

Thaisy Mara Richetti da Silva Palhano

**COMPLEXOS BINUCLARES DE COBALTO COM LIGANTES
N,O-DOADORES MACROCÍCLICOS: ELABORAÇÃO E
ESTUDOS COMO CATALISADORES NA OXIDAÇÃO DE
CATECÓIS**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-graduação em
Química da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção
do Grau de Mestre em Química
Orientador: Prof. Dr. Ademir Neves

Florianópolis
2017

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

Palhano, Thaisy Mara Richetti da Silva
Complexos binucleares de cobalto com ligantes N,O
doadores macrocíclicos: elaboração e estudos como
catalisadores na oxidação de catecóis. / Thaisy Mara
Richetti da Silva Palhano ; orientador, Ademir
Neves - SC, 2017.
115 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e
Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Química. 2. Química. 3. Química Bioinorgânica.
4. Complexos binucleares de Cobalto. 5. Catecol
oxidase. I. Neves, Ademir. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Química. III. Título.

Thaisy Mara Richetti da Silva Palhano

**COMPLEXOS BINUCLARES DE COBALTO COM LIGANTES
N,O-DOADORES MACROCÍCLICOS: ELABORAÇÃO E
ESTUDOS COMO CATALISADORES NA OXIDAÇÃO DE
CATECÓIS**

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

Local, 21 de fevereiro de 2017.

Prof. Vanderlei Gageiro Machado, Dr.
Coordenador do Curso

Banca examinadora:

Prof. Ademir Neves, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a, Renata El-Hage Meyer de Barros Osório Dr^a.
Instituto Federal de Santa Catarina – IFSC

Prof. Miguel Soriano Balparda Caro, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Prof^a. Vera Lúcia Azzolin Frescura Bascunan, Dr^a.
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado a minha
mãe, minha irmã e meus sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, pela dedicação, suporte, carinho, cuidados, sacrifícios e amor incondicional. Os últimos anos foram difíceis, porém só cheguei até aqui, pois você é meu exemplo maior de vida, te amo incondicionalmente. À minha irmã Geisa e meus sobrinhos, Luísa e Lucas, pela paciência e por me aguentarem nesta vida agitada e também por me mostrarem que independente de tudo, temos que ter força, foco e fé para vencer.

Quero agradecer, ao professor Ademir pela orientação, ensinamentos e oportunidade e aos professores Rosely, Bernardo e Adailton por toda ajuda e atenção. Aos meus colegas e demais professores do departamento de Química, vocês se tornaram fundamentais nos bons e maus momentos.

Agradeço a galerinha do LABINC, pelos melhores momentos que passei ao lado de vocês, pelas risadas, trollagens, companhias, joguinhos, cafés, conversas, discussões e tantas outras coisas. Vocês tornaram essenciais na minha vida e me fizeram crescer como pessoa e como química. Em especial a Graci e a Cacau pelos puxões de orelha, infundáveis ajudas e claro, por sempre estarem ao meu lado quando eu sempre precisei, serei eternamente grata a tudo que vocês fizeram por mim. A Bruna pelas loucuras na Licenciatura e por ser tão solícita quando eu sempre precisei, ao André por me aguentar um ano na mesma bancada. À Rhannanda pelas conversas, os inúmeros almoços no RU e pela ajuda e apoio nesta reta final e a Claudia P. pelo companheirismo e por sempre estar à disposição sempre que eu precisei. Muitos beijos de luz a todos vocês.

Agradeço aos professores, membros da banca examinadora por aceitarem convite.

Agradeço ao Departamento de Química, ao Programa de Pós-Graduação e a UFSC pela infraestrutura concedida, a CAPES pela bolsa concedida, ao CNPq e INCT-Catálise pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente durante o período do mestrado. Obrigada.

“Vai meu coração ouve a razão
Usa só sinceridade
Quem semeia vento, diz a razão
Colhe sempre tempestade”.
(Tom Jobim e Vinicius de Moraes)

RESUMO

O estudo e investigação da reatividade de íons metálicos em sistemas biológicos vêm ganhando destaque nos últimos decênios. Com o propósito de elucidar o mecanismo de ação de diversas metaloenzimas, neste caso cita-se a metaloenzima catecol oxidase a qual é de interesse neste trabalho. Propõe-se a síntese e o desenvolvimento de ligantes e seguidamente, de complexos que tenham capacidade de mimetizar várias características, tanto estruturais quanto funcionais das metaloenzimas.

No presente trabalho foram sintetizados dois ligantes macrocíclicos L_{but} e L_{t4am} sendo caracterizados por diferentes técnicas, como ponto de fusão, RMN ^1H , espectroscopia na região do IV e ESI-MS. A partir destes ligantes foram sintetizados dois complexos binucleares $[\text{Co}_2^{\text{III}}(\text{L}_{\text{but}})(\mu\text{-OAc})](\text{BPh}_4)_2 - \mathbf{C}_1$ e $[\text{Co}_2^{\text{III}}(\text{L}_{\text{t4am}})(\mu\text{-OAc})]\text{ClO}_4 - \mathbf{C}_2$ que foram caracterizados via espectroscopias no infravermelho e no UV-Vís, ESI-MS, condutividade molar, e eletroquímica. Os complexos foram estudados como catalisadores frente à oxidação do substrato 3,5-di-*terc*butilcatecol na presença de O_2 , onde ambos os complexos apresentam atividade catalítica. Observou que complexo \mathbf{C}_1 exibiu uma eficiência catalítica cinco vezes maior que o complexo \mathbf{C}_2 , o qual está associado ao seu menor valor de K_M , ou seja, maior eficiência ao coordenar-se com o substrato, mostrando que estes complexos podem ser considerados como modelos bioinspirados para a catecol oxidase.

Palavras-chave: Catecol oxidase. Ligantes macrocíclicos. Complexos binucleares de cobalto(III).

ABSTRACT

The study and investigation of metallic ions reactivity in biological systems have been receiving attention in the recent decades. In order to elucidate the mechanistic pathway of the catalytic reactions of various metalloenzymes, in this case the metalloenzyme catechol oxidase, the present work proposes the synthesis and development of new ligands and their complexes which have the capacity to mimic structural and functional characteristics of metalloenzymes.

This work reports the synthesis of two macrocyclic ligands L_{but} and L_{t4am} and their characterization through different techniques such as melting point, ^1H NMR, spectroscopy in region of the IR and ESI-MS. From these ligands, two binuclear complexes $[\text{Co}_2^{\text{III}}(L_{\text{but}})(\mu\text{-OAc)}](\text{BPh}_4)_2 - \mathbf{C}_1$ and $[\text{Co}_2^{\text{III}}(L_{\text{t4am}})(\mu\text{-OAc})]\text{ClO}_4 - \mathbf{C}_2$ were synthesized and characterized by spectroscopy in region of the IR and UV-Vis, ESI-MS, molar and electrochemical conductivity. The complexes were studied as catalysts in the oxidation of 3,5-di-*tert*-butylcatechol using O_2 , where both complexes showed a catalytic activity. Moreover, it was observed that the catalytic activity of the \mathbf{C}_1 complex is five times greater than \mathbf{C}_2 , and is associated with the small value of K_M , that is, greater efficiency when coordinating with the substrate, showing that these complexes can be considered bioinspired models for a catechol oxidase.

Keywords: Catechol oxidase. Macrocyclic ligands. Binuclear cobalt(III) complexes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Exemplos de cobalaminas de acordo com o ligante no sítio de coordenação β : Vitamina B₁₂ (**1**, R = CN), Metilcobalamina (**2**, R = CH₃) e coenzina B₁₂ (**3**, R = 5'-deoxi-5'-adenosil)..... 30
- Figura 2 - Representação simbólica do equilíbrio “coordenado” / “não coordenado” das Cbls..... 31
- Figura 3 - Reação de conversão de nitrilas nas suas correspondentes amidas, catalisadas pela nitrila hidratase. 32
- Figura 4 - Sítio ativo da NHase proveniente da *P. thermophila* (MITRA; HOLZ, 2006). 33
- Figura 5 - Reação de oxidação das catecóis oxidases..... 36
- Figura 6 - Estrutura cristalina da catecol oxidase como um complexo inibidor com a feniltiouréia (esquerda). Estrutura cristalina da catecol na sua forma oxidada (direita) (GERDEMANN; EICKEN; KREBS, 2002; DEY; MUKHERJEE, 2016). 36
- Figura 7 - Mecanismo proposto para oxidação de *o*-difenois promovido pela catecol oxidase (adaptado de COMBA et al., 2012). 38
- Figura 8 - Complexos de cobalto reportados por (A) Dey e Mukherjee, (B) Hazari e colaboradores e (C) Mitra e colaboradores. Nota: Figura adaptada. 39
- Figura 9 - Representação esquemática dos ligantes sintetizados neste trabalho. 49
- Figura 10 - Sobreposição dos espectros no IV dos ligantes. (a): dos precursores 2py e L_{2pyald}. (b): dos ligantes L_{t4am} e L_{but} e do precursor L_{2pyald}. 57
- Figura 11 - Espectro de RMN ¹H (200 MHz) do ligante L_{but} em CDCl₃. 59
- Figura 12 - Espectro de RMN ¹H (200 MHz) do ligante Lt4am em CDCl₃ 60
- Figura 13 - Espectro de massas do ligante L_{but} em CH₃CN para *m/z* 625,39 61

Figura 14 - Estrutura catiônica do ligante L_{but} de acordo com o ESI-MS	62
Figura 15 - Espectro de massas do ligante L_{t4am} em CH_3CN	62
Figura 16 - Espectro experimental e teórico para m/z 683,39 (a); espectro experimental e teórico para m/z 342,22 (b).	63
Figura 17 - Sobreposição dos espectros e IV dos complexos com seus respectivos ligantes: (a) L_{but} e C_1 ; (b) L_{t4am} e C_2 . (—) complexo; (—) ligante.	66
Figura 18 - Formas de coordenação do grupo acetato	67
Figura 19 - Espectro eletrônico, em MeOH na região do ultravioleta-visível do complexo C_1 e C_2	69
Figura 20 - Ampliação do espectros eletrônicos dos complexos C_1 e C_2	69
Figura 21 - Espectro eletrônico, em CH_3CN/H_2O (1:1), na região do ultravioleta-visível dos complexos C_1 e C_2 , na presença de NaOH 0,01 mol L^{-1}	70
Figura 22 - Espectro de massas dos complexos C_1 e C_2 em CH_3CN ..	72
Figura 23 - Simulação da distribuição isotópica com $m/z = 796,29$ para o complexo C_1	73
Figura 24 - Estrutura proposta do complexo C_1 de acordo com o espectro de ESI-MS	73
Figura 25 - Simulação da distribuição isotópica do complexo C_1 com $m/z = 426,13$	74
Figura 26 - Estrutura proposta do complexo C_1 de acordo com o espectro de ESI-MS	74
Figura 27 - Simulação da distribuição isotópica do complexo C_2 com $m/z = 456,64$	75
Figura 28 - Estrutura proposta do complexo C_2 de acordo com o espectro de ESI-MS	75

- Figura 29 - Voltamogramas de onda quadrada dos complexos **C₁** e **C₂** ambos em metanol com concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de trabalho: Carbono vitreo; Referência: Ag/Ag⁺; Auxiliar: Platina. Eletrólito suporte: TBAPF₆ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e padrão interno: Ferroceno..... 77
- Figura 30 - Esquema ilustrativo para a reação de oxidação do substrato 3,5-DTBC..... 78
- Figura 31 - Variação do espectro eletrônico para reação de oxidação do 3,5-DTBC catalisada pelos complexos. 79
- Figura 32 - Dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5-DTBC com o pH para o complexo. Condições: $[\text{Complexo}]_f = 3,35 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[3,5\text{-DTBC}]_f = 3,74 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Tampões}] = 2,94 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; solução MeOH/H₂O (30:1) a 25 °C..... 81
- Figura 34 - Complexos de cobalto reportados por Hazari et al, 2015 (**2a**) e por Dey; Mukherjee, 2014 (**1b**)..... 83
- Figura 33 - Dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5-DTBC com o pH para os complexos **C₁** e **C₂**. Condições: $[\text{Complexo}]_f = 3,67 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[3,5\text{-DTBC}]_f = 1,70 \times 10^{-3} - 11,90 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Tampões}] = 2,94 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; solução MeOH/H₂O (30:1) a 25 °C. 84
- Figura 35 - Variação do espectro eletrônico para reação de determinação de peróxido de hidrogênio pela método de iodometria... 86
- Figura 36 - Mecanismo proposto para a oxidação do substrato 3,5-DTBC catalisada pelos compostos **C₁** e **C₂**..... 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de enzimas ou proteínas não-corrinóides contendo Cobalto.....	32
Tabela 2 - Lista de reagentes e solventes utilizados neste trabalho.....	43
Tabela 3 - Condições cinéticas para o estudo da variação do pH	47
Tabela 4 - Condições cinéticas para o estudo da variação do efeito de substrato	47
Tabela 5 - Dados gerais dos ligantes finais.	55
Tabela 6 - Solubilidade dos ligantes	56
Tabela 7 - Principais bandas e atribuições dos precursores 2py e L _{2nvald} e dos ligantes L _{but} e L _{t4am} (PAVIA et al., 2009; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).	58
Tabela 8 - Deslocamentos químicos (ppm), observados nos espectros	60
Tabela 9 - Dados gerais dos complexos binucleares de cobalto (III) com ligantes macrocíclicos.....	64
Tabela 10 - Solubilidade dos complexos binucleares de cobalto (III) com ligantes macrocíclicos.....	64
Tabela 11 - Principais bandas e atribuições dos complexos C₁ e C₂ (NAKAMOTO, 2009; PAVIA et al., 2009; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).....	67
Tabela 12 - Atribuições às bandas dos espectros eletrônicos dos complexos de cobalto(III) na região do ultravioleta-visível.	68
Tabela 13 - Dados de Onda Quadrada para os complexos	77
Tabela 15 - Valores de pK _{as} para os complexos C₁ e C₂	81
Tabela 16 - Comparação dos parâmetros cinéticos de alguns complexos selecionados: ^a (Hazari et al, 2015); ^b (DEY; MUKHERJEE, 2014).	85

LISTA DE ABREVEVIATURAS E SIGLAS

2py	N,N'-(2-piridilmetil)-1,3-propano-2-ol
3,5-DTBC	3,5-di- <i>terc</i> -butilcatecol
3,5-DTBQ	3,5-di- <i>terc</i> -butilquinona
Å	Angstrom
AdoCbl	Adenosilcobalamina
ATR	Refletância total atenuada
BPh ₄	Tetrafenilborato
C	Complexo
C ₁	Complexo [Co ^{III} (Lbut)(μ-OAc)](BPh ₄) ₂
C ₂	Complexo [Co ^{III} (L _{14am})(μ-OAc)]ClO ₄
Cbls	Cobalaminas
CMFF	2-clorometil-4-metil-6-formilfenol
Cys	Cisteína
Dmbz	5,6-dimetilbenzimidazol
E _c	Eficiência Catalítica
ENH	Eletrodo normal de hidrogênio
E _{pc}	Potencial de pico catódico
E _{pa}	Potencial de pico anódico
ESI-MS	Espectrometria de massa com ionização via eletrospray
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
IV	Infravermelho
K _{ass}	Constante de associação
k _{cat}	Constante catalítica
K _M	Constante de Michaelis-Menten
L _{2pyald}	N,N'-bis-(2-piridilmetil)-(2-hidróxi-3-carbonil-5-metilbenzil)- 1,3-propano-2ol

L_{but}	N,N'-bis-(2-piridilmetil)-(2-hidr3xi-3-metil-butanodiamina-5- metilbenzil)-1,3-propano-2ol)
L_{t4am}	N,N'-bis-(2-piridilmetil)-(2-hidr3xi-3-metil-trietilenotetramina-5- metilbenzil)-1,3-propano-2-ol)
m/z	Raz3o massa/carga
MeCbl	Metilcobalamina
MeOH	Metanol
MES	3cido 2-[N-morfolino] etanossulf3nico
NHases	Nitrilas hidratases
OAc	Acetato
μ -OAc	Ponte acetato
pH	Potencial hidrogeni3nico
pKa	Constante 3cida de protona3o
ppm	Partes por milh3o
PS	Parcialmente sol3vel
RMN 1H	Resson3ncia magn3tica nuclear de hidrog3nio
S	Sol3vel
Sb	Substrato
T	Tamp3o
T.A	Temperatura ambiente
TCLM	Transfer3ncia de carga entre ligante-metal
TGS	Sulfato de triglicina
TMS	Tetrametilsilano
TRIS	Tris(hidroxi-metil) aminometano
UV-Vis	Espectroscopia na regi3o do ultravioleta-vis3vel
V_0	Velocidade inicial
V_{m3x}	Velocidade m3xima
δ	Deforma3o angular (IV)
δ_H	Deslocamento qu3mico do hidrog3nio (RMN 1H)
ϵ	Coeficiente de absortividade molar

Λ_M	Condutividade molar
$\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$	Comprimento de onda, no m\acute{a}ximo de absor\c{c}\~ao
ν	Estiramento (IV)
TBAPF ₆	Hexafluorofosfato de tetrabutilam\~onio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1	O PAPEL BIOINORGÂNICO DO COBALTO	29
2.2	MODELOS SINTÉTICOS	34
2.3	CATECOL OXIDASE.....	35
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL.....	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4	MATERIAIS E METODOS	43
4.1	MATERIAIS E REAGENTES	43
4.2	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	44
4.2.1	Espectroscopia no Infravermelho por Refletância Total Atenuada – ATR	44
4.2.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio – RMN ¹H	44
4.2.3	Espectrometria de massas	45
4.2.4	Espectroscopia eletrônica na região do Ultravioleta-visível (UV-Vis)	45
4.2.5	Comportamento Eletroquímico – Voltametria de onda quadrada	45
4.2.6	Testes Cinéticos – Atividade Catalítica	46
4.3	SÍNTESES	49
4.3.1	Sínteses dos ligantes	49
4.3.2	Sínteses dos complexos	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES.....	55
5.1.1	Espectroscopia no Infravermelho por Refletância Total Atenuada - ATR	56

5.1.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio – RMN ¹H.....	58
5.1.3	Espectrometria de massas – ESI - MS.....	61
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS	63
5.2.1	Espectroscopia no Infravermelho por Refletância Total Atenuada – ATR.....	65
5.2.2	Espectroscopia eletrônica na Região do Ultravioleta visível	68
5.2.3	Espectrometria de massas – ESI – MS.....	71
5.2.4	Eletroquímica – Voltametria de onda quadrada.....	76
5.2.5	Reatividade	78
6	CONCLUSÕES	91
7	PERSPECTIVAS	93
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
	APÊNDICE	107
	ANEXOS.....	109

1 INTRODUÇÃO

Parte do triunfo da nossa evolução se deve ao desenvolvimento de novas tecnologias. Deste modo, os avanços científicos e tecnológicos, resultaram em melhorias, não só para o bem-estar das pessoas, mas também para novas descobertas na Ciência.

Durante muito tempo acreditou-se que somente reações orgânicas eram importantes e vitais para o organismo humano. Isso acontecia, pois era de conhecimento que somente os elementos de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio (elementos base da química orgânica) se encontravam em abundância nos seres vivos. Desse modo, os elementos inorgânicos eram deixados de lado no estudo em sistemas biológicos. Neste contexto, a verdadeira importância dos elementos inorgânicos em sistemas biológicos foi descoberta recentemente, pois estes se encontram no organismo humano em baixas concentrações, havendo a necessidade de métodos sensíveis para determinação do seu caráter essencial. De uma maneira geral e simples tal estudo tem como objetivo a análise da reatividade de íons metálicos (elementos traços) em sistemas biológicos (HUGHES, 1981; COWAN, 1997; HOUSECROFT; SHARPE, 2013).

Perante aos sistemas biológicos, as enzimas se apresentam como catalisadores naturais, com um alto grau de seletividade, as quais são primordiais para reações químicas presentes nos organismos vivos. Neste contexto destacam-se as metaloenzimas, formadas por cadeias de aminoácidos as quais incorporam um ou mais centros metálicos em seu sítio ativo. Estes íons metálicos estão relacionados não apenas aos processos catalíticos presentes nos sistemas biológicos, mas também na estabilização de estrutura das macromoléculas, todavia muito pouco se sabe a respeito dos mecanismos de catálise dessas enzimas (ROMANOWSKI; MANGRICH; NEVES, 2001; VALDEZ et al., 2014).

Diante destas evidências, cientistas têm reportado na literatura, diversos compostos de baixo peso molecular, os quais são capazes de simular as propriedades estruturais, funcionais e eletrônicas das enzimas. Assim, pela menor heterogeneidade do sistema, os compostos sintéticos podem ser testados frente à substratos modelos e mostrar seu potencial catalítico para

determinadas reações. Uma vez que o estudo cinético se mostra favorável à interpretação dos resultados se torna mais fácil, e conseqüentemente a elucidação do mecanismo de ação para o substrato e das características estruturais, que podem ser relacionadas e comparadas com a metaloenzima.

Em trabalhos recentes (DEY; MUKHERJEE, 2014; Hazari et al, 2015) vem se estudando análogos sintéticos da metaloenzima catecol oxidase, com centros metálicos de Co(III), os quais tem se mostrado como bom catalisadores. Desta forma, o presente trabalho busca a síntese e caracterização de novos compostos metálicos de Co(III) capazes de atuar como catalisadores em reações de oxidação a fim de compreender, como a interdisciplinaridade de diversas áreas, pode servir na compreensão dos estudos mecanísticos de ação das metaloenzimas.

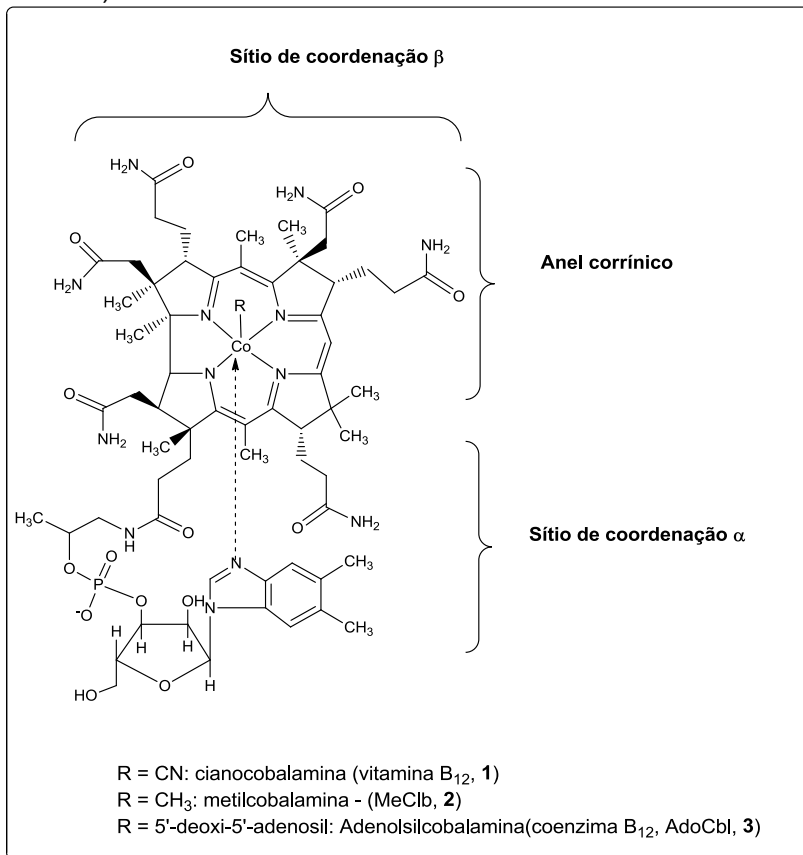
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O PAPEL BIOINORGÂNICO DO COBALTO

O Cobalto é um elemento traço com uma das menores abundâncias no corpo humano. Em consequência disso, a presença de Cobalto ocorre em apenas 1% de proteínas estruturalmente caracterizadas, notadamente muito inferior quando comparados a outros elementos traços, tais como ferro (8%), zinco (9%) e manganês (6%). Apesar disso, é essencial em funções metabólicas, atuando como cofator para uma série de enzimas/proteínas, tornando-o um catalisador precioso na área de tecnologia industrial (OKAMOTO; ELTIS, 2011).

Cofatores organometálicos são substâncias que possuem em sua estrutura íons metálicos, que são essenciais para o funcionamento de moléculas biológicas. Um dos principais cofatores organometálicos constituído por um íon metálico são as Cobalaminas (Cbls), que são referidas como os cofatores mais “belos da natureza” (MATTHEWS, 2001). As Cbls são constituídas estruturalmente por um íon metálico central de Cobalto na presença de um macrocíclico tetrapirrólico (anel corrínico). O sítio de coordenação do cobalto é completado pela interação covalente com o grupo 5,6-dimetilbenzimidazol (Dmbz) e pela ligação organometálica proveniente da interação com ligantes coordenados axialmente ao anel. Estes ligantes axiais, grupo ciano, metil e adenosil, determinam a classificação específica da variedade destes cofatores, como por exemplo: Cianocobalamina (vitamina B₁₂) Metilcobalamina (MeCbl) e Adenosilcobalamina (AdoCbl) (Figura 1). Apesar de existirem diversas cobalaminas naturais, nos seres humanos apenas duas formas apresentam atividade metabólica: metilcobalamina e a adenosilcobalamina (coenzima B₁₂) (GRUBER; PUFFER; KRÄUTLER, 2011; ZELDER; ZHOU; SONNAY, 2013; PROINSIAS; GIEDYK; GRYKO, 2013; CHENG; YAMAMOTO; BAUER, 2016).

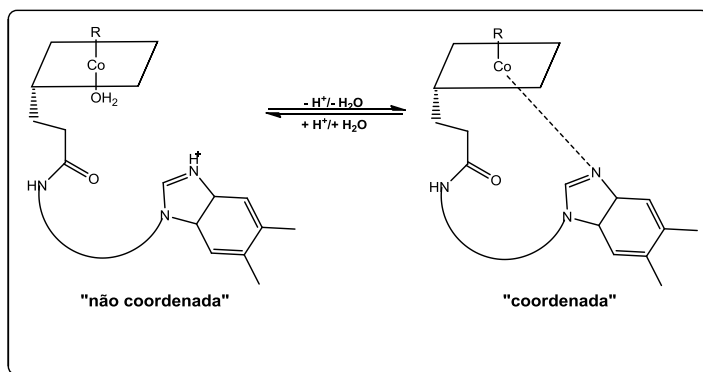
Figura 1 Exemplos de cobalaminas de acordo com o ligante no sítio de coordenação β : Vitamina B₁₂ (**1**, R = CN), Metilcobalamina (**2**, R = CH₃) e coenzima B₁₂ (**3**, R = 5'-deoxi-5'-adenosil)



No geral, as Cbls atuam em reações que envolvem transferência de elétrons, rearranjos e metilação. Entretanto, uma das suas principais funções é de apresentar um equilíbrio entre uma forma “coordenada” e outra “não coordenada” (Figura 2). Na primeira, o grupo Dmbz está coordenado ao centro metálico e, na segunda condição, o grupo Dmbz fica protonado e cede lugar para uma molécula de água, que fica fracamente coordenada. Este equilíbrio é extremamente importante, pois o mesmo controla as principais funções das cobalaminas em sistemas

biológicos. Contudo, esta habilidade de atuar como uma molécula *switch* oferece um acesso de cofatores artificiais que atuam como inibidores de reações adversas, eliminando a replicação e proliferação de células cancerígenas, oferecendo uma estratégia alternativa na terapia contra o câncer (OKAMOTO; ELTIS, 2011; ZELDER; ZHOU; SONNAY, 2013; DEREVEN'KOV et al., 2016).

Figura 2 Representação simbólica do equilíbrio “coordenado” / “não coordenado” das Cbls.



No que lhe diz respeito, o cobalto nas Cbls pode ser encontrado em sistemas biológicos em três diferentes estados redox: (1) Co(III), onde o íon metálico é diamagnético (d^6), estável e possui geometria octaédrica. A ligação Co-C para estas condições são lábeis, ocasionando em trocas de ligantes axiais, (2) Co(II), apresentando número de coordenação cinco, isto é, apresenta geometria pirâmide de base quadrada. Esta conformação apresenta magnetismo, pois possui um elétron desemparelhado, por essa razão as Cbls podem atuar via radical livre, (3) Co(I), onde é diamagnético (d^8), o centro metálico encontra-se coordenado apenas aos quatro nitrogênios do anel corrínico, apresentam geometria quase quadrado planar e possuem alta nucleofilicidade, permitindo que estas atuem como excelentes nucleófilos (OKAMOTO; ELTIS, 2011; ZELDER; ZHOU; SONNAY, 2013).

Recentes pesquisas tem mostrado a presença do Cobalto em enzimas sem a presença dos cofatores corrínóides. Até o momento foram caracterizadas estruturalmente oito

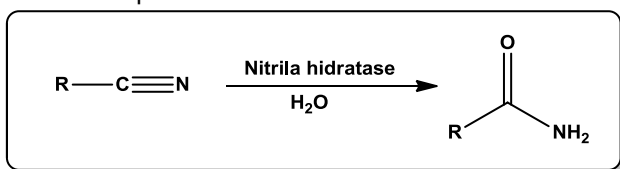
enzimas (Tabela 1), e aqui merecem destaque as metaloenzimas nitrilas hidratases (KOBAYASHI; SHIMIZU, 1999).

Tabela 1 Exemplos de enzimas ou proteínas não-corrinóides contendo Cobalto.

Enzima ou proteína	Fonte
Metionina Aminopeptidase	Animais, bactérias e Levedura
Prolidase	Archaea (bactéria)
Nitrila Hidratase	Actinomicetos e bactérias
Glucose isomerase	Actinomicetos
Metilmalonil-CoA-carboxitransferase	Bactérias
Aldeído decarbonilase	Acotiledóneas (algae)
Lisina-2,3-aminomutase	Bactérias
Bromopectidase	Bactérias

Nitrilas hidratases (NHases EC 4.2.1.84) são metaloproteínas, não-corrinóide (tipo-Co) e não-heme (tipo-Fe) presentes nas vias metabólicas de algumas bactérias que catalisam a hidratação de nitrilas nas correspondentes amidas (Figura 3).

Figura 3 Reação de conversão de nitrilas nas suas correspondentes amidas, catalisadas pela nitrila hidratase.

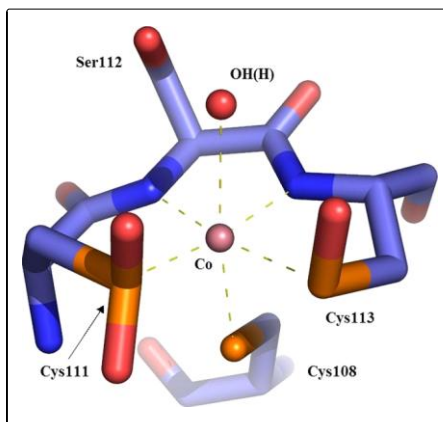


Estas enzimas têm sido utilizadas em processos industriais biológicos para a produção de acrilamida, nicotinamida, 5-cianovaleramida, na síntese de amidas assimétricas e na degradação de resíduos tóxicos. Até o momento grande parte das NHases são encontradas em organismos unicelulares, entretanto, há relatos mais recentes destas em organismos vivos unicelulares e pluricelulares

(PAYNE et al., 1997; SHEARER et al., 2001; VAN PELT et al., 2011; CUI et al., 2014; MACDONALD; BOYD, 2015; GAO et al., 2017).

Sua estrutura cristalográfica, representada na Figura 4, é constituída pelo centro metálico de Co(III), onde os resíduos de aminoácidos envolvidos na coordenação com o centro metálico são as cadeias laterais de três resíduos de cisteína (Cys¹¹¹, Cys¹¹³ e Cys¹⁰⁸) dois nitrogênios de amidas provenientes do esqueleto peptídico e uma molécula de água. É interessante salientar que os resíduos de cisteína Cys¹¹¹ e Cys¹¹³ podem sofrer uma oxidação pós-traducional de proteínas, ou seja, uma modificação química na cadeia proteica após sua tradução, que transforma os resíduos em ácido sulfínico (-SO₂H) e sulfênico (-SOH), respectivamente. Este processo de oxidação é crucial em processos catalíticos, pois quando mutados, a atividade reduz drasticamente ou suprime completamente. Até o momento, pouco se sabe a respeito do processo catalítico da NHase, apesar disso três mecanismos foram reportados na literatura, sendo um de esfera interna e dois de esfera externa. É interessante salientar que apesar da metaloenzima conter o íon metálico Co(III), o qual é bastante inerte em reações de substituições, as NHase do tipo-Co são bastantes estáveis e preferencialmente reagem com nitrilas aromáticas (KOVACS, 2004; MITRA; HOLZ, 2006; PRASAD; BHALLA, 2010; MACDONALD; BOYD, 2015; MARTINEZ et al., 2017).

Figura 4 Sitio ativo da NHase proveniente da *P. thermophila* (MITRA; HOLZ, 2006).



Contudo, o principal potencial das NHases em hidrolisar seletivamente um grupo nitrílica para sua amida correspondente, tem ganhado mais atenção e reconhecimento na produção de produtos químicos finos. Entretanto, o seu uso em processos industriais ainda é pouco explorado, isso se deve ao fato das NHases possuírem uma moderada estereoseletividade (MITRA; HOLZ, 2006; AMARAL, 2015).

Desta forma, o interesse nos estudos estruturais das metaloproteínas, os detalhes da reação enzimática bem como a natureza e o papel de centros metálicos em sistemas biológicos, que conferem propriedades particulares, tem tido bastante interesse em recentes pesquisas.

2.2 MODELOS SINTÉTICOS

Na pretensão de tentar compreender como ocorrem os mecanismos de ação das metaloenzimas, estudos realizados por químicos inorgânicos tem mostrado a eficácia de complexos modelos de imitar o sitio ativo destes sistemas biológicos. Salienta-se que o estudo estrutural e físico-químico das metaloenzimas apresenta dados com pouca precisão, ao fato destas possuírem alta complexidade, com isto está limitação tem encaminhado ao estudo de complexos modelos para as metaloenzimas.

Os primeiros complexos metálicos a obterem um grande impacto na química, em particular na química medicinal, começaram a surgir a partir da descoberta da cisplatina (HEWITT; WILSON, 2016). Por sua vez, um dos grandes desafios na química bioinorgânica é a descoberta e conseqüentemente o desenvolvimento de complexos metálicos, sejam eles de coordenação ou organometálicos citotóxicos, com possíveis atividades biológicas. Desta forma, procura-se sintetizar compostos com capacidade de catalisar a mesma reação de uma determinada metaloenzima, os quais são denominados como compostos modelos. Assim, o termo complexo modelo está correlacionado a capacidade de mimetizar várias características das enzimas de interesse, tanto estruturais quanto funcionais, ao ponto de ser a base para o estudo da modelagem biomimética. De certa forma, o estudo e a elaboração de compostos modelos vem ganhando grande atenção e interesse, pois estes ajudam a compreender melhor a

função de diversas enzimas (TORELLI et al., 2000; SIMÁNDI et al., 2003; HARTINGER; DYSON, 2009).

Preliminarmente, os compostos modelos, são projetados através de ligantes (compostos orgânicos), os quais possuem características semelhantes aos resíduos de aminoácidos N-doadores, presentes no ambiente enzimático. Estes sítios N-doadores, segundo a teoria de Pearson, possuem caráter mais macio e podem coordenar facilmente aos íons metálicos, os quais são considerados de fronteira segundo Pearson.

Com base nestas informações, a grande maioria dos complexos já reportados na literatura compõe-se de ligantes polidentados com apenas átomos de nitrogênio, variando apenas a natureza da ponte endógena, podendo ser μ -fenóxido, μ -alcóxido. Contudo, novos estudos vêm utilizando ligantes com átomos N,O-doadores, dos quais seus respectivos complexos também apresentam atividade catalítica (OSÓRO, 2007).

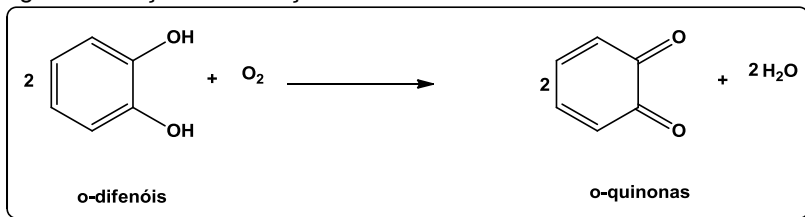
Com base no conhecimento da química de coordenação, fatores eletrônicos e potencialidade redox, estudos científicos vêm explorando estes conceitos na tentativa de modular e aperfeiçoar sistemas sintéticos como possíveis complexos modelos. Entretanto grande parte destes complexos modelos não possui uma atividade catalítica significativa, pois nem sempre há uma conversão eficiente das transformações catalíticas. Apesar disso, o estudo de complexos metálicos se torna um grande desafio e estes se tornam úteis e importantes para compreender os principais aspectos mecanísticos das metaloenzimas (FRIEDLE; REISNER; LIPPARD, 2010; ROLFF et al., 2011).

2.3 CATECOL OXIDASE

As catecóis oxidases são enzimas com centros binucleares de cobre(II) pertencentes ao grupo de proteínas denominado de proteínas de cobre do tipo 3. No que lhe diz respeito, as catecóis oxidases são capazes de catalisar reações de oxidação, através da transferência de dois elétrons, de o-difenóis às respectivas o-quinonas, acoplado à redução de oxigênio à água em um processo denominado atividade de catecolase (Figura 5). Estas o-quinonas são bastante reativas e sofrem reações de auto polimerização, levando a formação de um pigmento polifenólico castanho, onde tal pigmento atua como

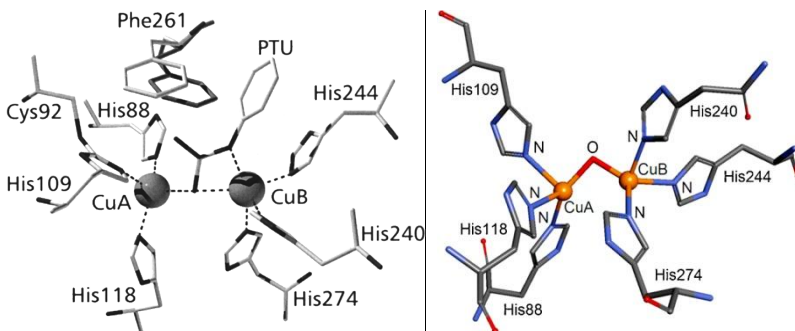
um protetor das células da pele dos raios ultravioletas, reduzindo o risco de câncer de pele além de proteger os danos causados por insetos e agentes patógenos nas plantas (AYAD, 2012; COMBA et al., 2012; MITRA; RAGHAIAIAH; GHOSH, 2015; CASTRO et al., 2016).

Figura 5 Reação de oxidação das catecóis oxidases.



A primeira catecol oxidase foi isolada em 1937, sendo subsequentemente obtida de plantas e frutas. Porém sua estrutura cristalina (forma *met*), proveniente da batata doce *Ipomoeas batatas* foi determinada em 1998, em três diferentes formas: na forma oxidada ($\text{Cu}^{\text{II}} - \text{Cu}^{\text{II}}$), na forma reduzida ($\text{Cu}^{\text{I}} - \text{Cu}^{\text{I}}$) e na forma de um complexo com o inibidor feniltiouréia (Figura 6) (GERDEMANN; EICKEN; KREBS, 2002; DEY; MUKHERJEE, 2016).

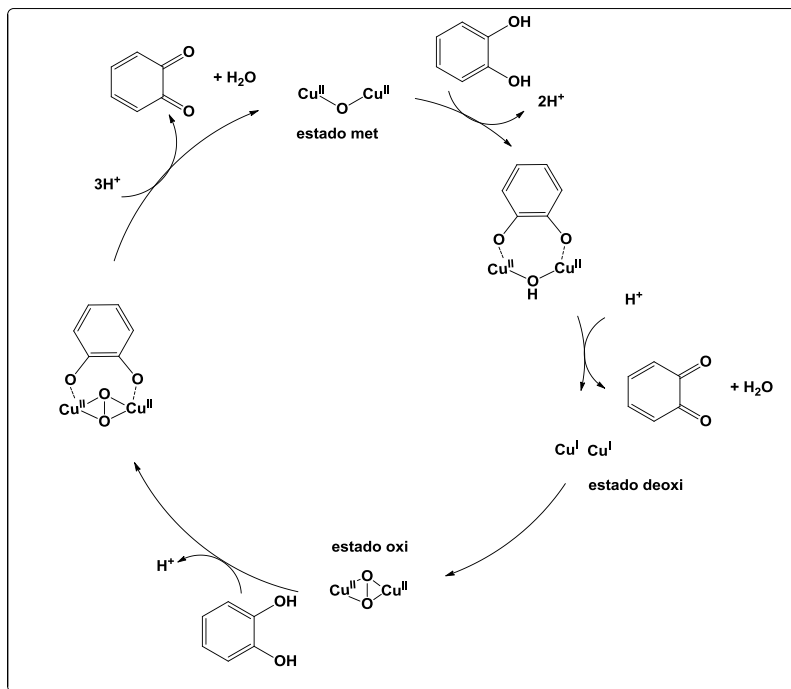
Figura 6 Estrutura cristalina da catecol oxidase como um complexo inibidor com a feniltiouréia (esquerda). Estrutura cristalina da catecol na sua forma oxidada (direita) (GERDEMANN; EICKEN; KREBS, 2002; DEY; MUKHERJEE, 2016).



A catecol oxidase em sua forma *met* (oxidada) apresenta geometria pirâmide trigonal com átomos de cobre separados por uma distância de 2,9 Å e coordenado a estes, uma ponte μ -hidróxido a uma distância de 1,8 Å de cada centro metálico e três átomos de nitrogênios provenientes dos resíduos de histidinas (Figura 6 - direita). Em seu estado reduzido, os centros metálicos de cobre(I) se encontram separados a uma distância de 4,4 Å, este aumento se dá ao fato da ausência da ponte μ -hidróxido, ao passo que, um dos centros metálicos de cobre(I) passa a apresentar número de coordenação 3 tendo apenas 3 resíduos de histidinas coordenadas, assumindo uma geometria quadrado planar, e o outro centro metálico apresenta número de coordenação 4 estando coordenado a 3 resíduos de histidinas e uma molécula de água, assumindo uma geometria de pirâmide trigonal (KLABUNDE et al., 1998; KOVAL et al., 2006; DEY; MUKHERJEE, 2016).

Tendo em vista que sua estrutura já foi determinada, uma das grandes dificuldades, quando se fala sobre as catecóis oxidases, se refere ao seu mecanismo de oxidação que ainda não foi completamente elucidado. Um dos mecanismos mais aceitos para a oxidação de catecóis pela metaloenzima catecol oxidase pode ser resumido em quatro etapas: (i) o mecanismo inicia-se a partir do estado de repouso (*met*) seguido da coordenação do substrato *o*-difenoil, ao centro metálico de Cu(II); (ii) oxidação do substrato resultando na formação da respectiva *o*-quinona e do estado reduzido da enzima (estado *deoxi*); (iii) os centros metálicos de cobre(I) são coordenados a uma molécula de O₂, gerando um estado *oxi*, o qual sofre um ataque de uma segunda molécula de substrato; (iv) oxidação de uma segunda molécula do *o*-difenoil, reestruturando a forma catalítica da enzima (forma *met*) e o ciclo catalítico pode ser reiniciado (Figura 7) (SOLOMON; SUNDARAM; MACHONKIN, 1996; GERDEMANN; EICKEN; KREBS, 2002; COMBA et al., 2012; ROLFF et al., 2011; SOLOMON et al., 2014).

Figura 7 Mecanismo proposto para oxidação de *o*-difenóis promovido pela catecol oxidase (adaptado de COMBA et al., 2012).



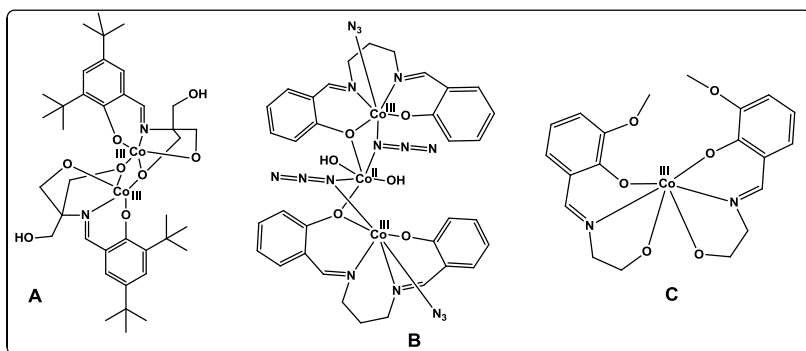
Deste modo, uma das vertentes do estudo científico é tentar elucidar as propriedades catalíticas da catecol oxidase utilizando compostos bioinspirados de baixa massa molecular que possuam as funções orgânicas semelhantes aos resíduos de aminoácido presentes no sítio ativo da enzima.

A despeito disso, grande parte dos compostos modelos para a enzima catecol oxidase são predominantemente de cobre(II), uma vez que a enzima catecol oxidase possui em sua estrutura um centro binuclear do íon metálico cobre. Apesar disso, pesquisadores vêm reportando na literatura diversos complexos metálicos de manganês(II/III) (JANA et al., 2013), ferro(III) (CAMARGO et al., 2015), níquel(II) (KARIPCIN et al., 2014), cobalto(II/III) (HAZARI et al., 2015), manganês(III) (BANU et al., 2009), cobalto (III) (MITRA; RAGHAIAH; GHOSH, 2015)

e ferro(III/II) (NEVES et al., 2010) que se mostraram ativos frente a atividade de catecolase. Esta variedade de compostos com centros metálicos diferentes daqueles cobre merecem um destaque especial, pois indica a existência de novas possibilidades de mimetizar a enzima.

Nestes estudos, foram empregados compostos mono, bi e trinucleares de cobalto, variando as propriedades estruturais dos ligantes, como o número e a natureza dos átomos coordenantes (HAZARI et al., 2015; MITRA; RAGHAIAIAH; GHOSH, 2015). A Figura 8 exhibe exemplos de complexos modelos de cobalto para a catecol oxidase.

Figura 8 Complexos de cobalto reportados por (A) Dey e Mukherjee, (B) Hazari e colaboradores e (C) Mitra e colaboradores. Nota: Figura adaptada.



Estudos de EPR junto a investigação da formação de peróxido de hidrogênio de complexos trinucleares de cobalto de valência mista foram realizados por Hazari et al. (2015) apresentando que a reação de oxidação se dá a partir da redução do centro metálico de Co(III).

Dey e Mukherjee (2014) reportaram três complexos binucleares de cobalto, um binuclear de Co(III) e os outros dois de valência mista Co(III,II) e observaram que apenas o complexo com o centro metálico Co(III,III) possui atividade de catecolase. A inatividade dos complexos de valência mista foram correlacionados ao estudo eletroquímico dos complexos, mostrando que a ausência de qualquer par redox dos centros

metálicos poder ser atribuída a ineficiência da atividade de catecolase.

Partindo desta abordagem, diversos estudos (BLAY et al., 2006; KAIZER et al., 2007; MAJUMDER et al., 2013; DEY; MUKHERJEE, 2014; MITRA; RAGHAVAIAH; GHOSH, 2015) mostram a perspectiva de novos compostos com diferentes ligantes e íons metálicos diferentes dos de cobre, ao mesmo tempo em que, seus diferentes estados de oxidação e nuclearidade, indicando que são capazes de mimetizar ou não a metaloenzima catecol oxidase. Estes estudos têm disponibilizado recursos para um melhor entendimento da ação de complexos modelos como catalisadores na reação de oxidação das catecóis a suas respectivas quinonas.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo principal os estudos de síntese, caracterização e atividade de catecolase de novos complexos binucleares de Cobalto com ligantes macrocíclicos N,O-doadores

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Sintetizar, purificar e caracterizar por RMN ^1H , IV-ATR e espectrometria de massa dois novos ligantes macrocíclicos;
- ii. Sintetizar, purificar e caracterizar por IV-ATR, espectrometria de massa, condutimetria, espectroscopia na região do UV-Vis e eletroquímica novos complexos binucleares de Cobalto com os ligantes L_{but} e L_{t4am} ;
- iii. Avaliar a reatividade dos complexos sintetizados frente à reação com o substrato modelo 3,5-di-*terc*-butilcatecol (3,5 – DTBC) para reações de oxidação de catecóis;
- iv. Comparar e relacionar a atividade catalítica de catecolase, obtida para os complexos estudados, pretendendo ampliar os conhecimentos sobre o papel dos íons metálicos no mecanismo de oxidação de catecóis.

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

As sínteses e caracterizações dos ligantes e complexos, bem como seus estudos cinéticos envolveram os reagentes e solventes descritos na Tabela 2.

Tabela 2 Lista de reagentes e solventes utilizados neste trabalho

Solventes e reagentes	Marca	Pureza
1,4-diaminobutano	Sigma-Aldrich	Destilado para uso sob pressão reduzida;
2-hidróxi-1,3-diaminoproprano	Sigma-Aldrich	95,0 %
2-piridilcarboxialdeído	Sigma-Aldrich	Destilado para uso sob pressão reduzida;
3,5-DTBC	Sigma-Aldrich	Recristalizado em Hexano
Acetato de colbalto tetrahidratado	Sigma-Aldrich	98,0 %
Acetonitrila	Vetec	99,8 %
Acetonitrila UV/HPLC e LC/MS	Tédia	99,9%
Ácido Clorídrico	Vetec	Mínimo 37%
Bicarbonato de sódio	Lafan	99,7%-100,3%
Borohidreto de sódio	Sigma-Aldrich	99,0 %
Carbonato de sódio	Lafan	99,0 %
Clorofórmio	Vetec	
Clorofórmio Deuterado	Aldrich	99,8 %
Diclorometano	Vetec	99,5 %
Gás Argônio	White-Martins	5.0 analítico
Gás Hidrogênio	White-Martins	5.0 analítico
Gás Oxigênio	White-Martins	2.8 analítico

Hidróxido de Sódio	Lafan	97,0 %
Metanol	Vetec	99,8 %
Metanol UV/HPLC e LC/MS	Tédia	99,9 %
<i>p</i> -cresol	Aldrich	99,0 %
Pd/C 5%	Aldrich	
Perclorato de sódio hidratado	Across	99,0%
Sílica gel	Aldrich	
Sulfato de sódio anidro	Vetec	99,0 %
Tetrafenilborato de sódio	Aldrich	99,5 %
Trietilenotetramina	Aldrich	97,0%
TRIS	Merk-Across	99,8 %

4.2 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

4.2.1 Espectroscopia no Infravermelho por Refletância Total Atenuada – ATR

As medidas dos espectros na região do infravermelho foram feitas com um espectrômetro FTIR – Spectrum 100, Perkin Elmer, com um acessório de refletância total atenuada horizontal (ZnSe, 45°), e um detector TGS. As amostras foram colocadas diretamente sobre o cristal e a média de 8 varreduras no intervalo 4000 - 550 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} . As medidas das amostras foram corrigidas pelo background de ar, isto é, sem nada sobre o cristal. As análises foram realizadas no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (Labinc), Departamento de Química- UFSC.

4.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio – RMN ^1H

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em um aparelho de RMN da marca Bruker - modelo AC 200, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC, em 200 MHz. Os deslocamentos químicos de hidrogênio foram registrados em

ppm utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ ppm) e como solvente CDCl_3 .

4.2.3 Espectrometria de massas

Os compostos sintetizados (ligantes e complexos) foram estudados via espectrometria de massa com ionização via eletrospray (ESI-MS). Os espectros foram medidos e obtidos em um equipamento Amazon – Ion Trap MS do Centro de Biologia Molecular Estrutural – UFSC. A análise foi realizada a partir das soluções dos ligantes e complexos em CH_3CN grau MS com concentração de aproximadamente 500 ppb e fluxo de $180 \mu\text{L min}^{-1}$. A temperatura do capilar foi mantida entre 180 e 200 °C e a voltagem do capilar entre -400 e -500 V.

4.2.4 Espectroscopia eletrônica na região do Ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os espectros eletrônicos na região do ultravioleta e visível foram obtidos em um espectrofotômetro UV-Vís Varian Cary 50 BIO, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. As análises em solução foram realizadas utilizando-se solventes de grau espectroscópico e cubetas de quartzo com capacidade para 1 mL e 1 cm de caminho óptico

4.2.5 Comportamento Eletroquímico – Voltametria de onda quadrada

O comportamento redox dos complexos foi investigado por voltametria de onda quadrada em um potenciostato/galvanostato modelo BAS Epsilon no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC.

O experimento eletroquímico de ambos os complexos foi realizados em metanol, com $[\text{Complexo}] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, sob atmosfera de argônio, utilizando como eletrólito suporte, TBAPF_6 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Já o experimentos eletroquímicos em condições cinéticas foram realizados em $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, sob atmosfera saturada de O_2 , com $[\text{Complexo}] = 3,55 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; [3,5-

DTBC] = $3,78 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; [tampão] = $2,94 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando como eletrólito suporte LiClO_4 ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$).

Ambos os experimento foram realizados em uma célula eletrolítica contendo um eletrodo de referência comercial de Ag/Ag^+ , um eletrodo de trabalho de carbono vítreo e um eletrodo auxiliar de platina.

4.2.6 Testes Cinéticos – Atividade Catalítica

Os testes cinéticos de reatividade dos compostos foram averiguados através da reação de oxidação do substrato 3,5-di-*terc*-butilcatecol (3,5-DTBC). Os experimentos foram realizados em triplicata sob condições de excesso de substrato monitorando-se espectrofotometricamente, em um espectrofotômetro UV-Vís Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostatizado (25°C), a variação de absorbância ocorrida em 400 nm ($\epsilon = 1645 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) correspondente a formação da 3,5-di-*terc*-butilquinona (3,5-DTBQ), como o produto da reação de oxidação. As reações foram monitoradas até 5% de conversão do substrato a produto e os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais.

O gráfico das velocidades iniciais (V_0) em função do pH permitiu a obtenção dos valores de pKa para as espécies em equilíbrio e pH ótimo. A determinação das velocidades iniciais em função da variação da concentração do substrato foi realizada sob as mesmas condições descritas para o estudo da influência do pH, no pH ótimo, resultando em cinéticas de saturação com comportamento de Michaelis-Menten. O tratamento dos dados através do método de Lineweaver-Burke permitiu a obtenção da constante catalítica (k_{cat}), velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) e constante de Michaelis-Menten (K_M), eficiência catalítica ($E = k_{\text{cat}} / K_M$) e constante de associação ($K_{\text{ass}} = 1 / K_M$).

Os estudos em função do pH para a atividade catecolase dos complexos \mathbf{C}_1 e \mathbf{C}_2 foram realizados em uma faixa de pH entre 7,0 e 10,5 (tampões TRIS) a 25°C . Utilizaram-se cubetas de vidro óptico com capacidade de $4000 \mu\text{L}$ e caminho óptico de 1 cm , fechadas com tampa de teflon, monitoradas por 15 minutos e o volume final da mistura reacional na cubeta foi de $1700 \mu\text{L}$. O solvente metanol com grau espectroscópico foi saturado com oxigênio. Correções da oxidação espontânea do substrato 3,5-DTBC foram realizadas sob as mesmas condições, entretanto

sem a adição de uma solução metanólica do complexo. As condições reacionais estão descritas na Tabela 3:

Tabela 3 Condições cinéticas para o estudo da variação do pH

	Solução estoque (mol L ⁻¹)	Volume adicionado na cubeta (μL)	Concentração final na cubeta (mol L ⁻¹)
Complexo	1,14 x 10 ⁻³	50	3,35 x 10 ⁻⁵
Metanol	---	1300	---
Substrato	2,12 x 10 ⁻³	300	3,74 x 10 ⁻³
Tampão	1,00	50	2,94 x 10 ⁻²

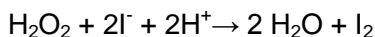
Já os estudos cinéticos em condições de excesso de substrato dos complexos **C₁** e **C₂** foram realizados em pH 9,0 (tampão TRIS), monitorados por 15 minutos utilizando como solvente metanol com grau espectroscópico saturado com oxigênio. Correções da oxidação espontânea do substrato 3,5-DTBC foram realizadas sob as mesmas condições, entretanto sem a adição de uma solução metanólica do complexo. A relação entre a concentração final do substrato e a concentração final do complexo alternou de 50 a 350 vezes de excesso de substrato, onde o volume do substrato em cada leitura variou em 30 μL cada. As condições reacionais estão descritas na Tabela 4:

Tabela 4 Condições cinéticas para o estudo da variação do efeito de substrato

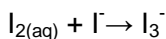
	Solução estoque (mol L ⁻¹)	Volume adicionado na cubeta (μL)	Concentração final na cubeta (mol L ⁻¹)
Complexo	1,25 x 10 ⁻³	50	3,67 x 10 ⁻⁵
Metanol	---	1570 - 1390	---
Substrato	2,10 x 10 ⁻³	30 – 210	(1,70 – 11,90) x 10 ⁻³
Tampão	1,00	50	2,94 x 10 ⁻²

A formação de peróxido de hidrogênio nas reações de oxidação do 3,5-DTBC catalisadas pelos complexos **C₁** e **C₂** foi detectada por uma modificação do método da iodometria. Uma mistura reacional foi preparada da mesma forma que nos

experimentos cinéticos, ou seja: concentração de complexo $[C]_{\text{final}} = 3,67 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de substrato $[S]_{\text{final}} = 1,70 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e concentração do tampão $[T]_{\text{final}} = 2,94 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Após uma hora de reação, igual volume de água foi adicionado e a quinona foi extraída com diclorometano. A camada aquosa foi acidificada com ácido sulfúrico concentrado a $\text{pH} \cong 2$, para interromper a reação de oxidação e 1 mL de solução aquosa de iodeto de potássio ($[\text{iodeto}] = 0,3 \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionados. Na presença de peróxido de hidrogênio ocorre a seguinte reação:



e em excesso de iodeto ocorre a formação do íon tri-iodeto,



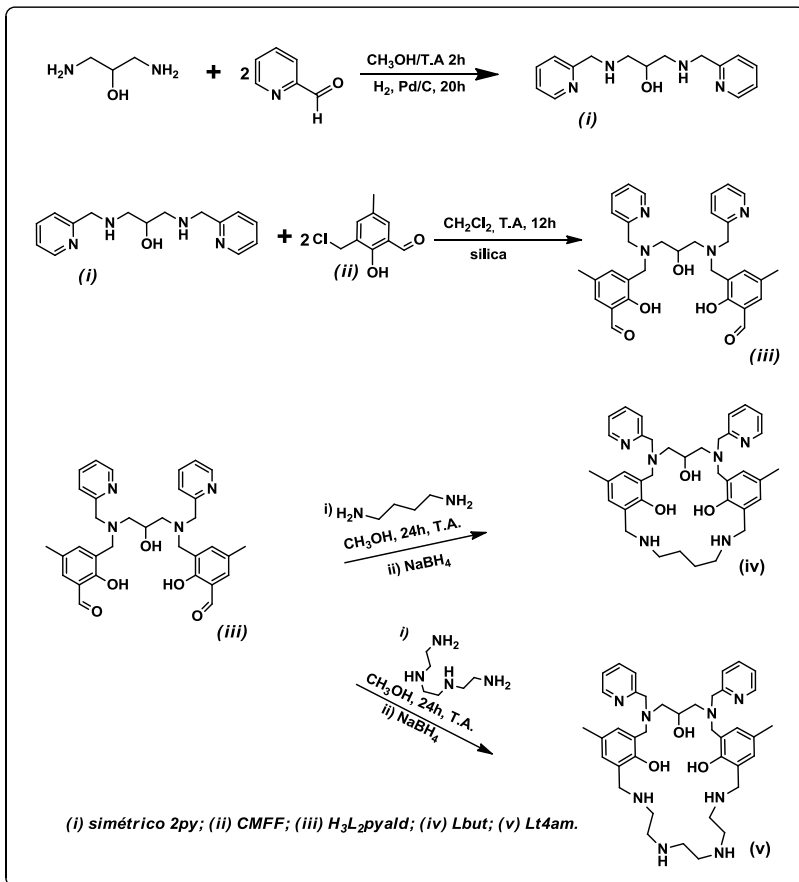
Esta reação geralmente é lenta, mas em meio ácido torna-se praticamente instantânea. A formação do I_3^- pode ser monitorada espectrofotometricamente devido ao surgimento de uma banda característica em 353 nm ($\epsilon = 26000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.3 SÍNTESES

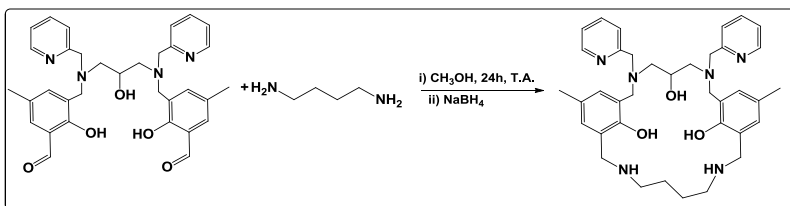
4.3.1 Sínteses dos ligantes

As sínteses dos ligantes, realizadas no presente trabalho, seguem esquematizadas e descritas na Figura 9, as rotas/esquemas e os espectros de RMN ^1H e infravermelho dos precursores 2_{py} , CMFF e $L_{2\text{pyald}}$ se encontram nos anexos deste trabalho. Já os espectros de RMN ^1H , infravermelho e massa dos ligantes L_{but} e L_{t4am} encontram-se na seção 5.1.

Figura 9 Representação esquemática dos ligantes sintetizados neste trabalho.

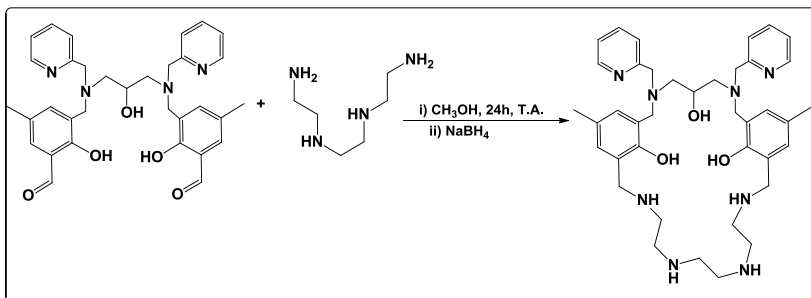


4.3.1.1 Síntese do N,N'-bis-(2-piridilmetil)-(2-hidróxi-3-metilbutanodiamina-5- metilbenzil)-1,3-propano-2ol) – Lbut



Em um balão de 500 mL adicionou-se o 3,12 g do precursor L_{2pyald} (5,50 mmol; $568,67 \text{ g mol}^{-1}$) previamente diluído em 300 mL de metanol. Sobre esta solução adicionou-se gota a gota, sob agitação, uma solução metanólica contendo 0,65 mL de 1,4-butanodiamina ($6,40 \text{ mmol}$; $0,877 \text{ g mL}^{-1}$; $88,15 \text{ g mol}^{-1}$) Após total adição da amina sobre o aldeído. A solução tornou-se amarela intensa, e permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, NaBH_4 ($0,53 \text{ g}$; 14 mmol ; $37,84 \text{ g mol}^{-1}$) foi adicionado em pequenas porções, em banho de gelo, ocorrendo uma brusca diminuição na intensidade da coloração amarela. A reação permaneceu por mais duas horas a temperatura ambiente, e o solvente foi evaporado à pressão reduzida, sendo adicionado CHCl_3 ao resíduo viscoso e procedida a extração com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado até a secura sob vácuo, a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, resultando em um sólido amarelado, a qual foi deixado sob vácuo ($0,1 \text{ mmHg}$). Obtiveram-se $2,1 \text{ g}$ do ligante L_{but} ($3,36 \text{ mmol}$; $624,82 \text{ g mol}^{-1}$), com rendimento de 62 % em relação ao precursor L_{2pyald} .

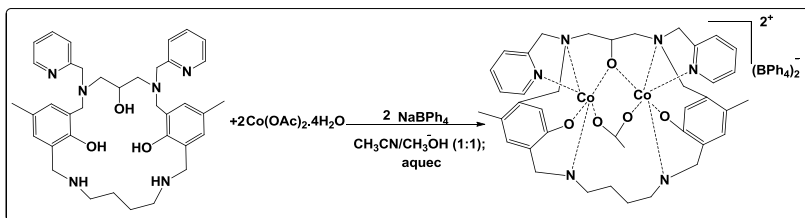
4.3.1.2 Síntese do N,N'-bis-(2-piridilmetil)-(2-hidróxi-3-metil-trietilenotetramina-5- metilbenzil)-1,3-propano-2ol) – Lt4am



Em um balão de 500 mL adicionou-se 2,05 g do precursor (3,60 mmol; 568,67 g mol⁻¹) previamente diluído em 250 mL de metanol. Sobre esta solução adicionou-se gota a gota, sob agitação, uma solução metanólica contendo 0,92 mL de trietilenotetramina (6,12 mmol; 0,982 g mL⁻¹; 146,24 g mol⁻¹) Após total adição da amina sobre o aldeído. A solução tornou-se amarela intensa, e permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, NaBH₄ (0,35 g; 9,17 mmol; 37,84 g mol⁻¹) foi adicionado em pequenas porções, em banho de gelo, ocorrendo uma brusca diminuição na intensidade da coloração amarela. A reação permaneceu por mais duas horas a temperatura ambiente, e o solvente foi evaporado à pressão reduzida, sendo adicionado CHCl₃ ao resíduo viscoso e procedida a extração com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado até a secura sob vácuo, a 40 °C, resultando em um sólido amarelado, a qual foi deixado sob vácuo (0,1 mmHg). Obtiveram-se 1,7 g do ligante L_{t4am} (4,40 mmol; 682,90 g mol⁻¹), com rendimento de 69 % em relação ao precursor L_{2pyald}.

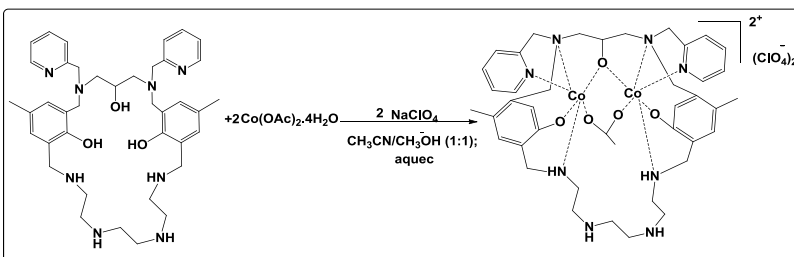
4.3.2 Sínteses dos complexos

4.3.2.1 Síntese do complexo $[\text{Co}_2^{\text{III}}(\text{L}_{\text{but}})(\mu\text{-OAc})](\text{BPh}_4)_2 - \mathbf{C}_1$



Em um béquer contendo o ligante L_{but} (0,31 g; 0,5 mmol; $624,82 \text{ g mol}^{-1}$) adicionou-se uma mistura de acetonitrila/metanol (1:1) sob agitação e leve aquecimento. A esta foi adicionada lentamente uma solução de acetonitrila/metanol (1:1) de $\text{Co}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,25 g; 1,0 mmol; $249,08 \text{ g mol}^{-1}$). Após 15 minutos, adicionou-se 0,24 g de NaBPh_4 (0,24 g; 1,0 mmol; $342,22 \text{ g mol}^{-1}$) mantendo-se a agitação e aquecimento por mais 20 minutos. Em seguida, a solução foi filtrada e deixada em repouso. Após a lenta evaporação do solvente, formou-se um precipitado marrom, que foi filtrado e lavado com éter etílico gelado. Obtiveram-se 0,31 g do complexo \mathbf{C}_1 (0,21 mmol; $1434,14 \text{ g mol}^{-1}$), com rendimento de 43 % em relação ao ligante L_{but} . As caracterizações e os respectivos espectros do complexo \mathbf{C}_1 estão discutidos na seção 5.2 deste trabalho.

4.3.2.2 Síntese do complexo $[\text{Co}_2^{\text{III}}(\text{L}_{\text{t4am}})(\mu\text{-OAc})]\text{ClO}_4 - \mathbf{C}_2$



Em um béquer contendo o ligante L_{t4am} (0,34 g; 0,5 mmol; $682,90 \text{ g mol}^{-1}$) adicionou-se uma mistura de acetonitrila/metanol (1:1) sob agitação e leve aquecimento. A esta foi adicionada

lentamente uma solução de acetronitrila/metanol (1:1) de $\text{Co}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,25 g; 1,0 mmol; $249,08 \text{ g mol}^{-1}$). Após 15 minutos tempo adicionou-se 0,12 g de NaClO_4 (1,0 mmol; $122,44 \text{ g mol}^{-1}$) mantendo-se a agitação e aquecimento por mais 20 minutos. Em seguida, a solução foi filtrada e deixada em repouso. Após a lenta evaporação do solvente, formou-se um precipitado marrom, que foi filtrado e lavado com éter etílico gelado. Obtiveram-se 0,25 g do complexo **C**₂ (0,24 mmol; $1054,68 \text{ g mol}^{-1}$), com rendimento de 47 % em relação ao ligante $\text{L}_{14\text{am}}$. As caracterizações e os respectivos espectros do complexo **C**₂ estão discutidos na seção 5.2 deste trabalho.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES

As sínteses dos ligantes macrocíclicos está descrita na seção 4.3 deste trabalho. O L_{2pyald} foi sintetizado a partir da adição lenta do precursor CMFF sobre o 2_{py} . Esta reação se dá por meio de uma reação S_{N2} do nitrogênio do precursor 2_{py} no carbono ligado ao cloro do precursor CMFF.

Os ligantes macrocíclicos foram sintetizados, em um sistema altamente diluído, a partir de uma reação de aminação redutiva pela adição lenta da diamina (1,4-butanodiamina) e da tetramina (trietilenotetramina) sobre o L_{2pyald} , o qual contém o grupo funcional aldeído. Inicialmente ocorre a formação de uma imina, isto é, ocorre o ataque nucleofílico do nitrogênio no centro carbonílico seguida pela ação do reagente redutor, borohidreto de sódio para a formação da amina secundária. A adição de duas aminas de tamanho e estrutura diferentes é para avaliar o efeito destas aminas frente a atividade catalítica do complexo modelo.

A síntese dos precursores, assim como, a dos ligantes macrocíclicos mostraram rendimentos satisfatórios para a sequência da rota sintética e para a utilização destes nas sínteses inorgânicas e foram caracterizados através de IV-ATR, RMN 1H e ESI-MS. A Tabela 5 mostra os dados gerais dos ligantes finais.

Tabela 5 Dados gerais dos ligantes finais.

Ligante	Formula Molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	Ponto de fusão (° C)	Cor
L_{but}	$C_{37}H_{48}N_6O_3$	624,82	~ 90	Amarelo
L_{t4am}	$C_{39}H_{54}N_8O_3$	682,90	~ 76	Amarelo

Também é de grande importância saber a solubilidade destes compostos frente a solvente orgânicos, uma vez que estes são usados posteriormente para as sínteses inorgânicas e também em diversas análises de caracterização. A tabela 6

destaca a solubilidade dos complexos em solventes polares (próticos e apróticos) e apolares.

Tabela 6 Solubilidade dos ligantes

Ligante	MeOH	CH ₃ CN	CHCl ₃	CH ₂ Cl ₂
Lbut	S	PS	S	S
Lt4am	S	PS	S	S

S: solúvel – PS: parcialmente solúvel

Ambos foram caracterizados por RMN de ¹H e espectroscopia no infravermelho, sendo que os ligantes finais também foram caracterizados por espectrometria de massas.

5.1.1 Espectroscopia no Infravermelho por Refletância Total Atenuada - ATR

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica que auxilia na detecção de modificações químicas, uma vez que a mesma traz informações acerca das principais bandas referentes aos diversos grupos funcionais presentes nas moléculas. A técnica de IV por refletância total atenuada (ATR) envolve o contato direto da amostra com um cristal com índice de refração conhecido, onde a luz no comprimento de onda do IV é incidida em um ângulo superior ao ângulo crítico, resultando na total refletância do feixe (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006; KHOSHESAB, 2012).

Todos os precursores e ligantes foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho por refletância total atenuada. As bandas referentes às deformações angulares e estiramentos dos principais grupos funcionais, foram atribuídas por semelhança e utilizadas para acompanhar a formação dos ligantes (PAVIA et al., 2009; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Os espectros dos ligantes L_{but} e L_{t4am}, assim como o dos precursores estão sobrepostos, indicando a formação dos produtos, na Figura 10. A Tabela 7 apresenta os modos vibracionais dos principais grupos funcionais presentes nos compostos sintetizados.

Figura 10 Sobreposição dos espectros no IV dos ligantes. (a): dos precursores 2py e L_{2pyald} . (b): dos ligantes L_{t4am} e L_{but} e do precursor L_{2pyald} .

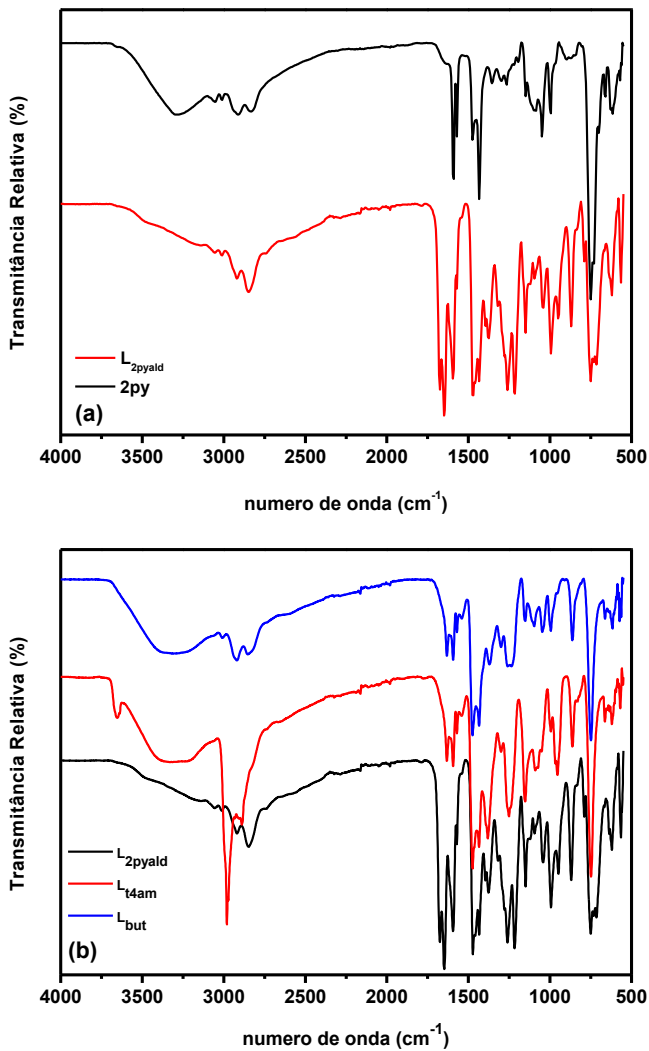


Tabela 7 Principais bandas e atribuições dos precursores 2py e L_{2pyald} e dos ligantes L_{but} e L_{t4am} (PAVIA et al., 2009; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Atribuições	2py (cm ⁻¹)	L _{2pyald} (cm ⁻¹)	L _{but} (cm ⁻¹)	L _{t4am} (cm ⁻¹)
v (O-H _{ácool})	3288	3180	3313	3315
v (C-H _{ar} e CH _{alif})	2917-2835	2920-2851	2922-2845	2912-2821
v (C=O)	-----	1674-1647	-----	-----
v (C=N e C=C)	1590-1475	1596-1474	1593-1474	1594-1474
δ _{N-H} amina 2 ^a	1570	-----	1570	1570
δ (O-H _{fenol})	-----	1377	1371	1381
v (C-O _{fenol})	-----	1260-1216	1259	1251
δ (C-H _{arom})	-----	994	995	953
δ (C-H _{py})	741	749	748	748

Pode-se notar que no espectro do precursor 2py há a presença de uma banda em 1570 cm⁻¹ referente deformação angular da ligação N-H de amina secundária, indicando a formação do mesmo. Entretanto, o espectro do precursor L_{2pyald} há o desaparecimento desta banda, porém nota-se o aparecimento de bandas em 1674 e 1647 cm⁻¹, que são atribuídas aos modos vibracionais de estiramento dos grupos carbonila, indicando que a inserção de um grupo funcional aldeído, oriundo do CMFF, ao 2py.

Os ligantes L_{but} e L_{t4am} apresentam bandas específicas de aminas secundárias (1570 cm⁻¹), indicando a formação dos ligantes. A Figura 12 ilustra as sobreposições destes espectros indicando a formação dos produtos.

5.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio – RMN ¹H

O método espectroscópico de ressonância magnética nuclear é observado em núcleos que possuem uma distribuição não homogênea de massa e carga, isto é momento de spin nuclear diferente de zero. Quando se estudam núcleos de hidrogênio, consegue-se determinar o número de cada tipo

distinto de núcleos de hidrogênio, bem como a natureza do ambiente de cada tipo (PAVIA et al., 2009).

Desta forma, a análise de RMN ^1H mostrou-se propícia para as caracterizações dos compostos sintetizados, visto que os deslocamentos químicos e a integração dos sinais nos espectros de RMN estão de acordo com o número de hidrogênios presentes nos ligantes bem como sua natureza (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006). Os espectros do L_{but} e L_{t4am} estão apresentados nas Figuras 13 e 14 respectivamente. A tabela 8 indica os valores dos deslocamentos químicos (ppm), o número de hidrogênios e as respectivas atribuições dos sinais dos precursores 2py e $L_{2\text{pyald}}$ e dos ligantes L_{but} e L_{t4am} .

Figura 11 Espectro de RMN ^1H (200 MHz) do ligante L_{but} em CDCl_3

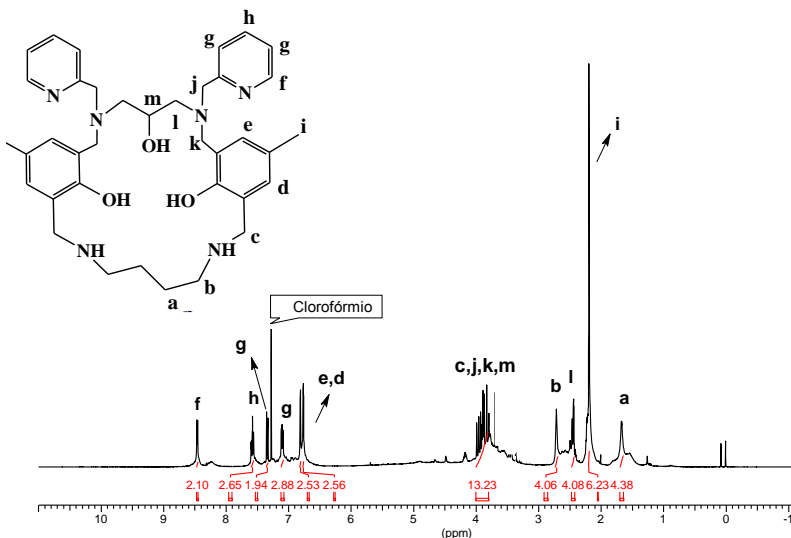
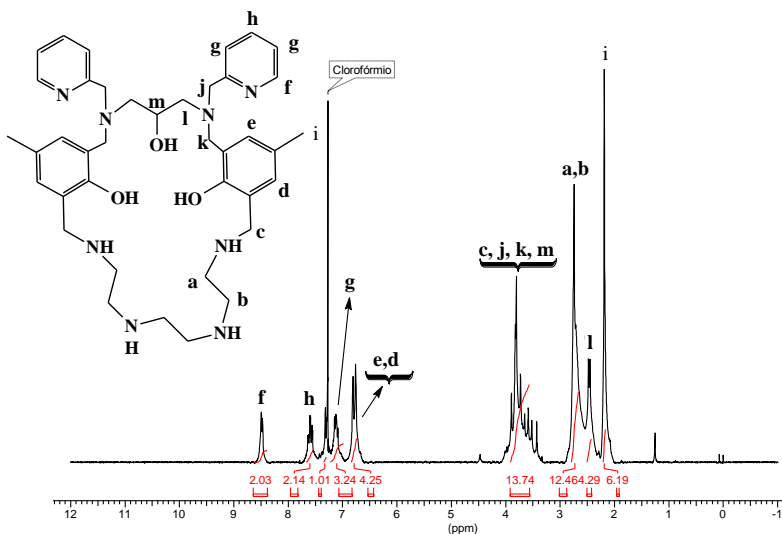


Figura 12 Espectro de RMN ^1H (200 MHz) do ligante Lt4am em CDCl_3 Tabela 8 Deslocamentos químicos (ppm), observados nos espectros de RMN ^1H para os precursores 2py e $\text{L}_{2\text{pyald}}$ e dos ligantes L_{but} e L_{t4am} .

Atribuições	2py	$\text{L}_{2\text{pyald}}$	L_{but}	L_{t4am}
CH_3	-----	2,15 ^a	2,20 ^a	2,20 ^a
$\text{CH}_2\text{-OH}_{\text{alcohol}}$	2,4-2,7 ^b	2,4-2,6 ^b	2,4-2,5 ^b	2,4-2,5 ^b
$\text{CH}_2\text{-t4am}$	-----	-----	-----	2,6-2,8
$\text{CH}_2\text{-but}$	-----	-----	1,67 ^b e 2,6-2,8	-----
$\text{CH}_2/\text{C-H}_{\text{alif}}$	3,3 ^d e 3,7-3,9 ^b	3,6-4,0 ^c	3,5-4,0 ^c	3,5-4,0 ^c
C-H_{arom}	6,9-7,1 ^b 7,15-7,3 ^b 7,4-7,6 ^f 8,4 ^g	7,0-7,2 ^e 7,5-7,6 ^f 8,4 ^f -----	6,7-6,9 ^k 7,0-7,3 ^p 7,5-7,6 ^f 8,5 ^g	6,7-6,9 ^k 7,0-7,3 ^p 7,5-7,6 ^f 8,5 ^g
$\text{C-OH}_{\text{aldeido}}$	-----	10,1 ^h	-----	-----

a (s, 6H); b (d, 4H); c (m, 13H); d (m, 1H); e (m, 8H); f (t, 2H); g (d, 2H), h (s, 2H), k (s, 4H) p (m, 4H) - s = singleto; m = multipeto, d = dubleto, t = tripleto

A formação do precursor $\text{L}_{2\text{pyald}}$ e dos ligantes L_{but} e o L_{t4am} pode ser observada a partir da presença de um singleto entre 2,15 – 2,20 ppm nos espectros de RMN ^1H , relativo aos seis hidrogênios do grupo metil do CMFF, ausente no espectro

do precursor 2py. Outra evidência na formação dos ligantes L_{but} e L_{t4am} é a ausência de um sinal na região de 10 ppm atribuído ao próton do aldeído do precursor L_{2pyald} mostrando que novos grupos funcionais, tais quais, aminas foram acrescentadas no lugar do aldeído.

5.1.3 Espectrometria de massas – ESI - MS

A espectrometria de massas é uma técnica analítica de impacto de elétrons, onde moléculas no estado gasoso são convertidas a íons e o resultado deste experimento é um espectro destes íons separados na base da razão massa/carga. Os espectros de massas e os respectivos espectros simulados dos ligantes L_{but} e L_{t4am} estão apresentados na Figura 13 e 15 - 16, respectivamente.

Figura 13 Espectro de massas do ligante L_{but} em CH_3CN para m/z 625,39

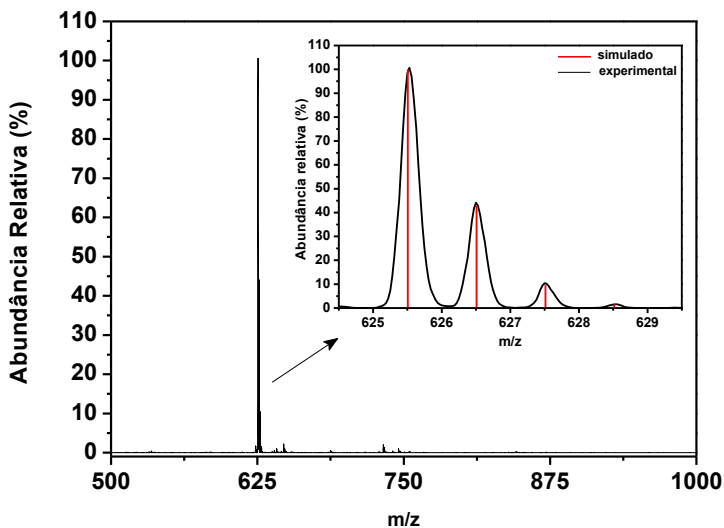


Figura 14 Estrutura catiônica do ligante L_{but} de acordo com o ESI-MS

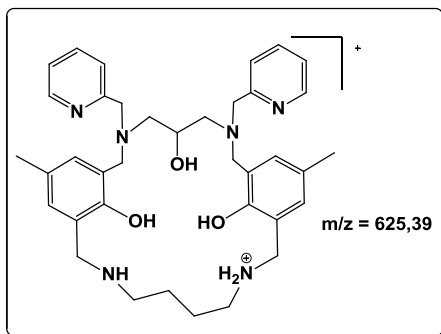
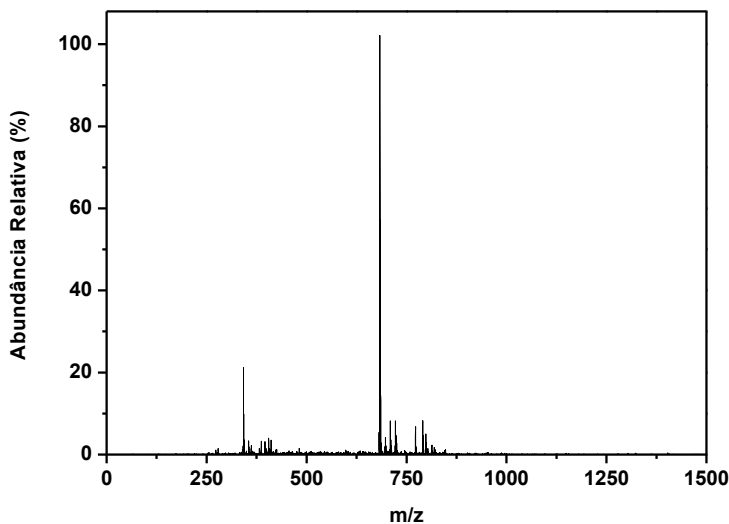
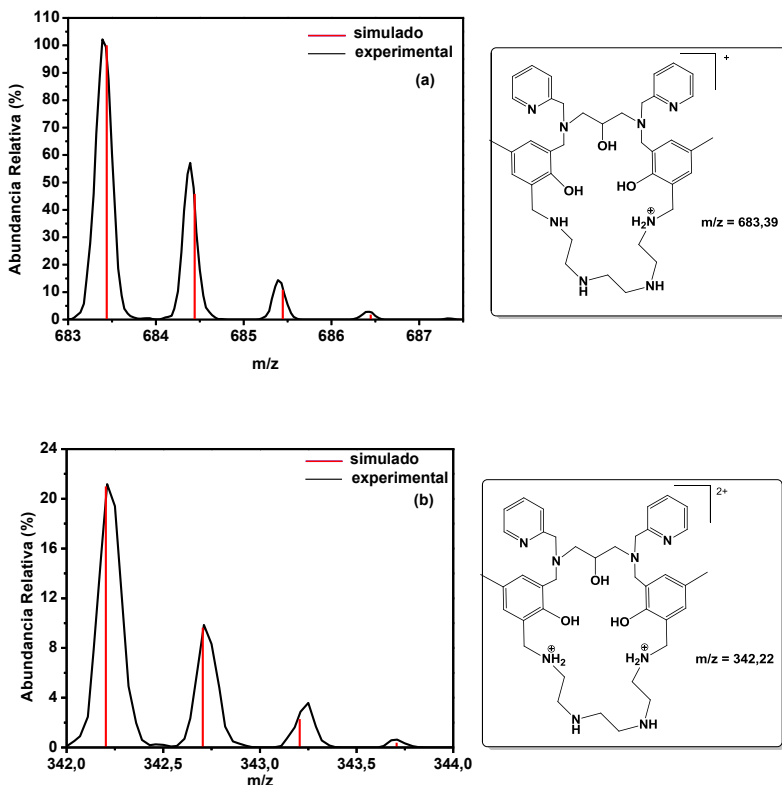


Figura 15 Espectro de massas do ligante L_{t4am} em CH_3CN



O espectro do ligante L_{but} (Figura 13) apresenta um conjunto de picos com razão m/z de 625,39 o qual é atribuído à espécie $(L_{\text{but}})^+$ - com uma amina protonada (Figura 16). Já o espectro do ligante L_{t4am} (Figura 15) apresenta dois conjuntos de picos, um com razão m/z de 683,44 atribuído à espécie $(L_{\text{t4am}})^+$ - com uma amina protonada e outro com m/z 342,22 o qual é atribuído à espécie $(L_{\text{t4am}})^{2+}$ - com duas aminas protonadas (Figura 16).

Figura 16 Espectro experimental e teórico para m/z 683,39 (a); espectro experimental e teórico para m/z 342,22 (b).



Ambos os picos bases dos ligantes possuem uma diferença entre um pico e outro de uma unidade, o qual é atribuído para espécies com carga 1+. Para espécies com carga 2+, a diferença entre um pico e outro é sempre de 0,5 unidades.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

Os complexos C_1 e C_2 foram sintetizados, respectivamente, a partir dos ligantes L_{but} e L_{t4am} e do sal de acetato de cobalto(II) em proporção estequiométrica de 2:1 do sal do metal e do ligante, respectivamente. Inicialmente foi

utilizado como contra-íon, para ambos os complexos, o sal de perclorato de sódio obtendo-se apenas um pó do complexo **C₁**. Devido a várias tentativas de recristalização do complexo **C₂** optou-se trocar o contra-íon perclorato por tetrafenil borato. A Tabela 9 mostra os dados gerais dos complexos sintetizados.

Os complexos não foram submetidos à análise para a determinação de ponto de fusão já que possuem o íon perclorato, e este, quando submetido a altas temperaturas atua como um agente comburente, e do íon tetrafenilborato, o qual pode produzir gases inflamáveis e vapores perigosos (FICHA... 2015, 2016). Tanto a fórmula molecular quanto a massa molar levam em consideração a presença dos contra-íons (**C₁** – ânion perclorato – (ClO₄)⁻; **C₂** - ânion tetrafenil [B(Ph)₄]⁻) e não sua forma catiônica.

Tabela 9 Dados gerais dos complexos binucleares de cobalto (III) com ligantes macrocíclicos.

Composto	Formula Molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	Cor
C₁	{Co ₂ ^{III} [C ₃₉ H ₄₆ N ₆ O ₅][B(Ph ₄) ₂]	1435,14	Marrom
C₂	[Co ₂ ^{III} (C ₄₁ H ₅₂ N ₈ O ₅)(ClO ₄) ₂]	1053,67	Marrom

Da mesma forma que os ligantes, é de grande relevância saber a solubilidade dos compostos frente a solvente orgânicos (Tabela 10), uma vez que estes serão caracterizados por diversas técnicas. Ambos os complexos foram testados em um solvente polar prótico e dois apróticos. Para o solvente metanol, os complexos se mostraram solúveis, entretanto em concentrações maiores, os mesmos se mostraram parcialmente solúveis. Já para o solvente acetonitrila e acetona ambos se mostraram solúveis independente da concentração.

Tabela 10 Solubilidade dos complexos binucleares de cobalto (III) com ligantes macrocíclicos.

Complexo	MeOH	CH ₃ CN	Acetona
C₁	S ^a - PS ^b	S	S
C₂	S ^a - PS ^b	S	S

^aSolúvel quando [C] ≤ 1,5 x10⁻³ mol L⁻¹

^bParcialmente solúvel quando [C] ≥ 1,5 x10⁻³ mol L⁻¹

Ambos os complexos foram caracterizados através de IV-ATR, espectrometria de massas, espectrofotometria na região do UV-Vis, condutividade molar e eletroquímica e a partir destas análises foram realizados estudos catalíticos frente a reações de oxidações de catecóis.

5.2.1 Espectroscopia no Infravermelho por Refletância Total Atenuada – ATR

A espectroscopia na região do Infravermelho é uma técnica frequentemente empregada como uma análise prévia, a qual traz informações importantes a respeito da formação dos complexos. Os espectros mostram a presença de bandas características dos ligantes livres, o qual indica a presenças do mesmo nos compostos sintetizados. Os deslocamentos, alargamentos e/ou desaparecimento das bandas de absorção dos complexos em comparação aos ligantes, assim como a presença de novas bandas, referentes ao contra-íon também são observados. (NAKAMOTO, 2009; PAVIA et al., 2009; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006). A Tabela 11 mostra as principais bandas dos complexos e a Figura 17 apresenta os espectros dos complexos **C₁** e **C₂** sobrepostos aos ligantes livres.

Os ligantes apresentam em seus espectros bandas intensas na região de 1470 cm^{-1} , as quais são atribuídas aos estiramentos das ligações C=C e C=N dos anéis aromáticos, estas bandas também são observadas nos complexos, porém com menor intensidade e um pouco deslocadas quando comparadas ao ligante livre. Tal deslocamento ocorre devido ao estiramento simétrico e assimétrico das ligações O-C-O do grupo acetato em ponte. A ausência da banda em 1370 cm^{-1} nos complexos, e a presença da mesma nos ligantes - a qual é proveniente da deformação angular da ligação O-H do fenol - comprova a coordenação pelo mesmo na forma desprotonada. Além disso, a banda na região de 3400 cm^{-1} indica a presença de moléculas de solvente coordenadas ou de hidratação.

Figura 17 Sobreposição dos espectros e IV dos complexos com seus respectivos ligantes: (a) L_{but} e C_1 ; (b) L_{t4am} e C_2 . (—) complexo; (—) ligante.

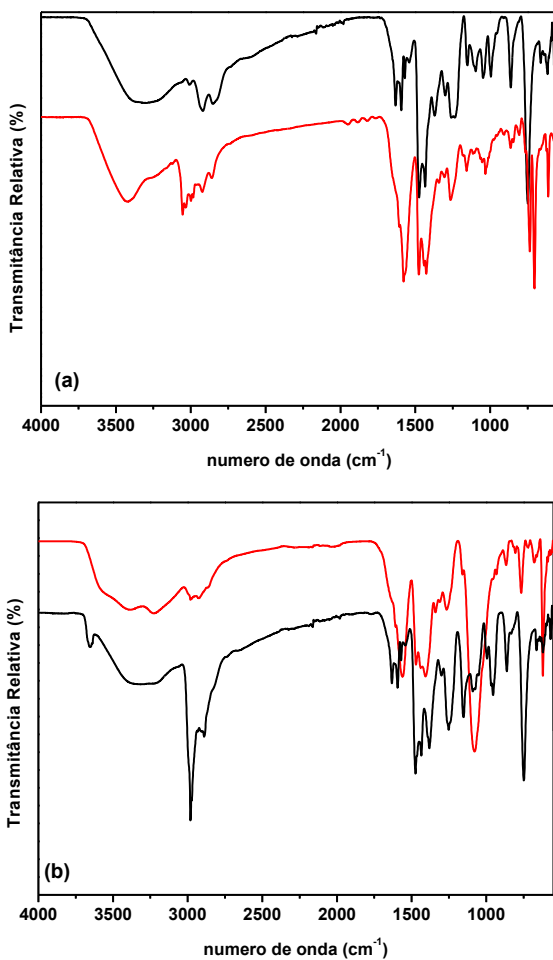


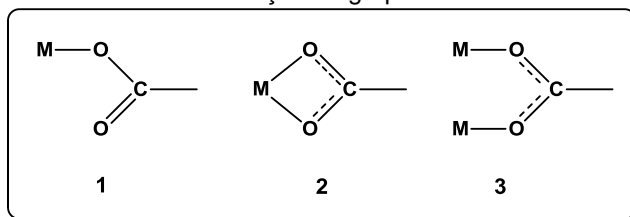
Tabela 11 Principais bandas e atribuições dos complexos C_1 e C_2 (NAKAMOTO, 2009; PAVIA et al., 2009; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Atribuições	C_1 (cm^{-1})	C_2 (cm^{-1})
ν (O-H. H_2O)	3422	3225
ν (C-H _{ar} e CH _{alif})	2923	2923
ν (C=N e C=C)	1475	1471
ν (OAc _{assim})	1578	1559
ν (OAc _{sim})	1426	1407
ν (C-O _{fenol})	1254	1261
ν (Cl-O)	---	1078
δ (C-H _{ar} tetrafenilborato)	735-704	---
δ (C-H _{arom})	612	620

A banda em 1078 cm^{-1} , presente no espectro do complexo C_2 , refere-se ao estiramento axial da ligação Cl-O do contra-íon perclorato. Já para o complexo C_1 observa-se duas novas bandas em $735-794 \text{ cm}^{-1}$ as quais, são características do contra-íon tetrafenilborato (BPh_4).

Ambos os espectros dos complexos observa-se a presença de bandas em 1578 e 1426 cm^{-1} para o complexo C_1 e 1559 e 1407 cm^{-1} para o complexo C_2 , as quais são atribuídas respectivamente ao estiramento assimétrico e simétrico do grupo acetato. Segundo Nakamoto (2009), a diferença entre esses estiramentos ($\Delta_{\text{vass-vs}}$) indicam de que forma o grupo acetato está coordenado junto ao centro metálico. Há três formas que o grupo acetato pode estar coordenado: 1 – unidentado; 2 – bidentado/quelato; 3 – bidentado/ponte (figura 17).

Figura 18 Formas de coordenação do grupo acetato



Estas formas de coordenação estão correlacionadas a partir da $\Delta_{\text{vass-vs}}$ do grupo acetato na sua forma iônica. A $\Delta_{\text{vass-vs}}$ do grupo acetato na sua forma iônica é de 164 cm^{-1} e segundo este estudo, uma coordenação unidentada exibe valores de $\Delta_{\text{vass-vs}}$ muito maiores que o valor iônico, já a coordenação na forma quelato este apresenta valores muito menores e para a forma de coordenação em ponte os valores de $\Delta_{\text{vass-vs}}$ são próximos ao valor iônico. O valor de $\Delta_{\text{vass-vs}}$ de ambos os complexos é de 152 cm^{-1} indicando um valor próximo à forma iônica do grupo acetato e com isso indicando que o acetato está coordenado de forma bidentada formando ponte entre os centros metálicos (NAKAMOTO, 2009).

5.2.2 Espectroscopia eletrônica na Região do Ultravioleta visível

Os espectros eletrônicos dos complexos de cobalto sintetizados foram analisados tanto na região do ultravioleta quanto na região do visível, como mostra a Figura 18. As absorptividades molares (ϵ) das bandas detectadas estão sumarizadas na Tabela 13. Em ambos os complexos utilizou-se como solvente metanol.

Dos espectros eletrônicos obtidos duas bandas foram detectadas, uma na faixa de 400 nm e outra na faixa de 600 nm, Figura 19 e 20. O espectro do complexo **C₁** apresentou uma banda não muito definida (ombro) em 384 nm e uma banda mais alargada de baixa intensidade em 676 nm. Da mesma forma ocorre para o complexo **C₂** ($\lambda_{\text{máx}} = 385$ e 673 nm), porém a banda na região de mais alta energia é mais definida quando comparada ao complexo **C₁**.

Tabela 12 Atribuições às bandas dos espectros eletrônicos dos complexos de cobalto(III) na região do ultravioleta-visível.

Complexo	$\lambda_{\text{máx}} - \text{nm} (\epsilon - \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1})$	
	TCLM	d → d
MeOH		
C₁	383 (2537)*	683 (293)
C₂	383 (1987)	673 (203)

*Ombro - absorptividade aparente

Figura 19 Espectro eletrônico, em MeOH na região do ultravioleta-visível do complexo **C₁** e **C₂**

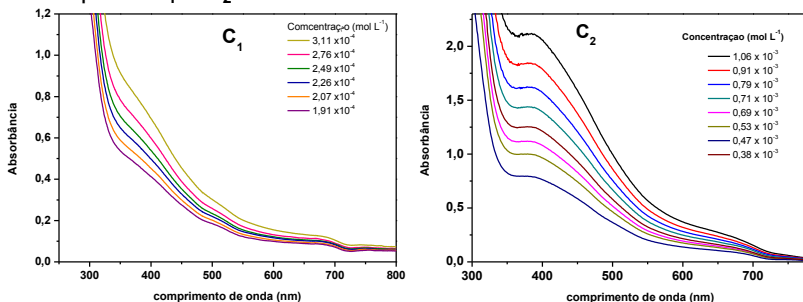
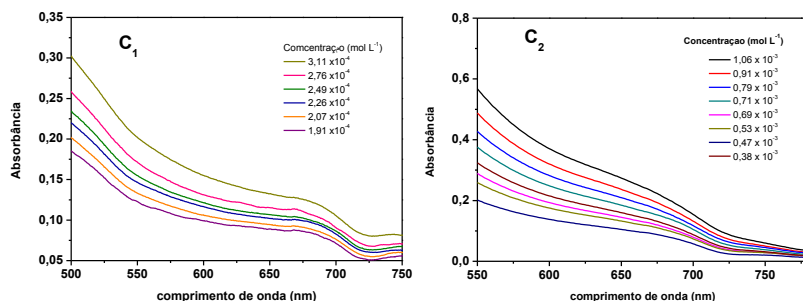


Figura 20 Ampliação do espectros eletrônicos dos complexos **C₁** e **C₂**

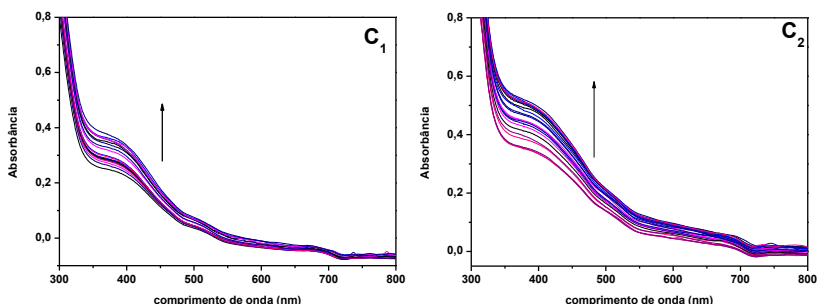


Complexos de cobalto em seu estado de oxidação 3+ possuem configuração d^6 e são geralmente de spin baixo e diamagnéticos. Grande parte destes complexos são hexacoordenados obtendo assim geometria octaédrica com os orbitais t_{2g} preenchidos e os orbitais e_g vazios ($t_{2g}^6 - e_g^0$) (HUHEEY, 1983; LICHTY et al., 2004).

Preliminarmente, sugere-se que as transições eletrônicas na região de mais alta energia são de uma transferência de carga entre ligante-metal (TCLM), oriundo dos orbitais $\pi\pi$ do fenolato para o orbital d do centro metálico (d_{σ^*}), a qual é governada por transições permitidas por Laporte e por spin (HUHEEY, 1983). Diferentemente das transferências de cargas, a transições $d-d$ são proibidas pela regra de Laporte, isso ocorre, pois há uma variedade de mecanismos que permitem o relaxamento das regras de seleção, para a regra de Laporte as vibrações moleculares durante as transições e que de certa

maneira ocorrem, porém com menor intensidade. Estas bandas de menor energia são atribuídas as transições do campo ligante ${}^1A_{1g} \rightarrow {}^1T_{1g}$. Em sistemas de Co(III) outra banda d-d poderia ser observada, referente a transição ${}^1A_{1g} \rightarrow {}^1T_{2g}$ da espécie de Co(III) de spin baixo, entretanto não observa-se pois a mesma é encoberta pela transição TCLM (SHONGWE et al., 2002; ABDELHAK et al., 2014; BUCALON, 2014; MIESSLER; FISCHER; TARR, 2014; SALEHI; HASANZADEH, 2015).

Figura 21 Espectro eletrônico, em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1), na região do ultravioleta-visível dos complexos C_1 e C_2 , na presença de NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$



Salienta-se que apesar da semelhança do ambiente de coordenação, diferindo somente no grupo amino do macrocíclico, não se notou nenhum efeito significativo em relação aos possíveis deslocamentos do $\lambda_{\text{máx}}$.

Não obstante, estudos qualitativos na presença de uma base (NaOH) foram realizados na tentativa de avaliar o aumento da banda de transferência de carga em torno de 400 nm. O aumento da banda ocorre, pois conforme realiza-se a adição de base de $100 \mu\text{L}$ de base a cada leitura, o fenol passa à sua forma desprotonada o que pode levar à transferência de carga entre o fenolato e o centro metálico, Figura 21 (CHAVES, 2015).

5.2.3 Espectrometria de massas – ESI – MS

Tendo em vista que os complexos sintetizados não formaram monocristais adequados para determinação da sua estrutura cristalina, e a partir das informações obtidas pela técnica de IV-ATR, a técnica de espectrometria de massas se torna bastante valiosa para identificar e estimar o ambiente de coordenação destes complexos e com isso determinar as possíveis espécies em solução. Com isso os espectros de massas dos complexos **C₁** e **C₂** estão apresentados na Figura 22.

O espectro de **C₁** (Figura 22 – acima) apresentou um pico base em $m/z = 796,29$, referente a espécie catiônica $[\text{Co}_2(\text{C}_{39}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_5)]^+$ representada na Figura 24. Para este conjunto de sinais, mostrado na Figura 23, apresenta-se um dos íons metálicos na sua forma reduzida (Co^{II}) que pode ser explicado por um processo de redução ocasionada pela ionização por eletrospray (RALPH et al., 1996).

Nota-se a presença de picos de fragmentação com valores de m/z com abundâncias menores. Um destes valores localiza-se em $m/z = 426,13$ (Figura 25) atribuído a espécie catiônica $[\text{Co}_2(\text{C}_{40}\text{H}_{51}\text{N}_6\text{O}_7)\text{Li}]^{2+}$, apresentada na Figura 26. A estrutura proposta a este sinal é apresentada com os íons metálicos com carga 3+ (ou seja Co^{III} e Co^{III}), e a presença do aduto com íon Li^+ , onde a presença deste aduto é bastante recorrente em análises de espectrometria de massa (HOFFMANN, 2007 apud HEYING, 2014). A existência deste aduto supostamente pode ser proveniente da vidraria utilizada na síntese dos compostos ou da linha de injeção da amostra do equipamento. Por sua vez, a presença de metanol é explicada pelo uso do mesmo no processo de cristalização do composto.

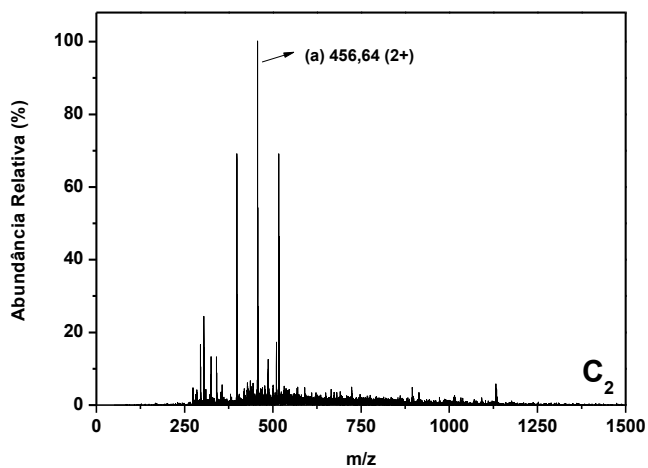
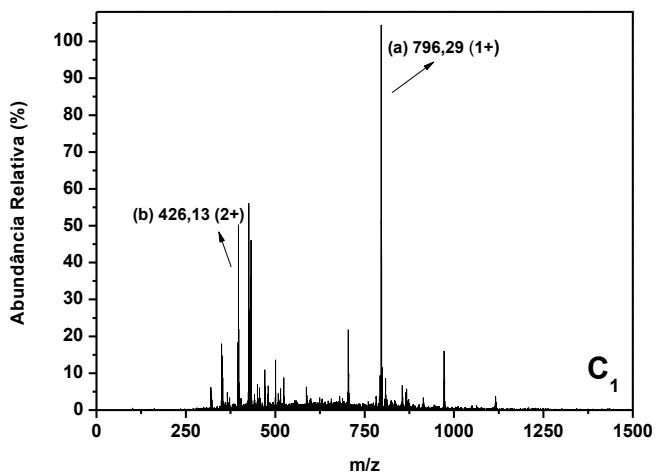
Figura 22 Espectro de massas dos complexos C_1 e C_2 em CH_3CN .

Figura 23 Simulação da distribuição isotópica com $m/z = 796,29$ para o complexo C_1

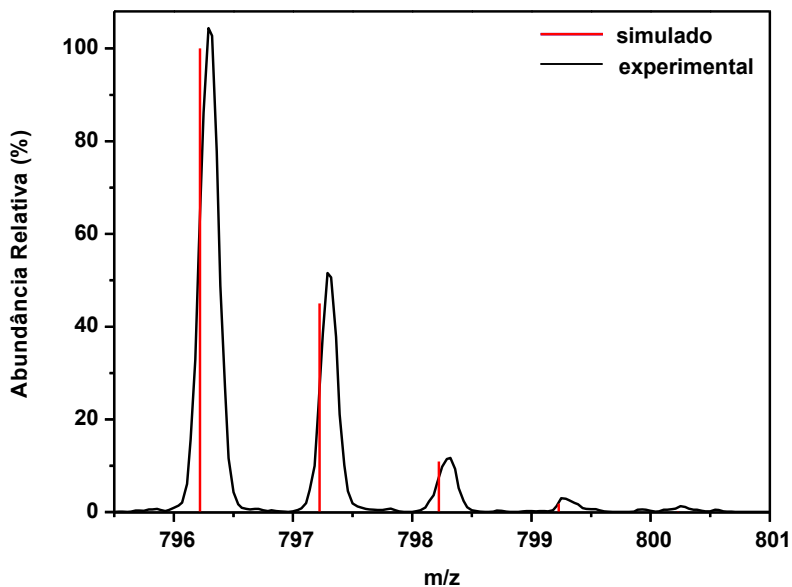


Figura 24 Estrutura proposta do complexo C_1 de acordo com o espectro de ESI-MS

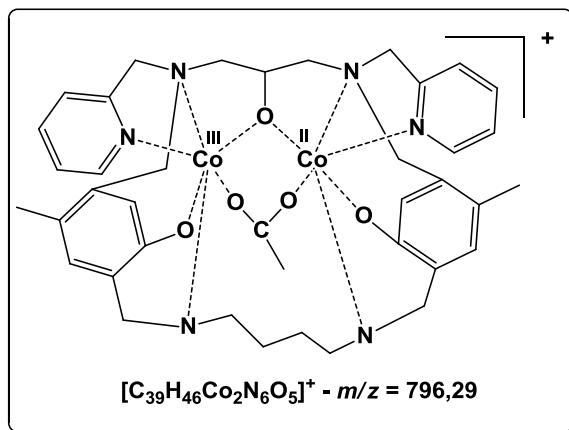


Figura 25 Simulação da distribuição isotópica do complexo C_1 com $m/z = 426,13$.

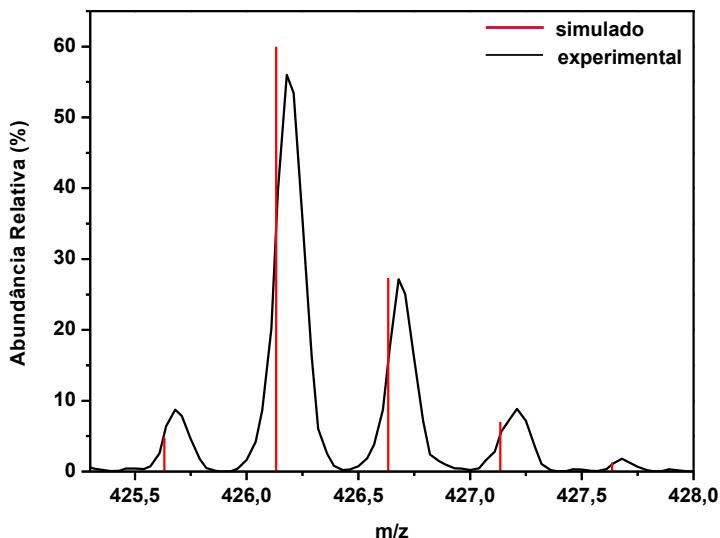
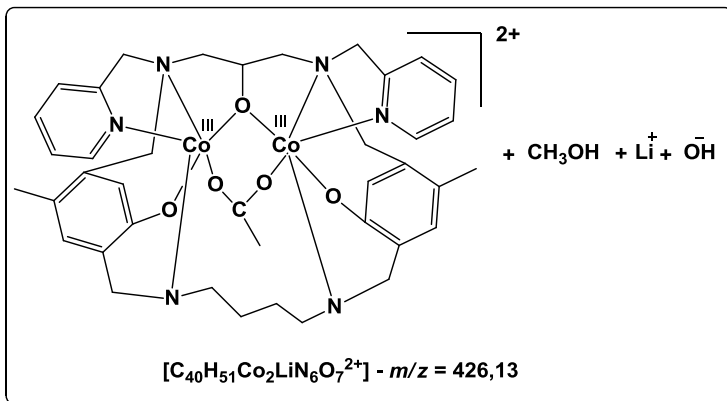


Figura 26 Estrutura proposta do complexo C_1 de acordo com o espectro de ESI-MS



Para o complexo C_2 o espectro (Figura 22 - abaixo) apresentou um pico base em $m/z = 456, 64$ com diferença de 0,5 unidades entre os picos, observada na Figura 27 referente a espécie catiônica $[Co_2(C_{43}H_{57}N_9O_6)]^{2+}$. A estrutura proposta

(Figura 28) para este conjunto de sinais apresenta os íons metálicos na forma de Co^{III} , além da presença de acetonitrila, já que a análise é realizada na mesma, e a presença de uma molécula de água, oriunda da linha de injeção da amostra, pelo fato que análises anteriores podem ter sido realizadas em água.

Figura 27 Simulação da distribuição isotópica do complexo C_2 com $m/z = 456,64$.

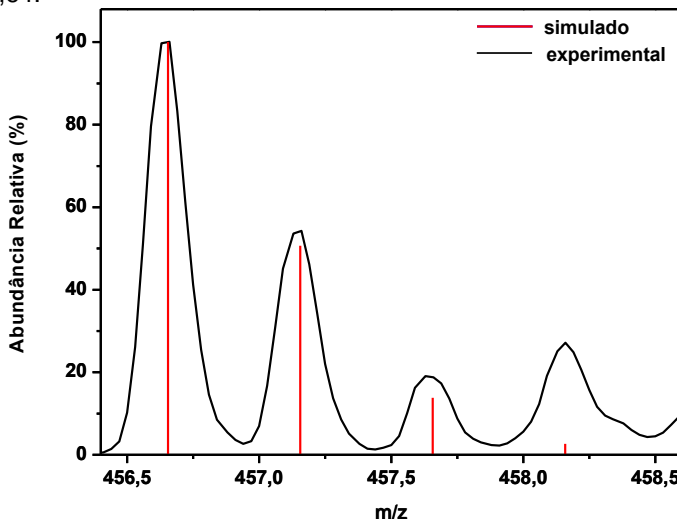
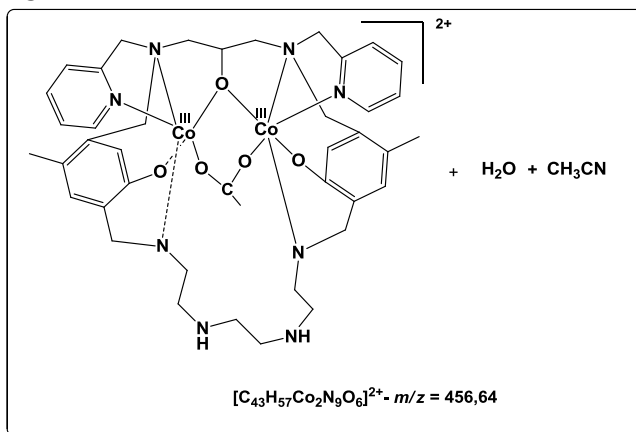


Figura 28 Estrutura proposta do complexo C_2 de acordo com o espectro de ESI-MS



De forma similar que o complexo C_1 , nota-se no espectro de massas do complexo a presença de outros picos de fragmentação, entretanto para o complexo C_2 não se obteve nenhuma estrutura para estes fragmentos.

5.2.4 Eletroquímica – Voltametria de onda quadrada

Os estudos eletroquímicos têm como finalidade obter informações acerca dos processos de oxidação e redução de substâncias. A voltametria de onda quadrada é uma técnica de pulso, a qual possibilita a obtenção de correntes de picos bem definidas em experimentos com alta velocidade de varredura, favorecendo, assim, a maior sensibilidade da técnica (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; SKOOG, 2006).

O desempenho redox dos complexos C_1 e C_2 foi avaliado através da técnica de voltametria de onda quadrada em solução metanólica. Os potenciais catódicos (E_{pc}) e anódicos (E_{pa}) e os voltamogramas dos complexos são apresentados na Tabela 13 e na Figura 29. Todos os potenciais foram referenciados ao eletrodo normal de hidrogênio (ENH) através do par ferroceno/ferrocínio ($E_{1/2} = 0,400$ V vs ENH).

Nos voltamogramas do complexo C_1 observa-se, a presença de um processo com $E_{pc} -920$ mV vs. NHE atribuído ao processo de transferência simultânea de dois elétrons $Co(III)/Co(III) \rightarrow Co(II)/Co(II)$ (OLIVEIRA, 2013). Igualmente, para o complexo C_2 o voltamograma apresenta um processo, $E_{pc} = -874$ mV e, $E_{pa} = -964$ mV, o qual também é atribuído à transferência de dois elétrons, porém diferentemente do complexo C_1 este processo aparece tanto na onda de redução quanto de oxidação. Notam-se também outros dois processos um em $+635$ mV e outro em $+940$ mV, para o complexo C_1 e C_2 respectivamente que podem ser referentes há processos de oxidação dos ligantes.

Figura 29 Voltamogramas de onda quadrada dos complexos C_1 e C_2 ambos em metanol com concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de trabalho: Carbono vitreo; Referência: Ag/Ag^+ ; Auxiliar: Platina. Eletrólito suporte: TBAPF_6 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e padrão interno: Ferroceno.

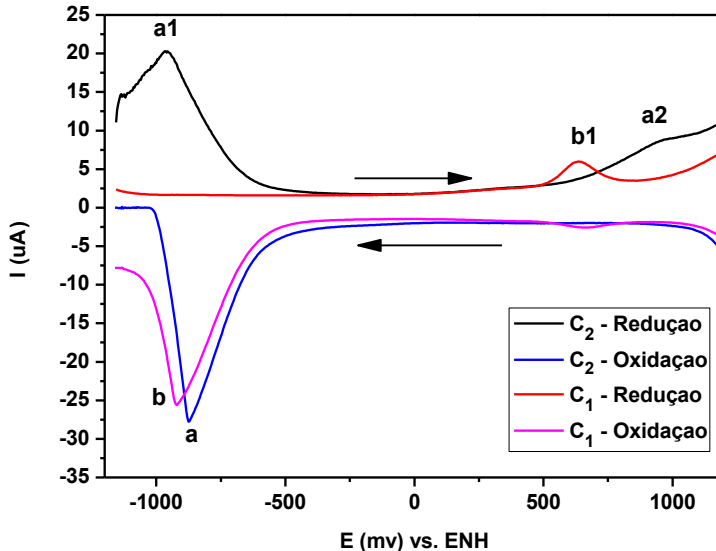


Tabela 13 Dados de Onda Quadrada para os complexos

Complexo C_1	E_{pa} (mV) vs. ENH	E_{pc} (mV) vs. ENH
Redução	---	-920 (b)
Oxidação	635 (b1)	---
Complexo C_2	E_{pa} (mV) vs. ENH	E_{pc} (mV) vs. ENH
Redução	---	-874 (a)
Oxidação	940 (a2) e -964 (a1)	---

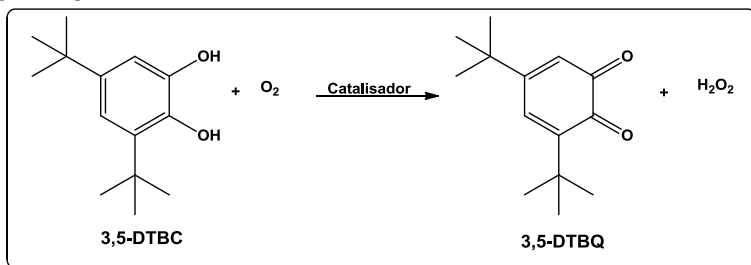
Os valores dos potenciais catódicos apresentam valores de redução bastante negativos. Isto ocorre em razão de que o grupo $-CH_3$ presente na posição *para* ao grupo fenolato, interfere diretamente no processo de redução do cobalto, ou seja, o caráter de sigma doador do grupo $-CH_3$ torna mais difícil o ganho de elétrons pelo metal e conseqüentemente desloca o potencial de redução para regiões mais negativas.

Destaca-se também, que embora o ambiente de coordenação dos complexos sejam análogos, diferindo somente no grupo amino (relacionado ao macrociclo), há diferença entre os potenciais de redução dos complexos. Este efeito pode ser conferido, pois processos de oxirredução de complexos de cobalto podem ocasionar mudança no estado de spin (estabilização) seguida de mudança estrutural (SOUZA et al., 2009, 2011).

5.2.5 Reatividade

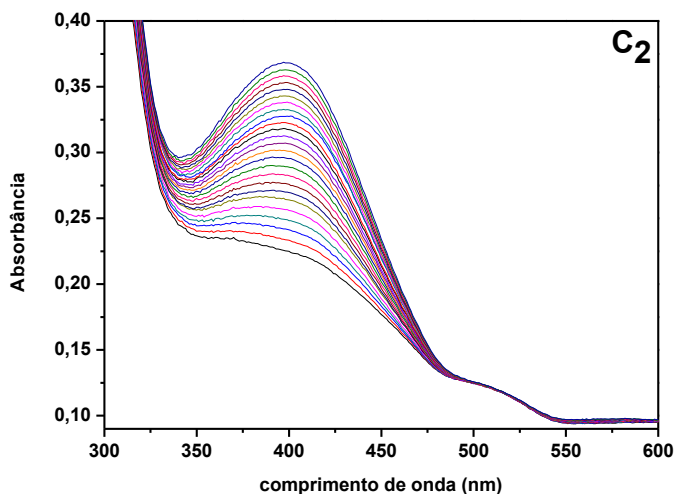
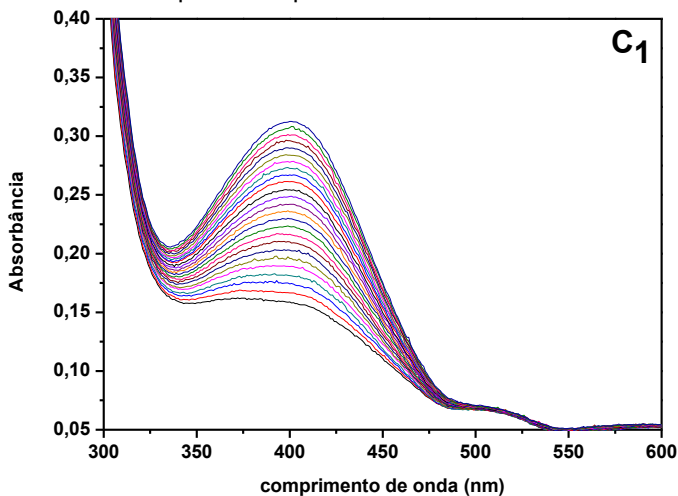
Um dos propósitos da química bioinorgânica, especificamente a área biomimética, é a obtenção de compostos que tenham atividade catalítica análoga às metaloenzimas. Os complexos sintetizados neste trabalho dispõem de sítios lábeis indicando que possam ser testados quanto às suas capacidades oxidativas. Desta maneira, estudos cinéticos foram realizados para avaliar a capacidade dos complexos **C₁** e **C₂** de promover a oxidação do substrato modelo 3,5-di-*terc*-butilcatecol (3,5-DTBC) à 3,5-di-*terc*-butilquinona (3,5-DTBQ).

Figura 30 Esquema ilustrativo para a reação de oxidação do substrato 3,5-DTBC.



Este substrato é tido como apropriado para a realização deste experimento, pois possui um baixo potencial redox, o que facilita a oxidação do 3,5-DTBC, além da presença dos grupos *tert*-butil os quais impedem a formação de reações com abertura do anel (MONZANI et al., 1999).

Figura 31 Variação do espectro eletrônico para reação de oxidação do 3,5-DTBC catalisada pelos complexos.



Os estudos cinéticos, foram acompanhados espectrofotometricamente, em metanol saturado de O_2 , acompanhando-se o aparecimento de uma banda em 400 nm ($\epsilon = 1645 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), referente à banda da *o*-quinona. O fato de saturar o meio reacional com O_2 é que de acordo com o mecanismo de reação o oxigênio participa diretamente do ciclo catalítico (CAMARGO et al., 2015).

A Figura 33 mostra a mudança da banda em 400 nm e a partir desse estudo preliminar viu-se a necessidade de estudos mais específicos. Todavia, foram investigados o efeito do pH e da concentração do substrato sobre a reação de oxidação do substrato modelo catalisada pelos complexos C_1 e C_2 .

5.2.5.1 Efeito do pH na reação de oxidação do 3,5-DTBC

O estudo da variação do pH sobre a reação de oxidação do 3,5-DTBC foi realizado com propósito de analisar a influência causada pelo pH para cada sistema, buscando definir o pKa cinético da reação e também o pH ótimo da reação.

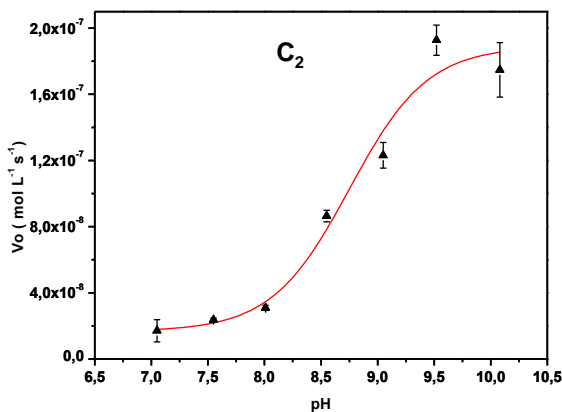
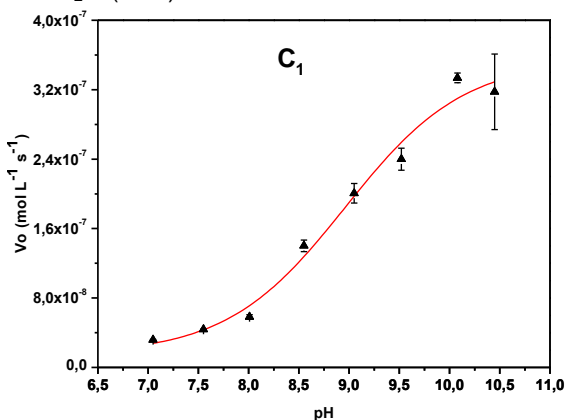
A reatividade de oxidação do 3,5-DTBC foi experimentalmente realizada em uma faixa de pH de 7 – 10,5, entretanto para o complexo C_2 o ponto em pH 10,5 foi excluído, em razão de possuir uma atividade muito baixa, a qual pode ser resultante de precipitação ou a formação do hidróxido do metal. Para ambos os complexos não houve atividade em $\text{pH} < 7$. A Figura 34 mostra os gráficos de velocidade inicial (V_o) em função do pH, onde na faixa de pH entre 7 e 8 constata-se uma atividade baixa independente do pH, e uma região intermediária (pH entre 8,5 e 9,5) em que a velocidade de reação aumenta de acordo com o aumento do pH. Pelo fato de ocorrer uma reação espontânea de oxidação que é dependente do pH, foram utilizadas soluções de mesma grandeza tanto em concentração quanto em volume, porém sem a presença do complexo, como referência interna (branco) para cada medida e descontada da reação catalisada pelos complexos.

O gráfico de V_o vs. pH apresenta um perfil sigmoidal, e em função disso para o cálculo do pKa cinético de reação usa-se o método das velocidades iniciais ajustado pelo modelo de Boltzmann, em que a inflexão da curva fornece o valor do pKa, a Tabela 15 mostra os valores obtidos dos pK_{as} de cada complexo.

Tabela 14 Valores de $pK_{a,s}$ para os complexos C_1 e C_2

	pH ótimo	pK_a Cinético
C_1	$\geq 9,0$	$8,96 \pm 0,17$
C_2	$\geq 9,0$	$8,75 \pm 0,16$

Figura 32 Dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5-DTBC com o pH para o complexo. Condições: $[Complexo]_f = 3,35 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[3,5\text{-DTBC}]_f = 3,74 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[Tampões] = 2,94 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; solução MeOH/H₂O (30:1) a 25 °C.



5.2.5.2 Efeito da concentração do substrato na reação de oxidação do 3,5-DTBC

Com o propósito de determinar os parâmetros cinéticos da reação de oxidação do substrato 3,5-DTBC catalisados pelos complexos, foram realizados ensaios cinéticos com a variação da concentração do substrato, e tais estudos foram realizados em pH 9,0. A síntese de modelos biomiméticos tem como finalidade adquirir clareza com relação aos processos enzimáticos e tendo em vista que em pH abaixo de 4 ou acima de pH 9, a enzima sofre uma perda considerável da sua atividade, por isso a escolha de pH ótimo em 9,0 (REY, 2008).

A Figura 35 apresenta o gráfico de velocidade inicial em função da concentração do substrato, onde a curva segue um perfil de saturação, de modo que esta dependência indica a formação de um intermediário complexo-substrato. Logo, o modelo de Michaelis-Menten pode ser aplicado para ambos os sistemas. Os parâmetros cinéticos estão apresentados na Tabela 16.

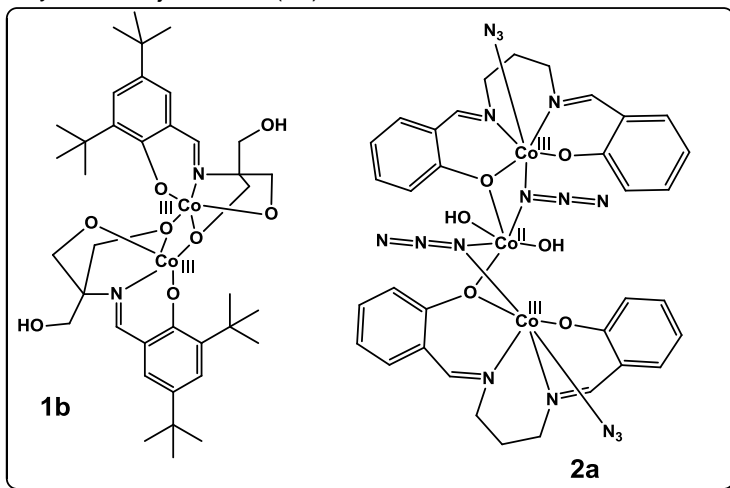
Os parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 16 revelam que estes novos complexos de cobalto(III) **C₁** e **C₂** mostraram ser ativos na catálise da reação de oxidação do 3,5-DTBC (atividade de catecol oxidase). Entretanto, os dados cinéticos revelam que o complexo **C₁** é cataliticamente mais eficiente do que o complexo **C₂** o que pode estar relacionado aos grupos substituintes (ciclo) dos complexos. Este comportamento pode ser tentativamente atribuído, pois o grupo trietiltetramino oferece maior impedimento estérico do que o grupo butil, o que pode vir a causar dificuldade na coordenação do substrato ao centro metálico.

As constantes cinéticas, K_M (constante de Michaelis) e k_{cat} (constante catalítica) e eficiência catalítica (E), podem trazer informações acerca do comportamento dos complexos frente ao substrato 3,5-DTBC. Valores pequenos de K_M indicam maior afinidade catalisador-substrato, ao passo que valores altos de k_{cat} , indicam maior taxa de conversão das moléculas de substrato em produto por segundo por sítio ativo (OLIVEIRA, 2015).

Ao comparar o valor de eficiência catalítica com o complexo reportado por Hazari et al. (2015), para complexos trinucleares de cobalto com valência mista (Figura 33 - **2a**), observa-se que os complexos **C₁** e **C₂** apresentaram uma

eficiência catalítica menor, porém se comparado ao complexo reportado por Dey e Mukherjee (2014) (Figura 33 – **1b**) a eficiência catalítica segue a seguinte ordem: complexo **C₁** > complexo **1b** > complexo **C₂**.

Figura 33 Complexos de cobalto reportados por Hazari et al. 2015 (**2a**) e por Dey; Mukherjee, 2014 (**1b**)



A diferença na atividade para os complexos sintetizados quando comparado com o complexo **2a** poder estar associada pela presença neste último de três centros metálicos de cobalto ($\text{Co}^{\text{III}}\text{Co}^{\text{II}}\text{Co}^{\text{III}}$) que favorece notavelmente a oxidação do substrato 3,5-DTBC aos seus correspondentes produtos, o qual é evidenciado pelo alto valor de k_{cat} .

Em compensação, a diferença dos complexos **C₁** e **C₂** para o complexo **1b**, pode estar relacionado ao impedimento estérico dos grupos trietiltetramino (complexo **C₂**) e do grupo terc-butil os quais interferem na ligação e interação de aproximação do substrato modelo com os centros metálicos. Esta evidência pode ser justificada uma vez que o complexo **C₁** apresenta menor valor de K_M , indicando maior afinidade pelo substrato.

Por fim, analisando-se os dados cinéticos, é possível observar que os complexos sintetizados apresentam uma atividade catalítica relativamente boa para complexos

binucleares de cobalto(III) na oxidação de o-difenóis, no entanto, observa-se que o complexo C_1 exibe uma eficiência catalítica cinco vezes maior que o complexo C_2 , o qual está associado ao seu menor valor de K_M , ou seja, sua maior eficiência ao se coordenar com o substrato.

Figura 34 Dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5-DTBC com o pH para os complexos C_1 e C_2 . Condições: $[\text{Complexo}]_f = 3,67 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{3,5-DTBC}]_f = 1,70 \times 10^{-3} - 11,90 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Tampões}] = 2,94 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; solução MeOH/H₂O (30:1) a 25 °C.

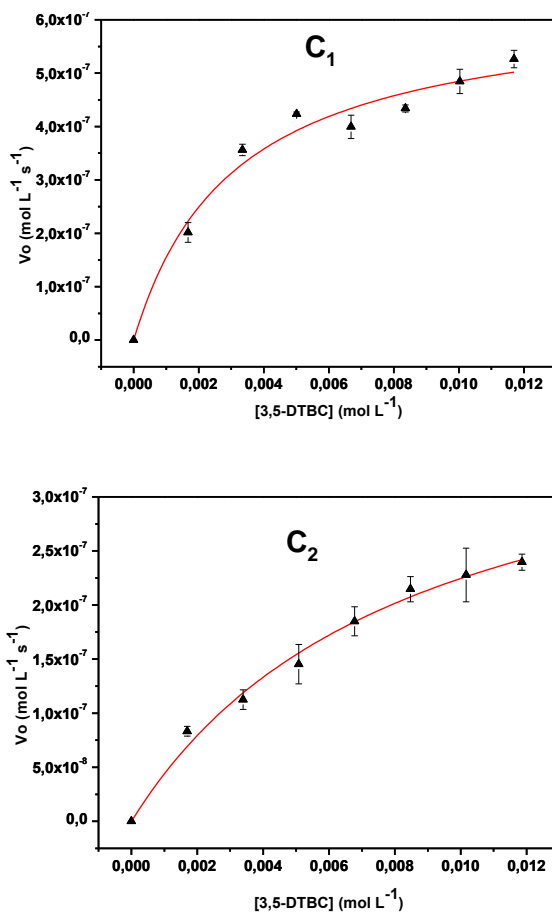
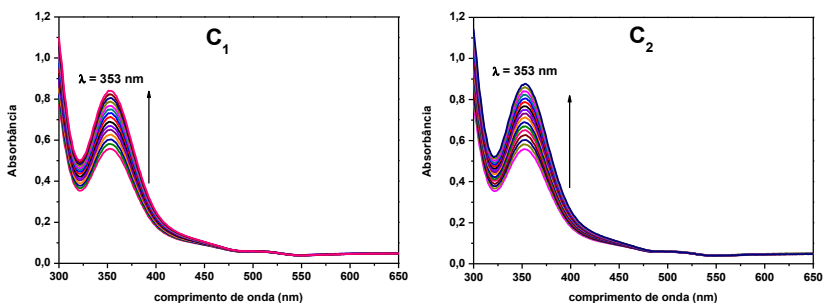


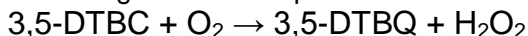
Tabela 15 Comparação dos parâmetros cinéticos de alguns complexos selecionados: ^a(Hazari et al, 2015); ^b(DEY; MUKHERJEE, 2014).

	C ₁	C ₂	2a	1b
$E = k_{cat}/K_M$ (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	6,17 ± 1,55	1,22 ± 0,24	16,39	2,52
K_{ass} (L mol ⁻¹)	322,6 ± 84,67	118,7 ± 25,95	---	---
K_M (mol L ⁻¹)	(3,10 ± 0,74) × 10 ⁻³	(8,42 ± 1,48) × 10 ⁻³	(1,44 ± 0,0081) × 10 ⁻³	(8,7 ± 1,47) × 10 ⁻³
k_{cat} (s ⁻¹)	(19,1 ± 1,48) × 10 ⁻³	(10,2 ± 0,94) × 10 ⁻³	23,61 × 10 ⁻³	21,9 × 10 ⁻³
$V_{máx}$ (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	(6,35 ± 0,49) × 10 ⁻⁷	(4,14 ± 0,38) × 10 ⁻⁷	(11,95 ± 0,10) × 10 ⁻⁷	(2,22 ± 0,23) × 10 ⁻⁷

Figura 35 Variação do espectro eletrônico para reação de determinação de peróxido de hidrogênio pela método de iodometria.



Para esclarecer o processo mecanístico exercido pelos complexos na oxidação do substrato 3,5-DTBC, foi feito um teste de detecção de peróxido através de modificação do método de iodometria. Através do método, foi estudado a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) durante a reação de oxidação do substrato catalisada pelos complexos C_1 e C_2 . A presença de H_2O_2 foi detectada espectrofotometricamente através da reação de iodeto gerando I_3^- , em que há o surgimento de uma banda característica em 353 nm ($\epsilon = 26000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Figura 35) (NEVES et al., 2002). Desta forma a reação de oxidação dos complexos ocorre seguindo a estequiometria:



Tendo em vista que a determinação de H_2O_2 já tenha sido descrita na literatura, ainda há impasses a respeito do mecanismo exato da formação de H_2O_2 nas reações de oxidações de substratos modelos (KOVAL, 2006). De uma maneira geral, estes impasses interferem nos fatores eletrônicos sugerindo uma grande diversidade entre a afinidade do centro metálico com o substrato.

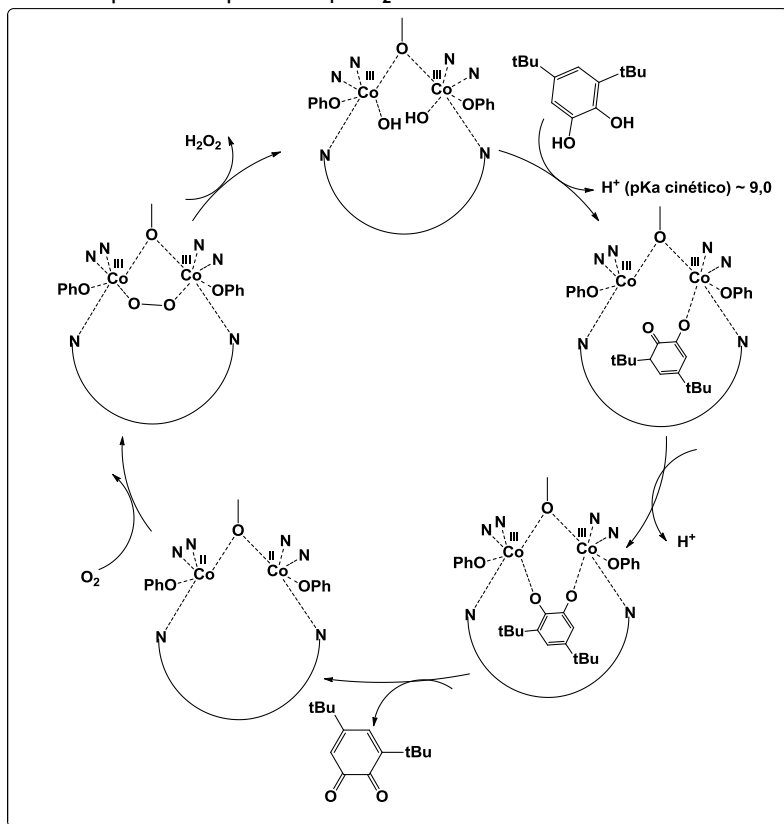
Com isso Dey e Mukherjee (2014) reportaram na literatura um novo comportamento, no qual o complexo estudado coordena-se simultaneamente, de maneira monodentada, a duas moléculas do substrato, e na sequência ocorre à reação de transferência de elétrons resultando na formação da respectiva semiquinona e a redução dos centros metálicos. A reação desta espécie com o oxigênio resulta na reoxidação dos centros

metálicos, na liberação da quinona e na formação de peróxido de hidrogênio.

Já Osório (2007) ressalta que para complexos binucleares de cobre(II) o mecanismo de ação pode ocorrer de forma que o substrato modelo se coordene de forma bidentada ao centro metálico. Entretanto Rey (2008) reportou em seu trabalho de doutorado outro comportamento da coordenação do substrato, o qual inicialmente pode estar coordenado de forma monodentada a apenas um dos centros metálicos, sendo que este comportamento foi determinado a partir dos valores de pK_{as} encontrados. Destaca-se que os pK_{as} para as desprotonações do substrato 3,5-DTBC livre são iguais a 10,3 e 14,7. Deste modo, espera-se que quando este estiver coordenado os valores dos pK_a 's diminuam. Como mostrado na tabela 15 os valores de pK_a para os complexos **C₁** e **C₂** foram de $8,96 \pm 0,17$ e $8,75 \pm 0,16$, respectivamente. Desta forma, os valores encontrados podem estar relacionados com a primeira desprotonação do substrato.

Conforme os dados obtidos, a respeito da formação de peróxido e também do estudo eletroquímico dos complexos em condições cinéticas, onde os resultados deste último encontram-se discutidos no Apêndice 1 deste trabalho, uma proposta do modo de coordenação do substrato aos complexos **C₁** e **C₂** torna-se bastante abstrato, já que por se tratar de um complexo binuclear o substrato poderia estar coordenando-se por diversas formas. Entretanto a partir dos valores de pK_{as} encontrados, pode-se inferir que inicialmente o substrato coordena-se de maneira monodentada a um dos centros metálicos, obtendo-se o primeiro aduto complexo-substrato. Já com o substrato desprotonado e coordenado aos centros metálicos, ocorre a transferência de elétrons, resultando na liberação da 3,5-DTBQ e na redução dos centros metálicos. Na sequência, o oxigênio molecular se coordena aos íons cobalto, levando a um estado intermediário (não identificado), ocorre a reoxidação dos centros de cobalto e a formação do peróxido de hidrogênio (subproduto detectado quimicamente no meio reacional) completando o ciclo catalítico (Figura 36) (OSÓRIO 2007; REY, 2008).

Figura 36 Mecanismo proposto para a oxidação do substrato 3,5-DTBC catalisada pelos compostos **C**₁ e **C**₂.



Vale frisar que esta proposta é uma suposição e por esta razão, outros estudos devem ser realizados para que se possam obter maiores esclarecimentos do mecanismo catalítico pelos complexos **C**₁ e **C**₂. Deste modo, um estudo do efeito da concentração do substrato frente ao substrato com a técnica de espectrometria de massas poderia auxiliar a elucidar de que forma ocorre a coordenação do substrato ao complexo, durante o ciclo catalítico. Outra sugestão seria a realização da síntese do complexo com a adição do substrato, dando atenção às tentativas de obtenção de monocristais destas novas espécies, pois os mesmos poderão ser analisados de forma precisa pela técnica de difração de raio-X.

Por conseguinte, a análise das constantes catalíticas comparadas a outros complexos já reportados na literatura, assim como, o estudo por outras técnicas para a determinação de um provável mecanismo, nota-se que os complexos C_1 e C_2 podem ser considerados modelos bioinspirados para a catecol oxidase.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Foram sintetizados e caracterizados por IV-ATR, RMN ^1H e espectrometria de massas dois novos ligantes N,O-doadores, L_{but} e L_{t4am} , assim como seus precursores, todos com rendimentos satisfatórios;
- ✓ Foram sintetizados dois complexos binucleares de cobalto(III) empregando-se os ligantes L_{but} e L_{t4am} . Os complexos foram caracterizados por IV, no qual foi capaz de identificar as bandas provenientes dos ligantes e dos contra-íons, por espectrometria de massa, onde foi possível identificar as espécies sintetizadas, espectroscopia eletrônica, onde atribuíram as bandas d-d e de transferência de carga, e eletroquímica, onde experimentos forneceram os valores dos potenciais redox;
- ✓ Os ensaios de reatividade dos complexos \mathbf{C}_1 e \mathbf{C}_2 frente à oxidação do substrato modelo 3,5-DTBC revelaram que esses podem ser considerados como catalisadores para as catecóis oxidases, pois possuem capacidade catalítica frente à oxidação do substrato, ambos apresentando eficiência bastante similar;
- ✓ A partir dos resultados espectroscópicos, eletroquímicos e cinéticos, foi possível estimar um ciclo catalítico para a oxidação do substrato 3,5-DTBC, catalisada pelos complexos \mathbf{C}_1 e \mathbf{C}_2 ;

7 PERSPECTIVAS

- i. Análise elementar (CHN) dos complexos **C₁** e **C₂**;
- ii. Aplicação de cálculos computacionais para melhores entendimentos da estrutura, das propriedades físico-químicas e do mecanismo da reação dos compostos sintetizados neste trabalho;
- iii. Ensaio cinéticos com variação da concentração dos complexos sobre o substrato 3,5-DTBC, a fim de elucidar o mecanismo da reação de oxidação dos complexos **C₁** e **C₂**;
- iv. Estudos cinéticos, com variação de temperatura, com o propósito de se obter a energia de ativação da reação de oxidação do substrato 3,5 – DTBC para os complexos **C₁** e **C₂**;
- v. Estudos de reatividade dos complexos **C₁** e **C₂** frente ao DNA.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHAK, J. et al. Iron(III) and Cobalt(III) Complexes with Oxalate and Phenanthroline: Synthesis, Crystal Structure, Spectroscopy Properties and Magnetic Properties. **Journal Of Superconductivity And Novel Magnetism**, v. 27, n. 7, p.1693-1700, 31 jan. 2014.

AMARAL, B. S. **Síntese quimioenzimática do levetiracetam e análogos**. 2015. 212 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

AYAD, M. I. Synthesis, characterization and catechol oxidase biomimetic catalytic activity of cobalt(II) and copper(II) complexes containing N_2O_2 donor sets of imine ligands. **Arabian Journal Of Chemistry**, p. S1297–S1306, fev. 2012.

BANU, K. S. et al. Mono- and dinuclear manganese(III) complexes showing efficient catechol oxidase activity: syntheses, characterization and spectroscopic studies. **Dalton Transactions**, n. 40, p.8755-9764, 2009

BLAY, G. et al. Chemistry and reactivity of dinuclear manganese oxamate complexes: Aerobic catechol oxidation catalyzed by high-valent bis(oxo)-bridged dimanganese(IV) complexes with a homologous series of binucleating 4,5-disubstituted-o-phenylenedioxamate ligands. **Journal Of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 250, n. 1-2, p.20-26, maio 2006.

BUCALON, D. H. **Complexos mono- e bimetálicos de cobre(II) e de cobalto(III) com bases de Schiff tridentadas e tetradentadas : Sínteses, caracterizações e estudos em reações catalíticas**. 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

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

CASTRO, K. A. D. F. et al. New copper porphyrins as functional models of catechol oxidase. **Journal Of Catalysis**, v. 344, p.303-312, dez. 2016.

CHAVES, C. C. V. **Síntese, caracterização e atividade de catecolase de complexos de cobre com ligantes tripodais**. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

CHENG, Z.; YAMAMOTO, H.; BAUER, C. E.. Cobalamin's (Vitamin B12) Surprising Function as a Photoreceptor. **Trends In Biochemical Sciences**, v. 41, n. 8, p.647-650, ago. 2016

COMBA, P. et al. Structure, Bonding, and Catecholase Mechanism of Copper Bispidine Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 17, p.9214-9225, 3 set. 2012.

COWAN, J. A.. **Inorganic biochemistry: An introduction**. 2. ed. New York: Wiley-vch, 1997. 440 p.

CUI, Y. et al. Improvement of stability of nitrile hydratase via protein fragment swapping. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 1, p.401-408, jul. 2014.

DEREVEN'KOV, I. A. et al. Redox chemistry of cobalamin and its derivatives. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 309, p.68-83, fev. 2016.

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

DEY, S. K.; MUKHERJEE, A. The synthesis, characterization and catecholase activity of dinuclear cobalt(II/III) complexes of an O-donor rich Schiff base ligand. **New Journal of Chemistry**, v. 38, n. 10, p.4985-4995, 26 ago. 2014.

FICHA de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) - Tetrafenilborato de sódio p.a.. Cotia: Merck S/a, 2015. 10 p. FISPQ de acordo com a NBR 14725-4:2014.

Disponível em:

<http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-BR-Site/pt_BR/-/BRL/ProcessMSDS-Start?PlainSKU=MDA_CHEM-106669&Origin=PDP>. Acesso em: 26 dez. 2016.

FICHA de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) - Perclorato de sódio monohidratado. Cotia: Merk S/a, 2016. 15 p. FISPQ De acordo com a NBR 14725-4:2014.

Disponível em:

<http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-BR-Site/pt_BR/-/BRL/ProcessMSDS-Start?PlainSKU=MDA_CHEM-106564&Origin=PDP>. Acesso em: 26 dez. 2016.

FRIEDLE, S.; REISNER, E.; LIPPARD, S. J. Current challenges of modeling diiron enzyme active sites for dioxygen activation by biomimetic synthetic complexes. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 8, p.2768-2779, 2010.

GAO, J. et al. Formation of cross-linked nitrile hydratase aggregates in the pores of tannic-acid-templated magnetic mesoporous silica: Characterization and catalytic application. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p.92-101, jan. 2017.

GEARY, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p.81-122, out. 1971.

GERDEMANN, C.; EICKEN, C.; KREBS, B. The Crystal Structure of Catechol Oxidase: New Insight into the Function of Type-3 Copper Proteins. **Accounts Of Chemical Research**, v. 35, n. 3, p.183-191, mar. 2002.

GRUBER, K.; PUFFER, B.; KRÄUTLER, B. Vitamin B12-derivatives—enzyme cofactors and ligands of proteins and nucleic acids. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 8, p.4346-4363, 2011.

HARTINGER, C. G.; DYSON, P. J. Bioorganometallic chemistry—from teaching paradigms to medicinal applications. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p.391-401, 2009.

HAZARI, A. et al. Unprecedented structural variations in trinuclear mixed valence Co(II/III) complexes: theoretical studies, pnictogen bonding interactions and catecholase-like activities. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 8, p.3862-3876, 2015.

HEWITT, S. H.; WILSON, A. J. Metal complexes as “protein surface mimetics”. **Chemical Communications**, v. 52, n. 63, p.9745-9756, 2016.

HEYING, R. S. **Síntese, caracterização e atividade diesterase de novos modelos biomiméticos com efeitos de segunda esfera de coordenação para fosfatases ácidas púrpuras**. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

HUGHES, M. N. **The Inorganic chemistry of biological processes**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1981. 338 p.

HUHEEY, J. E. **Inorganic chemistry: principles of structure and reactivity**. 3. ed. Cambridge: Harper International SI Edition, 1983. 936 p.

JANA, A. et al. Structures, Magnetochemistry, Spectroscopy, Theoretical Study, and Catechol Oxidase Activity of Dinuclear and Dimer-of-Dinuclear Mixed-Valence MnIIIMnIIComplexes Derived from a Macrocyclic Ligand. **Inorganic Chemistry**, v. 52, n. 13, p.7732-7746, jul. 2013.

KAIZER, J. et al. Synthesis, properties, and catecholase-like activity of the [1,4-di(6'-methyl-2'-pyridyl)aminophthalazine]dimanganese(II) complex, $Mn_2(6'Me_2PAP)_2Cl_4$. **Transition Metal Chemistry**, v. 32, n. 8, p.1047-1050, 21 ago. 2007.

KARIPCIN, F. et al. Mono-, trinuclear nickel(II) and copper(II) dioxime complexes: synthesis, characterization, catecholase and catalase-like activities, dna cleavage studies. **Journal Of The Chilean Chemical Society**, v. 59, n. 3, p.2539-2544, set. 2014.

KHOSHESAB, Z. M. **Reflectance IR Spectroscopy. In: INFRARED Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology.** Intech, 2012. Cap. 11. p. 233-244. ISBN 978-953-51-0537-4.

KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, S. Cobalt proteins. **European Journal Of Biochemistry**, v. 261, n. 1, p.1-9, 19 mar. 1999.

KOVACS, J, A. Synthetic Analogues of Cysteinate-Ligated Non-Heme Iron and Non-Corrinoid Cobalt Enzymes. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 2, p.825-848, fev. 2004

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

KRÄUTLER, B. Vitamin B 12: chemistry and biochemistry. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 4, p.806-810, 1 ago. 2005.

LICHTY, J. et al. Synthesis and characterization of the cobalt(III) complexes of two pendant-arm cross-bridged cyclams. **Inorganica Chimica Acta**, v. 357, n. 2, p.615-618, 30 jan. 2004.

MACDONALD, C. A.; BOYD, R. J. Competing nitrile hydratase catalytic mechanisms: Is cysteine-sulfenic acid acting as a nucleophile?. **Computational And Theoretical Chemistry**, v. 1070, p.48-54, out. 2015.

MAIA, P. J. S. **Síntese, Caracterização e Estudos Biológicos de Complexos de Co(III) como Possíveis Metalofármacos Antitumorais**. 2012. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012

MAJUMDER, S. et al. Dinuclear mixed-valence $\text{Co}^{\text{III}}\text{Co}^{\text{II}}$ complexes derived from a macrocyclic ligand: unique example of a $\text{Co}^{\text{III}}\text{Co}^{\text{II}}$ complex showing catecholase activity. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 13, p.4561-4569, 2013.

MARTINEZ, S. et al. A cobalt-containing eukaryotic nitrile hydratase. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**, v. 1865, n. 1, p.107-112, jan. 2017.

MATTHEWS, R. G. Cobalamin-Dependent Methyltransferases. **Accounts Of Chemical Research**, v. 34, n. 8, p.681-689, ago. 2001.

MEISSLER, G. L.; FISCHER, P. J.; TARR, D. A. **Química inorgânica**. 5. ed. São Paulo: Pearson, 2014. 649 p.

MITRA, M.; RAGHAVAIHAH, P.; GHOSH, R. A mononuclear cobalt(III) complex and its catecholase activity. **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 1, p.200-205, 2015.

MITRA, S.; HOLZ, R. C. Unraveling the Catalytic Mechanism of Nitrile Hydratases. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 282, n. 10, p.7397-7404, 20 dez. 2006.

MONZANI, E. et al. Mechanistic, Structural, and Spectroscopic Studies on the Catecholase Activity of a Dinuclear Copper Complex by Dioxygen. **Inorganic Chemistry**, v. 38, n. 23, p.5359-5369, nov. 1999.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry**. 6. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009. 424 p.

NEVES, A. et al. Catalytic promiscuity: catecholase-like activity and hydrolytic DNA cleavage promoted by a mixed-valence FeIII/FeII complex. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 7, p.1201-1212, 2010.

NEVES, A. et al. Catecholase Activity of a Series of Dicopper(II) Complexes with Variable Cu–OH(phenol) Moieties. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 7, p.1788-1794, abr. 2002.

OKAMOTO, S.; ELTIS, L. D.. The biological occurrence and trafficking of cobalt. **Metallomics**, v. 3, n. 10, p.963-970, 2011.

OLIVEIRA, J. A. F. **Oxidação de catecóis promovida por complexos binucleares de cobre(II): catálise homogênea e heterogênea**. 2013. 136 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

OLIVEIRA, T. V. **Desenvolvimento de um novo complexo de cobre(ii) para atividade de catecolase**. 2015. 63 f. TCC (Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

OSÓRIO, R. E. H. M B. et al. Synthesis, structure, magnetism, and hydrolase and catecholase activity of a new trinuclear copper(II) complex. **Inorganica Chimica Acta**, v. 435, p.153-158, ago. 2015.

OSÓRIO, R. E. H. M B. **Novos ligantes e complexos binucleares de cobre(II) promíscuos: modelos miméticos para as enzimas catecol oxidase e hidrolases/nucleases sintéticas.** 2007. 135 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PAVIA, D. L. et al. **Introduction to spectroscopy.** 4. ed. Belmont: Cengage Learning, 2009. 657 p.

PAYNE, M. S. et al. A Stereoselective Cobalt-Containing Nitrile Hydratase. **Biochemistry**, v. 36, n. 18, p.5447-5454, maio 1997.

PRASAD, S.; BHALLA, T. C. Nitrile hydratases (NHases): At the interface of academia and industry. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p.725-741, nov. 2010.

PROINSIAS, K. Ó.; GIEDYK, M.; GRYKO, D. Vitamin B12: chemical modifications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 16, p.6605-6619, 2013.

RALPH, S. F. et al. An electrospray mass spectrometry study of some metal-ion cage complexes. **Journal Of The Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 23, p.4417-4424, 1996.

REY, N. A. **Novos Ligantes Binucleantes e seus Complexos Metálicos do tipo $CuII-(u-OH)-CuII$: 1) Modelos Estruturais para o Sítio Ativo das Catecol Oxidases e 2) Análogos Sintéticos com Atividade Redox e/ou Hidrolítica.** 2008. 200 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

ROLFF, M. et al. Copper- O_2 reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: molecular mechanism and comparison with the enzyme. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 7, p.4077-4098, 2011.

ROMANOWSKI, S. M. M.; MANGRICH, A. S.; NEVES, A.. Síntese e caracterização de novos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes não-simétricos N,O-doadores: contribuições para o sítio ativo da galactose oxidase. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p.592-598, out. 2001.

SALEHI, M.; HASANZADEH, M. Characterization, crystal structures, electrochemical and antibacterial studies of four new binuclear cobalt(III) complexes derived from o-aminobenzyl alcohol. **Inorganica Chimica Acta**, v. 426, p.6-14, fev. 2015.

SHEARER, J. et al. Why Is There an “Inert” Metal Center in the Active Site of Nitrile Hydratase? Reactivity and Ligand Dissociation from a Five-Coordinate Co(III) Nitrile Hydratase Model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 3, p.463-468, jan. 2001.

SHONGWE, M. S. et al. Complexes of cobalt(III) with phenolate-containing polydentate ligands and bovine serum apo-transferrin: towards creating spectroscopic models for cobalt(III)–tyrosinate interactions. **Dalton Transactions**, n. 21, p.4064-4069, 2002.

SILVA, M. P. **Síntese, caracterização e estudos cinéticos de complexos de cobre(II) com ligantes triazínicos como modelos biomiméticos da metaloenzima catecol oxidase**. 2014. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Ltc, 2006. 490 p.

SIMÁNDI, L. I. et al. Catalytic activation of dioxygen by oximatocobalt(II) and oximatoiron(II) complexes for catecholase-mimetic oxidations of o-substituted phenols. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 245, n. 1-2, p.85-93, out. 2003.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2006. 999p.

SOLOMON, E. I. et al. Copper Active Sites in Biology. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 7, p.3659-3853, 9 abr. 2014.

SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKIN, T. E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p.2563-2606, jan. 1996.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p.81-89, jan. 2003.

SOUZA, E. T. et al. A series of mononuclear Co(III) complexes using tridentate N,O-donor ligands: Chemical properties and cytotoxicity activity. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 12, p.1767-1773, dez. 2011.

SOUZA, E. T. et al. Synthesis, characterization and biological activities of mononuclear Co(III) complexes as potential bioreductively activated prodrugs. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 10, p.1355-1365, out. 2009.

SOUZA, R. J. **Síntese, caracterização e avaliação da promiscuidade catalítica de complexos binucleares bioinspirados**. 2010. 108 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

TORELLI, S. et al. PH-Controlled Change of the Metal Coordination in a Dicopper(II) Complex of the Ligand H-BPMP: Crystal Structures, Magnetic Properties, and Catecholase Activity. **Inorganic Chemistry**, v. 39, n. 16, p.3526-3536, ago. 2000.

VALDEZ, C. E. et al. Mysteries of Metals in Metalloenzymes. **Accounts Of Chemical Research**, v. 47, n. 10, p.3110-3117, 21 out. 2014.

VAN P. S. et al. Probing the enantioselectivity of a diverse group of purified cobalt-centred nitrile hydratases. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 8, p.3011-3019, 2011.

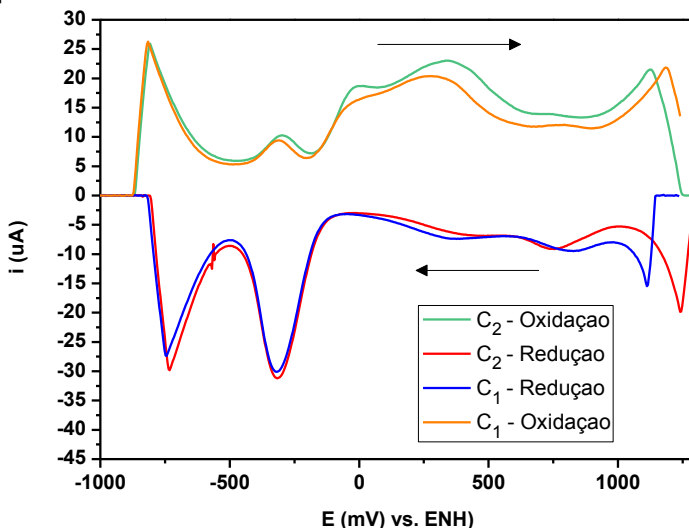
ZELDER, F.; ZHOU, K.; SONNAY, M. Peptide B 12: emerging trends at the interface of inorganic chemistry, chemical biology and medicine. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 4, p.854-862, 2013.

APÊNDICE

Estudo eletroquímico dos complexos C_1 e C_2 em condições cinéticas.

O comportamento eletroquímico dos complexos foi investigado através da técnica de voltametria de onda quadrada em solução MeOH/H₂O, em pH 9 (tampão TRIS) na presença do substrato modelo 3,5-DTBC. Os potenciais foram referenciados ao eletrodo normal de hidrogênio (ENH) e o voltamograma obtido para os complexos é apresentado na Figura 39.

Figura 1 Voltamogramas de onda quadrada (pulso = 20 mV, frequência = 15 Hz) dos complexos C_1 e C_2 em condições cinéticas, pH 9,0 tampão TRIS. [Complexo] = $3,55 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; [3,5-DTBC] = $3,78 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; [tampão] = $2,94 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo; Referência: Ag/AgCl; Auxiliar: Platina; Eletrólito suporte: LiClO₄ 0,05 mol L⁻¹ e padrão interno: Ferroceno.



Como observado na figura 39 os complexos C_1 e C_2 apresentam um comportamento similar na reação de oxidação do substrato modelo 3,5-DTBC frente à técnica de voltametria de onda quadrada. Na parte catódica, observa-se uma onda de redução em -315 mV; 748 mV e -315 mV; -730 mV vs. ENH para os complexos C_1 e C_2 respectivamente, e da mesma maneira,

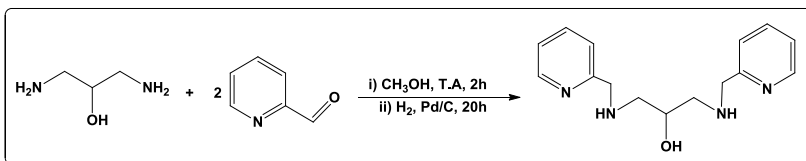
nota-se uma onda de oxidação em -820 mV; -300 mV vs. ENH para ambos os complexos, referindo estas ao processo de redução do Co(III) Co(II), entretanto estes valores diferem ao processo de voltametria de onda quadrada do complexos. Ao que indica, os valores de E_{pc} podem ser atribuídos a coordenação do substrato ao centro metálico, ou seja, uma transferência de elétrons resultando na formação da quinona/semiquinona e também na redução dos centros metálicos.

Na parte anódica, os valores de E_{pa} podem estar relacionados ao processo de oxidação da espécie gerada no processo de redução, assim como o processo de formação de H_2O_2 a partir da presença do O_2 . Já os valores de $E_{pa} > 1000$ Mv vs. ENH podem ser atribuídos ao processo de oxidação do fenolato, presente no ligante. De certa modo, o estudo de voltametria cíclica em nas condições cinéticas, trás informações relevantes a respeito da reatividade dos complexos frente a reação de oxidação do substrato modelo 3,5-DTBC.

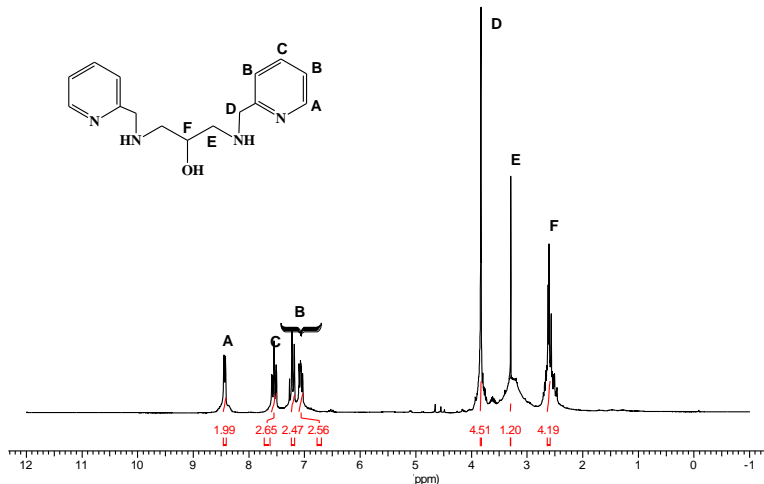
ANEXOS

1) SÍNTESE DO PRECURSOR N,N'-(2-PIRIDILMETIL)-1,3-PROPANO-2-OL - 2py.

O 2py foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito na literatura (OSÓRIO et al., 2015).

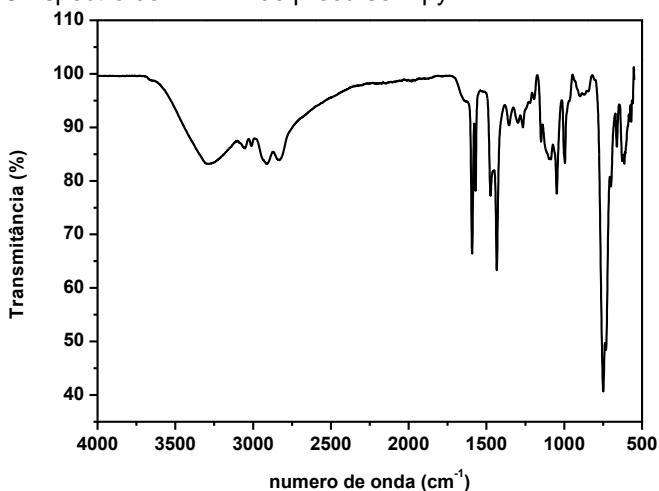


Sob banho de gelo, 3,60 g de 2-hidróxi-1,3-diaminopropano destilado (40 mmol; 90,12 g mol⁻¹) foi dissolvido em 100 mL de metanol. Sob este sistema, foi gotejado lentamente uma solução metanólica contendo 7,60 mL de 2-piridínicarboxaldeído destilado (80 mmol; 107,11 g mol⁻¹; 1,126 g mL⁻¹). As duas soluções quando misturadas, resultaram em uma solução amarelo pálido, a qual permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por 2 horas. A solução resultante foi então transferida para a garrafa de hidrogenação e adicionou-se 0,9 g de Pd/C 5%. O sistema foi hidrogenado por 20 horas, filtrado sob celite e o solvente foi evaporado em rotaevaporador, resultando em pó. Obtiveram-se 9,2 g do produto simétrico 2-py (16,52 mmol; 272,35 g mol⁻¹), com rendimento de 84 % em relação ao 2-hidróxi-1,3-diaminopropano.

Figura 2 Espectro de RMN ^1H (200 MHz) do precursor 2py em CDCl_3 .

RMN ^1H - δ (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,4-2,7 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 3,3 (m, 1H, CH); 3,7-3,9 (m, 4H, CH_2); 6,9-7,1 (m, 2H, CH_{ar}); 7,15-7,3 (m, 2H, CH_{ar}); 7,4-7,6 (m, 2H, CH_{ar}); 8,4 (d, 2H, CH_{ar}).

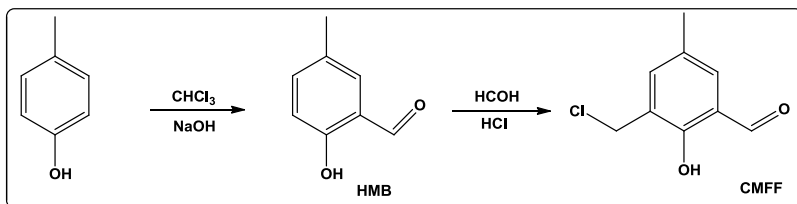
Figura 3 Espectro de IV-ATR do precursor 2py.



IV-ATR, em cm^{-1} : 3288 ($\nu_{\text{O-H}}$ álcool ponte); 2917 – 2835 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático e $\nu_{\text{C-H}}$ alifático); 2912 - 2830 ($\nu_{\text{N-H}}$); 1590-1475 ($\nu_{\text{C=C}}$ e $\nu_{\text{C=N}}$ aromático); 1570 ($\delta_{\text{N-H}}$ amina secundária). 992 ($\delta_{\text{C-H}}$ aromático); 741 ($\delta_{\text{C-H}}$ piridina).

2) SÍNTESE DO PRECURSOR 2-CLOROMETIL-4-METIL-6-FORMILFENOL – CMFF

O CMFF foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito na literatura (SOUZA, 2010).

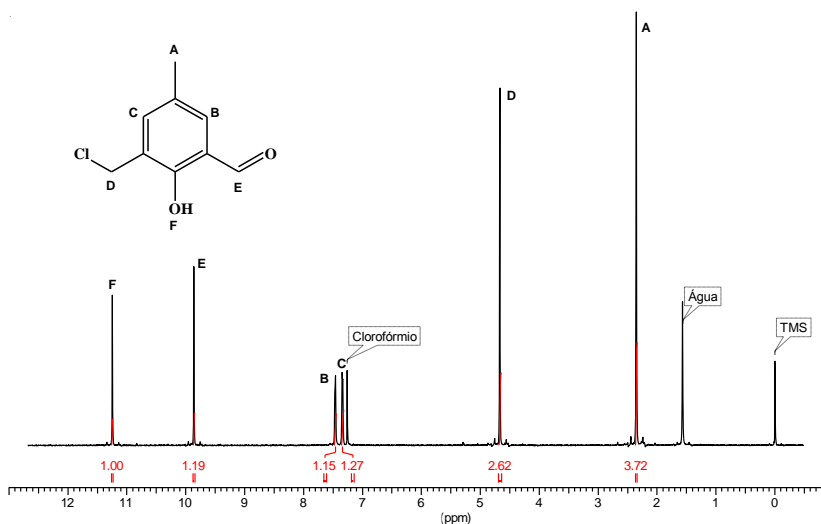


Primeira Etapa - preparação do 2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (HMB): A síntese do HMB se dá através de uma reação de formilação do p-cresol. Em um balão de 3 bocas de 5000 mL, equipado com um agitador mecânico e um condensador, adicionou-se o p-cresol (21,6 g, 200 mmol, $108,14 \text{ g mol}^{-1}$) em 1,5 L de clorofórmio. A solução foi mantida sob agitação com temperatura controlada entre $56 - 60 \text{ }^\circ\text{C}$ com um banho. Iniciou-se então a adição de NaOH (60 g, $1,5 \text{ mmol}$, $40,00 \text{ g mol}^{-1}$), solubilizado em 100 mL de água destilada, em pequenas porções durante 3 horas. A reação foi mantida por mais uma hora e então deixou-se o sistema resfriar a temperatura ambiente. Adicionou-se aproximadamente 500 mL de água destilada e, sob agitação, acidificou-se com HCl concentrado até $\text{pH} = 2$. A fase orgânica foi separada, lavada com água destilada, seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente foi retirado à pressão reduzida. O produto foi então destilado à pressão reduzida. Obteve-se o HMB como um sólido amarelo pálido. O sólido foi solubilizado em um mínimo de diclorometano e purificado com coluna cromatográfica em sílica, utilizando diclorometano como eluente. O solvente foi retirado à pressão reduzida e obteve-se um sólido cristalino.

Segunda Etapa - síntese do CMFF: Em um balão de 500 mL adicionou-se o HMB (6,4 g, 47 mmol, $136,15 \text{ g mol}^{-1}$), formaldeído 37% (3,81 g, 94 mmol) e ácido clorídrico concentrado (25 mL). O sistema foi mantido sob refluxo e agitação por 30 minutos e, na sequência, resfriado a $0 \text{ }^\circ\text{C}$, formando um precipitado compacto no fundo do balão, que foi

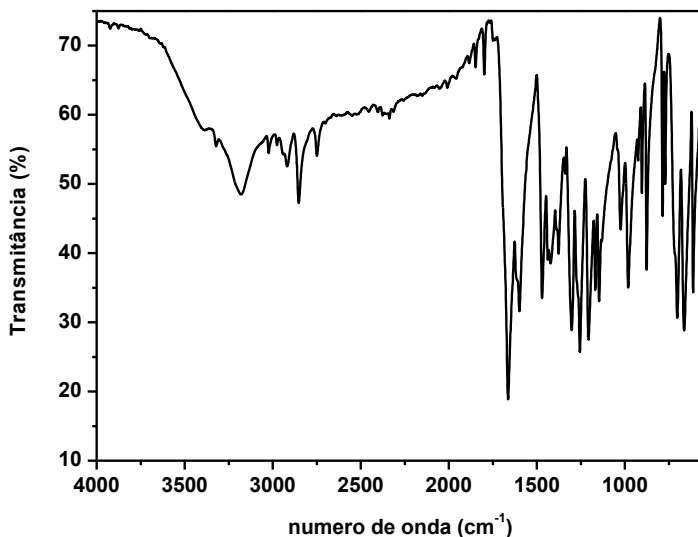
triturado, filtrado sob vácuo e recristalizado a quente em diclorometano. Obteve-se um sólido branco, que foi deixado no dessecador com sílica sob vácuo para secar. P.F.: 94-96 ° C com rendimento de 85% (7,4 g, 40 mmol, 184,62 g mol⁻¹) em relação ao HMB.

Figura 4 Espectro de RMN ¹H (200 MHz) do precursor CMFF em CDCl₃.



RMN ¹H - δ (200 MHz; CDCl₃), em ppm: 2,35 (s, 3H, CH₃); 4,67 (s, 2H, CH₂); 7,35 (s, 1H, CH_{ar}); 7,46 (s, 1H, CH_{ar}); 9,86 (s, 1H, CH_{ald}); 11,25 (s, 1H, OH_{fenol}).

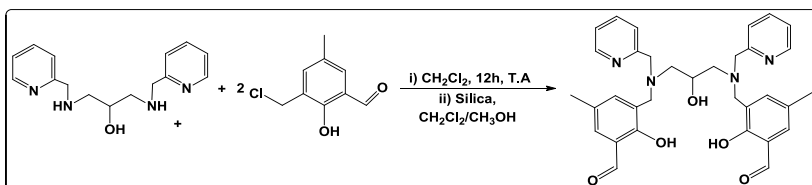
Figura 5 Espectro de IV-ATR do precursor CMFF.



IV-ATR em cm^{-1} : 3028-2850 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático e $\nu_{\text{C-H}}$ alifático); 2747 ($\nu_{\text{C-H}}$ aldeído); 1664 ($\nu_{\text{C=O}}$); 1597-1467 ($\nu_{\text{C=C}}$); 1380 ($\delta_{\text{O-H}}$ fenol); 1255 ($\nu_{\text{C-O}}$ fenol); 700 ($\delta_{\text{C-H}}$ aromático); 611 ($\nu_{\text{C-Cl}}$).

3) SÍNTESE DO LIGANTE N,N'-BIS-(2-PIRIDILMETIL)-(2-HIDRÓXI-3-CARBONIL-5-METILBENZIL)- 1,3-PROPANO-2OL – $L_{2\text{pyald}}$

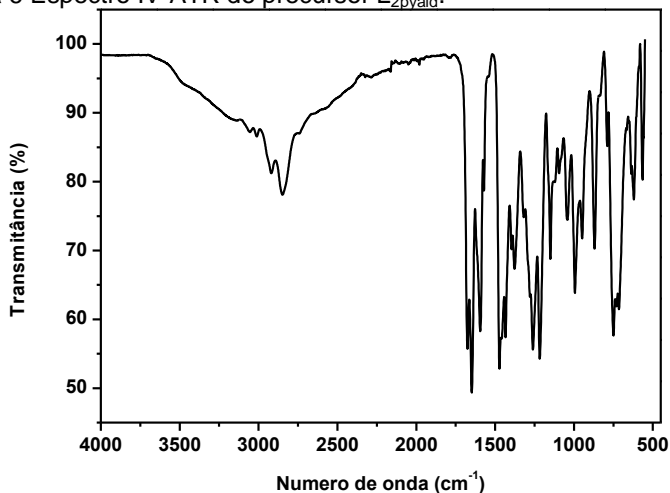
O $L_{2\text{pyald}}$ foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito na literatura (OSÓRIO et al., 2015).



Em um balão de 250 mL adicionou-se 4,10 g do precursor 2py (15 mmol; $272,35 \text{ g mol}^{-1}$) previamente dissolvido em 30 mL de CH_2Cl_2 . O precursor CMFF (5,56 g; 30 mmol; $185,62 \text{ g mol}^{-1}$), foi solubilizado em CH_2Cl_2 (solução incolor) e

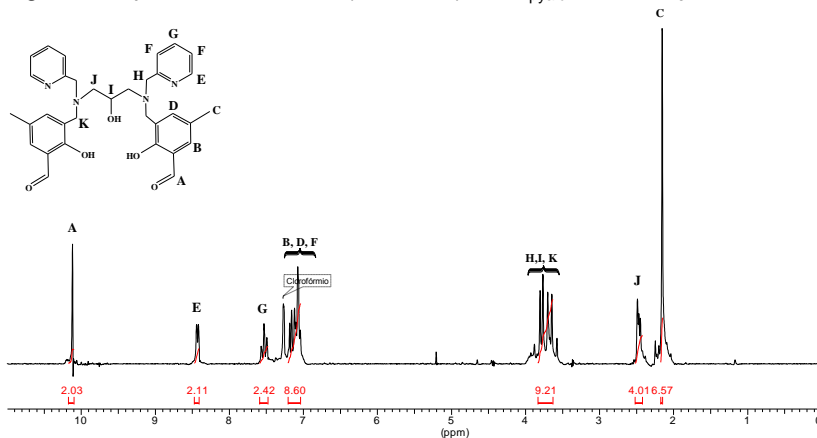
gotejado lentamente sobre a amina (2py). A solução final tornou-se amarela intensa turva, e permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por 12 horas. Procedeu-se então a extração com solução aquosa saturada de carbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e o solvente removido por rotaevaporação. O produto final foi purificado através de coluna cromatográfica de sílica gel, passando primeiro somente CH_2Cl_2 até sair bem o amarelo intenso, que trata-se do excesso de CMFF que não reagiu, e posteriormente passa-se CH_3OH para retirar o produto de interesse da coluna. Obtiveram-se 6,5 g do ligante final 2pyald (6,15 mmol; $568,67 \text{ g mol}^{-1}$), com rendimento de 76 % em relação ao simétrico 2py.

Figura 6 Espectro IV-ATR do precursor $\text{L}_{2\text{pyald}}$.



IV-ATR, em cm^{-1} : 3180 ($\nu_{\text{O-H}}$ álcool ponte); 2920 – 2851 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático e $\nu_{\text{C-H}}$ alifático); 1674-1647 ($\nu_{\text{C=O}}$); 1596-1474 ($\nu_{\text{C=C}}$ e $\nu_{\text{C=N}}$ aromático); 1377 ($\nu_{\text{O-H}}$ fenol); 1260-1216 ($\nu_{\text{C-O}}$); 994 ($\delta_{\text{C-H}}$ aromático); 749 ($\delta_{\text{C-H}}$ piridina).

Figura 7 Espectro de RMN ^1H (200 MHz) do $\text{L}_{2\text{pyald}}$ em CDCl_3



RMN ^1H - δ (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,15 (s, 6H, CH_3); 2,4-2,6 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 3,6-4,0 (m, 9H, 8- CH_2 e 1 CH); 7,0-7,2 (m, 8H, CH_{ar}); 7,5-7,6 (m, 2H, CH_{ar}); 8,4 (d, 2H, CH_{ar}); 10,1 (s, 2H, COH).