



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

MARLON DE SOUZA SILVA

**ESTUDOS EM SOLUÇÃO (RECONHECIMENTO MOLECULAR)
ENTRE COMPLEXOS HOMOBINUCLEARES E MOLÉCULAS DE
INTERESSE BIOLÓGICO.**

FLORIANÓPOLIS - SC

2006

MARLON DE SOUZA SILVA

**ESTUDOS EM SOLUÇÃO (RECONHECIMENTO MOLECULAR)
ENTRE COMPLEXOS HOMOBINUCLEARES E MOLÉCULAS DE
INTERESSE BIOLÓGICO.**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Bruno Szpoganicz

Florianópolis - SC

2006

MARLON DE SOUZA SILVA

**ESTUDOS EM SOLUÇÃO (RECONHECIMENTO MOLECULAR)
ENTRE COMPLEXOS HOMOBINUCLEARES E MOLÉCULAS DE
INTERESSE BIOLÓGICO.**

Esta tese foi julgada e aprovada para obtenção do título de **Doutor em Química** no
Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa
Catarina

Florianópolis, 14 de dezembro de 2006.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bruno Szpoganicz
Orientador – UFSC

Profa. Dra. Judith Felcman
Relatora – PUC-Rio

Prof. Dr. Ademir Neves
UFSC

Prof. Dr. Adriano Martendal
UNISUL

Prof. Dr. Gustavo A. Micke
UFSC

Prof. Dr. César V. Franco
UFSC

“Algo só é impossível até que alguém duvide ou prove o contrário”.

Albert Einstein

“O que somos é um presente que a vida nos dá. O que nós seremos é um presente que daremos à vida”.

Herbert de Souza

*“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice.”
Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã”.*

Leonardo da Vinci

À meus queridos pais Didi e Moisés.

À meus irmãos

À minha esposa Deca e recém-nascida filha Bárbara

Em quem encontrei amor, sabedoria e compreensão durante toda a jornada de luta
pela realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bruno Szpoganicz, pela receptividade, compreensão, paciência, orientação, amizade e pelos bons momentos de convivência.

Ao Prof. Dr. Ademir Neves, pelas sugestões, discussões, amizade, entusiasmo e sábios ensinamentos. Um grande exemplo de profissionalismo e dedicação.

Aos Dr. Fábio Gozzo (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron) e Prof. Dr. Marcos Eberlim (Instituto de Química, UNICAMP) pela colaboração nas análises de espectrometria de massa por eletrospray.

Ao Prof. Dr. Hernan Terenzi, Ms. Claus Pich (Departamento de Bioquímica, UFSC) pelos estudos de interação com DNA.

Aos Prof. Dr. Adolfo Horn e Profa. Dra. Christiane Fernandes (Departamento de Química, UENF) pela colaboração, discussões, amizade e pelo fornecimento dos compostos estudados neste trabalho.

Aos Prof. Dr., Ademir Neves, Adriano Martendal, César Franco, Gustavo Micke e Judith Felcman por terem gentilmente aceitado fazerem parte como membros desta banca de doutorado, expresso aqui o meu reconhecimento.

Ao jornalista Sérgio Lino, meu amigo Cereja, pelas correções e pelas vírgulas.

Ao meu grande amigo Fabio Miranda, um Químico brilhante, pela ajuda, sugestões, críticas e pelos bons momentos de convivência.

Aos colegas e amigos que se fizeram presentes durante esta jornada: Christian, Fabrício, Rafael, Gustavo, Eduardo, Mateus, Adriano, Pauleto, Wagner, Mora, Passarinho, Juliano, Adriano, Rusi, Patrícia, Ana Paula, Ângela, Rodrigo, Meriene, Nicolás, Annelise, Rosely, Ademir dos Anjos, Irineu, Rivail, Eliandra, Cláudia, Denice, Verônica, Minatti, Luka, Luciano, Daliana, Sandro, Eliandra, Andréia, Thiago.

Aos funcionários da Central de Análises, Secretaria da Pós-Graduação em Química e Biblioteca setorial do CFM, pelos serviços prestados.

À CAPES e a UFAM pela apoio e oportunidade.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a execução desse trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
SUMÁRIO.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	15
ÍNDICE DE TABELAS	16
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	17
RESUMO.....	18
ABSTRACT	20
1 INTRODUÇÃO	22
1.1 DA QUÍMICA MOLECULAR À SUPRAMOLECULAR	23
1.2 LIGANTES MACROCÍCLICOS.....	25
1.2.1 Ligantes macrocíclicos poliaza e polioxoaza de bases de schiff.....	28
1.3 AMINOÁCIDOS PROTÉICOS	30
1.4 NUCLEOTÍDEOS E ÁCIDOS NUCLÉICOS.....	33
1.4.1 Estrutura e propriedades.....	33
1.4.2 Interações ácidos nucleicos – metais.....	35
1.5 HIDROLASES – NUCLEASES.....	37
1.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR “ELECTROSPRAY” (ESI-MS) APLICADA AO ESTUDO DE ESPÉCIES INORGÂNICAS.....	40
2 OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GERAL.....	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	44
3.1 MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO	44
3.1.1 Materiais.....	44
3.1.2 Complexos metálicos em estudo	44
3.1.2.1 $[\text{Fe}_2(\text{BPCINOL})_2(\text{SO}_4)_2(\mu\text{-O})]$ (1).....	45
3.1.2.2 $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{OAc})](\text{ClO}_4)$ (2)	46
3.2 MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO.....	47
3.2.1 Análise elementar de C, H e N.....	47

3.2.2	Espectroscopia no infravermelho – IV.....	47
3.2.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio RMN ¹ H.....	47
3.2.4	Titulação espectrofométrica.....	47
3.2.5	Titulação potenciométrica.....	48
3.2.6	Espectrometria de massas por “Eletrospray” (ESI-MS).....	50
3.2.7	Interação com o DNA.....	50
3.2.8	Cálculos computacionais.....	51
3.3	SÍNTESE DOS LIGANTES MACROCÍCLICOS.....	53
3.3.1	Síntese do 3,6,9,17,20,23-hexaaza-29-30-dihidroxi-13,27-dimetil triciclo [23,3,1,1 ^{11,15}] triaconta -1(28),11,13,15(30),25,26-hexaene – BDBPH.....	53
3.3.2	Síntese do 3,6,9,17,20,23-hexaazatriciclo [23.3.1.1 ^{11,15}]-triaconta-1(29), 11(30),12,14,25(26),27 hexaene - BMXD.....	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1	CARATERIZAÇÃO DOS LIGANTES MACROCÍCLICOS.....	59
4.2	ESTUDOS DE EQUILÍBRIO POTENCIOMÉTRICO.....	59
4.2.1	Constantes de protonação do ligante BDBPH.	59
4.2.2	Estudo do sistema mono e binuclear BDBPH-Zn(II).....	64
4.2.3	Estudo de equilíbrio potenciométrico do sistema ternário BDBPH-Zn(II)- peptídeos (glicilglicina (GG), <i>dl</i> -alanil- <i>dl</i> -alanina (AA) e glicil- <i>l</i> -leucina (GL)).	66
4.2.4	Estudo de equilíbrio potenciométrico do sistema ternário BDBPH-Fe(III)- ATP (5'-trifosfato de adenosina).....	73
4.2.5	Estudo de equilíbrio potenciométrico do sistema ternário BMXD-Cu(II)- Peptídeos (GG, AA e GL).....	81
4.2.6	Estudos de equilíbrio potenciométrico do complexo binuclear de ferro(III) [Fe ₂ (HPCINOL) ₂ (SO ₄) ₂ (μ-O)] (1).....	91
4.2.7	Estudos de equilíbrio potenciométrico do complexo binuclear de níquel [Ni ₂ (HBPCINOL) ₂ (OAc)](ClO ₄) (2).....	99
4.3	ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR “ELECTROSPRAY” (ESI-MS).....	107
4.3.1	Sistema [(BDBPH)Zn ^{II}] ₂ – dipeptídeos (GG eAA).....	107
4.3.2	Sistema [(BDBPH)Fe ₂] – ATP.....	113
4.3.3	[Fe ₂ (HPCINOL) ₂ (SO ₄) ₂ (μ-O)] (1).....	115
4.3.4	[Ni ₂ (HBPCINOL) ₂ (OAc)](ClO ₄) (2).....	116
4.4	INTERAÇÃO COM DNA.....	119

4.5 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS.....	123
4.5.1 Cálculos – Teoria do funcional densidade (DFT)	123
5 CONCLUSÕES	144
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ligantes macrocíclicos.....	26
Figura 2. Estrutura terciária da hemoglobina, destacando-se os grupos heme responsáveis pelo transporte de oxigênio no sangue de mamíferos.....	27
Figura 3. (a) Síntese de macrocíclico e (b) Síntese templatado de macrocíclico base de Schiff [1+1] e [2+2].	29
Figura 4. Fórmula estrutural geral para os α -aminoácidos e a forma zwitteriônica de α -aminoácidos que ocorrem em valores de pH fisiológico. Há 20 diferentes grupos R nos aminoácidos de ocorrência comum.	30
Figura 5. (a) Condensação de dois α -aminoácidos para formar um dipeptídeo. A ligação peptídica é mostrada em vermelho, (b) Dipeptídeos glicilglicina, dl-Alanil-dl-Alanina, Glicil-l-leucina.	31
Figura 6. Representação da estrutura de nucleosídeos e nucleotídeos.....	33
Figura 7. Estrutura química da molécula de ATP.....	34
Figura 8. Estrutura da ligação fosfodiéster (em vermelho) unindo nucleosídeos de DNA e RNA.	35
Figura 9. A dupla hélice proposta por Watson e Crick.	38
Figura 10. Representação esquemática da fonte do “eletrospray”: a-capilar, b-contraeletrodo, c-cone de amostra, d-skimmer, e-lentes do skimmer. A região I está sob pressão atmosférica, a região II, sob pressão intermediária e a região III, sob alto vácuo.....	42
Figura 11. Ortep ¹²⁶ do complexo $[\text{Fe}_2(\text{HPCINOL})_2(\text{SO}_4)_2(\mu\text{-O})]$ (1).	45
Figura 12. Ortep ¹²⁶ do cátion $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{OAc})]^+$ (2).....	46
Figura 13. Representação dos ligantes e substratos.	57
Figura 14. Representações dos cátions complexos macrocíclicos de Cu(II), Zn(II) e Fe(III).....	58
Figura 15. Representação dos complexos (1) e (2).	58
Figura 16. Curvas de equilíbrio potenciométrico do BDBPH.	60
Figura 17. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o ligante BDBPH. Onde o L é o ligante desprotonado e HL, H ₂ L, H ₃ L, H ₄ L, H ₅ L, H ₆ L, H ₇ L, H ₈ L são as formas mono, di, tri-, tetra-, penta-, hexa-, hepta- e octaprotónada do ligante BDBPH.....	62

Figura 18. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o sistema BDBPH – Zn(II), (1:1). As cargas foram omitidas para maior clareza.	65
Figura 19. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o sistema BDBPH – Zn(II), (1:2).	65
Figura 20. Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema ternário: BDBPH - Zn(II)-GG A - 0,050 mmol de GG; B - 0,050 mmol de GG e 0,050 mmol de Zn(II); C - 0,050 mmol de BDBPH; D - 0,050 mmol de BDBPH e 0,050 mmol de Zn(II); E - 0,050 mmol de BDBPH e 0,100 mmol de Zn(II); F - 0,050 mmol de BDBPH, 0,100 mmol de Zn(II) e 0,050 mmol de GG, todas em 50,0 mL de solução.	67
Figura 21. Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema ternário BDBPH - Zn(II)-AA- A - 0,050 mmol de AA; B - 0,050 mmol de AA e 0,050 mmol de Zn(II); C - 0,050 mmol de BDBPH; D - 0,050 mmol de BDBPH e 0,050 mmol de Zn(II); E - 0,050 mmol de BDBPH e 0,100 mmol de Zn(II); F - 0,050 mmol de BDBPH, 0,100 mmol de Zn(II) e 0,050 mmol de AA, todas em 50,0 mL de solução.	68
Figura 22. Diagrama de distribuição de espécies do sistema BDBPH - Zn(II) - GG na proporção 1:2:1, em função do pH, onde LZn_2P^{3+} (LZn_2GG^{3+}), LZn_2HP^{4+} (LZn_2HGG^{4+}), e $LZn_2(OH)P^{2+}$ ($LZn_2(OH)GG^{2+}$) são as espécies não-protonada, monoprotônica e hidroxida, respectivamente.	72
Figura 23. Diagrama de distribuição de espécies do sistema BDBPH-Zn(II)- AA na proporção 1:2:1, em função do pH, onde LZn_2P^+ (LZn_2AA^+), LZn_2HP^{2+} (LZn_2HAA^{2+}), e $LZn_2(OH)P$ ($LZn_2(OH)AA$) são as espécies não-protonada, monoprotônica e hidroxida, respectivamente.	73
Figura 24. Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema ternário BDBPH-Fe(III)-ATP- A - 0,050 mmol de ATP; B - 0,050 mmol de ATP e 0,050 mmol de Fe(III); C - 0,050 mmol de BDBPH; D - 0,050 mmol de BDBPH e 0,050 mmol de Fe(III); E - 0,050 mmol de BDBPH e 0,100 mmol de Fe(III); F - 0,050 mmol de BDBPH, 0,100 mmol de Fe(III) e 0,050 mmol de ATP, todas em 50,0 mL de solução.	74
Figura 25. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o sistema BDBPH – Fe(III), (1:1).	77
Figura 26. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o sistema BDBPH – Fe(III), (1:2).	78
Figura 27. Diagrama de distribuição de espécies do sistema ternário ATP-Fe(III)-BDBPH na proporção 1:2:1, em função do pH, onde LFe_2A , é o complexo ternário	

BDBPH-Fe(III) ₂ -ATP, LFe ₂ HA ⁺ é a complexo ternário protonado e LFe ₂ (H ₋₁)A ⁻ , LFe ₂ (H ₋₁) ₂ A ²⁻ , LFe ₂ (H ₋₁) ₃ A ³⁻ são as espécies hidróxidas do complexo ternário.	80
Figura 28. Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema ternário Cu(II)-BMXD-GG: A - 0,050 mmol de GG; B - 0,050 mmol de GG e 0,050 mmol de Cu(II); C - 0,050 mmol de BMXD; D - 0,050 mmol de BMXD e 0,050 mmol de Cu(II); E - 0,050 mmol de BMXD e 0,100 mmol de Cu(II); F - 0,050 mmol de BMXD, 0,100 mmol de Cu(II) e 0,050 mmol de GG, todas em 50mL de solução.	81
Figura 29. Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema ternário BMXD-Cu(II)-AA: A - 0,050 mmol de AA; B - 0,050 mmol de AA e 0,050 mmol de Cu(II); C - 0,050 mmol de BMXD; D - 0,050 mmol de BMXD e 0,050 mmol de Cu(II); E - 0,050 mmol de BMXD e 0,100 mmol de Cu(II); F - 0,050 mmol de BMXD, 0,100 mmol de Cu(II) e 0,050 mmol de AA, todas em 50mL de solução.	82
Figura 30. Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema ternário BMXD - Cu(II)-GL: A - 0,050 mmol de GL; B - 0,050 mmol de GL e 0,050 mmol de Cu(II); C - 0,050 mmol de BMXD; D - 0,050 mmol de BMXD e 0,050 mmol de Cu(II); E - 0,050 mmol de BMXD e 0,100 mmol de Cu(II); F - 0,050 mmol de BMXD, 0,100 mmol de Cu(II) e 0,050 mmol de GL, todas em 50mL de solução.	83
Figura 31. Diagrama de distribuição das espécies presentes no sistema BMXD - Cu(II)-GG na proporção 1: 2:1.....	88
Figura 32. Diagrama de distribuição das espécies presentes no sistema BMXD-Cu(II)-AA na proporção 1:2:1.	89
Figura 33. Diagrama de distribuição das espécies ternárias presentes no sistema BMXD-Cu(II)-GL na proporção 1:2:1.....	91
Figura 34. Curvas de titulação potenciométrica para o sistema binário complexo (1) – Substrato (ATP e GG).	92
Figura 35. Diagrama de distribuição das espécies para o complexo 1 em função do pH. Onde A = [Fe ₂ (OH ₂) ₂ L ₂], B = [Fe ₂ (OH ₂)(OH)L ₂], C = [Fe ₂ (OH) ₂ L ₂], D = [Fe ₂ (OH) ₂ (H ₋₁)L ₂], E = [Fe ₂ (OH) ₂ (H ₋₁) ₂ L ₂].	94
Figura 36. Gráfico de distribuição das espécies formadas pela associação do ATP com o complexo 1 (C ₁) em função do pH, onde C ₁ ATP é o complexo binário formado, C ₁ HATP é a espécie protonada, C ₁ (OH)ATP é uma espécie hidróxida e a outra espécie hidróxida é a C ₁ (OH)H ₋₁ ATP que apresenta um braço alcoólico desprotonado.	97

Figura 37. Gráfico de distribuição das espécies formadas pela associação da GG com o complexo 1 (C ₁) em função do pH, onde C ₁ GG é o complexo binário formado, C ₁ HGG é a espécie protonada, C ₁ (OH)GG é uma espécie hidróxida e a outra espécie hidróxida é a C ₁ (OH)H ₋₁ S, que apresenta um braço alcoólico desprotonado.	98
Figura 38. Curvas de titulação potenciométrica para o sistema binário complexo (2) – Substrato (ATP e GG).	100
Figura 39. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o complexo (2) [Ni ₂ (HBPCINOL) ₂ (OAc)] ⁺ . Onde F = [Ni(H ₂ BPCINOL)(H ₂ O) ₂] ²⁺ ; G = [Ni ₂ (H ₂ BPCINOL)(OAc)(H ₂ O)] ⁺ ; H = [Ni ₂ (HBPCINOL)(H ₂ BPCINOL)(H ₂ O) ₃] ²⁺ ; I = [Ni ₂ (HBPCINOL) ₂ (H ₂ O) ₂] ²⁺ ; J = [Ni ₂ (HBPCINOL) ₂ (H ₂ O)(OH)] ⁺ ; K = [Ni ₂ (HBPCINOL) ₂ (OH) ₂].	103
Figura 40. Gráfico de distribuição das espécies formadas pela associação do ATP com o complexo (2) (C ₂) em função do pH, onde C ₂ ATP é o complexo binário formado, C ₂ H ₋₁ ATP (C ₂ (OH)ATP) é a espécie hidróxida.	105
Figura 41. Gráfico de distribuição das espécies formadas pela associação da GG com o complexo (2) (C ₂) em função do pH, onde C ₂ GG é o complexo binário formado, C ₂ H ₋₁ GG é a espécie binária com a GG desprotonada, a espécie C ₂ H ₋₁ (OH)GG é a espécie hidróxida e a espécie C ₂ H ₋₁ (OH) ₂ GG é a dihidróxida.	106
Figura 42. ESI-MS no modo positivo de 1,0.10 ⁻⁴ M do BDBPH em solução de água, acetonitrila e ácido fórmico (50:49,9:0,1 % v/v) (pH = 10,6 tampão CHES) Vc = 70 V, m/z 471 ([BDBPH + H] ⁺).	108
Figura 43. ESI-MS no modo positivo de 1,0.10 ⁻⁴ M do complexo [(BDBPH)Zn ^{II}] ₂ ²⁺ em água, acetonitrila e ácido fórmico (50:49,9:0,1 % v/v) (pH = 9, tampão CHES) Vc = 80 V. (Vc = voltagem do cone).	109
Figura 44. (a) Região ampliada dos picos m/z 267, 299, 633 e 679 no ESI-MS do complexo [(BDBPH)Zn ^{II}] ₂ ²⁺ (Figura 43). (b) ESI-MS dos picos m/z 267, 299, 633 e 679 simulados no software MassLynx [®] 4.0. (% = Intensidade relativa).	111
Figura 45. ESI-MS no modo positivo de 1,0.10 ⁻⁴ M do sistema ternário BDBPH-Zn(II)-GG na proporção 1:2:1 em água, acetonitrila e ácido fórmico (50:49,9:0,1 % v/v) (pH = 7, tampão PIPES) Vc = 70 V. (Vc = voltagem do cone).	112
Figura 46. ESI-MS no modo positivo de 1,0.10 ⁻⁴ M do sistema ternário BDBPH-Zn(II)-AA na proporção 1:2:1 em água, acetonitrila e ácido fórmico (50:49,9:0,1 % v/v) (pH = 7, tampão PIPES) Vc = 70 V. (Vc = voltagem do cone).	113

Figura 47. ESI-MS no modo positivo de $1,0 \cdot 10^{-4}$ M do complexo [BDBPH-Fe ₂ ^{III}] ⁴⁺ em água, acetonitrila e ácido fórmico (50:49,9:0,1 % v/v) (pH = 7, tampão PIPES) Vc = 70 V. (Vc = voltagem do cone).....	114
Figura 48. Espectro de massas por “electrospray” no modo positivo de $1,0 \cdot 10^{-4}$ M do sistema ternário BDBPH-Fe-ATP na proporção 1:2:1 em água, acetonitrila e ácido fórmico (50:49,9:0,1 % v/v) (pH = 5, tampão PIPES) Vc = 70 V. (Vc = voltagem do cone).....	115
Figura 49. ESI-MS no modo positivo de $2,0 \cdot 10^{-5}$ M de 1 em metanol/água (1:1% v/v). Vc = 40 V (Vc = voltagem do cone).....	116
Figura 50. ESI-MS no modo positivo de $2,5 \cdot 10^{-5}$ M de 2 em metanol/água (1:1% v/v). Vc = 40 V (Vc = voltagem do cone).....	117
Figura 51. ESI-MS/MS para os íons (a) <i>m/z</i> 825.0, (b) <i>m/z</i> 785.1 e (c) <i>m/z</i> 363.1..	118
Esquema 10. Estruturas presentes em solução MeOH/H ₂ O (1:1) e fragmentos observados via experimentos ESI-MS e ESI-MS/MS do complexo 2. (A), (B) e (D) são compostos presentes em solução. (C) e (E) são fragmentos observados após ionização.....	119
Figura 52. Eletroforese em gel de agarose evidenciando a clivagem do DNA plasmidial pBSK II em agarose 0,8% à temperatura de 50 °C nos pH's 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0, por 16h com concentrações de 1 de 10, 50, 100, 250 e 0 (controle) μM.	120
Figura 53. Variação da forma superenovelada (F I) em função da concentração de (1).....	121
Figura 54. Clivagem de DNA plasmidial por (1) em condições aeróbias e anaeróbias (atmosfera de argônio); poços 1 e 6: controle – somente DNA (pBSK-II 25 μM); poços 2 e 3: DNA + complexo; poços 4 e 5: DNA + Fe(EDTA) ⁻² 50 μM + complexo; poços 6, 7 e 8: DNA + DMSO 400 mM + complexo; poço 9: DNA + Fe(EDTA) ⁻² 50 μM + DMSO 400 mM + complexo. Todas as amostras foram incubadas por 6 horas a 50 °C em tampão PIPES 25 mM, pH = 6,0.	122
Figura 55. Cada linha representa uma vista das superfícies para o BMXD, da esquerda para direita temos: representação tridimensional da estrutura, densidade total de carga com o potencial eletrostático incluso com isodensidade de 0,002 u.a., e somente o potencial eletrostático com isopotencial de 1,0 u.a.....	123
Figuras 56. Linha de cima perspectiva do HOMO, linha de baixo LUMO, (ambos com isodensidade de 0,02 u.a.) para o BMXD.....	124

Figuras 57. Linha de cima: perspectivas do HOMO, linha de baixo: perspectivas do LUMO, (ambos com isodensidade de 0,02 u.a.), para o BDBPH.....	125
Figura 58. Cada linha representa uma vista das superfícies para o BDBPH, da esquerda para direita temos: representação tridimensional da estrutura, densidade total de carga com o potencial eletrostático incluso com isodensidade de 0,002 u.a., e somente o potencial eletrostático com isopotencial de 1,0 u.a.....	126
Figura 59. Cada linha representa uma vista das superfícies para os peptídeos, de cima para baixo temos: representação tridimensional da estrutura, densidade total de carga com o potencial eletrostático incluso (0,002 u.a), potencial eletrostático (1,0 u.a.), HOMO (0,02 u.a.) e LUMO (0,02 u.a.). Primeira coluna GG, segunda: AA, terceira GL.....	128
Figura 60. Da esquerda para direita, representação tridimensional; superfície de potencial eletrostático (4,3 u.a.); HOMO e LUMO (ambos com 0,02 u.a.). Cada linha contém um dipeptídeo, primeira linha apresenta a glicil-glicina, segunda a <i>d</i> -alanil- <i>d</i> -alanina e a terceira a glicil- <i>l</i> -leucina, todos em suas formas aniônicas.	132
Figura 61. Estrutura otimizada pelo método de mecânica molecular AMBER para o ATP ⁴⁻	135
Figura 62. Propostas estruturais para a associação da GG com [BMXDCu ₂] ⁴⁺ , as duas primeiras linhas são propostas para espécie ativa e a última linha é para a espécie inativa onde o nitrogênio da amida está desprotonado.....	137
Figura 63.– Proposta estrutural para a associação da GG com Zn ₂ BDBPH.....	138
Figura 64. Superfícies para o complexo 1 (De cima para baixo: densidade total de carga com potencial eletrostático incluso (0,002 u.a.), potencial eletrostático (1,3 u.a.), densidade total de spin (0,01 u.a.) . Lado esquerdo: estado triplete e lado direito: estado 11.....	139
Figura 65. Orbitais moleculares para o complexo 1, lado esquerdo estado triplete e lado direito: estado 11.	142

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Da química molecular à supramolecular.	24
Esquema 2. Rota sintética do BDBPH	53
Esquema 3. Rota sintética do BMXD.	55
Esquema 4. Proposta para os equilíbrios observados para o ligante BDBPH.	63
Esquema 5. Formação das espécies ternárias [(BDBPH)Zn ₂ P].....	71
Esquema 6. Formação das espécies ternárias LFe ₂ -ATP.....	79
Esquema 7. Formação das espécies ternárias LCu ₂ -peptídeo.	86
Esquema 8. Proposta para os equilíbrios observados para o complexo (1).	93
Esquema 9. Proposta das espécies presentes em solução etanol/água (70:30% v/v) em diferentes pH's.	102
Esquema 11. Mecanismo proposto para a hidrólise e deuturação do dipeptídeo GG catalisadas pelo complexo binuclear [BMXDCu ₂] ⁴⁺	130

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Logaritmos das constantes de protonação do BDBPH em solução aquosa.	61
Tabela 2. Logaritmos das constantes de estabilidade dos complexos BDBPH – Zn(II).....	64
Tabela 3. Logaritmos das constantes de protonação e de estabilidade dos peptídeos com o íon zinco (II).....	69
Tabela 4. Logaritmos das constantes de estabilidade para os complexos ternários, BDBPH-Zn(II)-peptídeos (GG e AA).....	71
Tabela 5. Logaritmos das constantes de protonação do ATP e de complexação do ATP com o íon ferro (III). (A = ATP).	75
Tabela 6. Logaritmos das constantes de estabilidade dos complexos BDBPH – Fe(III).....	75
Tabela 7. Logaritmos das constantes de formação para os complexos ternários, BDBPH-Fe(III)-ATP.	79
Tabela 8. Logaritmos das constantes de protonação do BMXD e de equilíbrio das espécies do sistema BMXD-Cu(II).	84
Tabela 9. Logaritmos das constantes de protonação dos dipeptídeos e de equilíbrio das espécies nos sistemas dipeptídeos-Cu(II).	85
Tabela 10. Logaritmos das constantes de estabilidade para os complexos ternários BMXD-Cu(II)-peptídeos(GG, AA, GL).	87
Tabela 11. Logaritmos das constantes de equilíbrio do complexo (1).....	94
Tabela 12. Logaritmos das constantes de equilíbrio para o sistema binário complexo (1) + substrato (ATP, GG).....	96
Tabela 13. Logaritmos das constantes de equilíbrio do complexo (2).....	101
Tabela 14. Logaritmos das constantes de equilíbrio para o sistema binário complexo (2) + substrato (ATP, GG).....	104
Tabela 15. Resultados eletrônicos (eV).	129
Tabela 16. Cargas sobre os átomos do substrato glicilglicina.....	131
Tabela 17. Cargas sobre os átomos do substrato <i>d</i> -alanil- <i>d</i> -alanina.	133
Tabela 18. Cargas sobre os átomos do substrato glicil- <i>l</i> -leucina.	134
Tabela 19. Transições eletrônicas calculadas.....	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – *dl*-Alanil-*dl*-Alanina

BMXD – 3,6,9,17,20,23) hexazatriciclo [23.3.1.1^{11,15}] triaconta1 (29) ,11 (30), 12, 14, 25,26,27-hexeno

BDBPH – (3, 6, 9, 17, 20, 23- hexaza-29,30-dihidroxi-13-27-dimetil-triciclo [23,3,1,1^{11,15}] triaconta-1(28),11,13,15(30),25,26-hexeno)

CHES – ácido 2-[N-Cicloexilamino]etanosulfônico]

DFT – Teoria do Funcional Densidade

DNA – ácido desoxirribonucléico

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ESI-MS – Espectrometria de massas por “electrospray”

ESI-MS/MS – Espectrometria de massas por “electrospray” em tandem

GG – Glicilglicina

GL – Glicil-*l*-leucina

¹H NMR –ressonância magnética nuclear do hidrogênio

HEPES – ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazino]-etanosulfônico

HPCINOL – (1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloro-propan-2-ol)

H₂BPCINOL – N-(2-hidroxibenzil)-N-(2piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)] propilamina

HOMO – Orbital molecular mais alto ocupado

IV – espectroscopia vibracional na região do infravermelho

KOH – hidróxido de potássio

Log K – logarítmo da constante de protonação

LUMO – Orbital molecular vazio mais baixo

MES – ácido 2-[N-Morfolino]etanosulfônico]

M – concentração molar

mmol – milimoles

PAPs – Fosfatases ácidas púrpuras

PIPES – ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazino]-etanosulfônico

μ – força iônica

ν – estiramento (IV)

δ – deformação angular (IV)

δ_H – deslocamento químico do hidrogênio (RMN)

RESUMO

O reconhecimento da importância de complexos binucleares contendo ligantes macrocíclicos e ligantes de cadeia aberta para a ciência supramolecular, para a química bioinorgânica, para aplicações biomédicas, e também, para a formação de compostos com estruturas e propriedades incomuns, tem levado a consideráveis esforços para o desenvolvimento de métodos e sínteses desses compostos. Ligantes macrocíclicos são usados em estudos de equilíbrio em solução, reconhecimento molecular, modelos estruturais de sítios ativos de metaloenzimas e metaloproteínas, complexos com atividade na clivagem do DNA, e em algumas aplicações tecnológicas.

Neste trabalho, apresentamos um novo procedimento sintético para o desenvolvimento de ligantes macrocíclicos. Com base nesse procedimento, foram reproduzidos os ligantes BDBPH e BMXD anteriormente descritos na literatura por Martell. Foram realizados estudos de equilíbrio potenciométrico do ligante BDBPH em presença e ausência dos íons metálicos zinco (II) e ferro (III), e as constantes de associação dos peptídeos, glicilglicina (GG), *dl*-alanil-*dl*-alanina (AA) e glicil-*l*-leucina (GL) com o complexo binuclear de BDBPH-Zn(II) e com o complexo binuclear de BMXD-Cu(II) foram determinadas. Com o complexo binuclear de Fe(III)-BDBPH foram determinadas as constantes de associação do nucleotídeo 5' trifosfato de Adenosina (ATP).

Neste trabalho foram utilizados dois novos complexos binucleares com ligantes de cadeia aberta. Ambos com estrutura cristalográfica resolvida por difração de raios X. Um de ferro (III), **1** - $[\text{Fe}_2(\text{HPCINOL})_2(\text{SO}_4)_2(\mu\text{-O})]$, que está sendo estudado como modelo para as fosfatases ácidas púrpuras, e o outro de níquel (II), **2** - $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{OAc})](\text{ClO}_4)$, que está sendo estudado como modelo para as ureases. Foram realizados estudos potenciométricos dos complexos **1** e **2** e determinado as constantes de associação desses complexos com a GG e o ATP.

Com o objetivo de confirmar as espécies detectadas em solução por potenciometria, foram realizados estudos de espectrometria de massas por “eletrospray” para todos os compostos utilizados neste trabalho.

Utilizando a teoria da densidade funcional (DFT - *Density Functional Theory*), com o método B3LYP, foram feitos cálculos que nos permitiram ter uma visão global

da estrutura eletrônica dos ligantes (BDBPH e BMXD) e substratos (GG, AA, GL e ATP), que permitiu três propostas estruturais de reconhecimento molecular. Os cálculos foram feitos com o programa Gaussian 98.

A realização de testes de interação com DNA, para o complexo **1**, revelou sua capacidade de promover a clivagem hidrolítica em concentrações significativamente baixas. Estudos mais detalhados encontram-se em andamento para obtenção de maiores informações, como atividade catalítica na reação de hidrólise de ésteres de fosfatos, interação com a proteína BSA e parâmetros cinéticos, o que pode indicar aplicações para esse composto como uma nuclease sintética.

ABSTRACT

The recognition of the importance of binuclear complexes containing macrocyclic ligands and open chain ligands in supramolecular science for bioinorganic chemistry, for biomedical applications and also for the formation of compounds with unusual structures and properties, has increased considerably with regard to the development of methods and the synthesis of these compounds. Macrocyclic ligands are used in equilibrium studies in solution, molecular recognition, structural models of active sites of metalloenzymes and metalloproteins, complexes with activity in the cleavage of DNA and in some technological applications.

We report here on a new synthesis procedure for the development of macrocyclic ligands. Based on this procedure, the ligands BDBPH and BMXD, previously described in the literature by Martell, were produced. Potentiometric equilibrium studies of the ligand BDBPH in the presence and absence of the metal ions zinc (II) and iron (III) were carried out, and the association constants of the peptides, glycylglycine (GG), *dl*-alanyl-*dl*-alanine (AA) and glycyl-*l*-leucine (GL) with the binuclear complex BDBPH-Zn(II) and binuclear complex BMXD-Cu(II), were determined. The association constants of adenosine-5'-triphosphate (ATP) with BDBPH-Fe(III) complex, were determined.

In this study two new binuclear complexes with open chain ligands were used, both with their crystallographic structure resolved by X-ray diffraction. One is an iron (III) complex, **1** - $[\text{Fe}_2(\text{HPCINOL})_2(\text{SO}_4)_2(\mu\text{-O})]$, which is being studied as a model for purple acid phosphatases, and the other is a nickel (II) complex, **2** - $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{OAc})](\text{ClO}_4)$, which is being studied as a model for ureases. Potentiometric studies were carried out with complexes **1** and **2** and the association constants of these complexes with GG and ATP were determined.

With the aim of confirming the species detected in solution by potentiometry, electrospray mass spectrometry analysis was carried out on all of the compounds used in this study.

Using the Density Functional Theory (DFT), with the B3LYP method, calculations were carried out which allowed a global view of the electronic structure of the ligands (BDBPH and BMXD) and substrates (GG, AA, GL and ATP), giving

three structural proposals of molecular recognition. The calculations were carried out with the program Gaussian 98.

Tests on the interaction with DNA, for complex **1**, revealed its capacity to promote hydrolytic cleavage in significantly low concentrations. More detailed studies are in progress in order to obtain further information, such as the catalytic activity in the hydrolysis reaction of phosphate esters, the interaction with the protein BSA and kinetic parameters, which may indicate applications for this compound, for example, as a synthetic nuclease.

1 INTRODUÇÃO

As formas de como os íons metálicos influenciam o seu ambiente de coordenação, e como esse ambiente influencia suas propriedades intrínsecas, requer o conhecimento da química de coordenação, um campo de investigação que encontra raízes nos trabalhos de químicos como Werner, que no final do século XIX, estudou os complexos “coloridos” de cobalto. A partir deste trabalho inicial, atingimos agora um período no qual podemos desvendar os mistérios do papel dos íons metálicos em sistemas biológicos, e podemos projetar novos materiais e dispositivos que rivalizam e até suplantam os contidos na natureza.

A química de coordenação em solução desenvolveu-se na década de 1950, com os trabalhos de equilíbrio em solução, de Bjerrum e Schwarzenbach.^{1,2} Uma realização específica foi o reconhecimento do efeito quelato.³ Uma outra constatação foi a de padrões presentes na preferência de íons metálicos por ligantes com átomos doadores com diferentes eletronegatividades baseada nas classificações de ácidos e bases do tipo A e B de Schwarzenbach, e nos princípios de ácidos e bases ‘duros e macios’ de Pearson.^{2,4}

A descoberta de que íons metálicos exercem papéis essenciais nos sistemas biológicos, abriu espaço para o surgimento de uma nova área de pesquisa, em que os princípios da química inorgânica estão relacionados aos sistemas naturais: a Química Bioinorgânica, “ciência que traz a química inorgânica para dentro da vida”, e que nos apresenta o mimetismo como parâmetro inicial de compressão do modo de ação dos íons metálicos nos sistemas vivos, e de suas interações a níveis moleculares. A química bioinorgânica está na interface entre a química inorgânica clássica e a bioquímica. Apesar de esta estar associada à química orgânica, para que alguns processos biológicos vitais sejam realizados, se faz necessário a presença de íons metálicos. A partir da metade do século passado, surgiram inúmeros trabalhos envolvendo a síntese e caracterização de compostos de coordenação de baixo peso molecular com aspectos espectroscópicos, estruturais e de reatividade dos elaborados sistemas biológicos.^{5,6} A vantagem de um complexo modelo é o tamanho molecular, justamente quando comparado com a complexidade dos sistemas naturais, por exemplo: informações sobre a estrutura eletrônica das heme-biomoléculas são dificultadas pelas transições internas do anel porfirínico, que

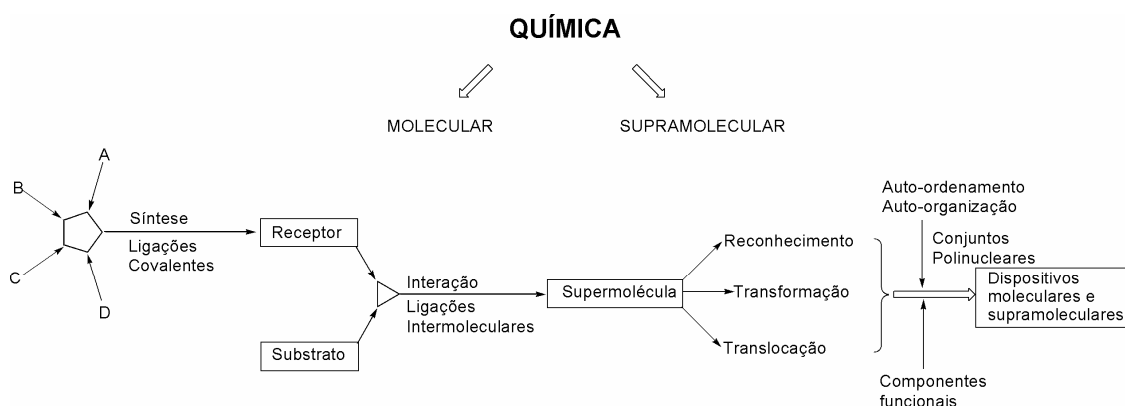
dominam todo o espectro visível, encobrendo as transições de campo ligante e de transferência de carga, as quais se relacionam mais diretamente com o comportamento do íon metálico.⁷ Desde então, a química bioinorgânica passou a ser uma ciência multidisciplinar que promove a interação de diversas áreas da ciência como: química, bioquímica, física, biologia, microbiologia, farmacologia, medicina, toxicologia, dentre outras, com o intuito de desenvolver o conhecimento acerca dos mecanismos de ação dos metais nos organismos vivos.⁸ O resultado dessa interação entre as várias áreas da ciência pode ser vista hoje no grande número de publicações envolvendo compostos bioinorgânicos, trabalhos que enfatizam os diversos tipos de interações entre os metais e sistemas biológicos, tais como: ambiente de coordenação do íon metálico em metaloenzimas e metaloproteínas, desenvolvimento de novos fármacos,⁹ desintoxicação de metais no corpo humano,¹⁰ transportes dos metais em organismos vivos,¹¹ processos de biomineralização.¹² Graças à interdisciplinaridade, inúmeros progressos nessa área têm sido feitos, comprovando que a química bioinorgânica não pode mais ser vista como uma área intermediária entre a bioquímica e a química inorgânica clássica, mas sim como uma ciência que também promove o desenvolvimento científico de muitas áreas afins, através da assimilação de novos conhecimentos.

1.1 DA QUÍMICA MOLECULAR À SUPRAMOLECULAR

A necessidade de expandir horizontes e olhar para a química não somente como uma ciência de moléculas individuais, mas também como as moléculas se agrupam e interagem em pares, grupos pequenos ou grandes agregados, abriu espaço para o surgimento da Química Supramolecular.¹³

Em 1935, Klaus Wolf, químico alemão, cunhou o termo *Übermoleküle* (macromolécula) para descrever associações moleculares.¹⁴ Durante os anos de 1960, Charles Pederson investigando aditivos para a borracha, descobriu, de maneira casual, que éteres cíclicos ligavam-se a íons metálicos. O anel, então adota uma conformação corrugada que lembra uma coroa. Pederson batizou esses receptores de éter coroa.¹⁵ A partir dos éteres coroas Jean-Marie Lehn e colaboradores sintetizaram moléculas bicíclicas e tricíclicas que devido às suas capacidades de ligar e “esconder” um íon metálico dentro das suas cavidades

internas, chamou essas moléculas de criptandos, e os complexos metálicos resultantes de criptatos. Em 1978, Lehn, pela primeira vez, sugeriu o termo Química Supramolecular, que pode ser melhor definido como: “justamente como há um campo da química baseado nas ligações covalentes, a química molecular, há um campo da química supramolecular, a química da reunião molecular e das ligações intermoleculares”. O Esquema 1 ilustra uma hierarquia de níveis estruturais que partem do molecular para o supramolecular, e é comumente encontrada nos complexos sistemas da natureza, como vírus e células.^{16,17}



Esquema 1. Da química molecular à supramolecular.

Na Biologia, ligações covalentes definem a composição das moléculas fundamentais - proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, hormônios -, mas ligações não-covalentes desempenham um papel crítico na determinação de suas funções. É por meio de interações fracas que as enzimas são capazes, não somente de se ligar, mas também de liberar suas moléculas-alvo, que a dupla hélice do DNA poder ser aberta e copiada, e que as células nervosas podem enviar sinais umas às outras.¹³

Espécies supramoleculares são caracterizadas pelo arranjo espacial de seus componentes, sua estrutura ou superestrutura e pela natureza das ligações intermoleculares que suportam simultaneamente estes componentes. Tais espécies possuem propriedade estrutural, conformacional, termodinâmica, cinética e dinâmica bem definidas. Vários tipos de interações podem ser distinguidos apresentando diferentes graus de força, distância e ângulos, coordenação de íons metálicos, forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals,

interações doador-receptor etc. Entretanto forças intermoleculares são mais fracas do que ligações covalentes, assim, espécies supramoleculares são termodinamicamente menos estáveis, cineticamente mais lábeis e dinamicamente mais flexíveis do que moléculas.¹³

Os componentes em uma supermolécula são denominados: receptor e substrato. O substrato é usualmente o menor componente. Esta terminologia transmite a relação da interação biológica receptor-substrato, com suas propriedades estrutural e funcional definidas, complexos cascata, complexos de inclusão e hóspede-hospedeiro - “host-guest” - são designações também utilizadas.

A ligação seletiva de um substrato com o receptor forma a supermolécula e envolve um processo de reconhecimento molecular. Os princípios de reconhecimento molecular e da complementaridade ressoam por toda a bioquímica. A complementaridade entre os grupos unidos por ligação de hidrogênio nas fitas do DNA é o que torna a dupla hélice estável. A comunicação intercelular é normalmente feita pela transferência extracelular de uma molécula sinalizadora, que é reconhecida e ligada às proteínas pendentes da superfície externa da célula. Se o receptor possui uma função reativa, este pode causar uma transformação química no substrato, comportando-se como um reagente ou catalisador supramolecular. O fenômeno de translocação seria a capacidade de o receptor transportar o substrato de uma fase para outra, como ocorre com membranas, micelas, etc. Assim, reconhecimento molecular, transformação e translocação, representam as funções básicas das espécies supramoleculares.^{13,16,17}

1.2 LIGANTES MACROCÍCLICOS

O entendimento da química dos íons metálicos e ligantes macrocíclicos possui grande implicação nas áreas de química e bioquímica. Ligantes macrocíclicos são ligantes polidentados, contendo seus átomos doadores incorporados no ciclo, e muitas vezes ligados ao ciclo como doadores pendentes.¹⁸ Na Figura 1 estão representados alguns exemplos de ligantes macrocíclicos, usados em estudos de equilíbrio em solução, modelos estruturais de sítios ativos de metaloenzimas e metaloproteínas, complexos de lantanídeos com atividade na clivagem do DNA, e algumas aplicações como agentes de contrastes em ressonância magnética de

imagens. Ligantes poliazamacrocíclicos (**1** e **3**),¹⁹ azacoroa (**2**),²¹ poliazadifenóis (**4**, **5**, **6**),²² éter coroa (**7**),²⁰ macrocíclicos com ligantes pendentes,^{23,32} (**8**), bases de Schiff (**9**), ligantes porfirínicos (**10**) e derivados artificiais (**11**) usados como modelos biomiméticos em processos que envolvem transferência de elétrons e ativação do dioxigênio.²⁴

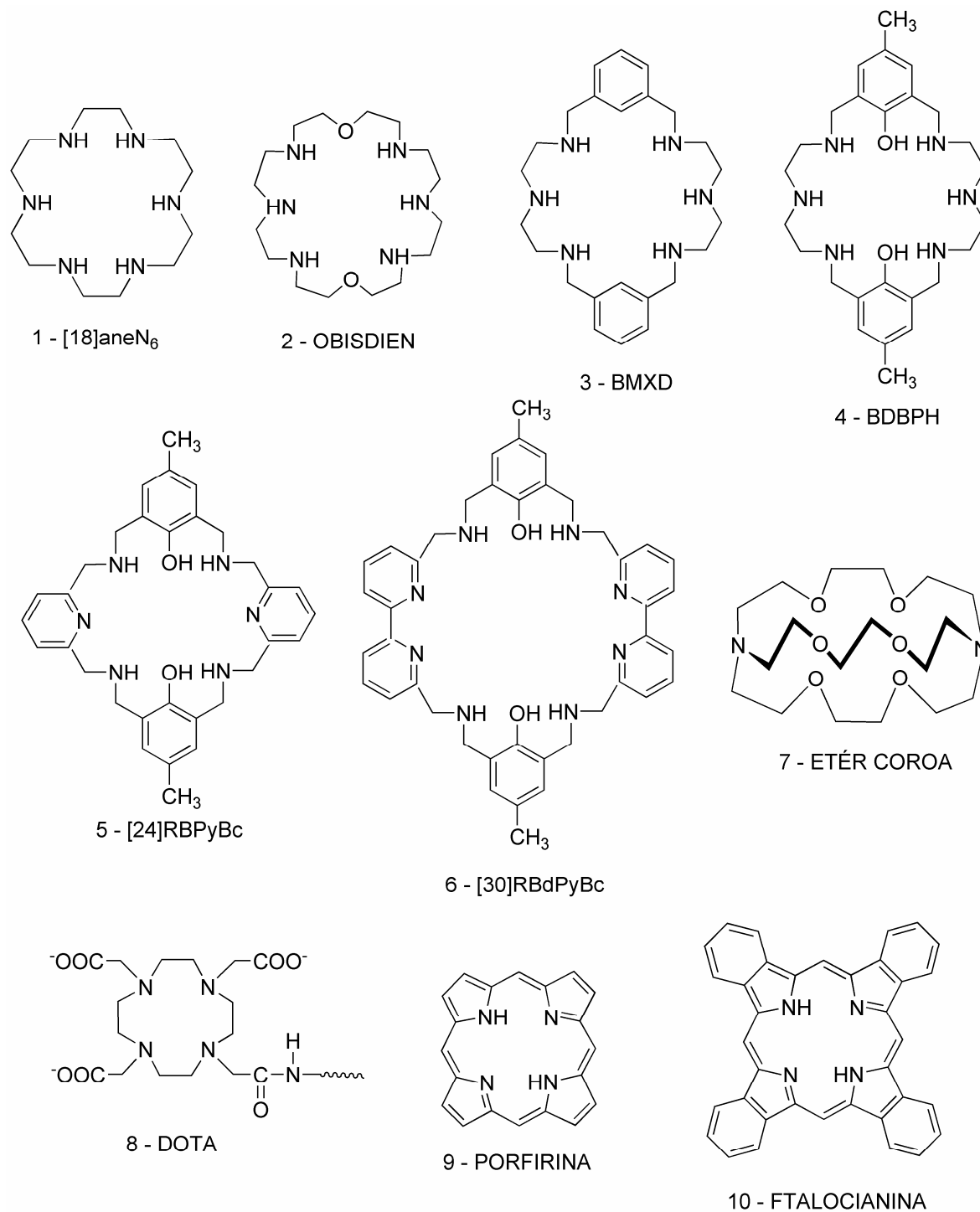


Figura 1. Ligantes macrocíclicos.

Um número considerável de macrocíclicos sintéticos bem como naturais é hoje estudado. A maioria das pesquisas está relacionada com as propriedades espectrais, eletroquímicas, estruturais, cinéticas e termodinâmicas da formação dos respectivos complexos.²⁵

O fato dos complexos de ligantes macrocíclicos estarem envolvidos em sistemas biológicos fundamentais também é reconhecido. A importância de seus complexos, como por exemplo, no mecanismo de fotossíntese, ou no transporte de oxigênio em mamíferos (Figura 2), e em outros sistemas respiratórios, promoveu e ainda promove uma motivação para a investigação da química dos íons metálicos nesses sistemas, bem como nos sistemas contendo ligantes cíclicos. Tal interesse conduziu à síntese do primeiro composto biomimético que forma interação π axial com o imidazol.²³

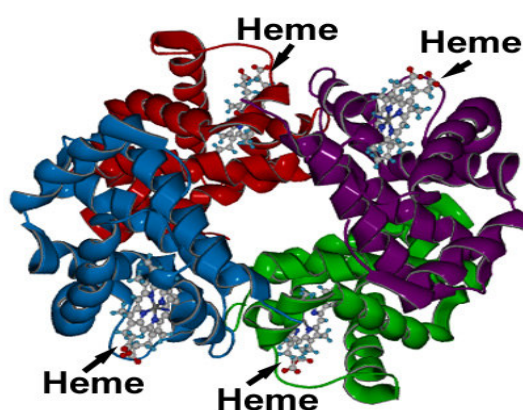


Figura 2. Estrutura terciária da hemoglobina, destacando-se os grupos heme responsáveis pelo transporte de oxigênio no sangue de mamíferos.

Há boas razões para a natureza preferir derivados de ligantes macrocíclicos para os importantes sistemas acima mencionados: geralmente uma estabilidade cinética e termodinâmica adicional é conferida aos respectivos complexos, pelos ligantes cíclicos. As constantes de formação dos compostos macrocíclicos contendo grupos aminos são 5-7 unidades logarítmicas mais elevadas que as poliaminas análogas de cadeia aberta. Foi sugerido por Cabbiness que este efeito macrocíclico tão elevado é devido ao fato que o ligante poliamina de cadeia aberta é grandemente solvatado em solução aquosa. E existe numa conformação estendida, permitindo uma hidratação com um número máximo de moléculas de água. O ligante

macrocíclico, por outro lado, tem seus grupos doadores relativamente próximos, restringindo o número de moléculas de água que podem solvatar os átomos polares como os de nitrogênio. Portanto, a formação de um complexo macrocíclico requer uma energia de solvatação muito menor do que no caso das poliaminas abertas. A formação de quelatos metálicos com ligantes poliaminas de cadeia aberta requer mudanças na conformação do ligante de uma estrutura estendida do ligante para um arranjo mais rígido no quelato metálico. Estas mudanças em conformação estão associadas com decréscimos significantes da entropia por causa das restrições de movimentos rotacionais e vibracionais do ligante. Tais restrições não ocorrem, ou ocorrem muito pouco, na formação de quelatos macrocíclicos, porque estes ligantes já possuem uma conformação muito parecida com aquela do complexo.²⁶ Esses efeitos entálpicos e entrópicos refletem numa maior constante de estabilidade na formação do complexo macrocíclico quando comparado com o complexo análogo do ligante de cadeia aberta.²⁷ Eles são capazes de se protonarem em solução, formando cátions poliamônio, que podem se ligar seletivamente a uma variedade de espécies inorgânicas, orgânicas e ânions biologicamente importantes. O tamanho de sua cavidade pode ser variado e, tanto grupos alquilas ou aromáticos podem ser incorporados ao macrocíclico, durante o processo de síntese, possibilitando a sua construção com diferentes densidades de carga e flexibilidade.²⁸⁻³²

1.2.1 Ligantes macrocíclicos poliaza e polioxoaza de bases de schiff

Macrocíclicos de bases de Schiff têm sido de grande importância. Eles estão entre os primeiros complexos metálicos artificiais dessa classe a serem sintetizados. Compostos contendo esses ligantes têm atraído grande atenção, porque eles podem ser usados como modelos para sistemas biológicos mais intrincados: metaloporfirinas (hemoglobina, mioglobina, citocromos, clorofila), corinas (vitamina B₁₂) e antibióticos (valinomicina, nonactina).³³ Estas descobertas ajudaram o desenvolver a química supramolecular e sua enorme diversidade.¹³ O reconhecimento seletivo e a incorporação de terras raras por essas estruturas tem sido objeto de grande importância para o crescente desenvolvimento desta área de estudo. A química peculiar, estrutural, espectroscópica e as propriedades magnéticas de íons lantanídeos trivalentes associada com sua configuração 4fⁿ fez essa serie química

muito adequada para o desenvolvimento de novas estruturas supramoleculares fascinantes, como: sensores e conversores de luz,^{34,35} agentes de contrastes em ressonância magnética de imagens,^{36,37} potenciais radiofármacos,³⁷ sensibilizadores em diagnósticos biomédicos, terapia fotodinâmica^{38,39} e nucleases artificiais para clivagem hidrolítica ou transesterificação de ligações fosfodiéster do RNA e DNA.^{40,41} Em todos esses casos o complexo metálico deve ser suficientemente estável *in vivo* e inerte para lançar o metal sob condições fisiológicas sem danos às células.³³

O reconhecimento da importância de complexos contendo ligantes macrocíclicos para a ciência supramolecular, química bioinorgânica, aplicações biomédica, separação e processos de encapsulação e também para a formação de compostos com estruturas e propriedades incomuns, tem levado a consideráveis esforços para o desenvolvimento de métodos e sínteses desses compostos. Muitas rotas sintéticas para ligantes macrocíclicos envolvem o uso de um íon metálico templatado para orientar grupos reacionais ou substratos lineares na conformação desejada para o fechamento do anel (Figura 3).³³

A síntese de ligantes macrocíclicos normalmente é mais difícil que a forma como aparece no papel. Contudo, químicos que trabalham com esses compostos têm usado várias estratégias e técnicas para minimizar essas dificuldades, tais como: altas diluições, uso de eficientes grupos protetores e abandonadores, uso de compostos que podem atuar como templatados e uso de solventes adequados (ou a ausência deles) no meio reacional.²⁴

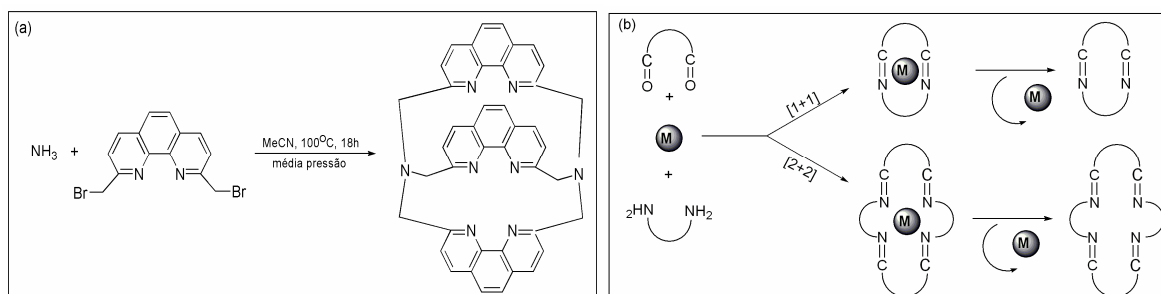


Figura 3. (a) Síntese de macrocíclico e (b) Síntese templatado de macrocíclico base de Schiff $[1+1]$ e $[2+2]$.

1.3 AMINOÁCIDOS PROTÉICOS

As análises de um grande número de proteínas obtidas de praticamente todas as fontes imagináveis têm mostrado que *todas as proteínas são constituídas por 20 aminoácidos*. Estas substâncias são conhecidas como α -aminoácidos, porque, com exceção da prolina, apresentam um grupo amino primário e um grupo carboxílico ligados ao mesmo átomo de carbono.⁴² (Figura 4; a prolina apresenta um grupo amino secundário)

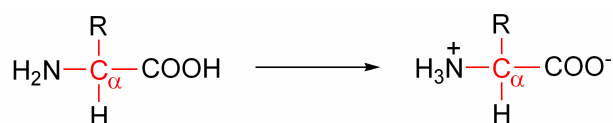


Figura 4. Fórmula estrutural geral para os α -aminoácidos e a forma zwitteriônica de α -aminoácidos que ocorrem em valores de pH fisiológico. Há 20 diferentes grupos R nos aminoácidos de ocorrência comum.

Os α -aminoácidos polimerizam, pelo menos conceitualmente, por meio da eliminação de uma molécula de água, conforme indicado na Figura 5. A ligação CO-NH resultante, que foi caracterizada independentemente, em 1902, por Emil Fisher e Franz Hofmeister, é conhecida como ligação peptídica. Compostos formados por dois, três, alguns poucos (4 -10) ou por muitos resíduos de aminoácidos (alternativamente denominados unidades peptídicas) são conhecidos, respectivamente, como dipeptídeos, tripeptídeos, oligopeptídeos e polipeptídeos. Essas substâncias, entretanto, com freqüência são denominadas simplesmente “peptídeos”. *Proteínas são moléculas que consistem de uma ou mais cadeias polipeptídicas*. Esses polipeptídeos apresentam um comprimento variável, indo de aproximadamente 40 a cerca de 33.000 resíduos de aminoácidos (embora poucos tenham mais de 1500 resíduos) e, uma vez que a massa média de um resíduo de aminoácido é aproximadamente 110 Da, apresentam massas moleculares que variam entre cerca de 4 a 3.600 kDa.⁴²

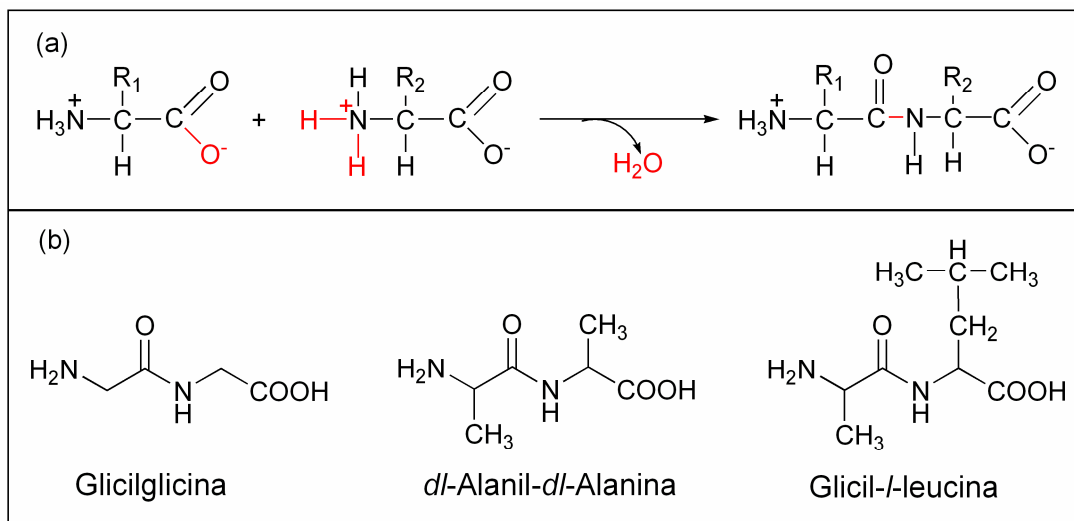


Figura 5. (a) Condensação de dois α -aminoácidos para formar um dipeptídeo. A ligação peptídica é mostrada em vermelho, (b) Dipeptídeos glicilglicina, *dl*-Alanil-*dl*-Alanina, Glicil-*L*-leucina.

Dependendo da seqüência de sua cadeia, os peptídeos coordenam-se de diversas maneiras com íons metálicos. Por exemplo, o dipeptídeo glicilglicina (Figura 5) tem dois grupos terminais coordenantes, além dos átomos de oxigênio e nitrogênio da ligação peptídica, sendo possível a coordenação tridentada. O oxigênio carbonílico da ligação peptídica é uma base muito fraca e pouco coordenante. Já o nitrogênio peptídico, só coordena após a remoção do próton, sem perder as características sp^2 . Em ambos os casos, a coordenação é estabilizada pelo fechamento do anel. Em virtude do grande número de grupos coordenantes, é comum a formação de complexos polinucleares.⁴³ Alguns íons de metais de transição estão envolvidos na atividade de dipeptídeos, por exemplo: Co(II) e Mn(II) são requeridos na atividade catalítica da glicilglicina dipeptidase.⁴⁴ Íons metálicos sozinhos catalisam reações hidrolíticas, que foram demonstradas através da hidrólise da glicilglicina catalisada pelo Co(II).⁴⁵

As vantagens do uso de enzimas para hidrolisar proteínas e peptídeos são várias: enzimas são específicas e quebram prontamente ligações que são resistentes à catálise não-específica, não são destrutivas, atuam rapidamente e podem teoricamente completar a hidrólise em minutos.⁴⁶

Peptidases (também chamadas de *proteases*, quando a hidrólise é de proteínas), são da família das enzimas, cuja função é catalisar a hidrólise de

ligações peptídicas. A hidrólise da ligação peptídica não é uma reação fácil. A velocidade não-enzimática da hidrólise em pH 7 e 25 °C é $8,2 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$ e corresponde a uma meia-vida de aproximadamente 106 anos.⁴⁶

Algumas peptidases hidrolisam o carbono terminal (*carboxipeptidases*), outras hidrolisam o grupo amino terminal (*aminopeptidases*) e algumas hidrolisam as ligações peptídicas interiores, dependendo onde o grupo (R) de cadeia lateral do aminoácido está. Aquelas que clivam as ligações peptídicas interiores são chamadas de *endopeptidases*, e aquelas que clivam as ligações terminais são chamadas de *exopeptidases*.⁴⁷ Existe um grande interesse no desenvolvimento de metalopeptidases sintéticas, complexos que poderiam ser úteis na elucidação da estrutura de proteínas em solução, assim como no sequenciamento de proteínas com grandes estruturas.⁴⁸ A hidrólise de proteínas e peptídeos tem sido estudada mais do ponto de vista bioquímico do que químico. Por causa da extrema estabilidade das ligações peptídicas, estudos mecanísticos e cinéticos têm sido feito quase exclusivamente com amidas, que são variavelmente ativadas por substituintes, por tensão no anel, forçando a não-planaridade ou aproximando grupos funcionais. Certas enzimas (peptidases), todavia, hidrolisam ligações amidas rapidamente e, uma vez que essas enzimas requerem íons metálicos para a sua atividade, reações de hidrólise têm recebido a atenção de químicos inorgânicos.^{28,50-52} A ligação amida é extremamente não-reativa, a constante de velocidade de pseudo-primeira-ordem da hidrólise de um tetrapeptídeo é de $3 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ e corresponde a uma vida-média de aproximadamente 7 anos.⁵³ Em outro estudo, usando técnicas diferentes, foi encontrado um valor entre 350 e 600 anos.⁵⁴ Em geral, a hidrólise catalisada ocorre através de um ataque nucleofílico intramolecular do OH^- sobre a carbonila da amida,⁵⁵ reforçado pela relação stereoquímica favorável entre o nucleófilo e a ligação amida.⁵⁶ Uma série de complexos de Ni(II),⁵⁶ Co(III),⁵⁷ Co(II),⁵⁸ Cu(II),⁵⁸ Zn(II),⁵⁹ Pd(II)⁶⁰ e Pt (II)⁶⁰ foram usados em estudos de mecanismos e reações intermediárias em hidrólises de peptídeos e amidas promovidas por metais.

Metaloenzimas ou enzimas ativadas por metais são classificadas de acordo com suas especificidades pelo substrato. Amino-peptidases apresentam especificidades pelo substrato $-\text{NH} - \text{CO} - \text{CHR} - \text{NH}_2$, a hidrólise ocorre no aminoácido N-terminal do substrato peptídico, e contém no seu centro ativo o íon metálico Zn(II). A Carboxipeptidase A (peptidyl-L-aminoacido hidrolase EC 3.4.17.1), CPA, é uma metaloexopeptidase de peso molecular 34472 Da contendo um íon

zinco como centro ativo ligado a uma cadeia polipeptídica simples de 307 resíduos de aminoácidos, apresenta especificidade pelo substrato $\text{OOC} - \text{CHR} - \text{NH} - \text{CO} -$, sua função biológica é a hidrólise do aminoácido C-terminal de substratos polipeptídicos, mostrando especificidade por substrato com cadeias laterais aromáticas.⁵²

1.4 NUCLEOTÍDEOS E ÁCIDOS NUCLÉICOS

1.4.1 Estrutura e propriedades

Os ácidos nucléicos são polímeros lineares muito longos constituídos de monômeros chamados nucleotídeos. Diferentes ácidos nucléicos podem ter desde 80 nucleotídeos, como em tRNA, até mais de 10^8 pares de nucleotídeos em um cromossomo eucariótico. A unidade de tamanho de um ácido nucléico é o par de bases (para espécies com fita dupla), geralmente abreviado pb, ou base (para espécies com fita simples). O cromossomo da *Escherichia coli* (*E. coli*) tem 4×10^6 , o que significa uma massa molar de 3×10^9 Da e um comprimento de 1,5 mm. Já o DNA genômico de uma única célula humana tem $3,9 \times 10^9$ pb e 990 mm de comprimento.⁴²

Os nucleotídeos são constituídos por uma base nitrogenada heterocíclica, uma pentose e um grupo fosfato, sendo que a molécula sem este grupo fosfato é chamada nucleosídeo (Figura 6)

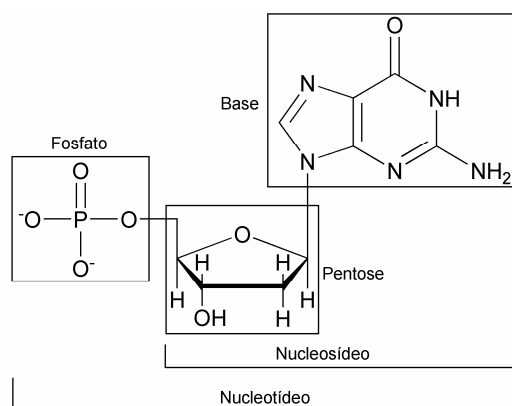


Figura 6. Representação da estrutura de nucleosídeos e nucleotídeos.

No DNA, as seqüências de bases contêm a informação genética, enquanto que o açúcar e o fosfato têm um papel estrutural. As bases nitrogenadas são derivadas de anéis de purina e pirimidinas. As principais purinas são adenina (A) e guanina (G), que são encontradas tanto no DNA como no RNA. Já as principais pirimidinas são: citosina (C), timina (T) e uracila (U). A primeira, sendo encontrada tanto no DNA como no RNA. A segunda, somente no DNA. E a terceira somente no RNA.

Os nucleotídeos são os ésteres de fosfato dos nucleosídeos. Os nucleotídeos podem conter um, dois ou três grupos fosfato, sendo chamados, respectivamente: de nucleosídeos mono, di e trifosfato. A molécula 5'-Trifosfato de adenosina (ATP) é um exemplo clássico (Figura 7).

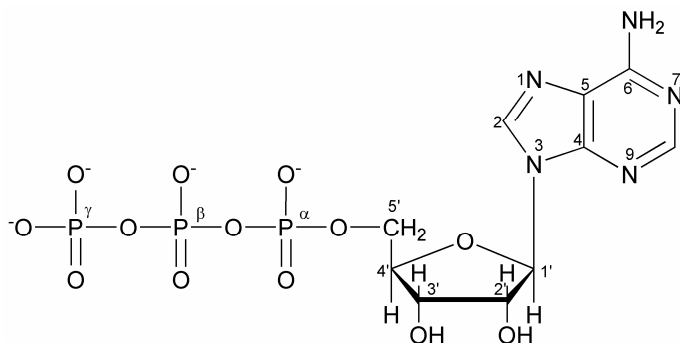


Figura 7. Estrutura química da molécula de ATP.

Os nucleotídeos que constituem as moléculas de DNA e RNA estão ligados covalentemente uns aos outros através dos grupos fosfatos. Esta ligação é formada pela junção do grupo 5'-fosfato de um nucleotídeo com o grupo 3'-OH de outro nucleotídeo, criando uma ligação fosfodiéster (Figura 8).

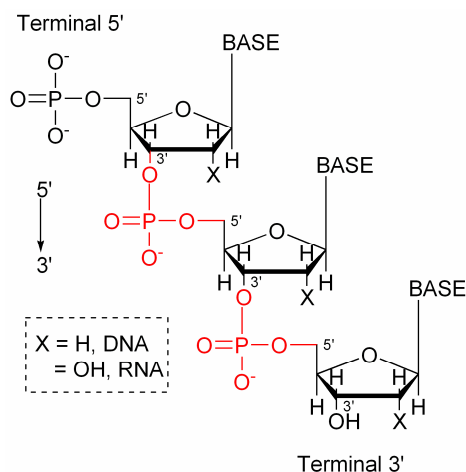


Figura 8. Estrutura da ligação fosfodiéster (em vermelho) unindo nucleosídeos de DNA e RNA.

Desta forma, o esqueleto covalente dos ácidos nucléicos é constituído por grupos fosfato e anéis de ribose de forma alternada. Todas as ligações fosfodiéster possuem a mesma orientação ao longo da cadeia, dando a cada fita do ácido nucléico linear uma polaridade específica e diferentes terminais 3' e 5' (3'-OH e 5'-OPO₃²⁻). Convencionalmente, as seqüências de nucleotídeos nas moléculas de DNA e RNA são descritas no sentido da extremidade 5'-OPO₃²⁻ para a extremidade 3'-OH (5'→3'), e correspondem a estrutura primária desses ácidos nucléicos.⁴²

1.4.2 Interações ácidos nucléicos – metais

Sabemos, através de experimentos descritos na literatura, que o papel desempenhado pelos íons metálicos nos processos *in vivo* e *in vitro*, envolvendo os ácidos nucléicos, na maioria dos casos, não têm sua função específica completamente elucidada. Podemos citar quatro papéis exercidos pelos íons metálicos nessas interações ácidos nucléicos - metais: estrutural, regulatório, farmacêutico e catalítico.⁶¹

- **Estrutural:** Os íons metálicos são requeridos para estabilizar a estrutura secundária dos ácidos desoxirribonucléicos. O DNA é uma cadeia polianiónica, em solução e em pH fisiológico, esta carga é devido aos grupamentos fosfatos. Assim, ele necessita de contra-íons para formalmente neutralizar a carga polianiónica do

seu esqueleto fosfodiéster, a fim de adotar uma estrutura compacta e estável. Estes contra-íons neutralizam parcialmente ou completamente as cargas negativas dos grupos fosfatos, para que as repulsões eletrostáticas não inutilizem outros efeitos estabilizadores. Assim, provavelmente uma das principais funções dos íons metálicos Na^+ , K^+ e Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , consiste em estabilizar a estrutura secundária do DNA através da interação com os grupos fosfatos por um processo conhecido pelo nome de condensação. Esta condensação leva à formação de um complexo do tipo lábil e não-específico, ao longo da parte exterior da dupla-hélice do DNA, na qual a cinética de associação e dissociação desse complexo é rápida.^{62,63}

- **Regulatório:** As proteínas metaloreguladoras atuam como estímulos, reprimindo ou ativando o processo de transcrição de acordo com a presença ou ausência do metal, considerando um sistema biológico que deve responder a mudanças na concentração de metal intracelular. Em altas concentrações, muitos metais se tornam tóxicos à célula. Para combater este efeito, um completo sistema de proteínas deverá ser sintetizado para quelar e desintoxicar o acúmulo de íon metálico ligado.⁶³

- **Farmacêutico:** A cisplatina⁶⁴ é o quimioterápico mais utilizado, porém um grande número de produtos farmacêuticos utilizados, como agentes que se ligam ao DNA, foram primeiramente isolados de produtos naturais provindo de bactérias, fungos e plantas. As bleomicinas estão entre os produtos naturais usados clinicamente como antibióticos e antitumorais que mais se destacam. Para a bleomicina clivar o DNA ela necessita de Fe^{2+} e oxigênio, ela se liga ao DNA e utilizando a química redox do oxigênio, associada com o sítio polipeptídico de ligação ao metal, catalisa a clivagem do esqueleto açúcar-fosfato.^{65,66}

- **Catalítico:** Os íons metálicos parecem ser essenciais para o funcionamento de várias enzimas que agem no DNA. O íon Zn^{2+} parece ser essencial para o funcionamento da RNA polimerase (responsável pela síntese do RNA) e da DNA topoisomerase, que catalisa a conversão de topoisômeros de DNA, promove a quebra transitória nas ligações fosfodiéster, gerando uma forma transitória, onde a proteína permanece ligada covalentemente ao DNA e permite que as fitas do DNA passem uma sobre a outra, alterando assim o superenovelamento da molécula. Os íons metálicos podem estar ainda em várias endonucleases e exonucleases, são cofatores essenciais, promovendo a hidrólise da ligação fosfodiéster.^{62,63}

1.5 HIDROLASES – NUCLEASES

Segundo a comissão de enzimas da União Internacional de Bioquímica, as principais classes de enzimas são: oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases.

As hidrolases são enzimas capazes de clivar hidroliticamente uma série de ligações químicas, como: amidas, ésteres, éteres, nitrilas, entre outras. São chamadas de nucleases as enzimas que catalisam a hidrólise das ligações fosfodiéster do DNA e RNA, por um fator de 10^{12} vezes relativo à reação não catalisada. As nucleases são também chamadas de fosfodiesterases. São enzimas que atuam sobre as moléculas do DNA e do RNA.⁶⁷ Ao grupo dessa nucleases específicas para o DNA, dá-se o nome de DNases (ou DNAases), e RNases (ou RNases) as específicas para o RNA.⁶⁷ Entre as suas funções destaca-se a de proteção do código genético, pois clivam partes mutantes do DNA que poderiam levar à multiplicação de células com atividades destoantes daquelas previstas. Constata-se que um grande número de nucleases apresenta atividade dependente da presença de íons metálicos. Atualmente, sabe-se que essa dependência está relacionada com a capacidade dos metais em: (a) formarem nucleófilos fortes (OH⁻) em condições suaves de pH; (b) atuarem como suporte para o substrato (grupo fosfato); (c) neutralizarem a carga do substrato; (d) ativarem as ligações de ésteres de fosfato; (e) estabilizarem o estado de transição.⁶⁷

A hidrólise do DNA é uma importante reação enzimática. Mas uma das mais difíceis de imitar no laboratório, por causa da estabilidade deste ácido nucléico à hidrólise.⁶⁸ A estabilidade excepcional das ligações fosfodiéster no DNA tem sido sugerida como uma das razões deste ácido nucléico conter o material genético na sua necessidade de preservá-lo intacto. A hidrólise das ligações fosfodiéster do DNA é impedida principalmente pela grande carga negativa que inibe o ataque dos nucleófilos no esqueleto do DNA.⁶⁹ Esta notável estabilidade hidrolítica necessita do uso de catalisadores enzimáticos - as nucleases - para que ocorra a quebra da fita deste esqueleto de ésteres de fosfato, *in vivo*. A meia-vida para a hidrólise das ligações fosfodiéster, quando extrapolada para as condições fisiológicas, é estimada em 1.000.000 de anos para o DNA, e 1.000 para o RNA.⁶⁷ É bom lembrar que existem grandes controvérsias nesta estimativa de meia-vida, encontrando-se citações que vão de 130.000 até quatro bilhões de anos. As constantes de primeira

ordem para a hidrólise das ligações fosfodiéster do DNA, em condições fisiológicas, têm sido estimadas em 6×10^{-9} e $6 \times 10^{-10} \text{ min}^{-1}$ para o DNA simples e dupla fita respectivamente.⁷⁰

A estrutura tridimensional do DNA foi resolvida e publicada por Watson e Crick há mais de 50 anos.⁷¹ Este trabalho foi um marco para a ciência. E foi a partir dele que se desenvolveram diversas áreas de pesquisas exploradas atualmente, entre elas: a biologia molecular, a clonagem e produção de organismos geneticamente modificados, a determinação da seqüência genômica de diferentes organismos e mais recentemente os estudos de proteômica. Neste trabalho foi proposto que o DNA é composto por duas cadeias polinucleotídicas, de sentidos opostos, enroladas em torno de um eixo, formando uma dupla hélice. Estas duas cadeias são mantidas unidas através de ligações de hidrogênio entre as bases de cada fita, mas sempre pareando uma adenina com uma timina e uma citosina com uma guanina (Figura 9).

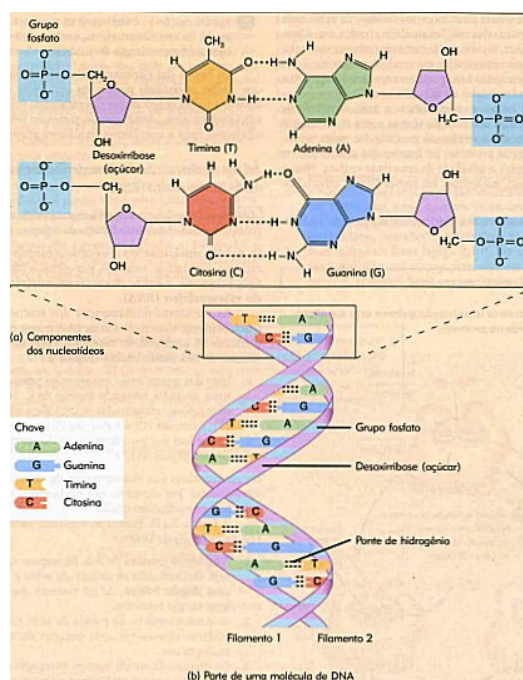


Figura 9. A dupla hélice proposta por Watson e Crick.

Os íons metálicos constituem os cofatores essenciais nas reações de muitas hidrolases. Porém, o papel específico do íon metálico no mecanismo hidrolítico não está ainda completamente elucidado. Por esse motivo, a esse grupo de nucleases

que possuem um ou mais íons metálicos dá-se o nome de metalonucleases ou metalohidrolases. Exemplos destas enzimas constituem as fosfatases ácidas púrpuras (PAPs), as fosfatases alcalinas (APs), a EcoRI, EcoRV, urease, dentre outras.⁷² As fosfatases ácidas púrpuras e alcalinas são também denominadas fosfohidrolases. Existe um grande número de metalohidrolases naturais. Porém, são poucas em que o mecanismo de como ocorre a hidrólise é conhecido. Muito do conhecimento do mecanismo enzimático da hidrólise do DNA provém de duas enzimas muito estudadas: a fosfatase ácida púrpura e a fosfatase alcalina.

As fosfatases alcalinas são assim denominadas porque sua faixa ótima de trabalho situa-se num pH próximo de oito. O seu sítio ativo envolve três átomos metálicos, sendo dois átomos de Zn^{2+} e um de Mg^{2+} . Já as fosfatases ácidas são assim chamadas porque sua região ótima de trabalho está entre pH 2 e 7, e são caracterizadas por sua intensa coloração púrpura. Elas podem ser encontradas em plantas, animais, fungos e bactérias.^{73,74}

Outra enzima da classe das hidrolases é a urease (EC 3.5.1.5) uma metaloenzima níquel-dependente que catalisa a hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono em conjunção como outras funções biológicas usando a uréia como fonte de nitrogênio.^{75,76} Essa foi a primeira metaloenzima extraída e cristalizada de feijões *Jack* por James B. Summer, em 1926, e é a única metalohidrolase que utiliza níquel.^{77,78}

A urease converte a uréia nos seus produtos a uma velocidade de pelo menos 10^{14} vezes mais rápida que a decomposição da uréia espontânea.⁷⁹ O mecanismo proposto para a hidrólise da uréia no sítio ativo da enzima envolve:(a) produção de um íon hidróxido no centro biníquel (II), (b) ativação do substrato pela coordenação de um ou ambos íons metálicos, e (c) ataque nucleofílico do íon hidróxido no carbono carbonílico do substrato, produzindo amônia e ácido carbâmico que se decompõe espontaneamente em pH fisiológico, dando uma segunda molécula de amônia e bicarbonato.⁸⁰ Os dois íons de níquel estão envolvidos na reação catalítica, Karplus and Hausinger sugeriram a coordenação do oxigênio carbonílico da uréia ao Ni(1), seguido pelo ataque nucleofílico de um íon hidróxido coordenado ao Ni(2). Em contraste, Ciurli e colaboradores propuseram que a uréia forma uma ponte entre os íons de níquel via oxigênio carbonílico e o grupo NH_2 da uréia. Eles sugerem que o ataque nucleofílico deva ocorrer via íon hidróxido ponte.^{81,82}

1.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR “ELECTROSPRAY” (ESI-MS) APLICADA AO ESTUDO DE ESPÉCIES INORGÂNICAS

Um espectrômetro de massas pode ser entendido, via de regra, como um instrumento contendo uma fonte de íons, um separador ou filtro de massas – na realidade, massa/carga (m/z) – e um detector. Embora existam várias estratégias para separação e detecção, a etapa de ionização é aquela com o maior número de diferentes estratégias. Isso se deve à grande variedade de tipos de amostras e espécies de interesse. Amostras sólidas, líquidas ou gasosas contendo espécies voláteis ou não, e com interesses voltados desde a análise elementar até a composição de proteínas, requerem diferentes processos de ionização. Uma vez gerados os íons, os processos de separação e detecção podem ser escolhidos de acordo com as características mais ou menos comuns como sensibilidade, resolução e precisão de m/z e custo. Neste contexto, surgiu a ionização por “eletrospray”, como uma alternativa para geração de íons de espécies pouco voláteis presentes em fase líquida.⁸³

Embora seja normalmente considerada como uma fonte de ionização, o “electrospray” é, na realidade, um processo de transferência de íons pré-existentes em solução para a fase gasosa. Pode-se dizer que a efetiva ionização (transformação de uma espécie neutra em íon) é um efeito secundário. De qualquer forma, é fácil entender porque uma técnica que permite a transferência de íons de uma solução para a fase gasosa para análise por espectrometria de massas, em tão pouco tempo, teve um impulso tão grande: (de 1980 a 2000, o número aproximado de artigos publicados usando “electrospray” passou de 100 para 7800). Isto se deve ao fato da maioria dos processos químicos e bioquímicos ocorrerem em fase líquida, envolvendo, muitas vezes, espécies pouco voláteis.⁸³

O “electrospray” foi sugerido como um possível modo de ionização para espectrometria de massas, por Dole, em 1968.⁸⁴ No entanto, seus experimentos não foram convincentes, pois estes visavam à análise de espécies poliméricas, como poliestireno que não estão ionizados em solução. Foi somente em 1984 que Yamashita e Fenn demonstraram a aplicabilidade da fonte de “eletrospray” como um método de ionização branda.^{85,86}

Métodos de ionização anteriores ao “electrospray”, nos quais íons são transferidos da fase líquida para a fase gasosa, tal como bombardeamento de

átomos rápido (FAB) ou dessorção por plasma, provocam não só a dessolvatação dos íons, mas, muitas vezes, sua fragmentação e formação de íons a partir de moléculas neutras. Isto se deve ao fato de que, nestas técnicas, uma grande quantidade de energia é fornecida de forma localizada e em um curto período de tempo. A principal vantagem do “electrospray” sobre estas outras técnicas é que a dessolvatação ocorre gradualmente em temperaturas relativamente baixas (tipicamente, de temperatura ambiente até 80 °C), de forma a não gerar fragmentos nem moléculas ionizadas. Assim, muitos íons gerados na fase gasosa mantêm exatamente a mesma estrutura e carga das espécies em solução, o que é perfeito para análise de espécies não-voláteis e para estudos de especiação.⁸³ No entanto isso não ocorre para todas as espécies. Muitas vezes, uma espécie com carga maior ou igual a dois está estabilizada devido à camada de solvatação. À medida que a espécie é dessolvatada, tende a se envolver em processos que levem à redução de sua carga. Além disto, espécies neutras podem ser ionizadas por processos eletrolíticos na fase líquida, formação de agregados iônicos durante o processo de “eletrospray” e por dissociação induzida por colisão (CID) já na fase gasosa. A preservação ou não dos íons originais está intimamente ligada ao processo de ionização por eletrospray.⁸⁵

A ionização por “eletrospray” envolve a formação de um “spray” eletrostático, a partir do qual são geradas pequenas gotas carregadas. E destas, são liberados os íons. A implementação de uma fonte de “eletrospray” é relativamente simples, comparando-se com outras fontes para espectrometria de massas.⁸⁵ É necessária uma fonte de alta tensão (1000 a 7000 V) que esteja em contato com a solução, e que seja bombeada através de um capilar com uma vazão inferior a 10µL/min. O processo é chamado de “nanoeletrospray”.

A Figura 10 mostra uma representação esquemática da fonte de “eletrospray” de um espectrômetro Platform II (Micromass, Inglaterra). Toda a região da fonte está à pressão atmosférica. Quando um potencial positivo, por exemplo, é aplicado na solução, os íons positivos tendem a se afastar para uma região menos positiva, isto é, em direção ao contra-eletródo. Assim, a gota sendo formada na ponta do capilar, estará enriquecida em íons positivos. Este tipo de separação é chamado de processo eletroforético. Conforme a densidade de carga aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o contra-eletródo aumenta, provocando a

deformação da gota. A gota ganha a forma de um cone que é denominado cone de Taylor.⁸³

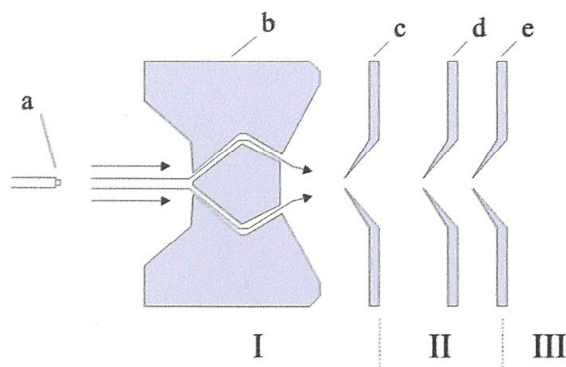


Figura 10. Representação esquemática da fonte do “eletrospray”: a-capilar, b-contra-eletródo, c-cone de amostra, d-skimmer, e-lentes do skimmer. A região I está sob pressão atmosférica, a região II, sob pressão intermediária e a região III, sob alto vácuo.

Esta gota na forma de cone permanece “presa” ao capilar até o momento em que a densidade de carga na superfície da gota e o aumento da repulsão entre os íons vençam a tensão superficial do líquido, ocorrendo então a liberação de pequenas gotas com alta densidade de carga. A frequência deste processo depende da magnitude do campo elétrico, da tensão superficial do solvente e da condutividade da solução.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar em solução a interação (reconhecimento molecular) entre complexos homobinucleares e moléculas de interesse biológico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✚ Síntese e caracterização dos ligantes macrocíclicos BDBPH e BMXD
- ✚ Estudos de equilíbrio de associação dos sistemas BDBPH-Zn(II)-dipeptídeos (Glicilglicina (GG), *dl*-Alanil-*dl*-Alanina (AA), Glicil-Leucina (GL)), BMXD-Cu(II)-dipeptídeos (GG, AA, GL) e BDBPH-Fe(II)-ATP (5' Trifosfato de adenosina).
- ✚ Caracterização estrutural em solução dos complexos $[\text{Fe}_2(\text{HPCINOL})_2(\text{SO}_4)_2(\mu\text{-O})]$ **1** e $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{OAc})](\text{ClO}_4)$ **2** sozinhos e associados a glicilglicina e ATP.
- ✚ Estudos de espectrometria de massa por eletrospray dos sistemas BDBPH-Zn^{II}-(GG, AA), BDBPH-Fe^{III}-ATP e dos complexos **1** e **2**.
- ✚ Determinar a capacidade dos complexos estudados de clivar moléculas de DNA.
- ✚ Estudos de química computacional para determinar teoricamente a estrutura mais provável dos sistemas estudados em solução.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

3.1.1 Materiais

Os seguintes reagentes, materiais, gases e solventes empregados nas sínteses e análises, foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia: glicilglicina, *dl*-alanil-*dl*-alanina, glicil-*l*-leucina, *p*-cresol, dietilenotriamina, paraformaldeído, hexametilenotretamina, paládio/carbono 5%, ácido clorídrico 37%, sulfato de sódio anidro P.A., argônio, clorofórmio deuterado, água deuterada, cloreto de potássio, cloreto de cobre(II), cloreto de ferro (III) hexahidratado, nitrato de zinco(II) hexahidratado, KOH isento de CO₂, Ftalato ácido de potássio, fenolftaleína, tampões biológicos PIPES, MES, HEPES, CHES, etanol absoluto, metanol PA, clorofórmio, isoftalaldeído. O composto tiocianato de chumbo foi preparado a partir do nitrato de chumbo e tiocianato de potássio. O composto 2,6-diformil-*p*-cresol foi sintetizado, purificado e caracterizado de acordo com procedimentos descritos na literatura.^{88,89}

3.1.2 Complexos metálicos em estudo

Neste trabalho foram usados dois novos complexos com estruturas cristalinas resolvidas por raios - X: um binuclear de ferro(III), [Fe₂(BPCINOL)₂(SO₄)₂(μ-O)] **1** e outro, binuclear de níquel (II), [Ni₂(HBPCINOL)₂(OAc)](ClO₄) **2**.⁹⁰ Estes complexos foram sintetizados no Laboratório de Ciências Químicas e cedidos para este estudo pelos professores Adolfo Horn Jr. e Christiane Fernandes, da Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF.

3.1.2.1 $[\text{Fe}_2(\text{BPCINOL})_2(\text{SO}_4)_2(\mu\text{-O})]$ (**1**)

O complexo binuclear de ferro $[\text{Fe}_2(\text{HPCINOL})_2(\text{SO}_4)_2(\mu\text{-O})]$ **1**, foi obtido a partir do ligante HPCINOL (1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloro-propan-2-ol), e sua estrutura determinada através da cristalografia de raios X (Figura 11).¹³⁰

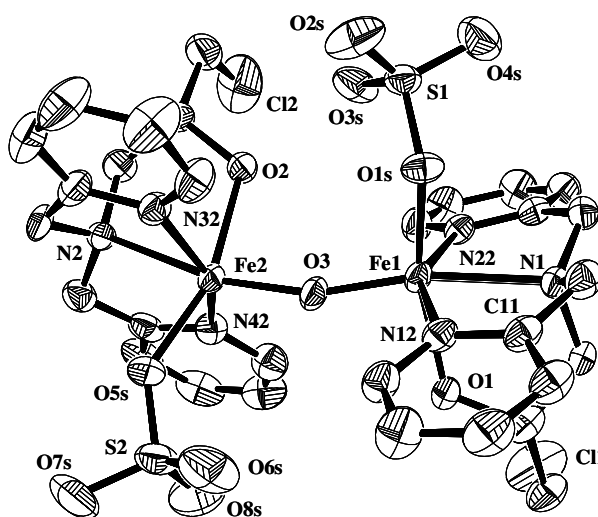


Figura 11. Ortep¹²⁶ do complexo $[\text{Fe}_2(\text{HPCINOL})_2(\text{SO}_4)_2(\mu\text{-O})]$ (**1**).

O complexo **1** apresenta uma estrutura centrossimétrica, composta por dois átomos de ferro (III) hexacoordenados, unidos por uma ponte *oxo* ($\mu\text{-O}$). Cada um dos ligantes coordena-se terminalmente a um dos íons de Fe(III) através do oxigênio alcoólico, do nitrogênio amínico, de dois nitrogênios piridínicos e do oxigênio do sulfato, proveniente do sal de ferro $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ utilizado na síntese do complexo. Este complexo está sendo estudado como modelo das fosfatases ácidas púrpuras (PAPs).

3.1.2.2 $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{OAc})](\text{ClO}_4)$ (**2**)

O complexo binuclear de níquel $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{OAc})](\text{ClO}_4)$ **2**, foi obtido a partir do ligante $\text{H}_2\text{BPCINOL}$ N-(2-hidroxibenzil)-N-(2piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina, e sua estrutura determinada através da cristalografia de raios X (Figura 12).⁹⁰

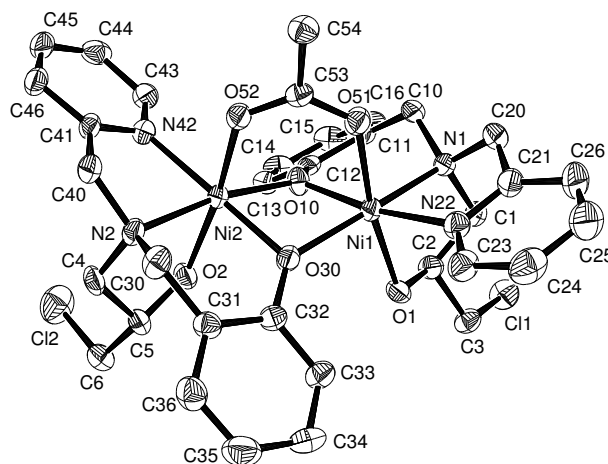


Figura 12. Ortep¹²⁶ do cátion $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{OAc})]^+$ (**2**)

O estrutura cristalina de **2** revela que o complexo consiste de um cátion binuclear de níquel contendo um perclorato como contra-íon. Cada íon Ni(II) está coordenado a dois nitrogênios (amínico e piridínico) e quatro oxigênios (fenolato, álcool e acetato), resultando em um mesmo ambiente de coordenação para ambos centros metálicos. Cada centro de Ni(II) está hexa coordenado com uma geometria octaédrica distorcida, e unidos por duas pontes fenolato e uma ponte acetato. Na síntese do composto **2** além do ligante $\text{H}_2\text{BPCINOL}$ foi utilizado o perclorato de níquel ($[\text{Ni}(\text{OH}_2)_6](\text{ClO}_4)]$) e o acetato de sódio na proporção 1:1:6.⁹⁰

3.2 MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

3.2.1 Análise elementar de C, H e N.

As medidas para a determinação dos percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas em analisador elementar de CHNS – Carlo Erba modelo E-1110, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC.

3.2.2 Espectroscopia no infravermelho – IV

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR 1600 com sistema de registro computadorizado, na região de 4000 a 400 cm^{-1} , na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC. As amostras foram analisadas em pastilhas de KBr.

3.2.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio RMN ^1H

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker-FT 200 MHz, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ ppm) e água e clorofórmio deuterados como solvente.

3.2.4 Titulação espectrofométrica

Os espectros UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo Lambda-19 no Laboratório de Físico-Química Orgânica, Departamento de Química – UFSC. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com capacidade para 4 mL e 1 cm de caminho óptico a $25,00 \pm 0,1$ °C. Uma série de soluções contendo concentrações apropriadas de KOH e KCl (onde $[\text{KOH}] + [\text{KCl}] = 0,100$ M) e com 0,100 mM do ligante foram medidas entre 200 e 400 nm.⁹²

3.2.5 Titulação potenciométrica

A técnica de titulação potenciométrica é muito empregada para estudos de medidas de equilíbrio de complexos metálicos em solução, podendo-se usar o eletrodo de vidro, muito preciso nas medidas de concentração de íons hidrogênio. Nesse tipo de titulação, adiciona-se uma base padronizada, em incrementos de volume conhecidos, a um sistema contendo um ligante conhecido na ausência ou na presença de uma quantidade também conhecida de íon metálico. A potenciometria não fornece informações microscópicas envolvendo a identificação de protonação e sítios de coordenação com o metal no ligante. Para essa informação são necessárias medidas espectroscópicas como estudo de absorbâncias espectrofotométricas ou ressonância magnética nuclear.⁹³

Os experimentos foram realizados em sistema totalmente aquoso e em sistema misto etanol/água (70/30% v/v) devido à baixa solubilidade de alguns compostos em água. Cada sistema em consideração foi estudado em uma célula termostatizada a $25,00 \pm 0,05$ °C refrigerada mecanicamente por um banho de circulação termostatizado (Microquímica Ind. Com. Ltda), usando um pHmetro Corning 350 acoplado a um eletrodo de vidro e outro de referência do tipo Ag-AgCl, calibrados na célula com soluções diluídas de HCl para leitura direta de pH ($\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$). As medidas foram feitas com soluções contendo 0,05 mmol de ligante, complexo ou sistema ternário (ligante + metal + substrato) em 50 mL de solução e a força iônica ajustada para $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ com KCl, sob fluxo de argônio para eliminar a presença de CO_2 atmosférico. As soluções foram preparadas com água (bidestilada previamente na presença de KMnO_4 e fervida) para os sistema aquosos e para os sistemas misto etanol/água (70/30% v/v). As soluções dos dipeptídeos e do complexo binuclear de níquel tiveram o pH ajustado para próximo de 3, pela adição de HCl $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$. Para as titulações foi utilizada uma solução padrão de KOH isenta de CO_2 (J. T. Baker) com a adição de aliquotas de 0,50 mL até $\text{pH} \approx 12$ com o auxílio de uma bureta Schott Geräte modelo T80/20. A base KOH utilizada foi padronizada com ftalato ácido de potássio PA, seco previamente por duas horas, a 110 °C, usando como indicador fenolftaleína solução 1% em etanol. As adições sucessivas de base foram realizadas após a obtenção de valores constantes de pH. O pK_w da água contendo $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl utilizado para os cálculos foi de 13,78 e para a solução etanol/água 70:30% v/v contendo $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ foi de 14,87.⁹⁴

No arquivo de entrada para o cálculo das constantes de estabilidade dos sistemas em estudo, envolvendo metal, necessita-se fornecer as constantes de hidrólise do metal. Foram utilizados valores calculados para as condições experimentais deste trabalho, conforme Baes.⁹⁵ As soluções metálicas utilizadas nas titulações dos metais Zn(II), Cu(II) e Fe(III) foram preparadas a partir de sais metálicos comerciais e padronizadas por titulação com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético).⁹⁶ Na solução de metais trivalentes, adiciona-se ácido clorídrico para evitar a hidrólise, o excesso de ácido foi determinado pelo método de Gran's.⁹⁷

As titulações foram realizadas em triplicata e os valores apresentados referem-se à média dos experimentos. As constantes foram calculadas com o programa BEST7 e os diagramas de distribuição de espécies presentes em solução, em função do pH, foram obtidos com os programas, SPE, SPEPLOT e SPECIES.^{94,98} O programa BEST7 utiliza curvas de titulação para determinar as constantes de estabilidade e/ou as constantes de protonação dos ligantes e complexos, bem como a correta concentração do ligante (peso molecular experimental) utilizado. A entrada de dados para o programa, consiste em fornecer o número de milimoles de cada componente, as constantes de equilíbrio inicialmente estimadas de cada espécie que pode ser formada a partir dos componentes da solução, e o perfil de pH determinado experimentalmente *versus* a composição da solução (KOH adicionado). O programa emprega equações de balanço de massa para todas as espécies presentes a cada incremento de base adicionada e resolve a concentração de cada espécie presente. As espécies sugeridas são aquelas adquiridas ou observadas a partir de evidências espectrofotométricas e que podem ser justificadas com base em princípios estabelecidos na química de coordenação em solução. Convencionalmente, este programa emprega constantes globais de protonação e de formação de complexos metálicos, designadas por β .

Nos cálculos deve-se sempre buscar a minimização do desvio padrão (ajuste σ) do sistema, entre os valores experimentais de pH encontrados na titulação e os calculados. O desvio padrão é calculado como um fator de peso de modo a aumentar a sensibilidade dos cálculos computacionais nas regiões de tamponamento do sistema e diminuir a importância das inflexões.⁹⁸

3.2.6 Espectrometria de massas por “Eletrospray” (ESI-MS)

Os espectros de massa foram feitos no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - LNLS em um espectrômetro de massas Q-ToF última API (Waters/Micromass). A técnica de ionização utilizada foi a ionização por “eletrospray” no modo positivo (ESI (+)-MS). Foram feitos também espectros de massas em *tandem* (ESI-MS/MS), dois espectrômetros de massas acoplados em série. O primeiro funciona para selecionar e separar o íon de interesse dos outros íons, e também de quaisquer contaminantes que estejam presentes. As condições de análises foram: temperatura da fonte de 70-100 °C, temperatura de desolvatação de 100 °C, voltagem do capilar de 3,5 kV e voltagem do cone variando de 40 a 100 V. O aparelho foi calibrado usando como padrão o ácido fórmico. As soluções dos ligantes macrocíclicos e seus complexos foram preparadas em solução aquosa com tampões biológicos (PIPES, MES, CHES, HEPES), mas ao serem injetados no aparelho, eram diluídos em solução de água, acetonitrila e ácido fórmico (50:49,9:0,1). Os complexos binucleares de níquel e ferro foram diluídos em metanol/água (1:1 v/v). As amostras foram injetadas usando uma seringa (Hamilton) a uma velocidade de fluxo de 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Os espectros de massa foram adquiridos numa faixa de 100 a 1500 m/z . Os dados foram analisados usando o software MassLynx[®] 4.0.

3.2.7 Interação com o DNA

Estudos de reatividade dos complexos na clivagem do DNA foram realizados em colaboração com o doutorando Claus Pich sob a supervisão do Prof. Hernán Terenzi, do Laboratório de Expressão Gênica do Departamento de Bioquímica – UFSC.

Estes estudos foram realizados com o DNA plasmidial pBluescript[®] II SK(+) (pBSK-II). Plasmídios são pequenas moléculas circulares de DNA fita dupla (em geral alguns milhares de pares de bases), extracromossomais e replicados independentemente do cromossomo, presentes (uma ou mais cópias) em muitas bactérias, mas também encontrados em alguns organismos eucarióticos unicelulares como leveduras e outros fungos.⁴² A extração do DNA plasmidial foi realizada com o

kit comercial HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit, QIAGEN.¹²⁹ Foram preparadas soluções com um volume final de 20 μL . Estas soluções continham 330 ng do plasmídeo pBSK-II superenovelado (que corresponde a uma concentração de DNA de $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e diferentes concentrações do composto analisado ($1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ a $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$). O estudo foi feito nos pH's 6,0 e 7,0 (tampão PIPES $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$), 8,0 (tampão HEPES $5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) e 9,0 (tampão CHES $5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$). O efeito de captadores (DMSO, $4,0 \cdot 10^{-1} \text{ M}$) e de geradores de radicais hidroxila ($\text{Fe}(\text{EDTA})^{2-}$, $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) foi testado na presença do composto analisado sob as mesmas condições descritas acima.

Com a finalidade de avaliar a influência do oxigênio (O_2) nas reações de clivagem estudou-se a clivagem anaeróbica do DNA em atmosfera de argônio, conforme trabalho descrito na literatura.¹⁰⁴ As amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 0,8% a 100 V por 1 hora, reveladas com brometo de etídio, scaneadas e quantificadas com o software LabWorks™ 4.0, DigiDoc.It System (UVP).

3.2.8 Cálculos computacionais

Os cálculos da otimização da geometria foram feitos com a Teoria do Funcional Densidade (DFT - *Density Functional Theory*), o método utilizado foi o B3LYP,⁹⁹ a escolha das bases (*basis set*) foi diferente para os ligantes, substratos e complexos. Isto se deve ao custo computacional que os complexos apresentam.

Para os ligantes (BMXD e BDBPH) e substratos (GG, AA, GL e ATP), suas geometrias foram determinadas com o conjunto de bases 6-31+G(d,p) que oferece uma melhor descrição da estrutura eletrônica, e pelo custo computacional neste caso ser menos dispendioso.¹⁰⁰ Somente no caso do ATP otimizamos sua geometria pelo método de mecânica molecular AMBER (apropriado para nucleotídeos), devido à elevada carga negativa e os átomos de fósforo.

Para os compostos de coordenação, os cálculos de otimização de geometria e energia foram realizados usando o conjunto de bases LANL2DZ¹⁰⁰ que usa a base D95 (*Dunning/Huzinaga full double zeta*) sobre os átomos de H, C, N, O¹⁰¹ e usa “*Los Alamos ECP plus DZ*” sobre os átomos de metais de transição (nos casos estudados Fe, Cu e Zn).¹⁰² Foram estudados três sistemas inorgânicos diferentes:

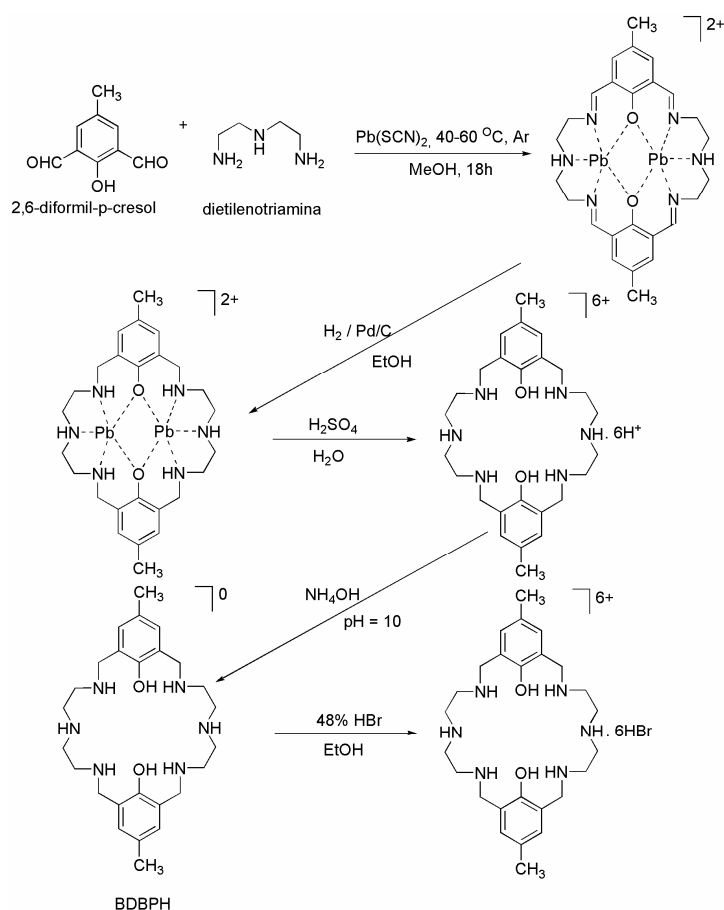
O primeiro foi o sistema $[(\text{BMXD})\text{Cu}_2\text{-GG}]^{3+}$ sendo a espécie mais ativa no estudo cinético de hidrólise da GG e que representa a interação e reconhecimento da GG pelo $[(\text{BMXD})\text{Cu}_2]^{4+}$ no pH mais apropriado para ocorrer à reação de hidrólise.¹⁰³

O segundo é o sistema $[(\text{BDBPH})\text{Zn}_2\text{-GG}]^{1+}$ que representa a espécie mais provável no reconhecimento molecular da GG pelo composto $[(\text{BDBPH})\text{Zn}_2]^{2+}$.

E o terceiro é o sistema binuclear $[\text{Fe}_2(\text{HPCINOL})_2(\text{O})(\text{SO}_4)_2]$ que possui estrutura cristalográfica resolvida por raio X. Foram realizados dois cálculos de energia nesse caso. Ambos usaram as coordenadas tridimensionais experimentais. O primeiro caso com o máximo de emparelhamento dos elétrons, resultando em uma configuração triplete, e um segundo caso com o máximo desemparelhamento dos elétrons, resultando em uma multiplicidade de spin 11. Os cálculos foram feitos com o programa Gaussian 98 (Gaussian, Inc.).

3.3 SÍNTESE DOS LIGANTES MACROCÍCLICOS

3.3.1 Síntese do 3,6,9,17,20,23-hexaaza-29-30-dihidroxi-13,27-dimetil triciclo [23,3,1,1^{11,15}] triaconta -1(28),11,13,15(30),25,26-hexaene – **BDBPH**



Esquema 2. Rota sintética do BDBPH

O ligante BDBPH foi sintetizado de acordo com modificações na rota encontrada na literatura.²⁸ O 2,6-diformil-*p*-cresol foi sintetizado e purificado de acordo com o método descrito na literatura.^{88,89} A mistura de 1,32 g de 2,6-diformil-*p*-cresol (8 mmol; 164,16 g.mol⁻¹) e 2,70 g de $\text{Pb}(\text{SCN})_2$ (8 mmol; 323,34 g.mol⁻¹) em 400 mL de metanol foi aquecida (40-60 °C) até a maior parte do $\text{Pb}(\text{SCN})_2$ ter sido dissolvido. Então, 0,83 g de dietilenotriamina (8 mmol; 103,75 g.mol⁻¹) em 80 mL de metanol foi adicionado lentamente, sob gotejamento, por 4 horas ou mais. A mistura, sob agitação, foi aquecida (40-60 °C) por 18h. Após ser resfriada à temperatura

ambiente, o precipitado amarelo foi filtrado e lavado com metanol e clorofórmio. O precipitado amarelo foi solubilizado em etanol, e em seguida transferiu-se esta solução para um recipiente apropriado, contendo 1,0 g de paládio/carbono 5%, que ficou sob agitação e em atmosfera de hidrogênio a 40 psi durante 20h. O filtrado foi diluído com 200 mL de água e acidificado com H₂SO₄ 8M frio. O precipitado de PbSO₄ formado foi filtrado e a solução resultante, em um banho de gelo, foi basificada com amônia concentrada até pH 10. Após extração com clorofórmio (2 x 200mL) a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro por 24h. A solução foi filtrada e o solvente evaporado até a secura sob vácuo, a 40 °C, resultando em um óleo, na forma de espuma, amarelo escuro, o qual que foi deixado sob vácuo (0,1 mmHg) por 3 horas. Obtiveram-se 1,5 g do ligante BDBPH (3,2 mmol; 470,26 g.mol⁻¹), com rendimento de 90%. P.F.: 159-160 °C. O ligante foi caracterizado por CHN, IV, RMN ¹H e ESI/MS.

Análise elementar de CHN calculada para C₂₆H₄₂N₆O₂; C, 67,83; H, 8,98; N, 18,06%. encontrado C, 67.18; H, 9.10; N, 17.89 %.

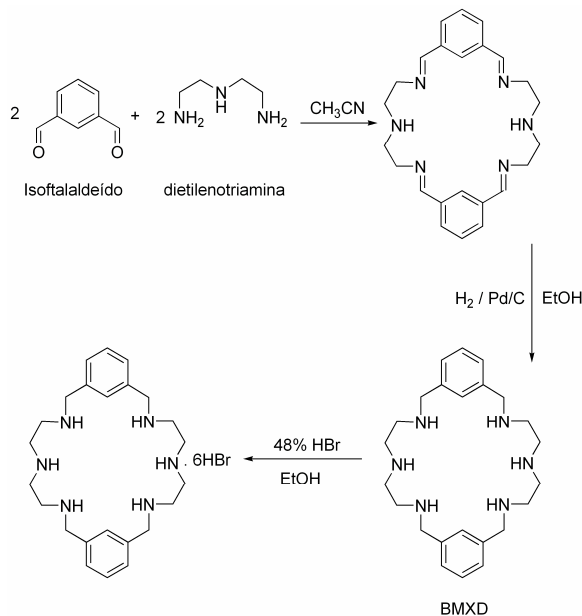
IV (KBr), em cm⁻¹:ν(O-H_{fenol}) 3470, ν(N-H) 3244, ν(C-O) 1401, δ(C-H_{ar}) 770.

RMN ¹H - δ_H (200 MHz, em CDCl₃), em ppm: 2,19 (s, 6H, 2 x CH_{3ar}); 2,70 (s, 16H, 4 x CH₂CH₂), 3.80 (s, 8H, 4 x CH_{2ar}), 4,12 (s, 6H, 6 x NH), 6,72 (s, 4H, 4 x ArH_{ar}), 7.50 (s, 2H, 2 x OH_{ar}).

ESI/MS, *m/z* 471 ([M + H]⁺)

Para os trabalhos potenciométricos fez-se um sal de bromo; o produto obtido (1,5 g de BDBPH) foi dissolvido em 50 mL de etanol e 10 mL de HBr 48% em 20 mL de etanol foi adicionado, lentamente, até o precipitado se formar. O precipitado foi filtrado e seco a 60 °C por 3 h, dando um produto amarelo, quebradiço, de sal hexabrometo. RMN ¹H - δ_H (200 MHz em D₂O), em ppm: 2,13 (s, 6H, 2 x CH_{3ar}), 3,35 (q, 16H, etileno), 4,21 (s, 8H, 4 x CH_{2ar}), 7,16 (s, 4H).

3.3.2 Síntese do 3,6,9,17,20,23-hexaazatriciclo [23.3.1.1^{11,15}]-triaconta-1(29), 11(30),12,14,25(26),27 hexaene - **BMXD**



Esquema 3. Rota sintética do BMXD.

O ligante BMXD foi sintetizado de acordo com modificações na rota encontrada na literatura.²⁹ A 2,012 g de isoftalaldeído (15 mmol, 143,08 g.mol⁻¹), solubilizado em 250 mL de MeCN, foi adicionado lentamente, sob gotejamento, por 2 horas ou mais, 1,62 mL de dietilenotriamina (15 mmol; 103,75 g.mol⁻¹) solubilizado em 400 mL de MeCN. O precipitado branco formado (base de Schiff) foi solubilizado em solução CH₂Cl₂/MeCN (1:1) e deixado por 12 h para precipitação do produto. O sólido branco formado foi então filtrado obtendo-se 2,18 g (5,44 mmol, 402,30 g.mol⁻¹), com rendimento de 71%.

Análise elementar de CHN calculada para C₂₄H₃₀N₆; C, 71,64; H, 7,45; N, 20,89 %. encontrado C, 72,01; H, 7,50; N, 20,92 %.

O precipitado branco foi solubilizado em etanol, e em seguida transferiu-se esta solução para um recipiente apropriado, contendo 1,0 g de paládio/carbono 5%, que ficou sob agitação e em atmosfera de hidrogênio a 40 psi durante 18h. O solvente foi seco em rotaevaporador e o produto foi extraído com diclorometano de uma solução aquosa (CH₂Cl₂/H₂O = 120 mL/10 mL). O solvente foi seco em rotaevaporador. Ao óleo amarelo claro restante, foi adicionado 3 mL de HBr 48%. O precipitado foi

solubilizado na mistura H₂O / MeOH (25 mL / 125 mL) e levou-se esta solução ao freezer onde, após 48 horas, houve a precipitação do ligante na forma de cristais incolores. Obtiveram-se 2,10 g (2,30 mmol 895,7 g.mol⁻¹) com rendimento de 66%. O ligante foi caracterizado por CHN, RMN ¹H, RMN ¹³C e ESI/MS.

Análise elementar de CHN calculada para C₂₄H₃₈N₆.6HBr; C, 32,18; H, 4,91; N, 9,38 %. encontrado C, 32,01; H, 4,87; N, 9,32 %.

RMN ¹H - δ_H (200 MHz em D₂O), em ppm: 3,14 (m, 12H, 6 x CH₂), 4,23 (s, 8H, 4 x CH_{2ar}), 7,42 (s, 3H), 7,51 (s, 1H)

RMN ¹³C - δ_H (200 MHz em CDCl₃ com NaOD suficiente para solubilizar a mostra), em ppm: 41,95 e 43,80 (CH₂), 50,96 (ArCH₂), 130,50, 130,61, 130,83 e 132,02 (4 carbonos aromáticos não equivalentes)

ESI/MS, *m/z* 417 ([M + H⁺]⁺)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os estudos de: equilíbrio potenciométrico, de espectrometria de massas por eletrospray, computacionais e de interação com o DNA. A Figura 13 contém as representações dos ligantes e compostos (substratos) utilizados e as Figura 14 e Figura 15 contém a representação dos complexos utilizados.

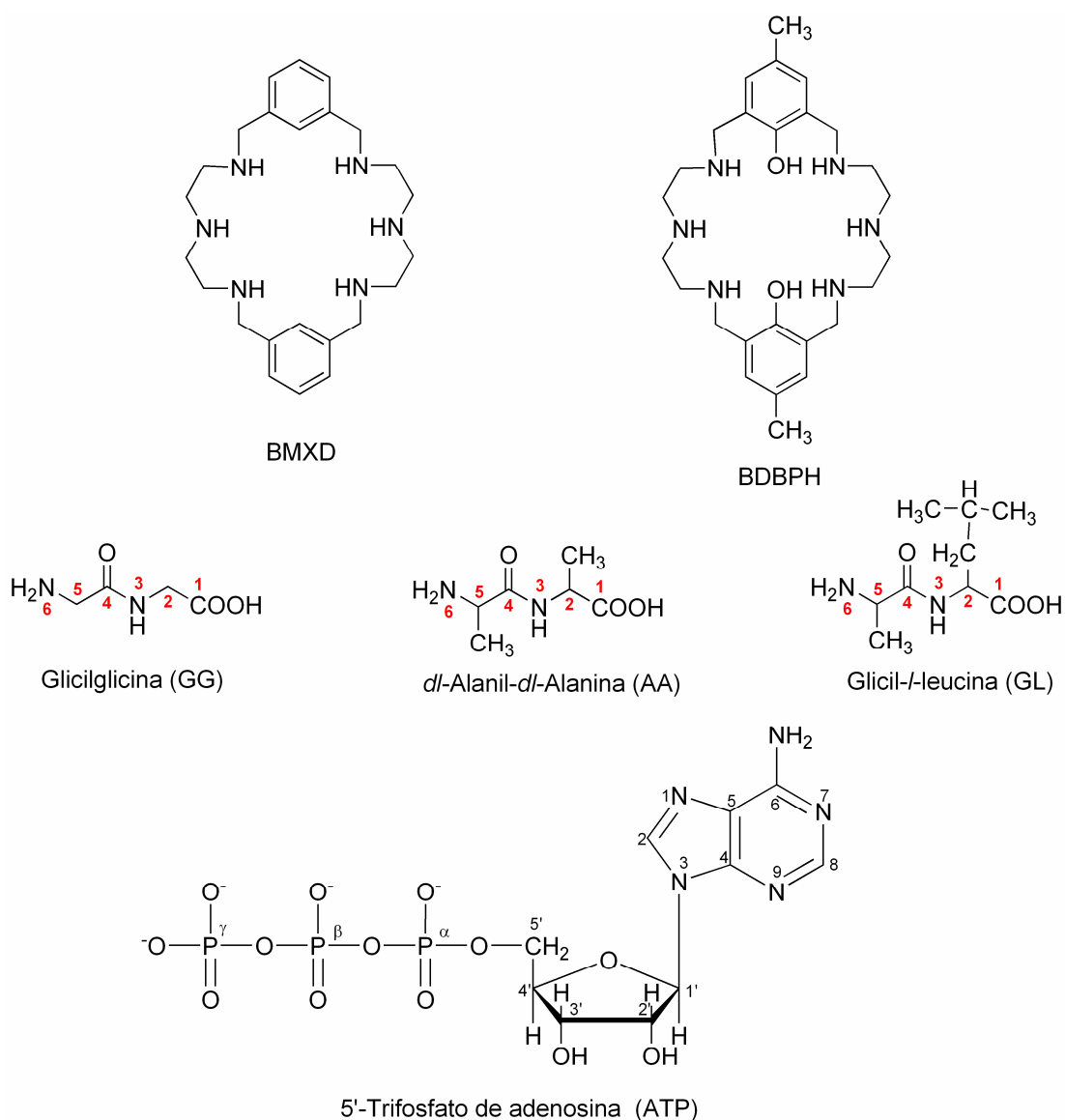


Figura 13. Representação dos ligantes e substratos.

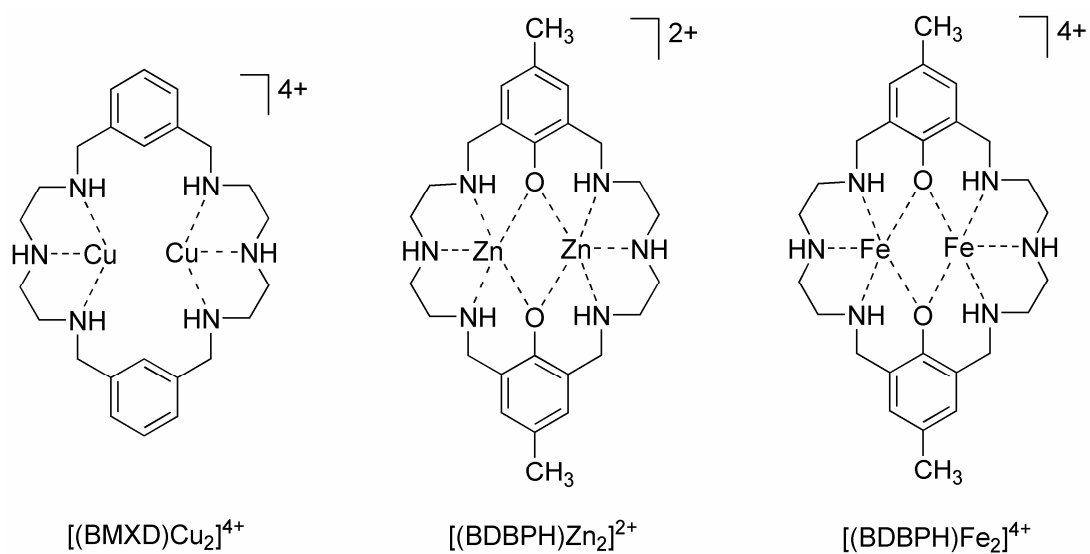


Figura 14. Representações dos cátions complexos macrocíclicos de Cu(II), Zn(II) e Fe(III).

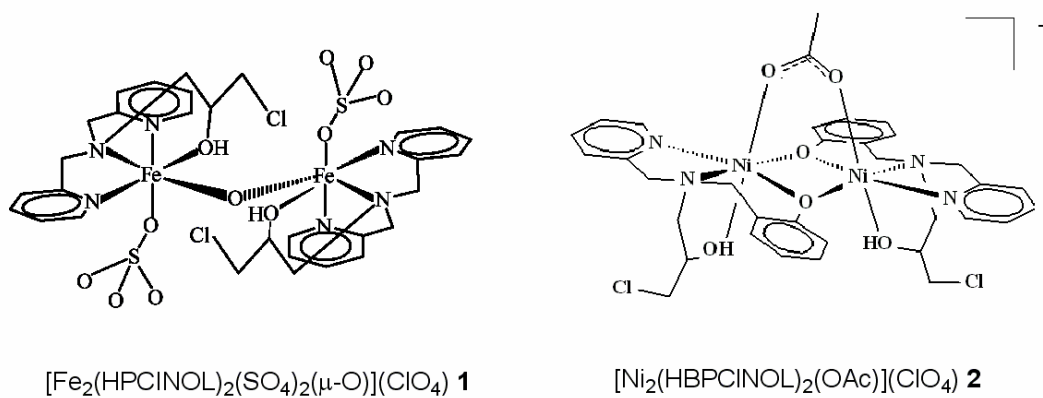


Figura 15. Representação dos complexos (1) e (2).

4.1 CARATERIZAÇÃO DOS LIGANTES MACROCÍCLICOS

Os ligantes macrocíclicos BDBPH e BMXD foram obtidos com rendimentos adequados de acordo com as rotas sintéticas descritas na seção experimental. Esses compostos apresentaram elevado grau de pureza, adequados para a utilização em trabalhos potenciométricos e geração dos complexos em solução. Foram caracterizados por: análise de CHN, espectrometria de infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono e espectrometria de massas por “eletrospray”.¹⁰⁵

4.2 ESTUDOS DE EQUILÍBRIO POTENCIOMÉTRICO

4.2.1 Constantes de protonação do ligante BDBPH.

A curva de equilíbrio potenciométrico do ligante BDBPH (Figura 16) tem duas infleções em $a = 3$ e $a = 4$ ($a = \text{mol de KOH} / \text{mol de ligante}$). De $a = 0$ à $a = 3$ e de $a = 4$ à $a = 8$, há duas regiões tamponadas. A primeira região tamponada corresponde à neutralização dos três mais ácidos grupos aminos protonados. Entre a primeira e a segunda inflexão há a neutralização de um outro grupo amino protonado. A segunda região tamponada, em valores de pH mais alto, corresponde à dissociação de três grupos aminos protonados e de um dos grupos fenólicos em sequência.

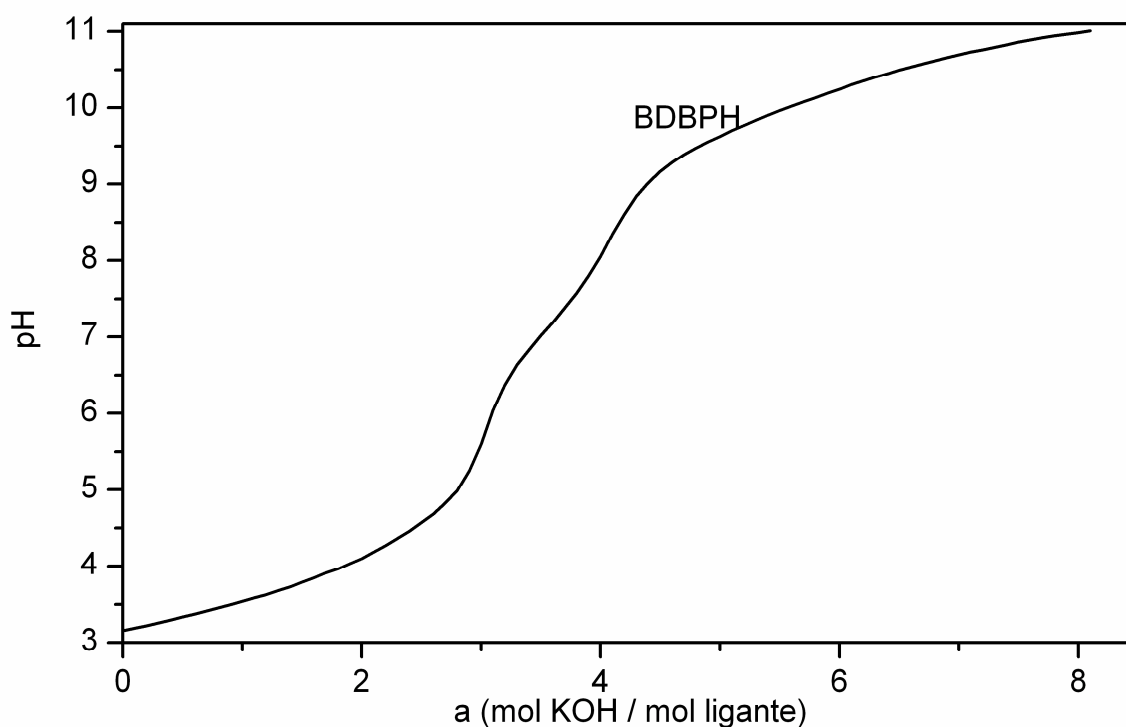


Figura 16. Curvas de equilíbrio potenciométrico do BDBPH.

Este macrocíclico poliazadifenol contém 6 grupos aminos secundários consistindo de duas partes dietilenotriamina separadas pelo grupo p-cresol, dando considerável flexibilidade ao ligante que pode assumir conformações de forma a se adaptar a uma variedade de condições de complexação e dimensões requeridas por íons metálicos e substratos para se coordenarem em sua cavidade.^{22,106-108} Os logaritmos das constantes de protonação ($\text{Log } K_n^H$) para esse ligante foram obtidos sob as condições experimentais deste trabalho, e definidos pela Equação 1 (Tabela 1).^{94,109}



Tabela 1. Logaritmos das constantes de protonação do BDBPH em solução aquosa.

Quociente de Equilíbrio	Log $K_n^{H^+}$
$[H_8L] / [H_7L] [H]$	3,20(9)
$[H_7L] / [H_6L] [H]$	3,53(4)
$[H_6L] / [H_5L] [H]$	4,49(2)
$[H_5L] / [H_4L] [H]$	7,11(5)
$[H_4L] / [H_3L] [H]$	9,47(8)
$[H_3L] / [H_2L] [H]$	9,89(6)
$[H_2L] / [HL] [H]$	11,04(3)
$[HL] / [L] [H]$	11,90(5)*

O Log $K_n^{H^+}$ mais alto não pode ser obtido acuradamente por titulação potenciométrica por causa da fraca acidez de um dos grupos fenólicos, essa constante de protonação foi medida por titulação espectrofotométrica UV-Vis.⁹² A porcentagem das espécies protonadas em função do pH foram calculadas utilizando-se os valores das constantes acima.

Analisando-se o diagrama de distribuição das espécies presentes (Figura 17), que apresenta oito equilíbrios de protonação/desprotonação, gerando um total de nove espécies, propõem-se um processo de desprotonação (Esquema 4). Em pH < 2, o ligante existe na forma completamente protonado H_8L^{6+} . Com aumento do pH, o ligante perde os protons dos nitrogênios aminos protonados para se tornar H_7L^{5+} , H_6L^{4+} , H_5L^{3+} , H_4L^{2+} , H_3L^+ . O ligante neutro H_2L atinge sua concentração máxima (59,8%) em pH 10,6. Acima de pH 9,3 um dos grupos fenólicos desprotona para formar o HL^- , que atinge sua concentração máxima (56,8%) em pH 11,5. Sob condições mais alcalinas o segundo fenol desprotona para formar o diânion L^{2-} (pH >12).

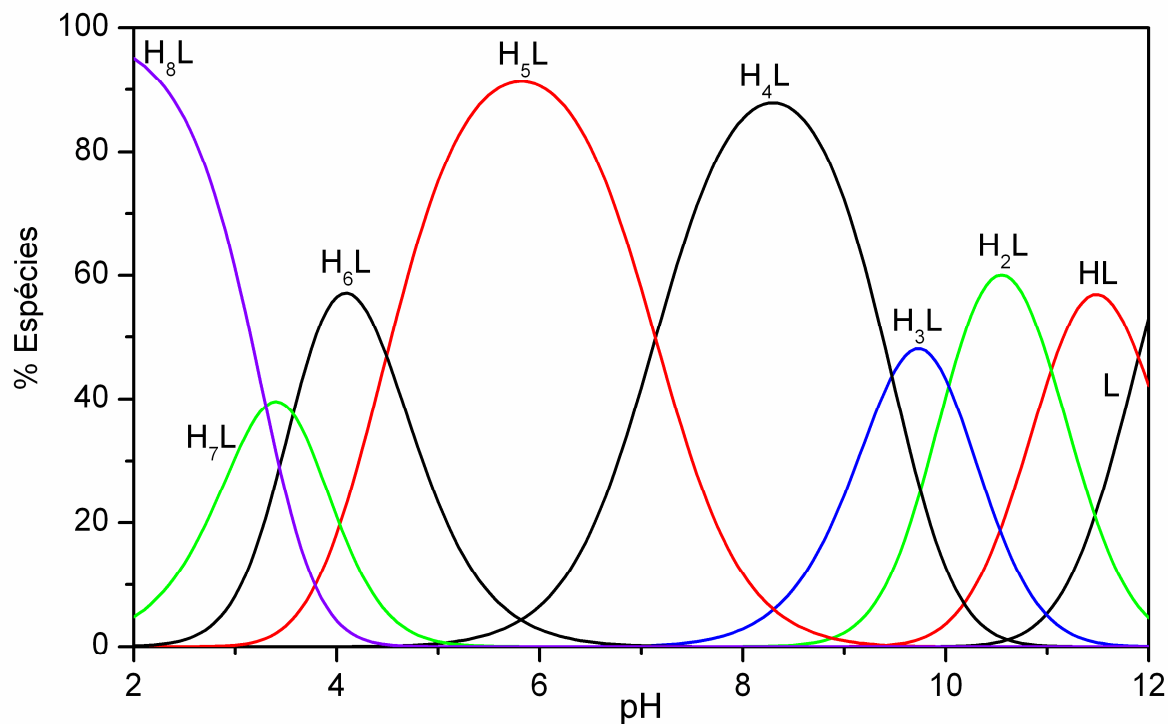
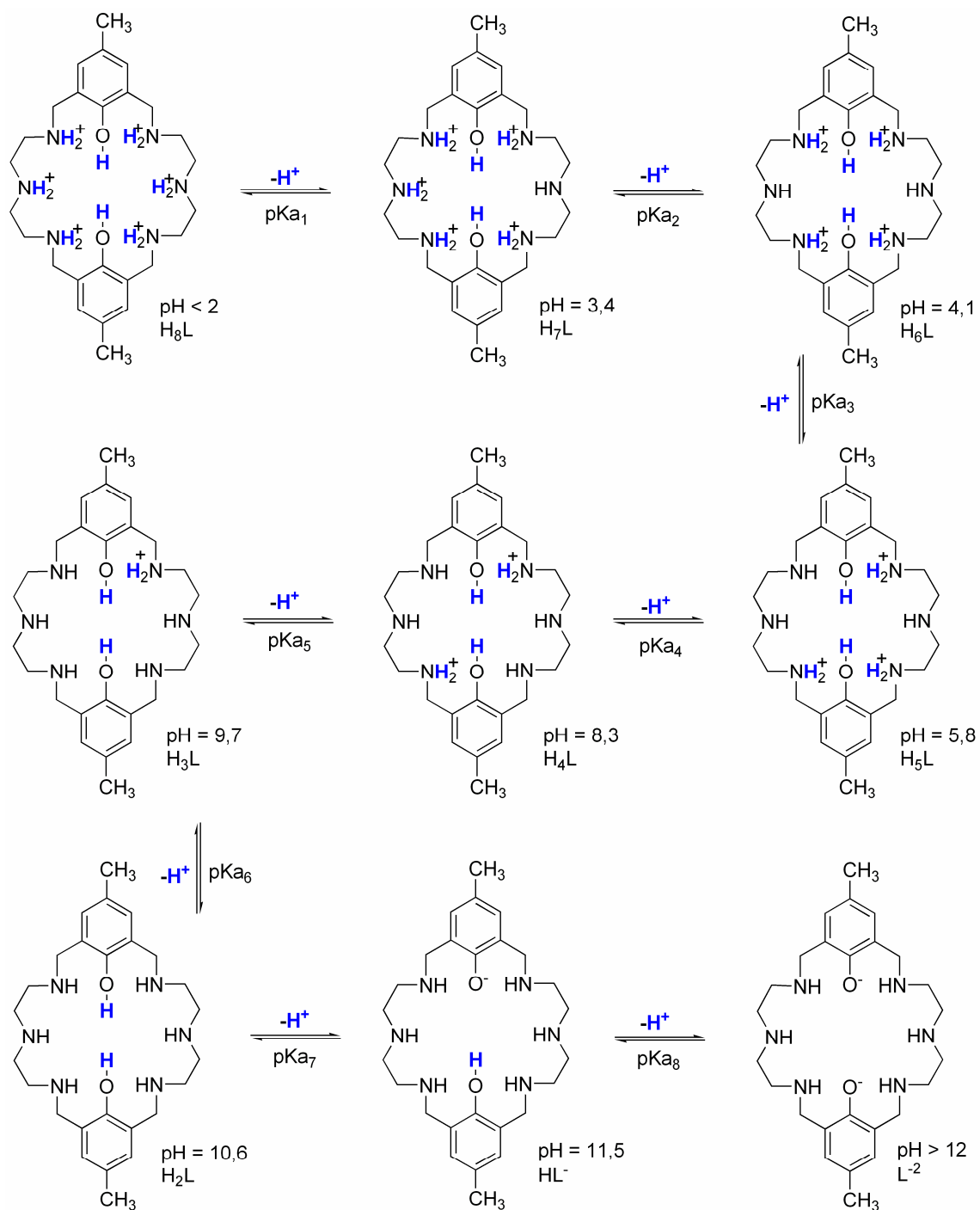


Figura 17. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o ligante BDBPH. Onde o L é o ligante desprotonado e HL, H₂L, H₃L, H₄L, H₅L, H₆L, H₇L, H₈L são as formas mono, di, tri-, tetra-, penta-, hexa-, hepta- e octaprotionada do ligante BDBPH.



Esquema 4. Proposta para os equilíbrios observados para o ligante BDBPH.

4.2.2 Estudo do sistema mono e binuclear BDBPH-Zn(II)

A formação dos complexos Zinco(II)-BDBPH, mono e binuclear, protonados, não protonados e espécies hidróxidas foram investigados sob as condições experimentais desse trabalho, ambos, mono e bi, formam espécies hidróxidas, o pKa da molécula de água coordenada ao mononuclear é 11,80 e o das duas águas ligadas ao binuclear são 8,94 e 10,61, respectivamente (Tabela 2). É importante observar as espécies hidróxidas, em sistemas modelos semelhantes, de complexos formados por ligantes macrocíclicos, são responsáveis pela atividade catalítica e a faixa de pH em que se formam é usada em trabalhos cinéticos.^{59,110,111}

Tabela 2. Logaritmos das constantes de estabilidade dos complexos BDBPH – Zn(II).

Quociente de Equilíbrio	Log K
$[ZnL] / [Zn][L]$	17,77(4)
$[ZnHL] / [ZnL][H]$	10,69(4)
$[ZnH_2L] / [ZnHL][H]$	9,80(2)
$[ZnH_3L] / [ZnH_2L][H]$	4,74(5)
$[ZnL(OH)][H] / [ZnL]$	- 11,80(8)
$[Zn_2L] / [ZnL][Zn]$	12,25(6)
$[Zn_2HL] / [Zn_2L][H]$	5,40(5)
$[Zn_2(OH)L][H] / [Zn_2L]$	-8,94(3)
$[Zn_2(OH)_2L][H] / [Zn_2(OH)L]$	-10,61(5)

Ajustando estequiometricamente a concentração do íon zinco, a formação dos compostos mono e binuclear podem ser favorecidas, como mostra os diagramas de distribuição das espécies para esses dois sistemas (Figuras 18 e 19)

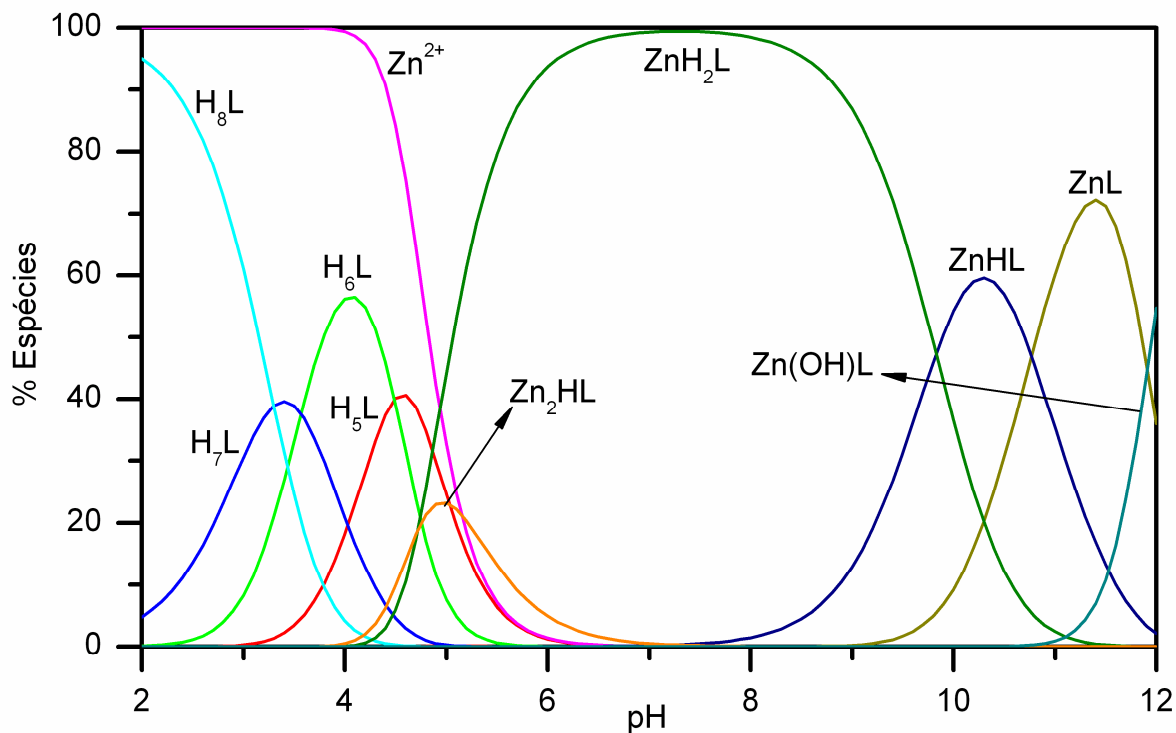


Figura 18. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o sistema BDBPH – Zn(II), (1:1). As cargas foram omitidas para maior clareza.

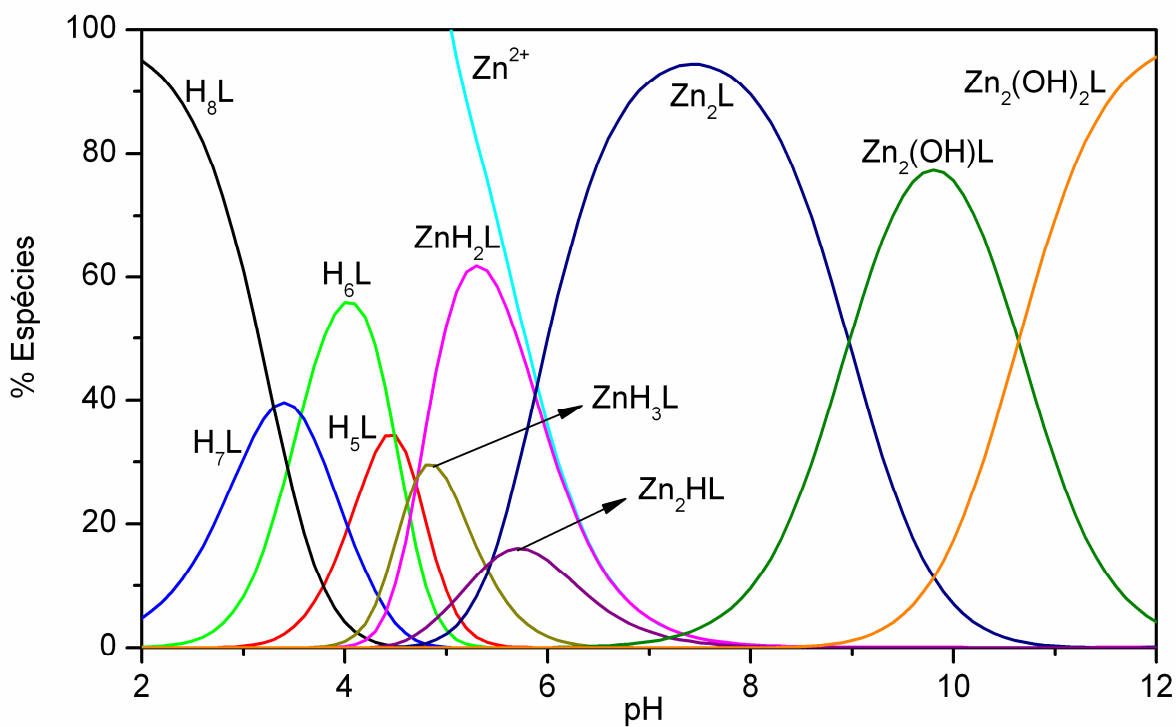


Figura 19. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o sistema BDBPH – Zn(II), (1:2).

No sistema Zn(II)-BDBPH 1:1, o complexo mononuclear hidróxido Zn(OH)L começa a se formar no pH 10,90 e o complexo binuclear Zn₂HL está presente numa faixa de pH de 4 à 6 com o máximo de 23% formado, mesmo as condições sendo favoráveis a formação das espécies mononucleares. Isso é uma indicação que íons zinco têm uma forte tendência para formar complexos binucleares com esse ligante. No sistema Zn(II)-BDBPH 2:1, as espécies hidróxidas começam a se formar a partir do pH 7. A espécie hidróxida Zn₂(OH)L atinge o máximo de formação a pH 9,81 quando está 77% formada e a espécie dihidróxida predomina a valores de pH acima de 11. Esse complexo forma um ambiente de coordenação com duas pontes oxo (μ -fenoxo) entre os dois íons zinco.¹¹¹

4.2.3 Estudo de equilíbrio potenciométrico do sistema ternário BDBPH-Zn(II)-peptídeos (glicilglicina (GG), *dl*-alanil-*dl*-alanina (AA) e glicil-*l*-leucina (GL)).

As curvas de titulação potenciométrica referentes aos sistemas BDBPH-Zn(II)-peptídeos são mostradas nas Figuras 20 e 21 e, cada curva representa um experimento em separado. As inflexões das curvas nos fornecem informações qualitativas sobre a estequiometria da solução, sugerindo possíveis espécies presentes.

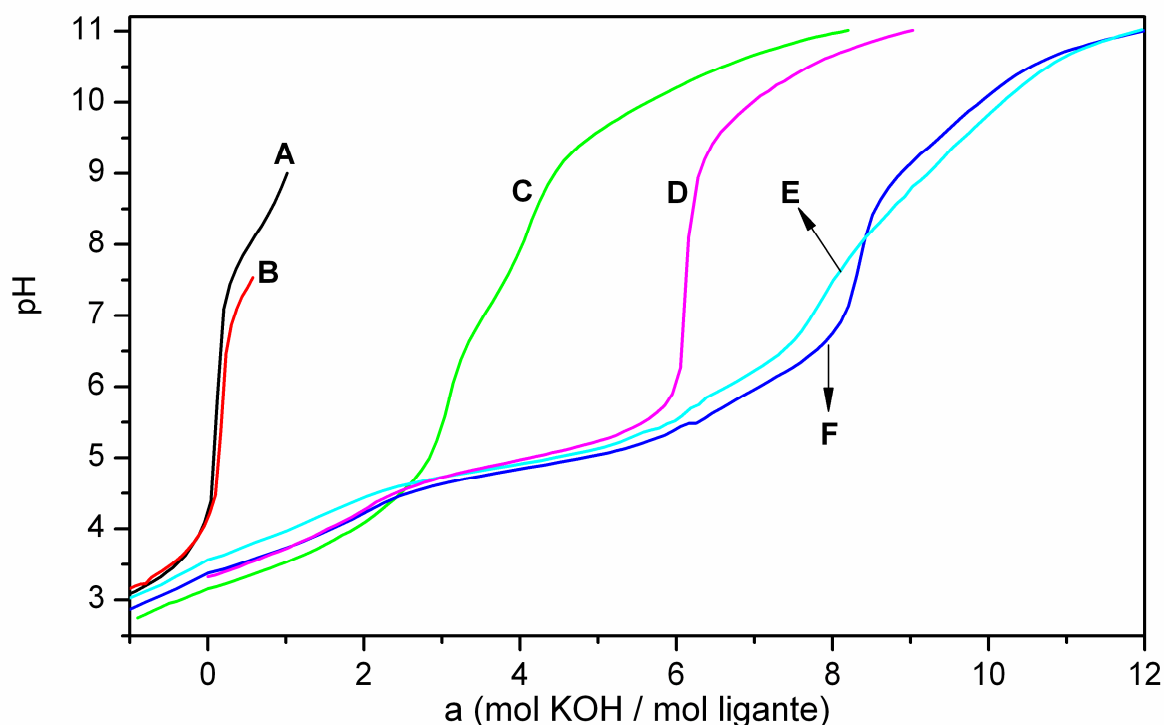


Figura 20. Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema ternário: BDBPH - Zn(II)-GG A - 0,050 mmol de GG; B - 0,050 mmol de GG e 0,050 mmol de Zn(II); C - 0,050 mmol de BDBPH; D - 0,050 mmol de BDBPH e 0,050 mmol de Zn(II); E - 0,050 mmol de BDBPH e 0,100 mmol de Zn(II); F - 0,050 mmol de BDBPH, 0,100 mmol de Zn(II) e 0,050 mmol de GG, todas em 50,0 mL de solução.

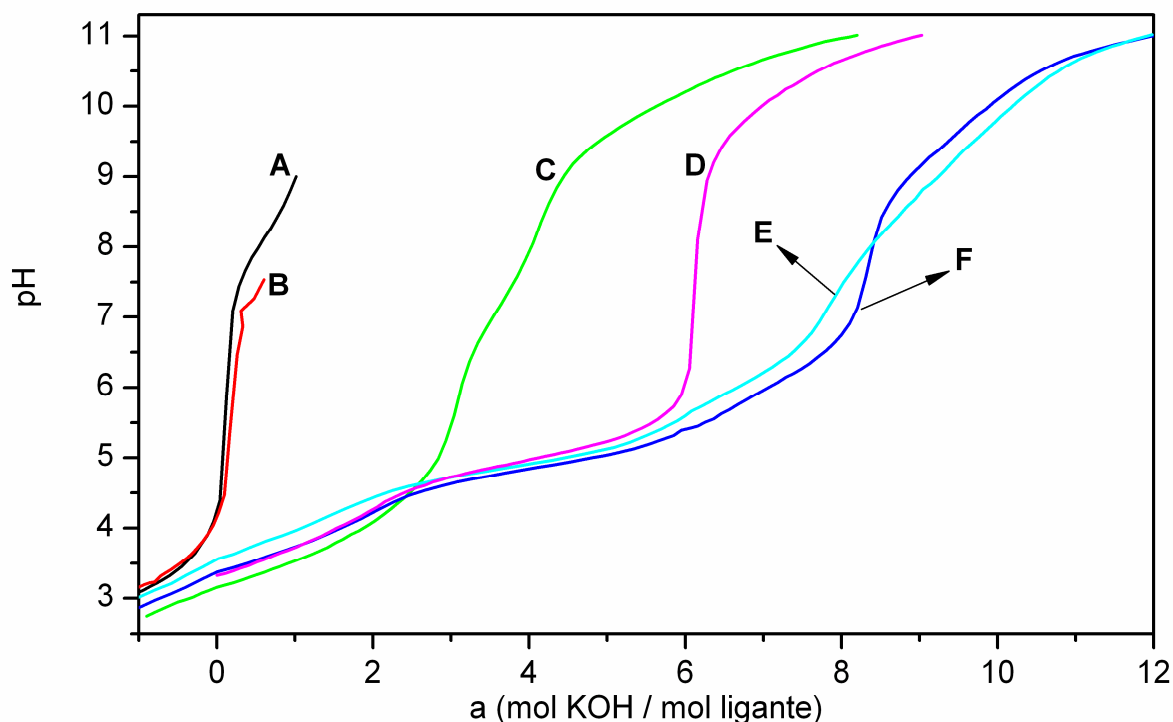


Figura 21. Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema ternário BDBPH - Zn(II)-AA- A - 0,050 mmol de AA; B - 0,050 mmol de AA e 0,050 mmol de Zn(II); C - 0,050 mmol de BDBPH; D - 0,050 mmol de BDBPH e 0,050 mmol de Zn(II); E - 0,050 mmol de BDBPH e 0,100 mmol de Zn(II); F - 0,050 mmol de BDBPH, 0,100 mmol de Zn(II) e 0,050 mmol de AA, todas em 50,0 mL de solução.

Os logaritmos das constantes de protonação dos peptídeos e de complexação dos peptídeos GG e AA, com íon zinco(II) definidas pelas Equações 1 – 4, foram determinados e são mostrados na Tabela 3. Os valores encontrados para estas constantes estão de acordo com o encontrado na literatura.⁵⁹ As curvas potenciométricas referentes a estes sistemas são mostradas nas Figuras 20 e 21, sendo a curva **A** referente à titulação potenciométrica do peptídeo e a curva **B** referente à titulação potenciométrica do sistema peptídeo-zinco(II).

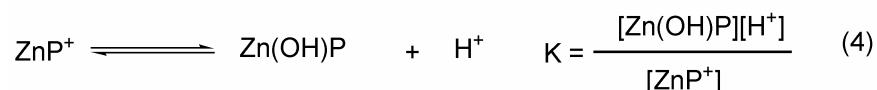
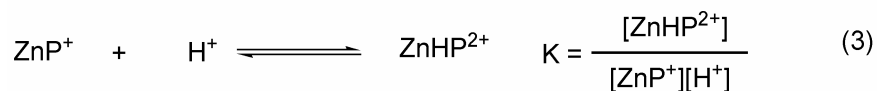
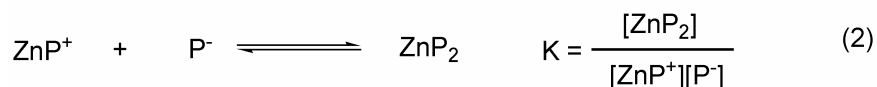
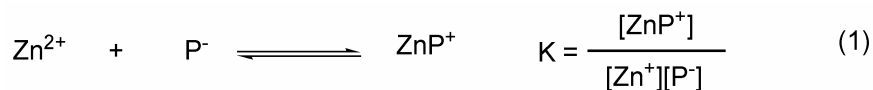
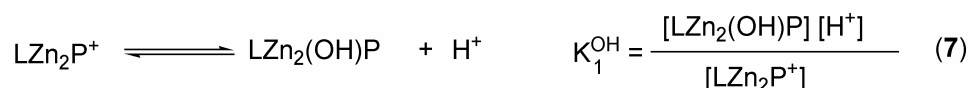
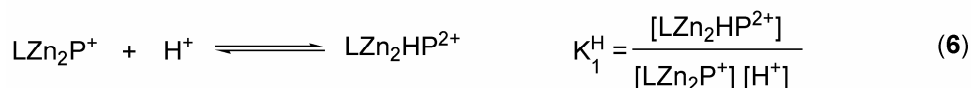


Tabela 3. Logaritmos das constantes de protonação e de estabilidade dos peptídeos com o íon zinco (II).

Quociente de Equilíbrio	GG Log K	AA Log K
$[\text{HP}] / [\text{P}][\text{H}]$	8,10(3)	8,17(5)
$[\text{H}_2\text{P}] / [\text{HP}][\text{H}]$	2,95(7)	3,07(4)
$[\text{ZnP}] / [\text{Zn}][\text{P}]$	3,54(4)	3,60(5)
$[\text{ZnP}_2] / [\text{ZnP}][\text{P}]$	2,69(7)	2,35(4)
$[\text{ZnHP}] / [\text{ZnP}][\text{P}]$	6,37(2)	6,12(6)
$[\text{Zn(OH)P}][\text{H}] / [\text{ZnP}]$	- 8,60(8)	- 8,20(3)

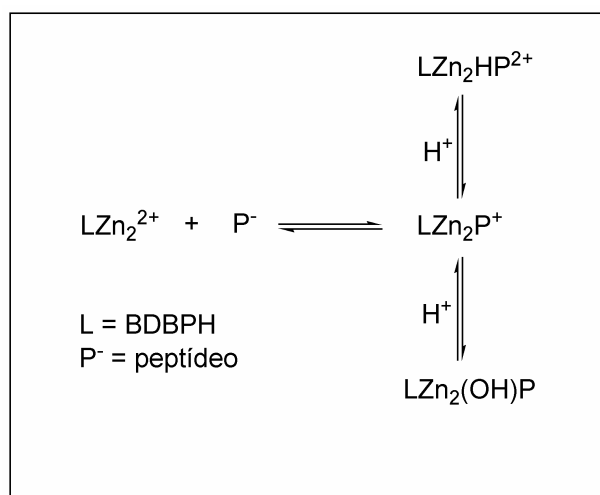
4.2.3.1 Sistemas formado pelas espécies BDBPH- Zn(II)-GG

Depois de testar várias combinações das espécies prováveis, as espécies definidas pelos equilíbrios (Equações 5 – 7), foram derivadas a partir dos dados das titulações potenciométricas. LZn_2^{2+} é o complexo receptor binuclear BDBPH -Zn(II) e P^- é a forma desprotonada dos peptídeos.



A curva de equilíbrio potenciométrico para a formação do complexo ternário BDBPH-Zn(II)-GG na proporção 1:2:1, é mostrada na Figura 20 (curva **F**). A inflexão desta curva indica que além do consumo de seis prótons referentes ao macrocíclico BDBPH ($a = 6$) uma quantidade adicional de base foi utilizada, indicando a formação da espécie hidróxida. A curva **B**, referente à titulação da GG-Zn(II), termina bruscamente devido a precipitação da solução e o experimento foi interrompido. Analisando as curvas, as seguintes espécies foram encontradas: LZn_2P^+ (LZn_2GG^+), $\text{LZn}_2\text{HP}^{2+}$ (LZn_2HGG^+), $\text{LZn}_2(\text{OH})\text{P}$ ($\text{LZn}_2(\text{OH})\text{GG}$), onde LZn_2P^+ , é o complexo μ -peptídeo-BDBPH-Zn(II)₂, $\text{LZn}_2\text{HP}^{2+}$ é a espécie protonada e $\text{LZn}_2(\text{OH})$ é a espécie hidróxida.

O esquema 5 mostra as espécies em equilíbrio neste sistema e os valores dos logaritmos das constantes de formação são listadas na tabela 4. A constante de formação da espécie LZn_2P^+ (LZn_2GG^+) é um pouco mais elevada quando comparada a espécie LZn_2AA^+ . A protonação deste complexo ($\text{Log } K = 6,55$) deve ocorrer no grupo amino terminal do dipeptídeo, pois o grupo carboxilato estando coordenado a um dos centros metálicos não poderia ser protonado, além desse valor ser um pouco elevado para a protonação do grupo carboxilato. Esse valor está de acordo com o encontrado na literatura para sistemas semelhantes.⁵⁹



Esquema 5. Formação das espécies ternárias [(BDBPH)Zn₂P].

Tabela 4. Logaritmos das constantes de estabilidade para os complexos ternários, BDBPH-Zn(II)-peptídeos (GG e AA).

Quociente de Equilíbrio	Glicilglicina	dl-Alanil-dl-Alanina
	Log K	Log K
$[\text{LZn}_2\text{P}^+] / [\text{LZn}_2\text{HP}^{2+}][\text{P}^-]$	4,59(4)	4,21(5)
$[\text{LZn}_2\text{HP}^{2+}] / [\text{LZn}_2\text{P}^+][\text{H}^+]$	6,55(7)	6,35(4)
$[\text{LZn}_2(\text{OH})\text{P}][\text{H}^+] / [\text{LZn}_2\text{P}^+]$	8,89(2)	8,12(6)

A Figura 22 mostra a distribuição das espécies para o sistema BDBPH-Zn(II)-glicilglicina. As espécies ternárias começam a se formar à p[H] 5,0, aumentando rapidamente a valores de p[H] mais altos. A espécie protonada (LZn₂HP²⁺) está 9 % formada em pH 6,2 e a espécie não protonada (LZn₂P⁺) atinge um máximo de 56 % formada em p[H] 8 e depois decresce dando espaço para a formação da espécie hidróxida (LZn₂(OH)P), que está 38 % formada em pH 9,6.

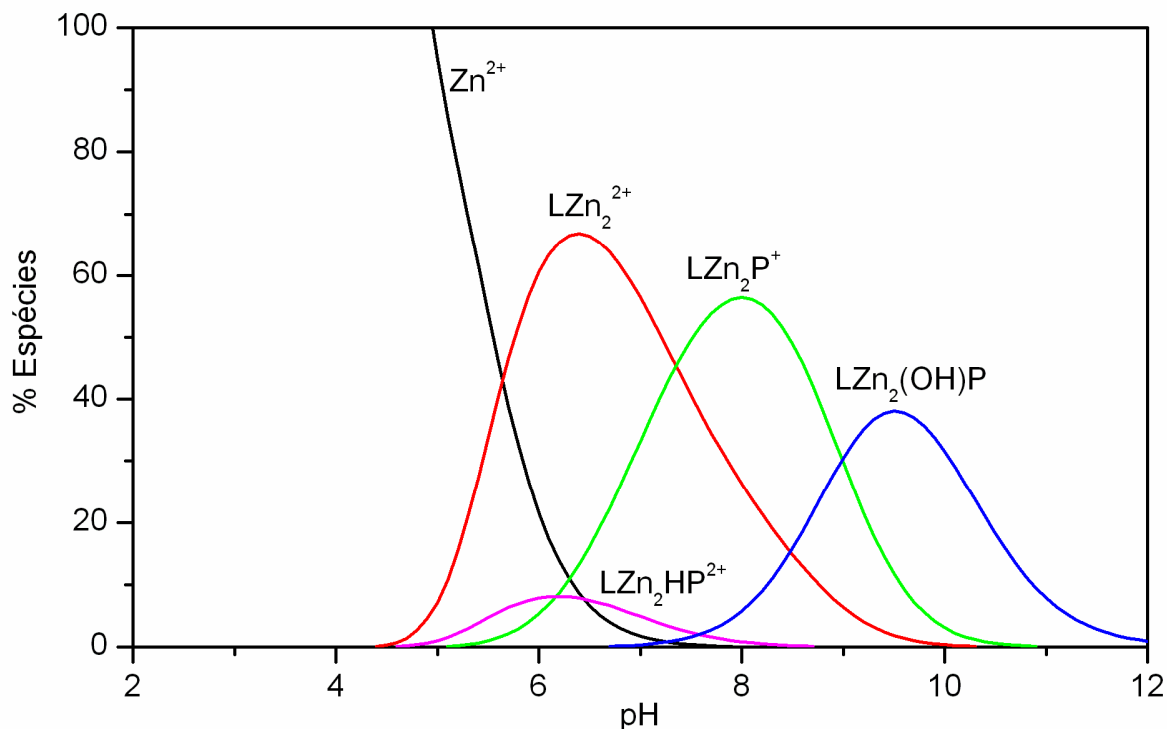


Figura 22. Diagrama de distribuição de espécies do sistema BDBPH - Zn(II) - GG na proporção 1:2:1, em função do pH, onde $\text{LZn}_2\text{P}^{3+}$ ($\text{LZn}_2\text{GG}^{3+}$), $\text{LZn}_2\text{HP}^{4+}$ ($\text{LZn}_2\text{HGG}^{4+}$), e $\text{LZn}_2(\text{OH})\text{P}^{2+}$ ($\text{LZn}_2(\text{OH})\text{GG}^{2+}$) são as espécies não-protonada, monoprotionada e hidróxida, respectivamente.

4.2.3.2 Sistemas formado pelas espécies BDBPH-Zn(II)-AA

As curvas de equilíbrio potenciométrico para a formação do complexo ternário BDBPH-Zn(II)-AA na razão 1:2:1, são mostradas na Figura 21. Elas são similares as curvas obtidas para o sistema GG-Zn(II)-BDBPH. Os logaritmos das constantes de formação definidas pelas Equações 5-7 foram determinados e aparecem na Tabela 4. O diagrama de distribuição de espécies para este sistema (Figura 23) apresenta as mesmas espécies do sistema com a glicilglicina. A espécie protonada ($\text{Zn}_2\text{LHP}^{2+}$) está 36 % formada em pH 6,2 e a espécie não protonada (Zn_2LP^+) atinge um máximo de 56 % formada em pH 8 e depois decresce dando espaço para a formação da espécie hidróxida ($\text{LZn}_2(\text{OH})\text{P}$), que está 54 % formada em pH 9,6.

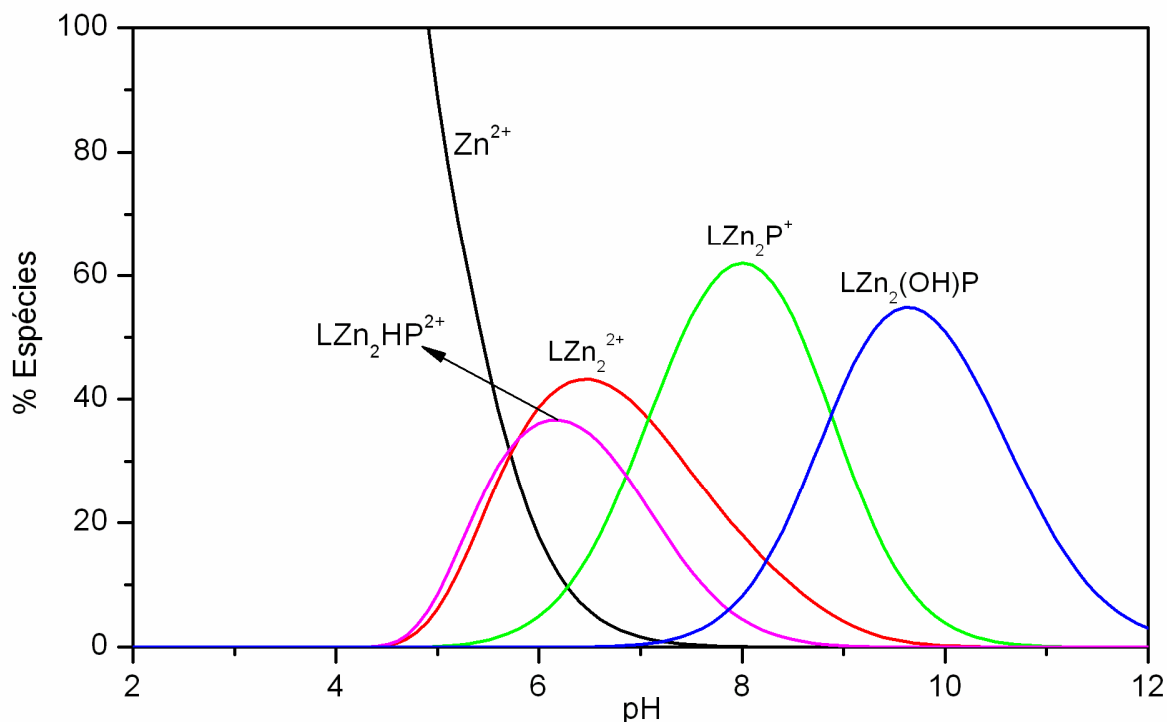


Figura 23. Diagrama de distribuição de espécies do sistema BDBPH-Zn(II)- AA na proporção 1:2:1, em função do pH, onde LZn₂P⁺ (LZn₂AA⁺), LZn₂HP²⁺ (LZn₂HAA²⁺), e LZn₂(OH)P (LZn₂(OH)AA) são as espécies não-protonada, monoprotionada e hidróxida, respectivamente.

4.2.3.3 Sistemas formado pelas espécies BDBPH -Zn(II)-GL

O peptídeo GL foi usado no lugar da AA e o complexo ternário não foi detectado em quantidade apreciável, provavelmente devido ao efeito de impedimento do resíduo de aminoácido leucina, o qual dificulta por impedimento espacial este dipeptídeo de coordenar-se ao centro metálico na cavidade do complexo receptor binuclear BDBPH- Zn(II).¹¹²

4.2.4 Estudo de equilíbrio potenciométrico do sistema ternário BDBPH-Fe(III)-ATP (5'-trifosfato de adenosina).

Nesta etapa, foram estudados todos os equilíbrios no sistema ternário BDBPH-Fe(III)-ATP. No estudo desse sistema, os equilíbrios binários: BDBPH-

Fe(III), ATP-Fe(III) e BDBPH-ATP foram considerados e estudados em experimentos separados. Também foram consideradas as reações de hidrólise do íon metálico ferro(III). Metais trivalentes hidrolisam facilmente e seus equilíbrios de hidrólise devem ser levados em conta no cálculo das constantes de equilíbrio desses metais. Todas as espécies sugeridas neste estudo foram baseadas em trabalhos de reconhecimento molecular e medidas das interações 'host-guest' de complexos macrocíclicos binucleares, fosfatos inorgânicos e nucleotídeos.¹⁰³⁻¹⁰⁶ As curvas de equilíbrio potenciométrico para esse sistema são mostradas na Figura 24 e cada curva representa um experimento em separado. A curva **A** refere-se à titulação potenciométrica do ATP e a curva **B** a do sistema ATP-ferro(III).

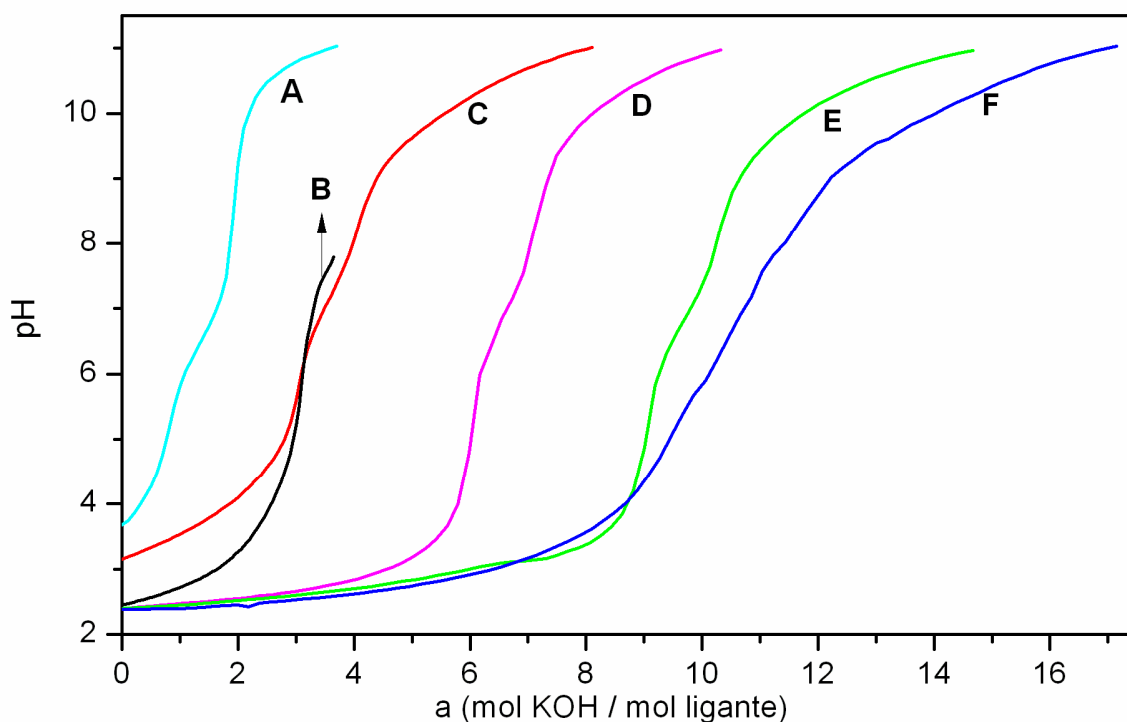


Figura 24. Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema ternário BDBPH-Fe(III)-ATP- A - 0,050 mmol de ATP; B - 0,050 mmol de ATP e 0,050 mmol de Fe(III); C - 0,050 mmol de BDBPH; D - 0,050 mmol de BDBPH e 0,050 mmol de Fe(III); E - 0,050 mmol de BDBPH e 0,100 mmol de Fe(III); F - 0,050 mmol de BDBPH, 0,100 mmol de Fe(III) e 0,050 mmol de ATP, todas em 50,0 mL de solução.

Os logaritmos das constantes protonação do ATP e de complexação do ATP com íon ferro(III), foram determinados e aparecem na Tabela 5, onde são

comparados com os valores da literatura, esses valores estão de acordo com os encontrados na literatura.^{113,114}

Tabela 5. Logaritmos das constantes de protonação do ATP e de complexação do ATP com o íon ferro (III). (A = ATP).

<i>Quociente de Equilíbrio</i>	Log K
$[HA] / [A][H]$	6,71(5)
$[H_2A] / [HA][H]$	3,96(3)
$[FeHA] / [FeA][H]$	24,39(2)
$[Fe(OH)A][H] / [FeA]$	-4,14(7)
$[Fe(OH)_2A][H] / [Fe(OH)A]$	-6,27(2)
$[Fe(OH)_3A][H] / [Fe(OH)_2A]$	- 8,60(8)

A formação dos complexos BDBPH-Ferro(III) mono e binucleares, protonados, não protonados e espécies hidróxidas foram investigados, sob as condições experimentais deste trabalho (Tabela 6).

Tabela 6. Logaritmos das constantes de estabilidade dos complexos BDBPH – Fe(III).

Quociente de Equilíbrio	Log K
$[FeL] / [Fe][L]$	32,37(5)
$[FeHL] / [FeL][H]$	9,91(9)
$[FeH_2L] / [FeHL][H]$	7,05(7)
$[Fe_2L] / [FeL][Zn]$	15,82(6)
$[Fe_2(\mu-OH)L][H] / [Fe_2L]$	-3,57(8)
$[Fe_2(\mu-O)L][H] / [Fe_2(\mu-OH)L]$	-6,91(5)
$[Fe_2(\mu-O,\mu-OH)L][H] / [Fe_2(\mu-O)L]$	-9,33(4)
$[Fe_2(\mu-O)_2L][H] / [Fe_2(\mu-O,\mu-OH)L]$	-10,03(3)

As curvas de equilíbrio potenciométrico para o ligante BDBPH (curva **C**) e para o ligante-metal nas proporções 1:1 e 1:2 foram plotadas (curvas **D** e **E**) na Figura 24. A curva **D** apresenta uma região tamponada longa até uma inflexão em $a = 6$, indicando a neutralização de seis prótons do ligante. Uma segunda região tamponada aparece em valores de pH neutro, consumindo 1 mol de base por mol de ligante e a terceira região tamponada aparece acima de pH 10.

Na curva **E**, a primeira região tamponada vai até $a = 9$, indicando que além da neutralização dos oito prótons do ligante, ocorre a neutralização um próton adicional. Isso é atribuído à dissociação de uma molécula de água ligada ao íon metálico trivalente e formando uma ponte hidróxida que estabiliza o arranjo binuclear. O segundo tampão aparece em pH neutro, onde mais um próton é neutralizado. Esse próton é da ponte hidróxida, que se transforma numa ponte oxo.⁹⁴ A terceira região tamponada ocorre acima de pH 9 e está relacionada com a formação de espécies hidróxidas.

A distribuição das espécies presentes nesses sistemas ligante-metal aparece nas Figuras 25 e 26, para os sistemas 1:1 e 1:2, respectivamente. No sistema BDBPH-Fe(III) 1:1 (Figura 25), não ocorre formação de espécies hidróxidas, todos os sítios de coordenação do íon metálico são ocupados pelo ligante. Em valores de pH próximo de 8, predomina a espécie diprotonada, $LFeH_2$, que só não está 100 % formada porque a quantidade de metal é um pouco menor, havendo um pequeno excesso de ligante. Em valores de pH mais elevados, predominam as espécies monoprotionada ($LFeH$) e a não protonada (LFe).

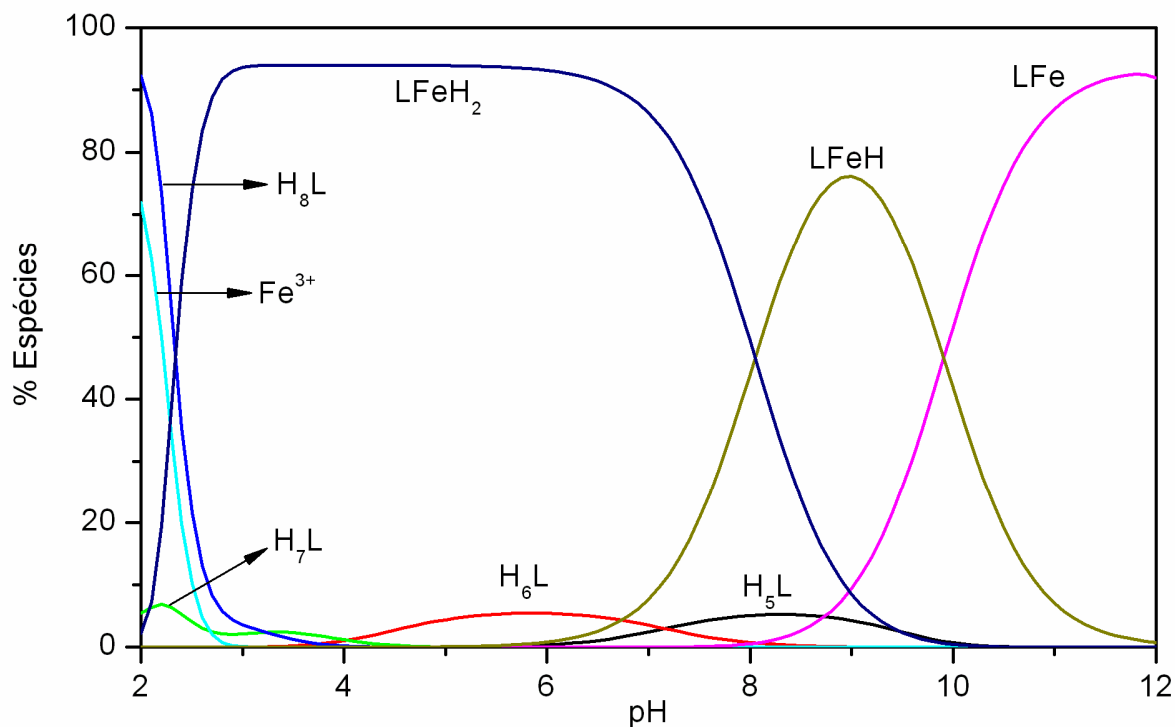


Figura 25. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o sistema BDBPH – Fe(III), (1:1).

No sistema BDBPH-Fe(III) 1:2 (Figura 26), a adição de um segundo íon férrico ao complexo mononuclear (LFe) para formar o binuclear (LFe_2) é caracterizada por uma constante de estabilidade mais baixa devido a desestabilização resultante da repulsão eletrostática dos dois íons metálicos na cavidade do macrocíclico (Tabela 6). Essa tendência também é observada em outros complexos macrocíclicos.^{94,109-111,115-122} Nesse sistema, o complexo binuclear (LFe_2) está 40 % formado em pH 3,2, decrescendo em valores de pH maiores para dar espaço à espécie $\mu\text{-OH}$, $\text{LFe}_2(\mu\text{-OH})$ (espécie binuclear com uma ponte hidróxida entre os íons metálicos). Nessa espécie, a ponte hidróxida estabiliza o arranjo binuclear e o complexo está 90 % formado em pH 5,5. Após a desprotonação da ponte hidróxida ($\mu\text{-OH}$) forma-se a espécie $\mu\text{-oxo}$, $\text{LFe}_2(\mu\text{-O})$ (espécie binuclear com uma ponte oxo entre os íons metálicos), que predomina em valores de pH mais elevados e está 93 % formada em pH 8,3. Acima de pH 8 forma-se ainda mais duas espécies: $\text{LFe}_2(\mu\text{-O},\mu\text{-OH})$ (espécie binuclear com uma ponte hidróxida e uma ponte oxo entre os íons metálicos) e $\text{LFe}_2(\mu\text{-O})_2$ (espécie binuclear com duas ponte oxo entre os íons metálicos), sendo que a última predomina em valores de pH acima de 9,6.¹¹⁵

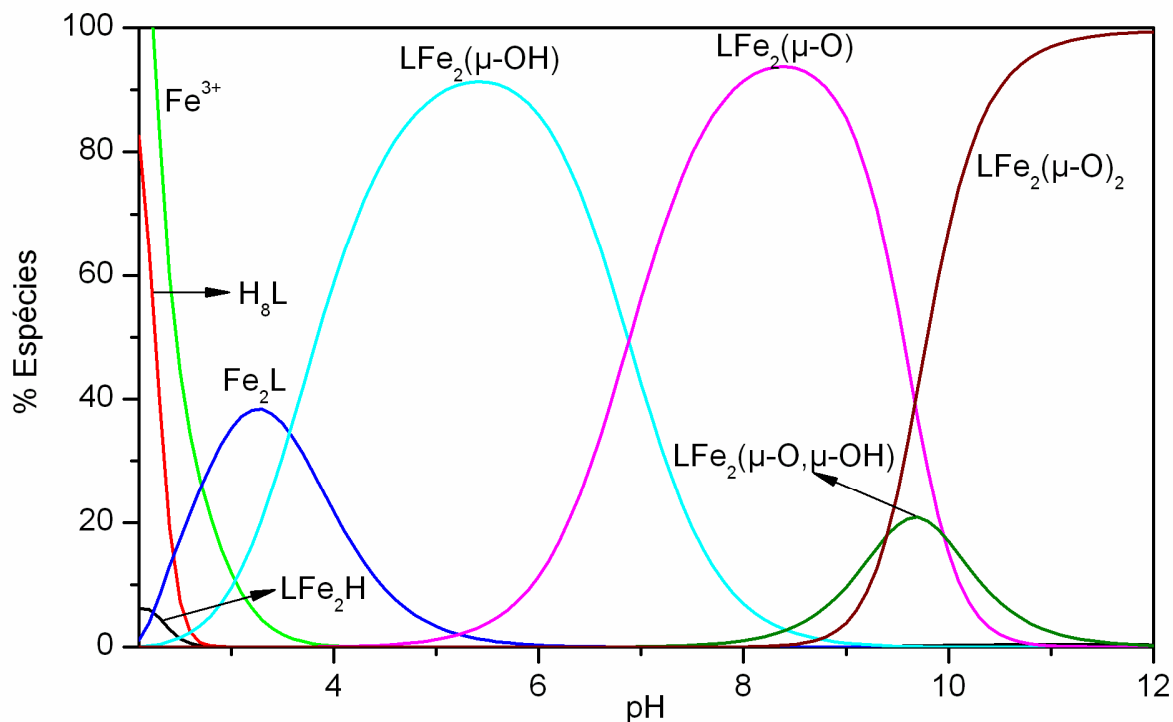
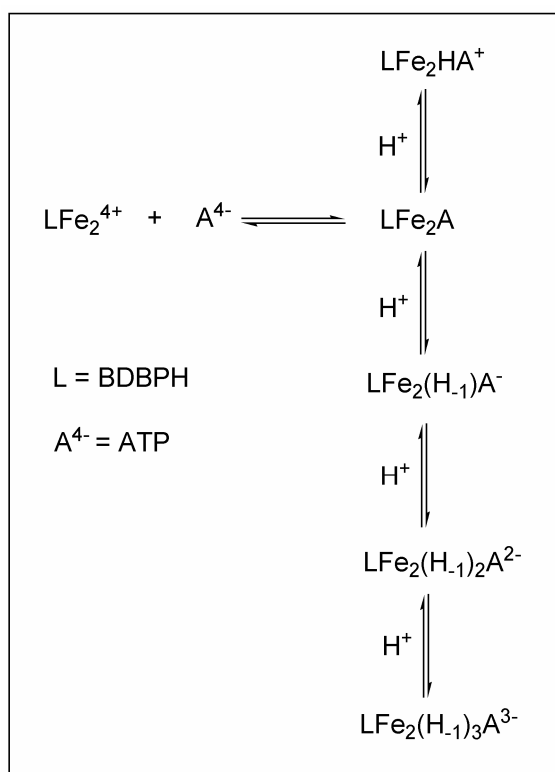


Figura 26. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o sistema BDBPH – Fe(III), (1:2).

A curva do sistema ternário BDBPH-Fe(III)-ATP 1:2:1 (Figura 22, curva F) apresenta um tampão longo que consome nove prótons, oito do ligante macrocíclico e um do ATP e um tampão adicional não bem definido, que consome um adicional de dois prótons. Um consumo adicional de dois prótons indica a formação possível de uma espécie $\mu-OH$, que sofre uma desprotonação produzindo a espécie $\mu-oxo$, como foi observado no sistema BDBPH-Fe(III), discutido anteriormente. Após análise das curvas com a ajuda do programa de computação BEST7 cinco espécies de complexos ternários foram encontradas onde LFe_2A é o complexo ternário BDBPH-Fe(III)₂-ATP desprotonado, LFe_2HA^+ , é o complexo ternário protonado, $LFe_2(H_{-1})A^-$ é a espécie μ -hidróxida, $LFe_2(H_{-2})A^{2-}$ é a espécie μ -oxo e $LFe_2H_{-3}A^{3-}$ é a espécie μ -oxo μ -hidróxida, (Esquema 6 e Tabela 7).



Esquema 6. Formação das espécies ternárias LFe₂-ATP.

Tabela 7. Logaritmos das constantes de formação para os complexos ternários, BDBPH-Fe(III)-ATP.

Quociente de Equilíbrio	(Log K)
$[\text{LFe}_2\text{A}] / [\text{LFe}_2^{4+}][\text{A}^{4-}]$	16,85(3)
$[\text{LFe}_2\text{HA}^+] / [\text{LFe}_2\text{A}][\text{H}^+]$	6,55(7)
$[\text{LFe}_2(\text{H}_{-1})\text{A}^-][\text{H}^+] / [\text{LFe}_2\text{A}]$	-7,79(2)
$[\text{LFe}_2(\text{H}_{-1})_2\text{A}^{2-}][\text{H}^+] / [\text{LFe}_2(\text{H}_{-1})\text{A}^-]$	-9,07(5)
$[\text{LFe}_2(\text{H}_{-1})_3\text{A}^{3-}][\text{H}^+] / [\text{LFe}_2(\text{H}_{-1})_2\text{A}^{2-}]$	-9,90(4)

O diagrama de distribuição das espécies detectadas no sistema BDBPH-Fe(III)-ATP é mostrado na Figura 27, as espécies ternárias começam a se formar a partir do pH 3. A espécie protonada (LFe_2HA^+) atinge o máximo de formação (92%) em pH 4,7, a espécie não protonada (LFe_2A) atinge um máximo de formação (77 %) em pH 6,9. Acima de pH 8 as espécies ponte predominam; a espécie μ -hidróxida ($\text{LFe}_2(\text{H}_{-1})\text{A}^-$) atinge um máximo de formação (68%) em pH 8,4, com a desprotonação dessa ponte forma-se a espécie μ -oxo ($\text{LFe}_2(\text{H}_{-1})_2\text{A}^{2-}$) que está 55% formada em pH 9,5 e a espécie diponte μ -oxo; μ -hidróxida ($\text{LFe}_2(\text{H}_{-1})_3\text{A}^{3-}$) está 98 % formada em pH 11,7.

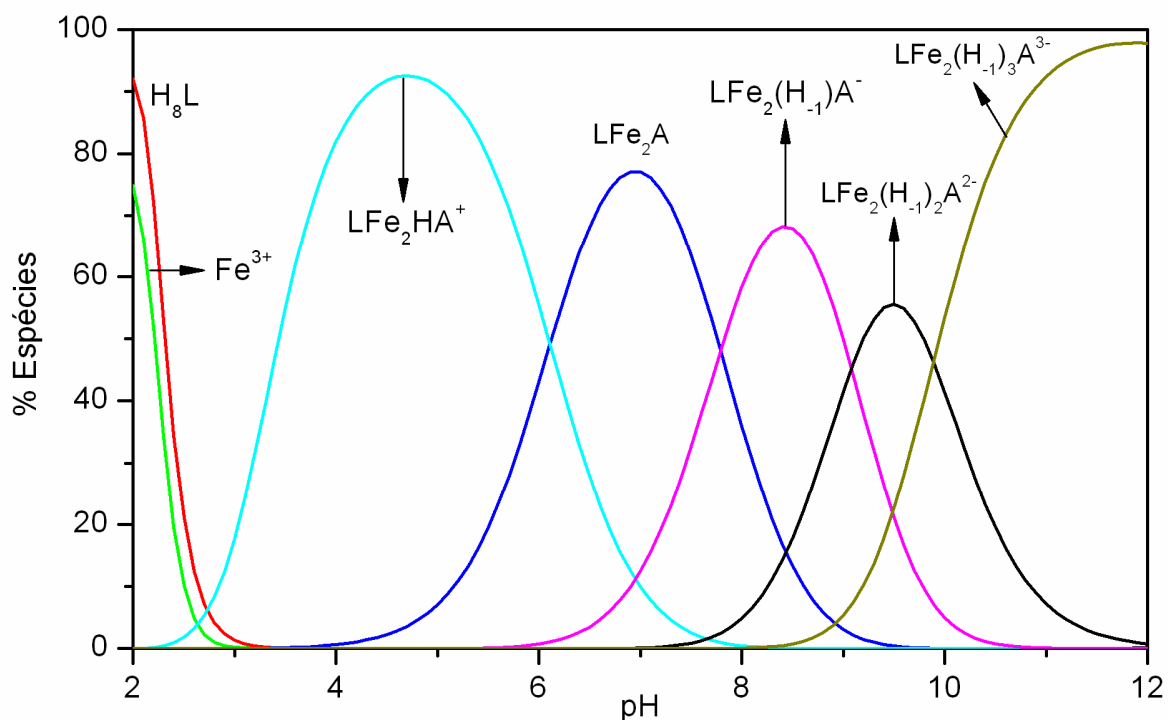


Figura 27. Diagrama de distribuição de espécies do sistema ternário ATP-Fe(III)-BDBPH na proporção 1:2:1, em função do pH, onde LFe_2A , é o complexo ternário BDBPH-Fe(III)₂-ATP, LFe_2HA^+ é a complexo ternário protonado e $\text{LFe}_2(\text{H}_{-1})\text{A}^-$, $\text{LFe}_2(\text{H}_{-1})_2\text{A}^{2-}$, $\text{LFe}_2(\text{H}_{-1})_3\text{A}^{3-}$ são as espécies hidróxidas do complexo ternário.

4.2.5 Estudo de equilíbrio potenciométrico do sistema ternário BMXD-Cu(II)-Peptídeos (GG, AA e GL).

O sistema BMXD-Cu(II)-GG foi estudado com detalhes e aparece na literatura.¹⁰⁰ Por se tratar de sistemas bem complexos e necessitando realizar os estudos dos sistemas ternários com os peptídeos AA e GL, os mesmos procedimentos foram realizados para os três sistemas.

As curvas de titulação potenciométrica referente ao sistema ternário BMXD-Cu(II)-Peptídeos (GG, AA e GL) são mostradas nas Figuras 28, 29 e 30 e cada curva representa um experimento em separado.

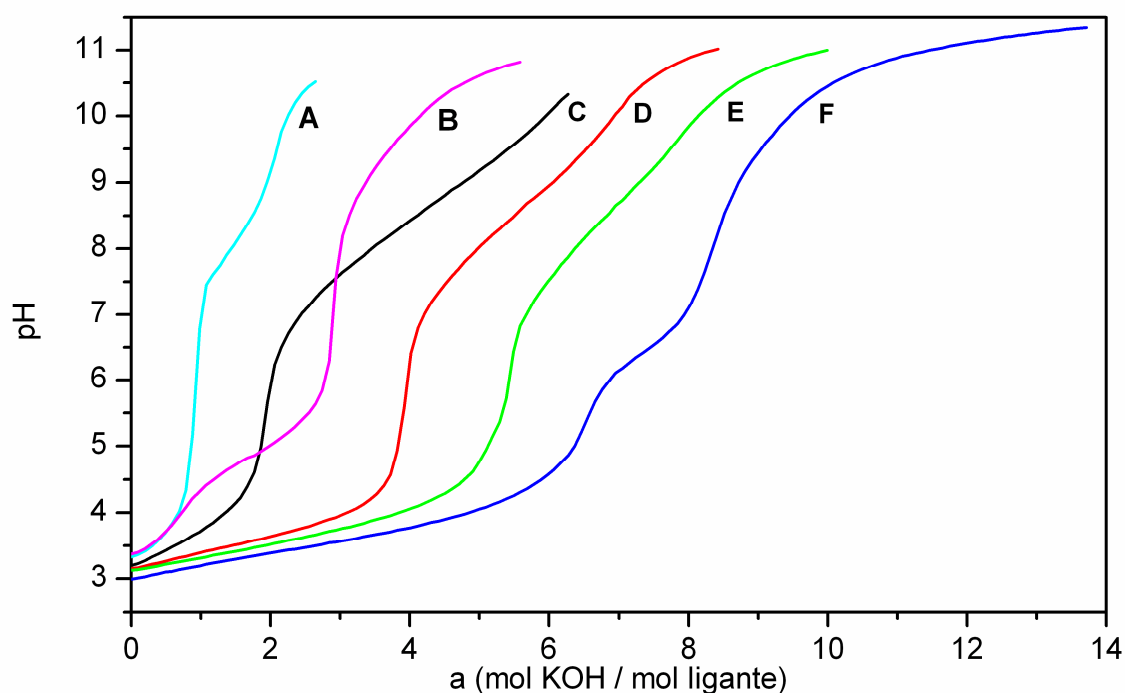


Figura 28. Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema ternário Cu(II)-BMXD-GG: A - 0,050 mmol de GG; B - 0,050 mmol de GG e 0,050 mmol de Cu(II); C - 0,050 mmol de BMXD; D - 0,050 mmol de BMXD e 0,050 mmol de Cu(II); E - 0,050 mmol de BMXD e 0,100 mmol de Cu(II); F - 0,050 mmol de BMXD, 0,100 mmol de Cu(II) e 0,050 mmol de GG, todas em 50mL de solução.

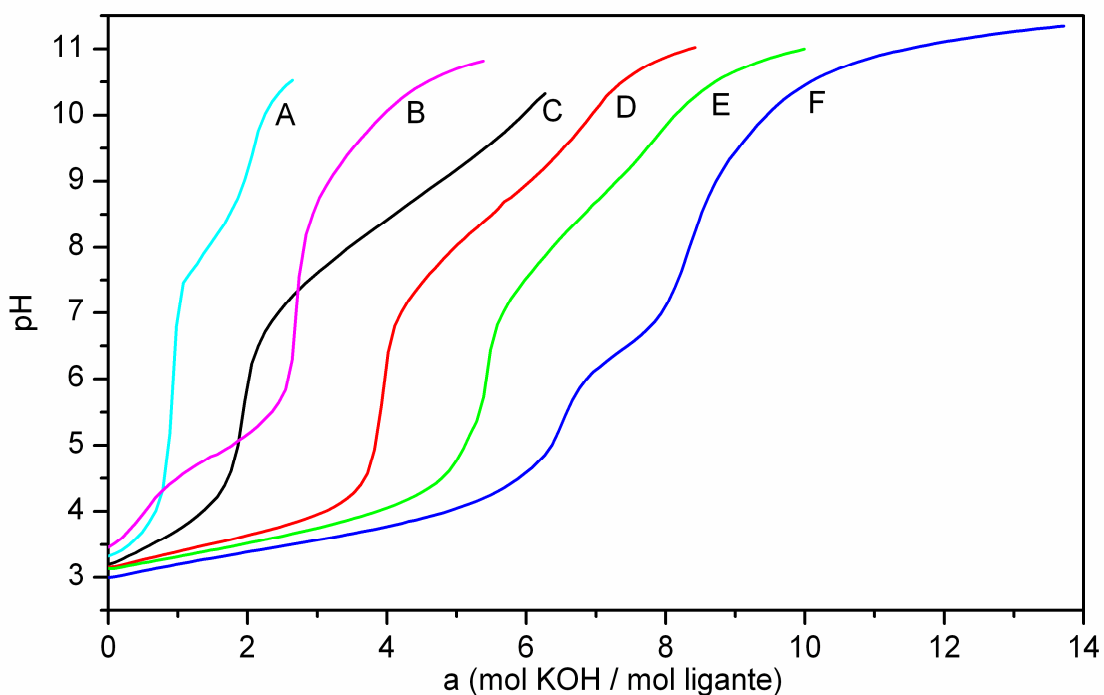


Figura 29. Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema ternário BMXD-Cu(II)-AA: A - 0,050 mmol de AA; B - 0,050 mmol de AA e 0,050 mmol de Cu(II); C - 0,050 mmol de BMXD; D - 0,050 mmol de BMXD e 0,050 mmol de Cu(II); E - 0,050 mmol de BMXD e 0,100 mmol de Cu(II); F - 0,050 mmol de BMXD, 0,100 mmol de Cu(II) e 0,050 mmol de AA, todas em 50mL de solução.

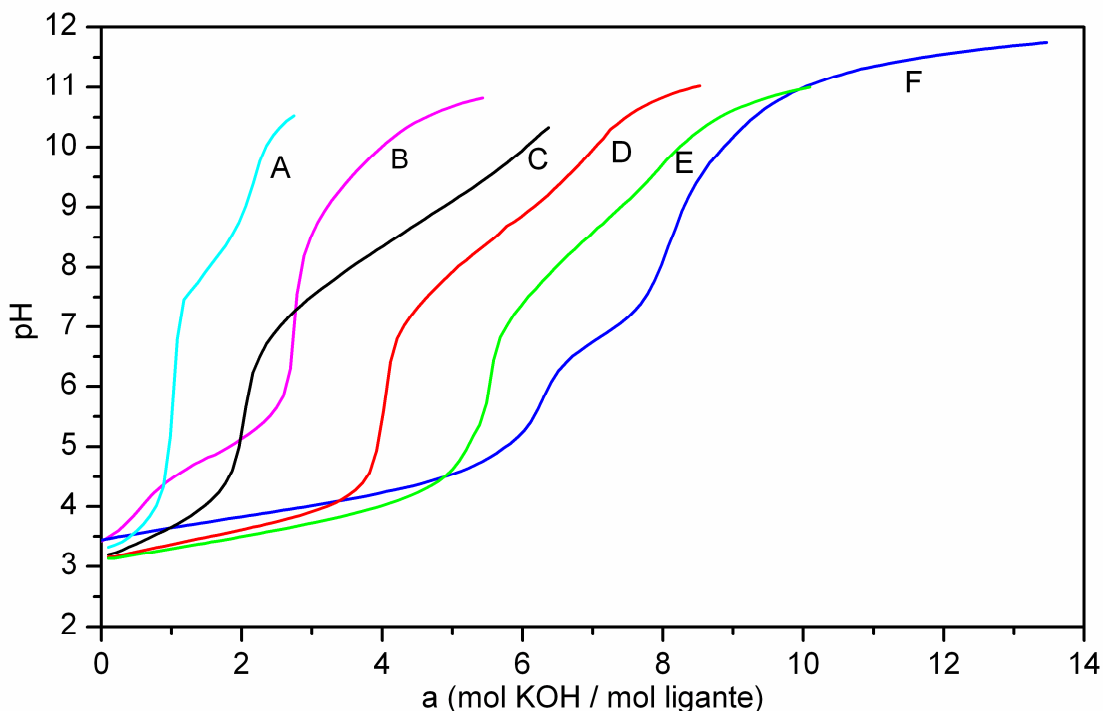


Figura 30. Curvas de equilíbrio potenciométrico para o sistema ternário BMXD - Cu(II)-GL: A - 0,050 mmol de GL; B - 0,050 mmol de GL e 0,050 mmol de Cu(II); C - 0,050 mmol de BMXD; D - 0,050 mmol de BMXD e 0,050 mmol de Cu(II); E - 0,050 mmol de BMXD e 0,100 mmol de Cu(II); F - 0,050 mmol de BMXD, 0,100 mmol de Cu(II) e 0,050 mmol de GL, todas em 50mL de solução.

A curva de equilíbrio potenciométrico do ligante BMXD (curva **C** das Figuras 28, 29 e 30) apresenta uma inflexão em $a = 2$, indicando o consumo de dois mols de KOH por mol de ligante, que corresponde à neutralização de dois prótons do ligante em valores de pH menores que 4,5. Na região tamponada de $a = 2$ a $a = 6$, são consumidos mais quatro mols de KOH por mol de ligante correspondentes a neutralização de mais quatro prótons.

As curvas **A** nas Figuras 28, 29 e 30 representam as titulações da GG, AA e da GL, respectivamente. Todas possuem um comportamento semelhante, com duas regiões tamponadas: uma em meio ácido e outra em valores de pH de 8 à 9. Esses tampões correspondem as neutralizações dos prótons do grupo carboxílico e do grupo amino do peptídeo. As curvas **B** representam as titulações potenciométricas dos sistemas peptídeo-cobre(II). Em presença do íon cobre(II), ocorre uma inflexão

em $a = 3$, correspondendo a neutralização de três prótons do dipeptídeo, referente a desprotonação dos grupos carboxílico, amino e amida. O consumo adicional de base indicado pela segunda região tamponada (8.5-10.5) é devido a formação de espécies mono e dihidróxidas dos complexos peptídeo-Cu(II).

Os logaritmos das constantes de protonação do ligante BMXD e das constantes de equilíbrio das espécies formadas nos sistemas: BMXD-Cu(II) (Tabela 8) e peptídeos-Cu(II) (Tabela 9), foram determinadas. Esses valores estão em concordância com os valores encontradas na literatura para sistemas análogos.^{116,119-121}

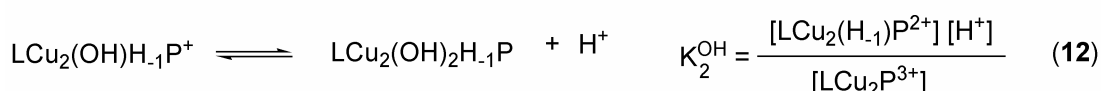
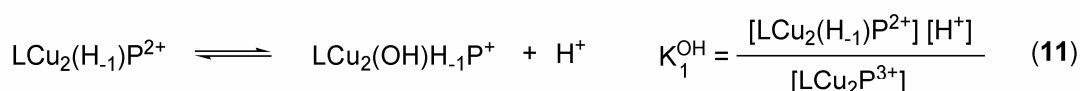
Tabela 8. Logaritmos das constantes de protonação do BMXD e de equilíbrio das espécies do sistema BMXD-Cu(II).

Quociente de Equilíbrio	Log K
$[H_6L] / [H_5L][H]$	3,19(2)
$[H_5L] / [H_4L][H]$	3,80(1)
$[H_4L] / [H_3L][H]$	7,01(7)
$[H_3L] / [H_2L][H]$	7,89(6)
$[H_2L] / [HL][H]$	8,70(3)
$[HL] / [L][H]$	9,49(5)
$[LCu] / [Cu][L]$	13,65(7)
$[LCuH] / [LCu][H]$	8,38(4)
$[LCuH_2] / [LCuH][H]$	7,19(2)
$[LCuH_3] / [LCuH_2][H]$	3,65(2)
$[LCu(OH)][H] / [LCu]$	-8,98(4)
$[LCu_2] / [CuL][L]$	10,75(6)
$[Cu_2L(OH)][H] / [LCu_2]$	-7,80(5)
$[LCu_2(OH)_2][H] / [Cu_2L(OH)]$	-8,12(3)

Tabela 9. Logaritmos das constantes de protonação dos dipeptídeos e de equilíbrio das espécies nos sistemas dipeptídeos-Cu(II).

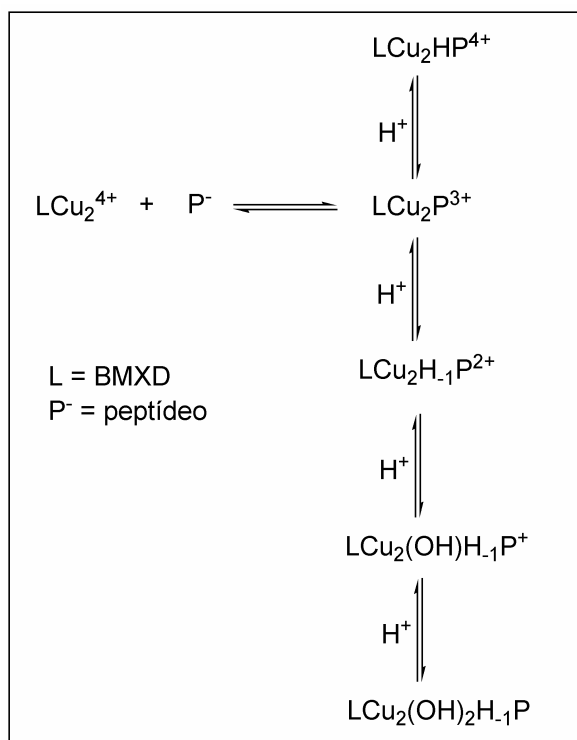
Quociente de Equilíbrio	GG Log K	AA Log K	GL Log K
$[HP] / [P][H]$	8,10(3)	8,17(5)	8,21(3)
$[H_2P] / [HP][H]$	2,95(7)	3,07(4)	3,13(2)
$[CuP] / [Cu][P]$	5,34(4)	5,37(5)	5,60(5)
$[Cu(H_{-1}L)][H] / [CuP]$	-3,65 (7)	-3,99(4)	-4,60(7)
$[Cu(OH)(H_{-1}L)][H] / [Cu(H_{-1}L)][H]$	-8,89(2)	-9,12(6)	-9,33(8)
$[Cu(OH)_2(H_{-1}L)][H] / [Cu(OH)(H_{-1}L)]$	- 11,06(8)	- 11,17(3)	—

As constantes de formação dos sistemas ternários BMXD-Cu(II)-dipeptídeos 1:2:1 são definidas pelas Equações 8-12, onde LCu_2^{4+} é o complexo receptor binuclear BMXD-Cu(II), e P^- é a forma não-protonada dos peptídeos. LCu_2HP^{4+} é a forma mono-protonada do complexo ternário e $LCu_2H_{-1}P^{2+}$ é a forma do complexo com o grupo amida, do peptídeo, desprotonado. As espécies hidróxidas são a mono, $LCu_2(OH)H_{-1}P^+$ e a dihidróxida, $LCu_2(OH)_2H_{-1}P$.



4.2.5.1 Sistema formado pelas espécies BMXD- Cu(II)-GG

A curva de titulação potenciométrica correspondente ao sistema BMXD-Cu(II)-GG 1:2:1 é mostrado na Figura 28 (curva F). A curva foi analisada, e foi detectada a formação dos seguintes complexos: $\text{LCu}_2\text{P}^{3+}$, $\text{LCu}_2\text{HP}^{4+}$, $\text{LCu}_2\text{H}_{-1}\text{P}^{2+}$ e $\text{LCu}_2(\text{OH})_x\text{H}_{-1}\text{P}^{3-x}$, onde $x = 1, 2$. Os equilíbrios de formação desses complexos são definidos pelas Equações 8 -12. As espécies detectadas são mostradas no Esquema 7 e os valores das constantes dos equilíbrios aparecem na Tabela 10 e são comparados com os valores encontrados na literatura.^{112,116}



Esquema 7. Formação das espécies ternárias LCu_2 -peptídeo.

Tabela 10. Logaritmos das constantes de estabilidade para os complexos ternários BMXD-Cu(II)-peptídeos(GG, AA, GL).

Quociente de Equilíbrio	GG	AA	GL
	Log K	Log K	Log K
$[\text{LCu}_2\text{P}^{3+}] / [\text{LCu}_2^{4+}][\text{P}^-]$	8,13(4)	8,01(5)	5,61(2)
$[\text{LCu}_2\text{HP}^{4+}] / [\text{LCu}_2\text{P}^{3+}][\text{H}^+]$	5,38(7)	5,45(4)	-
$[\text{LCu}_2\text{H}_{-1}\text{P}^{2+}][\text{H}^+] / [\text{LCu}_2\text{P}^{3+}]$	-6,32(2)	-6,92(8)	-7,21(5)
$[\text{LCu}_2\text{H}_{-1}(\text{OH})\text{P}^+] / [\text{LCu}_2\text{H}_{-1}\text{P}^{2+}]$	-8,19(7)	-8,35(6)	-9,80(3)
$[\text{LCu}_2\text{H}_{-1}(\text{OH})_2\text{P}] / [\text{LCu}_2\text{H}_{-1}(\text{OH})\text{P}^+]$	-10,35(2)	-10,48(9)	-

A espécie $\text{LCu}_2\text{H}_{-1}\text{P}^{2+}$ é formulada como o complexo contendo o peptídeo desprotonado ao invés de um complexo hidróxido. A desprotonação da ligação amida em peptídeos pela coordenação do íon Cu(II) ocorre em valores de pH baixos ou levemente ácidos, enquanto que a formação de espécies hidróxidas ocorre em valores de pH básicos.⁹⁴ A desprotonação da GL (7,21) ocorre em pH mais elevado do que a AA (6,92) e a GG (6,32). O aumento do impedimento espacial do peptídeo na coordenação, na cavidade do complexo receptor, pelo acréscimo de um grupo metila, CH_3 , e um grupo terc-butila, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$, à GG parece dificultar a coordenação do peptídeo ao centro bimetálico de cobre(II), elevando o pH da desprotonação. Além disso, a associação do dipeptídeo também diminui, como mostram as constantes de associação para a GG (8,13), AA (8,01) e GL (5,61). Esse comportamento também é observado na desprotonação da ligação amida pelo íon Cu(II) na formação do complexo CuP (-3,65, -3,99 e -4,60, para GG, AA e GL, respectivamente, Tabela 9). O valor ligeiramente alcalino para a desprotonação da amida na glicil-l-leucina não é único. Registros de complexos binários do 2,2' bipyridil e glicil derivados, mostram que a desprotonação do grupo amida ocorre com $\text{pK}^{\text{H}} = 7,71 \pm 0,06$ (glicinamida); $7,77 \pm 0,04$ (gliciglicinato), $7,4 \pm 0,02$ (gliciglicinamida); $8,17 \pm 0,13$ (triglicinato) e $7,5 \pm 0,01$ (tetraglicinato).¹¹¹ Estudos dos sistemas cobre(II)-histamina ou histidina-dipeptídeos também mostram que a desprotonação da ligação amida de dipeptídeos ocorre com $\text{pK}^{\text{H}} = 7,49$ (L = glicilglicina); $7,64$ (L

=glicil-I-alanina) e 8,06 (L = glicil-I-leucina) para o sistema cobre (II) histamina dipeptídeo a 37 °C.¹²³

Pelo diagrama de distribuição das espécies para o sistema BMXD-Cu(II)-GG (Figura 31), observamos que a coordenação do peptídeo começa no pH 2 e o complexo protonado, $\text{LCu}_2\text{HP}^{4+}$, atinge o máximo de formação (91%) a pH 3,4, decrescendo em valores maiores de pH, dando espaço para a formação da espécie $\text{LCu}_2\text{P}^{3+}$, que atinge o máximo de formação (57%) a pH 5,8 e decresce a valores de pH mais altos onde a espécie amida desprotonada, $\text{LCu}_2\text{H}_{-1}\text{P}^{2+}$ aumenta e chega a um máximo a pH 7,3 com 80% de formação. Em valores de pH mais elevados aparece a espécie monohidróxida, $\text{LCu}_2\text{H}_{-1}(\text{OH})\text{P}^+$, que atinge o máximo de formação a pH 9,3, quando está 85% formada, e a espécie dihidróxida, $\text{LCu}_2\text{H}_{-1}(\text{OH})_2\text{P}$, predomina a valores de pH acima de 10,5.

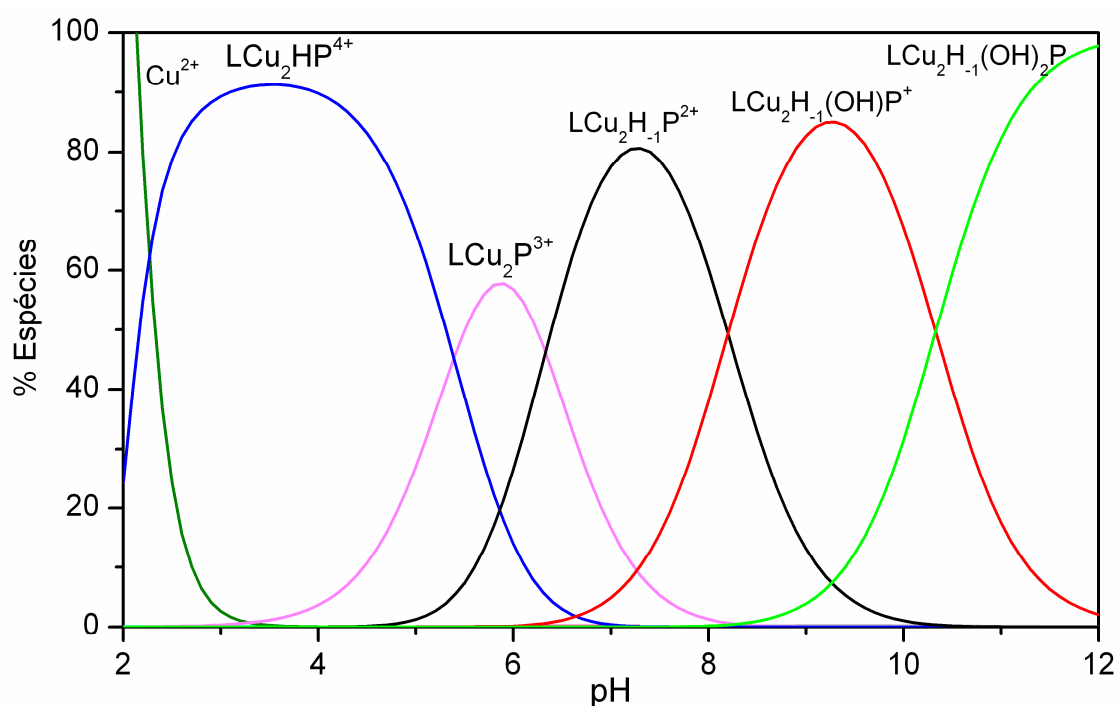


Figura 31. Diagrama de distribuição das espécies presentes no sistema BMXD - Cu(II)-GG na proporção 1: 2:1.

4.2.5.2 Sistema formado pelas espécies BMXD-Cu(II)-AA

As curvas de titulação potenciométrica para este sistema estão representadas na Figura 29. Elas são similares ao sistema BMXD-Cu(II)-GG (Figura 28). As

constantes de equilíbrios definidos pelas Equações 8-12, foram determinadas e são mostradas na Tabela 10. Esses resultados similares aos obtidos para o sistema da GG, sugerem que a presença de um metil substituinte na estrutura do dipeptídeo afeta muito pouco a estabilidade do complexo.^{59,112} No diagrama de distribuição das espécies (Figura 32), a espécie $\text{LCu}_2\text{P}^{3+}$ tem um máximo de formação em pH 6,2 onde está 71% formada. Ela diminui em valores de pH mais baixos para formar a espécie protonada, $\text{LCu}_2\text{HP}^{4+}$, que está 91% formada em pH 3,5. A espécie amida desprotonada, $\text{LCu}_2\text{H}_{-1}\text{P}^{2+}$, atinge o máximo de formação (71%) em pH 7,6 e decresce em valores de pH mais elevados, originando as espécies hidróxidas : $\text{LCu}_2\text{H}_{-1}(\text{OH})\text{P}^+$ e $\text{LCu}_2\text{H}_{-1}(\text{OH})_2\text{P}$. A espécie monohidróxida predomina em valores de pH acima de 8,5, atingindo um máximo de formação em pH 9,4 onde está 84 % formada e decresce em valores de pH mais elevados, dando espaço para a formação da espécie dihidróxida, que predomina acima de pH 8,4

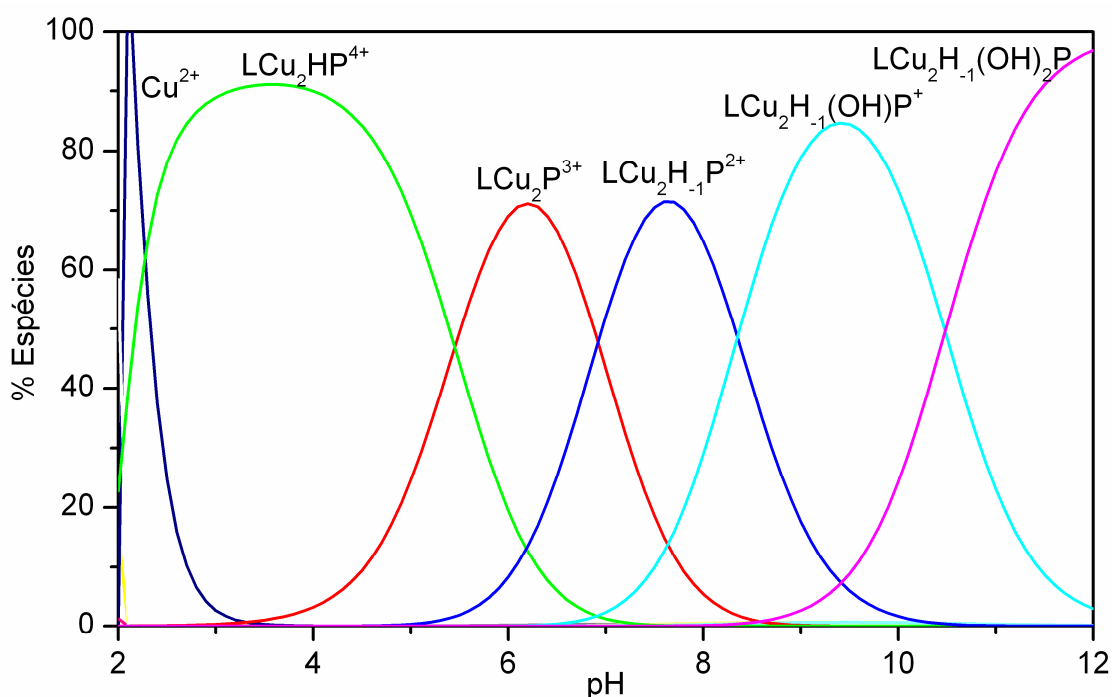


Figura 32. Diagrama de distribuição das espécies presentes no sistema BMXD-Cu(II)-AA na proporção 1:2:1.

4.2.5.3 Sistema formado pelas espécies BMXD-Cu(II)-GL

As espécies detectadas neste sistema estão representadas no esquema 7 e as curvas de distribuição dessas espécies são mostradas na Figura 33. As constantes dos equilíbrios definidas pelas Equações 8, 10 e 11 aparecem na Tabela 10. A associação da GL ao complexo receptor (5,61) é 2,5 unidades logarítmicas menor do que as associações dos dipeptídeos GG e AA (Tabela 10, em contraste com os resultados observados para as interações dos dipeptídeos com o íon Cu(II) livre, que apresentam valores da constante de associação similares nos três casos.¹¹² A baixa constante de associação do substrato GL ao complexo receptor reflete um comportamento de reconhecimento molecular, onde o substrato mais volumoso interage mais fracamente com o centro bimetálico do complexo receptor. Como consequência de sua menor estabilidade, os complexos ternários deste sistema começam a se formar em valores de pH mais elevados. Pelo diagrama de distribuição das espécies (Figura 33) observa-se que a espécie protonada não se forma e espécie LCu_2P^{3+} está somente 49% em pH 6,6. A espécie amida desprotonada, $LCu_2H_{-1}P^{2+}$, atinge o máximo de 64% em pH 8,2 e a espécie hidróxida, $LCu_2H_{-1}(OH)P^+$, está somente 26% formada no pH 10,8. Uma boa parte dos complexos receptores ficam em solução sem o substrato associado (não mostrados na figura).

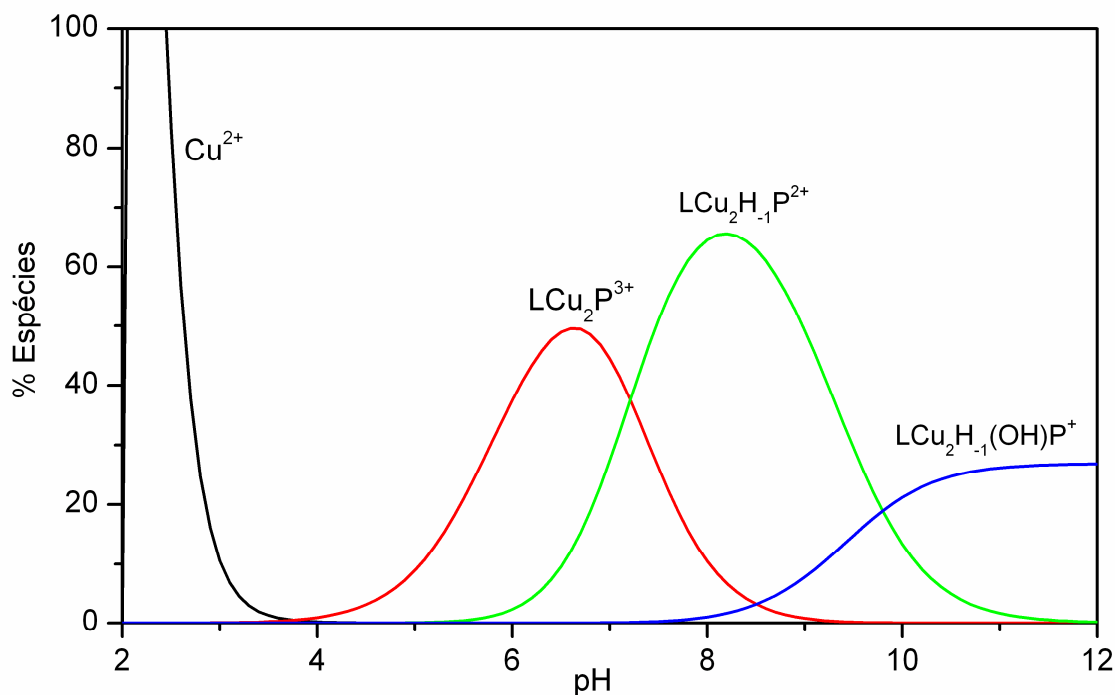


Figura 33. Diagrama de distribuição das espécies ternárias presentes no sistema BMXD-Cu(II)-GL na proporção 1:2:1.

4.2.6 Estudos de equilíbrio potenciométrico do complexo binuclear de ferro(III) [Fe₂(HPCINOL)₂(SO₄)₂(μ-O)] (1)

A titulação potenciométrica foi realizada com o intuito de avaliar o comportamento do complexo **1**, em solução aquosa. A estrutura cristalina desse complexo (Figura 11) revela a ausência de moléculas de água coordenada aos íons ferro. Esses experimentos foram realizados para avaliar a presença de moléculas de água coordenadas aos centros metálicos, quando o complexo se encontra em solução.

A curva de titulação potenciométrica (Figura 34) apresenta duas regiões tamponadas, de $a = 0$ a $a = 2$ e de $a = 2$ a $a = 4$.

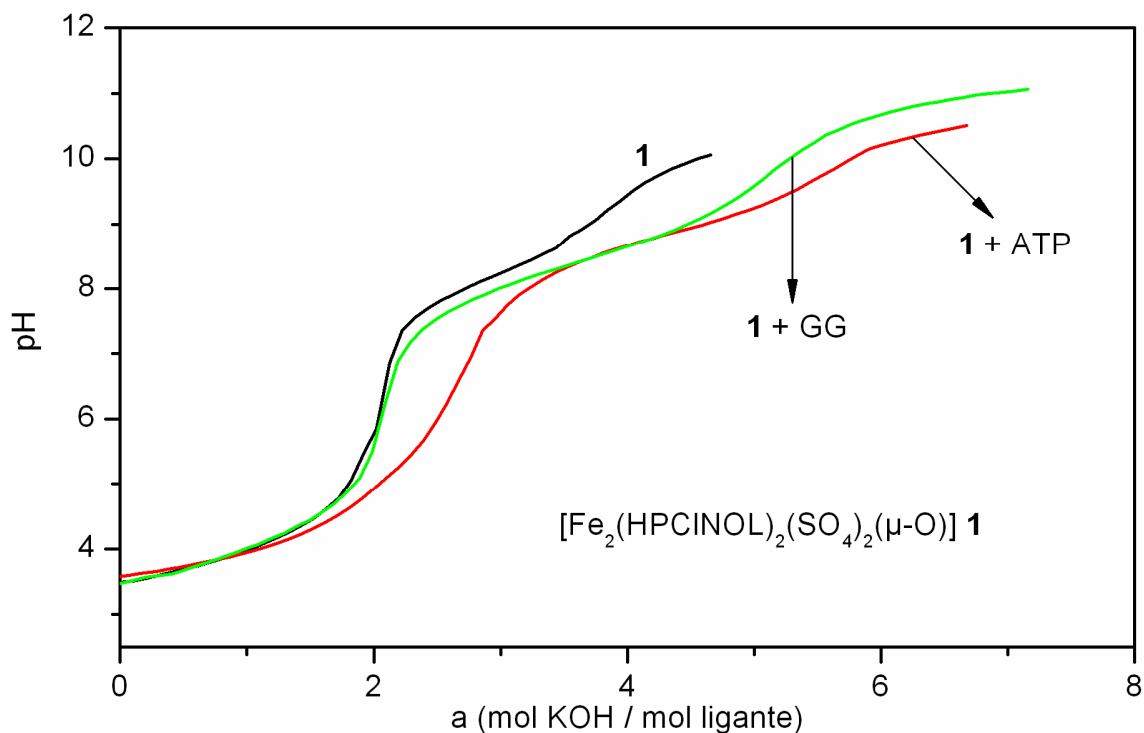
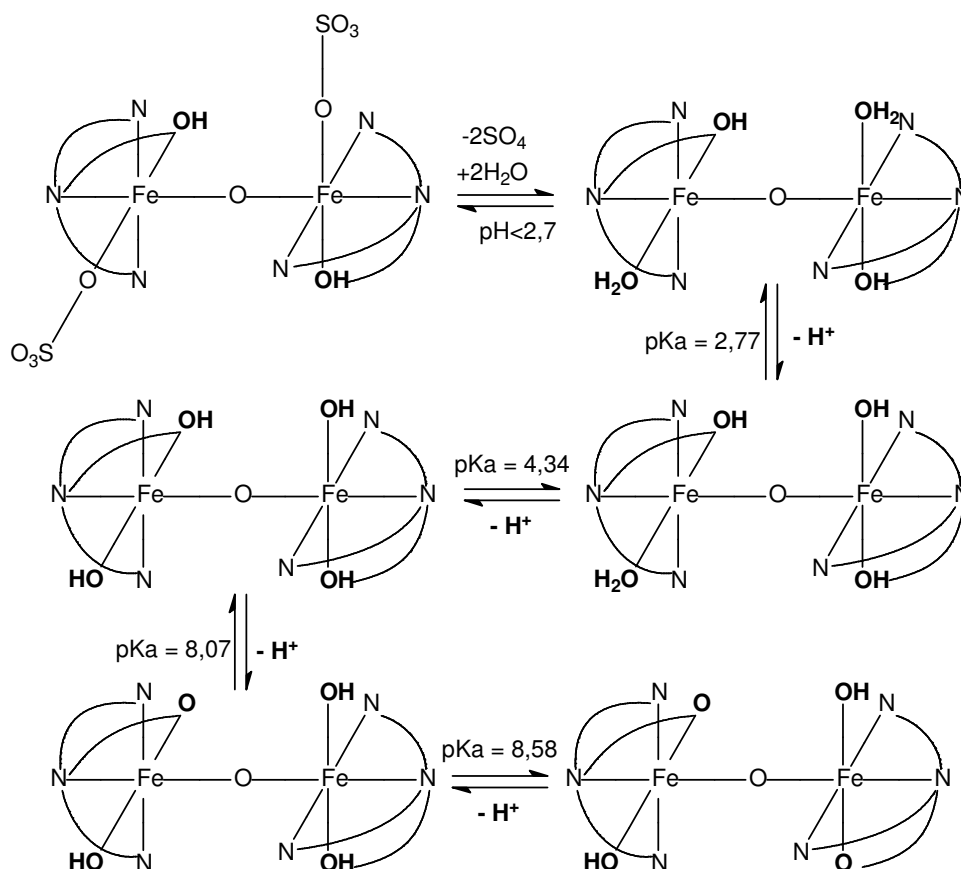


Figura 34. Curvas de titulação potenciométrica para o sistema binário complexo (1) – Substrato (ATP e GG).

A solubilização do complexo em água resulta na substituição dos grupos sulfatos, que são liberados da esfera de coordenação do centro bimetálico, dando lugar a duas moléculas de água, formando a espécie diaquo. Quatro equilíbrios ácido-básicos foram detectados. Eles são interpretados como sendo a desprotonação de duas moléculas de água coordenadas ao centro bimetálico, na primeira região tamponada, e a desprotonação dos dois braços alcoólicos do complexo dímero, na segunda região tamponada (Esquema 8).



Esquema 8. Proposta para os equilíbrios observados para o complexo (1).

Os logaritmos das constantes dos equilíbrios detectados foram calculados e aparecem na Tabela 11. Essas constantes foram utilizadas para gerar as curvas de distribuição das espécies detectadas, que são mostradas na Figura 35 e Esquema 8. A concentração da espécie diaquo, espécie **A**, que se forma em valores de pH bem ácidos, decresce com o aumento do pH, dando espaço para a formação da espécie hidróxida **B**, que atinge um máximo de formação de 75 % em pH 3,5. Aumentando-se o pH, essa espécie decresce e se forma a espécie dihidróxida, espécie **C**, proveniente da desprotonação da segunda molécula de H_2O coordenada ao centro bimetalico. Essa espécie apresenta um máximo de formação de 97 % em pH 6,2. Em valores de pH mais elevados tem-se as espécies alcoóxidas desprotonadas (desprotonação do grupo álcool do ligante) que se formam pela desprotonação de um álcool em cada molécula de ligante do complexo dímico. A espécie monoalcoóxida desprotonada, espécie **D**, atinge um máximo de formação de 47 %

em pH 8,3, e a espécie dialcoóxida desprotonada, espécie **E**, predomina em valores de pH maiores que 8,7, atingindo 100 % de formação em pH 11.

Tabela 11. Logaritmos das constantes de equilíbrio do complexo (1).

<i>Quociente de equilíbrio</i>	Log K
$[\text{Fe}_2(\text{OH}_2)(\text{OH})\text{L}_2][\text{H}^+] / [\text{Fe}_2(\text{OH}_2)_2\text{L}_2]$	-2,70 (3)
$[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{L}_2][\text{H}^+] / [\text{Fe}_2(\text{OH}_2)(\text{OH})\text{L}_2]$	-4,34 (5)
$[\text{Fe}_2(\text{OH})_2(\text{H}_{-1})\text{L}_2][\text{H}^+] / [\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{L}_2]$	-8,07 (4)
$[\text{Fe}_2(\text{OH})_2(\text{H}_{-1})_2\text{L}_2][\text{H}^+] / [\text{Fe}_2(\text{OH})_2(\text{H}_{-1})\text{L}_2]$	-8,58 (2)

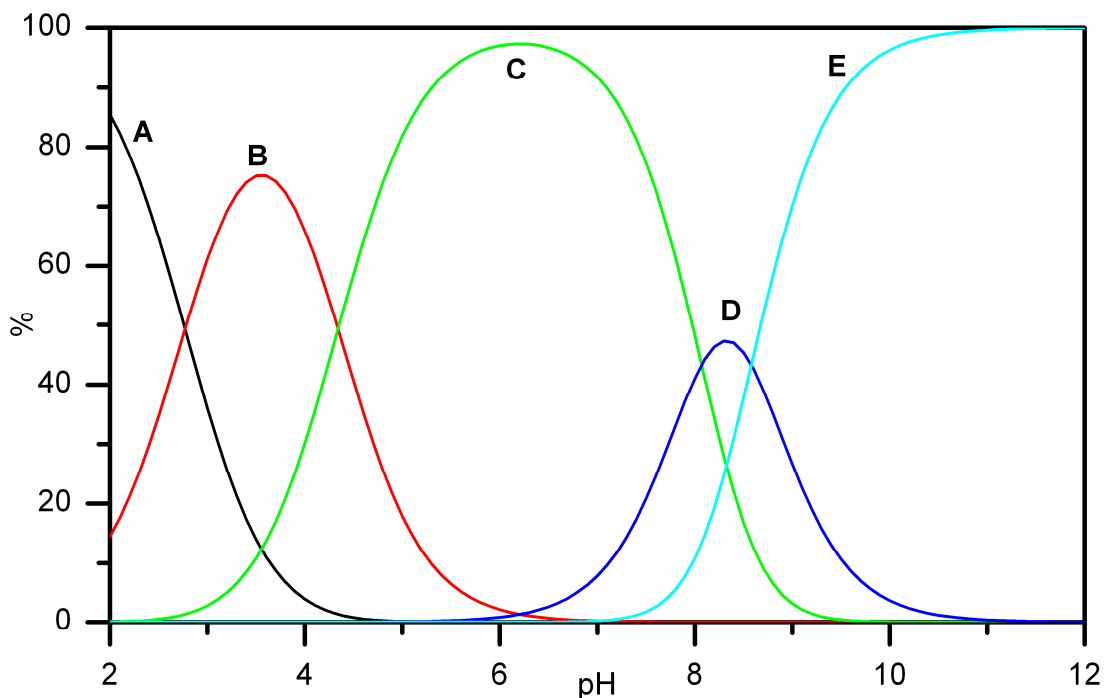


Figura 35. Diagrama de distribuição das espécies para o complexo 1 em função do pH. Onde A = $[\text{Fe}_2(\text{OH}_2)_2\text{L}_2]$, B = $[\text{Fe}_2(\text{OH}_2)(\text{OH})\text{L}_2]$, C = $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{L}_2]$, D = $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2(\text{H}_{-1})\text{L}_2]$, E = $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2(\text{H}_{-1})_2\text{L}_2]$.

4.2.6.1 Estudo de equilíbrio das associações do ATP e da GG com o complexo (1)

Nesta etapa, são descritas, as associações dos substratos: 5' trifosfato de adenosina (ATP) e glicilglicina (GG) com o complexo binuclear de ferro(III). As curvas de titulação potenciométrica aparecem na Figura 34. A curva **1** é a curva do complexo sozinho e as outras duas são as curvas do complexo na presença do ATP (curva vermelha), e da glicilglicina (curva verde). A curva vermelha (**1 + ATP**) não é coincidente com a curva **1** desde valores de pH menores do que 4,0, indicando que a associação do ATP já ocorre em valores de pH baixos. A curva **1** e a curva **1 + GG** apresentam uma região tamponada no intervalo de pH de 3,6 até 5,0; com uma inflexão em $a = 2$ mols de base por mol de ligante. Elas são coincidentes até pH 6,0; indicando que na associação da glicilglicina ocorre a formação de uma espécie protonada. A neutralização adicional de três prótons, além do próton do substrato, na região tamponada que vai do pH 7,7 até 10; indica que na associação da glicilglicina pelo complexo **1**, ocorre a formação de espécies desprotonadas e hidróxidas. O mesmo é observado para a curva de **1 + ATP**, onde o consumo adicional de base para neutralizar três prótons, além dos dois do substrato, na região tamponada que vai do pH 8,0 até 10, indica que na associação do ATP pelo complexo **1**, ocorre a formação de espécies desprotonadas e hidróxidas.

Os valores dos logaritmos das constantes de equilíbrio aparecem na Tabela 12. A associação do ATP (10,80) ao complexo **1** é duas unidades logaritmas maior do que a associação da glicilglicina (8,76), devido a interação do ATP ocorrer na parte fosfato com o centro bimetálico de ferro(III) (um íon duro que interage muito bem com bases duras como o trifosfato). Essas constantes foram utilizadas na obtenção das curvas de distribuição das espécies detectadas (Figuras 36 e 37).

Tabela 12. Logaritmos das constantes de equilíbrio para o sistema binário complexo (1) + substrato (ATP, GG).

Quociente de Equilíbrio	ATP Log K	Glicilglicina Log K
$[C_1S] / [C_1][S]$	10,80(7)	8,76(3)
$[C_1HS] / [C_1S][H]$	4,02(5)	4,21(2)
$[C_1(OH)S][H] / [C_1S]$	4,32 (5)	4,29 (6)
$[C_1(OH)(H_{-1})S][H] / [C_1(OH)S]$	-7,82(7)	-7,92(4)

A associação do ATP com o complexo **1**, forma o C_1S (C_1ATP), que está 40 % formado em pH 4,2. Esse complexo sofre uma protonação no ATP associado ($pK_a = 4,02$) formando a espécie protonada, C_1HS (C_1HATP), que atinge um máximo de formação de 93 % em pH = 2,4. Em valores de pH acima de 4,2; a espécie C_1S (C_1ATP) decresce e a espécie hidróxida $C_1(OH)S$ ($C_1(OH)ATP$) passa a predominar em solução. Essa espécie se forma pela dissociação de uma molécula de água coordenada ao centro bimetálico de ferro (III) e predomina no intervalo de pH 4,2 - 7,7, atingindo um máximo de 93,5 % formada em pH 6,0 (Figura 36). No intervalo de pH 7,8-9,0; predomina a espécie com o braço alcoólico desprotonado ($pK_a = 7,82$), $C_1(OH)(H_{-1})S$ ($C(OH)H_{-1}ATP$). A partir de pH neutro o substrato começa a se soltar do complexo receptor, forçado pela dissociação de mais uma água que vai se coordenando e pela desprotonação do segundo braço alcoólico. Esses dois fenômenos combinados empurram o substrato para a solução, que fica 100 % solto em pH 11. O complexo **1** fica então, na forma de uma espécie dihidróxida e com os dois braços alcoólicos desprotonados e coordenados, $C_1(OH)_2(H_{-1})_2$. Essa espécie predomina em valores de pH maiores do que 9,0.

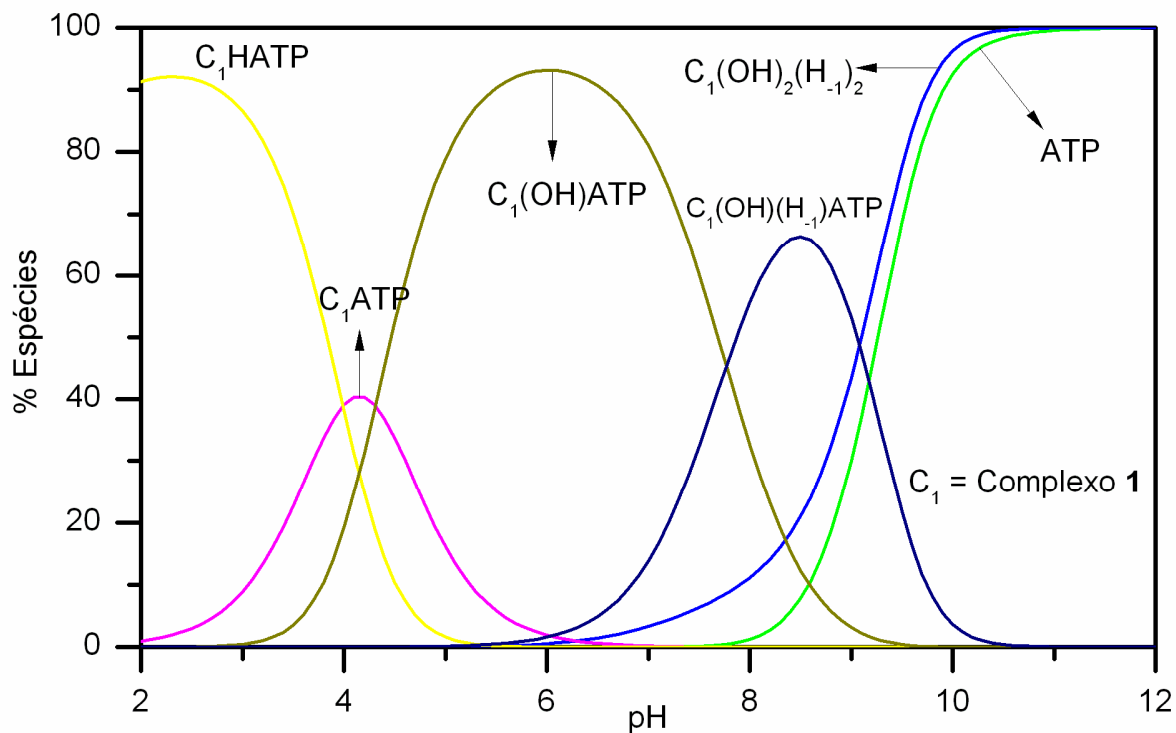


Figura 36. Gráfico de distribuição das espécies formadas pela associação do ATP com o complexo 1 (C_1) em função do pH, onde C_1ATP é o complexo binário formado, C_1HATP é a espécie protonada, $C_1(OH)ATP$ é uma espécie hidróxida e a outra espécie hidróxida é a $C_1(OH)H_{-1}ATP$ que apresenta um braço alcoólico desprotonado.

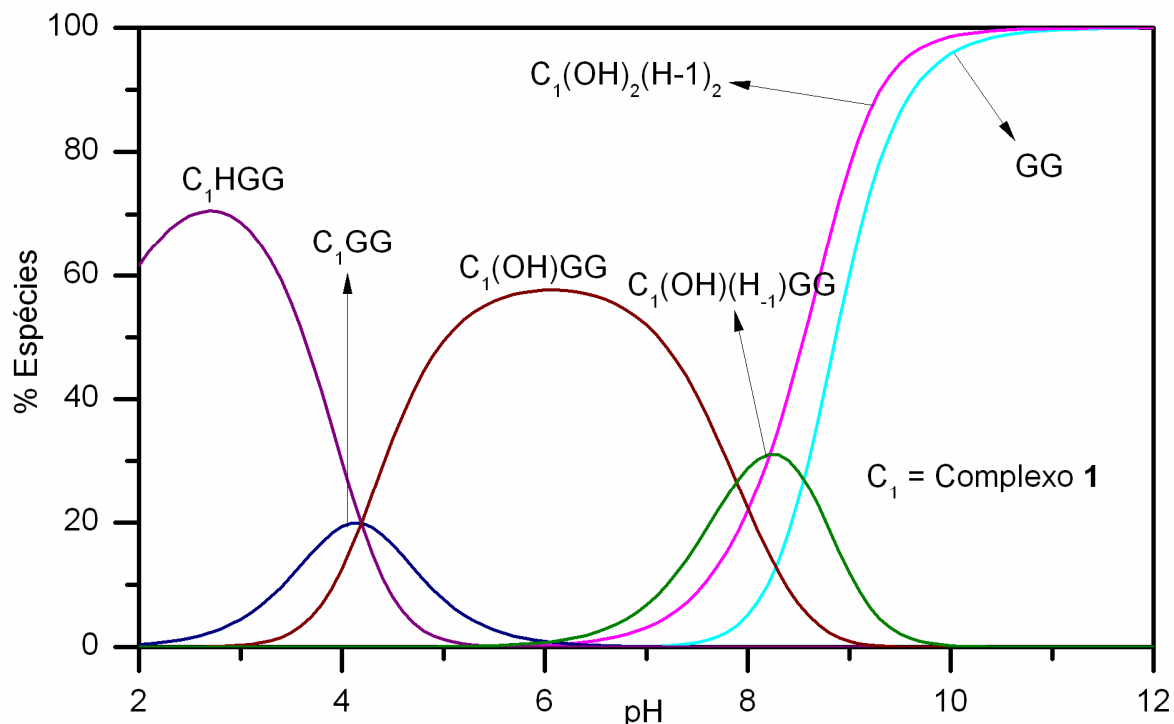


Figura 37. Gráfico de distribuição das espécies formadas pela associação da GG com o complexo 1 (C_1) em função do pH, onde C_1GG é o complexo binário formado, C_1HGG é a espécie protonada, $C_1(OH)GG$ é uma espécie hidróxida e a outra espécie hidróxida é a $C_1(OH)H_{-1}S$, que apresenta um braço alcoólico desprotonado.

A Figura 37 mostra as espécies detectadas no sistema complexo 1 - GG. A associação da GG com o complexo 1 forma o C_1GG , que está apenas 20 % formado em pH 4,1. Esse complexo sofre uma protonação na GG associada ($pK_a = 4,21$, Tabela 1) formando a espécie protonada, C_1HGG , que atinge um máximo de formação de 70 % em $pH = 2,7$. Em valores de pH acima de 4,2; a espécie C_1GG decresce e a espécie hidróxida passa a predominar em solução. Assim como no sistema com o ATP, essa espécie se forma pela dissociação de uma molécula de água coordenada ao centro bimetálico de ferro(III) e predomina no intervalo de pH 4,2-7,8, atingindo um máximo de 57 % formada em $pH 6,0$. Essa espécie está menos formada do que no sistema com o ATP. Isso é um reflexo da constante de associação da glicilglicina ser duas unidades logarítmicas menor do que a constante de associação do ATP. Em valores de pH mais elevados, essa espécie decresce, dando espaço para a formação da espécie com o braço alcoólico desprotonado ($pK_a = 7,92$), $C_1(OH)H_{-1}GG$. A partir de pH neutro o substrato começa a se soltar do complexo receptor, forçado pela dissociação de mais uma água que vai se

coordenando e pela desprotonação do segundo braço alcoólico. Assim como foi observado anteriormente com o ATP, esses dois fenômenos combinados empurram o substrato para a solução, que fica 100 % solto em pH 11. O complexo **1** fica então sozinho, na forma de uma espécie dihidróxida e com os dois braços alcoólicos desprotonados e coordenados, $C_1(OH)_2(H_{-1})_2$. Essa espécie predomina em valores de pH maiores do que 8,5.

4.2.7 Estudos de equilíbrio potenciométrico do complexo binuclear de níquel $[Ni_2(HBPCINOL)_2(OAc)](ClO_4)$ (**2**)

Os estudos de titulação potenciométrica do complexo **2** foram realizados em solução etanol/água (70:30% v/v) devido à baixa solubilidade do mesmo em água. A estrutura cristalina desse complexo (Figura 12) revela a ausência de moléculas de água coordenada aos íons níquel.¹¹³ Esses experimentos foram realizados para verificar a presença de moléculas de água coordenadas aos centros metálicos, quando o complexo se encontra em solução. Devido à labilidade dos grupos ponte, estes podem ser substituídos por moléculas de água, que podem se dissociarem gerando hidróxido-complexos.

Em um complexo de ferro (III), $[Fe_2(BPCINOL)_2(OAc)]^+$, do mesmo ligante ($H_2BPCINOL$) foi reportado que o grupo ponte acetato (OAc) foi deslocado por moléculas de água em solução. A recristalização desse complexo em metanol/água resultou na formação do complexo diaquo $[Fe_2(BPCINOL)_2(H_2O)_2]^+$ que foi caracterizado por difração de raios X.¹⁰⁴

A curva de titulação potenciométrica do complexo **2** apresenta duas regiões tamponadas, uma no intervalo de pH 4-5 e a outra acima de pH 8 (Figura 38).

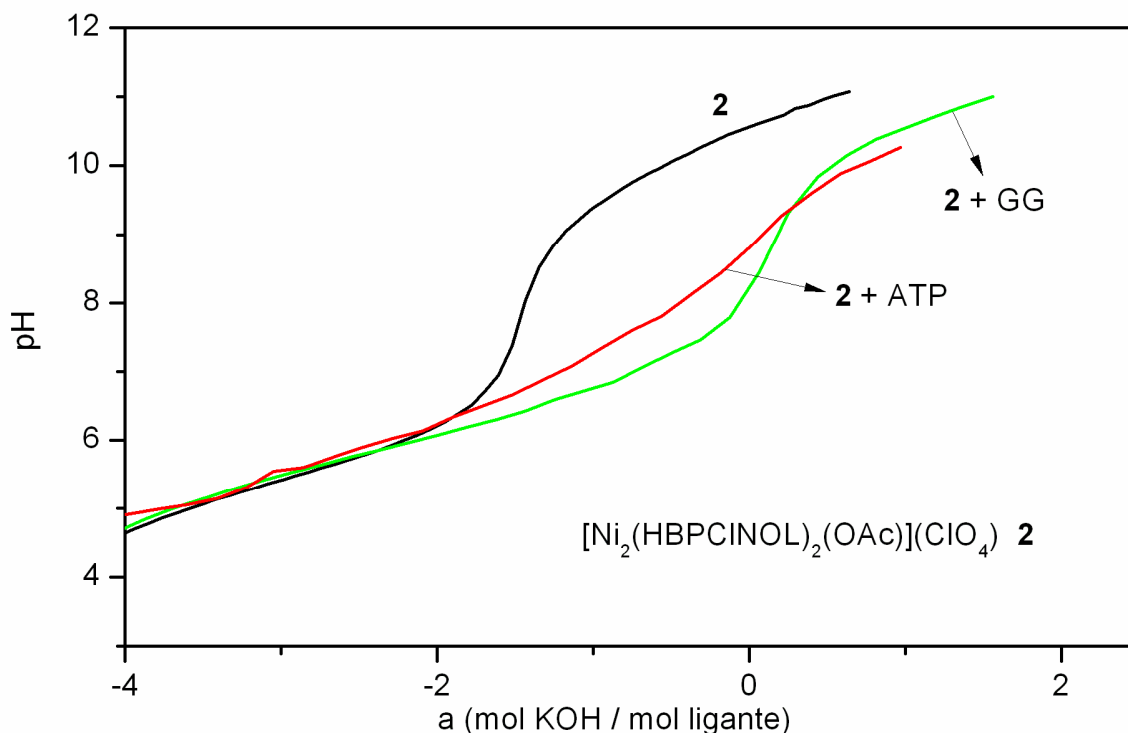


Figura 38. Curvas de titulação potenciométrica para o sistema binário complexo (**2**) – Substrato (ATP e GG).

A região tamponada ácida pode ser atribuída aos equilíbrios HOAc/OAc⁻ e fenol/fenolato, sugerindo que o complexo binuclear pode ser ‘quebrado’ em condições ácida/neutra de pH, resultando em compostos mononucleares. Essa proposta está de acordo com as análises de espectrometria de massas por eletrospray (ESI-MS), que mostra o íon mononuclear [Ni(H₂BPCINOL)₂(OAc)]⁺ (*m/z* = 423) em equilíbrio com os íons binucleares [Ni₂(HBPCINOL)₂(OAc)]⁺ e [Ni₂(HBPCINOL)₂(ClO₄)]⁺ em solução (ver seção 4.3.4).

Em valores de pH ácido os grupos acetato e o do fenolato do ligante, coordenado com o íon metálico, são protonados (pKa 4,98, 5,35 e 6,12, respectivamente (Tabela 13), resultando na ‘quebra’ da unidade binuclear [Ni₂(HBPCINOL)₂(OAc)]⁺ (Esquema 9, composto **F**). O pKa = 4,98 é atribuído ao equilíbrio envolvendo as espécies HOAc/OAc⁻. A presença do íon OAc⁻ resulta na formação do composto mononuclear contendo acetato coordenado (Esquema 9, composto **G**).

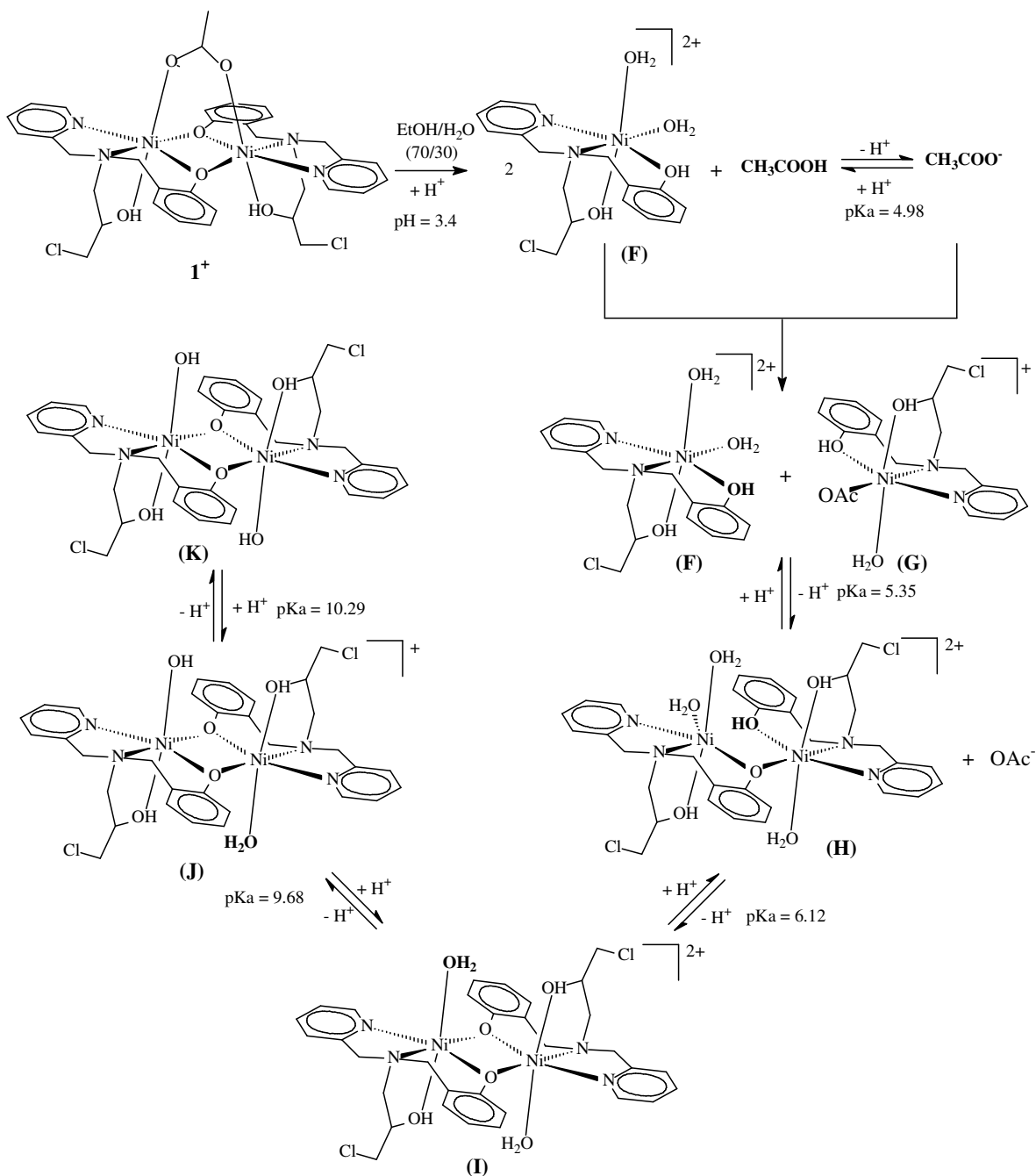
Tabela 13. Logaritmos das constantes de equilíbrio do complexo (2).

<i>Quociente de equilíbrio</i>	Log K
$[\text{Ni}_2(\text{OH})(\text{OH}_2)\text{L}_2][\text{H}^+] / [\text{Ni}_2(\text{OH}_2)_2\text{L}_2]$	-9,68 (7)
$[\text{Ni}_2(\text{OH})_2\text{L}_2][\text{H}^+] / [\text{Ni}_2(\text{OH})(\text{OH}_2)\text{L}_2]$	-10,29 (2)
$[\text{Ni}_2(\text{OH})_2\text{HL}_2] / [\text{Ni}_2(\text{OH})_2\text{L}_2][\text{H}^+]$	6,12 (3)
$[\text{Ni}(\text{OAc})\text{HL} + \text{NiHL}] / [\text{Ni}_2(\text{OH})_2\text{HL}_2][\text{H}^+]$	5,35 (3)
$[\text{HOAc}] / [\text{OAc}][\text{H}^+]$	4,98 (8)

Como o composto inicial $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{OAc})]^+$ tem o grupo acetato pontecendo os dois íons níquel, o composto mononuclear $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{BPCINOL})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (composto **F**) deve coexistir em solução com o composto **G**. Sob as condições empregadas nesse estudo, moléculas de água estão coordenadas, mantendo os íons níquel hexacoordenado, uma vez que equilíbrios de protonação/desprotonação consistentes com espécies aquo/hidroxo foram observadas em valores de pH mais alto.

A protonação dos grupos fenolatos leva a quebra do arranjo binuclear e a formação das espécies mononucleares **F** e **G**. A existência de dois valores distintos de pKa, 5,35 e 6,12 (Tabela 13) indica a presença em solução de dois compostos mononucleares diferentes (Esquema 9, compostos **F** e **G**). A desprotonação do primeiro fenol (pKa = 5,35) resulta no composto binuclear monoponte $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})(\text{H}_2\text{BPCINOL})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ (Esquema 9, composto **H**). A desprotonação do segundo (pKa = 6,12) resulta no composto binuclear diponte $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (Esquema 9, composto **I**), que é a espécie predominante na faixa de pH, que vai de 6,12 a 9,68 (Figura 39).

Pelo diagrama de espécies (Figura 39) observamos que o primeiro equilíbrio de protonação/desprotonação envolvendo as moléculas de água (Esquema 9, composto **J**) tem um valor de pKa = 9,68 para a primeira molécula de água. Acima desse valor a espécie aquo/hidroxo predomina, alcançando o máximo de 50% no pH 10,00.



Esquema 9. Proposta das espécies presentes em solução etanol/água (70:30% v/v) em diferentes pH's.⁹⁰

O pK_a da segunda molécula de água é de 10,29, formando a espécie dihidroxo [Ni₂(HBPCINOL)₂(OH)₂] (Esquema 9, composto **K**).

Comparando os valores de pK_a das moléculas de água desse complexo de níquel (II) com os valores de pK_a das moléculas de água do complexo de ferro(III), [Fe₂(BPCINOL)₂(H₂O)₂]⁺ (pK_{a1} = 5,00; pK_{a2} = 7,03),¹⁰⁴ confirma-se a maior acidez de Lewis para o íon ferro(III). Portanto, a presença de moléculas de água coordenadas

aos íons níquel, sob condições básicas, foi confirmada e esse complexo binuclear de níquel está sendo estudado como um possível modelo para a urease.¹¹³

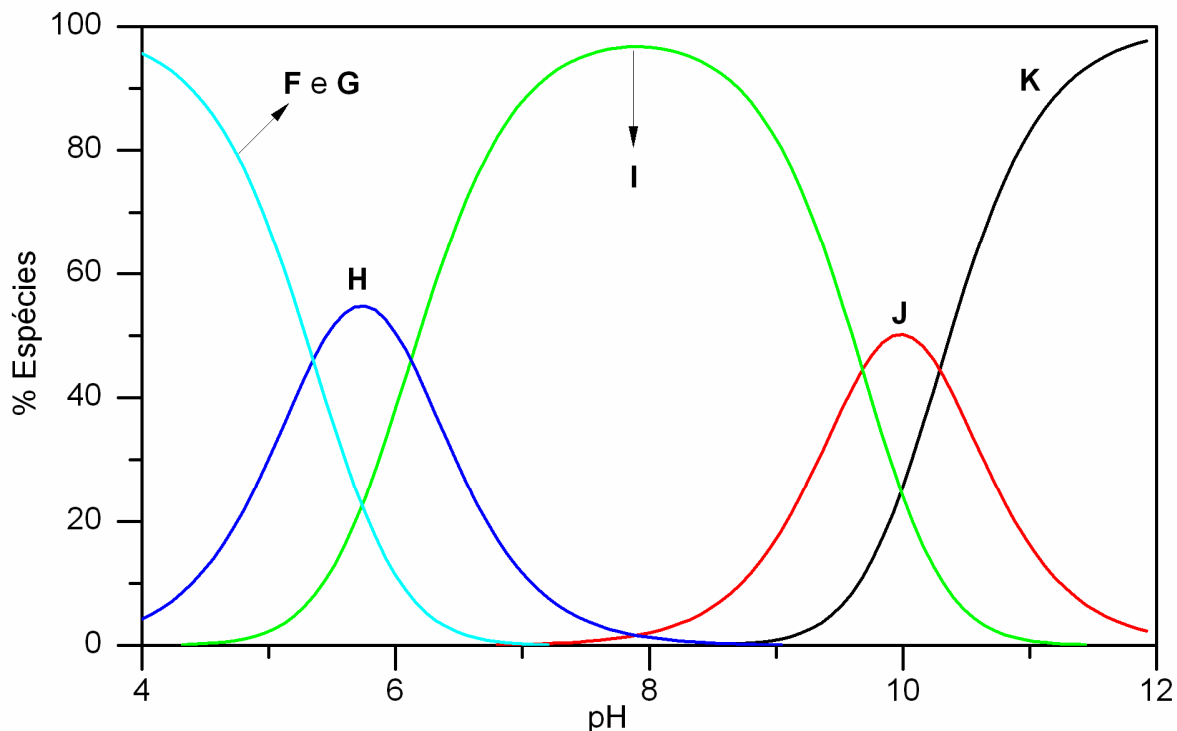


Figura 39. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o complexo (2) $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{OAc})]^+$. Onde **F** = $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{BPCINOL})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$; **G** = $[\text{Ni}_2(\text{H}_2\text{BPCINOL})(\text{OAc})(\text{H}_2\text{O})]^+$; **H** = $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})(\text{H}_2\text{BPCINOL})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$; **I** = $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$; **J** = $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^+$; **K** = $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{OH})_2]$.

4.2.7.1 Estudo de equilíbrio das associações do ATP e da GG com o complexo (2).

As curvas de titulação potenciométrica desses sistemas complexo-substrato são mostradas na Figuras 38. As inflexões nas curvas nos fornecem informações qualitativas sobre a estequiometria da solução. Os dados experimentais foram tratados e as constantes dos equilíbrios detectados foram calculadas (Tabela 14). Diferentemente do complexo 1, o complexo 2 mostra uma maior afinidade pela glicilglicina em relação ao ATP, como mostra as constantes de associação do ATP e da GG (Tabela 14). A constante de associação do ATP ao complexo receptor ($\log K$

= 4,41) é quatro unidades logaritmas e meia menor do que a constante de associação da glicilglicina (log K = 9,07).

Tabela 14. Logaritmos das constantes de equilíbrio para o sistema binário complexo **(2)** + substrato (ATP, GG).

Quociente de Equilíbrio	ATP Log K	Glicilglicina Log K
$[C_2S] / [C_2][S]$	4,41(8)	9,07(4)
$[C_2H_{-1}S][H] / [C_2S]$	-10,09(5)	-7,10 (6)
$[C_2H_{-1}(OH)S][H] / [C_2H_{-1}S]$	--	-9,72(4)
$[C_2H_{-1}(OH)_2S] / [C_2H_{-1}(OH)S]$	--	-10,24(2)

As constantes de equilíbrios determinadas foram utilizadas para o cálculo das curvas de distribuição das espécies presentes nesses sistemas (Figura 40 e 41). Nessas figuras aparecem somente as espécies binárias: complexo **2** + substrato. Como já foi mostrado (ver seção 4.2.7), em valores de pH ácido, o complexo **2** sofre uma 'ruptura' com a formação de complexos mononucleares. A associação do ATP com o complexo binuclear **2** só ocorre em valores de pH neutro e alcalino. Para a GG a associação só ocorre a partir do pH 5, que é onde começa a formar o complexo binuclear. O complexo **2** ao associar o ATP forma somente duas espécies, o complexo binário C_2ATP , com um máximo de 55% no pH 9,3 e a espécie hidróxida $C_2H_{-1}ATP$ ($C_2(OH)ATP$), que é o complexo **2** associado ao ATP com uma água desprotonada ($pK_a = 10,09$), com formação máxima de 80% no pH 11,8 (Figura 40).

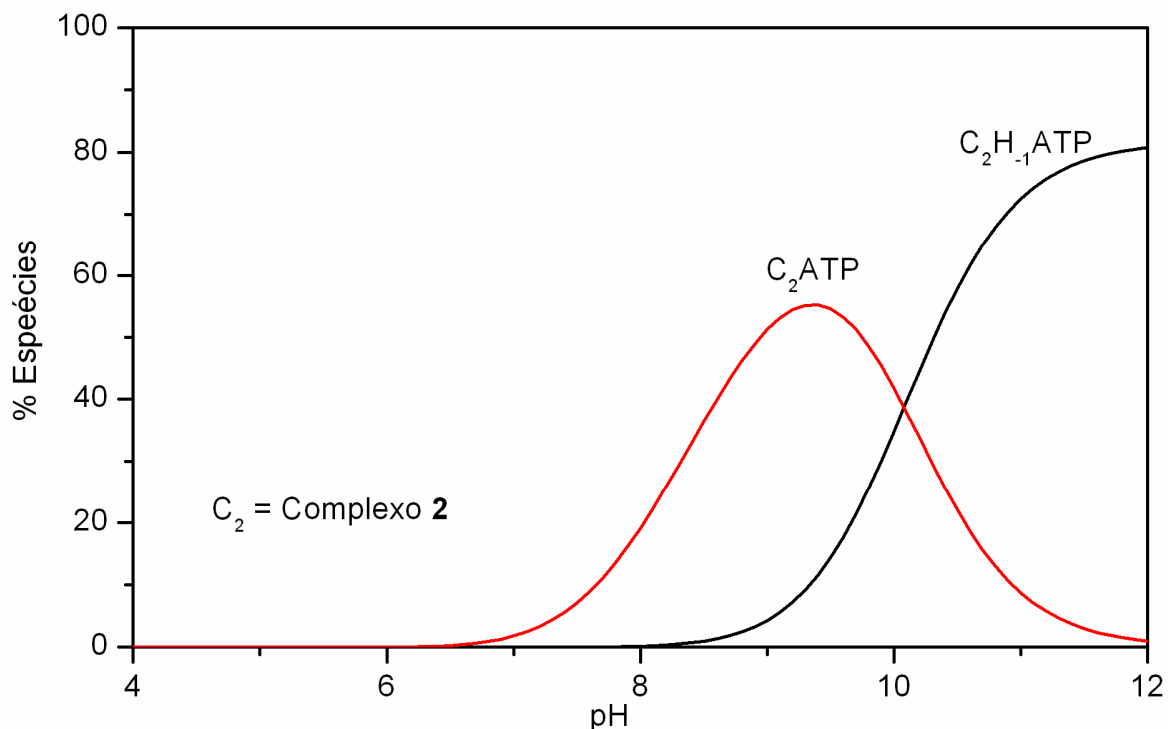


Figura 40. Gráfico de distribuição das espécies formadas pela associação do ATP com o complexo (2) (C_2) em função do pH, onde C_2ATP é o complexo binário formado, $C_2H_{-1}ATP$ ($C_2(OH)ATP$) é a espécie hidróxida.

A Figura 41 mostra as espécies detectadas no sistema complexo 2 - GG. A associação da GG com o complexo 1 forma o complexo binário C_1GG , que está 72 % formado no pH 6,3. Esse complexo sofre uma desprotonação na GG associada ($pK_a = 7,10$ Tabela 14) formando a espécie, $C_1H_{-1}GG$, que atinge um máximo de formação de 94 % em pH = 8,6. Em valores de pH mais elevados, essa espécie decresce, dando espaço para a formação das espécies hidróxido. A desprotonação da primeira água ($pK_a = 9,72$), forma a espécie $C_2H_{-1}(OH)GG$, que está 21% formada no pH 9,9. Com o aumento do pH ocorre a desprotonação da segunda água coordenada ($pK_a = 10,24$), que forma a espécie $C_2H_{-1}(OH)_2GG$ que está 99% formado no pH 11,8 (ver seção 4.2.7).

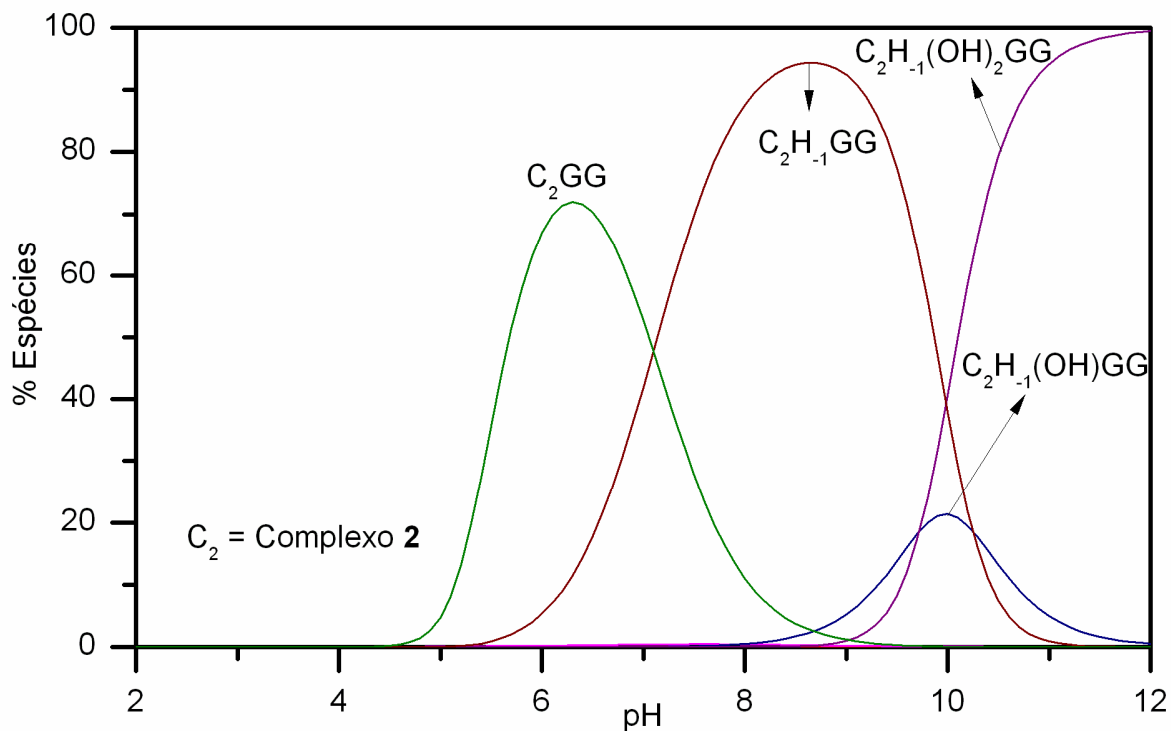


Figura 41. Gráfico de distribuição das espécies formadas pela associação da GG com o complexo (2) (C_2) em função do pH, onde C_2GG é o complexo binário formado, $C_2H_{-1}GG$ é a espécie binária com a GG desprotonada, a espécie $C_2H_{-1}(OH)GG$ é a espécie hidróxida e a espécie $C_2H_{-1}(OH)_2GG$ é a dihidróxida.

4.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR “ELECTROSPRAY” (ESI-MS)

4.3.1 Sistema [(BDBPH)Zn^{II}]₂ – dipeptídeos (GG eAA)

As espécies em solução do ligante BDBPH, do complexo [(BDBPH)Zn^{II}]₂²⁺ e das associações desse complexo com os dipeptídeos glicilglicina (GG) e dl-alanil-dl-alanina (AA) foi investigado por espectrometria de massas por “eletrospray” (ESI-MS), uma técnica conveniente para estudos de compostos pouco voláteis. Embora, em geral, os íons pré-existentes em fase líquida sejam observados através dos espectros, outros podem ser produzidos durante a formação do “electrospray”. O surgimento destas novas espécies é dependente da composição da solução – solvente, pH, presença de supressores – e das condições da fonte de “electrospray” – voltagem do cone, tensões no capilar, contra-eletrodo e lentes e vazão dos gases.⁸³ Estes fatores devem ser cuidadosamente considerados já que alterações nestes parâmetros costumam levar a uma interpretação equivocada da composição da solução original. Durante a ionização por “electrospray”, três tipos de íons podem ser gerados: íons moleculares, moléculas protonadas/desprotonadas (íons *quasi*-moleculares) e moléculas cationizadas ou anionizadas. A extensão com a qual cada um destes íons é formado pode ser compreendida em termos do balanço entre três processos essencialmente distintos, que ocorrem no interior do capilar: reações redox (oxidação/redução), que produzem íons moleculares (M⁺) ou (M⁻); reações ácido/base (protonação/desprotonação), que resultam na formação de moléculas protonadas ([M+H]⁺) ou desprotonadas [M-H]⁻ e, coordenação (formação de aductos) com cátions (geralmente os da família 1A) ou ânions (principalmente cloretos), que leva à formação de moléculas cationizadas ([M+Na]⁺, [M+K]⁺, ou anionizadas [M+Cl]⁻ etc).⁸⁷

O espectro de massas do ligante BDBPH (Figura 42) no modo positivo foi feito em solução de água:acetonitrila:ácido fórmico (50:49,9:0,1 % v/v), pH 10,6, onde o ligante está na forma neutra (H₂L, Figura 10), revela que além do pico *m/z* 471 ([BDBPH + H]⁺), que é o BDBPH protonado com carga +1, tem outros picos, provavelmente de fragmentações do ligante, formação de dímeros, trímeros, assim como combinações desses compostos com contra-íons do ligante (Br⁻).¹¹⁶ Na interpretação dos dados foram considerados somente os picos dos compostos ou

espécies estudadas nesse trabalho, os picos dos compostos que sofrem fragmentação ou combinação com outros constituintes da solução não serão considerados aqui.

Um dos grandes problemas no “electrospray” é a falta de linearidade da intensidade com a concentração. A vazão da amostra, do gás nebulizante, do gás secante e a distância da ponta do capilar ao contra eletrodo são parâmetros que afetam a estabilidade do “electrospray” e, portanto, a formação das espécies na fase gasosa.⁸³ No entanto, estes são facilmente controlados para se obter um fluxo de amostra constante. Já a presença de outros eletrólitos na solução não é fácil de ser controlada e compromete a linearidade de resposta da intensidade de um pico em função da concentração. A seção linear do “electrospray” trabalha numa faixa estreita de concentração (de 10^{-6} a 10^{-3} mol.L⁻¹). Todavia, esta linearidade pode ser prejudicada se outros eletrólitos estiverem presentes na solução.^{84,85}

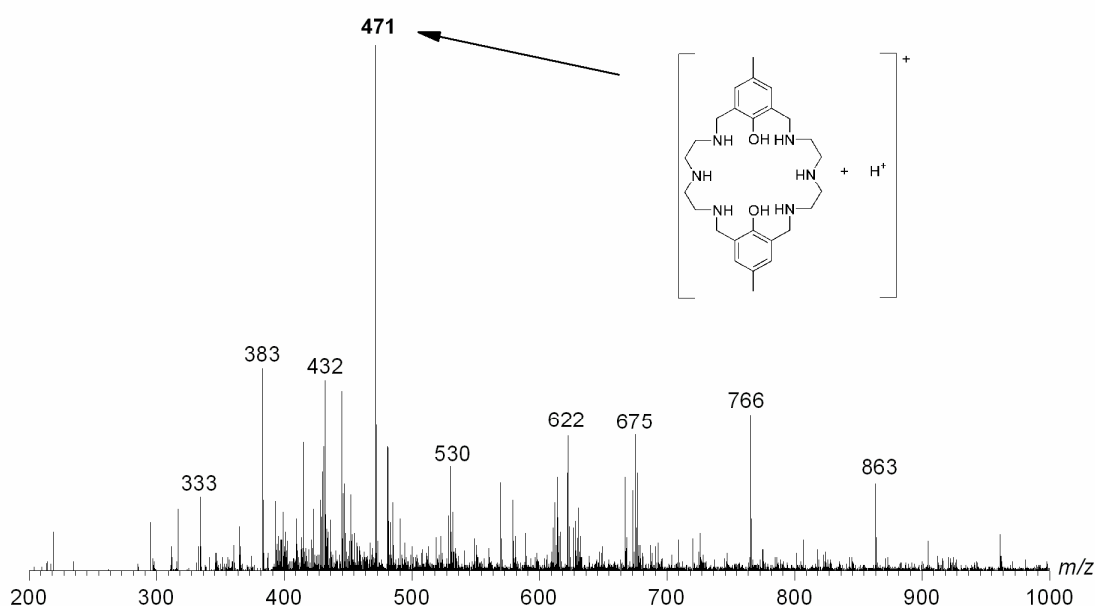


Figura 42. ESI-MS no modo positivo de $1,0 \cdot 10^{-4}$ M do BDBPH em solução de água, acetonitrila e ácido fórmico (50:49,9:0,1 % v/v) (pH = 10,6 tampão CHES) $V_c = 70$ V, m/z 471 ([BDBPH + H]⁺).

A espectrometria de massas é por definição; uma técnica capaz de determinar a abundância isotópica ou padrão isotópico de íons atômicos ou moleculares.⁸³ Para todos os compostos analisados nessa etapa, foi feito um estudo para determinar o seu padrão isotópico, onde compara-se os espectros obtidos experimentalmente com os espectros simulados no software MassLynx[®] 4.0. No espectro de massas do complexo binuclear $[(\text{BDBPH})\text{Zn}^{\text{II}}_2]^{2+}$ (Figura 43), destacamos os picos m/z 268, que é o complexo mononuclear $[(\text{BDBPH})\text{Zn}^{\text{II}} + 2\text{H}^+]^{2+}$ (1); m/z 300 é o complexo binuclear $[(\text{BDBPH})\text{Zn}^{\text{II}}_2]^{2+}$ (2); m/z 617, complexo binuclear hidróxido $[(\text{BDBPH})\text{Zn}^{\text{II}}_2 (\text{OH})]^+$ (3); m/z 633, complexo binuclear aquo-hidróxido $[(\text{BDBPH})\text{Zn}^{\text{II}}_2 (\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^+$ (4); m/z 679, complexo binuclear com uma ponte brometo entre os íons $\text{Zn}(\text{II})$ $[(\text{BDBPH})\text{Zn}^{\text{II}}_2(\text{Br})]^+$ (5). Todas essas espécies foram observadas nos estudos potenciométricos do como BDBPH-Zn 1:1 e 1:2.(ver a seção 4.2.2)

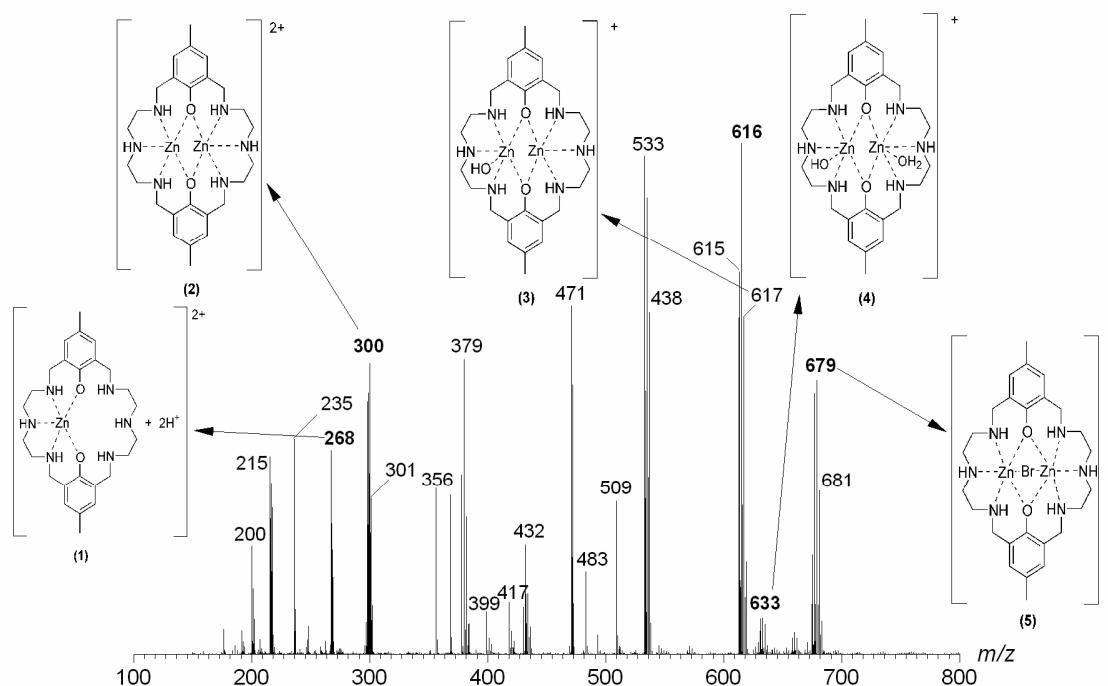


Figura 43. ESI-MS no modo positivo de $1,0 \cdot 10^{-4}$ M do complexo $[(\text{BDBPH})\text{Zn}^{\text{II}}_2]^{2+}$ em água, acetonitrila e ácido fórmico (50:49,9:0,1 % v/v) (pH = 9, tampão CHES) $V_c = 80$ V. (V_c = voltagem do cone).

A ampliação dos picos m/z 268, 300, 633 e 679 (Figura 44a) revela os detalhes isotópicos; nos espectros dos picos m/z 267 e 299, os picos adjacentes são de íons que diferem por 0,5 unidades de massa, que corresponde a uma carga +2, nos picos m/z 633 e 679, os picos adjacentes são de íons que diferem por uma unidade de massa que corresponde a uma carga +1. A concordância entre os padrões isotópicos dos espectros obtidos experimentalmente (Figura 44a) e dos espectros simulados (Figura 44b), assim como para todos os compostos analisados nessa etapa, nos permite inferir sobre os mais prováveis íons em solução.¹²⁴

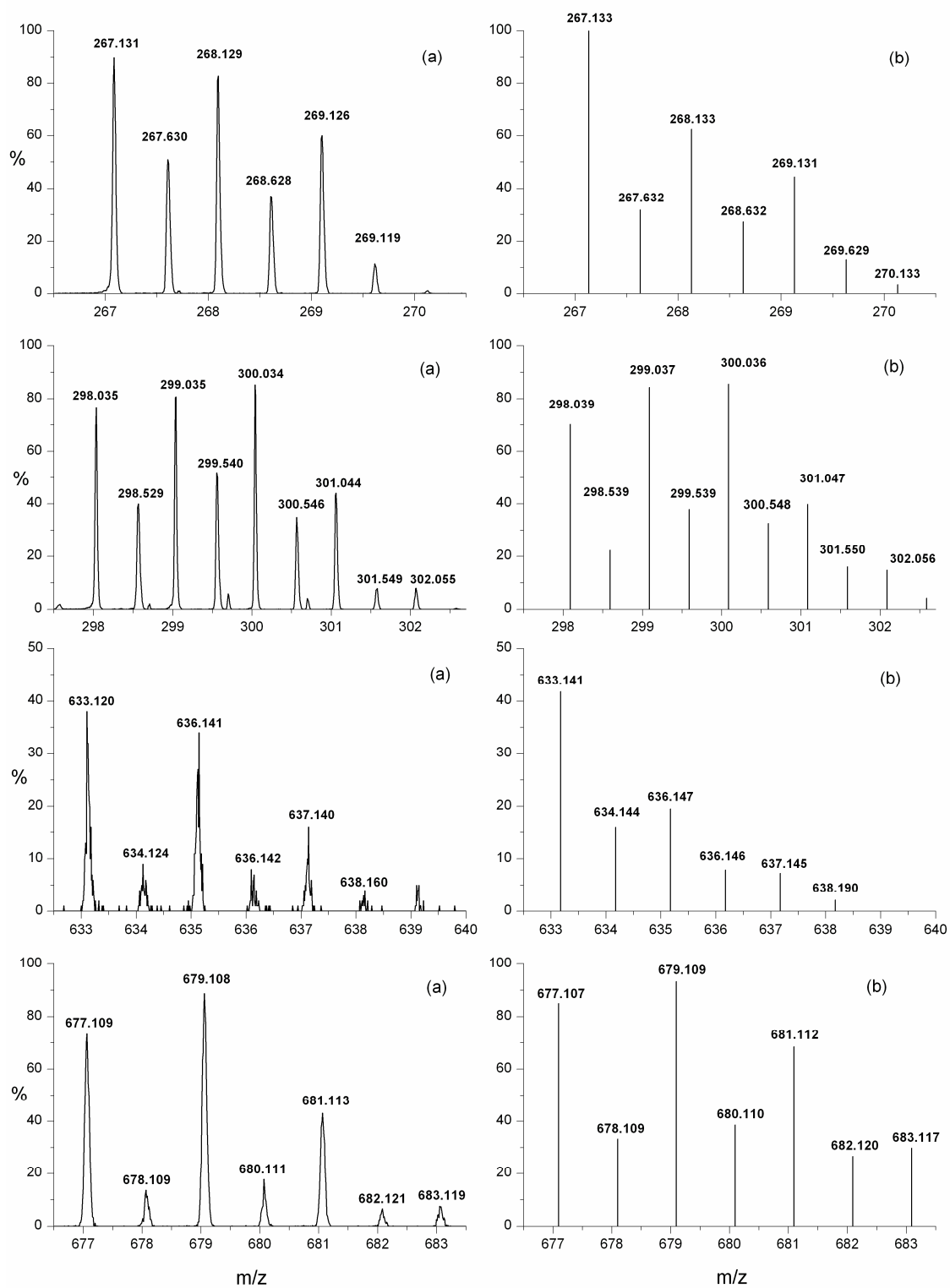


Figura 44. (a) Região ampliada dos picos m/z 267, 299, 633 e 679 no ESI-MS do complexo $[(\text{BDBPH})\text{Zn}^{\text{II}}_2]^{2+}$ (Figura 43). (b) ESI-MS dos picos m/z 267, 299, 633 e 679 simulados no software MassLynx[®] 4.0. (% = Intensidade relativa).

Os espectros de massa do sistema ternário BDBPH-Zn^{II}-dipeptídeos (GG e AA), são apresentados nas Figura 45 e 46, respectivamente. Para o sistema BDBPH-Zn^{II}-GG (Figura 45) destacamos os picos 134, 374, 430, 439, 471 e 732. O pico m/z 134, corresponde ao íon molecular $[GG + 2H^+]^{2+}$ (dipeptídeo GG diprotonado), pico m/z 374, corresponde ao íon $[(BDBPH)Zn^II_2(HGG)(H_2O)]^{2+}$ (complexo binuclear associando uma molécula de GG e uma molécula de água), pico m/z 430, do íon $[(BDBPH)Zn^II_2(HGG)_2]^{2+}$ (complexo binuclear associando duas moléculas de GG), m/z 439 da espécie $[(BDBPH)Zn^II_2(HGG)_2(H_2O)]^+$ (complexo binuclear associando duas moléculas de GG e uma de água). Szpoganicz e colaboradores reportaram que no íon molecular $[(BMXD)Cu^II_2(GG)_2 - H]^+$ também é observado a associação de duas moléculas de GG ao complexo binuclear $[(BMXD)Cu^II_2]^{4+}$,¹⁰⁰ m/z 732 da espécie $[(BDBPH)Zn^II_2(HGG)]^+$ (complexo binuclear associando uma molécula de GG) além do pico m/z 471, da espécie $[(BDBPH) + H]^+$ (ligante BDBPH protonado).

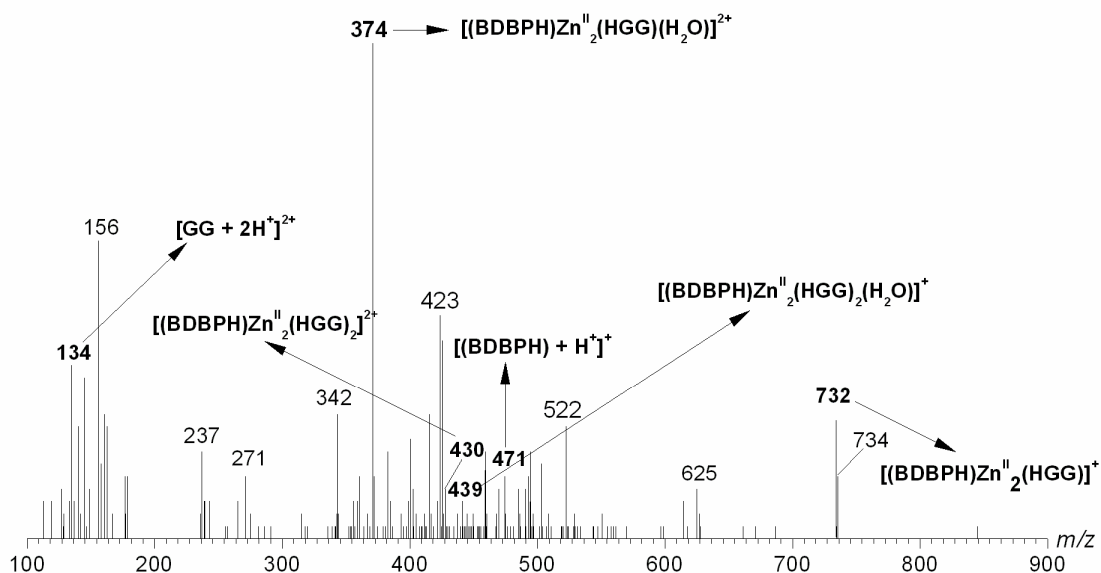


Figura 45. ESI-MS no modo positivo de $1,0 \cdot 10^{-4}$ M do sistema ternário BDBPH-Zn(II)-GG na proporção 1:2:1 em água, acetonitrila e ácido fórmico (50:49,9:0,1 % v/v) (pH = 7, tampão PIPES) $V_c = 70$ V. (V_c = voltagem do cone).

No sistema BDBPH-Zn(II)-AA (Figura 46) destacamos os picos m/z 162, 299, 380, 471, 534, 634 e 639. O pico m/z 162, corresponde ao íon molecular $[AA + 2H]^2+$ (dipeptídeo AA diprotonado), m/z 300, da espécie $[(BDBPH)Zn^II_2]^{2+}$ (complexo binuclear), m/z 380, da espécie $[(BDBPH)Zn_2(HAA)]^{2+}$ (complexo binuclear associando uma molécula de AA, m/z 471, da espécie $[(BDBPH) + H]^+$ (ligante BDBPH protonado), m/z 534, da espécie $[(BDBPH)Zn^II]^+$ (complexo mononuclear), m/z 634, da espécie $[(BDBPH)Zn^II_2(H_2O)(OH)]^+$ (complexo binuclear com uma água e um íon hidróxido coordenado), m/z 679, da espécie $[(BDBPH)Zn^II_2(Br)]^+$ (complexo binuclear ponte brometo (μ -Br)).

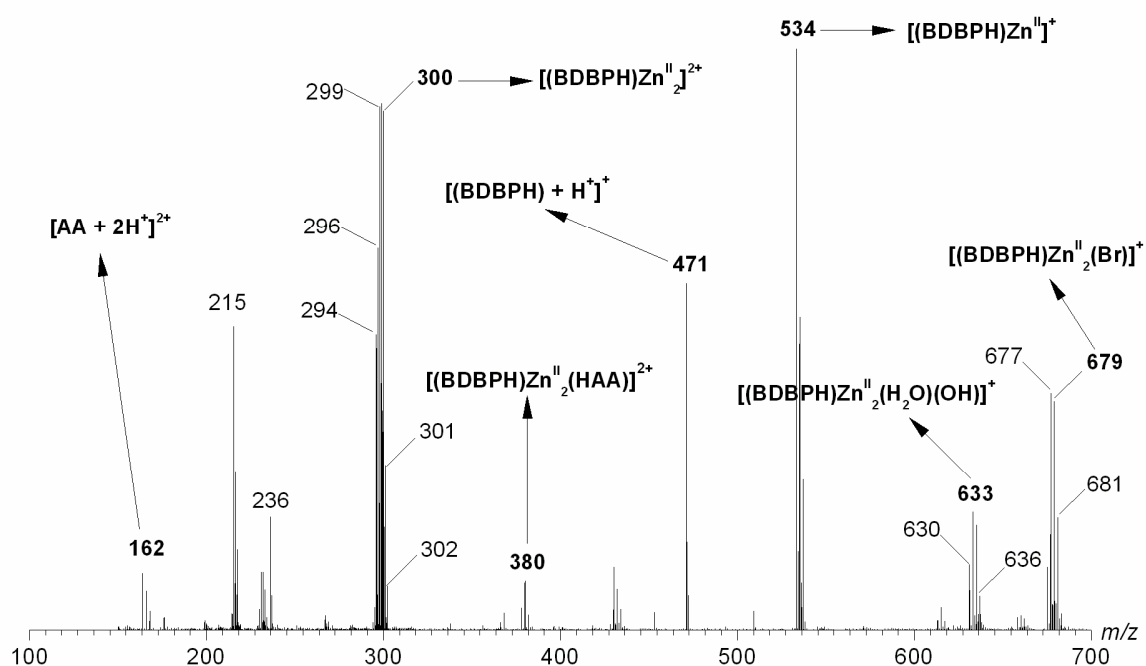


Figura 46. ESI-MS no modo positivo de $1,0 \cdot 10^{-4}$ M do sistema ternário BDBPH-Zn(II)-AA na proporção 1:2:1 em água, acetonitrila e ácido fórmico (50:49,9:0,1 % v/v) (pH = 7, tampão PIPES) $V_c = 70$ V. (V_c = voltagem do cone).

4.3.2 Sistema $[(BDBPH)Fe_2] - ATP$

No espectro de massas do complexo binuclear $[(BDBPH)Fe^III_2]^{4+}$ (Figura 47), destacamos os picos m/z 686 que é o complexo binuclear $[(BDBPH)Fe^III + 3 Cl]^+$, complexo binuclear associado a 3 cloretos, que é o contra-íon do sal de ferro(III) utilizado, m/z 471, da espécie $[(BDBPH) + H]^+$ (ligante BDBPH protonado), m/z 526,

que é o complexo mononuclear $[(\text{BDBPH})\text{Fe}^{\text{III}}]^+$, m/z 544, complexo mononuclear $[(\text{BDBPH})\text{Fe}^{\text{III}}]^+$. No sistema ternário BDBPH-Fe(III)-ATP (Figura 48), destacamos o pico m/z 1132, que corresponde a espécie ternária $[\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{BDBPH})\text{ATP}]^+$ protonada, observada numa faixa de pH de 3 a 7 (Figura 27, seção 4.2.4). Além dos picos m/z 471 e m/z 686, ligante protonado e complexo binuclear associando 3 cloretos, respectivamente, também observado no sistema BDBPH-Fe sem ATP.

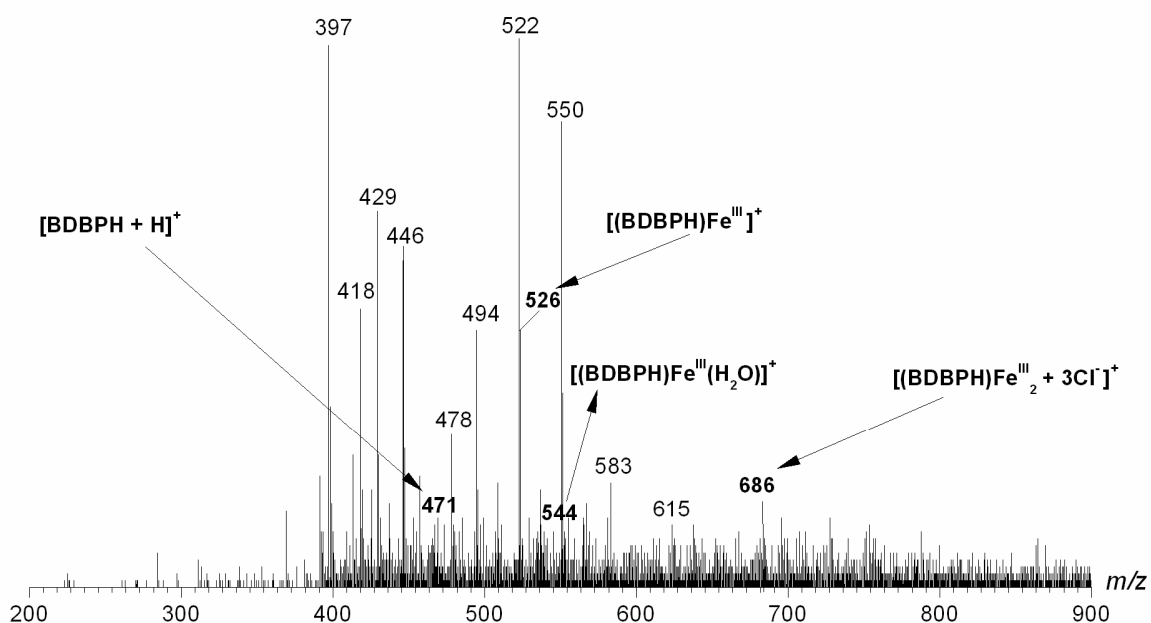


Figura 47. ESI-MS no modo positivo de $1,0 \cdot 10^{-4}$ M do complexo $[\text{BDBPH-Fe}_2]^{\text{III}4+}$ em água, acetonitrila e ácido fórmico (50:49,9:0,1 % v/v) (pH = 7, tampão PIPES) $V_c = 70$ V. (V_c = voltagem do cone).

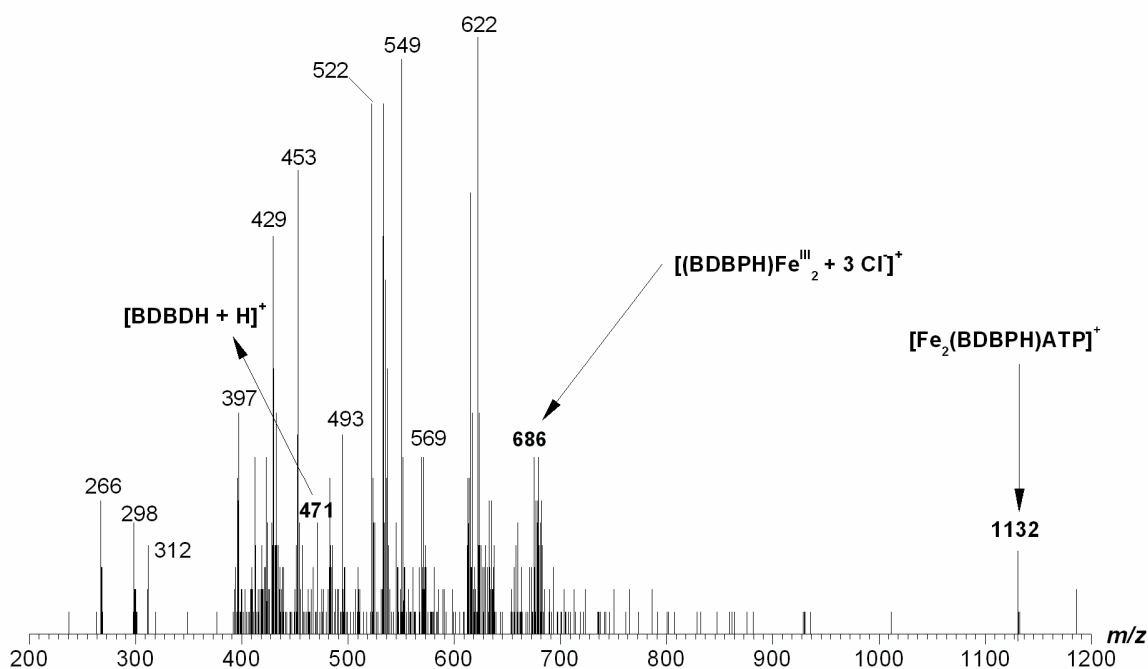


Figura 48. Espectro de massas por “electrospray” no modo positivo de $1,0 \cdot 10^{-4}$ M do sistema ternário BDBPH-Fe-ATP na proporção 1:2:1 em água, acetonitrila e ácido fórmico (50:49,9:0,1 % v/v) (pH = 5, tampão PIPES) $V_c = 70$ V. (V_c = voltagem do cone).

4.3.3 $[\text{Fe}_2(\text{HPCINOL})_2(\text{SO}_4)_2(\mu\text{-O})]$ (**1**)

Nos estudos de titulação potenciométrica de **1**, feitos em água, propomos a substituição dos grupos sulfato por água (ver seção 4.2.6), na esfera de coordenação dos íons Fe(III). No espectro de massas de **1** (Figura 49), em solução metanol/água (1:1% v/v) destacamos o pico m/z 903, que corresponde ao complexo $[\text{Fe}_2(\text{HPCINOL})_2(\text{SO}_4)_2(\mu\text{-O}) + \text{H}^+]^+$ protonado, ou seja, é o complexo com os grupos sulfatos coordenados aos íons metálicos. Semelhante ao complexo **2**, o complexo **1** sofre uma ruptura e forma complexos mononucleares. Foi detectado 4 espécies; m/z 375 $[\text{Fe}_2(\text{HPCINOL})_2(\text{OH})_2(\mu\text{-O})]^{2+}$, complexo binuclear μ -oxo dihidróxido, m/z 381 $[\text{Fe}(\text{HPCINOL})(\text{OH})_2]^{2+}$, complexo mononuclear, m/z 444 $[\text{Fe}_2(\text{HPCINOL})_2(\text{SO}_4)_2]^{2+}$, complexo binuclear com dois sulfatos, m/z 463 $[\text{Fe}(\text{HPCINOL})(\text{SO}_4)(\text{H}_2\text{O})]^+$ complexo mononuclear com um sulfato e uma água coordenados. As espécies

binucleares que correspondem aos picos m/z 375 e m/z 903 foram detectadas nos estudos de equilíbrio (ver seção 4.2.6).

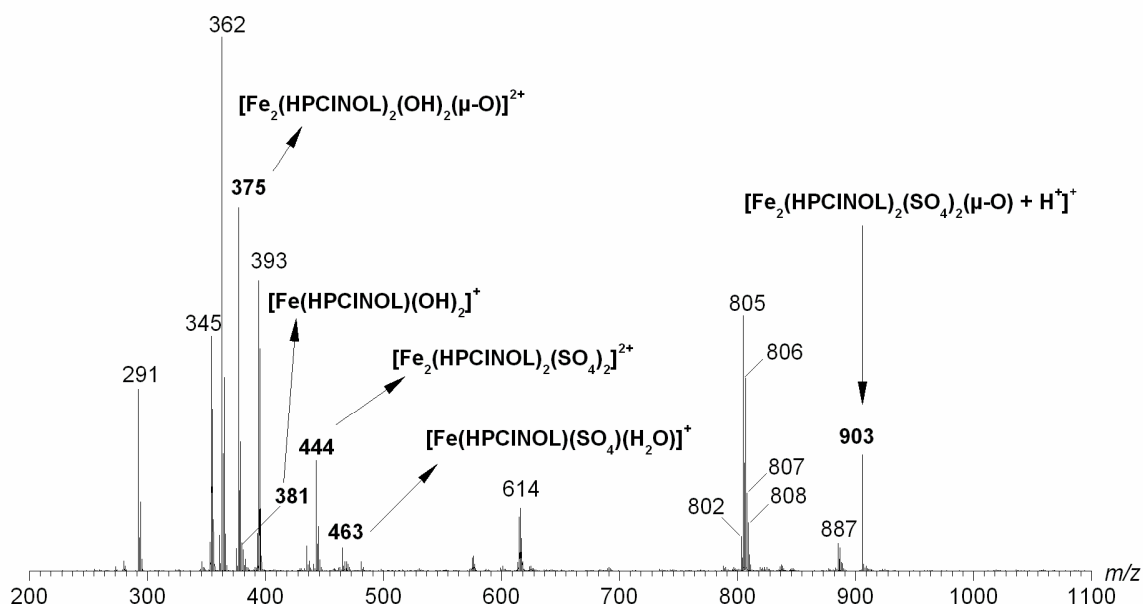


Figura 49. ESI-MS no modo positivo de $2,0 \cdot 10^{-5}$ M de **1** em metanol/água (1:1% v/v). $V_c = 40$ V (V_c = voltagem do cone)

4.3.4 $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{OAc})](\text{ClO}_4)$ (**2**)

O espectro de massas de **2** é apresentado na Figura 50 e o Esquema 1 mostra os complexos catiônicos detectados. Destacamos o íon principal m/z 787, que corresponde ao complexo binuclear com uma ponte acetato $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{OAc})]^+$. Nesse espectro também foi detectado um complexo com uma ponte perclorato, m/z 825 (Figura 9), onde o perclorato é o contra-íon de **2**. McKenzi e colaboradores reportaram a estrutura cristalina de um composto binuclear de manganês com uma ponte perclorato $[\text{Mn}_2(\text{bpbp})(\text{ClO}_4)(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Hbpbp = 2,6-bis(2-picolyl)amino-methyl)-4-tertbutylphenol. Estudos de espectrometria de massas por eletrospray comprovam que o anião perclorato permanece ligado aos íons manganês em solução de nitrometano.¹²⁵

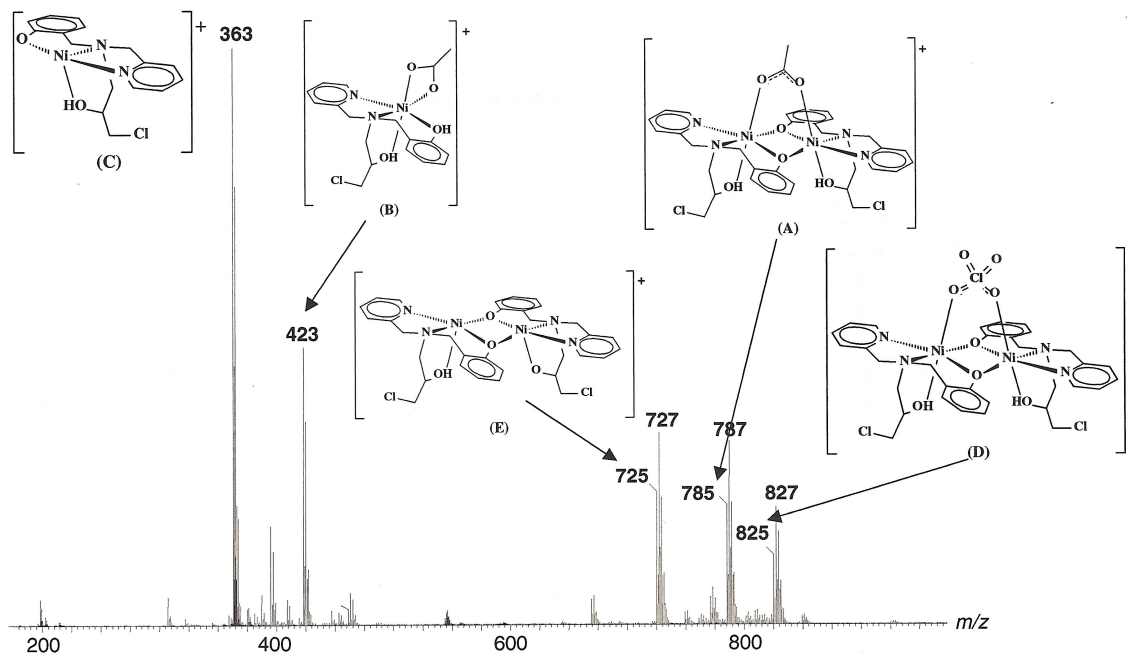


Figura 50. ESI-MS no modo positivo de $2,5 \cdot 10^{-5}$ M de 2 em metanol/água (1:1% v/v). $V_c = 40$ V (V_c = voltagem do cone).⁹⁰

Para os picos m/z 825, 785 e 363 foram feitos espectros de massa em tandem (ESI-MS/MS), dois espectrômetros de massa acoplados em série. O primeiro funciona para selecionar e separar o íon de interesse dos outros íons e também de qualquer contaminante que esteja presente. O ESI-MS/MS (Figura 51a) do íon m/z 825 mostra a dissociação de uma molécula neutra de ácido perclórico de 100 Da. A perda dessa molécula de HClO_4 se dá primeiramente pela perda do ânion ClO_4^- , que gera um cátion duplamente carregado instável, que prontamente elimina um íon hidrogênio reduzindo sua carga para formar o íon fragmento m/z 725 monocarregado (Esquema 10 e Figura 51a). Similarmente o íon m/z 785 elimina uma molécula neutra de ácido acético para formar o mesmo o íon fragmento m/z 725 (Esquema 10 e Figura 51b). O ESI-MS/MS do íon m/z 363 é também característico estruturalmente; ele perde uma molécula de HCl para formar o íon fragmento m/z 327, que perde uma molécula de 106 Da para formar o íon fragmento m/z 221 (Figura 51c).

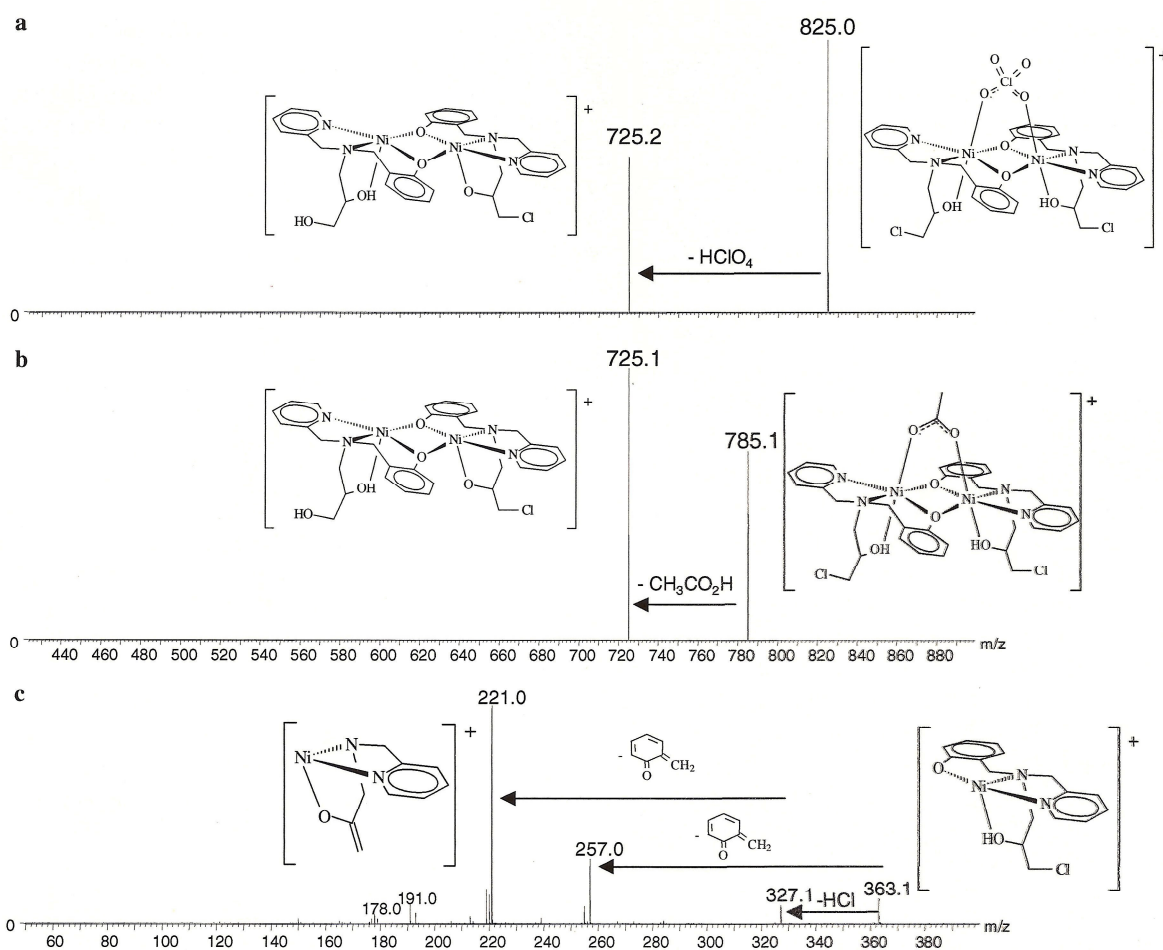
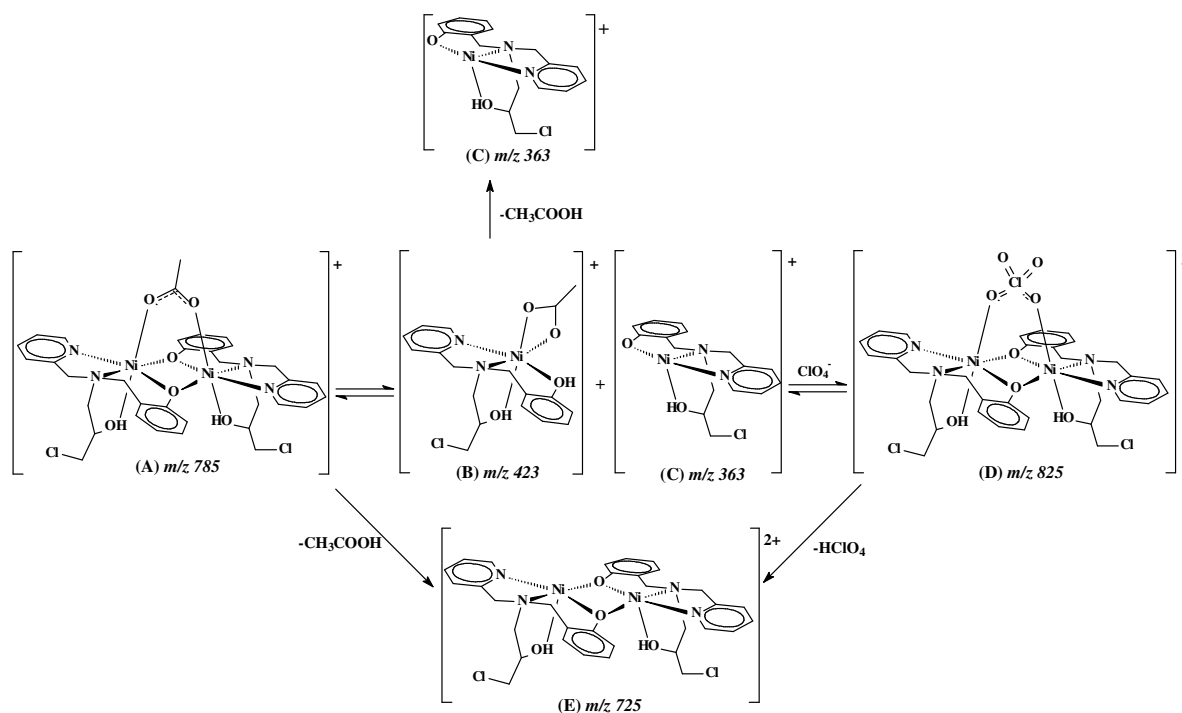


Figura 51. ESI-MS/MS para os íons (a) m/z 825.0, (b) m/z 785.1 e (c) m/z 363.1.⁹⁰

No estudo de equilíbrio do complexo binuclear **2** (ver seção 4.2.7) foi observado que ele sofre uma dissociação para formar complexos mononucleares (Esquema 10, compostos B e C), sendo o cátion mononuclear de níquel (II) m/z 423 inequivocadamente detectado na solução. Essa conclusão é baseada no fato de não ter sido observado a formação desse íon nos experimentos de ESI-MS/MS com os íons m/z 825, m/z 785 e m/z 725. Dessa forma, os experimentos de ESI-MS indicam a presença de três cátions em solução: $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{BPCINOL})(\text{OAc})]^+$, $[\text{Ni}(\text{HBPCINOL})_2(\text{OAc})]^+$, $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})(\text{ClO}_4)]^+$ (Esquema 10, compostos B, A e D, respectivamente).⁹⁰



Esquema 10. Estruturas presentes em solução MeOH/H₂O (1:1) e fragmentos observados via experimentos ESI-MS e ESI-MS/MS do complexo 2. (A), (B) e (D) são compostos presentes em solução. (C) e (E) são fragmentos observados após ionização.⁹⁰

4.4 INTERAÇÃO COM DNA

Para verificar a clivagem de ácidos nucleicos pelo complexo [Fe₂(HPCINOL)₂(SO₄)₂(μ-O)](ClO₄) **1** foi utilizado DNA plasmidial pBSK-II como substrato, sob as condições descritas na parte experimental. Esse complexo mostrou-se apto a clivar o DNA plasmidial nos pH's 6,0; 7,0 (2,5·10⁻² M, PIPES); 8,0 (5·10⁻² M, HEPES) e 9,0 (5·10⁻² M, CHES, após 16 h de incubação e em concentrações do complexo que variavam de 0 a 250 μM. A clivagem do DNA plasmidial foi detectada pela transformação da forma I plasmidial (F I ou superenovelada) na forma II (F II ou circular relaxada) produzida por cisão de fita simples. A passagem da forma II para III (F III ou forma linear) é mediada por uma segunda clivagem na fita oposta do DNA ao redor de 12 pb (pares de base) da primeira cisão.¹²⁷ A 50 °C a reação de clivagem foi estritamente dependente da concentração do complexo, levando ao aumento na formação da forma plasmidial

relaxada (forma II), e mesmo na concentração mais baixa utilizada (10 μM), tem-se a formação de DNA plasmidial linear (forma III). A quebra da fita dupla foi mais eficiente a pH 6,0, (Figura 52), pois houve maior formação da F III nesse pH.

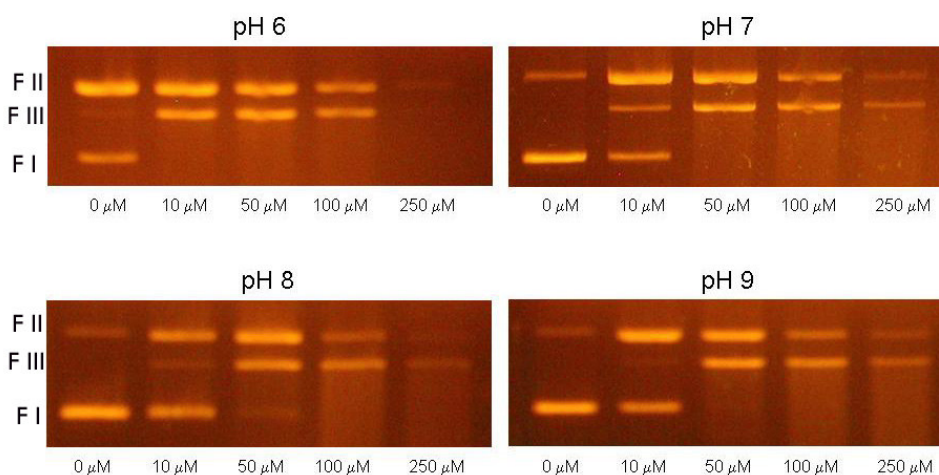


Figura 52. Eletroforese em gel de agarose evidenciando a clivagem do DNA plasmidial pBSK II em agarose 0,8% à temperatura de 50 °C nos pH's 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0, por 16h com concentrações de 1 de 10, 50, 100, 250 e 0 (controle) μM .

A Figura 53 mostra um tratamento quantitativo para o processo de clivagem, evidenciando a maior atividade de clivagem no pH 6,0; com apenas 10 μM de complexo tem-se a degradação total da forma superenovelada (F I) para a forma linear (F III), os valores da fração da F I foram obtidos pela quantificação das bandas dos géis mostrados na Figura 52.

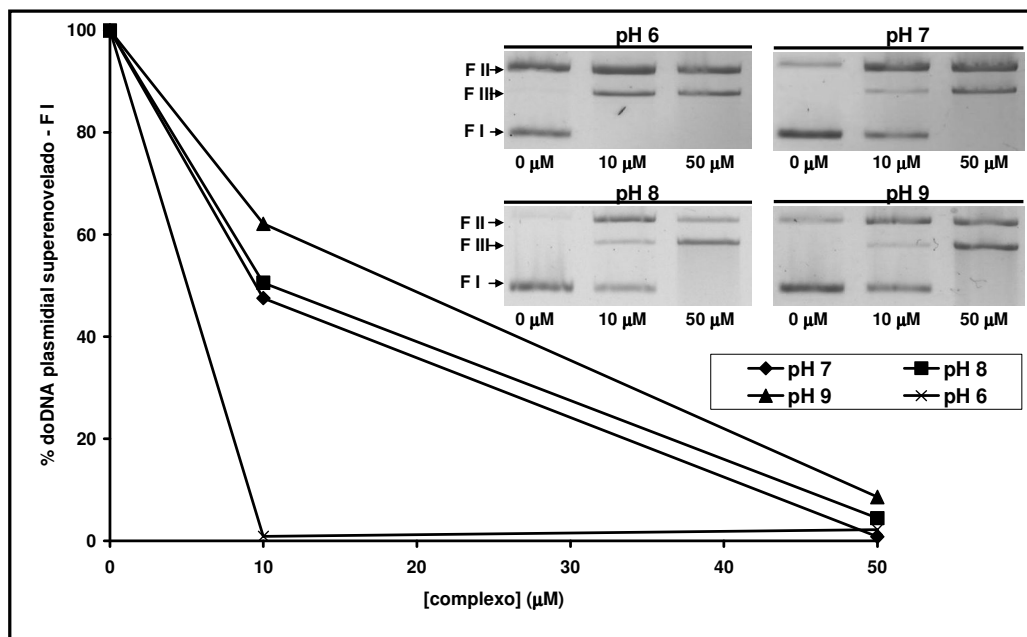


Figura 53. Variação da forma superenovelada (F I) em função da concentração de (1).

A clivagem do DNA pode ocorrer através de um mecanismo oxidativo (por oxidação do anel da ribose via radicais livres) e/ou hidrolítico (por hidrólise do grupo fosfato).⁶¹ Com o objetivo de avaliar se a clivagem do DNA plasmidial envolvia radicais difusíveis (OH^\bullet), sequestrador de radical livre como o DMSO foi utilizado como potencial inibidor da atividade de quebra da fita. A presença de DMSO na reação ilustrada na Figura 54 indica que esse captador de radicais tem efeito inibitório sobre a clivagem plasmidial, tanto em presença como em ausência de oxigênio (comparar os poços 3 e 8).

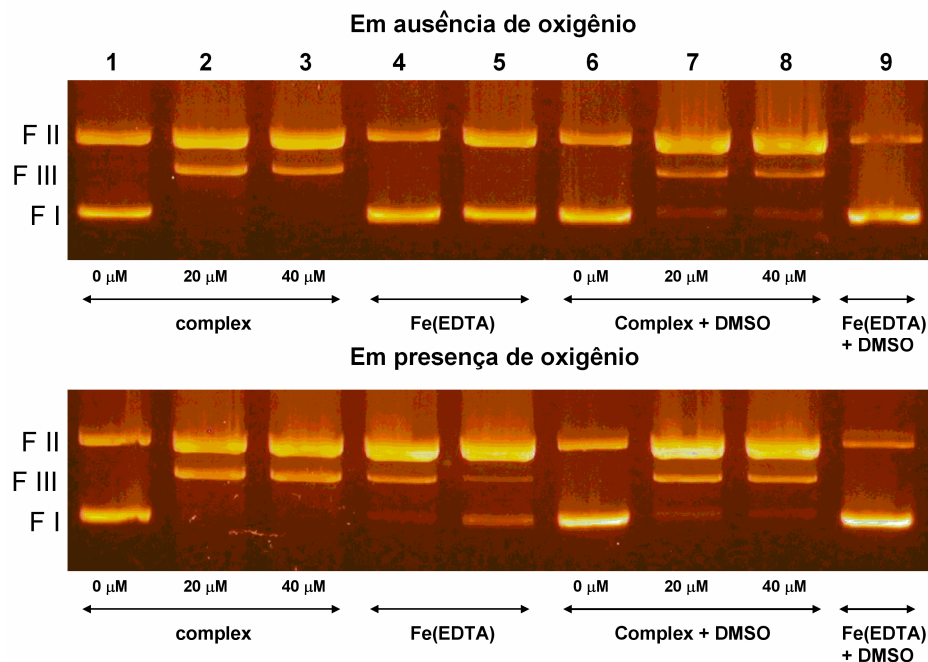
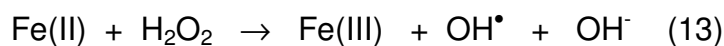


Figura 54. Clivagem de DNA plasmidial por (1) em condições aeróbias e anaeróbias (atmosfera de argônio); poços 1 e 6: controle – somente DNA (pBSK-II 25 μM); poços 2 e 3: DNA + complexo; poços 4 e 5: DNA + $\text{Fe}(\text{EDTA})^{2-}$ 50 μM + complexo; poços 6, 7 e 8: DNA + DMSO 400 mM + complexo; poço 9: DNA + $\text{Fe}(\text{EDTA})^{2-}$ 50 μM + DMSO 400 mM + complexo. Todas as amostras foram incubadas por 6 horas a 50 $^{\circ}\text{C}$ em tampão PIPES 25 mM, pH = 6,0.

Com a finalidade de se avaliar a influência do oxigênio molecular (O_2) no processo de clivagem foram realizadas, paralelamente, reações em condições aeróbias e anaeróbias (atmosfera de argônio). A Figura 54 mostra o resultado deste experimento, onde é utilizado o sistema $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ como controle, uma vez que este é um conhecido sistema gerador de OH^{\bullet} na presença de O_2 , através da reação de Fenton.¹²⁸ Fenton postulou sua reação em 1894. (Equações 13 -14)



Pelos resultados deste teste podemos verificar que o complexo mantém sua atividade em ausência de oxigênio demonstrada pela inatividade do $[\text{Fe}(\text{EDTA})^{2-}]$ em cortar o DNA (poços 3 e 4) e mesmo com uma leve inibição causada pelo DMSO nos leva a propor que o mecanismo de clivagem do DNA pelo complexo esteja se

dando por um mecanismo hidrolítico. Medidas cinéticas e testes mais detalhados encontram-se em andamento para obtenção de maiores informações.

4.5 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS

4.5.1 Cálculos – Teoria do funcional densidade (DFT)

4.5.1.1 Ligante macrocíclico BMXD

Para os ligantes (BMXD e BDBPH) foram obtidas geometrias com simetria C_2 . As superfícies de densidade eletrônica e potencial eletrostático (Figura 55) enfatizam a densidade de elétrons sobre os nitrogênios aminícos do BMXD, neste caso o HOMO é localizado nos nitrogênios (Figura 56), caso inverso ao do BDBPH onde o HOMO é localizado sobre o anel fenólico (Figura 57).

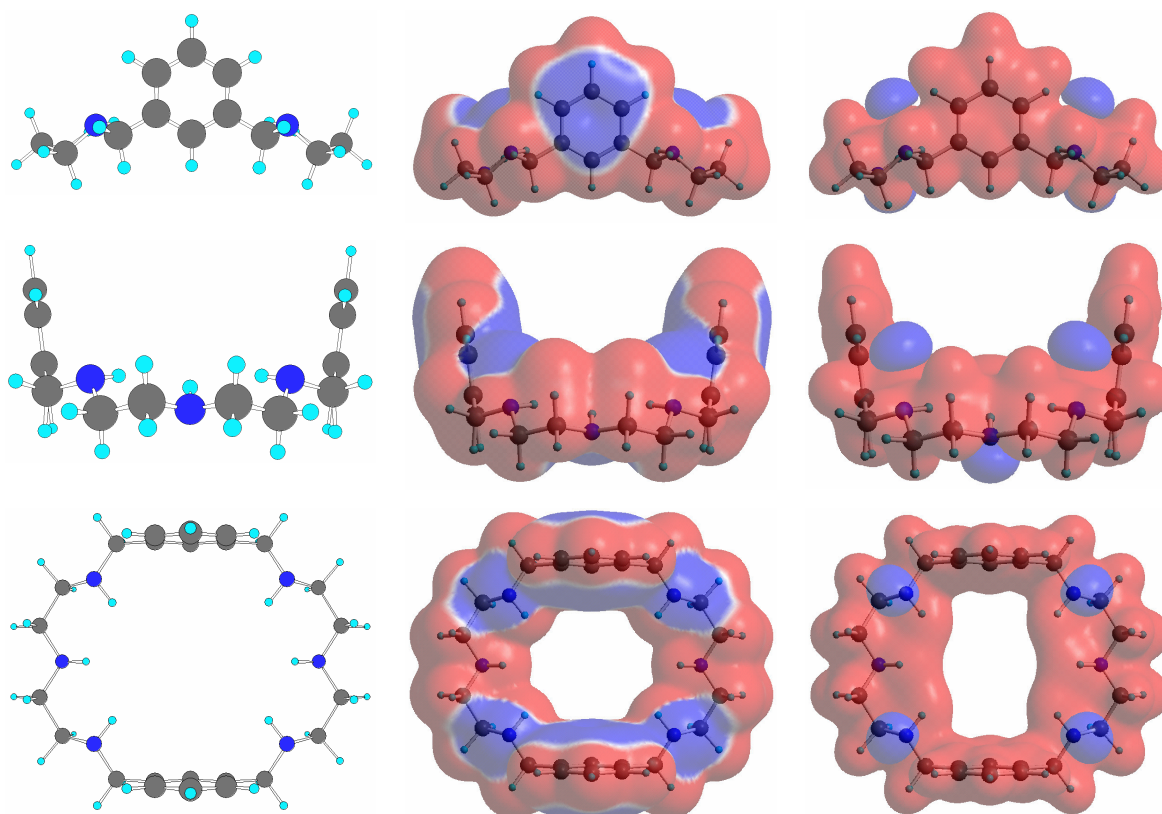
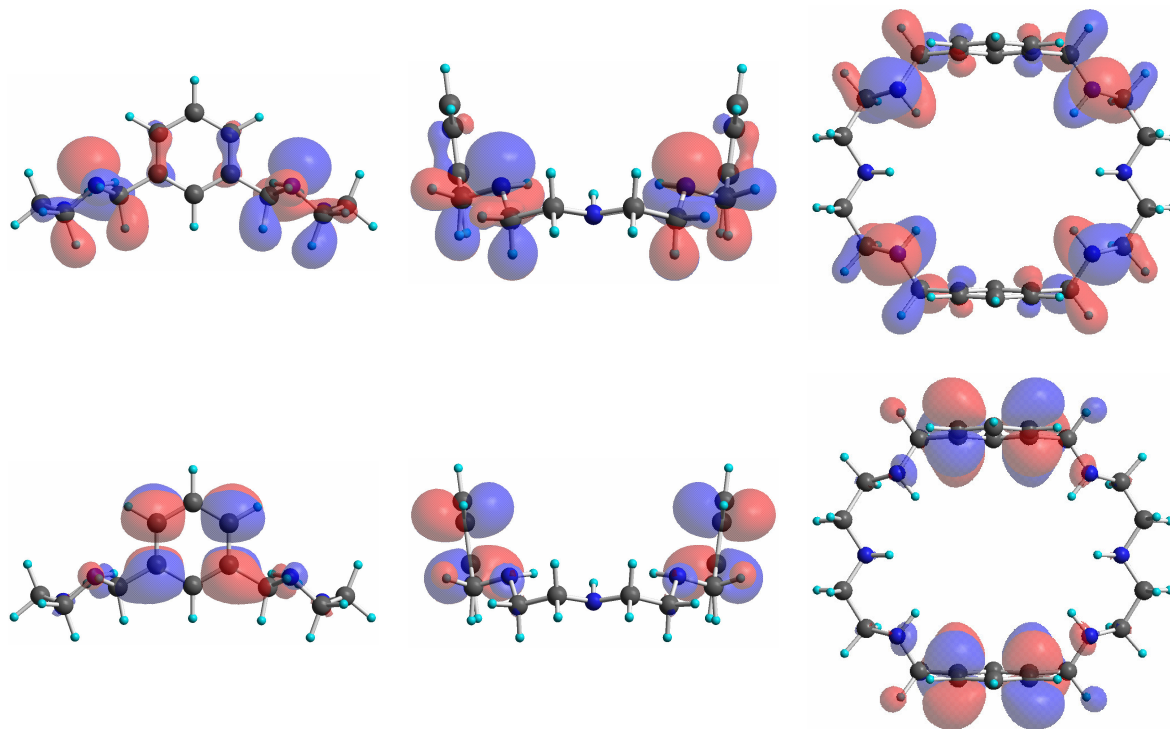


Figura 55. Cada linha representa uma vista das superfícies para o BMXD, da esquerda para direita temos: representação tridimensional da estrutura, densidade total de carga com o potencial eletrostático incluso com isodensidade de 0,002 u.a., e somente o potencial eletrostático com isopotencial de 1,0 u.a.

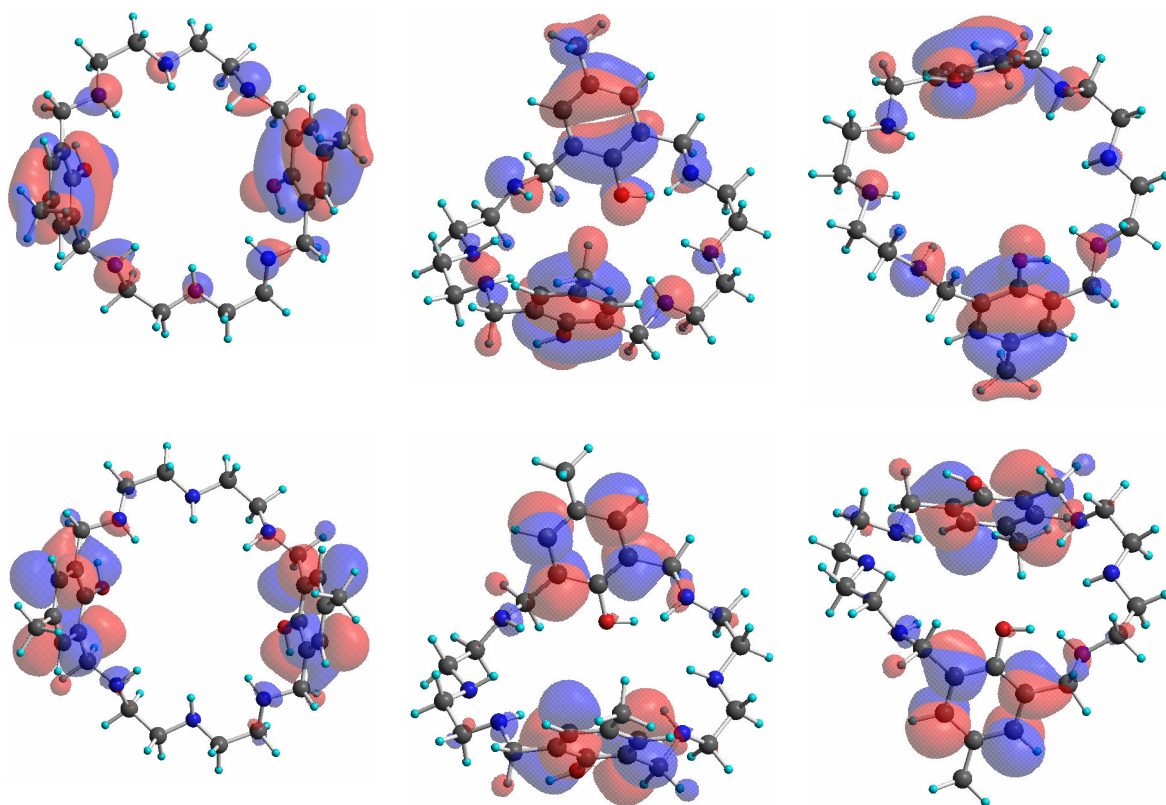
O LUMO do BMXD (Figura 56) está concentrado sobre o anel benzênico, ou seja, é a região do ligante mais pobre em elétrons e que possivelmente pode receber elétrons em um processo de redução.



Figuras 56. Linha de cima perspectiva do HOMO, linha de baixo LUMO, (ambos com isodensidade de 0,02 u.a.) para o BMXD.

4.5.1.2 Ligante macrocíclico BDBPH

O BDBPH apesar da semelhança estrutural com o BMXD, é eletronicamente bastante diferente, como já comentado, possui o HOMO localizado sobre o anel fenólico, mas como pode ser observado nas superfícies de densidade eletrônica (Figura 58), uma forte presença de carga negativa sobre os nitrogênios como no caso do BMXD.



Figuras 57. Linha de cima: perspectivas do HOMO, linha de baixo: perspectivas do LUMO, (ambos com isodensidade de 0,02 u.a.), para o BDBPH.

Do mesmo modo ao BMXD o LUMO está localizado sobre o anel benzênico, mas deve-se ressaltar que o oxigênio do fenol não participa do LUMO do BDBPH.

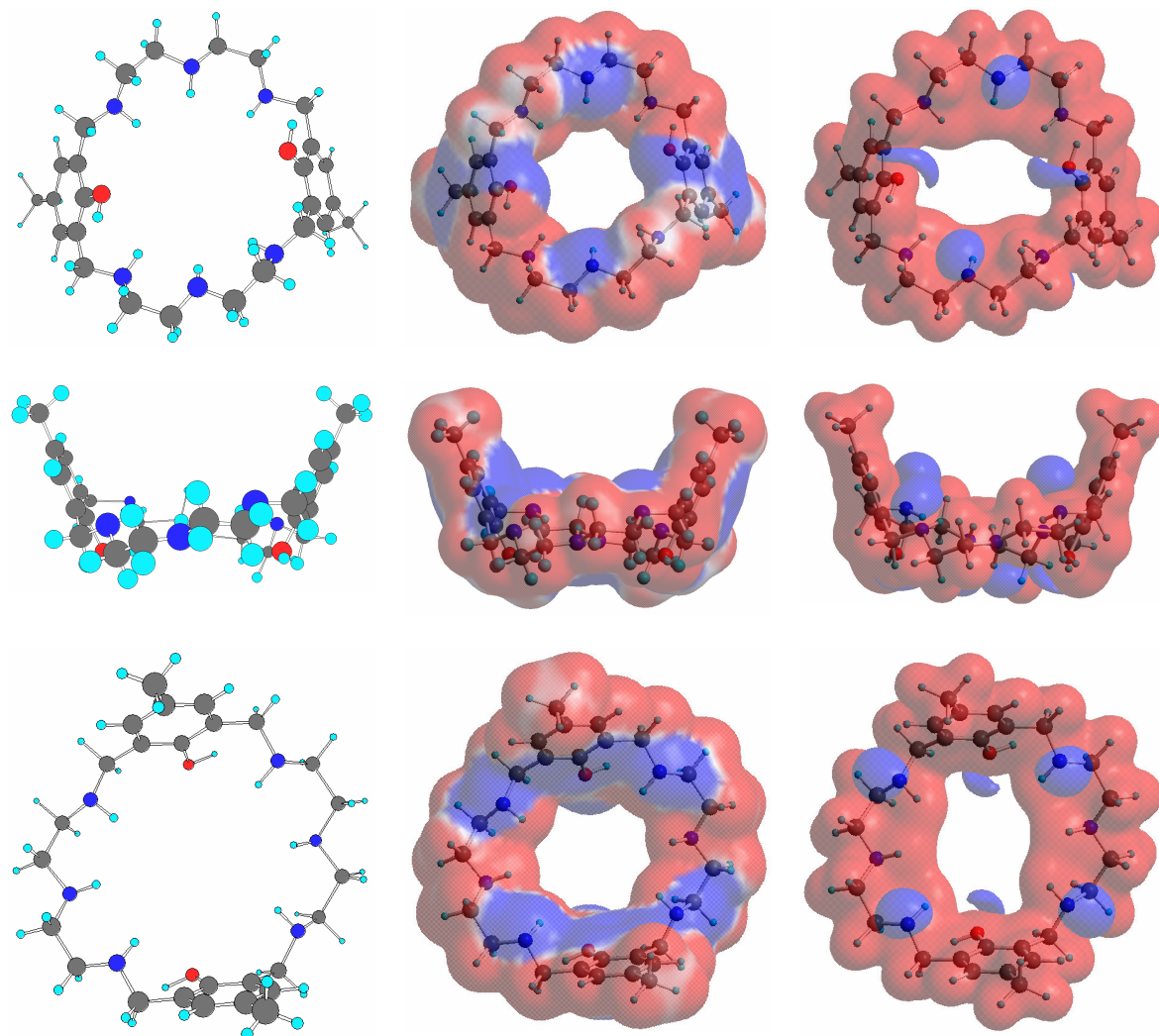


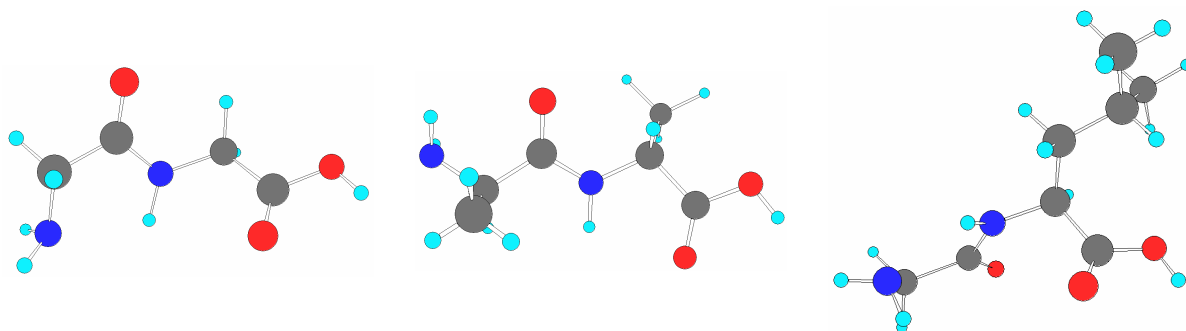
Figura 58. Cada linha representa uma vista das superfícies para o BDBPH, da esquerda para direita temos: representação tridimensional da estrutura, densidade total de carga com o potencial eletrostático incluso com isodensidade de 0,002 u.a., e somente o potencial eletrostático com isotopotencial de 1,0 u.a.

Em ambos os casos o nitrogênio central da cadeia lateral é o mais eletronegativo, e sendo assim, deve possuir um pKa mais alto e conseqüentemente este é o que deve protonar primeiro.

4.5.1.3 Peptídeos GG, AA e GL

Szpoganicz e colaboradores reportaram o estudo de hidrólise da GG pelo complexo $[\text{BMXDCu}_2]^{4+}$, baseado nesse trabalho, realizamos um estudo dos

peptídeos GG, AA e GL em suas formas aniônicas e não-zwitterion, pois o zwitterion é importante apenas quando o peptídeo não está complexado.¹⁰³ Quando o peptídeo estiver complexado o grupo amino não estará protonado, pelo menos no caso do complexo $[\text{BMXDCu}_2]^{4+}$ que coordena o peptídeo preferencialmente pelo grupo amino terminal. Neste caso o grupo carboxilato poderá ou não ser protonado, fator dependente do pH. Assim obtivemos as geometrias de equilíbrio para os peptídeos e geramos suas respectivas superfícies de densidade eletrônica, potencial eletrostático e orbitais moleculares. A distribuição de cargas dos substratos serviu como um bom ponto de partida para a dedução do mecanismo de hidrólise de peptídeos, evidenciando os pontos na molécula acessíveis tanto para um ataque nucleofílico ou eletrofílico dependendo da reação (hidrólise ou deuteração (ou troca de prótons))¹⁰³. A Figura 59 exibe cinco maneiras diferentes para comparar os peptídeos, sendo o potencial eletrostático a superfície que oferece uma excelente visão da distribuição de cargas, com uma concentração maior sobre a carbonila da posição 4. Este é um grande subsídio para os modelos de complexos propostos neste trabalho, onde a associação do peptídeo com o $[\text{BMXDCu}_2]^{4+}$ acontece pela complexação dos átomos de cobre pelo grupo carbonílico da amida e pelo amino terminal.



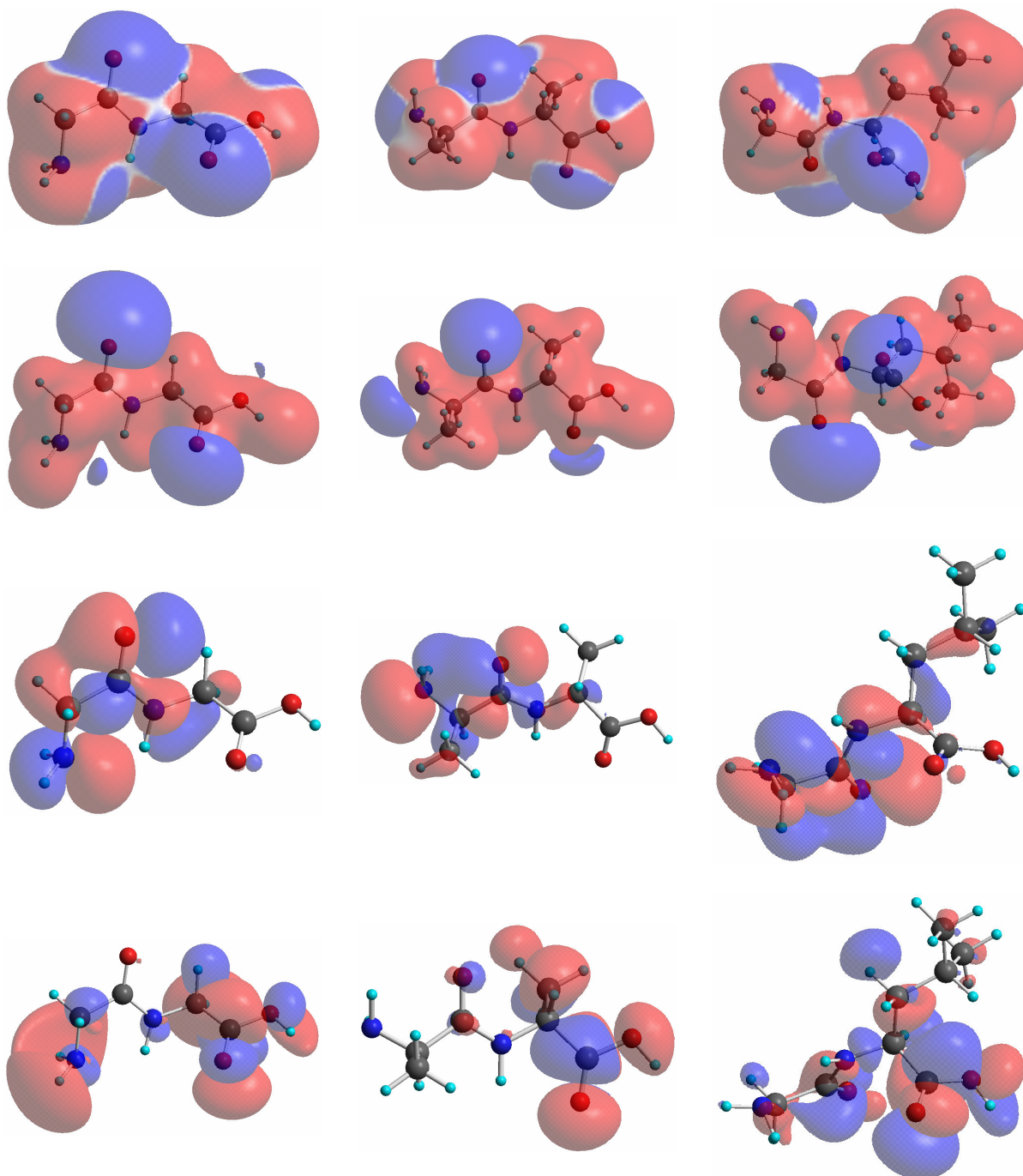


Figura 59. Cada linha representa uma vista das superfícies para os peptídeos, de cima para baixo temos: representação tridimensional da estrutura, densidade total de carga com o potencial eletrostático incluso (0,002 u.a), potencial eletrostático (1,0 u.a.), HOMO (0,02 u.a.) e LUMO (0,02 u.a.). Primeira coluna GG, segunda: AA, terceira GL.

A Tabela 15 resume as propriedades eletrônicas para os ligantes e substratos, as formas neutras possuem a seguinte ordem para o gap de energia (que pode

expressar a capacidade de ionização da molécula): GG > GL > AA, já para a forma aniônica é alterada GL > AA > GG, que é inversamente proporcional à ordem de associação destas espécies em pH = 6 (GG > AA > GL). Em relação aos ligantes o BDBPH é mais suscetível a ionização, fato devido ao grupamento fenólico presente.

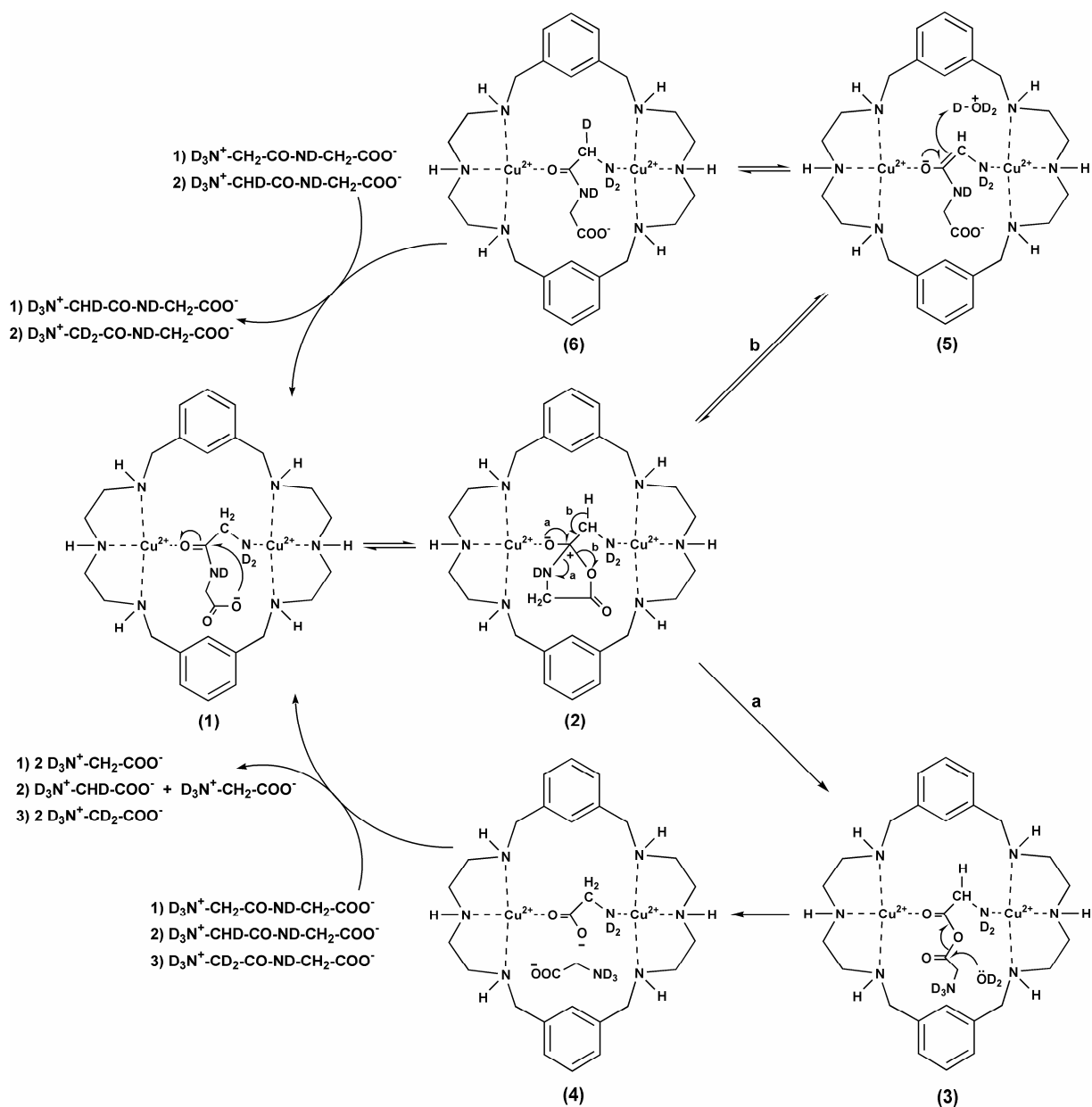
Tabela 15. Resultados eletrônicos (eV).

molécula	HOMO ₋₁	HOMO	LUMO	gap	LUMO ₊₁	LUMO ₊₂	Dipolo (Debye)
GG-(N*)	-7.29	-6.90	-0.41	6.49	-0.33	-0.14	3.19
GG-(A**)	-2.42	-2.07	2.61	4.68	3.39	3.58	8.10
AA-(N)	-7.45	-6.70	-0.82	5.88	-0.39	0.03	3.13
AA-(A)	-2.42	-2.09	2.61	4.71	2.98	3.38	8.31
GL-(N)	-7.21	-6.85	-0.45	6.40	-0.30	-0.06	2.79
GL-(A)	-2.52	-2.18	2.58	4.76	2.73	3.18	6.06
BMXD	-6.31	-6.31	-0.67	5.63	-0.64	-0.45	0.79
BDBPH	-6.07	-6.07	-0.60	5.47	-0.58	-0.37	0.09

*N – forma neutra;

**A – forma aniônica.

A distribuição de cargas nos peptídeos (Tabelas 16, 17 e 18), nos possibilitou traçar o seguinte panorama (com base no esquema 11),¹⁰³ o carbono da posição 4 pode sofrer ataque nucleofílico e conseqüentemente o peptídeo é clivado ou o carbono 5 pode abstrair um deutério do meio e realizar uma deuteração, no primeiro caso o principal fator eletrônico é a eletropositividade do carbono, já no segundo caso é o inverso o importante é a eletronegatividade do carbono. Em ambos os casos (dos carbonos 4 e 5 nos peptídeos neutros e aniônicos) a ordem de magnitude é a seguinte GL > GG > AA. Desta forma podemos traçar o seguinte panorama, a distribuição de cargas na GL é favorecida para que ocorram as reações de hidrólise e deuteração, mas o impedimento estérico causado pelo volumoso grupo alquílico causa um cancelamento deste fator.



Esquema 11. Mecanismo proposto para a hidrólise e deuteração do dipeptídeo GG catalisadas pelo complexo binuclear $[BMXDCu_2]^{4+}$.¹⁰³

Tabela 16. Cargas sobre os átomos do substrato glicilglicina.

Átomo	Normal	ânion
C(1)	0,469	0,498
O(carbonila)	-0,451	-0,627 -0,638
O(O-H)	-0,445	-
C(2)	-0,191	-0,292
N(3)	-0,312	-0,356
C(4)	0,294	0,355
O(4)	-0,535	-0,600
C(5)	-0,181	-0,233
N(6)	-0,690	-0,624
H (O-1)	0,369	-
H (C-2)	0,175	0,146 0,220 0,147
H (N-3)	0,346	0,338
H (C-5)	0,166	0,135 0,173 0,152
H (N-6)	0,294	0,282 0,298 0,305

A figura 60 apresenta as superfícies para as formas aniônicas dos peptídeos, o potencial eletrostático mais uma vez oferece uma excelente descrição da dinâmica das cargas nessas espécies. O carboxilato concentra o enorme volume de carga, mas a carbonila da amida continua apresentar uma concentração razoável de carga bem como o grupo amino terminal, isto fortalece a complexação via amino terminal e pela carbonila (amida), com o grupo carboxilato podendo realizar um ataque nucleofílico (Esquema 11). É importante lembrar que é mais fácil explorar a

estrutura química do substrato não complexado, e assim obter valiosas informações para explicar as observações experimentais. Pois a inclusão do metal no cálculo torna a solução problema, mais custosa computacionalmente.

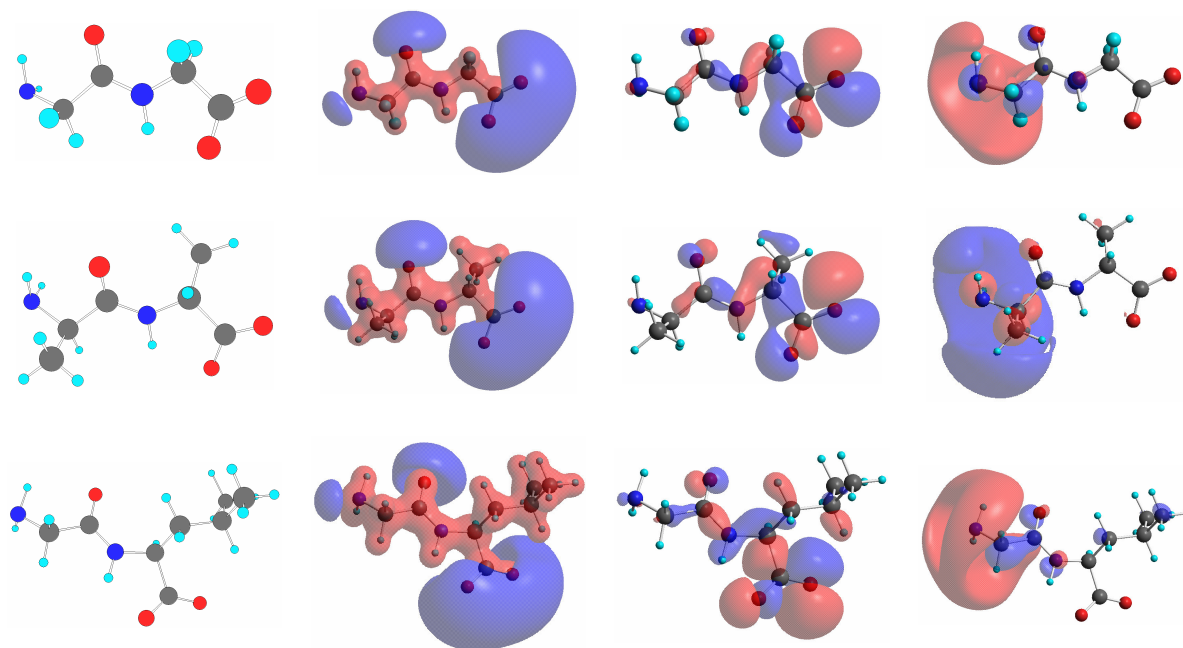


Figura 60. Da esquerda para direita, representação tridimensional; superfície de potencial eletrostático (4,3 u.a.); HOMO e LUMO (ambos com 0,02 u.a.). Cada linha contém um dipeptídeo, primeira linha apresenta a glicil-glicina, segunda a *D*-alanil- *D*-alanina e a terceira a glicil-*L*-leucina, todos em suas formas aniônicas.

Tabela 17. Cargas sobre os átomos do substrato *d*-alanil-*d*-alanina.

Átomo	Normal	Ânion	Átomo	Normal	Ânion
C(1)	0,650	0,596	C (C-5)	-0,445	-0,450
O(carbonila)	-0,473	-0,603	H (O-1)	0,377	-
		-0,640			
O(O-H)	-0,435	-	H (C-2)	0,193	0,140
C(2)			H(C(C-2))	0,154	0,129
	-0,269	-0,269		0,169	0,149
				0,189	0,165
C (C-2)	-0,434	-0,469	H (N(3))	0,324	0,335
N(3)	-0,300	-0,259	H (C-5)	0,123	0,123
C(4)			H(C(C-5))	0,147	0,145
	0,182	0,223		0,164	0,153
				0,170	0,154
O(4)	-0,515	-0,571	H (N-6)	0,287	0,279
				0,308	0,306
C(5)	-0,031	-0,073			
N(6)	-0,537	-0,565			

Tabela 18. Cargas sobre os átomos do substrato glicil-*l*-leucina.

Átomo	Normal	Ânion
C(1)	0,523	0,505
		-0,575
O(carbonila)	-0,425	-0,616
O(O-H)	-0,414	-
C(2)	-0,315	-0,521
C (C-2)	-0,519	-0,120
N(3)	-0,229	-0,260
C(4)	0,419	0,370
O(4)	-0,501	-0,574
C(5)	-0,231	-0,224
N(6)	-0,677	-0,626
H (O-1)	0,368	-
H (C-2)	0,189	0,137
H(C(C-2))	0,149	0,120
	0,161	0,145
H (N(3))	0,347	0,331
	0,166	0,137
H (C-5)	0,167	0,151
	0,295	0,285
H (N-6)	0,303	0,306

A proposta estrutural para o ATP⁴⁻ foi obtida pelo método de mecânica molecular AMBER que tem seus parâmetros ajustados para nucleotídeos e ácidos nucléicos e seu custo computacional é baixo. Sendo a molécula complexa por apresentar inúmeros sítios de coordenação, ainda estamos desenvolvendo um

modelo apropriado para submeter a cálculos mais rigorosos, só que a grande carga negativa, o número de átomos de fósforo e a liberdade conformacional eleva o tamanho do problema e dificulta o tratamento.

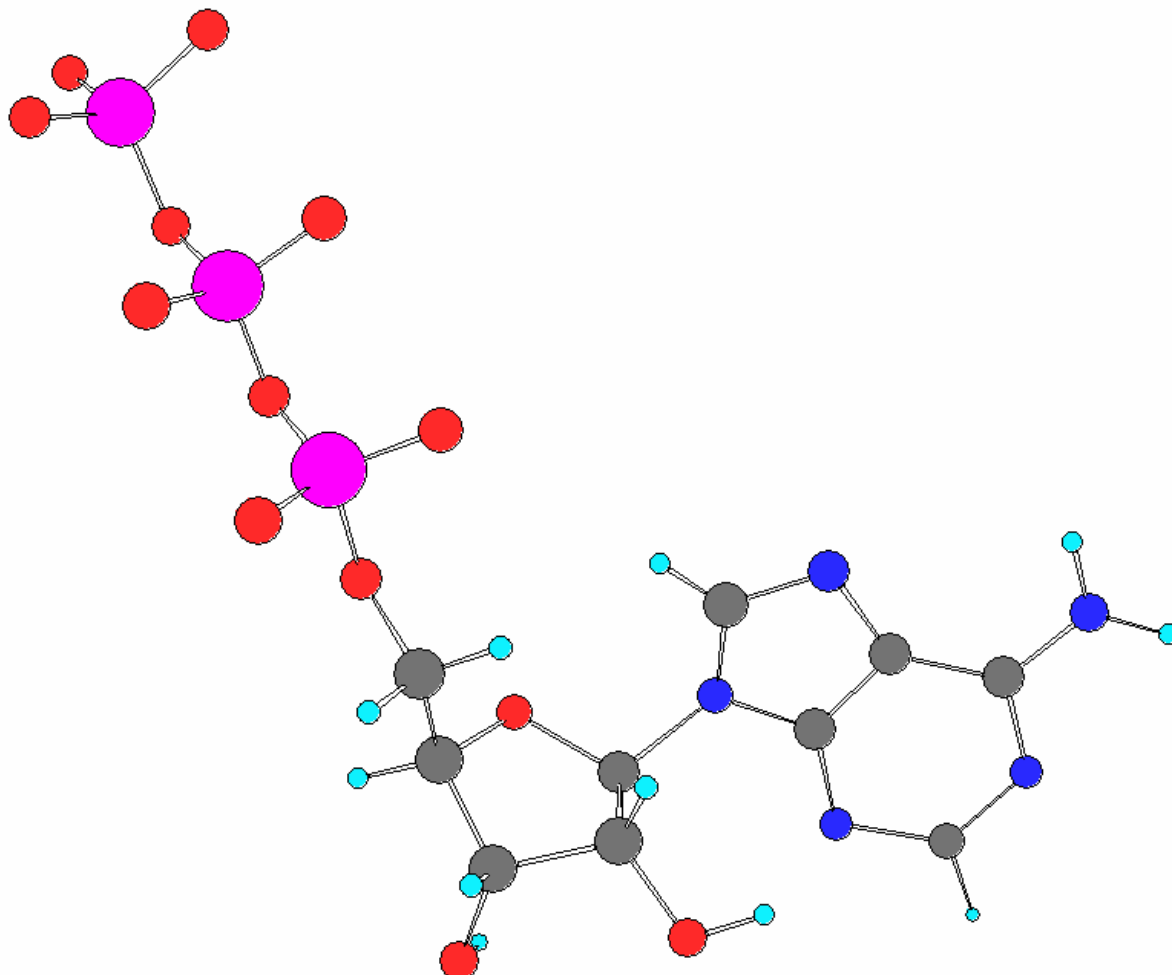


Figura 61. Estrutura otimizada pelo método de mecânica molecular AMBER para o ATP⁴⁻.

4.5.1.4 [BMXDCu₂-GG]³⁺

A teoria do funcional densidade é um método de qualidade com custo computacional médio para estudos teóricos de problemas bioinorgânicos. Foram testados inúmeros modelos para a associação da GG com o [(BMXD)Cu₂]⁴⁺ e chegamos a dois modelos que representam a espécie ativa e um modelo para a espécie inativa na hidrólise do dipeptídeo GG (Figura 62).¹⁰³

O modelo para a associação BMXD-Cu₂ consiste de dois átomos de cobre com uma esfera de coordenação com cinco átomos coordenados. Cada íon cobre tem 3 grupos aminos do BMXD na posição axial. De um lado tem-se coordenado um grupo amino terminal e do outro o grupo carbonila na posição 4, ambos em posição axial. A diferença em cada sítio de coordenação é o reconhecimento da GG; no primeiro modelo o carboxilato está complexado, já no segundo a carboxila terminal está livre para atacar a carbonila na posição 4 e fazer a hidrólise ou deuteração (Figura 62), a inclusão das águas de coordenação foi realizada para fechar uma esfera de pentacoordenação.

Nós supomos que por causa da distância entre os dois íons cobre (II) não ocorra nenhum acoplamento de spins. Assim, o complexo [BMXDCu₂-GG] tem dois spins desemparelhados isolados, que configure um spin total de $S = 1$ para a molécula ou um estado triplete.

A molécula apresenta certa simetria, pois os anéis aromáticos são movidos para baixo, e as duas unidades dietilenotriamina são viradas para o mesmo lado, caracterizando uma conformação do tipo “barco” (boat). A distância interatômica dos dois centros de cobre é de 6.9 Å.

A glicilglicina (GG) deve se aproximar do complexo por cima, uma vez que por baixo há um grande impedimento estérico, devido ao núcleo dos átomos envolvidos, e também ao impedimento eletrônico, pois essa área já está ocupada por muitos elétrons (anéis aromáticos).

A proposta para a espécie inativa é meramente especulativa e não há trabalhos na literatura que expliquem essa inativação. Nosso modelo é uma proposta de complexação pelo ânion resultante da desprotonação da amida peptídica que causaria a inativação da hidrólise.

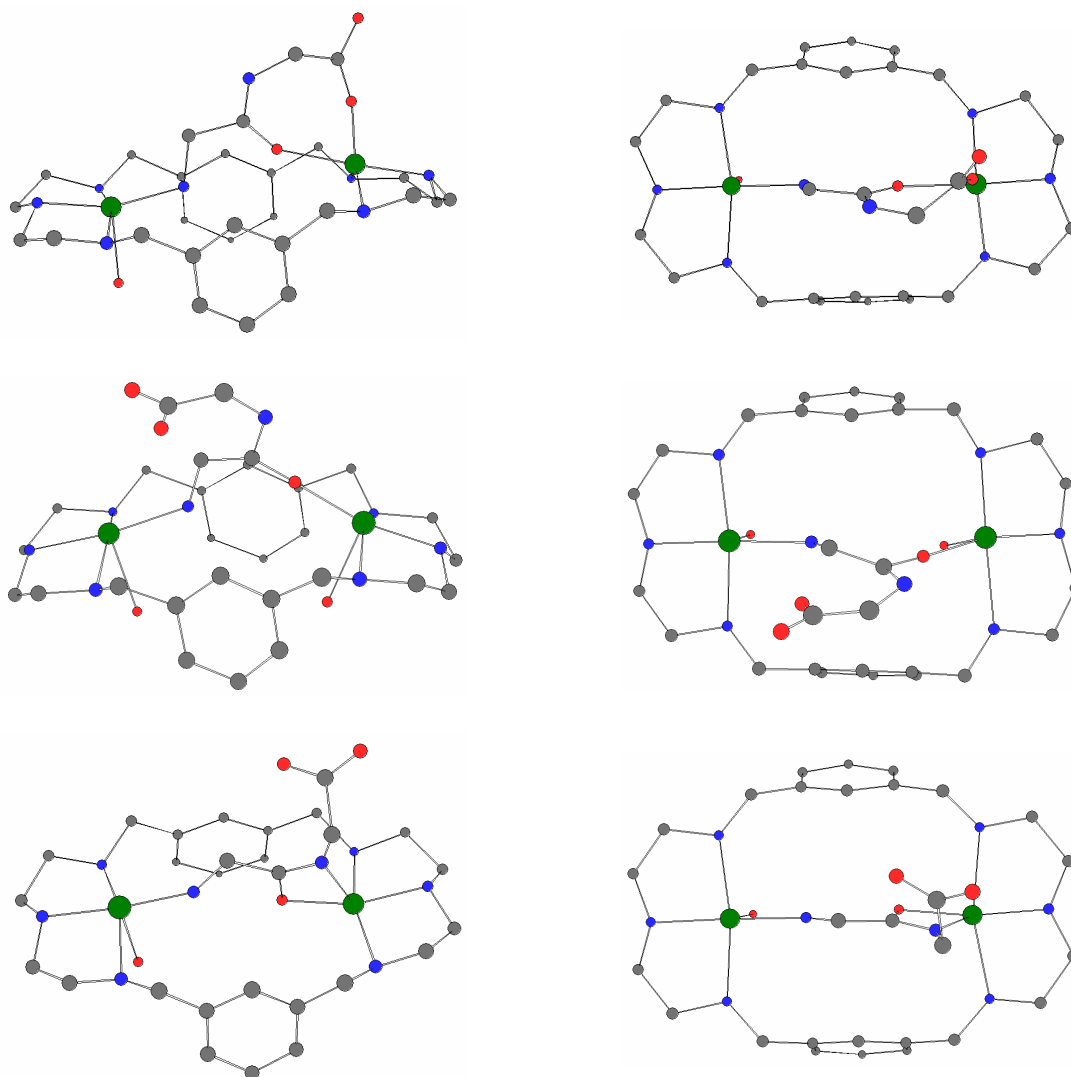


Figura 62. Propostas estruturais para a associação da GG com $[BMXDCu_2]^{4+}$, as duas primeiras linhas são propostas para espécie ativa e a última linha é para a espécie inativa onde o nitrogênio da amida está desprotonado.

4.5.1.5 $[BDBPHZn_2-GG]^+$

Para o modelo $[BDBPHZn_2-GG]^+$ foi criado apenas como um protótipo baseado na afinidade do oxigênio pelo átomo de Zinco. O modelo consiste na coordenação via a carbonila do carboxilato e da amida em um arranjo simétrico. Optamos por não colocar moléculas de água coordenadas, pois o zinco (II) se encontra hexacordenado, o que não impede também de realizar mais uma ou duas coordenações em solução aquosa. O modelo ainda está sob tratamento, a ilustração da figura 63 é o resultado obtido até a presente data.

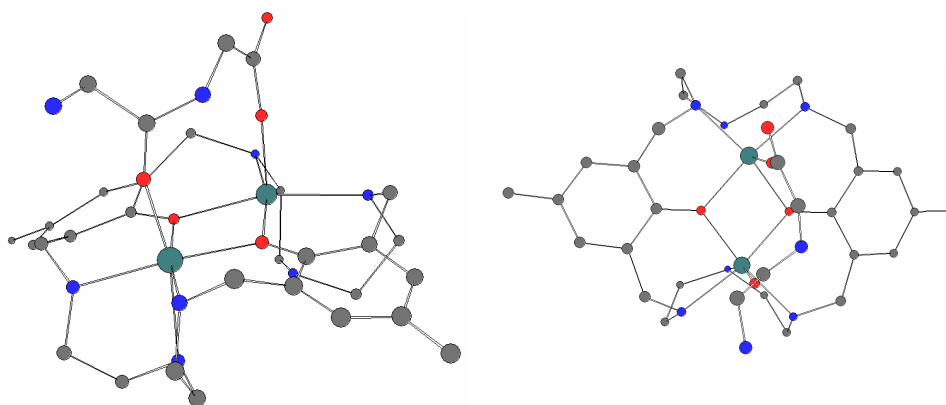


Figura 63.– Proposta estrutural para a associação da GG com Zn₂BDBPH.

4.5.1.6 [Fe₂(HPCINOL)₂(O)(SO₄)₂] (**1**).

Foram gerados os orbitais moleculares e as superfícies de densidade eletrônica, potencial eletrostático e densidade de spins, para os dois estados de spin limites, ou seja, o estado tripleto e o estado 11 para o complexo **1**, foram usados as coordenadas estruturais obtidas por difratometria de raios X. Aqui vale lembrar que o estado tripleto é mais importante para comparação com estudos magnetoquímicos a baixa temperatura, sendo o estado de spin 11 mais interessante para o estudo em solução a temperatura ambiente. A densidade de carga e o potencial eletrostático (Figura 64) são idênticos para ambos os estados de spin, com uma concentração de carga negativa sob íon sulfato. A principal diferença se observa na densidade de spin, onde o estado tripleto concentra o spin desemparelhado ao redor dos átomos metálicos, enquanto o estado onzeteto possui uma maior distribuição de spin para os ligantes, principalmente para os grupos sulfônicos. O oxigênio ponte em ambos os casos tem uma enorme densidade de spins, demonstrando um forte acoplamento. Mas a ausência de dados magnetoquímicos não permitiu essa correlação.

Vale relembrar que as coordenadas estruturais empregadas são as obtidas experimentalmente, e que a cela não é totalmente simétrica, sendo assim os dois átomos de ferro são levemente diferentes, apesar das semelhanças estruturais, fato que se observa tanto nas densidades de spin e orbitais moleculares (Figura 65).

Pequenas distorções da geometria fazem que a sobreposição dos orbitais não seja totalmente simétrica ou efetiva.

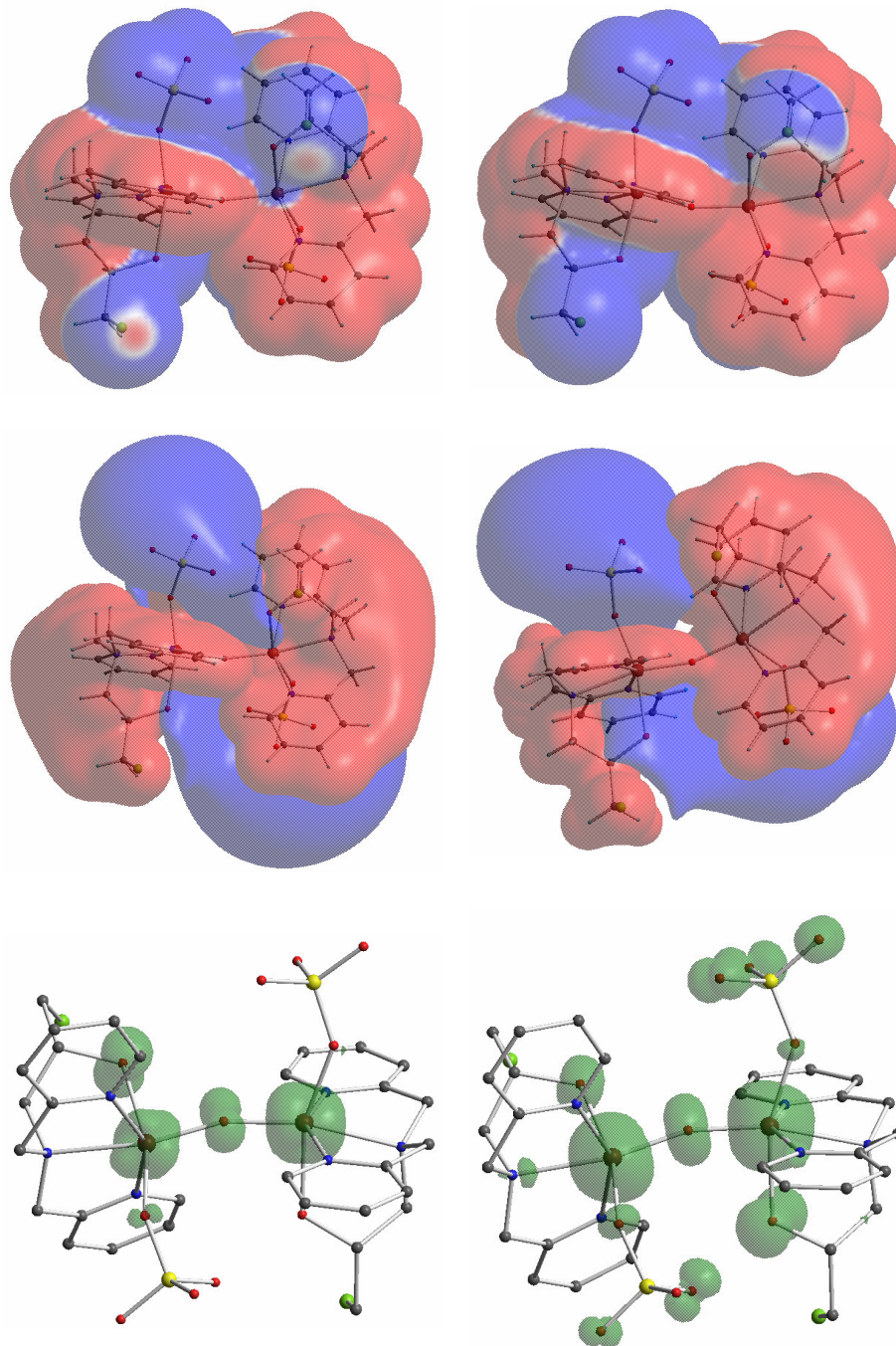
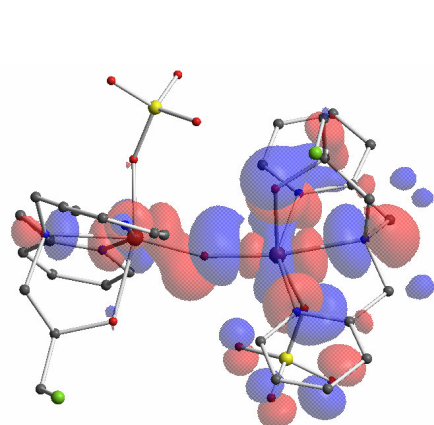
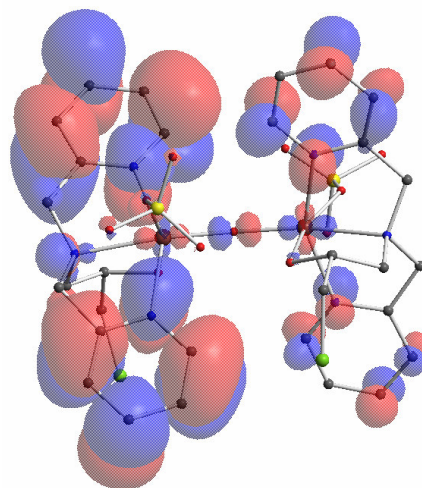


Figura 64. Superfícies para o complexo 1 (De cima para baixo: densidade total de carga com potencial eletrostático incluso (0,002 u.a.), potencial eletrostático (1,3 u.a.), densidade total de spin (0,01 u.a.) . Lado esquerdo: estado triplete e lado direito: estado 11.

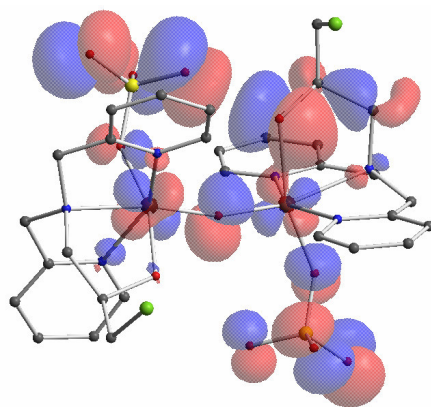
A Figura 65 traz um panorama da distribuição dos orbitais moleculares, a população dos orbitais é bastante distinta para cada caso de spin. Como a estrutura de raios X não corresponde a espécie ativa em solução, a qual troca os grupos sulfatos por águas de coordenação e subsequentemente realiza hidrólise formando uma espécie hidróxido, que é a espécie ativa, não podemos traçar correlações estrutura *versus* atividade. Ficando o diagrama meramente para correlação magnetoquímica.



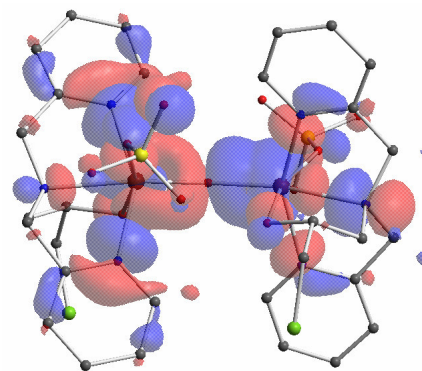
LUMO₊₁ = -4,77 eV



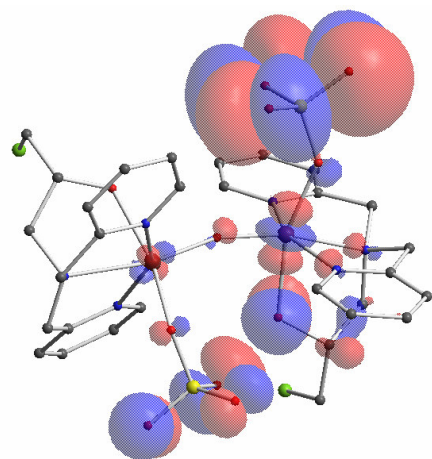
LUMO₊₁ = -6,20 eV



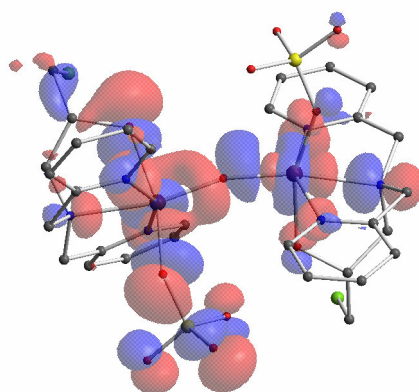
LUMO = -4,79 eV



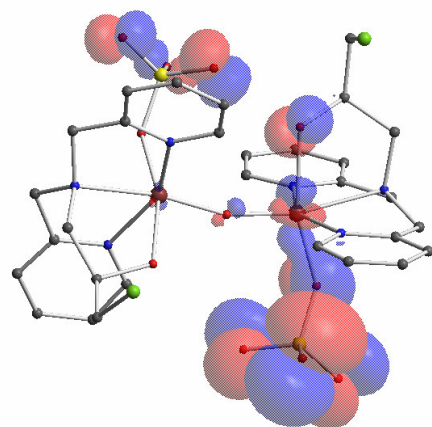
LUMO = -6,28 eV



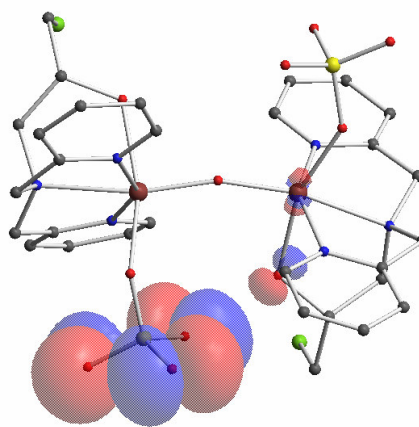
HOMO = -5,19 eV



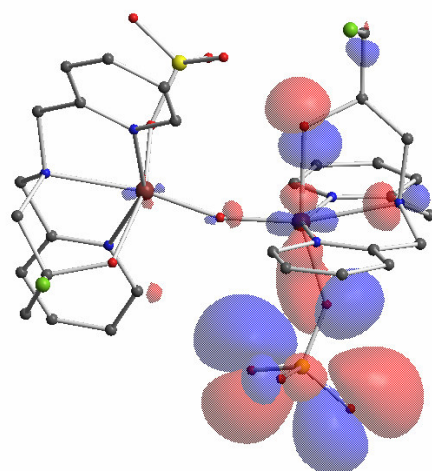
HOMO = -6,35 eV



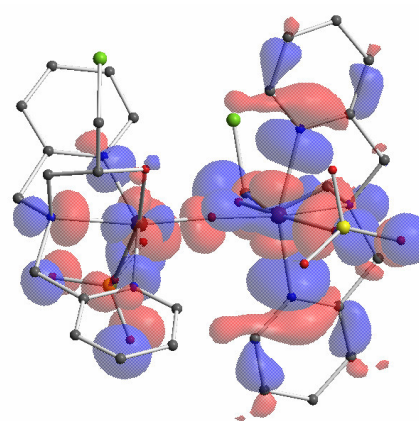
HOMO₋₁ = -5,47 eV



HOMO₋₁ = 6,61 eV



HOMO₋₂ = -5,88 eV



HOMO₋₂ = -6,77 eV

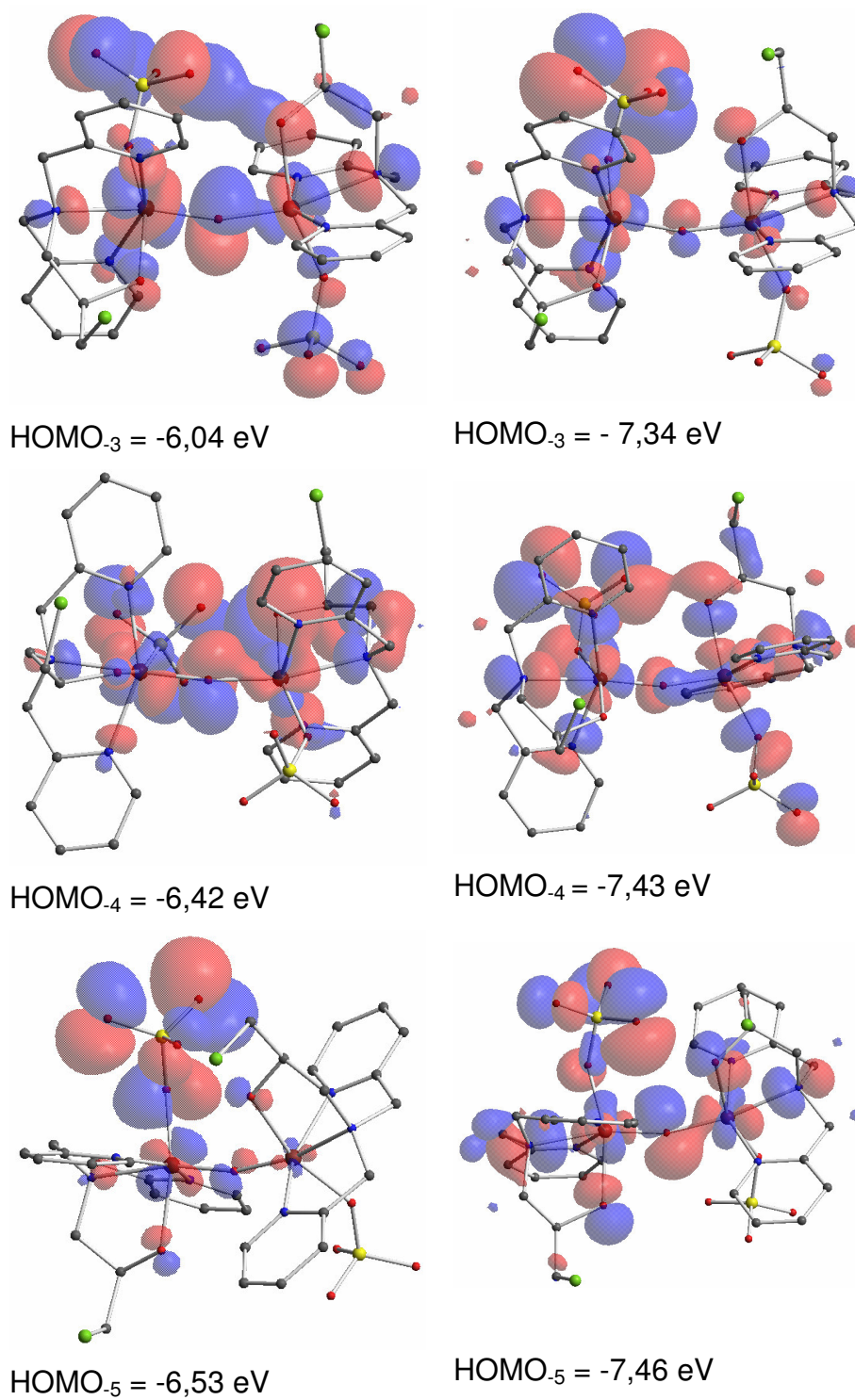


Figura 65. Orbitais moleculares para o complexo 1, lado esquerdo estado triplete e lado direito: estado 11.

A tabela 19 mostra as transições eletrônicas possíveis em cada estado de spin, no caso tripleto elas são mais energéticas pois devem envolver orbitais provenientes dos ligantes e os estado onzeteto deve envolver mais orbitais d dos metais.

Tabela 19. Transições eletrônicas calculadas.

Estado de spin	Gap (eV)	2º Trans. (eV)	3º Trans. (eV)
3	0,40	0,62	1,94
11	0,07	0,15	0,33

5 CONCLUSÕES

- ✓ O complexo binuclear BDBPH-Zn(II) forma complexos ternários com os peptídeos glicilglicina e *dl*-alanil-*dl*-alanina. Complexos ternários BDBPH-Zn(II)-glicil-*l*-leucina não foram detectados em quantidade apreciáveis, demonstrando uma seletividade do complexo na associação de peptídeos. Provavelmente devido ao efeito de impedimento do resíduo de aminoácido leucina, o qual dificulta por impedimento espacial este dipeptídeo de coordenar-se ao centro metálico na cavidade do complexo receptor, a exemplo dos descritos na literatura.¹¹²
- ✓ O complexo binuclear BMXD-Cu(II) forma complexos ternários com os peptídeos glicilglicina, *dl*-alanil-*dl*-alanina e glicil-*l*-leucina demonstrando, através de maiores constantes de associação do complexo receptor, uma maior seletividade, quando comparado ao complexo binuclear BDBPH-Zn(II). Além das características intrínsecas de cada metal, um número maior de sítios de coordenação livres, em meio aquoso, parece favorecer o complexo BMXD-Cu(II) na associação desses peptídeos.
- ✓ A associação do ATP pelo complexo binuclear BDBPH-Fe forma complexos ternários hidróxidos. O presente estudo permite decidir quais os valores de pH onde cada espécie ternária é máxima, para medir o efeito catalítico sobre a hidrólise do ATP.
- ✓ Os complexos $[\text{Fe}_2(\text{HPCINOL})_2(\text{SO}_4)_2(\mu\text{-O})]$ **1** e $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{OAc})](\text{ClO}_4)$ **2**, quando em solução aquosa, geram espécies do tipo $(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-O})\text{Fe}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})$ e $[\text{Ni}_2(\text{HBPCINOL})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^+$, respectivamente, potenciais nucleófilos nas reações de hidrólise. Em solução, esses complexos também se associam a moléculas de interesse biológico como o ATP e a GG. O complexo **1** apresenta maior afinidade pelo ATP em relação a GG, provavelmente devido a maior interação dos grupos fosfatos pelo centro binuclear de ferro (III). Com **2** tem-se uma relação inversa, ou seja, o complexo **2** tem uma maior afinidade pela GG em relação ao ATP.

- ✓ As análises dos compostos por espectrometria de massas por “electrospray” confirmaram a maioria das espécies detectadas em solução. A informação de que complexos mononucleares se formam a partir de complexos binucleares, só foi possível obter graças a essa técnica.⁹⁰
- ✓ Estudos preliminares de interação do complexo $[\text{Fe}_2(\text{HPCINOL})_2(\text{SO}_4)_2(\mu\text{-O})]$ **1** com o DNA evidenciam a capacidade desse composto em promover uma clivagem hidrolítica dessa biomolécula.
- ✓ A distribuição de cargas dos substratos serviu para efetuar correlações com os resultados experimentais de hidrólise e deuteração de peptídeos pelo $[\text{BMXDCu}_2]^{4+}$, onde o fator eletrônico é importante, mas pode ser anulado por impedimento estérico.¹⁰³

Os ligantes BMXD e BDBPH possuem orbitais de fronteira diferentes (HOMO e LUMO), porém suas distribuições de carga são semelhantes, em ambos os casos o nitrogênio da posição 2 é o mais eletronegativo, e sendo assim possui um pKa mais alto.

Foram montados dois modelos para espécie ativa do $[\text{BMXDCu}_2\text{-GG}]^{3+}$ com base nos resultados experimentais anteriores e uma estrutura para espécie inativa. Para o sistema $[\text{BDBPHZn}_2\text{-GG}]^+$ somente um modelo foi criado, baseado na afinidade dos oxigênios pelo átomo de zinco. Estes modelos dão uma ótima noção da distribuição espacial do substrato na cavidade do macrocíclico.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BJERRUM, J. Metal Ammine Formation in Aqueous Solution, Thesis 1941, reprinted P. Haase & Son, Copenhagen, 1957.
2. SCHWARZENBACH, G., MEIER, J. Formation and investigation of unstable protonation and deprotonation products of complexes in aqueous solution, Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, v. 8, p. 302-312, 1958.
3. SCHWARZENBACH, G. Chelate complex formation as a basis for titration processes Analytica Chimica Acta, v. 7, p. 141-155, 1952.
4. PEARSON, R. G. Hard and Soft acids and bases, Coordination Chemistry Reviews, v.100, p. 403-425, 1990.
5. IBERS, J. A., HOLM, R. H. Modeling coordination sites in metallobiomolecules, Science, v. 209, p. 223-235, 1980.
6. WILCOX, D. E., Binuclear Metallohydrolases, Chemical Reviews, v.96, p. 2435-2458, 1996.
7. COLLMAN, J. P. Synthetic models for oxygen - binding hemoproteins., Accounts Chemical Research, v.10, p. 265-272, 1977.
8. KARLIN, K. D., BARTON, J. K., Bio-inorganic chemistry: New advances, new directions and new investigators, Current Opinion in Chemical Biology, v. 5, p. 165-167, 2001.
9. TAKARAHARA, P. M., FREDERICK, C. A., LIPPARD, S. J., Crystal structure of the anticancer drug cisplatin bound to duplex DNA, Journal of the American Chemical Society, v. 118, p.12309-12321, 1996.
10. DOMINGO, J. L., Developmental toxicity of metal chelating agents, Reproductive Toxicology Review, v. 12, p.499-510, 1998.
11. WANG, S., LEE, R. J., GREEN, M. A., LOW, P. S., Synthesis, purification and tumor cell uptake of Ga-67-deferoxamine-fosfato, a potencial radiopharmaceutical for tumor imaging, Bioconjugate Chemistry, v. 7. p. 56-62, 1996.
12. BANFIELD, J. F., WELCH, S. A., ZHANG, H., et al. Aggregation-based crystal biomineralization products, Science, v. 289, p. 751-754, 2000.
13. LEHN, J. M., In Perspectives in Coordination Chemistry, (Eds.: A. F. Williams, C. Floriani and A. E. Merbach), VHCA, Basel and VCH, Weinheim, 447p, 1995.
14. WALSH, C., Flavin coenzymes: At the crossroads of biological redox chemistry, Accounts Chemical Research, v.13, p.148-154, 1980.

15. PEDERSEN, C. J. Cyclic Polyethers and Their complexes with Metal Salts, Journal of the American Chemical Society Communications p.2495-96, 1967.
16. LEHN, J. M., Cryptates – Inclusion complexes of macropolycyclic receptor molecules, Pure and Applied Chemistry, v.50, p.871-877, 1978.
17. LEHN, J. M. Dinuclear Cryptates: Dimetallic Macropolycyclic Inclusion Complexes Concepts - Design - Prospects, Pure and Applied Chemistry, v. 52, p. 2441-2459, 1980.
18. MELSON, G. A. Coordination Chemistry of Macrocyclic Compounds, p.02-35, Plenum Press, London, 1979.
19. BENCINI, A., BIANCHI, A., PAOLETTI, P., Thermodynamic and structural aspects of transition metal compounds. Polynuclear complexes of Azamacrocycles. Coordination Chemistry Reviews, v.120, p.51-58, 1992.
20. PEDERSEN, C. J. Cyclic polyethers and their complexes with metal salts, Journal of the American Chemical Society Communications p. 2495-96, 1967.
21. ZHU, B., et al. Lanthanide binuclear macrocyclic complexes as synthetic enzymes for the cleavage of DNA. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, v.135, n. 1, p.107-110, 1998.
22. OKAWA, H., FURUTACHI, H., FENTON, D. E. Heterodinuclear metal complexes of phenol-based compartmental macrocycles. Coordination Chemistry Reviews, v.174, p.51-75, 1998.
23. KIMURA, E., SHIONOYA, M., MITA, T. YOICHI. I. A New Cyclam with an Appended Imidazole. The first biomimetic ligand of imidazole for axial π -interaction with metal ions, Journal of the American Chemical Society Communications., p.1712-1714, 1987.
24. ILIOUDIS, C. A., STEED, J., W., Organic Macrocyclic polyamine-based receptors for anions, Journal of Supramolecular Chemistry, v.1, p. 165-187, 2001.
25. IZATT, R. M., CHRISTENSEN, J. J. Synthesis of Macrocycles - The Design of Selective Complexing Agents, Progress in Macrocyclic Chemistry, v.3, John Wiley & Sons, New York, 1987.
26. CABBINESS, D. K., MARGERUM, D. W., Macrocyclic effect on the stability of copper(II) tetramine complexes, Journal of the American Chemical Society v. 91, p. 6540-41, 1969.

27. MARTELL, A. E., ANDERSON, W. F., BASMAN, D. G. The Design and Synthesis of Chelating Agents, Elsevier/North-Holland, New York, p. 67, 1981.
28. MENIF, R., MARTELL, A. E. Oxygen insertion by a new tyrosinase model binuclear Cu^I macrocyclic complex, Journal of the Chemical Society Communications p. 1521-1523, 1989.
29. SHANGGUAN, G., MARTELL, A. E. et al. The synthesis, crystal structure and metal complexes of a new macrocyclic dinucleating ligand, 3,6,9,17,20, 23-hexaaza-29-30-dihydroxy-13,27-dimethyl-tricyclo[23,3,1,1^{11,15}] triaconta-1(28),11,13,15(30),25,25-hexaene Inorganica Chimica Acta, v.299, p.47-58, 2000.
30. GAO, J., MARTELL, A. E. et al. μ -Imidazole-bridged dicopper(II) macrocyclic complex: synthesis, structure, stability and Tyr-like activity, Inorganic Chimica Acta, v.346, p.67-75, 2003.
31. LU, Q., MARTELL, A. E. et al. Molecular Recognition by the Protonated Hexaaza Macrocyclic Ligand 3,6,9,16,19,22-Hexaaza-27,28-dioxatricyclo[22.2.1.111.14] octacos-1(26),11,13,24-tetraene, Inorganic Chemistry v.34, p.4958-4964, 1995.
32. COSTAMAGNA, J., et al. Complexes of macrocycles with pendant arms as models for biological molecules, Coordination Chemical Reviews, v.196, p.125-164, 2000.
33. RADECKA-PARYZEK, W., PATRONIAK, V., LISOWSKI, Metal complexes of polyaza and polioxaaza Schiff base macrocycles, Coordination Chemistry Reviews, v. 249, p. 2156-2175, 2005.
34. OUDER WOLBERS, M. P. et al. Novel preorganized hemispherands to encapsulate rare earth ions: Shielding and ligand deuteration for prolongate lifetime of excited Eu³⁺ ions, Journal of the American Chemical Society, v. 119, p. 138-144, 1997.
35. HUSKENS, J., PETERS, J. A., VAN BECCUM, H., Lanthanide(III) catalyzed synthesis of 2-(carboximethyl)-2,4-(R),5-(R)tricarboxy-1,3-dioxolane and its coordination of lanthanide(III) and calcium(II), Inorganic Chemistry, v. 34, p. 1756-1763, 1995.
36. AIME, S., CASTELI, D. D., FEDELI, F., TERRENO, E., A paramagnetic MRI-CEST agent responsive to lactate concentration, Journal of the American Chemical Society, v. 124, p. 9364-9365, 2002.
37. JANG, Y. H., BLANCO, M., et al. Mechanism and energetics for complexation of ⁹⁰Y with 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-Tetraacetic acid (DOTA), a model for cancer radioimmunotherapy, Journal of the American Chemical Society, v. 121, p. 6142-6151, 1997.

38. SESSLER, J. L., MODY, T. D., HEMMI, G. W., et al. Gadolinium(III) texaphirin: a novel MRI contrast agent, Journal of the American Chemical Society, v. 115, p. 10368 -10369, 1993.
39. WANG, K., LI, R., CHENG, Y., ZHU, B., Lanthanides: future drugs ?, Coordination Chemistry Reviews, v. 190-192, p. 296-308, 1998.
40. MORROW, J. R., BUTTERRY, L. A., SHELTON, V. M., BERBACK, K. A., Efficient catalytic cleavage of RNA by lanthanide(III) macrocyclic complexes: Towards synthetic nucleases for *in vivo* applications, Journal of the American Chemical Society, v. 114, p. 1903 -1905, 1992.
41. HAYASHI, N., TAKEDA, N., SHIIBA, T., YASHIRO, K., WATANABE, K., KOMIYAMA, M., Interaction of binuclear transition metal complexes with DNA, Inorganic Chemistry, v. 32, p. 5851-5867, 1993.
42. VOET, D., VOET, J. G. Bioquímica, 3^a ed. Artmed, Porto Alegre, 2006.
43. GRANT, I. J., HAY, R.W., Copper(II) catalysis of the hydrolysis of glycyglycine, Australian Journal of Chemistry, v.8, p.1189-1195, 1965.
44. HAY, R. W., Glycyglycine dipeptidase Pure and Applied Chemistry, v. 13, p. 157-163, 1963.
45. LAWRENCE, L., MOORE, W. J., Kinetics of the hydrolysis of simple glycine peptides, Journal of the American Chemical Society, v. 73, p. 3973 -3977, 1951.
46. BRYANT, R. A., HANSEN, D. E., Direct measurement of the uncatalyzed rate of hydrolysis of a peptide bond, Journal of the American Chemical Society, v.118, p. 5498-5499, 1996.
47. SILVERMAN, R. B. The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions Revised Edition, p.39 - 64, Academic Press, London, 2002.
48. TAKASAKI, B. K., CHIN, J. et al. Determination of the equilibrium constant for coordination of an amide carbonyl to a metal complex in Water, Journal of the American Chemical Society, v. 115, p. 1157- 1159, 1993.
49. BURGESSON, I. E., KOSTIC, N. M. Selective hydrolysis of unactivated peptide bonds, promoted by platinum(II) complexes anchored to amino Acid Side Chains. Inorganic Chemistry, v.30, p.4299-4305, 1991.
50. OLIVEIRA, M. C. B., TEREZI, H., NEVES, A. et al., Hydrolytic protein cleavage mediated unusual mononuclear copper(II) complexes: X-ray structure and solution studies, Inorganic Chemistry, v.44 p. 921-929, 2005.

51. MATTHEWS, B. W. Structural Basis of the Action of Thermolisin and Related Zinc Peptidases, Accounts Chemical Research, v.21, p.333- 340, 1988.
52. CHRISTIANSON, D. W., LIPSCOMB, W. N. Carboxypeptidase A, Accounts Chemical Research, v.22, p.62-69, 1989.
53. KAHNE, D., STILL, W. C. Hydrolysis of a peptide bond in neutral water, Journal of the American Chemical Society, v. 110, p. 7529-7534, 1988.
54. RADZICKA, A., WOLFENDEN, R., Rates of uncatalyzed peptide bond hydrolysis in neutral solution and the transition state affinities of proteases, Journal of the American Chemical Society, v. 118, p. 6105- 6109, 1988.
55. FIFE, T. H., SQUILLACOTE, V. L., Metal ion effects on intramolecular nucleophilic carboxyl group participation in amide and ester hydrolysis. Hydrolysis of N-(8-Quinolyl)phthalamic acid and 8-quinolyl hydrogen glutarate, Journal of the American Chemical Society, v.100, p. 4778-4787, 1978.
56. GROVES, J. T., CHAMBRES, R. R. Jr., Geometrical and stereochemical factors in metal-promotes amide hydrolysis, Journal of the American Chemical Society, v.106, p. 630-638, 1984.
57. SCHEPARTZ, A., BRESLOW, R., Hydrolysis of an amide in carboxipeptidase model using Co(III) and bifuncional catalysis, Journal of the American Chemical Society, v. 109, p. 1814-1826, 1987.
58. FIFE. T. H., PRZYSTAS, T. J., Divalent metal ion catalysis in amide hydrolysis, the Hydrolysis of N-Acylimidazoles, Journal of the American Chemical Society, v. 108, p. 4631-4636, 1986.
59. LUIZ, M. T. B., SZPOGANICZ, B., MARTELL, A. E. et al., Molecular recognition of dipeptides. Catalysis of deuteration and hydrolysis of glycyglycine by dinuclear OBISDEIN-Zn(II) complexes Inorganica Chimica Acta, v. 287, p.134-141, 1999.
60. ZHU, L., KOSTIC, N. M., Toward artificial metallopeptidases: Mechanisms by which platinum(II) and palladium (II) complexes promote selective fast hydrolysis of unactivated amide bonds in peptides, Inorganic Chemistry, v. 31, p. 3994-4001, 1992.
61. BERTINI, I., GRAY, H. B., LIPPARD, S., VALENTINE, J., Bioinorganic Chemistry, Editora University Science Books, California, 1994.
62. KESICKI, E. A., DEROSCH, M. A., FREEMAN, L. H., WALTON, C. L., HARVEY, D. F., TROGLER, W. C., Interaction of binuclear transition metal complexes with DNA, Inorganic Chemistry, v.32, p. 5851-5867, 1993.

63. BLACKBURN, G. M., GAIT, M. J., Nucleic acids in chemistry and biology, 2^a Edition, Oxford University Press, USA, 1996.
64. KORELKA, J., LEGENDRE, F., E'REEDER, F., CHOTTARD, J. C., Kinetic aspects of interactions between DNA and platinum complexes, Coordination Chemistry Reviews, v. 190, n.192, p. 61-82, 1999.
65. STUBBE, J., Mechanisms of bleomycin-induced DNA degradation, Chemical Reviews, n. 87, p. 1107-1136, 1987.
66. HECHT, S. M., The chemistry of activated bleomycin, Accounts of Chemical Research, v. 19, p. 383-391, 1986.
67. COWAN, J. A., Chemical nucleases, Current Opinion in Chemical Biology, v. 5, n. 6, p. 634-642, 2001.
68. HEGG, E. L., BURSTIN, J. N. Toward the development of metal-based synthetic nucleases and peptidases: a rationale and progress report in aplying the principles of coordination chemistry. Coordination Chemistry Reviews, v.173, p.133-165, 1998.
69. WESTHEIMER, F. H., Why nature chose phosphatases, Science, v. 235, p. 1173-1178, 1987.
70. SIGMAN, D. S., MAZUMBER, A., PERRIN, D. M., Chemical Nucleases, Chemical Reviews, v. 93, p. 2295-2316, 1993.
71. WATSON, J. D., CRICK, F. H. C., Molecular structure of nucleic acids, Nature, v. 171, p. 737-738, 1953.
72. WILCOX, D. E., Binuclear Metallohydrolases, Chemical Reviews, v.96, p.2435-2458, 1996.
73. KLABUNDE, T., KREBS, B., The dimetal center in purple acid hosphatases, Structure and Bonding, v. 89, p. 177-198, 1997.
74. GANI, D., WILKIE, J., Metal ions in the mechanism of enzyme-catalysed phosphate monoester hydrolyses, Structure and Bonding, v. 89, p. 133-175, 1997.
75. CIURLI, S., BENINI, S., RYPNIEWSKI, W. R., WILSON, K. S., MILETTI, S., MANAGNI, S., Structural properties of the nickel ions urease: novel insights into the catalytic and of inhibition mechanisms Coordination Chemistry Reviews, v. 331, p.190-192, 1999.
76. BARRIOS, A. M., LIPPARD. S. J., Interaction of urea with a hydroxide-bridgeg dinuclear nickel center: An alternative model for mechanism of urease, Journal of the American Chemical Society, v.122, p. 9172-9181, 2000.

77. SUMMER, J. B., The isolation and crystallization of enzyme urease, Journal of Biological Chemistry, v. 69, p- 435-441, 1926.
78. JABRI, E., CARR, M. B., HAUSINGER, R. P., KARPLUS, P. A., The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*, Science, v. 268, p. 998-1004, 1995.
79. BLAKELEY, R. L., TRESTON, A., ANDREWS, R. K., ZENNER, B., Nickel(II)-promoted ethanolysis and hydrolysis of N-(2-pyridylmethyl)urea. A model for urease, Journal of the American Chemical Society, v.104, p. 612-614, 1982
80. MOBLEY, H. L. T., HAUSINGER, R. P, Microbial ureases – Significance, regulation an molecular characterization, Microbiology Review, v. 53, p. 85-108, 1989.
81. BENINI, S., RYPNIEWSKI, W. R., WILSON, K.S., MILETTI, S., CIURLI, S., MANGANI, S., A new proposal for urease mechanism based on the crystal structure of native enzyme from *Bacillus Pasteurii*: Why urea costs two nickels, Structure with Folding & Design, v. 7, p. 205-214,1999.
82. BENINI, S., RYPNIEWSKI, W. R., WILSON, K.S., MILETTI, S., CIURLI, S., MANGANI, S., The complex of *Bacillus pasteurii* urease acetohydroxamate anion from X-ray data at 1,55 Å resolution , Journal Biological of Inorganic Chemistry ,v.5, p.110-118, 2000.
83. STEWART, I., Electrospray mass spectrometry: a tool for elemental speciation, Spectrochimica Acta Part B, v.54, p. 1649-1695, 1999.
84. DOLE, M., et al., Molecular beams of macroions, Journal of Chemical Physics, v. 49, p. 2240-2249, 1968.
85. FENN, J. B., YAMASHITA, M., Eletrospray íon source – Another variation on the free-jet theme, Journal of Chemical Physics, v. 88, p. 4451-4459, 1984.
86. FENN, J. B., YAMASHITA, M., Negative ion production with the electrospray ion source, Journal of Chemical Physics, v. 88, p. 4671-4675, 1984.
87. CROTTI, A.E. M., VESSECCHI, R., LOPES, J. L. C., LOPES, N. P., Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular, Química Nova, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.
88. TANIGUCHI, S., Oxidation of 2, 6 – Bis(hydroxymethyl)phenols to 2-Hydroxyisophthalaldehydes by MnO₂, Bulletin Chemistry Society of Japan, v. 57, p. 2683-2684, 1984.

89. MOORE, K., VIGEE, G. S. The Synthesis of Binuclear Copper(II) Complexes and the Study of their Catecholase Activity, Inorganic Chimica Acta, v.66, p.125-130, 1982.
90. FERNANDES, C., HORN Jr, A., SILVA, M. S., SZPOGANICZ, B., BORTOLUZZI, A. J., et al. Solid state and solution characterization of a new dinuclear nickel (II) complex: The search for synthetic models for urease, Journal of Molecular Structure, v. 797, p.154-164, 2006
91. HORN Jr, A., FERNANDES, C., BORTOLUZZI, A. J., et al. Coordination chemistry of a new ligand 1-(bis-piridin-2-ylmethyl-amino)-3-chloro-propan-2-ol (HPCINOL) with copper (II). X-ray crystal structure, spectroscopic and electrochemical properties of the complex [Cu(HPCINOL)(CH₃CN)](ClO₄)₂, Journal do Molecular Structure, v. 749, p.96-102, 2005.
92. MOTEKAITIS, R. J., MARTELL, A. E., WELCH, M. J., Stabilities of trivalent metal complexes of phenolic ligands related to *N,N'*-Bis(2-hydroxybenzil)ethylenediamine-*N,N'*-diacetic acid (HBED), Inorganic Chemistry, v. 29, p. 1463-1467, 1990.
94. MARTELL, A. E., MOTEKAITIS, R. J. Determination and Use of Stability Constants. 2 ed., New York: VCH Publishers, 200p. 1992.
95. BAES JR, C. F., MESMER, R. E., The Hydrolysis of Cations, John-Wiley & Sons, Interscience Publication, New York, 1976.
96. SCHWARZENBACH, G., FLASCHKA, H., Complexometric Titrations, Methuen & Co., London, 1969.
97. ROSSOTTI, F. J. C. R., Potentiometric titrations using Gran's plot, Journal of Chemical Education, v. 42, p. 375-379, 1965.
98. MOTEKAITIS, R. J., MARTELL, A. E., BEST – A new program for rigorous calculation of equilibrium parameters of complex multicomponent systems, Canadian journal of chemistry, v. 60, p. 2403-2409, 1982.
99. WADT, W.R., HAY, P. J., *Ab Initio* effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au includind the outermost core orbitals, Journal of Chemical Physics, v. 82, p.299-308, 1985.
100. STEVENS, W. J., BASCH, H., KRAUSS. M., Compact effective potentials and efficient shared-exponent basis sets for the first-and second-row atoms, Journal of Chemical Physics, v.81, p.6026-6033, 1984.
101. WADT, W.R., HAY, P.J., *Ab Initio* effective core potentials for molecular calculations. potentials for main group elements Na to Bi, Journal of Chemical Physics, v.82, p.284-298, 1985.

102. WADT, W.R., HAY, P. J., *Ab Initio* effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg, Journal of Chemical Physics v. 82, p. 270-283, 1985.
103. FRANZOI, A.C., SZPOGANICZ, B., et al., Hydrolysis and deuteration of glycyglycine catalyzed by dinuclear BMXD-copper(II) complex, Journal of the Brazilian Chemical Society, *in press*.
104. HORN Jr, A., NEVES, A., SZPOGANICZ, B., et al., Synthesis, crystal structure and properties of dinuclear iron(III) complexes containing terminally coordinated phenolate/H₂O/OH⁻ groups as models for purple acid phosphatases: efficient hydrolytic DNA cleavage, Inorganica Chimica Acta, v.358, p.339-351, 2005.
105. SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRIL, T. C. Identificação espectrofométrica de compostos orgânicos, Editora LTC, Traduzido por LENCRASO, R. B., WIRCKER, L., GIL, R. A. S., 5^a, 387 p, 1994.
106. GAO, J., MARTELL, A. E. et al., Novel macrocyclic heterodinuclear catalase-like model complex CuMnL and CuZnL (L= BBPH): synthesis, stability and catalytic properties, Inorganic Chimica Acta, v.325, p.164-170, 2001.
107. GAO, J., MARTELL, A. E. et al., Novel dicopper(II) catalase-like model complexes: synthesis, crystal structure, properties and kinetics studies, Inorganic Chimica Acta, v.346, p.32-42, 2003.
108. NATION, D. A., MARTELL, A. E. et al., Phosphate anion binding by macrocyclic dinucleating ligands and their metal complexes, Polyhedron, v.18, p.3203-3218, 1999.
109. MOTEKAITIS, R. J., MARTELL, A. E., LECOMTE, J. P., LEHN, J., M, Stability of mononuclear e dinuclear macrocyclic of BISDIEN, Inorganic Chemistry, v. 22, p. 609-614, 1982.
110. JUREK, P., MARTELL, A. E., Catalysis of hydrolysis of a phosphate diester by mono- and dinuclear macrocyclic zinc(II) complexes, Inorganic Chimica Acta, v. 287, p 47-51, 1999.
111. KONG, D., MARTELL, A. E., REIBENSPIES, J., Macrocyclic dinuclear Zn(II) complexes: synthesis, structure and hydrolysis of tris(*p*-nitrophenyl) phosphate, Inorganic Chimica Acta, v. 333, p 7-14, 2002.
112. LUIZ, M. T. B., SZPOGANICZ, B., MARTELL, A. E. et al. Equilibrium studies and recognition in the glycyglycine, *dl*-alanine-*dl*-alanine and glycyglycine Cu(II)-1,4,7,13,16,19-hexaaza-10,22-dioxacyclotetracosane complexes Inorganica Chimica Acta, v.254, p.345-351, 1997.

113. SILVA, J. A., FELCMAN, J., et al., Study of binary and ternary complexes of copper(II) with some polyamines and adenosine 5' triphosphate, Inorganica Chimica Acta, v.356, p.155-166, 2003.
114. KISS, T., SOVAGO, I., MARTIN, B., Al³⁺ binding by Adenosine 5'-Phosphates: AMP, ADP and ATP, Inorganic Chemistry, v. 30, p.2130-2132, 1991.
115. WANG, Z., MARTELL, A. E., MOTEKAITIS, R. J., REIBENSPIES, J., The first systematic stability study of mononuclear and dinuclear iron(II) and iron(III) complexes incorporating a dinucleating macrocyclic ligand in aqueous solution, Journal of the Chemical Society Dalton Transaction, p. 2441-2449, 1999.
116. MARTINS, G. T. S., SZPOGANICZ, B. et al., Equilibrium and kinetic studies of ligand BMXD complexation with copper(II) and glycylglycine, Inorganica Chimica Acta, v.357, p.2261-2268, 2004.
117. GAO, J., MARTELL, A. E. et al., Novel macrocyclic heterodinuclear catalase-like model complex CuMnL and CuZnL (L= BBPH): synthesis, stability and catalytic properties, Inorganica Chimica Acta, v.325, p.164-170, 2001.
118. GAO, J., MARTELL, A. E. et al., Novel dicopper(II) catalase-like model complexes: synthesis, crystal structure, properties and kinetics studies, Inorganica Chimica Acta, v.346, p.32-42, 2003.
119. NATION, D. A., MARTELL, A. E. et al., Phosphate anion binding by macrocyclic dinucleating ligands and their metal complexes, Polyhedron, v.18, p.3203-3218, 1999.
120. NATION, D. A., MARTELL, A. E. et al., Host - Guest Interactions of Inorganic Phosphates with the Copper (II) Complexes of the Hexaaza Macrocyclic Ligand 3,6,9,17,20,23-hexaazatricyclo [23.3.1.1^{11,15}] triaconta 1(29),11(30),12,14,25,26,27-hexaene, Inorganic Chemistry, v.35, p.7246-7252, 1996.
121. NATION, D. A., MARTELL, A. E. et al., Molecular recognition of nucleotides by the protonated macrocyclic Ligand 3,6,9,17,20,23-hexaazatricyclo[23.3.1.1^{11,15}]triaconta 1(29),11(30),12,14,25,26,27-hexaene and by its Cu(II) complexes; catalysis of the conversion of ATP to ADP, Inorganica Chimica Acta, v.263, p.209-217, 1997.
122. MEIER, M. M., SZPOGANICZ, B., et al., Equilibrium and hydrolysis studies of phosphate esters model molecules and DNA catalyzed by Obisdien-Zn(II) complexes, Southern Brazilian Journal of Chemistry, v.7, p.11-23, 1999.
123. NAIR, M.S., SANTAPPA, M., NATARAJAN, P., Mixed-ligand complex formation by copper(II) with imidazole derivatives and dipeptides in aqueous

- solution, Journal of the Chemical Society Dalton Transaction, p. 2138-2142, 1980.
124. BACH, S. B. H., SEPEDA, T. G., MERRILL, G. N., WALMSLEY, J. A., Complexes of dibromo(ethylenediamine)-Palladium(II) observed from aqueous solutions by elctrospray mass spectrometry, Journal of the American Society Mass Spectrometry, v. 16, p. 1461-1469, 2005.
 125. JENSEN, K. B., JOHANSEN, E., LARESEN, F. B., MCKENZIE, C.J., Inorganic Chemistry Communications, v. 43, p.3801-3802, 2004.
 126. FARRUGIA, L. J., ORTEP3 for Windows, Journal of Applied Crystallography, v. 30, p.565, 1997.
 127. HEGG, E. L., BURSTIN, J. N., Copper(II) macrocylces cleave single-stranded and double-stranded DNA under both aerobic and anaerobic conditions, Inorganic Chemistry, v. 35, p. 7474-7481, 1996
 128. HENLE, S. E., HAN, H., et al., Sequence-specific DNA cleavage by Fe²⁺-mediated Fenton reations has possible biological implications, The Journal of Biological Chemistry, v. 274, p. 962-971, 1999.
 129. QIAGEN. HiSpeedTM Plasmid Purification Handbook, 46 p., 2001
 130. HORN Jr, A., FERNANDES, C., BORTOLUZZI, A. J., et al.Coordination chemistry of a new ligand 1-(bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-3-chloro-propan-2-ol (HPCINOL) with copper (II). X-ray crystal structure, spectroscopic and electrochemical properties of the complex [Cu(HPCINOL)(CH₃CN)](ClO₄)₂, Journal do Molecular Structure, v. 749, p.96-102, 2005.