

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

**ESTUDOS DOS EQUILÍBRIOS DE FORMAÇÃO DE COMPLEXOS  
TERNÁRIOS FORMADOS ENTRE O 1,4,7,13,16,19-HEXAZA-10,22-  
DIOXACICLOTETRACOSANO (OBISDIEN) E OS SISTEMAS Cu(II)-  
DIPEPTÍDEOS E Zn(II)-DIPEPTÍDEOS.  
HIDRÓLISE E DEUTERAÇÃO DA GLICILGLICINA.**

**MARILDE TEREZINHA BORDIGNON LUIZ**

**Tese Submetida à Universidade Federal de Santa Catarina  
para obtenção de grau de**

**Doutora em Química**

**1996**

**ESTUDOS DOS EQUILÍBRIOS DE FORMAÇÃO DE COMPLEXOS TERNÁRIOS FORMADOS ENTRE O 1,4,7,13,16,19-HEXAZA-10-22-DIOXACICLO TETRACOSANO (OBISDIEN) E OS SISTEMAS Cu(II)-DIPEPTÍDEOS E Zn(II)-DIPEPTÍDEOS. HIDRÓLISE E DEUTERAÇÃO DA GLICILGLICINA.**

**MARILDE TEREZINHA BORDIGNON LUIZ**

Esta tese foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador e membros da banca examinadora

  
Prof. Dr. Bruno Szpoganicz  
Orientador

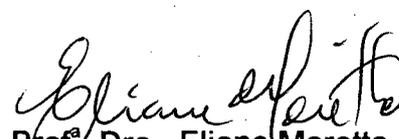
  
Prof. Dr. Adilson José Curtius  
Coordenador

Banca Examinadora :

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Marcela Rizzotto  
UNR - Rosario - Argentina

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Marcia Martinelli  
UFRGS - Rio Grande do Sul

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Marta de Souza Sierra  
UFSC - Santa Catarina

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliane Moretto  
UFSC - Santa Catarina

  
Prof. Dr. Bruno Szpoganicz  
UFSC - Santa Catarina

*Ao Jorge e nossas amadas filhas  
Fernanda e Beatriz,  
que lado a lado comigo caminharam  
nos tempos de chuva e de sol.*

## **AGRADECIMENTOS**

- Ao Prof. Dr. Bruno Szpoganicz, por sua orientação, apoio e amizade.
- Ao Prof. Dr. Arthur E. Martell, Departamento de Química da Texas A&M University, pela doação do ligante macrocíclico OBISDIEN e pelas sugestões apresentadas.
- A Prof. Dra. Marcela Rizzotto pela contribuição dada a esse trabalho.
- A banca examinadora.
- A todos que diretamente ou indiretamente, por atos ou pensamentos, incentivaram e colaboraram para que eu concluísse este trabalho com êxito.
- Aos meus pais Severino (in memorium) e Elma que incentivaram-me e rezaram, para que com persistência e dedicação eu pudesse ter forças para prosseguir e vencer.
- A DEUS.

# ÍNDICE GERAL

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO

1.1. Hidrólise de Peptídeos e Amidas	1
1.2. Hidrólise Enzimática	3
1.3. Complexos Macrocíclicos	09
1.3.1. Macrocíclico, 1,4,7,13,16,19-hexaza-10,22-dioxacicotetracosano OBISDIEN	12
1.4. Reações Modelos	24

## CAPÍTULO 2

### 2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Material	29
2.2. Medidas Potenciométricas	29
2.2.1. Procedimentos	31
2.2.2. Cálculos Computacionais	31
2.3. Medidas cinéticas	31
2.4. Caracterização do produto da hidrólise da glicilglicina catalisada pelo complexo Cu(II)-OBISDIEN	32
2.5. Medidas de UV-Vis	32

## CAPÍTULO 3

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

<b>3.1. Estudos de Equilíbrio Potenciométrico dos Sistemas OBISDIEN-Cu(II)-Peptídeos (glicilglicina, di-alanil-di-alanina e glicil-l-leucina)</b>	<b>33</b>
<b>3.1.1. Sistema Formado pelas Espécies Glicilglicina-Cu(II)-OBISDIEN</b>	<b>44</b>
<b>3.1.2. Sistema Formado pelas Espécies di-Alanil-di-alanina-Cu(II)-OBISDIEN</b>	<b>51</b>
<b>3.1.3. Sistema Formado pelas Espécies Glicil-l-leucina-Cu(II)-OBISDIEN</b>	<b>55</b>
<b>3.2. Estudos de Equilíbrio Potenciométrico dos Sistemas OBISDIEN-Zn(II)-Peptídeos (Glicilglicina, di-alanil-di-alanina e glicil-l-leucina)</b>	<b>60</b>
<b>3.2.1. Sistema Formado pelas Espécies Glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN</b>	<b>66</b>
<b>3.2.2. Sistema Formado pelas Espécies di-Alanil-di-alanina-Zn(II)-OBISDIEN</b>	<b>73</b>
<b>3.2.3. Sistema Formado pelas Espécies Glicil-l-leucina-Zn(II)-OBISDIEN</b>	<b>73</b>
<b>3.3. Estudos Cinéticos das Reações de Hidrólise e Deuteração do Dipeptídeo Glicilglicina Catalisadas pelo Complexo Binuclear Zn(II)- OBISDIEN</b>	<b>75</b>

## **CAPÍTULO 4**

<b>4. CONCLUSÕES</b>	<b>93</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>95</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Intermediário tetraédrico proposto para o mecanismo promovido pela água. 04
- Figura 2.** Sítio ativo da Carboxipeptidase A com um inibidor ligado, mostrado por uma representação convencional de palitos. Importantes aminoácidos constituintes são numerados por seus números de sequência Glu-270, Arg-127, Arg-145, Tir-248. O inibidor, colorido de azul claro, é a forma cetônica hidratada do substrato t-butoxicarbonil-l-fenilalanil-l-fenilalanina. 06
- Figura 3.** Mecanismo proposto para a hidrólise de ligação peptídica catalisada pela carboxipeptidase A. 07
- Figura 4.** Curvas de distribuição das espécies de uma solução contendo OBISDIEN  $2,0 \times 10^{-3}$  M em função de  $-\log[H^+]$  sob condições anaeróbicas. L é o ligante OBISDIEN desprotonado e HL, H<sub>2</sub>L, H<sub>4</sub>L, H<sub>5</sub>L, H<sub>6</sub>L, são as formas mono- di-, tri-, tetra-, penta- e hexaprotionada do OBISDIEN. H<sub>3</sub>LBr, H<sub>4</sub>LBr, H<sub>5</sub>LBr e H<sub>6</sub>LBr são as espécies tri-, tetra-, penta- e hexaprotionada do ligante com íon brometo em sua cavidade. 14
- Figura 5.** Disposições espaciais de baixa energia para o complexo dicobre(II) OBISDIEN gerado por cálculos MM, usando o programa SYBYL. 18
- Figura 6.** Estrutura provável do complexo pirofosfato-dicobre(II)-OBISDIEN, gerado por cálculo de mecânica molecular, usando o programa SYBYL. 19

- Figura 7.** Estrutura do cátion  $[Zn_2(bbap)H_2O(\mu Obz)^{2+}$ , distância entre  $Zn_1$  e  $Zn_2$  igual a 3,443Å. 26
- Figura 8.** Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema glicilglicina-Cu(II)-OBISDIEN a  $25,00 \pm 0,05$  °C e  $\mu = 0,100M$  (KCl). A - 0,103 mmol de glicilglicina em 50,00 ml de solução; B - 0,1134 mmol de glicilglicina e 0,10145 mmol de Cu(II) em 50,00 ml de solução; C - 0,1019 mmol de OBISDIEN em 50,00 ml de solução; D - 0,1019 mmol de OBISDIEN e 0,1826 mmol de Cu(II) em 65,80 ml de solução; E - 0,1019 mmol de OBISDIEN, 0,1826 mmol de Cu(II) e 0,11189 mmol de glicilglicina em 75,95 ml de solução (a = moles de KOH por mol de ligante). 34
- Figura 9.** Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema dl-alanil-dl-alanina- Cu(II)-OBISDIEN a  $25,00 \pm 0,05$  °C e  $\mu = 0,100M$  (KCl). A - 0,11207 mmol de dl-alanil-dl-alanina em 50,00 ml de solução; B - 0,1134 mmol de dl-alanil-dl-alanina e 0,10145 mmol de Cu(II) em 50,00 ml de solução; C - 0,0208 mmol de OBISDIEN em 50,00 ml de solução; D- 0,1019 mmol de OBISDIEN e 0,1826 mmol de Cu(II) em 65,80 ml de solução; E - 0,10208 mmol de OBISDEN, 0,2029 mmol de Cu(II) e 0,11511 mmol de dl-alanil-dl-alanina em 56,4 ml de solução (a = moles de KOH por mol de ligante). 35
- Figura 10.** Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema glicil-l-leucina-Cu(II)-OBISDIEN a  $25,00 \pm 0,05$  °C,  $\mu = 0,100M$  (KCl). A - 0,09833 mmol de glicil-l-leucina em 50,00 ml de solução; B - 0,1142 mmol de glicil-l-leucina e 0,10145 mmol de Cu(II) em 51,00 ml de solução; C - 0,09938 mmol de OBISDIEN em 50,00 ml de solução; D- 0,11436 mmol de OBISDIEN e 0,20209 mmol de Cu(II) em 65,80 ml de solução; E - 0,9938 mmol de OBISDEN,

0,20209 mmol de Cu(II) e 0,09882 mmol de glicil-l-leucina em 78,83 ml de solução (a = moles de KOH por mol de ligante). 36

**Figura 11.** Curvas de distribuição das espécies do sistema glicilglicina-Cu(II)-OBISDIEN 1:2:1 em função de  $-\log[H^+]$  para uma solução inicialmente contendo OBISDIEN  $1,00 \times 10^{-3}$  M, Cu(II)  $2,00 \times 10^{-3}$  M, glicilglicina  $1,00 \times 10^{-3}$  M, em função de  $-\log [H^+]$ , onde  $LCu_2P^{3+}$ ,  $HLCu_2P^{4+}$ ,  $LCu_2H_{-1}P^{2+}$  e  $LCu_2(OH)H_{-1}P^+$  e  $LCu_2(OH)_2H_{-1}P$  são as espécies não-protonada, monoprotionada, amida desprotonada e hidróxidas do complexo glicilglicina-Cu(II)-OBISDIEN. O íon  $Cu^{2+}$  é o íon livre aquoso Cu(II).  $T = 25,00 \pm 0,05^\circ C$  e  $\mu = 0,100M$  (KCl). % = porcentagem do  $\Sigma [OBISDIEN] = 100\%$ . Somente as espécies peptídeo-Cu(II) - OBISDIEN são mostradas. 48

**Figura 12.** Espectros de UV-Vis de uma solução contendo glicilglicina  $1,02 \times 10^{-3}$  M, Cu(II)  $2,02 \times 10^{-3}M$  e OBISDIEN  $1,05 \times 10^{-3}$  M, e nos seguintes valores de p[H] A = 4,18 ; B = 6,37 ; C = 8,51 ; D = 10,35 ; E = 11,31 e F =  $Cu(NO_3)_2$  ;  $T = 25,00 \pm 0,05^\circ C$  e  $\mu = 0,100M$  (KCl). 49

**Figura 13.** Curvas de distribuição de espécies do sistema 1:2:1 dl-alanil-dl-alanina-Cu(II)-OBISDIEN em função de  $-\log [H^+]$  para uma solução inicialmente contendo OBISDIEN  $1,00 \times 10^{-3}M$ , Cu(II)  $2,00 \times 10^{-3}$  M e dl-alanil-dl- alanina  $1,00 \times 10^{-3}$  M, em função de  $-\log [H^+]$ , onde  $LCu_2P^{3+}$ ,  $HLCu_2P^{4+}$ ,  $LCu_2H_{-1}P^{2+}$ ,  $LCu_2(OH)H_{-1}P^+$  são as espécies não-protonada, monoprotionada, amida desprotonada e hidróxidas do sistema dl-alanil-dl-alanina-Cu(II)-OBISDIEN. O íon  $Cu^{2+}$  é o íon livre aquoso Cu(II).  $T = 25,00 \pm 0,05^\circ C$  e  $\mu = 0,100M$  (KCl). % = porcentagem do  $\Sigma [OBISDIEN] = 100\%$ . Somente espécies peptídeo-Cu(II) -OBISDIEN são mostradas. 52

**Figura 14.** Espectros de UV-Vis de uma solução contendo dl-alanil-dl-alanina  $1,00 \times 10^{-3}$  M, Cu(II)  $2,02 \times 10^{-3}$  M e OBISDIEN  $1,05 \times 10^{-3}$  M, e nos seguintes valores de pH: A = 4,27 ; B = 6,27 ; C = 8,39 ; D = 10,41; E = 11,26 e F =  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  ; T =  $25,00 \pm 0,05$  °C e  $\mu = 0,100$  M (KCl).

53

**Figura 15.** Curvas de distribuição de espécies do sistema 1:2:1 glicil-l-leucina-Cu(II)-OBISDIEN em função de  $-\log[\text{H}^+]$  para uma solução inicialmente contendo OBISDIEN  $1,00 \times 10^{-3}$  M, Cu(II)  $2,00 \times 10^{-3}$  M e glicil-l-leucina  $1,00 \times 10^{-3}$  M em função de  $-\log[\text{H}^+]$ , onde  $\text{LCu}_2\text{P}^{3+}$ ,  $\text{LCu}_2\text{H}_1\text{P}^{2+}$  e  $\text{LCu}_2(\text{OH})\text{H}_1\text{P}^+$  são as espécies não-protonada, amida desprotonada e hidróxida dos complexos binucleares glicil-l-leucina-Cu(II)-OBISDIEN. O íon  $\text{Cu}^{2+}$  é o íon livre aquoso Cu(II). T =  $25,00 \pm 0,05$  °C e  $\mu = 0,100$  M (KCl). % = porcentagem do  $\Sigma[\text{OBISDIEN}] = 100$  %. Somente espécies peptídeo-Cu(II)-OBISDIEN são mostradas.

56

**Figura 16.** Espectro de 200 MHz RMN do próton em  $\text{D}_2\text{O}$  do sistema 1:2:1 de glicilglicina-Cu(II)-OBISDIEN para uma solução extraída por precipitação do íon Cu(II) de uma solução inicial contendo, OBISDIEN 0,01M, Cu(II) 0,02M e glicilglicina 0,01M a  $\text{p}[\text{D}] = 6,01$ , mostrando a formação do produto glicina, depois de 71 horas de reação. T =  $80,0 \pm 0,2$  °C ;  $\text{p}[\text{D}]$  4,02 e  $\mu = 0,100$  M (KCl).

59

**Figura 17.** Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN a  $25,00 \pm 0,05$  °C e  $\mu = 0,100$  M (KCl). A - 0,11231mmol de glicilglicina em 50,00 ml de solução; B - 0,12429 mmol de glicilglicina e 0,0979 mmol de Zn(II) em 50,00 ml de solução; C - 0,10564 mmol de OBISDIEN em 50,00 ml de solução; D- 0,10564 mmol de OBISDIEN e 0,17955 mmol de Zn(II) em

66,17 ml de solução; E - 0,10564 mmol de OBISDEN, 0,17955 mmol de Zn(II) e 0,1064 mmol de glicilglicina em 77,76 ml de solução (a = moles de KOH por mol de ligante).

63

**Figura 18.** Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema dl-alanil-dl-alanina-Zn(II)-OBISDIEN a  $25,00 \pm 0,05$  °C e  $\mu = 0,100$ M (KCl). A - 0,11207 mmol de dl-alanil-dl-alanina em 50,00 ml de solução; B - 0,1116 mmol de dl-alanil-dl-alanina e 0,09975 mmol de Zn(II) em 50,00 ml de solução; C - 0,09880 mmol de OBISDIEN em 50,00 ml de solução; D - 0,09880 mmol de OBISDIEN e 0,17955 mmol de Zn(II) em 64,10 ml de solução; E - 0,09880 mmol de OBISDEN, 0,17955 mmol de Zn(II) e 0,11036 mmol de dl-alanil-dl-alanina em 76,80 ml de solução (a = moles de KOH por mol de ligante).

64

**Figura 19.** Variação do deslocamento químico da ressonância nuclear magnética dos prótons CH<sub>2</sub> adjacente ao grupo amino terminal do complexo glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN (•) e glicilglicina (◊). T =  $25,00 \pm 0,05$  °C e  $\mu = 0,10$ M (KCl).

70

**Figura 20.** Curvas de distribuição das espécies do sistema 1:2:1 glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN em função de  $-\log [H^+]$  para uma solução inicialmente contendo OBISDIEN  $1,00 \times 10^{-2}$ M, Cu(II)  $2,00 \times 10^{-2}$  M e glicil-glicina  $1,00 \times 10^{-2}$  M em função de  $-\log[H^+]$ , onde  $LZn_2P^{3+}$ ,  $HLZn_2P^{4+}$ ,  $LCu_2(OH)P^{2+}$  e  $LCu_2(OH)_2P^+$  e  $LCu_2(OH)_3P$  são as espécies não-protonada, monoprotada, e hidróxidas dos complexos glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN. O íon  $Zn^{2+}$  é o íon livre aquoso Zn(II). T =  $25,00 \pm 0,05$ °C, e  $\mu = 0,100$ M (KCl). % = porcentagem do  $\sum [OBISDIEN] = 100\%$ . Somente as espécies peptídeo - Zn(II) - OBISDIEN são mostradas.

72

**Figura 21.** Curvas de distribuição de espécies do sistema 1:2:1 dl-alanil-dl-alanina-Zn(II)-OBISDIEN em função de  $-\log[H^+]$  para uma solução inicialmente contendo OBISDIEN  $1,00 \times 10^{-2}M$ , Zn(II)  $2,00 \times 10^{-2}M$  e dl-alanil-dl-alanina  $1,00 \times 10^{-2} M$  em função de  $-\log[H^+]$ , onde  $LZn_2P^{3+}$ ,  $HLZn_2P^{4+}$ ,  $LZn_2(OH)P^{2+}$ ,  $LZn_2(OH)_2P^+$ ,  $LZn_2(OH)_3P$  são as espécies não-protonada, monoprotionada, e hidróxidas dos complexos binucleares dl-alanil-dl-alanina-Zn(II)-OBISDIEN. O íon  $Cu^{2+}$  é o íon livre aquoso Cu(II).  $T = 25,00 \pm 0,05 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,100M$  (KCl). % = porcentagem do  $\Sigma[OBISDIEN] = 100 \%$ . Somente espécies peptídeo-Cu(II)-OBISDIEN são mostradas. 74

**Figura 22.** Espectro de 200 MHz RMN do próton do sistema 1:2:1 glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN para uma solução inicialmente contendo OBISDIEN  $1,00 \times 10^{-2}$ , Zn(II)  $1,8 \times 10^{-2} M$  e glicilglicina  $1,6 \times 10^{-2} M$  em p[D] 8,37 mostrando o decréscimo do sinal do  $NCH_2$  e o aparecimento da ressonância dos prótons do  $CH_2$  da glicina, A = zero ; B = depois de 91 h e 30 min; C = depois de 210 h e 30 min em  $D_2O$ , ( $T = 70,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\mu = 0,1 M$  de KCl). 76

**Figura 23.** Espectro de 200 MHz RMN do próton do sistema 1:2:1 glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN para uma solução inicialmente contendo OBISDIEN,  $1,00 \times 10^{-2}$ , Zn(II),  $1,8 \times 10^{-2} M$  e glicilglicina,  $1,3 \times 10^{-2} M$  em p[D] 8.72, mostrando o decréscimo do sinal do  $NCH_2$  e a ressonância dos prótons do  $CH_2$  da glicina, A = zero ; B = depois de 37 horas; C = depois de 58 horas de 30 min em  $D_2O$ , ( $T = 70,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\mu = 0,1 M$  de KCl). 77

- Figura 24.** Gráfico de  $\text{Ln}[\text{NCH}_2]$  vs tempo para a deuteração do  $\text{CH}_2$  N-terminal da gliciglicina em  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{p}[\text{D}]$  8,37 ( $T = 70,0 \pm 0,2$  °C,  $\mu = 0,1$  M de KCl). 80
- Figura 25.** Gráfico de  $\text{Ln}[\text{NCH}_2]$  vs tempo para a deuteração do  $\text{CH}_2$  N-terminal da gliciglicina em  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{p}[\text{D}]$  7,0 ( $T=70,0 \pm 0,2$  °C e  $\mu = 0,1$  M de KCl). 81
- Figura 26.** Gráfico de  $\text{Ln}[\text{CCH}_2]$  vs tempo para a hidrólise do dipeptídeo glicilglicina em  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{p}[\text{D}]$  8,37 ( $T= 70,0 \pm 0,2$  °C e  $\mu = 0,1$  M de KCl). 86
- Figura 27.** Gráfico de  $\text{Ln} [\text{CCH}_2]$  vs tempo para a hidrólise do dipeptídeo glicilglicina em  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{p}[\text{D}]$  8,72 ( $T = 70,0 \pm 0,2$  °C e  $\mu = 0,1$  M de KCl). 87

## ÍNDICE DAS TABELAS

<b>Tabela I.</b>	Logarítmos das constantes de protonação do OBISDIEN em solução aquosa a $25,00 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ e $\mu = 0,100(\text{KCl})$ .	37
<b>Tabela II.</b>	Logarítmos das constantes de estabilidade dos complexos de $\text{Cu(II)}$ -OBISDIEN em solução aquosa a $25,00 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ e $\mu = 0,100 (\text{KCl})$ .	38
<b>Tabela III.</b>	Logarítmos das constantes de protonação da glicilglicina, e das constantes de complexação com íon cobre(II), a $25,00 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ e $\mu = 0,100\text{M} (\text{KCl})$ .	40
<b>Tabela IV.</b>	Logarítmos das constantes de protonação da dl-alanil-dl-alanina, e das constantes de complexação com íon cobre (II), a $25,00 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ , $\mu = 0,100\text{M} (\text{KCl})$ .	41
<b>Tabela V.</b>	Logarítmos das constantes de protonação da glicil-l-leucina e das constantes de complexação com íon cobre (II), a $25,00 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ , $\mu = 0,100\text{M} (\text{KCl})$ .	42
<b>Tabela VI.</b>	Logarítmos das constantes de equilíbrios para os complexos ternários OBISDIEN-Cu(II)-dipeptídeos (glicilglicina, dl-alanil-dl-alanina e glicil-l-leucina) $25,00 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ e $\mu = 0,100\text{M} (\text{KCl})$ .	46
<b>Tabela VII.</b>	Logarítmos das Constantes de Estabilidade dos Complexos $\text{Zn(II)}$ -OBISDIEN em solução aquosa a $25,00 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ e $\mu = 0,100 (\text{KCl})$ .	61

- Tabela VIII.** Logarítmos das constantes de complexação da glicilglicina e dl-alanil-dl-alanina com o íon zinco(II) a  $25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,100$  (KCl). 62
- Tabela IX.** Logarítmo das constantes de equilíbrio para os complexos ternários, OBISDIEN-Zn(II)-dipeptídeos (glicilglicina e dl-alanil-dl-alanina) a  $25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,100$  (KCl). 68
- Tabela X.** Constantes de velocidades observadas para vários valores de p[D] obtidas do gráfico de  $\text{Ln}[\text{NCH}_2]$  vs tempo em  $\text{D}_2\text{O}$ , ( $T = 70,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,1$  M de KCl). 82
- Tabela XI.** Constantes de velocidades observadas para a hidrólise da glicilglicina em  $\text{D}_2\text{O}$ , ( $T=70,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,1$  M KCl). 83
- Tabela XII.** Constantes de velocidades observadas para a deuteração da glicilglicina em  $\text{D}_2\text{O}$ , ( $T=70,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,1$  M KCl). 84
- Tabela XIII.** Constantes de velocidades específicas para a hidrólise da glicilglicina em  $\text{D}_2\text{O}$ , ( $T=70,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,1$  M KCl). 88

## ÍNDICE DAS ABREVIATURAS

ARG	⇒	Arginina
A	⇒	Absorbância
BFBP	⇒	3,6,9,16,19,22-hexaza-27,28-dioxatriciclo[22.2.1.1 <sup>11,14</sup> ] octacosa 1(26),11,13 -24-tetraene
CPA	⇒	Carboxipeptidase A
EDTA	⇒	Ácido etilenodiaminotetracético
Glu	⇒	Ácido glutâmico
<sup>1</sup> H RMN	⇒	Ressonância Magnética Nuclear, do próton
Hbbap	⇒	2,6-Bis[bis(2-benzimidazolilmetil) aminometil-4-metilfenol
His	⇒	Histidina
KOH	⇒	Hidróxido de Potássio
Log K	⇒	Logarítmo da constante de protonação
Log β	⇒	Logarítmo da constante de estabilidade total
Mc	⇒	3,7,11,19,23,27- hexazatriciclo [27.3.1.1 <sup>13,17</sup> ] tetraconta, 13,15,17(34),29 (33), 30 hexaene
M	⇒	Concentração molar
mmol	⇒	Milimoles
MHz	⇒	Mega Hertz
OBISDIEN	⇒	1,4,7,13,16,19-hexaza-10,22-dioxaciclotetracosano
OBISBAMP	⇒	3,9,23,29,30-hexaza-6,20-dioxatriciclo[23.3.1. <sup>11,15</sup> ] triaconta-1(28),11,13-24-tetraeno
PM	⇒	Peso Molecular
Tir	⇒	Tirosina
UV-Vis	⇒	Ultravioleta visível
δ ppm	⇒	Deslocamento químico, refere-se à análise <sup>1</sup> H RMN.
μ	⇒	Força iônica
≈	⇒	Aproximadamente

## RESUMO

Foram realizados estudos de equilíbrio potenciométrico do OBISDIEN (1,4,7,13,16,19-hexaza-10,22-dioxaciotetracosano) em presença e ausência dos íons metálicos cobre(II) e zinco(II), e dos peptídeos, glicilglicina, dl-alanil-dl-alanina e glicil-l-leucina. As constantes de equilíbrio para formação das espécies ternárias binucleares peptídeo-íon metálico-OBISDIEN foram determinadas. Os sistemas dos complexos binucleares foram caracterizados por titulação potenciométrica e medidas de espectroscopia UV-Vis. Os complexos binucleares de cobre(II), mostram uma complexação maior para os dipetídeos glicilglicina e dl-alanil-dl-alanina, quando comparada com glicil-l-leucina. O produto da reação de hidrólise da glicilglicina catalisada pelo complexo binuclear Cu(II)-OBISDIEN foi caracterizado por RMN do próton. Complexos ternários glicil-l-leucina-Zn(II)-OBISDIEN não foram detectados em quantidades apreciáveis para estudos de equilíbrio, provavelmente devido ao impedimento espacial do aminoácido leucina deste dipeptídeo. Estudos cinéticos da hidrólise e deuteração da glicilglicina catalisadas pelo complexo binuclear Zn(II)-OBISDIEN foram acompanhados por RMN do próton. Foram observadas duas reações paralelas para o sistema glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN: a deuteração de um dos CH<sub>2</sub> da glicilglicina, o NCH<sub>2</sub>, e a hidrólise da ligação peptídica, a quebra da ligação C-N. Observou-se que os grupos hidroxilas coordenados ao íon metálico no complexo são importantes nas reações de hidrólise e deuteração. As constantes de velocidades específicas de deuteração, obtidas para as espécies individuais foram:  $k(\text{LZn}_2\text{HP}^{4+} \text{ e } \text{LZn}_2\text{P}^{3+}) = 0,6 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ;  $k(\text{LZn}_2(\text{OH})\text{P}^{2+}) = 8,9 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ;  $k(\text{LZn}_2(\text{OH})_2\text{P}^+) = 25,4 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  e  $k(\text{LZn}_2(\text{OH})_3\text{P}) = 37,3 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ . As constantes de velocidade específicas obtidas para a reação de hidrólise foram  $k(\text{LZn}_2\text{HP}^{4+} \text{ e } \text{LZn}_2\text{P}^{3+}) = 0,6 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ;  $k(\text{LZn}_2(\text{OH})\text{P}^{2+}) = 2,1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ;  $k(\text{LZn}_2(\text{OH})_2\text{P}^+) = 1,8 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  e  $k(\text{LZn}_2(\text{OH})_3\text{P}^{4+}) = 3,5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ . Os resultados mostram que a espécie mais reativa para a reação de hidrólise é a trihidróxida, e que a reação de deuteração também é facilitada pela presença da hidroxila no complexo.

## ABSTRACT

Potentiometric studies of OBISDIEN in the presence and absence of copper(II) and zinc (II) ions, and the peptides: glycylglycine, dl-alanyl-dl-alanine and glycyl-l-leucine were performed. Equilibrium constants for the formation of peptide binuclear metal ion-OBISDIEN species are reported. The binuclear complex systems were characterized by potentiometric titration and UV-Vis spectrophotometric measurements. The binuclear copper(II)-OBISDIEN complexes show much higher complexation for glycylglycine and dl-alanyl-dl-alanine compared with glycyl-l-leucine. The reaction product of catalyzed hydrolysis of glycylglycine by binuclear Cu(II)-OBISDIEN complexes were detected by proton NMR. Ternary glycyl-l-leucine-Zn(II)-OBISDIEN complexes were not detected in appreciable amount for the equilibrium studies, probably due to the steric hindrance of leucine moiety to this dipeptide. Kinetic studies of hydrolysis and deuteration reactions catalyzed by Zn(II)-OBISDIEN complexes has been carried out by  $^1\text{H}$  NMR. Two parallel reactions were observed for the glycylglycine-Zn(II)-OBISDIEN system: deuteration of  $\text{NCH}_2$  of glycylglycine, and hydrolysis of the peptide bond. The hydroxyl groups coordinated to the metal ion in the complex, play import role in the hydrolysis and deuteration reactions. The specific deuteration rate constant for the individual species are:  $k(\text{LZn}_2\text{HP}^{4+} \text{ and } \text{LZn}_2\text{P}^{3+}) = 0,6 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$   $k(\text{LZn}_2(\text{OH})\text{P}^{2+}) = 8,9 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$   $k(\text{LZn}_2(\text{OH})_2\text{P}^+) = 25,4 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  and  $(\text{LZn}_2(\text{OH})_3\text{P}^{4+}) = 37,3 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ , and the specific rate constant for the hydrolysis reaction are:  $k(\text{LZn}_2\text{HP}^{4+} \text{ and } \text{LZn}_2\text{P}^{3+}) = 0,6 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$   $k(\text{LZn}_2(\text{OH})\text{P}^{2+}) = 2,1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$   $k(\text{LZn}_2(\text{OH})_2\text{P}^+) = 1,8 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  and  $k(\text{LZn}_2(\text{OH})_3\text{P}^{4+}) = 37,3 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ . The results show that the most active species for the hydrolysis of glycylglycine is the trihidroxo, and the deuteration reaction is also facilitated by the hydroxyl coordinated to the metal ion.

## **OBJETIVOS**

- 1. Medir os equilíbrios químicos da complexação dos dipeptídeos : glicilglicina, dl-alanil-dl-alanina, e glicil-l-leucina com os complexos binucleares: Cu(II)-OBISDIEN e Zn(II)-OBISDIEN.**
- 2. Caracterizar o produto da hidrólise do dipeptídeo glicilglicina catalisada pelo complexo binuclear Cu(II)-OBISDIEN.**
- 3. Realizar estudos cinéticos das reações de hidrólise e deuteração do dipeptídeo glicilglicina catalisadas pelo complexo binuclear Zn(II) - OBISDIEN e caracterizar os produtos destas reações.**
- 4. Após os estudos cinéticos e os de equilíbrio, identificar as espécies mais reativas e propor um mecanismo para essas reações.**

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Hidrólise de Peptídeos e Amidas

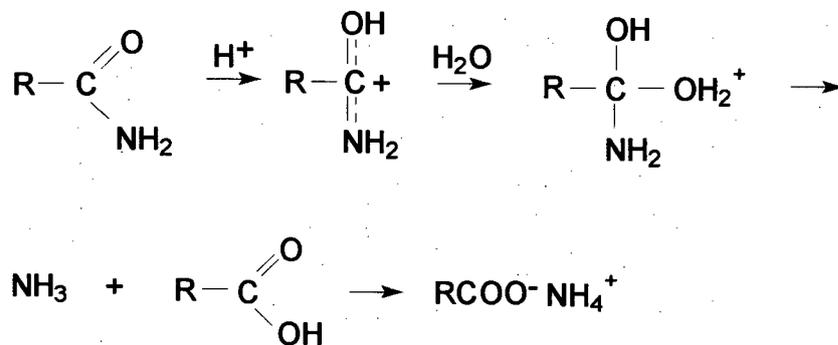
Peptídeos são amidas resultantes da reação entre os grupos amino e carboxílico dos aminoácidos. <sup>1</sup> O grupo amida,  $-NHCO-$ , nestes compostos é frequentemente designado por ligação peptídica. Conforme o número de resíduos aminoacídicos por molécula, esses compostos recebem o nome de dipeptídeo, tripeptídeo, etc, e, finalmente polipeptídeos. <sup>1</sup>

A hidrólise de amidas constitui uma reação típica destes derivados dos ácidos carboxílicos. Em condições ácidas, a hidrólise resulta do ataque da água sobre a amida protonada ( Esquema 1). A carbonila protonada deixa o carbono parcialmente positivo, favorecendo o ataque nucleofílico da molécula da água.

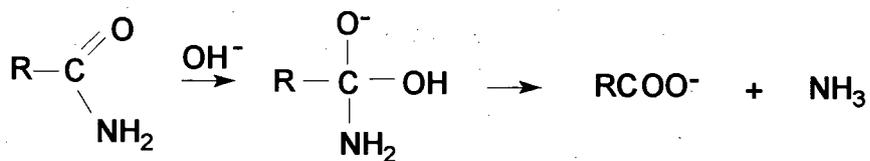
Vários ácidos têm sido usados para catalisar a hidrólise de ligações peptídicas e todos apresentam desvantagens, como a destruição parcial ou completa de alguns aminoácidos. <sup>2</sup>

O método mais comum usado emprega HCl 6 N a 110°C por 25 h , embora altas temperaturas (155°C) também tenham sido empregadas, resultando em um decréscimo do tempo requerido para hidrólise total. Porém, a destruição completa de alguns aminoácidos também aumenta. <sup>2</sup> A principal desvantagem da hidrólise ácida é a destruição de aminoácidos, notavelmente serina, treonina, cistina e triptofano. <sup>2</sup>

Em condições alcalinas, a hidrólise ocorre devido ao ataque do íon hidróxido, um agente fortemente nucleofílico, sobre a própria amida (Esquema 2). O grande número de aminoácidos destruídos neste tipo de hidrólise tem impedido este método de ser usado comumente. Serina, treonina , arginina e cistina são completamente destruídos. A aplicação mais comum deste método é para a determinação de triptofano. <sup>2</sup>



**Esquema 1.** Hidrólise de amidas em condições ácidas.



**Esquema 2.** Hidrólise de amidas em condições alcalinas.

## 1.2. Hidrólise Enzimática

As vantagens do uso de enzimas para hidrolisar proteínas e peptídeos são várias. As enzimas são específicas e quebram prontamente ligações que são resistentes à catálise não específica. Não são destrutivas, não somente para aminoácidos comuns, mas também para grupos lábeis introduzidos *in vivo* ou *in vitro*. Agem rapidamente e podem teoricamente completar a hidrólise em minutos.<sup>2</sup>

Certas enzimas proteolíticas requerem íons metálicos para suas atividades<sup>3-5</sup> e por isso reações de hidrólise têm chamado atenção de químicos inorgânicos.<sup>6</sup> Metaloenzimas ou enzimas ativadas por metais são classificadas de acordo com suas especificidades pelo substrato. Aminopeptidases apresentam especificidades pelo substrato  $-NH - CO - CHR - NH_2$ , a hidrólise ocorre no aminoácido N-terminal do substrato peptídico, e contém no seu centro ativo o íon metálico Zn(II).<sup>7</sup> Leucina aminopeptidase, extraída do pâncreas bovino foi identificada estruturalmente e contém 2 moles de zinco por unidade, PM 54.000.<sup>8</sup>

A carboxipeptidase (CPA, peptidil-l-aminoácido hidrolase), apresenta especificidade pelo substrato  $-OOC - CHR - NH - CO -$  a hidrólise ocorre no aminoácido C-terminal de substratos polipeptídicos. A enzima consiste de uma cadeia de polipeptídeo de 307 resíduos de aminoácidos e um íon  $Zn^{2+}$  em seu centro ativo. O íon  $Zn^{2+}$  serve não somente como um grupo ligante com o substrato, mas também como um centro ativo para quebrar a ligação peptídica.<sup>3,4,9,10</sup> O mecanismo hidrolítico da CPA tem sido tema de muitas pesquisas, particularmente à partir da determinação do sítio ativo através de cristalografia de raio-X.<sup>11</sup> Estudos de Christianson e Lipscomb observaram a estrutura de um complexo enzima inibidor, rendendo um possível intermediário (Figura 1) que poderia ser encontrado promovendo o mecanismo hidrolítico água/íon hidróxido.<sup>12</sup>

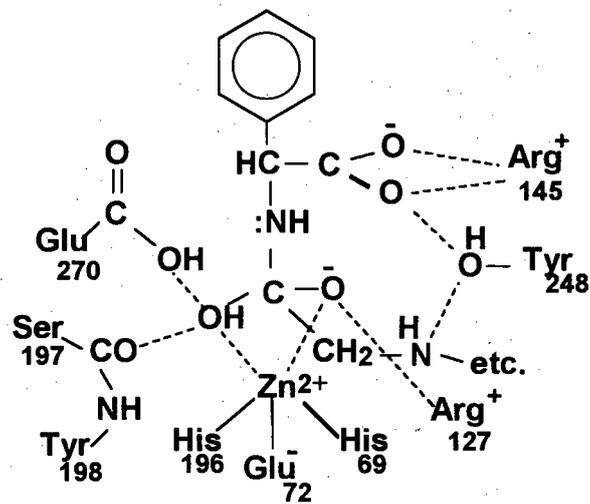
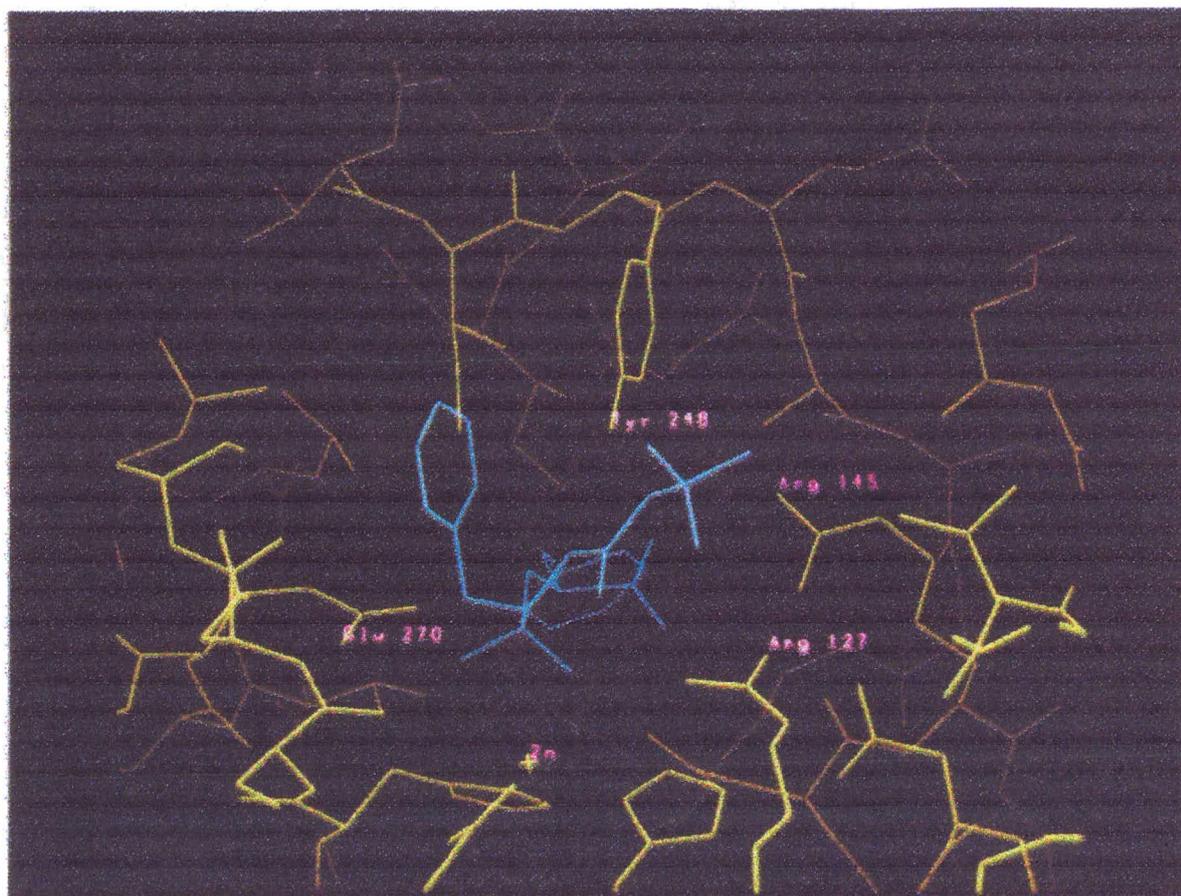


Figura 1. Intermediário proposto para o mecanismo promovido pela água.<sup>12</sup>

Resíduos e espécies importantes para a catálise e as ligações desta enzima são Glu-270, Arg-127, Arg-145, Tir-248,  $Zn^{2+}$  e a ligação zinco molécula de água, Figura 2. Segundo Ochiai, as funções do íon  $Zn(II)$  podem ser : 1) A energia de ligação do íon  $Zn(II)$  traz o substrato à posição favorável, com respeito à enzima. 2) O íon  $Zn(II)$  polariza o grupo carboxílico e com isto o átomo de carbono fica mais susceptível ao ataque nucleofílico. 3) Uma outra possível função decorre do fato que a estrutura de coordenação relativa ao íon  $Zn(II)$  é muito distorcida de um tetraedro regular, sendo mais uma estrutura trigonal bipiramidal, esta sugere um outro ligante, a molécula de água, facilitando a adição da mesma ao grupo carbonílico.<sup>7</sup> Estudos de Kuo e Makinen<sup>13</sup> sobre hidrólise de ester pela carboxipeptidase A [Co(II)substituído] sugere fortemente a quinta coordenação do íon metálico ativo com um ligante, sendo  $H_2O$  ou  $OH^-$ . A polarização do grupo carbonílico pela coordenação com o  $Zn(II)$  conduz a um aumento na susceptibilidade ao ataque nucleofílico<sup>14</sup> produzindo um aumento de velocidade da reação na ordem de  $10^4$  quando comparada a um sistema sem íons metálicos.<sup>7</sup>

O mecanismo proposto na Figura 3 tem sido suportado por estudos modelos<sup>5,15,16</sup>. Acredita-se que o Glu 270 atua junto com o Zinco para promover o ataque da molécula de água sobre o carbono carbonílico (Figura 2 B). O aceite de um próton, a partir de uma molécula de água, pelo GLU 270 e a transferência deste para o Nitrogênio como indicado em C e D (Figura 3) são propostas por Monzingo e Matthews.<sup>15</sup>

Outro exemplo de metalopeptidase é a termolisina, uma peptidase termoestável de PM 34600 isolada do *Bacillus thermoproteolyticus*. A sequência de aminoácidos é conhecida e a estrutura tridimensional foi determinada.<sup>5</sup> As ligações da enzima por 4 íons cálcio são necessárias para estabilidade térmica. O mecanismo sugerido por Kester e Matheus para termolisina propõe que o GLU 270 atua como base geral.<sup>17</sup> Na enzima natural o íon zinco apresenta uma coordenação tetraédrica com 3 ligantes, His-142, His-146 e Glu-166, e a quarta ligação é com uma molécula de água.<sup>5</sup> Embora a sequência de aminoácidos e todas as estruturas terciárias da termolisina e carboxipeptidase A não serem relacionadas, os sítios ativos dessas duas metalopeptidases têm elementos em



**Figura 2.** Sítio ativo da Carboxipeptidase A com um inibidor ligado, mostrado por uma representação convencional de palitos. Importantes aminoácidos constituintes são numerados por seus números de sequência Glu - 270, Arg-127, Arg-145, Tir-248. O inibidor, colorido de azul claro, é a forma cetônica hidratada do substrato t-butoxicarbonil-l-fenilalanil-l-fenilalanina.<sup>3</sup>

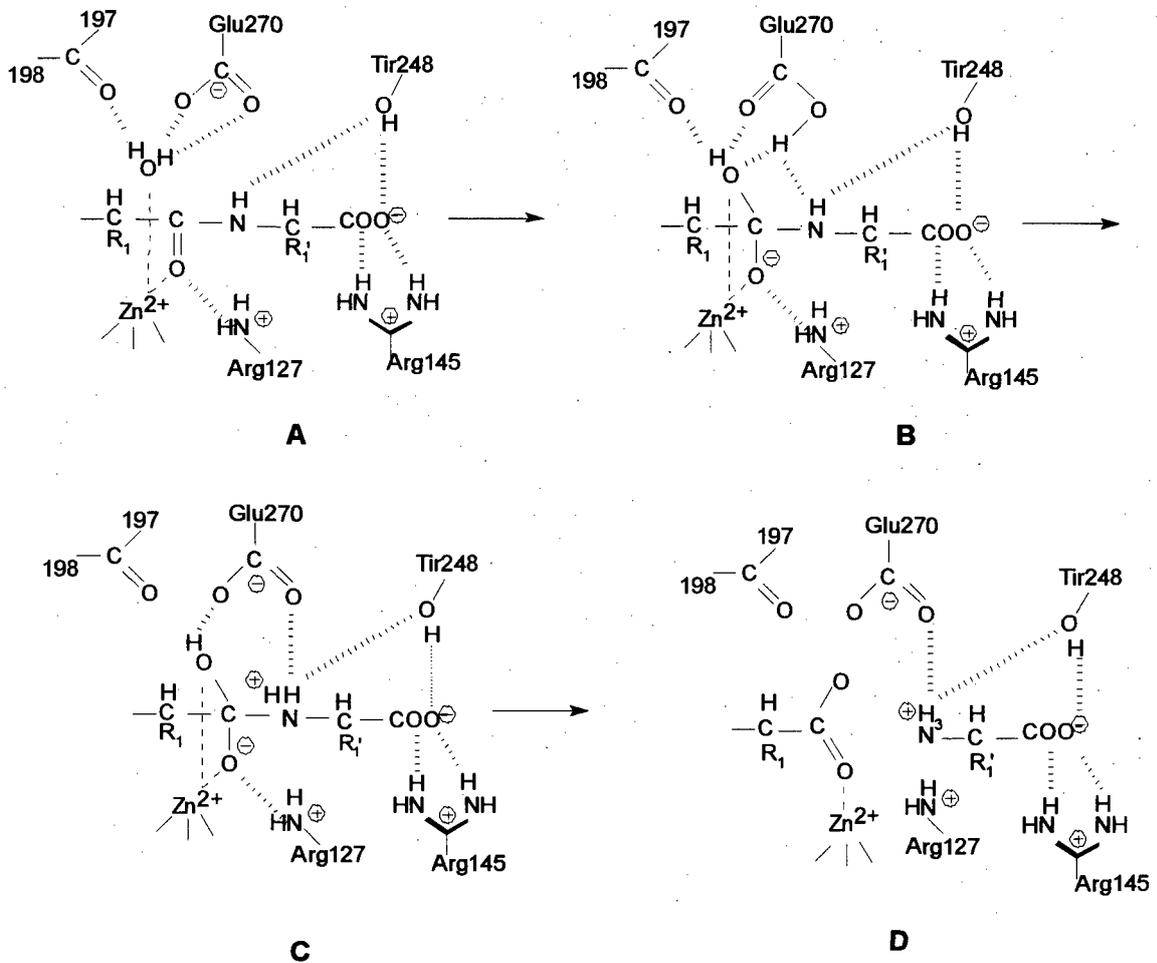


Figura 3. Mecanismo proposto para a hidrólise de ligação peptídica catalisada pela carboxipeptidase A. <sup>5</sup>

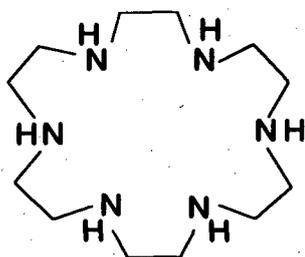
comum. A superposição de um sítio sobre outro mostra que a posição da ligação Glu 270 da carboxipeptidase A ao íon Zinco (II) corresponde à ligação do Glu143 da termolisina . Esta correspondência sugere que a combinação química e estereoquímica do íon zinco(II) e os grupos ácidos do Glu 143 da termolisina e Glu 270 da carboxipeptidase são vitais para a catálise. Em contraste, foi observado que His 231 da termolisina e Tir 248 da carboxipeptidase A, dois grupos doadores de prótons, não ocupam posições similares. O que leva à conclusão que não é absolutamente requerido à histidina ou à tirosina, em hidrólise catalisada pelas zinco proteases. <sup>5</sup>

### 1.3. Complexos Macrocíclicos

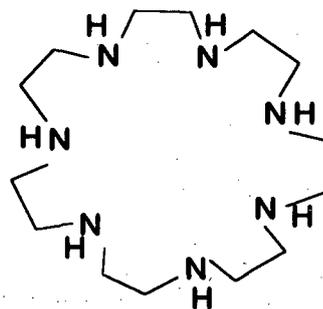
Complexos macrocíclicos polinucleares de metais de transição representam uma ferramenta importante no estudo dos mecanismos que governam as interações do íon metálico e a ativação do substrato.<sup>18</sup> O reconhecimento que a realização de várias funções biológicas necessita de centros metálicos tem dado um forte impulso ao estudo de complexos macrocíclicos como modelo desses sistemas.<sup>18</sup>

Poliázacicloalcanos, estruturas 1-7, seguindo uma série de  $[3k]aneN_k$  têm sido empregados para estudar os equilíbrios para formação de complexos de metais de transição, nos quais mais de um íon metálico estão coordenados pelo mesmo anel macrocíclico.<sup>19-27</sup> As constantes de equilíbrio foram obtidas por titulação potenciométrica para os complexos polinucleares.

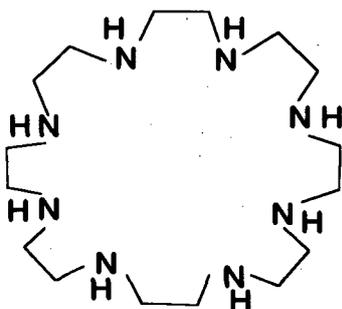
Ligantes binucleares capazes de complexar dois íons metálicos surgem na literatura como resultado relevante sob vários aspectos, na química de coordenação.<sup>28</sup> De especial interesse como agentes complexantes salientam-se os ligantes macrocíclicos porque eles podem impôr um alto grau de preorganização na formação de complexos metálicos.<sup>29</sup> Ligantes macrocíclicos constituem excelente base para reconhecimento molecular, assim pode-se variar o tamanho da cavidade, forma e componentes.<sup>30-33</sup>



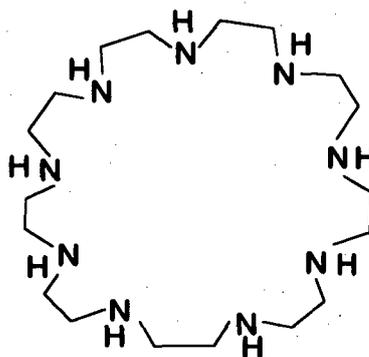
1. 1,4,7,10,13,16-hexazaciclooctadecano  
[18]ane N<sub>6</sub>



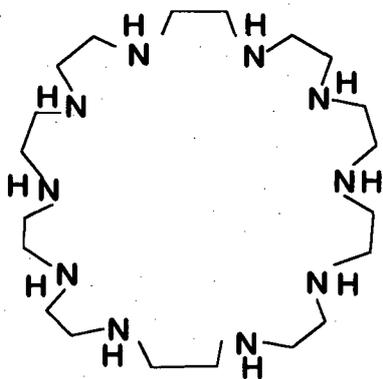
2. 1,4,7,10,13,16,19-heptazacicloheptacosano  
[21]ane N<sub>7</sub>



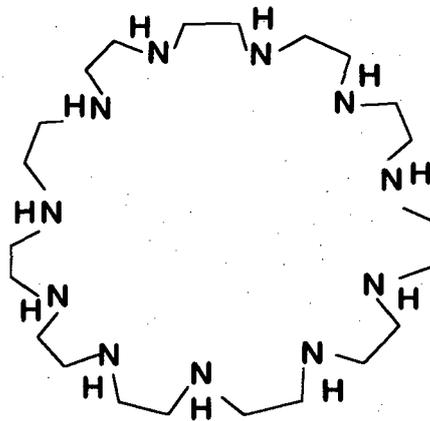
3. 1,4,7,10,13,16,19,22-octazacicotetracosano  
[24]ane N<sub>8</sub>



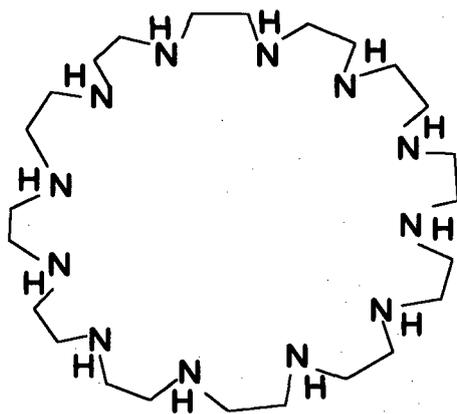
4. 1,4,7,10,13,16,19,22,15-nonazacicloheptacosano  
[27]ane N<sub>9</sub>



5. 1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,-decazaciclo triacontano[30] ane N<sub>10</sub>



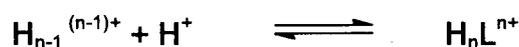
6. 1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,34 undecazaciclo tritriacontano[33] ane N<sub>11</sub>



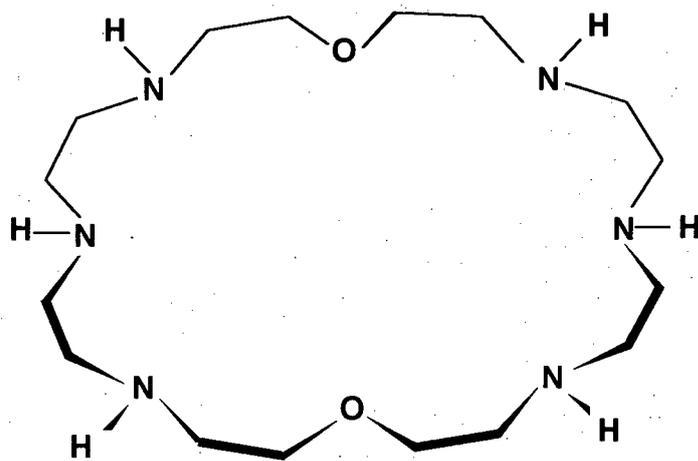
7. 1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,3,341-dodecazaciclohexariacontano [36] ane N<sub>12</sub>

### 1.3.1 . Macrocíclico, 1,4,7,13,16,19-hexaza-10,22-dioxaciclotetracosano (OBISDIEN)

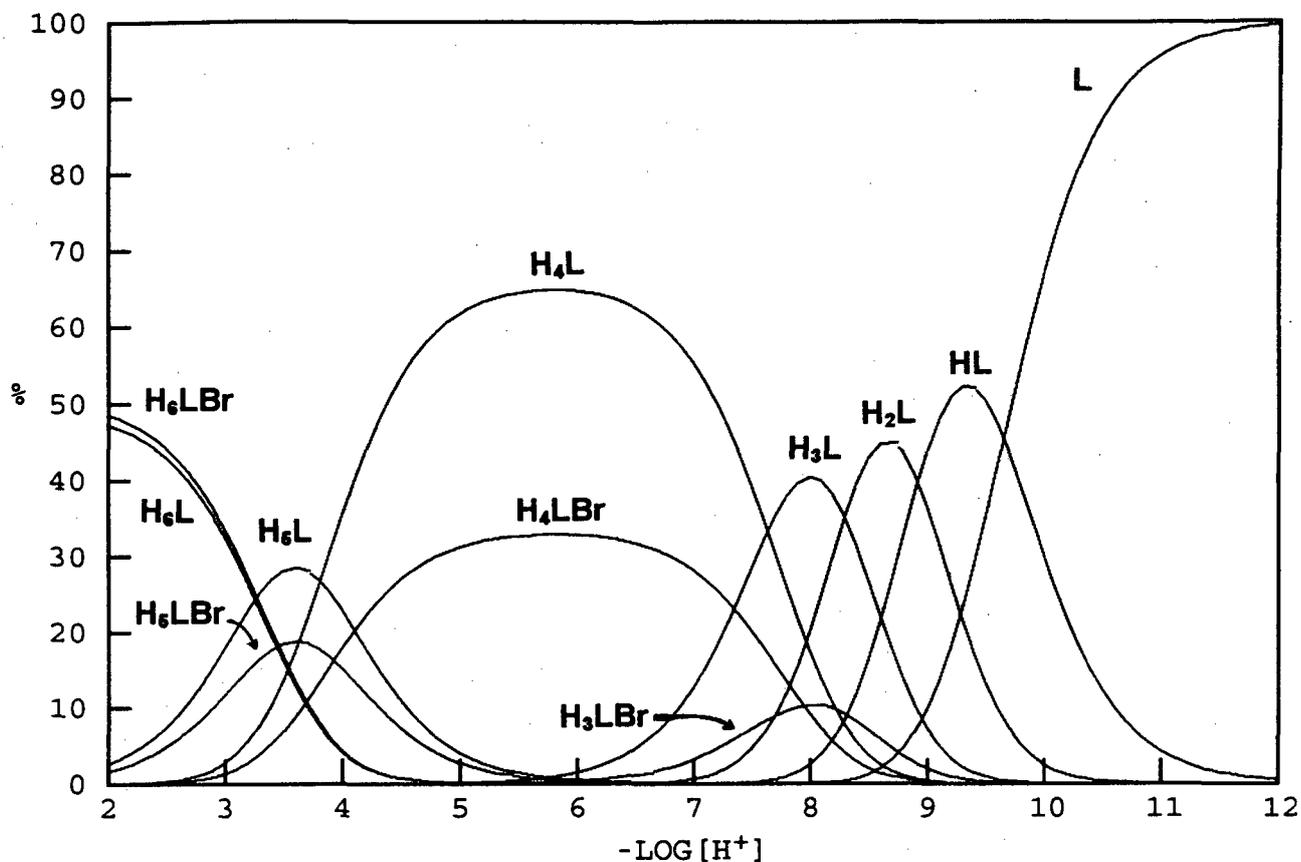
Um exemplo típico de ligante macrocíclico binuclear é o hexamino OBISDIEN (1,4,7,13,16,19-hexaza-10,22-dioxaciclotetracosano), **8**, sintetizado por Lehn e colaboradores.<sup>33-34</sup> Este macrocíclico contém 6 grupos aminos secundários consistindo de duas partes dietilenotriaminas separadas por duas pontes éter etílicas, dando considerável flexibilidade ao ligante que pode assumir conformações de forma a se adaptar a uma variedade de condições de complexação e dimensões requeridas pelos substratos para se coordenarem em sua cavidade.<sup>35</sup> As constantes de protonação para o OBISDIEN obtidos a  $25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,100\text{M}$ , definidas pela Equação 1, são: 9,65; 8,92; 8,30; 7,64; 3,81 e 3,26.<sup>36</sup> Em presença do íon brometo foram determinadas as constantes de associação deste íon com as espécies tri-, tetra-, penta- e hexaprotonada do macrocíclico que são 1,40(9); 1,67(7); 1,80(8); e 197(8) respectivamente.<sup>37</sup> A porcentagem das espécies protonadas em função do p[H] foram calculadas utilizando-se os valores das constantes acima e as curvas de distribuição dessas espécies aparecem na Figura 4. A importância desta figura está no fato de que em cada valor de p[H] tem-se a quantidade de cada espécie presente e pode-se conhecer a espécie predominante. Por exemplo a p[H] 8,7 a espécie que predomina é a espécie diprotonada  $\text{H}_2\text{L}$  que está 44,9% formada. Essa espécie decresce para valores de p[H] maiores do que 8,7. Em p[H] 9,3 a espécie predominante é a monoprotionada com um percentual de 53,8% e a espécie deprotonada predomina em valores de p[H] acima de 9,6. O íon brometo aparece associado às espécies mais protonadas do OBISDIEN. Interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio são responsáveis pela formação desses complexos.<sup>37</sup>



$$K_n^H = \frac{[\text{H}_n\text{L}^{n+}]}{[\text{H}_{n-1}\text{L}^{(n-1)+}][\text{H}^+]} \quad (1)$$

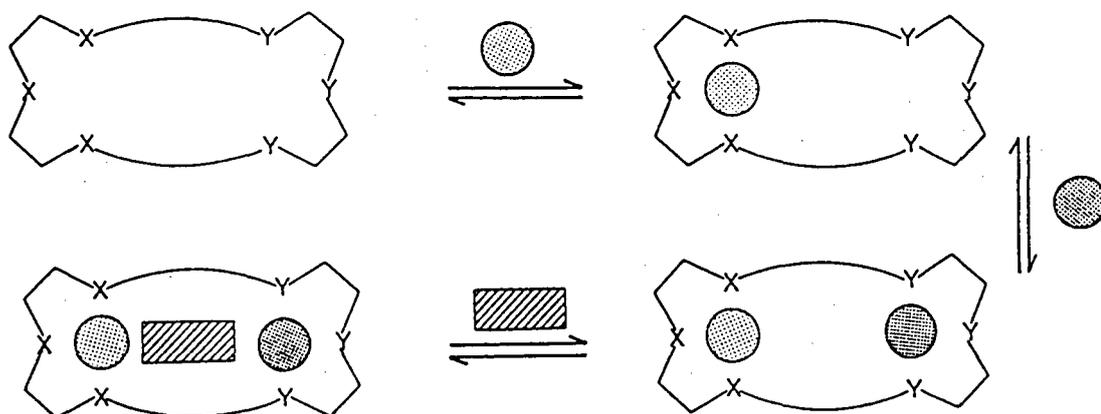


## 8. OBISDIEN



**Figura 4.** Curvas de distribuição das espécies de uma solução contendo OBISDIEN  $2,0 \times 10^{-3}$  M em função de  $-\log[H^+]$  sob condições anaeróbicas. L é o ligante OBISDIEN deprotonado, HL, H<sub>2</sub>L, H<sub>4</sub>L, H<sub>5</sub>L, H<sub>6</sub>L, são as formas mono-, di-, tri-, tetra-, penta- e hexaprotonada do OBISDIEN. H<sub>3</sub>LBr, H<sub>4</sub>LBr, H<sub>5</sub>LBr e H<sub>6</sub>LBr são as espécies tri-, tetra-, penta- e hexaprotonada do ligante com íon brometo em sua cavidade.

O OBISDIEN forma complexos binucleares com íons metálicos de transição da primeira fileira da tabela periódica, aos quais ligam-se ânions secundários como grupos ligantes biquelantes <sup>36, 38-45</sup>. Neste caso, complexos metálicos binucleares são hóspedes, e os ânions ligantes hospedeiros. Este tipo de complexo com o ânion formando uma ponte entre os dois centros metálicos foi classificado por Lehn como complexo cascata, Esquema 3. <sup>41</sup>



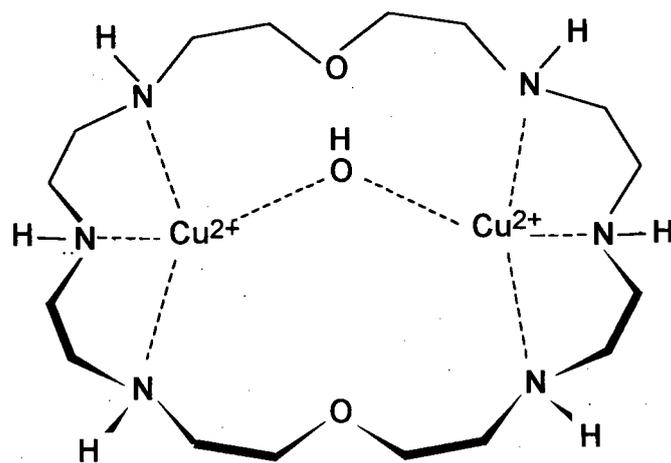
**Esquema 3.** Formação sequencial do complexo cascata envolvendo a complexação de dois cátions metálicos, que podem ser diferentes, por um ligante macrocíclico. <sup>41</sup>

Este ligante macrocíclico é capaz de reconhecer substratos negativos e pode catalisar reações hidrolíticas.<sup>46-47</sup>

Estudos dos equilíbrios potenciométricos do OBISDIEN com os íons metálicos Cu(II) e Zn(II), foram realizados.<sup>36</sup> O quelato binuclear de Cu(II) é suficientemente estável para se formar em solução. Ele é estabilizado por um íon ponte hidróxido em pH neutro e alcalino (Fórmula 9).<sup>36</sup> Tem sido mostrado que complexos binucleares de Co(II) e Cu(II) são estabilizados por ligantes secundários.

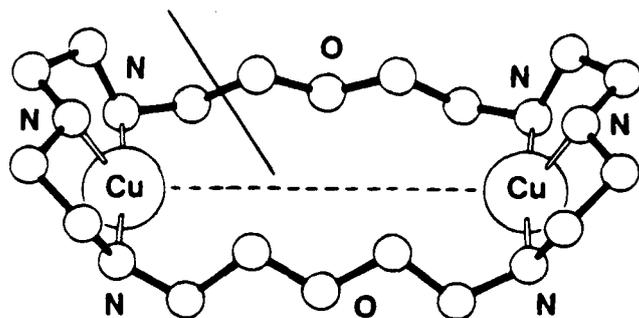
Cálculos de mecânica molecular, reproduzindo a estrutura do complexo binuclear OBISDIEN-Cu(II) (Figura 5) mostram que esse complexo é inteiramente flexível. Assim, é possível reproduzir complexos de baixa energia, variando a distância entre os dois átomos de Cu, podendo acomodar ligantes pontes de diferentes tamanhos como F<sup>-</sup> ou OH<sup>-</sup> na conformação de menor distância (Cu---Cu = 4.27Å), conformação de cuia (Figura 5C) e para ligantes maiores como o pirofosfato a distância entre os íons cobre é de 7,31 Å, exigindo uma conformação estendida (Figura 5A).<sup>35</sup>

Coughlin e colaboradores determinaram a estrutura cristalina do imidazolato-dicobre(II)-OBISDIEN.<sup>48</sup> O imidazol também foi investigado como ligante secundário para sistema aquoso dinuclear Cu(II)-OBISDIEN, Fórmula 10.<sup>38</sup> Mais tarde Coughlin e Lippard registraram a estrutura cristalina do  $\mu$ -hydroxo- $\mu$ -perchlorato - dicobre(II) - OBISDIEN.<sup>49</sup>



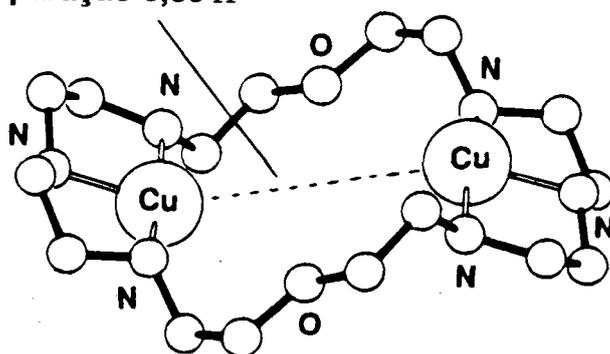
**9. Complejo dinuclear hidróxido Cu(II)-OBISDIEN**

Cu - Cu  
Separação 7,31 Å



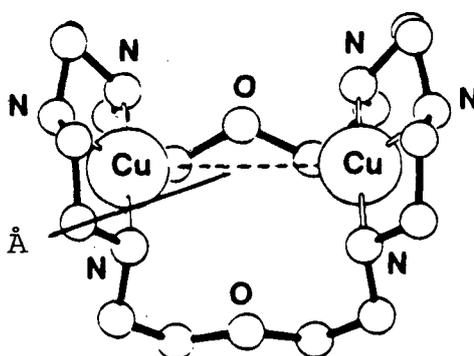
a) Forma estendida

Cu - Cu  
Separação 5,39 Å



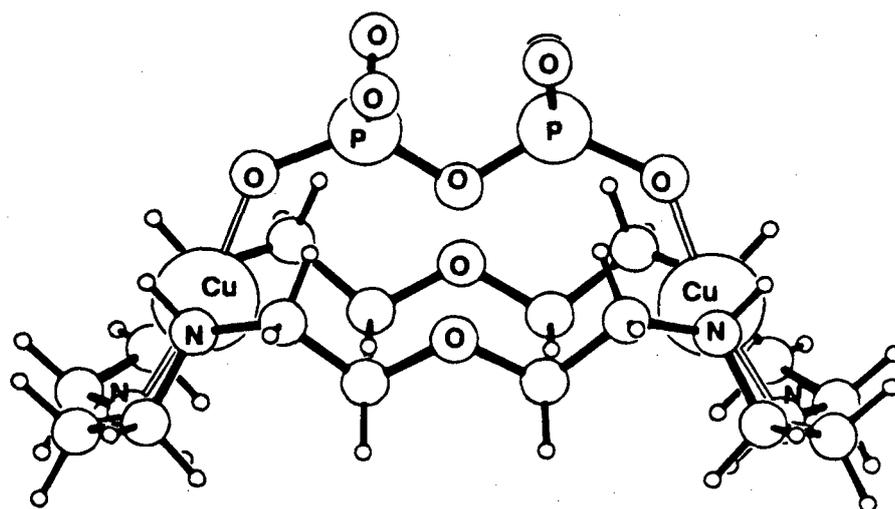
b) Forma intermediária

Cu - Cu  
Separação 4,27 Å

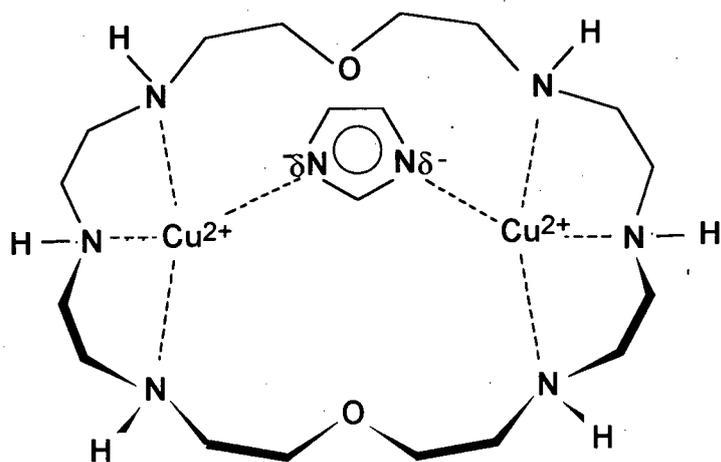


c) Conformação de "Cuia"

Figura 5. Disposições espaciais de baixa energia para o complexo dicobre(II) OBISDIEN gerado por cálculos MM usando o programa SYBYL.<sup>35</sup>



**Figura 6.** Estrutura provável do complexo pirofosfato-dicobre(II)-OBISDIEN, gerado por cálculo de mecânica molecular usando programa SYBYL.<sup>35</sup>

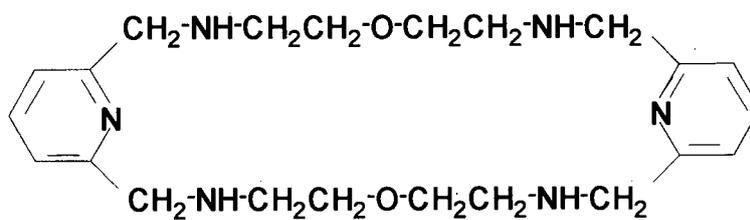


**10. Complexo dinuclear Imidazolato-Cu(II)-OBISDIEN**

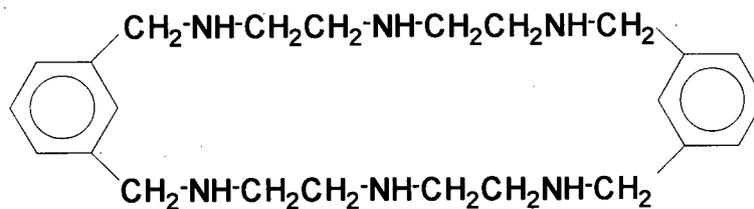
Em presença dos íons azida o OBISDIEN forma complexos binucleares com Cu(II), nos quais os dois íons metálicos estão contidos na cavidade do ligante macrocíclico. Sua estrutura e propriedades magnéticas foram estudadas.<sup>36</sup>

A síntese do 3,9,17,23,29,30-hexaaza-6,20-dioxatriciclo[23.3.1.1<sup>11,15</sup>] triaconta- 1(28),11,13,15(30),25,26-hexaeno BISBAMP, 11 e a complexação deste ligante com os íons metálicos Co(II), Ni(II), Cu(II) e Zn(II) foram estudadas. Na formação de complexos binucleares, espécies protonadas e hidróxidas foram observadas.<sup>50</sup> O estudo de complexos binucleares formados por três ligantes, um macrobíciclo, O-BISTREN e dois macrocíclicos O-BISBAMP e OBISDIEN e várias combinações de íons ferro e íons sulfato foram realizados por potenciometria. As constantes de estabilidade envolvendo os referidos ligantes, íon hidrogênio, ferro(II) e o ânion sulfato foram determinadas.<sup>51</sup> A síntese do macrocíclico 3,6,9,17,20,23-hexazatriciclo[23.3.1.1<sup>11,15</sup>]triacon1(29),11(30),12,14,25(26),27- hexano, 12, foi registrada por Menif e Martell,<sup>52</sup> o estudo potenciométrico e a complexação deste com Cu<sup>+</sup> foram realizados.<sup>53</sup>

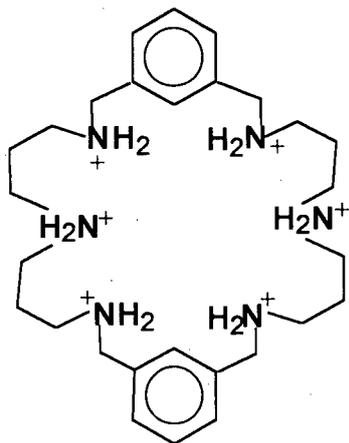
A síntese de um novo macrocíclico 3,7,11,19,23,27,-hexazatriciclo [27.3.1.1<sup>13,17</sup>] tetratriaconta1(32), 13,15,17(34),29 (33), 30-hexaene, 13, por hidrogenação da correspondente base de Schiff foi descrita por Llobet e colaboradores.<sup>29</sup> As constantes de protonação e constantes de estabilidade do complexo macrocíclico mononuclear e dinuclear , foram determinadas potenciométricamente e comparadas com ligantes análogos.<sup>29</sup> O ligante macrocíclico [22.2.1.1<sup>11,14</sup>] octacosa-1(26),11,13-24-tetraene(BFBD), 14, um macrocíclico análogo do OBISDIEN, contém duas unidades dietilenotriaminas separadas por duas pontes, o átomo de oxigênio do furano substitui o oxigênio alifático do OBISDIEN. Lu e colaboradores realizaram o estudo de equilíbrio potenciométrico deste macrocíclico e o reconhecimento molecular com oxalato, malonato e pirofosfato. Eles descrevem também a estrutura cristalina do complexo binário (H<sub>5</sub>BFBD-C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)Cl<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O e (H<sub>5</sub>BFBD-H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)Cl<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O.<sup>54</sup>



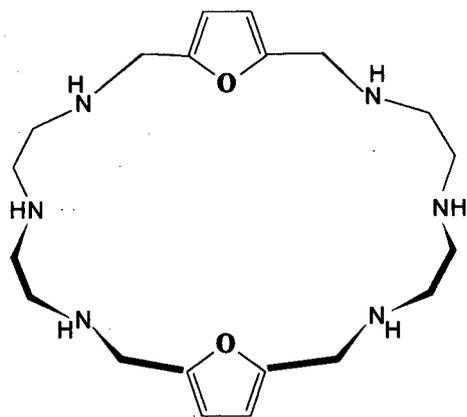
- 11.** 3,9,17,23,29,30-hexaza-6,20-dioxatriciclo[23.3.1.1<sup>11,15</sup>] triaconta- 1(28),11,13,15(30),25,26-hexaeno, BISBAMP



- 12.** 3,6,9,17,20,23-hexazatriciclo[23.3.1.1.1<sup>11,15</sup>] triacon- 1(29),11(30),12,14,25(26),27-hexaano



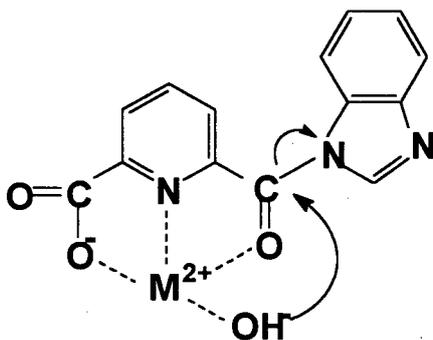
- 13.** 3,7,11,19,23,27,-hexazatriciclo [27.3.1.1<sup>13,17</sup>] tetratriaconta  
1(32), 13,15,17(34),29 (33), 30-hexaene.



- 14.** BFBD

## 1.4 Reações Modelo

A hidrólise de proteínas e peptídeos tem sido estudada mais do ponto de vista bioquímico do que químico.<sup>55</sup> Muitos processos biológicos envolvem hidrólise de proteínas e peptídeos, mas pouco se conhece sobre o mecanismo dessas importantes reações.<sup>56</sup> Íons metálicos catalisam a hidrólise de amidas.<sup>57-58</sup> Fife e Przystas em estudos sobre a hidrólise de n-acilimidazol catalisada por íons metálicos divalentes observaram, em presença dos íons  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , e  $Cu^{2+}$ , um aumento na velocidade da reação de  $10^5$  -  $10^6$  e  $10^9$  para os três primeiros íons e íon cobre respectivamente.<sup>58</sup> A reação do complexo com íon  $Cu(II)$  foi interpretada como um ataque nucleofílico intramolecular do  $OH^-$  sobre a carbonila da amida 15.<sup>58</sup>

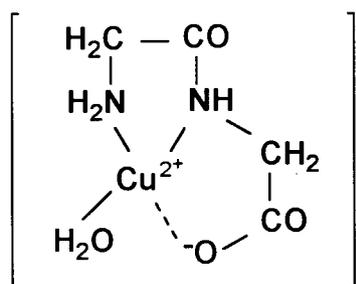


15

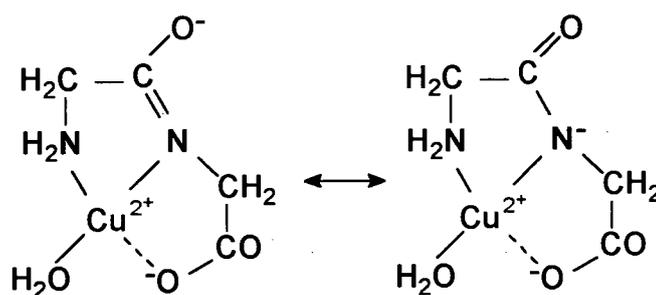
Os estudos cinéticos e mecanísticos sobre a hidrólise de amidas são na sua grande maioria, realizados em soluções alcalinas ou ácidas.<sup>06</sup> Assim, ácidos ou bases em altas concentrações e aquecimento prolongado são necessários.<sup>06</sup>

Para obter uma reação de meia vida substancialmente menor que 1 ano em solução neutra, Hine e col. utilizaram temperatura de 80 °C.<sup>56</sup> A velocidade de hidrólise da formamida em ácido clorídrico, utilizando vários tampões aquosos, foi estudada na faixa de pH 1-9 à 80°C. A reação está sujeita a catálise geral em vários tampões.<sup>56</sup> Kahne e Still estudaram a hidrólise de uma ligação peptídica em água neutra e observaram que a velocidade de hidrólise da resina PhePhePheGly em pH neutro e temperatura ambiente era de  $3 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ , a qual corresponde a uma meia vida de aproximadamente 7 anos.<sup>59</sup>

Íons cobre(II) catalisam a hidrólise da glicilglicina na faixa de pH 3,6-6,0. O perfil de velocidade tem um máximo a pH 4,2 devido a formação do complexo,  $\text{CuGliGli}^+$  (16, Complexo A). A valores de pH mais elevados, a velocidade decresce devido à formação do complexo cataliticamente inativo  $\text{CuGliGli}$  produzido pela ionização do átomo hidrogênio da ligação peptídica, (17, Complexo B).<sup>60</sup>



16. Complexo A



17. Complexo B

A hidrólise do dipeptídeo glicilglicina catalisada pelo complexo macrocíclico mononuclear cobre(II)  $\text{Cu[9]aneN}_3\text{Cl}_2$  foi registrada. A reação foi

estudada a pH 8,1 ( próximo do pH fisiológico) e a glicina foi o único produto observado, confirmando a quebra hidrolítica do dipeptídeo glicilglicina.<sup>61</sup>

Uhlenbrock e Krebs estudaram compostos modelos para o sítio ativo da fosfolipase C (PLC).<sup>62</sup> A reação entre dois equivalentes de  $Zn(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$  e um equivalente do ligante 2,6-Bis[bis(2-benzimidazolmetil)aminometil]-4-metilfenol (Hbbap) reagindo com benzoato de sódio (NaOBz) em etanol e etanol/metanol leva à formação de cristais incolores do complexo (Figura 7). A distância entre os dois átomos de Zn foi determinada como sendo 3,443 Å.<sup>62</sup>

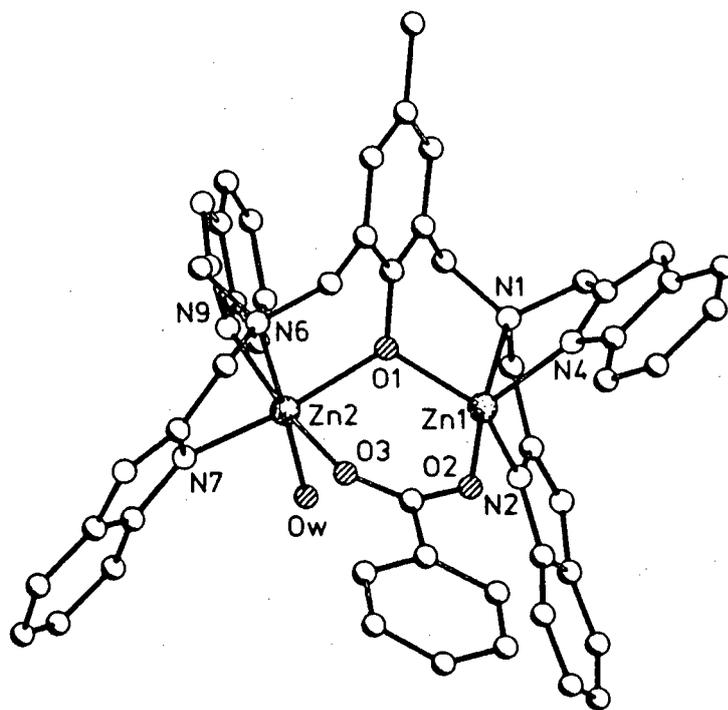
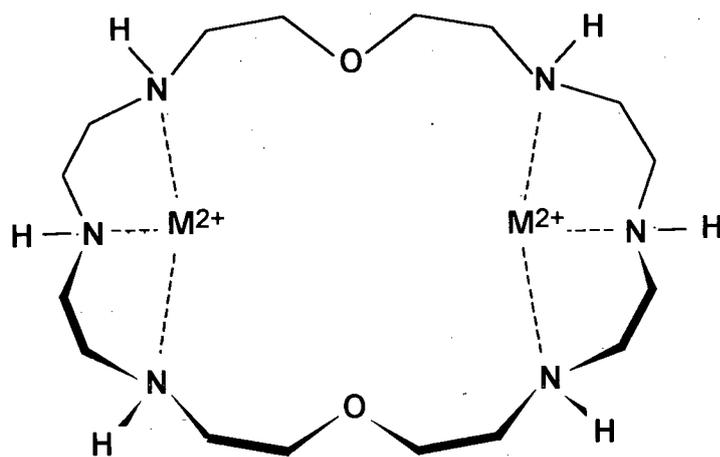


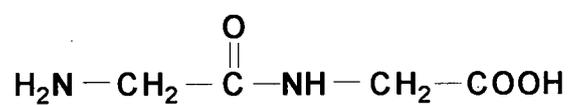
Figura 7. Estrutura do cátion  $[Zn_2(bbap)H_2O(\mu Obz)]^{2+}$ , distância entre  $Zn_1$  e  $Zn_2$  igual a 3,443 Å.<sup>62</sup>

A natureza tem desenvolvido muitas metaloenzimas hidrolíticas, que envolvem algumas das moléculas mais importantes da vida como as proteínas, peptídeos e fosfolipídeos.<sup>63</sup> A ligação amida extremamente não reativa, apresenta uma meia vida para a hidrólise em solução neutra de mais ou menos 7 anos.<sup>59</sup> O maior problema dessas importantes reações tem sido a determinação do verdadeiro sítio ligante, do ligante para o íon metálico, e a identificação das espécies cataliticamente ativas em solução.<sup>64</sup> Estudos realizados com modelos utilizando sistemas tampões têm levado a problemas adicionais como as interações do íon metálico com o tampão. Vários modelos tem sido observados na literatura. Porém, as velocidades das reações nesses modelos, têm apresentado valores de vida média muito elevados, quando comparados com reações enzimáticas. Embora complexos macrocíclicos binucleares tenham ganhado importância nos últimos anos, a literatura é falha na apresentação de modelos de hidrólise de peptídeos com esses compostos.

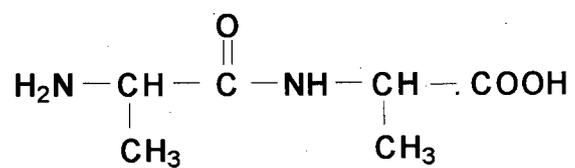
Estudos sobre o efeito do íon metálico sobre a hidrólise de peptídeos são requeridos considerando as limitações técnicas, a complexidade e o grande número de variáveis encontradas no estudo da hidrólise catalisada por enzimas e a simplicidade de reações modelo, justificam o grande número de trabalhos publicados. Neste trabalho, complexos macrocíclicos binucleares de Cu(II) e Zn(II) foram selecionados. Esses complexos apresentam a fórmula geral indicada em 18, e como substratos para a reação de hidrólise foram escolhidos os dipeptídeos: glicilglicina, 19, dl-alanil-dl-alanina, 20, e glicil-l-leucina, 21.



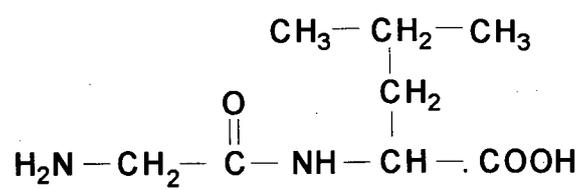
18



19



20



21

## CAPÍTULO 2

### 2. PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.1. Material

O ligante OBISDIEN.6HBr foi gentilmente doado pelo Professor Arthur E. Martell, da Texas A&M University, USA. O eletrólito suporte cloreto de potássio foi adquirido da Aldrich. Nitrato de zinco hexahidratado ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Vetec) e nitrato de cobre trihidratado ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (Riedel de Haën), foram reagentes P.A., utilizados sem prévia purificação. As soluções de KOH 0,100 M isentas de carbonatos foram preparadas com ampolas "Diluit-it" e padronizadas, titulando-se soluções de ftalato ácido de potássio (Sigma Chemical Company), usando fenoltaleína como indicador. As soluções metálicas foram padronizadas por titulação com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) comprado da Sigma Company.<sup>65</sup>

#### 2.2. Medidas potenciométricas

Cada sistema aquoso em consideração foi estudado em uma célula termostaticada a  $25,00 \pm 0,05$  °C refrigerada mecanicamente por um banho de circulação termostaticado (Microquímica Ind. Com. Ltda). Como eletrólito suporte foi utilizado KCl para manter a força iônica constante 0,100 M. A atmosfera inerte na célula foi mantida por um fluxo de argônio purificado (solução alcalina de pirogalol) para eliminar traços de  $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ .

As medidas foram realizadas com um pH-metro de pesquisa Micronal modelo B-375 equipado com um eletrodo de vidro e outro de referência do tipo Ag-AgCl, calibrados em uma célula termostaticada com soluções diluídas de HCl

para ler diretamente -  $\text{Log} [\text{H}^+]$ .<sup>66</sup> A calibração dos eletrodos foi ajustada com diversas titulações de soluções diluídas de HCl. As diferenças entre os valores das leituras  $\text{p}[\text{H}]$  e os cálculos na faixa alcalina eram minimizados com o ajuste da inclinação.

### 2.2.1. Procedimento

As concentrações dos reagentes usados em cada sistema foram 0,05-0,02 mmol em volumes que variavam de 50,0 a 80,0 ml. As medidas de  $\text{p}[\text{H}]$  foram feitas com adição de pequenos incrementos de KOH ao sistema. O  $\log K_w$  utilizado foi -13,78 para a força iônica empregada e foi mantido constante durante os refinamentos. Todas as constantes foram determinadas usando procedimentos detalhados na literatura.<sup>66</sup> Os erros calculados como  $\sigma_{\text{fit}}$  representam o desvio padrão computado a partir dos valores de  $\text{p}[\text{H}]$  calculados comparados com valores experimentais. A faixa de  $\text{p}[\text{H}]$  considerada para as medidas foi de 2 à 11. Em geral 10 pares de dados (volume de base e  $\text{p}[\text{H}]$ ) por equivalente eram obtidos.

Para o sistema OBISDIEN-Cu(II)-peptídeos cada titulação era realizada pelo menos 3 vezes e as médias das constantes obtidas foram utilizadas para os cálculos dos valores das constantes. Para os sistemas OBISDIEN-Zn(II)-peptídeos várias titulações foram realizadas, mas somente com objetivo de comparar as similaridades. Apenas uma titulação final foi usada para os cálculos das constantes. Assim, a titulação da glicilglicina provém de 25 pontos; sistema 1:1 Zn(II)-glicilglicina, 34 pontos ; OBISDIEN, 65 pontos; sistema 2:1 Zn(II)-OBISDIEN, 88 pontos, e o sistema ternário 1:2:1 glicil-glicina-Zn(II)OBISDIEN deriva de 101 pontos. A titulação da dl-alanil-dl-alanina deriva de 24 pontos; o sistema Zn(II)-dl-alanil-dl-alanina de 34 pontos, o OBISDIEN de 61 pontos; o sistema Zn(II)-OBISDIEN de 87 pontos, e o sistema ternário 1:2:1 dl-alanil-dl-alanina-Zn(II)-OBISDIEN de 100 pontos.

### 2.2.2. Cálculos computacionais

O programa BEST7<sup>66</sup> foi empregado para determinar as constantes de protonação e formação dos complexos. Este programa consiste em fornecer os valores de p[H] determinados experimentalmente em função da base adicionada, concentração em mmoles de cada componente presente na solução e constantes de equilíbrio estimadas para cada espécie que possivelmente se forme na solução. A partir das constantes de equilíbrio o percentual das espécies presentes foi calculado com ajuda do programa SPE, que calcula o percentual de cada espécie em função do p[H], sendo representados em diagramas com ajuda do programa SPEPLOT.<sup>66</sup>

### 2.3. Medidas cinéticas.

As medidas cinéticas foram seguidas por Ressonância Magnética Nuclear do próton. Os espectros RMN do próton dos compostos foram registrados em um espectrometro Bruker AM 200, 200 MHz a  $\approx 25^\circ\text{C}$ . Em alguns experimentos foi utilizado como referência interna o 3-(trimetilsilil)-propano sulfonato de sódio (DSS)(Aldrich) e para os demais o pico da água. Os compostos foram diluídos em D<sub>2</sub>O 99,9% (Aldrich Chemical Company) e os diferentes valores de p[D] foram obtidos adicionando-se solução de KOD/D<sub>2</sub>O, essas soluções foram preparadas a partir de uma solução 40% de KOD v/v 98% D<sub>2</sub>O (Aldrich Chemical ). A concentração do OBISDIEN era de 0,01 M, do íon metálico aproximadamente 0,02 M e da glicilglicina 0,01- 0,02 M . Para cada valor de p[D] o número de medidas cinéticas variou de 1 a 3 , um excesso de peptídeo foi utilizado em alguns experimentos com o objetivo de evitar a precipitação da solução em valores de p[D] mais altos. Os valores de p[H] das soluções foram medidos com um pH-metro de pesquisa DIGIMED DMPH-3 equipado com um eletrodo combinado (Ingold), o instrumento era calibrado com soluções tampão (Corning) e convertidos para pD:  $pD = pH_{\text{medido}} + 0.4$ .<sup>67</sup> As soluções foram incubadas em um banho (Ética equip. Cient. S.A.).

## **2.4. Caracterização do produto da hidrólise da glicilglicina catalisada pelo complexo Cu(II)-OBISDIEN**

O produto da reação de hidrólise da glicilglicina catalisada pelo complexo Cu(II)-OBISDIEN, foi caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear do próton.

Os valores de p[D] das soluções foram medidos de acordo com metodologia descrita na seção 2.3. p. 31. Soluções reagentes foram incubadas em um banho (Ética equip. Cient. S.A.). Depois do período de incubação os tubos eram abertos, precipitado o metal passando corrente de H<sub>2</sub>S e então, centrifugados.

## **2.5. Medidas de UV-Vis**

As medidas de espectros de UV-Vis foram realizadas com um espectrofotômetro HITACHI- U-3000, equipado com uma célula termostaticada a  $25,00 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$  refrigerada mecanicamente por um banho de circulação termostaticado(Microquímica).

Amostras de mais ou menos 0,020 mmol de OBISDIEN, 0,040 mmol de Cu(II) e 0,020 mmol de dl-alanil-dl-alanina ou glicilglicina, foram diluídas para 20,00 ml em uma célula termostaticada a  $25,00 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ , equipada com um eletrodo de vidro e outro de referência calibrados do mesmo modo como descrito para medidas potenciométricas. A força iônica das soluções foi ajustada para 0,100M por adição de KCl. Os valores de p[H] das soluções foram ajustados com a adição de pequenos volumes de KOH ou HCl 2,00 M com ajuda de uma microbureta Gilmont fixada à célula. Em torno de 3,5 ml de cada solução foram transferidos para uma célula de quartzo com caminho ótico de 1,00 cm.

## CAPÍTULO 3

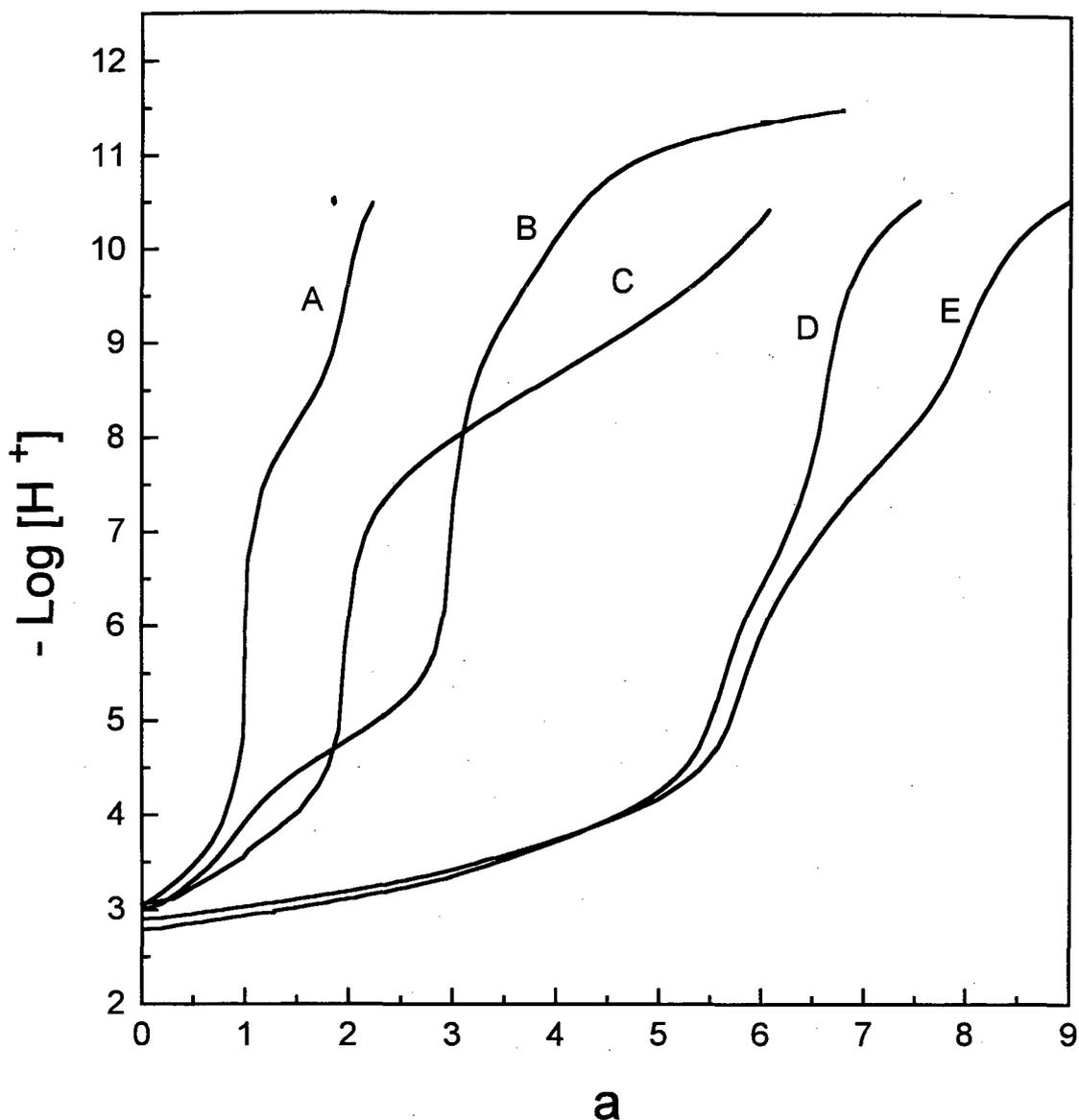
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Estudos de equilíbrio potenciométrico dos sistemas OBISDIEN - Cu(II)- Peptídeos (glicilglicina, dl-alanil-dl-alanina e glicil-l-leucina)

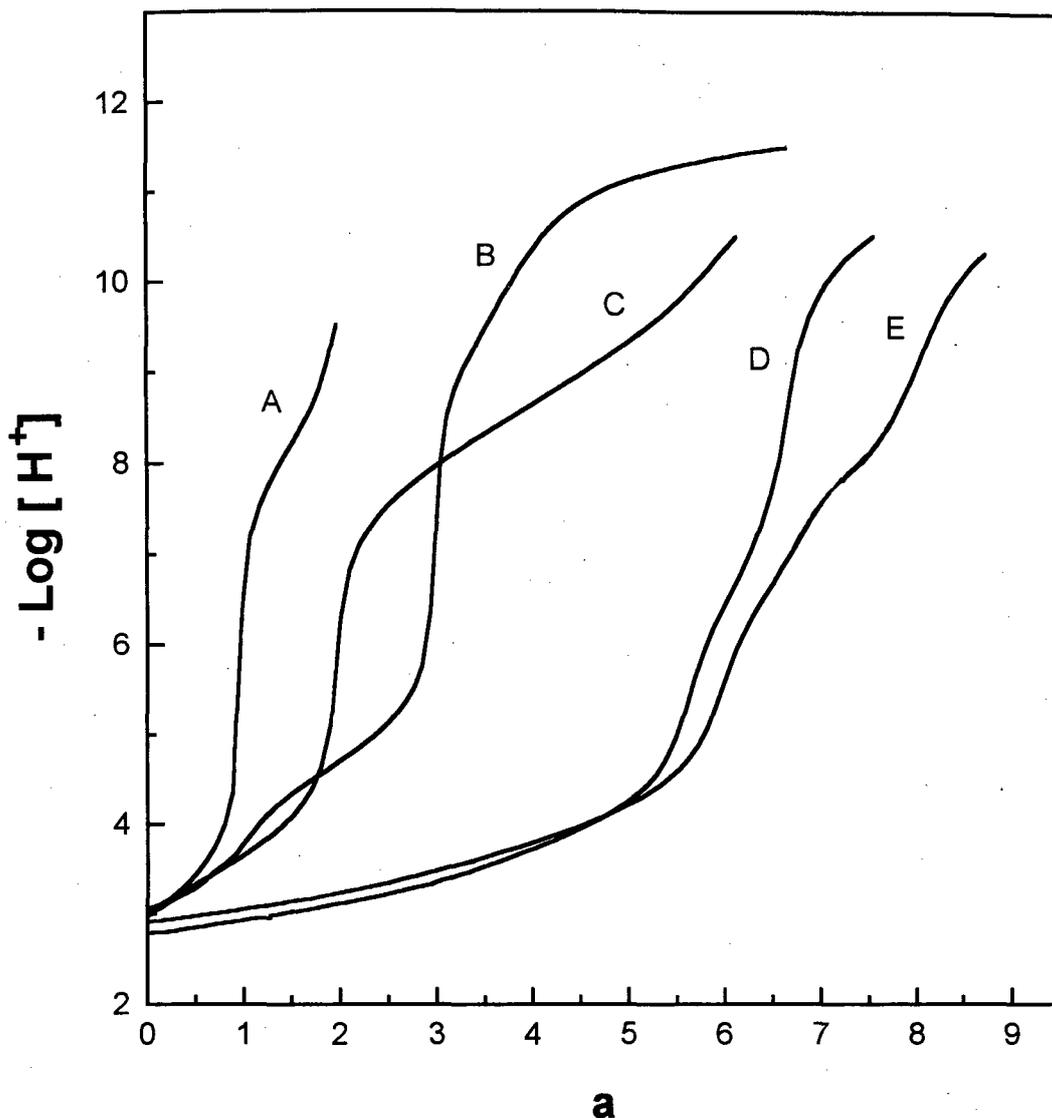
As curvas de titulação potenciométrica referentes aos sistemas OBISDIEN-Cu(II)-peptídeos (glicilglicina, dl-alanil-dl-alanina e glicil-l-leucina) são mostradas nas Figuras 8, 9, e 10 respectivamente. Cada curva representa um experimento em separado. As inflexões das curvas nos fornecem informações qualitativas sobre a estequiometria da solução, sugerindo possíveis espécies presentes.

As curvas (C) de titulações potenciométricas mostradas nas Figuras 8, 9 e 10 referem-se ao ligante OBISDIEN. Elas revelam que este ligante hexaprotonado possui uma inflexão em  $a=2$ ; ou seja foram consumidos dois moles de base por mol de ligante, indicando que dois prótons foram neutralizados em valores de  $p[H]$  menores que 4,5, seguidos por uma extensa região tamponada de  $a=2$  à  $a=6$ .

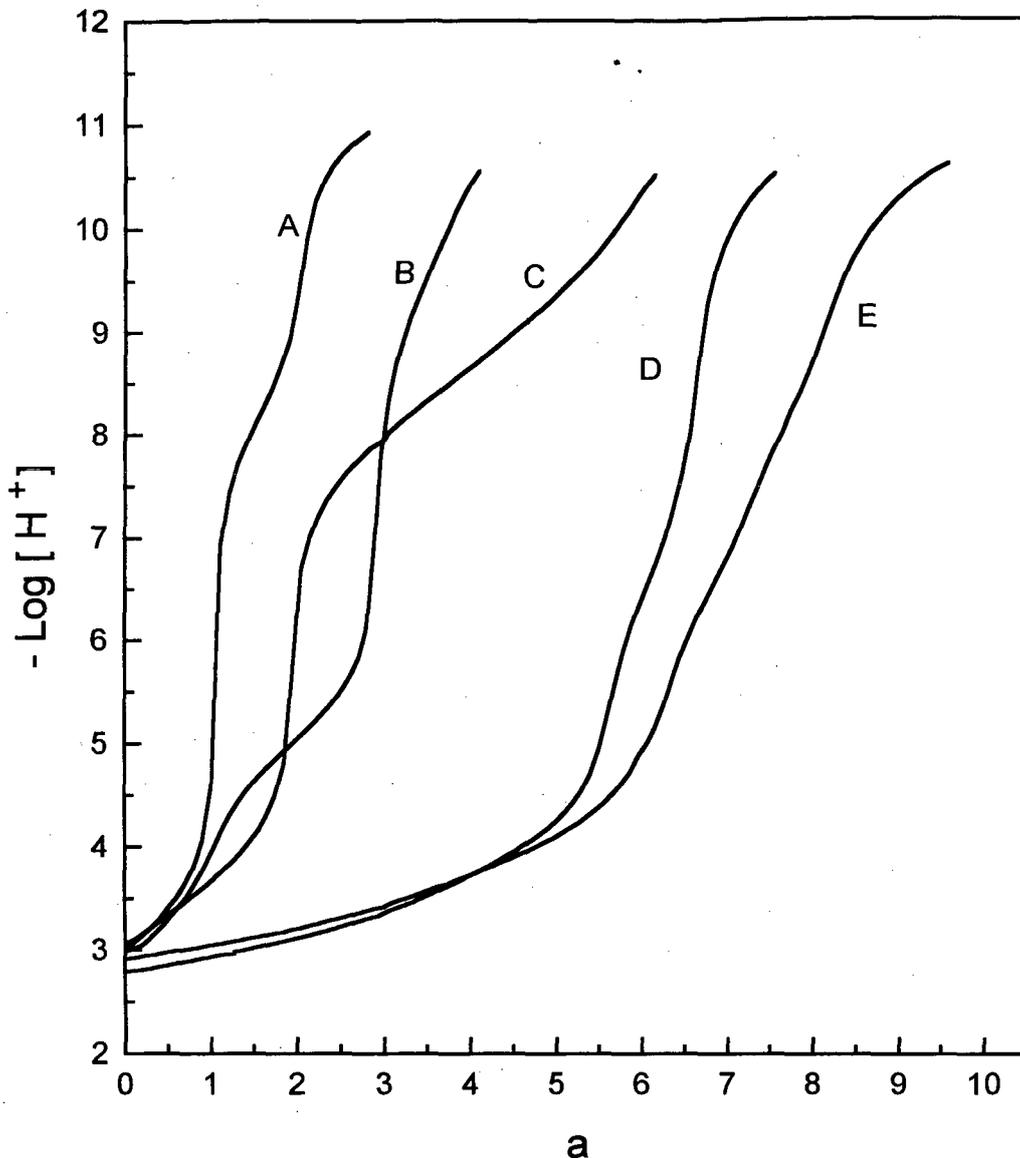
As constantes de protonação do ligante macrocíclico OBISDIEN definidas pela Equação 1, p.12, foram determinadas (Tabela I) e são comparadas com os valores publicados na literatura. As constantes de associação do íon brometo com as espécies tri-, tetra-, penta- e hexaprotonada foram calculadas e são comparadas com os valores publicados. Os resultados são bem concordantes, indicando que a amostra do OBISDIEN utilizada é pura e o sistema está aferido. Complexos OBISDIEN-Cu(II) mononucleares e dinucleares protonados e não protonados conhecidos<sup>31</sup> foram investigados e os valores são listados na Tabela II, comparados com os valores publicados na literatura.<sup>36</sup>



**Figura 8.** Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema glicilglicina-Cu(II)-OBISDIEN a  $25,00 \pm 0,05$  °C e  $\mu = 0,100\text{M}$  (KCl). A - 0,103 mmol de glicilglicina em 50,00 ml de solução; B - 0,1134 mmol de glicilglicina e 0,10145 mmol de Cu(II) em 50,00 ml de solução; C - 0,1019 mmol de OBISDIEN em 50,00 ml de solução; D - 0,1019 mmol de OBISDIEN e 0,1826 mmol de Cu(II) em 65,80 ml de solução; E - 0,1019 mmol de OBISDIEN, 0,1826 mmol de Cu(II) e 0,11189 mmol de glicilglicina em 75,95 ml de solução ( $a$  = moles de KOH por mol de ligante).



**Figura 9.** Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema dl-alanil-dl-alanina-Cu(II)-OBISDIEN a  $25,00 \pm 0,05$  °C e  $\mu = 0,100\text{M}$  (KCl). A - 0,11207 mmol de dl-alanil-dl-alanina em 50,00 ml de solução; B - 0,1134 mmol de dl-alanil-dl-alanina e 0,10145 mmol de Cu(II) em 50,00 ml de solução; C - 0,10208 mmol de OBISDIEN em 50,00 ml de solução; D- 0,1019 mmol de OBISDIEN e 0,1826 mmol de Cu(II) em 65,80 ml de solução; E - 0,10208 mmol de OBISDIEN, 0,2029 mmol de Cu(II) e 0,11511 mmol de dl-alanil-dl-alanina em 56,94 ml de solução (a = moles de KOH por mol de ligante).



**Figura 10.** Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema glicil-L-leucina-Cu(II)-OBISDIEN a  $25,00 \pm 0,05$  °C e  $\mu = 0,100$ M (KCl). A - 0,09833 mmol de glicil-L-leucina em 50,00 ml de solução; B - 0,1142 mmol de glicil-L-leucina e 0,10145 mmol de Cu(II) em 51,00 ml de solução C- 0,09938 mmol de OBISDIEN em 50,00 ml de solução; D - 0,11436 mmol de OBISDIEN e 0,20209 mmol de Cu(II) em 65,80 ml de solução; E - 0,09938 mmol de OBISDIEN, 0,20209 mmol de Cu(II) e 0,09882 mmol de glicil-L-leucina em 78,83 ml de solução (a = moles de KOH por mol de ligante).

Tabela I. Logarítmos das constantes de protonação do OBISDIEN em solução aquosa a  $25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,100$  (KCl)

Quociente de Equilíbrio	Log K	Log K <sup>a</sup>	Log K <sup>b</sup>	Log K <sup>c</sup>
$[\text{HL}]/[\text{L}][\text{H}]$	9,65(1)	9,63(3)	9,65	9,62
$[\text{H}_2\text{L}]/[\text{HL}][\text{H}]$	8,98(2)	8,98(2)	8,92	8,87
$[\text{H}_3\text{L}]/[\text{H}_2\text{L}][\text{H}]$	8,26 (1)	8,20(1)	8,30	8,28
$[\text{H}_4\text{L}]/[\text{H}_3\text{L}][\text{H}]$	7,67(2)	7,68(2)	7,64	7,62
$[\text{H}_5\text{L}]/[\text{H}_4\text{L}][\text{H}]$	3,75(4)	3,80(1)	3,81	3,79
$[\text{H}_6\text{L}]/[\text{H}_5\text{L}][\text{H}]$	3,26(1)	3,29(1)	3,26	3,31
$[\text{H}_3\text{LBr}]/[\text{H}_3\text{L}][\text{Br}]$	1,38(8)	1,40(9)	-	-
$[\text{H}_4\text{LBr}]/[\text{H}_4\text{L}][\text{Br}]$	1,50(9)	1,67(7)	-	-
$[\text{H}_5\text{LBr}]/[\text{H}_5\text{L}][\text{Br}]$	1,83(5)	1,80(8)	-	-
$[\text{H}_6\text{LBr}]/[\text{H}_6\text{L}][\text{Br}]$	1,95(9)	1,97(8)	-	-

<sup>a</sup> Referência 37, <sup>b</sup> Referência 36, <sup>c</sup> Referência 35. Os números entre parênteses são os erros estimados no último algarismo significativo.

Tabela II. Logarítmos das constantes de estabilidade dos complexos de Cu(II)-OBISDIEN em solução aquosa a  $25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,100$  (KCl).

Quociente de Equilíbrio	Log K	Log K <sup>a</sup>	Log K <sup>b</sup>
$[\text{CuL}]/[\text{Cu}][\text{L}]$	16,46(2)	16,46	16,21
$[\text{CuHL}]/[\text{CuL}][\text{H}^+]$	8,01(2)	8,01	7,81
$[\text{CuH}_2\text{L}]/[\text{CuHL}][\text{H}]$	7,46(3)	7,46	7,76
$[\text{CuH}_3\text{L}]/[\text{CuH}_2\text{L}][\text{H}^+]$	3,31(4)	3,45	3,44
$[\text{CuOHL}][\text{H}^+]/[\text{CuL}]$	-10,65(2)	-10,63	-
$[\text{Cu}_2\text{L}]/[\text{Cu}][\text{CuL}]$	10,80(3)	10,84	10,79
$[\text{Cu}_2\text{OHL}][\text{H}]/[\text{Cu}_2\text{L}]$	-6,52(2)	-6,51	-6,38
$[\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{L}][\text{H}]/[\text{Cu}_2(\text{OH})\text{L}]$	-10,41(2)	-10,40	-10,49

<sup>a</sup> Referência 36, <sup>b</sup> Referência 35. Os números entre parênteses são os erros estimados no último algarismo significativo.

As constantes de protonação da glicilglicina, dl-alanil-dl-alanina e glicil-I-leucina e as constantes de complexação destes peptídeos com o íon cobre(II) foram determinadas sob as condições deste trabalho ( $25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,100\text{M}$ ), e são mostradas nas Tabelas III, IV e V respectivamente. As curvas referentes a estes sistemas são mostradas nas Figuras 8, 9 e 10 p. 34, 35 e 36 respectivamente, sendo que as curvas A representam os resultados das titulações dos peptídeos e as curvas B representam as titulações potenciométricas dos sistemas peptídeo-cobre(II). Em presença do íon cobre(II) (curva B), três unidades de a são neutralizadas na primeira região de tampão. Isto é devido aos dois prótons do dipeptídeo e a desprotonação do grupo amida. O consumo adicional de base indicado pela segunda região tamponada é devido as espécies mono- e dihidróxidas dos complexos Cu(II) - peptídeo (Figuras 8 - 10).

Tabela III. Logarítmos das constantes de protonação da glicilglicina e das constantes de complexação com o íon cobre (II), a  $25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,100\text{M}$  (KCl).

Quociente de Equilíbrio	Glicilglicina	
	Log K	Log K <sup>a</sup>
$[\text{HL}]/[\text{H}^+][\text{L}^-]$	8,05(5)	8,07
$[\text{H}_2\text{L}^+]/[\text{HL}][\text{H}^+]$	3,03(6)	3,13
$[\text{CuL}^+]/[\text{Cu}^{2+}][\text{L}^-]$	5,40(6)	5,50
$[\text{Cu}(\text{H}_1\text{L})][\text{H}^+]/[\text{CuL}^+]$	-3,93(6)	-4,07
$[\text{Cu}(\text{OH})(\text{H}_1\text{L})][\text{H}^+]/[\text{CuH}_1\text{L}]^{\text{b}}$	-8,99(6)	-9,28
$[\text{Cu}(\text{OH})_2(\text{H}_1\text{L})][\text{H}^+]/[\text{CuH}_2\text{L}]^{\text{b}}$	-11,14(5)	-12,80
$[\text{Cu}(\text{H}_1\text{L})\text{L}]/[\text{Cu}(\text{H}_1\text{L})][\text{L}]^{\text{b}}$	3,30(5)	3,14

<sup>a</sup> Referência 68, 69. <sup>b</sup> Peptídeos desprotonados são designados por  $\text{H}_1\text{L}^{2-}$ . Os números entre parênteses são os erros estimados no último algarismo significativo.

Tabela IV. Logarítmos das constantes de protonação da di-alanil-di-alanina e das constantes de complexação com o íon cobre (II), a  $25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,100\text{M}$  (KCl).

Quociente de Equilíbrio	DI-alanil-di-alanina	
	Log K	Log K <sup>a</sup>
$[\text{HL}]/[\text{H}^+][\text{L}^-]$	8,16(5)	8,06
$[\text{H}_2\text{L}^+]/[\text{HL}][\text{H}^+]$	3,05(6)	3,19
$[\text{CuL}^+]/[\text{Cu}^{2+}][\text{L}^-]$	5,44(5)	5,35
$[\text{Cu}(\text{H}_1\text{L})][\text{H}^+]/[\text{CuL}^+]$	-3,69(4)	-3,56
$[\text{Cu}(\text{OH})(\text{H}_1\text{L})][\text{H}^+]/[\text{CuH}_1\text{L}]^{\text{b}}$	-9,23(6)	-9,48
$[\text{Cu}(\text{OH})_2(\text{H}_1\text{L})][\text{H}^+]/[\text{CuH}_2\text{L}]^{\text{b}}$	-11,39(4)	--
$[\text{Cu}(\text{H}_1\text{L})\text{L}]/[\text{Cu}(\text{H}_1\text{L})][\text{L}]$	2,86(3)	2,96

<sup>a</sup> Referência 68, 69. <sup>b</sup> Peptídeos desprotonados são designados como  $\text{H}_1\text{L}^-$ . Os números entre parênteses são os erros estimados no último algarismo significativo.

Tabela V. Logarítmos das constantes de protonação da glicil-I-leucina e das constantes de complexação com o íon cobre (II), a  $25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,100\text{M}$  (KCl).

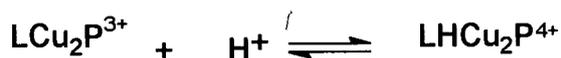
Quociente de Equilíbrio	glicil-I-leucina	
	Log K	Log K <sup>a</sup>
$[\text{HL}]/[\text{H}^+][\text{L}^-]$	8,20(4)	8,14
$[\text{H}_2\text{L}^+]/[\text{HL}][\text{H}^+]$	3,13(3)	3,09
$[\text{CuL}^+]/[\text{Cu}^{2+}][\text{L}^-]$	5,79(4)	5,93
$[\text{Cu}(\text{H}_1\text{L})][\text{H}^+]/[\text{CuL}^+]$	-4,70(5)	-4,65
$[\text{Cu}(\text{OH})(\text{H}_1\text{L})][\text{H}^+]/[\text{CuH}_1\text{L}]^{\text{b}}$	-9,62(8)	-9,50
$[\text{Cu}(\text{OH})_2(\text{H}_1\text{L})][\text{H}^+]/[\text{CuH}_2\text{L}]^{\text{b}}$	--	--
$[\text{Cu}(\text{H}_1\text{L})\text{L}]/[\text{Cu}(\text{H}_1\text{L})][\text{L}]$	--	--

<sup>a</sup> Referência 68, 69. <sup>b</sup> Peptídeos desprotonados são designados por  $\text{H}_1\text{L}^{2-}$ . Os números entre parênteses são os erros estimados no último algarismo significativo.

As constantes de formação dos sistemas ternários OBISDIEN-Cu(II)-peptídeos 1:2:1 são definidos pelas Equações 2-6, onde  $\text{Cu}_2\text{L}^{4+}$  é o complexo receptor binuclear Cu(II)-OBISDIEN, e  $\text{P}^-$  é a forma não-protonada dos peptídeos.  $\text{LCu}_2\text{HP}^{4+}$  é a forma mono-protonada do complexo ternário e  $\text{LCu}_2\text{H}_{-1}\text{P}^{2+}$  é a forma do complexo com o grupo amida desprotonado. As espécies hidróxidas são a mono-,  $\text{LCu}_2(\text{OH})\text{H}_{-1}\text{P}^+$  e a dihidróxida,  $\text{LCu}_2(\text{OH})_2\text{H}_{-1}\text{P}$ .



$$K = \frac{[\text{LCu}_2\text{P}^{3+}]}{[\text{Cu}_2\text{L}^{4+}][\text{P}^-]} \quad (2)$$



$$K_1^{\text{H}} = \frac{[\text{LHCu}_2\text{P}^{4+}]}{[\text{LCu}_2\text{P}^{3+}][\text{H}^+]} \quad (3)$$



$$K_1^{-\text{H}} = \frac{[\text{LCu}_2\text{H}_{-1}\text{P}^{2+}][\text{H}^+]}{[\text{LCu}_2\text{P}^{3+}]} \quad (4)$$



$$K_1^{\text{OH}} = \frac{[\text{LCu}_2(\text{OH})\text{H}_{-1}\text{P}^+][\text{H}^+]}{[\text{LCu}_2\text{H}_{-1}\text{P}^{2+}]} \quad (5)$$



$$K_2^{\text{OH}} = \frac{[\text{LCu}_2(\text{OH})_2\text{H}_{-1}\text{P}][\text{H}^+]}{[\text{LCu}_2(\text{OH})\text{H}_{-1}\text{P}^+]} \quad (6)$$

### 3.1.1. Sistema Formado pelas Espécies Glicilglicina - Cu(II) - OBISDIEN

A curva de titulação potenciométrica correspondente a mistura Cu(II)-OBISDIEN e glicilglicina em uma razão 2:1:1 é mostrado na Figura 8 (Curva E), p. 34. A curva foi analisada, e foi detectada a formação dos seguintes complexos:  $\text{LCu}_2\text{P}^{3+}$ ,  $\text{LCu}_2\text{HP}^{4+}$ ,  $\text{LCu}_2\text{H}_{-1}\text{P}^{2+}$  e  $\text{LCu}_2(\text{OH})_x\text{H}_{-1}\text{P}^{3-x}$ , onde  $x = 1, 2$ . Os equilíbrios de formação desses complexos são definidos pelas Equações 2-6. As espécies detectadas são mostradas no Esquema 4 e os valores das constantes dos equilíbrios aparecem na Tabela VI. A espécie  $\text{LCu}_2\text{H}_{-1}\text{P}^{2+}$  é formulada como um complexo contendo o peptídeo desprotonado ao invés do complexo hidroxido  $\text{LCu}_2(\text{OH})\text{P}^{2+}$ . O valor do logaritmo do quociente  $[\text{LCu}_2\text{PH}_{-1}^{2+}][\text{H}^+]/[\text{LCu}_2\text{P}^{3+}]$  é -7,17, o qual é consideravelmente menor que o valor da desprotonação da amida no complexo CuP (-3,9). Contudo, registros de complexos binários e misturas complexos ligantes do 2,2' bipyridil e glicil derivados, mostram que a desprotonação do grupo amida ocorre a  $\text{pK}^{\text{H}} = 7,71 \pm 0,06$  (glicinamida);  $7,77 \pm 0,04$  (glicilglicinato),  $\approx 7,4$  (glicilglicinamida);  $8,17 \pm 0,13$  (triglicinato);  $\approx 8,5$



Tabela VI. Logarítmos das constantes dos equilíbrios dos complexos ternários OBISDIEN-Cu(II)-dipeptídeos (glicilglicina, dl-alanil-dl-alanina e glicil-l-leucina)  $25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,100\text{M}$  (KCl).

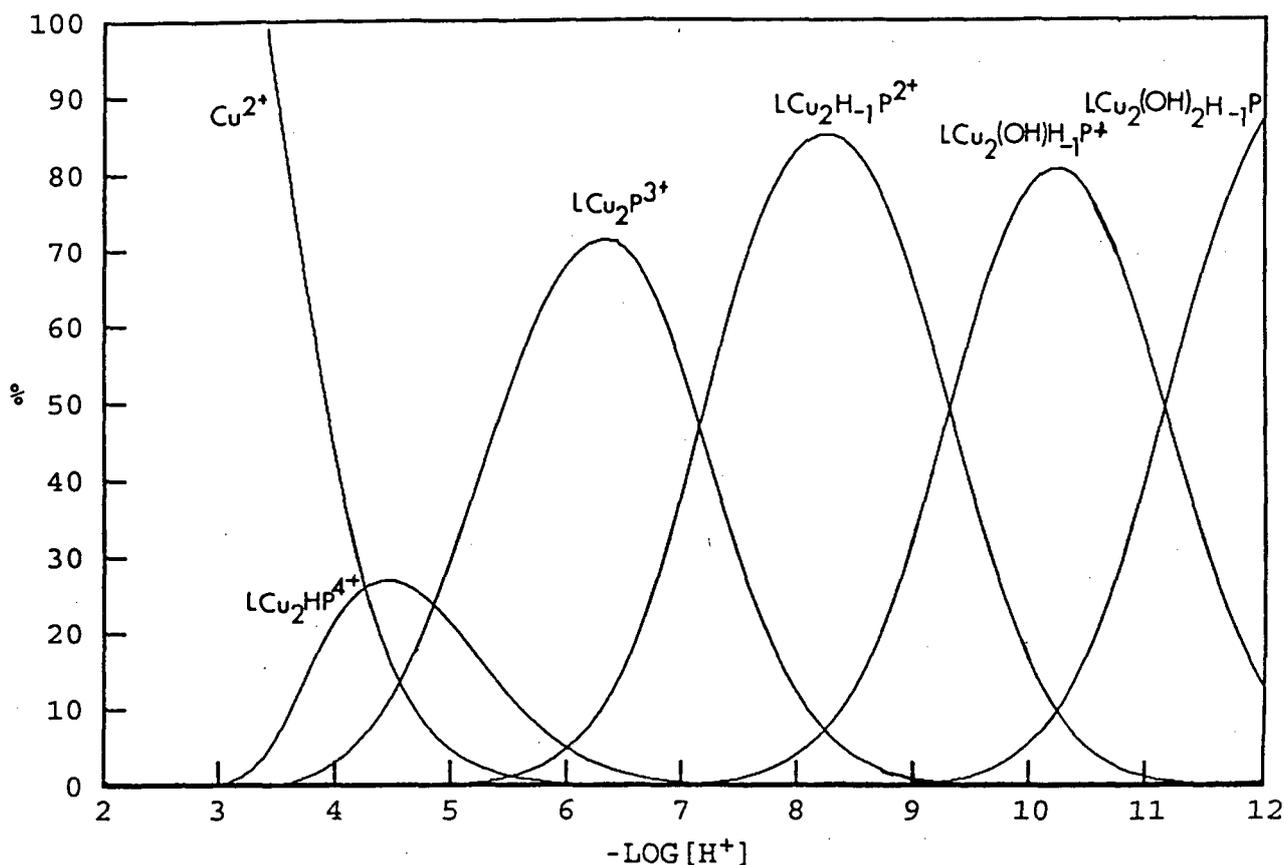
Dipeptídeo	Glicilglicina	dl-Alanil-dl-alanina	Glicil-l-leucina
	Log K	Log k	Log K
$[\text{LCu}_2\text{P}^{3+}]/[\text{Cu}_2\text{L}^{4+}][\text{P}^-]$	6,18(5)	6,18(5)	3,99(6)
$[\text{LCu}_2\text{HP}^{4+}]/[\text{LCu}_2\text{P}^{3+}][\text{H}^+]$	4,86(5)	4,79(4)	---
$[\text{LCu}_2\text{H}_{-1}\text{P}^{2+}][\text{H}^+]/[\text{LCu}_2\text{P}^{3+}]$	-7,17(6)	-7,34(5)	-7,73(6)
$[\text{LCu}_2(\text{OH})\text{H}_{-1}\text{P}^+][\text{H}^+]/[\text{LCu}_2\text{H}_{-1}\text{P}^{2+}]$	-9,32(6)	-9,33(6)	-9,78(8)
$[\text{LCu}_2(\text{OH})_2\text{H}_{-1}\text{P}][\text{H}^+]/[\text{LCu}_2(\text{OH})\text{H}_{-1}\text{P}^+]$	-11,18(8)	-11,18(6)	---

<sup>a</sup> Peptídeos desprotonados são designados por  $\text{H}_{-1}\text{P}^{2-}$ . Os números entre parênteses são os erros estimados no último algarismo significativo.

(tetraglicinato).<sup>70</sup> Estudos dos sistemas cobre(II)-histamina(A) ou l-histidina e dipeptídeos(B) também mostram que a protonação da ligação amida de dipeptídeos ocorre a  $pK^H = 7,49$  (L-glicilglicina);  $7,64$  (L = glicil-l-alanina) e  $8,06$  (L=glicil-l-leucina) para o sistema cobre(II) histamina dipeptídeo a  $37^\circ\text{C}$ . Os valores de  $pK^H$  para os sistemas cobre(II)-l-histidina-dipeptídeo a  $37^\circ\text{C}$  são  $8,71$  (L = glicilglicina);  $8,70$  (L = glicil-l-alanina);  $8,74$  (L = glicil-l-leucina).<sup>71</sup> Assim, a desprotonação do complexo  $\text{LCu}_2\text{P}^{3+}$  para formar  $\text{LCu}_2\text{H}_1\text{P}^{4+}$  (Esquema 4) é atribuído ocorrer na ligação peptídica.

A Figura 11, mostra a distribuição das espécies para o sistema glicilglicina-Cu(II)-OBISDIEN, em função do p[H]. A coordenação do peptídeo começa em p[H] 3 e o complexo  $\text{LCu}_2\text{HP}^{4+}$  atinge o máximo de formação (27%) a p[H] 4,4. A espécie  $\text{LCu}_2\text{P}$  atinge o máximo de formação (75%) a p[H] 6,3 e decresce a valores de p[H] mais altos onde a espécie amida desprotonada,  $\text{LCu}_2\text{H}_1\text{P}$ , aumenta e chega a um máximo a p[H] 8,3 onde está 85% formada. A espécie hidróxida,  $\text{LCu}_2(\text{OH})\text{H}_1\text{P}$  atinge o máximo de formação a p[H] 10,2 quando está 80,0% formada e a espécie dihidróxida predomina a valores de p[H] acima de 11.

Os espectros UV-Vis das espécies dinucleares glicilglicina-Cu(II)-OBISDIEN são mostrados na Figura 12 em vários valores de p[H]. O máximo de absorvância a 650 nm é observado a p[H] 4,18, e desloca-se para menores comprimentos de onda, quando o valor do p[H] aumenta, devido a formação das espécies amida desprotonada e hidróxidas. As curvas são semelhantes as curvas das espécies do sistema Cu(II)-OBISDIEN, mas com os valores das absorvâncias maiores. Isto é uma forte indicação de que o dipeptídeo estabiliza o arranjo dinuclear do complexo, como indicado em 27.



**Figura 11.** Curvas de distribuição das espécies do sistema OBISDIEN-Cu(II)-glicilglicina 1:2:1 em função de  $-\log [\text{H}^+]$  para uma solução inicialmente contendo OBISDIEN  $1,00 \times 10^{-3}$  M, Cu(II)  $2,00 \times 10^{-3}$  M e glicilglicina  $1,00 \times 10^{-3}$  M, em função de  $-\log [\text{H}^+]$ , onde  $\text{LCu}_2\text{P}^{3+}$ ,  $\text{HLCu}_2\text{P}^{4+}$ ,  $\text{LCu}_2\text{H}_{-1}\text{P}^{2+}$  e  $\text{LCu}_2(\text{OH})\text{H}_{-1}\text{P}^+$  e  $\text{LCu}_2(\text{OH})_2\text{H}_{-1}\text{P}$  são as espécies não-protonada, monoprotionada, amida desprotonada e hidróxidas do complexo glicilglicina-Cu(II)-OBISDIEN. O íon  $\text{Cu}^{2+}$  é o íon livre aquoso Cu(II).  $T = 25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,100\text{M}$  (KCl). % = porcentagem do  $\sum [\text{OBISDIEN}] = 100\%$ . Somente as espécies peptídeo-Cu(II)-OBISDIEN são mostradas.

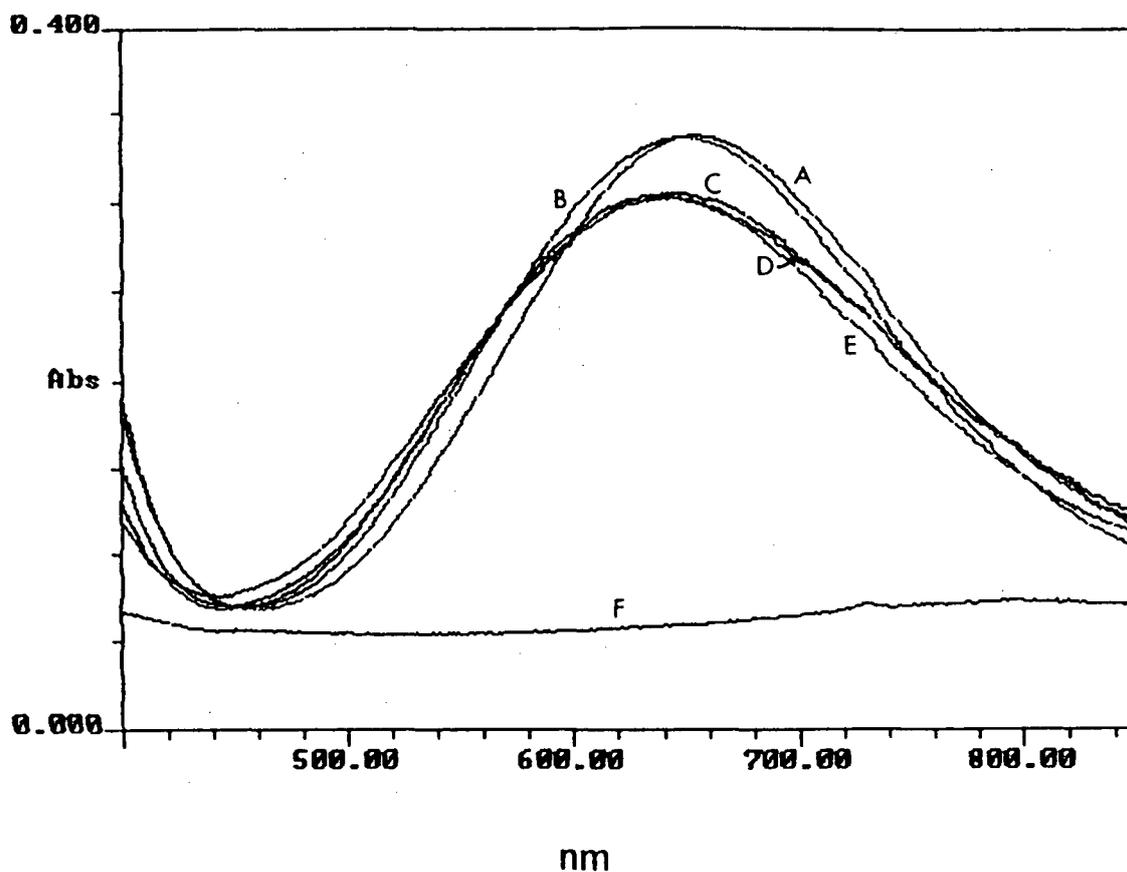
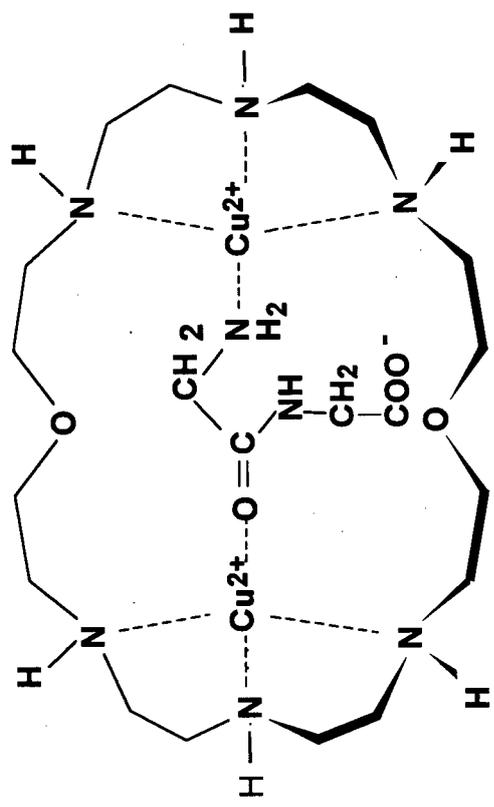


Figura 12. Espectros de UV-Vis de uma solução contendo glicilglicina  $1,02 \times 10^{-3} \text{M}$ ,  $\text{Cu(II)}$   $2,02 \times 10^{-3} \text{M}$  e OBISDIEN  $1,05 \times 10^{-3} \text{M}$ , e nos seguintes valores de p[H]: A = 4,18 ; B = 6,37 ; C = 8,51 ; D = 10,35 ; E = 11,31 e F =  $\text{Cu(NO}_3)_2$  ; T =  $25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,100 \text{M}$  (KCl).

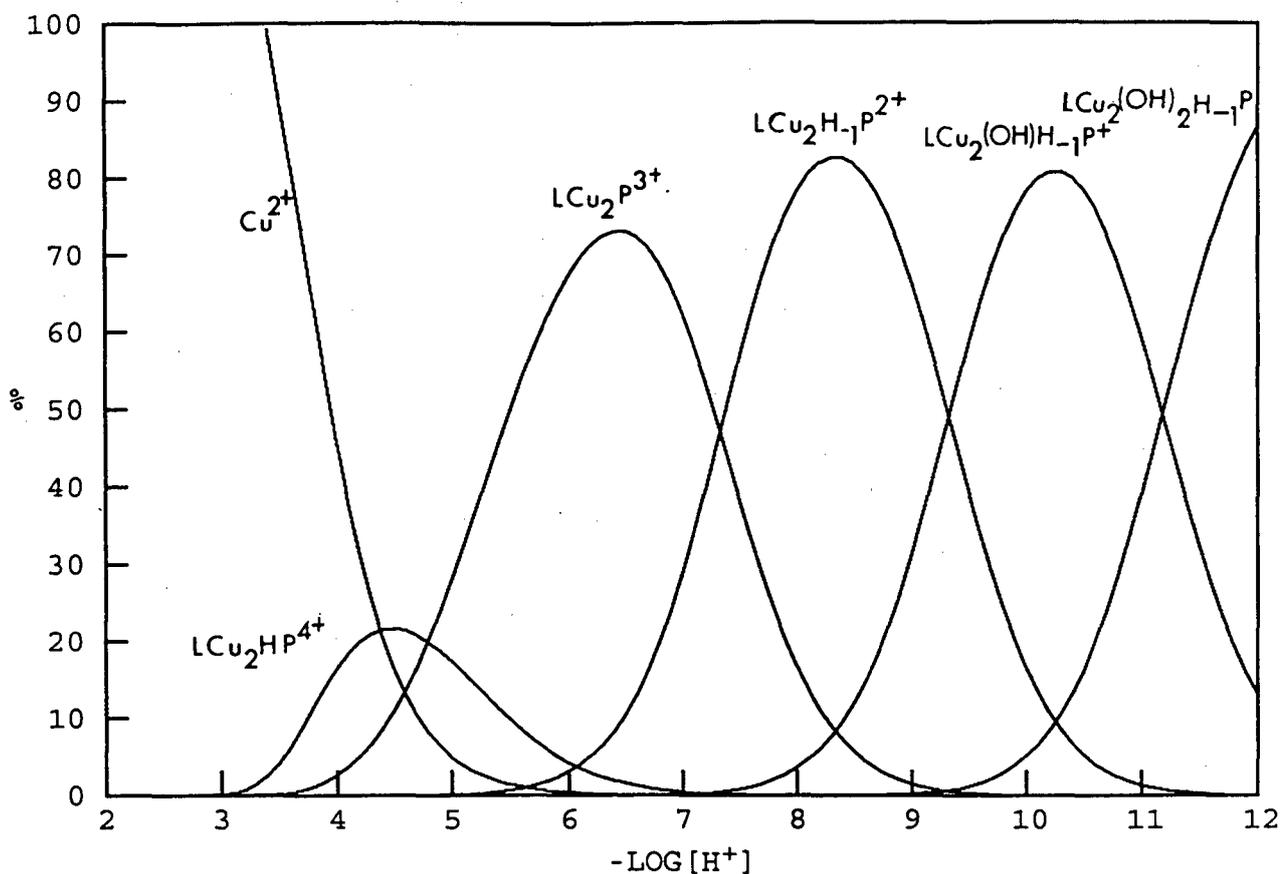


27.  $\mu$ -glicilglicina-dicobre(II)-OBISDIEN,  $\text{LCu}_2\text{P}^{4+}$

### 3.1.2. Sistema Formado pelas Espécies dl-Alanil-dl-alanina-Cu(II) OBISDIEN

As curvas de titulação potenciométrica para este sistema estão representadas na Figura 9, p. 35. Elas são similares ao sistema glicilglicina-Cu(II)-OBISDIEN. As constantes dos equilíbrios definidos pelas Equações 2-6, p.43, foram determinadas e são mostradas na Tabela VI, p. 46. Os resultados são similares aos obtidos para o sistema glicilglicina-Cu(II)-OBISDIEN, sugerindo que a presença de um metil substituinte não afeta a estabilidade do complexo. A Figura 13 mostra as curvas de distribuição das espécies para este sistema no intervalo de p[H] 2 à 12. A espécie  $LCu_2P$  é formada na faixa de p[H] 5,2 até p[H] 7,2, atingindo a um máximo a p[H] 6,4 onde está 73% formada. A espécie protonada ( $LCu_2HP$ ) aparece nos valores mais baixos de p[H] e apresenta-se 21% formada a p[H] 4,5. A espécie amida desprotonada ( $LCu_2H_{-1}P^{2+}$ ) atinge o máximo de formação (85%) a p[H] 8,2 e as espécies hidróxidas ( $LCu_2(OH)H_{-1}P$  e ( $LCu_2(OH)_2H_{-1}P$ ) predominam a valores de p[H] acima de 9,3. Elas atingem o máximo de formação a p[H] 10,2 e 12,0 quando estão 80 e 85% formadas, respectivamente.

A família das curvas de absorvância para os complexos dl-alanil-dl-alanina-Cu(II)-OBISDIEN, Figura 14, são muito similares aquelas mostradas para os complexos, glicilglicina-Cu(II)-OBISDIEN. As absorvâncias maiores para as espécies ternárias, comparado com as curvas de absorção das espécies Cu(II)-OBISDIEN, indicam também que este dipeptídeo estabiliza o arranjo dinuclear do complexo, como indicado em 28.



**Figura 13.** Curvas de distribuição de espécies do sistema 1:2:1 dl-alanil-dl-alanina-Cu(II)-OBISDIEN em função de  $-\log [H^+]$  para uma solução inicialmente contendo OBISDIEN  $1,00 \times 10^{-3}$  M, Cu(II)  $2,00 \times 10^{-3}$  M e dl-alanil-dl-alanina  $1,00 \times 10^{-3}$  M, em função de  $-\log [H^+]$ , onde  $LCu_2P^{3+}$ ,  $HLCu_2P^{4+}$ ,  $LCu_2H_{-1}P^{2+}$ ,  $LCu_2(OH)H_{-1}P^+$  são as espécies não-protonada, monoprotônica, amida desprotonada e hidróxidas do sistema dl-alanil-dl-alanina-Cu(II)-OBISDIEN. O íon  $Cu^{2+}$  é o íon livre aquoso Cu(II).  $T = 25,00 \pm 0,05^\circ C$  e  $\mu = 0,100M$  (KCl). % = porcentagem do  $\Sigma[OBISDIEN] = 100$  %. Somente espécies peptídeo-Cu(II)-OBISDIEN são mostradas.

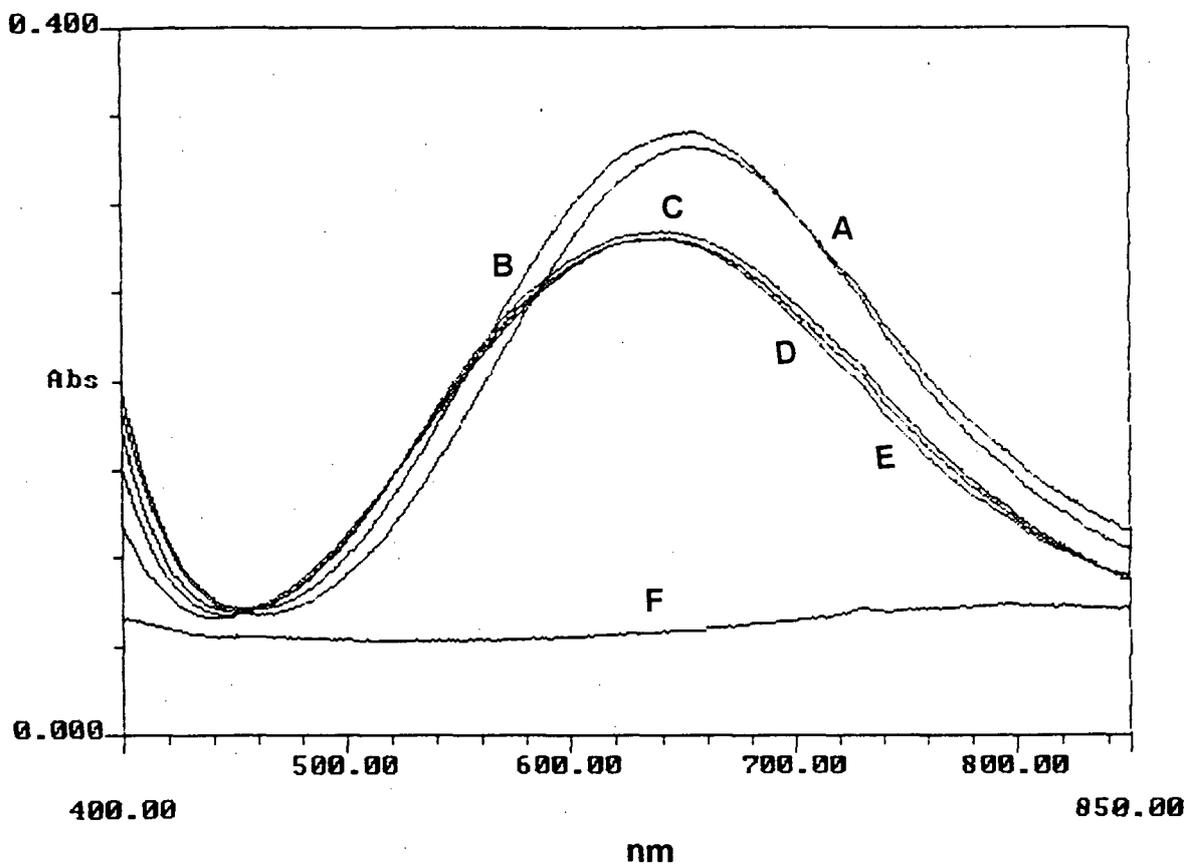
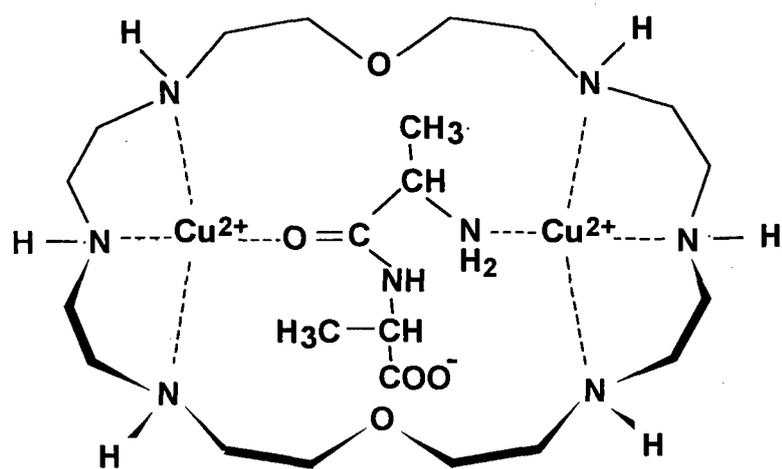


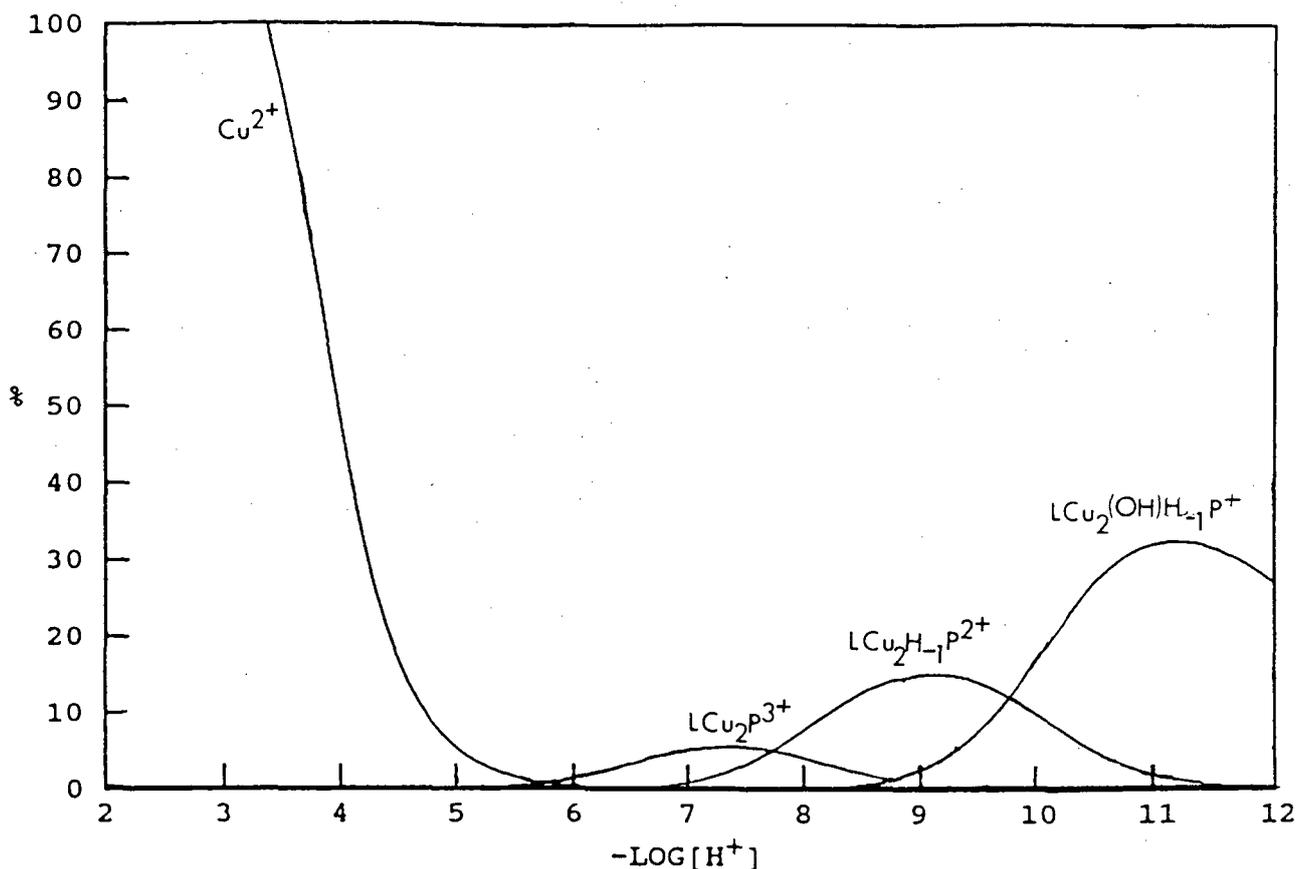
Figura 14. Espectros de UV-Vis de uma solução contendo dl-alanil-dl-alanina  $1,00 \times 10^{-3}$  M, Cu(II)  $2,02 \times 10^{-3}$  M e OBISDIEN  $1,05 \times 10^{-3}$  M, nos seguintes valores de pH: A = 4,27 ; B = 6,27 ; C = 8,39 ; D = 10,41; E = 11,26 e F = Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ; T = 25,00 ± 0,05°C e μ = 0,100 M (KCl).



28.  $\mu$ -dl-alanil-dl-alanina-dicobre(II)-OBISDIEN

### 3.1.3. Sistema Formado pelas Espécies Glicil-l-leucina-Cu(II)-OBISDIEN

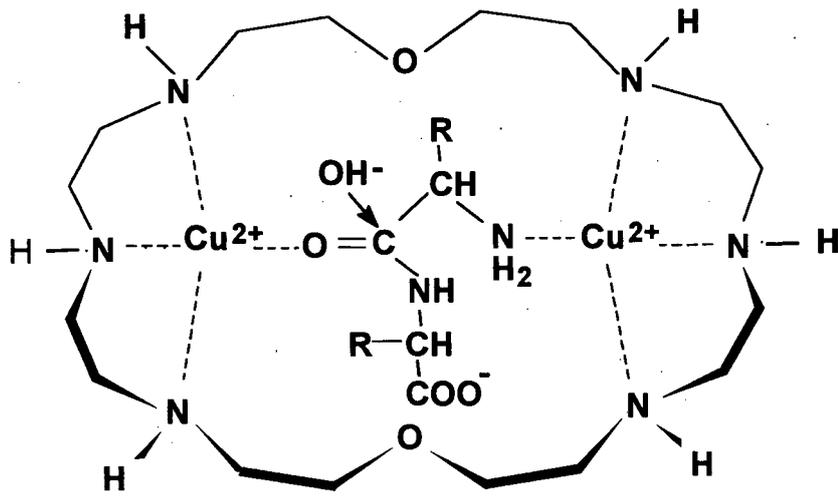
As espécies detectadas para este sistema estão representadas no Esquema 3, p. 45 e as curvas de titulações potenciométricas são mostradas na Figura 10, p.36. As constantes dos equilíbrios definidas pelas Equações 3, 5 e 6, p. 43 e 44, aparecem descritas na Tabela VI p. 46. As constantes de formação das espécies neste sistema são 2-3 unidades logarítmicas menores do que para as espécies dos sistemas glicilglicina-Cu(II)-OBISDIEN e dl-alanil-dl-alanina-Cu(II)-OBISDIEN, em contraste com os resultados observados para as interações dos dipeptídeos com Cu(II) livre, que apresentam valores de constantes dos equilíbrios similares nos três casos. A estrutura imposta pelo macrocíclico é tal que cria importantes interações espaciais com a cadeia carbônica ramificada da leucina. Como consequência de sua menor estabilidade os complexos ternários começam a se formarem a valores de p[H] mais altos, como é mostrado na Figura 15. A espécie  $LCu_2HP^{4+}$ , não se forma. O máximo de concentração da espécie  $LCu_2P^{3+}$  é somente 5,5% a  $p[H]=7,3$ . A espécie  $LCu_2H_{.1}P^{2+}$  é 15% formada a  $p[H]=9,0$ , e a espécie hidróxida  $LCu_2(OH)H_{.1}P^+$  é 32% formada a  $p[H] 11$ .



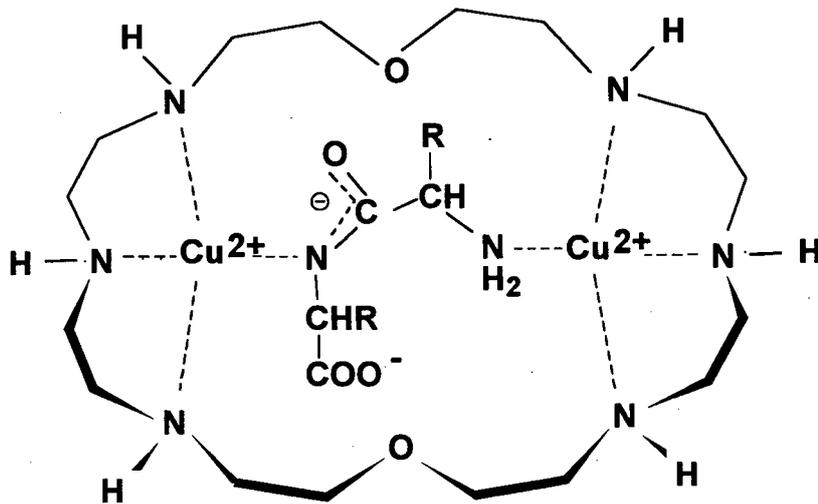
**Figura 15.** Curvas de distribuição de espécies do sistema 1:2:1 glicil-l-leucina-Cu(II)-OBISDIEN em função de  $-\log [H^+]$  para uma solução inicialmente contendo OBISDIEN  $1,00 \times 10^{-3}$  M, Cu(II)  $2,00 \times 10^{-3}$  M e glicil-l-leucina  $1,00 \times 10^{-3}$  M em função de  $-\log[H^+]$ , onde  $LCu_2P^{3+}$ ,  $LCu_2H_{-1}P^{2+}$  e  $LCu_2(OH)H_{-1}P^+$  são as espécies não-protonada, amida desprotonada e hidróxida dos complexos binucleares glicil-l-leucina-Cu(II)-OBISDIEN. O íon  $Cu^{2+}$  é o íon livre aquoso Cu(II).  $T = 25,00 \pm 0,05^\circ C$  e  $\mu = 0,100M$  (KCl). % = porcentagem do  $\Sigma[OBISDIEN] = 100$  %. Somente espécies peptídeo-Cu(II)-OBISDIEN são mostradas.

Após a caracterização das espécies presentes nos sistemas glicilglicina-Cu(II)-OBISDIEN , dl-alanil-dl-alanina-Cu(II)-OBISDIEN e glicil-l-leucina-Cu(II)-OBISDIEN através de estudos potenciométricos e espectrofotométricos UV-vis, as condições adequadas para os estudos cinéticos ficam identificadas. O modo de ativação esperado para o substrato dipeptídeo é indicado na fórmula 29. O grupo amino terminal e o oxigênio carbonílico do grupo amida estão coordenados aos dois centros metálicos. A ativação do grupo carbonila pela coordenação deste ao íon Cu(II), aumenta a carga positiva sobre o carbono carbonílico, favorecendo o ataque de um reagente nucleofílico tal como o íon hidróxido. O arranjo sugerido do dipeptídeo na cavidade do complexo receptor em 22 e 23 (Esquema 3, p.45) é mostrado com mais detalhe na fórmula 29. Estas espécies são esperadas serem ativas na reação de hidrólise. A reação pode ser mais difícil em 24, 25 e 26 onde a ligação peptídica está desprotonada e estabilizada pela coordenação ao íon metálico, como indicado em 30.

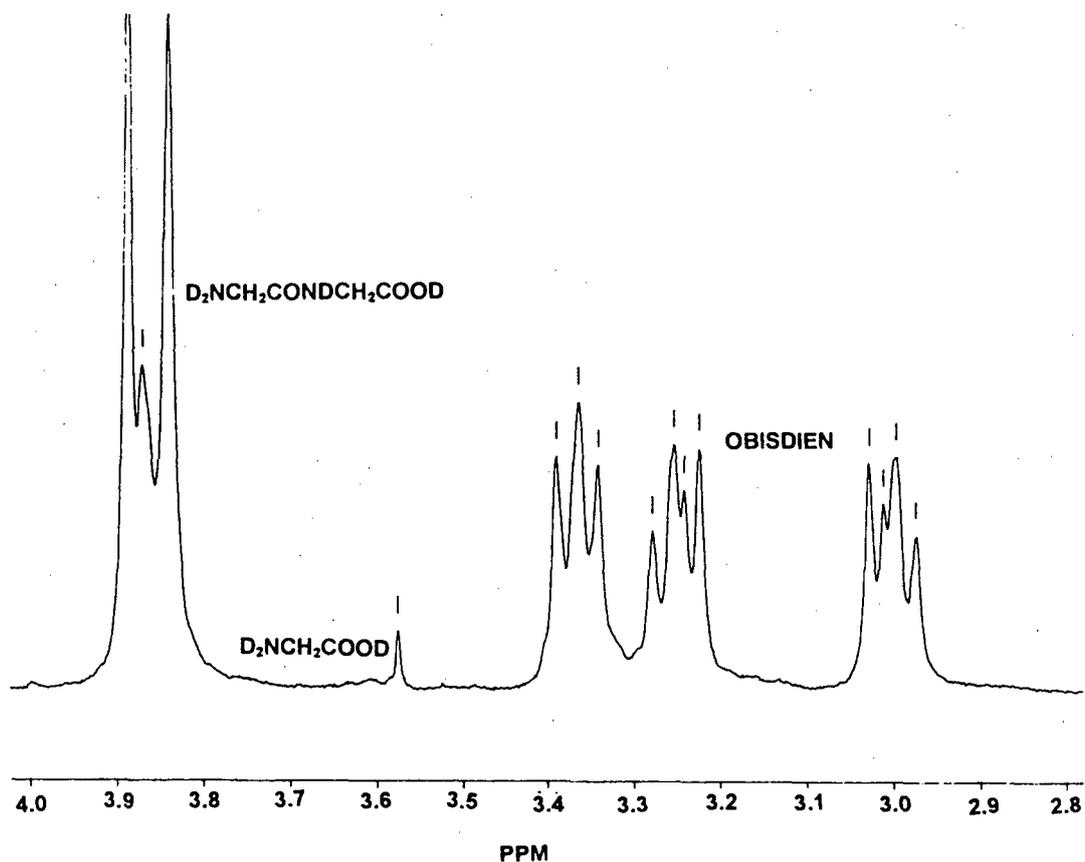
O produto da reação de hidrólise do dipeptídeo glicilglicina catalisada pelo complexo macrocíclico binuclear Cu(II)-OBISDIEN a p[D] 4,02 foi caracterizado por RMN do próton. A Figura 16 mostra o singlete da glicina próximo a 3,57 ppm.



29



30



**Figura 16.** Espectro de 200 MHz RMN do próton em  $D_2O$  do sistema 1:2:1 de glicilglicina-Cu(II)-OBISDIEN para uma solução extraída por precipitação do íon Cu(II) de uma solução inicial contendo, glicilglicina 0,01M, Cu(II) 0,02M e OBISDIEN 0,01M, a  $p[D] = 6,01$ , mostrando a formação do produto glicina, depois de 71 horas de reação.  $T = 80,0 \pm 0,2 \text{ } ^\circ\text{C}$  ;  $p[D] 4,02$  e  $\mu = 0,100\text{M}$  (KCl).

### 3.2. Estudo de Equilíbrio Potenciométrico dos Sistemas OBISDIEN-Zn(II)-Peptídeos (glicilglicina, dl-alanil-dl-alanina e glicil-l-leucina).

Complexos Zinco(II)-OBISDIEN, mononucleares e dinucleares, protonados e não protonados foram investigados sob as condições deste trabalho conforme descrito na seção experimental, p. 29. Os resultados aparecem na Tabela VII, onde os valores da literatura são listados para comparação. As interações do ligante com o íon brometo também foram calculadas e consideradas para os cálculos das constantes.<sup>74</sup> As constantes de complexação dos dipeptídeos, glicilglicina e dl-alanil-dl-alanina, com íon zinco(II) definidas pelas Equações 7-10 foram determinadas e são mostradas na Tabela VIII. Os valores das constantes de complexação da glicilglicina são comparados com os valores da literatura. As curvas potenciométricas referentes a estes sistemas são mostrados nas Figuras 17 e 18, sendo a curva A referente à titulação potenciométrica do dipeptídeo e a curva B o resultado da titulação potenciométrica do sistema peptídeo-zinco(II).

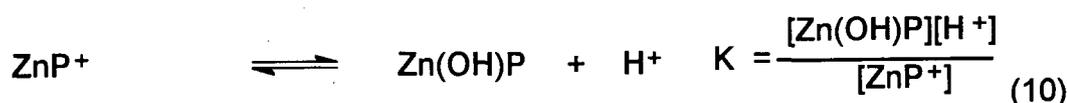
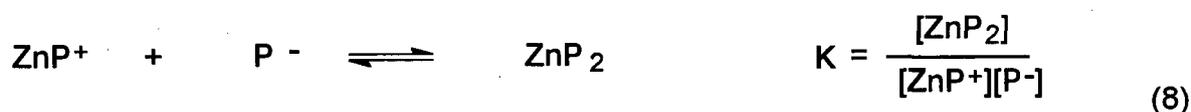


Tabela VII. Logarítmos das constantes de estabilidade dos complexos Zn(II)-OBISDIEN em solução aquosa a  $25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,100$  (KCl).

Quociente de Equilíbrio	Zn(II)-OBISDIEN	
	Log K <sup>a</sup>	Log K <sup>b</sup>
$[\text{ZnL}]/[\text{Zn}][\text{L}]$	10,31	10,66(1)
$[\text{ZnHL}]/[\text{ZnL}][\text{H}^+]$	8,06	7,58(1)
$[\text{ZnH}_2\text{L}]/[\text{ZnHL}][\text{H}]$	5,71	5,63(1)
$[\text{ZnOHL}][\text{H}^+]/[\text{ZnL}]$	-9,16	-10,13(1)
$[\text{Zn}_2\text{L}]/[\text{Zn}][\text{ZnL}]$	4,16	4,20
$[\text{Zn}_2\text{OHL}][\text{H}]/[\text{Zn}_2\text{L}]$	-6,38	>-7 <sup>d</sup>
$[\text{Zn}_2(\text{OH})_2\text{L}][\text{H}]/[\text{Zn}_2(\text{OH})\text{L}]$	-7,73	c

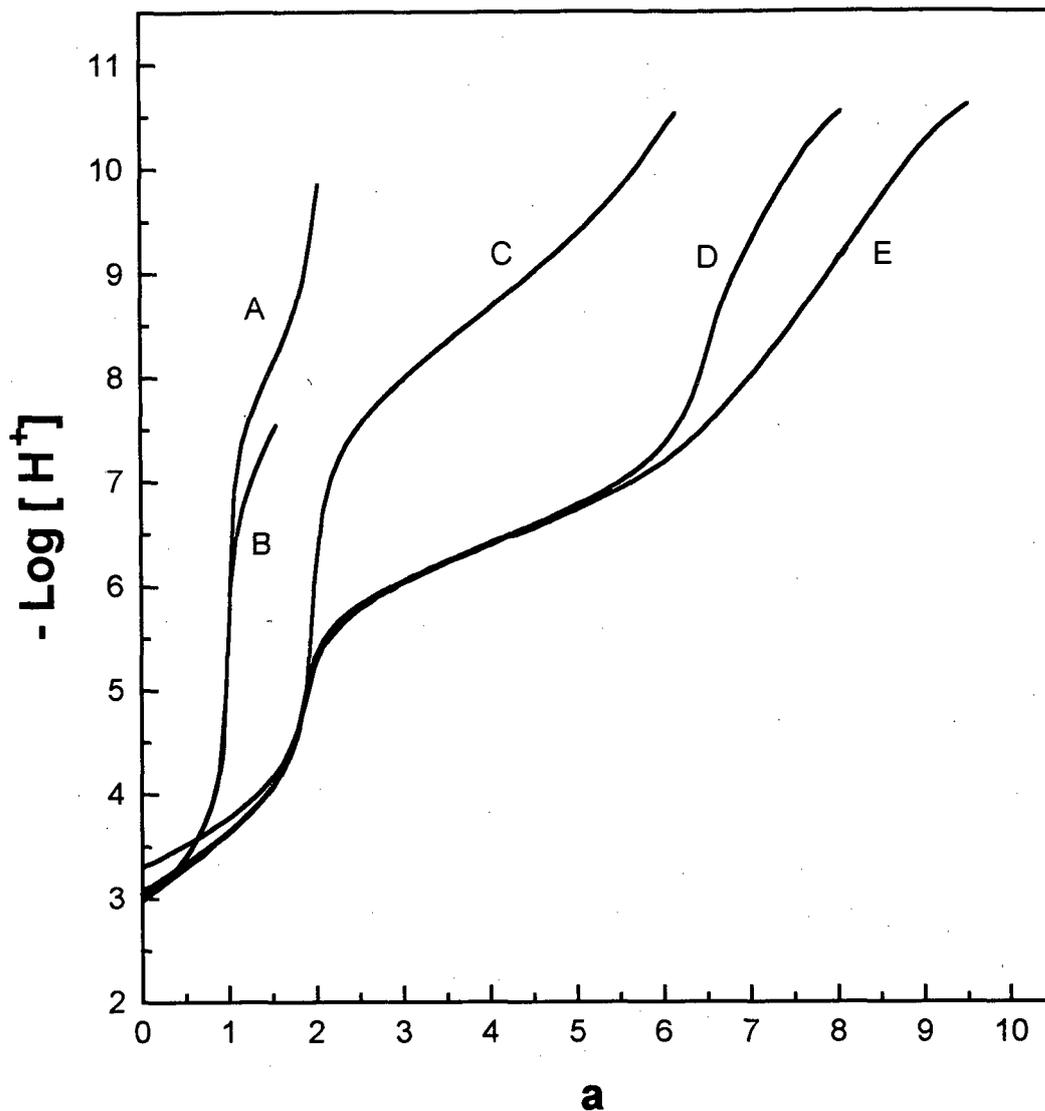
<sup>a</sup>  $\sigma$  fit = 0,009336 , <sup>b</sup> Referência 36, Os números entre parênteses são os erros estimados no último algarismo significativo.

Tabela VIII. Logaritmos das constantes de complexação da glicilglicina e di-alanil-dl-alanina com o íon zinco (II) a  $25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,100$  (KCl).

*ref.*

Quociente de Equilíbrio	Zn(II)-glicilglicina		Zn(II)-di-alanil-dl-alanina
	Log K	Log K <sup>a</sup>	Log K
$[\text{ZnP}^+]/[\text{Zn}^{2+}][\text{P}]$	3,52	3,44 <sup>b</sup>	3,61
$[\text{ZnP}_2]/[\text{ZnP}][\text{P}]$	6,20	6,31 <sup>b</sup>	6,21
$[\text{ZnHP}]/[\text{ZnP}][\text{H}^+]$	6,27	5,60 <sup>c</sup>	6,08
$[\text{ZnOHP}][\text{H}^+]/[\text{ZnP}]$	8,51	8,24 <sup>d</sup>	8,20

<sup>a</sup> Referência 68, <sup>b</sup>  $25^\circ\text{C}$ ,  $\mu = 0,1$ , <sup>c</sup>  $25^\circ\text{C}$ ,  $\mu = 0,7$ , <sup>d</sup>  $37^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,15$   
 $\rho_{\text{fit}} =$  <sup>b</sup>  $= 0,00974$ ,  $\rho_{\text{fit}}$  <sup>c</sup>  $= 0,00756$



**Figura 17.** Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN a  $25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,100\text{M}$  (KCl). A - 0,11231mmol de glicilglicina em 50,00 ml de solução; B - 0,12429 mmol de glicilglicina e 0,0979 mmol de Zn(II) em 50,00 ml de solução; C - 0,10564 mmol de OBISDIEN em 50,00 ml de solução; D - 0,10564 mmol de OBISDIEN e 0,17955 mmol de Zn(II) em 66,17 ml de solução; E - 0,10564 mmol de OBISDIEN, 0,17955 mmol de Zn(II) e 0,1064 mmol de glicilglicina em 77,76 ml de solução ( $a$  = moles de KOH por mol de ligante).

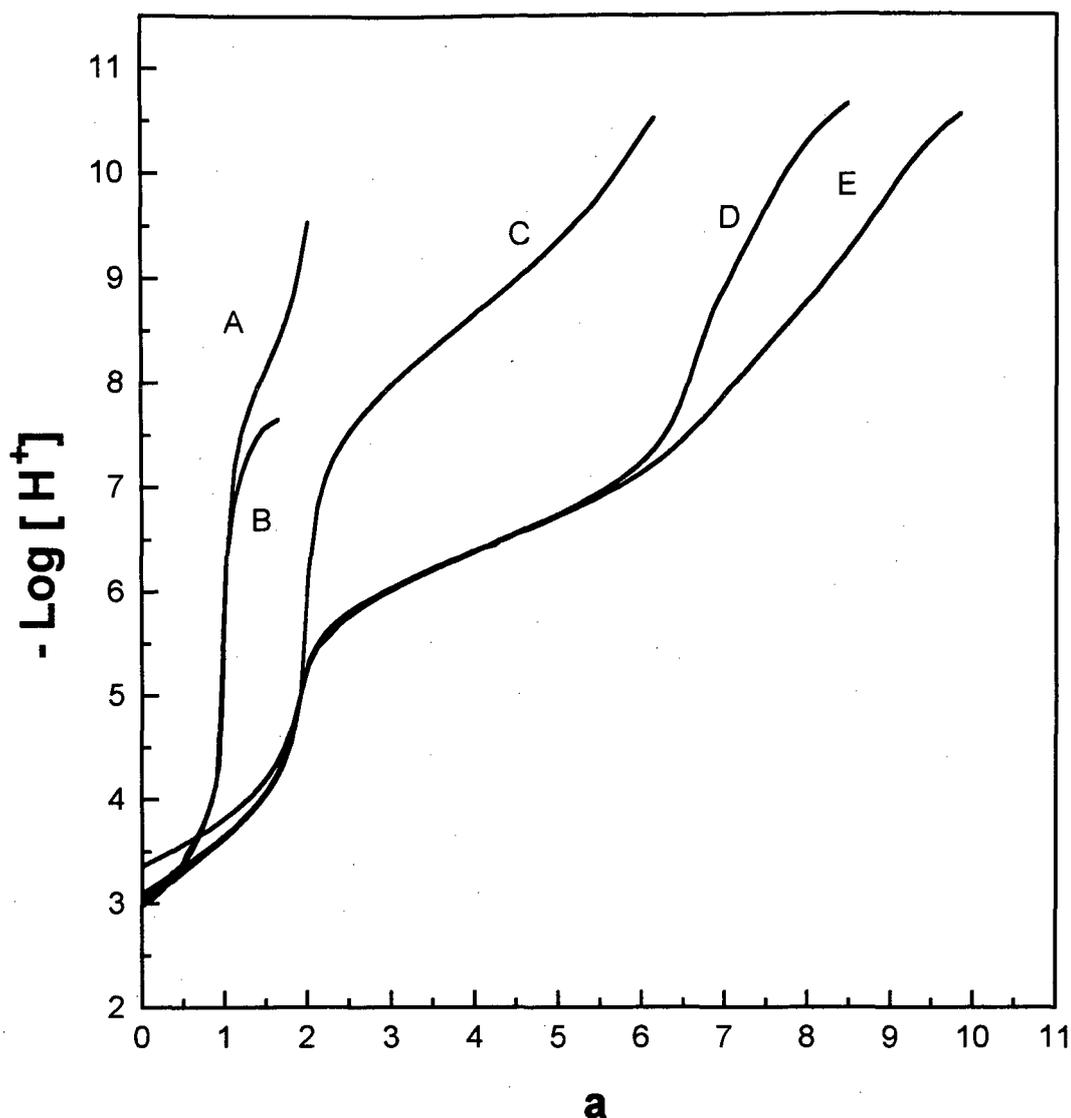


Figura 18. Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema dl-alanil-dl-alanina-Zn(II)-OBISDIEN a  $25,00 \pm 0,05$  °C e  $\mu = 0,100$ M (KCl). A - 0,11207 mmol de dl-alanil-dl-alanina em 50,00 ml de solução; B - 0,1116 mmol de dl-alanil-dl-alanina e 0,09975 mmol de Zn(II) em 50,00 ml de solução; C - 0,09880 mmol de OBISDIEN em 50,00 ml de solução; D - 0,09880 mmol de OBISDIEN e 0,17955 mmol de Zn(II) em 64,10 ml de solução; E - 0,09880 mmol de OBISDIEN, 0,17955 mmol de Zn(II) e 0,11036 mmol de dl-alanil-dl-alanina em 76,80 ml de solução (a = moles de KOH por mol de ligante).

Depois de testar várias combinações de espécies prováveis, as espécies definidas pelos equilíbrios (Equações 11-15), foram derivadas a partir dos dados das titulações potenciométricas sob as condições experimentais deste trabalho.  $Zn_2L^{4+}$  é o complexo receptor dinuclear Zn(II)-OBISDIEN e  $P^-$  é a forma desprotonada dos dipeptídeos glicilglicina e di-alanil-di-alanina.



$$K = \frac{[LZn_2P^{3+}]}{[LZn_2P^{4+}][P^-]} \quad (11)$$



$$K_1^H = \frac{[LZn_2HP^{4+}]}{[LZn_2P^{3+}][H^+]} \quad (12)$$



$$K_1^{OH} = \frac{[LZn_2(OH)P^{2+}][H^+]}{[LZn_2P^{3+}]} \quad (13)$$



$$K_2^{OH} = \frac{[LZn_2(OH)_2P^+][H^+]}{[LZn_2(OH)P^{2+}]} \quad (14)$$

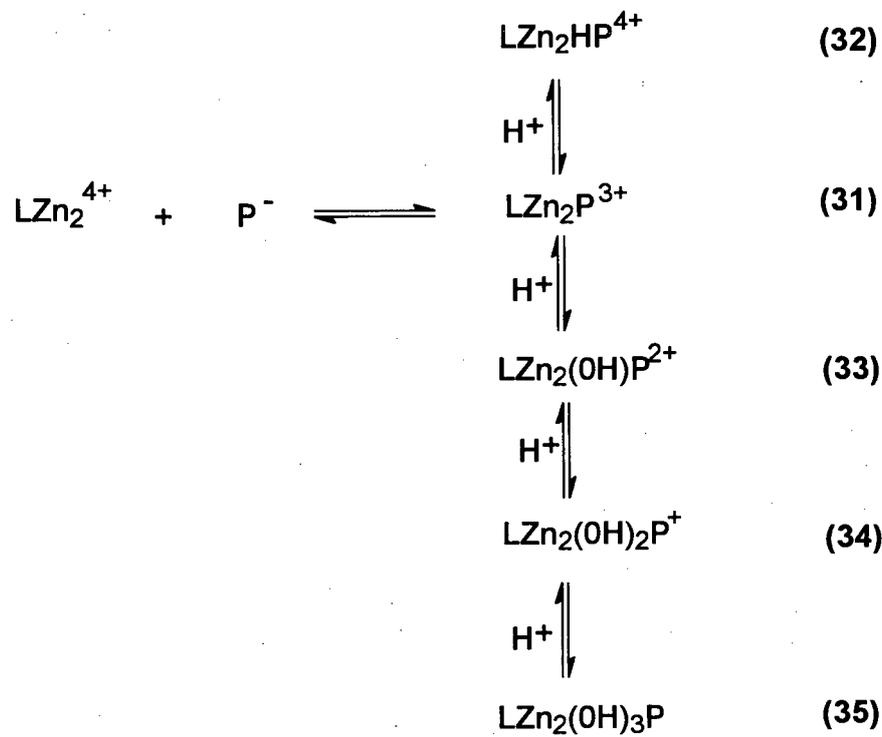


$$K_3^{\text{OH}} = \frac{[\text{LZn}_2(\text{OH})_3\text{P}] [\text{H}^+]}{[\text{LZn}_2(\text{OH})_2\text{P}^+]} \quad (15)$$

### 3.2.1. Sistema Formado pelas Espécies Glicilglicina - Zn(II)-OBISDIEN

A curva de equilíbrio potenciométrico para a formação do complexo binuclear glicilglicina-OBISDIEN- Zn(II) na razão 1:2:1 , é mostrada na Figura 17, p.63 (curva E). A inflexão desta curva indica que além do consumo de seis prótons referentes ao macrocíclico OBISDIEN (a = 6) uma quantidade adicional de base foi utilizada (a=3) indicando a formação de espécies hidróxidas. As curvas A, B, C e D na Figura 17 referem-se aos sistemas glicilglicina, glicilglicina - Zn(II), OBISDIEN e Zn(II)-OBISDIEN respectivamente. A curva B, referente a titulação da glicilglicina-Zn(II), termina bruscamente devido a precipitação da solução e o experimento foi interrompido. Analisando as curvas, as seguintes espécies foram encontradas:  $\text{LZn}_2\text{P}^{4+}$ ,  $\text{LZn}_2\text{HP}^{3+}$ ,  $\text{LZn}_2(\text{OH})_n\text{P}^{3-x}$ ,  $x = 1, 2$  e  $3$ , onde  $\text{LZn}_2\text{P}^{3+}$ , é o complexo  $\mu$ -peptídeo-dizinc(II)-OBISDIEN,  $\text{LZn}_2\text{HP}^{3+}$  é a espécie protonada e  $\text{LZn}_2(\text{OH})_n\text{P}^{3-x}$  são as espécies hidróxidas.

O Esquema 5 mostra as espécies em equilíbrio neste sistema e os valores das constantes de equilíbrio são listadas na Tabela IX. A constante de formação da espécie  $\text{LZn}_2\text{P}^{3+}$  é um pouco mais elevada quando comparada ao sistema dl-alanil-dl-alanina. A protonação deste complexo (Log K = 6,65) deve ocorrer no grupo terminal amino do dipeptídeo, pois o grupo carboxilato estando coordenado à um dos centros metálicos como indicado em 36 não poderia ser protonado, além de, o valor de Log K = 6,65 ser um tanto elevado para a protonação do grupo carboxilato.

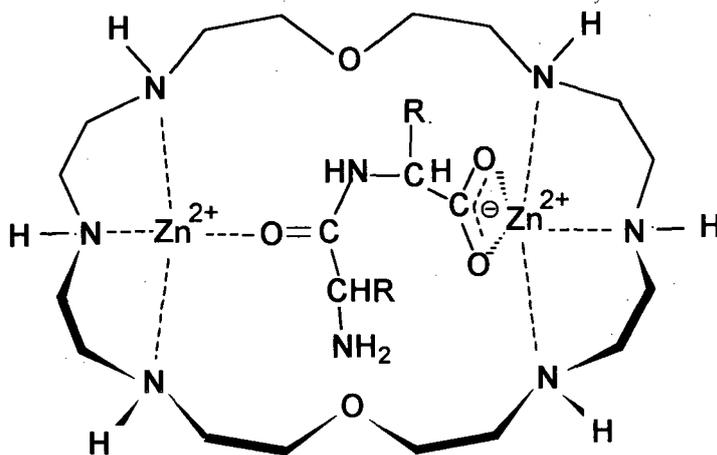


ESQUEMA 5

Tabela IX. Logarítmo das constantes de equilíbrio para os complexos ternários, OBISDIEN-Zn(II)-dipeptídeos (Glicilglicina e dl-alanil-dl-alanina) a  $25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,100$  (KCl).

Quociente de Equilíbrio	Glicilglicina Log K <sup>a</sup>	dl-alanil-dl-alanina Log K <sup>b</sup>
$[\text{LZn}_2\text{P}^{3+}]/[\text{LZn}_2^{4+}][\text{P}]$	4,87	4,68
$[\text{LZn}_2\text{HP}^{4+}]/[\text{LZn}_2\text{P}^{3+}][\text{H}^+]$	6,65	6,83
$[\text{LZn}_2(\text{OH})\text{P}^{2+}][\text{H}^+]/[\text{LZn}_2\text{P}^{3+}]$	-7,65	-8,03
$[\text{LZn}_2(\text{OH})_2\text{P}^+][\text{H}^+]/[\text{LZn}_2(\text{OH})\text{P}^{2+}]$	-9,27	-8,85
$[\text{LZn}_2(\text{OH})_3\text{P}][\text{H}^+]/[\text{LZn}_2(\text{OH})\text{P}^+]$	-10,50	-10,29

$\rho$  fit <sup>a</sup> = 0,014521    <sup>b</sup> = 0,012592

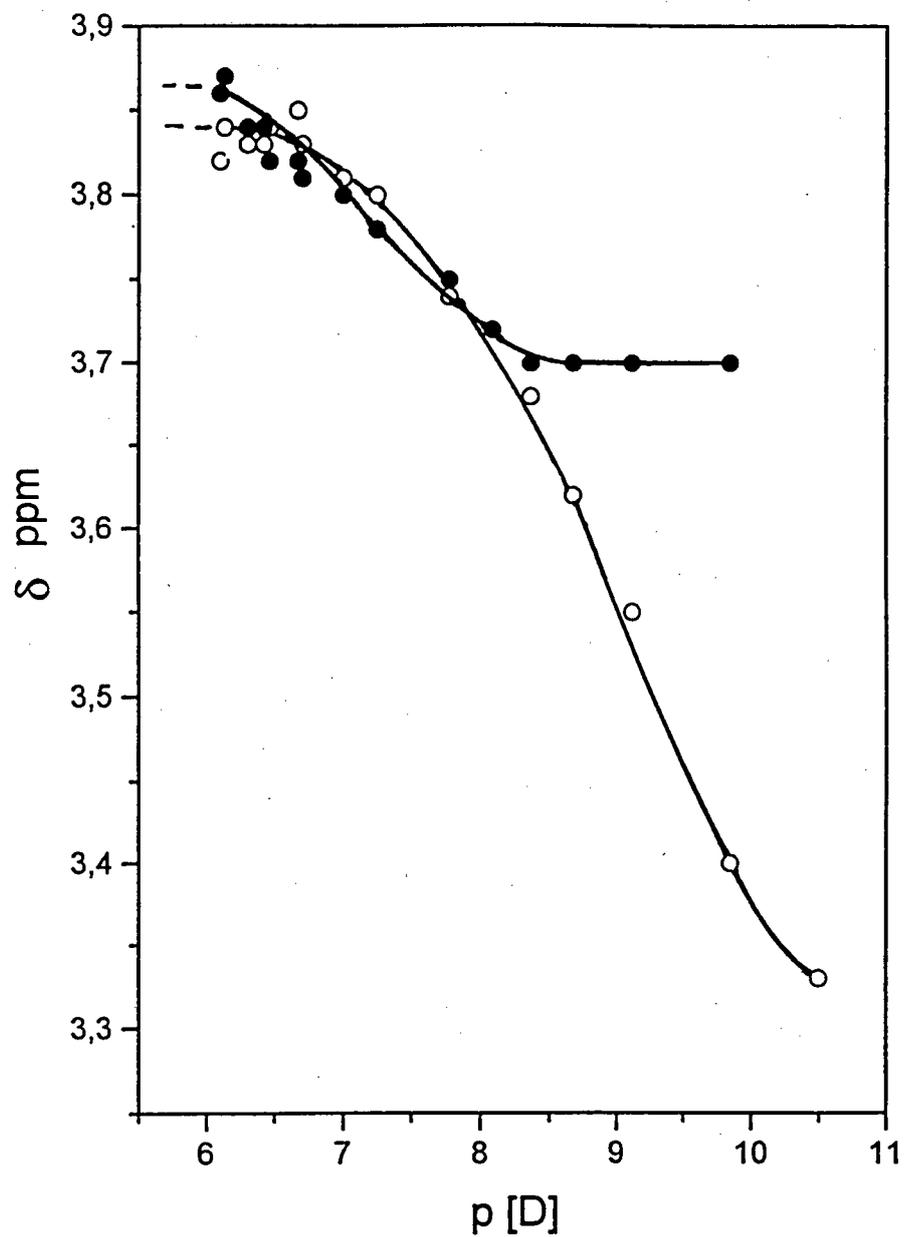


36

Para verificar se a protonação ocorre no grupo amino terminal do dipeptídeo complexado ou em um dos grupos aminos do macrocíclico, foi medida em função do  $p[H]$ , a variação do deslocamento químico da ressonância dos prótons  $CH_2$  adjacentes ao grupo amino da glicilglicina,  $NCH_2$ , livre e complexada (Figura 19). O valor de  $\log K$  encontrado na curva foi 8,7 para a glicilglicina livre e 7,3 para a glicilglicina complexada, respectivamente.

Constantes de protonação determinadas em  $D_2O$  e  $H_2O$  para muitos ligantes diferem de mais ou menos 0,5 - 0,7 unidades logarítmicas, uma variação que foi demonstrada estar de acordo com Equação 16.<sup>72</sup>

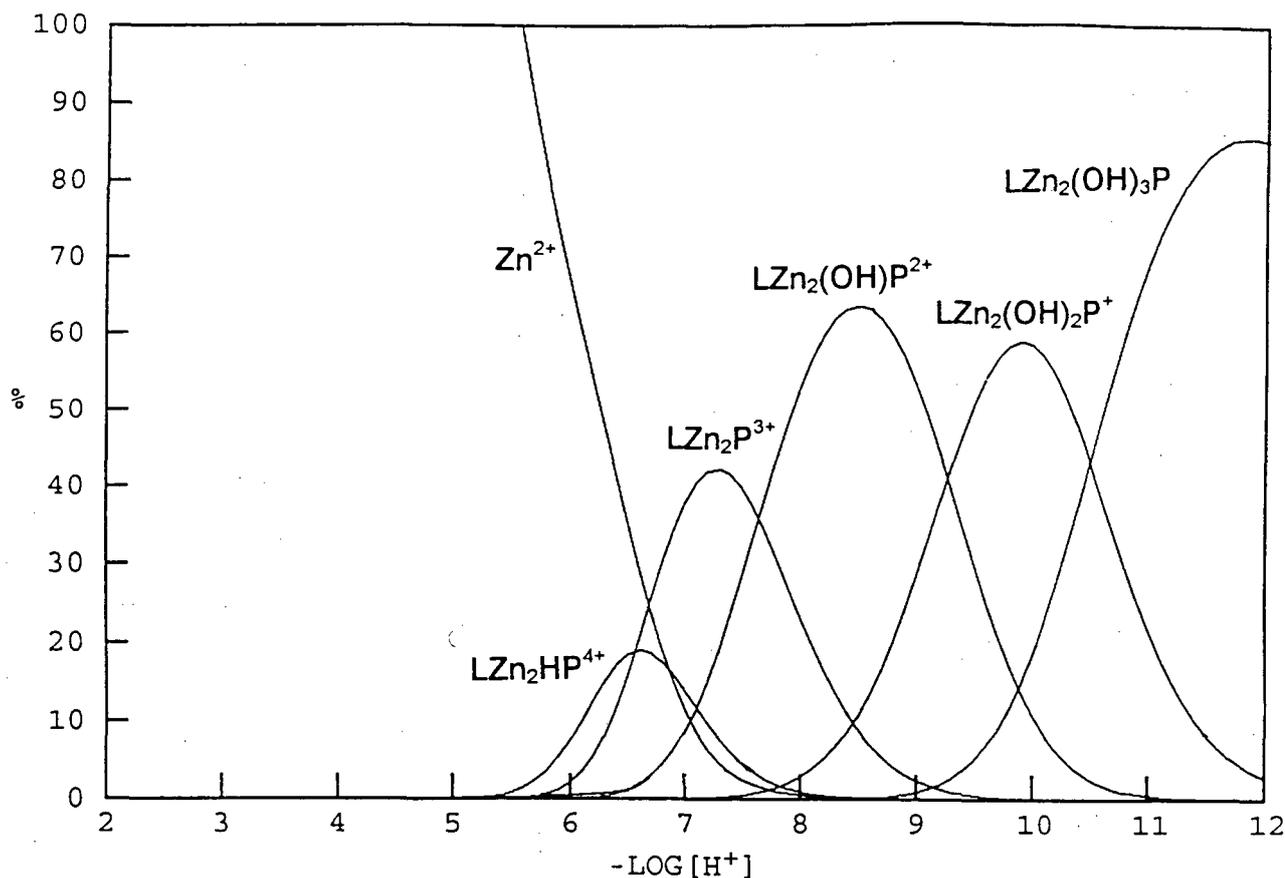
$$pK(D_2O) - pK(H_2O) = 0,41 + 0,020 pK(H_2O) \quad (16)$$



**Figura 19.** Variação do deslocamento químico da ressonância nuclear magnética dos prótons  $\text{CH}_2$  adjacente ao grupo amino terminal do complexo glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN (●) e glicilglicina (○).  $T = 25,00 \pm 0,05 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $\mu = 0,10\text{M}$  (KCl).

Subtraindo 0,6 de 7,3 tem-se um valor bem próximo de 6,65 que foi o valor encontrado por potenciometria para Log K em H<sub>2</sub>O. Portanto, o resultado indica que a protonação do complexo  $\mu$ -glicilglicina dizinco(II)-OBISDIEN (Estrutura 36, p. 70) ocorre no grupo amino terminal do dipeptídeo.

A Figura 20 mostra a distribuição das espécies para o sistema glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN. As espécie ternárias começam a se formar à p[H] 5,5, aumentando rapidamente a valores de p[H] mais altos. A espécie protonada é 18,9% formada a p[H] 6,6 e a espécie não-protonada está 42,3% formada a p[H] 7,3. Acima de p[H] 7,6 predominam as espécies hidróxidas. A espécie monohidróxida é 63,5% formada a p[H] 8,5, a dihidróxida está 58,9% formada a p[H] 9,9 e a espécie trihidróxida é 85,5% formada a p[H] 11,8.



**Figura 20.** Curvas de distribuição de espécies do sistema 1:2:1 glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN em função de  $-\log [H^+]$  para uma solução inicialmente contendo OBISDIEN  $1,00 \times 10^{-2}$  M, Cu(II)  $2,00 \times 10^{-2}$  M e glicilglicina  $1,00 \times 10^{-2}$  M em função de  $-\log[H^+]$ , onde  $LZn_2P^{3+}$ ,  $HLZn_2P^{4+}$ ,  $LCu_2(OH)P^{2+}$  e  $LCu_2(OH)_2P^+$  e  $LCu_2(OH)_3P$  são as espécies não-protonada, monoprotionada, e hidróxidas dos complexos glicilglicina Zn(II)-OBISDIEN. O íon  $Zn^{2+}$  é o íon livre aquoso Zn(II).  $T = 25,00 \pm 0,05^\circ C$  e  $\mu = 0,100M$  (KCl). % = porcentagem do  $\sum [OBISDIEN] = 100\%$ . Somente as espécies peptídeo-Zn(II)-OBISDIEN são mostradas.

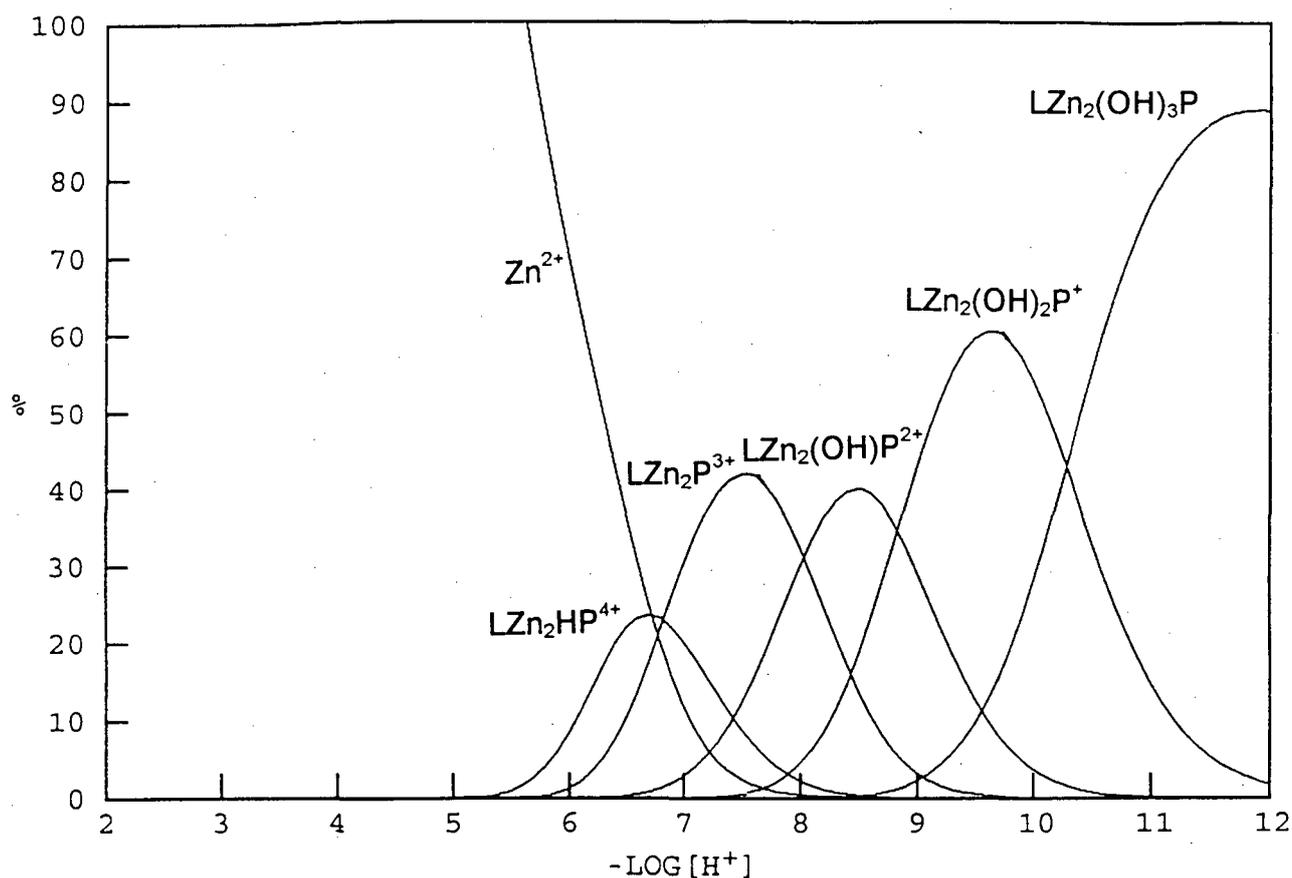
### **3.2.2. Sistema Formado pelas Espécies dl-alanil-dl-alanina-Zn(II)-OBISDIEN.**

As curvas de titulação potenciométrica para este sistema são mostradas na Figura 18, p.64. Elas são similares as curvas obtidas para o sistema glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN. As constantes de equilíbrio definidas pelas Equações 10-14, p. 65 e 66, foram determinadas e aparecem na Tabela IX, p. 68.

As curvas de distribuição das espécies para este sistema são mostradas na Figura 21. A espécie não-protonada ( $LZn_2P^{3+}$ ) atinge o máximo de formação a  $p[H]$  7,5 quando está 41,9% formada e a espécie protonada ( $LZn_2HP^{4+}$ ) atinge um máximo de formação a  $p[H]$  6,7; quando está 23,5% formada. As espécies mono-, di-, e trihidróxidas atingem o percentual máximo de formação a valores de  $p[H]$  8,5; 9,6 e 11,9; quando estão 40,0; 60,2 e 88,7 % formadas, respectivamente.

### **3.2.3 Sistema Formado pelas Espécies Glicil-l-leucina-Zn(II)-OBISDIEN.**

O dipeptídeo glicil-l-leucina foi usado no lugar da dl-alanil-dl-alanina e o complexo ternário não foi detectado em quantidade apreciável, provavelmente devido ao efeito de impedimento do resíduo de aminoácido leucina, o qual dificulta por impedimento espacial este dipeptídeo de coordenar-se ao centro metálico na cavidade do complexo receptor binuclear Zn(II)-OBISDIEN.



**Figura 21.** Curvas de distribuição de espécies do sistema 1:2:1 dl-alanil-dl-alanina-Zn(II)-OBISDIEN em função de  $-\log [H^+]$  para uma solução inicialmente contendo OBISDIEN  $1,00 \times 10^{-2}$  M, Zn(II)  $2,00 \times 10^{-2}$  M e dl-alanil-dl-alanina  $1,00 \times 10^{-2}$  M em função de  $-\log [H^+]$ , onde  $LZn_2P^{3+}$ ,  $HLZn_2P^{4+}$ ,  $LZn_2(OH)P^{2+}$ ,  $LZn_2(OH)_2P^+$ ,  $LZn_2(OH)_3P$  são as espécies não-protonada, monoprotonada, e hidróxidas dos complexos binucleares dl-alanil-dl-alanina-Zn(II)-OBISDIEN. O íon  $Cu^{2+}$  é o íon livre aquoso Cu(II).  $T = 25,00 \pm 0,05^\circ C$  e  $\mu = 0,100M$  (KCl). % = porcentagem do  $\Sigma[OBISDIEN] = 100$  %. Somente espécies peptídeo-Cu(II)-OBISDIEN são mostradas.

### 3.3. Estudo Cinético das Reações de Hidrólise e Deuteração do Dipeptídeo Glicilglicina Catalisada pelo Complexo Binuclear Zn(II)-OBISDIEN.

No sistema glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN foram observadas duas reações paralelas: a deuteração de um dos CH<sub>2</sub> da glicilglicina, o NCH<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub> adjacente ao grupo amino) e a hidrólise da ligação peptídica, a quebra da ligação C – N. O espectro de RMN do próton do sistema glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN a p[D] 8,37, Figura 22, mostra uma ressonância a 3,75 ppm devida ao CH<sub>2</sub> adjacente ao grupo amino (NCH<sub>2</sub>) e uma ressonância a 3,85 ppm devida ao CH<sub>2</sub> adjacente ao grupo carboxilato (CCH<sub>2</sub>) da glicilglicina. A reação de deuteração foi seguida segundo a sequência A, B e C mostradas nas Figuras 22 e 23. O produto da reação de hidrólise aparece, como um singlete a 3,47 ppm.

Segundo Moore e Pearson <sup>74</sup> duas reações paralelas de 1ª ordem são definidas pelas Equações 17 -26,



sendo A, a concentração correspondente de reagente, A<sub>0</sub> a concentração inicial e U e V as concentrações correspondentes dos produtos, aminoácido e peptídeo deuturado respectivamente, e  $k = k_1 + k_2$

$$\begin{aligned} \frac{-dA}{dt} &= k_1A + k_2A \\ &= (k_1 + k_2) A = k A \end{aligned} \quad (19)$$

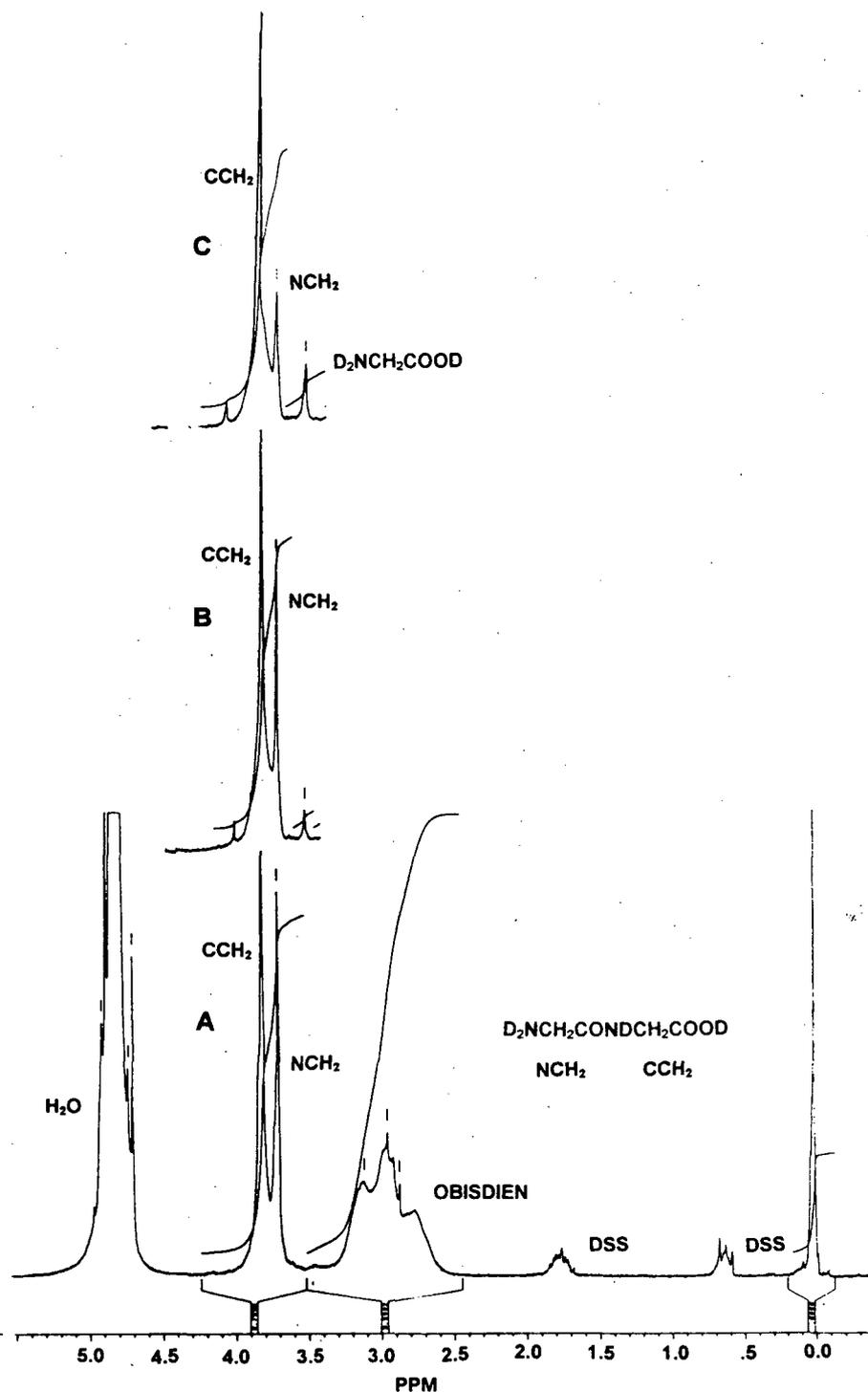


Figura 22. Espectro de 200 MHz RMN do próton do sistema 1:2:1 glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN para uma solução inicialmente contendo OBISDIEN  $1,00 \times 10^{-2}$  M, Zn(II)  $1,8 \times 10^{-2}$  M e glicilglicina  $1,6 \times 10^{-2}$  M em p[D] 8,37; mostrando o decréscimo do sinal do NCH<sub>2</sub> e o aparecimento da ressonância dos prótons do CH<sub>2</sub> da glicina, A = zero ; B = depois de 91 h e 30 min. ; C = depois de 210 h e 30 min. em D<sub>2</sub>O (T = 70,0 ± 0,2 °C, μ = 0,1 M de KCl).

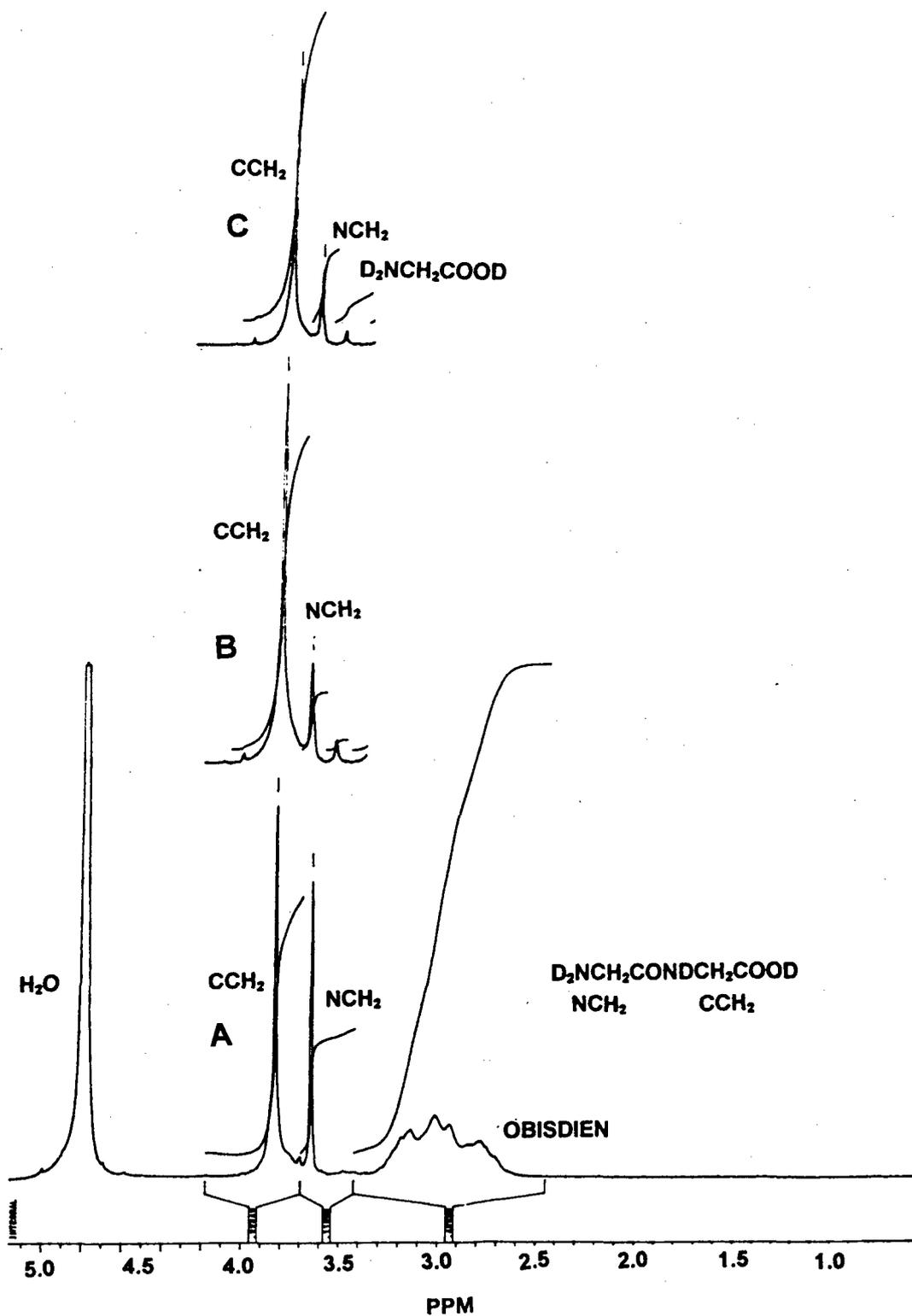


Figura 23. Espectro de 200 MHz RMN do próton do sistema 1:2:1 glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN para uma solução inicialmente contendo OBISDIEN  $1,00 \times 10^{-2}$  M, Zn(II)  $1,8 \times 10^{-2}$  M e glicilglicina  $1,3 \times 10^{-2}$  M em p[D] 8,72; mostrando o decréscimo do sinal do  $\text{NCH}_2$  e aparecimento da ressonância dos prótons do  $\text{CH}_2$  da glicina, A = zero ; B = depois de 37

$$\frac{\ln A_0}{A} = kt$$

$$A = A_0 e^{-kt} \text{ (permite obter } k_{\text{obs}} \text{ total)} \quad (20)$$

$$\frac{dU}{dt} = k_1 A = k_1 A_0 e^{-kt} \quad (21)$$

$$U = \frac{-k_1 A_0}{k} e^{-kt} + \text{cte} \quad (22)$$

$$U = U_0 + \frac{k_1 A_0}{k} (1 - e^{-kt}) \quad (23)$$

$$V = V_0 + \frac{k_2 A_0}{k} (1 - e^{-kt}) \quad (24)$$

Se  $U_0$  e  $V_0 = 0$  então as equações (23) e (24) são simplificadas

$$\frac{V}{U} = \frac{k_2}{k_1} \quad (25)$$

Os produtos encontram-se em uma relação independente do tempo e de  $A_0$ .

Assim os dados cinéticos para o sistema glicilglicina-Zn(II)-OBISDIEN são interpretados segundo as Equações 26 e 27, onde



$k_h$  = constante de hidrólise,  $k_d$  = constante de deuteração. A constante observada é a soma das constantes de hidrólise e de deuteração (Equação 28).

$$k_{obs} = k_h + k_d \quad (28)$$

Os valores de  $k_{obs}$  foram obtidos da inclinação da reta tangente a curva de  $\ln[\text{NCH}_2]$  vs tempo no tempo inicial, (Figuras 24 e 25). Essas figuras são referentes aos valores de  $p[\text{D}]$  7,01 e 8,37 respectivamente. Os valores de  $k_{obs}$  determinados são mostrados na Tabela X e crescem a medida que  $p[\text{D}]$  aumenta. Foi preferido utilizar a inclinação da reta tangente à curva para o cálculo de  $k_{obs}$  devido ao fato de que a glicilglicina deuterada também é hidrolisada e o gráfico resulta em uma curva.

Os valores das constantes de hidrólise foram obtidos a partir da Equação 29 e são mostradas na Tabela XI. Eles são maiores para valores de  $p[\text{D}]$  mais elevados, sendo praticamente iguais em  $p[\text{D}]$  8,72 e 9,8.

$$U = \frac{k_h A_0 (1 - e^{-kt})}{k} = k_h = \frac{Uk}{A_0 B} \quad (29)$$

Os valores das constantes de deuteração,  $k_d$ , foram determinadas através da Equação 28, e aparecem na Tabela XII. A exemplo da reação de hidrólise, a

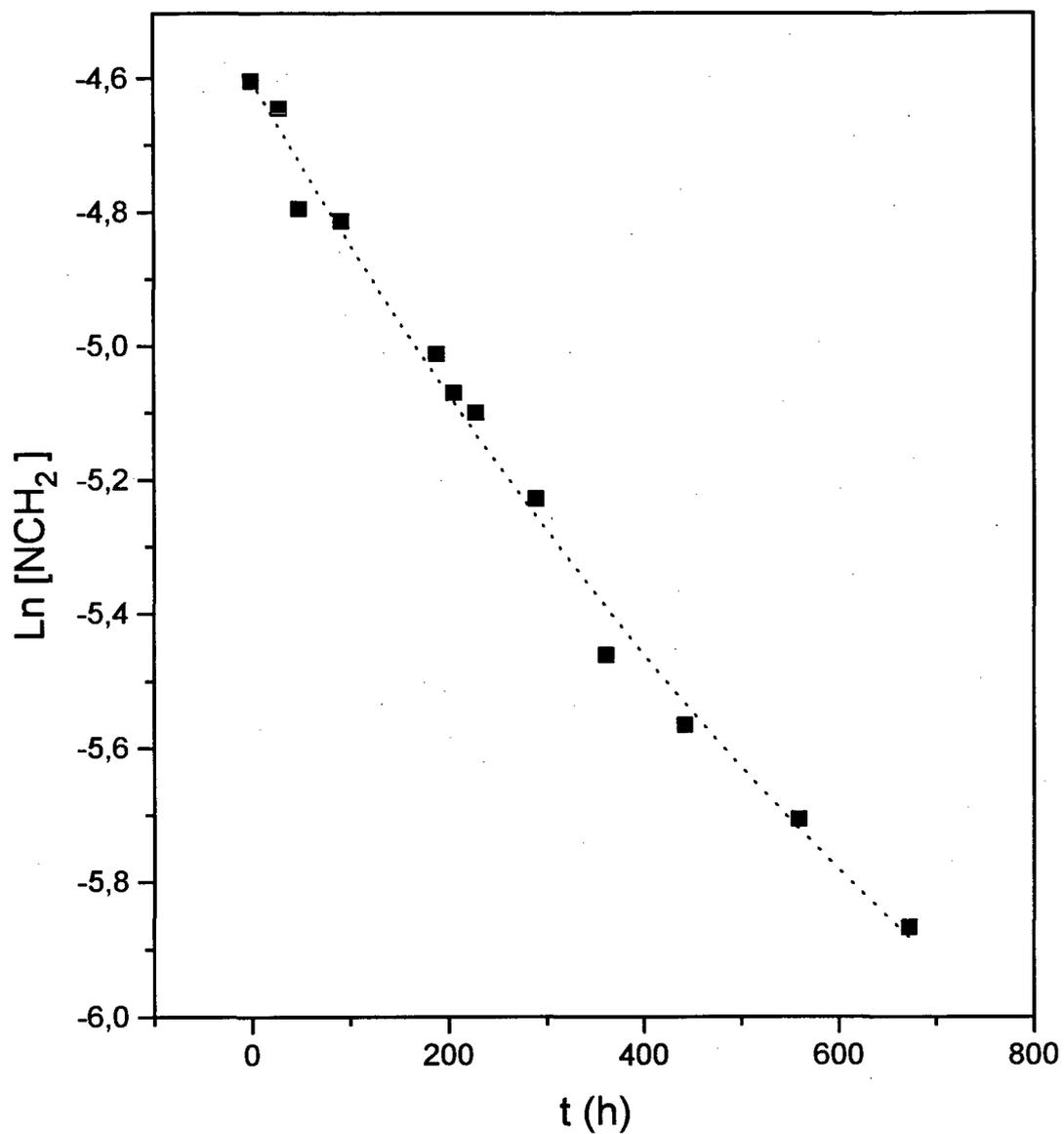


Figura 24. Gráfico de Ln [NCH<sub>2</sub>] vs tempo para a deuteração do CH<sub>2</sub> N-terminal da gliciglicina em D<sub>2</sub>O, p[D] 8,37 ( T = 70,0 ± 0,2 °C, μ = 0,1 M de KCl).

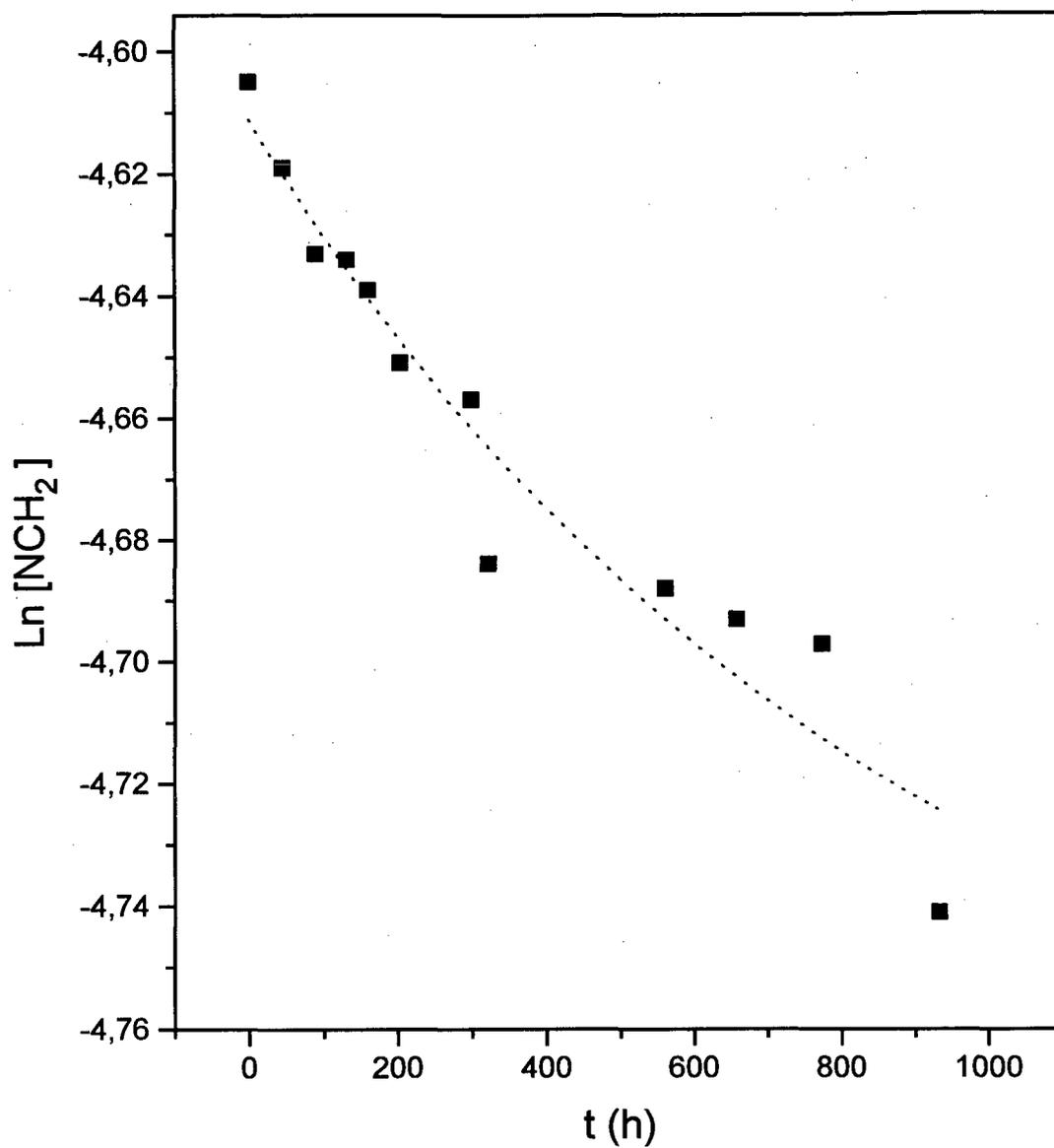


Figura 25. Gráfico de Ln [NCH<sub>2</sub>] vs tempo para a deuteração CH<sub>2</sub> N-terminal da gliciglicina em D<sub>2</sub>O, p[D] 7,0 (T = 70,0 ± 0,2 °C, μ = 0,1 M de KCl).

Tabela X. Constantes de velocidades observadas para vários valores de p[D] obtidas do gráfico de Ln[NCH<sub>2</sub>] vs tempo em D<sub>2</sub>O, (T = 70,0 ± 0,2 °C e μ = 0,1 M de KCl).

p[D]	k <sub>obs</sub> x 10 <sup>7</sup> s <sup>-1</sup>
7,01	0,5 (3)
8,37	6,3 (3)
8,72	14,0 (3)
9,8	27,0 (5)
10,6	40,0 (8)

Os números entre parênteses são os erros estimados no último algarismo significativo.

Tabela XI. Constantes de velocidades observadas para a hidrólise da glicilglicina, em D<sub>2</sub>O (T=70,0 ± 0,2 °C e μ = 0,1 M KCl).

p[D]	k <sub>h</sub> x 10 <sup>7</sup> , s <sup>-1</sup>
7,01	0,3 (3)
8,37	1,3 (2)
8,72	1,7 (3)
9,8	1,6 (6)
10,6	2,1 (8)

Os números entre parênteses são os erros estimados no último algarismo significativo.

Tabela XII. Constantes de velocidades observadas para a deuteração da glicilglicina, em D<sub>2</sub>O (T=70,0 ± 0,2 °C e μ = 0,1 M KCl).

p[D]	k <sub>d</sub> × 10 <sup>7</sup> s <sup>-1</sup>
7,01	0,3 (3)
8,37	5,0 (2)
8,72	12,3 (3)
9,8	25,4 (6)
10,6	37,3 (8)

Os números entre parênteses são os erros estimados no último algarismo significativo.

constante de deuteração observada é maior para valores de p[D] mais elevados, sendo muito baixa em p[D] neutro. Essa reação é observada ocorrer somente no CH<sub>2</sub> adjacente ao grupo amino do dipeptídeo, o NCH<sub>2</sub>. Os prótons do CH<sub>2</sub> adjacentes ao grupo carboxilato (CCH<sub>2</sub>) não são trocados por deutério sob as condições presentes em nossos experimentos. A deuteração do CH<sub>2</sub> adjacente ao grupo amino de vários dipeptídeos foi observada anteriormente e aparece na literatura.<sup>74</sup>

Os valores das constantes de hidrólise podem ser obtidas independentes da deuteração, acompanhando o desaparecimento da ressonância do CCH<sub>2</sub>. O valor da constante observada é obtida da inclinação do gráfico de Ln[CCH<sub>2</sub>] vs tempo. As constantes obtidas para os valores de p[D] 8,37 e 8,72 foram  $1,3 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  e  $1,7 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  (Figuras 26 e 27 ) respectivamente. Esses valores estão de acordo com os obtidos da Equação 29 e listados na Tabela XI.

As constantes de hidrólise específicas para cada espécie presente foram calculadas usando a Equação 30 e aparecem na Tabela XIII. A atividade da espécie protonada foi considerada a mesma da espécie não protonada por serem muito semelhantes. Os valores das constantes aparecem com somente uma casa decimal, devido ao erro experimental dos sinais das integrais de RMN do próton.

$$k_h[\text{LZn}_2\text{P}]_T = k_1[\text{LZn}_2\text{HP}^{4+}] + k_2[\text{LZn}_2\text{P}^{3+}] + k_3[\text{LZn}_2(\text{OH})\text{P}^{2+}] + k_4[\text{LZn}_2(\text{OH})_2\text{P}^+] + k_5[\text{LZn}_2(\text{OH})_3\text{P}] \quad (30)$$

$[\text{LZn}_2\text{P}]_T$  é a concentração total das espécies do sistema peptideo-Zn(II)-OBISDIEN, e  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ,  $k_4$ , e  $k_5$  são as constantes de hidrólise específicas das espécies monoprotonada, não-protonada, monohidróxida, dihidróxida e trihidróxida.

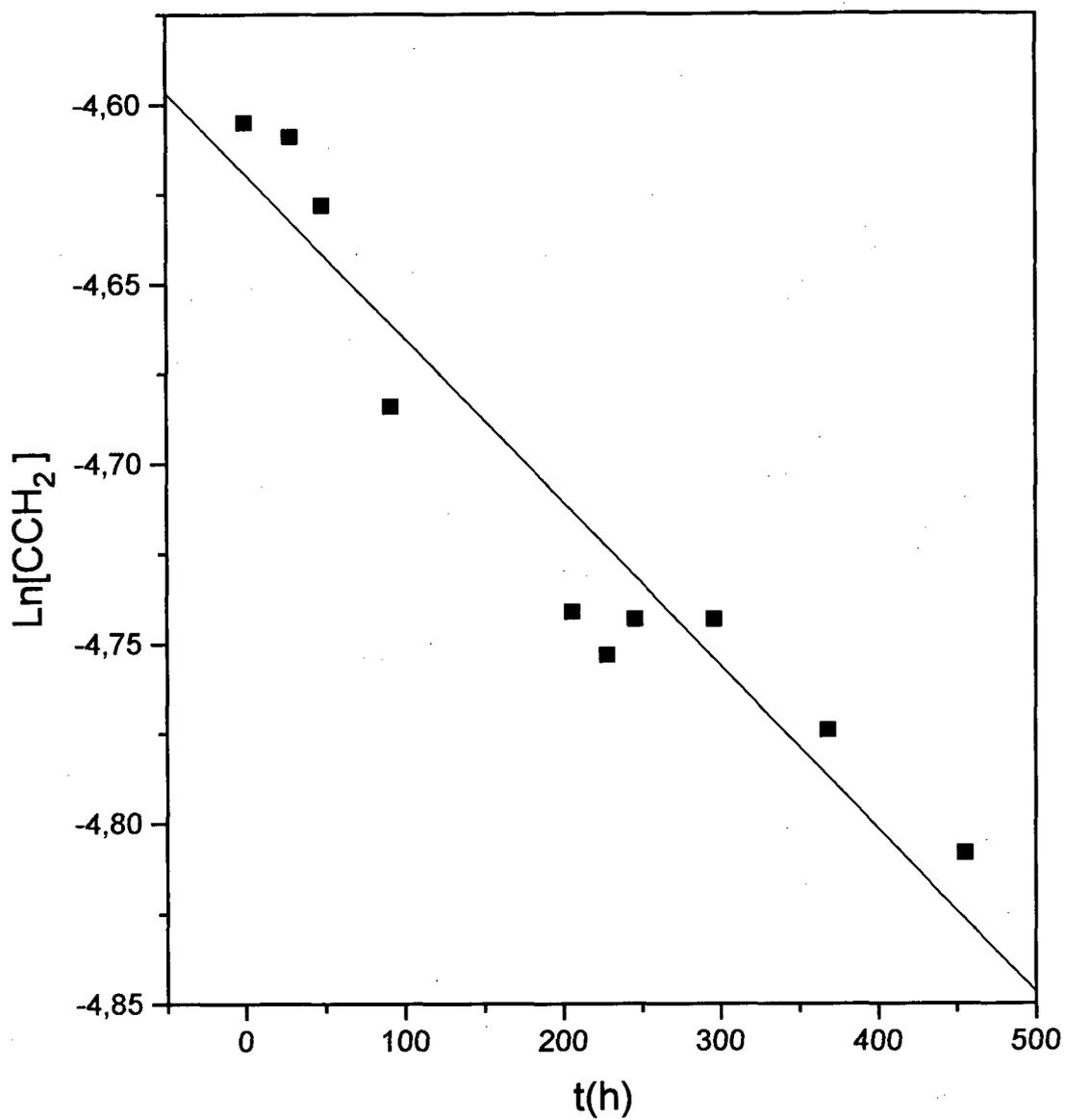


Figura 26. Gráfico de Ln[CCH<sub>2</sub>] vs tempo para a hidrólise do dipeptídeo glicilglicina em D<sub>2</sub>O, p[D] 8,37 ( T = 70,0 ± 0,2 °C e μ = 0,1 M de KCl).

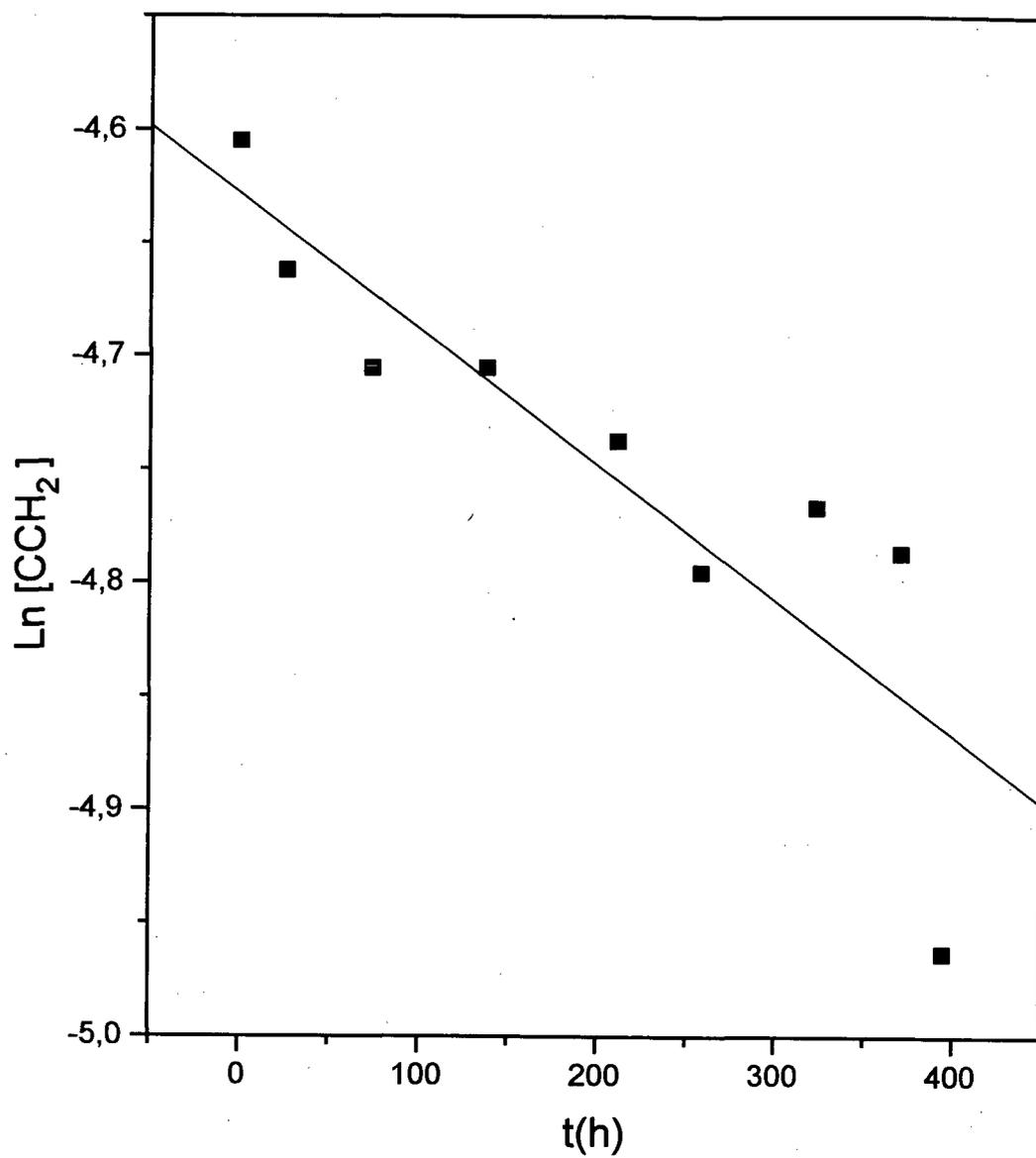


Figura 27. Gráfico de  $\text{Ln}[\text{CCH}_2]$  vs tempo para a hidrólise do dipeptídeo glicilglicina em  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{p}[\text{D}]$  8,72 ( $T = 70,0 \pm 0,2$  °C e  $\mu = 0,1$  M de KCl).

Tabela XIII. Constantes de velocidades específicas para a hidrólise da glicilglicina em D<sub>2</sub>O ( T = 70,0 ± 0,2 °C e μ = 0,1 M KCl).

Espécies	k <sub>cat</sub> , x 10 <sup>7</sup> s <sup>-1</sup>
LZn <sub>2</sub> HP <sup>4+</sup> , LZn <sub>2</sub> P <sup>3+</sup>	0,6 (4)
LZn <sub>2</sub> (OH)P <sup>2+</sup>	2,1 (3)
LZn <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub> P <sup>+</sup>	1,8 (4)
LZn <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub> P	3,5 (4)

Os números entre parênteses são os erros estimados no último algarismo significativo.

Os resultados da tabela XIII mostram que a espécie trihidróxida é a mais reativa. Ela é aproximadamente seis vezes mais ativa do que as espécies não hidróxidas,  $LZn_2HP^{4+}$  e  $LZn_2P^{3+}$ , ou seja, que não apresentam hidroxila coordenada ao centro metálico.

Fazendo o mesmo tratamento anterior para a reação de deuteração os valores das constantes de deuteração específicas para cada espécie presente, foram calculadas pela Equação 31 que é semelhante a Equação 30.

$$k_d[LZn_2P]_T = k^I[LZn_2HP^{4+}] + k^{II}[LZn_2P^{3+}] + k^{III}[LZn_2(OH)P^{2+}] + k^{IV}[LZn_2(OH)_2P^+] + k^V[LZn_2(OH)_3P] \quad (31)$$

Os resultados mostrados na Tabela XIV indicam que as espécies di- e trihidróxidas são as mais reativas, sendo a constante de velocidade da dihidróxida setenta e seis vezes maior do que as espécies não hidróxidas.

O Esquema 6 mostra o mecanismo proposto para as reações de hidrólise e deuteração da glicilglicina catalisadas pelo complexo binuclear de Zn(II)-OBISDIEN. A coordenação da glicilglicina na cavidade do complexo receptor dihidroxo-dizínco(II)-OBISDIEN forma o complexo ternário 37. Neste complexo, o grupo carboxilato está coordenado ao íon  $Zn^{2+}$  de um lado e o grupo carbonila da amida é labilizado pelo outro centro metálico do complexo binuclear, permitindo o ataque nucleofílico do  $OH^-$  coordenado ao íon Zn(II) em posição favorável. A espécie mais ativa na reação de hidrólise é a trihidróxida, cerca de duas vezes maior quando comparada com a mono e dihidróxida. Um maior número de hidroxilas coordenadas ao centro bimetálico aumenta a probabilidade do ataque do carbono carbonílico da ligação peptídica pelo nucleófilo  $OH^-$  coordenado, aumentando a constante de velocidade da reação de hidrólise. Para a reação de deuteração, uma hidroxila adicional à espécie dihidróxida praticamente não altera a constante de velocidade. O intermediário 38 é sugerido para essas duas reações paralelas. A reação de hidrólise segue o caminho "a" onde a quebra da

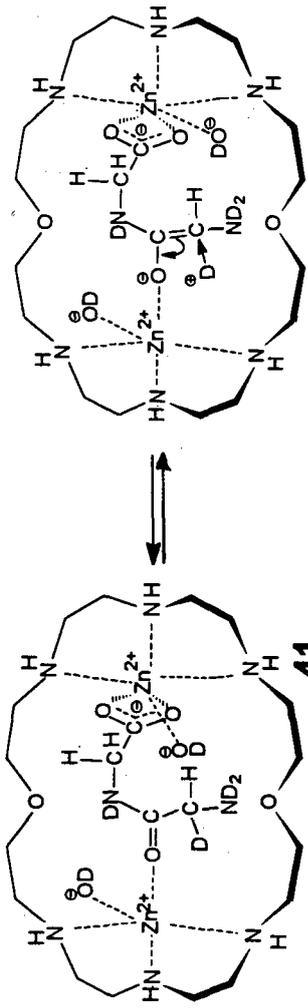
Tabela XIV. Constantes de velocidades específicas para a deuteração do NCH<sub>2</sub> da glicilglicina em D<sub>2</sub>O ( T = 70,0 ± 0,2 °C e μ = 0,1 M KCl).

Espécies	k <sub>cat</sub> , x 10 <sup>7</sup> s <sup>-1</sup>
LZn <sub>2</sub> HP <sup>4+</sup> , LZn <sub>2</sub> P <sup>3+</sup>	0,6 (4)
LZn <sub>2</sub> (OH)P <sup>2+</sup>	8,9 (3)
LZn <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub> P <sup>+</sup>	45,6 (6)
LZn <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub> P	43,9(6)

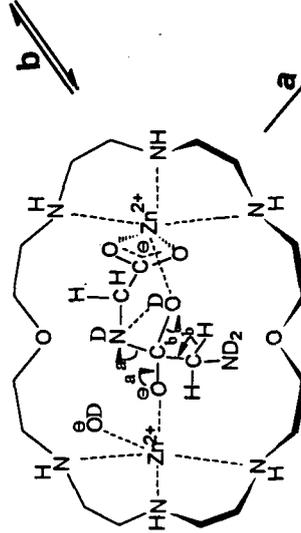
Os números entre parênteses são os erros estimados no último algarismo significativo.

- 1) D<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CONDCH<sub>2</sub>COOD
- 2) D<sub>2</sub>NCHDCONDCH<sub>2</sub>COOD

- 1) D<sub>2</sub>NCHDCONDCH<sub>2</sub>COOD
- 2) D<sub>2</sub>NCD<sub>2</sub>CONDCH<sub>2</sub>COOD

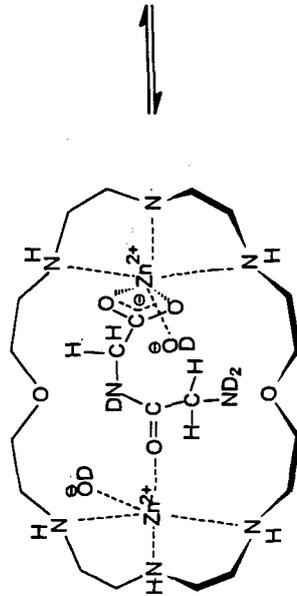


40



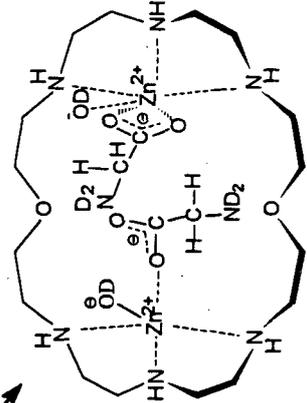
38

b



37

a



39

- 1) D<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CONDCH<sub>2</sub>COOD
- 2) D<sub>2</sub>NCHDCONDCH<sub>2</sub>COOD
- 3) D<sub>2</sub>NCD<sub>2</sub>CONDCH<sub>2</sub>COOD

- 1) 2D<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>COOD
- 2) D<sub>2</sub>NCHDCOOD + D<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>COOD
- 3) 2D<sub>2</sub>NCD<sub>2</sub>COOD

ligação amida produz duas moléculas de glicina. A substituição das duas moléculas de glicina por uma molécula de glicilglicina em **39**, produz o complexo **37** e fecha o ciclo catalítico.

A reação de deuteração segue o caminho "b". O intermediário **40** é seguido pela formação de uma molécula do dipeptídeo monodeuterado, **41**. Esse complexo pode liberar uma molécula deuterada e complexar uma nova molécula glicilglicina. Ambos os ciclos podem ocorrer até completa deuteração do grupo  $\text{NCH}_2$  do peptídeo e hidrólise da ligação amida rendendo moléculas de glicina deuteradas não deuteradas.

## CAPÍTULO 4

### 4. CONCLUSÕES

- 1) O complexo binuclear Zn(II)-OBISDIEN forma complexos ternários com a glicilglicina e dl-alanil-dl-alanina. O grupo carboxilato estaria coordenado ao íon  $Zn^{2+}$  de um lado da cavidade do complexo binuclear e a carbonila da ligação peptídica é ativada pela coordenação do oxigênio carbonílico ao outro íon metálico.
- 2) Foram detectadas e estudadas duas reações catalisadas pelo complexo binuclear Zn(II)-OBISDIEN que ocorrem paralelamente: a reação de hidrólise e a reação de deuteração de um dos grupos  $CH_2$  da glicilglicina.
- 3) Os resultados da cinética da reação de hidrólise da glicilglicina catalisada pelo complexo binuclear Zn(II)-OBISDIEN, mostram que a espécie mais reativa é a trihidróxida. A presença da hidroxila coordenada ao centro metálico, em posição favorável ao ataque na carbonila ativada pela coordenação ao outro íon metálico, é importante nesse modelo de catálise dessa reação indispensável a vida.
- 4) Na reação de deuteração da glicilglicina as espécies mais ativas são a di- e a trihidróxidas, exigindo a existência de um intermediário comum às duas reações. Ou seja, a deuteração também depende da hidroxila coordenada ao centro metálico.
- 5) Complexos ternários glicil-l-leucina-Zn(II)-OBISDIEN não foram detectadas em quantidade apreciáveis, demonstrando uma seletividade do complexo binuclear Zn(II)-OBISDIEN na associação de dipeptídeos.
- 6) Enquanto o complexo binuclear Zn(II)-OBISDIEN coordena o grupo carboxilato terminal dos dipeptídeos (glicilglicina e dl-alanil-dl-alanina) deixando o grupo

amino terminal livre, o complexo binuclear Cu(II)-OBISDIEN coordena o grupo amino terminal à um íon  $\text{Cu}^{2+}$  em um lado da cavidade e o grupo amida ao outro íon  $\text{Cu}^{2+}$ .

- 7) Nos complexos ternários dipeptídeos-Cu(II)-OBISDIEN as espécies com a ligação peptídica desprotonada não deverão ser ativas, já que o íon  $\text{Cu}^{2+}$  ao desprotonar o grupo amida, estabiliza essa ligação contra um ataque nucleofílico. A reação de hidrólise foi observada em pH ácido ( $\text{p[D]} = 4,02$ ) e o produto foi detectado por RMN do próton.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MORRISON, Robert T.; BOYD, Robert N. **Organic Chemistry**, 6 ed., New York, 1278 p. 1992.
2. BENSON, R.J.; LOUIE, P.C.; BRADSHAW, A.R. **Amino Acid Analysis of Peptides**. In: **The Peptides**. Academic Press Inc, V.5, p. 217-260, 1981.
3. CHRISTIANSON, D.W. ; LISPCOMB, W. N. **Carboxypeptidase A**. **Acc. Chem. Res.**, v. 22, p. 62-69, 1989.
4. CAMPBELL, P ; NASHED, T. **Carboxypeptidase A Catalyzed Hydrolysis of Thiopeptide and Thionester Analogues of Specific Substrates. An Effect on  $k_{cat}$  for Peptide, but Not Ester Substrates**. **J. Am. Chem.Soc.**, v. 104, p. 5221-5226, 1982.
5. MATTHEWS, B.W. **Structural Basis of the Action of Thermolysin and Related Zinc Peptidases**. **Acc. Chem. Res.**, v. 21, p. 333-340, 1988.
6. BERGUSON, I. E. ; KOSTIC, N.M. **Selective Hydrolysis of Unactivated Peptide Bonds, Promoted by Platinum(II) Complexes Anchored to Amino Acid Side Chains**. **Inorg. Chem.**, v. 30, p. 4299-4305, 1991.
7. ÓCHIAI, E. **General Principles of Biochemistry of the Elements**, Plenum Press, New York, 460p., 1987.
8. VALLEE, B.L.; AULD D.L. **New Perspective on Zinc Biochemistry: Cocatalytic Sites in Multi-Zinc Enzymes**. **Biochemistry**, v. 32, p. 6493-6500, 1993.
9. KADEN, A.T. **Magnetic Circular Dichroic Studies of the Active Site Geometry in Metalloenzymes**. In: HELMUT Sigel, **Metal Ions in Biological Systems**, Marcel Dekker Inc. v. 4, p. 16-18, 1974.

10. MANGANI, S. ; ORIOILI, P. Crystal structure of the Ternary Complex between Carboxypeptidase A, L-Phenylalanine and the Azide Ion. *Inorg. Chem.*, v. 31, p. 365-368, 1992.
11. QUIOCHO, F.A. ; LIPSCOMB, W.N. Carboxipeptidase A: Protein and an Enzyme. *Adv. Protein. Chem.*, v. 25, p.1-78, 1971.
12. CHRISTIANSON, D. W. and LIPSCOMB W. N The Complex between Carboxipeptidase A and a Possible Transition-State Analogue: Mechanistic Inferences from High-Resolution X-ray Structures of Enzyme-Inhibitor Complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 108, p. 4998-5003, 1986.
13. KUO, L. C. ; MAKINEN, M. W. Hidrolysis of Esters by Carboxipeptidases A Requires a Pentacoordinate Metal Ion. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 24-27, 1982.
14. FIFE T.H.; SQUILLACOTE V.L. Metal Ion Effects on Intramolecular Nucleophilic Carboxyl Group Participation in Amide and Ester Hydrolysis. Hydrolysis of N-(8-Quinoly)phthalamic Acid and 8-Quinoly Hydrogen Glutarate. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 100, p. 4787-4778, 1978.
15. MONZINGO, A.F ; MATHEWS, B.W. Binding of N-Carboxymethyl Dipeptide Inhibitors to Thermolysin Determined by X-ray Crystallography: A Novel Class of Transition-State Analogues for Zinc Peptidases. *Biochemistry*, v. 23, p. 5724-5729, 1984.
16. HOLMES, M.A. ; Matthews B.W. Binding of Hydroxamic Acid Inhibitors to Crystalline Thermolysin Suggests a Pentacoordinate Zinc Intermediate in Catalysis. *Biochemistry*, v. 20, p. 6912-6920, 1981.

17. KESTER, W.R. and MATTEWS, B. W. Crystallographic Study of the Binding of Dipeptide Inhibitors to Thermolysin: Implications for the Mechanism of Catalysis. *Biochemistry*, v. 16, p. 2506-2516, 1977.
18. BENCINI, A.; BIANCHI A. ; PAOLETTI, P. Thermodynamic and Structural Aspects of Transition Metal Compounds. Polynuclear Complexes of Azamacrocycles. *Coord. Rev.*, v. 120, p.51-58, 1992.
19. BENCINI, A. ; BANCHI, A.; GARCIA-ESPAÑA, ; S. MICHELON, M. Syntesis and Ligatonal Properties of the Very Large Polyazacycloalkanes [33]aneN<sub>11</sub> and [36]aneN<sub>12</sub> Forming Trinuclear Copper (II) Complexes, *Inorg. Chem.*, v. 27, p. 176-180, 1988.
20. BENCINI, A. ; BIANCHI, A. ; GARCIA-ESPAÑA, E. ; GIUSTI, M. ; MANGANI, S. MICHELON, M. ORILI, P. and PAOLETTI, P. . Synthesis and Complexing Properties of the Large Polyazacycloalkane 1,4,7,10,13,16,19,22,25,28 Decaazacyclotriacontane(L). Crystal Structure of the Monoprotonated Dicopper(II) Complex [Cu<sub>2</sub>(L)HCl<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.4H<sub>2</sub>O. *Inorg. Chem.*, v. 26, p. 1243-1247,1987.
21. BENCINI, A. ; BIANCHI, A. ; GARCIA-ESPAÑA, E. ; GIUSTI, M. ; MICHELON, M. ; ORILI, P. and PAOLETTI, P. Solution Chemistry of Macrocycles 5. Syntesis and Ligational Behavior toward Hydrogen and Copper(II) ions of the Large Polyazacycloalkane 1,4,7,10,13,16,19,22,25 Nonaazacycloheptacosane [27] ane N<sub>9</sub>). *Inorg. Chem.*, v. 26, p. 681-684, 1987.
22. MICHELON, M. ; PAOLETTI, P. ; BIANCHI A. 1,4,7,10,13,116,19 Heptaazacyclo henecosane . A Large Potentially Dinucleating Polyazacycloalkane. Syntesis and Equilibrium between Hydrogen and Copper(II) ions. *Inorg. Chem.*, v. 29, p. 3702-3704, 1985.

23. BIANCHI, A. ; BIANCHI, A.; MICHELON, M.; NANINI, V. ; ORIONI, P. PAOLETTI, P. and SEGHI, B. Dicopper(II) Complex of the Large Polyazacycloalkane 1,4,7,13,16,19,22 - Octaazacyclotetracosane (BISTRIEN) Synthesis, Crystal Structure Electrochemistry and Thermodynamics of Formation. *Inorg. Chem.*, v. 24, p. 1182-1187, 1985.
24. BENCINI BIANCHI, A. ; GARCIA-ESPAÑA, E. ; MICHELON, M. and PAOLETTI, P. Anaerobic Complexation of Cobalt(II) by [3k]ane N<sub>k</sub> (k=7-12) Polyazacycloalkanes. *Inorg.Chem.*, v. 28, p. 2480-2482, 1989.
25. BENCINI, A. ; CASTELLÓ, M. ; DAPPORTO, P. ; FAUS, J. ; GARCIA-ESPAÑA, E.; MICHELON, M ; PAOLETTI, P and PAOLI, P. Nickel (II) Complexes of [3k] ane N<sub>k</sub>(7-12). Solution and Solid-State Studies. *Inorg. Chem.*, v. 28, p. 3175-3181, 1989.
26. BENCINI, A. ; CASTELLÓ, M. ; DIVAIRA, M. ; FAUS, J. ; GARCIA-ESPAÑA, E. ; MICHELONI, M. and PAOLETTI, P. Thermodynamic Study of the Formation in Aqueous Solution of Cadmium (II) Complexes with Polyazacycloalkanes. Synthesis and Crystal Structure of the Dicadmium(II) Complex Na[Cd<sub>2</sub>(L)Cl<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> L=,14,7,13,16,19,22,25,28-Decaazacyclotriacontane). *Inorg. Chem.*, v. 28, p. 347-351, 1989.
27. BENCINI, A. ; GARCIA-ESPAÑA, E. ; MANGANI, S. ; MICHELONI, M. ; ORIOLI, P. AND PAOLETTI, P. Polynuclear Zinc(II) Complexes with Large Polyazacycloalkanes. Equilibrium Studies and Cristal Structure of the Binuclear[Zn<sub>2</sub>([30]aneN<sub>10</sub>)(NCS)](ClO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> Complex. *Inorg. Chem.*, v. 27, p. 1104-1107, 1988.
28. VIGATO, D.E. and TAMBURINI, S. The activation of Small Molecules by Dinuclear Complexes of Copper and Other Metals Coordination. *Chemistry Reviews*, v. 106, p. 25-170, 1990.

29. LLOBET A.; REIBENSPIES J.; MARTELL A.E. Oxydiacetic Acid and Copper(II) Complexes of a New Hexaaza Macrocyclic Dinucleating Ligand. *Inorg. Chem.*, v.33, p. 5946-5951, 1994.
30. LEHN, J.M. ; MÉRIC, R. ; VIGNERON, J.R. ; BKOUCHE-WASKMAN, I. and PASCARD C. Molecular Recognition of Anionic Substrates Binding of Carboxylates by Macrobicyclic Coreceptor and Crystal Structure of its Supramolecular Cryptate with three Terephthalate Dianion. *J.Chem. Soc. Chem. Commun.*, p. 62-64, 1991
31. BENCINI, A. ; BIANCHI, A. ; BURGUETE, M. I.; GARCIA-ESPAÑA, E. ; LUIZ, S.V. and RAMIREZ, J. A. Remarkable Shape Selectivity in the Molecular Recognition of Carboxilate Anions in Aqueous Solution. *J. Am. Chem.Soc.*, v. 114, p. 1919-1920, 1992.
32. LEHN, J.-M. Supramolecular Chemistry-Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, v. 27, p. 89-112, 1988.
33. LEHN, J-M.; PINE H.S. ; WATANABE, E. ; WILLARD, A.K. Binuclear Cryptates. Synthesis and Binuclear Cation Inclusion Complexes of Bistren Macrobicyclic Ligands. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 99, p. 6766- 6768, 1977.
34. COMARMOND J. ; PLUMERÉ P. ; LEHN J-M.; AGNUS Y. ; LOUIS R. ; WEISS R. ; KAHN O. ; MORGENSTEM-BADARAU I. Dinuclear Copper(II) Cryptates of Macrocyclis Ligands: Syntesis, Crystal Structure, and Magnetic Properties. Mechanism of Exchange Interaction through Bridging Azido Ligand. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 104, p. 6330-6340, 1982.
35. JUREK, E.P.; MARTELL A.E. ; MOTEKAITIS R.J. HANCOCK R. D. Molecular Recognition of Pyrophosphate by 1,13-Dioxa-4,7,10,16,19,22,-hexaazacyclotetracosane (OBISDIEN) and by Its Mononuclear and

Dinuclear Copper(II) Complexes. A Thermodynamic and Molecular Mechanics Study. *Inorg. Chem.*, v. 34, p. 1823 - 1829 , 1995.

36. MOTEKAITIS, R. J. ; MARTELL, A.E. ; LECOMTE, J-P ; LEHN, J-M. Stabilities of Mononuclear and Dinuclear Macrocyclic Complexes of 1,4,7,13,16,19-Hexaaza-10,22-dioxacyclotetracosane (bisdien). *Inorg. Chem.*, v. 22, p. 609-614, 1983.
37. ROSSO, N.D. ; DEBACHER, N. e SZPOGANICZ, B. Estudos de Equilíbrios do Íon Brometo com as Formas Protonadas do Macrocíclico 1,4,7,13,19-Hexaaza-10,22-Dioxacyclotetracosano(OBISDIEN) e com o Complexo Binuclear Co(II)-OBISDIEN. *Química Nova*, v. 5 , p. 421-424, 1995.
38. MOTEKAITIS, R.J. ; MARTELL, A.E. Molecular Recognition of Phosphite and Phosphate by the Cobalt(II)-OBISDIEN System and Oxidation of Phosphite to Phosphate by Coordinated Molecular Oxygen. *Inorg. Chem.*, v. 33, p. 1032-1037, 1994.
39. ROSSO, N.D. ; SZPOGANICZ, B. ; MOTEKAITIS R.J.; MARTELL, A.E. Equilibrium Studies of 1,2-Diaminobenzene and 3,4-Diaminobenzoato Anion with Dinuclear Cobalt(II) 1,4,7,13,16,19-Hexaaza-10,22-dioxacyclotetracosane . *Inorg. Chim. Acta*, v. 227. 49-56, 1994.
40. SZPOGANICZ, B. ; MOTEKAITIS, J.R. and MARTELL, A.E. Equilibrium Studies and Molecular Recognition in the Catecol-and TIRON-Bridged Binuclear Cobalt(II) 1,4,7,13,16,19-Hexaaza-10,22-dioxacyclotetracosane Dioxygen Complexes. *Inorg. Chem.*, v. 29, p. 1467- 1474 , 1990.
41. LEHN, J.M. Dinuclear Cryptates: Dimetallic Macropolycyclic Inclusion Complexes. Concepts-Design-Prospects. *Pure & Appl. Chem.*, v. 52, p. 2441-2459, 1980.

42. MARTELL A.E. and MOTOKAITIS R.J. Formation and Degradation of an Peroxo-Bridged Dicobalt BISDIEN Dioxygen Complex. Binuclear Complexes as Hosts for the Activation of Two Coordinated Guests. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 110, p. 8059-8064, 1988.
43. MARTELL A. E. and MOTOKAITIS, J.R. Formation and Degradation of an Oxalato and Peroxo Bridged Dicobalt Bisdien Dioxygen Complex: A Binuclear Complex as Host for the Activation of Two Co-ordinated Guests. *J. Chem. Soc. Chem. Commum.*, p. 915-916, 1988.
44. MOTOKAITIS J.R. and MARTELL A.E. Molecular Recognition by Protonated O-BISDIEN and Its Metal Complexes. *Inorg. Chem.*, v. 31 p. 5534-5542, 1992.
45. MOTOKAITIS J.R. and MARTELL A.E. A New Catalytic System for Activation of Molecular Oxygen within the Cavity of a Dinuclear Macrocyclic Complex. Redox Reaction of the ( $\mu$ -Mesolato) ( $\mu$ -Peroxo) Dicobalt-BISDIEN Complex. *Inorg. Chem.*, v. 30, p 694-700, 1991.
46. HOSSEINI, M.W.; LEHN J.-M.; MAGGIORA, L.; MERTES, K.B. and MERTES, M.P. Supramolecular Catalysis in the Hydrolysis of ATP Facilitated by Macrocyclic Polyamines: Mechanistic Studies. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 109, p.537-544, 1987.
47. HOSSEINI, M.W.; BLAKER, J.; LEHN, J.-M. Multiple Molecular Recognition and Catalysis. A Multifunctional Anion Receptor Bearing an Anion Binding Site, an Intercalating Group, and a Catalytic Site for Nucleotide Binding and Hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 112, p. 3896-3904, 1990.
48. COUGHLIN P.K.; DEWAN J.C.; LIPPARD S.J. Synthesis and Structure of the Imidazolate Bridged Dicopper (II) Ion Incorporated into a Circular Cryptate Macrocycle. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 101, p. 265-266, 1979.

49. COUGHLIN P.K. ; LIPPARD S.J. A Monohydroxo Bridged, Strongly Antiferromagnetically Coupled Dicopper(II) Center in a Binucleating Macrocycle Comparisons with Binuclear Copper Sites in Biology. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 103, p. 3228 - 3229 , 1981.
50. BASALLOTE, M.G. and Martell A.E. New Multidentate Ligands. 29. Stabilities of Metal Complexes of the Binucleating Macrocyclic Ligand BISBAMP and Dioxygen affinity of Its Dinuclear Cobalt(II) Complex. *Inorg. Chem.*, v. 27, p. 4219-4224, 1988.
51. MOTEKAITIS, J.R. ; UTLEY, B.W. and MARTELL, A.E. Iron(II) and Sulfate Binding by the Binucleating Ligands O-BISDIEN, O-BISTREN and O-BISBAMP. *Inorg. Chem. Acta*, v. 212, p 15-21, 1993.
52. MENIF, R. and MARTELL, A.E. Oxygen Insertion by a New Tyrosinase Model Binuclear Cu<sup>I</sup> Macrocylic Complex. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, p. 1522-1523, 1989.
53. MENIF, R.; MARTELL A.E.; SQUATTRITO J.P. and CLEARFIELD A. New Hexaaza Macrocylic Binucleating Ligands. Oxygen Insertion with a Dicopper(I) Schiff Base Macrocylic Complex. *Inorg.Chem.*, v. 29, p. 4723-4729, 1990.
54. LU, Q.; MOTEKAITIS, R.J.; REIBENSPIES, J.J. and MARTELL, A.E. Molecular, Recognition by the Protonated Hexaaza Macrocylic Ligand 3,6,9,16,19,22- Hexaaza-27,28-dioxatricyclo [22.2.1.1<sup>11,14</sup>]octacos-1(26), 11, 13,24 -tetraene. *Inorg. Chem.*, v. 34, p. 4958- 4964, 1995.
55. ZHU, L. and KOSTIC, N. M. Toward Artificial Metallopeptidases: Mechanisms by Which Platinum (II) and Palladium(II) Complexes Promote Selective,

Fast Hydrolysis of Unactivated Amide Bonds in Peptides. *Inorg. Chem.*, v. 31, p. 3994-4001, 1992.

56. HINE, J. ; KING R. S.-M. ; MIDDEN, W. R. and SINHA, A. Hydrolysis of Formamide at 80°C and pH 1-9. *J. Org. Chem.*, v. 46, p.3186-3189, 1981.
57. PRZYSTAS, T.J. ; FIFE, T.H. The Metal Ion Promoted Water and Hydroxide-Ion-Catalysed Hydrolysis of Amides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, p. 393-399, 1990.
58. FIFE, T. H. and PRZYSTAS, T. J. Divalent Metal Ion Catalysis in Amide Hydrolysis. The Hydrolysis of N-Acylimidazoles. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 108, p. 4631-4636, 1986.
59. KAHNE, D. and STILL, W. C. Hydrolysis of a Peptide Bond in Neutral Water. *J. Am. Chem. Soc.*, v.110, p. 7529-7534, 1988.
60. GRANT, I. J. and HAY, R. W. Copper (II) Catalysis of the Hydrolysis of Glycylglycine. *Aust. J. Chem.*, v. 8, p. 1189-1195, 1965.
61. HEGG E.L. and BURSTYN J.N. Hydrolysis of Unactivated Peptide Bonds by a Macrocyclic Copper(II) Complex:  $\text{Cu}([\text{9}]_{\text{aneN}_3})\text{Cl}_2$ . Hydrolysis both Dipeptides and Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, v.117, p. 7015-7016, 1995.
62. UHLENBROCK, S. and KREBS B. A. Phenoxy-Bridged Homodinuclear Zn Complex with Unusual Coordination Sphere; Model Compound for a Active Site of Phospholipase C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, v.31, 1647-1648, 1992.
63. CHIN, J. Developing Artificial Hydrolytic Metalloenzymes by a Unified Mechanistic Approach. *Acc. Chem. Res.*, v.24, p.145-152, 1991.

64. GRAY, R. W. and MORRIS, P.J. Metal Ion-Promoted Hydrolysis of Amino acid Esters and Peptides. In: Sigel, Helmut. **Metal Ions in Biological Systems**. New York: Marcel Inc, v. 5, cap. 4, p. 173-243, 1976.
65. SHWARZENBACH, G. ; FLASKA, H. **Complexometric Titrations**. Meheun & Co. ; London 1969.
66. MARTELL, A.E. and MOTEKAITIS, R.J. **Determination and Use of Stability Constants**. 2 ed., New York: VCH Publishers, 200 p. 1992.
67. GLASOE, P. K. ; LONG, F.A. Use of Glass Electrodes to Measure Acidities in Deuterium Oxide. **J. PHYS. CHEM.**, v. 64, p.188-190, 1960.
68. SMITH, R.M.; MARTELL, A.E. MOTEKAITIS, R.J. **NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes**. NIST Database 46, Gaithersburg, MD, USA, 1993.
69. MARTELL, A. E.; SMITH,M.R. **Critical Stability Constants**. Plenum Press, New York, Vol. 1-6. 1974; 1975;1976;1977;1982;1989.
70. SIGEL, H. and MARTIN, R. B. Coordinating properties of the Amide Bond. **Stability and Structure of Metal Ion Complexes of Peptides and Related Ligands**. **Chem. Rev.**, v. 82, p. 385-426, 1982.
71. NAIR, M. S.; SANTAPPA M. AND NATARAJAN P. Mixed-ligand Complex Formation by Copper(II) with Imidazole Derivates and Dipeptides in Aqueous Solution. **J. C. S. Dalton**, p. 2138-2142, 1980.
72. SZPOGANICZ, B. and MARTELL, A. E. Thermodynamic and Microscopic Equilibrium Constants of Molecular Species Formed from Pyridoxal 5'-Phosphate and 2-Amino-3-phosphonopropionic Acid in Aqueous and D<sub>2</sub>O Solution. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 106, p. 5513- 5521, 1984.

73. SILVA, M. R. ; SZPOGANICZ, B.; LAMOTTE, M. ; DONARD, O.F.X. and FAGES, F. Equilibrium Studies of Selenite and Selenate Ions with the Receptor Complex formed by  $\text{Cu}^{2+}$  and 1,4,7,13,16,,19-hexaaza-10,22-dioxacyclotetracosane (OBISDIEN). *Inorg. Chim. Acta*, v. 236, p.189-196, 1995.
74. MOORE, W. J. and PEARSON R. G. *Kinetics and Mechanism*, John Wiley & Sons, Inc., 3 ed., New York, 455 p., 1981.
75. Tikhonov, V.E.; Yamskov, I.A.; Bakhmutov, V.I.; Tsyryapkin, V.A. Regioselective Deuteration of Dipeptides. *Bioorg. Khim.*, v.11, p.31-36, 1985.