



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

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO II (QMC 5512)
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE
PROMISCUIDADE CATALÍTICA DE UM NOVO
COMPLEXO Fe^{III} Cu^{II}**

Orientador: Prof. Dr. Ademir Neves

Co-orientador: Doutorando Rafael Jovito Souza

MARESSA DANIELLI DOLZAN

Maressa Danielli Dolzan

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE
PROMISCUIDADE CATALÍTICA DE UM NOVO
COMPLEXO Fe^{III} Cu^{II}**

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

Prof. Dr. Ademir Neves
Orientador

Banca Examinadora:

Dr. Rosely Aparecida Peralta

Prof. Dr. Tereza Cristina Rozone de Souza

Florianópolis
novembro/2009

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Dóris, e à minha irmã, Mayra, por estarem sempre tão dentro de mim. Vocês são o meu maior orgulho, e amor. Obrigada pela proteção e presença quando o meu mundo desaba e por tudo o que me ensinaram a ser.

Ao meu pai, Jaime, obrigada por toda a dedicação e preocupação enquanto este mundo ainda era pequeno para mim.

Ao Maurício, por todo o carinho e força.

Aos meus tios, Lide e Sérgio, por tudo o que fizeram por mim e pela minha família. Pela compreensão e coração aberto quando eu mais precisei. Pela cama quentinha, pelos cafés da manhã e por aquele abraço que eu vou lembrar sempre.

Aos meus primos, Daniel e Fernanda, que me abriram suas portas.

Ao Vicente, por ter sido uma companhia tão inteira. Pelos 12321 momentos de risadas, pelo colo e apoio nos momentos mais difíceis. Obrigada pelos conselhos, piadas sem graça e, muito, pela tua presença nos meus dias.

Ao Marquinho, por tudo o que temos um do outro. Te amo, amigo.

Ao Parafa e à Anna, pelo tempo feliz; ao Santista, por me fazer ser criança; à Edna, pela companhia e idéias comuns; ao Evertato, pelos 'cafés com piadinas'; à Joyce e à Nataly, por terem me tido tão aberta; ao Geovanni e ao Chap, pela presença tão leve.

À Aline, Má, Chico e Pi, pela essência. A Mi, pelo o que é.

Ao Marcelo e ao Lange, pela intimidade e por eu gostar tanto.

Ao time de futebol feminino da Química e toda sua equipe.

Ao Alexandre, pelo incentivo para estar aqui, pelos papos cabeça e pelos nem tanto, por ser quem é e pela companhia verdadeira.

Ao professor Ademir Neves, pela imensa oportunidade.

Aos membros do LABINC, em especial ao Rafa, pelos ensinamentos, paciência e ajuda no laboratório; e à Rô, pela presença, atenção, discussões, ensinamentos e colaboração direta neste trabalho. Ao Bernardo, Tiago e Geovana, pela abertura e apoio.

Aos professores Eduardo Castellano e Adailton Bortoluzzi, pela estrutura de Raios X. Ao professor Adailton também pelas palavras motivadoras quando as suas notícias para mim não eram 'lá' muito felizes.

Aos professores Cecatto, Graça, Gustavo Micke, João Laurindo, Marcus Sá, Minatti e Tereza, os quais tive a oportunidade de ter como professores, desempenhando com relevância esse papel. Obrigada pela formação.

À UFSC e ao Departamento de Química, pela infra-estrutura.

Ao CNPq/PIBIC pela oportunidade e auxílio financeiro.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
SUMÁRIO	4
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	9
RESUMO	11
1 INTRODUÇÃO	12
Metaloenzimas e o papel da Química Bioinorgânica	12
Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs)	14
Catecol Oxidase	16
Promiscuidade Catalítica	19
Modelos Biomiméticos	20
2 OBJETIVOS	22
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	23
3.1 MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO	23
3.1.1 Materiais	23
3.1.2 Espectroscopia no Infravermelho	23
3.1.3 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio - RMN ¹ H	24
3.1.4 Difratomia de Raios X	24
3.1.5 Condutimetria	24
3.1.6 Espectroscopia eletrônica – UV-Visível	25
3.1.7 Eletroquímica	25
3.1.8 Promiscuidade Catalítica	25
3.2 SÍNTESE DO LIGANTE	27
3.2.1 Síntese dos precursores	27
3.2.2 Síntese do ligante 2-[2(hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]- 4-metil-6-[(2-piridilmetil)aminometil]-fenol – H ₂ BPAMPAF	31
3.3 SÍNTESE DO COMPLEXO 1 – [Fe^{III}Cu^{II}(μ-OAc)₂(BPAMPAF)]ClO₄	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

4.1	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio	
–	RMN ¹H	35
4.2	Espectroscopia no Infravermelho – IV	35
4.3	Difratometria de Raios X	36
4.4	Condutimetria	39
4.5	Espectroscopia Eletrônica – UV-Visível	39
4.6	Eletroquímica	41
4.6.1	Voltametria Cíclica	41
4.6.2	Voltametria de Onda-quadrada	41
4.7	Promiscuidade Catalítica	44
4.7.1	Hidrólise do <i>bis</i>(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP)	44
4.7.2	Oxidação do 3,5-di-<i>terc</i>-butilcatecol (5,5-DTBC)	47
5	CONCLUSÃO	49
6	PERSPECTIVAS	50
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismo proposto por KLABUNDE e colaboradores, em 1996, para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAPs.	16
Figura 2 Sítios ativos da Catecol Oxidase extraída da batata doce nas formas complexada ao inibidor, oxidada (<i>met</i>) e reduzida (<i>deoxi</i>).	17
Figura 3 Mecanismos propostos por Krebs, 1998; Solomon, 1996 e Siegbahn, 2004, para a ação da Catecol Oxidase na reação de oxidação de catecóis....	19
Figura 4 Representação esquemática da síntese do CMFF.....	27
Figura 5 Representação esquemática da síntese do HBPA.....	29
Figura 6 Representação esquemática da síntese do HBPAMFF.	30
Figura 7 Espectro de RMN ¹ H do precursor HBPAMFF - δH (400 MHz; CDCl ₃), em ppm, utilizando TMS como padrão interno.	31
Figura 8 Representação esquemática da síntese do ligante H ₂ BPAMPAF.	31
Figura 9 Espectro na região do infravermelho para o ligante H ₂ BPAMPAF, obtido em pastilha de KBr.	32
Figura 10 Espectro de RMN H ¹ do ligante H ₂ BPAMPAF - δH (400 MHz; CDCl ₃), em ppm, utilizando TMS como padrão interno.	33
Figura 11 Representação esquemática da síntese do complexo 1	33
Figura 12 Espectro na região do infravermelho para o complexo 1 , obtido em pastilha de KBr.....	34
Figura 13 Estruturas cristalinas dos complexos 1 e 2 , respectivamente.	37
Figura 14 Espectro UV-Vis do complexo 1 obtido em solução de CH ₃ CN com concentrações entre 7,9 x 10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ e 4,0 x 10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹	40
Figura 15 Voltamograma cíclico do complexo 1 . Condições: solvente CH ₃ CN; [complexo 1] = 4,0 x 10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ ; velocidade de varredura: 100 mV.s ⁻¹ , eletrólito	

suporte: TBAPF₆ (0,1 mol.L⁻¹); eletrodos: trab.: Pt; ref.: Ag/Ag⁺ e aux.: fio de Pt; padrão interno: ferroceno. 41

Figura 16 Voltamograma de onda quadrada do complexo **1**. Condições: solvente CH₃CN; [complexo **1**] = 4,0 x 10⁻⁴ mol.L⁻¹; pulso: 15 mV; frequência: 25 Hz; eletrólito suporte: TBAPF₆ (0,1 mol.L⁻¹); eletrodos: trab.: Pt; ref.: Ag/Ag⁺ e aux.: fio de Pt; padrão interno: ferroceno. 42

Figura 17 Representação das estruturas dos ligantes H₂BPBPMP e H₂BPAMPAF. 43

Figura 18 Representação da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP gerando 2,4-dinitrofenolato (2,4-DNP). 44

Figura 19 Curvas obtidas para o efeito do pH na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada pelos complexos A) **1** e B) **2**. Condições: CH₃CN/H₂O 1:1; [complexo] = 4,0 x 10⁻⁵ mol.L⁻¹; [2,4-BDNPP] = 5,0 x 10⁻³ mol.L⁻¹; T = 25 °C... 44

Figura 20 A) Curva de saturação de Michaelis Menten e B) Linearização de Lineweaver Burk obtidas para o complexo **1** para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP em pH = 6,02. Condições: CH₃CN/H₂O 1:1; [complexo **1**] = 2,0 x 10⁻⁵ mol.L⁻¹; [2,4-BDNPP] = entre 1,0 x 10⁻³ mol.L⁻¹ e 9,3 x 10⁻³ mol.L⁻¹; T = 25°C. 45

Figura 21 A) Curva de saturação de Michaelis Menten e B) Linearização de Lineweaver Burk obtidas para o complexo **1** para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP em pH = 9,05. Condições: CH₃CN/H₂O 1:1; [complexo **1**] = 4,0 x 10⁻⁵ mol.L⁻¹; [2,4-BDNPP] = entre 1,0 x 10⁻³ mol.L⁻¹ e 9,3 x 10⁻³ mol.L⁻¹; T = 25°C. 46

Figura 22 Representação esquemática da reação de oxidação do 3,5-DTBC à 3,5-di-*terc*-butilquinona (3,5- DTBQ). 47

Figura 23 Curva obtida para o efeito do pH na reação de oxidação do 3,5-DTBC catalisada pelo complexo **1**. Condições: CH₃OH/H₂O 32:1; [complexo **1**] = 3,0 x 10⁻⁵; 3,5-DTBC = 5,0 x 10⁻³ mol.L⁻¹; T = 25 °C..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB	12
Tabela 2 Tipos de enzimas de cobre classificadas por seu sítio ativo.....	17
Tabela 3 Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligações do complexo 1	37
Tabela 4 Dados cristalográficos selecionados da estrutura do complexo 1	38
Tabela 5 Máximos de absorção e coeficiente de absorvidade molar encontrados na literatura para complexos do tipo $Fe^{III}M^{II}$ e para as enzimas kbPAP e $Fe^{III}Cu^{II}$ -ufPAP modificada, além do encontrado para o complexo 1 . 40	
Tabela 6 Valores de $E_{1/2}$ (V) encontrados nas análises de voltametria cíclica (VC) e onda quadrada (OQ) para o complexo 1	42
Tabela 7 Valores dos $E_{1/2}$ inerentes ao processo $Fe^{III} + e \rightleftharpoons Fe^{II}$ encontrados por análise de voltametria cíclica para os complexos 1 e 2	43
Tabela 8 Parâmetros cinéticos encontrados para o complexo 1 em condições de CH_3CN/H_2O 1:1; pHs 6,02 e 9,05; $T = 25$ °C.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- PAPs** – Fosfatases Ácidas Púrpuras
- bsPAP** – Fosfatase Ácida Púrpura de Baço de Bovinos
- ufPAP** - Fosfatase Ácida Púrpura de Útero de Suínos
- kbPAP** - Fosfatase Ácida Púrpura de Feijões do Tipo “Red Kidney Bean”
- rbPAP** - Fosfatase Ácida Púrpura de Ossos de Ratos
- sbPAP** - Fosfatase Ácida Púrpura de Grãos de Soja
- spPAP** - Fosfatase Ácida Púrpura de Batata Doce
- HMB** - 2-hidroxi-5-metilbenzaldeído
- CMFF** - 2-clorometil-4-metil-6-formil-fenol
- HBPA** - (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina
- HBPAMFF** - 2-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formil-fenol
- H₂BPAMPAF** - 2-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil]-fenol
- H₂BPBPMP** - 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol
- ¹H RMN** – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
- CHES** – Ácido 2-[N-Cicloexilamino]etanossulfônico
- HEPES** – Ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazino]-etanossulfônico
- MES** – Ácido 2-[N-Morfolino] etanossulfônico
- TRIS** – Tris(hidroximetil)aminometano
- TMS** – Tetrametilsilano
- THF** – Tetrahidrofurano
- NaOAc** – Acetato de Sódio
- NaCl₄** – Perclorato de Sódio
- CDCl₃** – Clorofórmio deuterado
- NaBH₄** – Borohidreto de Sódio
- CH₂Cl₂** – Diclorometano
- 2,4 - BDNPP** – bis(2,4-dinitrofenil)fosfato
- 2,4 - DNP** – 2,4-dinitrofenolato
- 3,5 - DTBC** – 3,5-di-*terc*-butilcatecol
- 3,5 - DTBQ** – 3,5-di-*terc*-butilquinona
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico

E – Eficiência catalítica

MeOH – Metanol

Et₃N – Trietilamina

HMB – 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído

IV – Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

IUBMB – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

TC – Transferência de carga

TCLM – Transferência de carga do ligante para o metal

K_{ass} – Constante de associação

k_{cat} – Constante catalítica

K_M – Constante de Michaelis-Menten

f – Fator catalítico

ENH – Eletrodo normal de hidrogênio

P.F – Ponto de fusão

pH – Potencial hidrogeniônico

pK_a – Constante ácida de protonação

TBAPF₆ – Hexafluorofosfato de tetrabutílamônio

V₀ – Velocidade inicial

UV-Vis – Espectroscopia no ultravioleta-visível

V_{máx} – Velocidade máxima

ε – Coeficiente de absorvidade molar

λ_{máx} – Comprimento de onda no máximo de absorção

ν – Estiramento de ligação (IV)

δ – Deformação angular (IV);

δ_H – Deslocamento químico do hidrogênio (RMN 1H)

%T – Percentagem de transmitância

T – Temperatura

FTU – feniltiouréia

Λ_M – Condutividade molar

E_{1/2} – Potencial de meia onda

I – Força iônica

RESUMO

A Química Bioinorgânica, embora seja um título recente no campo da ciência, vem contribuindo para a compreensão de uma série de reações e interações que ocorrem nos organismos vivos e não só possibilitam, mas caracterizam as diferentes formas de vida.

O termo 'inorgânica' refere-se ao estudo acerca de moléculas e biomoléculas que apresentam íons metálicos na sua constituição, como também do próprio elemento metálico. Uma das linhas de pesquisa desenvolvidas neste sentido envolve o estudo de metaloproteínas e metaloenzimas, conforme o caso, desejando compreender seus mecanismos de ação e super seletividade, para possíveis aplicações principalmente na medicina e farmacologia.

Algumas metaloenzimas apresentam comportamento promíscuo, ou seja, têm a capacidade de catalisar diferentes reações, com diferentes substratos. Além disto, compostos sintéticos promíscuos têm apresentado sucesso no tratamento de doenças, o que torna a pesquisa neste sentido útil e promissora.

Por apresentarem-se estruturalmente complexas, propõe-se que para estudar macromoléculas biológicas, sejam desenvolvidos compostos sintéticos de baixa massa molecular, planejados com base nos sítios ativos das enzimas de interesse (modelos miméticos). Dentre elas, apresenta-se como foco deste trabalho as do tipo nucleases, cuja ação ocorre na clivagem de ácidos nucléicos, como também, outro tipo específico de enzima oxidorreductase.

Pensando nisso, descreve-se aqui a síntese de um ligante N_4O_2 -doador e seu complexo binuclear $Fe^{III}Cu^{II}$ inspirado no sítio ativo das Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs) que, *in vitro*, catalisam reações de hidrólise de ésteres de fosfato. Estudos de promiscuidade catalítica também foram realizados com o complexo, e o mesmo mostrou-se ativo também em reações de oxidação de catecóis. O presente trabalho traz, portanto, a síntese do complexo inédito $[Fe^{III}Cu^{II}(\mu-OAc)_2(BPAMPAF)]ClO_4$, como possível modelo funcional para PAPs e Catecol Oxidase, simultaneamente.

1 INTRODUÇÃO

Acredita-se que há 20 bilhões de anos deu-se início a formação de tudo o que conhecemos hoje como matéria, visíveis ou não. O Universo deixou de ser uma energia pontual e em poucos segundos passou a existir um conjunto de cores e formas que permanecem e se renovam constantemente.

Os cientistas, principalmente físicos e químicos, além de filósofos, biólogos e teólogos, propuseram e propõem dezenas de teorias que tentam compreender a visível perfeição das coisas. Curiosamente, até a vida se tornou possível durante esses bilhões de anos.

Metaloenzimas e o papel da Química Bioinorgânica

Apesar de o DNA (ácido desoxirribonucléico) ser considerado por muitos a 'molécula da vida', são as proteínas que constituem a maior parte da matéria viva. Dentre estas, destaca-se o papel fundamental das enzimas, responsáveis por tornar o organismo vivo e seus variados processos em algo dinâmico, sem a necessidade de centenas ou mesmo milhares de anos.

As enzimas constituem um grupo de proteínas capaz de diminuir a energia de ativação de uma gama de reações químicas que ocorrem nos sistemas vivos, acelerando-as até milhões de vezes (LIPPARD, 1994).

De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as enzimas são classificadas segundo os tipos de reações às quais atuam (LIPPARD, 1994), como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB.

Classe	Atuação
Oxido-redutases	Reações de transferência de elétrons.
Transferases	Reações de transferência de grupos funcionais.
Hidrolases	Reações de hidrólise.
Líases	Adição ou remoção de grupos e duplas ligações.
Isomerases	Reações de transferência de grupos funcionais dentro de moléculas dando origem às formas isoméricas.
Ligases	Formação de ligações C-C, C-N, C-O e C-S

Apesar de as milhões de proteínas descobertas até hoje serem formadas a partir da combinação de somente um conjunto básico de vinte aminoácidos dispostos em sequências específicas, cerca de 1/3 se diferenciam por apresentar íons metálicos em sua estrutura (STRÄTER *et al.*, 1996). A essas proteínas dá-se o nome de metaloproteínas ou metaloenzimas, conforme o caso.

Muitos metais desempenham um papel importante nos sistemas vivos, uma vez que se ligam e interagem com moléculas biológicas como proteínas e o DNA, além de apresentarem afinidade por moléculas importantes para a vida (como O₂, ou NO). Assim, a evolução natural dos seres vivos incorporou os metais às suas funções essenciais. Por exemplo, sabe-se que o transporte de oxigênio é feito pelo Ferro na hemoglobina, que a Citocromo *c* Oxidase (através de seus íons de cobre) transferem elétrons, que o Zinco e o Magnésio exercem função estrutural importante, e ainda que minerais contendo cálcio são constituintes dos ossos.

Sabe-se também que sódio, potássio, magnésio e cálcio encontram-se em grandes quantidades nas formas vivas, enquanto os elementos vanádio, cromo, molibdênio, manganês, ferro, cobalto, níquel, cobre e zinco, estão presentes em pequenas quantidades, e são conhecidos como elementos em concentração traço.

Assim, o conhecimento do papel dos metais nos sistemas vivos tornou-se assunto de interesse comum. Neste sentido, cientistas de várias áreas do conhecimento têm contribuído para o ramo da ciência denominado Química Bioinorgânica. Dentre as principais linhas de pesquisa na área estão as que estudam: o ambiente de coordenação dos metais em metaloproteínas, ácidos nucléicos, carboidratos e membranas; os mecanismos de reações ocorridas no centro metálico de uma enzima; os análogos sintéticos para um sítio ativo em metaloenzimas (planejamento, síntese, estrutura, espectroscopia e reações catalíticas); fármacos contendo metais para a cura ou prevenção de doenças (síntese e mecanismos de ação); a remoção e transporte de íons e compostos metálicos “para” e “de” sistemas vivos (desintoxicação) e os processos de biomineralização.

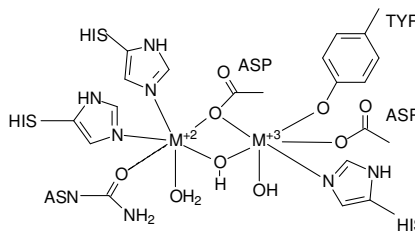
O maior desafio da Química Bioinorgânica é, portanto, a compreensão das interações e reações às quais os íons metálicos fazem parte e a aplicação

desses conhecimentos na medicina, biologia, ciências ambientais, catálise e tecnologia.

Neste sentido, o grupo de pesquisa do professor Ademir Neves vêm desenvolvendo trabalhos elucidativos acerca de metaloenzimas como as Fosfatases Ácidas Púrpuras e Catecol Oxidase, cujas atividades inspiraram este trabalho. A seguir estão descritas informações sobre estas enzimas que são de fundamental relevância para a compreensão deste.

Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs)

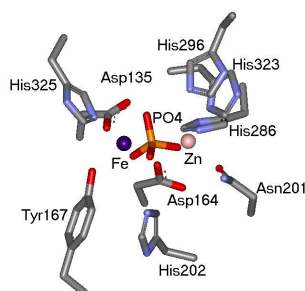
As PAPs representam um grupo de metaloenzimas pertencentes à classe das hidrolases, que atuam em reações de hidrólise de ésteres de fosfatos e anidridos *in vitro*. As PAPs contêm em seus sítios ativos um centro binuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-M}^{\text{II}}$ onde $\text{M} = \text{Fe}, \text{Mn}$ ou Zn , dependendo do sistema biológico do qual foram isoladas. As PAPs $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ estão presentes em mamíferos e foram isoladas de fluido uterino de suínos (uteroferrina - ufPAP), baço de bovinos (bovine spleen - bsPAP), macrófagos, lisossomos humanos e ossos de ratos. As PAPs isoladas de plantas apresentam sítios heterobimetálicos, como FeMn (batata doce - spPAP) e FeZn (feijão vermelho - kbPAP e soja - sbPAP) (KLABUNDE *et al.*, 1997; SCHENK *et al.*, 1999). Dessas, as enzimas de origem animal, ufPAP e bsPAP, além da proveniente dos feijões vermelhos kbPAP, são as mais bem estudadas.



A atividade máxima das PAPs ocorre em pHs entre 4 e 7 e são caracterizadas por uma intensa coloração (KLABUNDE *et al.*, 1997). As PAPs de mamíferos contêm centros ativos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ (LINDQVIST *et al.*, 1999; THAN *et al.*, 1999). A espécie cataliticamente inativa $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$, conhecida como forma púrpura, caracteriza-se por uma banda de absorção típica em $\lambda_{\text{max}} = 550$ nm ($\epsilon = 4300 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e a forma ativa, ou rosa, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$, apresenta um máximo no espectro eletrônico em $\lambda_{\text{max}} = 505$ nm ($\epsilon = 4000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Essas bandas foram atribuídas a processos de transferência de carga do tipo

tirosinato \rightarrow Fe^{III}, que é observado em ambas as formas (AVERILL *et al.*, 1987; SCHENK *et al.*, 1999).

A primeira PAP que teve sua estrutura cristalina determinada, por difração de Raios X, foi a kbPAP (KLABUNDE *et al.*, 1996; STRÄTER *et al.*, 1995). Outras PAPs também tiveram suas estruturas de Raios X resolvidas, dentre elas a PAP de ossos de ratos e de fluido uterino de suínos (GUDDAT *et al.*, 1999; UPPENBERG *et al.*, 1999). A principal diferença entre as PAPs de mamíferos e a kbPAP é que a enzima extraída de plantas é uma metaloproteína dimérica Fe^{III}Zn^{II}, enquanto que as de mamíferos na sua forma ativa são enzimas monoméricas Fe^{III}Fe^{II}. Os centros metálicos, Fe^{III} e Zn^{II},



kbPAP

estão separados por uma distância de 3,26 Å, sendo que o íon Fe^{III} encontra-se em uma geometria octaédrica e está coordenado a resíduos de tirosinato, histidina, aspartato terminal (monodentado) e aspartato ponte (bidentado). Completando a esfera de coordenação do íon Fe^{III}, dois ligantes foram modelados em função das distâncias encontradas:

um hidróxido terminal e um hidróxido ponte. Para o íon Zn^{II} foi observada uma geometria octaédrica distorcida que, além dos grupos ponte mencionados anteriormente, é composta pelos resíduos de aminoácidos histidina, asparagina e uma molécula de água terminal modelada (KLABUNDE *et al.*, 1996; STRÄTER *et al.*, 1995).

Devido à similaridade observada entre os sítios ativos da PAPs, sugere-se que a catálise da reação de hidrólise de ésteres de fosfato ocorra através de um mecanismo similar. Um dos mecanismos mais aceitos foi proposto por KLABUNDE e colaboradores em 1996, e o qual está descrito na Figura 1.

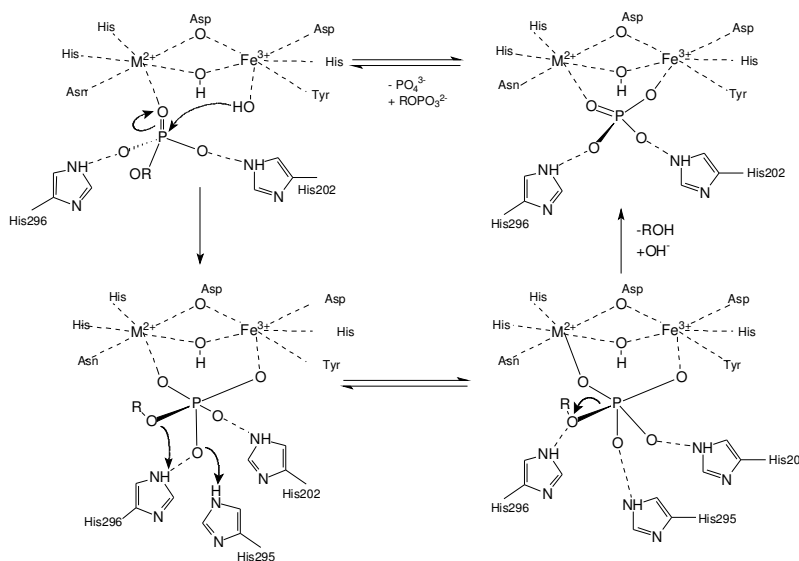


Figura 1 Mecanismo proposto por KLABUNDE e colaboradores, em 1996, para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAPs.

Vale ressaltar algumas evidências que confirmam o mecanismo demonstrado acima. O ataque nucleofílico deve ser facilitado devido primeiramente ao fato de que o íon Fe^{III} é um forte ácido de Lewis e pode facilmente gerar um grupo nucleofílico (OH) em sua esfera de coordenação. Além disto, o íon Zn^{II} também age como um ácido de Lewis retirando densidade eletrônica do átomo de fósforo do grupo fosfato coordenado. Outro fator importante se deve à estabilização da carga negativa sobre os átomos de oxigênio do fosfato pelos resíduos de histidina, por meio de ligações de hidrogênio (KLABUNDE *et al.*, 1996; LINDQVIST *et al.*, 1999).

Catecol Oxidase

Por ser o cobre um metal relativamente versátil em termos de geometrias moleculares e, em geral, com potencial redox mais positivo para o par Cu^{II}/Cu^I, as metaloenzimas que o contém possuem diversos tipos de centros catalíticos, os quais são também o fator de classificação entre elas.

Estas enzimas são classificadas por seus sítios ativos, sendo eles Tipo 1, 2, 3, 4, Cu_A, Cu_B e Cu_Z, resumidos na Tabela 2 (KOVAL *et al.*, 2006).

Tabela 2 Tipos de enzimas de cobre classificadas por seu sítio ativo.

Tipo	Sítio ativo	Exemplo
1 (azuis)	Mononuclear tetraédrico	Plastocianina
2 (normais)	Mononuclear tetragonal	Galactose Oxidase
3	Binuclear coordenado por histidinas	Catecol Oxidase
4	Núcleos mistos de Tipo 2 e 3 na enzima	Polifenol Oxidase
Cu _A	Binuclear de valência mista	Oxido Nítrico Redutase
Cu _B	Mononuclear tricoordenado por histidinas	Citocromo c Oxidase
Cu _Z	Tetranuclear tetraédrico ligado por S	Oxido Nítrico Redutase

A Catecol Oxidase é uma enzima de cobre do Tipo 3 e catalisa a reação de oxidação de *orto*-difenóis às suas respectivas quinonas (KOVAL *et al.*, 2006).

A Catecol Oxidase pode ser extraída de uma série de vegetais e frutas como, por exemplo, batata, espinafre, maçã e uva. A primeira enzima deste tipo foi isolada em 1937, e em 1998 KLABUNDE e colaboradores reportaram a estrutura cristalina da Catecol Oxidase isolada da *Ipomoea batatas* (batata doce) em três estados diferentes: a forma nativa *met* (Cu^{II}/Cu^{II}), a reduzida *deoxi* (Cu^I/Cu^I) e a complexada com o inibidor feniltiouréia, as quais estão representadas na Figura 2.

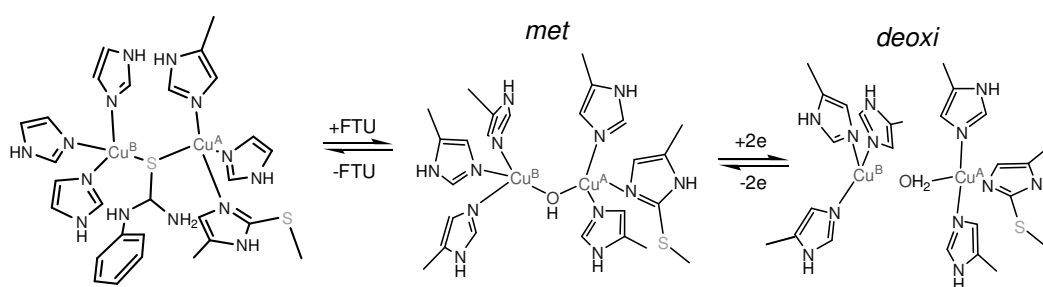


Figura 2 Sítios ativos da Catecol Oxidase extraída da batata doce nas formas complexada ao inibidor, oxidada (*met*) e reduzida (*deoxi*).

No estado *met*, os centros de Cu^{II} estão a 2,9 Å de distância. Em adição aos seis resíduos de histidina coordenados, há uma ponte entre os centros metálicos, provavelmente um hidróxido (modelado), completando a esfera de coordenação de quatro ligantes em uma geometria de pirâmide trigonal.

A forma reduzida, *deoxy*, apresenta uma distância internuclear muito maior, de 4,4 Å. Há uma molécula de água coordenada ao centro Cu_A , que possui geometria de pirâmide trigonal distorcida, e no centro Cu_B a geometria é quadrado planar, mas faltando uma posição de coordenação (tricoordenado). Observa-se que a estrutura conformacional da enzima praticamente não muda apesar da redução (KOVAL *et al.*, 2006).

Na estrutura obtida com o inibidor da enzima, a feniltiouréia (FTU) toma o lugar da ponte hidróxido e aumenta a distância internuclear para 4.2 Å. Nesta estrutura, alguns resíduos aromáticos próximos ao centro mudam de posição por apresentarem interações hidrofóbicas com o anel aromático da tiouréia. A principal importância dessa forma se dá no tipo de coordenação do inibidor, entre os centros de Cu^{II} , como foi proposta a coordenação do catecol no mecanismo sugerido por KREBS e colaboradores em 1998.

Apesar de ser uma enzima estudada há muito tempo, ainda não foi possível esclarecer o mecanismo de ação da Catecol Oxidase. SOLOMON *et al.*, em 1996 e KREBS *et al.*, em 1998, propuseram mecanismos onde o catecol liga-se de forma mono ou bidentada aos íons de Cu^{II} sendo, posteriormente, oxidado (Figura 3). Entretanto, em 2004, SIEGBAHN propôs um mecanismo radicalar com a participação de um radical peroxil na catálise. Diante de propostas tão variadas, ainda se fazem necessários estudos que auxiliem na elucidação de certos aspectos do processo catalítico, entre eles, a dependência do pH, a complexação com o substrato e a influência dos potenciais de redução dos íons cobre na catálise (KOVAL *et al.*, 2006; ACKERMANN *et al.*, 2007).

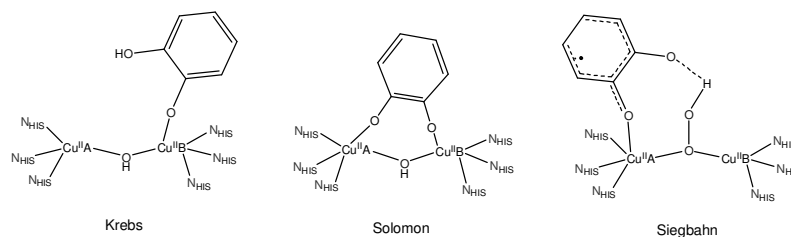


Figura 3 Mecanismos propostos por Krebs, 1998; Solomon, 1996 e Siegbahn, 2004, para a ação da Catecol Oxidase na reação de oxidação de catecóis.

Promiscuidade Catalítica

A promiscuidade enzimática pode ocorrer de diversas formas, como a mostrada por enzimas que apresentam atividade em variadas condições de pH, temperatura ou meio reacional (de condição), ou por catalisarem reações de diversos substratos (como a Anidrase Carbônica), ou ainda as que apresentam promiscuidade catalítica (catalisam transformações químicas diferentes com estados de transição diferentes).

Na década de 60, Poker e Stone relataram que a Anidrase Carbônica, metaloenzima envolvida na catálise da hidratação reversível do CO₂, também apresenta atividade catalítica em reações de outros substratos como acetatos de fenila e naftila. Este comportamento catalítico, portanto, pode ser considerado promíscuo e é assim denominado devido a capacidade de um único catalisador promover reações de diferentes substratos (NOBELI *et al.*, 2009).

Estudos recentes acerca da Aminopeptidase P, uma metaloenzima cuja ação nativa ocorre na clivagem de ligações peptídicas e proteínas, revelaram que, curiosamente, a mesma também exibe atividade catalítica em reações de hidrólise de triésteres de fosfato. Esta enzima pode, então, atuar como protease e nuclease, exibindo comportamento catalítico promíscuo (KAZLAUSKAS, 2005).

De fato, a promiscuidade não é um fenômeno raro na Biologia, entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos são inúmeros e a compreensão dos mesmos é bastante limitada. Portanto se faz necessário um

melhor entendimento com relação a seletividade apresentada (ou não) pelos grupos de compostos ativamente promíscuos, podendo ser úteis em âmbito industrial e acadêmico (NOBELI *et al.*, 2009).

Além disto, compostos sintéticos promíscuos têm apresentado sucesso no tratamento de doenças, ampliando a relevância de se desenvolver pesquisas acerca deste comportamento.

Modelos Biomiméticos

Devido a dificuldade em isolar biomoléculas dos sistemas vivos sem que sejam modificadas suas características estruturais e funcionais, principalmente as proteínas por sua complexidade estrutural, o desenvolvimento de compostos de baixa massa molecular (que mimetizam os sítios ativos de proteínas) tem sido uma ferramenta útil para a compreensão dos mecanismos de ação das mesmas.

No que diz respeito às metaloenzimas, a Química Bioinorgânica vem contribuindo com a síntese de complexos metálicos inspirados no ambiente de coordenação que compõe o centro ativo da metaloenzima de interesse. Para isto deve-se, primeiramente, planejar ligantes que mimetizem os resíduos de aminoácidos que se encontram coordenados ao(s) centro(s) metálico(s); em seguida, deve-se escolher os metais aos quais os ligantes devem ser complexados e estudá-los quanto a capacidade catalítica em reações químicas às quais atuam as enzimas naturais. O estudo de atividade dos complexos sintetizados pode ser realizado com o auxílio de substratos sintéticos que também mimetizam os substratos reais.

Esses mesmos complexos metálicos, se inspirados em enzimas de restrição e/ou nucleases, podem ser usados como “sondas” conformacionais na determinação da estrutura do DNA e como antibióticos e drogas quimioterapêuticas (COWAN *et al.*, 2001), visto que estas desenvolvem papel biológico que inclui a degradação ou digestão de biopolímeros, modificação dos ácidos nucleicos, reparação do DNA e defesa viral (enzimas restritivas).

Assim, a utilização de modelos capazes de hidrolisar cataliticamente ácidos nucleicos (nucleases artificiais) é de extrema importância. O grupo de

pesquisa do Prof. Dr. Ademir Neves tem obtido sucesso no que se refere à obtenção de catalisadores artificiais, contribuindo para a elucidação dos mecanismos de metaloenzimas (NEVES *et al.*, 1992; NEVES *et al.*, 1996; NEVES *et al.*, 2007).

Atualmente, a hidrólise biomimética de ácidos nucleicos e proteínas tem sido alvo de intensa pesquisa em muitos segmentos da biotecnologia e medicina. A habilidade de clivar essas macromoléculas de maneira eficiente, não degradativa e com alto grau de seletividade para sítios e/ou estruturas específicas, pode oferecer muitas aplicações para a manipulação de genes, desenvolvimento de sondas moleculares e novos compostos com finalidades terapêuticas (COWAN *et al.*, 2001).

Recentemente foram reportados complexos metálicos capazes de promover a hidrólise do DNA, de ligações peptídicas ou ainda oxidar catecóis às suas respectivas quinonas, apresentando *promiscuidade catalítica* (OLIVEIRA *et al.*, 2009; REY *et al.*, 2006). Com base em resultados como estes e no sucesso de medicamentos que apresentam *promiscuidade catalítica*, cresce o interesse na elaboração de novos fármacos multiativos e a reavaliação de seu valor terapêutico (MENCHER e WANG, 2005).

Diante desse contexto, apresenta-se neste trabalho a síntese de um ligante N_4O_2 -doador (H₂BPAMPAF) e seu complexo heterobinuclear de Fe^{III}Cu^{II}, inspirado no sítio ativo das PAPs, capaz de apresentar *promiscuidade catalítica* na hidrólise de ésteres de fosfato e na oxidação de catecóis.

2 OBJETIVOS

- Obter e caracterizar, através de técnica de Espectroscopia no Infravermelho e Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, o ligante 2-[2-hidroxibenzil](2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[(2-piridilmetil)aminometil]-fenol (H₂BPAMPAF);
- Sintetizar o complexo [Fe^{III}Cu^{II}(μ-OAc)₂(BPAMPAF)]ClO₄ (**1**) e caracterizá-lo por técnicas de Espectroscopia no Infravermelho, Condutimetria, Espectroscopia Eletrônica UV-Visível, Eletroquímica e Difractometria de Raios X;
- Estudar a capacidade de promiscuidade do complexo quanto a catálise da hidrólise do *bis*(2,4-dinitrofenil)fosfato e da oxidação do 3,5-di-*terc*-butilcatecol, testando-o como modelo para as metaloenzimas Fosfatases Ácidas Púrpuras e Catecol Oxidases, respectivamente;
- Estudar a influência de uma posição livre no ambiente de coordenação mais macio do complexo, quando comparado com o composto semelhante publicado por LANZMASTER e colaboradores em 2005 ([Fe^{III}Cu^{II}(μ-OAc)₂(BPBPMP)]ClO₄) (**2**), o qual apresenta um radical metilpiridil na posição “manca” do ligante H₂BPAMPAF.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

3.1.1 Materiais

Para as sínteses foram utilizados os reagentes *p*-Cresol, formaldeído, 2-(aminometil)piridina, 2-hidroxibenzaldeído, trietilamina, hidróxido de sódio, bicarbonato de sódio, sulfato de sódio anidro, ácido clorídrico, perclorato de cobre II hexahidratado, perclorato de ferro III hexahidratado, acetato de sódio e perclorato de sódio. Os solventes utilizados para o desenvolvimento desta etapa do trabalho foram diclorometano, clorofórmio, tetrahidrofurano, metanol, isopropanol, acetonitrila e clorofórmio deuterado, obtidos de fonte comercial, com grau de pureza compatível com a utilização.

Para as análises analíticas e físico-químicas e para os ensaios de reatividade, foram utilizados os reagentes TBAPF₆, ferroceno, cloreto de potássio, brometo de potássio grau espectroscópico, hidróxido de lítio, perclorato de lítio hidratado, tampões biológicos MES, HEPES, CHES e TRIS, 3,5-DTBC e 2,4-dinitrofenol. Foram utilizados como solventes metanol e acetonitrila de grau espectroscópico, água destilada e água deionizada.

3.1.2 Espectroscopia no Infravermelho - IV

Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Varian 3100 FT-IR Excalibur Series, na região de 4000 a 400 cm⁻¹. As amostras foram preparadas pela dispersão da amostra em KBr de grau espectroscópico e prensadas (~10 toneladas), formando pastilhas com cerca de 1 cm de diâmetro e 0,5 mm de espessura. Estas pastilhas foram introduzidas diretamente no caminho óptico do equipamento e, então, foram lidos os percentuais de transmitância (%T).

3.1.3 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN ^1H

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker– FT - 400 MHz, na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. Foi utilizado como solvente clorofórmio deuterado, contendo tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ ppm) como padrão interno. As amostras foram solubilizadas e acondicionadas em tubos de 5 mm.

3.1.4 Difractometria de Raios X

A análise de difração de raios X do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OAc})_2(\text{BPAMP AF})]\text{ClO}_4$ foi realizada pelo Prof. Dr. Eduardo Ernesto Castellano no Departamento de Física na Universidade de São Paulo em São Carlos. Os dados foram coletados em um difratômetro Enraf-Nonius Kappa-CCD, equipado com monocromador de grafite e tubo de molibdênio ($\text{MoK}\alpha$ $\lambda = 0,71073$ Å). A estrutura cristalina foi resolvida com a utilização do programa SHELXS97 e os dados refinados com a utilização do programa SHELXL97, pelo Prof. Dr. Adailton João Bortoluzzi na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC. As representações gráficas das estruturas moleculares foram geradas utilizando o programa ORTEP (SHELDRICK, 1990, 1997; FARRUGIA, 1997).

3.1.5 Condutimetria

As análises de condutividade molar foram efetuadas em triplicata, em um condutivímetro Schott-Geräte CG 853, utilizando-se acetonitrila (grau espectroscópico) e concentrações de $1,0 \times 10^{-3}$ mol.L $^{-1}$ da espécie a ser analisada.

A análise foi realizada após a calibração do equipamento com solução padrão de KCl ($0,01$ mol.L $^{-1}$ - $\Lambda_{\text{M}} = 1408 \Omega^{-1}.\text{cm}^2.\text{mol}^{-1}$)¹ a 25 °C.

3.1.6 Espectroscopia eletrônica – UV-Visível

Os espectros de absorção nas regiões do ultravioleta e visível (300 a 800 nm) foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo Lambda-19. As análises foram realizadas em cubetas de quartzo com capacidade para 4 mL e 1 cm de caminho óptico, utilizando-se como solvente acetonitrila com grau espectroscópico.

3.1.7 Eletroquímica

O comportamento redox do complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OAc})_2(\text{BPAMPAPF})\text{ClO}_4$ foi analisado por voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada em um potenciostato-galvanostato BAS (Bioanalytical Systems, Inc.) modelo Epsilon. Ambas as análises foram realizadas utilizando uma solução em acetonitrila com concentração de $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ do composto, $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de TBAPF_6 (eletrólito suporte) e ausência de oxigênio. Os eletrodos utilizados foram: de trabalho: Pt, referência: Ag/Ag^+ e auxiliar: fio de Pt e como padrão interno o par redox ferrocínio/ferroceno ($E_{1/2} = 0,40 \text{ V vs NHE}$). Todos os potenciais de óxido-redução foram referenciados ao eletrodo normal de hidrogênio (GAGNÉ, 1980).

3.1.8 Promiscuidade Catalítica

Os estudos de reatividade do complexo **1** foram realizados em triplicata utilizando um espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostático (25°C), e cubetas de vidro com capacidade para 4 mL e caminho óptico de 1 cm. A variação da concentração dos produtos foi acompanhada por espectroscopia eletrônica em 400 nm, cuja absorvidade molar é $12100 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (BATISTA, 2003) para o produto da reação de hidrólise (2,4-DNP) e $1900 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ para o produto da reação de oxidação (3,5-DTBQ) (PERALTA, 2005; ROSSI, 2001).

3.1.8.1 Hidrólise

A atividade catalítica do complexo foi avaliada para a reação de hidrólise do éster de fosfato *bis*-(2,4-dinitrofenil)fosfato, sob condições de excesso de substrato, pelo método das velocidades iniciais.

Primeiramente foram realizados ensaios verificando a influência do pH na reação de interesse. Para isto foram utilizadas soluções aquosas de tampões MES, CHES e HEPES ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) de pHs entre 4,0 e 10,5 e soluções do complexo e do substrato, ambas em acetonitrila. Os volumes das soluções adicionados em cada cubeta foram de forma a obter $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de complexo, $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de 2,4-BDNPP (125 vezes de excesso) e uma proporção 1:1 de acetonitrila/água(tampão).

Com os dados obtidos nas análises foi construído um gráfico das velocidades iniciais (V_0) em função do pH, que permitiu a obtenção de pK_a s cinéticos para as espécies em equilíbrio e pH ótimo para a reação (pH onde a atividade catalítica é máxima).

Um segundo estudo de reatividade foi realizado analisando a influência da variação da concentração de substrato na velocidade inicial da reação (nos pHs de máxima atividade). As concentrações de complexo na cubeta foram de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 6,02) e $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 9,05), as concentrações de substrato variaram entre $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e $9,3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e, novamente, foi mantida a proporção 1:1 de acetonitrila/água.

OBS: As soluções tampão foram preparadas a partir dos tampões MES, HEPES e CHES, solubilizados em água deionizada e o pH ajustado pela adição de solução aquosa de hidróxido de lítio, com auxílio de pHmetro com eletrodo de vidro combinado Ag/AgCl. A força iônica da reação foi mantida constante em $I = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pela adição de perclorato de lítio à solução tampão.

3.1.8.2 Oxidação

Os ensaios de reatividade do complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OAc})_2(\text{BPAMP AF})\text{ClO}_4$ também foram realizados para a catálise da reação de

oxidação do 3,5-di-*terc*-butilcatecol sob condições de excesso de substrato, pelo método das velocidades iniciais.

O objetivo desta análise foi verificar a ação catalítica do complexo inspirado no sítio ativo das PAPs frente outro tipo de reação e substrato. Para isto foram preparadas soluções aquosas de tampões MES e TRIS ($1,0 \text{ mol.L}^{-1}$) de pHs entre 4,0 e 9,0 e soluções do complexo e do substrato, ambas em metanol. Os volumes das soluções adicionados em cada cubeta foram de forma a obter $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de complexo, $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de 3,5-DTBC (167 vezes de excesso) e uma proporção de 32:1 de metanol/água.

OBS: As soluções tampões foram preparadas a partir dos tampões MES e TRIS, solubilizados em água deionizada, sem força iônica, e o pH ajustado com auxílio de pHmetro com eletrodo de vidro combinado Ag/AgCl.

3.2 SÍNTESE DO LIGANTE

3.2.1 Síntese dos precursores

3.2.1.1 Síntese do 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol - CMFF

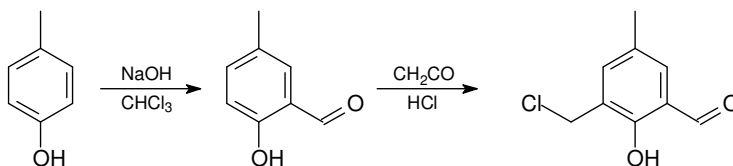


Figura 4 Representação esquemática da síntese do CMFF.

A síntese do CMFF foi realizada em duas etapas, como mostrado na Figura 4.

Primeiramente foi preparado o precursor 2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (HMB) através de uma reação de formilação do *p*-cresol, baseada no procedimento descrito na literatura para a reação de Reimer-Tiemann (THOER et al, 1988). Em um balão de 3 bocas com capacidade para 5,0 L, equipado com condensador e agitador mecânico, foram adicionados 2,5 L de clorofórmio e 42 mL de *p*-cresol ($0,4 \text{ mol}$; $108,14 \text{ g.mol}^{-1}$; $1,034 \text{ g.mL}^{-1}$). O balão foi colocado em um banho com temperatura controlada entre 56 - 60 °C e, sob

agitação, deu-se início a adição de 120 g de hidróxido de sódio (3,0 mol; 40 g.mol⁻¹) solubilizados em 100 mL de água destilada, em pequenas porções durante as 3 primeiras horas de reação. A mistura reacional foi mantida sob agitação e refluxo por mais uma hora e, então, deixou-se resfriar até a temperatura ambiente. A seguir foram adicionados cerca de 500 mL de água destilada e, ainda sob agitação, o meio foi acidificado até pH = 2 com a adição de ácido clorídrico concentrado. Em seguida a fase orgânica foi separada, lavada com água destilada, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. O óleo preto restante foi destilado a pressão reduzida com auxílio de uma coluna de vigreux de 40 cm (55 – 65 °C a 0,1 mm Hg) e posteriormente purificado em coluna cromatográfica de sílica utilizando-se diclorometano como eluente. Foram obtidos 7,2 g de HMB (0,2 mol; 36,15 g.mol⁻¹) como um sólido branco cristalino com rendimento de 50 % em relação ao *p*-cresol. A caracterização do produto foi feita por ponto de fusão e infravermelho. **PF**: 56 °C.

IV (KBr), em cm⁻¹: ν (O-H) 3355; ν (C-H_{arom}, C-H_{alif}) 3024-2864; ν (C-H_{ald}) 2738; ν (C=O) 1658; ν (C=C) 1610-1590; δ (O-H) 1372; ν (C-O_{fenol}) 1282; δ (C-H_{arom}) 742.

Na segunda etapa, o CMFF foi obtido pela reação de clorometilação do HMB realizada da seguinte forma: em um balão de 3 bocas, com capacidade para de 1 L foram adicionados 32,0 g de 2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (0,235 mol; 136,15 g.mol⁻¹), 37,5 mL de formaldeído 37% (30,03 g.mol⁻¹; 1,04 g.mL⁻¹) e 390 mL de ácido clorídrico concentrado. A mistura reacional permaneceu sob agitação e refluxo durante 30 minutos e, na sequência, resfriada até 0 °C, formando um precipitado compacto no fundo do balão, que foi triturado, filtrado sob vácuo e lavado com ácido clorídrico concentrado. O sólido branco obtido foi solubilizado em diclorometano a quente e deixado em banho de gelo para recristalização. O produto obtido foi filtrado e deixado em um dessecador com sílica, sob vácuo, por 12 horas e estocado sob argônio a temperatura inferior a -10 °C. Obtiveram-se 40,0 g do produto 2-clorometil-4-metil-6-formil-fenol (CMFF) (184,62 g.mol⁻¹) com 92 % de rendimento em relação ao HMB. A caracterização foi feita por ponto de fusão e infravermelho. **PF**: 95-96 °C.

IV (KBr) cm^{-1} : ν (C-H_{arom}, C-H_{alif}) 3048,2852; ν (C-H_{ald}) 2749; ν (C=O) 1664; ν (C=C) 1600-1590; δ (O-H) 1378; ν (C-O_{fenol}) 1257; δ (C-H_{arom}) 703; ν (C-Cl) 613.

3.2.1.2 Síntese do *N*-(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina – HBPA

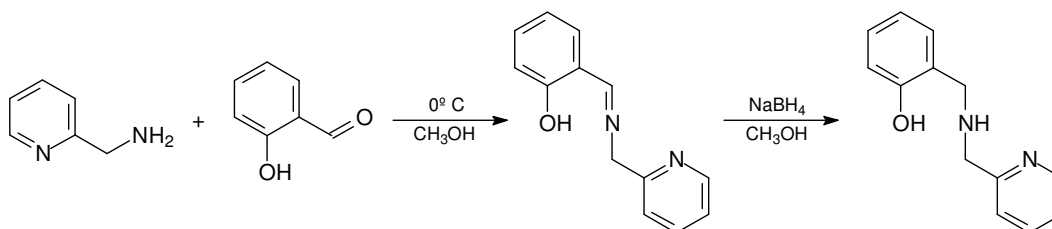


Figura 5 Representação esquemática da síntese do HBPA.

Dando continuidade a síntese dos precursores, o HBPA foi preparado através da modificação do procedimento experimental descrito por NEVES *et al.* em 1992 (Figura 5).

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 1,73 g de 2-hidroxibenzaldeído (16,0 mmol; 108,14 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 1,16 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) dissolvidos em 30 mL de metanol. A esta solução foi adicionada sob agitação magnética e banho de gelo, uma quantidade equimolar de 2-(aminometil)piridina (16,0 mmol; 122,12 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; 1,05 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), e permaneceram reagindo por 3 horas a temperatura ambiente. A imina formada foi reduzida com 0,60 g de borohidreto de sódio (16,0 mmol; 37,83 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e, após, foi feita a neutralização da solução com ácido clorídrico. O solvente foi então retirado em rotaevaporador e substituído por diclorometano para extração com solução aquosa de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado à pressão reduzida, resultando em um óleo amarelo. Este foi colocado em dessecador com sílica sob vácuo para precipitação do produto, que foi lavado com isopropanol gelado e filtrado, resultando em 2,4 g de HBPA (11,2 mmol; 214,27 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), com rendimento de 70%. **PF**: 62-63°C.

IV: ν (N-H) 3462; ν (C-H_{arom} e C-H_{alif}) 3080-2853; ν (C=N, C=C) 1612-1432; δ (O-H) 1310; ν (C-O_{fenol}) 1260; δ (C-H_{arom}) 725.

3.2.1.3 Síntese do 2-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formil-fenol - HBPAMFF

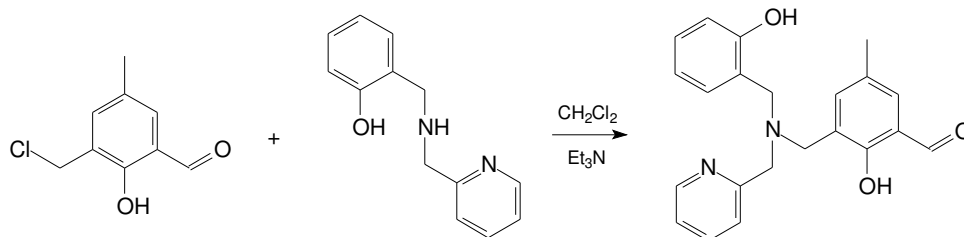


Figura 6 Representação esquemática da síntese do HBPAMFF.

O pró-ligante HBPAMFF foi obtido pela reação de substituição nucleofílica entre os precursores CMFF e HBPA (Figura 6).

O procedimento foi realizado solubilizando 4,60 g de CMFF (25 mmol; $184,62 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) em 80 mL de diclorometano num balão de 250 mL. Sobre esta solução, em banho de gelo, foram adicionados 5,35 g de HBPA (25 mmol; $214,17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) seguido por 3,5 mL de trietilamina (25 mmol; $101,19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $0,727 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$), sob agitação magnética. Após a adição dos reagentes, o banho de gelo foi removido e a mistura foi deixada reagir por mais 12 horas a temperatura ambiente. A seguir a solução reacional foi lavada 6 x 50 mL com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio a 5% e, após, a fase orgânica foi separada, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida, restando um óleo amarelo-claro. A adição de acetonitrila provocou a precipitação de 6,70 g do produto HBPAMFF (19 mmol; $348,42 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) com 77% de rendimento. **PF:** 105-107 °C. O ligante foi caracterizado por RMN ^1H (Figura 7).

RMN ^1H : - δ_{H} (400 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,29 (s, 3 H_{CH_3}); 3,79 (s, 2 H_{CH_2}); 3,83 (s, 2 H_{CH_2}); 3,87 (s, 2 H_{CH_2}); 6,77, 6,79 e 6,81 (t, 1 H_{arom}); 6,87 e 6,89 (d, 1 H_{arom}); 7,04 e 7,06 (d, 1 H_{arom}); 7,15-7,33 (m, 5 H_{arom}); 7,66, 7,68 e 7,70 (t, 1 H_{Py}); 8,61 e 8,82 (d, 1 H_{Py}); 9,99 (s, 1 $\text{H}_{\text{aldeído}}$).

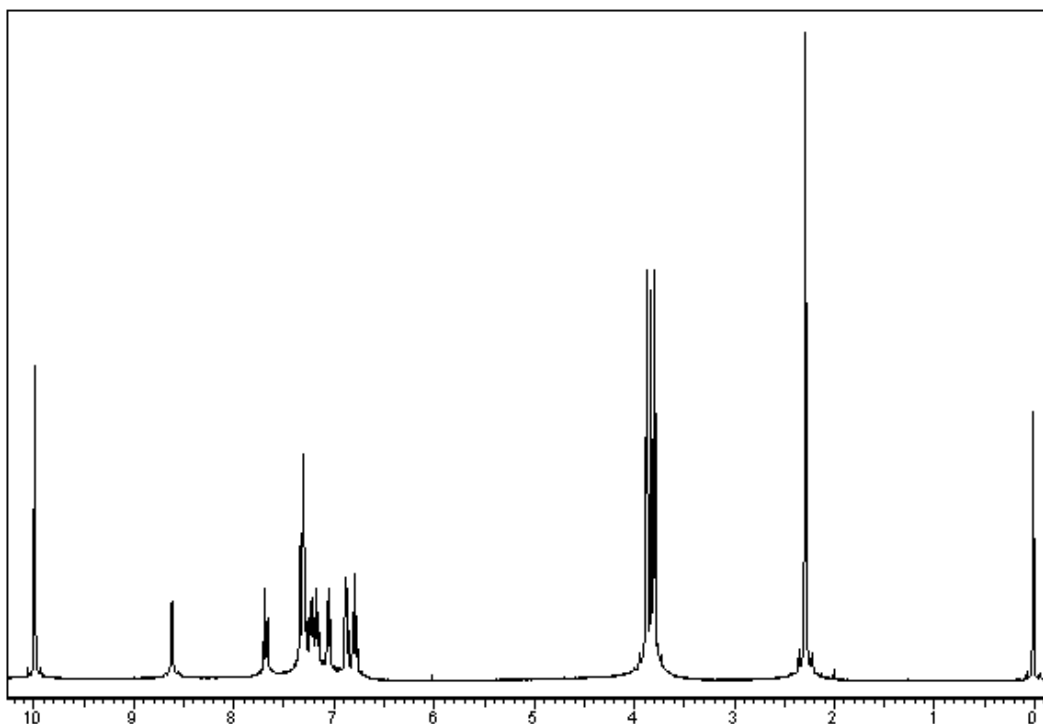


Figura 7 Espectro de RMN ^1H do precursor HBPAMFF - δH (400 MHz; CDCl_3), em ppm, utilizando TMS como padrão interno.

3.2.2 Síntese do ligante 2-[2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[(2-piridilmetil)aminometil]-fenol – $\text{H}_2\text{BPAMPAF}$

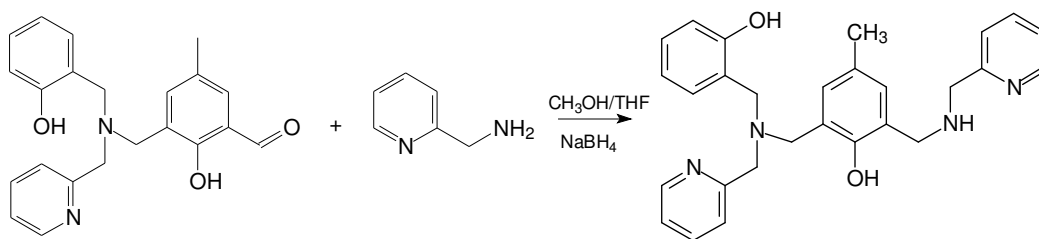


Figura 8 Representação esquemática da síntese do ligante $\text{H}_2\text{BPAMPAF}$.

A última etapa para obtenção do ligante HBPAMPAF, ocorreu através da reação de adição nucleofílica entre a 2-(aminometil)piridina e o HBPAMFF, seguida pela eliminação de água e posterior redução da imina formada (Figura 8).

A síntese foi realizada solubilizando 6,7 g de HBPAMFF (19 mmol; $348,42 \text{ g.mol}^{-1}$) em 80 mL de uma mistura THF/metanol 1:1 v/v formando uma solução sobre a qual foram adicionados, sob agitação magnética, 2,0 mL de 2-(aminometil)piridina (19 mmol; $108,14 \text{ g.mol}^{-1}$; $1,05 \text{ g.mL}^{-1}$). Após três horas, foram adicionados 0,7 g de borohidreto de sódio (19 mmol; $37,83 \text{ g.mol}^{-1}$) em pequenas porções. A mistura permaneceu reagindo por mais uma hora e, então, a solução foi neutralizada com a adição de ácido clorídrico 4 mol.L^{-1} . Em seguida o solvente foi evaporado sob vácuo a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e o produto oleoso solubilizado em 50 mL de diclorometano. À solução foram adicionados 50 mL de água destilada e gotejado ácido clorídrico concentrado até $\text{pH} = 2$. As fases orgânica e aquosa foram separadas e esta última foi lavada com diclorometano. Mais uma vez as fases foram separadas e à solução aquosa foi adicionado hidróxido de sódio até $\text{pH} = 12$. Novamente foi realizada a extração com diclorometano, seguindo com a separação das fases, a solução orgânica seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado em rotaevaporador, resultando em um óleo amarelo-claro que foi seco sob vácuo ($0,1 \text{ mmHg}$, 25°C). Foram obtidos 7,5 g do produto $\text{H}_2\text{BPAMPAF}$ ($16,5 \text{ mmol}$; $454,57 \text{ g.mol}^{-1}$) com 87 % de rendimento. O ligante $\text{H}_2\text{BPAMPAF}$ foi caracterizado por infravermelho (Figura 9) e RMN ^1H (Figura 10).

IV (KBr) em cm^{-1} : ν (C-H_{arom} , C-H_{alif}) 3012, 2915, 2825; ν (C=C) 1590, 1475; δ ($\text{O-H}_{\text{fenol}}$) 1377; ν (C-N , C-O) 1249; δ (C-H_{arom}) 755.

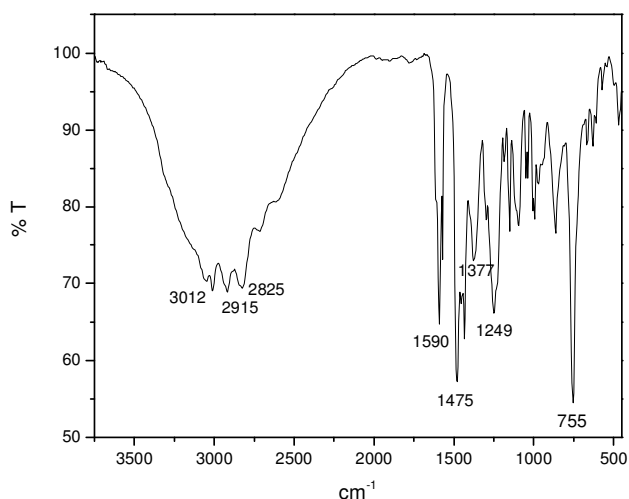


Figura 9 Espectro na região do infravermelho para o ligante $\text{H}_2\text{BPAMPAF}$, obtido em pastilha de KBr.

RMN H¹ - δ_H (400 MHz; CDCl₃), em ppm: 2,21 (s, 3 H_{CH3}); 3,73 (s, 2 H_{CH2}); 3,81 (s, 2 H_{CH2}); 3,85 (s, 2 H_{CH2}); 3,92 (s, 2 H_{CH2}); 3,95 (s, 2 H_{CH2}); 5,29 (CH₂Cl₂); 6,74-6,91 (m, 4 H_{arom}); 7,17-7,37 (m, 6 H_{arom}); 7,63, 7,65 e 7,67 (t, 2 H_{arom}); 8,55 e 8,56 (d, 1 H_{Py}), 8,58 e 8,59 (d, 1 H_{Py}).

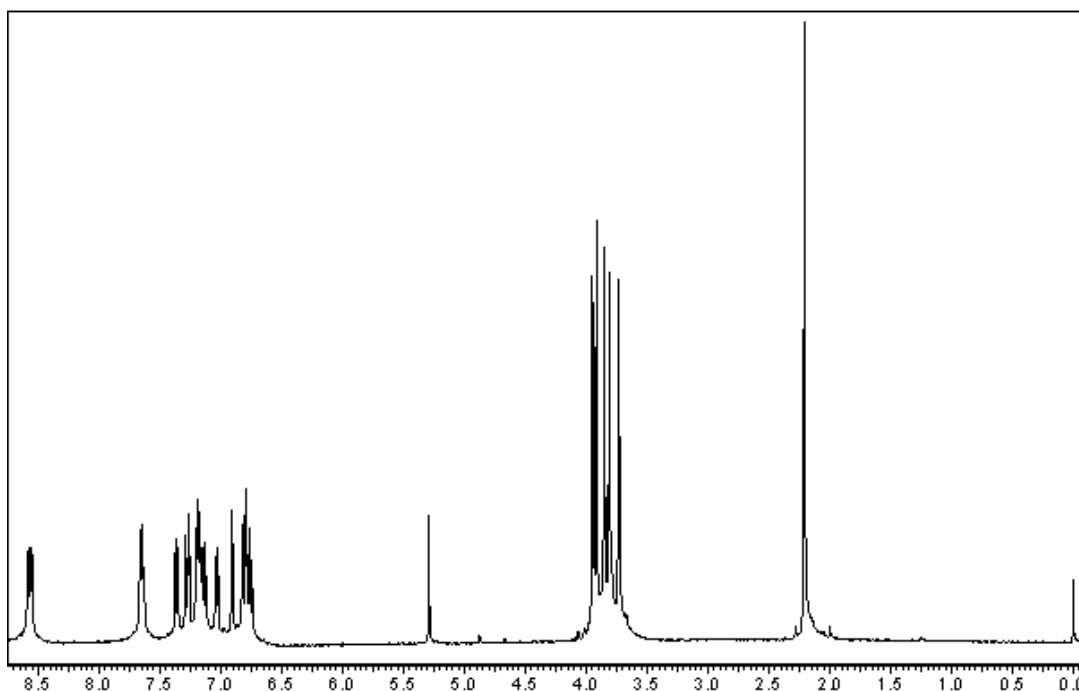


Figura 10 Espectro de RMN H¹ do ligante H₂BPAMPAF - δ_H (400 MHz; CDCl₃), em ppm, utilizando TMS como padrão interno.

3.3 SÍNTESE DO COMPLEXO 1 - [Fe^{III}Cu^{II}(μ -OAc)₂(BPAMPAF)]ClO₄

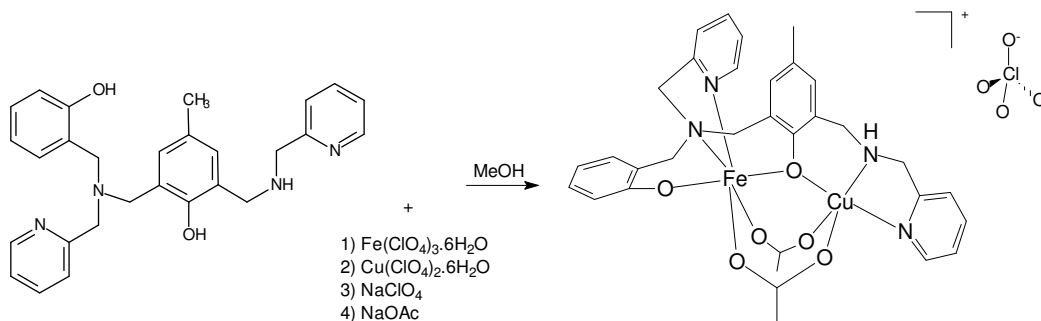


Figura 11 Representação esquemática da síntese do complexo 1.

O complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OAc})_2(\text{BPAMP AF})]\text{ClO}_4$ (onde BPAMP AF^{2-} é a forma desprotonada do ligante $\text{H}_2\text{BPAMP AF}$) foi obtido a partir de 0,23 g do ligante (0,5 mmol; $454,57 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) que foram dissolvidos em 20 mL de metanol sob agitação constante e aquecimento brando ($\sim 35 \text{ }^\circ\text{C}$). Nesta solução foram gotejados lentamente 20 mL de uma solução contendo 0,26 g de perclorato de Fe^{III} hexahidratado (0,5 mmol; $516,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). A seguir foi adicionada uma quantidade equimolar de perclorato de Cu^{II} hexahidratado (0,185 g; 0,5 mmol; $370,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Completados dez minutos de reação foram acrescentados ao sistema 0,27 g de acetato de sódio trihidratado (2,0 mmol; $136,03 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e 0,61 g de perclorato de sódio (5,0 mmol; $122,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). A solução, de coloração púrpura bastante intensa, permaneceu reagindo por aproximadamente quinze minutos e em seguida foi filtrada com papel filtro comum e transferida para um béquer, onde permaneceu em repouso a temperatura ambiente. Passados sete dias foi observada a formação de monocristais púrpura, adequados à resolução da estrutura por difração de raios X. O complexo foi caracterizado por infravermelho (Figura 12).

IV (KBr) em cm^{-1} : ν (N-H) 3211; ν (C-H_{arom} , C-H_{alif}) 3012, 2932; ν ($\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{O}_{\text{acetato}}$) 1605, 1478; ν (C-N, C-O) 1295; ν (Cl-O) 1091; δ (C-H_{arom}) 762.

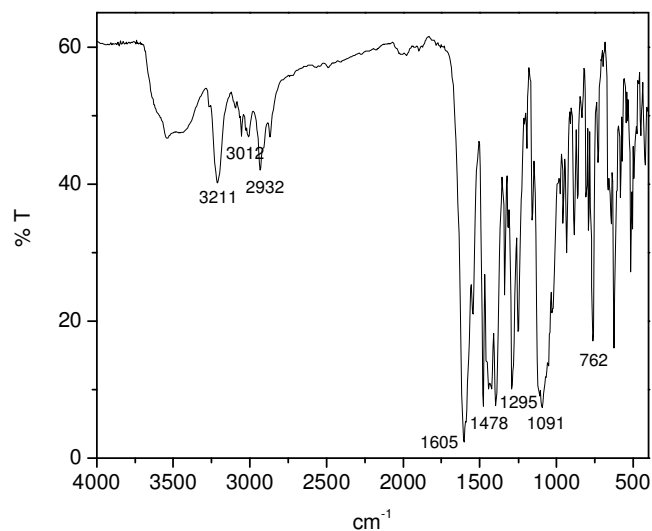


Figura 12 Espectro na região do infravermelho para o complexo **1**, obtido em pastilha de KBr.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN ^1H

Os espectros de RMN ^1H do precursor HBPAMFF e do ligante HBPAMPAF afirmam a obtenção e denotam a pureza de ambos. No primeiro é possível observar a presença de um pico em aproximadamente 10 ppm, atribuído ao hidrogênio ligado ao grupamento carbonílico do aldeído. Já no espectro do ligante final, a ausência deste próton afirma que ocorreu reação e o produto caracterizado é, de fato, o planejado $\text{H}_2\text{BPAMPAF}$, tendo sido atribuídos picos coerentes com as naturezas de todos os prótons, exceto os presentes nos grupos N-H e O-H, os quais podem estar ausentes. As integrais dos picos afirmam números de prótons congruentes com os presentes nas estruturas. No espectro do ligante final observa-se, em 5,29 ppm, a presença de diclorometano na amostra (solvente utilizado na extração: etapa final de obtenção do composto). O problema pode ser resolvido deixando o produto em bomba à vácuo por mais tempo, até que todo o solvente seja evaporado.

4.2 Espectroscopia no Infravermelho - IV

Os espectros do ligante $\text{H}_2\text{BPAMPAF}$ e do Complexo **1** obtidos na região do Infravermelho apresentam bandas referentes aos estiramentos angulares e axiais típicos de ligações químicas presentes na estrutura do $\text{H}_2\text{BPAMPAF}$. Em ambos os espectros há absorção em comprimentos de onda típicos de estiramentos de ligação C=C, C-O/C-N e C-H de cadeia alifática e aromática.

No espectro do Complexo **1** é observada uma maior intensidade e quantidade de bandas na região dos estiramentos axiais de duplas ligações ($1400\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) dadas à presença dos grupos acetatos não presentes no ligante livre. No mesmo espectro também ocorre uma banda fraca em 3211 cm^{-1} atribuída ao estiramento axial da ligação N-H típica de aminas secundárias,

sugerindo que o grupo amino permanece protonado após a coordenação ao íon metálico. Ainda pode ser observada uma banda na região de 3500 cm^{-1} atribuída a ligação O-H possivelmente devida a adsorção de água na amostra.

No espectro do ligante $\text{H}_2\text{BPAMPAF}$ há a presença de uma banda bastante alargada entre 2100 cm^{-1} e 3500 cm^{-1} , também resultado de uma provável presença de umidade na amostra, e que pode ter encoberto a banda resultante da vibração da ligação N-H. Pelo mesmo motivo, a banda referente ao estiramento axial da ligação O-H dos fenóis apresenta-se no espectro como um ombro.

Por fim, no espectro do Complexo **1** é notável a presença de uma banda bastante intensa em 1091 cm^{-1} não presente no espectro do ligante, atribuída ao estiramento axial da ligação Cl-O do grupo perclorato (utilizado como contra-íon na síntese do complexo), confirmando a obtenção de um cátion complexo.

4.3 Difractometria de Raios X

A estrutura obtida a partir da difração de raios X de um monocristal púrpura, coletado da solução metanólica, apresenta o ligante binucleante, os íons metálicos Fe^{III} e Cu^{II} e dois acetatos ponte, de acordo com o objetivo proposto inicialmente. Além disso, ocorre a presença de meia molécula de metanol na cela cristalina. O arranjo estrutural do complexo **1**, $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BPMAMPAF})(\mu\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$, apresentado na Figura 13, é comparável ao complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OAc})_2(\text{BPBPMP})]\text{ClO}_4$ (denominado complexo **2** neste trabalho), descrito por LANZMASTER e colaboradores em 2005, em que o ligante BPBPMP^{2-} possui um grupo adicional metilpiridina sobre a amina secundária do presente ligante. As distâncias de ligação e os ângulos das esferas de coordenação do complexo **1** estão sumarizados na Tabela 3.

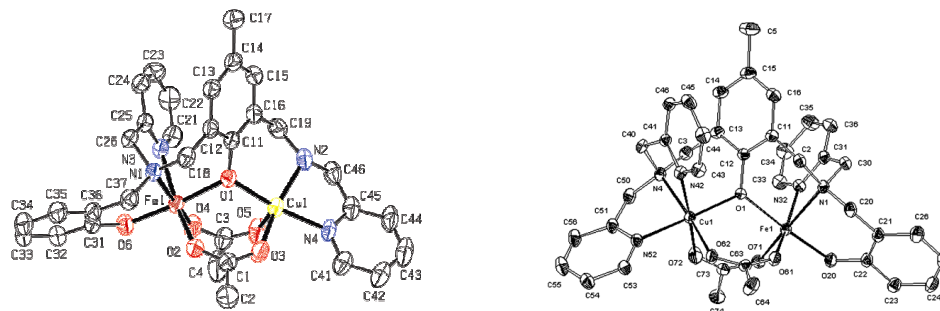


Figura 13 Estruturas cristalinas dos complexos **1** e **2**, respectivamente.

Tabela 3 Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligações do complexo **1**.

Comprimentos (Å)		Ângulos (°)			
Cu1-O3	1,945(5)	O3-Cu1-O1	92,92(19)	O4-Fe1-O1	94,29(19)
Cu1-O1	1,950(4)	O3-Cu1-N4	91,7(2)	O2-Fe1-O1	86,19(19)
Cu1-N4	2,005(5)	O1-Cu1-N4	171,2(2)	O6-Fe1-N3	93,8(2)
Cu1-N2	2,011(6)	O3-Cu1-N2	160,5(2)	O4-Fe1-N3	94,0(2)
Cu1-O5	2,148(5)	O1-Cu1-N2	92,6(2)	O2-Fe1-N3	166,2(2)
Cu1-Fe1	3,4302(11)	N4-Cu1-N2	80,7(2)	O1-Fe1-N3	84,37(18)
Fe1-O6	1,891(4)	O3-Cu1-O5	96,7(3)	O6-Fe1-N1	86,43(19)
Fe1-O4	1,946(5)	O1-Cu1-O5	96,93(18)	O4-Fe1-N1	171,4(2)
Fe1-O2	2,021(5)	N4-Cu1-O5	89,9(2)	O2-Fe1-N1	91,8(2)
Fe1-O1	2,049(4)	N2-Cu1-O5	101,2(2)	O1-Fe1-N1	86,78(17)
Fe1-N3	2,165(5)	O6-Fe1-O4	92,4(2)	N3-Fe1-N1	77,56(19)
Fe1-N1	2,216(5)	O6-Fe1-O2	94,4(2)	C31-O6-Fe1	136,2(4)
		O4-Fe1-O2	96,7(2)	C11-O1-Cu1	118,9(3)
		O6-Fe1-O1	173,19(19)	C11-O1-Fe1	122,7(3)
				Cu1-O1-Fe1	118,1(2)

No complexo **1** os grupos amino (N1), piridina (N3) e fenolato (terminal - O6) estão coordenados facialmente ao centro de Fe^{III}, à uma distância de 2,216(5), 2,165(5) e 2,049(4) Å respectivamente, em um ambiente octaédrico. Na esfera de coordenação do íon Cu^{II} (pirâmide de base quadrada; $\tau = 0,18$) (ADDISON *et al.*, 1984) observam-se semelhanças com o complexo **2**, sendo coordenado por uma amina secundária (N2) e piridina (N4) em duas de suas posições meridionais. A principal diferença entre estes complexos é a simples ausência de um segundo coordenante piridínico em **1**, presente à uma

distância de 2,342 Å em **2**, a maior para este complexo. Completando as posições de coordenação dos centros metálicos encontram-se duas pontes acetato (O2, O3, O4 e O5) e, por último, uma ponte fenolato (O1) com ângulo (Fe1-O1-Cu1) de 118,1(2)°. A distância entre os centros metálicos Fe1-Cu1 é de 3,4302(11) Å, aproximadamente 0,0398 Å menor que a encontrada para **2**. O estudo comparativo entre as estruturas de **1** e **2** é coerente com os efeitos de repulsão eletrônica em ambos os complexos, sendo as ligações de **1** encurtadas em relação a **2**. Ainda, o arranjo estrutural de **1**, tal como **2**, possui características desejáveis para a formação de intermediários catalisador/substrato passíveis de hidrólise pouco energética do substrato justificado pela possibilidade de **1** gerar, em solução, espécies onde as posições lábeis podem se estabelecer sob orientação *cis* (KLABUNDE *et al.*, 1996). Abaixo (Tabela 4) estão sumarizados os dados cristalográficos do complexo **1**.

Tabela 4 Dados cristalográficos selecionados da estrutura do complexo **1**.

Fórmula empírica	C _{32.50} H ₃₆ Cl Cu Fe N ₄ O _{10.50}
Massa molar	805,49
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P 21/c
Dimensões da cela unitária	$a = 10,7281(2) \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ$ $b = 19,4880(4) \text{ \AA}$ $\beta = 101,1350(10)^\circ$ $c = 17,3824(3) \text{ \AA}$ $\gamma = 90^\circ$
Volume	3565,71(12) Å ³
Z	4
Densidade	1,500 Mg/m ³
Dimensões do cristal	0,34 x 0,34 x 0,30 mm ³
Reflexões coletadas	31775
Reflexões únicas	6727 [R(int) = 0,0772]
Goodness-of-fit on F ²	1,159
Índices finais [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0,0821, wR ₂ = 0,2303

4.4 Condutimetria

As análises condutimétricas foram realizadas a partir de $8,0 \times 10^{-3}$ g do Complexo **1** dissolvidos em 10 mL de acetonitrila espectroscópica, formando soluções de concentração $1,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹.

A condutividade molar da espécie (média aritmética dos resultados obtidos pelas análises em triplicata) é de $168 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ e, segundo GARY, 1971, encontra-se entre a faixa típica de cátions complexos monovalentes quando em sistema CH₃CN - $1,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹.

4.5 Espectroscopia Eletrônica - UV-Visível

Os Espectros Eletrônicos do complexo (Figura 14), na região do ultravioleta e visível, foram obtidos utilizando-se soluções de acetonitrila. É possível observar a presença de duas bandas com comprimentos de onda máximos em aproximadamente 333 nm e 559 nm ($\epsilon = 3337 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Ambas são atribuídas a transferência de carga do tipo ligante → metal (TCLM) que ocorre do ânion fenolato para o centro de Fe^{III}. A banda de absorção em 333 nm é atribuída a uma transferência de carga do orbital $p\pi$ do fenolato para o orbital $d\sigma^*$ do íon férrico, e em 559 nm a transferência do orbital $p\pi$ do fenolato para o orbital $d\pi^*$ do Fe^{III}, o que implica a coloração púrpura da espécie (ANTANAITS *et al.*, 1982).

A banda em 333 nm apresenta-se na forma de um ombro parcialmente encoberto pelas bandas de transição eletrônica dos anéis fenólicos e piridínicos do ligante (GABER *et al.*, 1974; KREBS *et al.*, 1994) o que dificulta a exatidão dos valores de absorbância e por isso há apenas uma aproximação para o valor de absorvidade molar que, de fato, confirma a natureza TC.

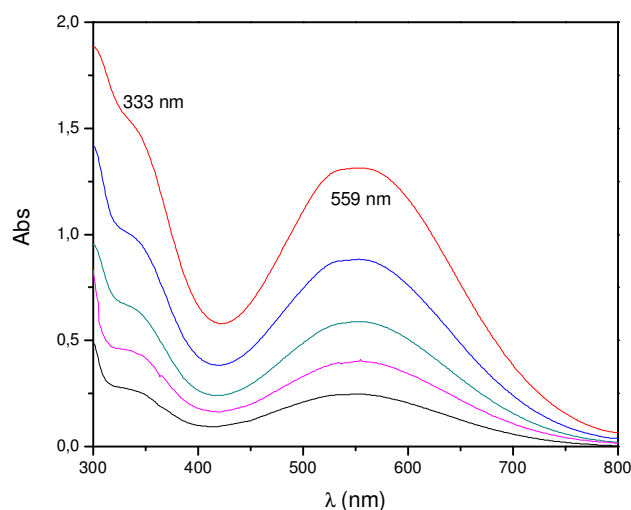


Figura 14 Espectro UV-Vis do complexo **1** obtido em solução de CH_3CN com concentrações entre $7,9 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

O valor do comprimento de onda de máxima absorção obtido a partir dos espectros do complexo **1** para $\text{TCLM O}_{\text{fenolato}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}} (\rho\pi^* \rightarrow d\pi^*)$ encontra-se bastante próximo aos valores encontrados na literatura para os complexos do tipo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$ como também para as enzimas kbPAP e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ -ufPAP modificada (LANZMASTER *et al.*, 2002; LANZMASTER *et al.*, 2005), e podem ser analisados na Tabela 5, abaixo.

Tabela 5 Máximos de absorção e coeficiente de absorvidade molar encontrados na literatura para complexos do tipo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$ e para as enzimas kbPAP e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ -ufPAP modificada, além do encontrado para o complexo **1**.

COMPLEXO	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ ($\text{L. mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\mu\text{-OAc})_2(\text{BPBPMP})]\text{ClO}_4$	540	3700
2 , $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OAc})_2(\text{BPBPMP})]\text{ClO}_4$	546	3400
$\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ -ufPAP modificada	545	3400
kbPAP	560	3360
1 , $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OAc})_2(\text{BPAMPAF})]\text{ClO}_4$	559	3337

4.6 Eletroquímica

4.6.1 Voltametria Cíclica

No voltamograma cíclico do Complexo (Figura 15) obtido em velocidade de varredura de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, são observados dois processos de oxido-redução e um processo de oxidação bem definido em $-0,33 \text{ V}$ inerente a redissolução de cobre depositado no eletrodo.

O primeiro processo de óxido-redução é referente ao par $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$ com um potencial de meia onda ($E_{1/2}$) de $-0,57 \text{ V vs NHE}$ e de natureza *quasi*-reversível. O voltamograma ainda apresenta um segundo processo *quasi*-reversível atribuído ao par $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}}$ com $E_{1/2} = -0,87 \text{ V vs NHE}$.

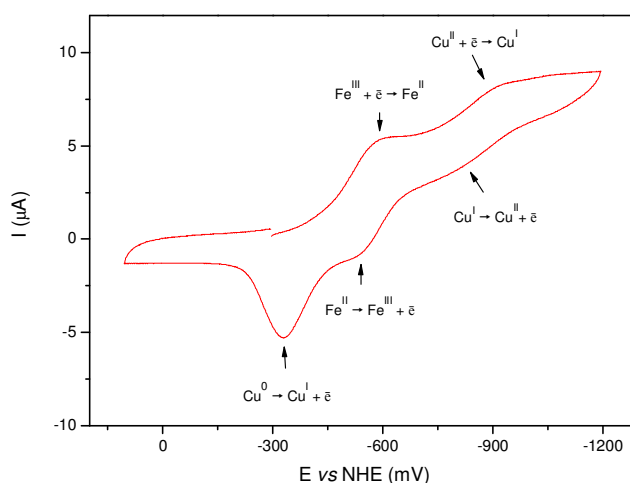


Figura 15 Voltamograma cíclico do complexo **1**. Condições: solvente CH_3CN ; $[\text{complexo } 1] = 4,0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; velocidade de varredura: $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, eletrólito suporte: TBAPF_6 ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); eletrodos: trab.: Pt; ref.: Ag/Ag^+ e aux.: fio de Pt; padrão interno: ferroceno.

4.6.2 Voltametria de Onda-quadrada

A análise eletroquímica de voltametria de onda quadrada foi realizada com o complexo (pulso = 15 mV e frequência = 25 Hz) e o voltamograma obtido está exposto na Figura 16. Como pode ser observado, ocorrem dois processos de oxido-redução *quasi*-reversíveis: o primeiro atribuído ao processo

redox $\text{Fe}^{\text{III}} + \bar{e} \rightleftharpoons \text{Fe}^{\text{II}}$ com $E_{1/2} = -0,55 \text{ V}$ e o segundo inerente ao par $\text{Cu}^{\text{II}} + \bar{e} \rightleftharpoons \text{Cu}^{\text{I}}$ com $E_{1/2} = -0,73 \text{ V}$.

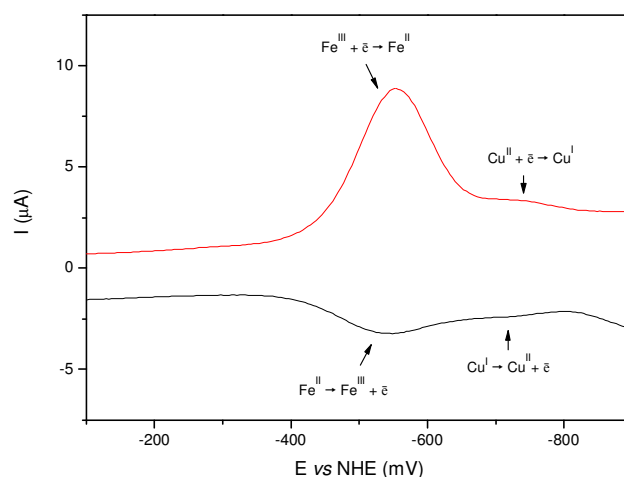


Figura 16 Voltamograma de onda quadrada do complexo **1**. Condições: solvente CH_3CN ; [complexo **1**] = $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$; pulso: 15 mV; frequência: 25 Hz; eletrólito suporte: TBAPF_6 ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$); eletrodos: trab.: Pt; ref.: Ag/Ag^+ e aux.: fio de Pt; padrão interno: ferroceno.

A Tabela 6 apresenta os valores dos potenciais de meia onda encontrados nas análises de voltametria cíclica e de onda quadrada. Podem ser observados resultados bastante próximos para o processo $\text{Fe}^{\text{III}} + \bar{e} \rightleftharpoons \text{Fe}^{\text{II}}$, enquanto que para o par $\text{Cu}^{\text{II}} + \bar{e} \rightleftharpoons \text{Cu}^{\text{I}}$ apresentam uma maior variação, possivelmente devida a baixa intensidade de corrente do processo quando nas condições o qual foi submetido, o que pode ter interferido na leitura dos potenciais de picos catódico e anódico, acarretando numa maior faixa de erro para os valores de $E_{1/2}$.

Tabela 6 Valores de $E_{1/2}$ (V) encontrados nas análises de voltametria cíclica (VC) e onda quadrada (OQ) para o complexo **1**.

Reação redox correspondente	$E_{1/2}$ (V) vs NHE	
	VC	OQ
$\text{Fe}^{\text{III}} + \bar{e} \rightleftharpoons \text{Fe}^{\text{II}}$	-0,57	-0,55
$\text{Cu}^{\text{II}} + \bar{e} \rightleftharpoons \text{Cu}^{\text{I}}$	-0,87	-0,73

Quando comparados os valores dos potenciais de meia onda encontrados para o processo redox do centro de ferro do complexo descrito neste trabalho com o valor publicado por LANZMASTER e colaboradores em 2005 para o complexo **2**, nota-se, no primeiro, um deslocamento para potenciais mais elevados (Tabela 7). Isto é atribuído ao fato de o ligante H₂BPAMPAF ser hexadentado enquanto o H₂BPBPMP (Figura 17) apresenta um grupo -CH₂-Py ligado ao grupamento amínico protonado presente na estrutura do ligante H₂BPAMPAF (Figura 17), o que aumenta a densidade eletrônica no centro de Cu^{II} e afeta, conseqüentemente, o centro de Fe^{III}. Os resultados encontrados são, portanto, coerentes, já que o íon férrico no complexo Fe^{III}Cu^{II}(μ-OAc)₂(BPAMPAF)ClO₄ mostrou-se ser mais facilmente reduzido comparado-se com o seu similar publicado (**2**).

Tabela 7 Valores dos E_{1/2} inerentes ao processo Fe^{III} + e⁻ ⇒ Fe^{II} encontrados por análise de voltametria cíclica para os complexos **1** e **2**.

COMPLEXO	E _{1/2} (V)
1 , Fe ^{III} Cu ^{II} (μ-OAc) ₂ (BPAMPAF)ClO ₄	- 0,57
2 , [Fe ^{III} Cu ^{II} (μ-OAc) ₂ (BPBPMP)]ClO ₄	- 0,61

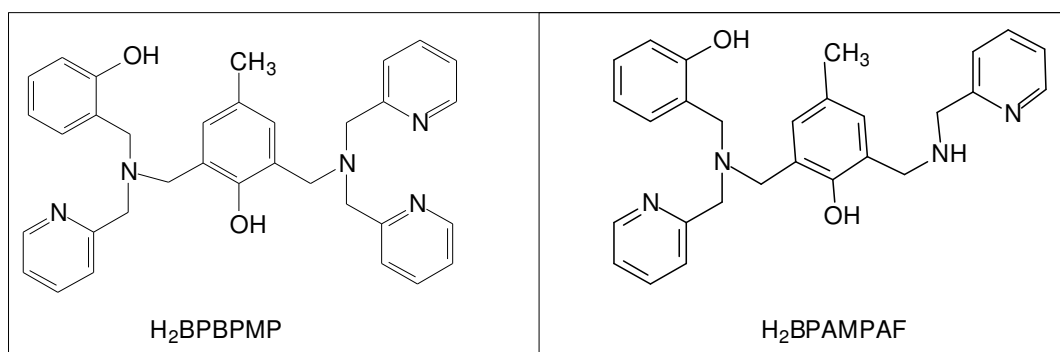


Figura 17 Representação das estruturas dos ligantes H₂BPBPMP e H₂BPAMPAF.

4.7 Promiscuidade Catalítica

4.7.1 Hidrólise do *bis*-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP)

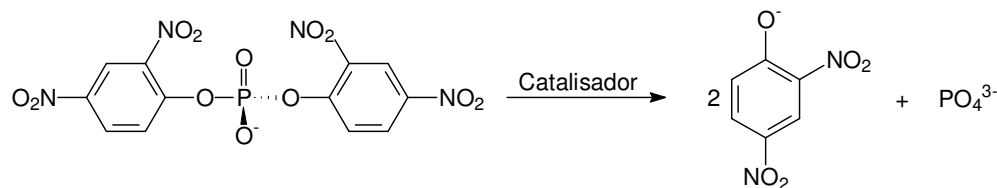


Figura 18 Representação da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP gerando 2,4-dinitrofenolato (2,4-DNP).

O ensaio de reatividade frente à hidrólise do 2,4-BDNPP (Figura 18) foi realizado a fim de analisar a influência do pH do meio na atividade catalítica do complexo. Com os dados obtidos foi construído um gráfico das velocidades iniciais *versus* pH, representado na Figura 19 A.

De maneira geral, os complexos do tipo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$ com ambiente de coordenação próximos ao estudado neste trabalho porém com ligantes heptadentados, apresentam um gráfico de V_0 vs pH, para a mesma reação de hidrólise, em formato de sino, com um máximo de atividade em pH próximo a 7 (pH ótimo). A Figura 19B mostra o perfil encontrado por LANZMASTER e colaboradores em 2005.

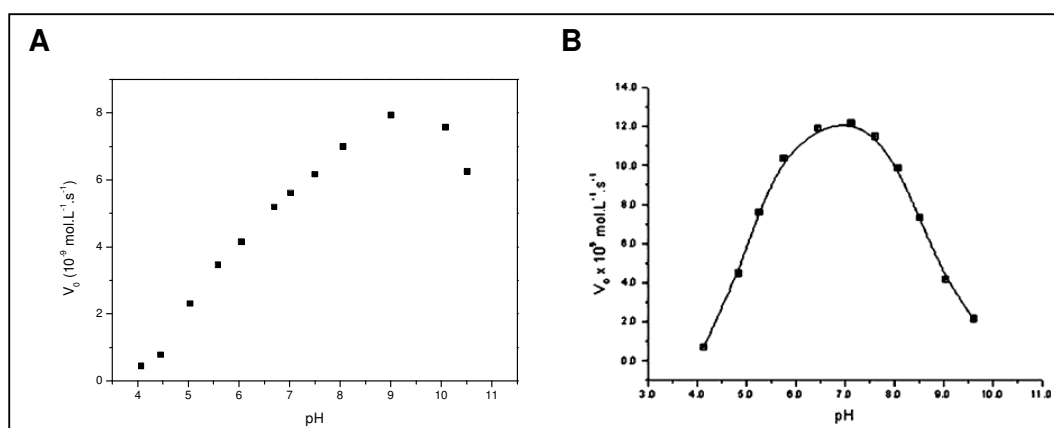


Figura 19 Curvas obtidas para o efeito do pH na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada pelos complexos A) **1** e B) **2**. Condições: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1; $[\text{complexo}] = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{2,4-BDNPP}] = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

De fato, o complexo **1** mostrou que a velocidade da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP sofre a influência do pH do meio. Porém, comparando-se os gráficos apresentados na Figura 19, é possível observar uma diferença de comportamento entre o complexo **1** e **2** e os demais publicados pelo grupo de pesquisa de NEVES (MITIC *et al.*, 2006), observando-se um deslocamento do pH ótimo para um valor mais elevado, próximo a 9,0.

Tendo em vista o comportamento do complexo **1** observado na curva V_0 vs pH, propôs-se que fossem analisadas as atividades das espécies em pHs próximos a 6,0 e 9,0 tendo-se como variável no sistema a concentração de substrato (6,0 por estar entre a faixa de pH que as PAPs atuam e 9,0 por ser o pH ótimo do complexo de fato). Os gráficos das Figuras 20 (A e B) e 21 (A e B) são, portanto, referentes ao comportamento catalítico do complexo nos pHs citados, em condições de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1, $T = 25^\circ\text{C}$; concentração de complexo $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, para os pHs 6,02 e 9,05 respectivamente, e concentração de substrato variando entre $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e $9,3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

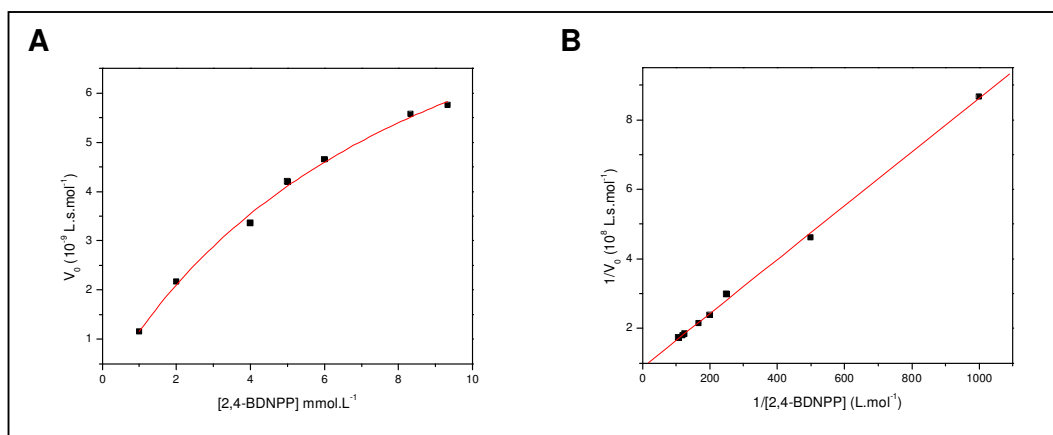


Figura 20 A) Curva de saturação de Michaelis Menten e B) Linearização de Lineweaver Burk obtidas para o complexo **1** para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP em pH = 6,02. Condições: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1; [complexo **1**] = $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; [2,4-BDNPP] = entre $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e $9,3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $T = 25^\circ\text{C}$.

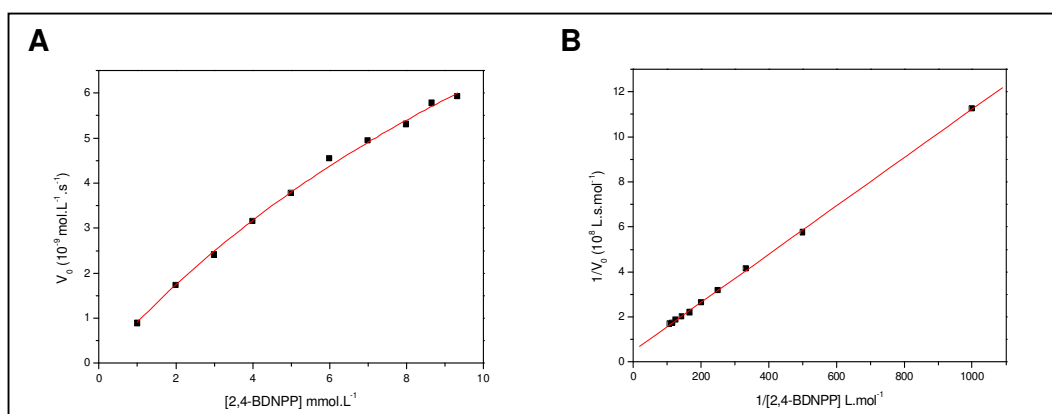


Figura 21 A) Curva de saturação de Michaelis Menten e B) Linearização de Lineweaver Burk obtidas para o complexo **1** para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP em pH = 9,05. Condições: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1; $[\text{complexo } \mathbf{1}] = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; $[2,4\text{-BDNPP}] = \text{entre } 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} \text{ e } 9,3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $T = 25^\circ\text{C}$.

A partir das curvas de saturação de Michaelis Menten (V_0 vs $[2,4\text{-BDNPP}]$) mostradas nos compartimentos A das Figuras 20 e 21, fez-se a linearização de Lineweaver-Burk ($1/V_0$ vs $1/[2,4\text{-BDNPP}]$, compartimentos B), de onde foram obtidos os parâmetros cinéticos representados na Tabela 8, onde $V_{\text{máx}}$ = velocidade máxima da reação; K_M = constante de Michaelis Menten, K_{ass} = constante de associação; k_{cat} = constante de velocidade da reação catalisada, E = eficiência catalítica e f = fator catalítico, que corresponde a razão entre a constante de velocidade da reação catalisada e da auto-hidrólise (k_{nc}) do substrato em temperatura de 25°C ($k_{\text{nc}} = 1,93 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ em pH 6,5 e $k_{\text{nc}} = 3,88 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ em pH 9,0) (BUNTON e FARER, 1969).

Tabela 8: Parâmetros cinéticos encontrados para o complexo **1** em condições de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1; pHs 6,02 e 9,05; $T = 25^\circ\text{C}$.

	pH 6,02	pH = 9,05
$V_{\text{máx}}$ ($10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	1,13	1,96
K_M ($10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$)	8,78	21,1
K_{ass} (L.mol^{-1})	114	47,4
k_{cat} (10^{-4} s^{-1})	2,83	8,04
E ($10^{-2} \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	3,22	3,81
f ($k_{\text{cat}}/k_{\text{nc}}$)	1466	2072

Embora as atividades catalíticas observadas em pH 6,02 e 9,05 sejam menores do que a atividade do complexo **2**, em seu pH ótimo, os valores de fator catalítico de 1466 e 2072 apresentados pelo complexo **1** fazem do mesmo um composto de coordenação útil aos fins do trabalho, no que diz respeito a propostas mecanísticas, estudos bioquímicos de hidrólise de biomoléculas, ensaios de citotoxicidade, etc.

4.7.2 Oxidação do 3,5-di-*tert*-butilcatecol (3,5-DTBC)

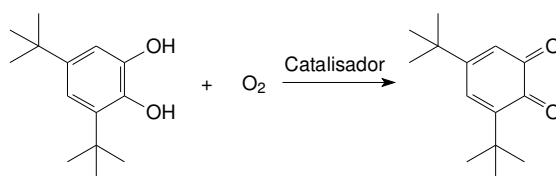


Figura 22 Representação esquemática da reação de oxidação do 3,5-DTBC à 3,5-di-*tert*-butilquinona (3,5- DTBQ).

O ensaio de reatividade do complexo **1** frente a oxidação do 3,5-DTBC (Figura 22) foi realizado de forma a obter informações quanto a presença de comportamento catalítico promíscuo do complexo. Para isto, foram feitos acompanhamentos cinéticos de soluções de MeOH/H₂O 32:1, contendo quantidades equivalentes de complexo ($3,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e substrato (~ 167 vezes de excesso - $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$). Entretanto foram variados os pHs dos sistemas, a fim de analisar uma possível influência do mesmo na reatividade do composto.

Os resultados obtidos nas análises foram satisfatórios. De fato, o complexo **1** apresenta atividade catalítica perante a reação de oxidação do 3,5-DTBC e esta apresenta dependência direta com o pH do meio (Figura 23).

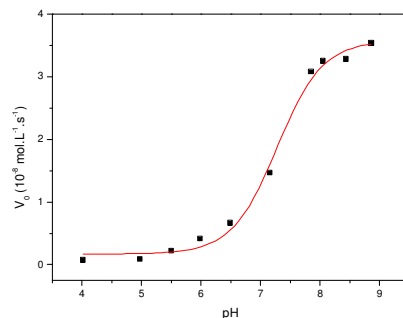


Figura 23 Curva obtida para o efeito do pH na reação de oxidação do 3,5-DTBC catalisada pelo complexo **1**. Condições: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 32:1; $[\text{complexo } \mathbf{1}] = 3,0 \times 10^{-5}$; 3,5-DTBC = $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Como observado na Figura 23, o complexo apresenta atividade próxima a zero em pHs ácidos ocorrendo um aumento súbito quando encontra-se em pHs levemente básicos. Em seguida, em pHs mais elevados, observa-se novamente uma independência das velocidades iniciais da reação com o pH.

Os dados obtidos desse estudo foram ajustados pelo modelo de Boltzmann, por apresentarem um perfil sigmoideal em V_0 vs pH, fornecendo um valor de $pK_a = 7,28$. O pH ótimo para que a reação ocorra está situado na segunda região em que a velocidade da reação é muito pouco influenciada pelo pH do meio, ou seja, pHs $\geq 7,8$. Este valor está próximo ao encontrado para a enzima catecol oxidase (pH 8,0) (PERALTA, 2005).

O complexo apresentou comportamento semelhante aos observados por complexos binucleares heptacoordenados descritos na literatura e caracterizados como modelos estruturais e funcionais da metaloenzima Catecol Oxidase. De acordo com os trabalhos já publicados nesta área, propõe-se que ocorra a desprotonação de uma molécula de água coordenada ao centro de Cu^{II} , gerando a espécie cataliticamente ativa para a reação de oxidação do 3,5-DTBC (KOVAL *et al.*, 2006).

5 CONCLUSÃO

- Os pré-ligantes foram caracterizados por Espectroscopia no Infravermelho e Ponto de Fusão, apresentando-se de acordo com os resultados reportados (Catálogo Sigma-Aldrich; NEVES *et al*, 1996; LANZMASTER, 2003; PERALTA, 2005);
- O ligante H₂BPAMPAF foi obtido em várias etapas, sendo caracterizado por Infravermelho e sua pureza constatada por RMN ¹H;
- O complexo **1**, [Fe^{III}Cu^{II}(OAc)₂(BPMAMPAF)]ClO₄, foi obtido na forma de cristais de coloração púrpura e a técnica de Difractometria de Raios X confirmou a sua estrutura idêntica a inicialmente planejada, com o ligante coordenado facialmente, dois acetatos ponte e um contra-íon perclorato.
- Os resultados dos estudos espectroscópicos na região do Ultra-violeta/Visível e as análises eletroquímicas, convergem com os obtidos por complexos do mesmo tipo já reportados, considerando as similaridades e diferenças entre eles.
- Os estudos de reatividade frente às reações de hidrólise do 2,4-BDNPP e oxidação do 3,5-DTBC confirmaram a atividade do complexo **1** em ambos os casos, o que caracteriza a promiscuidade catalítica apresentada pelo composto.
- Após analisados os resultados obtidos nos experimentos cinéticos para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP, propõem-se que haja duas espécies cataliticamente ativas: em pHs mais baixos, acredita-se que há um hidróxido terminal coordenado ao centro de Fe^{III} agindo como nucleófilo da reação e em pH ~ 9,0 o nucleófilo é um hidróxido coordenado ao centro de Cu^{II}.
- Por fim, o complexo **1** pode ser considerado modelo funcional para as metaloenzimas Fosfatases Ácidas Púrpuras, como também para a Catecol Oxidase.

6 PERSPECTIVAS

- Observar o comportamento catalítico do complexo **1** frente as reações estudadas, analisando o efeito da concentração de substrato, para que informações quantitativas acerca da aceleração provocada nas reações sejam conhecidas e possam ser comparadas;
- Observar a formação de peróxido, ou não, na reação de oxidação do 3,5-DTBC catalisada pelo complexo **1**, a fim de contribuir para uma melhor compreensão da via mecanística pela qual a reação ocorre;
- Analisar as espécies presentes em solução em diferentes pHs;
- Testar a atividade do complexo **1** no processo de clivagem do DNA;
- Testar a atividade citotóxica do composto em células cancerosas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, J., BUCHLER, S., MEYER, F. Structure-activity correlations in highly preorganized dicopper catechol oxidase model systems, Comptes Rendus Chimie, v. 10, p. 421-432, **2007**.

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

ANTANAITS, B. C.; STREKAS, T.; AISEN P. Characterization of pink and purple uteroferrin by resonance raman and CD spectroscopy. Journal of Biological Chemistry, v. 257, p. 3766-3770, **1982**.

AVERILL, B. A.; DAVIS, J. C.; BURMAN, S.; ZIRINO, T.; SANDERSLOEHR, J.; LOEHR, T.M.; SAGE, J.T.; DEBRUNNER, P.G. Spectroscopic and magnetic studies of the purple acid phosphatase from bovine spleen. Journal of the American Chemical Society. v. 109, n. 12, p. 3760-3767, **1987**.

BATISTA, S. C.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J.; VENCATO, I.; PERALTA, R. A.; SZPOGANICZ, B.; AIRES, V. E.; SEVERINO, P. A.; Highly efficient phosphate diester hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical Fe^{III}Ni^{II} model complex, Inorganic Chemistry Communications, v. 6, p. 161-1165, **2003**.

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

Catálogo Sigma-Aldrich. **2003/2004**

FARRUGIA, L. J. ORTEP3 for Windows. Journal of Applied Crystallography, v. 30, p. 565, **1997**.

GABER, B. P.; MISKOWSKI, V.; SPIRO, T. G. Resonance raman scattering from iron(III)- and copper(II)- transferrin and an iron (III) model compound. A spectroscopic interpretation of transferrin binding site. Journal of American Chemical Society. v. 96, n. 22, p. 6868-6873, **1974**.

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

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

GUDDAT, L. W.; McALPINE, A. S.; HUME, D.; HAMILTON, S.; De JERSEY, J.; MARTIN, J.L. Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase. Structure with Folding and design, v. 7, n. 7, p. 757-767, **1999**.

KARSTEN, P.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A.; DRAGO, V. and LANZMASTER, M. Synthesis, Structure, Properties, and Phosphatase-Like Activity of the First Heterodinuclear Fe^{III}Mn^{II} Complex with the Unsymmetric ligand H₂BPPMP as a model for the PAP in Sweet Potato. Inorganic Chemistry, v. 41, p. 4624-4625, **2002**.

KAZLAUSKAS, R. J.: Enhancing Catalytic Promiscuity for Biocatalysis, Current Opinion in Chemical Biology, v. 9, p. 195–201, **2005**.

KLABUNDE, T.; STRÄTER, N.; FRÖHLICH, R.; WITZEL, H., KREBS, B. Mechanism of Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase based on crystal structures. Journal of Molecular Biology, v. 259, p. 737-748, **1996**.

KLABUNDE, T.; KREBS, B. The dimetal center in purple acid phosphatases. Structure and Bonding, v. 89, p. 177-198, **1997**.

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

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

KREBS, B.; SCHEPERS, K.; HENKEL, G.; HENKEL, G.; ALTHAUS, E.; MULLERWARMUTH, W.; GRIESAR, K. and HAASE, W. Model compounds for the oxidized Uteroferrin-phosphate complex with novel dinucleating ligands containing phenolate and pyridine donors. Inorganic Chemistry, v. 33, n. 9, p. 1907-1914, **1994**.

LANZMASTER, M.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICZ, B. and SCHWINGEL, E. New Fe^{III}Zn^{II} Complex Containing a Single Terminal Fe–O_{phenolate} Bond as a Structural and Functional Model for the Active Site of Red Kidney Bean Purple Acid Phosphatase. Inorganic Chemistry, v. 41 (22), p. 5641-5643, **2002**.

LANZMASTER, M. Desenvolvimento de novos complexos modelos estruturais e funcionais para as Fosfatases Ácidas Púrpuras. Tese de Doutorado em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, **2003**.

LANZMASTER, M.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J.; AIRES, V. V. E.; SZPOGANICZ, B.; TERENCEZI, H.; SEVERINO, R. C.; FULLER, J. M.; DREW, S. C.; GAHAN, L. R.; HANSON, G. R.; RILEY, M. J.; SCHENK, G. A new heterobinuclear Fe^{III}Cu^I complex with a single terminal Fe^{III}–O(phenolate) bond. Relevance to purple acid phosphatases and nucleases. Journal of Biological Inorganic Chemistry, v. 10, p. 319-332, **2005**.

LINDQVIST, Y.; JOHANSSON, E.; KAIJA, H.; VIHKO, P.; SCHNEIDER, G. Three-dimensional structure of a mammalian purple acid phosphatase at 2.2 Å resolution with a μ -(hydr)oxo bridged di-iron center. Journal Molecular Biology, v. 291, p. 135-147, **1999**.

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

MARTELL, A. E.; MOTOKAITIS, R. J. Determination and use of stability constants. VCH, New York, 2nd ed, **1992**.

MENCHER, S. K.; WANG, L. G.: Promiscuous drugs compared to selective drugs (promiscuity can be a virtue), BMC Clinical Pharmacology, v. 5, p. 3, **2005**.

MITIC, N.; SMITH, S. J.; NEVES, A.; GUDDAT, L. W.; GAHAN, L. R.; SCHENCK, G. The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases. Chemical Reviews, v. 106(8), p. 3336-3338, **2006**.

NEVES, A.; ERTHAL, S. M. D.; DRAGO, V.; GRIESAR, K. and HAASE, W. A new N,O-donor binucleating ligand and its first iron(III) complex as a model for the purple acid phosphatase. Inorganica Chimica Acta, v. 197, p. 121-124, **1992**.

NOBELI, I.; FAVIA, A. D. & THORNTON, J. M. Protein promiscuity and its implications for biotechnology. Nature Technology, v. 27, p. 157-167, **2009**.

OLIVEIRA, M.; MAZERA, D.; SCARPELLINI, M.; SEVERINO, P. C.; NEVES, A.; TEREZI, H.: Mononuclear Cu^{II}-Phenolate Bioinspired Complex is Catalytically Promiscuous: Phosphodiester and Peptide Amide Bond Cleavage, Inorganic Chemistry Communications, v. 48, p. 2711-2713, **2009**.

PERALTA, R. A. Novos complexos binucleares de cobre(II) e de ferro(III) zinco(II): Biomiméticos sintéticos para Catecol Oxidase e para Fosfatases Ácidas Púrpuras. Tese de Doutorado em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, **2005**.

POCKER, Y.; STONE, J.T. The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. VII. Kinetic studies of esterase activity and competitive inhibition by substrate analogs. Biochemistry, v. 7, p. 3021-3031, **1968**.

REY, N. A.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J.; PICH, C. T.; TEREZI, H.: Catalytic Promiscuity in Biomimetic Systems: Catecholase-like Activity, Phosphatase-like Activity, and Hydrolytic DNA Cleavage Promoted by a New Dicopper(II) Hydroxo-Bridged Complex, Inorganic Chemistry, v. 46, p. 348-350, **2006**.

ROSSI, L. M., Novos complexos binucleares de cobre de relevância bioinorgânica, Tese de Doutorado em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, **2001**.

SCHENK, G.; GE, Y. B.; CARRINGTON, L. E.; WYNNE, C.J.; SEARLE, I.R.; CARROLL, B.J.; HAMILTON, S. and De JERSEY, J. Binuclear metal centers in purple acid phosphatases: Fe-Mn in sweet potato and Fe-Zn in soybean. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 370, p. 183-189, **1999**.

SHELDRICK, G. M. SHELXS-97: program for the solution of crystal structures. University of Göttingen, Germany, **1990**.

SHELDRICK, G. M. SHELXL-97: program for the refinement of crystal structures. University of Göttingen, Germany, **1997**.

SIEGBAHN, P. E. M. The catalytic cycle of catechol oxidase, Journal of Biological Inorganic Chemistry, v. 9, p. 577-590, **2004**.

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

STRÄTER, N., KLABUNDE, T., TUCKER, P.; WITZEL, H., KREBS, B. Crystal structure of a purple acid-phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active-site. Science, v. 268, p. 1489-1492, **1995**.

THAN, R., FELDMANN A., KREBS, B. Structural and functional studies on model compounds of purple acid phosphatases and catechol oxidases, Coordination Chemistry Reviews, v. 182, p 211-241, **1999**.

THOER, A.; DENIS, M., DELMAS, M. and GASET, A. The Reimer-Tiemann reaction in slightly hydrated solid-liquid medium: a new method for the synthesis of formyl and diformyl phenols. Synthetic Communications, v. 18, p. 2095-2101, **1988**.

UPPENBERG, J.; LINDQVIST, F.; SVENSSON, C.; EK-RYLANDER, B., ANDERSSON, G. Crystal structure of a mammalian purple acid phosphatase. Journal of Molecular Biology, v. 290, p. 201-211, **1999**.