

Annelise Casellato

**Síntese, Caracterização e Reatividade de Complexos modelos para as PAPs
Gálio substituídas**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química ,
Departamento de Química,
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a
passagem direta no Sistema PGI com obtenção do título de Mestre em
Química**

Área de concentração: Química Inorgânica

Orientador : Prof. Dr. Ademir Neves

Florianópolis

2003

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E REATIVIDADE DE COMPLEXOS MODELO
PARA AS PAPS Ga SUBSTITUÍDAS**

**dissertação apresentada por
Annelise Casellato**

**Esta dissertação foi julgada e aprovada em sua forma final para a obtenção
do título de Mestre em Química**

Prof. Dr. Ademir Neves
Orientador

Prof. Dr. Faruk Nome
Coordenador da Pós Graduação

Prof. Dr. Adailton J. Bortoluzzi

Dr^a Marciela Scapellini

Prof. Dr. Miguel Soriano B. Caro

"Nunca é tão fácil perder-se como quando se julga conhecer o caminho."

Provérbio Chinês

Ao meus pais e irmã,
A minha avó materna,
Ao Fernando por todos os momentos a mim dedicados

Agradecimentos

Meu mais sincero agradecimento àqueles que auxiliaram de alguma maneira a concretização deste trabalho:

Aos meus pais, Elmo e Marlene, por toda a dedicação e estímulo;

Ao Fernando por toda sua tolerância e paciência;

Ao professor Dr. Ademir Neves pela atenção, orientação e ensinamentos ;

Aos professores Dr. Marcos Aires de Brito, Dr. Augusto S. Ceccato e aos colegas do Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia pela convivência e colaborações;

Aos professores Dr. Antônio S. Mangrich, Dr. Bruno Szpoganicz, Dr. Miguel Caro pelas sugestões e colaborações

Ao prof. Dr. Adailton J. Bortoluzzi pelas análises de raios X;

Aos amigos Anildo, Andreia, Cristiano, Eliandra, Maria Amélia, Rusiene pelo auxílio desde o início;

A Dr^a Marciela Scarpellini e Dr. Maurício Lanznaster pela confiança e inúmeras colaborações;

Aos amigos Rosely, Alessandra, Ademir dos Anjos pelas muitas sugestões durante o trabalho;

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Sumário

Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	vii
Resumo	1
Abstract	2
1 Introdução	3
1.1 A Química Bioinorgânica	3
1.2 Metaloenzimas	5
1.3 As Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs)	6
2 Objetivos	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3 Parte experimental	13
3.1 - Materiais	13
3.2 - Métodos e Instrumentação	13
3.2.1 - Espectroscopia no infravermelho	13
3.2.2 - Espectroscopia eletrônica	13
3.2.3 – Ressonância Magnética Nuclear.....	14
3.2.4 - Eletroquímica	14
3.2.5 – Difractometria de Raios X de Monocristais	14
3.2.6 – Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica – RPE ...	15
3.2.7 - Titulação potenciométrica	15
3.2.8 Reatividade	16
3.2 Síntese do ligante H₂L1	17
3.2.1 Síntese do 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído - HMB.....	17
3.2.2 Síntese do 2-clorometil-4-metil-6-(formil)fenol - CMFF	18
3.2.3 Síntese do bis-(2-piridilmetil) amina - BPMA.....	19
3.2.4 Síntese do 2-(hidróxibenzil)-2-(piridilmetil)amina -HBPA	20
3.2.5 Síntese do 2-[bis-(piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidróxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil] fenol H ₂ L1	21
3.3 Síntese dos compostos de coordenação	24
3.2.1 Síntese do complexo [GaCuL1(μ-OAc) ₂]ClO ₄	24
3.2.2 Síntese do complexo [GaZnL1(μ-OAc) ₂]ClO ₄	24

4 Resultados e discussão.....	25
4.1 Caracterização do ligante	25
4.1.1 Espectroscopia no infravermelho	25
4.1.2 Espectroscopia de ¹ H RMN.....	26
4.2 Caracterização dos complexos	27
4.2.1 Estrutura Cristalina por Difratoimetria de Raios X.....	27
4.2.2 Espectroscopia no infravermelho	29
4.2.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ¹ H RMN e ¹³ C	31
4.2.4 Estudo de Equilíbrio através de Titulação Potenciométrica	35
4.2.5 Espectroscopia Eletrônica.....	38
4.2.6 Espectroscopia Paramagnética de Eletrônica.....	40
4.2.7 Eletroquímica	42
4.2.8 Reatividade	43
5 Considerações Finais	48
6 Perspectivas	49
7 Anexos	51
8 Referências Bibliográficas	59

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema da sistemática utilizada para a síntese de complexos-modelo.	5
Figura 2. Esquema de hidrólise das PAPs.	7
Figura 3. Estruturas cristalinas dos sítios ativos das PAPs : a) kbPAP, b) rbPAP c) ufPAP.	9
Figura 4. Mecanismo proposto por Lindqvist e colaboradores para a hidrólise de ésteres de fosfato catalisada pela PAP.	10
Figura 5. Espectro no infravermelho do ligante L1.	25
Figura 6. Espectro de ¹ H-RMN em CDCl ₃ do ligante L1.	26
Figura 7. Zortep da estrutura molecular do cátion complexo [GaZnL1(μ-OAc) ₂] ⁺	27
Figura 8. Esquema de numeração utilizado na discussão de RMN do complexo [GaZnL1(μ-OAc) ₂]ClO ₄	31
Figura 9. Espectro de ¹ H-RMN do complexo [GaZnL1(μ-OAc) ₂]ClO ₄	32
Figura 10. Espectros de ¹³ C-RMN (a) e ¹³ C-RMN DEPT (b) do complexo [GaZnL1(μ-OAc) ₂]ClO ₄ em CD ₃ CN a 50,13MHz.	34
Figura 11. Curvas de distribuição das espécies para o complexo [Ga ^{III} (μ-OAc) ₂ Cu ^{II}]ClO ₄ onde A = (H ₂ O)Ga ^{III} (μ-OAc) ₂ Cu ^{II} (OH ₂), B = (H ₂ O)Ga ^{III} (μ-OAc)Cu ^{II} (OH ₂), C = (HO)Ga ^{III} Cu ^{II} (OH ₂), D = (HO)Ga ^{III} Cu ^{II} (OH). ..	36
Figura 12. Curvas de distribuição das espécies para o complexo [Ga ^{III} (μ-OAc) ₂ Zn ^{II}]ClO ₄ onde A = (H ₂ O)Ga ^{III} (μ-OAc)Zn ^{II} (OH ₂), B = (H ₂ O)Ga ^{III} (μ-OH ₂)Zn ^{II} (OH ₂), C = (HO)Ga ^{III} (μ-OH ₂)Zn ^{II} (OH ₂), D = (HO)Ga ^{III} (μ-OH)Zn ^{II} (OH ₂), E = (HO)Ga ^{III} (μ-OH)Zn ^{II} (OH).	37
Figura 13. Diagrama de desdobramento dos níveis de energia dos orbitais d em diferentes simetrias.	38
Figura 14. Espectros eletrônicos do complexo [GaCuL1(μ-OAc) ₂]ClO ₄ em (a) acetonitrila, (b) água.	40
Figura 15. Espectros de RPE experimental (---) e simulado (—) do complexo [GaCuL1(μ-OAc) ₂]ClO ₄ em acetonitrila/tampão a 77K.	42

Figura 16. Voltamogramas cíclicos (a) (velocidades de varredura : 300, 200,150,100,50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) e de onda quadrada (b) (pulso 40mV, freqüência 20Hz) do complexo $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ em acetonitrila eletrólito $0,1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de TBAPF ₆ , eletrodo de trabalho carbono vítreo, eletrodo de referência Ag/AgCl e contra eletrodo fio de platina; padrão interno ferroceno.....	43
Figura 17. Gráficos de V_0 em função do pH nas reações de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisadas pelos complexos $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ (a) e $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ (b) a 25°C	44
Figura 19. Proposta de novos ligantes.....	50
Figura 20. Espectro no infravermelho do complexo $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ em pastilhas de KBr.....	51
Figura 21. Espectro no infravermelho do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ em pastilhas de KBr.....	51
Figura 22. Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ ampliado na região entre 3,0 e 5,2 ppm.....	52
Figura 23. Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ ampliado na região entre 6,4 e 8,8 ppm.....	52
Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ em CD_3CN ampliado na região de 20 a 65ppm.....	53
Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ em CD_3CN ampliado na região de 115 a 185 ppm.....	53
Figura 26. Espectro de RMN COSY do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ em CD_3CN	54
Figura 27. Espectro de RMN NOESY do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ em CD_3CN	55
Figura 28. ORTEP do cátion complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]^+$	56

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados cristalográficos para o complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\cdot\text{H}_2\text{O ClO}_4$..	28
Tabela 2. Principais comprimentos (Å) e ângulos ($^\circ$) de ligação para o complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$	29
Tabela 3. Principais bandas (cm^{-1}) e atribuições nos espectros no infravermelho dos complexos estudados.....	30
Tabela 4. Deslocamentos químicos observados no espectro de ^1H -RMN do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$	32
Tabela 5. Deslocamentos químicos observados no espectro de ^{13}C -RMN do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$	34
Tabela 6. Valores de pKa determinados potenciométricamente para os complexos $[\text{Ga}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}\text{L1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ e $[\text{Ga}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$	37
Tabela 7. Comparação entre os valores de pK _a cinéticos e pKa potenciométricos dos complexos $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ e $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$	45
Tabela 8. Parâmetros cinéticos determinados a partir da linearização de Lineweaver-Burke dos dados obtidos para os complexos estudados e os similares de $[\text{FeCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ ³² e $[\text{FeZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ ⁴⁸ .	46

Lista de Abreviaturas

- 2,4-BDNPP – bis (2,4-dinitrofenil)fosfato
Å – angström (1 Å = 10⁻⁸cm)
A – constante hiperfina (RPE)
Asn – asparagina
Asp – ácido aspártico
ATP – adenosina trifosfato
BBPMP – 2,6-bis([2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino)metil]-4-metilfenol
BPMA – bis(2-piridilmetil)amina
BPMAMFF – 2-[bis(2-piridilmetil)amina]-4-metil-6-formil-fenol
bsPAP – fosfatase ácida púrpura do baço de bovinos
CHES – ácido 2-[N-cicloexilamino]etanosulfônico
CMFF – 2-clorometil-4-metil-6-formil-fenol
DNA – ácido desoxirribonucleíco
E_{1/2} – potencial de meia onda
ENH – eletrodo normal de hidrogênio
EPR – ressonância paramagnética eletrônica
Et₃N – trietilamina
EtOH – etanol
EXAFS – estrutura fina estendida de absorção de raios X
g – tensor *g* (EPR)
glu – glutamato
his – histidina
H₂L1 – 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxibenzil)
(2-piridilmetil)aminometil]fenol
I – força iônica
IV – espectroscopia no infravermelho
J – constante de acoplamento (RMN)
K_a – constante de dissociação de um ácido (pK_a = -logK_a)
K_{ass} – constante de associação

kbPAP – fosfatase ácida púrpura do feijão *kidney bean*
k_{cat} – constante catalítica
K_M – constante de Michaelis-Menten
MM – massa molar
MES – ácido 2-[N-morfolino]etanosulfônico
PAP – fosfatases ácidas púrpuras
P_i – fosfato inorgânico
ratTRAP – fosfatase ácida púrpura resistente ao tartarato de ratos
rbTRAP – fosfatase ácida púrpura de ratos resistente ao tartarato de ossos de ratos
sbPAP – fosfatase ácida púrpura de soja
ser – serina
TBAPF₆ – hexafluorofosfato de tetrabutílamônio
TCLM – transferência de carga do tipo ligante→metal
TCML – transferência de carga do tipo metal→ligante
TMS – tetrametilsilano
tyr – tirosina
ufPAP – fosfatase ácida púrpura de fluido de suínos (uteroferrina)
UV-Vis – espectroscopia no ultravioleta visível
V₀ – velocidade inicial
V_{max} – velocidade máxima
ε - coeficiente de absorvidade molar
λ - comprimento de onda (espectroscopia eletrônica)

Resumo

Nos últimos anos a presença de inúmeros íons metálicos envolvidos em processos biológicos essenciais à vida dos mais variados organismos tem sido avaliada. O estudo desses processos tem levado à descoberta de proteínas e enzimas que dependem dos metais para seu normal funcionamento. Embora várias enzimas já tenham sido exaustivamente estudadas, a grande maioria continua sem ter sua estrutura, funções e mecanismos de ação elucidados. No entanto, diversas metaloproteínas conhecidas têm algumas de suas propriedades físico-químicas determinadas, o que permite um estudo através de comparações com complexos-modelo de baixa massa molar, cuja estrutura cristalina pode ser facilmente determinada, permitindo a obtenção de importantes informações a respeito de sua estrutura e funções

As fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) pertencem a uma família de metaloidrolases binucleares, as quais têm sido isoladas de uma variedade de fontes incluindo leveduras, fluido uterino de suínos (uteroferrina - ufPAP), baço de bovinos (*bovine spleen* - bsPAP), macrófagos lisossomos humanos, ossos de ratos, plantas e bactérias. São enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres de fosfato em condições ácidas (faixa de pH entre 4 e 7) e que contêm em seus sítios ativos um centro binuclear $Fe^{III} - M^{II}$ (M= Fe, Mn, Zn).

Um método usual para o estudo do mecanismo de ação da enzima é a substituição de um dos íons metálicos naturais por outro metal com mesmo estado de oxidação, para avaliação das diferenças nas propriedades espectroscópicas e catalíticas.

A utilização de Ga^{III} como análogo ao Fe^{III} é bastante descrita tanto em Química Inorgânica quanto na química de proteínas por possuírem raio iônico (0,62Å vs 0,65 Å), carga e modos de coordenação semelhantes. Complexos de Fe^{III} e Ga^{III} apresentam velocidades de troca do ligante e os valores de pKa para as moléculas de água coordenada semelhantes, o que é muito importante no estudo de reações catalíticas que envolvem a troca de ligante no metal.

Neste trabalho foram sintetizados dois novos complexos heterodimetálicos de GaCu e GaZn

O complexo $[GaCuL1(\mu-OAc)_2]ClO_4$ foi estudado através de técnicas espectroscópicas (no infravermelho e eletrônica), titulação potenciométrica e ressonância paramagnética eletrônica (EPR).

Já o complexo $[GaZnL1(\mu-OAc)_2]ClO_4$ foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de 1H e ^{13}C , titulação potenciométrica e teve sua estrutura de raios X determinada. Esse complexo merece destaque por ser o primeiro descrito até o momento na literatura.

A partir da caracterização dos complexos foram realizados os estudos cinéticos desses compostos frente à hidrólise do substrato modelo 2,4 bis(dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP) que indicam que os complexos podem ser considerados bons modelos funcionais para as PAPs Ga substituídas.

Abstract

In the last years the presence of countless metallic ions involved in essential life processes of the most varied organisms has been discovered. The study of those processes has been taking to the discovery of proteins and enzymes that depend on the metals for their normal operation. Although several enzymes have already been studied thoroughly, the great majority continues without having their structure, functions and action mechanisms elucidated. However, the great majority of the known metalloproteins has some of their properties certain physical-chemistries, what allows a study through comparisons with complex-model of low mass molar, whose crystalline structure can be easily certain, allowing the knowledge of important information regarding their structure and functions.

The purple acid phosphatases (PAPs) belong to a family of dinuclear metallohydrolases, which have been isolated of a variety of sources including yeasts, pig uterine fluid (uteroferrin - ufPAP), bovine spleen (bsPAP), human macrophages, mice bones, plants and bacteria. They are enzymes that catalyze the hydrolysis of phosphate esters in acidic conditions (pH between 4 and 7) and that contain at their active site a bimetallic center $Fe^{III} - M^{II}$ ($M = Fe, Mn, Zn$).

An usual method for the study of the mechanism of action of the enzyme is the substitution of one of the natural metallic ion for other metal with same oxidation state, and evaluation of the differences in the properties spectroscopic and catalytic.

The use of Ga^{III} as similar to Fe^{III} is quite described in Inorganic Chemistry as in the Chemistry of proteins. Ga^{III} and Fe^{III} possess ionic radii (0,62Å vs 0,65 Å), charge and manners of similar coordination. Complex of Fe^{III} and Ga^{III} show rate of change of the ligand and pKa values for the molecules of water coordinated similar, what is very important in the study of catalytic reactions that involve ligand change in metal.

In this work two new heterodimetallic complexes of GaCu and GaZn were synthesized with the ligand 2,6-bis[(2-hydroxybenzyl)(2-methylpyridyl)(aminomethyl)]-methylphenol (L1).

$[GaCuL1(\mu-OAc)_2]ClO_4$ was studied through spectroscopic techniques (infrared and electronic) and electrochemistry, potentiometric titration, electronic paramagnetic resonance (EPR).

The compound $[GaZnL1(\mu-OAc)_2]ClO_4$ was characterized by spectroscopic in the infrared, nuclear magnetic resonance of 1H and ^{13}C , potentiometric titration and had its structure of X ray obtained. This complex deserves highlight for being the first described containing those metals.

Starting from the characterization of the compounds the kinetic studies were accomplished from those complexes towards the hydrolysis of 2,4-BDNPP phosphate diester that indicate that the compounds can be considered good functional models for PAPs Ga substituted.

1 Introdução

Nos últimos anos a presença de inúmeros íons metálicos envolvidos em processos biológicos essenciais à vida dos mais variados organismos tem sido avaliada. O estudo desses processos tem levado à descoberta de proteínas e enzimas que dependem dos metais para seu normal funcionamento. Embora várias enzimas já tenham sido exaustivamente estudadas, a grande maioria continua sem ter sua estrutura, funções e mecanismos de ação elucidados. O grande problema na elucidação da estrutura e propriedades das metaloproteínas consiste em sua elevada massa molar e complexidade, o que se reflete na dificuldade de sua obtenção com pureza adequada. Além disso, a obtenção de monocristais adequados à resolução da estrutura cristalina de proteínas é extremamente difícil, sendo por isso raras as proteínas cuja estrutura tenham sido resolvidas. No entanto, diversas metaloproteínas conhecidas têm algumas de suas propriedades físico-químicas determinadas, o que permite um estudo através de comparações com complexos-modelo de baixa massa molar, cuja estrutura cristalina pode ser mais facilmente determinada, permitindo a obtenção de importantes informações a respeito de sua estrutura e funções. Além de servirem para o estudo das metaloenzimas, os complexos-modelo podem apresentar aplicações em potencial, tais como atividade farmacológica e catalisadores em processos industriais. Estudos dessa natureza são de grande importância para o domínio do conhecimento necessário ao desenvolvimento científico e tecnológico do país, possibilitando a formação de recursos humanos e infra-estrutura destinados à pesquisa aplicada e criação de novas tecnologias.

1.1 A Química Bioinorgânica

A parte da ciência que estuda a interação dos compostos de coordenação em sistemas biológicos é a Química Bioinorgânica. Esta se encontra na interface entre a Química Inorgânica clássica e a Biologia além de englobar uma variedade

de ciências desde a Química Inorgânica, Bioquímica, a Espectroscopia, Biologia Molecular e inclusive a Medicina¹.

Embora os compostos orgânicos desempenhem a maioria das funções biológicas, a natureza aprendeu a utilizar as propriedades especiais dos metais, constituintes naturais das enzimas, para exercer uma ampla variedade de funções específicas associadas ao processo da vida. Os elementos de principal interesse na Química Bioinorgânica são os metais alcalinos terrosos, vanádio, manganês, cobre, níquel, zinco, ferro, gálio entre outros.

Informações muito significativas no estudo de Bioinorgânica têm sido obtidas através do estudo de compostos modelo. Estes apresentam massas molares menores que os observados nas proteínas e o principal interesse é que venham mimetizar o centro ativo das mesmas.

Sendo um dos objetivos da Química Bioinorgânica o desenvolvimento de compostos modelo, este processo usualmente segue uma sistemática¹ que se inicia com o isolamento e purificação da enzima de interesse com posterior estudo das propriedades físico-químicas e caracterização preliminar dos constituintes do sítio ativo.

Com base nos dados obtidos a partir da enzima prossegue-se com o projeto de um ligante capaz de mimetizar características dos aminoácidos presentes para então, sintetizar e caracterizar os complexos modelo, analisando também sua estrutura e posteriormente sua reatividade.

Caso os resultados sejam satisfatórios pode-se concluir que se trata de um complexo modelo ou análogo sintético. No caso de resultados insatisfatórios a estratégia é voltar à etapa de projeção do ligante e seguir a mesma metodologia empregada anteriormente.

A seguir, o esquema da sistemática que os químicos bioinorgânicos costumam seguir para o desenvolvimento de novos complexos modelo.

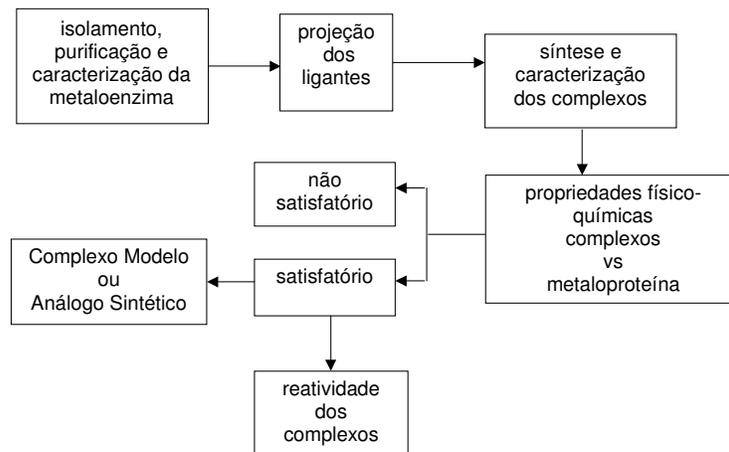


Figura 1. Esquema da sistemática utilizada para a síntese de complexos-modelo.

1.2 Metaloenzimas

Metaloenzimas e metaloproteínas são biomoléculas que contém, no mínimo, um íon metálico em seu sítio ativo². Assim, o sítio ativo de uma proteína consiste de um ou mais íons metálicos, toda a cadeia lateral da proteína, pontes exógenas e ligantes terminais que definem a primeira esfera de coordenação de cada íon metálico.

Desse modo, enzimas são as proteínas mais notáveis e especializadas, aquelas que possuem atividade catalítica. Elas aceleram reações químicas específicas sem a formação de subprodutos, têm um alto grau de especificidade por seus substratos e atuam em meio aquoso e condições suaves de pH e temperatura. Acredita-se que a alta especificidade apresentada pelas enzimas esteja relacionada a um arranjo tridimensional único para cada uma delas.

As enzimas são internacionalmente classificadas³, de acordo com as reações por elas catalisadas, em:

Oxirredutases : responsáveis pela catálise de transferência de elétrons;

Transferases : responsáveis pela catálise de reações de transferências de grupos aldeídicos, cetônicos, acila, fosforila etc.;

Hidrolases : responsáveis pela catálise de reações de hidrólise;

Liasas : responsáveis pela catálise de adição ou remoção de grupos a duplas ligações;

Isomerases : responsáveis pela catálise de transferência de grupos dentro de moléculas produzindo formas isoméricas;

Ligases : responsáveis pela catálise de formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas a clivagem de ATP.

A partir desta classificação serão destacadas as enzimas capazes de clivar hidroliticamente ésteres de fosfato, as fosfatases ácidas púrpuras (EC 3.1.3.2)³

1.3 As Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs)

As fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) pertencem a uma família de metaloidrolases binucleares, as quais têm sido isoladas de uma variedade de fontes incluindo leveduras, fluido uterino de suínos (uteroferrina - ufPAP), baço de bovinos (*bovine spleen* - bsPAP), macrófagos lisossomos humanos, ossos de ratos, plantas e bactérias. São enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres de fosfato em condições ácidas (faixa de pH entre 4 e 7) e que contêm em seus sítios ativos um centro binuclear $Fe^{III} - M^{II}$ (M= Fe, Mn, Zn)⁴, sendo que as PAPs isoladas de plantas são as que apresentam sítios heterobimetálicos, FeMn e FeZn presentes, respectivamente, na batata doce (spPAP) e da soja (sbPAP) . Entretanto as enzimas de origem animal, ufPAP e bsPAP, são as que têm sido mais bem estudadas.⁵

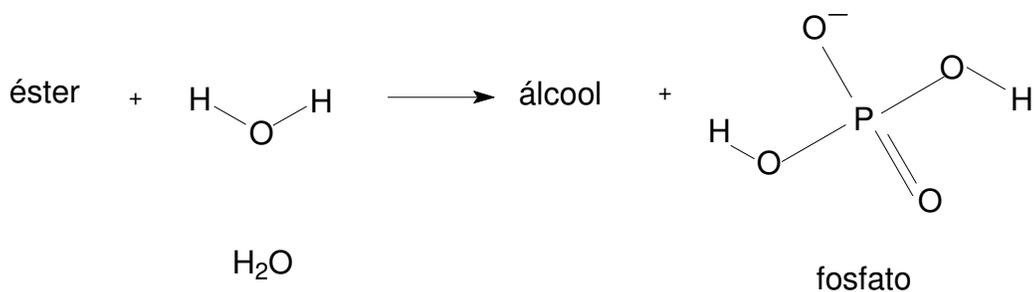


Figura 2. Esquema de hidrólise das PAPs.

A ufPAP e a bsPAP são glicoproteínas com massa molar em torno de 35kDa, que apresentam uma estrutura monomérica peptídica com 90% de similaridade.⁶⁻⁸ O sítio ativo das PAPs de origem animal consiste de um centro binuclear de ferro com dois estados de oxidação possíveis: um cataliticamente inativo, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$, conhecido como forma púrpura e caracterizado por uma banda de absorção típica ($\lambda = 550\text{nm}$, $\epsilon = 4000\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$) e outro, enzimaticamente ativo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ conhecido como forma rosa ($\lambda = 505\text{nm}$, $\epsilon = 4000\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$). Essas bandas foram atribuídas a processos de transferência de carga do tipo tirosinato $\rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$. O fato de serem observadas absorvidades molares similares para ambas formas da enzima e de ser possível a interconversão das formas púrpura em rosa pelo uso de redutores (ascorbato ou ditioeritritol), ou de oxidantes (ferricianeto ou peróxido de hidrogênio), sugere que o resíduo tirosinato encontra-se coordenado a somente um dos centros de ferro, sendo ele o sítio não redutível.⁹

Ambas formas, reduzida e oxidada, das PAPs têm sido caracterizadas por vários métodos físico-químicos e espectroscópicos, os quais incluem: eletroquímica¹⁰, espectroscopia Raman ressonante⁹, EPR^{9,11}, susceptibilidade magnética,^{9,12} Mössbauer^{9,13}, ^1H -RMN¹⁴, EFEARX (EXAFS)¹⁵, e estudos cinéticos.¹⁶

Recentemente, a elucidação estrutural ocorreu com a determinação das estruturas cristalinas, por difração de raios X, das enzimas do feijão (*kidney bean* - kbPAP)¹⁷, da PAP resistente ao tartarato de ratos (*rat*TRAP)¹⁸, da PAP de ossos de ratos (*rb*TRAP)¹⁹ e da ufPAP²⁰. A principal diferença entre as

PAPs de mamíferos e a kbPAP extraída de plantas é que esta é uma metaloproteína homodimérica $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$, com subunidades de aproximadamente 55kDa, enquanto que a de mamíferos na sua forma ativa é uma enzima monomérica $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ com massa molar em torno de 35kDa.

A estrutura da kbPAP (resolução de $2,65\text{\AA}$)¹⁷, revela que os centros metálicos estão separados por uma distância de $3,26\text{\AA}$, sendo que o íon Fe^{III} encontra-se em uma geometria octaédrica e está coordenado aos seguintes resíduos de aminoácidos em cadeias laterais: Tyr 167, His325, um grupo carboxilato monodentado do Asp135 e um grupo carboxilato monodentado ponte do Asp164. Completando a esfera de coordenação do metal, dois ligantes exógenos foram modelados : um hidróxido terminal coordenado ao Fe^{III} , um grupo μ -hidróxido ponte ($\text{Fe-O}:1,9\text{\AA}$ e $\text{Zn-O}:2,1\text{\AA}$) e uma água coordenada ao zinco (II)¹⁷. Para o íon Zn^{II} foi observada uma geometria octaédrica distorcida que além dos grupos ponte mencionados anteriormente, é composta pelos resíduos de aminoácidos His286, His323, um nitrogênio amínico da Asn201.

A partir da resolução dessas estruturas pôde-se observar uma grande similaridade entre os sítios ativos das enzimas, o que sugere que a catálise de hidrólise de ésteres de fosfato deva ocorrer segundo mecanismos bastante semelhantes.

A Figura 3 apresenta os desenhos esquemáticos da kbPAP contendo fosfato coordenado, da rbPAP com o íon sulfato presente e ufPAP com o fosfato simetricamente coordenado aos dois átomos metálicos.

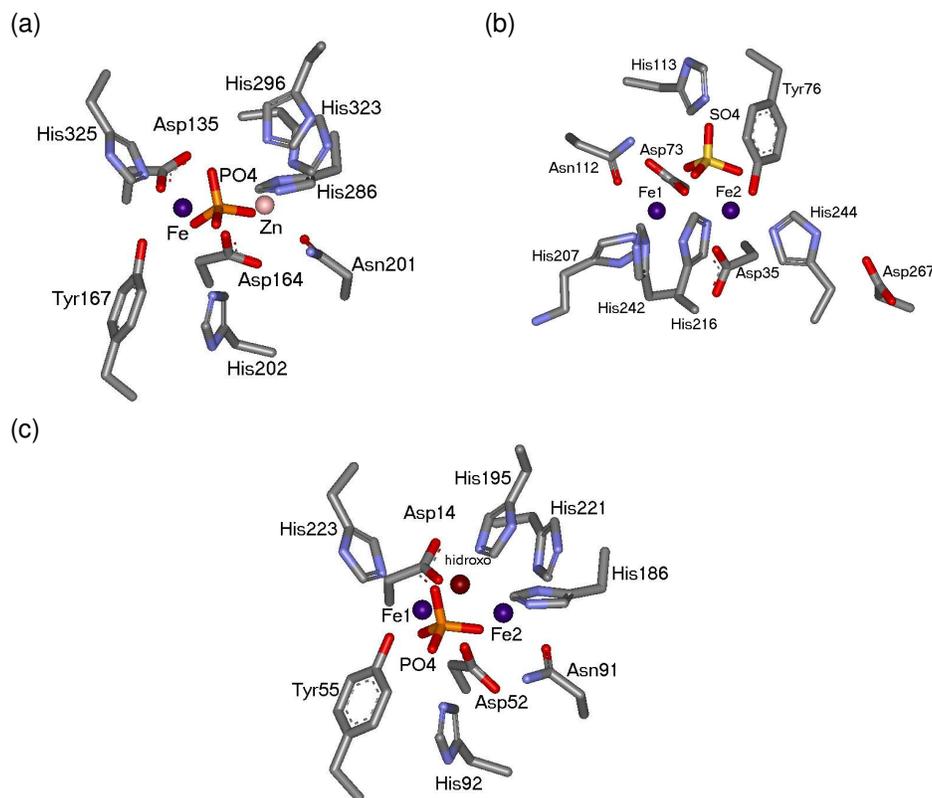


Figura 3. Estruturas cristalinas dos sítios ativos das PAPs : a) kbPAP¹⁷, b) rbPAP¹⁹ e c) ufPAP²⁰.

Em 1996, Klabunde e colaboradores^{17a} propuseram um mecanismo de catálise assistida pelo metal, do tipo S_N2 , baseado na estrutura cristalina da kbPAP. Com a resolução da estrutura da rbPAP em 1999, Lindqvist e colaboradores¹⁹ propuseram um mecanismo similar ao proposto por Klabunde e colaboradores.

Segundo Lindqvist e colaboradores na primeira etapa da reação o grupo fosfato do substrato liga-se ao centro de Fe^{II} da forma ativa da enzima após o deslocamento de uma molécula de água. Uma vez coordenado, o átomo de fósforo assume um caráter positivo, facilitando um ataque nucleofílico do íon hidróxido presente na esfera de coordenação do íon Fe^{III} , o qual está em posição adequada para um ataque “em linha” sobre o átomo de fósforo. Devido ao ataque ocorrer do lado oposto ao grupo álcool do substrato, este acarreta uma inversão

de configuração no átomo de fósforo. O ataque nucleofílico resulta em um estado de transição onde o átomo de fósforo se apresenta pentacoordenado sendo provavelmente estabilizado pelos resíduos de histidina, His113 e His216, conservados no sítio ativo. A hidrólise propriamente dita deve ocorrer a partir da protonação do grupo álcool abandonador pelo resíduo de ácido aspártico, Asp267 e subsequente clivagem da ligação P-OR. Ao final da etapa catalítica, o grupo fosfato encontra-se coordenado aos dois centros de ferro de forma bidentada e pode ser deslocado do centro de Fe^{III} por uma molécula de água, em uma reação de substituição.¹⁹

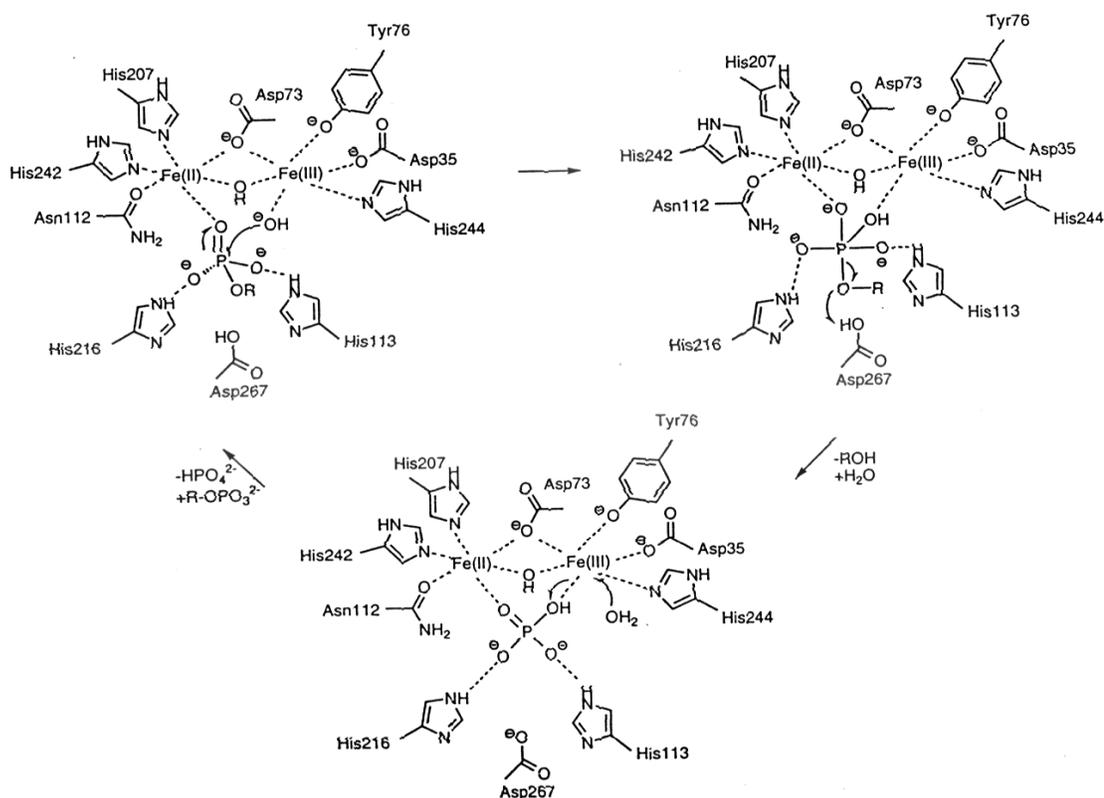


Figura 4. Mecanismo proposto por Lindqvist e colaboradores para a hidrólise de ésteres de fosfato catalisada pela PAP¹⁹.

Embora ambos metais sejam essenciais para a catálise, o papel individual dos íons metálicos continua sendo objeto de controvérsias.²¹ Um método útil para

o estudo do mecanismo de ação da enzima é a substituição de um dos íons metálicos naturais por outro metal com mesmo estado de oxidação, e avaliação das diferenças nas propriedades espectroscópicas e catalíticas. Nas PAPs essa metodologia tem sido amplamente aplicada ao centro metálico divalente apenas. Assim, na ufPAP e na bsPAP, a substituição do Fe^{II} pelo Zn^{II} tem sido descrita sem significativos efeitos nos parâmetros cinéticos e nas constantes de inibição. A substituição por outros metais divalentes como Co^{II} e Cd^{II} tem sido descrita também para a kbPAP²² resultando em derivados com atividades que variam entre 20 e 100% da atividade da enzima nativa.

Recentemente, Averill e colaboradores estudaram a substituição do Fe^{III} por outros metais trivalentes como Ga^{III} , In^{III} e Al^{III} . O íon Ga^{III} tem sido utilizado como análogo estrutural do Fe^{III} em proteínas como PAP, transferrina, lactoferrina, ovotransferrina.²³

A utilização de Ga^{III} como análogo ao Fe^{III} é bastante descrita tanto em Química Inorgânica quanto na química de proteínas. Ga^{III} e Fe^{III} possuem raios iônicos (0,62Å vs 0,65 Å), cargas e modos de coordenação semelhantes. Complexos de Fe^{III} e Ga^{III} apresentam velocidades de troca do ligante e os valores de pKa para as moléculas de água coordenada semelhantes, o que é muito importante no estudo de reações catalíticas que envolvem a troca de ligante no metal.²³

Considerando o exposto, este projeto tem por objetivo contribuir para o desenvolvimento da Química Bioinorgânica através da síntese de modelos funcionais para as PAPs Ga^{III} substituídas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

2.1.1 Sintetizar, caracterizar e estudar a reatividade de novos compostos de coordenação heterodimetálicos como modelos para as fosfatases ácidas púrpuras Ga substituídas.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Sintetizar e caracterizar o ligante 2-[bis(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol H₂L1

2.2.2 Síntese e caracterização de complexos binucleares de Ga^{III}Cu^{II} e Ga^{III}Zn^{II} com o ligante descrito acima, buscando obter a unidade estrutural (OH)Ga^{III}-(μ-OH)-M^{II}(OH₂).

2.2.3 Estudo das propriedades espectroscópicas, eletroquímicas e estruturais dos complexos obtidos, buscando correlacioná-los com as propriedades das PAPs.

2.2.4 Estudo de equilíbrio das espécies em solução através de titulação potenciométrica.

2.2.5 Estudo da reatividade dos complexos obtidos frente à hidrólise de ésteres de fosfato.

3 Parte experimental

3.1 - Materiais

Os reagentes e solventes usados foram adquiridos das companhias Aldrich Chemical, Merck, Reagen, Vetec, Nuclear, Quimex e Grupo Química e utilizados sem prévia purificação.

Solventes de grau espectroscópico, secos com peneira molecular foram utilizados na caracterização dos compostos. Argônio ultrapuro foi utilizado na obtenção de atmosfera inerte.

3.2 - Métodos e Instrumentação

3.2.1 - Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro FT-IR Perkin Elmer 16PC, com leituras na região de 4000 a 400 cm^{-1} , no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia do Departamento de Química – UFSC. As amostras sólidas foram analisadas em pastilhas de brometo de potássio de grau espectroscópico.

3.2.2 - Espectroscopia eletrônica

O espectro eletrônico na região do infravermelho próximo, visível e ultravioleta foi obtido em um espectrofotômetro L-19 da Perkin Elmer acoplado a um microcomputador IBM/AT – 386 e impressora no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia.

As leituras em solução foram efetuadas em cubetas de vidro de caminho óptico de 1,0 cm. Utilizaram-se solventes de grau espectroscópico e apropriados para cada amostra, em soluções de concentrações adequadas para obtenção de leituras com absorvância entre 0,2 e 1,0.

3.2.3 – Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos com um espectrômetro Bruker FT-200MHz na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. As amostras foram solubilizadas em solventes deuterados contendo tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os deslocamentos químicos são dados em parte por milhão (ppm).

3.2.4 - Eletroquímica

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato, modelo 273 da Princeton Applied Research (PAR) acoplado a um microcomputador IBM/AT-386.

Os experimentos de voltametria cíclica foram realizados em acetonitrila, sob atmosfera de argônio ultra-puro. Hexafluorofosfato de tetrabutamônio (TBAPF_6) foi utilizado como eletrólito suporte. Nestes experimentos foi utilizada uma célula eletrolítica com sistema de 3 eletrodos, sendo: 1) eletrodo de trabalho: eletrodo planar de platina; 2) eletrodo auxiliar: fio de platina; 3) eletrodo de referência: eletrodo saturado de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl). Para monitorar o eletrodo de referência foi utilizado ferroceno como referência interna.

3.2.5 – Difractometria de Raios X de Monocristais

As análises cristalográficas foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, em colaboração com o Prof. Dr. Adailton J. Bortoluzzi. Os dados foram coletados em um difratômetro CAD-4 Enraf Nonius, em temperatura ambiente e as estruturas foram resolvidas utilizando o programa SHELXS²⁵, e refinadas com o programa SHELXL97²⁶. As representações gráficas foram geradas com o programa ZORTEP²⁷.

3.2.6 – Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica – RPE

O espectro de RPE, em banda X, foi obtido em solução congelada, à temperatura de 77K (nitrogênio líquido). Os dados foram obtidos em um espectrômetro Bruker 300E, no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, em colaboração com o Prof. Dr. Antonio Sálvio Mangrich.

3.2.7 - Titulação potenciométrica

Os estudos potenciométricos foram realizados em solução de etanol/água (70/30 % v/v- $pK_w = 14,72^{28}$) devido a baixa solubilidade dos complexos em água, utilizando um pHmetro Corning 350 acoplado a um eletrodo de vidro combinado (Ag/AgCl). As soluções foram preparadas com água bidestilada na presença de $KMnO_4$ e etanol de grau espectroscópico. Os eletrodos foram calibrados com uma solução diluída de HCl em etanol/água 70/30 % para leitura direta de $-\log[H^+]$ (pH) e o “slope” foi fixado utilizando dados obtidos a partir da titulação potenciométrica de uma solução com volume conhecido de HCl $0,0100 \text{ mol.L}^{-1}$ com solução padrão de KOH $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ livre de CO_2 , ambos em etanol/água 70/30 %. Os experimentos foram realizados com $0,05 \text{ mmol}$ do complexo solubilizado em $20,0 \text{ mL}$ de solução com força iônica $I = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (KCl), em uma célula termostatizada ($25,0^\circ\text{C}$), sob atmosfera de argônio. Essas soluções tiveram o pH ajustado para $\text{pH} = 3,0$ pela adição de HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e foram tituladas com uma solução padrão de KOH $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ até $\text{pH} = 12,5$, fornecendo cerca de 50 pontos. O pK_w da solução etanol/água 70/30 % contendo $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl (força iônica) utilizado para os cálculos foi $14,78$. A adição de alíquotas de $0,05 \text{ mL}$ de solução de KOH (titulante) foi realizada com auxílio de uma bureta Schott, modelo T80/20, com adições sucessivas de base após a obtenção de valores constantes de pH. As titulações foram repetidas por três vezes e os valores foram obtidos como a média dos três experimentos. As constantes de equilíbrio foram calculadas com programa BEST7²⁹ e os diagramas de distribuição de espécies foram obtidas

com os programas SPE e SPEPLOT²⁹. As constantes de estabilidade foram variadas para a realização do melhor ajuste entre os valores observados e calculados de pH para cada ponto de acordo com o parâmetro estequiométrico fornecido.

3.2.8 Reatividade

A atividade catalítica dos complexos foi avaliada através da reação de hidrólise do éster de fosfato bis-(2,4 dinitrofenil)fosfato, sal de piridinium³⁰, [BDNPP]⁻[HPy]⁺, sob condições de excesso de substrato. As reações foram realizadas em cubetas de vidro óptico com volume de 4mL e caminho óptico de 1,0cm, seladas com tampa de teflon, onde foram adicionados 2,0mL de solução tampão 0,1mol.L⁻¹, I= 0,1mol.L⁻¹ com a adição de LiClO₄ (em água), 0,2mL de complexo (6,0.10⁻⁵mol.L⁻¹ em acetonitrila), quantidades adequadas de substrato entre 0,2 e 1,6mL (2,5.10⁻² mol.L⁻¹ em acetonitrila) e acetonitrila para completar o volume de 4,0mL da mistura reacional.

As soluções tampão foram obtidas a partir de tampões MES, HEPES e CHES, solubilizados em água desionizada e o pH ajustado pela adição de hidróxido de lítio, com auxílio de um pHmetro (precisão de 2 dígitos) com eletrodo de vidro combinado Ag/AgCl. A força iônica foi mantida constante em I= 0,1mol.L⁻¹ pela adição de perclorato de lítio.

Foi utilizado em um espectrofotômetro Hewlett Packard modelo 8452 utilizando o software Microquímica MQCIN para a aquisição dos dados e posteriormente exportados no formato ASCII e tratados no software Microcal Origin 5.0.

O acompanhamento das reações foi realizado acompanhando-se o aumento na absorvância em 400nm ($\epsilon = 12100\text{mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$).

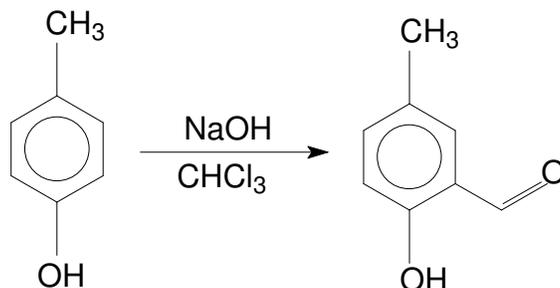
A influência do pH sobre a velocidade da reação de hidrólise foi investigada na faixa de pH entre 3,6 e 10,0, onde [complexo] = 8,0.10⁻⁵mol.L⁻¹, [substrato] = 5,0.10⁻³mol.L⁻¹.

O gráfico das velocidades iniciais (V_0) em função do pH permitiu a obtenção dos valores de pK para as espécies em equilíbrio e pH ótimo (valor de pH onde a atividade catalítica é máxima). O estudo para a determinação das velocidades iniciais em função da concentração de substrato foi realizado sob as mesmas condições descritas para o estudo da influência do pH, no valor de pH ótimo, resultando em cinéticas de saturação com comportamento de Michaelis-Menten.

O tratamento dos dados através do método de Lineweaver-Burk permitiu a obtenção da constante catalítica (k_{cat}), velocidade máxima ($V_{máx.}$) e constante de Michaelis-Menten (K_M), além do fator catalítico, definido como sendo a razão entre a constante catalítica e a constante da reação não catalisada ($f = k_{cat} / k_{n\tilde{a}o\ catalisada}$), eficiência catalítica ($E = k_{cat}/K_M$) e da constante de associação ($K_{ass} = 1/K_M$). A determinação do número de moléculas de substrato hidrolisadas por molécula de complexo foi realizada pelo acompanhamento espectrofotométrico em 445 nm da reação de $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ do complexo com $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de BDNPP, em pH 6,80 (tampão MES) a 50°C durante 26 horas. O cálculo do número de moléculas do substrato hidrolisadas foi realizado com base na absorvância do 2,4 dinitrofenolato liberado em 445nm ($\epsilon = 3600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).

3.2 Síntese do ligante $\text{H}_2\text{L1}$ ^{31,32}

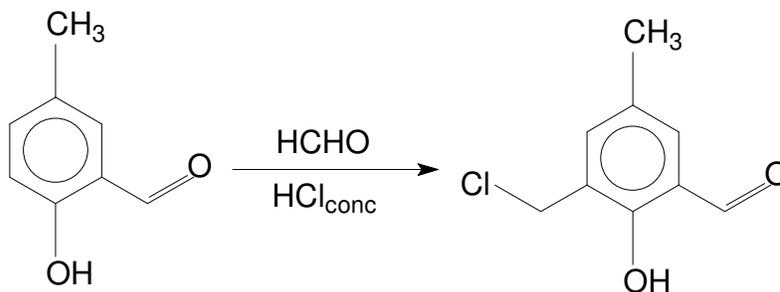
3.2.1 Síntese do 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído - HMB



O HMB foi sintetizado através de uma reação de formilação do p-cresol, baseada no procedimento descrito na literatura para a reação de Reimer-Tiemann³³. Em um balão de 5000mL equipado com um condensador e agitador mecânico, em banho de água a 56°C adicionou-se 3L de clorofórmio e 314mL de p-cresol ($MM= 108,14 \text{ g.mol}^{-1}$, $n= 3$, $m= 324,42 \text{ g}$, $d= 1,034 \text{ g.mL}^{-1}$). Sob agitação iniciou-se a adição de uma solução de NaOH ($MM=40\text{g.mol}^{-1}$, $n= 3$, $m=120\text{g}$) (solubilizados em 80mL de água destilada), em pequenas porções durante as 3 primeiras horas de reação. Deixou-se reagir por mais 1 hora completando as 4 horas de reação e então deixou-se resfriar até a temperatura ambiente. Adicionou-se então cerca de 2L de água destilada e sob agitação iniciou-se a neutralização com HCl concentrado até pH 2. A fase orgânica foi separada, lavada com água destilada, seca com NaSO_4 anidro e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O material restante (um óleo preto viscoso) foi destilado a pressão reduzida com auxílio de uma coluna de vigreux de 40cm (55-65°C a 0,1mmHg). Obtiveram-se 25g de 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído ($MM= 136,15 \text{ g.mol}^{-1}$) com rendimento de 70%.

^1H RMN (δ , ppm) : 2,34 (s, 3 H); 6,90 (d, 1 H); 7,34 (dd, 2 H); 9,85 (s, 1 H); 10,84 (s, 1 H).

3.2.2 Síntese do 2-clorometil-4-metil-6-(formil)fenol - CMFF

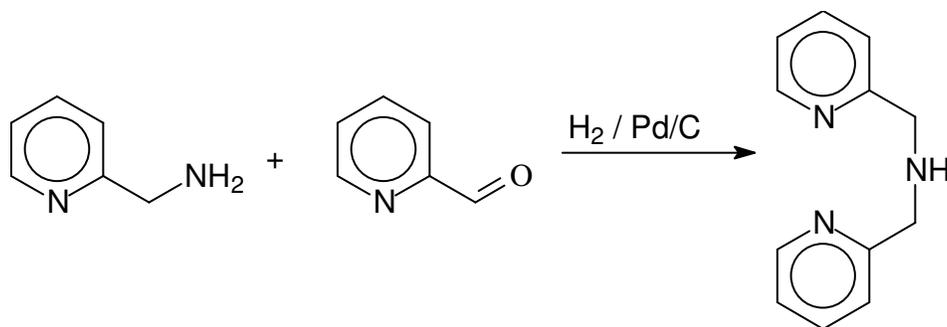


Em um balão de 250mL foram adicionados 6,4g de 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído ($MM= 136,15\text{g.mol}^{-1}$, $n=4,7\text{mmol}$), 7,5 mL de formaldeído e 25 mL de ácido clorídrico concentrado. Sob agitação magnética

deixou-se refluxar por 15 minutos e resfriou-se até 0°C. Um precipitado formou-se no fundo do balão, sendo então triturada, filtrada sob vácuo, lavado com HCl concentrado e recristalizado em etanol absoluto a quente. O sólido obtido foi deixado secar no dessecador com sílica por 12 horas e armazenado no freezer. **Cuidado:** durante a reação é formado o composto bis-(clorometil)éter, composto altamente tóxico e comprovadamente um potente agente carcinogênico. Por isso, deve-se trabalhar em capela com luvas e máscara de proteção. Além disso, todo o material utilizado na síntese deve ser lavado com uma solução alcalina (etanol/água/KOH : 60/40/5g) na própria capela pois o bis-(clorometil)éter é hidrolisado na presença de base.

^1H RMN (δ , ppm) : 2,35 (s, 3 H); 4,67 (s, 2 H); 7,35 (2 s, 2 H); 9,86 (s, 1 H); 11,25 (s, 1 H).

3.2.3 Síntese do bis-(2-piridilmetil) amina - BPMA

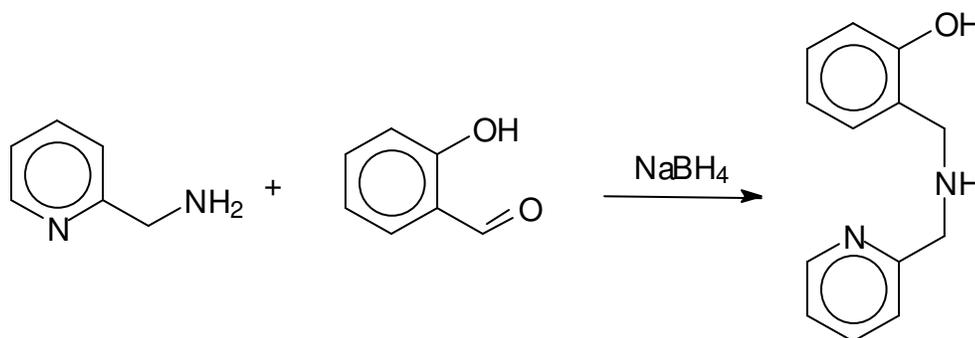


Em um béquer de 400mL foram adicionados a 100mL de metanol sob agitação magnética e banho de gelo 51,5mL (MM=108,14 g.mol⁻¹, n=0,5 mol, d= 1,05 g.mL⁻¹) de 2-aminometilpiridina. Em seguida adicionaram-se 47,56 mL (MM=107,11g.mol⁻¹, n=0,5 mol, d= 1,126 g.mL⁻¹) de piridincarboxialdeído e deixou-se a mistura reagir por 30 minutos. Então essa solução foi transferida para uma garrafa apropriada contendo 1g de paládio/carbono 5% (previamente ativado em 50mL de metanol por 1 hora), sob atmosfera de hidrogênio a 60 psi e agitada por 15 horas. A solução foi então filtrada e o solvente evaporado a

pressão reduzida a 40°C. Para eliminação completa do metanol e água residuais o balão foi mantido sob alto vácuo (0,1mm Hg) por 6 horas aquecido a 40°C. Foi obtido rendimento de 100%.

^1H RMN (δ , ppm) : 2,90 (s, 1 H); 3,99 (s, 4 H); 7,15 (m, 2 H); 7,35 (d, 2H); 7,63 (dt, 2H); 8,56 (d, 2 H).

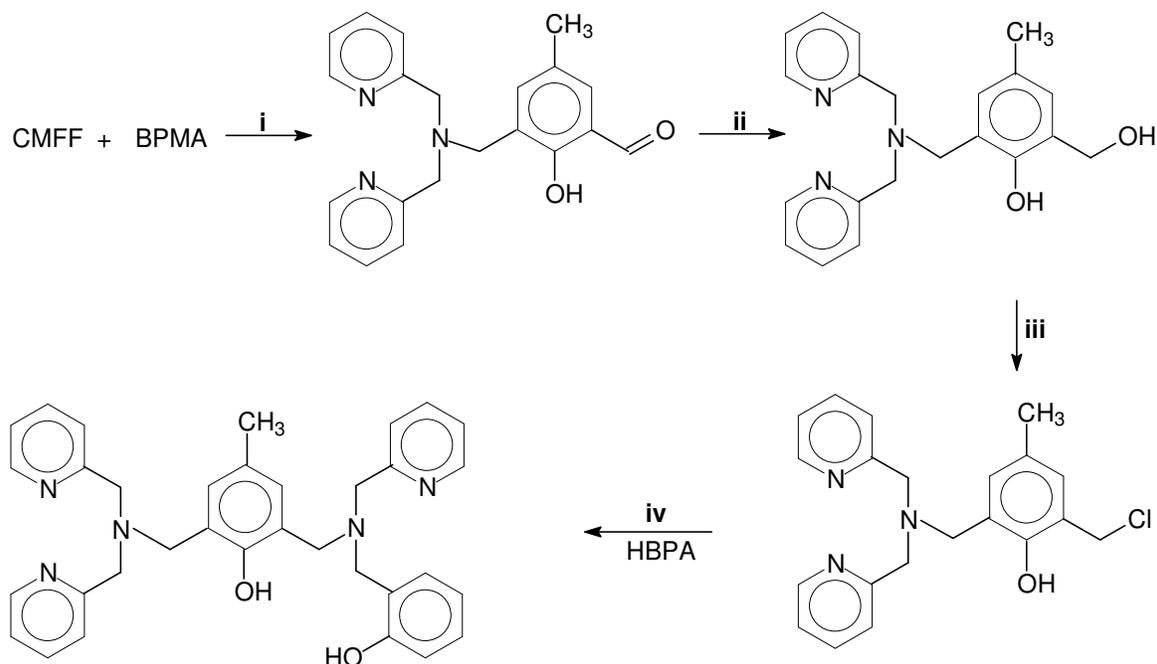
3.2.4 Síntese do 2-(hidróxibenzil)-2-(piridilmetil)amina -HBPA



Em um béquer contendo 100mL de metanol em banho de gelo foram adicionados 15mL ($\text{MM}=108,14\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n=0,15$ mol, $d= 1,05\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de 2-aminometilpiridina, seguida pela adição de 16mL ($\text{MM}= 122,12\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n=0,15\text{mol}$, $d= 1,16\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de aldeído salicílico, sob agitação magnética. Após 1 hora de reação foram adicionados 5,7g ($\text{MM}=37,83$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n=0,15\text{mol}$) de borohidreto de sódio em pequenas porções durante 1 hora e ajustou-se o pH entre 6 e 7 com HCl 2N. Evaporou-se o solvente sob pressão reduzida a 40°C e adicionou-se clorofórmio ao óleo restante, que foi lavado com uma solução de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi então seca com NaSO_4 anidro e o clorofórmio evaporado sob pressão reduzida. Ao óleo amarelo claro foi adicionado éter etílico e levado ao freezer a fim de provocar a precipitação do produto que foi filtrado e lavado com éter etílico gelado. Foram obtidos 25g ($\text{MM}=214\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n=0,12\text{mol}$) de HBPA com rendimento de 80% .

^1H RMN (δ , ppm) : 3,92 (s, 2H); 4,00 (s, 2H); 6,74-6,88 (m, 2H); 6,97 (d, 1H); 7,14-7,26 (m, 6H); 7,81 (dt, 1H); 8,58 (d, 1H).

3.2.5 Síntese do 2-[bis-(piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidróxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil] fenol H₂L1



etapa i: Realizou-se uma reação de substituição nucleofílica do cloreto do CMFF pela amina secundária do BPMA, formando 2-[bis-(piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formil-fenol (BPMAMFF). Em um balão de 250mL, foram adicionados 5,6g de CMFF ($\text{MM} = 184,62\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n=0,03\text{mol}$), dissolvido em 80mL de diclorometano e resfriado a 0°C em um banho de gelo. Uma solução de 6,0g de BPMA ($\text{MM} = 199,26\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n=0,03\text{mol}$) em 80mL de diclorometano foram adicionados lentamente sobre o CMFF com auxílio de um funil de adição. Depois de completada a adição, o banho de gelo foi removido e a mistura reacional deixada sob agitação por 12 horas a temperatura ambiente. Terminada a reação, a solução resultante foi transferida para um funil de separação e lavada exaustivamente com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com

sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado até a secura sob vácuo a 40°C, restando um óleo amarelado que foi dissolvido em 40mL de isopropanol a quente e transferido para um béquer. Após algumas horas, formou-se um precipitado cristalino que foi lavado com isopropanol gelado e filtrado. Foram obtidos 8,0g de BPMAMFF ($MM=347,42\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n=0,03\text{ mol}$) com rendimento de 77%.

$^1\text{H RMN}$ (δ , ppm): 2,30 (s, 3 H); 3,74 (s, 2 H); 3,94 (s, 4 H); 7,18-7,30 (m, 3 H); 7,40-7,47 (m, 3 H); 7,64-7,72 (m, 2 H); 8,60 (d, 2 H); 10,45 (s, 1H).

etapa ii: 13,6g ($MM=347,42\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n=0,03\text{ mol}$) de BPMAMFF foram adicionados a um balão de 250mL contendo 50mL de tetrahidrofurano de 20mL de metanol, sob agitação magnética, formando uma solução amarelo-clara. Adicionaram-se, em pequenas porções, 1,5g ($MM = 37,83\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n= 0,039\text{mol}$) de borohidreto de sódio, tornando a solução incolor ao final da adição. Então ajustou-se o pH da reação para 7 pela adição de ácido clorídrico 2,0N, evaporou-se o solvente e adicionaram-se 100mL de diclorometano e 50mL de água ao óleo viscoso restante no balão. Essa mistura foi transferida para um balão de separação e lavada exaustivamente com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado a pressão reduzida, restando uma espuma branca, que foi seca em um dessecador com sílica sob vácuo. Foram obtidos 13,36g ($MM= 349,43\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n=0,038\text{mol}$) de BPMAMHF com rendimento de 98%.

$^1\text{H RMN}$ (δ , ppm): 2,23 (s, 3 H); 3,76 (s, 2 H); 3,88 (s, 4 H); 4,73 (s, 2 H); 6,82 (s, 1 H); 6,95 (s, 1 H); 7,17 (t, 2 H); 7,32 (d, 2 H); 7,63 (m, 2 H); 8,56 (d, 2 H).

etapa iii: 13,36g ($MM= 349,43\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $0,038\text{mol}$) de BPMAMHF foram solubilizados em 60mL de diclorometano sob agitação magnética, formando uma solução incolor sobre a qual adicionaram-se, gota a gota, 3,3mL ($MM = 118,97\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n= 0,046\text{mol}$, $d= 1,64\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de cloreto de tionila. Formou-se uma solução amarelo-clara que foi deixada reagir por 30 minutos. Então evaporou-se o solvente até a secura a 40°C sob vácuo; adicionaram-se mais 50mL de

diclorometano, que foi novamente evaporado, e repetiu-se esse procedimento mais duas vezes. Formou-se uma espuma branca que foi seca sob vácuo, (0,1mmHg) a 40°C por 24 horas, obtendo-se 15,4g de produto (MM = 404,34g.mol⁻¹, 0,038mol).

¹H RMN, ppm (D₂O): 2,07 (s, 3 H); 3,71 (s, 2 H); 4,41 (2 s, 4 H); 6,73 (s, 1 H); 6,87 (s, 1 H); 7,87 (m, 4 H); 8,42 (t, 2 H); 8,64 (d, 2 H).

etapa iv: Realizou-se a reação do BPMAMCF. HCl (404,34g.mol⁻¹, m 0,0275mol) com 5,89g (MM 214,17g.mol⁻¹, n = 0,0275mol) de 2-(hidroxibenzil-2-(piridilmetil)amina (HBPA), na presença de 11,5mL de trietilamina (MM = 101,19g.mol⁻¹, n= 0,0825mol, d= 0,727g.mL⁻¹) em diclorometano, sob refluxo e agitação magnética durante 24 horas. Após esse período, a solução reacional foi lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio e a fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e o óleo amarelado resultante foi solubilizado em acetona. Essa solução foi mantida sob refrigeração durante 24 horas, o que provocou a precipitação de produto que foi filtrado e seco sob vácuo. Foram obtidos 11,5g (MM = 545,68 g.mol⁻¹, n= 0,0210mol) do ligante 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol] (H₂L1) com rendimento de 76%.

p. f. 86-87°C

¹H RMN, ppm (CDCl₃): 2,30 (s, 3 H); 3,74 (s, 2 H); 3,79 (s, 2 H); 3,85 (s, 8 H); 6,71-7,17 (m, 9 H); 7,37 (d, 3 H); 7,60 (t, 3 H); 8,56 (d, 3 H).

3.3 Síntese dos compostos de coordenação

3.2.1 Síntese do complexo $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$

Em um béquer contendo 20mL de metanol foram dissolvidos 0,27g (0,5mmol) do ligante $\text{H}_2\text{L1}$ sob agitação e aquecimento moderado. Sobre esta solução foram adicionados 0,18g (0,5mmol) de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e gotejados lentamente 20mL de uma solução metanólica contendo 0,12g (0,5mmol) de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, cuja coloração alterou-se imediatamente de castanha para verde. Em seguida, foram adicionados 0,27g de $\text{NaOAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2mmol) e 0,24g (2mmol) de NaClO_4 . O aquecimento e a agitação foram mantidos por cerca de quinze minutos. A solução foi filtrada e permaneceu em repouso por 24 horas formando um precipitado verde. A recristalização do composto em acetonitrila/acetato de etila resultou em um produto microcristalino.

3.2.2 Síntese do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$

Em um béquer contendo 20mL de metanol foram dissolvidos 0,27g (0,5mmol) do ligante $\text{H}_2\text{L1}$ sob agitação e aquecimento moderados. Sobre esta solução foram adicionados 0,18g (0,5mmol) de $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e gotejados lentamente 20mL de uma solução metanólica contendo 0,12g (0,5mmol) de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, não havendo alteração de cor. Foram adicionados em seguida 0,27g de $\text{NaOAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2mmol) e 0,24g (2mmol) de NaClO_4 . O aquecimento e a agitação foram mantidos por cerca de quinze minutos. A solução foi então filtrada e permaneceu em repouso por 24 horas formando cristais rosados adequados à resolução da estrutura cristalina por difratometria de raios X.

4 Resultados e discussão

4.1 Caracterização do ligante

4.1.1 Espectroscopia no infravermelho

Conforme pode ser observado no espectro na região do infravermelho (Figura 5) estiramentos característicos de grupos como fenol e aromáticos são encontrados.

Na região acima de 3000 cm^{-1} pode-se observar uma larga banda referente ao estiramento O-H dos grupos fenóis. Pela forma alargada da banda pode-se inferir que não há interação intramolecular de hidrogênio na molécula. Entre 2980 a 2920 cm^{-1} estiramentos correspondentes as ligações C-H das metilenas e da metila são evidenciados.

Os estiramentos correspondentes aos anéis aromáticos piridinas são observados na região entre 1600 cm^{-1} (C=C) e 1570 cm^{-1} (C=N).

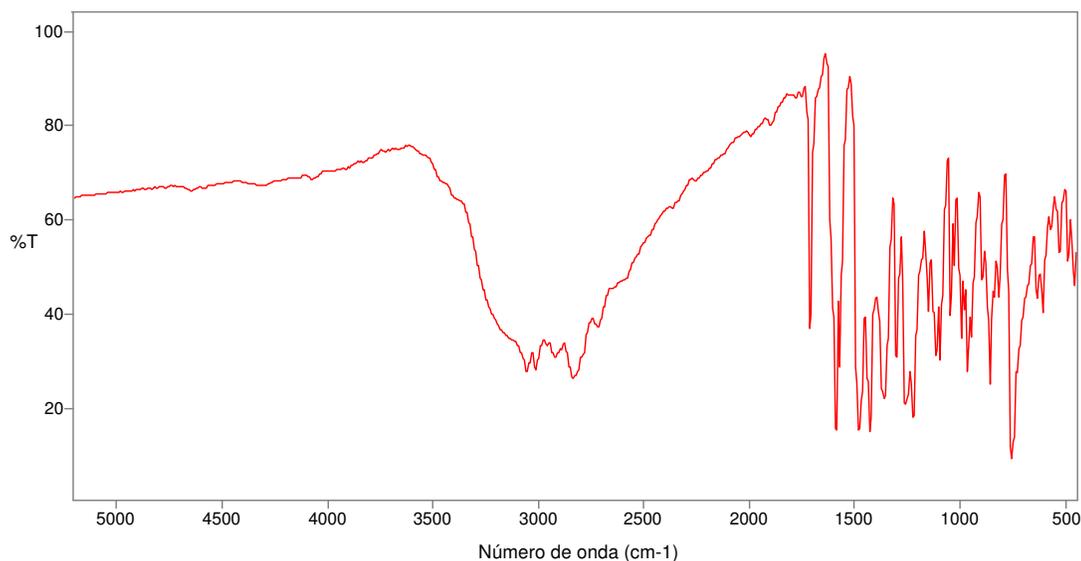


Figura 5. Espectro no infravermelho do ligante L1.

4.1.2 Espectroscopia de ^1H RMN

Os deslocamentos químicos e a integração dos sinais observados nos espectros de ^1H RMN permitiram determinar o número de prótons presentes no ligante e distinguir entre os átomos de hidrogênio metílicos, metilênicos e aromáticos. A relação entre o número dos diferentes átomos de hidrogênio permitiu confirmar a obtenção do ligante sintetizado com pureza adequada. Não foi possível a determinação das constantes de acoplamento devido à sobreposição de sinais na região dos prótons aromáticos.

^1H -RMN (CDCl_3): δ (ppm) 2,30 (s, 3H, CH_3); 3,72(s, 2H, CH_2); 3,79 (s, 2H, CH_2); 3,85 (s, 8H, CH_2); 6,71-7,17(m, 9H, CH_{Ar}); 7,37 (d, 3H, CH_{Ar}); 7,60 (t, 3H, CH_{Ar}); 8,56 (d, 3H, CH_{Ar}).

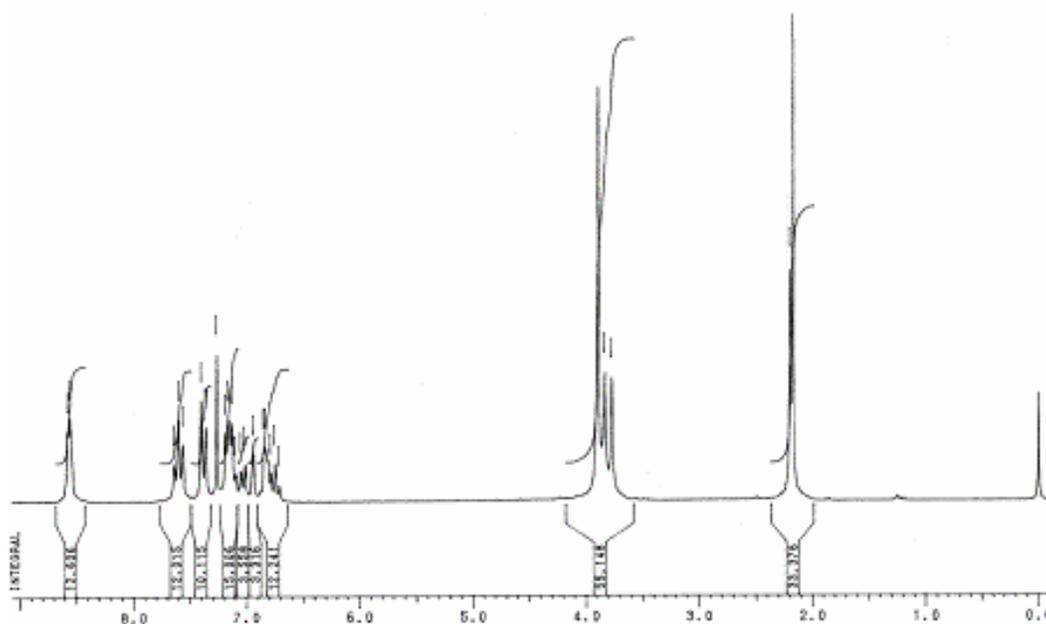


Figura 6. Espectro de ^1H -RMN em CDCl_3 do ligante L1.

4.2 Caracterização dos complexos

Os complexos $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ e $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ foram caracterizados por técnicas espectroscópicas (infravermelho e eletrônica) eletroanalíticas. O complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ teve sua estrutura determinada por difração de raios X de monocristal. Os resultados das análises são descritos e discutidos a seguir.

4.2.1 Estrutura Cristalina por Difractometria de Raios X

A estrutura cristalina do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ foi obtida através da análise de monocristais do complexo pelo método de difração de raios X.

O complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ apresenta um arranjo heterodinuclear onde cada íon metálico encontra-se coordenado por umas das metades do ligante heptadentado e ponteados pelo grupo fenolato 2,4,6 substituído. O átomo de Zn^{II} está coordenado a dois nitrogênios piridínicos e um nitrogênio de uma amina terciária, enquanto que o átomo de Ga^{III} encontra-se na parte mais dura do ligante, coordenado a um nitrogênio piridínico, um nitrogênio amínico e pelo oxigênio do fenolato terminal. Para completar a esfera de coordenação, nos metais estão presentes pontes do tipo μ -acetato exógenas, formando um arranjo octaédrico distorcido com as duas metades do ligante ocupando as faces externas do octaedro e as pontes acetato e fenóxido as faces internas.

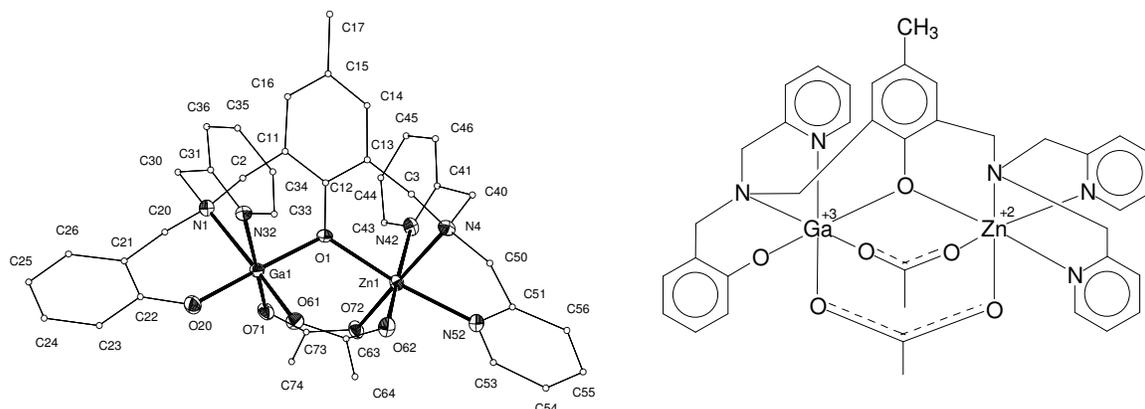


Figura 7. Zortep²⁷ da estrutura molecular do cátion complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]^+$.

Tabela 1. Dados cristalográficos para o complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\cdot\text{H}_2\text{O ClO}_4$.

Fórmula empírica	$\text{C}_{38}\text{H}_{41}\text{ClGa}_5\text{N}_{11}\text{O}_{11}\text{Zn}$
Massa Molar	914.30
Sistema Cristalino	Monoclinico
Grupo Espacial	$\text{P2}_1/\text{n}$
	$a = 12.737(3) \text{ \AA}$
	$b = 16.997(5) \text{ \AA}$
	$c = 18.322(3) \text{ \AA}$
Cela unitária	$\beta = 93.87(2)^\circ$
Volume	$3957.5(16) \text{ \AA}^3$
Z	4
Densidade	1.535 g/cm^3
Reflexões coletadas	6692
Raio interno	0,954
Parâmetros refinados	508
“Goodness-of-fit on”	1014
Índices finais	$\text{R1} = 0,0575$
$[I > 2s(I)]$	$w\text{R}_2 = 0,1694$

O complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ apresenta o mesmo modo de coordenação do composto similar $\text{FeZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ ³². Em ambos complexos os átomos de oxigênio das pontes acetato estão coordenados ao sítio de Zn^{II} em posição *trans* a uma das piridinas e à amina terciária, enquanto que a outra piridina ligada ao sítio divalente encontra-se coordenada em posição *trans* à ponte fenóxido. As pontes acetato ligadas aos átomos de Ga^{III} estão coordenadas em posição *trans* aos átomos de nitrogênio piridínicos e amínico. O fenolato terminal está coordenado em posição *trans* à ponte fenóxido.

No complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ obteve-se a média dos comprimentos de ligação no átomo de Ga^{III} de $2,016 \text{ \AA}$ enquanto a apresentada pelo composto $\text{FeZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ ³² é de $2,041 \text{ \AA}$. A diferença se deve ao raio iônico do Ga^{III} ser menor quando comparado ao Fe^{III} .

Tabela 2. Principais comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação para o complexo [GaZnL1(μ-OAc)₂]ClO₄

Zn(1)-O(72)	1,871(5)	Ga(1)-O(71)	1,893(5)
Zn(1)-N(4)	2,060(6)	Ga(1)-O(20)	1,908(6)
Zn(1)-O(62)	2,103(5)	Ga(1)-O(1)	1,989(5)
Zn(1)-N(42)	2,218(6)	Ga(1)-O(61)	2,005(6)
Zn(1)-O(1)	2,228(5)	Ga(1)-N(32)	2,046(6)
Zn(1)-N(52)	2,257(7)	Ga(1)-N(1)	2,257(6)
Zn(1) – Ga(1) 3,701			
O(72)-Zn(1)-N(4)	171,3(2)	O(71)-Ga(1)-O(61)	95,8(2)
O(72)-Zn(1)-O(62)	94,2(2)	O(20)-Ga(1)-O(61)	88,1(2)
N(4)-Zn(1)-O(62)	93,7(2)	O(1)-Ga(1)-O(61)	91,2(2)
O(72)-Zn(1)-N(42)	93,9(2)	O(71)-Ga(1)-N(32)	168,4(3)
N(4)-Zn(1)-N(42)	78,4(2)	O(20)-Ga(1)-N(32)	89,7(3)
O(62)-Zn(1)-N(42)	171,7(2)	O(1)-Ga(1)-N(32)	91,7(2)
O(72)-Zn(1)-O(1)	90,4(2)	O(61)-Ga(1)-N(32)	95,4(2)
N(4)-Zn(1)-O(1)	93,3(2)	O(71)-Ga(1)-N(1)	93,4(2)
O(62)-Zn(1)-O(1)	89,3(2)	O(20)-Ga(1)-N(1)	87,0(2)
N(42)-Zn(1)-O(1)	88,5(2)	O(1)-Ga(1)-N(1)	93,9(2)
O(72)-Zn(1)-N(52)	101,2(2)	O(61)-Ga(1)-N(1)	169,9(2)
N(4)-Zn(1)-N(52)	76,0(3)	N(32)-Ga(1)-N(1)	75,7(2)
O(62)-Zn(1)-N(52)	84,2(2)	C(22)-O(20)-Ga(1)	131,7(5)
N(42)-Zn(1)-N(52)	96,4(2)	C(63)-O(61)-Ga(1)	137,7(5)
O(1)-Zn(1)-N(52)	167,0(2)	C(63)-O(62)-Zn(1)	132,1(5)
O(71)-Ga(1)-O(20)	93,8(2)	C(73)-O(71)-Ga(1)	136,6(5)
O(71)-Ga(1)-O(1)	84,9(2)	C(73)-O(72)-Zn(1)	130,4(5)
O(20)-Ga(1)-O(1)	178,4(2)		
Ga(1)-O(1)-Zn(1) 122,6(2)			

4.2.2 Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho foi bastante útil na caracterização inicial dos complexos uma vez que apresentaram bandas características do ligante comprovando a formação dos compostos de coordenação. A Tabela 3 apresenta as principais bandas e suas respectivas atribuições para os complexos [GaCuL1(μ-OAc)₂]ClO₄ e [GaZnL1(μ-OAc)₂]ClO₄.

Observa-se, nos espectros, a presença de bandas na região de 1600 e 1570 cm^{-1} referentes ao estiramento C=C e C=N, respectivamente, dos anéis piridínicos. Em ambos complexos pode ser observada também uma banda na região de 1100 cm^{-1} atribuída ao estiramento das ligações Cl-O do contra-íon perclorato e o desaparecimento da banda na região de 1380 cm^{-1} referente ao modo de vibração δ (O-H) fora do plano dos anéis fenólicos, o que evidencia a coordenação do fenol na forma desprotonada .

Observa-se ainda no espectro de infravermelho a banda referente ao estiramento das ligações C-H em 2920 cm^{-1} da metilas e metilenas.

Podem ser observadas bandas entre 1200 e 1450 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos assimétrico e simétrico do ânion acetato coordenado como ponte na forma bidentada.

A banda larga na região acima de 3000 cm^{-1} pode ser atribuída à presença de moléculas de solvente de cristalização (H_2O) ou umidade da matriz (KBr).

Tabela 3. Principais bandas (cm^{-1}) e atribuições nos espectros no infravermelho dos complexos estudados.

Atribuições	[GaCuL1(μ -OAc) ₂]ClO ₄	[GaZnL1(μ -OAc) ₂]ClO ₄
ν (OH)	3341	3474 / 3604
ν (CH ₂ /CH ₃)	2929	2927
ν (C=C/C=N)	1609 / 1574	1602 / 1571
ν_{ass} (OAc)	1602	1602
ν_{sim} (OAc)	1452	1426
δ (C-O) _{fenol}	1255	1228
ν (Cl-O)	1088	1094

4.2.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ^1H RMN e ^{13}C

Por ser composto apenas por metais de transição com configuração eletrônica d^{10} o complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ possibilitou que sua análise de RMN fosse mais facilmente interpretada.

A caracterização através de RMN se torna importante uma vez que existe o interesse na identificação do produto da hidrólise do substrato 2,4-BDNPP catalisada via complexo. Essa caracterização pode ser realizada, entre outras técnicas através de RMN.

A atribuição dos sinais foi realizada a partir da previsão realizada com o auxílio de tabelas descritas na literatura.^{34,35}

Para facilitar a discussão dos espectros e a atribuição dos sinais a Figura 9 apresenta um esquema de numeração utilizado.

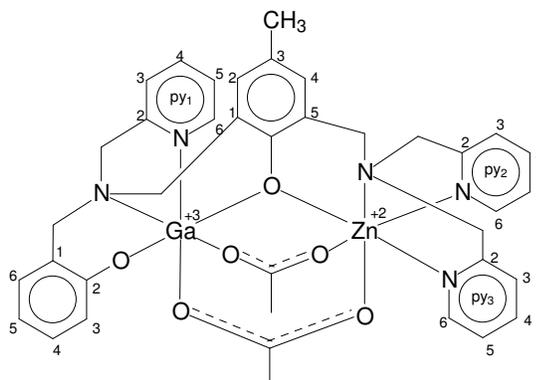


Figura 8. Esquema de numeração utilizado na discussão de RMN do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$.

O espectro de ^1H -RMN (Figura 8) apresentou uma diferenciação dos hidrogênios metilênicos por estarem em ambientes químicos diferentes devido a estrutura rígida na qual o ligante se encontra quando complexado aos dois metais de transição. Observa-se uma faixa mais ampla (de 3,0 a 5,3ppm) de deslocamento químico onde pode ser observado o acoplamento entre dois

hidrogênios de uma mesma metilena conforme o espectro bidimensional COSY. As atribuições dos hidrogênios é apresentada na Tabela 4.

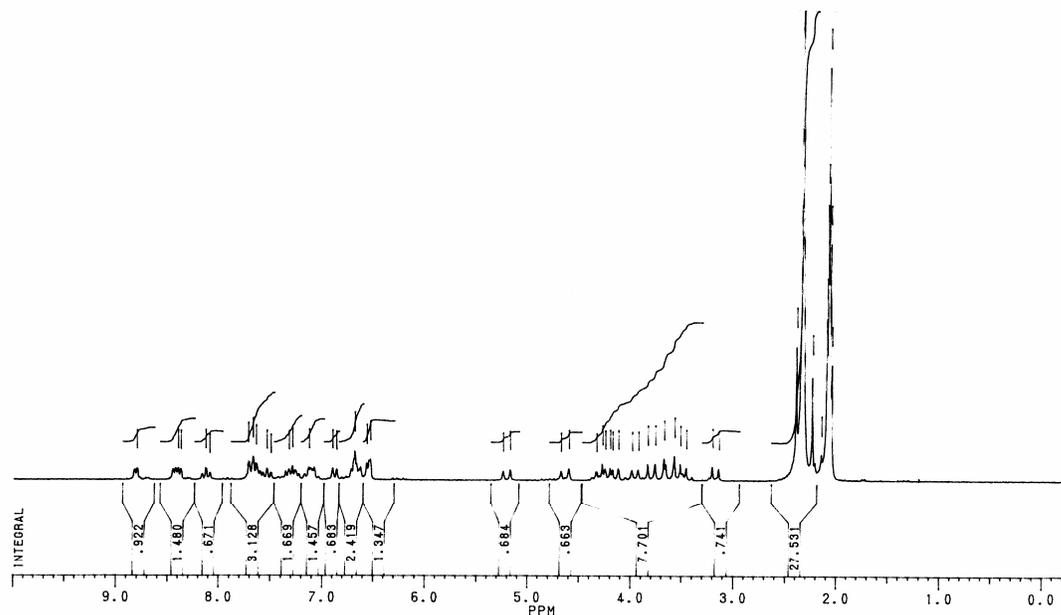


Figura 9. Espectro de ^1H -RMN do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$.

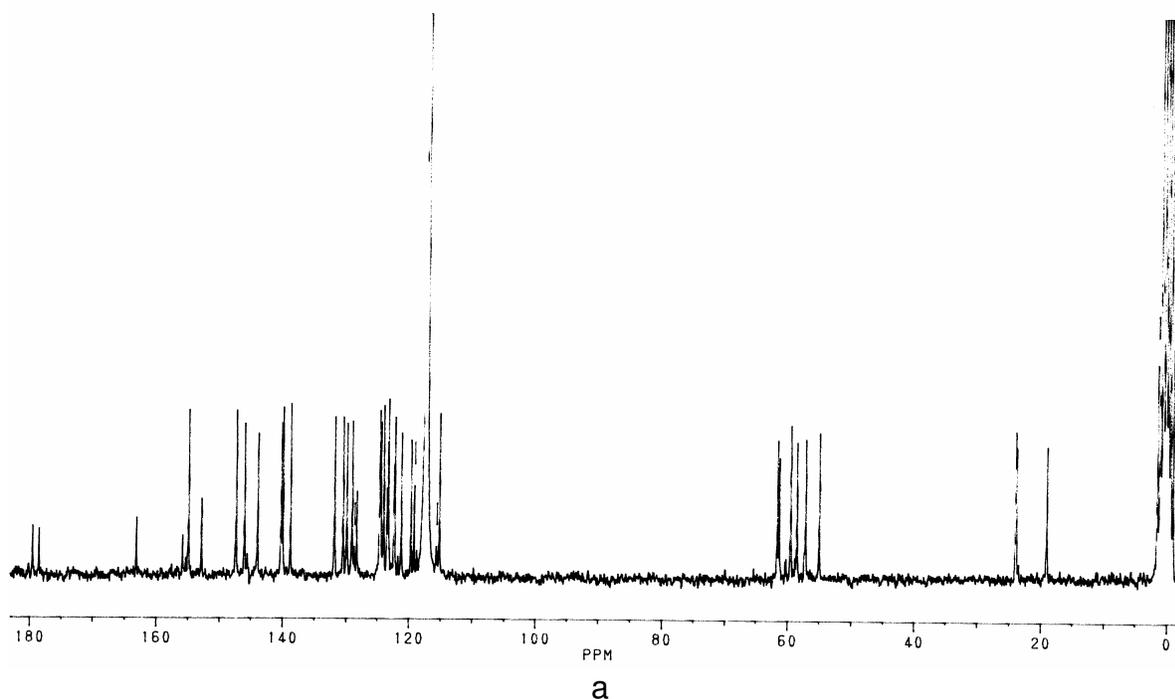
Tabela 4. Deslocamentos químicos observados no espectro de ^1H -RMN do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$.

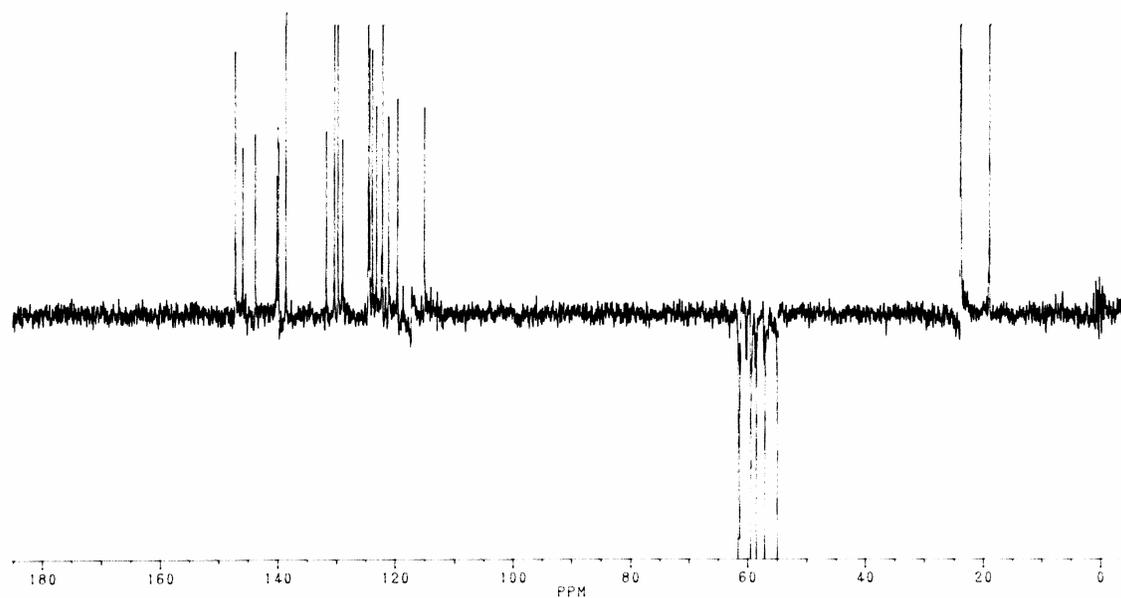
Deslocamento	Integração	Atribuição
2,23-2,39	9H	CH_3
3,0 – 5,23	12H	metilenas
6,52-6,55	2H	H_5 e H_3 – p-cresol
6,67	2H	H_2 e H_4 - fenol
6,85-6,89	2H	H_3 - py_2 e py_3
7,12	2H	H_5 e H_3 – fenol
7,28-7,31	2H	H_5 - py_2 e py_3
7,50-7,53	2H	H_4 - py_2 e py_3
7,63-7,71	1H	H_5 - py_1
8,08-8,12	1H	H_4 - py_1

8,40-8,37	2H	H ₆ - py ₂ e py ₃
8,80	1H	H ₆ - py ₁

A partir do espectro bidimensional COSY foi possível determinar o acoplamento a longa distância entre os hidrogênios metílicos e os hidrogênios H₂ e H₄ do anel p-cresol.

O espectro de ¹³C também foi obtido, auxiliando na elucidação da estrutura do complexo em solução, onde todos os carbonos puderam ser atribuídos. O espectro de ¹³C- RMN DEPT permitiu a distinção entre os carbonos quartenários e os metilênicos, sendo possível atribuir inclusive os carbonos quartenários dos grupos acetato ponte em 178,4 e 179,5 ppm, comprovando a permanência desses grupos em solução de CD₃CN.





b

Figura 10. Espectros de ^{13}C -RMN (a) e ^{13}C -RMN DEPT (b) do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ em CD_3CN a 50,13MHz.

Tabela 5. Deslocamentos químicos observados no espectro de ^{13}C -RMN do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$.

Deslocamento	Atribuição
19,00	CH_3 - p-cresol
23,88-23,97	CH_3 -OAc
55,02-61,60	Metilenas
115,07	C_4 -fenol
119,13	C_4 -p-cresol
119,59	C_2 -fenol
121,12-121,19	C_3 -py ₁ ,py ₂ e py ₃

122,35-123,44	C ₂ e C ₆ ⁻ p-cresol
123,93-124,60	C ₅ -py ₁ ,py ₂ e py ₃
128,26	C ₆ -fenol
128,97	C ₃ -fenol
129,80-130,40	C ₃ e c ₅ p-cresol
131,80	C ₅ -fenol
138,67-140,12	C ₄ -py ₁ ,py ₂ e py ₃
143,81-147,225	C ₆ -py ₁ ,py ₂ e py ₃
152,78	C ₁ -p-cresol
154,84	C ₂ ⁻ py ₂ e py ₃
155,77	C ₁ -fenol
163,08	C ₂ -py ₁
178,43-179,46	C _{OAc}

4.2.4 Estudo de Equilíbrio através de Titulação Potenciométrica

Os estudos de titulação potenciométrica dos complexos [GaCuL1(μ-OAc)₂]ClO₄ e [GaZnL1(μ-OAc)₂]ClO₄ foram realizados em solução etanol/água (70:30) devido à baixa solubilidade dos complexos em água pura. As curvas de distribuição das espécies são apresentadas na Figura 11 e os valores das constantes de protonação e pH para os percentuais máximos das espécies em equilíbrio são descritos na Tabela 6.

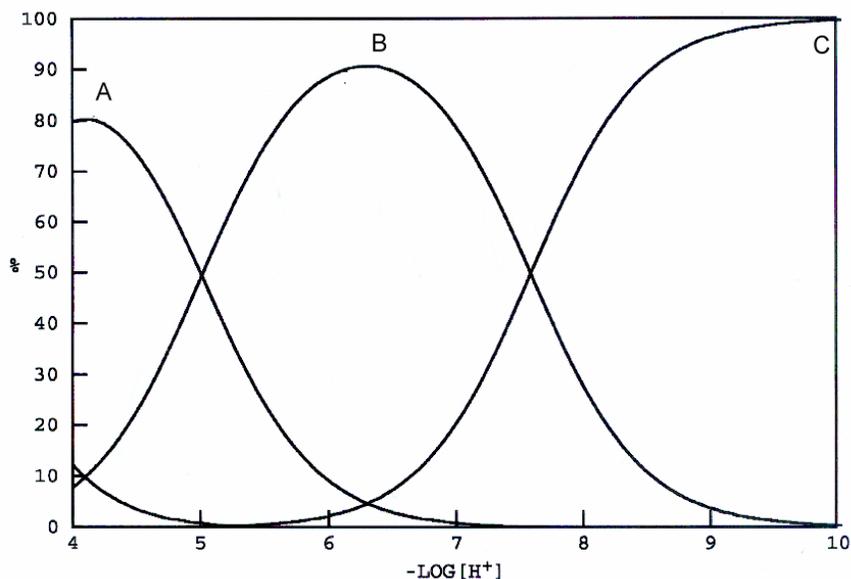


Figura 11. Curvas de distribuição das espécies para o complexo $[\text{Ga}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})_2\text{Cu}^{\text{II}}]\text{ClO}_4$ onde **A** = $(\text{H}_2\text{O})\text{Ga}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})_2\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$, **B** = $(\text{H}_2\text{O})\text{Ga}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$, **C** = $(\text{HO})\text{Ga}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$, **D** = $(\text{HO})\text{Ga}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OH})$.

Pode ser observado que o complexo $[\text{Ga}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})_2\text{Cu}^{\text{II}}]\text{ClO}_4$ apresenta apenas dois pKas. Propõem-se então que, em solução, o complexo não apresente as pontes $\mu\text{-OAc}$ ou $\mu\text{-OH}$, além disso sugere-se que o valor de pKa determinado para a molécula de água no íon Cu^{II} seja mais baixo do que o esperado devido à posição da molécula de água de acordo com a proposta de estrutura de pirâmide de base quadrada para o complexo.

Já curva de equilíbrio para o complexo $[\text{Ga}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})_2\text{Zn}^{\text{II}}]\text{ClO}_4$ apresenta uma região de tampão entre pH 4 e 9, o que corresponde à neutralização de quatro prótons. Este fato indica a hidrólise do complexo onde há a substituição das duas pontes acetato por moléculas de água. As constantes de protonação obtidas para os dois complexos são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de pKa determinados potenciométricamente para os complexos $[\text{Ga}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}\text{L1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ e $[\text{Ga}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$.

Complexo	pK _{a1}	pK _{a2}	pK _{a3}	pK _{a4}
$[\text{GaCuL1}(\mu\text{OAc})_2]^+$	3,18	5,01	-	7,58
$[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]^+$	4,60	5,59	6,19	7,96

Em pH próximo a 4,50 observa-se o primeiro pKa, relacionado à hidrólise da ponte acetato dando origem a espécie $(\text{H}_2\text{O})\text{Ga}^{\text{III}}(\mu\text{-OH}_2)\text{M}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$. Com a desprotonação da molécula de água ligada ao íon Ga^{III} (pKa \cong 5,3) há a formação da espécie $(\text{HO})\text{Ga}^{\text{III}}(\mu\text{-OH}_2)\text{M}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$. Em pH \cong 6,8 observa-se o terceiro pKa, atribuído à desprotonação da água formando a ponte μ -hidróxido após a saída da ponte acetato. O quarto pKa, corresponde à desprotonação da molécula de água ligada ao íon Zn^{II} , observado em pH $>7,5$, onde a espécie predominante é $(\text{HO})\text{Ga}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH})$.

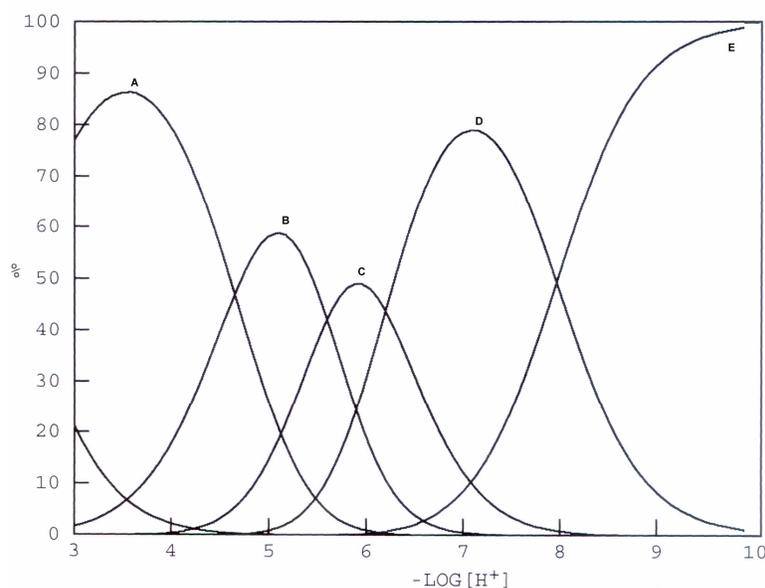


Figura 12. Curvas de distribuição das espécies para o complexo $[\text{Ga}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})_2\text{Zn}^{\text{II}}]\text{ClO}_4$ onde **A** = $(\text{H}_2\text{O})\text{Ga}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$, **B** = $(\text{H}_2\text{O})\text{Ga}^{\text{III}}(\mu\text{-OH}_2)\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$, **C** = $(\text{HO})\text{Ga}^{\text{III}}(\mu\text{-OH}_2)\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$, **D** = $(\text{HO})\text{Ga}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$, **E** = $(\text{HO})\text{Ga}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH})$.

4.2.5 Espectroscopia Eletrônica

Em virtude das propriedades eletrônicas dos complexos de Cu^{II} serem fortemente influenciados pela estereoquímica, descreve-se aqui as principais características eletrônicas apresentadas por complexos de Cu^{II} .

O íon Cu^{II} livre, configuração d^9 , possui nove elétrons distribuídos em cinco orbitais d degenerados. Quando submetido à influência de um campo ligante, esses orbitais sofrem um desdobramento em diferentes níveis de energia (Figura 13), o que possibilita a ocorrência de transições eletrônicas do tipo d-d. A energia de desdobramento desses orbitais é fortemente influenciada pela natureza dos ligantes (série espectroquímica) e pela geometria do centro metálico³⁶. Complexos de Cu^{II} em ambiente octaédrico normalmente apresentam estereoquímicas altamente distorcidas, sendo a mais comum a alongação tetragonal do eixo z, conhecida por distorção Jahn Teller.^{36,37}. Nesses casos, os espectros eletrônicos podem apresentar até três transições, as quais podem estar encobertas em uma banda única e alargada na região entre 600 e 700nm³⁷.

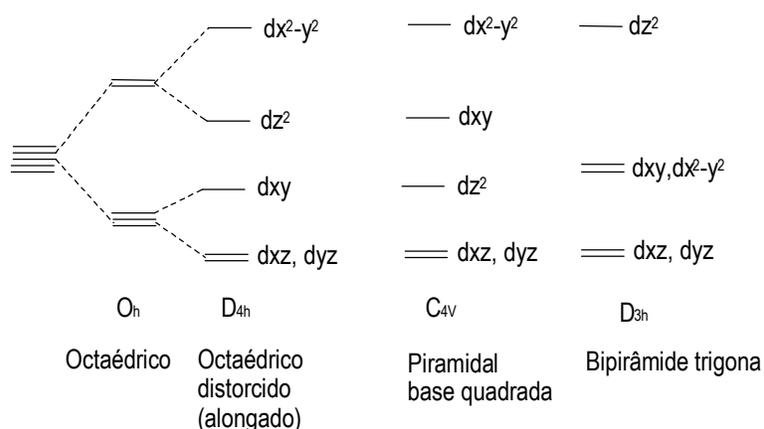


Figura 13. Diagrama de desdobramento dos níveis de energia dos orbitais d em diferentes simetrias.

Complexos de Cu^{II} pentacoordenados normalmente podem encontrar-se em duas geometrias: piramidal de base quadrada e bipirâmide trigonal. Os espectros eletrônicos de complexos de cobre com geometrias piramidais de base

quadrada apresentam tipicamente uma banda de absorção mais intensa em alta energia (região visível) e uma menos intensa (ombro) em menor energia. De maneira contrária, os espectros de complexos bipirâmides trigonais são caracterizados por uma banda menos intensa em mais alta energia e uma outra de maior intensidade em menor energia^{37,38}. Assim, a espectroscopia eletrônica pode ser uma ferramenta muito importante fornecendo uma série de informações a respeito da esfera de coordenação e da geometria da molécula.

Como já mencionado, os complexos de Cu^{II} devem apresentar transições d-d proibidas por Laporte, caracterizadas por baixos valores do coeficiente de absorvidade molar (ϵ). Entretanto, podem apresentar ainda uma banda em maior energia, em relação à d-d, referente às transições de transferência de carga do tipo ligante \rightarrow metal (TCLM) ou metal \rightarrow ligante (TCML), as quais são permitidas por Laporte e são caracterizadas por elevados valores de ϵ .³⁶

Os espectros de absorção do complexo $[\text{GaCuL}1(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ foram avaliados na região entre 300 e 1000nm, utilizando-se acetonitrila, e água como solventes e são apresentados na Figura 14.

Em solução de acetonitrila foi possível observar além de uma banda em 450 nm ($\epsilon = 229\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$), uma banda alargada entre 600 e 850 nm (menos intensa) que por apresentarem valores de $\epsilon < 1000\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$ foram atribuídas às transições d-d do íon Cu^{II} . A observação de todas as bandas foi possível devido à não interferência do íon Ga^{III} , que, possuindo configuração eletrônica d^{10} , não apresenta bandas de absorção na região visível do espectro.

Em água o complexo mostra um comportamento semelhante ao obtido em solvente orgânico apresentando bandas nas mesmas regiões.

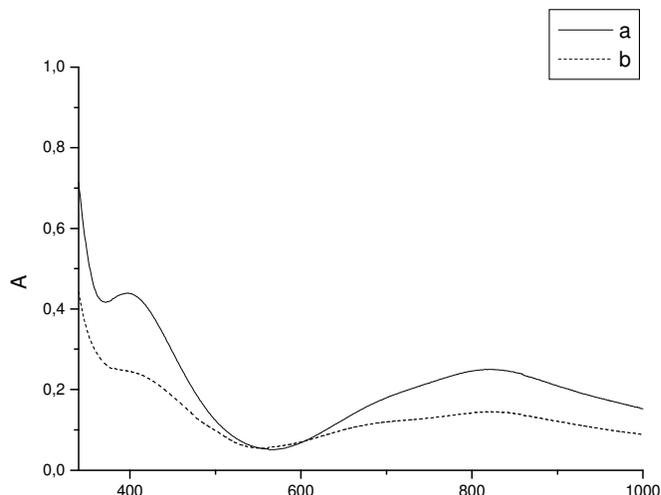


Figura 14. Espectros eletrônicos λ_{dm} do complexo $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ em (a) acetonitrila, (b) água.

De acordo com os espectros obtidos pode-se prever que o complexo $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ presente, em solução, uma geometria de pirâmide de base quadrada.

4.2.6 Espectroscopia Paramagnética de Eletrônica

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE) tem sido uma ferramenta muito útil na investigação da geometria adotada pelos complexos em solução, além de fornecer informações a respeito do estado de oxidação e do tipo de ligante presente na esfera de coordenação do metal. Os principais parâmetros fornecidos pela técnica são: a) o fator g , que caracteriza o ambiente de coordenação no qual o centro metálico está inserido; b) a constante de interação hiperfina A , que é uma interação de natureza dipolar entre o spin do elétron desemparelhado e o spin do núcleo a que esse elétron pertence fornecendo uma medida da grandeza dessa interação (covalência da ligação) e c) a constante de interação super-hiperfina que mede a interação dipolar entre o spin do elétron desemparelhado e o spin do(s) núcleo(s) ligado(s) ao átomo ou íon paramagnético a que pertence esse elétron.³⁹⁻⁴¹

Para o íon Cu^{II} (spin nuclear $=3/2$), o espectro de RPE é caracterizado por apresentar quatro linhas largas. Para os casos de Cu^{II} com distorção Jahn–Teller, as geometrias octaédrica alongada, quadrada, piramidal de base quadrada e bipirâmide trigonal, geralmente apresentam um espectro denominado de axial, com dois componentes g coincidentes ($g_x=g_y=g_{\perp}$), perpendiculares ao eixo do campo magnético e um componente g diferente ($g_z=g_{\parallel}$) paralelo ao campo magnético. As geometrias octaédrica alongada, quadrada e piramidal de base quadrada que apresentam estado fundamental $d(x^2-y^2)$ e seus espectros de RPE em soluções congeladas são caracterizadas por um padrão axial com $g_{\parallel}>g_{\perp}>2,04$ e $A_{\parallel}>A_{\perp}$, de modo que a interação do elétron desemparelhado do cobre seja significativamente maior na direção axial do que com componentes perpendiculares do campo magnético.^{36,42}

Complexos de Cu^{II} pentacoordenados podem adotar geometrias piramidal de base quadrada (estado fundamental $d_x^2-y^2$) e bipirâmide trigonal (estado fundamental d_z^2), que por possuírem o elétron desemparelhado em estados fundamentais diferentes, apresentarão, conseqüentemente, espectros de RPE completamente diferentes. Complexos com coordenação bipiramidal trigonal possuem tipicamente um espectro denominado de “axial reverso” que é caracterizado por $g_{\perp}>g_{\parallel} \approx 2,0$ e $A_{\parallel} = (60-100) \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$.⁴³ Sendo assim, as geometrias de coordenação ao redor do íon metálico em complexos de Cu^{II} , em geral podem ser propostas com o auxílio da espectroscopia de RPE.

O complexo $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ foi investigado por RPE em soluções de acetonitrila e acetonitrila/tampão MES (pH6,5) congeladas em nitrogênio líquido. Os espectros foram simulados com o auxílio do programa Simfonia⁴⁴ e dele foram obtidos os parâmetros $g_{\parallel} = 2,32$ e $A_{\parallel} = 140$ enquanto $g_{\perp} = 2,107$ e $A_{\perp} = 55$.

Conforme observado na Figura 15, o espectro pôde ser simulado como sendo axial com os parâmetros obtidos $g_{\parallel}>g_{\perp}$ e $A_{\parallel}>A_{\perp}$, característicos de complexos com estado fundamental $d_x^2-y^2$, configuração d^9 , com geometria pirâmide de base quadrada o que concorda com os dados obtidos a partir da espectroscopia eletônica e a proposta de estrutura do complexo.

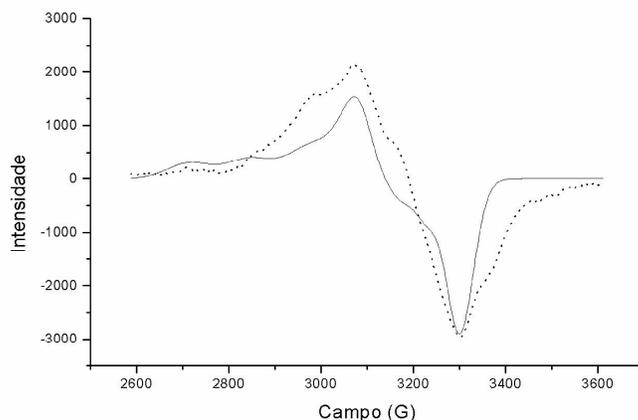


Figura 15. Espectros de RPE experimental (···) e simulado (—) do complexo $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ em acetonitrila/tampão a 77K.

4.2.7 Eletroquímica

O comportamento redox do complexo $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ foi investigado através da técnica de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada em acetonitrila. O voltamograma do complexo é apresentado na Figura 16.

O voltamograma obtido apresenta uma onda irreversível sendo determinado o potencial de $-0,65$ V versus NHE para o complexo referente ao processo $\text{Cu}^{\text{II}} + \text{e}^- \rightarrow \text{Cu}^{\text{I}}$ o qual está de acordo com o potencial encontrado para o complexo $[\text{FeCu}(\text{BPBPMP})(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ ³² ($-0,61$ V vs NHE) .

Dada a maior sensibilidade da técnica de voltametria de onda quadrada pôde-se observar a onda de oxidação do Cu^{I} a Cu^{II} em $-0,63$ V versus NHE.

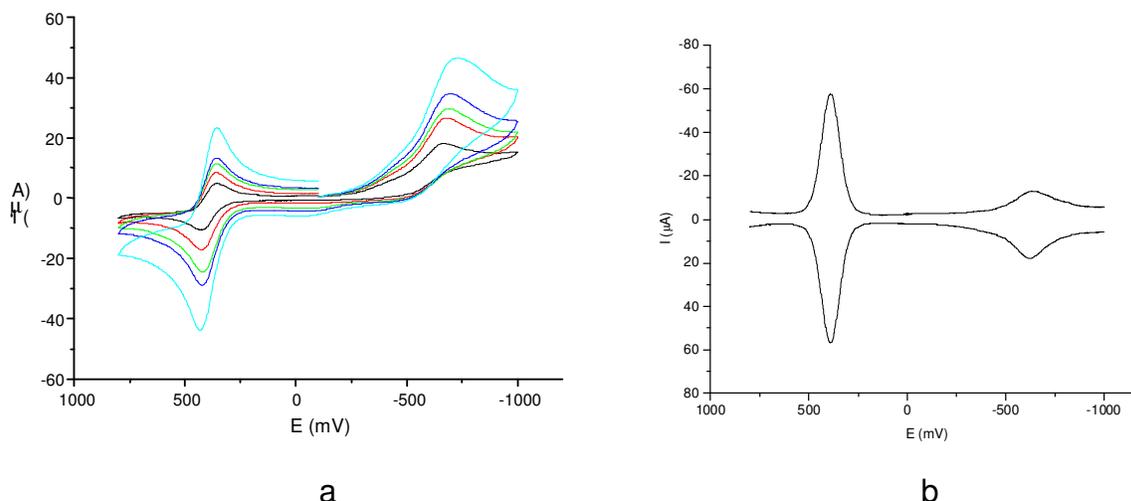


Figura 16. Voltamogramas cíclicos (a) (velocidades de varredura : 300, 200,150,100,50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) e de onda quadrada (b) (pulso 40mV, freqüência 20Hz) do complexo $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ em acetonitrila eletrólito $0,1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de TBAPF_6 , eletrodo de trabalho carbono vítreo, eletrodo de referência Ag/AgCl e contra eletrodo fio de platina; padrão interno ferroceno.

4.2.8 Reatividade

A atividade catalítica dos complexos $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ e $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ na hidrólise de ésteres de fosfato foi investigada através da reação com bis-(2,4 dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP), estudando o efeitos do pH e do excesso de substrato a 25°C . Para a obtenção dos parâmetros cinéticos utilizou-se o método de velocidades iniciais, onde as reações foram monitoradas espectrofotometricamente durante 3 a 5% da conversão do substrato a produto através do acompanhamento da absorvância em 400nm devido à formação do 2,4-dinitrofenolato como produto. A concentração do 2,4-dinitrofenolato foi calculada a partir dos valores de absorvância e do coeficiente de absorvidade molar⁴⁶, $\epsilon=12100\text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$. Em todas as leituras foi descontada a contribuição devido à hidrólise não catalisada do substrato.

Quando foi estudada a influência do pH na reação, o gráfico da velocidade inicial (V_0) versus pH forneceu uma curva em forma de sino (Figura 17), com os valores de velocidade muito baixos em $\text{pH} < 3,5$, aumentando gradativamente até o valor máximo próximo de 7 e diminuindo novamente com o aumento do pH. O pH onde se obteve o máximo valor de V_0 , determinou-se como “pH ótimo”. Este comportamento é um indicativo de que, para ambos complexos estudados, a espécie ativa contém, em solução, uma molécula de água coordenada ao metal divalente (Zn^{II} ou Cu^{II}) e um íon hidróxido ligado ao íon Ga^{III} como proposto pelo estudo potenciométrico.

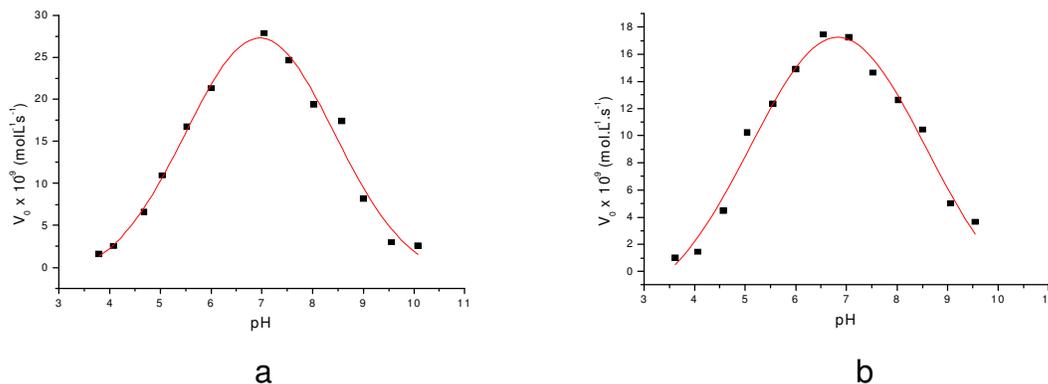


Figura 17. Gráficos de V_0 em função do pH nas reações de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisadas pelos complexos $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ (a) e $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ (b) a 25°C .

As duas metades do sino foram tratadas pelo método de Boltzmann, onde os pontos de inflexão das curvas sigmoidais correspondem aos valores de $\text{pK}_{\text{a}1}$ e $\text{pK}_{\text{a}2}$ os quais foram denominados de “ pK_{a} cinéticos” e podem ser comparados aos obtidos através da titulação potenciométrica como mostra a Tabela 7.

Os valores de pK obtidos também podem ser relacionados aos de outros complexos similares FeCu^{32} e FeZn^{48} sendo o aumento nos valores explicado pela menor acidez de Lewis do íon Ga^{III} em comparação ao íon Fe^{III} devido à diferença polarizabilidade.

Tabela 7. Comparação entre os valores de pK_a cinéticos e pK_a potenciométricos dos complexos $[GaCuL1(\mu-OAc)_2]ClO_4$ e $[GaZnL1(\mu-OAc)_2]ClO_4$.

Complexos	pH ótimo	Cinético		Potenciométrico	
		pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a1}	pK_{a2}
$[GaCuL1(\mu OAc)_2]^+$	6,8	4,99	7,8	5,01	7,58
$[GaZnL1(\mu-OAc)_2]^+$	6,9	5,35	8,56	5,59	7,96
$[FeCuL1(\mu-OAc)_2]^+$	7,0	5,0	8,9	5,0	7,82
$[FeZnL1(\mu-OAc)_2]^+$	6,5	4,6	7,8	4,6	7,22

Os resultados obtidos para os complexos estudados podem ser comparados a outros similares^{32,45,47}. Já quando comparados à enzima Ga substituída observa-se uma inversão dos dados obtidos, com o valor de pK_a atribuído à desprotonação da molécula de água ligada ao íon Ga^{III} menor que o da enzima nativa contendo Fe^{III} . Esse fato pode ser explicado pela influência do menor raio iônico do Ga^{III} , que pode afetar a estrutura do sítio ativo, resultando em diferentes valores de pK_a para os aminoácidos presentes na PAP²³.

O estudo das reações em função da concentração de substrato mostrou um comportamento de Michaelis-Menten, como observado para as curvas apresentadas na Figura 18.

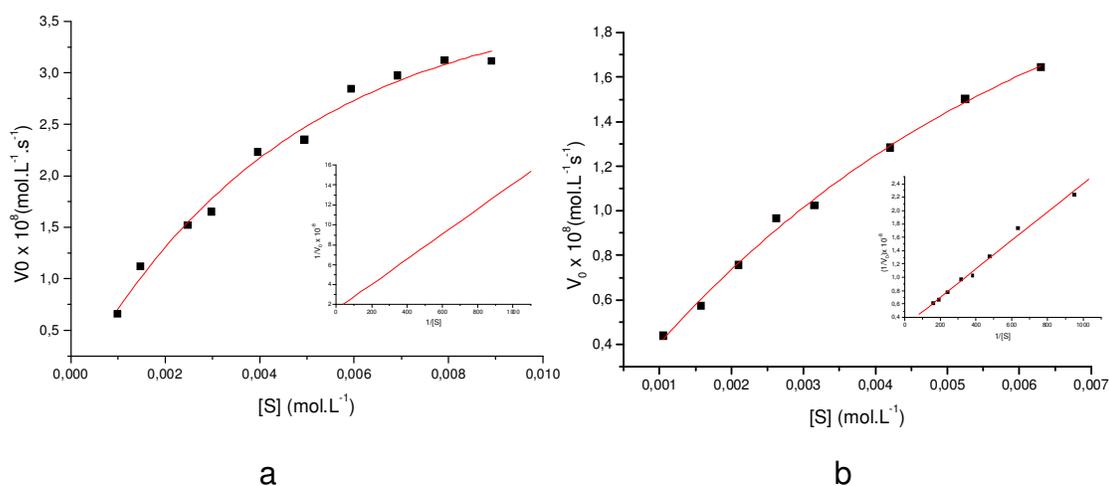


Figura 18. Curvas de saturação e gráficos de Lineweaver-Burk para as reações de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisadas pelos complexos $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ e $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ a 25°C .

O tratamento dos dados através da linearização de Lineweaver-Burk forneceu os parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros cinéticos determinados a partir da linearização de Lineweaver-Burke dos dados obtidos para os complexos estudados e os similares de $[\text{FeCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ ³² e $[\text{FeZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ ⁴⁸.

Complexos	$V_{\text{máx}}$ ($\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	K_M (mol.L^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	E ($\text{mol}^{-1}.\text{L}.\text{s}^{-1}$)	K_{ass} ($\text{mol}^{-1}.\text{L}$)	$k_{\text{cat}}/k_{\text{nc}}$
$[\text{GaCuL1}(\mu\text{OAc})_2]^+$	$7,4 \times 10^{-8}$	$10,42 \times 10^{-3}$	$1,33 \times 10^{-3}$	$13,01 \times 10^{-2}$	100	7400
$[\text{GaZnL1}(\mu\text{OAc})_2]^+$	$3,68 \times 10^{-8}$	$7,39 \times 10^{-3}$	$6,24 \times 10^{-4}$	$8,44 \times 10^{-2}$	135	3500
$[\text{FeCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$						
$[\text{FeZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$						

A análise dos dados demonstra que o complexo $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ apresentou uma aceleração de 7400 vezes quando comparado à reação não

catalisada enquanto que no complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ foi observada uma aceleração de 3500 vezes. A maior atividade do complexo $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ pode ser tentativamente explicada pelo fato da molécula de substrato estar mais próxima do OH gerado no íon Ga^{III} o qual irá atuar como nucleófilo atacando o átomo de P. Esta proposta concorda com os dados de potenciometria e espectroscopia eletrônica que sugerem que o íon Cu^{II} apresente uma geometria de pirâmide de base quadrada.

Os complexos estudados apresentaram atividades com a mesma ordem de grandeza de outros compostos similares^{32,48,49}. O fato de compostos contendo Ga^{III} em substituição ao Fe^{III} apresentarem atividades e parâmetros cinéticos similares confirma a hipótese de que a função do M^{III} na catálise é de agir como ácido de Lewis gerando um grupo hidróxido (nucleófilo) responsável pelo ataque ao éster de fosfato da mesma maneira que o proposto para as enzimas Ga substituídas.²³

Para avaliar a atividade catalítica dos complexos estudados foi realizado um experimento onde uma reação foi acompanhada espectrofotometricamente a 445nm em pH 6,9, durante 26 horas a 50°C. Foi observado que durante esse período o complexo $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ foi capaz de hidrolisar 22 moléculas de substrato enquanto o complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ catalisou 5 moléculas.

5 Considerações Finais

O ligante H₂BPBPMP (2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol) foi sintetizado como descrito na literatura e a partir dele foram obtidos dois novos complexos : [GaCuL1(μ-OAc)₂]ClO₄ e [GaZnL1(μ-OAc)₂]ClO₄.

O complexo [GaCuL1(μ-OAc)₂]ClO₄ foi estudado através de técnicas espectroscópicas (no infravermelho e eletrônica) e eletroquímicas, titulação potenciométrica, ressonância paramagnética eletrônica (RPE) mas até o momento não teve sua estrutura determinada.

Já o complexo [GaZnL1(μ-OAc)₂]ClO₄ foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C, titulação potenciométrica e teve sua estrutura de raios X determinada. Esse complexo merece destaque por ser o primeiro descrito até o momento que contém esses metais.

A avaliação da reatividade desses complexos mostrou que são eficientes ao hidrolisar o substrato 2,4-BDNPP sendo o complexo [GaCuL1(μ-OAc)₂]ClO₄ capaz de acelerar 7400 vezes a reação em relação à reação não catalisada. O substrato 2,4-BDNPP foi utilizado por apresentar uma cinética que pode ser mais facilmente acompanhada, apesar de não ter sido utilizado em estudos cinéticos com a enzima.

Mesmo possuindo uma aceleração menor, o complexo [GaZnL1(μ-OAc)₂]ClO₄ se torna muito importante por possibilitar o melhor acompanhamento de outras propriedades como por exemplo a ordem da reação com relação a esse reagente, contribuindo para a elucidação do mecanismo envolvido nessa reação e por conseqüência na reação com a enzima também.

Assim os complexos estudados podem ser considerados bons modelos funcionais para as PAP Ga substituídas.

6 Perspectivas

Por ser um trabalho extremamente complexo é necessário que muitos outros experimentos sejam realizados antes que se possa postular um mecanismo completo para a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP catalisada por compostos de coordenação desse tipo.

Assim torna-se essencial a avaliação da ordem de reação com relação à concentração de complexo. O complexo $[\text{GaZnL}1(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ irá auxiliar muito nesse estudo uma vez que por não possuir transições eletrônicas na região visível do espectro, possibilita o acompanhamento da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP espectrofotometricamente.

A determinação dos produtos formados durante a hidrólise também pode fornecer valiosas informações a respeito do mecanismo envolvido nessas reações. Os produtos serão caracterizados através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em colunas de fase reversa (C18), onde alíquotas de uma reação serão injetadas em intervalos de tempo determinados. A observação da proporção do 2,4-dinitrofenol e do 2,4-dinitrofenolato, por exemplo, deve indicar se existe a hidrólise de um ou dois fenolatos nessas reações.

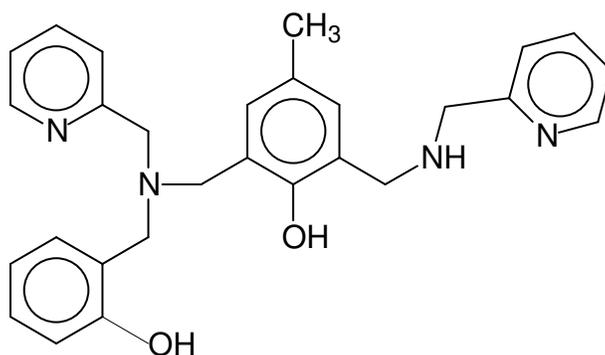
Os produtos também poderão ser caracterizados por ressonância magnética nuclear de ^{31}P . O acompanhamento das cinéticas de hidrólise poderia indicar a formação de intermediários de reação e também se existe a formação de um produto onde o fosfato estaria diretamente coordenado ao complexo.

Existe um grande interesse em se dar continuidade ao estudo de outros compostos do tipo Ga-M^{II} onde $\text{M}^{\text{II}} = \text{Fe}^{\text{II}}, \text{Co}^{\text{II}}, \text{Mn}^{\text{II}}$ podendo auxiliar na elucidação do mecanismo pela determinação da constante de associação do substrato ao complexo através da ligação do fosfato ao M^{II} do complexo. Esse estudo poderá ser realizado através da técnica de *stop-flow* uma vez que essa é a etapa rápida da reação.

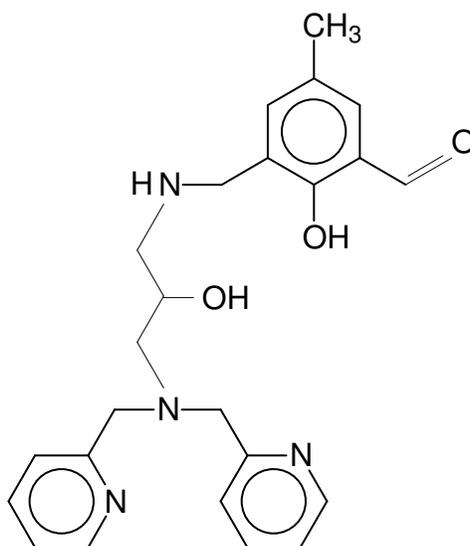
Há a necessidade, também, em se estudar a cinética de hidrólise de outros substratos como o p-nitrofenilfosfato, amplamente utilizado em estudos

enzimáticos para que seja possível uma comparação direta da atividade apresentada pelos complexos estudados com a PAP.

Propõem-se também a síntese novos ligantes multinucleantes como os apresentados na Figura 19 e seus respectivos complexos para que possa ser estudada de maneira mais completa o mecanismo de hidrólise de ésteres de fosfato presente nesses complexos.



L2



L3

Figura 19. Proposta de novos ligantes.

7 Anexos

7.1 Espectros no infravermelho dos complexos

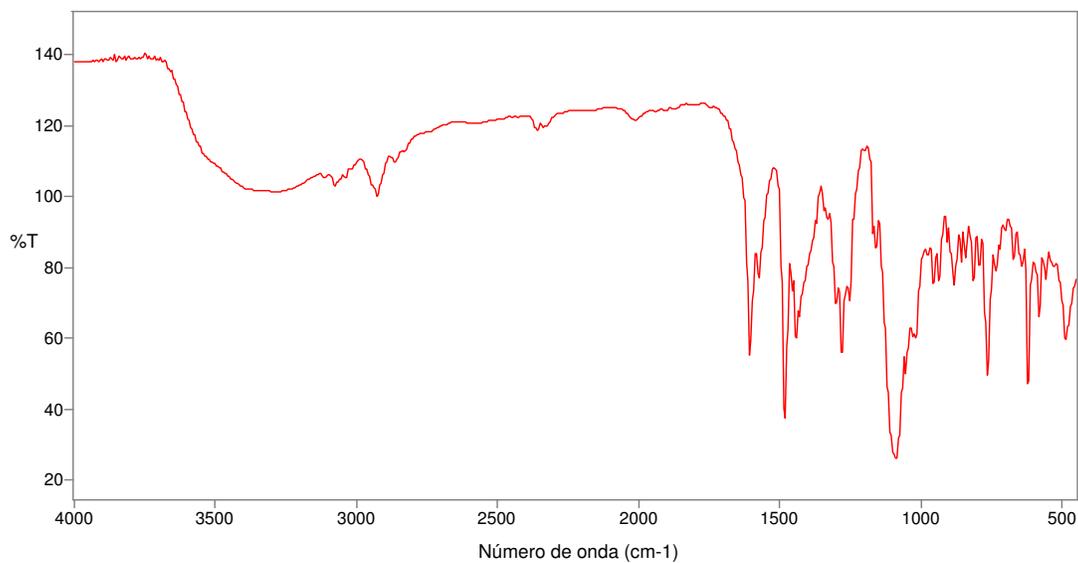


Figura 20. Espectro no infravermelho do complexo $[\text{GaCuL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ em pastilhas de KBr.

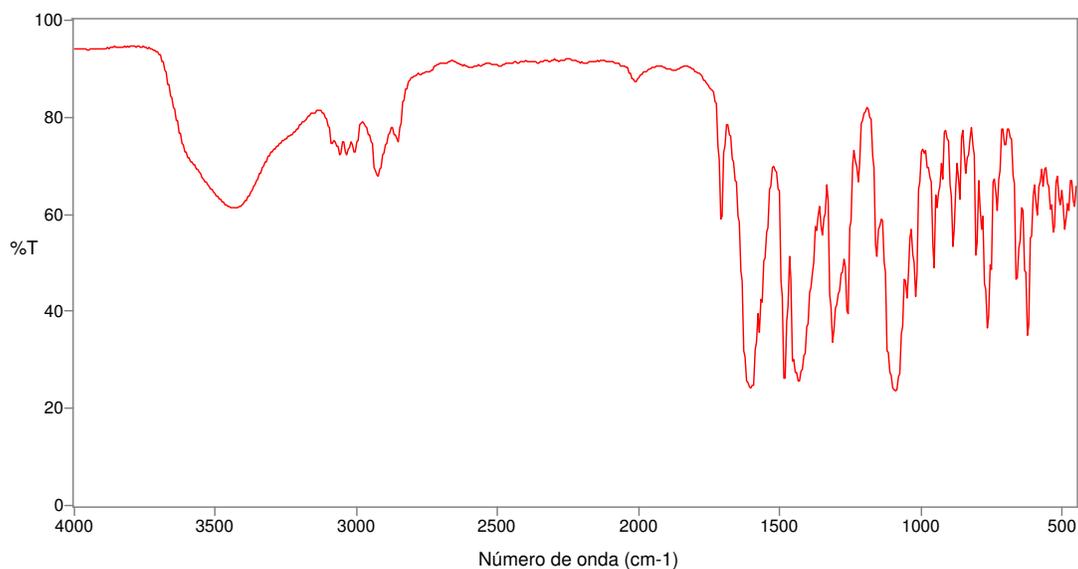


Figura 21. Espectro no infravermelho do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ em pastilhas de KBr.

7.2 Espectros de RMN do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$

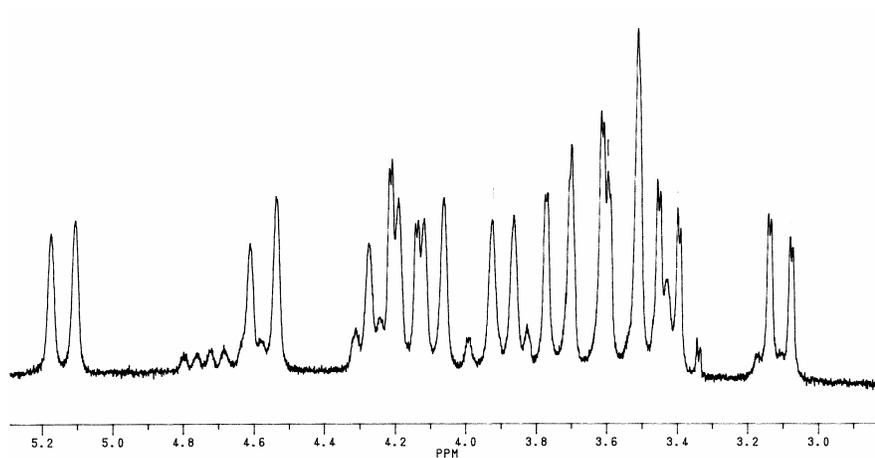


Figura 22. Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ ampliado na região entre 3,0 e 5,2 ppm.

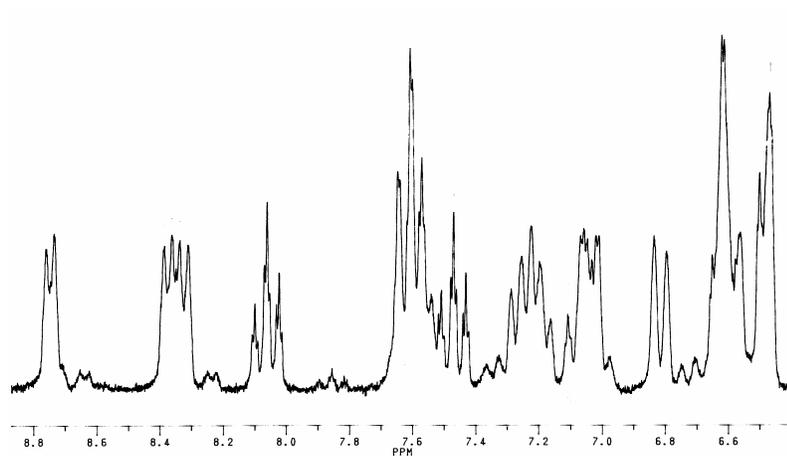


Figura 23. Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ ampliado na região entre 6,4 e 8,8 ppm.

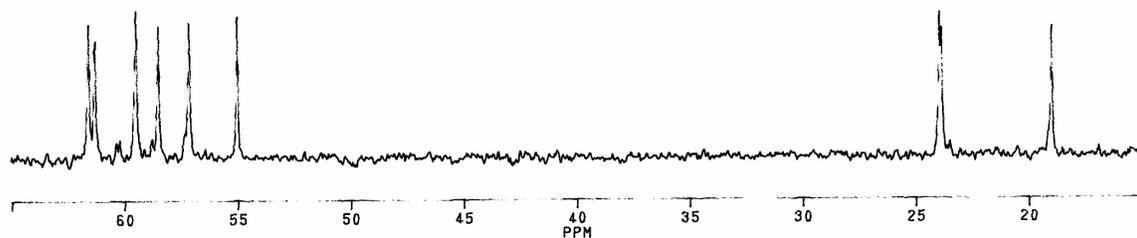


Figura 24. Espectro de RMN ¹³C do complexo [GaZnL1(μ-OAc)₂]ClO₄ em CD₃CN ampliado na região de 20 a 65ppm.

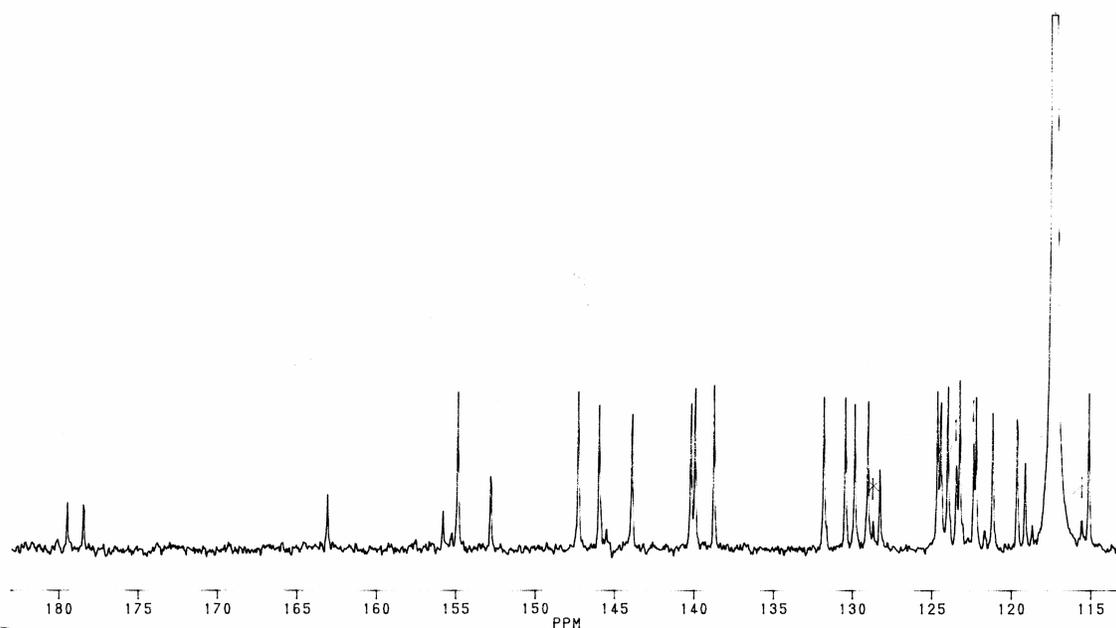


Figura 25. Espectro de RMN ¹³C do complexo [GaZnL1(μ-OAc)₂]ClO₄ em CD₃CN ampliado na região de 115 a 185 ppm.

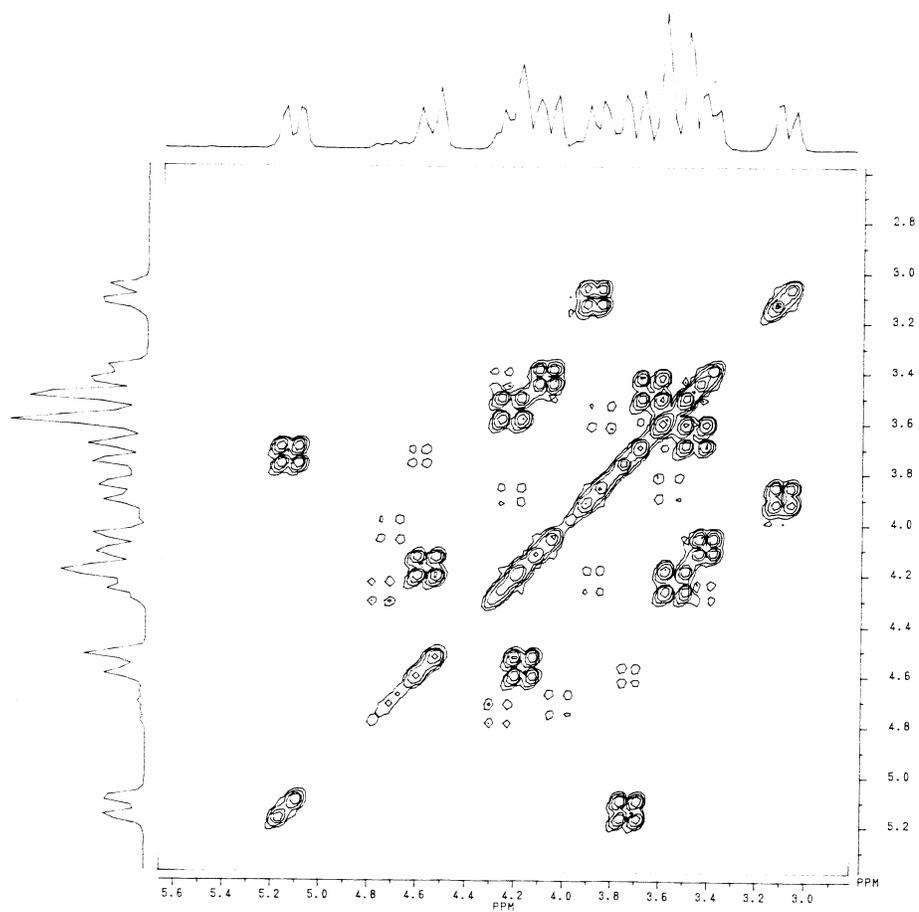


Figura 26. Espectro de RMN COSY do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ em CD_3CN .

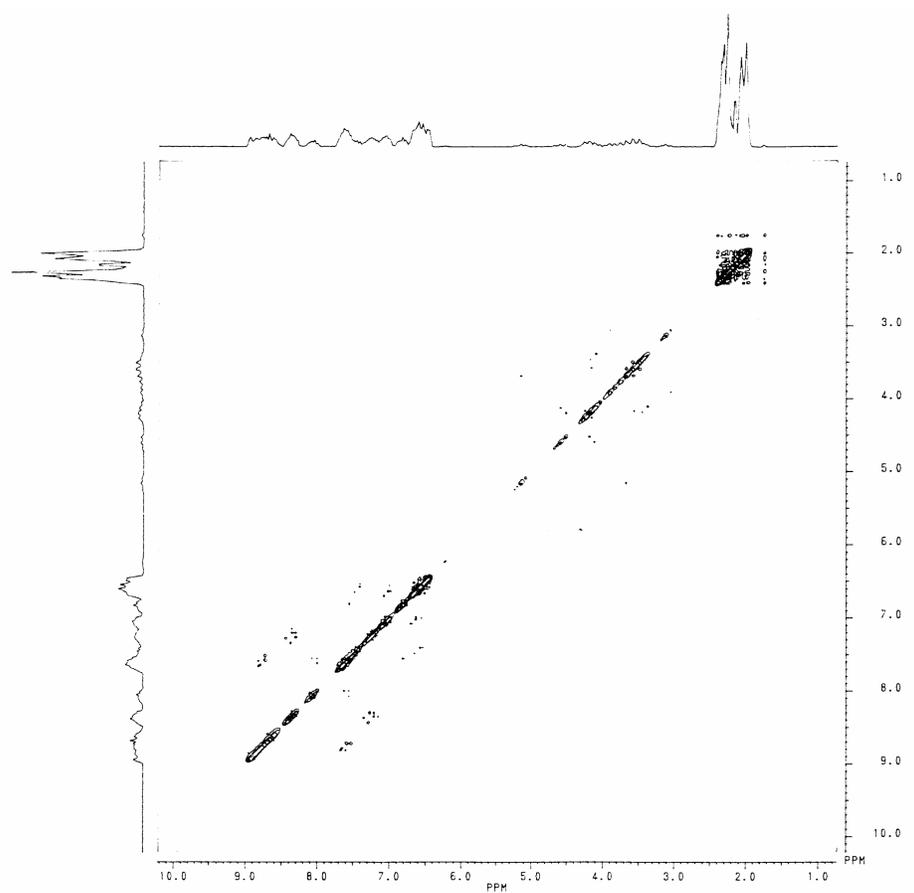
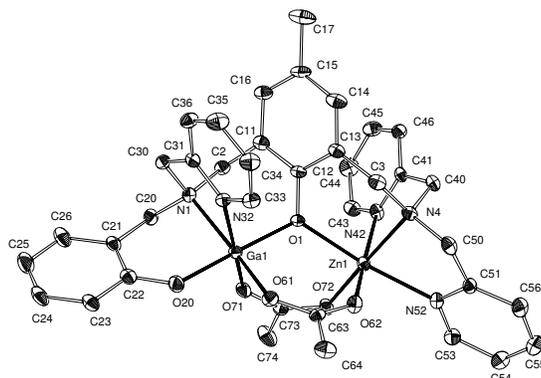


Figura 27. Espectro de RMN COSY do complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\text{ClO}_4$ em CD_3CN .

7.3 Dados Cristalográficos

Figura 28. ORTEP do cátion complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]^+$ Tabela 9. Distâncias interatômicas (Å) e ângulos de ligação ($^\circ$) para o complexo $[\text{GaZnL1}(\mu\text{-OAc})_2]\cdot\text{H}_2\text{O ClO}_4$

Zn(1)-O(72)	1,871(5)	C(31)-C(36)	1,305(10)
Zn(1)-N(4)	2,060(6)	C(31)-N(32)	1,412(10)
Zn(1)-O(62)	2,103(5)	N(32)-C(33)	1,310(10)
Zn(1)-N(42)	2,218(6)	C(33)-C(34)	1,302(11)
Zn(1)-O(1)	2,228(5)	C(34)-C(35)	1,453(13)
Zn(1)-N(52)	2,257(7)	C(35)-C(36)	1,344(12)
Ga(1)-O(71)	1,893(5)	C(40)-C(41)	1,496(10)
Ga(1)-O(20)	1,908(6)	C(41)-N(42)	1,254(8)
Ga(1)-O(1)	1,989(5)	C(41)-C(46)	1,412(10)
Ga(1)-O(61)	2,005(6)	C(44)-C(45)	1,274(11)
Ga(1)-N(32)	2,046(6)	C(45)-C(46)	1,351(11)
Ga(1)-N(1)	2,257(6)	C(50)-C(51)	1,483(11)
N(1)-C(20)	1,440(9)	C(51)-N(52)	1,286(9)
N(1)-C(30)	1,487(9)	C(51)-C(56)	1,504(12)
N(1)-C(2)	1,516(9)	N(52)-C(53)	1,303(10)
C(2)-C(11)	1,427(10)	C(53)-C(54)	1,478(12)
C(3)-N(4)	1,529(10)	C(54)-C(55)	1,328(12)
C(3)-C(13)	1,586(11)	C(55)-C(56)	1,344(12)
N(4)-C(40)	1,486(9)	O(61)-C(63)	1,386(10)
N(4)-C(50)	1,562(10)	O(62)-C(63)	1,267(9)
O(1)-C(12)	1,327(8)	C(63)-C(64)	1,523(11)
C(11)-C(16)	1,373(10)	O(71)-C(73)	1,333(9)
C(11)-C(12)	1,478(11)	O(72)-C(73)	1,279(9)
C(12)-C(13)	1,347(10)	C(73)-C(74)	1,401(10)
C(13)-C(14)	1,363(11)	Cl(1)-O(3P')	1,375(13)

C(14)-C(15)	1,458(12)	Cl(1)-O(4P)	1,377(11)
C(15)-C(16)	1,321(12)	Cl(1)-O(2P')	1,402(13)
C(15)-C(17)	1,492(11)	Cl(1)-O(1P)	1,408(7)
O(20)-C(22)	1,402(10)	Cl(1)-O(2P)	1,416(9)
C(20)-C(21)	1,510(11)	Cl(1)-O(4P')	1,430(13)
C(21)-C(22)	1,426(12)	Cl(1)-O(3P)	1,498(10)
C(21)-C(26)	1,457(12)	O(2P)-O(2P')	0,964(19)
C(22)-C(23)	1,423(11)	O(2P)-O(4P')	1,77(2)
C(23)-C(24)	1,451(13)	O(2P')-O(3P)	1,66(2)
C(24)-C(25)	1,404(13)	O(3P)-O(3P')	1,157(19)
C(25)-C(26)	1,391(13)	O(3P')-O(4P)	1,36(2)
C(30)-C(31)	1,453(10)	O(4P)-O(4P')	1,172(19)
O(72)-Zn(1)-N(4)	171,3(2)	C(43)-N(42)-Zn(1)	127,3(6)
O(72)-Zn(1)-O(62)	94,2(2)	N(42)-C(43)-C(44)	126,2(8)
N(4)-Zn(1)-O(62)	93,7(2)	C(45)-C(44)-C(43)	119,0(9)
O(72)-Zn(1)-N(42)	93,9(2)	C(44)-C(45)-C(46)	116,6(8)
N(4)-Zn(1)-N(42)	78,4(2)	C(45)-C(46)-C(41)	121,5(8)
O(62)-Zn(1)-N(42)	171,7(2)	C(51)-C(50)-N(4)	115,9(6)
O(72)-Zn(1)-O(1)	90,4(2)	N(52)-C(51)-C(50)	107,9(7)
N(4)-Zn(1)-O(1)	93,3(2)	N(52)-C(51)-C(56)	124,5(8)
O(62)-Zn(1)-O(1)	89,3(2)	C(50)-C(51)-C(56)	127,5(8)
N(42)-Zn(1)-O(1)	88,5(2)	C(51)-N(52)-C(53)	111,0(8)
O(72)-Zn(1)-N(52)	101,2(2)	C(51)-N(52)-Zn(1)	118,4(6)
N(4)-Zn(1)-N(52)	76,0(3)	C(53)-N(52)-Zn(1)	130,6(6)
O(62)-Zn(1)-N(52)	84,2(2)	N(52)-C(53)-C(54)	127,5(8)
N(42)-Zn(1)-N(52)	96,4(2)	C(55)-C(54)-C(53)	121,7(9)
O(1)-Zn(1)-N(52)	167,0(2)	C(54)-C(55)-C(56)	111,9(10)
O(71)-Ga(1)-O(20)	93,8(2)	C(55)-C(56)-C(51)	123,3(9)
O(71)-Ga(1)-O(1)	84,9(2)	C(63)-O(61)-Ga(1)	137,7(5)
O(20)-Ga(1)-O(1)	178,4(2)	C(63)-O(62)-Zn(1)	132,1(5)
O(71)-Ga(1)-O(61)	95,8(2)	O(62)-C(63)-O(61)	127,5(7)
O(20)-Ga(1)-O(61)	88,1(2)	O(62)-C(63)-C(64)	115,9(8)
O(1)-Ga(1)-O(61)	91,2(2)	O(61)-C(63)-C(64)	116,6(8)
O(71)-Ga(1)-N(32)	168,4(3)	C(73)-O(71)-Ga(1)	136,6(5)
O(20)-Ga(1)-N(32)	89,7(3)	C(73)-O(72)-Zn(1)	130,4(5)
O(1)-Ga(1)-N(32)	91,7(2)	O(72)-C(73)-O(71)	132,0(7)
O(61)-Ga(1)-N(32)	95,4(2)	C(33)-N(32)-C(31)	123,8(7)
O(71)-Ga(1)-N(1)	93,4(2)	C(33)-N(32)-Ga(1)	117,3(6)
O(20)-Ga(1)-N(1)	87,0(2)	C(31)-N(32)-Ga(1)	117,3(5)
O(1)-Ga(1)-N(1)	93,9(2)	C(34)-C(33)-N(32)	116,4(9)
O(61)-Ga(1)-N(1)	169,9(2)	C(33)-C(34)-C(35)	119,1(9)
N(32)-Ga(1)-N(1)	75,7(2)	C(36)-C(35)-C(34)	124,9(8)
C(20)-N(1)-C(30)	102,8(6)	C(31)-C(36)-C(35)	112,5(9)
C(20)-N(1)-C(2)	108,4(6)	N(4)-C(40)-C(41)	112,4(6)
C(30)-N(1)-C(2)	113,2(6)	N(42)-C(41)-C(46)	121,3(7)

C(20)-N(1)-Ga(1)	111,9(5)	N(42)-C(41)-C(40)	113,1(7)
C(30)-N(1)-Ga(1)	113,7(5)	C(46)-C(41)-C(40)	125,4(7)
C(2)-N(1)-Ga(1)	106,7(5)	C(41)-N(42)-C(43)	115,4(7)
C(11)-C(2)-N(1)	113,0(6)	C(41)-N(42)-Zn(1)	114,0(5)
N(4)-C(3)-C(13)	115,9(6)	O(72)-C(73)-C(74)	113,5(8)
C(40)-N(4)-C(3)	111,6(6)	O(71)-C(73)-C(74)	114,5(8)
C(40)-N(4)-C(50)	108,7(6)	O(3P')-Cl(1)-O(4P)	59,4(10)
C(3)-N(4)-C(50)	117,3(6)	O(3P')-Cl(1)-O(2P')	108,1(9)
C(40)-N(4)-Zn(1)	109,8(4)	O(4P)-Cl(1)-O(2P')	138,0(10)
C(3)-N(4)-Zn(1)	104,9(5)	O(3P')-Cl(1)-O(1P)	117,3(9)
C(50)-N(4)-Zn(1)	104,1(4)	O(4P)-Cl(1)-O(1P)	112,2(7)
C(12)-O(1)-Ga(1)	117,4(5)	O(2P')-Cl(1)-O(1P)	108,8(8)
C(12)-O(1)-Zn(1)	119,9(5)	O(3P')-Cl(1)-O(2P)	130,5(10)
Ga(1)-O(1)-Zn(1)	122,6(2)	O(4P)-Cl(1)-O(2P)	114,2(7)
C(16)-C(11)-C(2)	117,7(8)	O(2P')-Cl(1)-O(2P)	40,0(8)
C(16)-C(11)-C(12)	122,3(8)	O(1P)-Cl(1)-O(2P)	110,2(5)
C(2)-C(11)-C(12)	120,0(7)	O(3P')-Cl(1)-O(4P')	107,9(8)
O(1)-C(12)-C(13)	114,3(7)	O(4P)-Cl(1)-O(4P')	49,3(8)
O(1)-C(12)-C(11)	123,0(7)	O(2P')-Cl(1)-O(4P')	116,2(9)
C(13)-C(12)-C(11)	122,7(7)	O(1P)-Cl(1)-O(4P')	98,6(8)
C(12)-C(13)-C(14)	112,4(8)	O(2P)-Cl(1)-O(4P')	76,8(10)
C(12)-C(13)-C(3)	122,2(7)	O(3P')-Cl(1)-O(3P)	47,2(9)
C(14)-C(13)-C(3)	125,3(8)	O(4P)-Cl(1)-O(3P)	106,3(7)
C(13)-C(14)-C(15)	125,9(8)	O(2P')-Cl(1)-O(3P)	69,9(9)
C(16)-C(15)-C(14)	121,1(7)	O(1P)-Cl(1)-O(3P)	105,5(6)
C(16)-C(15)-C(17)	114,7(9)	O(2P)-Cl(1)-O(3P)	107,9(6)
C(14)-C(15)-C(17)	124,2(9)	O(4P')-Cl(1)-O(3P)	151,6(9)
C(15)-C(16)-C(11)	115,6(9)	O(2P')-O(2P)-Cl(1)	69,2(10)
C(22)-O(20)-Ga(1)	131,7(5)	O(2P')-O(2P)-O(4P')	120,4(12)
N(1)-C(20)-C(21)	114,2(6)	Cl(1)-O(2P)-O(4P')	51,9(6)
C(22)-C(21)-C(26)	120,9(8)	O(2P)-O(2P')-Cl(1)	70,8(10)
C(22)-C(21)-C(20)	120,3(8)	O(2P)-O(2P')-O(3P)	125,3(13)
C(26)-C(21)-C(20)	118,7(8)	Cl(1)-O(2P')-O(3P)	57,7(7)
O(20)-C(22)-C(23)	118,9(8)	O(3P')-O(3P)-Cl(1)	60,8(8)
O(20)-C(22)-C(21)	125,2(8)	O(3P')-O(3P)-O(2P')	104,3(11)
C(23)-C(22)-C(21)	115,9(8)	Cl(1)-O(3P)-O(2P')	52,3(6)
C(22)-C(23)-C(24)	121,9(9)	O(3P)-O(3P')-O(4P)	131,9(13)
C(25)-C(24)-C(23)	121,7(9)	O(3P)-O(3P')-Cl(1)	72,0(9)
C(26)-C(25)-C(24)	116,9(10)	O(4P)-O(3P')-Cl(1)	60,4(8)
C(25)-C(26)-C(21)	122,6(10)	O(4P')-O(4P)-O(3P')	126,7(13)
C(31)-C(30)-N(1)	104,9(7)	O(4P')-O(4P)-Cl(1)	67,7(8)
C(36)-C(31)-N(32)	123,2(8)	O(3P')-O(4P)-Cl(1)	60,2(8)
C(36)-C(31)-C(30)	116,2(8)	O(4P)-O(4P')-Cl(1)	63,0(8)
N(32)-C(31)-C(30)	120,6(7)	O(4P)-O(4P')-O(2P)	104,0(11)
		Cl(1)-O(4P')-O(2P)	51,2(6)

8 Referências Bibliográficas

1. KAIM, W. and SCHWEDERSKI, B. Bioinorganic Chemistry : Inorganic Chemistry Elements in the Chemistry of Life – An Introduction and Guide. Chinchester:John Wiley & Sons, Inc. 1994. p.1-36.
2. LIPPARD, S. J. and BERG, J. M. Principles of bioinorganic chemistry, Mill Valley: University Science Books, 1194. p.1-20.
3. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/>, maio/2003
4. THAN, R., FELDMANN, A. A. and KREBS, B., Structural and functional studies on model compounds of purple acid phosphatase and catechol oxidases. Coordination Chemistry Reviews, v. 182, p. 211-241, 1999.
4. KLABUNDE, T. and KREBS, B., The dimetal center in purple acid phosphatase. Structure and Bonding, v. 89, p. 177-198, 1997.
6. DOI, K., ANTANAITIS, B. C. AND AISEN, P. The binuclear iron centers of uteroferrin and the purple acid phosphatases. Structure and Bonding, v. 70, p. 1-26, 1988.
7. GANI, D. and WILKIE, J. Metal ions in the mechanism of enzyme-catalyzed phosphate monoester hydrolyses., Structure and Bonding, v. 89, p. 133-175, 1997.
8. STRÄTER, N., LIPSCOMB, W. N., KLABUNDE, T. *et al.* Two metal ion catalysis in enzymatic acyl and phosphoryl- transfer reactions. Angewandte Chemie International Edition in English, v. 35, p. 2024-2055, 1996.
9. WANG, D. L., HOLZ, R. C., DAVID, S. S. *et al.* Electrochemical properties of the diiron core of uteroferrin and its anion complexes. Biochemistry, v. 30, p. 8187-8194, 1991.
10. AVERILL, B. A., DAVIS, J. C. BURMAN, S. *et al.* G. Spectroscopic and magnetic studies of purple acid phosphatase from bovine spleen. Journal of American Chemical Society, v. 109, p. 3760-3767, 1987.
11. CROWDER, M. W., VINCENT, J. B. And AVERILL, B. A., Electron paramagnetic resonance studies on the high-salt form of bovine spleen purple acid phosphatases. Biochemistry, v. 31, p. 9603-9608, 1992.
12. GEHRING, S., FLEICHHAUER, P., BEHLENDORF, M., *et al.* Magnetic susceptibility studies of diiron forms of the metalloprotein purple acid phosphatase

from bovine spleen and kidney bean. Inorganica Chimica Acta, v. 252, p. 13-17, 1996.

13. (a) DEBRUNNER, P. G., HENDRICH, M. P., JERSEY, J. *et al.* Mössbauer and EPR study of binuclear iron center in purple acid phosphatase. Biochimica et Biophysica Acta, v. 745, p. 103-106, 1983. (b) RODRIGUEZ, J. H., OK, H. N., XIA, Y. M. *et al.* Mössbauer spectroscopy of the spin-coupled $\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+}$ center of reduced uteroferrin. Journal of Physical Chemistry, v. 100, p. 6849-6862, 1996.

14.(a) LAUFFER, R. B., ANTANAITIS, B. C., AISEN, P. *et al.* ^1H -NMR studies of porcine uteroferrin. Magnetic interactions and native site structure. The Journal of Biological Chemistry, v. 258, n. 23, p.14212-14218, 1983. (b) SCARROW, R. C., PYRZ, J. W. , QUE, Jr. L. NMR studies of the dinuclear iron site in reduced uteroferrin and its oxoanion complexes. Journal of American Chemical Society, v.112, p.657-665, 1990.

15. (a) TRUE, A. E., SCARROW, R. C., RANDALL, C.R. *et al.* EXAFS studies of uteroferrin and its oxoanion complexes. Journal of American Chemical Society, v.115, p.4246-4255, 1993. (b) PRIGGEMEYER, S., BORKENSTEIN, P. E., AHLERS, F. *et al.* XAS investigations on the iron-zinc center of purple acid phosphatase, Inorganic Chemistry, v. 34, p.1445-1454, 1995.

16. (a) AQUINO, M. A. S., LIM, J. -S. and SYKES, G., Mechanism of the reaction of phosphate with purple acid phosphatase. Journal of Chemical Society. Dalton Transaction, p.2135-2136,1992. (b) MUELLER, E. G., CROWDER, M. W., AVERILL, B. A. *et al.* Purple acid phosphatase : a diiron enzyme that catalyzes a direct phospho group transfer to water. Journal of the American Chemical Society, v.115, p. 2974-2975,1993. (c) AQUINO, M. A. S., LIM, J. -S. and SYKES, G. Mechanism of the reaction of different phosphatases with iron(II)/iron(III) form of purple acid phosphatase from porcine uteri (Uteroferrin). Journal of Chemical Society. Dalton Transaction , p.683-687,1994

17. (a) KLABUNDE, T., STRÄTER, N., FRÖHLICH, R. *et al.* Mechanism of Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase based on crystal structures. Journal of Molecular Biology, v. 259, p.737-748, 1996. (b) STRÄTER, N., KLABUNDE, T., TUCKER, P. *et al.* Crystal structure containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active site. Science, v. 268, p. 1489-1492, 1995.

18. UPPENBERG, J., LIDQVIST, F. SVENSSON, C. *et al.* Crystal structures of a mammalian purple acid phosphatase. Journal of Molecular Biology, v. 290, p.201-211, 1999.

19. LIDQVIST, Y. JOHANSSON, E., KAIJA, H. *et al.* Three dimensional structure of mammalian purple acid phosphatase at 2,2 Å resolution with a μ -(hydr)oxo bridged di-iron center. Journal of Molecular Biology, v. 291. p.135-147, 1999.

20. GUDDAT, L. W., McALPINE, A. S., HUME, D., *et al.* Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase. Structure, v. 7, p. 757-767, 1999.
21. VERGE, F., LEBRUN, C., FONTECAVE, M., MENAGE, S., Hydrolysis of Phosphodiester by Diiron Complexes: Design of Nonequivalent Iron Sites in Purple Acid Phosphatase Models. Inorganic Chemistry, v.42, p.499-507, 2003.
22. BECK, J. L., MCARTHUR, M. J., DE JERSEY, J., AND ZERNER, B. Derivatives of the purple phosphatase from red kidney bean: Replacement of zinc with other divalent metal ions. Inorganica Chimica Acta v.153, p. 39-44, 1988.
23. AVERILL, A., MERKX, B. A., Ga⁺³ as a functional substitute for Fe⁺³. Preparation and characterization of the Ga⁺³Fe⁺² and Ga⁺³Zn⁺² form of bovine spleen purple acid phosphatase. Biochemistry, v. 37, p.8490-8497, 1998.
24. AVERILL, A., MERKX, B. A., Probing the Role of the Trivalent Metal in Phosphate Ester Hydrolysis: Preparation and Characterization of Purple Acid Phosphatases Containing Al^{III}Zn^{II} and In^{III}Zn^{II} Active Sites, Including the First Example of an Active Aluminum Enzyme. Journal of American Chemical Society, v. 121, p.6683-6689, 1999.
25. SHELDRIK, G. M. SHELXS-97: Program for the Solution of Crystal Structures. University of Göttingen, Germany, 1990.
26. SHELDRIK, G. M. SHELXS-97: Program for the Refinement of Crystal Structures. University of Göttingen, Germany, 1997.
27. ZSOLNAI, L. ZORTEP: An interactive ORTEP Program. University of Heidelberg, Germany, 1997.
28. SCHWINGEL, E.W.; AREND, K.; ZARLING, J.; NEVES, A.; SZPOGANICZ, B. Protonation equilibrium studies of H₂BBPEN, H₂BBPPN and H₂BBPBN. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 7, p. 31-37, 1996.
29. MARTELL, A. E.; MOTEKAITIS, R. J. Determination and Use of Stability Constants. VCH, New York, 2nd ed, 1992.
30. BUNTON, C. A. , FARBER, S. J. The hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate. The Journal of Organic Chemistry, v.34, n.4, p.767-772, 1969.
31. BRITO, M. A., Análogos Sintéticos para a Estrutura do Sítio Ativo das Fosfatases Ácidas Púrpuras, Tese de Doutorado em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1994.

32. LANZMASTER, M., Desenvolvimento de novos modelos estruturais e funcionais para as fosfatases ácidas púrpuras, Tese de Doutorado em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.
33. THOER, A. , DENIS, M., DELMAS, M. and GASET, A. The Rimmer –Tiemann reaction in slightly hydrated solid-liquid medium: a new method for the synthesis of formyl and diformyl phenols. Synthetic Communications, v.18, p.2095-2101, 1988.
34. HESSE, M., MEIER H., Zeeh, B. Spektroskopie Methoden in der Organischem Chemie,
35. KALINOWSKI, H.O., BERGER, S., BRAUN, S. ¹³C-NMR- Spektroskopie, Georg Thieme Verlag Stutgard, 4st ed. ,1984
36. HATHAWAY, B. J., BILLING, D. E. The electronic properties and stereochemistry of mono-nuclear complexes of the cooper(II) ion. Coordination Chemistry Reviews, v.5,p.143-207,1970.
37. LEVER, A. B. P. Inorganic Electronic Spectroscopy, 2^a Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1984,p.553-572.
38. RAJENDRAN, U., VISWANATHAN, R., PALANIANDAVAR, M., LAKSHMINARAYANAM, M. An unusual axial coordination of phenolate oxygen to cooper(II): crystal structure of a copper(II) complex. Journal Chemical Society, Dalton Transactions, p.3563-3564,1992.
39. GOODMAN, B. A., REYNOR, J.B. Electon Spin Ressonance of Transition Metal Complexes. Advances in Inorganic Chemical Radiochemistry, v.13,p.135-362,1970.
40. MANGRICH, A. S. Cadernos de EPR, Curitiba, 1998.
41. ORTON, J. W., Electron Paramagnetic Ressonance. London life Books LTD, London, 1968.
42. DUGGAN, M., RAY, N., HATHAWAY, B. et al. Crystal structure and electronic properties of amine [tris(2-aminoethyl)amine]copper (II) diperchlorate and potassium penta-amine-copper (II) tris(hexafluorophosphate) Journal Chemical Society, Dalton Transactions, p.1342-1348, 1980.
43. SCHATZ, M., BECKER, M., THALER, F., et al. Copper (II) complexes, copper(I)/O₂ reactivity, and copper (II) complexes adducts, with a series of tetradentate tripyridylalkylamine tripodall ligands. Inorganic Chemistry. v.40, p. 2312-2322, 2001.

44. Bruker EPR, Win-EPR and SimFonia: post-processing program and simulations software for PC-Windows or CD-ROM, version 1.0, 1997.
45. ROSSI, L. M. , Novos complexos binucleares de Cobre de relevância Bioinorgânica. Tese de Doutorado em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.
46. KIRBY, A. J. , VARVOGLIS, A. G., The Reactivity oh Phosphate Esters. Monoester Hydrolysis. *Journal of American Chemical Society*, v. 89, p. 415-423,1967.
47. LANZMASTER, M. , NEVES, A., BORTOLUZZI, A. J., SZPOGANICZ, B., SCHWINGEL, E. New Fe^{III}Zn^{II} complex containing a single terminal Fe-O_{phenolate} bond as a structural and functional model for the active site of Red Kidney Bean Purple Acid Phosphatase. *Inorganic Chemistry*, v.41, p. 5641,5642, 2002.
48. KARSTEN, P., NEVES, A., BORTOLUZZI, A., DRAGO, V., LANZMASTER, M., Synthesis, Structure, Properties and Phosphatase-like activity of the first heterodinuclear Fe^{III}Mn^{II} complex with the unsymmetry ligand H₂BPBPMP as a model for the PAP in Sweet Potato. *Inorganic Chemistry* V. 41, p. 4624-4626, 2002.