn^{III} [$Mn(SALEN)Cl$], que será utilizado como referência neste trabalho.⁸⁻

¹¹ No entanto, o número de pesquisas envolvendo complexos inorgânicos ainda é reduzido comparado aos estudos envolvendo compostos antioxidantes orgânicos naturais, como os flavonoides. Adicionalmente, tem-se um número reduzido de estudos envolvendo a espécie $\cdot OH$, sendo essa a ERO mais prejudicial, devido à sua elevada reatividade. A alta instabilidade dessa espécie radicalar e seu curto tempo de meia vida,

são alguns dos fatores que dificultam a investigação de sistemas capazes de neutralizá-la.¹²

Nosso grupo de pesquisa já vem trabalhando no estudo e desenvolvimento de compostos de coordenação que apresentaram atividade mimética às metaloenzimas, Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD), e que atuam como antioxidantes, capturando EROs.¹³⁻¹⁶ Porém, várias questões relativas ao provável mecanismo de ação antioxidante de alguns desses sistemas estão sem resposta, necessitando de estudos complementares e multidisciplinares (teóricos, experimentais, *in vitro* e *in vivo*).

Desse modo, nesse trabalho serão avaliadas as atividades antioxidantes de seis compostos de coordenação de Cu^{II} , Fe^{III} e $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Mn}^{\text{III}}$, através de técnicas espectroscópicas, como espectroscopia eletrônica na região do ultra violeta-visível (UV-Vis) e Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR). Os estudos serão realizados frente à espécie radicalar DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e frente a diferentes EROs (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ e $\cdot\text{OH}$), com o intuito de elucidar o mecanismo de ação antioxidante desses compostos, gerando um melhor entendimento sobre estes sistemas. Adicionalmente, estas técnicas serão empregadas como método de triagem, selecionando-se os compostos mais promissores para serem aplicados em futuros estudos empregando-se diferentes matrizes biológicas (tecido cerebral e mitocôndrias de camundongo *swiss*), além de futuros estudos *in vivo* (empregando-se a levedura *S. cerevisiae* e o invertebrado *Galleria Mellonella*).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GERAÇÃO DE EROS

O oxigênio molecular (O_2), vital para os seres aeróbios², possui dois elétrons desemparelhados, sendo passível de duas reduções sucessivas, gerando o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Equação 1) e o diânion peróxido (O_2^{2-}) respectivamente (Figura 1). O peróxido (O_2^{2-}) pode originar a espécie reativa peróxido de hidrogênio (H_2O_2), de acordo com a Equação 2. Estas são denominadas de espécies reativas de oxigênio (EROs)^{1,17,18}. A Figura 1 apresenta o Diagrama de Orbital Molecular para a molécula de oxigênio e as EROs geradas via reduções sucessivas.

Equações 1 e 2. Reações químicas da formação de diferentes EROs em sistemas biológicos. A Equação 1 ocorre na presença de oxidoredutase (NADPH oxidase). A Equação 2 é catalisada pela enzima Superóxido Dismutase (SOD).¹⁸

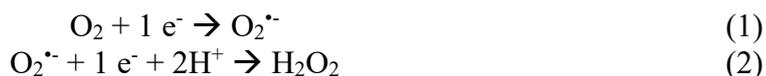
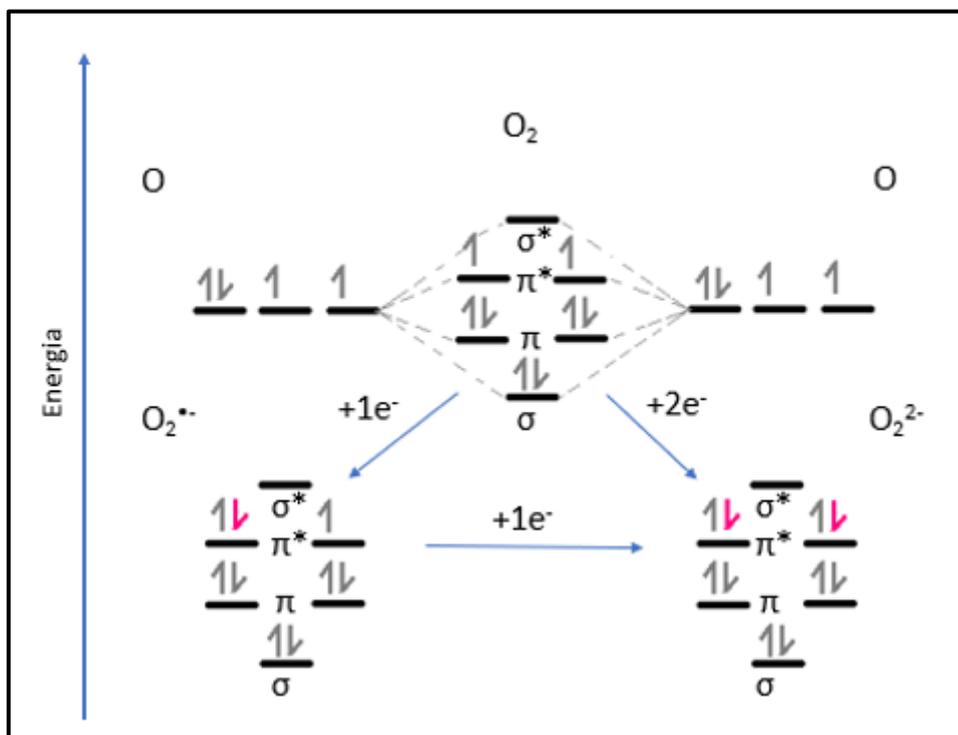


Figura 1. Diagrama de orbital molecular simplificado para a molécula de O_2 e as EROs geradas via reduções sucessivas. Adaptado pelo autor.²



O H_2O_2 gerado pela reação de redução do $\text{O}_2^{\cdot-}$ e interação com H^+ , pode gerar a espécie reativa $\cdot\text{OH}$ na presença de íons de Fe^{II} através de reações de Fenton (Equação 3).¹⁹ Íons metálicos como Fe^{III} ou Cu^{II} , podem reagir com o ânion radical superóxido, de acordo com a Equação 4, gerando Fe^{II} ou Cu^{I} e O_2 . A reação global é descrita como reação de Haber-Weiss (Equação 5), e a reação líquida mostra que o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são convertidos em oxigênio, íon hidróxido (OH^-) e radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$).^{20,21}

Equações 3, 4 e 5. Representação das equações da reação de Fenton (Equação 3), reação química do íon de Fe^{III} disponível com o ânion $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Equação 4), e a reação líquida de Haber-Weiss (Equação 5).^{20,21}



O radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) é o mais agressivo de todas as EROs. Possui alto potencial oxidativo, com potencial de redução de 2,4V vs NHE, sendo altamente reativo, reagindo covalentemente com compostos orgânicos e biomoléculas. Apesar da alta reatividade e impacto no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, seu estudo é dificultado por seu curto tempo de meia vida (10^{-9} s).¹²

Outro importante radical livre é óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), o qual pode interagir com o ânion radical superóxido, de acordo com as Equações 6 e 7:^{3,22}

Equações 6 e 7. Equação representando a reação do $\text{NO}\cdot$ com o $\text{O}_2^{\cdot-}$.³



As EROs são geradas na mitocôndria durante o processo de fosforilação oxidativa como um subproduto natural desse processo metabólico. Desse modo, a presença de EROs é esperada e até mesmo essencial em quantidades basais,²³ desempenhando funções biológicas importantes.

A mitocôndria é a maior e mais importante fonte de EROs em células de mamíferos, em especial $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , pois é nessa organela que o O_2 consumido por seres eucariontes é reduzido à H_2O para produção de energia na forma de ATP.^{2, 4} Em condições normais, cerca de 2 a 3% do O_2 consumido pela mitocôndria é transformado

em EROs, porém, essa porcentagem pode ser maior quando devido a fatores endógenos (como genética ou enfermidades) ou exógenos (como hábitos alimentares não saudáveis, falta ou excesso de exercícios físicos ou ainda condições ambientais).²⁴

O equilíbrio entre efeitos benéficos e prejudiciais das EROs no organismo é de extrema importância para a saúde dos organismos eucariontes. Este equilíbrio é chamado de homeostase e é mantido por processos naturais de regulação redox.⁴ Quando há um desequilíbrio na homeostase, onde o metabolismo natural não é suficiente para manter os níveis de EROs e antioxidantes em quantidades basais, ocorre a condição conhecida como estresse oxidativo.^{24, 25}

Estresse oxidativo é um conceito que foi introduzido na área da bioquímica redox e no ramo medicinal em 1985 por Helmut Sies, através do review “Bioquímica do Estresse Oxidativo”.^{7, 26} Sies caracterizou estresse oxidativo como sendo um desequilíbrio entre espécies pro-oxidantes e antioxidantes, com excesso de espécies pro-oxidantes. No capítulo intitulado “Oxidative stress: introductory remarks”, Sies descreve espécies reativas de oxigênio e antioxidantes, suas fontes endógenas e exógenas e os danos que podem ser causados pela condição de estresse oxidativo.²⁶ Desde então, houve um crescimento nas pesquisas envolvendo o papel do estresse oxidativo em diversas doenças. Em plataformas de busca como Science direct, mais de 800.000 resultados são encontrados com este termo de 1985 – 2021, mais de 60.000 apenas neste ano.²⁷

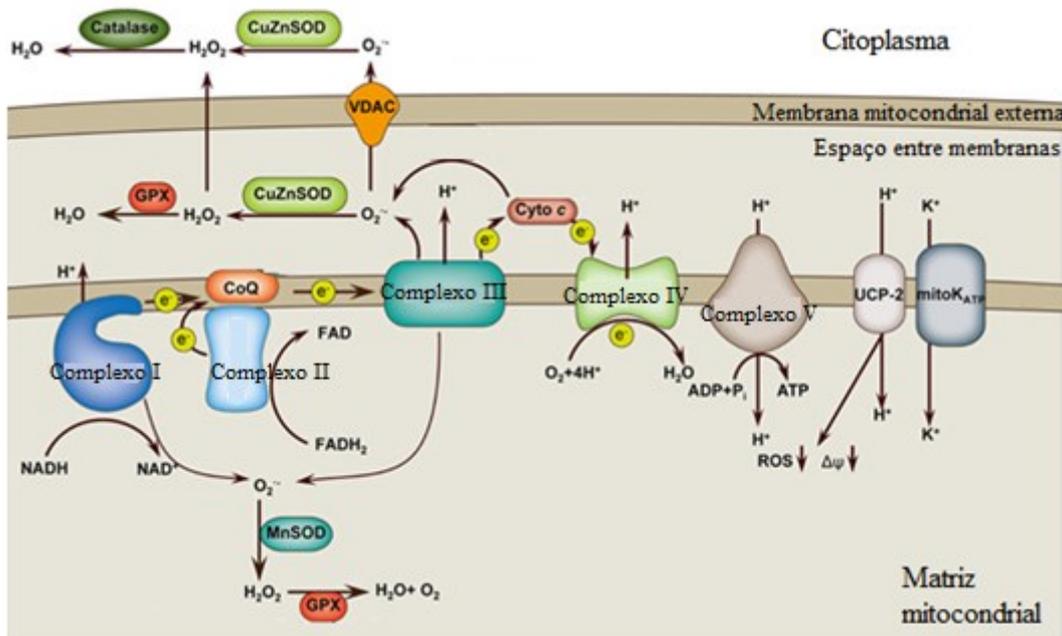
O estresse oxidativo é um dos maiores responsáveis pela disfunção mitocondrial, podendo prejudicar proteínas mitocondriais, ácidos nucleicos e lipídios, contribuindo para uma maior geração de EROs. A disfunção mitocondrial tem um papel importante na progressão de doenças degenerativas.²⁸

2.2 METALOENZIMAS E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

As metaloenzimas antioxidantes, como Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase (GPX), atuam na manutenção da homeostase pelo sequestro de espécies oxidantes (EROs), convertendo os oxidantes em espécies menos nocivas ou mesmo inócuas. Enzimas antioxidantes também têm como função bloquear metabólitos tóxicos secundários e mediadores de inflamações, bloquear a formação de EROs secundárias, reparar moléculas danificadas, iniciar e melhorar o sistema

antioxidante endógeno do organismo.⁵ Na Figura 2, está representado o processo de regulação de EROs na mitocôndria.

Figura 2. Representação do processo de regulação de EROs na mitocôndria.²⁹



A SOD é a enzima de maior poder antioxidante na célula e é a primeira linha de defesa contra as EROs, sendo que os principais íons de metais encontrados ligados no seu sítio ativo são íons Cu^{II} , Fe^{III} , Mn^{II} e Zn^{II} (Figura 4). Esta metaloenzima catalisa a dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 , que é então convertido em O_2 e H_2O pela CAT que utiliza íons Fe^{III} ou Mn^{II} como cofatores. As reações catalisadas por ambas enzimas estão representadas pelas Equações 8 e 9. A Figura 3 mostra um esquema da conexão entre os processos promovidos por ambas as metaloenzimas.^{1, 17}

Equações 8 e 9. Reação de dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ catalisada pela SOD (Equação 8) e reação de redução do H_2O_2 catalisada pela CAT (Equação 9).¹

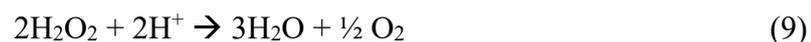


Figura 3. Esquema das reações catalisadas pelas metaloenzimas SOD e CAT e a relação entre as duas.¹⁹

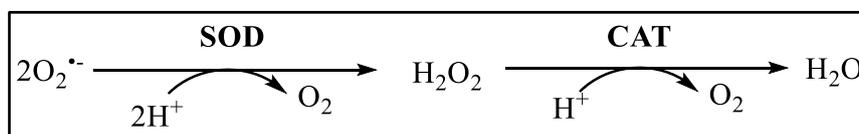
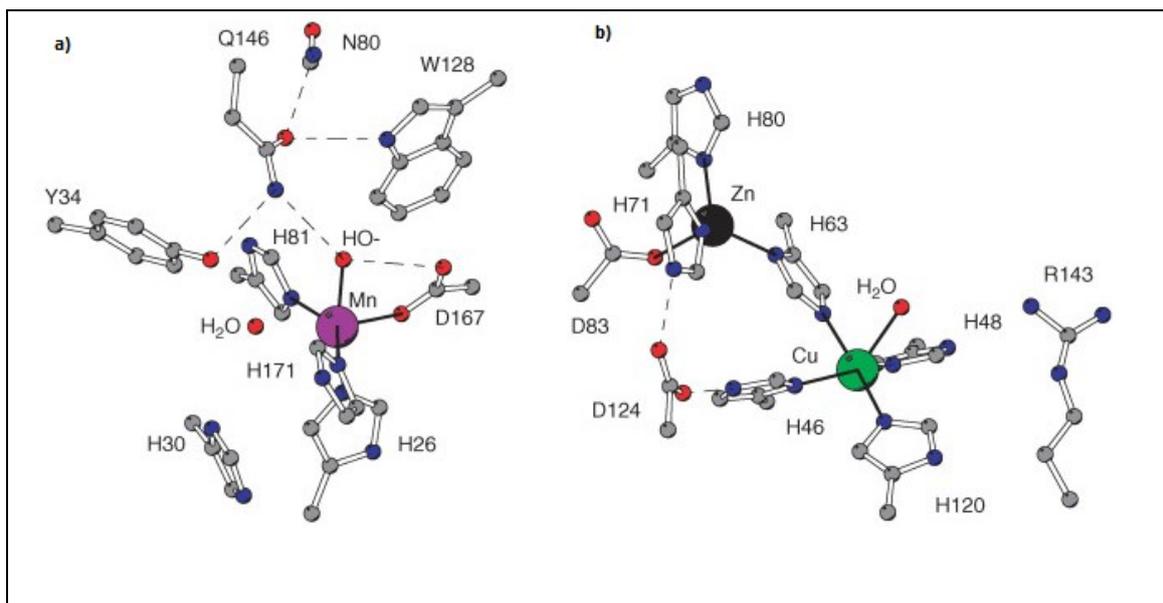


Figura 4. Representação dos sítios ativos da: a) MnSOD e b) Cu-ZnSOD.³⁰



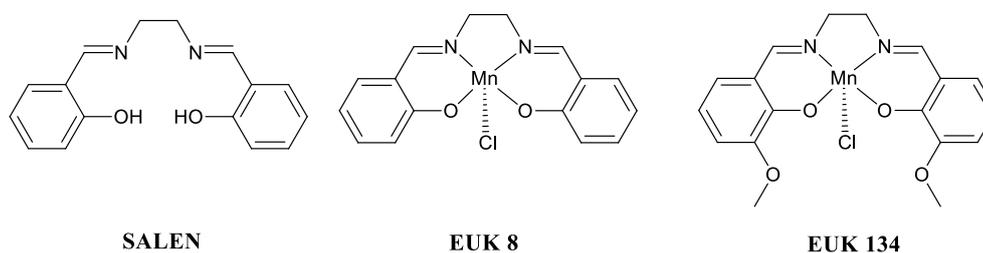
No entanto, quando há uma condição de estresse oxidativo, tanto por deficiência de espécies antioxidantes (metaloenzimas como CAT e SOD), quanto por excesso de EROs, os mecanismos naturais de defesa do corpo não são o suficiente para reverter a situação.³¹ Apesar disso, a utilização de enzimas como SOD e CAT como agentes terapêuticos, não é viável devido à diversos fatores, seu tamanho elevado, densidade de carga e rápida depuração renal, além do alto custo envolvido na síntese dessas enzimas.³²

Uma alternativa ao uso de metaloenzimas antioxidantes para diminuir o nível das EROs é o *design* e desenvolvimento de compostos de baixo peso molecular, os quais podem mimetizar as atividades das enzimas citadas. Alguns compostos biomiméticos com capacidade para degradar EROs durante o estresse oxidativo já têm sido relatados, incluindo sistemas que utilizam os ligantes SALEN (bis(salicideno)etan-1,2-diamina), porfirinas ou macrociclos não aromáticos para coordenarem-se aos centros metálicos.³³ O grande interesse no desenvolvimento e estudo da atividade antioxidante de compostos biomiméticos a metaloenzimas é motivado pela necessidade de novos medicamentos para o tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, Diabetes, Câncer, Aterosclerose, entre outras.^{4, 24, 28}

2.3 COMPOSTOS DA CLASSE EUK

Na área da química de coordenação, destacam-se os compostos da classe EUK. Os EUKs são compostos derivados de ligantes tipo SALEN com centro metálico de Mn^{III} (Figura 5). Estes compostos são conhecidos por apresentarem atividade catalítica mimética a metaloenzimas como CAT e SOD.⁸⁻¹⁰ O composto EUK-8 foi sintetizado e utilizado como referência nos estudos realizados neste trabalho.

Figura 5. Representação da estrutura molecular do ligante SALEN e seus respectivos compostos de coordenação contendo centro metálico de Mn^{III} , registrados sob a patente EUK-8 e EUK-134.¹¹



Os compostos da classe EUK, atuam como miméticos à SOD, através da redução do seu centro de Mn^{III} para Mn^{II} , oxidando o $O_2^{\cdot-}$ a O_2 , o Mn^{II} é imediatamente oxidado à Mn^{III} por outra molécula de ânion radical superóxido, gerando H_2O_2 (Equações 10 e 11). Já o mecanismo de reação desses compostos frente ao H_2O_2 , envolve a oxidação do centro de Mn^{III} à um complexo de oxomanganês-SALEN (oxoMn-SALEN), liberando água, seguido de uma redução desse composto formado, promovida por outra molécula de H_2O_2 , regenerando o composto inicial e liberando H_2O e O_2 (Equações 12 e 13).⁸

Equações 10, 11, 12, 13. Reações representando o mecanismo de ação dos compostos de Mn^{III} EUK-8 e EUK-134 frente as EROS $O_2^{\cdot-}$ (10 e 11) e H_2O_2 (12 e 13).⁸



2.4 ESTUDO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE DIVERSOS COMPOSTOS POR MÉTODOS COLORIMÉTRICOS E ESPECTROSCÓPICOS

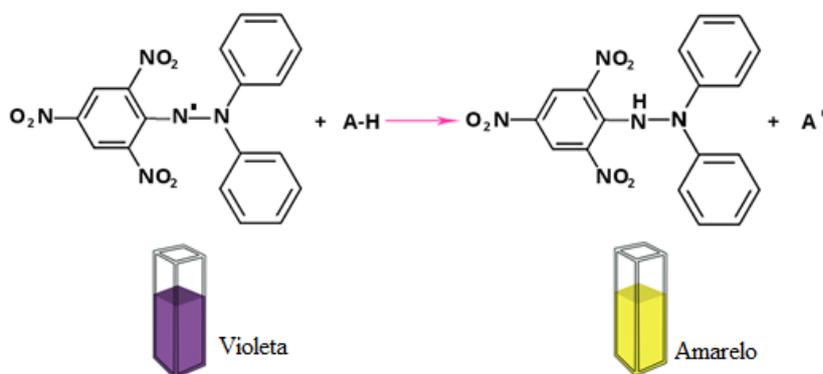
O estudo da ação antioxidante de compostos de coordenação pode ser realizado por acompanhamento espectral, na região do ultra-violeta visível,³⁴ via EPR

(Ressonância Paramagnética Eletrônica)³⁵ e também via técnicas eletroquímicas (como voltametria cíclica).³⁶

Um dos estudos mais simples e difundidos é o método colorimétrico que utiliza o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH; Figura 6). Devido à sua estabilidade em solução e coloração violeta, este é passível de determinação por espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-vis),³⁷ como também por Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), por se tratar de uma espécie paramagnética radicalar.³⁸

O DPPH é um radical livre estável amplamente utilizado para avaliar atividade antioxidante de doadores de hidrogênio ou sequestrantes de radicais livres. Na reação de sequestro de radicais o composto doa hidrogênio ou elétrons para o radical DPPH[•] transformando-o em uma molécula diamagnética, desse modo, o potencial antioxidante é dependente da capacidade do composto de doar hidrogênio ou elétrons.³⁹

Figura 6. Equação química de redução do radical DPPH[•] (à esquerda). Um antioxidante (representado por A-H) captura o elétron desemparelhado reduzindo o DPPH[•] (violeta) para DPPH-H (amarelo). A mudança de coloração permite o estudo via espectroscopia eletrônica. A formação de uma espécie diamagnética permite o estudo via EPR.³⁹



A técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) é uma das mais importantes no estudo de espécies paramagnéticas, incluindo radicais orgânicos e inorgânicos. O princípio da técnica é similar ao princípio da ressonância magnética nuclear (RMN), ambas as técnicas utilizam a aplicação de um campo magnético externo. Enquanto no RMN o campo magnético interage com o núcleo do átomo, no EPR, o campo magnético interage com um spin eletrônico desemparelhado na molécula.⁴⁰ A maioria dos metais de transição, assim como os radicais livres, possuem elétrons desemparelhados, o que possibilita sua detecção por EPR.⁴¹ A quantidade de

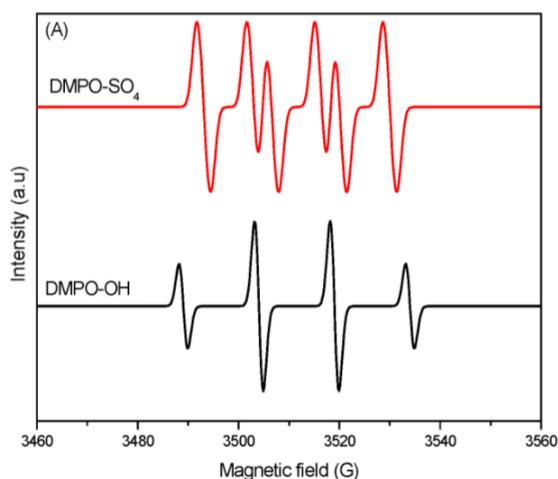
linhas espectrais é dada pela Equação 14, onde n é a quantidade de núcleos da espécie paramagnética estudada e I é o spin nuclear tabelado para essa espécie.⁴²

Equação 14. Determinação do número de linhas no espectro de EPR para cada espécie paramagnética.⁴²

$$2nI + 1 \quad (14)$$

Como os radicais livres em geral são instáveis, possuem curto tempo de meia vida e existem em baixas concentrações em meios biológicos, sua detecção por EPR pode ser dificultada, desse modo, frequentemente são utilizados os “spin-traps”, técnica que converte esses radicais em espécies mais estáveis e detectáveis.⁴³ Essa técnica torna possível a quantificação e detecção de radicais livres envolvidos em processos biológicos, incluindo o $\cdot\text{OH}$, que possui tempo de meia vida de aproximadamente 10^{-9} s (Figura 7), e o $\text{O}_2^{\cdot-}$, que possui tempo de meia vida na faixa de 10^{-6} s. Este composto é adicionado ao sistema sob investigação com o objetivo de sequestrar (trap) intermediários reativos, formando espécies paramagnéticas mais estáveis e que são denominadas de adutos radicalares, os quais poderão ser analisadas por EPR. Os “spin-traps” mais empregados são compostos orgânicos, abreviados como DEPMPO (5-(Dietoxifosforil)-5-metil-1-pirrolina-N-óxido), BMPO (5-terc-(butoxicarbonil)-5-metil-1-pirrolina-N-óxido) e DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido).⁴¹

Figura 7. Espectros de EPR dos adutos radicalares DMPO-SO₄ e DMPO-OH respectivamente. Figura adaptada da referência 44.⁴⁴



Em 2019, Deng e colaboradores relataram compostos de coordenação de Gálio (Ga^{III}) derivados do flavonoide natural Kaempferol (Kae). A coordenação a este

composto foi realizada para melhorar sua solubilidade em água e suas propriedades antioxidantes. A avaliação da atividade antioxidante desses compostos foi realizada utilizando o DPPH para determinar a capacidade dos mesmos de sequestrar espécies radicalares.³⁹

O grupo preparou uma placa de 96 poços com 100 µL por poço de uma solução controle de DPPH• com concentração fixa de 5×10^{-5} mM. Em seguida, diferentes concentrações (5, 15, 30, 45, 60 e 75 µM) dos complexos de Ga^{III} foram adicionados ao DPPH•. O ácido ascórbico cuja a atividade antioxidante já é bem estabelecida na literatura, foi usado como controle positivo. A placa foi mantida por 40 min no escuro e à temperatura ambiente antes da leitura em comprimento de onda igual a 517 nm. O cálculo de porcentagem da atividade de redução do radical DPPH• (RSA%, do inglês *Radical Scavenging Activity*) foi realizado conforme a Equação 15, onde A é a absorvância do DPPH• na presença dos complexos de Ga^{III} e A_{DPPH} é a absorvância da solução controle de DPPH•.

Equação 15. Equação para determinar a porcentagem da capacidade de redução (RSA%) dos compostos de Ga^{III} frente ao DPPH•.³⁹

$$RSA\% = \left[\frac{(A_{DPPH} - A)}{A_{DPPH}} \right] \times 100\% \quad (15)$$

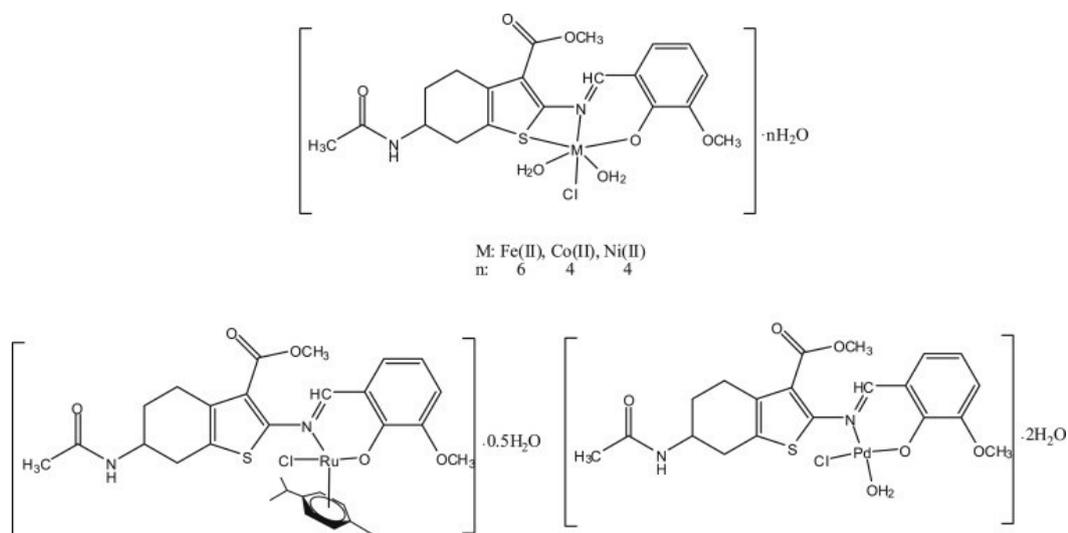
Os autores observaram que a atividade antioxidante dos complexos de Ga^{III} frente ao DPPH• aumentou significativamente para todos os compostos com aumento da concentração, na faixa de 0 a 75 µM ($p < 0,05$). A maior atividade foi de 82% para o composto Kae-SO₃-Ga, na concentração de 75 µM (foi obtido valor de RSA de 88% para o ácido ascórbico, na mesma concentração). Adicionalmente, a coordenação com o íon Ga^{III} aumentou a capacidade antioxidante desses compostos frente ao radical DPPH• em comparação com os flavonoides Kae e Kae-SO₃. Esse aumento foi atribuído à maior solubilidade em água do composto de coordenação e sua capacidade de doar elétrons, além do mecanismo de transferência de hidrogênio do ligante Kae.³⁹

A transferência de hidrogênio (HT), do inglês *hydrogen transfer*, é uma reação onde um hidrogênio, na forma de íon hidreto, próton ou radical é transferido de uma (na referência diz que não precisa ser só um radical, pode ser um hidrogênio nessas formas, e como nossos compostos são doadores de prótons em alguns momentos, deixei assim, acho que fica melhor) molécula doadora de hidrogênio para uma molécula aceptora,

sendo que o mecanismo dessa transferência dependerá do catalisador, do substrato e das condições reacionais.^{39, 45}

Compostos de coordenação com centros metálicos que apresentam química redox já tiveram sua atividade antioxidante testada frente ao radical DPPH[•]. Bingöl e Turan relataram estudos relativos a compostos de coordenação de Fe^{II}, Co^{II}, Ni^{II}, Ru^{II} e Pd^{II} com um novo ligante do tipo base de Schiff (Figura 8), os quais tiveram suas atividades antioxidantes estudada através do método de DPPH. Os autores prepararam soluções etanólicas nas concentrações 25, 50 e 100 µg mL⁻¹, para cada composto, em seguida adicionaram 1 mL de uma solução de DPPH com concentração de 1 mM. As soluções foram mantidas no escuro por 30 min e então foi realizada leitura em 517 nm, empregando-se espectroscopia eletrônica. Uma solução de 3 mL de etanol e 1 mL de DPPH (1 mM) foi utilizada como controle. Os autores observaram que a capacidade sequestrante de espécies radiculares dos compostos estudados diminui com o aumento da concentração dos mesmos, não sendo linear. O composto que apresentou melhor atividade foi o de Ru^{II}, seguido pelos compostos de Pd^{II} e Fe^{II} respectivamente. O ligante sozinho, assim como os compostos de Co^{II} e Ni^{II}, apresentaram % de *radical scavenging* negativa, atuando como oxidantes.⁴⁶

Figura 8. Representação genérica dos compostos de coordenação de Fe^{II}, Co^{II} e Ni^{II} e dos compostos de Ru^{II} e Pd^{II} sintetizados por Bingöl e Turan.⁴⁶

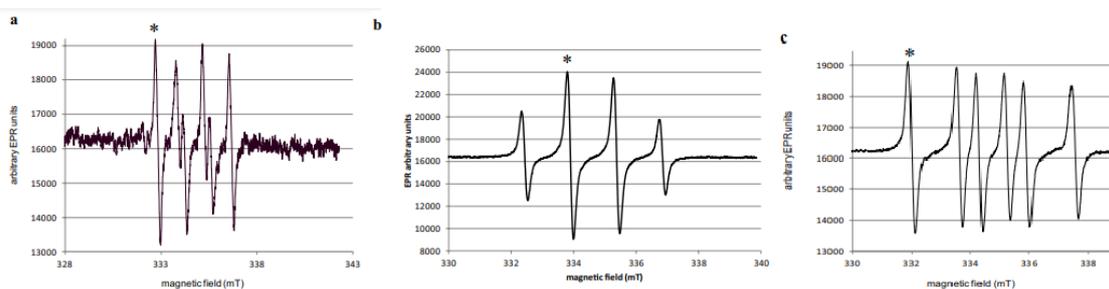


Outra técnica muito utilizada para avaliação de atividade antioxidante é a EPR, principalmente quando a espécie oxidante é radicalar ou possui elétrons desemparelhados.⁴⁷ Scalzo estudou a capacidade de “*radical scavenging*” por EPR de antioxidantes hidrofílicos comuns (ácido ascórbico (AsA), ácido clorogênico (CGA) e

cisteína (Cys)), utilizando as espécies radiculares $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ e terc-butil hidroperóxido (t-BuOO \cdot) como oxidantes e DMPO como “*spin-trap*”. A atividade de *scavenging* (RSA%) de cada composto testado foi expressa em porcentagem de acordo com a Equação 15. Onde A_{DPPH} e A são a altura dos sinais de EPR (pico a pico) no espectro da solução sem o composto antioxidante (A_{DPPH}) e com o composto antioxidante (A) respectivamente.

O ânion radical $O_2^{\cdot-}$ foi gerado a partir de uma solução de superóxido de potássio (KO $_2$) em DMSO, o radical $\cdot OH$ foi gerado através de reação de Fenton (Equação 3, página 4) e o ROO \cdot foi gerado a partir de uma reação de redução do t-BuOOH por um quelato de Fe^{II} com NaEDTA. Para os três radicais utilizou-se o “*spin trap*” DMPO e o aduto formado (DMPO-OOH \cdot , DMPO-OH \cdot e DMPO-OOR \cdot respectivamente) foi registrado após 1 min de reação à 25°C (Figura 9).⁴³

Figura 9. Espectros de EPR dos adutos DMPO-OOH \cdot (a), DMPO-OH \cdot (b) e DMPO-OOR \cdot (c) em tampão fosfato (PBS), respectivamente.⁴³



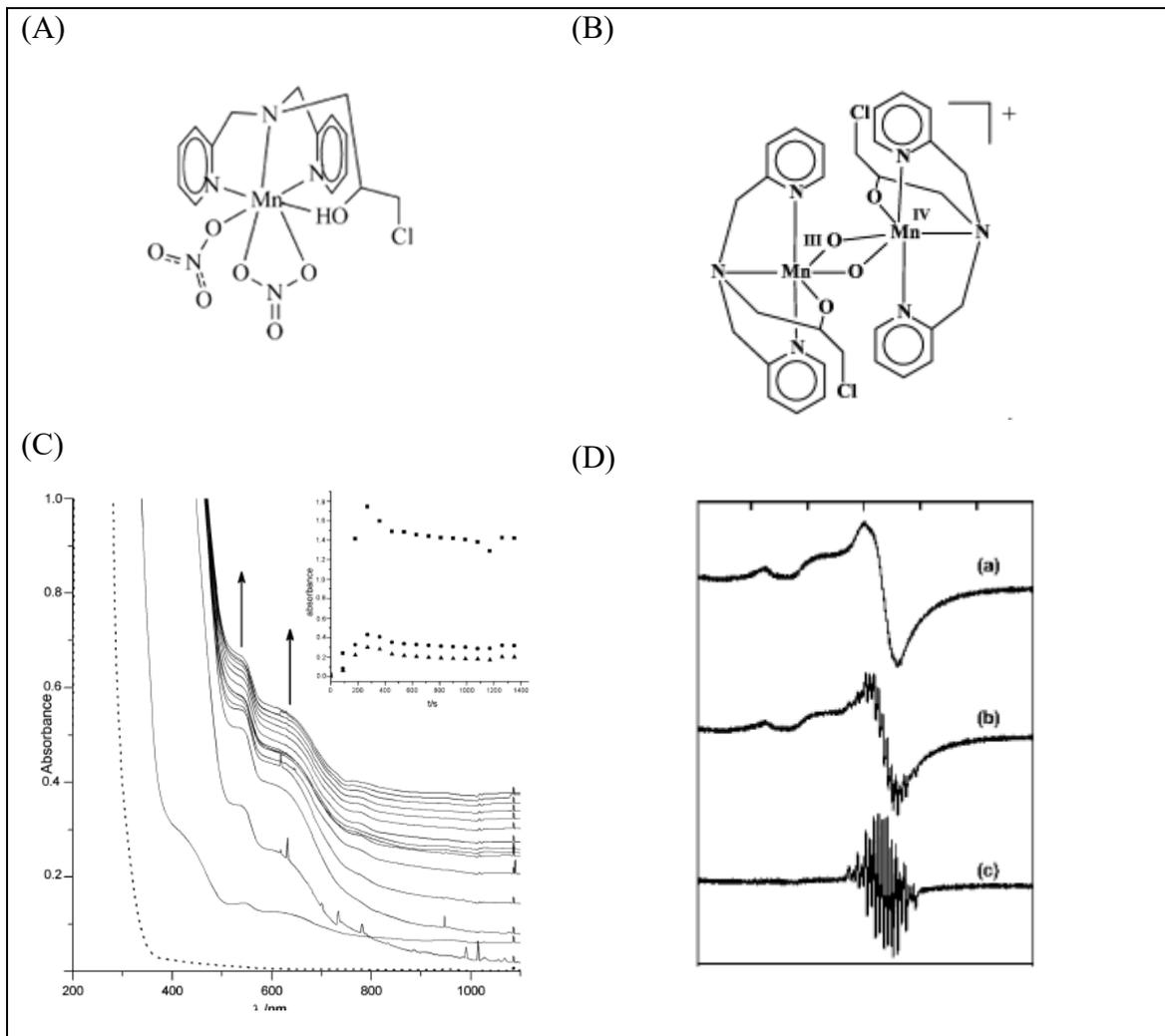
Os autores relataram que a capacidade de sequestro de espécies radiculares dos antioxidantes estudados frente ao ânion radical $O_2^{\cdot-}$ seguiu a ordem CGA>AsA>Cys. Um comportamento semelhante foi obtido para a espécie radicalar ROO \cdot , porém, nesse caso, a cisteína (CYS) apresentou atividade pró-oxidante, com aumento da intensidade do sinal DMPO-OOR \cdot no espectro de EPR, diferentemente de quando foi realizada a interação com o $O_2^{\cdot-}$, onde ela apresentou capacidade antioxidante baixa. Com relação ao radical $\cdot OH$, foi observado um resultado completamente diferente, com ordem de capacidade antioxidante Cys>CGA>AsA e menores valores de poder anti radicalar (ARP) quando comparado aos outros radicais em estudo, com necessidade de maior concentração de espécies antioxidantes.⁴³

2.5 ESTUDOS PRÉVIOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE Cu^{II}, Fe^{III} E Mn^{II}Mn^{III}

Nosso grupo de pesquisa vem utilizando técnicas como espectroscopia eletrônica, EPR e espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS), para avaliar a atividade SOD e CAT de compostos de coordenação de Cu^{II}, Fe^{III} e Mn^{II}.^{13-16,48}

Em 2009, as atividades de catalase e de peroxidase de um composto de Mn^{II} contendo o ligante 1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol (HPCINOL) (Figura 10) foram relatadas pelo grupo de pesquisa.⁴⁸ O estudo da atividade desse composto foi realizado através da utilização de técnicas como espectroscopia eletrônica e EPR, além de técnicas adicionais para elucidação do mecanismo, e estudos cinéticos. Através do monitoramento do progresso da reação entre o composto de Mn^{II} e o H₂O₂ por espectroscopia eletrônica, foi possível observar o aparecimento de novas bandas de absorção em 410, 539 e 620 nm. Essas bandas foram atribuídas à transferência de carga LMCT oxo → Mn^{IV} (410 nm) e transições d-d do Mn^{IV} (539 e 620 nm) (Figura 10). A interação entre este composto e o H₂O₂ também foi estudada via EPR, sendo observado o aparecimento de 16 linhas características de espécies de Mn^{III}Mn^{IV}, que desaparecem com o tempo, com o retorno do espectro para as linhas características do composto original. O composto de Mn^{III}Mn^{IV} formado pela reação foi identificado através de espectrometria de massas com ionização por *electrospray* ESI(+)-MS, mostrando a formação de um composto binuclear de alta valência [Mn(III)-(μ-O)₂-Mn(IV)] (Figura 10), corroborando os resultados obtidos por espectroscopia eletrônica e via EPR.⁴⁸

Figura 10. Estrutura molecular do composto de Mn^{II} com o ligante HPCINOL (A), do intermediário formado (B), espectro eletrônico da interação entre o composto de Mn^{II} com H_2O_2 (C) e espectro de EPR do composto sozinho (a) e interação com o H_2O_2 (b) e (c) (D).⁴⁵

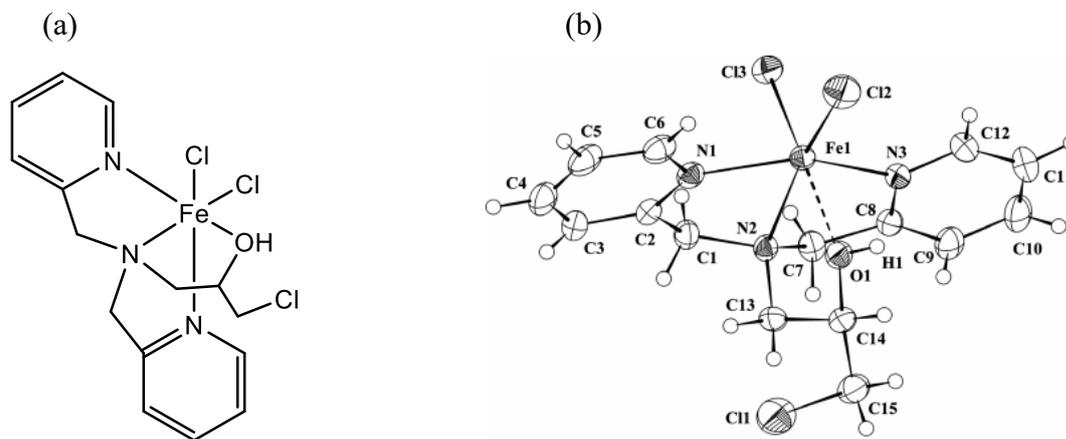


Em 2010, um composto mononuclear de Fe^{III} contendo o ligante HPCINOL (Figura 11) foi sintetizado e suas atividades mimética à CAT e à SOD foram estudadas *in vitro*.¹³ Os estudos foram realizados utilizando voltametria cíclica (VC) e método colorimétrico para avaliação da redução do nitroazul de tetrazólio (NBT), promovida pelo ânion radical $O_2^{\cdot-}$, gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase. Foi observado, por VC, que o composto produz O_2 na presença de H_2O_2 além de impedir a redução do NBT.

Adicionalmente, realizou-se um estudo utilizando modelo de células eucarióticas *Saccharomyces cerevisiae* (selvagens e mutantes deficientes em SOD e CAT), avaliando a sobrevivência dessas células após serem expostas a estresse oxidativo, sendo ou não tratadas com o composto em estudo. Nos dois casos, as células tratadas

com o composto apresentaram alto índice de sobrevivência (52 e 97% para células selvagens e deficientes em SOD respectivamente) com relação às não tratadas (7 e 11%).¹³

Figura 11. Estrutura do composto de coordenação de Fe^{III} com o ligante HPCINOL (a) e estrutura de raios-X obtida para este composto (b).¹³



Em 2015, resultados da atividade antioxidante de três compostos de Cu^{II}, Fe^{III} e Mn^{II} com o ligante HPCINOL (Figura 12) foram publicados no periódico *Free Radical Biology and Medicine*.¹⁴ Os compostos protegeram as células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* contra o estresse oxidativo induzido por H₂O₂ e O₂^{•-}. O composto com melhor atividade protetora foi o composto de Fe^{III}, seguido pelo composto de Cu^{II} e Mn^{II} respectivamente. Esses compostos protegem a membrana lipídica, sem induzir fatores de transcrição relacionados com a síntese de fatores de proteção como proteínas antioxidantes, o que indica que os compostos agem como miméticos com atividade dual de CAT e SOD, removendo excesso de EROs como o O₂^{•-} e H₂O₂. Na Figura 13 estão representados os efeitos dos compostos de coordenação estudados na sobrevivência das células de *Saccharomyces cerevisiae* expostas a estresse oxidativo.¹

Figura 12. Estrutura dos compostos de Cu^{II} , Fe^{III} e Mn^{II} reportadas por Ribeiro e colaboradores.¹⁴

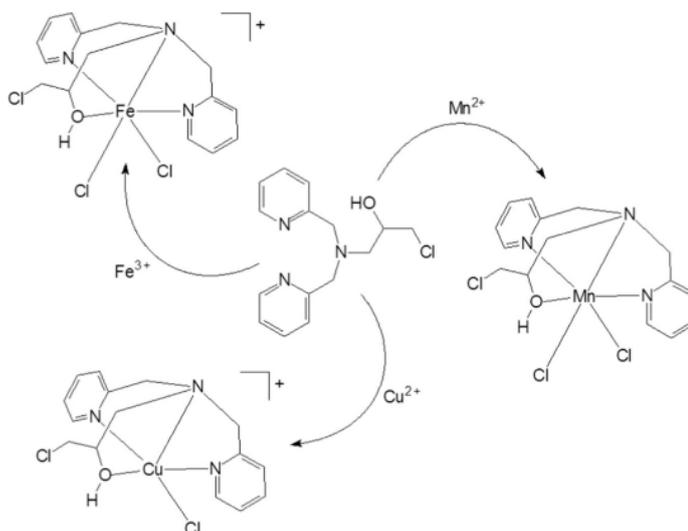
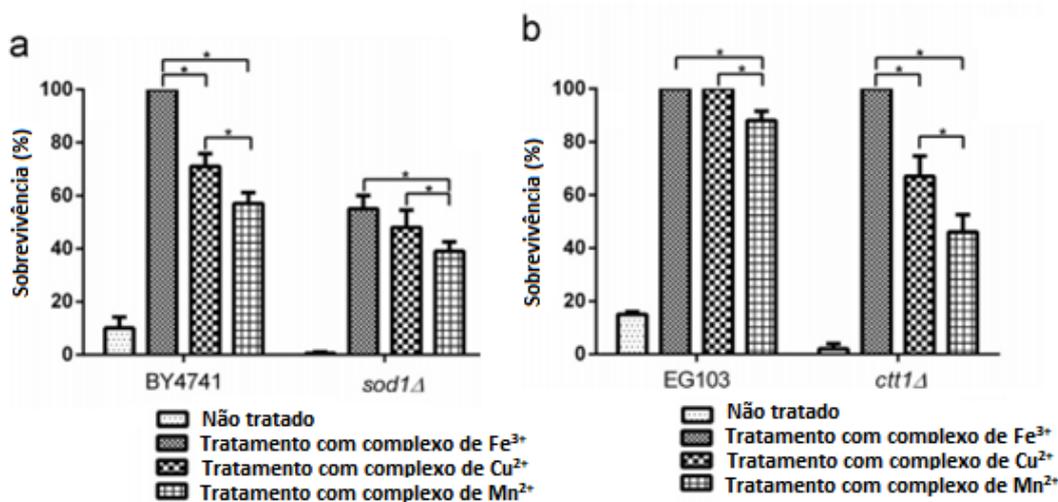


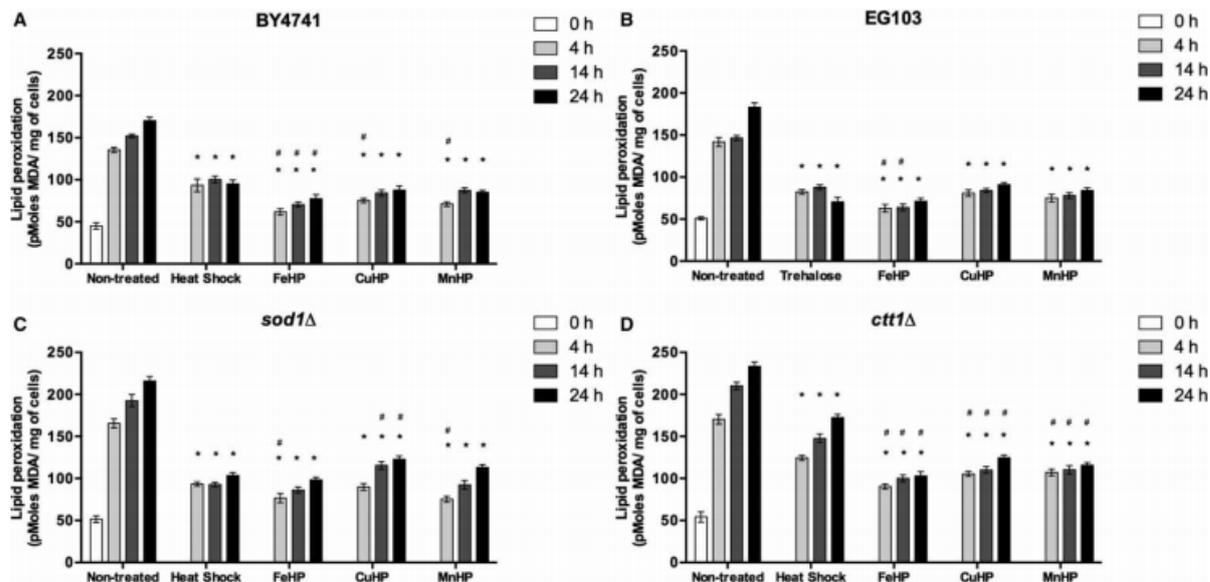
Figura 13. Gráficos mostrando os efeitos dos compostos de coordenação estudados na sobrevivência das células de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes deficientes em SOD e CAT (a e b respectivamente) expostas ao estresse oxidativo. Figura adaptada da referência 14.



Em 2017, os mesmos compostos de coordenação foram estudados, novamente utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae*, dessa vez, avaliou-se o efeito protetor desses compostos contra oxidação de lipídios e proteínas em células que passaram por um processo de envelhecimento.¹⁵ Foi feita a avaliação da viabilidade celular e de marcadores de estresse oxidativo como peroxidação lipídica e oxidação de proteínas, antes e depois do processo de envelhecimento das células selvagens e mutantes, com e

sem tratamento com os compostos de coordenação. Os resultados obtidos para os níveis de peroxidação lipídica nas células tratadas e não tratadas estão expostos na Figura 14.

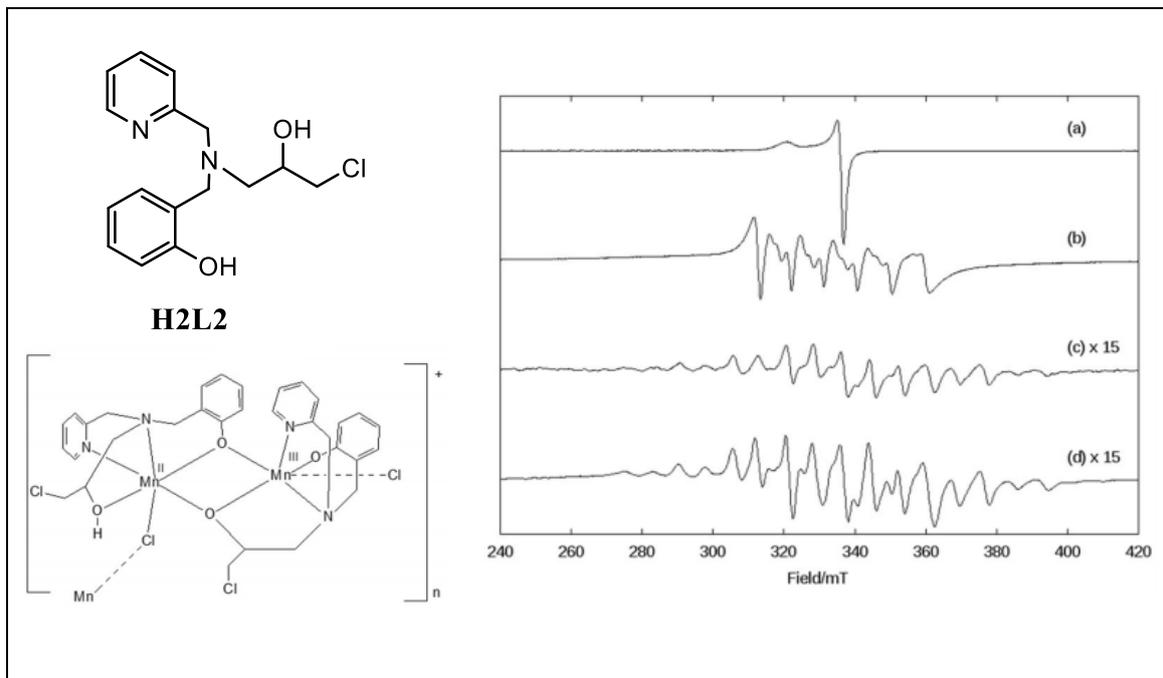
Figura 14. Efeito dos compostos miméticos à CAT e à SOD na peroxidação lipídica de células que passaram por um processo de envelhecimento. Choque térmico foi utilizado como controle positivo.¹⁵



Os autores observaram que os compostos aumentam a vida útil das células *S. cerevisiae*, o que está diretamente relacionado com a proteção da membrana lipídica e proteínas. Os resultados indicam que esses compostos mimetizam agentes antienvhecimento através da remoção do excesso de EROs geradas pelo processo de envelhecimento, diminuindo os efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo.¹⁵

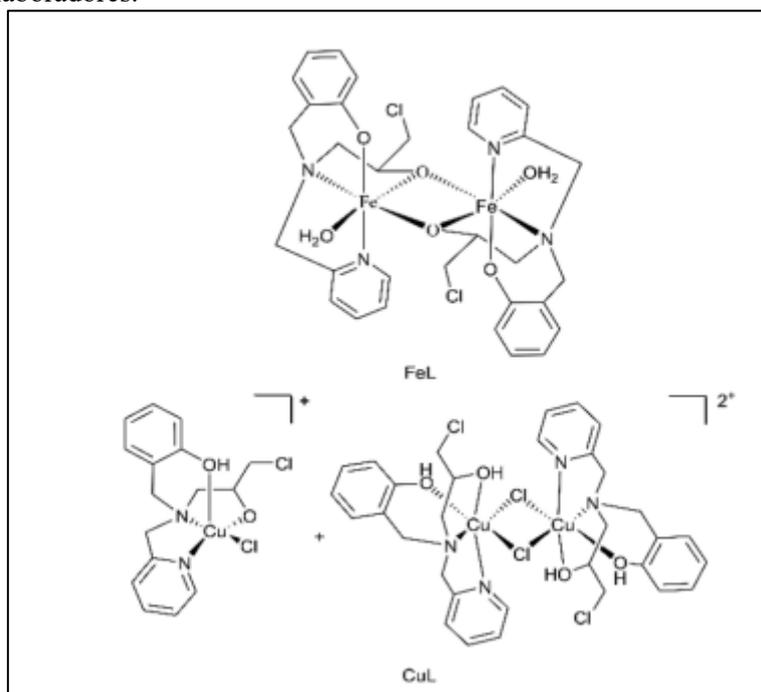
Em 2018, um novo composto binuclear de valência mista $Mn^{II}Mn^{III}$, com o ligante *N*-(2-hidroxibenzil)-*N*-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)-propano (**H₂L2**) foi sintetizado e suas atividades miméticas à CAT e à SOD foram investigadas através da técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR). Através dessa técnica foi evidenciado um espectro contendo 16 linhas, após interação do composto de valência mista com o ânion radical superóxido, sendo proposto que este composto decompõe o $O_2^{\cdot-}$ através da formação de um intermediário de alta valência $Mn^{III}-(\mu-O)-Mn^{IV}$ (Figura 15). Quanto à atividade de CAT, o composto é ativo na presença de uma base como a piperazina, apresentando atividade mimética dual à ambas as metaloenzimas: CAT e SOD.¹⁶

Figura 15. Estrutura molecular do ligante **H2L2** e do composto binuclear de valência mista $Mn^{II}Mn^{III}$ e espectros de EPR para o ânion radical $O_2^{\cdot-}$ (a), para o composto (b), interação do composto com o $O_2^{\cdot-}$ (c) e após 1 h de interação do composto com o $O_2^{\cdot-}$ (d).¹⁶



Em 2020, compostos de Cu^{II} e Fe^{III} contendo o ligante **H2L2** (Figura 16), tiveram sua atividade antioxidante e antimetastática estudada frente a células de neuroglioma humano.⁴⁹

Figura 16. Estrutura molecular dos compostos de Fe e Cu com o ligante H2L2 estudados por Guerreiro e colaboradores.⁴⁹



O estudo mostrou que ambos compostos apresentam atividade mimética à CAT e à SOD, diminuindo os níveis de EROs nas células de neuroglioma H4. O composto de Cu^{II} apresentou melhor atividade SOD, sendo que cada molécula de composto reagiu com 35 unidades de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (40 min de reação), indicando reação catalítica. Já o composto de Fe^{III} apresentou reação estequiométrica com o $\text{O}_2^{\cdot-}$, indicando uma reação não catalítica. Os valores de IC_{50} e dados cinéticos obtidos no estudo da atividade antioxidante dos compostos frente às células H4 encontram-se na Tabela 1. Adicionalmente, os compostos inibiram a migração de células H4, diminuindo a expressão de marcadores de células epiteliais mesenquimais em modelos de camada única e 3D, sendo que o composto de Cu^{II} inibiu completamente a habilidade de invasão das células de glioma.⁴⁹

Tabela 1. Dados cinéticos e de IC_{50} da atividade antioxidante dos compostos de Cu^{II} e Fe^{III} com o ligante **H2L2** estudados por Guerreiro e colaboradores.⁴⁹

Composto	Atividade SOD		Atividade CAT		
	IC_{50} (μM)	K_{cat} ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	K_{cat} ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	K_{M} (mM)	$K_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
FeL	8,946±0,345	1,42x10 ⁵	0,08±0,003	23,2±1,2	3,45±0,04
CuL	0,181±0,016	7,07x10 ⁶	0,360±0,125	41,9±15,7	8,25±0,06

Compostos de Cu^{II} , Fe^{III} e $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Mn}^{\text{III}}$ com o ligante **H2L2** também tiveram sua atividade antioxidante estudada frente a cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e a larvas de *Galleria mellonella*. Neste estudo foi constatado que os compostos protegeram as células de *S. cerevisiae* do estresse oxidativo causado por H_2O_2 e menadiona, além de aumentar sua longevidade quando estas são submetidas ao envelhecimento cronológico. Suplementarmente, as larvas de *Galleria mellonella* tratadas com os compostos apresentaram maior sobrevivência ao estresse oxidativo causado por H_2O_2 quando comparadas às não tratadas. Esses compostos agem reduzindo a peroxidação lipídica nas células, sem induzir a ativação da CAT e da SOD.⁵⁰

De acordo com o exposto, nota-se a necessidade de ampliar os estudos da atividade antioxidante de compostos de coordenação, conduzindo-os de forma sistemática e visando aplicações futuras, na área de metalofármacos antioxidantes. Desta forma, o presente trabalho visa a obtenção de compostos de coordenação de Cu^{II} , Fe^{III} e $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Mn}^{\text{III}}$, contendo os ligantes **HL1** e **H2L2**, a avaliação das suas atividades antioxidantes, empregando-se métodos espectrofotométricos e via EPR. Tem-se como

objetivo a correlação das atividades antioxidantes com o estado de oxidação do metal, natureza do centro metálico, estrutura do ligante; proposição de prováveis mecanismos de ação visando aplicações futuras: estudos *in vitro* e *in vivo* empregando-se matrizes biológicas (mitocôndrias, tecido neural), levedura *S. cerevisiae* e invertebrado *Galleria mellonella*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade antioxidante de compostos de coordenação de Cu^{II} , Fe^{III} e $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Mn}^{\text{III}}$ frente a diferentes espécies reativas e radicalares, empregando-se técnicas espectroscópicas e via EPR.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Sintetizar e caracterizar os ligantes **HL1**, **H₂L2** e **SALEN**;
- Sintetizar e caracterizar seis compostos de coordenação de Cu^{II} , Fe^{III} e $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Mn}^{\text{III}}$, com os ligante **HL1** e **H₂L2**, bem como o composto de referência **[Mn(SALEN)Cl]**;
- Avaliar a atividade antioxidante de seis compostos de Cu^{II} , Fe^{III} e $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Mn}^{\text{III}}$, bem como seus respectivos sais e ligantes (**HL1**, **H₂L2**), através da técnica de espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis, utilizando-se o método colorimétrico de determinação da porcentagem de *Radical Scavenging* (%RSA), frente ao radical DPPH;
- Avaliar a atividade antioxidante de seis compostos de Cu^{II} , Fe^{III} e $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Mn}^{\text{III}}$, frente ao H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ e $\cdot\text{OH}$ através da técnica de espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis;
- Avaliar a atividade antioxidante de seis compostos de Cu^{II} , Fe^{III} e $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Mn}^{\text{III}}$ frente ao H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ através da técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR);
- Avaliar a atividade antioxidante dos compostos mais promissores frente ao radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), através da técnica de EPR, com utilização de *spin trap* DMPO e determinar os valores de IC_{50} (concentração que inibe 50% do radical hidroxil);
- Comparar a atividade antioxidante dos compostos de coordenação em estudo com a apresentada pelo composto de referência **[Mn(SALEN)Cl]**.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As sínteses dos ligantes e dos seus respectivos compostos de coordenação foram realizadas utilizando-se reagentes de grau comercial.

Os ligantes **HL1** e **H₂L2** foram caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹H RMN) e espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), empregando-se a confecção de pastilhas de KBr para o **HL1** (composto sólido) e de filme sobre KBr para o **H₂L2** (composto obtido na forma de óleo). As caracterizações foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os dados obtidos para ambos os ligantes foram comparados com aqueles já relatados na literatura. O ligante de referência **SALEN**, teve sua estrutura confirmada através da técnica de espectroscopia na região do infravermelho, análise elementar e determinação do ponto de fusão.

Os compostos de coordenação de Cu^{II}, Fe^{III} e Mn^{II}Mn^{III}, obtidos com os ligantes **HL1** e **H₂L2**, já foram relatados na literatura ((**1**) – (**6**))^{16,50-53}, exceto o composto (**3**), bem como o composto [Mn(SALEN)Cl]. Todos os compostos de coordenação tiveram suas estruturas moleculares confirmadas através de técnicas espectroscópicas, eletroquímicas, sendo os dados de caracterização físico químicas obtidos comparados com aqueles relatados na literatura. As mesmas técnicas foram utilizadas para a caracterização do composto inédito de Mn^{II}Mn^{III} (**3**), empregando-se adicionalmente a técnica de difração de raios-X, já que foram obtidos monocristais para este composto. As técnicas empregadas na caracterização dos compostos de coordenação foram: Análise Elementar (CHN), realizada na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade de São Paulo (USP); Estudos Eletroquímicos, realizados no Laboratório de Equilíbrio Químico (LABEQ) da UFSC, com colaboração do Prof. Bruno Szpoganicz, Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), realizada na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, pelo professor Adolfo Horn Junior e com auxílio do técnico Nilton César Pereira. Os estudos de difração de raios-X (DRX) para o composto inédito (**3**), foram realizados no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pela professora Roberta Cargnelutti.

5. PARTE EXPERIMENTAL

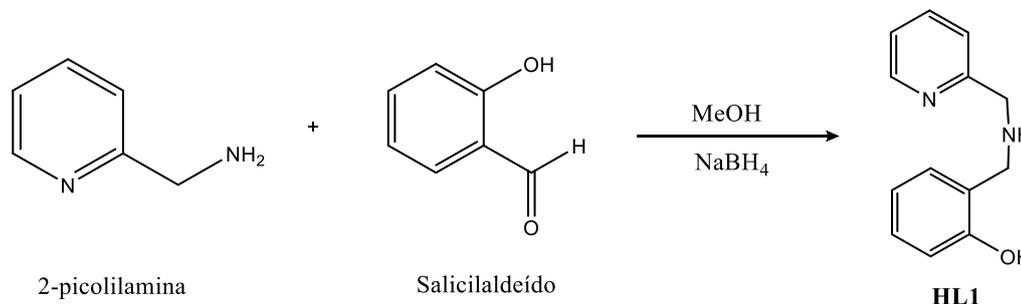
5.1. SÍNTESE DOS LIGANTES ORGÂNICOS **HL1**, **H₂L2** E **SALEN**

Foram sintetizados os ligantes orgânicos *N*-(2-hidroxibenzil)-*N*-(2-piridilmetil)amina (**HL1**), *N*-(2-hidroxibenzil)-*N*-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)propano (**H₂L2**) e o ligante utilizado para síntese do composto de referência *N,N'*-bis(salicideno)etan-1,2-diamina (**SALEN**), de acordo com rotas sintéticas já descritas na literatura.^{55, 56}

5.1.1 Síntese do ligante *N*-(2-hidroxibenzil)-*N*-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)amina(**HL1**)

O ligante **HL1** foi sintetizado através da reação entre 2-picolilamina e salicilaldeído, de acordo com a rota sintética descrita por Neves e colaboradores (1993) (Figura 17).⁵⁵ Este ligante foi obtido como um sólido branco cristalino, rendimento: 13 g (71%), p.f.: 63 °C.

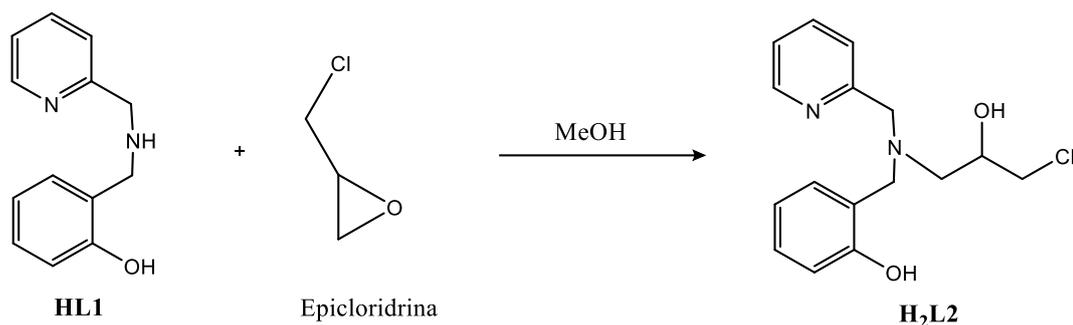
Figura 17. Esquema de síntese do ligante **HL1**.



5.1.2 Síntese do ligante *N*-(2-hidroxibenzil)-*N*-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)propano (**H₂L2**)

O ligante **H₂L2** foi sintetizado através da reação entre a amina secundária (**HL1**) e epiclorigrina, de acordo com a rota sintética previamente descrita por Horn e colaboradores (Figura 18).⁵⁴ Este ligante foi obtido como um óleo castanho. Rendimento: 4,8 g (82%).

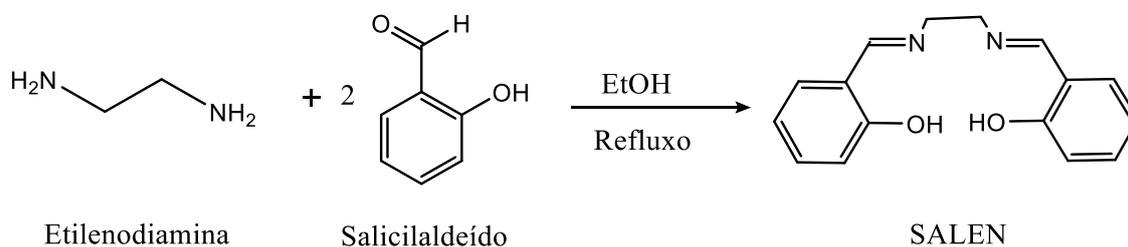
Figura 18. Esquema de síntese do ligante **H₂L2**.



5.1.3 Síntese do ligante *N,N'*-bis(salicideno)etan-1,2-diamina (SALEN)

O ligante utilizado para obtenção do composto de referência *N,N'*-bis(salicideno)etan-1,2-diamina (SALEN) foi sintetizado através de rota sintética já descrita na literatura.⁵⁶ Através da reação entre salicilaldeído e etilenodiamina (2:1) sob refluxo (Figura 19). Rendimento: 0,23 g (83%), p.f.:124 °C.

Figura 19. Esquema de síntese do ligante SALEN.



5.2. SÍNTESE DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE Cu^{II}, Fe^{III} E Mn^{II}Mn^{III} (1) – (6) E DO COMPOSTO DE REFERÊNCIA CONTENDO O LIGANTE SALEN

Foram sintetizados os compostos de coordenação [Cu(HL1)Cl₂] (1), [Fe₂(L1)₂Cl₂] (2), [Mn(L1)₂Cl₂]^{1/2} Cl^{1/2}•^{1/2}H₂O (3), [Cu(HL2)Cl]Cl•2H₂O (4), [Fe(HL2)Cl₂]•0,5H₂O (5) e [Mn₂(HL2)(L2)Cl₂]_nClO₄•3H₂O (6) a partir das reações de complexação entre os ligantes **HL1** e **H₂L2** e os sais CuCl₂•2H₂O, FeCl₃•6H₂O e MnCl₂•4H₂O, de acordo com rotas sintéticas já descritas na literatura.^{16,51-54} O composto inédito de Mn^{II}Mn^{III} (3), foi sintetizado de acordo com método descrito a seguir. O composto de coordenação utilizado como referência [Mn(SALEN)Cl], foi sintetizado através da reação do ligante

previamente obtido **SALEN** com o sal $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, de acordo com rota sintética já relatada na literatura.⁵⁶

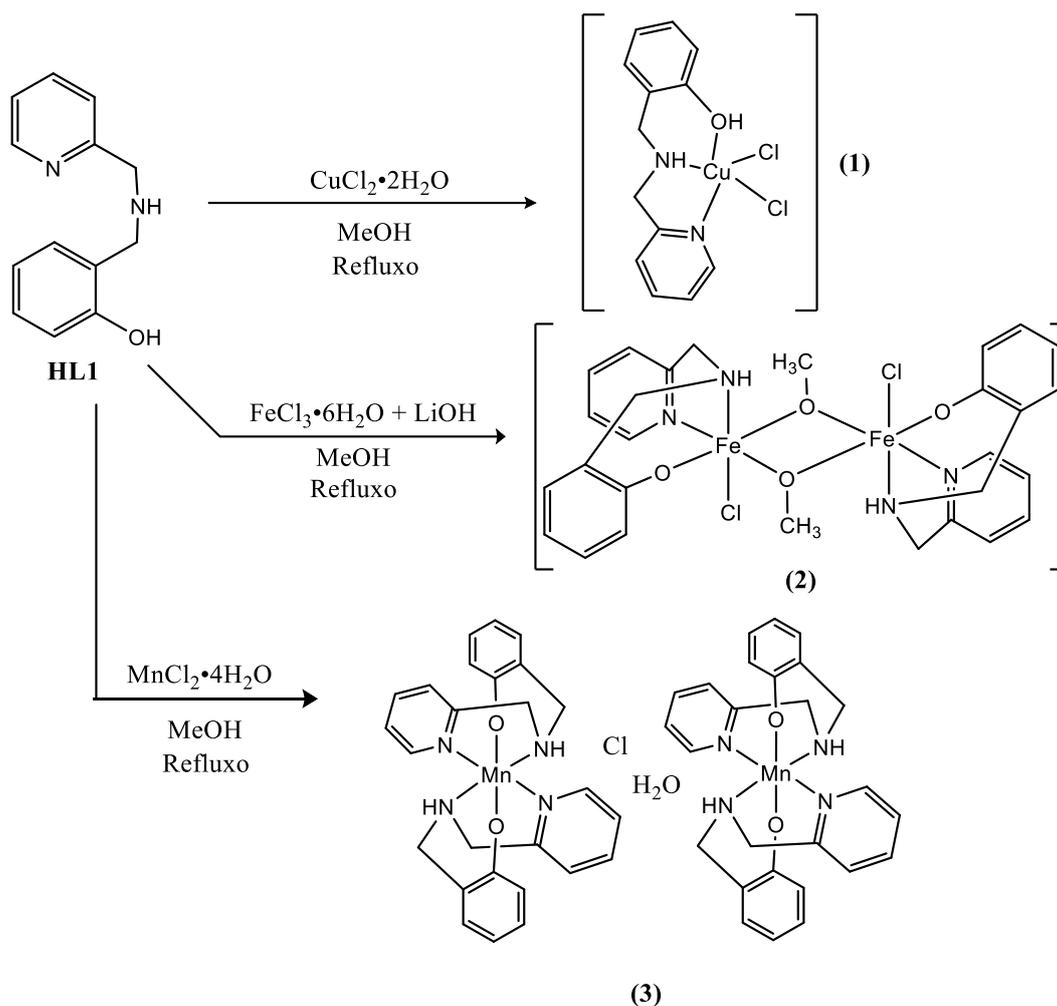
5.2.1 Síntese dos compostos de Cu^{II} , Fe^{III} e Mn^{III} com o ligante **HL1** (compostos 1 - 3)

O composto de Cu^{II} (**1**) foi sintetizado através da reação entre o ligante **HL1** e o sal $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, de acordo com procedimento relatado na literatura (Figura 20).⁵¹ Rendimento: 0,27 g (75%), ponto de decomposição,: 178 – 180°C.

O composto de Fe^{III} (**2**) foi sintetizado através da reação entre o ligante **HL1**, o sal $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e LiOH , de acordo com procedimento relatado na literatura (Figura 20).⁵² Rendimento: 0,11 g (30%), p.f.: 170°C.

O composto inédito de $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Mn}^{\text{III}}$ (**3**) foi sintetizado através da reação entre o ligante **HL1** e o sal $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Figura 20). 2 mmol do ligante (0,428 g) foram dissolvidos em 5 mL de metanol. Em seguida, 1 mmol de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,19 g) foi dissolvido em 10 mL de metanol. As duas soluções foram transferidas para um balão e o sistema permaneceu em refluxo por 3 h. Após 3 dias, cristais marrons escuros foram coletados. Rendimento: 0,22 g (40%), p.f.: 187°C.

Figura 20. Esquema de síntese para os compostos (1) – (3).



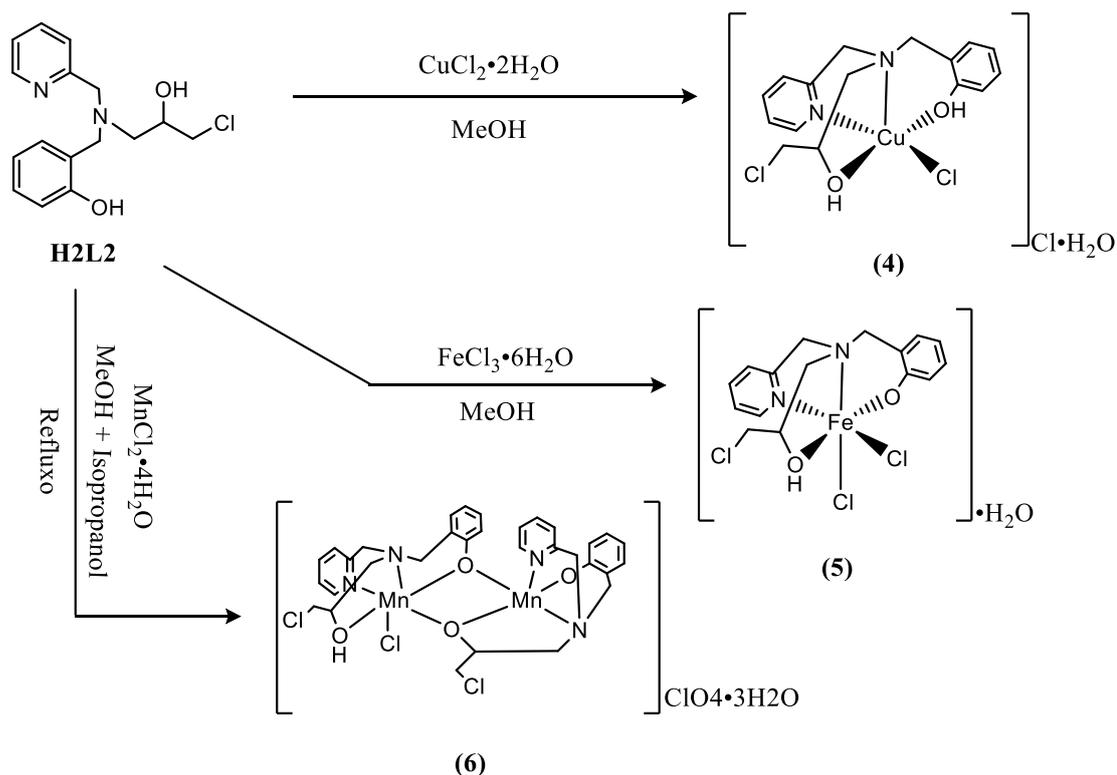
5.2.2 Síntese dos compostos de Cu^{II} , Fe^{III} e $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Mn}^{\text{III}}$ com o ligante H2L2 (compostos (4)-(6))

O composto de Cu^{II} (4), foi sintetizado através da reação entre o ligante H2L2 e o sal $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, de acordo com procedimento relatado na literatura (Figura 21).⁵³ Rendimento: 0,31 g (68%), p.f.: 160°C.

O composto de Fe^{III} (5), foi sintetizado através da reação entre o ligante H2L2 e o sal $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, de acordo com procedimento relatado na literatura (Figura 21).⁵⁴ Rendimento: 0,31 g (68%), p.f.: 225°C.

O composto binuclear de valência mista $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Mn}^{\text{III}}$ (6), foi sintetizado através da reação entre o ligante H2L2 e o sal $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, com adição de perclorato de lítio (LiClO_4), conforme rota proposta por Costa e colaboradores (Figura 21).¹⁶ Rendimento: 0,15 g (15%), p.f.: 220 °C.

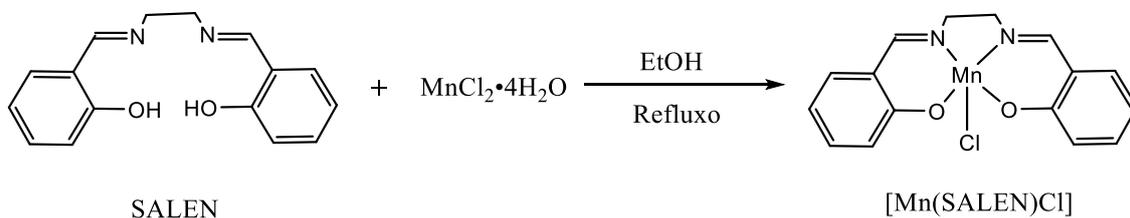
Figura 21. Esquema de síntese para os compostos (4) – (6).



5.2.3 Síntese do composto de referência $[\text{Mn}(\text{SALEN})\text{Cl}]$

O composto de coordenação utilizado como referência $[\text{Mn}(\text{SALEN})\text{Cl}]$, foi sintetizado através de uma reação entre o ligante previamente obtido SALEN e o sal $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em meio etanólico, sob refluxo (Figura 22).⁵⁶ Rendimento: 0,22 g (61%), ponto de decomposição.: 287 – 290°C.

Figura 22. Esquema de síntese do composto de referência $[\text{Mn}(\text{SALEN})\text{Cl}]$.



5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES HL1, H₂L2 E SALEN E DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO (1) – (6) E COMPOSTO DE REFERÊNCIA [Mn(SALEN)Cl]

5.3.1 Ponto de Fusão

Os compostos de coordenação obtidos, bem como o ligante cristalino SALEN tiveram seus pontos de fusão ou decomposição determinados através de um equipamento MQAPF 301 Micro Química.

5.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de Infravermelho para os ligantes e seus respectivos compostos de coordenação foram obtidos em espectrofotômetro ABB – Modelo FTLA 2000, janela espectral 4000 – 400 cm⁻¹. Os espectros foram obtidos em pastilhas de KBr, contendo 1% de composto e 99% de KBr para os ligantes sólidos (HL1 e SALEN) e para os compostos de coordenação ((1) – (6) e [Mn(SALEN)Cl]). O espectro do ligante oleoso (H₂L2) foi obtido em filme de KBr, com dissolução prévia do ligante em clorofórmio e leitura realizada após a evaporação do solvente.

5.3.3 Espectroscopia Eletrônica na região do Ultravioleta-Visível.

Os espectros eletrônicos para os compostos de coordenação (1) – (6) foram obtidos em espectrofotômetro Agilent, modelo Cary 60, no LABSELEN do departamento de Química da UFSC, foram utilizadas cubetas de quartzo de 1 mL e varredura na faixa de 200 à 800 nm empregando-se DMSO como solvente.

5.3.4 Voltametria Cíclica

Os voltamogramas cíclicos para os compostos de coordenação (1) - (6) e para o composto de referência [Mn(SALEN)Cl] foram obtidos em um voltamograma do tipo VersaSTAT 3 AMETEK[®], empregando-se a seguinte configuração: eletrodo de platina (eletrodo de trabalho), fio de platina (contra-eletrodo) e fio de platina (eletrodo de referência), hexafluorofosfato de tetrabutilamônio como eletrólito suporte (solução 0,1 M), e DMSO como solvente. Velocidades de varredura de 50 mV.s⁻¹. O ferroceno foi utilizado como padrão interno.

5.3.5 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Os espectros de ^1H RMN foram obtidos para os ligantes a fim de confirmar sua estrutura e pureza. Os espectros foram obtidos em equipamento Varian NMR AS 400, operando a 400 MHz. Os solventes utilizados foram clorofórmio e metanol deuterado e as amostras foram preparadas diluindo-se 15 – 20 mg das mesmas em cerca de 500 μL de solvente em tubos de 2,5 mm.

5.3.6 Ressonância Paramagnética eletrônica

As leituras foram realizadas em tubos de EPR de 4 mm para amostras congeladas e em capilar para amostras líquidas. Os espectros foram obtidos utilizando um sistema Bruker EMX micro-9,5/2,7/P/L com cavidade cilíndrica altamente sensível, operando em banda-X (9 GHz) em 120 e 291 K, microondas de 5 mW, modulação de amplitude 5 G e modulação de frequência 100 kHz. A temperatura empregada foi de 120 K para os estudos em frente ao H_2O_2 e ao $\text{O}_2^{\cdot-}$ e 291 K para os estudos frente ao DPPH e ao $\cdot\text{OH}$, os quais foram realizados em capilar.

5.3.7 Difração de raios-X

Cristais do composto de coordenação **(3)** foram selecionados e as medidas empregando-se a técnica de difração de raios-X de monocristal foram realizadas pela professora Roberta Cargnelutti no Departamento de Química da UFSM, utilizando um difratômetro Bruker D8 Venture. Dados e parâmetros cristalográficos obtidos encontram-se na Tabela 7, página 44.

5.4 ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS

5.4.1 Estudo do potencial de captura de radical via método colorimétrico empregando-se o radical DPPH

Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 μL de uma solução etanólica de 100 μM de DPPH, em cada poço. Preparou-se uma solução estoque de 200 μM para cada ligante orgânico (**HL1**, **H₂L2** e **SALEN**), composto de coordenação (**(1)** – **(6)** e **[Mn(SALEN)Cl]** e cloretos utilizados na síntese dos compostos ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), em etanol, contendo 1% de DMSO. Volumes de 5, 25, 50, 75 e 100 μL das soluções estoque foram adicionados aos poços e o volume foi completado para 200 μL , com etanol. A placa permaneceu em repouso, sob abrigo da

luz por 30 min. As leituras foram realizadas em comprimento de onda fixo de 517 nm em equipamento TECAN, modelo INFINITE M200, no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia, (LAMEB), localizado no Departamento de Bioquímica da UFSC. O estudo foi realizado em triplicata em três dias diferentes.

5.4.2 Estudo da atividade mimética funcional à CAT empregando-se espectroscopia eletrônica

Em uma cubeta de quartzo de 1 mL, adicionou-se 540 μL de uma solução com concentração 1 mM de cada composto de coordenação estudado. O solvente empregado foi meio aquoso PBS, contendo 1% de DMSO. Em seguida foi realizada uma varredura na faixa de 200 a 800 nm. Adicionou-se então 60 μL de uma solução aquosa de H_2O_2 de concentração 1 M, preparada em tampão PBS a partir de uma solução de H_2O_2 (28%), à cubeta. O H_2O_2 de 30 volumes, foi previamente titulado com uma solução padrão de permanganato de potássio (KMnO_4) 0,019 M em meio ácido, de acordo com método experimental descrito por Araújo e colaboradores.⁵⁷ Proporção composto: H_2O_2 de aproximadamente 1:100. A reação foi monitorada através de varreduras na faixa de 200 a 800 nm, de 12 em 12 s, até o tempo final de 5 min.

5.4.3 Estudo da atividade mimética funcional à SOD empregando-se espectroscopia eletrônica

Uma solução de concentração 1 mM, de cada composto de coordenação, em DMSO, foi titulada com uma solução de superóxido de potássio (KO_2), com concentração de 2 mM, também preparada em DMSO. Foram adicionadas alíquotas de 10 μL da solução de KO_2 à solução dos compostos em uma cubeta de quartzo e foi realizada varredura de 200 a 800 nm, após cada adição. O experimento também foi realizado em função do tempo, com adição de uma alíquota única de 100 μL e varredura de 200 a 800 nm, a cada 12 s por 5 min.

5.4.4 Estudo da capacidade de captura do radical $\cdot\text{OH}$ empregando-se espectroscopia eletrônica

Preparou-se uma solução de sulfato ferroso amoniacal ($[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (2 mM) em água destilada. Uma solução de concentração 1 mM, preparada em meio PBS contendo 1% de DMSO, de cada composto de coordenação estudado foi previamente preparada e 500 μL da mesma foram adicionados a uma cubeta de quartzo de 1 mL. No momento da leitura, adicionou-se 100 μL da solução de $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 10 μL de uma solução aquosa de H_2O_2 de 20 mM à cubeta para geração do radical $\cdot\text{OH}$ através da reação de Fenton (Equação 3, página 4). Foi feita uma varredura na faixa de 200 a 800 nm à cada 12 s até o tempo final de 5 min.

5.5 ESTUDOS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (EPR)

5.5.1 Estudo da capacidade de captura do radical DPPH via EPR

O estudo foi realizado em solventes prótico e aprótico, com o objetivo de determinar se os compostos agem através de mecanismo redox ou transferência de hidrogênio, frente a este radical. Preparou-se uma solução estoque dos compostos em DMSO, que foram então diluídos em etanol até uma concentração final de 100 μM (máximo de 0,1% DMSO). A solução também foi preparada em acetonitrila, sendo este o solvente empregado para estudo em meio aprótico. Uma solução de DPPH também foi preparada em ambos os solventes, com concentração 1 μM . Em eppendorfs protegidos da luz, foram adicionados 50 μL da solução de cada composto, 25 μL da solução de DPPH e 25 μL do solvente utilizado (proporção composto:DPPH 2:1). O sistema permaneceu em repouso, abrigado da luz por 30 min para que a reação ocorresse.

Após a reação, foi realizada a leitura no espectrômetro de EPR dos sistemas à temperatura ambiente, onde a solução foi inserida dentro de um capilar e este dentro do tubo de EPR, para posterior leitura. As leituras foram realizadas após 30 min e 1 h de iniciada a reação entre o composto de coordenação e o radical DPPH, em ambos os solventes: etanol e acetonitrila.

5.5.2 Estudo da atividade mimética funcional à CAT via EPR

Primeiramente foram obtidos espectros de EPR dos compostos de coordenação em estudo. Para isto, foram preparadas soluções estoque dos compostos de coordenação, na concentração 1 mM (150 μ L), empregando-se tampão PBS, contendo 1% DMSO. As soluções (150 μ L) foram adicionadas a tubos de EPR, com 4 mm de diâmetro, e o volume foi completado para 300 μ L com solução aquosa contendo o tampão PBS. As leituras foram realizadas a 120 K.

Em um tubo de EPR adicionou-se 150 μ L da solução estoque (1 mM) de cada composto, em seguida adicionou-se 150 μ L de uma solução aquosa de H₂O₂ de concentração 100 mM (proporção composto:H₂O₂ 1:100). As leituras foram realizadas a 120 K nos tempos de 30 s, 20 min e 1 h após iniciada a reação.

5.5.3 Estudo da atividade mimética funcional à SOD via EPR

Primeiramente foram obtidos espectros de EPR dos compostos de coordenação estudados em DMSO e da solução de KO₂ também em DMSO.

Diferentes volumes de uma solução de KO₂ em DMSO, de concentração 5 mM, foram adicionados à 150 μ L de uma solução estoque de cada composto de coordenação (concentração 1 mM). O volume foi completado para 300 μ L com DMSO e as leituras foram realizadas após 30 s de reação, à temperatura de 120 K.

5.5.4 Estudo da capacidade de captura do \cdot OH via EPR

O estudo da capacidade de captura do radical hidroxil também foi realizado através de técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica pela da adição do “*spin trap*” DMPO e geração do radical pela reação de Fenton (Equação 3, página 4). Foram preparadas soluções estoque de DMPO (400 mM), H₂O₂ (4 mM), FeSO₄ (0,4 mM) em água Mili-Q e dos compostos selecionados **(3)**, **(6)** e [Mn(SALEN)Cl] (0,4 mM, contendo 0,1% DMSO). Diferentes concentrações de composto foram adicionadas e as leituras foram realizadas em capilar, à temperatura ambiente, e em triplicata. Foi calculada a capacidade de captura do radical \cdot OH dos compostos e a concentração necessária para reduzir a produção do radical pela metade (IC₅₀), de acordo com método proposto por Scalzo.⁴³

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. DADOS DE CARACTERIZAÇÃO PARA OS LIGANTES ORGÂNICOS

6.1.1 Dados de caracterização para os ligantes HL1 e H₂L2

Abaixo são apresentados os dados de caracterização gerais obtidos para os ligantes **HL1** e **H₂L2** (Tabela 2), empregando-se as técnicas de espectroscopia na região do infravermelho (Tabela 3) e ressonância magnética nuclear de ¹H (Tabela 4). Os espectros de infravermelho para os ligantes encontram-se nas Figuras 25 (**HL1**) e 29 (**H₂L2**), juntamente com os seus respectivos compostos de coordenação. Os espectros de ¹H RMN estão representados nas Figuras 23 (**HL1**) e 24 (**H₂L2**).

Tabela 2. Informações gerais de caracterização dos ligantes orgânicos **HL1** e **H₂L2**.

	HL1	H₂L2
Fórmula molecular	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O	C ₁₆ H ₁₉ ClN ₂ O ₂
Massa Molar	214,27 g mol ⁻¹	306,79 g mol ⁻¹
Rendimento	13 g (71%)	4,8 g (82%)

Tabela 3. Atribuição de grupos funcionais para as principais bandas de absorção na região do infravermelho, para os ligantes orgânicos **HL1** e **H₂L2**. Os dados obtidos são comparados com valores relatados na literatura.^{52,53}

HL1			H₂L2		
Referência⁵²	Obtido		Referência⁵³	Obtido	
1/λ (cm⁻¹)	1/λ (cm⁻¹)	Grupo funcional	1/λ (cm⁻¹)	1/λ (cm⁻¹)	Grupo funcional
3263	3264	v NH	3188	3159	v OH
3040	3039	v CH	3053	3058	v CH
		aromático			aromático
3009	3009	v CH	3016	3015	v CH
		aromático			aromático
2947	2945	vas CH ₂	2951	2949	vas CH ₂
2839	2858	vs CH ₂	2831	2832	vs CH ₂
1589	1593	v C=C e v C=N	1595	1592	v C=C e v C=N
1566	1565	v C=C e v C=N	1587	-	v C=C e v C=N
1458	1453	v C=C e v C=N	1487	1488	v C=C e v C=N
1427	1425	v C=C e v C=N	1435	1434	v C=C e v C=N
1358	1352	δ OH	-	1373	δ OH
1280	1278	v CO	-	1249	v CO
1111	1107	v CH	756	753	δ γ-CH
		piridina			piridina ou β-anel
756	754	δ γ-CH	636	636	δ γ-CH
		piridina ou β-anel			piridina ou β-anel

Tabela 4. Valores encontrados para os sinais nos espectros de ^1H RMN, para os ligantes **HL1** e **H2L2** (δ ppm) e comparações com dados disponíveis na literatura. (Solvente empregado: CDCl_3 para o **HL1** e MeOH D_4 para o **H2L2**)^{52,53}

HL1				H2L2			
Referência⁵²		Obtido		Referência⁵³		Obtido	
$\delta(\text{ppm})$	Atribuição	$\delta(\text{ppm})$	Atribuição	$\delta(\text{ppm})$	Atribuição	$\delta(\text{ppm})$	Atribuição
CDCl_3		CDCl_3		CDCl_3		MetanolD4	
8,58-6,78	8H aromáticos	8,59	1H piridínico	8,52-7,06	4H piridínicos 1H anel fenólico	8,49	1H piridínico
		7,66	1H piridínico	6,94-6,71	3 H anel fenólico	7,78	1H piridínico
		7,25-	1H piridínico, 1H anel fenólico e 1H amínico			7,44	1H piridínico
		7,15					
		6,97	1H anel fenólico			7,3	1H piridínico
		6,85	1H anel fenólico			7,1	1H anel fenólico
		6,78	1H anel fenólico			6,76	2H anel fenólico
4,00	2H pir- CH_2NH	4,00	2H pir- CH_2NH	4-3,8	4 H pir- CH_2N^- e fenol- CH_2N^-	4-3,68	2H pir- CH_2N , 2H fenol- CH_2N , 1H $\text{NCH}_2\text{CH}(\text{OH})$, 1H OH
3,92	2H fenol- CH_2NH	3,92	2H fenol- CH_2NH	3,66	1H $\text{NCH}_2\text{CH}(\text{OH})^-$	3,53	1H $\text{NCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{Cl}$
				3,43-3,51	2H $\text{NCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{Cl}$	3,41	1H $\text{NCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{Cl}$
				2,74-2,86	2H- $\text{NCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{Cl}$	2,7	2H $\text{NCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{Cl}$

Figura 23. Espectro ^1H RMN para o ligante **HL1**, obtido em CDCl_3 e 400 Hz

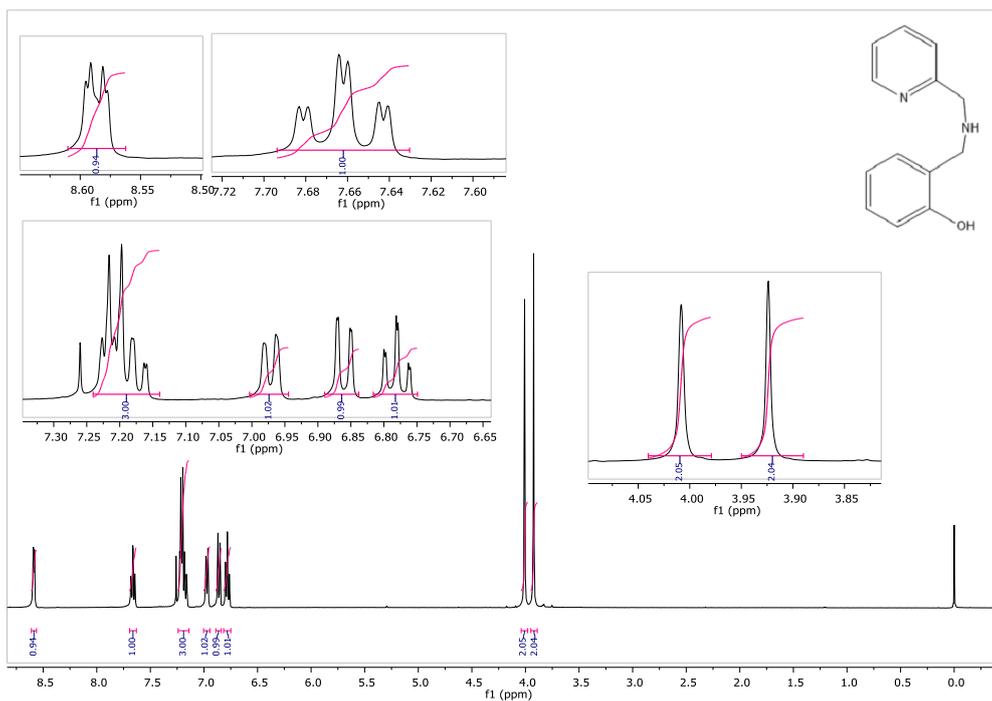
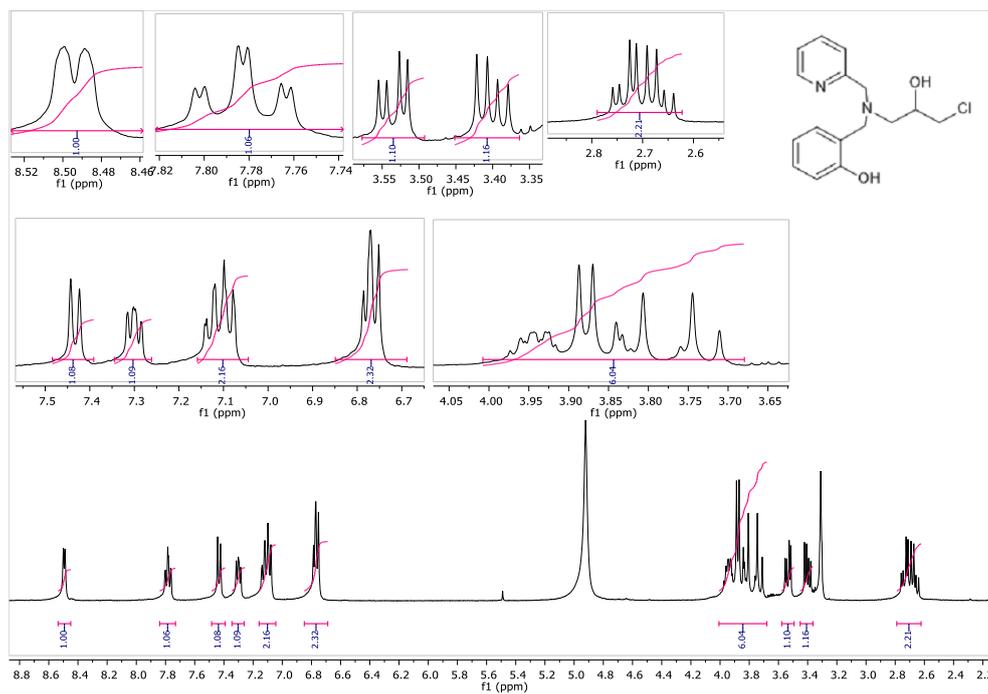


Figura 24. Espectro de ^1H RMN para o ligante **H₂L2**, obtido em Metanol D4 e 400 Hz



6.2. DADOS DE CARACTERIZAÇÃO PARA OS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO (1) – (6)

6.2.1 Dados de caracterização para os compostos de coordenação obtidos com o ligante HL1 (compostos (1) – (3))

Na Tabela 5, encontram-se dados de caracterização gerais para os compostos de coordenação (1) – (3).

Tabela 5. Dados gerais de caracterização para os compostos de coordenação (1) – (3), obtidos pelas técnicas de análise elementar e p.f. ou decomposição.

	(1)	(2)	(3)
Fórmula Molecular	$C_{14}H_{17}Cl_2CuN_2O$	$C_{29}H_{36}Cl_2Fe_2N_4O_4$	$C_{26}H_{28}ClMnN_4O_3$
Massa Molar	363,75 $g\text{mol}^{-1}$	687,22 $g\text{mol}^{-1}$	534,91 $g\text{mol}^{-1}$
Rendimento	0,27 g (75 %)	0,11 g (29%)	0,22 g (40%)
Ponto de Fusão	178 – 180°C	170°C	187°C
CHN teórico	C. 46,23 H. 4,71 N. 7,70	C. 50,69 H.5,28 N. 8,15	C. 58,38 H. 5,23 N. 10,47
CHN encontrado	C. 46,20 H. 4,71 N. 7,73	C. 50,66 H. 5,27 N. 8,16	C. 58,12 H. 5,26 N. 10,34

A Figura 25 apresenta os espectros na região do infravermelho para os compostos de coordenação (1) – (3). As atribuições para as principais bandas de absorção são apresentadas na Tabela 6, bem como os valores relatados na literatura.

Figura 25. Espectros na região do infravermelho para o ligante HL1 e seus respectivos compostos de coordenação (1) – (3), obtidos em pastilha de KBr.

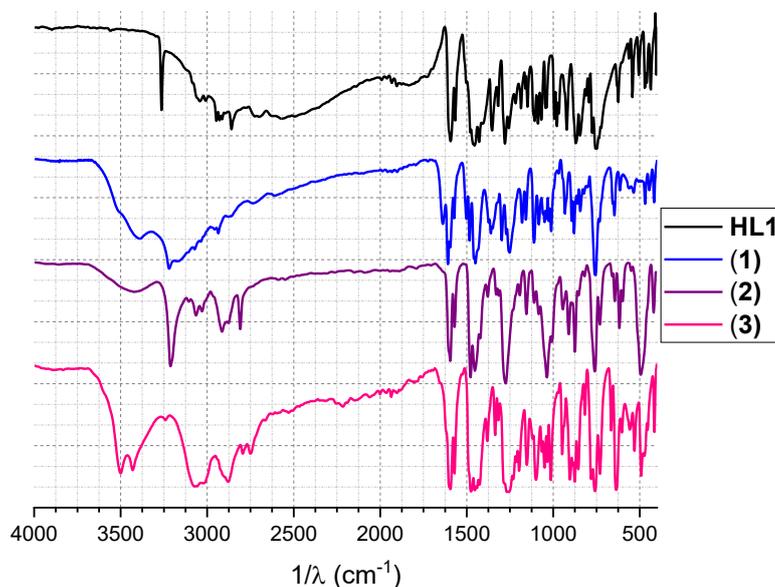


Tabela 6. Principais bandas de absorção na região do infravermelho para os compostos (1) – (3) e comparação com os valores relatados na literatura para estes compostos.^{50,51}

(1)			(2)			(3)	
Ref ⁵⁰	Obtido		Ref ⁵¹	Obtido		Obtido	
1/λ (cm ⁻¹)	1/λ (cm ⁻¹)	Grupo Funcional	1/λ (cm ⁻¹)	1/λ (cm ⁻¹)	Grupo funcional	1/λ (cm ⁻¹)	Grupo funcional
3396	3394	v OH	3042	3414	v OH	3244	v NH
	3220	v NH	3213	3212	v NH	3065	v CH
3068	3075	v CH arom	3067	3061	v CH	3024	v CH
	3033	v CH arom	3032	3027	v CH	2877	v CH ₂
2905	2936	v CH ₂	2912	2912	v CH ₂	1592	v C=C e C=N
29889	2956	v CH ₂	2878	2874	v CH ₂	1564	v C=C e C=N
	2860	v CH ₂		2807	v CH ₂	1474	v C=C e C=N
1607	1609	v C=C e C=N	1597	1593	v C=C e C=N	1446	v C=C e C=N
1572	1593	v C=C e C=N	1570	1568	v C=C e C=N	1243	v CO
1477	1501	v C=C e C=N	1477	1480	v C=C e C=N	1154	v CN
1431	1486	v C=C e C=N	1454	1542	v C=C e C=N	756	δ γ-CH piridina ou β-anel
	1252	v CO	1272	1274	v CO		
	1112	v CN		1154	v CN		
755	755	δ γ-CH piridina ou β-anel	767	761	δ γ-CH piridina ou β-anel		

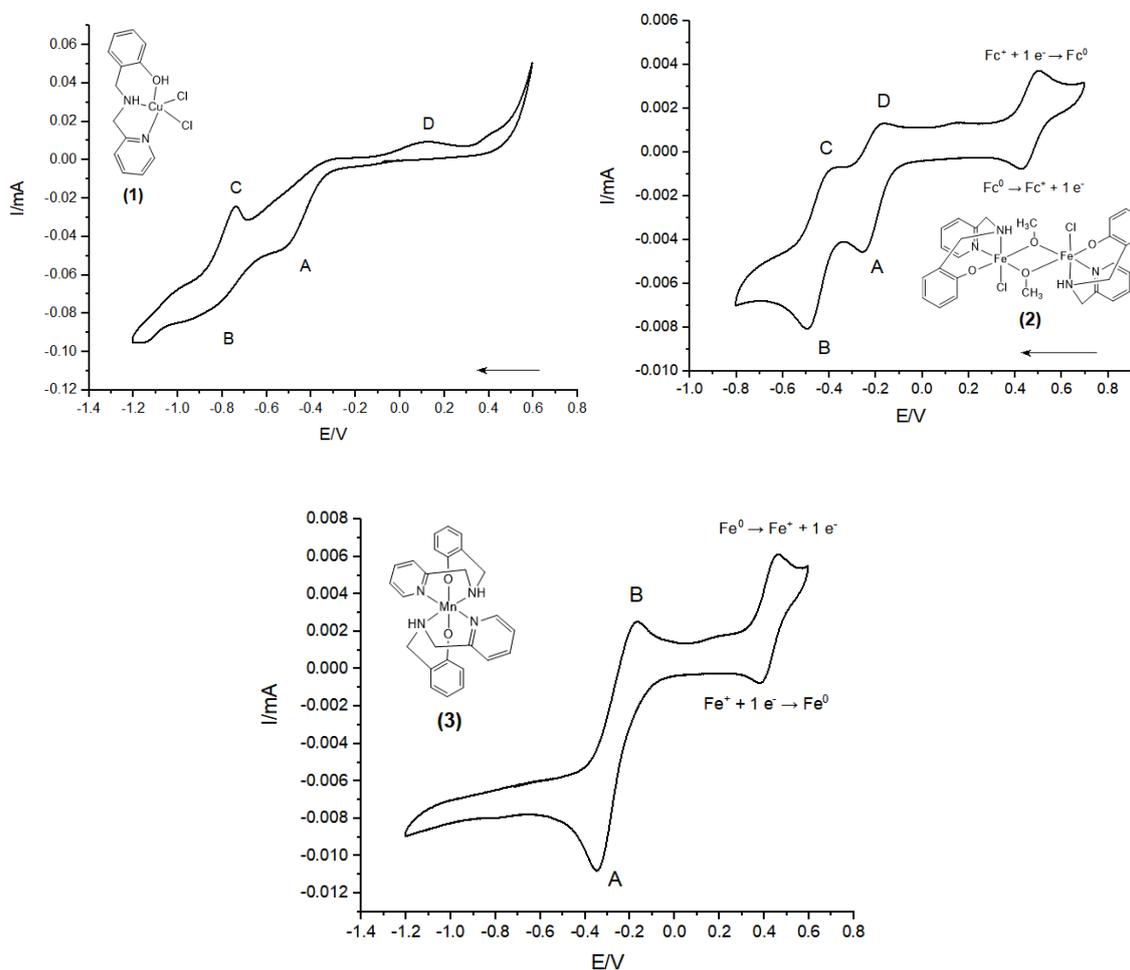
Obs.: Dados para o ligante **HL1** encontram-se na Tabela 3.

Os compostos apresentam bandas na região acima de 3400 cm⁻¹ que podem ser atribuídas à umidade residual das pastilhas de KBr, ou à água de coordenação presente

nesses compostos. Os três compostos de coordenação apresentam banda característica de amina secundária na região de 3200 à 3300 cm^{-1} , variando para cada composto. Observam-se também as bandas características de grupos aromáticos, além das bandas do CO do fenolato (1252, 1274 e 1243 cm^{-1}) e piridina (755, 761 e 756 cm^{-1}) respectivamente para os compostos (1), (2) e (3).

Os voltamogramas cíclicos para os compostos de coordenação (1) – (3) (Figura 26) foram obtidos em DMSO com velocidades de varredura de 50 mV s^{-1} , empregando-se ferroceno como padrão interno.

Figura 26. Voltamogramas cíclicos para os compostos (1), (2) e (3) obtidos em DMSO à 50 mVs^{-1} .



Para o composto (1), o voltamograma cíclico do padrão interno ferroceno foi obtido em separado devido à sobreposição dos processos redox deste com o do complexo em estudo (complexo (1)). O ferroceno exibiu processo redox reversível, com potenciais de pico catódico e anódico em 0,0991 V e 0,1291 V respectivamente, com $E_{1/2}$ de 0,1141 V e ΔE_p de 0,03 V. O voltamograma cíclico para o composto (1) apresenta dois processos

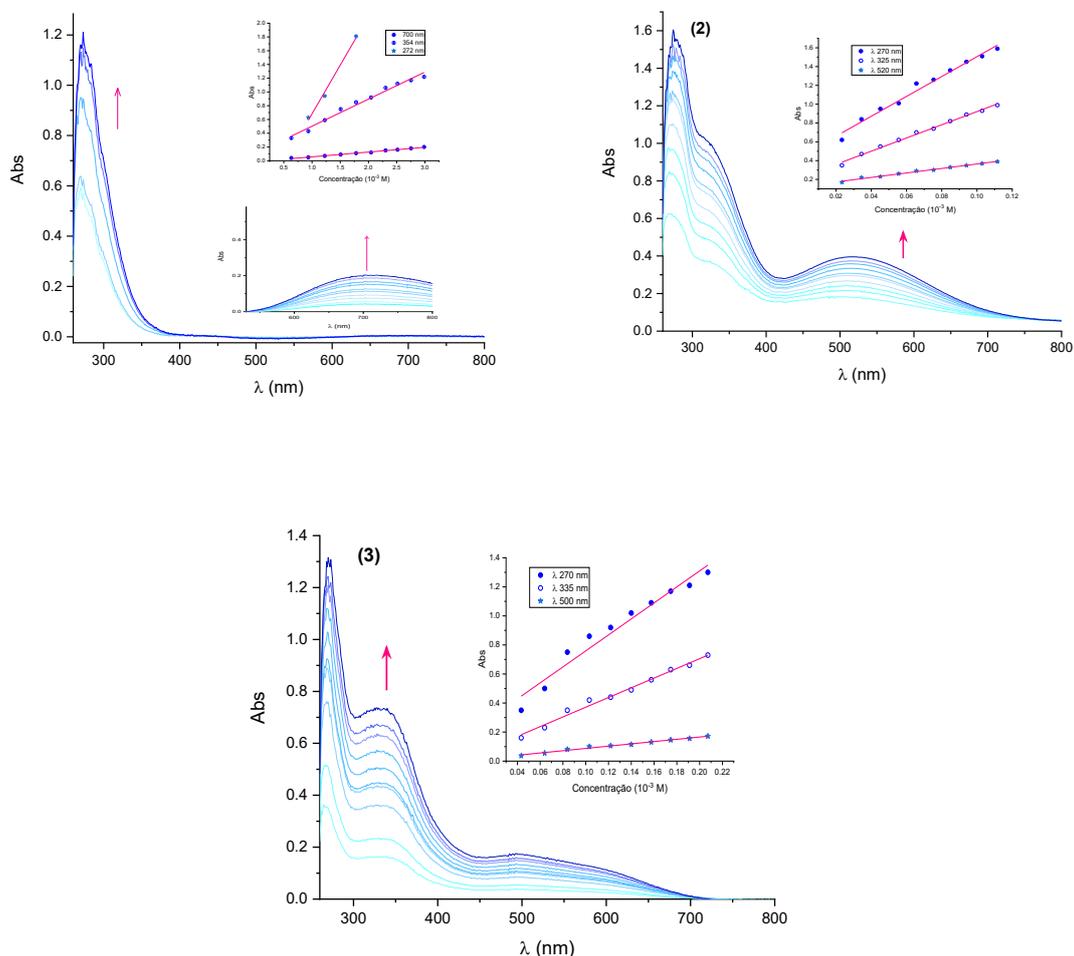
redox (letras A e B), com $E_{pc} = -0,5195$ e $-0,8386$ V atribuídos à reação de redução do centro metálico $Cu^{II} + 1 e^{-} \rightarrow Cu^{I}$. Estes processos estão associados às reações acopladas em virtude da presença de cloros lábeis ligados ao centro metálico, o que resulta em diferentes espécies em solução. Também é possível observar a presença de um pico anódico intenso e estreito (letra C), característico da deposição de Cu^0 no eletrodo, com $E_{pc} = -0,7443$. O processo redox observado com $E_{pa} = 0,1182$ V (letra D) é atribuído à oxidação de Cu^{I} a Cu^{II} . Essas observações estão de acordo com as já relatadas na literatura para esse composto.⁵¹

O voltamograma cíclico para o composto **(2)** apresenta dois processos redox identificados com A e B, os quais referem-se à redução dos centros de Fe^{III} do composto binuclear. Dessa forma observa-se primeiramente a redução de um dos centros de Fe^{III} com valor de $E_{pc} = -0,2527$ V (letra A), em seguida a redução do segundo centro de Fe^{III} , com valor de $E_{pc} = -0,4888$ V (letra B), ambos atribuídos à reação $Fe^{III} + 1 e^{-} \rightarrow Fe^{II}$. Os processos identificados como C e D referem-se à oxidação dos centros de Fe^{II} , com valores de $E_{pa} = -0,3857$ e $-0,1717$ V $Fe^{II} \rightarrow Fe^{III} + 1 e^{-}$. Esses processos possuem valores de ΔE_p de $0,1031$ e $0,081$ V respectivamente, sendo classificados como *quasi-reversíveis*.⁵²

O voltamograma cíclico para o composto **(3)** apresenta processos redox identificados pelas letras A e B, com valores de $E_{pc} = -0,3426$ V (letra A), atribuído à redução $Mn^{III} + 1 e^{-} \rightarrow Mn^{II}$ e $E_{pa} = -0,1680$ V (letra B), atribuído à oxidação $Mn^{II} \rightarrow Mn^{III} + 1 e^{-}$. O ΔE_p desse processo é de $0,174$ V, sendo classificado *quasi-reversível*.

Os espectros eletrônicos para os compostos **(1)** – **(3)** (Figura 27) foram realizados em DMSO, com concentração inicial de $0,6$; $0,02$ e $0,04$ mM, de cada composto, respectivamente e sucessivas adições de $10 \mu L$ de solução estoque de $20,0$; $0,7$ e $1,0$ mM respectivamente, a fim de determinar os coeficientes de extinção molar (ϵ).

Figura 27 Espectros eletrônicos para os compostos **(1)**, **(2)** e **(3)** obtidos em DMSO. As setas indicam aumento da concentração do composto em solução.



O espectro eletrônico do composto de coordenação **(1)** apresenta banda de transição $d-d$, típicas de compostos de Cu^{II} , em 700 nm (coeficiente de extinção molar de $69,3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Observa-se também banda de transição LMCT $\text{Cl} \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}$ em 354 nm ($393,8 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), além de banda de transição $\pi \rightarrow \pi^*$ característica do ligante em 270 nm ($14174 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).⁵¹

Para o composto **(2)** observa-se banda característica do ligante atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ em 270 nm ($10567 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), além de duas bandas de transferência de carga ligante \rightarrow metal (LMCT), em 325 e 520 nm, atribuídas à transferência de carga do oxigênio do DMSO para o metal, em virtude da alta labilidade do ligante Cl, que é substituído pelo solvente coordenante em solução, e à transferência fenolato $p\pi \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$

$d\pi$, respectivamente. Esses dados estão de acordo com aqueles obtidos previamente e relatados na literatura.⁵²

O espectro eletrônico do composto inédito (**3**), também apresenta transição $\pi \rightarrow \pi^*$ característica do ligante em 270 nm ($55060 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Observam-se duas bandas em 335 e 500 nm (3341 e $784 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), atribuídas à transferência de carga LMCT fenolato $p\pi \rightarrow \text{Mn}^{\text{III}} d \pi$.

Os dados cristalográficos obtidos para o composto de coordenação (**1**) revelam a formação de dois compostos mononucleares hexacoordenados de manganês, os quais compartilham o mesmo contra-íon cloreto (Figura 28). Os estados de oxidação são Mn^{III} e Mn^{II} . Cada centro metálico apresenta duas moléculas do ligante **HL1** coordenadas, em conformação facial, sendo que os átomos de oxigênio do fenol encontram-se em posição axial e desprotonados. Os centros metálicos apresentam geometria octaédrica distorcida com ambiente O_2N_4 , cada molécula do ligante **HL1** ocupa três posições de coordenação. A formação de um composto de valência mista é corroborada pelas diferentes distâncias observadas para as ligações $\text{Mn} - \text{N}$ e $\text{Mn} - \text{O}$ (Tabela 8). O centro de $\text{Mn}(1)$, apresenta menores distâncias de ligação quando comparado ao centro de $\text{Mn}(2)$, o que sugere que o centro de $\text{Mn}(1)$ é um melhor ácido de Lewis, sendo este o centro com estado de oxidação +3. A fórmula molecular e a massa molar obtidas para o composto foram $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{ClMnN}_4\text{O}_3$ e $534.91 \text{ g mol}^{-1}$ respectivamente. Os dados cristalográficos para o composto (**3**) estão apresentados na Tabela 7 e os principais comprimentos e ângulos de ligação estão apresentados na Tabela 8.

Figura 28. Representação da estrutura cristalina obtida por DRX para o composto (**3**).

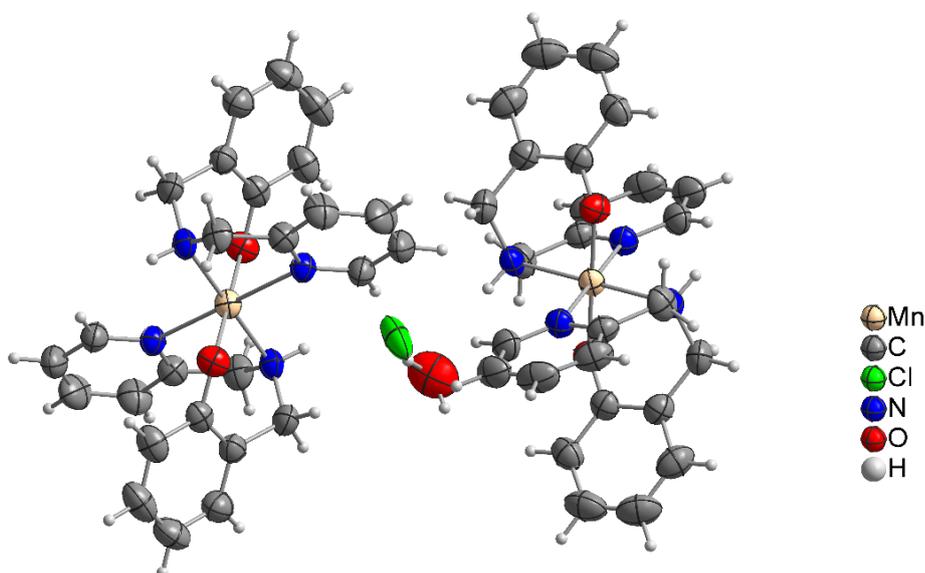


Tabela 7. Dados, parâmetros cristalográficos e refinamento de estrutura obtida via difração de raios-X de monocristal para o composto (3)

Fórmula empírica	C ₂₆ H ₂₈ ClMnN ₄ O ₃	
Peso molecular	534.91	
Temperatura	298(2) K	
Comprimento de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Triclínico	
Grupo espacial	P -1	
Dimensões de cela unitária	a = 11.061(2) Å	a = 91.309(9)°.
	b = 11.2171(18) Å	b = 110.805(7)°.
	c = 12.983(2) Å	g = 118.025(4)°.
Volume	1293.7(4) Å ³	
Z	2	
Densidade (calculada)	1.373 mg/m ³	
Coefficiente de absorção	0.648 mm ⁻¹	
F(000)	556	
Tamanho do cristal	0.215 x 0.127 x 0.086 mm ³	
Intervalo Theta para coleta de dados	2.113 to 30.560°.	
Intervalos de índice	-15<=h<=15, -16<=k<=16, -18<=l<=18	
Reflexões coletadas	104045	
Reflexões independentes	7906 [R(int) = 0.0366]	
Completude para Theta = 25.242°	99.9 %	
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²	
Dados / restrições / parametros	7906 / 3 / 335	
Qualidade de ajuste em F ²	1.026	
Índices de R finais [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0349, wR2 = 0.0855	
Índices de R (todos os dados)	R1 = 0.0535, wR2 = 0.0945	
Coefficiente de extinção	n/a	
Maior diferença de pico e espaço	0.322 e -0.266 e.Å ⁻³	

Tabela 8. Principais comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação para o composto (3).

Mn(1)-O(1)	1,8737(11)
Mn(1)-O(1)#1	1,8738(11)
Mn(1)-N(2)	2,0858(12)
Mn(1)-N(2)#1	2,0858(12)
Mn(1)-N(1)	2,2603(12)
Mn(1)-N(1)#1	2,2604(12)
Mn(2)-O(2)#2	1,8696(11)

Mn(2)-O(2)	1,8696(11)
Mn(2)-N(4)#2	2,1036(12)
Mn(2)-N(4)	2,1036(12)
Mn(2)-N(3)#2	2,2574(12)
Mn(2)-N(3)	2,2574(12)
O(1)-Mn(1)-O(1)#1	180,0
O(1)-Mn(1)-N(2)	91,98(5)
O(1)#1-Mn(1)-N(2)	88,02(5)
O(1)-Mn(1)-N(2)#1	88,02(5)
O(1)#1-Mn(1)-N(2)#1	91,98(5)
N(2)-Mn(1)-N(2)#1	180,0
O(1)-Mn(1)-N(1)	89,56(4)
O(1)#1-Mn(1)-N(1)	90,44(4)
N(2)-Mn(1)-N(1)	78,07(5)
N(2)#1-Mn(1)-N(1)	101,93(5)
O(1)-Mn(1)-N(1)#1	90,44(4)
O(1)#1-Mn(1)-N(1)#1	89,57(4)
N(2)-Mn(1)-N(1)#1	101,93(5)
N(2)#1-Mn(1)-N(1)#1	78,07(5)
N(1)-Mn(1)-N(1)#1	180,0
O(2)#2-Mn(2)-O(2)	180,0
O(2)#2-Mn(2)-N(4)#2	91,93(5)
O(2)-Mn(2)-N(4)#2	88,07(5)
O(2)#2-Mn(2)-N(4)	88,07(5)
O(2)-Mn(2)-N(4)	91,93(5)
N(4)#2-Mn(2)-N(4)	180,0
O(2)#2-Mn(2)-N(3)#2	89,69(5)
O(2)-Mn(2)-N(3)#2	90,31(5)
N(4)#2-Mn(2)-N(3)#2	77,58(5)
N(4)-Mn(2)-N(3)#2	102,42(5)
O(2)#2-Mn(2)-N(3)	90,31(5)
O(2)-Mn(2)-N(3)	89,69(5)
N(4)#2-Mn(2)-N(3)	102,42(5)
N(4)-Mn(2)-N(3)	77,58(5)
N(3)#2-Mn(2)-N(3)	180,0

6.2.2 Dados de caracterização para os compostos de coordenação obtidos com o ligante H₂L2 (compostos (4) – (6)).

Na Tabela 9, encontram-se dados de caracterização gerais para os compostos (4) – (6) realizadas empregando-se as técnicas de análise elementar (CHN) e determinação ponto de fusão/decomposição.

Tabela 9. Dados gerais de caracterização para os compostos (4) – (6).

	(4)	(5)	(6)
Fórmula Molecular	C ₁₆ H ₂₃ C ₁₃ CuN ₂ O ₄	C ₁₆ H ₁₉ C ₁₃ FeN ₂ O _{2,5}	C ₃₂ H ₄₁ Cl ₄ Mn ₂ N ₄ O ₁₁
Massa Molar	477,27 g.mol ⁻¹	441,54 g.mol ⁻¹	909,38 g.mol ⁻¹
Rendimento	0,31 g (68%)	0,31 g (67%)	0,15 g (15%)
Ponto de Fusão	160°C	225°C	220°C
CHN teórico	C. 40,26 H. 4,86 N. 5,87	C. 43,52 H. 4,34 N. 6,43	C. 42,26 H. 4,54 N. 6,16
CHN encontrado	C. 40,63 H. 4,48 N. 5,84	C. 43,31 H. 3,99 N. 5,98	C. 42,58 H. 4,58 N. 6,16

As principais bandas dos espectros de absorção na região do infravermelho observadas para os compostos (4) – (6) (Figura 29), encontram-se descritas na Tabela 10 e seus valores são comparados com os dados relatados na literatura.^{16, 52, 53}

Figura 29 Espectros na região do infravermelho para o ligante **H₂L2** e seus respectivos compostos de coordenação **(4)** – **(6)**, obtidos em pastilhas de KBr e filme de KBr (**H₂L2**).

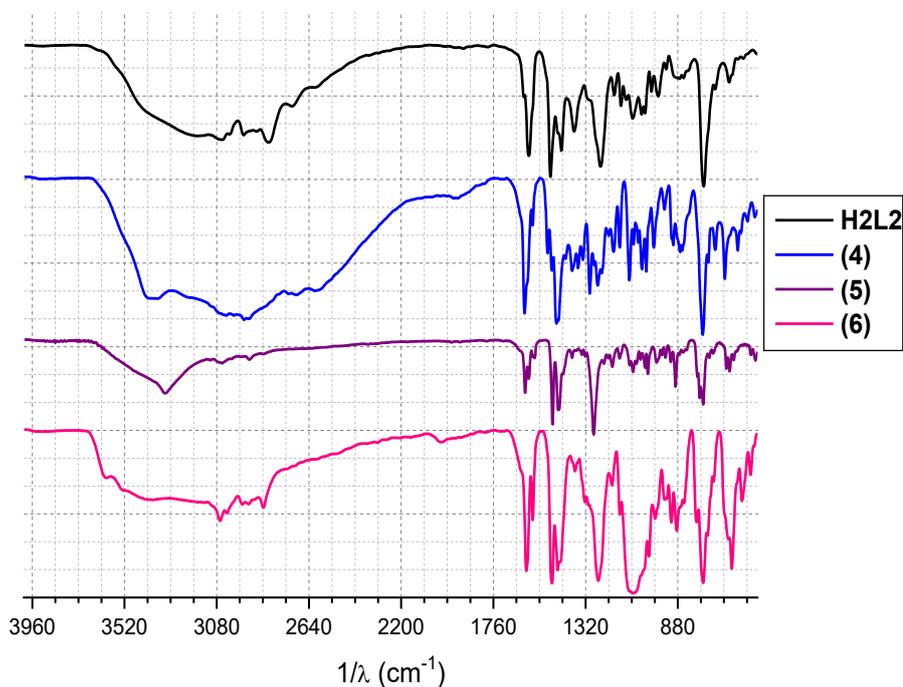


Tabela 10 Principais bandas presentes nos espectros de absorção na região do infravermelho para os compostos de coordenação **(4)** – **(6)** e comparação com os dados relatados na literatura.
53,54,16

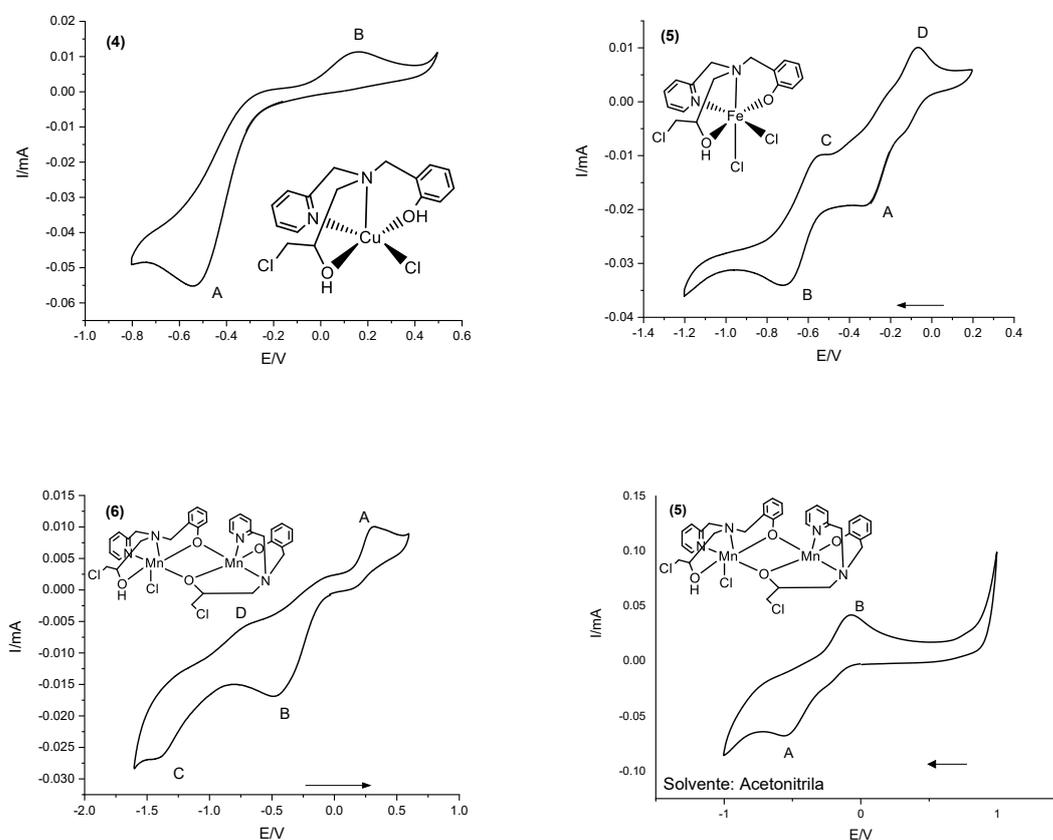
(4)			(5)			(6)		
Ref⁵³	Exp		Ref⁵⁴	Exp		Ref¹⁶	Exp	
1/λ	1/λ	Grupo	1/λ	1/λ	Grupo	1/λ	1/λ	Grupo
(cm⁻¹)	(cm⁻¹)	Funcional	(cm⁻¹)	(cm⁻¹)	funcional	(cm⁻¹)	(cm⁻¹)	funcional
3402	3389	ν OH	3416	3322	ν OH	N/A	3402	ν OH
1610	1612	ν C=N	1068	1608	ν C=N	N/A	1600	ν C=N
N/A	1571	ν C=C	1591	1589	ν C=C	1574	1570	ν C=C
N/A	1500	ν C=C	1479	1478	ν C=C	1478	1481	ν C=C
N/A	1481	ν C=C	1449	1449	ν C=C	1456	1454	ν C=C
1460	1457	ν C=C	1283	1280	ν CO	1275	1258	ν CO
N/A	1298	ν CO	756	756	δ CH	1080	1092	ClO ₄ -
761	761	δ CH				N/A	760	δ CH

Obs.: Dados para o ligante **H₂L2** encontram-se na Tabela 3.

Os três compostos apresentam banda característica, atribuída a ν OH, referente ao grupo álcool presente no ligante **H2L2**, o qual permanece protonado nos compostos **(4)** e **(5)**, estando parcialmente desprotonado no composto binuclear de valência mista **(6)**, onde um grupo álcool está protonado e outro está desprotonado. Também estão presentes as bandas características dos grupos fenol e piridina em 1298, 1280, 1258 cm^{-1} para os compostos **(4)**, **(5)** e **(6)** respectivamente. Para os compostos **(5)** e **(6)**, a banda característica do fenol está deslocada para região de menor número de onda (1280 e 1258 cm^{-1} respectivamente) comparada ao composto **(4)** (1298 cm^{-1}), devido à perda do H do grupo fenol, formando fenolato. No espectro do composto **(6)** observa-se uma banda em 1092 cm^{-1} , característica do íon ClO_4^- , estando de acordo com a estrutura previamente relatada para este composto, a qual foi elucidada por difração de raios-X de monocristal, indicando a presença do ânion perclorato como contra íon.^{16, 53, 54}

Os voltamogramas cíclicos para os compostos de coordenação **(4)** – **(6)** (Figura 30) foram obtidos em DMSO e velocidades de varredura de 50 mV s^{-1} . O potencial do par redox ferrocênio/ferroceno foi determinado tendo $E_{1/2} = 0,25$ V. Para o composto **(6)**, também é apresentado o voltamograma cíclico obtido em acetonitrila.

Figura 30. Voltamogramas cíclicos para os compostos **(4)**, **(5)** e **(6)** obtidos em DMSO e voltamograma cíclico para o composto **(6)** obtido em acetonitrila.



O voltamograma cíclico para o composto de coordenação **(4)**, apresenta um processo catódico (letra A) em -0,53 V e um processo anódico (letra B) em 0,15 V. O processo A pode ser atribuído à redução do Cu^{II} a Cu^{I} , o processo B pode ser atribuído à oxidação do Cu^{I} a Cu^{II} . Esse processo está associado à perda de um ligante cloro, com a formação de um composto tetracoordenado de Cu^{I} , sendo classificado como *quasi-reversível*. Os dois processos redox estão distantes, podendo ser atribuídos à reações acopladas envolvendo o ligante lábil cloro, que pode ser substituído pelo solvente coordenante, em solução.⁵³

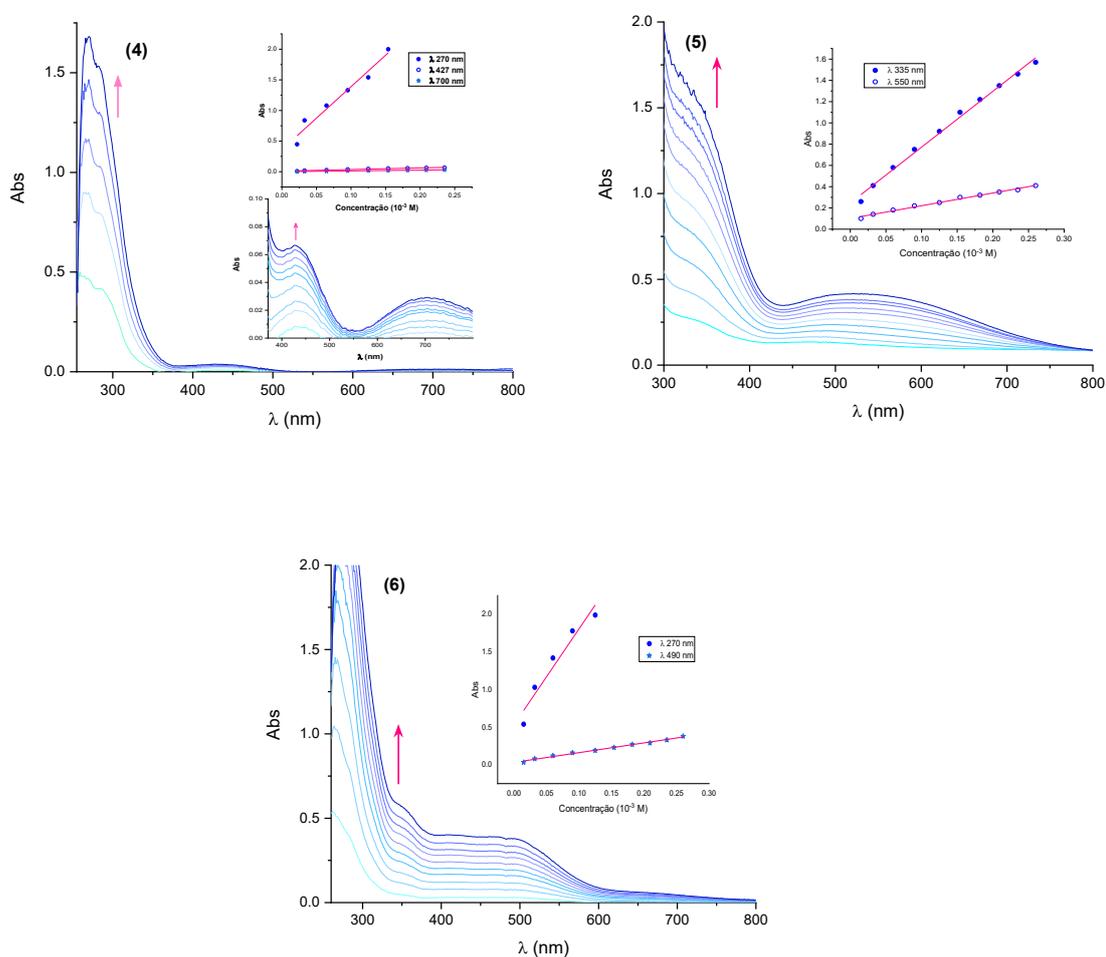
O voltamograma para o composto de coordenação **(5)** mostra dois processos catódicos (letras A e B) em -0,31 e -0,71 V, atribuídos à redução do centro de Fe^{III} a Fe^{II} ($\text{Fe}^{\text{III}} + 1\text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}$). Também apresenta dois processos anódicos (letras C e D) em -0,55 e -0,07 V, atribuídos à reação de oxidação $\text{Fe}^{\text{II}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}} + 1\text{e}^-$. Essas reações estão associadas à formação de espécies diferentes do composto em solução, devido à perda dos ligantes cloro lábeis, com possível substituição dos mesmos por grupos do solvente, desse modo, os processos de redução e oxidação dos centros metálicos do composto podem ocorrer em diferentes potenciais, com surgimento de mais de um processo redox. Para confirmar a estrutura mononuclear do composto, foi obtido voltamograma do mesmo em solvente acetonitrila, onde foi observado apenas um processo de redução e um processo de oxidação, em -0,54 e -0,074 V respectivamente.⁵⁴

O composto de coordenação **(6)** perde sua estrutura binuclear de valência mista em solução, formando espécies mononucleares de Mn^{II} e Mn^{III} . O voltamograma cíclico para este composto de coordenação mostra um processo anódico (letra A) em 0,30 V que se refere à reação de oxidação dos centros de Mn^{II} a Mn^{III} . O processo catódico B, refere-se à redução dos mesmos de Mn^{III} para Mn^{II} . O voltamograma ainda apresenta mais um processo catódico e um processo anódico (-1,39 e -0,72 V), atribuídos à redução do centro de Mn^{IV} a Mn^{III} e à oxidação dos centros de Mn^{III} a Mn^{IV} respectivamente. Os processos AB e CD estão bem separados, podendo ser atribuídos a reações acopladas envolvendo o ligante cloro. A baixa intensidade refere-se à instabilidade do composto após a redução, resultando em sua decomposição parcial.⁴⁸ Em solvente acetonitrila, o composto preserva sua estrutura binuclear de valência mista, apresentando apenas um processo catódico e um processo anódico, representados pelos picos A e B, que se referem à oxidação do centro de Mn^{II} do composto a Mn^{III} , seguida de sua redução para Mn^{II} novamente.

Os processos redox observados nos voltamogramas cíclicos dos compostos de coordenação **(4)** – **(6)**, são condizentes com os voltamogramas previamente publicados para esses compostos.^{16,53,54}

Os espectros eletrônicos para os compostos **(4)** – **(6)** (Figura 31) foram obtidos em DMSO, com concentração inicial de 0,03 mM de composto e sucessivas adições de 10 μ L de solução estoque 2 mM, a fim de determinar os coeficientes de extinção molar (ϵ).

Figura 31. Espectros eletrônicos dos compostos de coordenação **(4)** – **(6)**, obtidos em DMSO. As setas indicam aumento da concentração do composto em solução.



Os espectros eletrônicos para os três compostos de coordenação, **(4)** – **(6)**, apresentam banda característica do ligante, atribuída à transferência $\pi \rightarrow \pi^*$ em 270 nm ($127425 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para o composto de Cu^{II} **(4)**, é observada banda de transição d – d em 705 nm ($131 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Adicionalmente, observa-se banda LMCT em 430 nm ($261 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), atribuída à transferência de carga do solvente DMSO para o centro

de Cu^{II} , que pode se coordenar ao centro metálico devido à perda do ligante lábil cloro.⁵³

O composto de Fe^{III} (**5**), adicionalmente à banda característica do ligante, também apresenta duas bandas de transferência de carga, uma atribuída à transferência de carga fenolato $p\pi \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}} d\pi$ em 550 nm ($1195 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e outra atribuída à transferência $\text{Cl } p\pi \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}} d\pi$ em 335 nm ($5254 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O que está de acordo com o que já foi relatado para esse composto.⁵⁴

O composto (**6**) apresenta transição LMCT fenolato $p\pi \rightarrow \text{Mn}^{\text{III}} d\pi$ em 490 nm ($1298 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) além de um ombro em região de menor comprimento de onda (354 nm), característico de efeito Jahn Teller.

6.2.3 Dados de caracterização para o ligante SALEN e composto de referência $[\text{Mn}(\text{SALEN})\text{Cl}]$

Na Tabela 11 encontram-se os dados gerais de caracterização para o ligante SALEN e para o respectivo composto de coordenação de Mn(III) $[\text{Mn}(\text{SALEN})\text{Cl}]$, empregado como composto de referência neste trabalho.

Tabela 11. Dados gerais de caracterização para o ligante SALEN e para o composto de referência $[\text{Mn}(\text{SALEN})\text{Cl}]$.

	SALEN	$[\text{Mn}(\text{SALEN})\text{Cl}]$
Fórmula molecular	$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClMnN}_2\text{O}_2$
Massa Molar	214,27 g.mol^{-1}	392,79 g.mol^{-1}
Rendimento	0,23 g (83%)	0,22 g (61%)
Ponto de fusão ou decomposição	125°C	287 – 290°C
CHN teórico	-	C 48,92; H 4,62; N 7,13
CHN encontrado	-	C 48,55; H 4,60; N 7,16

Na Figura 32 estão representados os espectros de absorção na região do infravermelho para o ligante SALEN e para o composto de referência $[\text{Mn}(\text{SALEN})\text{Cl}]$. As principais bandas do espectro de absorção na região do infravermelho observadas para ambos encontram-se descritas na Tabela 12 e seus valores são comparados com os dados relatados na literatura.⁵⁵

Figura 32. Espectros na região do infravermelho para o ligante SALEN e composto de referência [Mn(SALEN)Cl], obtidos em pastilhas de KBr.

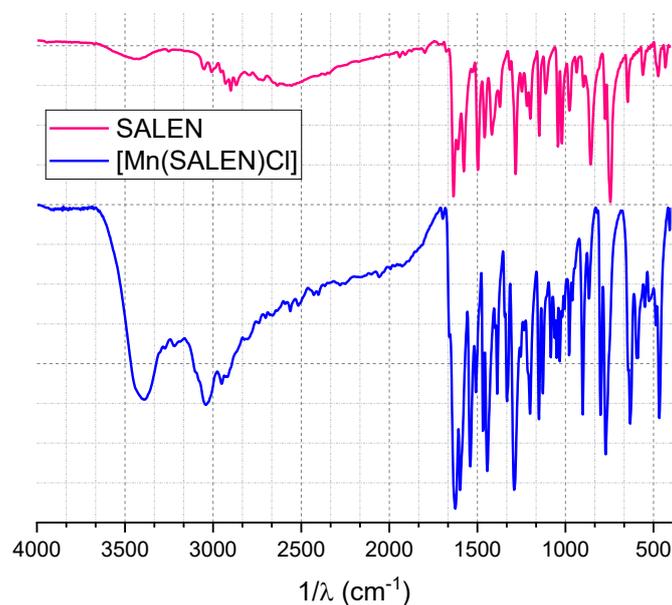


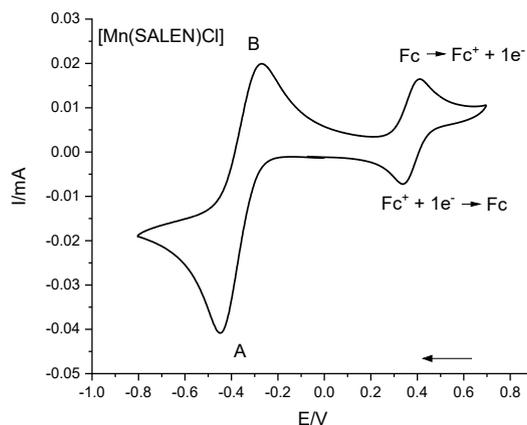
Tabela 12. Principais valores de absorção na região do infravermelho para o ligante SALEN e para o composto de referência [Mn(SALEN)Cl] e comparação com a literatura.⁵⁶

SALEN			[Mn(SALEN)Cl]		
Referência ⁵⁶	Obtido		Referência ⁵⁶	Obtido	
1/λ (cm ⁻¹)	1/λ (cm ⁻¹)	Grupo funcional	1/λ (cm ⁻¹)	1/λ (cm ⁻¹)	Grupo funcional
3425	3436	v OH	3426	3394	v OH
3052, 3009, 2931, 2901 e 2869	3051, 3002, 2931, 2895 e 2867	v CH aromático	3084 e 2922	3045, 2954 e 2912	v CH aromático
2610	2611	v CH alifático	2611	2563	v CH alifático
-	1636, 1609, 1572 e 1494	v C=C aromático	-	1625, 1597, 1540 e 1450	v C=C aromático
-	1281	v CO fenol	-	1289	v CO fenol
			624	635	v Mn – N
			452	466	v Mn – O

As principais bandas de absorção na região do infravermelho para o composto de referência **[Mn(SALEN)Cl]** foram atribuídas e comparadas com a literatura. O espectro apresenta banda característica de ν OH, que pode ser resquício do ligante **SALEN**, ou do solvente utilizado na reação MeOH. As bandas características de ν CH aromático também aparecem na região esperada, bem como vibrações características das ligações Mn – N e Mn – O também são observadas em 635 e 466 cm^{-1} respectivamente, em acordo com os valores relatados na literatura (624 e 452 cm^{-1}). Ainda são observadas bandas características de estiramento C=C aromático e CO do grupo fenólico presente na molécula, que não estão atribuídas na literatura.⁵⁶

O voltamograma cíclico para o composto de referência (Figura 33) foi obtido em DMSO e velocidade de varredura de 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. O potencial do par redox ferrocênio/ferroceno foi determinado tendo $E_{1/2} = 0,37$ V.

Figura 33. Voltamograma cíclico para o composto de referência **[Mn(SALEN)Cl]**, obtido em DMSO.



O voltamograma cíclico para o composto de referência **[Mn(SALEN)Cl]**, apresenta um processo catódico e outro anódico (letras A e B) em -0,44 e -0,27 V respectivamente. O processo catódico A, refere-se à reação de redução do centro de Mn^{III} do composto para Mn^{II} ($\text{Mn}^{\text{III}} + 1 e^- \rightarrow \text{Mn}^{\text{II}}$), já o processo anódico B, refere-se à reação de oxidação $\text{Mn}^{\text{II}} \rightarrow \text{Mn}^{\text{III}} + 1 e^-$. O ΔE_p para esse processo é de 0,170 V, sendo um processo *quasi-reversível*.⁵⁸

6.3. ESTUDOS DE REATIVIDADE DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO (1)–(6) FRENTE AO RADICAL DPPH E AS EROs H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ E $\cdot OH$ POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS E EPR E COMPARAÇÃO COM O COMPOSTO DE REFERÊNCIA $[Mn(SALEN)Cl]$

Os compostos de coordenação (1) – (6) sintetizados e previamente caracterizados tiveram sua atividade antioxidante estudada frente ao radical orgânico DPPH e frente às diferentes EROs, H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, para avaliar sua atividade mimética funcional às metaloenzimas CAT e SOD respectivamente. Adicionalmente, os compostos mais promissores (3) e (6), tiveram sua atividade antioxidante estudada também frente à espécie altamente reativa $\cdot OH$. Estes estudos foram realizados de forma qualitativa, no caso das espécies H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ e de forma quantitativa com as espécies DPPH e $\cdot OH$, através de métodos espectroscópicos e via EPR.

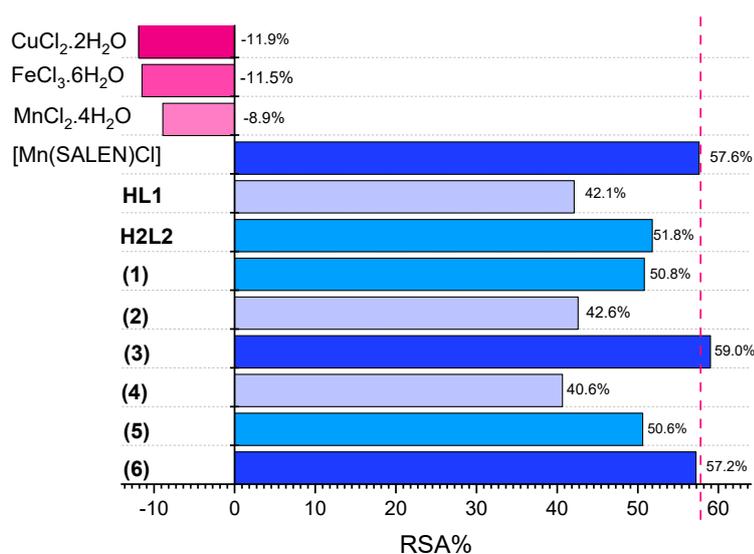
6.3.1 Avaliação da atividade antioxidante dos compostos de coordenação (1) – (6) e do $[Mn(SALEN)Cl]$ empregando-se o método colorimétrico 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A atividade antioxidante dos compostos de coordenação (1) – (6), dos ligantes HL1 e HL2 e do composto de referência $[Mn(SALEN)Cl]$, foi avaliada empregando-se o método colorimétrico DPPH. Os resultados foram obtidos em valor de *Radical Scavenging Activity* (RSA%), de acordo com equação 15 (página 11), para diferentes concentrações dos compostos, utilizando como comparativo o composto antioxidante $[Mn(SALEN)Cl]$. O ensaio empregando-se o radical DPPH foi realizado variando-se a concentração do composto de coordenação, seus respectivos ligantes, sais metálicos e do composto de referência, sendo empregadas as concentrações: 5, 25, 50, 75 e 100 μM , sendo cada um dos experimentos realizados em triplicata. As médias dos resultados obtidos neste teste encontram-se na Tabela 13. A Figura 34 apresenta um gráfico das médias dos valores RSA%, para cada composto, bem como para o composto de referência $[Mn(SALEN)Cl]$.

Tabela 13. Valores de RSA% obtidos para os compostos (1) – (6), seus respectivos cloretos e ligantes e para o composto de referência [Mn(SALEN)Cl], em concentrações de 5, 25, 50, 75 e 100 μ M respectivamente.

Composto	%RSA e Concentrações (μ M)					% RSA (Média)
	5	25	50	75	100	
CuCl₂•2H₂O	-15,6	-0,9	-11,1	-8,4	-23,4	-11,9
FeCl₃•6H₂O	-16,3	-2,3	-12,6	-13,2	-13,1	-11,5
MnCl₂•4H₂O	-14,9	-0,9	-10,3	-9,1	-9,4	-8,9
[Mn(SALEN)Cl]	26,6	58,2	67,1	68,6	67,8	57,6
HL1	17,2	28,0	52,2	56,0	56,9	42,1
H₂L2	16,6	46,7	69,4	56,9	69,7	51,8
(1)	8,2	41,2	69,4	68,5	66,7	50,8
(2)	15,2	57,7	55,8	48,7	35,5	42,6
(3)	27,8	62,6	69,4	68,5	66,7	59,0
(4)	15,1	45,5	40,9	48,0	53,8	40,6
(5)	19,4	56,7	60,7	58,8	57,4	50,6
(6)	45,1	67,9	62,5	57,7	52,9	57,2

Figura 34. Médias de valores de RSA% (considerando as concentrações empregadas no ensaio: 5, 25, 50, 75 e 100 μ M), para os compostos de coordenação (1) – (6), sais metálicos, ligantes e o composto de referência [Mn(SALEN)Cl].



Os resultados do estudo de sequestro de espécies radicalares, empregando-se o método de DPPH, indica que, enquanto os sais de cloreto, utilizados na síntese dos

compostos estudados apresentaram atividade oxidante, com valores de RSA% negativos (representados em rosa no gráfico), tanto os ligantes orgânicos quanto os compostos de coordenação **(1)** – **(6)**, apresentaram atividade antioxidante, realizando a captura de espécies radicalares, da mesma forma que o composto de referência **[Mn(SALEN)Cl]**. Os compostos que apresentaram maior índice de RSA% geral (representados no gráfico em azul escuro), foram os compostos contendo centro metálico de manganês **(3)** (59,0%) e **(6)** (57,2%) e o composto de referência **[Mn(SALEN)Cl]** (57,6%). Sendo que o **(3)** apresentou valor médio de RSA% maior que o controle **[Mn(SALEN)Cl]** e o **(6)** apresentou valor muito próximo. Os compostos contendo centro de Cu^{II} **(1)** (50,8%) e centro de Fe^{III} **(5)** (50,6%) são os próximos com valores de RSA% aproximados ao do controle, seguidos do **(2)** (42,6%) e **(4)** (40,6%) que apresentam os menores valores (representados em azul claro no gráfico). O ligante **HL1** apresentou RSA% moderado (42,1%) sendo maior apenas que o do composto **(4)**. Já o ligante **H₂L2** apresentou RSA% alto, apenas menor que os compostos com melhores atividades: compostos **(3)** e **(6)**.

A atividade RSA% dos compostos e ligantes não apresentou comportamento linear com relação ao aumento da sua concentração, resultado que também é observado para o composto de referência. Os compostos estudados apresentaram melhor atividade de RSA% em diferentes concentrações. Os compostos **(1)**, **(3)** e **(5)**, obtiveram melhor índice de RSA% na concentração de 50 μM (69,4%; 69,4% e 60,7% respectivamente). Os compostos **(2)** e **(6)**, apresentaram melhor índice de RSA% na concentração de 25 μM (57,7% e 67,9% respectivamente) e para o composto **(4)**, a concentração que se obteve melhor resultado foi a de 100 μM (53,8%). Já o composto referência **[Mn(SALEN)Cl]**, apresentou melhor índice de RSA% na concentração de 75 μM (68,6%). Vale ressaltar que o composto **(3)** apresentou atividade RSA% maior ou equivalente à atividade observada para o **[Mn(SALEN)Cl]** em todas as concentrações estudadas, indicando um alto índice de atividade antioxidante frente ao DPPH.

Com base nesses resultados conclui-se que os compostos atuam frente ao radical DPPH, provavelmente via mecanismo dual: HT (transferência de hidrogênio ou *hydrogen transfer*) e redox. Em etanol, sugere-se que o composto mais ativo (composto **(3)**) atua via mecanismos HT e redox, justificando o elevado valor de % RSA. Os maiores valores de % RSA estão relacionados aos melhores ácidos de Lewis (podem desprotonar o solvente prótico), ou aqueles compostos que possuem hidrogênios ácidos

em suas estruturas. Para comprovar esta hipótese, as reações entre os compostos de coordenação e o radical DPPH foram monitoradas por EPR.

6.3.2 Avaliação da supressão do radical DPPH pelos compostos de coordenação via EPR

A supressão do sinal do radical DPPH, pelos compostos de coordenação em investigação (compostos **(1)**-**(6)**) e composto de referência $[\text{Mn}(\text{SALEN})\text{Cl}]$, foi monitorada por EPR, empregando-se solventes prótico (etanol) e aprótico (acetonitrila). Este estudo foi conduzido para elucidar se os compostos atuam de fato por mecanismo dual, como exposto no item 6.3.1.

Os espectros obtidos para o radical DPPH após 30 e 60 min de reação com os compostos **(1)**-**(6)** e o composto de referência $[\text{Mn}(\text{SALEN})\text{Cl}]$, em solvente prótico (etanol) e aprótico (acetonitrila), são apresentados nas Figuras 35 e 36, respectivamente.

Figura 35. Espectros de EPR para o radical DPPH e reação com os compostos **(1)** – **(6)** e $[\text{Mn}(\text{SALEN})\text{Cl}]$ em etanol após 30 min (à esquerda) e 60 min (à direita) de reação. Proporção empregada no estudo: 2:1 (composto de coordenação: DPPH).

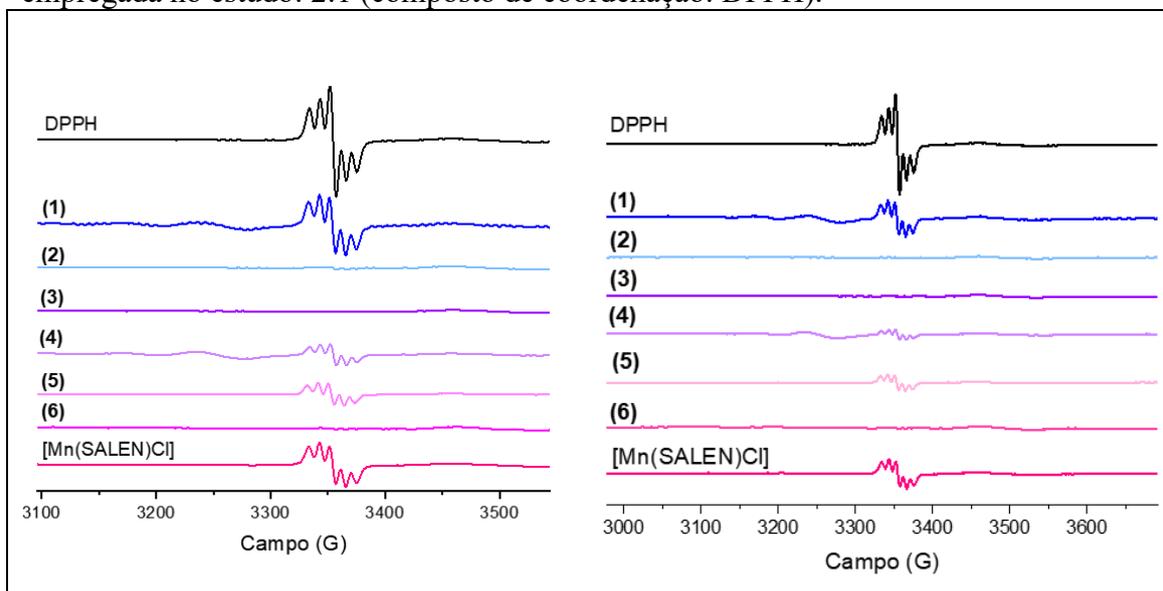
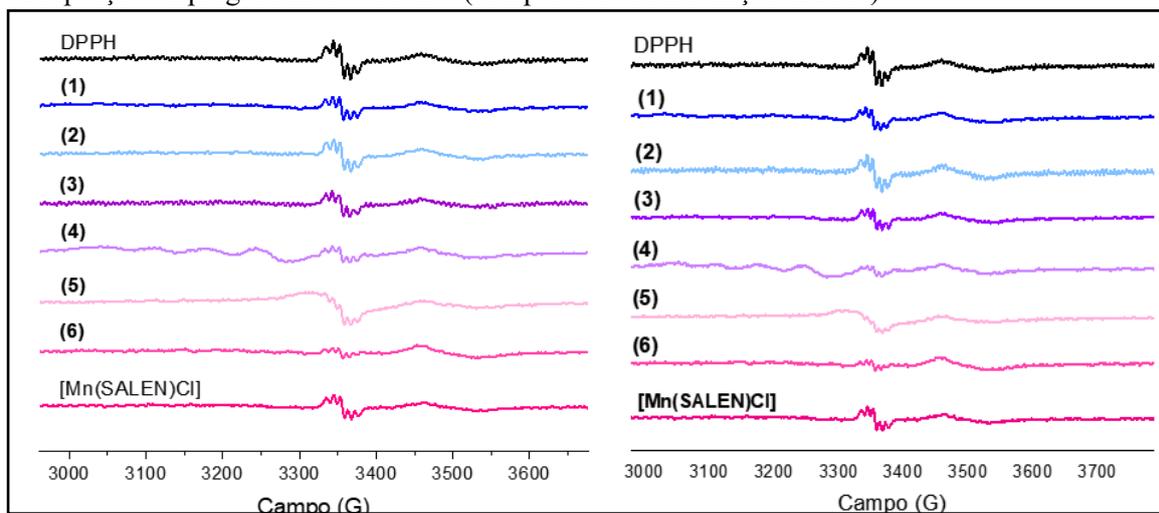


Figura 36. Espectros de EPR para o radical DPPH e reação com os compostos (1) – (6) e [Mn(SALEN)Cl] em acetonitrila após 30 min (à esquerda) e 60 min (à direita) de reação. Proporção empregada no estudo: 2:1 (composto de coordenação: DPPH).



As cinco linhas observadas no espectro de EPR são resultantes da interação entre os dois centros de N do radical DPPH (Figura 6, página 9), spin nuclear do $^{14}\text{N} = 1.42$. Os dados de % de *radical scavenging* (%RSA) para cada composto, em cada um dos solventes investigados, encontram-se na Tabela 14. Nesta tabela também são apresentados os valores da altura pico a pico da linha central inicial (h_0) e final (h_x) do radical DPPH, utilizados para o cálculo do RSA%, através da equação 15 (página 11), onde h_0 equivale a A_{DPPH} e h_x equivale a A .

Tabela 14. Valores de h_0 (altura do pico central do radical DPPH, tempo zero, sem interação com composto), h_x (altura do pico central do radical DPPH, após reação com os compostos de coordenação: 30 ou 60 min) e % RSA para os compostos (1) – (6) e para o composto de referência [Mn(SALEN)Cl]. Os estudos foram conduzidos em etanol e acetonitrila. Proporção empregada no estudo: 2:1 (composto de coordenação: DPPH).

Composto em estudo	% RSA em diferentes solventes					
	Etanol			Acetonitrila		
	h_0	h_x	RSA%	h_0	h_x	RSA%
(1)	3,05	0,9064	70,28	0,3232	0,1774	45,11
(2)		0,0266	99,13		0,311	3,77
(3)		0	100		0,1022	68,38
(4)		0,2799	90,82		0,08	75,24
(5)		0,4253	86,05		0,052	83,91
(6)		0	100		0,05	84,53
[Mn(SALEN)Cl]		0,7402	75,73		0,2053	36,48

Os valores de RSA% foram maiores em solvente prótico (etanol) para todos os compostos estudados, evidenciando o efeito do solvente na supressão do sinal do radical DPPH. Os compostos de manganês **(3)** e **(6)** apresentaram valores de RSA% de 100%, com completo desaparecimento do sinal do radical, em etanol. Adicionalmente, todos os compostos estudados, com exceção do composto de Cu^{II} **(1)**, apresentaram atividade melhor que o composto de referência [Mn(SALEN)Cl], em etanol. A ordem de capacidade de supressão do sinal do radical DPPH, para os compostos em investigação, em etanol foi **(3) = (6) > (2) > (4) > (5) > [Mn(SALEN)Cl] > (1)**.

Em solvente aprótico (acetonitrila), os compostos ainda apresentaram atividade supressora, porém, os valores de RSA% foram menores. Novamente, a maioria dos compostos apresentou atividade maior do que a do composto de referência, com exceção do composto binuclear de Fe^{III} (composto **(2)**). A ordem de capacidade de supressão do radical DPPH para os compostos, em acetonitrila, foi **(6) > (5) > (4) > (3) > (1) > [Mn(SALEN)Cl] > (2)**.

A supressão do sinal do radical DPPH em ambos os solventes indica que os mesmos atuam tanto por transferência de hidrogênio, quanto via reação redox. Sendo que a maior atividade em solvente prótico pode ser justificada por uma possível coordenação do solvente etanol ao centro metálico dos compostos (atuam como ácidos de Lewis). A interação entre o solvente prótico e o centro metálico também explica a menor atividade dos compostos de Cu^{II} nesse solvente, já que os mesmos são ácidos de Lewis mais fracos, interagindo fracamente com o solvente. Em acetonitrila, os compostos que apresentaram melhor atividade foram aqueles que possuem o oxigênio do grupo álcool e fenol protonados, podendo atuar tanto por mecanismo HT quanto por mecanismo redox, mesmo em solvente aprótico.^{39,45}

6.3.3 Estudo atividade mimética funcional à CAT via espectroscopia eletrônica dos compostos de coordenação **(1) – (6) e do composto de referência [Mn(SALEN)Cl]**

A capacidade dos compostos de coordenação **(1) – (6)** de mimetizar a atividade da metaloenzima CAT, dismutando o H₂O₂ em O₂ e H₂O através da reação $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ (Equação 9, página 6) foi estudada pela técnica de espectroscopia eletrônica na região do UV-vis e por Ressonância Paramagnética Eletrônica. Para o estudo por UV-Vis, adicionou-se uma alíquota de H₂O₂ à uma solução de cada composto, realizando-se

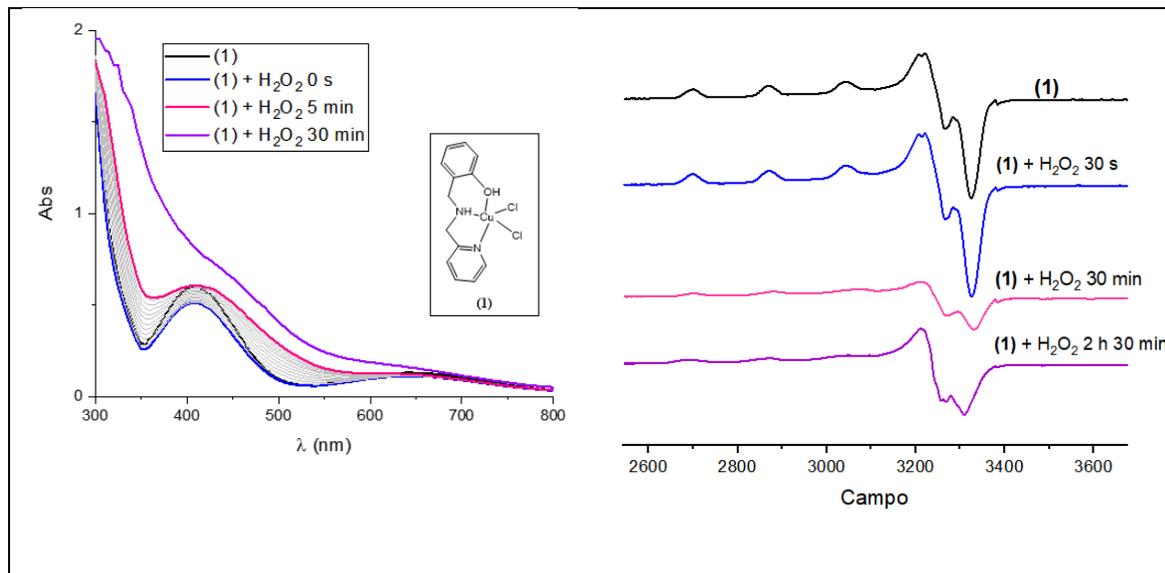
uma varredura de 12 em 12 segundos, por 5 min. O estudo via EPR foi realizado à 120 K, em tubos de 4 mm com adição de H₂O₂ à solução dos compostos em uma proporção composto:espécie reativa de 1:100, sendo as leituras realizadas a cada 30 min.

O espectro eletrônico do composto **(1)** (Figura 37), após adição de H₂O₂, mostra mudança na banda LMCT (DMSO → Cu^{II}) em 410 nm, onde em um primeiro momento há uma diminuição na sua intensidade, voltando a crescer com o tempo. No tempo final de 5 min, observa-se que a banda LMCT volta à sua intensidade original, estando mais alargada. Não houve alteração na banda d – d do composto.

O espectro de EPR para este mesmo composto **(1)** (Figura 37) apresenta sinais característicos de compostos de Cu^{II}, spin nuclear 3/2, resultando em um espectro de 4 linhas de acordo com a Equação 14 (página 10). Com a presença de sinais anisotrópicos decorrentes de alongamento no eixo z do centro metálico, onde os valores de g_{\parallel} (paralelo ao eixo de simetria) e g_{\perp} (perpendicular ao eixo de simetria) diferem significativamente.^{42, 58} Após adição de H₂O₂ (cem vezes mais concentrado) à solução do composto **(1)**, as linhas características do espectro de EPR original não desaparecem, mesmo após 2 h e 30 min de reação, ocorrendo apenas diminuição em suas intensidades.

Estas mudanças, tanto no espectro de EPR, quanto no espectro eletrônico (redução da intensidade banda LMCT e mudança da coloração da solução de verde claro para amarelo claro), podem ser atribuídas à interação direta entre o composto **(1)** e o H₂O₂, sendo esta, tempo dependente, resultando na formação de um novo complexo de Cu^{II}. Sugere-se que este processo seja catalítico.

Figura 37. Espectro eletrônico e de EPR para o composto **(1)** e resultados da interação com H_2O_2 , monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e por EPR (à direita) em função do tempo.



O espectro eletrônico para o composto binuclear de Fe^{III} **(2)** (Figura 38), apresenta deslocamento hipsocrômico da banda LMCT (fenolato $\rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$) em 520 nm para 480 nm, que pode ser atribuído à redução dos centros de Fe^{III} do composto para Fe^{II} , reação que ocorre juntamente com a decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 . O Fe^{III} que é d^5 , passa a Fe^{II} que é d^6 , diminuindo sua deficiência de elétrons, o que faz com que a energia necessária para ocorrer a transferência de carga do ligante fenolato para o centro metálico aumente, conseqüentemente a transferência é observada em menor comprimento de onda, maior energia. Essas mudanças no perfil espectral do composto, indicam interação direta do mesmo com o H_2O_2 , de acordo com as equações propostas 16-18.

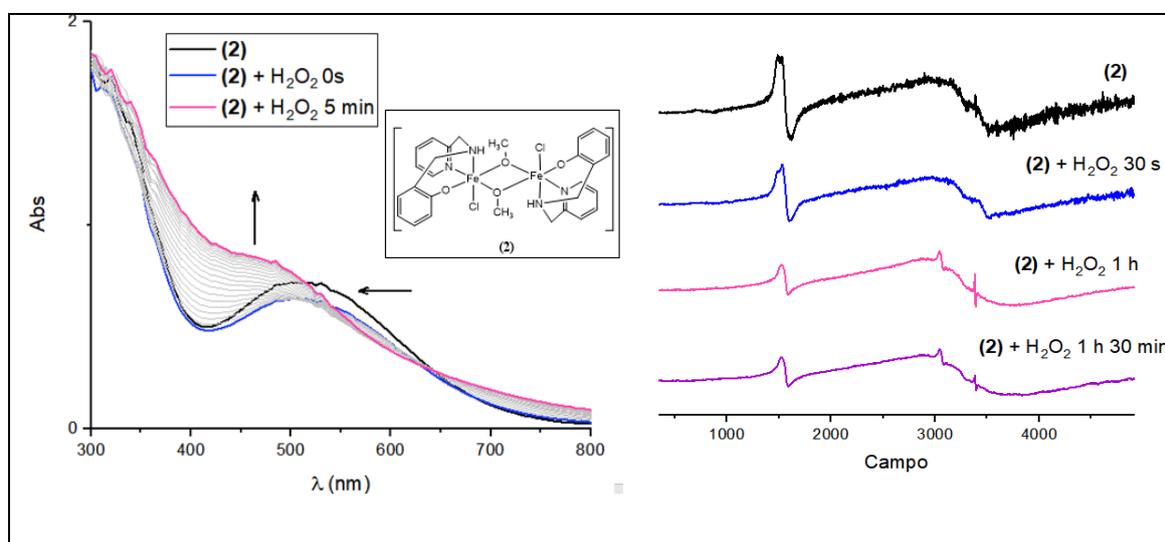
O espectro de EPR do composto **(2)** (Figura 38), apresenta sinal característico de Fe^{III} , spin nuclear = 0, resultando em uma linha (Equação 14, página 10)⁴² além de outro sinal largo e menos resolvido na região de 3000 a 3500 G, que é comum em espectros de EPR de compostos de ferro, atribuído à presença de agregados de óxido de ferro hidratados. O sinal característico de Fe^{III} perde intensidade com o tempo após adição de H_2O_2 , indicando redução do mesmo para Fe^{II} , estando em acordo com o que foi observado no estudo via espectro eletrônico. Observa-se também um novo sinal de baixa intensidade a partir de 1 h de reação, que pode estar relacionado ao surgimento de um radical orgânico, como radical fenolato em solução, estando concomitantemente relacionado à redução do centro de Fe^{III} à Fe^{II} pelo H_2O_2 .⁵⁸ A solução do composto, ao

interagir com H_2O_2 apresenta formação de bolhas, além de uma mudança na sua coloração, de um vermelho vinho para um vermelho alaranjado.

Equações 16, 17 e 18. Proposta de interação entre o composto **(2)** e o H_2O_2 .



Figura 38. Espectro eletrônico e de EPR para o composto **(2)** e resultados da interação com H_2O_2 , monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e por EPR (à direita), em função do tempo.



A interação do composto de valência mista de Mn^{II} e Mn^{III} **(3)** com o H_2O_2 é observada pelo aparecimento de uma nova banda em 390 nm em seu espectro eletrônico (Figura 39), que pode ser atribuída à transferência de carga do O_2^{2-} do peróxido para o centro de Mn^{III} , que se reduz à Mn^{II} . Essa redução provoca o desaparecimento da banda LMCT característica do composto original em 335 nm, que é atribuída à transferência de carga fenolato $\rightarrow \text{Mn}^{\text{III}}$. Adicionalmente, a banda em 500 nm, também atribuída à transferência de carga fenolato $\rightarrow \text{Mn}^{\text{III}}$ sofre uma diminuição na sua intensidade, desaparecendo completamente ao final da reação (após 30 min). A banda em 390 nm diminui de intensidade com o tempo, devido ao consumo da espécie de H_2O_2 .

O espectro de EPR para esse mesmo composto (Figura 39), que de acordo com sua estrutura de raios-X apresenta espécies de Mn^{II} e Mn^{III} em sua estrutura, mostra sinal característico de Mn^{II} de baixa intensidade, spin nuclear = 5/2, resultando em 6 linhas de acordo com a Equação 14 (página 10). A baixa resolução dos sinais é comum

para esta espécie, que necessita de um EPR de maior frequência para a obtenção de uma melhor resolução.⁴² Sinais de Mn^{III} não são observados através desta técnica, devido ao número par de elétrons presentes em orbitais d desse cátion. Após adição de H₂O₂ à solução do composto, os sinais característicos de Mn^{II} aumentam de intensidade e continuam a crescer com o tempo. Essas mudanças, juntamente com o que foi observado através do espectro eletrônico, indicam a redução do centro de Mn^{III} e aumento das espécies de Mn^{II} do composto de coordenação **(3)** em solução, o que pode ocorrer devido à reação de decomposição do H₂O₂ pelo composto, de acordo com as reações 19 - 21. A coloração inicial da solução é marrom escura, quase preta, ao ser adicionado H₂O₂ ocorre a descoloração da mesma, resultando em uma solução mais clara.

Equações 19, 20 e 21. Proposta de interação entre o composto **(3)** e o H₂O₂.

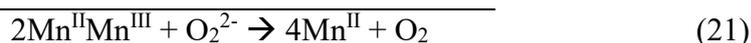
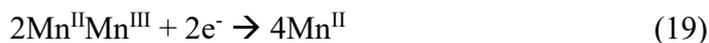
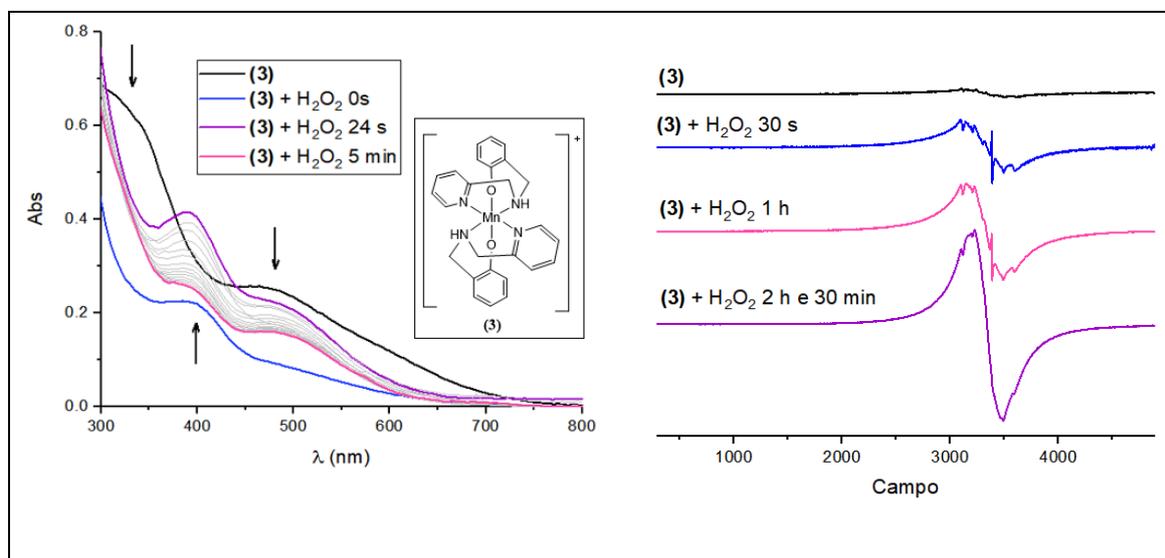


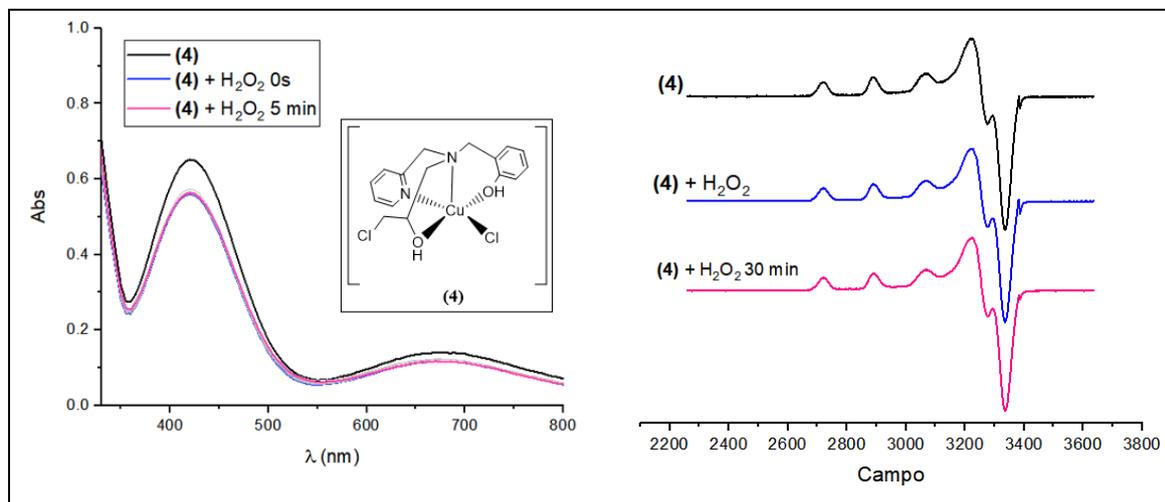
Figura 39. Espectro eletrônico e de EPR para o composto **(3)** e resultados da interação com H₂O₂, monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e por EPR (à direita), em função do tempo.



Para o composto **(4)**, não foi observado interação com a espécie reativa H₂O₂, sendo que ambos os espectros, eletrônico e de EPR, não mostraram nenhuma mudança no seu perfil original após a adição de H₂O₂ à solução do composto (Figura 40). O espectro de EPR confirmou a estrutura mononuclear de Cu^{II} do composto, através das 4

linhas características dessa espécie. A leve redução na intensidade das bandas em seu espectro eletrônico é atribuída ao efeito de diluição.

Figura 40. Espectro eletrônico e de EPR para o composto de coordenação **(4)** e resultados de interação com H_2O_2 monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e por EPR (à direita), em função do tempo.



A interação do composto **(5)** com o H_2O_2 foi comprovada pelo completo desaparecimento da banda de transferência de carga fenolato $\rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$ em 450 nm do espectro eletrônico original (Figura 41). O espectro original de EPR para o composto **(5)** apresenta sinais característicos de Fe^{III} que diminuem com o tempo após a adição de uma solução de H_2O_2 (Figura 41). Mesmo após duas horas de reação, ainda há sinais residuais de Fe^{III} presentes no espectro de EPR, sendo que o sinal em 836 G e o ombro em 1264 G desaparecem completamente, o que indica, juntamente com as mudanças no espectro eletrônico, que ocorrem mudanças na estrutura e no estado de oxidação do centro metálico do complexo, devido à interação direta do mesmo com as espécies de H_2O_2 em solução (Equações 22 - 24). O centro de Fe^{III} do composto, ao receber um elétron da espécie reativa H_2O_2 , se reduz à Fe^{II} o que faz com que a transferência $\text{L} \rightarrow \text{M}$ desapareça e o sinal característico de Fe^{II} diminua no espectro de EPR. Este é um processo não catalítico, não havendo regeneração do composto ao final da reação. A interação também pode ser observada através da mudança de cor da solução do composto, que muda de azul intenso (geralmente decorrente da transferência de carga do fenolato para o metal), para laranja avermelhado.

Equações 22, 23 e 24. Proposta de interação entre o composto **(5)** e o H_2O_2 .

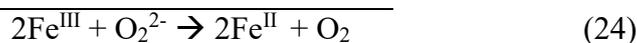
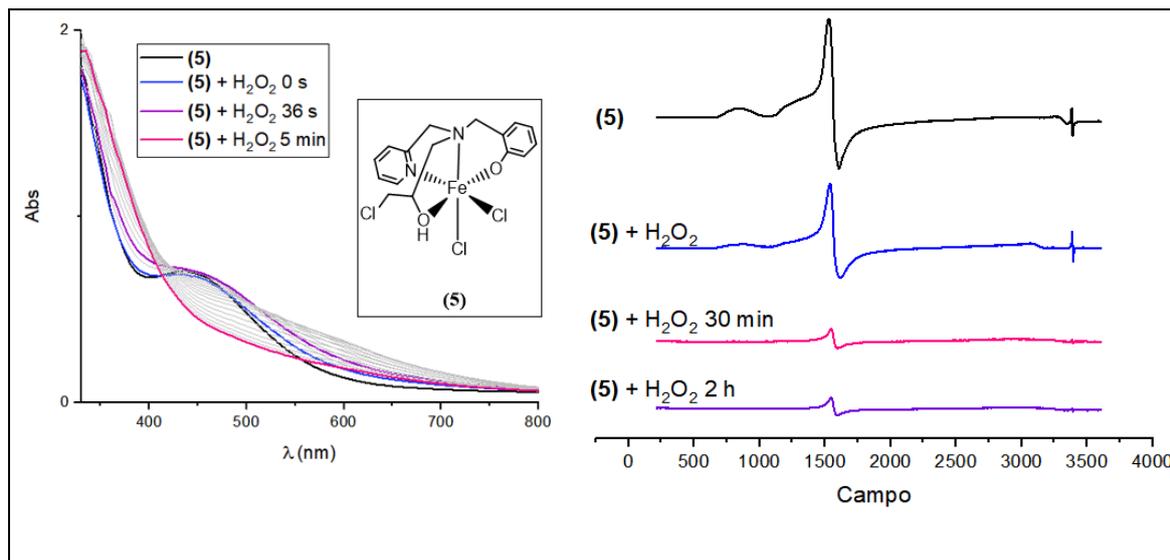


Figura 41. Espectro eletrônico e de EPR para o composto de coordenação **(5)** e interação com H_2O_2 monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e por EPR (à direita), em função do tempo.



Para o composto binuclear de valência mista $\text{Mn}^{\text{II}}/\text{Mn}^{\text{III}}$ **(6)**, observa-se um aumento seguido de diminuição da intensidade da banda LMCT em 485 nm do seu espectro eletrônico (Figura 42), além de um aumento na banda em 335 nm, atribuída à transferência de carga $\text{Cl} \rightarrow \text{Mn}^{\text{II}}$. O espectro de EPR do composto apresenta seis linhas que são características de íons de Mn^{II} , condizente com seu centro metálico binuclear de $\text{Mn}^{\text{II}}/\text{Mn}^{\text{III}}$ (Figura 42). O íon de Mn^{III} não apresenta sinal. O resultado é um espectro de composto mononuclear de Mn^{II} , devido à dissociação do composto em solução, formando espécies mononucleares de Mn^{II} e Mn^{III} . Após a adição de H_2O_2 (100 vezes mais concentrado), o perfil espectral não muda, mesmo após 20 min de reação, o que se observa é uma mudança na intensidade dos sinais, que aumenta com o tempo. Adicionalmente, observa-se mudança na cor da solução, de marrom avermelhado para incolor, além da formação de bolhas. Essas mudanças, em conjunto com o que foi observado no estudo da interação com H_2O_2 por UV-Vis, sugerem aumento das espécies de Mn^{II} e diminuição das espécies de Mn^{III} em solução. Com base nessas observações, acredita-se que o peróxido de hidrogênio está reagindo apenas com o centro de Mn^{III} do

composto, que por não possuir sinais no espectro de EPR, não pode ser observado. Complementarmente o aumento da intensidade dos sinais de Mn^{II} pode indicar aumento dessa espécie em solução, através da redução do Mn^{III} a Mn^{II} de acordo com as Equações 25 – 27.

Equações 25, 26 e 27. Proposta de interação entre o composto (6) e o H_2O_2 .

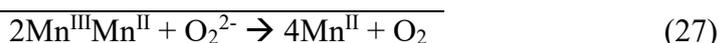
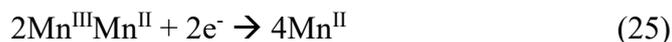
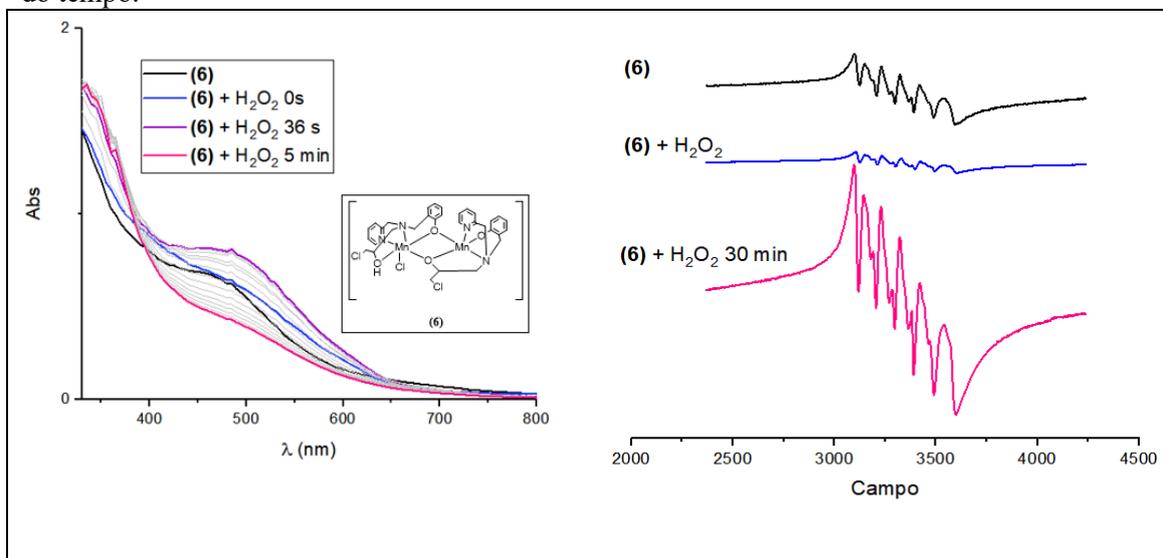


Figura 42. Espectro eletrônico e de EPR para o composto (6) e resultados da interação com H_2O_2 , monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e por EPR (à direita), em função do tempo.



Estes estudos também foram realizados utilizando-se o composto de Mn^{III} , amplamente estudado, $[\text{Mn}(\text{SALEN})\text{Cl}]$, o qual, tal qual os compostos estudados no presente trabalho, é um composto de coordenação que possui ligantes com grupos N,O-doadores. Os resultados obtidos para este composto foram utilizados como parâmetro de referência na avaliação da eficiência dos compostos de coordenação (1) – (6).

O espectro de EPR original do composto não apresenta sinal (Figura 43), o que condiz com a estrutura desse complexo, que possui centro de Mn^{III} , que é silencioso no EPR. Após a reação com H_2O_2 , observa-se o aparecimento de sinais característicos de espécies de Mn^{II} , sugerindo a redução do centro metálico. Essa interação pode ser observada também no espectro eletrônico (Figura 43), onde ocorre a diminuição na intensidade da banda em λ 400 nm, que é atribuída à transferência de carga $\text{Cl} \rightarrow \text{Mn}^{\text{III}}$.

Com a redução do centro metálico a Mn^{II} , essa transferência deixa de ocorrer. (Equações 28 – 30). A coloração da solução muda de marrom escura para marrom bem clara, quase incolor.

Equações 28, 29, 30. Proposta de interação entre o composto de referência $[Mn(SALEN)Cl]$ e o H_2O_2 .

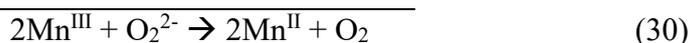
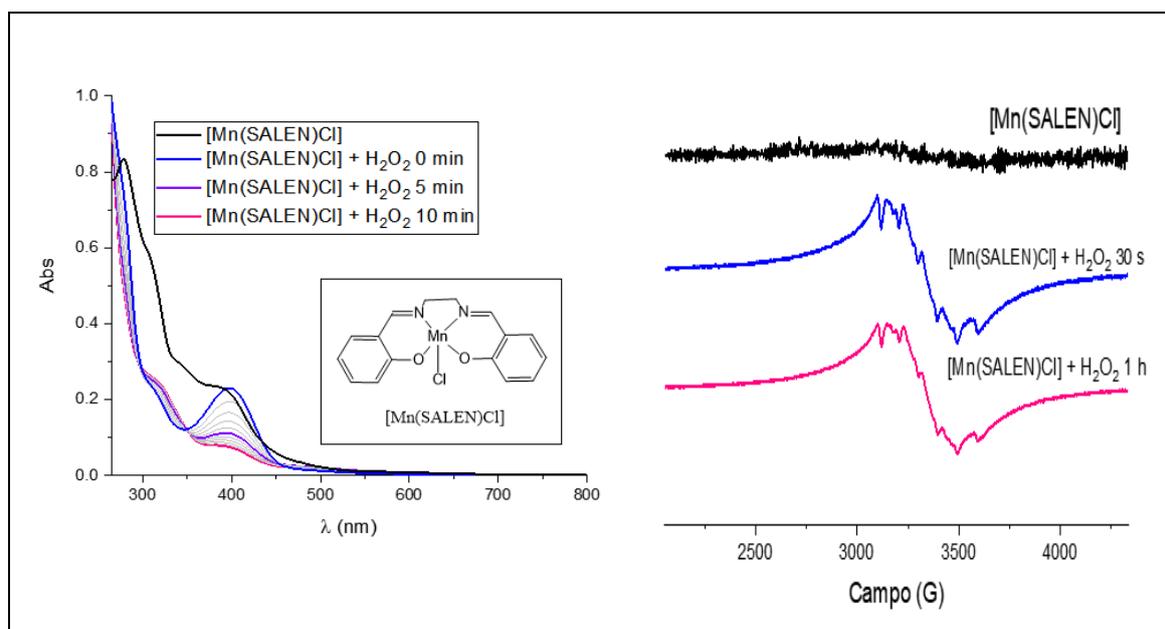


Figura 43. Espectro eletrônico e de EPR para o composto de referência $[Mn(SALEN)Cl]$ e resultados da interação com H_2O_2 , monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e por EPR (à direita), em função do tempo.



6.3.4 Estudo da atividade mimética funcional à SOD dos compostos de coordenação (1) – (6) e do composto de referência $[Mn(SALEN)Cl]$, monitorada por espectroscopia eletrônica

A capacidade dos compostos (1) ao (6) de mimetizar a atividade da metaloenzima SOD, dismutando o ânion radical $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 , foi estudada pela técnica de espectroscopia eletrônica na região do UV-vis, através da titulação de uma solução de cada composto ((1) – (6)), em DMSO, com uma solução de KO_2 também em

DMSO, para obtenção do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e por EPR através da adição de diferentes concentrações de uma solução de KO_2 à soluções contendo os compostos de coordenação e monitorando-se a reação. Os espectros de EPR foram obtidos a 120K. O spin nuclear do ^{16}O é 0, resultando em uma linha no espectro de EPR, de acordo com a Equação 14 (página 10). O espectro característico para o $O_2^{\cdot-}$ apresenta uma linha g_{\perp} e uma linha g_{\parallel} , referente à interação dos dois centros de ^{16}O com simetria axial divergente entre as linhas de g_{\parallel} e g_{\perp} . Os sinais são frequentemente de baixa resolução devido ao alargamento das bandas.^{42, 60} Os compostos de Cu^{II} (**1**) e (**4**), apresentam comportamento similar ao reagir com o radical $O_2^{\cdot-}$. Ambos os compostos apresentaram deslocamento da banda d – d característica para um λ de maior energia, de 680 para 650 nm para o composto (**1**) (Figura 44) e de 710 para 680 nm para o composto (**4**) (Figura 45). Conforme a concentração de $O_2^{\cdot-}$ em solução foi aumentando, também foi observado o aparecimento de uma banda em 430 nm, que no composto (**1**) cresce até a proporção 2:1, decrescendo com adição de KO_2 após esse ponto, formando dois pontos isobésticos em 414 e 375 nm. Esta nova banda, pode ser atribuída à transferência de carga $L \rightarrow M$ direta do $O_2^{\cdot-}$ para o centro de Cu^{II} , tanto no composto (**1**), quanto no composto (**4**).

Através dos espectros de EPR, é possível observar a interação entre a solução dos compostos (**1**) (Figura 44) e (**4**) (Figura 45) em DMSO e a solução de KO_2 também em DMSO, pelo desaparecimento gradual dos sinais anisotrópicos típicos de centros de Cu^{II} , em consequência do aumento da concentração de espécies de $O_2^{\cdot-}$ em solução. Também se constata a formação de um intermediário, com aparecimento de novos sinais entre 3200 e 3300 G, nas proporções 1:8 e 1:10 para o composto (**1**) e 1:4 e 1:5 para o composto (**2**). Essas mudanças espectrais podem estar atreladas à formação de um composto binuclear de $Cu^I Cu^I$, com os centros metálicos ligados através de uma coordenação com a espécie O_2^{2-} , formada a partir da interação do centro de Cu^{II} com o $O_2^{\cdot-}$ observada nos espectros eletrônicos. O deslocamento da banda d-d para uma região de maior energia corrobora essa interpretação, estando relacionado com o aumento da quantidade de ligantes de campo forte na esfera de coordenação do composto, com a formação de uma ponte oxo entre os centros de Cu^I , aumentando o Δo dos orbitais d do centro de cobre. O sinal característico do radical $O_2^{\cdot-}$ é observado apenas com excesso de KO_2 em solução.

As equações propostas para a interação entre ambos os compostos (**1**) e (**4**) com o radical $O_2^{\cdot-}$ estão representadas abaixo (Equações 31 – 34).

Equações 31, 32, 33 e 34. Proposta de interação entre o composto (1) e o $O_2^{\cdot-}$.

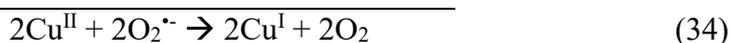
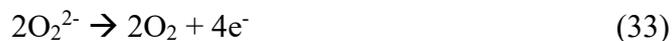


Figura 44. Espectro eletrônico e de EPR para a reação entre o composto de coordenação (1) e interação com diferentes proporções de $O_2^{\cdot-}$ em DMSO, monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e EPR (à direita).

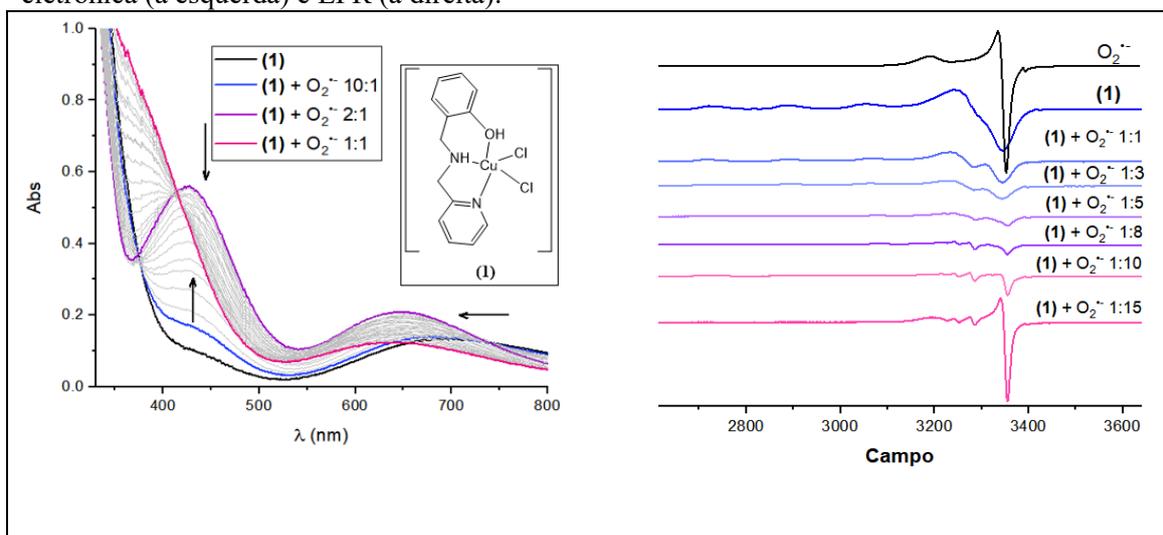
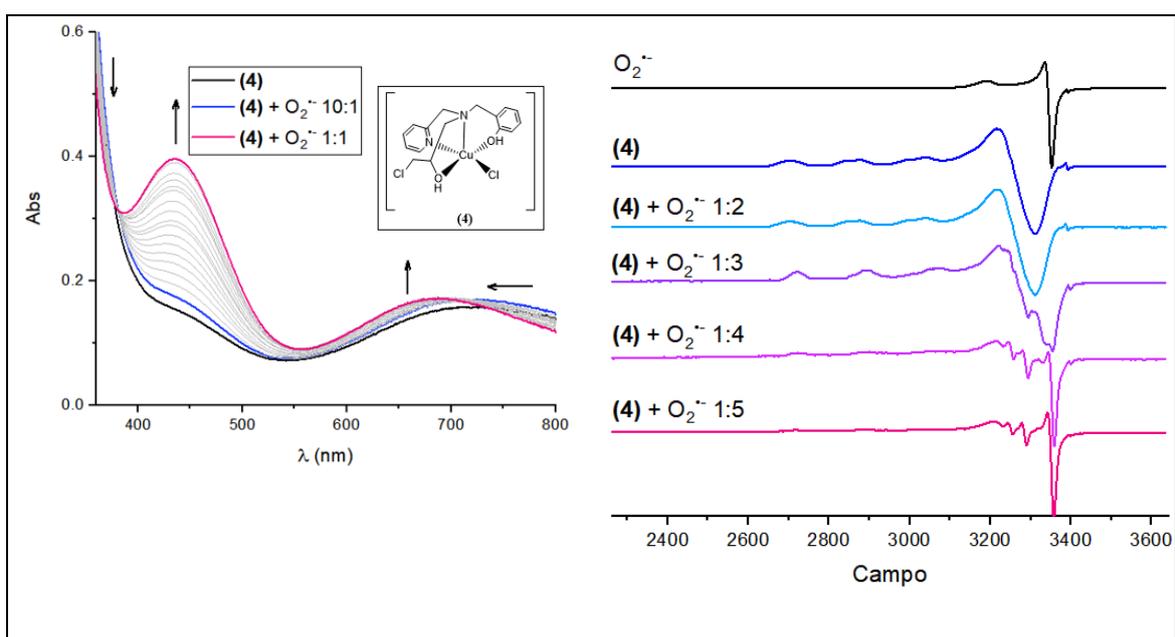


Figura 45. Espectros eletrônico e de EPR para a reação entre o composto de coordenação (4) e interação com diferentes proporções de $O_2^{\cdot-}$ em DMSO, monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e EPR (à direita).



Na reação entre o composto **(2)** e o KO_2 , a banda LMCT do espectro eletrônico atribuída à transferência de carga do fenolato para o centro de Fe^{III} do composto original em 535 nm sofre deslocamento hipsocrômico à medida que a concentração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ em solução aumenta (Figura 46). Para 504, 440 e 415 nm nas proporções 1:1, 1:3 e 1:10 respectivamente, além de haver uma diminuição na sua intensidade concomitantemente com esse deslocamento. Adicionalmente, observa-se redução na banda em 325 nm, atribuída à transferência de carga LMCT do $\text{DMSO} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$.

O espectro de EPR do composto **(2)** (Figura 46) apresenta sinal característico de Fe^{III} que desaparece a partir da proporção composto: KO_2 de 1:2. Na proporção 1:1, ainda é possível observar a presença de íons Fe^{III} do composto em solução, sem haver a presença do sinal de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Essas mudanças, em conjunto com as mudanças observadas no espectro eletrônico para este composto, quando na presença de KO_2 , mostram redução do centro de Fe^{III} do composto para Fe^{II} . A interação pode ser considerada imediata, frente ao radical superóxido, mas não catalítica, levando a inativação do composto de partida de Fe^{III} . A solução do muda de azul intenso (decorrente da transferência fenolato $\rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$) para laranja claro. A proposta de interação desse composto com o ânion radical superóxido encontra-se nas Equações 35 – 38.

Equações 35, 36, 37 e 38. Proposta de interação entre o composto **(2)** e o $\text{O}_2^{\cdot-}$.

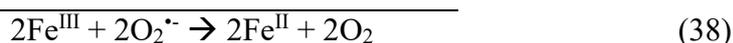
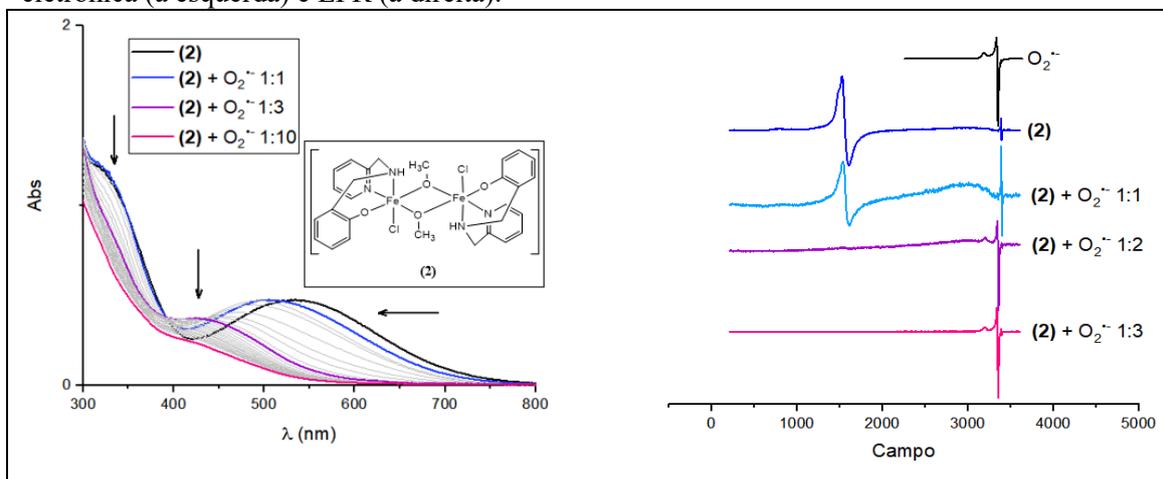


Figura 46. Espectro eletrônico e de EPR para a reação entre o composto de coordenação **(2)** e interação com diferentes proporções de $\text{O}_2^{\cdot-}$ em DMSO, monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e EPR (à direita).



Para o composto **(3)**, a interação com o $O_2^{\cdot-}$ é evidenciada através do completo desaparecimento das bandas características do espectro original em 545 e 335 nm, ambas atribuídas à transferência de carga fenolato $\rightarrow Mn^{III}$, mostrando que há mudança no estado de oxidação do centro metálico do composto (Mn^{III}), com a provável redução do mesmo para Mn^{II} , aumentando a quantidade dessa espécie em solução, que não apresenta bandas na região do visível, de acordo com equações 35 – 38 (Figura 47).

O composto **(3)** com espécies de Mn^{II} e Mn^{III} , apresenta 6 linhas características de espécies de Mn^{II} em seu espectro original (Figura 47). Este sinal desaparece completamente com a adição de KO_2 , indicando oxidação à Mn^{III} . Apesar do centro de Mn^{III} não poder ser observado no espectro de EPR, a interação do composto com o $O_2^{\cdot-}$ é constatada pelo desaparecimento dos sinais de Mn^{II} e pelo fato de não haver sinal característico dessa espécie reativa no espectro na proporção 1:1. Ao aumentar a proporção de $O_2^{\cdot-}$ em solução (1:2), observa-se o aparecimento do sinal de $O_2^{\cdot-}$, indicando a saturação e inativação do composto **(3)** (Equações 39 – 42). A esfera de coordenação contendo 6 ligantes, sem a presença de ligantes lábeis, dificulta a interação com o ânion radical superóxido.

Equações 39, 40, 41 e 42. Proposta de interação entre o composto **(3)** e o $O_2^{\cdot-}$.

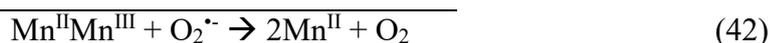
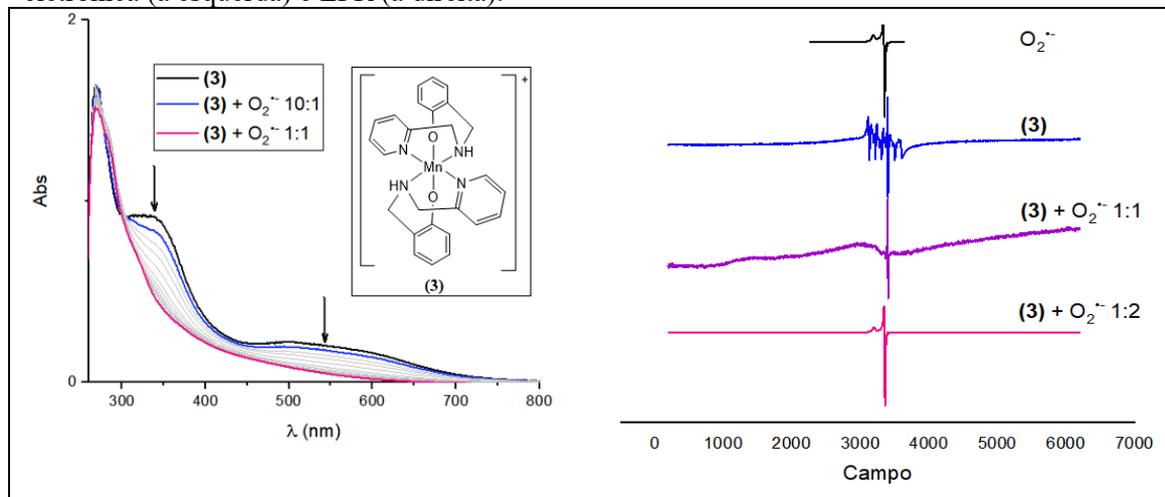


Figura 47. Espectro eletrônico e de EPR para a reação entre o composto de coordenação **(3)** e interação com diferentes proporções de $O_2^{\cdot-}$ em DMSO, monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e EPR (à direita).



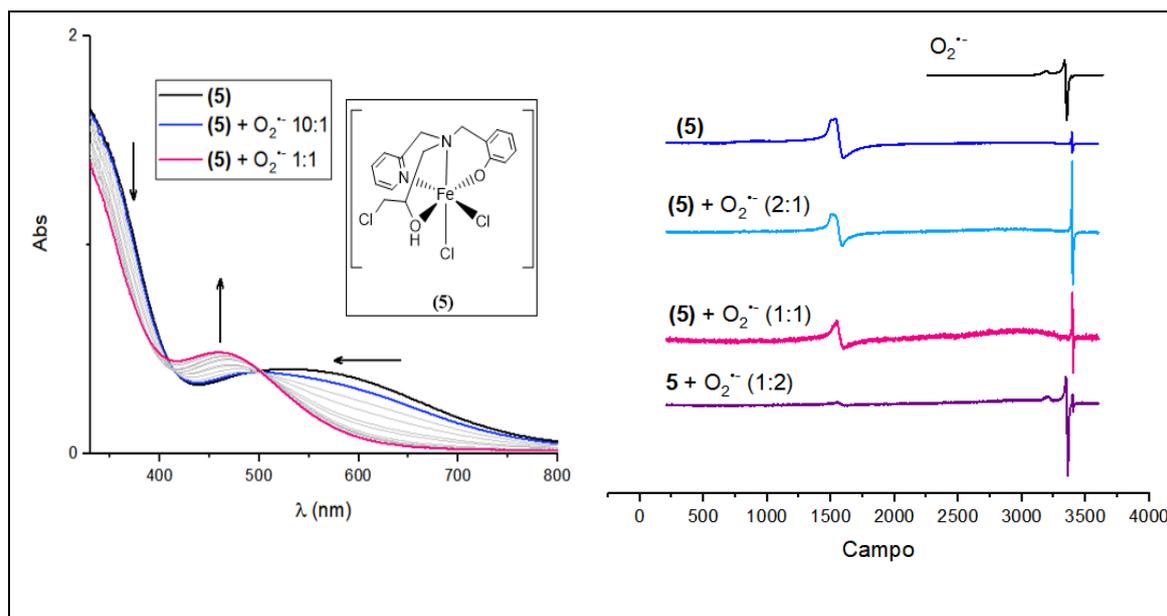
A interação do composto **(5)** com o $O_2^{\cdot-}$ provoca diminuição da banda em 550 nm atribuída à transferência de carga LMCT do fenolato para o centro de Fe^{III} , com surgimento de uma banda em 465 nm, que pode ser atribuída à transferência de carga $M \rightarrow L$, do Fe^{II} para a piridina (Figura 48). Concomitantemente, observa-se diminuição da banda atribuída à transferência $Cl \rightarrow Fe^{III}$, devido à perda desse ligante com a redução do Fe^{III} para Fe^{II} . Observa-se também a formação de dois pontos isobásticos em 500 e 410 nm. Essas mudanças são atribuídas à reação de redução do Fe^{III} (d^5) para Fe^{II} (d^6) (Equações 43 - 46), com mudança na coloração da solução de azul intenso para laranja.

O estudo via EPR para este composto (Figura 48), semelhante aos resultados que foram obtidos para o composto **(2)**, ambos com centros de Fe^{III} , indica diminuição na intensidade do sinal do composto de partida, com total desaparecimento do mesmo na proporção 1:2, quando há excesso de $O_2^{\cdot-}$ em solução. Nesta proporção também aparece o sinal característico do superóxido.

Equações 43, 44, 45 e 46. Proposta de interação entre o composto **(5)** e o $O_2^{\cdot-}$.



Figura 48. Espectro eletrônico e de EPR para a reação entre o composto de coordenação **(5)** e interação com diferentes proporções de $O_2^{\cdot-}$ em DMSO, monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e EPR (à direita).



Por fim, a titulação com KO_2 para o composto de $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Mn}^{\text{III}}$ (**6**), mostra diminuição da intensidade da banda LMCT característica do composto em 475 nm, atribuída à transferência de carga fenolato $\rightarrow \text{Mn}^{\text{III}}$, e aumento da absorção na região do UV, 350 nm (Figura 49). O estudo realizado da interação do composto com o $\text{O}_2^{\cdot-}$ através do tempo, inicialmente mostra um aumento na intensidade dessa mesma banda. Essas mudanças sugerem que no início da reação, o centro de Mn^{II} do composto é oxidado à Mn^{III} , mantendo as bandas associadas ao seu centro de Mn^{III} , o que justifica a estabilidade do espectro nas primeiras adições de KO_2 à solução e aumento da banda associada à transferência fenolato $\rightarrow \text{Mn}^{\text{III}}$ no estudo com concentração fixa e variação de tempo. A oxidação do composto é corroborada pelos estudos de EPR (Figura 49), onde na proporção 2:1, com excesso de composto, a intensidade dos sinais diminui, sem aparecimento de sinal característico de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Em uma proporção 1:1, não é observado sinal nem do composto nem da espécie radicalar, o que indica oxidação do centro de Mn^{II} para Mn^{III} que não apresenta sinal no EPR. Os centros de Mn^{III} formados podem ainda ser reduzidos à Mn^{II} pela presença de espécies de O_2^{2-} formadas pela redução do $\text{O}_2^{\cdot-}$, interação confirmada pelo estudo da interação do composto (**6**) com o H_2O_2 (Figura 49) e desaparecimento das bandas do espectro eletrônico associadas ao centro de Mn^{III} .

O sinal do ânion superóxido só é observado quando há um excesso de $\text{O}_2^{\cdot-}$ em solução, em uma proporção de 1:10. Quando há excesso de composto em comparação à espécie radicalar $\text{O}_2^{\cdot-}$, em uma proporção 20:1, é possível ser observada a formação de um composto $\text{Mn}^{\text{III}}-(\mu\text{-O})\text{-Mn}^{\text{IV}}$, através do aparecimento das 16 linhas características desse composto de alta valência, no espectro de EPR, indicando dessa forma a oxidação dos centros de $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Mn}^{\text{III}}$ à $\text{Mn}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{IV}}$. Essas linhas são resultantes de um emparelhamento com grande troca antiferromagnética e baixa anisotropia entre os centros de Mn^{III} e Mn^{IV} . O operador total de spin (n), dado por $ST = S1 + S2$, é igual 3 ($S1 = 2$ e $S2 = 3/2$), resultando em 16 linhas (Equação 14, página 10).⁶¹ A solução do composto que era marrom avermelhado se tornou quase incolor, indicando ainda redução dos centros de manganês a Mn^{II} , porém, não é possível observar a regeneração das espécies de Mn^{II} no espectro de EPR. A proposta de reação para este composto com o $\text{O}_2^{\cdot-}$ encontra-se nas equações 47 – 51.

Equações 47, 48, 49, 50 e 51. Proposta completa da interação entre o composto **(6)** com o $O_2^{\cdot-}$.

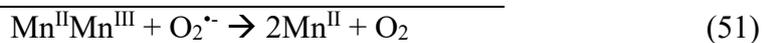
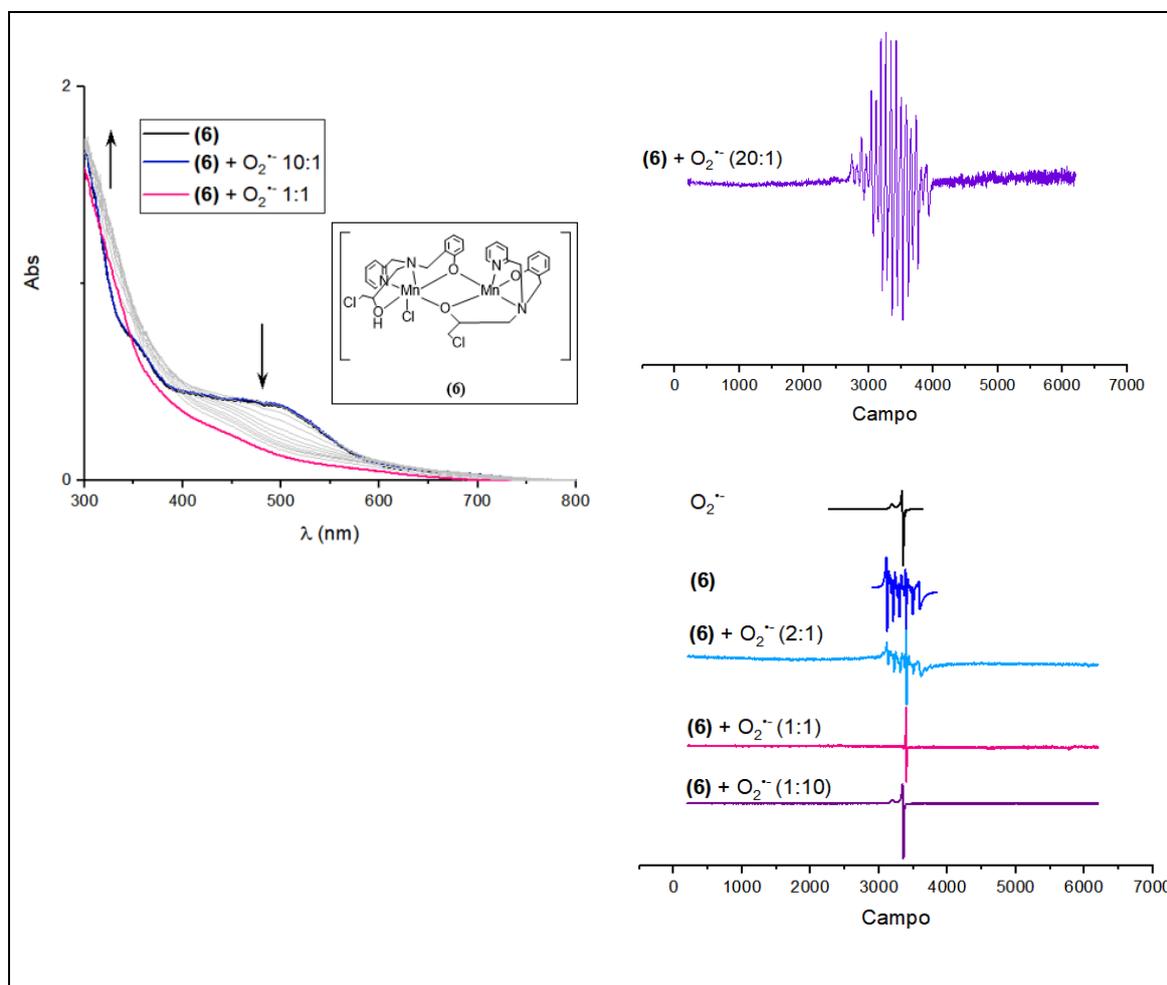


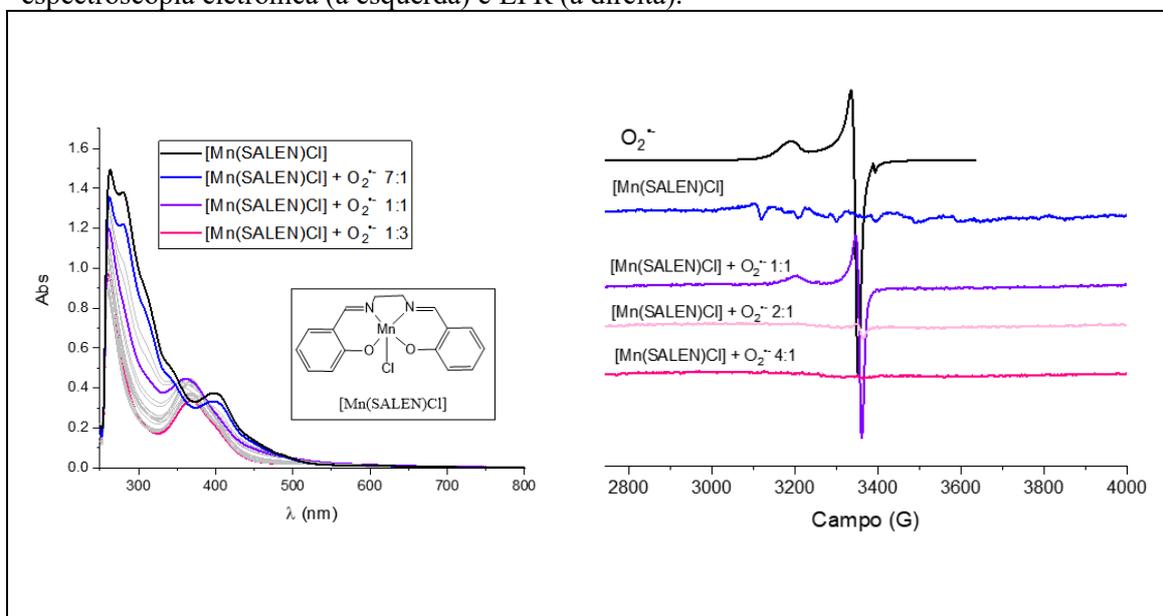
Figura 49. Espectro eletrônico e de EPR para a reação entre o composto de coordenação **(6)** e interação com diferentes proporções de $O_2^{\cdot-}$ em DMSO, monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e EPR (à direita).



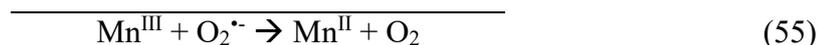
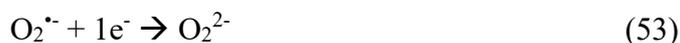
O composto de referência $[Mn(SALEN)Cl]$, não apresenta sinal no seu espectro original de EPR. O sinal do radical diminui conforme a proporção de composto aumenta em relação ao radical (Figura 50). O espectro eletrônico indica a redução do centro metálico a Mn^{II} , porém essas espécies não são observadas no espectro de EPR, o que

pode indicar uma reação catalítica e de alta cinética, com rápida regeneração do centro de Mn^{III} , que não possui sinal no EPR. (Equações 52 – 55).

Figura 50. Espectro eletrônico e de EPR para a reação entre o composto de referência **[Mn(SALEN)Cl]** e interação com diferentes proporções de $O_2^{\cdot-}$ em DMSO, monitorados por espectroscopia eletrônica (à esquerda) e EPR (à direita).

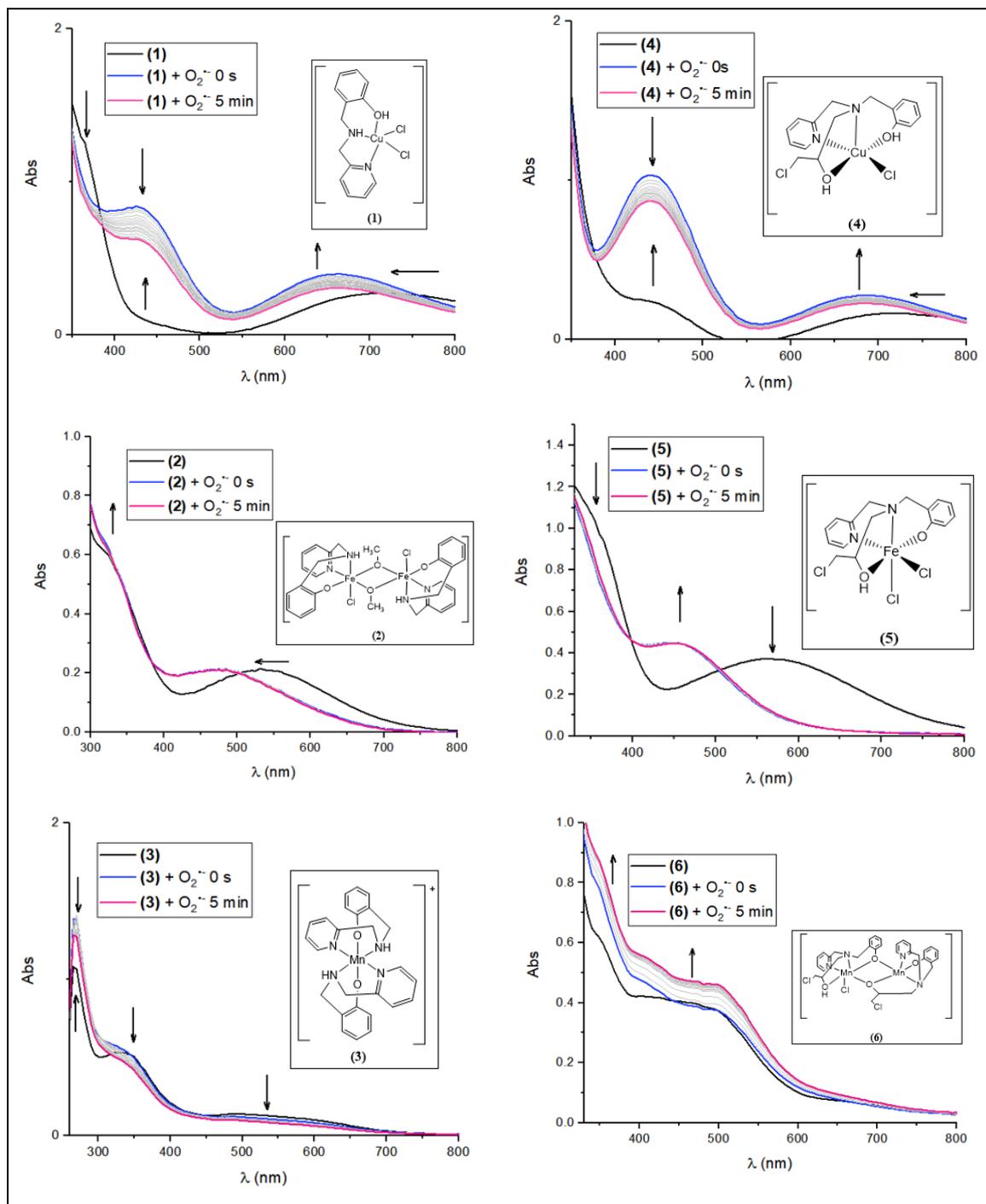


Equações 52, 53, 54, 55. Proposta para a interação entre o composto de referência **[Mn(SALEN)Cl]** e $O_2^{\cdot-}$.



O estudo da interação dos compostos com o $O_2^{\cdot-}$ também foi realizado em função do tempo, com varreduras de 12 em 12 s até 5 min, utilizando-se técnica semelhante à utilizada com o H_2O_2 . Os espectros eletrônicos obtidos neste experimento apresentaram mudanças espectrais similares às aquelas obtidas na titulação com KO_2 . Sendo que as mudanças mais significativas ocorreram no tempo zero, indicando que a reação com o $O_2^{\cdot-}$ é imediata (Figura 51)

Figura 51. Espectros eletrônicos para os compostos (1) – (6), resultantes da interação destes com uma alíquota única de 100 μL de KO_2 (2mM), em função do tempo, em DMSO.

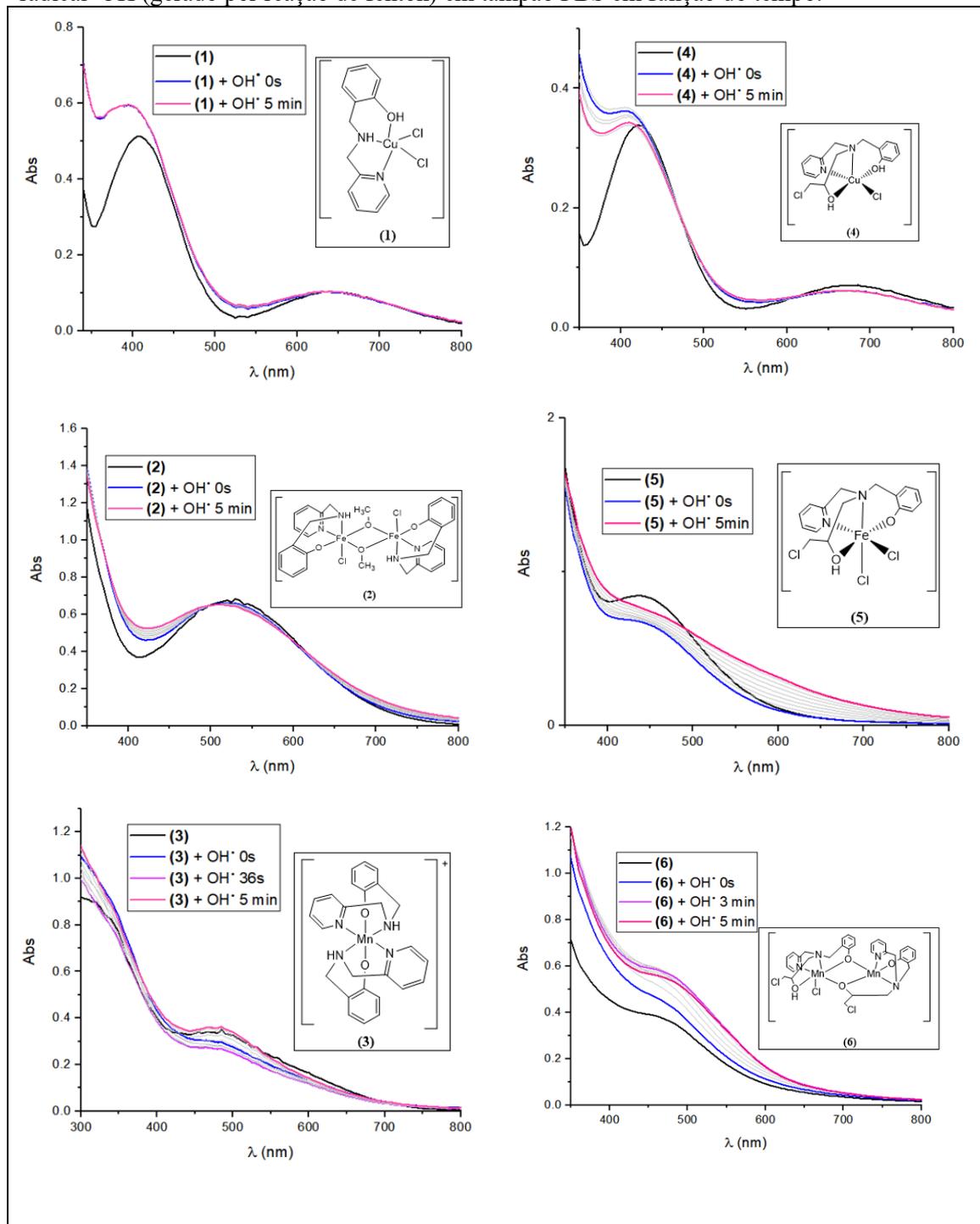


6.3.5 Estudo da supressão do sinal do radical $\cdot\text{OH}$ promovida pelos compostos de coordenação (1)-(6) e monitorado por espectroscopia eletrônica

A capacidade dos compostos de coordenação (1) – (6) de capturar o radical $\cdot\text{OH}$ também foi avaliada através da técnica de espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis (Figura 52). Uma solução de sulfato ferroso amoniacal ($[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

com H_2O_2 foi utilizada para formação do radical OH^\bullet (Equação 3, página 4) e adicionada a uma solução dos compostos de coordenação. A leitura foi realizada de 12 em 12 s até 5 min.

Figura 52. Espectros eletrônicos dos compostos (1) – (6) e resultados da interação com o radical OH^\bullet (gerado por reação de fenton) em tampão PBS em função do tempo.



Em geral, foram observadas poucas mudanças no espectro eletrônico original do composto no estudo da interação com o radical OH^\bullet , não havendo a possibilidade de

confirmação de que a reação estaria ocorrendo com o $\cdot\text{OH}$ ou com excesso de H_2O_2 em solução. Por esse motivo, além da instabilidade do radical $\cdot\text{OH}$ gerado pela reação de Fenton em solução, espectroscopia eletrônica pode não ser o melhor método para estudo da reatividade dos compostos de coordenação com essa espécie reativa. Dessa forma, os dois compostos que apresentaram melhor atividade **(3)** e **(6)** foram selecionados para prosseguir com este estudo através da técnica de EPR, utilizando *spin trap* DMPO.

6.3.6 Estudo da capacidade de supressão do sinal do radical $\cdot\text{OH}$ promovida pelos compostos de coordenação **(3)** e **(6)** e monitorada por EPR

Os compostos mais promissores **(3)** e **(6)** foram avaliados do ponto de vista da capacidade de supressão do sinal do radical $\cdot\text{OH}$, empregando-se a técnica de EPR. Os resultados foram comparados com os resultados obtidos para o composto de referência **[Mn(SALEN)Cl]**. A supressão do radical hidroxil (%RSA) foi calculada através da Equação 15 (página 11). Um gráfico da concentração dos compostos *versus* a %RSA calculada foi obtido e a regressão logarítmica foi realizada (Figura 53), para cálculo da IC_{50} , para cada composto. A IC_{50} é definida como a concentração de composto necessária para inibir 50%, nesse caso, do sinal do radical.⁶² Os dados obtidos nesse experimento encontram-se nas Tabelas 15 e 16 e os espectros de EPR resultantes da interação entre o radical hidroxil e os compostos de coordenação, estão expostos na Figura 54.

Tabela 15. Dados de %RSA do radical $\cdot\text{OH}$, obtidos para os compostos **(3)**, **(6)** e para o composto de referência **[Mn(SALEN)Cl]**, obtidos por EPR em meio aquoso, onde $h_0 = 9,642$.

Composto (3)			Composto (6)			Composto de referência [Mn(SALEN)Cl]		
Conc. (μM)	h_x	%RSA	Conc. (μM)	h_x	%RSA	Conc. (μM)	h_x	%RSA
1	8,539	3,722387	1	7,024	25,75838	10	4,98	47,36286
10	6,004	37,78048	10	4,789	49,38167	100	4,3	54,55026
25	3,197	60,15829	50	2,967	68,63968	200	4,256	55,01533
50	2,596	70,5601	80	1,456	84,61051	500	4,034	57,3618
75	1,836	84,65472	100	0,9669	89,78015	750	3,913	58,64074

Tabela 16. Dados obtidos através do estudo da interação entre o radical $\cdot\text{OH}$ com os compostos (3), (6) e $[\text{Mn}(\text{SALEN})\text{Cl}]$, pela técnica de EPR.

Composto	Regressão logarítmica		
	Equação	R^2	IC_{50} (μM)
(3)	$y = 18,296\ln(x) + 1,0582$	0,9846	14,51
(6)	$y = 13,738\ln(x) + 22,725$	0,9789	7,23
$[\text{Mn}(\text{SALEN})\text{Cl}]$	$y = 2,6118\ln(x) + 41,195$	0,9959	29,11

Figura 53. Regressão logarítma da concentração versus RSA% dos compostos (3) (azul), (6) (rosa) e composto de referência $[\text{Mn}(\text{SALEN})\text{Cl}]$ (roxo). A concentração para o composto de referência $[\text{Mn}(\text{SALEN})\text{Cl}]$ foi dividida por 10 para ficar na mesma faixa de concentração dos compostos de coordenação estudados.

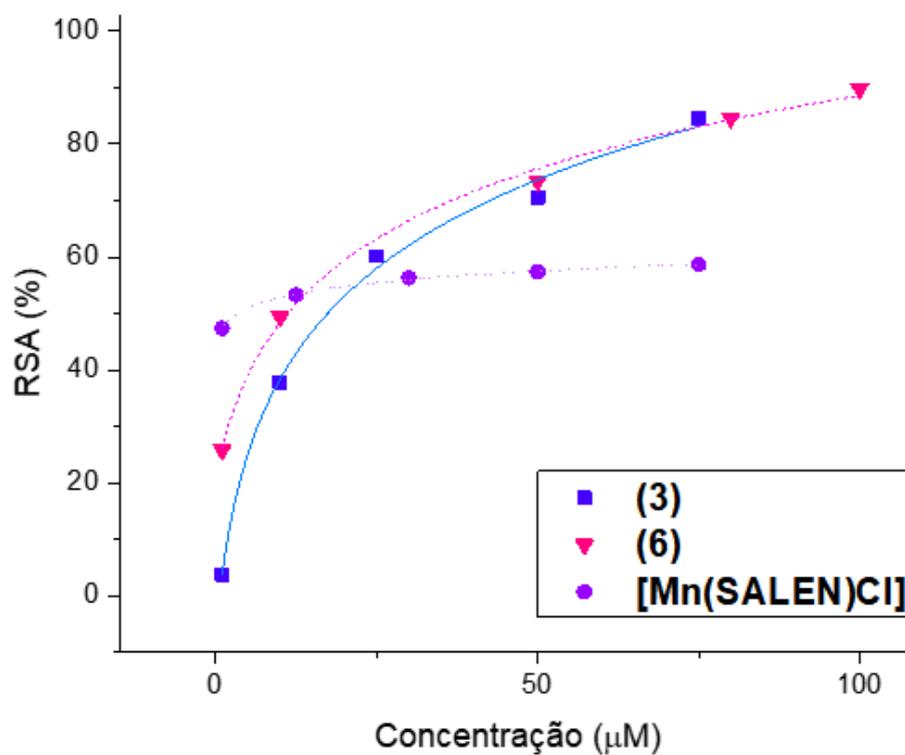
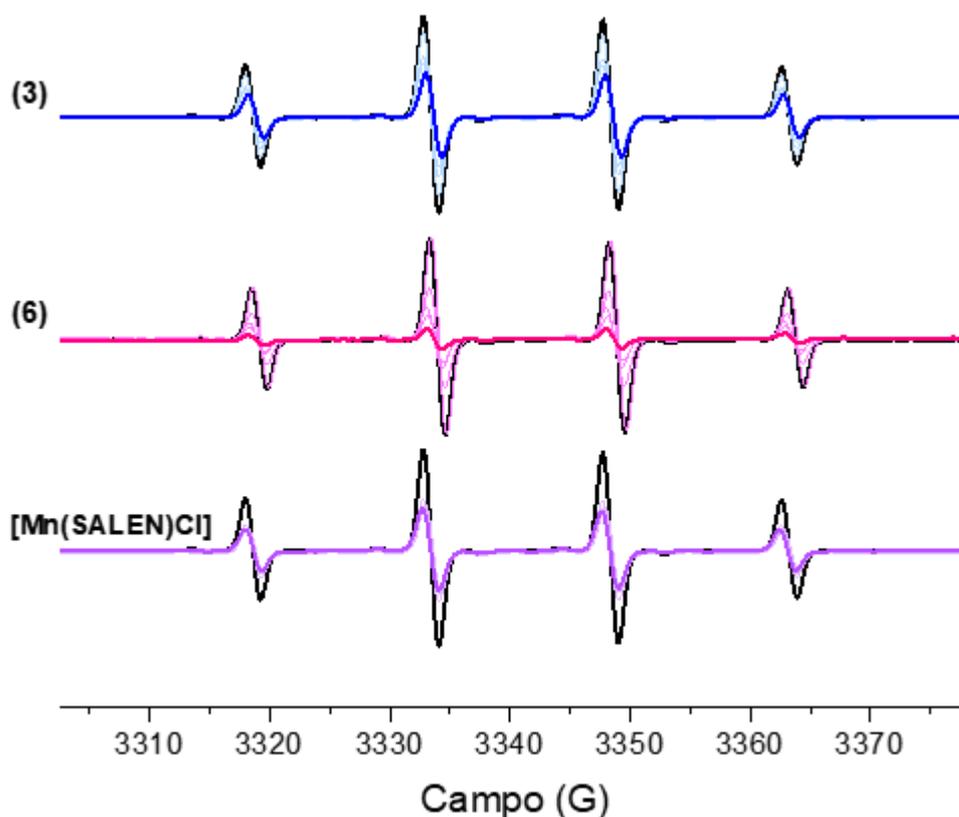
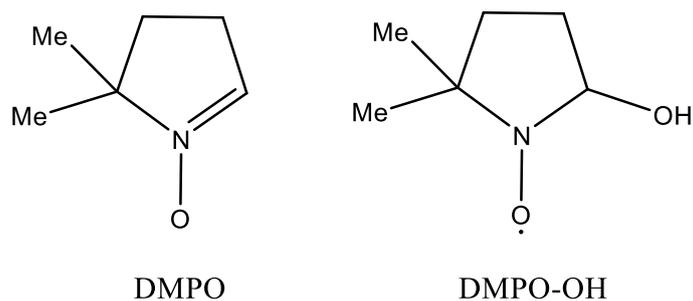


Figura 54. Espectros de EPR resultantes da interação entre os compostos de coordenação **(3)**, **(6)** e composto de referência **[Mn(SALEN)Cl]**, com o radical $\cdot\text{OH}$, em função da concentração do composto de coordenação. O radical hidroxil foi obtido através da reação de fenton e estabilizado com adição de “*spin trap*” DMPO, mantendo-se a proporção DMPO:H₂O₂:Fe³⁺ de 100:1:0,1, de acordo com metodologia descrita por Scalzo e colaboradores.⁴² A concentração dos compostos de coordenação foi variada de acordo com a Tabela 15. Sinal do aduto radicalar DMPO-OH em água (linhas pretas), sinal do aduto radicalar DMPO-OH após interação com a última concentração adicionado do composto **(3)** (75 μM , linha azul), sinal do aduto radicalar DMPO-OH após interação com a última concentração adicionado do composto **(6)** (100 μM linha rosa), sinal do aduto radicalar DMPO-OH após interação com a última concentração adicionado do composto de referência **[Mn(SALEN)Cl]** (750 μM , linha roxa).



O espectro de EPR para o aduto radicalar formado entre o *spin trap* DMPO e o radical $\cdot\text{OH}$ (DMPO-OH) (Figura 55) apresenta quatro linhas características (reação de hidroxilação do DMPO). O nitrogênio (spin nuclear = 1) e o hidrogênio β (spin nuclear = 1), da molécula formada (DMPO-OH), possuem o mesmo desdobramento, havendo uma sobreposição das linhas centrais do espectro de EPR, resultando em um sinal de intensidade 1:2:2:1.⁶³

Figura 55. Estrutura molecular do *spin trap* DMPO e aduto radicalar DMPO-OH, respectivamente.⁶³



O composto **(6)** apresentou menor valor de IC_{50} frente ao radical $\cdot OH$, com valor de $7,97 \mu M$, seguido do composto **(3)**, que apresentou valor de $14,51 \mu M$. Ambos os compostos apresentaram valores de IC_{50} menores do que o composto de referência **[Mn(SALEN)Cl]** ($IC_{50} 24,65 \mu M$). Estes compostos mostraram ser efetivos na captura desse radical, com valores promissores quando comparados àqueles encontrados na literatura, que são escassos, principalmente considerando-se compostos inorgânicos. A maioria dos estudos encontrados na literatura é realizada empregando-se antioxidantes orgânicos naturais, os quais apresentam valores de IC_{50} na faixa de M ou mM.^{43,62,64}

7. CONCLUSÃO

Foram sintetizados e caracterizados seis compostos de coordenação, sendo cinco destes já relatados na literatura. Um composto de coordenação inédito foi obtido (composto **(3)**), o qual teve sua estrutura de raios-X elucidada. Todos os compostos tiveram sua atividade antioxidante investigadas frente a diferentes espécies reativas (DPPH, H₂O₂, O₂^{•-} e [•]OH) e foram comparados com o composto de coordenação de referência, o qual exhibe propriedades antioxidantes amplamente relatadas na literatura [Mn(SALEN)Cl]. As diferentes técnicas empregadas mostraram que todos os compostos reagem diretamente com as espécies oxidantes, com exceção do composto de Cu^{II} (**(4)**), para o qual não se observou interação com a espécie reativa H₂O₂, portanto, conclui-se que este composto não possui atividade mimética funcional à CAT.

Quanto aos demais compostos, todos apresentam atividade mimética à CAT e à SOD, além de também serem capazes de capturar o radical DPPH[•], tanto por mecanismo de transferência de hidrogênio quanto por mecanismo redox, sendo que suas atividades são melhores em solvente prótico.

Considerando-se os resultados obtidos, os compostos que apresentaram melhor atividade antioxidante geral foram os compostos com centros metálicos de manganês (**(3)** e **(6)**), apresentando atividade melhor ou equivalente ao composto de referência [Mn(SALEN)Cl], sendo que o composto inédito (**(3)**), foi o mais promissor, considerando-se outros fatores, como rendimento por exemplo. Estes compostos apresentaram atividade de captura do radical hidroxil promissora, com IC₅₀ na faixa de μM. Os valores estão entre os mais baixos encontrados na literatura.

Assim, estes resultados motivam estudos antioxidantes futuros, empregando-se sistemas mais complexos, como matrizes biológicas (mitocôndrias de fígado de rato, tecido neural), levedura *S. cerevisiae*, invertebrado *Galleria mellonella*, submetidos à condição de estresse oxidativo severo e posterior tratamento com estes compostos.

8. PERSPECTIVAS PARA ESTUDOS FUTUROS

Os compostos estudados apresentaram atividades antioxidantes promissoras quando comparados ao composto de referência $[\text{Mn}(\text{SALEN})\text{Cl}]$, principalmente os compostos de manganês **(3)** e **(6)**. Dessa forma, o próximo passo seria a investigação da atividade antioxidante em matrizes biológicas, como mitocôndrias e tecidos neurais de camundongo, que são dois dos principais alvos das EROs no organismo. Na sequência, realizar estudos *in vivo*, frente à levedura *S. cerevisiae* e ao invertebrado *Galleria mellonella*. O estudo frente ao invertebrado, com a série de compostos contendo o ligante **H₂L2** está em fase final, sendo realizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em colaboração com o Prof. Marcos Dias Pereira, do Departamento de Bioquímica. Adicionalmente, a inserção de moléculas com atividade antioxidante comprovada à esfera de coordenação do metal, como o ácido gálico (flavonoide com propriedades antioxidantes), também poderá ser investigada, a fim de potencializar a atividade antioxidante desses compostos, através de efeito sinérgico, devido à combinação dos compostos que já exibem propriedades antioxidantes de forma isolada. Também pode-se obter o sinergismo agregando compostos que atuem por diferentes mecanismos: HT ou redox.

9- REFERÊNCIAS

- 1 IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria journal of medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.
- 2 KALYANARAMAN, Balaraman. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox biology**, v. 1, n. 1, p. 244-257, 2013
- 3 AMATO, Antonella; TERZO, Simona; MULÈ, Flavia. Natural compounds as beneficial antioxidant agents in neurodegenerative disorders: A focus on Alzheimer's disease. **Antioxidants**, v. 8, n. 12, p. 608, 2019.
- 4 BHAT, Aashiq Hussain et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 74, p. 101-110, 2015.
- 5 LOSADA-BARREIRO, Sonia; BRAVO-DIAZ, Carlos. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. **European journal of medicinal chemistry**, v. 133, p. 379-402, 2017.
- 6 BJØRKLUND, Geir et al. Oxidative stress in autism spectrum disorder. **Molecular neurobiology**, v. 57, n. 5, p. 2314-2332, 2020.
- 7 SIES, Helmut. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox biology**, v. 4, p. 180-183, 2015.
- 8 SHARPE, Martyn A. et al. Oxidation of nitric oxide by oxomanganese–salen complexes: a new mechanism for cellular protection by superoxide dismutase/catalase mimetics. **Biochemical Journal**, v. 366, n. 1, p. 97-107, 2002.
- 9 MELOV, Simon et al. Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1567-1569, 2000.
- 10 BAUDRY, M. et al. Salen-manganese complexes are superoxide dismutasemimics. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 192, n. 2, p. 964- 968, 1993.
- 11 DOCTROW, Susan R. et al. Salen– manganese complexes as catalytic scavengers of hydrogen peroxide and cytoprotective agents: structure– activity relationship studies. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 20, p. 4549-4558, 2002.
- 12 CHEN, Wenting et al. In situ detection of hydroxyl radicals in mitochondrial oxidative stress with a nanopipette electrode. **Chemical Communications**, v. 56, n. 86, p. 13225-13228, 2020.
- 13 HORN JR, Adolfo et al. An iron-based cytosolic catalase and superoxide dismutase mimic complex. **Inorganic chemistry**, v. 49, n. 4, p. 1274-1276, 2010.

- 14 RIBEIRO, Thales P. et al. Iron, copper, and manganese complexes with in vitro superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 67-76, 2015.
- 15 RIBEIRO, Thales de P. et al. Metal-based superoxide dismutase and catalase mimics reduce oxidative stress biomarkers and extend life span of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 2, p. 301-315, 2017.
- 16 COSTA, Rafael O. et al. A new mixed-valence Mn (II) Mn (III) compound with catalase and superoxide dismutase activities. **Frontiers in chemistry**, v. 6, p. 491, 2018.
- 17 SRIVASTAVA, Shikha et al. Role of enzymatic free radical scavengers in management of oxidative stress in autoimmune disorders. **International journal of biological macromolecules**, v. 101, p. 502-517, 2017.
- 18 MITTLER, Ron. ROS are good. **Trends in plant science**, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.
- 19 WANG, Ying et al. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. **Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 6, p. 1915-1928, 2018.
- 20 GAASCH, Julie A. et al. Brain iron toxicity: differential responses of astrocytes, neurons, and endothelial cells. **Neurochemical research**, v. 32, n. 7, p. 1196-1208, 2007.
- 21 OLMEDO-DÍAZ, Sonia et al. An altered blood–brain barrier contributes to brain iron accumulation and neuroinflammation in the 6-OHDA rat model of Parkinson’s disease. **Neuroscience**, v. 362, p. 141-151, 2017.
- 22 SILVA, Danielle da Costa; CERCHIARO, Giselle; HONÓRIO, Káthia M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 300-305, 2011.
- 23 ADWAS, Almohktar A. et al. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, v. 6, n. 1, p. 43-47, 2019.
- 24 SIES, Helmut; BERNDT, Carsten; JONES, Dean P. Oxidative stress. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 715-748, 2017.
- 25 BREUER, M. E. et al. The role of mitochondrial OXPHOS dysfunction in the development of neurologic diseases. **Neurobiology of disease**, v. 51, p. 27-34, 2013.
- 26 SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks in: *Oxidative Stress* (Sies, H., Ed.). 1985.
- 27 Science direct. Oxidative stress. Acesso em agosto de 2021. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/>
- 28 ELFAWY, Hasnaa A.; DAS, Biswadeep. Crosstalk between mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and age related neurodegenerative disease: Etiologies and therapeutic strategies. **Life sciences**, v. 218, p. 165-184, 2019.
- 29 TANG, Xiaoqiang et al. Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 175, 2014.

- 30 MILLER, Anne-Frances. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. **Current opinion in chemical biology**, v. 8, n. 2, p. 162-168, 2004.
- 31 MAILLOUX, Ryan J. An update on mitochondrial reactive oxygen species production. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 472, 2020.
- 32 McCord, J. M.; Edeos, M. A. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed. Pharmacother.* 59:139–142; 2005
- 33 DAY, Brian J. Catalase and glutathione peroxidase mimics. **Biochemical pharmacology**, v. 77, n. 3, p. 285-296, 2009.
- 34 CATALIN MOT, Augustin; SILAGHI-DUMITRESCU, Radu; SARBU, Costel. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV—vis spectroscopic data. **Journal of food composition and analysis (Print)**, v. 24, n. 4-5, p. 516-522, 2011.
- 35 CHEN, Xing; LIANG, Li; HAN, Cong. Borate suppresses the scavenging activity of gallic acid and plant polyphenol extracts on DPPH radical: A potential interference to DPPH assay. **LWT**, v. 131, p. 109769, 2020.
- 36 SARDAR, Sabahat et al. Synthesis, DNA-binding study and antioxidant assay of novel protic ionic liquids: Experimental and computational approaches. **Journal of Molecular Liquids**, v. 300, p. 112255, 2020.
- 37 ROMANET, Remy et al. The antioxidant potential of white wines relies on the chemistry of sulfur-containing compounds: An optimized DPPH assay. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1353, 2019.
- 38 LOHAN, Silke B. et al. EPR Spectroscopy as a Method for ROS Quantification in the Skin. In: *Reactive Oxygen Species*. **Humana**, New York, NY, 2021. p. 137-148.
- 39 DENG, Sui-Ping et al. Synthesis, spectroscopic study and radical scavenging activity of kaempferol derivatives: Enhanced water solubility and antioxidant activity. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 4, p. 975, 2019.
- 40 SAHU, Indra D.; LORIGAN, Gary A. Electron paramagnetic resonance as a tool for studying membrane proteins. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 763, 2020.
- 41 SPASOJEVIĆ, Ivan. Electron paramagnetic resonance: A powerful tool of medical biochemistry in discovering mechanisms of disease and treatment prospects. **Journal of Medical Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 175-188, 2010.
- 42 WEIL, John A.; BOLTON, James R..*Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*. **Wiley-Interscience**, 2 ed. 2007, 687 p.
- 43 SCALZO, Roberto Lo. EPR free radical scavenging activity on superoxide, hydroxyl and tert-butyl hydroperoxide radicals by common hydrophilic antioxidants: effect of mixing and influence of glucose and citric acid. **European Food Research and Technology**, p. 1-13, 2021.

- 44 LI, Xin; YUAN, Lijing; ZHAO, Liangfu. A Comparative Study on Oxidation of Acidic Red 18 by Persulfate with Ferrous and Ferric Ions. **Catalysts**, v. 10, n. 6, p. 698, 2020.
- 45 BARÁTH, Eszter. Hydrogen transfer reactions of carbonyls, alkynes, and alkenes with noble metals in the presence of alcohols/ethers and amines as hydrogen donors. **Catalysts**, v. 8, n. 12, p. 671, 2018.
- 46 BINGÖL, Mustafa; TURAN, Nevin. Schiff base and metal (II) complexes containing thiophene-3-carboxylate: synthesis, characterization and antioxidant activities. **Journal of Molecular Structure**, v. 1205, p. 127542, 2020.
- 47 SCHEINOK, Samantha et al. An EPR study using cyclic hydroxylamines to assess the level of mitochondrial ROS in superinvasive cancer cells. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 78, p. 249-254, 2020.
- 48 LESSA, Josane A. et al. Catalase vs Peroxidase Activity of a Manganese (II) Compound: Identification of a Mn (III)-(μ-O) 2- Mn (IV) Reaction Intermediate by Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. **Inorganic chemistry**, v. 48, n. 10, p. 4569-4579, 2009.
- 49 GUERREIRO, Joana F. et al. Iron and copper complexes with antioxidant activity as inhibitors of the metastatic potential of glioma cells. **RSC Advances**, v. 10, n. 22, p. 12699-12710, 2020.
- 50 MATTOS, Larissa Maura de Melo. Avaliação da atividade antioxidante de complexos de coordenação contendo metais de transição ferro, cobre e manganês. **Dissetação, Mestrado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.
- 51 BORGES, Layla JH et al. *In vitro* and *in vivo* studies of the antineoplastic activity of copper (II) compounds against human leukemia THP-1 and murine melanoma B16-F10 cell lines. **European journal of medicinal chemistry**, v. 123, p. 128-140, 2016.
- 52 LUBE, Leonardo Munaldi. Oxidação do cicloexano catalisada por complexos de ferro modelos para a metano monoxigenase. 2011. **Tese, Doutorado**. Universidade do Norte Fluminense – UENF.
- 53 FERNANDES, Christiane et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of FeIII, CoII, CuII and ZnII complexes probed by transmission electron microscopy. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 104, n. 11, p. 1214-1223, 2010.
- 54 SILVA, Giselle C. et al. A bio-inspired Fe (III) complex and its use in the cyclohexane oxidation. **Catalysis Today**, v. 133, p. 684-688, 2008.
- 55 HORN JR, Adolfo et al. A new dinucleating N, O donor ligand (H2BPCINOL) and the structural and magnetic properties of two diiron complexes with the di-m-alkoxo motif. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, p. 7-10, 2000.
- 56 DEAWATI, Yusi et al. Synthesis of [Mn (Salen) Cl] Complex Compound and Superoxide Dismutase Activity Determination through Non-Enzymatic Method. In: **Key Engineering Materials**. Trans Tech Publications Ltd, 2019. p. 22-27.

- 57 ARAÚJO, J., L., et al. Determinação de peróxido de hidrogênio em amostras de água oxigenada comercial por volumetria de oxirredução. **58º Congresso Brasileiro de Química**. 2018. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2018/trabalhos/4/1535-25746.html>. Acesso em: 04 de junho de 2021.
- 58 PANJA, Anangamohan et al. Structural characterization of a new manganese (III)–salen complex [H₂salen= N, N'-bis (salicylidene) ethane-1, 2-diamine] and study of its electron transfer kinetics with hydroquinone and catechol. **Polyhedron**, v. 22, n. 9, p. 1191-1198, 2003.
- 59 ETH Zürich. Electron Paramagnetic Resonance. g anisotropy. Disponível em: <https://epr.ethz.ch/education/basic-concepts-of-epr/one-elect--in-the-magn--field/g-anisotropy.html> acesso em 15/12/2021.
- 60 SOBAŃSKA, Kamila et al. Diagnostic features of EPR spectra of superoxide intermediates on catalytic surfaces and molecular interpretation of their g and A tensors. **Topics in Catalysis**, v. 58, n. 12, p. 796-810, 2015.
- 61 MITIC, Natasa et al. Metal-ion mutagenesis: conversion of a purple acid phosphatase from sweet potato to a neutral phosphatase with the formation of an unprecedented catalytically competent MnII/MnIII active site. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 23, p. 8173-8179, 2009.
- 60 AIME, Silvio et al. EPR investigations of the iron domain in neuromelanin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1361, n. 1, p. 49-58, 1997.
- 61 Swinney, D. C. (2011). Molecular Mechanism of Action (MMoA) in Drug Discovery. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, 301–317. doi:10.1016/b978-0-12-386009-5.00009-6
- 62 VAJRAGUPTA, Opa; BOONCHOONG, Preecha; BERLINER, Lawrence J. Manganese complexes of curcumin analogues: evaluation of hydroxyl radical scavenging ability, superoxide dismutase activity and stability towards hydrolysis. **Free radical research**, v. 38, n. 3, p. 303-314, 2004.
- 63 KOCHANY, Jan; LIPCZYNSKA-KOCHANY, Ewa. Application of the EPR spin-trapping technique for the investigation of the reactions of carbonate, bicarbonate, and phosphate anions with hydroxyl radicals generated by the photolysis of H₂O₂. **Chemosphere**, v. 25, n. 12, p. 1769-1782, 1992.
- 64 MONDAL, Susanta Kumar et al. *In vitro* antioxidant activity of Diospyros malabarica Kostel bark. 2006.