

Nicolás A. Rey

Novos Ligantes Binucleantes e seus Complexos

Metálicos do tipo $\text{Cu}^{\text{II}}-(\mu\text{-OH})-\text{Cu}^{\text{II}}$:

1) Modelos Estruturais para o Sítio Ativo das

Catecol Oxidases e

2) Análogos Sintéticos com Atividade

Redox e/ou Hidrolítica

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química (Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas – CCFM, Universidade Federal de Santa Catarina) como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Ademir Neves

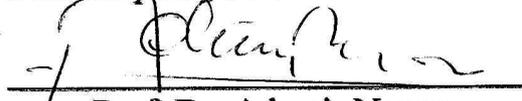
Florianópolis
2008

Nicolás Adrián Rey

**NOVOS LIGANTES BINUCLEANTES E SEUS COMPLEXOS
METÁLICOS DO TIPO $\text{Cu}^{\text{II}}-(\mu\text{-OH})-\text{Cu}^{\text{II}}$: 1) MODELOS
ESTRUTURAIS PARA O SÍTIO ATIVO DAS CATECOL OXIDASES
E 2) ANÁLOGOS SINTÉTICOS COM
ATIVIDADE REDOX E/OU HIDROLÍTICA**

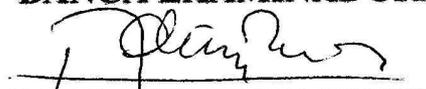
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de
Doutor em Química no Programa de Pós-Graduação em Química
da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 30 de abril de 2008.



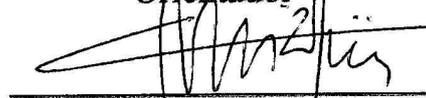
Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ademir Neves

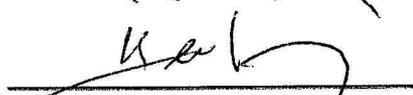
Orientador



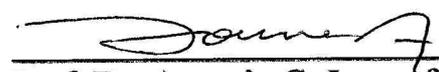
Prof. Dr. Manfredo Hörner
(DQ-UFSM)



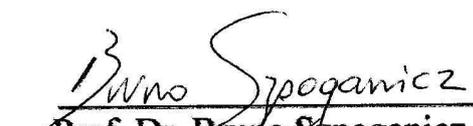
Profa. Dra. Elene C. Pereira-Maia
(DQ-UFG)



Prof. Dr. Hernán Terenzi
(BIOQUÍMICA-UFSC)



Prof. Dr. Antonio C. Joussef



Prof. Dr. Bruno Szpoganicz

*-Dedico o presente trabalho aos meus
filhos Júlia, Paloma e Juan Pablo-*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ademir Neves, pela orientação sempre segura, pelo seu entusiasmo frente a cada novo resultado e, principalmente, pela paciência e confiança em mim depositada. Ah, além, é claro, do papel fundamental que ele desempenhou na minha formação como Químico (Bio)Inorgânico.

À Profa. Dra. Elene Cristina Pereira-Maia, por ter aceitado o desafio de ser a relatora deste trabalho de Tese, pela leitura atenta do manuscrito e pelas suas valiosas sugestões. E também pela importante colaboração nos ensaios de citotoxicidade, acumulação e viabilidade celular envolvendo os compostos sintetizados.

A cada um dos demais membros da banca examinadora.

Aos Professores Adailton J. Bortoluzzi (UFSC), Manfred Höner (UFSM), Antônio S. Mangrich (UFPR), Hernán Terenzi (Depto. Bioquímica – UFSC), Wolfgang Haase (Institut für Physikalische Chemie – Technische Universität Darmstadt), Miguel Novak (UFRJ), José Dias de Souza Filho (UFMG), Miguel S. B. Caro (UFSC) e Sandra Carvalho (UFMG), pelas inestimáveis colaborações, sem as quais o presente trabalho certamente não seria o mesmo.

Ao Dr. Luiz Antônio Sodré Costa, pela fundamental colaboração que estabelecemos no estudo teórico dos sistemas catalisador/substrato via Teoria do Funcional de Densidade. E também pelas pizzas e “papos-cabeça” divididos nas noites de quarta-feira em Barbacena.

Ao Dr. Z. Tomkowicz, pela realização das medidas magnéticas nos complexos **1**, **2** e **3** e pela análise computacional dos resultados.

Aos alunos de doutorado Flávia Cristina Silva de Paula, Claus Tröger Pich e Silvana Castaman, por terem colocado “a mão na massa” nos testes de citotoxicidade e acumulação celular, de quebra de DNA plasmidial e na obtenção dos espectros de EPR, respectivamente.

Aos alunos de pós-graduação Cristiano e Fernando (UFMG), pela sua valiosa ajuda na utilização dos programas SUPERQUAD e SQUAD.

Aos meus pais Alberto Adrián Rey (in memoriam) e María Ester Menzica de Rey, pelo que foram, são e serão para mim. Obrigado pelo exemplo...será que um dia eu ainda aprendo? Los quiero muchísimo. Gracias, gracias y gracias...

Ao meu irmão Juan Manuel Rey, pelo seu apoio SEMPRE incondicional. Palavras não há para expressar a minha gratidão. Eu gostaria que ele soubesse o quanto o amo e admiro.

À Júlia, luz da minha vida...aqui pertinho de mim, e Paloma e Juan Pablo que, mesmo estando longe, são parte inseparável do meu ser. Eu amo muito essas três pessoas lindas!!!

À minha avó Maria, pela “colaboração científica” ao longo de toda uma vida.

À Wan. Obrigado pela sua companhia ao longo desta dura caminhada, pelo carinho, a compreensão e a sua força inabalável. E pela pequena Júlia. “As coisas se transformam e isso não é bom nem mal, e onde quer que eu esteja, o nosso amor tem brilho...vou ver o teu sinal”.

À Maryene Alves Camargo e Rosane Claumann Righez. Uma verdadeira amizade não se encontra em qualquer lugar...duas então...devo isso à Ilha da Magia. Obrigado por estarem sempre ao meu lado em momentos fundamentais (dos bons e também dos outros) e tornarem o LABINC o melhor lugar do mundo para se trabalhar. Vocês duas eu levo pro resto da minha vida. Thank you very much, Mariana e Rô!!!

Ao Alexandre Cuin e à Geovana Garcia Terra, outras duas peças fundamentais dentro do “planeta LABINC”, pelos ótimos momentos de convívio e distensão.

Às “outras duas panteras” do Instituto de Biociências (InBio – UNIPAC), Professoras Ana Paula Guimarães de Sousa e Patricia Valle de Lacerda. Com sua amizade, cumplicidade e alegria, vocês tornaram as idas e vindas a Barbacena uma experiência inesquecível...☺

A todo o pessoal do LABINC, espero não me esquecer de ninguém: dos Anjos, Ale, Rosely, Rafael, Annelise, Renata, Fernando Xavier, Ricardo, Bernardo, Elaine, Silvia, Karen Clariana, Anderson, Vítor, Fernando dos Passos, Clóvis, Maressa, Tiago e Sandro (o “quase-LABINC”), por compartilharem experiências...e pela tolerância demonstrada no dia a dia.

Aos amigos do laboratório 203 do Departamento de Química da UFMG: Cláudio, Flávia, Meiriane, Iara, Wendell, Weverson e Priscila.

Aos imprescindíveis amigos “extra-LABINC” Pat, Rênnio, Tati e Fábio, que fizeram de Florianópolis um lugar ainda mais mágico, se é que isto é possível...

Aos amigos que conheci nos cursos realizados em Montevideo (Uruguai), no mês de outubro de 2003: Dra. Queite Antônia de Paula, Dr. Oscar Quinzani, Dra. Ana González Baró e Dr. Winston Quiñones Fletcher. Até hoje, lembro de vocês com muito carinho.

Às minhas amigas Driks e Jussara, do antológico congresso em La Habana (Cuba).

A todo o povo da Confraria dos Vieiras e da AFAV (Associação Florianopolitana dos Amigos do Vinho), pelos ótimos momentos vividos em companhia da bebida dos Deuses.

À Grace e ao Jadir, da Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Química, pela atenção e boa vontade na resolução dos mais diversos problemas.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Química da UFSC que, de alguma maneira, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Brasil, por ter me acolhido de braços abertos e pelas oportunidades oferecidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida, e demais órgãos de fomento, pelo suporte financeiro.

*“Às vezes, parecia que de tanto acreditar
em tudo o que achávamos tão certo
teríamos o mundo inteiro e até um pouco mais,
fariamos floresta do deserto
e diamantes de pedaços de vidro...”*

*...Às vezes, parecia que era só improvisar
e o mundo então seria um livro aberto.
Até chegar o dia em que tentamos ter demais,
vendendo fácil o que não tinha preço”.*

Renato Russo
(1960-1996)

Índice Geral

<i>Agradecimentos</i>	iv
<i>Índice Geral</i>	vii
<i>Índice de Figuras</i>	xi
<i>Índice de Tabelas</i>	xviii
<i>Siglas, Abreviaturas e Símbolos</i>	xxi
<i>Resumo</i>	xxiii
<i>Abstract</i>	xxv
Capítulo 1 – Introdução e Objetivos do Trabalho	01
Fundamentação Teórica e Relevância do Assunto.....	02
a) A importância das enzimas e suas propriedades.....	02
b) Metaloenzimas e metaloproteínas.....	06
c) Metaloenzima-alvo: processos oxidativos e as CATECOL OXIDASES.....	07
d) A hidrólise das ligações fosfodiéster e sua relevância bioquímica.....	18
As fosfatases ácidas púrpuras – Parte I: considerações estruturais.....	19
As fosfatases ácidas púrpuras – Parte II: proposições mecanísticas.....	21
A calcineurina.....	24
e) Compostos modelos: a contribuição da Química Bioinorgânica.....	26
f) Estratégia de ação adotada.....	31
Objetivos do Trabalho.....	34
Capítulo 2 – Parte Experimental	35
Reagentes, Metodologia e Instrumentação.....	36
a) Reagentes utilizados.....	36
b) Metodologia e instrumentação.....	36
Análise elementar de C, H e N.....	36
Temperatura de fusão.....	37
Espectroscopia vibracional (IV).....	37
Espectroscopia eletrônica (UV-vis).....	37
Ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C	37
Difração de raios-X.....	37
Ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....	38
Magnetoquímica.....	38
Eletroquímica.....	39

Conduímetria.....	39
Titulações potenciométricas.....	40
Titulações espectrofotométricas.....	41
Reatividade química.....	41
Atividade de Catecolase.....	42
Atividade de Fosfatase.....	43
Síntese dos Ligantes Binucleantes e seus Precursores.....	44
a) Preparação dos centros precursores.....	44
Síntese do 2-hidroxi-5-metilsoftaldeído (Hdfmp).....	44
Síntese do 3-clorometil-5-metilsalicilaldeído (cmff).....	45
b) Braços pendentes primários e secundários e a sua obtenção.....	47
Síntese da 6-amino-6-metilperidro-1,4-diazepina (AAZ).....	47
Síntese da bis(2-piridilmetil)amina (bpma).....	49
Preparação do intermediário sintético 3-[<i>N,N</i> -bis(2-piridilmetil)aminometil]-5-metilsalicilaldeído (bpmamff).....	50
c) Preparação dos ligantes binucleantes.....	51
Síntese do 4-metil-2,6-bis[(6-metil-1,4-diazepan-6-il)iminometil]fenol (HL1).....	51
Síntese do 2-[<i>N,N</i> -bis(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[(6-metil-1,4-diazepan-6-il)iminometil]fenol (HL2).....	51
Síntese do 2-[<i>N,N</i> -bis(2-piridilmetil)aminometil]-6-[(2-hidroxifenil)iminometil]-4-metilfenol (H ₂ L3).....	51
Síntese do 2-[<i>N,N</i> -bis(2-piridilmetil)aminometil]-6-[(2-hidroxifenil)aminometil]-4-metilfenol (H ₂ L4).....	52
Síntese dos Complexos Metálicos.....	52
Síntese do perclorato de -hidroxo-{4-metil-2,6-bis[(6-metil-1,4-diazepan-6-il)iminometil]fenoxo} bis[cobre(II)] monoidratado – [Cu ₂ (-OH)(L1)](ClO ₄) ₂ ·H ₂ O.....	52
Síntese do perclorato de -hidroxo-{2-[<i>N,N</i> -bis(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[(6-metil-1,4-diazepan-6-il)iminometil]fenoxo} (perclorato)bis[cobre(II)] – [Cu ₂ (-OH)(L2)(ClO ₄)]ClO ₄	53
Síntese do perclorato de -hidroxo-{2-[<i>N,N</i> -bis(2-piridilmetil)aminometil]-6-[(2-oxofenil)iminometil]-4-metilfenoxo} bis[cobre(II)] – [Cu ₂ (-OH)(L3)]ClO ₄	54

Capítulo 3 – Resultados e Discussão: Ligantes Binucleantes Diazepínicos e seus Complexos Bimetálicos de Cobre(II)	56
Sínteses.....	57
Caracterização dos Complexos (Estado Sólido).....	57
a) Estruturas cristalinas.....	58
b) Espectroscopia vibracional.....	63
c) EPR e reflectância difusa (espectroscopia eletrônica no estado sólido).....	65
d) Propriedades magnéticas.....	66
Caracterização dos Complexos (Solução).....	69
a) Propriedades espectroscópicas (UV-vis e EPR).....	69
b) Eletroquímica.....	70
c) Condutimetria.....	73
d) Titulações potenciométricas.....	74
e) Titulações espectrofotométricas.....	79
Reatividade Química e Testes de Atividade Biológica.....	84
a) Atividade de catecolase.....	84
Efeito do pH e determinação dos parâmetros cinéticos.....	84
Proposição de mecanismo.....	89
b) Atividade de fosfatase: promiscuidade catalítica.....	90
Efeito do pH e determinação dos parâmetros cinéticos.....	91
Cálculos de modelagem computacional (composto 1).....	93
Proposição de mecanismo.....	98
c) Clivagem de DNA plasmidial.....	100
d) Efeito citotóxico e acumulação dos compostos em células tumorais.....	103
Efeito citotóxico em células de leucemia mielóide crônica K562.....	103
Incorporação dos compostos nas células K562.....	105
e) Efeito sobre a viabilidade celular em macrófagos peritoneais inflamatórios.....	107
Capítulo 4 – Resultados e Discussão: Ligantes Binucleantes Contendo 2-Aminofenol Como Braço Pendente - Estrutura e Reatividade do Complexo [Cu₂(-OH)(C₂₇H₂₄O₂N₄)]ClO₄	109
Sínteses.....	110
Caracterização dos Ligantes.....	111
a) Estruturas cristalinas.....	111
b) Espectroscopia vibracional.....	117

c) Espectroscopia eletrônica em solução.....	118
d) Ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C	119
Caracterização do Complexo (Estado Sólido).....	125
a) Estrutura cristalina.....	125
b) Espectroscopia vibracional.....	128
c) EPR e espectroscopia eletrônica (reflectância difusa).....	130
d) Propriedades magnéticas.....	131
Caracterização do Complexo (Solução).....	132
a) Propriedades espectroscópicas (UV-vis e EPR).....	132
b) Eletroquímica.....	133
c) Condutimetria.....	135
Reatividade Química e Testes de Atividade Biológica.....	135
a) Atividade de catecolase.....	135
b) Atividade de fosfatase.....	136
Efeito do pH e determinação dos parâmetros cinéticos.....	136
c) Clivagem de DNA plasmidial.....	138
Capítulo 5 – Considerações Finais	142
Capítulo 6 – Perspectivas e Continuidade do Trabalho	146
Capítulo 7 – Referências Bibliográficas	150
Apêndices	161
Apêndice A – Dados Cristalográficos Suplementares para o Ligante H_2L_3	162
Apêndice B – Dados Cristalográficos Suplementares para o Ligante H_2L_4	167
Apêndice C – Dados Cristalográficos Suplementares para o Complexo 1	174
Apêndice D – Dados Cristalográficos Suplementares para o Complexo 2	184
Apêndice E – Dados Cristalográficos Suplementares para o Complexo 3	193
Apêndice F – Artigos Publicados.....	201

Índice de Figuras

Figura 1.1. Representações estruturais para os três tipos clássicos de centros de cobre encontrados em proteínas.....	08
Figura 1.2. Estrutura tridimensional global da catecol oxidase de batata doce, ibCO (extraída da referência 22).....	10
Figura 1.3. Esfera de coordenação presente no estado <i>met</i> do centro binuclear de cobre da ibCO (referência 22).....	11
Figura 1.4. Mecanismo proposto para a oxidação de catecóis mediada pela CO (adaptado da referência 22).....	12
Figura 1.5. Processo de ligação do catecol ao sítio ativo da ibCO. Casella <i>et al.</i> (adaptado da referência 25).....	13
Figura 1.6. Mecanismo proposto por Siegbahn <i>et al.</i> para a oxidação de catecóis mediada pela CO (extraído das referências 26 e 27). Intermediários radiculares e de valência mista Cu ^{II} Cu ^I são importantes na dinâmica do ciclo.....	14
Figura 1.7. Um outro mecanismo, proposto por Güell e Siegbahn, para a oxidação de catecóis mediada pela CO (extraído da referência 28). A carga do sítio ativo permanece igual a +2 ao longo de todo o ciclo catalítico.....	15
Figura 1.8. Estados de transição DFT calculados para as etapas que conformam a primeira meia-reação do ciclo sugerido por Güell/Siegbahn (extraído da referência 28). Os átomos marcados com um asterisco foram mantidos fixos na posição que eles ocupam na estrutura de raios-X durante a otimização da geometria.....	16
Figura 1.9. Intermediário DFT calculado, o qual mostra bem o modo de interação do substrato com o sítio ativo da CO na segunda meia-reação do ciclo proposto por Güell/Siegbahn (extraído da referência 28). Como no caso anterior, os átomos marcados com um asterisco foram mantidos fixos na posição que eles ocupam na estrutura de raios-X durante a otimização da geometria.....	17
Figura 1.10. PAPs provenientes de fontes animais e vegetais: (a) Estrutura tridimensional do sítio ativo da (“rat bone”) rbPAP intacta, com sulfato complexado. Os resíduos de His 113, His 216 e Asp 267 não estão envolvidos diretamente na coordenação aos centros férricos, mas participam ativamente do processo catalítico. (b) Estrutura tridimensional do sítio ativo da (“kidney bean”) kbPAP, com fosfato complexado. Ambos os átomos de oxigênio não coordenados do grupo PO ₄ ³⁻ interagem, através de ligações de H, com os resíduos de His 202 e His 296.....	20
Figura 1.11. Representação esquemática da forma reduzida Fe ^{III} M ^{II} (cataliticamente ativa) dos sítios ativos das fosfatases ácidas púrpuras extraídas tanto de fontes animais quanto vegetais.....	21
Figura 1.12. Mecanismo proposto por Lindqvist <i>et al.</i> para a hidrólise de ésteres de fosfato mediada pela rbPAP (adaptado da referência 38).....	22

Figura 1.13. Dois diferentes mecanismos propostos para a hidrólise de um monoéster de fosfato pelas PAPs. A: com envolvimento de um nucleófilo terminal (Klabunde <i>et al.</i> ; Lindqvist <i>et al.</i>) e B: com envolvimento de um nucleófilo em ponte (Que, Jr. <i>et al.</i>) (extraído da referência 40).....	24
Figura 1.14. Representação esquemática do sítio ativo da calcineurina humana, com base na estrutura descrita por Kissinger <i>et al.</i> ⁽⁵⁸⁾ . É interessante notar a sua similaridade com o cluster binuclear Fe ^{III} Zn ^{II} presente na kbPAP; entretanto, há uma importante diferença: o íon férrico possui dois ligantes terminais derivados de solvente em sua esfera de coordenação e não apresenta o ligante tirosinato característico encontrado em todas as PAPs. Seria oportuno observar aqui que o grau de protonação do sítio ativo varia com o pH do meio, já que as duas moléculas de água presentes podem, a princípio, ser desprotonadas ao menos uma vez.....	26
Figura 1.15. Estruturas do ligante binucleante simétrico H-BPMP (-CH ₃) e derivados – Belle e colaboradores.....	29
Figura 1.16. Estrutura do ligante binucleante simétrico L-55, possuindo quatro resíduos de metil-benzoimidazol como braços pendentes e sem a presença de nenhuma ponte endógena em potencial – Casella e colaboradores.....	29
Figura 1.17. Estrutura do ligante binucleante hexadentado não-simétrico Htppnol ^(81,73) – Neves e colaboradores.....	30
Figura 1.18. Ligantes binucleantes contendo braço(s) pendente(s) fenólico(s) e as suas respectivas estruturas: H ₃ bbppnol (simétrico) ^(84,82,74) e H ₂ btpnol (não-simétrico) ⁽⁸³⁾ – Neves e colaboradores.....	30
Figura 1.19. Estrutura do ligante binucleante não-simétrico possuindo um braço pendente fenólico H ₂ Ldtb ⁽⁷⁶⁾ – Neves e colaboradores.....	31
Figura 1.20. Novos ligantes binucleantes, simétrico e não-simétricos, sintetizados no presente trabalho de Tese.....	32
Figura 3.1. ORTEP para o cátion complexo [Cu ₂ (-OH)(C ₂₁ H ₃₃ ON ₆)] ²⁺ . Todos os átomos de hidrogênio, com exceção daquele presente na ponte -hidroxo, foram omitidos por motivos de simplificação.....	59
Figura 3.2. ORTEP para o cátion complexo [Cu ₂ (-OH)(C ₂₇ H ₃₃ ON ₆)(ClO ₄)] ⁺ . Todos os átomos de hidrogênio, com exceção daquele presente na ponte -hidroxo, foram omitidos por motivos de simplificação.....	61
Figura 3.3. Espectro vibracional do composto 1 (amostragem: pastilha de KBr).....	64
Figura 3.4. Espectro vibracional do composto 2 (amostragem: pastilha de KBr).....	64
Figura 3.5. Espectro eletrônico do complexo 1 no estado sólido (reflectância difusa).....	66
Figura 3.6. Espectro eletrônico do complexo 2 no estado sólido (reflectância difusa).....	66

Figura 3.7. Dependência da susceptibilidade magnética, gráfico superior, e do momento magnético efetivo (χ_{eff}), gráfico inferior, do composto 1 com a temperatura.....	68
Figura 3.8. Dependência da susceptibilidade magnética, gráfico superior, e do momento magnético efetivo (χ_{eff}), gráfico inferior, do composto 2 com a temperatura.....	69
Figura 3.9. Voltamogramas cíclicos, obtidos a diferentes velocidades de varredura, para os complexos 1 (gráfico superior) e 2 (gráfico inferior) em acetonitrila, a 25 °C. Eletrólito suporte: 0,1 mol L ⁻¹ TBAP; trabalho: eletrodo de carbono vítreo; referência: Ag/AgCl (NaCl 3 mol.L ⁻¹); contra-eletrodo: fio de Pt; padrão interno: ferroceno.....	71
Figura 3.10. Voltamogramas de onda quadrada para os complexos 1 (gráfico superior) e 2 (gráfico inferior) em acetonitrila, a 25 °C. Eletrólito suporte: 0,1 mol L ⁻¹ TBAP; trabalho: eletrodo de carbono vítreo; referência: Ag/AgCl (NaCl 3 mol.L ⁻¹); contra-eletrodo: fio de Pt; padrão interno: ferroceno. Os respectivos voltamogramas cíclicos foram adicionados na figura (linha pontilhada) para efeito de comparação.....	73
Figura 3.11. Curvas de titulação experimental (---) e calculada (· · ·) correspondentes a uma solução aquosa de 1 de concentração igual a 10 ⁻³ mol L ⁻¹ , utilizando-se como titulante uma solução aquosa padronizada de hidróxido de sódio 0,10164 mol L ⁻¹ . Temperatura: 25,0 °C; $I = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (NaCl).....	74
Figura 3.12. Curvas de distribuição das espécies para 1 , calculadas pelo programa computacional SCECS. As porcentagens foram determinadas em relação à quantidade total de complexo 1 em solução. $[\mathbf{1}] = 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	75
Figura 3.13. Curvas de titulação experimental (---) e calculada (· · ·) correspondentes a uma solução aquosa de 2 de concentração igual a 10 ⁻³ mol L ⁻¹ , utilizando-se como titulante uma solução aquosa padronizada de hidróxido de sódio 0,10164 mol L ⁻¹ . Temperatura: 25,0 °C; $I = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (NaCl).....	77
Figura 3.14. Curvas de distribuição das espécies para 2 , calculadas pelo programa computacional SCECS. As porcentagens foram determinadas em relação à quantidade total de complexo 2 em solução. $[\mathbf{2}] = 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	78
Figura 3.15. Espectros eletrônicos registrados durante a titulação de uma solução aquosa 2,5 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de 1 . (a) pH 2,56 a 4,09; (b) pH 3,92 a 5,41; (c) pH 5,56 a 6,98. Temperatura: 25,0 °C; $I = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (NaCl).....	80
Figura 3.16. Espectros eletrônicos registrados durante a titulação de uma solução aquosa 2,5 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de 2 . Valores de pH variando entre 2,98 e 7,02. Temperatura: 25,0 °C; $I = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (NaCl).....	82
Figura 3.17. Espectros teóricos (absortividades molares), calculados pelo programa computacional SQUAD, do complexo 1 e das suas formas protonadas monoméricas presentes em equilíbrio abaixo de pH 7.....	84

Figura 3.18. Espectros teóricos (absortividades molares), calculados pelo programa computacional SQUAD, do complexo 2 e das suas formas protonadas monoméricas presentes em equilíbrio abaixo de pH 7.....	84
Figura 3.19. Esquema ilustrativo mostrando a reação de oxidação do substrato modelo 3,5-di- <i>terc</i> -butilcatecol.....	85
Figura 3.20. Dependência, em relação ao pH, da atividade oxidativa de 1 frente ao substrato modelo 3,5-dtbc, numa mistura solvente metanol / água (32:1 v/v). Condições experimentais usadas: $[1]_{\text{final}} = 2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[S]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura: 25,0 °C.....	85
Figura 3.21. Dependência, em relação ao pH, da atividade oxidativa de 2 frente ao substrato modelo 3,5-dtbc, numa mistura solvente metanol / água (32:1 v/v). Condições experimentais usadas: $[2]_{\text{final}} = 2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[S]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura: 25,0 °C.....	86
Figura 3.22. Dependência da velocidade da reação de oxidação catalisada pelo complexo 1 com a concentração de substrato a pH 9,0, numa mistura solvente metanol / água (32:1 v/v). “Inset”: gráfico dos duplos recíprocos. Condições experimentais: $[1]_{\text{final}} = 2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[S]_{\text{final}} = 1,2 \times 10^{-3}$ a $1,1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; 25,0 °C.....	87
Figura 3.23. Dependência da velocidade da reação de oxidação catalisada pelo complexo 2 com a concentração de substrato a pH 9,0, numa mistura solvente metanol / água (32:1 v/v). “Inset”: gráfico dos duplos recíprocos. Condições experimentais: $[2]_{\text{final}} = 2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[S]_{\text{final}} = 2,4 \times 10^{-3}$ a $1,1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; 25,0 °C.....	87
Figura 3.24. Mecanismo proposto para a oxidação do substrato 3,5-dtbc catalisada pelos compostos 1 e 2	89
Figura 3.25. Esquema ilustrativo para a reação de hidrólise do substrato bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (BDNPP).....	90
Figura 3.26. Dependência, em relação ao pH, da atividade hidrolítica de 1 frente ao substrato modelo BDNPP, numa mistura solvente água / acetonitrila (1:1 v/v). Condições experimentais usadas: $[1]_{\text{final}} = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[S]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura: 50,0 °C.....	92
Figura 3.27. Dependência, em relação ao pH, da atividade hidrolítica de 2 frente ao substrato modelo BDNPP, numa mistura solvente água / acetonitrila (1:1 v/v). Condições experimentais usadas: $[2]_{\text{final}} = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[S]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura: 50,0 °C.....	92
Figura 3.28. Dependência da velocidade da reação de hidrólise com a concentração de substrato a pH 9,6, numa mistura solvente água / acetonitrila (1:1 v/v). “Inset”: gráfico dos duplos recíprocos. Condições experimentais usadas: $[2]_{\text{final}} = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[S]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-4}$ a $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura: 50,0 °C.....	93
Figura 3.29. Estrutura otimizada [nível de teoria usado: B3LYP/6-311G*/LanL2DZ(f)] para o cátion complexo $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{ON}_6)]^{2+}$ em fase gasosa. Note-se a grande	

semelhança existente com o ORTEP da Figura 3.1.....	94
Figura 3.30. Estrutura otimizada [nível de teoria usado: B3LYP/6-311G*/LanL2DZ(f)] para o aduto catalisador-substrato gerado quando o diéster de fosfato BDNPP se coordena a $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{ON}_6)]^{2+}$, em fase gasosa. A estrutura é apresentada sob duas perspectivas diferentes com o intuito de facilitar a visualização da mesma.....	97
Figura 3.31. Mecanismo proposto para a reação de hidrólise do substrato BDNPP catalisada pelo composto 1	99
Figura 3.32. Clivagem do DNA plasmidial pBSKII promovida pelos complexos 1 (esquerda) e 2 (direita), após 16 horas de incubação em diferentes valores de pH. FI: forma superenovelada; FII: forma circular relaxada; FIII: forma linear. Resultados expressos como porcentagem da forma plasmidial. Condições experimentais: [1 e 2] _{final} variando de ZERO (controle) a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura: $50 \text{ }^\circ\text{C}$	102
Figura 3.33. Inibição do crescimento celular em células de leucemia mielóide crônica da linhagem K562 em função da concentração dos complexos 1 (gráfico superior) e 2 (gráfico inferior), após incubação por 72 horas. Resultados expressos como porcentagem de inibição.....	105
Figura 3.34. Inibição do crescimento celular em células de leucemia mielóide crônica da linhagem K562 em função da concentração intracelular de cobre, após incubação pelo período de 72 horas na presença de diferentes concentrações de 1 (gráfico superior) e 2 (gráfico inferior). Resultados expressos como porcentagem de inibição.....	107
Figura 3.35. Viabilidade celular de 1 em macrófagos peritoneais inflamatórios, após incubação por 72 horas. Resultados expressos como porcentagem de células vivas. [1] variando de ZERO (controle) a $6,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	108
Figura 4.1. ORTEP para o ligante binucleante imínico H ₂ L3, de fórmula molecular C ₂₇ H ₂₆ O ₂ N ₄	113
Figura 4.2. ORTEP para o ligante binucleante amínico H ₂ L4, de fórmula molecular C ₂₇ H ₂₈ O ₂ N ₄	114
Figura 4.3. Padrão de ligações de hidrogênio (intra- e intermoleculares) apresentado pelos cristais de H ₂ L3.....	116
Figura 4.4. Rede de ligações de hidrogênio intermoleculares presentes no cristal de H ₂ L4. Apenas os átomos de H que participam das interações são mostrados, para efeito de simplificação.....	116
Figura 4.5. Espectro vibracional do ligante H ₂ L3 (amostragem: pastilha de KBr).....	117
Figura 4.6. Espectro eletrônico do ligante H ₂ L3 em solução metanólica (concentração: $9,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).....	119
Figura 4.7. Espectro de RMN de ¹ H para o ligante H ₂ L4 em solução de CDCl ₃ à temperatura ambiente.....	122
Figura 4.8. Mapa de contornos COSY para o ligante H ₂ L4 em solução de CDCl ₃	

à temperatura ambiente.....	122
Figura 4.9. Espectro de RMN de ^{13}C para o ligante $\text{H}_2\text{L4}$ em solução de CDCl_3 à temperatura ambiente.....	123
Figura 4.10. Mapa de contornos HSQC para o ligante $\text{H}_2\text{L4}$ em solução de CDCl_3 à temperatura ambiente.....	123
Figura 4.11. Mapa de contornos HMBC para o ligante $\text{H}_2\text{L4}$ em solução de CDCl_3 à temperatura ambiente.....	124
Figura 4.12. ORTEP para o cátion complexo $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{N}_4)]^+$. Todos os átomos de hidrogênio, com exceção daquele presente na ponte -hidroxo, foram omitidos por motivos de simplificação.....	127
Figura 4.13. Espectro vibracional do composto 3 (amostragem: pastilha de KBr).....	129
Figura 4.14. Espectro eletrônico do complexo 3 no estado sólido (reflectância difusa).....	131
Figura 4.15. Dependência da susceptibilidade magnética e do momento magnético efetivo (χ_{eff}) do composto 3 com a temperatura. As linhas sólidas representam tentativas de ajuste entre os dados experimentais e calculados.....	132
Figura 4.16. Espectros eletrônicos para o complexo 3 no estado sólido (linha preta) e dissolvido em acetonitrila (linhas vermelhas). Neste último caso, a concentração da solução é igual a $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	133
Figura 4.17. Série de voltamogramas cíclicos, obtidos a diferentes velocidades de varredura, para o composto 3 em acetonitrila, a 25°C . Eletrólito suporte: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ TBAP; trabalho: eletrodo de carbono vítreo; referência: Ag/AgCl ($\text{NaCl } 3 \text{ mol.L}^{-1}$); contra-eletrodo: fio de Pt; padrão interno: ferroceno.....	134
Figura 4.18. Voltamograma de onda quadrada para uma solução de 3 em acetonitrila, a 25°C . Eletrólito suporte: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ TBAP; trabalho: eletrodo de carbono vítreo; referência: Ag/AgCl ($\text{NaCl } 3 \text{ mol.L}^{-1}$); contra-eletrodo: fio de Pt; padrão interno: ferroceno. O voltamograma cíclico (linha pontilhada) foi adicionado para comparação.....	135
Figura 4.19. Dependência, em relação ao pH, da atividade hidrolítica de 3 frente ao substrato modelo BDNPP, numa mistura solvente água / acetonitrila (1:1 v/v). Condições experimentais usadas: $[\mathbf{3}]_{\text{final}} = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{S}]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura: $50,0^\circ\text{C}$	137
Figura 4.20. Dependência da velocidade da reação de hidrólise com a concentração de substrato a pH 8,0, numa mistura solvente água / acetonitrila (1:1 v/v). “Inset”: gráfico dos duplos recíprocos. Condições experimentais usadas: $[\mathbf{3}]_{\text{final}} = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{S}]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-4}$ a $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura: $50,0^\circ\text{C}$	138
Figura 4.21. Clivagem do DNA plasmidial pBSKII pelo complexo 3 , após 16 horas de incubação em diferentes pHs. FI: forma superenovelada; FII: forma circular relaxada. Resultados expressos	

como porcentagem da forma plasmidial. Condições: $[3]_{\text{final}}$ variando de ZERO (controle) a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura: $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 140

Figura 6.1. Estrutura do ligante binucleante não-simétrico H_2L_5 , o qual contém o grupo N-doador etil-imidazol..... 149

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Classificação das enzimas, segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.....	03
Tabela 3.1. Seleção de dados cristalográficos para os complexos 1 e 2	58
Tabela 3.2. Principais distâncias interatômicas e ângulos de ligação para os compostos 1 e 2 , sintetizados neste trabalho, e os complexos da literatura A , B e C , relacionados aqui para efeito de comparação.....	62
Tabela 3.3. Constantes cumulativas de protonação / desprotonação para 1 em solução aquosa, obtidas a partir de dados potenciométricos com o auxílio do programa SUPERQUAD. Os respectivos equilíbrios químicos também são mostrados. Temperatura: 25,0 °C; $I = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (NaCl).....	74
Tabela 3.4. Constantes cumulativas de protonação / desprotonação para 2 em solução aquosa, obtidas a partir de dados potenciométricos com o auxílio do programa SUPERQUAD. Os respectivos equilíbrios químicos também são mostrados. Temperatura: 25,0 °C; $I = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (NaCl).....	77
Tabela 3.5. Panorama geral comparativo das constantes cumulativas de protonação / desprotonação calculadas a partir de dados potenciométricos e espectrofotométricos (método gráfico e computacional) para os sistemas 1 e 2 em solução aquosa. Temperatura: 25,0 °C; $I = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (NaCl).....	83
Tabela 3.6. Parâmetros cinéticos para a reação de oxidação do substrato 3,5-dtbc promovida por 1 e 2 a pH 9,0 e 25,0 °C. Dados referentes aos complexos da literatura B , D , E e F são incluídos aqui para efeito de comparação. No caso de F , os valores referem-se à primeira e segunda etapas de reação, respectivamente.....	88
Tabela 3.7. Principais comprimentos e ângulos de ligação calculados para o cátion $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{ON}_6)]^{2+}$ em fase gasosa. Valores experimentais, obtidos por difração de raios-X, também são incluídos.....	95
Tabela 3.8. Valores de CI_{50} frente à linhagem celular K562 determinados para 1 e 2 , usando-se mistura solvente água / acetonitrila (37 °C). Os valores representam a média de três experiências independentes.....	104
Tabela 4.1. Seleção de dados cristalográficos para os ligantes H_2L_3 e H_2L_4	111
Tabela 4.2. Parâmetros geométricos selecionados para os ligantes H_2L_3 e H_2L_4	112
Tabela 4.3. Geometria das ligações de hidrogênio nos ligantes H_2L_3 e H_2L_4 (Å, °).....	115
Tabela 4.4. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) para H_2L_3 , em CDCl_3 à temperatura ambiente.....	120
Tabela 4.5. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) para H_2L_4 , em CDCl_3 à temperatura ambiente.....	121

Tabela 4.6. Seleção de dados cristalográficos para o complexo 3	125
Tabela 4.7. Principais distâncias interatômicas e ângulos de ligação para o composto de coordenação 3	128
Tabela A.1. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros térmicos isotrópicos ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o ligante H ₂ L3. OBSERVAÇÃO: U(eq) é definido como $\frac{1}{3}$ do traço do tensor U^{ij} ortogonalizado.....	162
Tabela A.2. Comprimentos (\AA , esquerda) e ângulos ($^\circ$, direita) de ligação para o ligante H ₂ L3.....	163
Tabela A.3. Parâmetros térmicos de deslocamento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para H ₂ L3. OBSERVAÇÃO: O fator exponencial tem a forma: $-2^{-2} \times [h^2 a^2 \times U^{11} + \dots + 2hka \times b \times U^{12}]$	165
Tabela A.4. Ligações de hidrogênio para o ligante H ₂ L3 [\AA e $^\circ$].....	166
Tabela B.1. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros térmicos isotrópicos ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o ligante H ₂ L4. OBSERVAÇÃO: U(eq) é definido como $\frac{1}{3}$ do traço do tensor U^{ij} ortogonalizado.....	167
Tabela B.2. Comprimentos (\AA , esquerda) e ângulos ($^\circ$, direita) de ligação para o ligante H ₂ L4.....	168
Tabela B.3. Parâmetros térmicos de deslocamento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para H ₂ L4. OBSERVAÇÃO: O fator exponencial tem a forma: $-2^{-2} \times [h^2 a^2 \times U^{11} + \dots + 2hka \times b \times U^{12}]$	171
Tabela B.4. Coordenadas de hidrogênio ($\times 10^4$) e parâmetros de deslocamento isotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para H ₂ L4.....	172
Tabela B.5. Ligações de hidrogênio para o ligante H ₂ L4 [\AA e $^\circ$].....	173
Tabela C.1. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros térmicos isotrópicos ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o complexo 1 . OBSERVAÇÃO: U(eq) é definido como $\frac{1}{3}$ do traço do tensor U^{ij} ortogonalizado.....	174
Tabela C.2. Comprimentos (\AA , esquerda) e ângulos ($^\circ$, direita) de ligação para o complexo 1	176
Tabela C.3. Parâmetros térmicos de deslocamento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o complexo 1 . OBSERVAÇÃO: O fator exponencial tem a forma: $-2^{-2} \times [h^2 a^2 \times U^{11} + \dots + 2hka \times b \times U^{12}]$	181
Tabela C.4. Coordenadas de hidrogênio ($\times 10^4$) e parâmetros de deslocamento isotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para 1	182
Tabela C.5. Ligações de hidrogênio para o complexo 1 [\AA e $^\circ$].....	183
Tabela D.1. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros térmicos isotrópicos ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o complexo 2 . OBSERVAÇÃO: U(eq) é definido como $\frac{1}{3}$ do traço do tensor U^{ij} ortogonalizado.....	184
Tabela D.2. Comprimentos (\AA , esquerda) e ângulos ($^\circ$, direita) de ligação para	

o complexo 2.....	186
Tabela D.3. Parâmetros térmicos de deslocamento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o complexo 2. OBSERVAÇÃO: O fator exponencial tem a forma: $-2^{-2} \times [h^2 a^2 \times U^{11} + \dots + 2hka \times b \times U^{12}]$	190
Tabela D.4. Ligações de hidrogênio para o complexo 2 [\AA e $^\circ$].....	192
Tabela E.1. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros térmicos isotrópicos ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o complexo 3. OBSERVAÇÃO: $U(\text{eq})$ é definido como $\frac{1}{3}$ do traço do tensor U^{ij} ortogonalizado.....	193
Tabela E.2. Comprimentos (\AA , esquerda) e ângulos ($^\circ$, direita) de ligação para o complexo 3.....	195
Tabela E.3. Parâmetros térmicos de deslocamento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o complexo 3. OBSERVAÇÃO: O fator exponencial tem a forma: $-2^{-2} \times [h^2 a^2 \times U^{11} + \dots + 2hka \times b \times U^{12}]$	199
Tabela E.4. Ligações de hidrogênio para o complexo 3 [\AA e $^\circ$].....	200

Siglas, Abreviaturas e Símbolos

Å	Angstrom
AAZ	6-amino-6-metilperidro-1,4-diazepina
Asp	Aspartato
BDNPP	bis(2,4-dinitrofenil)fosfato
bpma	Bis(2-piridilmetil)amina
C	Graus Celsius
ca. ou ~	Aproximadamente
CAPS	Ácido N-cicloexil-3-aminopropanossulfônico
CHES	Ácido N-cicloexil-2-aminoetanossulfônico
cm	Centímetro
cmff	3-clorometil-5-metilsalicilaldeído
COs	Catecol oxidases
Cys	Cisteína
d	Dupleto Deslocamento químico
Da	Dalton
dd	Dupleto duplo
DFT	Teoria do funcional de densidade
DNA	Ácido desoxirribonucléico
3,5-dtbc	3,5-di- <i>terc</i> -butilcatecol
3,5-dtbq	3,5-di- <i>terc</i> -butilquinona
	Coefficiente de absorvidade molar
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
<i>et al.</i>	e colaboradores
EXAFS	Extended X-ray absorption fine structure
g	Gramma
h	Hora
Hdfmp	2-hidroxi-5-metilsoftaldeído
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxi-1-piperazino)etanossulfônico
His	Histidina
Hmb	5-metilsalicilaldeído
Hz	Hertz
<i>I</i>	Força iônica

IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
K	Kelvin
kbPAP	Fosfatase ácida púrpura extraída do feijão vermelho
L	Litro
m	Multiplete
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico
mol	Micromol
mm	Milímetro
mmol	Milimol
NC	Número de coordenação
NHE	Eletrodo normal de hidrogênio
NIR	Infravermelho próximo
nm	Nanômetro
PAPs	Fosfatases ácidas púrpuras
p.f.	Ponto de fusão
pH	Potencial hidrogeniônico
PP2B	Calcineurina
ratTRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato extraída de ratos
RbPAP	Fosfatase ácida púrpura extraída de ossos de rato
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ¹⁹ F	Ressonância magnética nuclear de flúor-19
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNA	Ácido ribonucléico
s	Segundo, ou simpleto (no contexto da RMN)
“s”	Simpletóide ou pseudo-simpleto
spPAP	Fosfatase ácida púrpura extraída da batata doce
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UfPAP	Fosfatase ácida púrpura extraída do útero de suínos
UV-vis	Ultravioleta-visível
V	Volt

Resumo

A oxidação de substratos orgânicos pelo oxigênio molecular sob condições brandas constitui reação de grande interesse para muitos processos sintéticos e industriais, tanto de um ponto de vista econômico quanto ambiental. Embora a reação de substâncias orgânicas com o dióxigênio seja termodinamicamente favorável, é cineticamente impedida devido ao estado fundamental triplete do O₂. Nos sistemas vivos, uma série de notáveis catalisadores biológicos conhecidos pelo nome de enzimas promove reações oxidativas com uma enorme rapidez e especificidade. Entre elas, podemos citar o grupo das catecol oxidases (COs), metaloenzimas contendo um centro binuclear de cobre que catalisam a oxidação de *orto*-difenois (catecóis) às respectivas *orto*-quinonas. Nos últimos anos, muitos esforços têm sido realizados na tentativa de imitar as várias funções enzimáticas, o que pode ser feito através da síntese de compostos modelos menores e mais simples, que possam assumir funções catalíticas análogas.

No presente trabalho, foram preparados quatro novos ligantes binucleantes: 4-metil-2,6-bis[(6-metil-1,4-diazepan-6-il)iminometil]fenol (HL1), 2-[*N,N*-bis(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[(6-metil-1,4-diazepan-6-il)iminometil]fenol (HL2), 2-[*N,N*-bis(2-piridilmetil)aminometil]-6-[(2-hidroxifenil)iminometil]-4-metilfenol (H₂L3) e 2-[*N,N*-bis(2-piridilmetil)aminometil]-6-[(2-hidroxifenil)aminometil]-4-metilfenol (H₂L4). A partir destes ligantes, três complexos binucleares de cobre(II) inéditos, a saber, [Cu₂(-OH)(L1)](ClO₄)₂·H₂O (**1**), [Cu₂(-OH)(L2)(ClO₄)]ClO₄ (**2**) e [Cu₂(-OH)(L3)]ClO₄ (**3**), todos eles contendo uma ponte do tipo -hidroxo entre os metais, foram sintetizados e caracterizados por análise elementar, espectroscopias IV e UV-vis, EPR, medidas magnéticas, eletroquímica e condutimetria. Os três compostos tiveram as suas estruturas elucidadas por difração de raios-X e se mostraram excelentes modelos estruturais para o sítio ativo das COs. Os complexos **1** e **2** e suas formas protonadas e desprotonadas foram igualmente caracterizados via titulações potenciométricas e espectrofotométricas e apresentaram também atividade oxidativa frente ao substrato modelo 3,5-di-*terc*-butilcatecol, podendo ser considerados então modelos funcionais para as COs.

Adicionalmente, os três complexos foram capazes de promover a reação de hidrólise do substrato modelo bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (BDNPP), assim como a clivagem do DNA plasmidial pBSKII. Foi feito ainda um estudo envolvendo cálculos teóricos em fase gasosa para o composto **1**, utilizando-se a teoria do funcional de densidade (DFT). Com base nesta investigação, foi possível se atribuir o modo de coordenação do BDNPP ao cátion complexo [Cu₂(-OH)(L1)]²⁺. Para o caso específico de **1** e **2**, que possuem também atividade oxidativa, as atividades hidrolíticas acima descritas os transformam num interessante e raro exemplo de

promiscuidade catalítica em sistemas biomiméticos. Finalmente, o efeito citotóxico de **1** e **2** foi testado em células de leucemia mielóide crônica da linhagem K562. Ambos os compostos foram ativos, sendo que **1** apresentou a maior citotoxicidade, com um valor para o parâmetro CI_{50} de $44,70 \text{ mol L}^{-1}$.

Abstract

Oxidation of organic substrates by molecular oxygen under mild conditions is a reaction of great interest for many synthetic and industrial processes, from a both economic and environmental point of view. Although the reaction of organic substances with dioxygen is thermodynamically favored, it is kinetically hindered owed to the fundamental triplet state of O₂. In the live systems, a series of notable biological catalysts known by the name of enzymes promotes oxidative reactions with high rates and specificity. Among them, we can make mention to the group of catechol oxidases (COs), copper-containing metalloenzymes that possess a binuclear Cu₂ core in their active site and catalyze the oxidation of *o*-diphenols (catechols) to the corresponding *o*-quinones. In last years, lots of effort have been dispended with the objective of mimic the several enzymatic functions, which can be made by means of the synthesis of smaller and less-complicated model compounds able to play similar catalytic roles.

In this work, we have prepared four new dinucleating ligands: 4-methyl-2,6-bis[(6-methyl-1,4-diazepan-6-yl)iminomethyl]phenol (HL1), 2-[*N,N*-bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl]-4-methyl-6-[(6-methyl-1,4-diazepan-6-yl)iminomethyl]phenol (HL2), 2-[*N,N*-bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl]-6-[(2-hydroxyphenyl)iminomethyl]-4-methylphenol (H₂L3) and 2-[*N,N*-bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl]-6-[(2-hydroxyphenyl)aminomethyl]-4-methylphenol (H₂L4). Using the synthesized ligands, a series of three novel Schiff base dinuclear copper(II) complexes, namely, [Cu₂(-OH)(L1)](ClO₄)₂·H₂O (**1**), [Cu₂(-OH)(L2)(ClO₄)]ClO₄ (**2**) and [Cu₂(-OH)(L3)]ClO₄ (**3**), all of them containing a single -hydroxo bridge, was obtained and fully characterized by elemental analysis, IR and UV-vis spectroscopies, EPR, magnetic and conductance measurements and electrochemistry. The three compounds have their structures elucidated by X-ray diffraction and showed to be excellent structural models for the active site of COs. Complexes **1** and **2** and their protonated and deprotonated forms were equally studied by potentiometric and spectrophotometric titrations and presented too an oxidative activity towards the model substrate 3,5-di-*tert*-butylcatechol; thus, they can be considered also functional models for COs.

In addition, the three complexes have the ability of promote the hydrolysis reaction of the model substrate bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate (BDNPP), as well as the pBSKII plasmid DNA cleavage. Moreover, it was performed a study involving theoretical calculations in the gas phase for compound **1** via density functional theory (DFT). Based on this investigation, it was possible to assign the coordination mode of BDNPP to the cation [Cu₂(-OH)(L1)]²⁺. For

the specific cases of **1** and **2**, which also showed oxidative activity, the hydrolytic activities described above make of them an interesting and uncommon example of catalytic promiscuity in biomimetic systems. Finally, the cytotoxic effect of **1** and **2** was tested in myelogenous chronic leukemia cells of the strain K562. Both complexes were active and compound **1** was that presenting the biggest cytotoxicity, with an IC_{50} value of $44.70 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E RELEVÂNCIA DO ASSUNTO

a) A importância das enzimas e suas propriedades

Existem três condições fundamentais para a vida. Uma delas é que o organismo vivo deve ser capaz de se auto-replicar; a segunda, que o mesmo deve também possuir capacidade de catalisar reações químicas de forma eficiente e seletiva. Finalmente, está a habilidade de sofrer mutação ou adaptação ao ambiente que o cerca. Todos os sistemas vivos requerem uma enorme variedade de reações bioquímicas para se sustentar, e quase todas elas são mediadas por uma série de notáveis catalisadores biológicos conhecidos pelo nome de enzimas. Sem estes extraordinários agentes, as reações necessárias para a manutenção da vida simplesmente não ocorreriam em uma escala de tempo útil ^(1,2).

Embora estejam sujeitas às mesmas leis da natureza que governam o comportamento de outras tantas substâncias cataliticamente ativas, as enzimas diferem desses catalisadores químicos “comuns” em vários aspectos importantes, a saber ⁽²⁾:

- 1) **Velocidades de reação mais rápidas:** As velocidades das reações catalisadas por enzimas são tipicamente de 10^6 (um milhão) a 10^{12} (um trilhão) vezes maiores do que aquelas das correspondentes reações não-catalisadas e são, pelo menos, várias ordens de grandeza maiores do que as mesmas reações catalisadas “quimicamente”.
- 2) **Condições reacionais mais brandas:** Todas as reações catalisadas enzimaticamente ocorrem em condições relativamente brandas, isto é, temperaturas inferiores a 100 °C, pressão atmosférica e pH próximo de 7 (meio neutro). Em contraste, uma catálise “química” eficiente frequentemente requer temperaturas e pressões elevadas, assim como também pHs extremos.
- 3) **Maior especificidade na catálise:** As enzimas apresentam um grau de especificidade imensamente maior do que os catalisadores “químicos” em relação à identidade dos seus substratos e produtos; isto se traduz no fato de que reações enzimáticas poucas vezes geram subprodutos.
- 4) **Capacidade de regulação:** As atividades catalíticas de muitas enzimas variam em resposta às concentrações de outras substâncias que não os seus substratos. Os mecanismos desses processos regulatórios incluem: controle alostérico, modificação covalente de enzimas e variação nas quantidades de enzimas sintetizadas.

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA que também apresentam propriedades catalíticas, todas as enzimas são proteínas e, como tais, o bom funcionamento

das mesmas depende da integridade da sua conformação protéica nativa. Isto é, as estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas são completamente essenciais para a sua atividade catalítica. As enzimas, a exemplo de outras proteínas, têm pesos moleculares que variam de cerca de 12.000 Da até mais de 1.000.000 ⁽¹⁾.

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) classifica e dá nome às enzimas de acordo com a natureza da reação química que elas catalisam. A Tabela 1.1 apresenta um panorama geral dos diferentes tipos existentes.

Tabela 1.1. Classificação das enzimas, segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular ^(1,2)

Número	Classe	Reação Catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidreto ou átomos de hidrogênio)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos funcionais
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liases	Adição de grupos a duplas ligações ou formação de duplas ligações pela remoção de grupos
5	Isomerases	Isomerização do substrato
6	Ligases	Formação de ligações do tipo C–C, C–S, C–O e C–N por meio de reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP

O sítio ativo é a região da enzima onde ocorre a catálise, isto é, aquela que se liga aos substratos (assim como também ao grupamento prostético, caso haja algum) e contém todos os resíduos de aminoácidos que participam diretamente na geração e quebra das ligações químicas. Embora as enzimas difiram amplamente em estrutura, especificidade e modo de ação, podem ser efetuadas algumas generalizações concernentes aos seus sítios (ou centros) ativos: (i) o centro ativo ocupa uma parte relativamente pequena do volume total da enzima; (ii) ele é uma entidade tridimensional formada por grupamentos vindos de diferentes partes da seqüência linear de aminoácidos; (iii) os substratos da enzima ligam-se ao seu sítio ativo por meio de atrações fracas múltiplas; (iv) em todas as enzimas de estrutura conhecida, os centros ativos são fendas ou então frestas e (v) a especificidade de ligação do substrato depende de um arranjo precisamente definido de átomos no sítio ativo ⁽³⁾.

As enzimas catalisam uma impressionante variedade de reações utilizando diferentes combinações de seis mecanismos catalíticos básicos (catálise ácido-base; catálise covalente; catálise eletrostática; catálise por íons metálicos; por efeitos de proximidade e orientação e, finalmente, via ligação preferencial do estado de transição). Entretanto, e a despeito da grande complexidade inerente aos processos catalíticos intermediados por enzimas, todas elas são passíveis de análise cinética, de modo que suas velocidades de reação e sua eficiência global

possam ser quantificadas. A seguir, serão tecidas certas considerações com relação à cinética enzimática baseadas, fundamentalmente, em informações extraídas das referências 1 e 2.

A formação reversível de um complexo “enzima-substrato” (Equação 1.1) constitui a primeira etapa na catálise enzimática. Este mecanismo foi proposto, independentemente, por Adrian Brown, em 1902, e Victor Henri, em 1903.



Equação 1.1. Reação global envolvida na catálise enzimática. E, S, ES e P simbolizam, respectivamente, a enzima, o substrato, o complexo enzima-substrato e os produtos de reação.

A reação global em duas etapas elementares mostrada na Equação 1.1 explica bem o fato experimental de que, para uma concentração constante de enzima, a velocidade de reação aumenta com o aumento da concentração do substrato até se atingir uma velocidade máxima. Isto corresponde ao ponto em que quase todos os sítios ativos se encontram na forma ES, ou seja, quando a enzima está “saturada” com o seu substrato. Reações não-catalisadas, por outro lado, não apresentam este comportamento.

No ano de 1913, o mecanismo envolvendo a formação do complexo enzima-substrato foi expandido em uma teoria geral da ação enzimática por Leonor Michaelis e Maud Menten. A curva que expressa a relação entre [S] e V_0 tem a mesma forma para a maioria das enzimas e pode ser expressa algebricamente pela equação que estes pesquisadores derivaram partindo da hipótese básica de que a etapa determinante da velocidade nas reações enzimáticas seria a quebra do complexo ES, formando então o produto e a enzima livre. Isto implica a suposição de que $k_{-1} \gg k_2$, o que significa que a primeira etapa da reação encontra-se em equilíbrio termodinâmico, de modo que $K_S = k_{-1} / k_1$ representa a constante de dissociação do complexo enzima-substrato. A equação de Michaelis-Menten é considerada a equação básica da cinética enzimática (Equação 1.2).

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Equação 1.2. Equação de Michaelis-Menten. [S] é a concentração molar do substrato e V_0 e $V_{\text{máx}}$ representam, respectivamente, as velocidades inicial e inicial máxima da reação. K_M é a constante de Michaelis. Todos esses termos podem ser obtidos experimentalmente.

A constante de Michaelis possui um valor único para cada par enzima-substrato, ou seja, substratos diferentes que reagem com uma mesma enzima o fazem com valores de K_M distintos. A definição operacional da constante de Michaelis é bastante simples: ela representa

a concentração de substrato para a qual a velocidade inicial da reação catalisada corresponde à metade da velocidade inicial máxima. A constante catalítica (k_{cat}) de uma enzima, um outro parâmetro importante, é definida como $V_{\text{máx}}$ dividida pela concentração total (formas livre e ligada ao substrato) de centros ativos. Essa quantidade, também conhecida como número de reciclagem, ou ainda *turnover number*, representa o número de processos reacionais que cada sítio ativo catalisa por unidade de tempo. A quantidade $k_{\text{cat}} / K_{\text{M}}$, por sua vez, é uma medida da eficiência catalítica da enzima. As enzimas mais eficientes apresentam valores para esse parâmetro próximos ao limite para reações controladas por difusão (10^8 - 10^9 L mol⁻¹ s⁻¹).

Quando uma reação química se processa por meio de intermediários muito reativos presentes em pequena concentração, tal concentração pode ser considerada constante. No caso particular da catálise enzimática, com exceção do estágio inicial da reação, que normalmente termina alguns milissegundos após a mistura de E e S, [ES] se mantém aproximadamente constante até que o substrato seja quase totalmente consumido. Assim, a velocidade de síntese de ES deve igualar a sua velocidade de consumo durante a reação. Ou, em outras palavras, o intermediário ES permanece em estado estacionário e pode ser tratado como possuindo uma concentração constante, isto é, $d[\text{ES}]/dt = 0$. O conceito ou postulado do estado estacionário, uma consideração mais geral do que a de Michaelis-Menten, somente foi introduzido no ano de 1925 pelos pesquisadores G. E. Briggs e J. B. S. Haldane. Apesar da grande simplificação que esta consideração introduz no estudo de dados cinéticos, o postulado de Briggs-Haldane apresenta um sério defeito: “a análise da cinética de uma reação em estado estacionário não pode ter seu mecanismo estabelecido sem ambigüidade”. Contudo, o fato não tira a utilidade do método, já que, embora não possa ser utilizado para estabelecer de forma inequívoca um mecanismo, ele é muito importante no teste e eliminação de propostas mecanísticas pois, se os dados cinéticos não forem compatíveis com um certo mecanismo, este deverá ser rejeitado.

Existem vários métodos para se determinar os valores dos parâmetros na expressão de Michaelis-Menten. Um dos mais empregados foi formulado por Hans Lineweaver e Dean Burk e usa uma forma inversa da Equação 1.2, a qual pode ser observada a seguir:

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_{\text{M}}}{V_{\text{máx}}} \right) \cdot \frac{1}{[\text{S}]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}}$$

Equação 1.3. Equação de Lineweaver-Burk, a qual representa uma reta com coeficiente angular ($K_{\text{M}} / V_{\text{máx}}$) e coeficiente linear ($1 / V_{\text{máx}}$). A partir dela, $V_{\text{máx}}$ e K_{M} são facilmente determinados.

A equação de Lineweaver-Burk gera um gráfico linear (obtido quando se coloca $1/V_0$ em função de $1/[\text{S}]$) denominado de gráfico dos duplos recíprocos, ou gráfico de Lineweaver-

Burk. Num gráfico deste tipo, o ponto onde a reta corta o eixo y fornece o inverso do valor da velocidade inicial máxima. Assim, uma vez determinada $V_{m\acute{a}x}$, o coeficiente angular da reta permite calcular de forma relativamente simples a constante de Michaelis.

b) Metaloenzimas e metaloproteínas

Cerca de 30% das enzimas conhecidas possuem pelo menos um metal em seu centro ativo ou requerem a presença de íons metálicos para o correto desempenho de suas funções^(2,4). Entretanto, as enzimas não constituem as únicas biomoléculas (proteínas estas ou não) a usar, com as mais diversas finalidades, íons de metais. Em ótimo artigo de revisão publicado no ano de 1996, Solomon *et al.*⁽⁵⁾ fornecem uma definição bastante geral do que seria um sítio metálico ligado a proteína: “são aqueles constituídos por um ou mais íons metálicos e a totalidade das cadeias laterais protéicas e ligantes exógenos (sejam em ponte ou terminais) que representam, em última instância, a primeira esfera de coordenação de cada metal”. Estes sítios podem ser classificados, segundo a função que desempenham nos sistemas biológicos, em cinco tipos básicos:

- i) **Estruturais**: responsáveis (parcialmente) pela configuração da estrutura terciária e/ou quaternária de uma proteína;
- ii) **De armazenamento de metais**: aqueles encarregados de realizar a captação, ligação e posterior liberação de metais numa forma hidrossolúvel;
- iii) **De transferência eletrônica**: fazem a captação, liberação e estocagem de elétrons nos sistemas vivos;
- iv) **De ligação de dioxigênio**: coordenação e posterior liberação de O_2 ;
- v) **Catalíticos**: funções de ligação do substrato, ativação e *turnover*.

Este último grupo, o das enzimas dependentes de metais, é subdividido ainda em duas outras categorias: as **metaloenzimas**, que contêm co-fatores de íons metálicos covalentemente ligados às mesmas (mais comumente íons de metais de transição como Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} e Co^{2+}) e as **enzimas ativadas por metais**, que se associam fracamente a íons metálicos do meio, em geral íons de metais alcalinos e alcalinos terrosos (como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} ou Ca^{2+}). Neste último tipo de ativação, os metais freqüentemente desempenham uma função estrutural ao invés de catalítica⁽²⁾.

Os íons metálicos participam de processos catalíticos de três maneiras principais: (a) ligando-se ao substrato para orientá-lo apropriadamente para a reação; (b) mediando reações

redox por intermédio de mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico ou (c) estabilizando eletrostaticamente ou protegendo, através de neutralização, cargas negativas: em muitas reações catalisadas por íons metálicos, estes atuam da mesma maneira que um próton e neutralizam uma carga negativa. Os íons metálicos são, freqüentemente, catalisadores muito mais eficientes do que os próprios prótons, pois podem estar presentes em altas concentrações em pHs próximos de 7 e costumam ter cargas maiores do que +1 ⁽²⁾. No caso específico das reações de hidrólise, de fundamental importância em sistemas biológicos, os íons metálicos podem promovê-las através de 1) fornecimento de uma “âncora molecular” que garanta uma conformação adequada; 2) ativação das ligações carbonílicas ou fosfodiéster; 3) neutralização de carga facilitando o ataque nucleofílico e a estabilização, tanto da carga relacionada com o estado de transição quanto a do grupo abandonador e 4) fornecimento de um nucleófilo forte em pH próximo da neutralidade ⁽⁶⁾, pois a carga de um íon metálico faz com que as moléculas de água a ele ligadas sejam mais ácidas do que se estivessem livres e, portanto, uma fonte de íons OH⁻ nucleofílicos mesmo em meio ácido ⁽²⁾.

Em diversas enzimas, o centro ativo é um complexo bimetálico com uma distância de 3 a 5 Å entre os cátions ⁽⁷⁾. O sítio ativo de muitas metaloenzimas, sejam tanto homo quanto heterobinucleares, apresenta uma ou incluso mais pontes dos tipos oxo, hidroxilo, carboxilato ou imidazolato ligando os metais. Até três grupos em ponte têm sido encontrados. Mesmo ao se considerar compostos homobinucleares, os íons metálicos possuem usualmente ambientes químicos diferentes, assimetria esta que pode envolver também os números de coordenação e as geometrias em torno das espécies centrais ⁽⁸⁾.

c) Metaloenzima-alvo: processos oxidativos e as CATECOL OXIDASES

O transporte, a ativação e o metabolismo do dioxigênio (O₂) constituem processos de enorme importância para a grande maioria dos organismos vivos. A habilidade das proteínas que contêm cobre de ligar oxigênio molecular de forma reversível e ativá-lo desempenha um papel vital na catálise biológica e tem sido matéria de grande e contínuo interesse em Química Bioinorgânica. Apesar de, como já foi dito, muitas metaloenzimas apresentarem sítios ativos com assimetrias em relação à esfera de coordenação oferecida aos metais, algumas possuem sítios catalíticos contendo uma esfera de coordenação simétrica. Nesse sentido, podemos citar como um exemplo importante o grupo de **oxidorreduções** de cobre conhecidas sob o nome de **catecol oxidases**, as quais são de especial relevância no contexto do presente trabalho já que constituem o objeto de estudo desta Tese.

Antes, porém, um pouco da Química das proteínas de Cu. Existem três tipos clássicos de centros de cobre em proteínas e sua diferenciação é realizada com base nas características espectroscópicas das mesmas (Figura 1.1) ^(9,10).

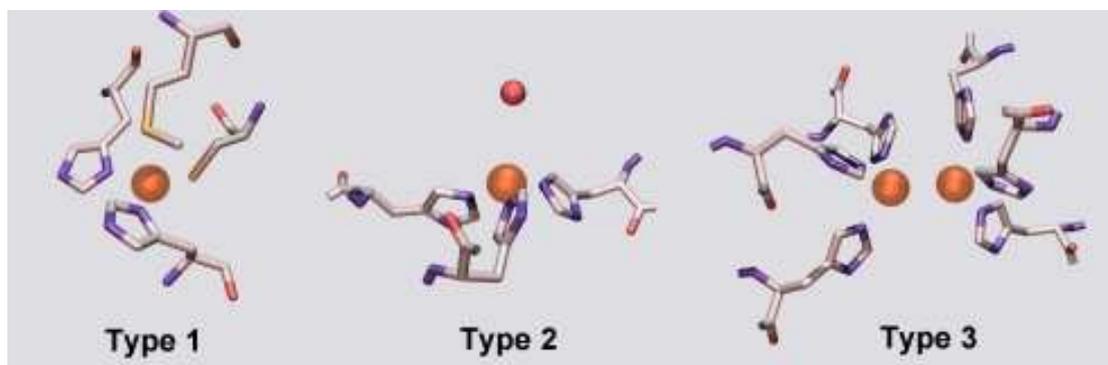


Figura 1.1. Representações estruturais para os três tipos clássicos de centros de cobre encontrados em proteínas.

Os centros de cobre do **tipo 1**, conhecidos por centros azuis de cobre, são encontrados em proteínas responsáveis pela transferência reversível de elétrons. A intensa cor azul desse tipo de proteínas deriva de uma forte absorção na região do visível ($> 3000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a aproximadamente 600 nm) devido a uma transferência de carga (LMCT) do tiolato da cisteína para o centro cúprico. No espectro de EPR, apresentam um desdobramento hiperfino estreito provocado pelo ambiente assimétrico do metal em geometria tetraédrica distorcida. Proteínas de cobre do tipo 1 possuem baixa massa molar e, dentre os mais estudados representantes da classe, podem ser citados a azurina (presente em bactérias), a amicianina e as plastocianinas (plantas superiores e algas).

Proteínas de cobre do **tipo 2**, ou não-azuis, são encontradas em oxidases, tais como a galactose oxidase, e em oxigenases, como a dopamina- -monooxigenase. Os membros desta classe estão envolvidos principalmente em processos catalíticos. Em seu estado oxidado, a cor dessas proteínas é azul-clara e tem origem nas transições d-d próprias dos íons Cu^{II} , com uma absorção limitada na região do visível. O espectro de EPR é típico de complexos comuns de cobre. Centros do tipo 2 são espectroscopicamente consistentes com as geometrias quadrática planar, piramidal ou tetragonal. O metal encontra-se ligado a átomos doadores de nitrogênio e/ou oxigênio.

A diferença das duas classes anteriores, o **tipo 3** contém dois íons cúpricos, cada um dos quais coordenado a três átomos de nitrogênio provenientes de resíduos de histidina. Estas proteínas apresentam uma absorção intensa na região do UV próximo, em torno de 330 nm, e possuem a capacidade de captar dioxigênio de forma reversível nas condições ambiente. Os íons Cu^{II} presentes no estado oxidado desses centros encontram-se fortemente acoplados, de

maneira antiferromagnética, o que leva a um comportamento silencioso no EPR. Esta classe é representada por três proteínas cujas estruturas foram resolvidas por cristalografia de raios-X, a saber: a hemocianina ^(11,12) e as enzimas tirosinase ⁽¹³⁾ e catecol oxidase, que será abordada adiante com maiores detalhes. Proteínas de cobre do tipo 3 atuam ou como transportadores / armazenadores de oxigênio molecular (a hemocianina) ou como enzimas do tipo oxigenase / oxidase (tirosinase e catecol oxidase) ⁽¹⁴⁾.

Entretanto, recentes desenvolvimentos nas técnicas cristalográficas e espectroscópicas permitiram a descoberta de outros tipos de sítios ativos contendo cobre, e uma classificação atual distingue SETE diferentes classes de sítios ativos no estado oxidado das proteínas que possuem o metal. Além dos três tipos descritos acima, há os centros de **tipo 4** (combinação de sítios ativos dos tipos 2 e 3, formando um cluster trinuclear em formato triangular // algumas vezes, essas proteínas apresentam também, pelo menos, um sítio do tipo 1 e passam então a ser chamadas multi-cobre oxidases ou, ainda, oxidases azuis // exemplos: laccase, ascorbato oxidase e ceruloplasmina), os **sítios ativos Cu_A** (sítios de cobre de valência mista contendo um centro binuclear no qual ambos os íons têm um estado de oxidação formal igual a +1,5 na forma oxidada e uma geometria tetraédrica, com duas pontes tiolato provenientes de resíduos de cisteína entre os metais // exemplos: citocromo *c* oxidase e óxido nitroso redutase), o **sítio ativo Cu_B** (detectado próximo a um centro de ferro tipo heme na enzima citocromo *c* oxidase // apresenta um íon cobre coordenado por três átomos de nitrogênio provenientes de resíduos de histidina numa geometria trigonal piramidal, sendo que a quarta posição de coordenação parece encontrar-se vaga e está direcionada no sentido de uma outra posição livre existente na esfera de coordenação do íon ferro presente no grupo heme) e, finalmente, o **sítio ativo Cu_Z** (consistindo de quatro íons cobre arranjados em um tetraedro distorcido e coordenados por sete resíduos de histidina e um ânion hidróxido // exemplo: óxido nitroso redutase) ⁽¹⁵⁾.

A metaloenzima catecol oxidase (CO), cuja nomenclatura oficial é 1,2-benzenodiol: oxigênio oxidorreductase, é o membro do qual se possui menos conhecimento da classe das proteínas de cobre do tipo 3. A primeira CO foi isolada em 1937 ⁽¹⁶⁾ e, desde então, COs têm sido encontradas em um amplo espectro de plantas e frutos e em alguns insetos e crustáceos. Estas enzimas catalisam a oxidação de uma grande variedade de *orto*-difenois (catecóis) às correspondentes *orto*-quinonas ⁽¹⁷⁾, oxidação esta acoplada à redução de oxigênio molecular a água. A taxa de conversão de catecol na batata doce foi medida e é igual a $2,3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ ⁽¹⁸⁾. As quinonas resultantes são altamente reativas e sofrem auto-polimerização formando melaninas polifenólicas marrons ⁽¹⁹⁾. Especula-se que este tipo de processo possa proteger uma planta danificada de organismos patogênicos ou mesmo insetos. O fato de alguns parasitas utilizarem

inibidores desta enzima indica que o sistema CO / difenol representa realmente um obstáculo para a colonização do hospedeiro e reforça a idéia anterior ⁽²⁰⁾. As outras funções fisiológicas propostas para as COs incluem envolvimento na fotossíntese e a coloração de certas flores.

As estruturas das formas *met* [$\text{Cu}^{\text{II}}-(\text{-OH)-Cu}^{\text{II}}$] e reduzida ($\text{Cu}^{\text{I}}\text{-OH}_2 \text{ Cu}^{\text{I}}$) da CO extraída de batata doce, *Ipomoea batatas* (ib), foram determinadas em 1998 por cristalografia de raios-X com resolução de 2,5 Å ^(21,22). Esta enzima monomérica, cuja estrutura terciária pode ser vista na Figura 1.2, contém 345 resíduos de aminoácidos e apresenta um formato elipsoidal com dimensões de 55 x 45 x 45 Å.

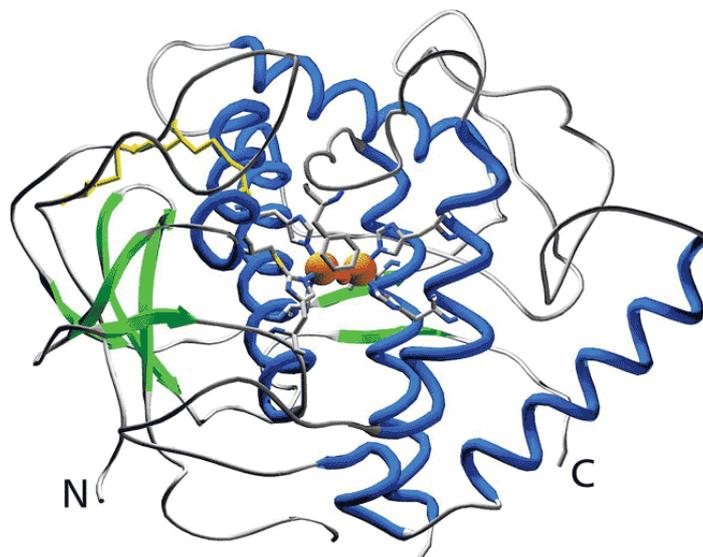


Figura 1.2. Estrutura tridimensional global da catecol oxidase de batata doce, ibCO (extraída da referência 22).

A estrutura secundária é dominada por α -hélices (azul), merecendo destaque especial o motivo estrutural formado pelo “pacote” de quatro hélices (2, 3, 6 e 7) que envolve os átomos de Cu e lhes fornece os resíduos de histidina aos quais eles se coordenam. Há somente pequenos segmentos de folhas β (verde), localizados principalmente na porção N-terminal, e também uma elevada proporção de regiões com espirais. Existem ainda duas pontes dissulfeto (entre os resíduos Cys11–Cys28 e Cys27–Cys89) que ajudam a ancorar a região N-terminal (aminoácidos 1 a 50 da seqüência) da proteína à hélice 2. O sítio ativo acomoda-se no já mencionado “pacote” helicoidal central, constituído pelas quatro α -hélices, o qual se encontra por sua vez localizado numa cavidade hidrofóbica próxima à superfície da enzima.

Ambos os sítios de ligação aos íons cobre são compostos por três anéis imidazólicos provenientes das cadeias laterais dos aminoácidos His 88, His 109 e His 118 (CuA) e His 240, His 244 e His 274 (CuB). Uma característica bem interessante do sítio catalítico da ibCO é a ligação covalente do tipo tioéter (C–S–C) formada entre o carbono γ do resíduo de His 109

(aminoácido que, como visto antes, coordena-se ao CuA) e o átomo de enxofre do resíduo de Cys 92. Esta ponte do tipo “cisteinil-histidil”, entretanto, parece não ter envolvimento direto no processo de transferência eletrônica. Na forma oxidada *met* do sítio ativo (Figura 1.3), as esferas de coordenação são completadas por uma molécula de solvente, ou provavelmente um íon hidróxido, atuando como ponte entre os metais (CuA–O 1,9 Å; CuB–O 1,8 Å). Ambos os centros de cobre apresentam uma geometria de coordenação trigonal piramidal (com His 109 e His 240 ocupando as posições apicais) e a distância intermetálica é de 2,9 Å.

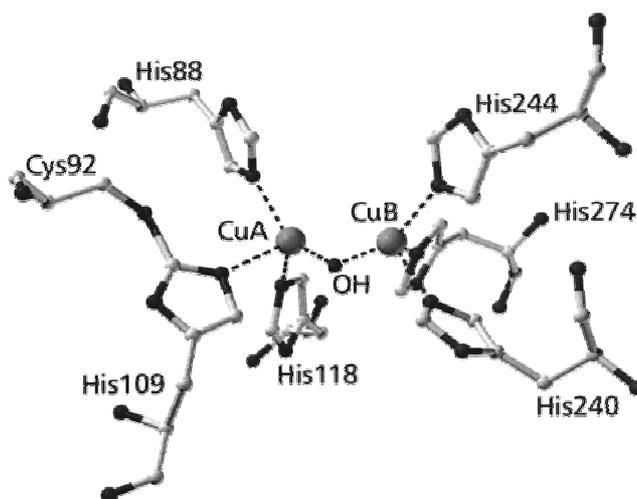


Figura 1.3. Esfera de coordenação presente no estado *met* do centro binuclear de cobre da ibCO (referência 22).

Na forma reduzida ($\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{I}}$) da catecol oxidase, a distância intermetálica aumenta consideravelmente (4,4 Å), mas os resíduos de histidina coordenados aos metais deslocam-se apenas levemente e não são observadas mudanças conformacionais significativas para os outros aminoácidos da proteína. A ponte -hidroxo desaparece, dando lugar a uma molécula de água coordenada ao centro de cobre A (CuA–O 2,2 Å), o qual apresenta uma geometria trigonal piramidal distorcida. Já o centro de cobre B assume uma geometria quadrática plana com uma posição de coordenação livre (NC=3).

O espectro eletrônico da forma oxidada da catecol oxidase apresenta um máximo na faixa de 700-800 nm, atribuído às transições d-d, e uma absorção na faixa de 310 e 330 nm, relacionada a uma transição de transferência de carga do tipo ligante metal, provavelmente da ponte -hidroxo para os centros de cobre(II). Além disso, os sítios binucleares de cobre nas catecol oxidases, assim como nos outros membros da classe de proteínas de cobre do tipo 3, são caracterizados por forte acoplamento antiferromagnético e ausência de sinal no EPR. Por sua vez, a forma reduzida desta enzima não apresenta acoplamento antiferromagnético pela ausência de ponte entre os centros metálicos ⁽²³⁾.

Com base em uma série de dados bioquímicos, espectroscópicos e estruturais (alguns dos quais discutidos acima) e em uma proposta inicial publicada por Solomon e colaboradores para o ciclo catalítico envolvido na atividade de catecolase exibida pela enzima tirosinase⁽¹⁴⁾, foi possível se sugerir um mecanismo para a reação de oxidação de catecóis mediada pela CO. Esta proposição pode ser observada na Figura 1.4⁽²²⁾.

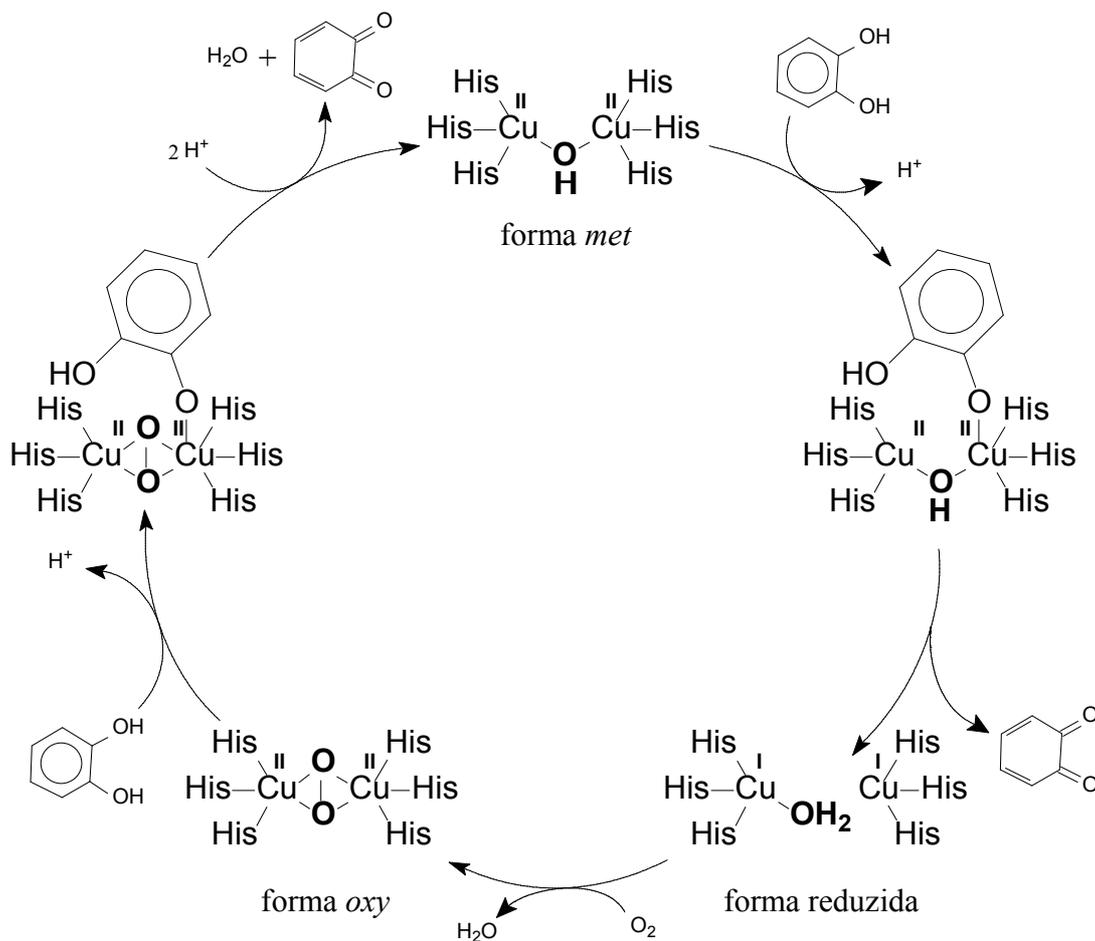


Figura 1.4. Mecanismo proposto para a oxidação de catecóis mediada pela CO (adaptado da referência 22).

O ciclo catalítico pode ter início a partir tanto do estado *oxy* quanto do estado *met* da enzima. Um *orto*-difenoil (substrato) liga-se, após a desprotonação de uma das suas hidroxilas, de forma monodentada ao átomo de cobre B, por exemplo, da forma *met* da catecol oxidase. Este processo é seguido pela oxidação do substrato, com formação da primeira *orto*-quinona e a conseqüente redução da enzima para a sua forma $\text{Cu}^{\text{I}} \cdots \text{Cu}^{\text{I}}$. A incorporação de oxigênio molecular como íon peróxido numa coordenação do tipo $\text{-}^{\text{2}}\text{:}^{\text{2}}$ (segundo sugerem estudos espectroscópicos de UV-vis e Raman) leva ao estado *oxy* da enzima, a qual é então atacada por uma segunda molécula do substrato, que se coordena, após desprotonação de uma de suas hidroxilas, de modo monodentado ao átomo de cobre B. A oxidação desse *orto*-difenoil a uma

segunda *orto*-quinona regenera o estado *met* da CO, encerrando-se assim o ciclo catalítico. Caberia aqui destacar, contudo, que o modo de coordenação do substrato ao centro binuclear de cobre constitui ainda motivo de controvérsias. Na Figura 1.4, utilizamos os intermediários propostos por Krebs, baseados em dados cristalográficos do aduto formado entre a catecol oxidase e o inibidor feniltiouréia. Em seu artigo original de 1996 ⁽¹⁴⁾, Edward I. Solomon dá preferência a uma coordenação bidentada em ponte e, mais recentemente, num estudo que fez uso das técnicas de UV-vis, EPR, eletroquímica e RMN de ¹⁹F, Torelli *et al.* propuseram um outro modelo para a interação entre uma série de complexos homobinucleares de cobre(II) e o substrato 3,5-di-*terc*-butilcatecol (3,5-dtbc) ⁽²⁴⁾. Para esses autores, a nova proposta reconcilia ambos os intermediários enzima-substrato antes descritos (propostos por Solomon e Krebs, respectivamente). Algum tempo depois, Casella e seus colaboradores publicaram o trabalho intitulado “Mechanistic insight into the catechol oxidase activity by a biomimetic dinuclear copper complex” ⁽²⁵⁾, no qual sugerem um ciclo catalítico bifásico (isto é, em duas etapas). Na primeira delas, uma molécula de 3,5-dtbc seria oxidada pelo complexo na sua forma Cu^{II}Cu^{II}, com a concomitante redução dos centros de cobre para Cu^ICu^I. A partir de estudos sobre a dependência da reação com o pH do meio, foi deduzido que a espécie ativa é o estado mono-hidroxo do composto binuclear. Já na segunda etapa, uma outra molécula de catecol é oxidada pelo complexo Cu^{II}Cu^{II}-O₂ formado após oxigenação da forma reduzida do catalisador. Em ambos os casos, a oxidação do substrato constituiria um processo de transferência eletrônica de esfera interna envolvendo a ligação do catecol à espécie ativa. Os autores destacam que, para a primeira etapa, a presença do grupo exógeno -hidroxo no sítio ativo da enzima pode ser de fundamental importância na remoção do segundo próton do *orto*-difenol, favorecendo a fixação do substrato num modo de coordenação bastante particular (ponte ²⁻: ¹⁻).

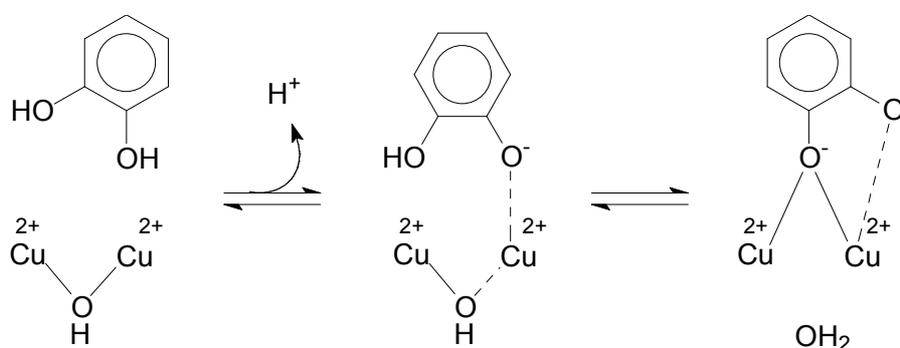


Figura 1.5. Processo de ligação do catecol ao sítio ativo da ibCO. Casella *et al.* (adaptado da referência 25).

No ano de 2004, um mecanismo muito diferente, desenvolvido através de um estudo computacional via teoria do funcional de densidade híbrido (DFT), foi proposto pelo químico

sueco Per E. M. Siegbahn ⁽²⁶⁾. O novo mecanismo foi construído sobre um crescente número de estudos teóricos e experimentais indicando que o sítio ativo de uma enzima não muda a sua carga ao longo do ciclo catalítico. Na proposição mostrada na Figura 1.4 (por Krebs *et al.*), a carga elétrica do sítio ativo varia de +1 a +3, o que requer a disponibilidade de vários centros de natureza básica (captadores de H⁺) próximos que possam armazenar os prótons liberados durante o ciclo. Entretanto, a estrutura cristalina da catecol oxidase não revela a presença de tais “candidatos a bases” na região do sítio ativo. O ciclo catalítico proposto por Siegbahn e colaboradores (Figura 1.6) apresenta alguns intermediários radiculares e espécies de valência mista Cu^{II}Cu^I. A partir de comparações feitas com a enzima tirosinase, cuja estrutura, como apontado anteriormente, é bem similar à da CO, foi escolhida uma carga igual a +1 para o complexo binuclear de cobre que constitui o sítio ativo, a qual se mantém constante ao longo de todo o mecanismo.

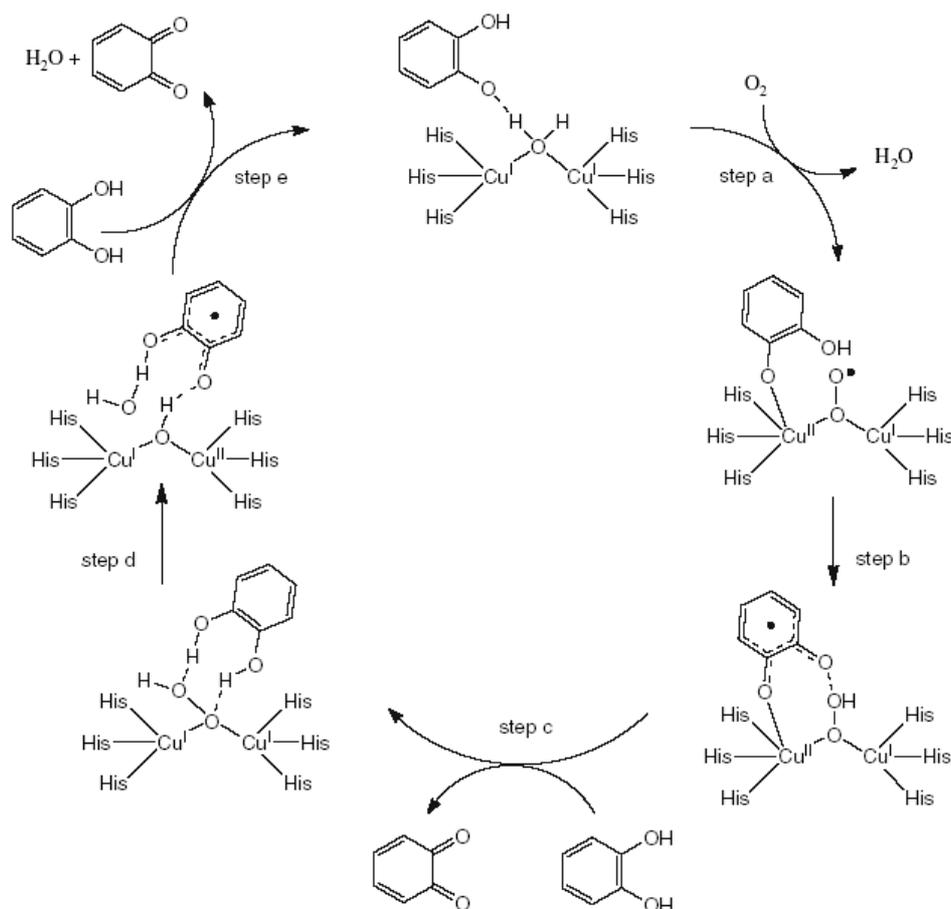


Figura 1.6. Mecanismo proposto por Siegbahn *et al.* para a oxidação de catecóis mediada pela CO (extraído das referências 26 e 27). Intermediários radiculares e de valência mista Cu^{II}Cu^I são importantes na dinâmica do ciclo.

Apesar das inovações incorporadas com esta proposição, o mecanismo peca no fato de não possuir, até o momento, suporte experimental adequado. Em particular, a existência de

um ânion radical superóxido em coordenação do tipo -1,1, como o decorrente da primeira etapa do ciclo, não possui antecedentes na literatura para qualquer complexo binuclear de Cu. Em virtude disto, Güell e Siegbahn (2007) resolveram deixar de lado a analogia com a enzima tirosinase e adotar uma carga igual a +2 para o sítio ativo da CO. Desta forma, realizaram um outro estudo teórico do mecanismo envolvido no ciclo oxidativo da catecol oxidase utilizando o funcional DFT híbrido B3LYP. Esse mecanismo pode ser visto na Figura 1.7⁽²⁸⁾.

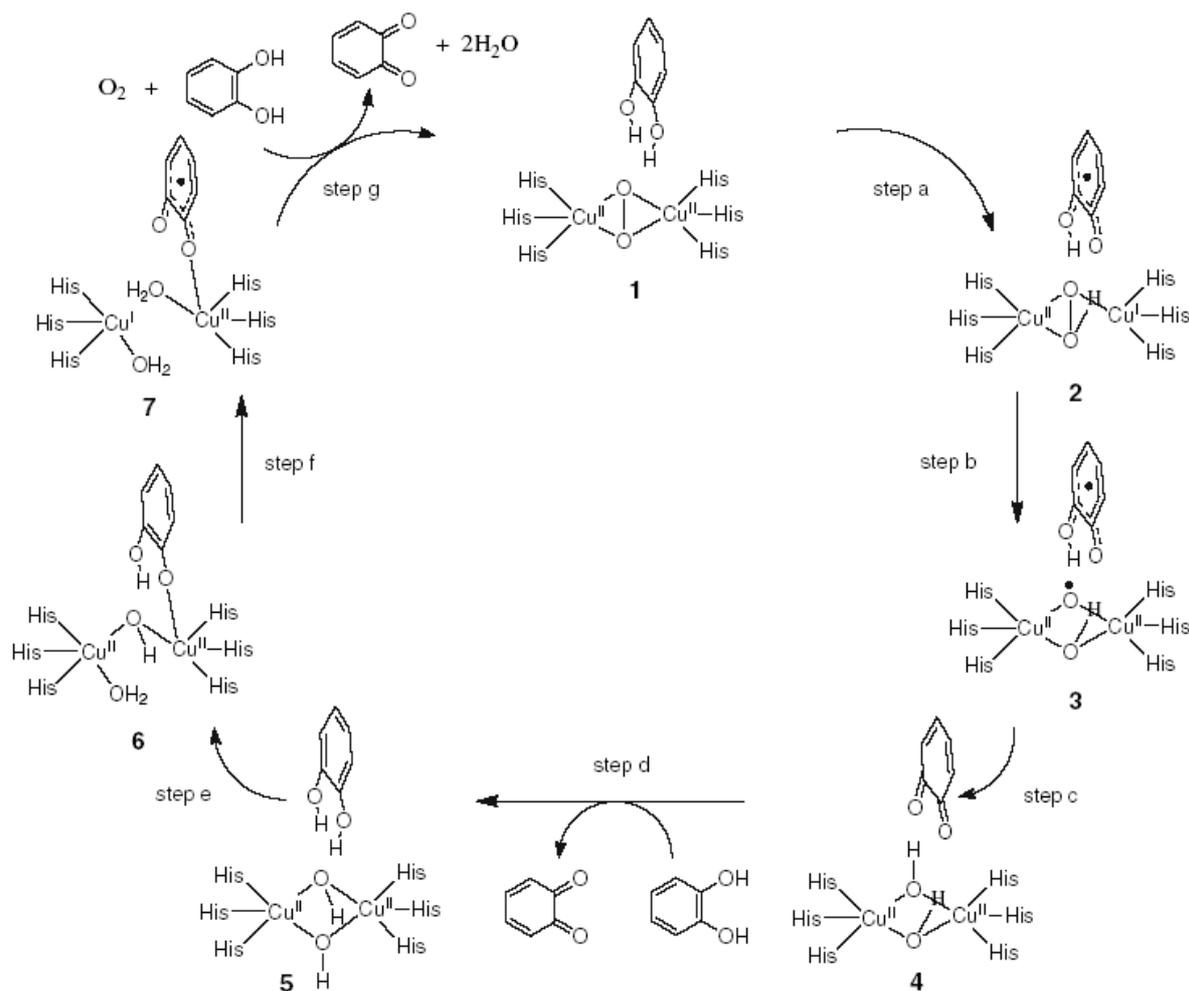
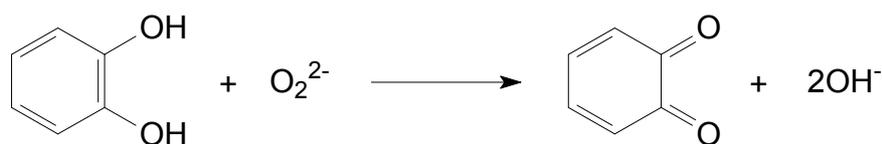


Figura 1.7. Um outro mecanismo, proposto por Güell e Siegbahn, para a oxidação de catecol mediada pela CO (extraído da referência 28). A carga do sítio ativo permanece igual a +2 ao longo de todo o ciclo catalítico.

O mecanismo começa a partir de uma estrutura na qual um íon peróxido encontra-se coordenado na forma O_2^{2-} ao centro binuclear de Cu, como proposto experimentalmente. A primeira meia-reação (envolvendo as etapas *a*, *b* e *c*) é descrita pela equação:



Os respectivos estados de transição calculados são mostrados na Figura 1.8.

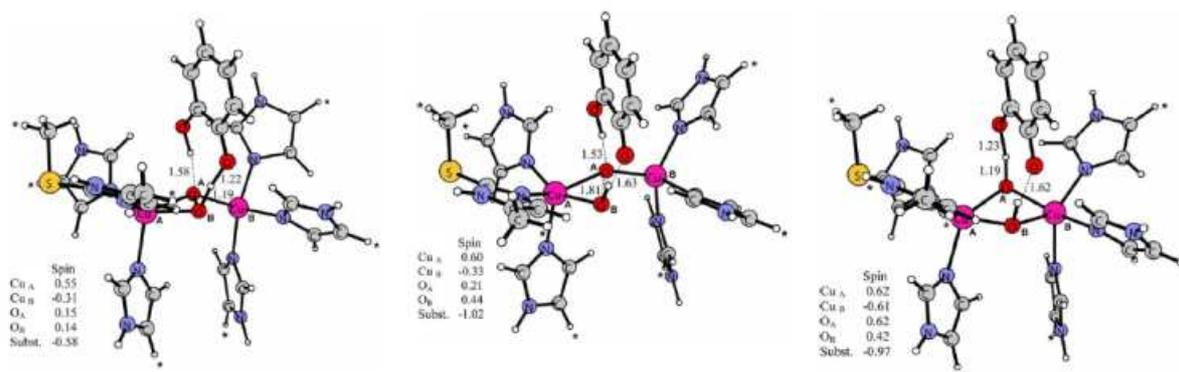
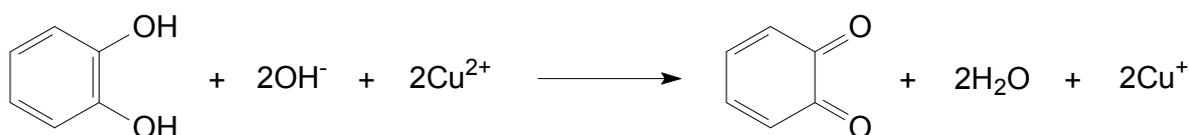


Figura 1.8. Estados de transição DFT calculados para as etapas que conformam a primeira meia-reação do ciclo sugerido por Güell/Siegbahn (extraído da referência 28). Os átomos marcados com um asterisco foram mantidos fixos na posição que eles ocupam na estrutura de raios-X durante a otimização da geometria.

Novamente, propõe-se aqui a presença de intermediários radicalares. A seu favor, os autores argumentam que, apesar de não haver até o momento evidência experimental que suporte o envolvimento de radicais no ciclo catalítico da enzima CO, estes estão fortemente envolvidos na formação da ligação covalente entre Cys 92 e His 109. Além disso, para outras enzimas nas quais ligações covalentes dessa natureza estão presentes, uma química radicalar foi também sugerida no mecanismo catalítico. Por exemplo, pressupõe-se que radicais tirosil tenham implicações importantes tanto para a galactose oxidase⁽²⁹⁾ quanto para a citocromo *c* oxidase⁽³⁰⁾. De acordo com os mecanismos propostos por Solomon e Krebs, uma molécula de água é obtida após a saída da primeira *orto*-quinona (meia-reação inicial). Esta molécula de água se encontraria coordenada a apenas um dos centros de cobre. No presente mecanismo há, entretanto, duas pontes de tipo -hidroxo conectando os centros metálicos após a liberação do produto. As duas moléculas de água que a estequiometria total do ciclo exige seriam então formadas durante a segunda meia-reação (mais especificamente, nas etapas *e* e *f* da mesma). Essa meia-reação pode ser descrita pela equação geral:



O processo começa a partir do intermediário cuja estrutura otimizada é mostrada na Figura 1.9. De acordo com os resultados obtidos, na segunda semi-reação uma molécula de catecol é oxidada à correspondente *orto*-quinona, o centro binuclear de cobre é reduzido do estado $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$ ao estado $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{I}}$ e duas moléculas de água são obtidas a partir de duas pontes -hidroxo. A etapa-chave do mecanismo global, e portanto a determinante da velocidade, é a quebra da ligação O–O do ligante peroxo coordenado (etapa *b*), a qual apresenta uma barreira energética calculada de $12,1 \text{ kcal mol}^{-1}$, em excelente concordância com o valor experimental de aproximadamente 13 kcal mol^{-1} (barreira de energia livre para a oxidação do catecol em *Ipomoea batatas*). Em algumas etapas deste ciclo, o substrato assume uma coordenação de tipo monodentada, o que condiz com a proposição de Krebs e colaboradores.

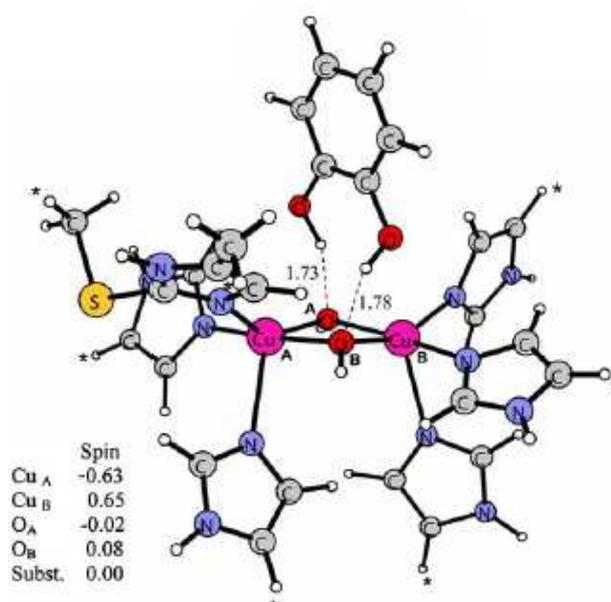


Figura 1.9. Intermediário DFT calculado, o qual mostra bem o modo de interação do substrato com o sítio ativo da CO na segunda meia-reação do ciclo proposto por Güell/Siegbahn (extraído da referência 28). Como no caso anterior, os átomos marcados com um asterisco foram mantidos fixos na posição que eles ocupam na estrutura de raios-X durante a otimização da geometria.

Muito recentemente, Comba *et al.* ⁽³¹⁾ publicaram um artigo baseado simultaneamente em cálculos teóricos e resultados experimentais, no qual analisaram o mecanismo envolvido na oxidação do substrato modelo 3,5-dtbc por uma série de complexos biomiméticos do tipo $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$ -bispidina na presença de dioxigênio. Esses autores sugeriram um ciclo catalítico para os compostos que estudaram que apresenta certas divergências importantes em relação aos últimos mecanismos propostos para a reação enzimática. Os principais pontos de diferença são: (i) apenas um catecolato é oxidado por ciclo com os catalisadores sintéticos, enquanto no caso da metaloenzima são dois; (ii) o substrato coordena-se aos complexos modelos na forma

bidentada (de acordo com a proposta inicial de Solomon para a tirosinase), enquanto para a CO várias propostas de interação enzima-substrato vêm sendo consideradas e (iii) o oxigênio molecular é reduzido a H_2O_2 (processo envolvendo dois elétrons) nos compostos com ligantes bispidina, enquanto na enzima ele é reduzido a H_2O (processo envolvendo quatro elétrons).

d) A hidrólise das ligações fosfodiéster e sua relevância bioquímica

Apesar de não constituírem assunto central desta Tese, torna-se necessário tecer neste momento algumas considerações de ordem estrutural e, principalmente, mecanística sobre as metaloenzimas que catalisam as reações de hidrólise, com ênfase especial para a clivagem de ésteres de fosfato. Isto, como poderá ser visto adiante (Capítulo 3), está relacionado com uma interessante propriedade apresentada por dois dos compostos modelos desenvolvidos ao longo de nosso trabalho. A seguir, uma breve introdução ao tema.

O genoma humano é constituído por 23 cromossomos e aproximadamente três bilhões de pares de bases nitrogenadas (as quais, na forma de nucleotídeos, representam as unidades monoméricas do ácido desoxirribonucléico, DNA). Neste “pacote” de DNA, estão codificados uns 30.000 genes, cada um dos quais deve ser transcrito numa molécula de RNA mensageiro para que a proteína correspondente possa ser sintetizada. Uma única mutação em qualquer um destes genes, ou também a degradação de uma proteína essencial, poderiam trazer consigo conseqüências devastadoras para o indivíduo. Assim sendo, a manutenção da integridade da informação genética contida nas macromoléculas de RNA e DNA, ou da estrutura primária das proteínas, é de fundamental importância. Neste contexto, a escolha de ligações do tipo fosfodiéster (as quais unem os nucleosídeos nos RNA e DNA) e peptídicas (que acoplam os aminoácidos em proteínas) não poderia ter sido mais adequada, a estabilidade cinética – a despeito de sua relativa instabilidade termodinâmica – que elas conferem a esses biopolímeros é realmente impressionante. Contudo, a mesma estabilidade cinética que torna essas ligações tão apropriadas pode, eventualmente, constituir um sério problema, por exemplo: proteínas e DNA estranhos, uma vez reconhecidos, precisam ser destruídos; mutações no DNA nativo têm de ser reparadas; o RNA mensageiro deve ser hidrolisado para que a proteína que ele codifica não seja sintetizada de forma desnecessária e, ainda, as proteínas nativas têm que ser degradadas aos correspondentes aminoácidos, uma vez cumprida a sua função. E, obviamente, tudo isto deve acontecer numa escala de tempo fisiologicamente adequada. Para dar conta desta formidável tarefa, a natureza utiliza a classe de enzimas chamadas de **hidrolases** ⁽⁶⁾.

O nosso interesse específico reside numa classe de metalo-hidrolases denominadas fosfo-hidrolases, as quais catalisam seletivamente a hidrólise de ligações “éster de fosfato” em

aminoácidos e sacarídeos fosforilados (fosfatases), nucleotídeos, DNA e RNA (nucleases) ⁽³²⁾. As fosfatases são um conjunto de hidrolases que utilizam como substratos fosfomonoésteres. Elas encontram-se amplamente distribuídas na natureza, tendo sido identificadas em animais, vegetais e microorganismos. Estas enzimas podem ser divididas em três classes principais: **fosfatases alcalinas** (com pH ótimo para catálise em torno de 9,0 e baixa especificidade em relação ao substrato para monoésteres de fosfato de pequena massa molar // requerem cátions Zn^{2+} para manifestar a sua atividade), **fosfatases ácidas** (com pH ótimo para catálise em torno de 5,0 e substratos de baixa massa molecular relativa) e **proteínas fosfatases**, as quais atuam na desfosforilação (isto é, a remoção de um grupamento fosfato) de proteínas. Com base em uma série de fatores (funções, estrutura, seqüência, especificidade, inibidores...), estas últimas podem ainda ser separadas em duas grandes categorias: proteínas Serina/Treonina fosfatases e proteínas Tirosina fosfatases ^(32,33).

Dois importantes grupos de fosfo-hidrolases são as fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) e a calcineurina (PP2B). As seções a continuação abordam com mais detalhes as principais propriedades destas enzimas.

As fosfatases ácidas púrpuras – Parte I: considerações estruturais

As fosfatases ácidas púrpuras são um conjunto de enzimas que, *in vitro*, catalisam a hidrólise de ésteres e anidridos ativados do ácido fosfórico, como o trifosfato de adenosina (ATP), numa faixa ótima de pH entre 4,0 e 7,0. Elas diferem de outras fosfatases ácidas pelo fato de não serem sensíveis à inibição por tartarato e já foram encontradas em uma grande variedade de tecidos provenientes de mamíferos (fluido alantóico suíno, ossos e baço de ratos, baço humano e bovino, etc.), de certas plantas (batata doce, feijão vermelho, soja) e também em fontes microbianas. A função fisiológica destas enzimas ainda não foi inequivocamente estabelecida ⁽³⁴⁾. As PAPs extraídas de mamíferos (tais como UfPAP, rbPAP, bsPAP, etc.) têm sido extensivamente estudadas e contêm um centro ativo constituído por dois núcleos de ferro antiferromagneticamente acoplados na sua forma oxidada inativa, ou púrpura, $Fe^{III}Fe^{III}$. Já a kbPAP, proveniente do feijão vermelho, é homodimérica (111 kDa) e apresenta um sítio $Fe^{III}Zn^{II}$ em cada uma das subunidades ⁽³⁵⁾ (Figura 1.10).

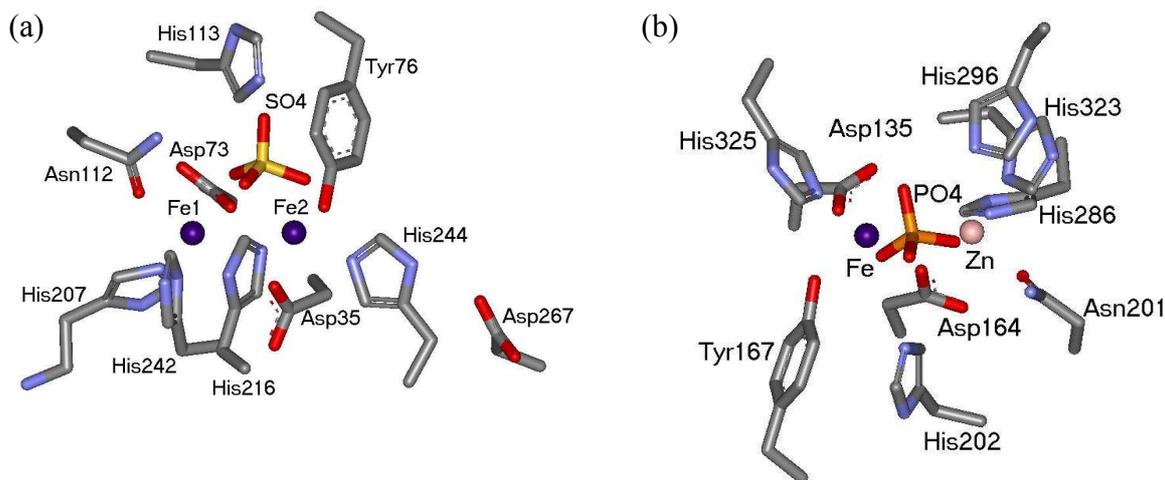


Figura 1.10. PAPs provenientes de fontes animais e vegetais: (a) Estrutura tridimensional do sítio ativo da (“rat bone”) rbPAP intacta, com sulfato complexado. Os resíduos de His 113, His 216 e Asp 267 não estão envolvidos diretamente na coordenação aos centros férricos, mas participam ativamente do processo catalítico. (b) Estrutura tridimensional do sítio ativo da (“kidney bean”) kbPAP, com fosfato complexado. Ambos os átomos de oxigênio não coordenados do grupo PO_4^{3-} interagem, através de ligações de H, com os resíduos de His 202 e His 296.

Em 2005, uma equipe de pesquisadores liderada por Gerhard Schenk e Luke Guddat, ambos da University of Queensland (Austrália), apresentou a estrutura cristalina do complexo formado entre o ânion dihidrogenofosfato e uma das isoformas de alta massa molecular (ca. 110 kDa) da fosfatase ácida púrpura extraída de batata doce, a qual possui um sítio catalítico antiferromagneticamente acoplado $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}$ único nesta classe de metaloenzimas⁽³⁶⁾. A assim chamada spPAP (do inglês, sweet potato PAP), com os seus centros metálicos separados por uma distância média de 3,26 Å e exibindo ambientes de coordenação octaédricos, se distingue dos outros membros do grupo pela maior eficiência catalítica frente a uma grande variedade de ésteres de fosfato (ativados ou não), pela dependência do íon Mn^{2+} para a manutenção de sua atividade e pela presença, em pH 4,9, de uma ponte do tipo -oxo entre os metais. O íon dihidrogenofosfato coordena-se ao sítio ativo da spPAP num modo *tripodal* bastante incomum, com dois oxigênios ligando-se aos centros de ferro(III) e manganês(II), respectivamente, e um terceiro atuando como ponte entre esses cátions. Esta forma de coordenação é considerada única entre as estruturas conhecidas pertencentes à família das PAPs, mas, segundo os autores do trabalho, remete ao modo de ligação do grupo fosfato na enzima binuclear de níquel(II) urease e do ânion sulfato ao sítio $\text{Mn}^{\text{II}}\text{Mn}^{\text{II}}$ da proteína fosfatase de bacteriófagos.

Todas as PAPs (sejam elas de fontes vegetais ou animais) possuem centros metálicos binucleares quimicamente idênticos no que diz respeito à esfera de coordenação dos metais. Uma representação esquemática da forma reduzida, e portanto ativa, ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$) do sítio ativo das PAPs encontra-se representada na Figura 1.11.

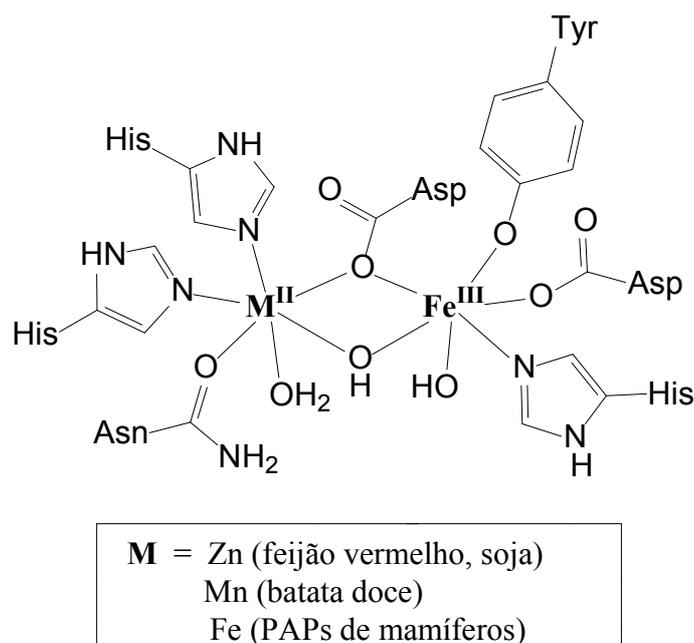


Figura 1.11. Representação esquemática da forma reduzida $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$ (cataliticamente ativa) dos sítios ativos das fosfatases ácidas púrpuras extraídas tanto de fontes animais quanto vegetais.

As fosfatases ácidas púrpuras – Parte II: proposições mecanísticas

Essa enorme semelhança entre os sítios ativos de todas as PAPs sugere que a catálise da reação de hidrólise de ésteres de fosfato possa ocorrer através de um mecanismo comum. Levando isto em consideração, duas propostas iniciais para o mecanismo de ação das PAPs foram descritas na literatura: uma por T. Klabunde e colaboradores⁽³⁷⁾ (publicada em 1996 e baseada em dados estruturais para a kbPAP) e a outra, mais recente, descrita por Y. Lindqvist e colaboradores em 1999 para a rbPAP⁽³⁸⁾. Esses dois mecanismos são muito parecidos entre si e apresentam, como principal característica, o ataque nucleofílico sobre o átomo de fósforo por parte do **ion hidróxido terminalmente coordenado ao centro de Fe^{III}** . Como exemplo ilustrativo, a Figura 1.12 apresenta o mecanismo proposto por Y. Lindqvist e colaboradores. Numa primeira etapa, o grupo fosfato do substrato se liga à forma reduzida (ativa) da enzima pelo deslocamento de uma molécula de água e subsequente coordenação ao centro metálico bivalente. Isto deixaria o ligante hidróxido terminal da esfera de coordenação do ferro(III) numa posição adequada para um ataque “em linha” sobre o átomo de fósforo, o qual assume, após coordenado, um caráter positivo que facilita a entrada do nucleófilo. Como esse ataque ocorre do lado oposto ao grupamento álcool (grupo abandonador) do substrato, há uma inversão de configuração no átomo de fósforo. O ataque nucleofílico resulta em um estado de transição pentacoordenado de geometria trigonal bipiramidal, que deve ser estabilizado por interações com os resíduos de His 113 e His 216, os quais são conservados no sítio ativo. No arranjo descrito, o grupo de entrada e o grupo abandonador se encontrariam alinhados, ocupando as

posições axiais. A hidrólise propriamente dita ocorreria a partir da protonação do grupo de saída pelo resíduo de ácido aspártico Asp 267, com subsequente clivagem da ligação P–OR. Ao final dessa etapa, o grupo fosfato encontra-se coordenado a ambos os centros de ferro de forma bidentada, podendo então ser deslocado do núcleo férrico por uma molécula de água em uma reação de substituição, fechando-se assim o ciclo.

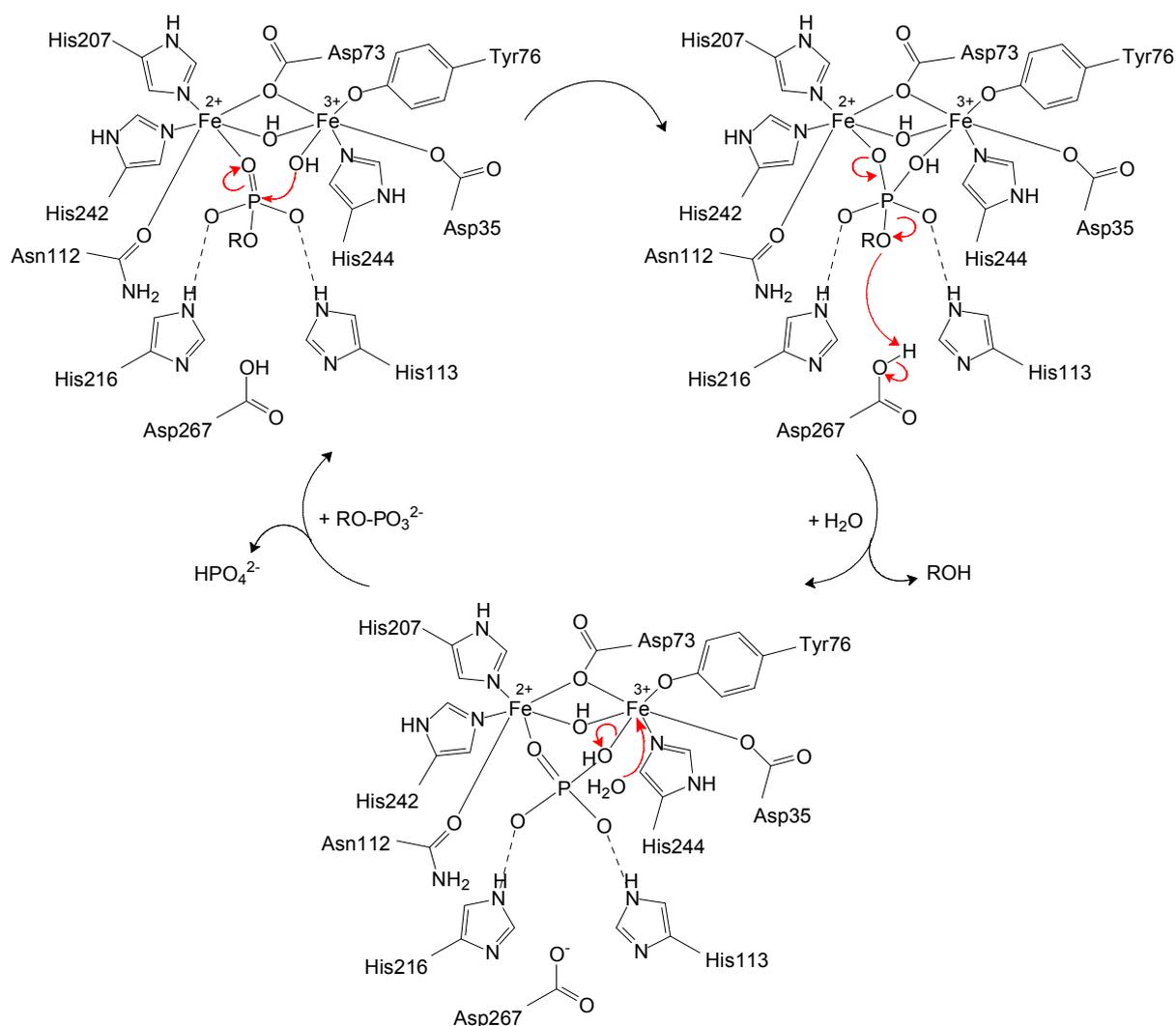


Figura 1.12. Mecanismo proposto por Lindqvist *et al.* para a hidrólise de ésteres de fosfato mediada pela rBPAP (adaptado da referência 38).

Entretanto, o grupo do professor Lawrence Que Jr., University of Minnesota (EUA), tem defendido a idéia de que o nucleófilo em questão possa ser o íon hidróxido que ponteia os metais ao invés de um ligante hidroxilo terminal (Figura 1.13) ^(39,40). Esse pesquisador utiliza alguns argumentos bastante fortes a favor de sua teoria: 1) apesar da disponibilidade de várias estruturas cristalinas de PAPs não há evidência direta, até o momento, de ligantes derivados do solvente em posições **terminais** na esfera de coordenação dos cátions metálicos da **forma ativa** dessas enzimas; 2) em um estudo por espectroscopia ENDOR (electron-nuclear double

resonance) envolvendo a forma ativa (o estado de valência mista $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$) da uteroferrina ⁽⁴⁰⁾, assim como seus complexos com os ânions tetraédricos MoO_4^{2-} , AsO_4^{3-} e PO_4^{3-} , não foram encontrados indícios para a presença de água ou íon hidróxido coordenado terminalmente ao centro de Fe^{III} , o que sugere que a sexta posição de coordenação desse cátion permanece vaga na forma reduzida ativa da enzima. Apenas a ponte -OH (característica estrutural que se mantém nos complexos dos ânions tetraédricos) e uma molécula de água, ou talvez um ânion hidróxido, terminal ligada(o) ao centro de ferro(II) foram detectadas, sendo que este último ligante é deslocado após a coordenação bidentada dos ânions e, finalizando, 3) a estrutura do complexo enzima-substrato é diferente em cada um dos mecanismos propostos, podendo ser utilizada para a escolha da proposição correta: enquanto o mecanismo A requer uma ligação monodentada por parte do éster de fosfato ao centro ferroso, o mecanismo B postula que a ligação do substrato se dá de maneira bidentada, formando uma ponte entre os metais. Até o presente momento, não há evidência experimental conclusiva sobre a verdadeira estrutura do complexo ES. O fosfato é um inibidor competitivo das PAPs e acredita-se que este íon se ligue à enzima através de interações bastante semelhantes àquelas do próprio substrato. A estrutura mostrada anteriormente (kbPAP) prova que, de fato, o ânion fosfato liga-se a ambos os cátions metálicos do sítio ativo das PAPs numa coordenação do tipo bidentada em ponte. Ademais, estudos espectroscópicos de EXAFS (extended X-ray absorption fine structure) têm corroborado esse modo de ligação ^(41,42), favorecendo, desta forma, o mecanismo B. Quando coordenado de maneira terminal ao centro metálico, espera-se que o íon hidróxido apresente uma nucleofilicidade muito maior do que quando coordenado como ponte ⁽⁴³⁾. Entretanto, a ligação do substrato pode disparar um processo de aproximação da ponte -OH ao íon bivalente, tornando-a um ligante *quasi*-terminal ($\text{M}^{\text{II}}\text{-OH}$) e, portanto, mais nucleofílico ⁽³⁹⁾.

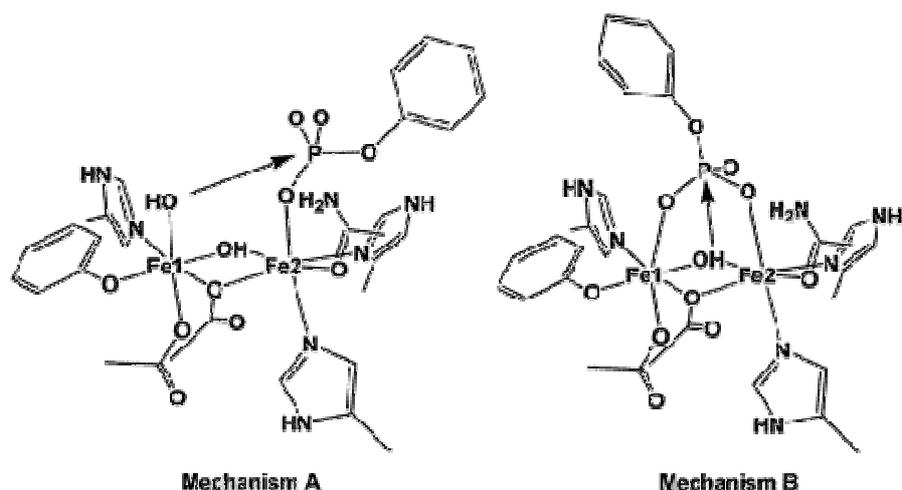


Figura 1.13. Dois diferentes mecanismos propostos para a hidrólise de um monoéster de fosfato pelas PAPs. **A:** com envolvimento de um nucleófilo terminal (Klabunde *et al.*; Lindqvist *et al.*) e **B:** com envolvimento de um nucleófilo em ponte (Que, Jr. *et al.*) (extraído da referência 40).

Por outro lado, seria interessante notar que o padrão de ligações de H para ambas as subunidades da spPAP (Schenk *et al.*) mostra que o oxigênio em ponte está protonado. Como é proposto que esse átomo tem origem a partir do nucleófilo que ponteia os metais, pode-se concluir que, em pH próximo de 4, um íon OH^- encontra-se presente em uma coordenação do tipo -hidroxo . A estrutura publicada por Schenk, assim como também os dados cinéticos que a acompanham, vão de encontro à hipótese de que, no caso da spPAP, é o átomo de oxigênio em ponte que inicia a hidrólise. Além disto, resultados de EXAFS publicados por Lanznaster e colaboradores ⁽⁴⁴⁾ para o complexo binuclear inédito $[\text{FeCu}(\text{-OAc})_2(\text{bpbpmp})](\text{ClO}_4)_2$, em que bpbpmp representa a forma desprotonada do ligante 2-[N-bis(piridilmetil)aminometil]-6-[N'-(piridilmetil-2-hidroxibenzil)aminometil]-4-metilfenol, indicam fortemente a presença de ferro pentacoordenado em solução. Por conseguinte, sugere-se que o nucleófilo envolvido no ataque seja a ponte óxido, o que constituiria então uma outra possibilidade mecanística.

Recentemente, A. Neves, Schenk e colaboradores apresentaram uma revisão completa dos mecanismos propostos para as metalo-hidrolases binucleares ⁽⁴⁵⁾.

A calcineurina

Esta enzima pertence à classe das proteínas Serina/Treonina fosfatases, um grupo de catalisadores envolvidos na modulação do estado de fosforilação de proteínas em organismos eucariontes. Nesse balanço entre a fosforilação e a desfosforilação de proteínas está a base para o controle de diversos eventos biológicos disparados por efetores extracelulares como hormônios, mitógenos, compostos carcinogênicos, citocinas, neurotransmissores e substâncias

ou metabólitos tóxicos. Em consequência da ação destes efetores pode ocorrer regulação da divisão, diferenciação, desenvolvimento e morte da célula, assim como também mudanças no metabolismo e na expressão gênica, contração, transporte, locomoção celular, aprendizado e memória. Praticamente um terço de todas as proteínas celulares são fosfoproteínas e uma quantidade importante de vias de sinalização são reguladas pelo estado de fosforilação das mesmas. Em células eucariontes, a adição de grupos fosfato a proteínas ocorre principalmente em resíduos de Tirosina, Serina e Treonina e é mediada por enzimas da classe das proteínas quinases. A calcineurina atua especificamente na desfosforilação (via hidrólise de ligações do tipo éster de fosfato) dos resíduos fosfoserina e fosfotreonina de grande número de cadeias polipeptídicas^(33,46). Por isso, e a diferença do que acontece com as PAPs, acredita-se que o papel fisiológico da PP2B esteja atualmente bem caracterizado para vários eucariontes, tanto inferiores (*Saccharomyces cerevisiae* e *Neurospora crassa*, por exemplo) quanto superiores (plantas e mamíferos). Uma listagem abrangente das suas funções conhecidas, em diferentes organismos, pode ser encontrada na revisão publicada por Rusnak e Mertz⁽⁴⁷⁾.

Nos mamíferos, a calcineurina é isolada predominantemente de tecidos nervosos e constitui a única fosfatase dependente de cálcio e calmodulina conhecida^(46,48). Essa enzima também é estimulada pela presença de outros cátions metálicos bivalentes, em particular Mn^{2+} e Ni^{2+} ^(49,50,51,52,53). Foi demonstrado que estes íons aumentam a atividade da PP2B na ausência de Ca^{2+} /calmodulina⁽⁵⁰⁾ e evitam a inativação da enzima, ou restituem a sua atividade após inativação por exposição a Ca^{2+} /calmodulina⁽⁴⁹⁾. Ainda não é completamente claro o motivo pelo qual esses cátions bivalentes constituem ativadores tão potentes⁽⁴⁷⁾.

Esta enzima desempenha um papel crítico em vários processos celulares importantes, incluindo aqui a transcrição gênica e a ativação das células T^(54,55,56). A calcineurina humana constitui o alvo bioquímico das drogas imunossupressoras ciclosporina A e FK506, as quais causam a sua inibição após formarem complexos em combinação com os receptores protéicos citoplasmáticos ciclofilina e FKBP-12, respectivamente⁽⁵⁷⁾.

Na Figura 1.14 é mostrada uma representação esquemática da suposta forma ativa do núcleo catalítico da calcineurina humana.

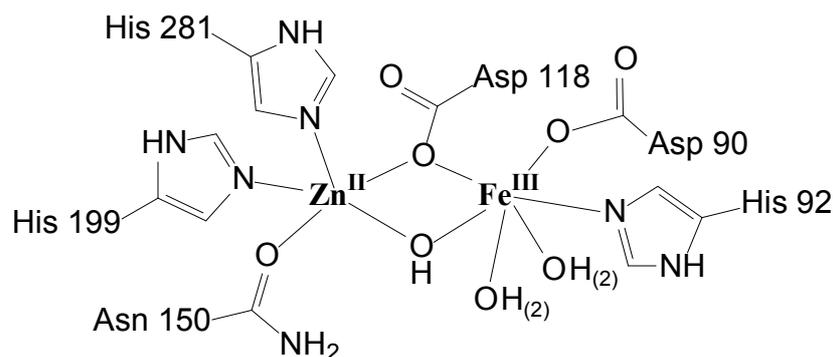


Figura 1.14. Representação esquemática do sítio ativo da calcineurina humana, com base na estrutura descrita por Kissinger *et al.* ⁽⁵⁸⁾. É interessante notar a sua similaridade com o cluster binuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ presente na kbPAP; entretanto, há uma importante diferença: o íon férrico possui dois ligantes terminais derivados de solvente em sua esfera de coordenação e não apresenta o ligante tirosinato característico encontrado em todas as PAPs. Seria oportuno observar aqui que o grau de protonação do sítio ativo varia com o pH do meio, já que as duas moléculas de água presentes podem, a princípio, ser desprotonadas ao menos uma vez.

Muito pouco é conhecido sobre o mecanismo catalítico da calcineurina e os membros relacionados da família das proteínas Serina/Treonina fosfatases. Acredita-se, contudo, que a hidrólise enzimática mediada por esta enzima siga um mecanismo similar àquele das PAPs, que foi discutido em detalhe na seção anterior ⁽⁴⁵⁾.

e) Compostos modelos: a contribuição da Química Bioinorgânica

Diversos esforços têm sido realizados na tentativa de imitar as funções enzimáticas observadas nos organismos vivos, o que pode ser feito através da síntese de compostos modelos menores e mais simples, que possam assumir funções catalíticas análogas. No caso específico das metaloenzimas, a área do conhecimento encarregada de efetuar esses estudos, e que tem realizado importantes contribuições, é a Química Bioinorgânica, a qual constitui uma das mais recentes ramificações da Química Inorgânica e se situa na interface entre esta e a Biologia. Seria oportuno salientar aqui que a Química Bioinorgânica é uma área da ciência altamente interdisciplinar, a qual promove a interação de disciplinas tão diversas quanto são Química, Física, Biologia, Bioquímica, Medicina, Toxicologia e Ciências Ambientais ⁽⁵⁹⁾.

Um primeiro passo na aproximação de modelos biomiméticos a sistemas biológicos reais consiste numa síntese planejada, a qual procura reproduzir as características estruturais da biomolécula, assim como as suas propriedades físicas e, particularmente, espectroscópicas. Para isto, supõe-se que a primeira esfera de coordenação dos centros metálicos seja a principal responsável pelas características espectroscópicas dos modelos sintetizados. Assim, uma etapa subsequente estaria relacionada com a realização de simulações qualitativas e quantitativas do comportamento da reação catalítica em presença do complexo modelo a ser testado.

Uma grande vantagem de se trabalhar com compostos modelos é que, em comparação com as próprias metaloenzimas, esses podem ser analisados por métodos múltiplos e mais precisos. Exemplificando isto, a determinação da estrutura cristalina dos modelos pode ser efetuada com uma resolução muito maior (10^{-3} Å, contra 2-3 Å na enzima). Sendo assim, dados obtidos a partir de sistemas análogos contribuem para uma melhor compreensão da constituição do centro ativo das enzimas. Finalmente, o estudo do comportamento das reações catalisadas por complexos modelos ajuda a elucidar os ciclos catalíticos enzimáticos e leva a uma melhor compreensão das reações elementares de proteínas.

A oxidação de substratos orgânicos pelo oxigênio molecular sob condições brandas constitui uma reação de grande interesse para muitos processos sintéticos e industriais, tanto de um ponto de vista econômico quanto ambiental. Embora a reação de substâncias orgânicas com o dióxigênio seja termodinamicamente favorável, ela é cineticamente impedida devido ao estado fundamental triplete do O_2 . Neste contexto, e também com o intuito de se obter um maior entendimento da química das metaloenzimas de cobre, um grande número de análogos biomiméticos (tanto estruturais quanto funcionais) para o sítio ativo da catecol oxidase foram desenvolvidos ^(25,31,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72), inclusive em nossos laboratórios ^(73,74,75,76). As abordagens utilizadas para estudar o mecanismo da atividade como catecolase de complexos de cobre(II) podem ser classificadas dentro de quatro grupos principais: (1) estudos do modo de coordenação do substrato; (2) estudos da relação estrutura-atividade; (3) estudos cinéticos sobre a reação catalítica e (4) estudos envolvendo a oxidação estequiométrica de catecóis por complexos dicobre–peroxo e dicobre–oxo ⁽¹⁵⁾.

A habilidade que os complexos de cobre possuem na oxidação de fenóis e catecóis é conhecida há mais de 40 anos. Por exemplo, em 1964, Grinstead relatou a oxidação do 3,5-dtbc à respectiva *orto*-quinona na presença de cloreto de cobre(II) 1% ⁽¹⁵⁾. Mais recentemente, no ano de 2002, P. Kamau e R. Jordan realizaram estudos cinéticos envolvendo a oxidação da molécula de catecol por nitrato de cobre(II) aquoso e mostraram que a presença de oxigênio molecular (incluindo aqui seus vários complexos e formas reduzidas) não constitui condição necessária para a reação ocorrer ⁽⁷⁷⁾. Entretanto, este último pode fornecer novas rotas, que aceleram a oxidação. A observação de que as reações simples desse sistema têm o complexo cobre(II)–catecol como espécie reativa é consistente com os mecanismos biológicos que sugerem que os íons cúpricos ativam o catecol para a oxidação.

Compostos binucleares de cobre(II), por sua vez, são capazes de oxidar catecóis desde que a distância Cu...Cu seja menor do que 5 Å. Acredita-se que um “ajuste” espacial entre o substrato e o complexo constitua o fator determinante na oxidação daquele, ou seja, os centros

metálicos devem estar próximos o suficiente para facilitar a coordenação bidentada do catecol através dos oxigênios das suas hidroxilas, o que deve anteceder o processo de transferência eletrônica. Esta teoria é sustentada pela observação de que compostos binucleares de cobre são geralmente mais ativos na oxidação de catecóis do que os análogos mononucleares ⁽⁷⁸⁾. Por esta razão, uma das principais estratégias experimentais empregadas consiste na utilização de ligantes binucleantes, devido ao efeito quelato que apresentam e à previsível formação de centros binucleares em seus compostos metálicos. Ligantes com grupos centrais alcóxido ou fenóxido, que nos complexos atuam como pontes endógenas entre os metais (existem também os ligantes sem ponte endógena nenhuma), e possuindo em sua estrutura braços pendentes coordenantes são certamente os mais usados, sobretudo aqueles que contêm oxigênio (fenol) e nitrogênio (aminas, piridina, imidazol ou benzoimidazol) como átomos doadores. Um certo número de artigos de revisão, que tratam o assunto com maior ou menor profundidade, foram publicados ^(78,8,15,79,80). Devido à enorme quantidade de modelos biomiméticos já descritos na literatura, a continuação, serão abordadas somente algumas das principais tentativas feitas no sentido da obtenção de análogos estruturais e/ou funcionais para as COs, com foco exclusivo sobre os sistemas binucleares.

Belle e colaboradores ^(63,64) prepararam uma série de quatro ligantes e, a partir deles nove complexos binucleares de cobre(II) baseados no 2,6-bis {[bis(2-piridilmetil)amino]metil} -4-metilfenol (H-BPMP, Figura 1.15). Essa série foi obtida através da substituição do grupo metil, originalmente presente na posição *para* ao fenol de H-BPMP, por flúor ou pelos grupos trifluorometil ou metóxido. Três dentre os complexos que tiveram as suas estruturas de raios-X resolvidas apresentaram uma ponte do tipo -hidroxo entre os metais (ligantes com R = CH₃, F e OCH₃), assim como aquela exibida pela forma *met* da CO. Esses compostos foram os únicos a mostrar atividade como catecolase. Atividade esta que mostrou ser fortemente dependente da natureza de R, com o grupo doador de densidade eletrônica metoxila tornando o seu sistema mais ativo, a despeito da pequena alteração nas propriedades estruturais que a presença deste induz no complexo ⁽⁶⁴⁾. Os compostos ativos foram utilizados em um estudo posterior para se determinar o modo de interação/coordenação com os substratos 3,5-dtbc e tetraclorocatecol (tcc) ⁽²⁴⁾.

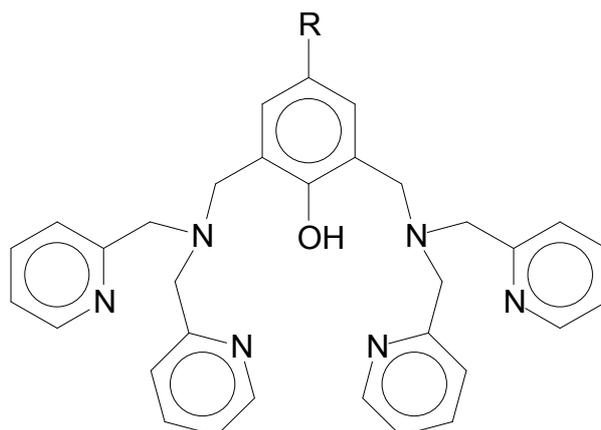
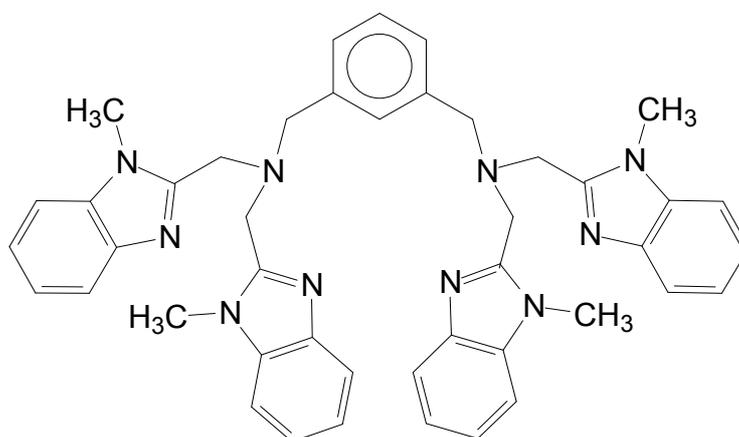


Figura 1.15. Estruturas do ligante binucleante simétrico H-BPMP (–CH₃) e derivados – Belle e colaboradores.

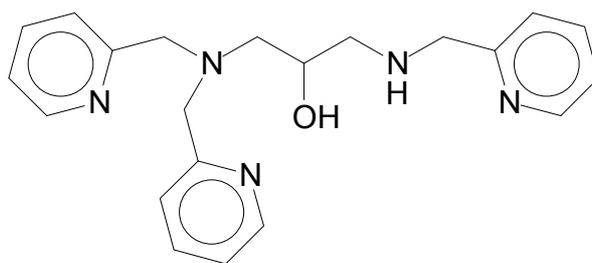
De todos os modelos já desenvolvidos, o que mostrou maior atividade é um complexo do ligante L-55 (Figura 1.16) publicado pelo grupo do Prof. Luigi Casella, da Università di Pavia (Itália) ^(60,61). Experimentos cinéticos permitiram calcular uma eficiência catalítica (k_{cat} / K_M) para este sistema de 140 L mol⁻¹ s⁻¹ ⁽⁶¹⁾. A partir de estudos de equilíbrio, determinou-se que a forma ativa do composto é [Cu₂(L-55)(H₂O)(OH)]³⁺. Curiosamente, a espécie bis(–hidroxo) é cataliticamente inativa. Estudos subseqüentes com este complexo levaram à proposição de um mecanismo para a oxidação de catecóis mediada pela CO ⁽²⁵⁾.



L-55

Figura 1.16. Estrutura do ligante binucleante simétrico L-55, possuindo quatro resíduos de metil-benzoimidazol como braços pendentes e sem a presença de nenhuma ponte endógena em potencial – Casella e colaboradores.

Dentre as contribuições efetuadas pelo grupo de pesquisa do Prof. A. Neves podemos citar um complexo binuclear de cobre(II) do ligante binucleante hexadentado não-simétrico Htppnol, *N,N,N'*-tris(2-piridilmetil)-2-ol-1,3-propanodiamina (Figura 1.17).

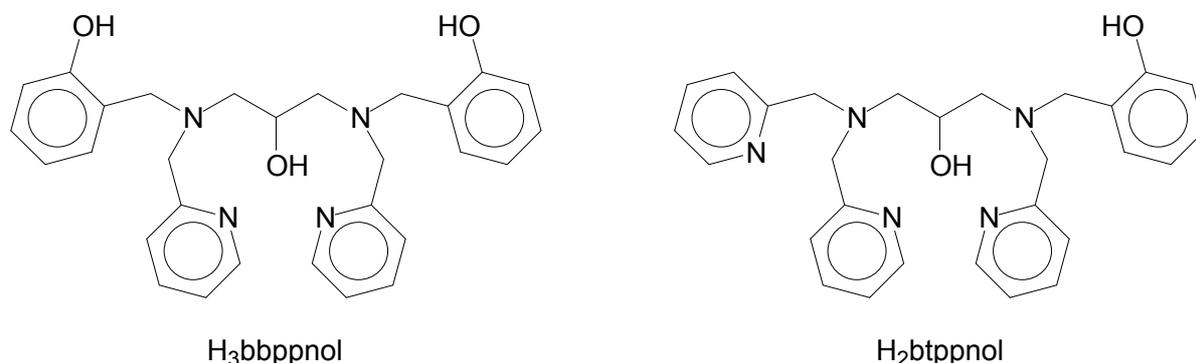


Htpnol

Figura 1.17. Estrutura do ligante binucleante hexadentado não-simétrico Htpnol ^(81,73) – Neves e colaboradores.

A estrutura de raios-X indica que a assimetria do ligante leva a dois centros de cobre distintos. Um deles apresenta geometria trigonal bipyramidal distorcida ($\tau = 0,73$), enquanto o outro encontra-se tetracoordenado, com uma geometria de tipo quadrado planar distorcida. O complexo $[\text{Cu}_2(\text{tpnol})(-\text{OAc})](\text{ClO}_4)_2$ apresentou boa atividade catalítica frente à reação de oxidação do substrato 3,5-di-*tert*-butilcatecol à respectiva quinona. O tratamento dos dados, através do método Michaelis-Menten, forneceu os parâmetros cinéticos: $k_{\text{cat}} = 3,12 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; $K_M = 1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $k_{\text{cat}} / K_M = 1,62 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ⁽⁷³⁾.

Diversos pesquisadores têm usado também ligantes com braços pendentes contendo grupos fenólicos para mimetizar o sítio ativo das COs, apesar desse tipo de átomo doador não estar presente na estrutura determinada para a enzima. Entretanto, os complexos sintetizados mostraram atividade como catecolase. São do nosso grupo de pesquisa os ligantes $\text{H}_3\text{bbppnol}$ e $\text{H}_2\text{btppnol}$, a partir dos quais foram obtidos três compostos homobinucleares de cobre(II) $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{bbppnol})(-\text{OAc})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ⁽⁸²⁾; $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{bbppnol})(-\text{OAc})(-\text{ClO}_4)]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{EtOAc}$ ⁽⁷⁴⁾ e $[\text{Cu}_2(\text{Hbtppnol})(-\text{OAc})](\text{ClO}_4)_2$ ⁽⁸³⁾.



$\text{H}_3\text{bbppnol}$

$\text{H}_2\text{btppnol}$

Figura 1.18. Ligantes binucleantes contendo braço(s) pendente(s) fenólico(s) e as suas respectivas estruturas: $\text{H}_3\text{bbppnol}$ (simétrico) ^(84,82,74) e $\text{H}_2\text{btppnol}$ (não-simétrico) ⁽⁸³⁾ – Neves e colaboradores.

Os complexos binucleares sintetizados a partir dos ligantes $\text{H}_3\text{bbppnol}$ e $\text{H}_2\text{btppnol}$ apresentam geometrias octaédricas distorcidas em ambos os centros de cobre. Dos três, o que

mostrou a maior atividade na catálise da reação de oxidação do 3,5-dtbc foi o composto $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{bbppnol})(-\text{OAc})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, para o qual foram obtidas as constantes cinéticas: $k_{\text{cat}} = 7,90 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; $K_M = 7,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $k_{\text{cat}} / K_M = 10,0 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ⁽⁷⁵⁾.

Mais recentemente, R. Peralta (também do grupo de pesquisa do Prof. Ademir Neves) publicou a síntese de um interessante sistema a partir do ligante binucleante inédito H_2Ldtb (Figura 1.19) ⁽⁷⁶⁾. Os complexos $[\text{Cu}_2(\text{HLdtb})(-\text{OCH}_3)](\text{ClO}_4)_2$ e $[\text{Cu}_2(\text{Ldtb})(-\text{OCH}_3)]\text{BPh}_4$ tiveram as suas estruturas determinadas por difração de raios-X. Em solução, as duas espécies encontram-se em equilíbrio: $[\text{Cu}_2(\text{HLdtb})(-\text{OCH}_3)]^{2+} = [\text{Cu}_2(\text{Ldtb})(-\text{OCH}_3)]^+ + \text{H}^+$, sendo que a forma desprotonada é a responsável pela catálise na reação de oxidação do 3,5-dtbc, a qual segue um comportamento clássico do tipo Michaelis-Menten, com $k_{\text{cat}} = 5,33 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e $K_M = 4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

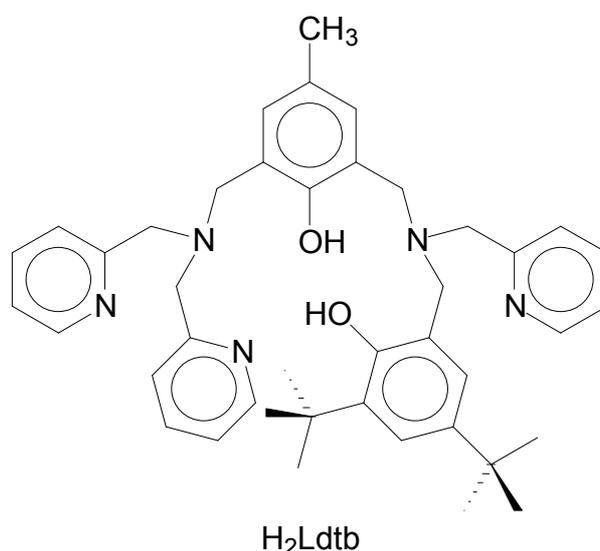


Figura 1.19. Estrutura do ligante binucleante não-simétrico possuindo um braço pendente fenólico H_2Ldtb ⁽⁷⁶⁾ – Neves e colaboradores.

f) Estratégia de ação adotada

“Avanços notáveis na compreensão das propriedades estruturais e químicas da catecol oxidase têm sido conseguidos através de estudos modelos de análogos sintéticos. O interesse atual tem foco em investigações da atividade como catecolase de compostos de coordenação de cobre com diferentes parâmetros estruturais e propriedades eletrônicas em torno dos íons metálicos” (Krebs *et al.*, 1999). Estas diretrizes, apontadas por Krebs há quase dez anos atrás, têm se mantido mais ou menos constantes neste campo de pesquisa. Assim, procurando dar a nossa contribuição para o entendimento da Química das metaloenzimas de cobre, com ênfase na catecol oxidase, CO, são apresentados neste trabalho de Tese quatro ligantes binucleantes

inéditos (Figura 1.20), a partir dos quais foram sintetizados três novos complexos binucleares contendo o motivo estrutural $\text{Cu}^{\text{II}}-(\text{-OH})-\text{Cu}^{\text{II}}$.

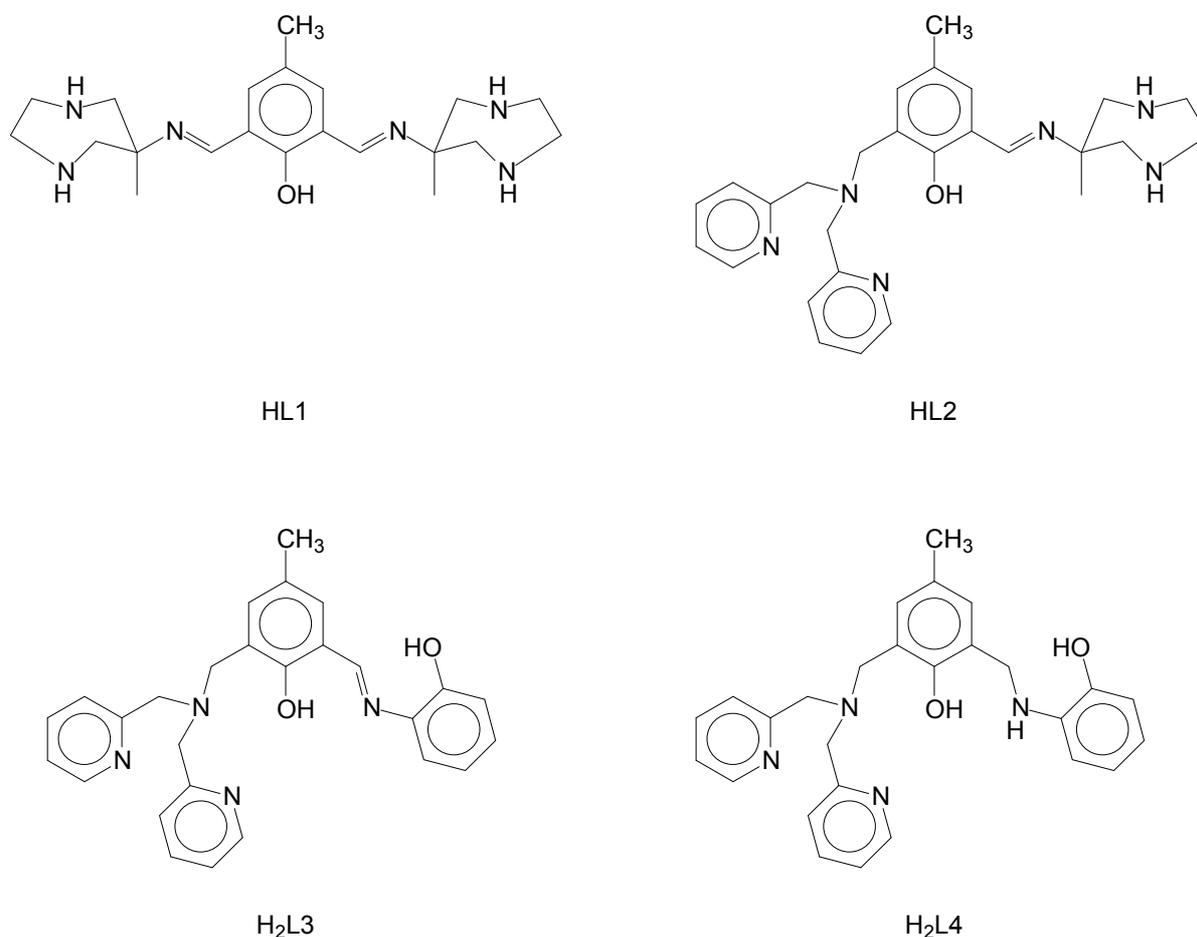


Figura 1.20. Novos ligantes binucleantes, simétrico e não-simétricos, sintetizados no presente trabalho de Tese.

Ligantes binucleantes são aqueles capazes de formar complexos bimetálicos e podem ser classificados de acordo com o grupo central que atua como ponte entre os metais ⁽⁸⁵⁾. Em todos os ligantes mostrados na Figura 1.20, a unidade fenolato é responsável por esta função. HL1 e HL2 são ligantes heptadentados simétrico e não-simétrico, respectivamente, possuindo, a modo de braço(s) pendente(s), uma amina cíclica cuja síntese foi recentemente publicada por Aime e colaboradores ⁽⁸⁶⁾. A importância destes compostos reside no fato de que o novo heterociclo, denominado AAZ, pode, de acordo com as atuais pesquisas de A. Neves *et al.* ⁽⁸⁷⁾, mimetizar de forma muito satisfatória as propriedades do versátil 1,4,7-triazaciclononano ⁽⁸⁸⁾. HL2 apresenta também como braço pendente uma unidade do tipo bis(2-piridilmetil)amina. Os ligantes não-simétricos H₂L3 e H₂L4, por sua parte, foram inicialmente planejados para mimetizar a esfera de coordenação presente no sítio ativo da metaloenzima calcineurina. Eles têm um lado macio constituído por duas unidades de 2-metilpiridina, uma amina terciária e o

grupo fenol que, uma vez desprotonado, servirá como ponte intermetálica. No lado duro dos mesmos, o já mencionado fenol central, um nitrogênio de imina (H₂L3) ou amina secundária (H₂L4) e um grupo fenol terminal.

OBJETIVOS DO TRABALHO

Na tentativa de se obter uma maior compreensão da função mecanística desempenhada pelos íons metálicos presentes nos sítios ativos do sistema enzimático em estudo, assim como visando a preparação de metalo-catalisadores de cobre(II) capazes de promover a oxidação de substratos orgânicos sob condições de reação brandas e potenciais hidrolases sintéticas, este trabalho tem como seus principais objetivos:

1. Desenvolvimento e caracterização de novos ligantes binucleantes simétricos e não-simétricos contendo como átomos doadores nitrogênio(s) e oxigênio(s), buscando mimetizar o ambiente de coordenação dos metais presente no sítio ativo das catecol oxidases.

2. Síntese e caracterização de complexos homobimetálicos inéditos do tipo $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$ no contexto da enzima de interesse, principalmente aqueles possuindo uma ponte -OH entre os metais, como modelos bioinorgânicos para os centros ativos da enzima.

3. Realização de estudos eletroquímicos, espectroscópicos e estruturais dos compostos de coordenação obtidos, tentando-se efetuar quando possível correlações com as propriedades da metaloenzima-alvo.

4. Determinação das constantes de equilíbrio (protonação) em solução dos complexos metálicos isolados.

5. Avaliação dos potenciais catalíticos (atividades como catecolase e fosfatase) desses compostos de coordenação frente aos substratos modelo 3,5-dtbc e BDNPP, respectivamente.

6. Estudo da reatividade dos complexos obtidos frente à clivagem de DNA plasmidial.

7. Ensaios quantitativos da citotoxicidade e acumulação celular dos novos compostos frente à linhagem K562 de leucemia mielóide crônica e teste para a avaliação da viabilidade celular em macrófagos peritoneais inflamatórios.

CAPÍTULO 2

PARTE EXPERIMENTAL

REAGENTES, METODOLOGIA E INSTRUMENTAÇÃO

a) Reagentes utilizados

Os seguintes reagentes, materiais, gases e solventes empregados nas sínteses e análises foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem qualquer tipo de purificação prévia ou tratamento adicional: *para*-cresol; hidróxido de sódio; ácido clorídrico conc.; sulfato de sódio anidro; formaldeído 37%; gases argônio, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio; paraformaldeído; ácido acético glacial; urotropina; ácido sulfúrico conc.; etilenodiamina; benzenocarbaldeído; nitroetano; carbonato de sódio; sílica-gel 70-230 mesh, 60 Å; catalisador de paládio (10%) suportado em C; Celite[®] 545; 2-(aminometil)piridina; catalisador de paládio (5%) suportado em C; trietilamina; bicarbonato de sódio; 2-aminofenol; boridreto de sódio; oxocloreto de fósforo; piridina; 3,5-di-*terc*-butilcatecol (3,5-dtbc); tetrametilsilano; clorofórmio deuterado (CDCl₃); brometo de potássio, grau espectroscópico; perclorato de cobre(II) hexaidratado; perclorato de zinco(II) hexaidratado; ferroceno; Ascarite[®]; Drierity[®]; cloreto de crômio(II); zinco amalgamado; perclorato de sódio; cloreto de sódio; perclorato de lítio hexaidratado; tampões biológicos MES, TRIS, HEPES, CHES e CAPS; iodeto de potássio; molibdato de amônio e os solventes acetonitrila UV/HPLC, acetonitrila PA, metanol UV/HPLC, metanol PA, etanol absoluto, isopropanol PA, clorofórmio PA, diclorometano PA, tetraidrofurano PA, éter etílico PA e tolueno PA. Por sua vez, foram purificados antes de utilizados os reagentes: hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (recristalização em etanol abs)⁽⁸⁹⁾, 2-piridinacarbaldeído (destilação sob pressão reduzida) e 2,4-dinitrofenol (recristalização em clorofórmio PA)⁽⁹⁰⁾. O diacetato de *N,N'*-di(benzil)etilenodiamina foi obtido por uma reação de aminação redutiva envolvendo os compostos benzenocarbaldeído (2 equiv.) e etilenodiamina e, posteriormente, precipitado pelo gotejamento de ácido acético glacial. O substrato bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (BDNPP), por sua parte, foi sintetizado e purificado de acordo com procedimentos descritos na literatura por Bunton e Farber⁽⁹⁰⁾.

b) Metodologia e instrumentação

Análise elementar de C, H e N

A determinação dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio presentes nas amostras de ligantes e complexos foi realizada num analisador de CHN Perkin Elmer, modelo 2400, no Laboratório de Análise Elementar – Departamento de Química – UFMG.

Temperatura de fusão

Os pontos (ou, eventualmente, faixas) de fusão dos sólidos orgânicos isolados foram medidos utilizando-se um aparelho BÜCHI, modelo Melting Point B-540, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia – Departamento de Química – UFSC.

Espectroscopia vibracional (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) foram obtidos num espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR-2000, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia – Departamento de Química – UFSC. As amostras sólidas foram analisadas em pastilha de KBr (grau espectroscópico) e as amostras líquidas em filme (entre placas de sal).

Espectroscopia eletrônica (UV-vis)

Os espectros eletrônicos nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho próximo foram obtidos num espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Lambda-19, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia – Departamento de Química – UFSC. As análises em solução foram realizadas com solventes (acetonitrila e metanol) de grau espectroscópico e cubetas de quartzo de caminho óptico 1,0 cm. Os espectros no estado sólido (reflectância difusa) foram registrados no mesmo equipamento, utilizando-se, na amostragem, discos prensados de KBr.

Ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C

Espectros de RMN de ^1H dos centros precursores, braços pendentes e do intermediário bpmamff foram obtidos através de um espectrômetro Bruker FT-200, na Central de Análises – Departamento de Química – UFSC. Um estudo pormenorizado envolvendo a atribuição total dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos ligantes H_2L_3 e H_2L_4 foi realizado em espectrômetros Varian Mercury Plus AS 400 (Central de Análises – Departamento de Química – UFSC) e Bruker DRX-400 (LAREMAR – Departamento de Química – UFMG). Em todos os casos, os espectros foram registrados à temperatura ambiente utilizando-se clorofórmio deuterado como solvente e tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ ppm) como padrão interno. Os experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) foram efetuados com gradientes de campo.

Difração de raios-X

As determinações estruturais por difração de raios-X de monocristal dos ligantes H_2L_3 e H_2L_4 e dos complexos $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{L}_1)](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{L}_2)(\text{ClO}_4)]\text{ClO}_4$ foram

realizadas pelo Prof. Dr. Adailton João Bortoluzzi na Central de Análises – Departamento de Química – UFSC. A coleta dos dados foi efetuada a 293(2) K num difratômetro Enraf-Nonius CAD-4 equipado com um tubo de molibdênio ($Mo K = 0,71069 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite. Os dados referentes ao complexo $[Cu_2(-OH)(L_3)]ClO_4$, por sua vez, foram coletados a 294(2) K no difratômetro Bruker KAPPA APEX II, também equipado com monocromador de grafite e tubo de molibdênio, em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Manfredo Hörner (Departamento de Química – UFSM). As estruturas cristalinas foram resolvidas por métodos diretos com a utilização do programa computacional SIR97⁽⁹¹⁾ e refinadas pelo método dos mínimos quadrados com matriz completa através do programa SHELXL97⁽⁹²⁾.

As representações gráficas das estruturas moleculares foram geradas utilizando-se o programa ORTEP-3 for Windows⁽⁹³⁾.

Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Medidas de ressonância paramagnética eletrônica foram realizadas num equipamento Bruker ESP 300E com frequência de modulação de 100 kHz e operando a 9,5 GHz (banda X) pela aluna de doutorado Silvana Castaman, através de uma cooperação com o grupo do Prof. Dr. Antônio S. Mangrich (Departamento de Química – UFPR). Amostras sólidas e soluções (acetonitrila) dos complexos de cobre foram acomodadas em tubos de quartzo e os espectros, registrados à temperatura ambiente (298 K) e sob condições de nitrogênio líquido (77 K).

Magnetoquímica

O estudo das propriedades magnéticas dos complexos sintetizados foi realizado pelo Dr. Z. Tomkiewicz (Institute of Physics – Jagiellonian University, Polônia) nas instalações do Institut für Physikalische Chemie – Technische Universität Darmstadt, Alemanha, por meio de uma colaboração com o grupo do Prof. Dr. Wolfgang Haase.

As medidas de susceptibilidade magnética em função da temperatura foram realizadas numa balança de Faraday, que consiste de uma micro-balança eletromagnética CAHN D200 com precisão máxima de 0,1 g. Um controlador de temperatura Leybold LTC 60 foi usado, sendo que as temperaturas baixas foram medidas com uma resistência de carbono vítreo e as temperaturas maiores do que 60 K, com um diodo de silicone. A corrente máxima aplicada de 60 A produz um campo magnético de 1,5 Tesla entre os pólos do magneto. A determinação da susceptibilidade magnética foi então feita através da medida da diferença de massa da amostra sem aplicar campo e com campo magnético aplicado, na faixa de temperatura de 2 a 300 K.

As massas da amostra antes de aplicar o campo magnético (m_1), durante a aplicação do campo magnético (m_2) e após aplicar o campo magnético (m_3) foram anotadas e a diferença de massa $m = m_2 - (m_1 + m_3)/2$, calculada. Para as determinações da susceptibilidade magnética (χ), em emu/mol, e do momento magnético efetivo (μ_{eff}), em μ_B , são usadas as equações abaixo, com o auxílio de um programa em linguagem FORTRAN:

$$\chi = [(m - m_{\text{amostrador}}) \times 981 \times M] / [m_{\text{amostra}} \times (HdH/dz)] \quad \text{dia}$$
$$\mu_{\text{eff}} = (8 \chi T)^{1/2}$$

em que: m = diferença de massa da amostra; $m_{\text{amostrador}}$ = diferença de massa do amostrador vazio; M = massa molecular do composto; m_{amostra} = massa da amostra (normalmente entre 10 e 30 mg de amostra sólida); HdH/dz = produto entre a força do campo e o gradiente do campo aplicado na amostra ($9,5241 \times 10^{-6} \text{ G}^2 \text{ cm}^{-1}$) e χ_{dia} = susceptibilidade diamagnética calculada a partir das constantes de Pascal tabeladas⁽⁹⁴⁾. Desta maneira, foram construídos os gráficos da susceptibilidade magnética e do momento magnético efetivo em função da temperatura. O ajuste dos dados experimentais será tratado brevemente no Capítulo 3 deste trabalho.

Eletroquímica

O comportamento redox dos complexos foi investigado pelas técnicas de voltametria cíclica e de onda quadrada num potenciostato-galvanostato PAR, modelo 273, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia – Departamento de Química – UFSC. Estes experimentos foram feitos em soluções de acetonitrila à temperatura ambiente, sob atmosfera de argônio. Utilizou-se hexafluorofosfato de tetrabutilamônio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrólito suporte e uma célula eletrolítica com três eletrodos, a saber: eletrodo de trabalho – carbono vítreo, contra-eletrodo – fio de platina e eletrodo de referência – Ag/AgCl ($\text{NaCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$). Para a correção do potencial relativo ao eletrodo de referência, usou-se o par redox ferrocínio/ferroceno como padrão interno de calibração.

Condutimetria

As medidas de condutividade molar dos compostos, em solução de acetonitrila (grau HPLC), foram realizadas à temperatura ambiente num condutímetro Digimed, modelo DM 31, equipado com célula condutométrica do mesmo fabricante (constante de célula: $1,18 \text{ cm}^{-1}$) pertencente ao Departamento de Química – UFMG. As soluções utilizadas foram preparadas na concentração de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Titulações potenciométricas

As titulações potenciométricas foram realizadas no titulador automático Titroprocessor Metrohm 670, utilizando-se bureta Metrohm 665 Dosimat, agitador Metrohm 649 e recipiente de titulação Metrohm EA 876-20, no Departamento de Química – UFMG. Para a medição dos potenciais, usou-se um eletrodo indicador de vidro EA 109 e, como referência, um eletrodo de calomelano [Hg/Hg₂Cl_{2(s)}] (NaCl 0,1 mol L⁻¹) Metrohm EA 404. Foi empregado o método de titulação dinâmica, no qual o incremento de volume do titulante é variável.

A calibração do par eletródico foi feita por meio de duas titulações potenciométricas: uma para se obter dados do meio ácido e outra para se obter dados do meio básico. Os dados do meio ácido foram obtidos mediante a titulação de 15,00 mL de solução padronizada de ácido clorídrico com solução, também padronizada, de hidróxido de sódio. O procedimento inverso foi realizado para se levantar dados referentes ao meio básico. No presente trabalho, foi utilizada a metodologia para calibração de um sistema potenciométrico para a medida de concentração hidrogeniônica publicada por Molina *et al.* ⁽⁹⁵⁾, com a inclusão da modificação proposta por Yamaki ⁽⁹⁶⁾.

Todas as titulações foram efetuadas em soluções aquosas, sob atmosfera de nitrogênio purificado e umidificado ⁽⁹⁶⁾. O tratamento do gás N₂ (White Martins Co.) foi realizado pela passagem deste através de frascos contendo Ascarite[®] (A. H. Thomas Co.) e Drierity[®] (W. A. Hammond Drierity Co.) e, em seguida, por dois frascos lavadores de gás: o primeiro contendo solução redutora de cloreto de cromo(II) em contato permanente com Zn amalgamado (garantindo assim a sua constante regeneração) e o segundo, contendo solução 0,10 mol L⁻¹ de perclorato de sódio, para possibilitar a saturação do nitrogênio com vapor d'água. Em cada experimento, a força iônica foi mantida constante em 0,10 mol L⁻¹ pela adição de cloreto de sódio sólido (0,1134 g) e a temperatura do recipiente de titulação, controlada (25,0 ± 0,1 °C) através da circulação de água termostatizada (termostato Masterline, modelo 2095).

Os complexos foram pesados de forma a se trabalhar com uma concentração final, no recipiente de titulação, igual a 10⁻³ mol L⁻¹. Essa massa foi dissolvida em água deionizada e a solução resultante, acidificada pelo acréscimo de ácido clorídrico aquoso 0,10175 mol L⁻¹. O volume inicial das soluções a serem tituladas foi sempre acertado para 20,00 mL pela adição de água deionizada. As soluções assim preparadas foram então tituladas com solução aquosa padronizada de hidróxido de sódio 0,10164 mol L⁻¹. A partir desses dados potenciométricos, calcularam-se as constantes de estabilidade com o auxílio do programa SUPERQUAD ⁽⁹⁷⁾.

Titulações espectrofotométricas

O acompanhamento das mudanças sofridas pelo espectro eletrônico dos complexos na região compreendida entre 300 e 500 nm com o aumento progressivo do pH do meio foi feito num espectrofotômetro HP 8453 (Departamento de Química – UFMG), utilizando-se cubetas de quartzo de caminho óptico 1,0 cm (Thomas Scientific, modelo 8490-D42). A concentração hidrogeniônica foi medida num pHmetro Metrohm, modelo 744, equipado com um eletrodo combinado Metrohm 6.0204.100.

Todas as titulações foram efetuadas em soluções aquosas, sob atmosfera de nitrogênio purificado e umidificado ⁽⁹⁶⁾. Trabalhou-se a uma temperatura constante igual a 25,0 ± 0,1 °C, controlada pela circulação de água termostatizada nos termostatos Masterline 2095 (recipiente de titulação) e PolyScience 1160A (cubeta, através de um suporte específico, da marca HP). Em cada experimento, a força iônica foi mantida constante em 0,10 mol L⁻¹ pela adição de cloreto de sódio sólido (0,1159 g).

Os complexos metálicos foram pesados de modo a se obter uma concentração final, no recipiente de titulação, de 2,5 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. Essa massa foi dissolvida em água deionizada e a solução resultante, acidificada pelo acréscimo de ácido clorídrico aquoso 0,10175 mol L⁻¹. O volume inicial das soluções a serem tituladas foi sempre acertado para 20,00 mL com água deionizada. As soluções assim preparadas foram tituladas com soluções aquosas de hidróxido de sódio ~0,1 e ~0,01 mol L⁻¹. A cada nova adição de base, o pH era medido e uma alíquota da solução era transferida para a cubeta, com o objetivo de se registrar o espectro eletrônico da mesma. Após leitura no espectrofotômetro, a alíquota retirada era devolvida ao recipiente de titulação. As constantes de estabilidade foram calculadas a partir dos dados titulométricos através do programa computacional SQUAD ⁽⁹⁸⁾.

Reatividade química

As atividades catalíticas dos complexos foram avaliadas através da reação de oxidação do substrato 3,5-di-*terc*-butilcatecol (3,5-dtbc), assim como através da reação de hidrólise do substrato bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (BDNPP). Todos os experimentos cinéticos foram feitos em duplicata e sob condições de excesso de substrato, num espectrofotômetro Varian Cary 50 BIO (Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia – Departamento de Química – UFSC) acoplado a um banho termostatizado. O monitoramento espectrofotométrico das variações de absorvância ocorridas a 400 nm, devido à formação do produto 3,5-di-*terc*-butilquinona ^(76,79)

($\epsilon = 1900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) na reação oxidativa ou à liberação do ânion 2,4-dinitrofenolato ⁽⁹⁹⁾ ($\epsilon = 12100 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) na hidrólise do diéster BDNPP, foi efetuado até 5% de conversão do substrato. Esses dados cinéticos foram tratados pelo método das velocidades iniciais, as quais foram obtidas diretamente do gráfico de absorvância do sistema versus tempo de reação.

Atividade de Catecolase

Os estudos em função do pH para a atividade como catecolase foram realizados numa faixa de pH entre 6,5 e 9,5 à temperatura de $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Utilizaram-se cubetas de quartzo de caminho óptico 1,0 cm seladas com tampa de teflon, nas quais foram adicionados 100 mL de solução aquosa ($[\text{tampão}]_{\text{final}} = 3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) dos tampões MES (pH 6,5), TRIS (pH 7,0 a 9,0) e CHES ou CAPS (pH 9,5); 100 mL de uma solução metanólica do complexo em estudo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e 3000 mL de metanol saturado com oxigênio. A reação foi então iniciada pela adição de 100 mL de uma solução metanólica do substrato 3,5-di-*tert*-butilcatecol ($[\text{S}]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e monitorada durante os primeiros 15 (pH 6,5 a 7,5), 10 (pH 8,0) ou 5 minutos (pH 8,5 a 9,5).

Experimentos cinéticos para se avaliar a dependência das velocidades de reação com a concentração de substrato foram realizados como descrito a seguir: 100 mL de solução aquosa de tampão TRIS, pH 9,0 ($[\text{tampão}]_{\text{final}} = 3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$); 100 mL de solução metanólica de complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e quantidades variáveis (de forma a se trabalhar com um volume final de 3300 mL) de metanol saturado com gás oxigênio foram transferidos para cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico seladas com tampa de teflon, sob condições de temperatura controlada ($25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$). A reação foi então iniciada pela adição de volumes variáveis (25 a 240 mL) de uma solução metanólica do substrato 3,5-dtbc ($[\text{S}]_{\text{final}} = 1,2 \times 10^{-3}$ a $1,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). As velocidades iniciais foram calculadas a partir da inclinação da curva “absorvância versus tempo” nos primeiros 5 minutos de reação. OBSERVAÇÃO: por causa de problemas de solubilidade apresentados pelo composto $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{L}_2)(\text{ClO}_4)]\text{ClO}_4$, uma solução diluída do mesmo teve que ser preparada. Por esse motivo, durante a realização dos experimentos cinéticos, pipetou-se um volume de 250 mL do composto, ao invés dos 100 mL relatados. Deve-se levar em consideração que esta modificação altera também os volumes de solvente a serem adicionados.

O teste para a detecção de peróxido de hidrogênio no meio reacional foi efetuado de acordo com a literatura, por modificação do método iodométrico ⁽⁷⁵⁾. Uma mistura ‘modelo’

foi preparada como descrito para os experimentos cinéticos, isto é: concentração de complexo $[C]_{\text{final}} = 2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; concentração de tampão $[\text{tampão}]_{\text{final}} = 3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH 9,0 e concentração de substrato $[S]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Após 1 hora de reação, igual volume de ácido sulfúrico $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionado com o objetivo de provocar a interrupção do processo reacional. A seguir, o sistema foi transferido para um funil de separação pequeno e lavado com diclorometano ($2 \times 5,0 \text{ mL}$) para a retirada da *o*-quinona. Tomou-se então uma alíquota de 2,0 mL da fase aquosa, à qual acrescentou-se 1,0 mL de solução de KI em água ($[\text{iodeto}] = 0,3 \text{ mol L}^{-1}$) e 3 gotas de uma solução de molibdato de amônio ($[\text{molibdato}]$ igual a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). A reação: $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{I}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{I}_2$, na presença de excesso de iodeto, leva à formação da espécie tri-iodeto, $\text{I}_{2(\text{aq})} + \text{I}^- \rightarrow \text{I}_3^-$. Esta reação é geralmente lenta mas, em meio ácido e com a adição do sal molibdato de amônio, torna-se praticamente instantânea. A formação do tri-iodeto pode ser acompanhada espectrofotometricamente, pelo surgimento de uma banda característica com centro em 353 nm ($\epsilon = 26000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁽⁷⁵⁾. Para todos os experimentos, correções em relação à oxidação espontânea do substrato foram realizadas sob condições experimentais idênticas às descritas, porém sem a adição do catalisador.

Atividade de Fosfatase

Estudos em função do pH para a atividade hidrolítica dos complexos obtidos frente ao substrato bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (BDNPP) foram realizados numa faixa de pH entre 3,5 e 10,0 à temperatura de $50,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Usaram-se cubetas de quartzo de caminho óptico igual a 1,0 cm seladas com tampa de teflon, nas quais foram adicionados 1500 μL de solução aquosa $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ dos tampões MES (pH 3,5 a 6,5), HEPES (pH 7,0 a 8,5) e CHES (pH 9,0 a 10,0) com força iônica constante ($I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, LiClO_4); 200 μL de uma solução em acetonitrila do complexo ($[C]_{\text{final}} = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e 500 μL de acetonitrila pura. Após 10 minutos de pré-estabilização da temperatura, a reação foi iniciada pela adição de 800 μL de uma solução do substrato em acetonitrila ($[S]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e acompanhada durante os primeiros 40 minutos.

Experimentos cinéticos para se avaliar a dependência das velocidades de reação com a concentração de substrato foram realizados da seguinte maneira: 1500 μL de solução aquosa de tampão HEPES (pH 8,0) ou CHES (pH 9,6) ($[\text{tampão}]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$); 200 μL de uma solução do complexo em acetonitrila ($[C]_{\text{final}} = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e alíquotas variáveis (de forma a se trabalhar com um volume final de 3000 μL) de acetonitrila foram transferidos

para cubetas de quartzo com caminho óptico igual a 1,0 cm seladas com tampa de teflon, sob condições de temperatura controlada (50,0 ± 0,1 °C). Após 10 minutos de pré-estabilização da temperatura, a reação foi iniciada pela adição de volumes variáveis (80 a 1280 L) de solução do substrato BDNPP em acetonitrila ($[S]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-4}$ a $8,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹). As velocidades iniciais foram obtidas da inclinação da curva “absorvância versus tempo”, considerando-se apenas os primeiros 40 minutos de reação. OBSERVAÇÃO: No caso específico do complexo $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{L1})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, inconvenientes de ordem experimental obrigaram a optar pelo estudo em função da concentração de catalisador, ao invés da concentração de BDNPP. Para isto, 1500 L de solução aquosa de tampão MES (pH 6,0) ($[\text{tampão}]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹); 200 L de uma solução do substrato em acetonitrila ($[S]_{\text{final}} = 4,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) e alíquotas variáveis (para se atingir um volume final de 3000 L) de acetonitrila foram adicionados em cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico seladas com tampa de teflon, sob condições de temperatura controlada (50,0 ± 0,1 °C). Após 10 minutos de pré-estabilização, a reação foi iniciada pela adição de volumes variáveis (160 a 960 L) de solução de $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{L1})]^{2+}$ em acetonitrila ($[C]_{\text{final}} = 1,3 \times 10^{-4}$ a $7,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). As velocidades iniciais foram obtidas da inclinação da curva “absorvância versus tempo” nos primeiros 60 minutos de reação. Estes valores foram então divididos por $[S]_{\text{final}}$ para se determinar os diferentes k_{obs} . A constante de velocidade de segunda ordem foi assim extraída de um gráfico de k_{obs} em função de $[C]_{\text{final}}$.

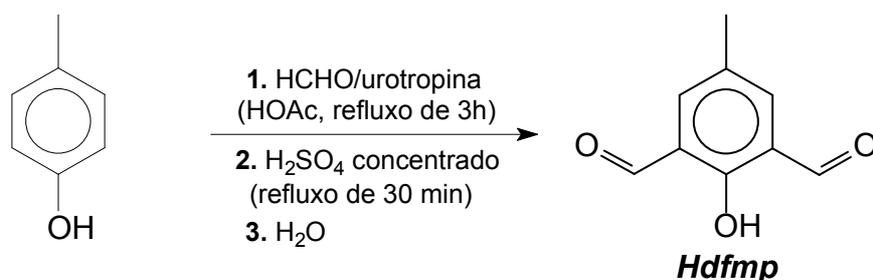
Para todos os experimentos, correções em relação à hidrólise espontânea do substrato foram realizadas sob condições experimentais idênticas às descritas nesta seção, porém sem a adição do catalisador.

SÍNTESE DOS LIGANTES BINUCLEANTES E SEUS PRECURSORES

Nos processos de obtenção dos ligantes binucleantes hexa- e heptadentados, foram utilizados dois centros precursores obtidos a partir do *para*-cresol: o composto 2-hidroxi-5-metilsoftaldeído (Hdfmp) para o ligante simétrico HL1 e o 3-clorometil-5-metilsalicilaldeído (cmff), para os não-simétricos HL2, H₂L3 e H₂L4.

a) Preparação dos centros precursores

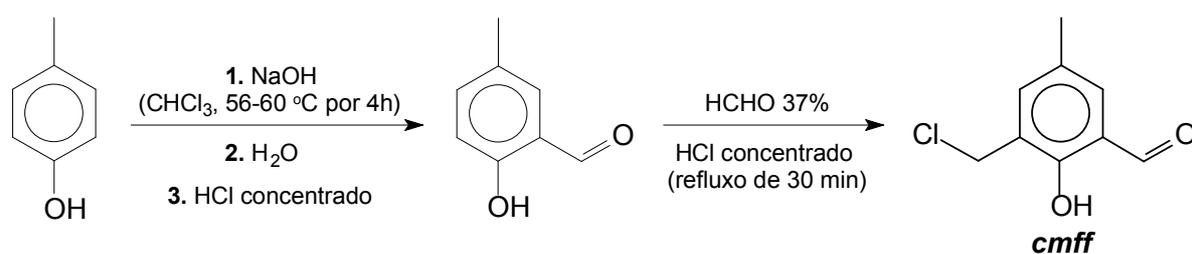
Síntese do 2-hidroxi-5-metilsoftaldeído (Hdfmp)



O centro precursor Hdfmp foi preparado de acordo com o protocolo descrito na Tese de Doutorado de C. N. Verani ⁽¹⁰⁰⁾. Num balão de reação de 250 mL, foram dissolvidos 10,8 g (0,1 mol) de *para*-cresol e 28,2 g (0,2 mol) de urotropina em 50 mL de ácido acético glacial. Adicionou-se então paraformaldeído (30,0 g; 1,0 mol; excesso de 500%) lentamente, sob agitação constante, e a suspensão resultante foi aquecida até o refluxo, o qual foi mantido por 3 horas. Após deixar a mistura esfriar, gotejaram-se 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e a solução foi refluxada por mais 30 minutos. O conteúdo do balão foi então transferido para um béquer de 1,0 L e o produto, precipitado pelo gotejamento de 400 mL de água deionizada. O sólido obtido foi filtrado, lavado com metanol gelado, recristalizado em tolueno a quente e deixado em repouso no freezer por 24 horas. O Hdfmp puro foi filtrado em funil de Büchner, lavado com tolueno e seco sob vácuo. Foram isolados 1,21 g (~7,4 mmol; 164,16 g mol⁻¹; rendimento: 8%) de 2-hidroxi-5-metilsoftaldeído (C₉H₈O₃), como um sólido amarelo-pálido. p.f.: 127-128 °C (Catálogo Aldrich: 128-130 °C).

IV (KBr): 3024-2871, 1682, 1603-1459, 1303, 1216, 962 e 626 cm⁻¹.

Síntese do 3-clorometil-5-metilsalicilaldeído (cmff)



O centro precursor cmff foi preparado em duas etapas de síntese. Na primeira delas, obteve-se o intermediário 5-metilsalicilaldeído (Hmb) através da formilação do *para*-cresol, baseada no procedimento descrito para a reação de Reimer-Tiemann ⁽¹⁰¹⁾. Após essa etapa inicial, a realização de uma clorometilação com formaldeído e ácido clorídrico concentrado transforma finalmente o Hmb no 3-clorometil-5-metilsalicilaldeído.

Num balão de reação de 5,0 L equipado com condensador e agitador mecânico, foram adicionados 3,0 L de clorofórmio e 173,7 g de *para*-cresol (1,6 mol). O balão de três bocas foi

colocado num banho com temperatura controlada (56-60 °C) e, sob agitação constante, adicionou-se, em pequenas porções, 480,0 g (12 mol) de hidróxido de sódio previamente dissolvido em 300 mL de água destilada. *(A adição de NaOH deve ser feita de forma lenta e cuidadosa ao longo de 3 horas, pois a reação é muito exotérmica)*. A mistura reacional foi mantida sob agitação e refluxo por mais 1 hora e, então, desligou-se o aquecimento e deixou-se o sistema atingir a temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados cerca de 1,5 L de água destilada e, ainda sob agitação, iniciou-se a acidificação com HCl concentrado até pH 2. A fase orgânica foi separada, lavada com água destilada, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente, evaporado no rotaevaporador. Destilou-se o material restante (óleo escuro viscoso) sob pressão reduzida com auxílio de uma coluna Vigreux de 40 cm (55-65 °C a 0,1 mmHg). Foram obtidos 100,0 g (0,73 mol; 136,15 g mol⁻¹; rendimento: 46%) de 5-metilsalicilaldeído (C₈H₈O₂), na forma de um sólido branco cristalino. p.f.: 56 °C (Catálogo Aldrich: 54-57 °C). OBSERVAÇÃO: Caso seja necessário purificar o Hmb antes de seu uso na próxima etapa da síntese, a purificação pode ser realizada por cromatografia em coluna de sílica, utilizando-se diclorometano como eluente.

IV (KBr): 3024-2864, 2738, 1658, 1590-1484, 1372, 1282 e 742 cm⁻¹.

RMN de ¹H - (CDCl₃, 200 MHz): 10,84 (s, 1H); 9,85 (s, 1H); 7,34 (m, 2H); 6,90 (m, 1H) e 2,34 (s, 3H).

Na última parte do processo sintético, o cmff foi preparado pela clorometilação do Hmb: num balão de reação de 500 mL, adicionaram-se 25,6 g de 5-metilsalicilaldeído, Hmb (0,188 mol), 30 mL de formaldeído 37% (0,384 mol) e 100 mL de HCl concentrado. Essa mistura reacional permaneceu sob agitação e refluxo durante 30 minutos e, em seguida, foi resfriada em banho de gelo, formando uma massa avermelhada compacta no fundo do balão; massa esta que foi triturada com o auxílio de um bastão de vidro, filtrada sob vácuo e lavada com HCl concentrado. No processo, um óleo avermelhado (impureza) é separado do sólido pela compactação do produto no funil. O sólido branco resultante foi então solubilizado numa quantidade mínima de diclorometano a quente e deixado em banho de gelo para cristalizar. O produto assim obtido foi filtrado, lavado uma única vez com etanol gelado, seco sob vácuo por 12 horas em dessecador contendo sílica e estocado sob atmosfera inerte de argônio numa temperatura inferior a 10 °C. Obtiveram-se 20,5 g (0,111 mol; 184,62 g mol⁻¹; rendimento de 59% em relação ao Hmb) de sólido branco, 3-clorometil-5-metilsalicilaldeído (C₉H₉O₂Cl). p.f.: 95-96 °C, em concordância com o valor previamente determinado⁽¹⁰²⁾.

IV (KBr): 3048-2852, 2749, 1664, 1600-1470, 1378, 1257, 703 e 613 cm⁻¹.

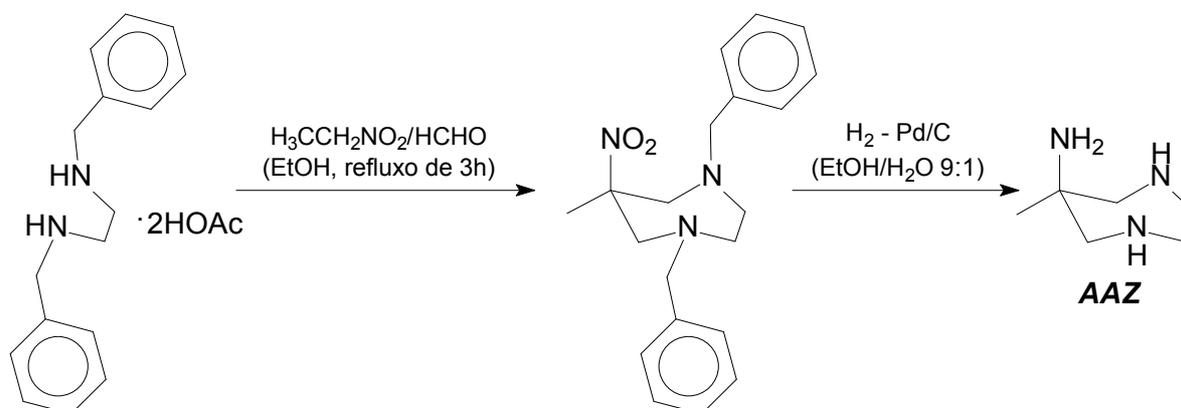
RMN de ^1H - (CDCl_3 , 200 MHz): 11,25 (s, 1H); 9,86 (s, 1H); 7,46 (“s”, 1H); 7,35 (“s”, 1H); 4,67 (s, 2H) e 2,35 (s, 3H).

ATENÇÃO: Durante esta última etapa sintética, pode ser produzido bis(clorometil)éter, $\text{ClCH}_2\text{OCH}_2\text{Cl}$, altamente tóxico e, comprovadamente, um potente agente carcinogênico. Portanto, essa reação deve ser integralmente realizada em capela de exaustão, utilizando-se máscara e luvas. Além disso, todo o material utilizado deve ser lavado com solução alcalina na própria capela (por exemplo, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} / \text{H}_2\text{O} / \text{KOH}$: 60 mL / 40 mL / 5,0 g), já que o bis(clorometil)éter é rapidamente hidrolisado a formaldeído na presença de base. A solução reacional e todos os resíduos devem ser descartados somente após correção do pH ($\text{pH} > 9,0$) por adição de hidróxido de sódio ou potássio.

b) Braços pendentes primários e secundários e a sua obtenção

Braços pendentes são aqueles que, uma vez acoplados aos anteriormente descritos centros precursores, fornecem átomos doadores exclusivos para cada um dos metais, isto é, que não atuam como ponte entre os mesmos. Classificamos os braços pendentes em duas categorias diferentes, de acordo com o tipo de amina (primária ou secundária) utilizada no processo de incorporação destes aos respectivos centros precursores. Os braços denominados primários foram anexados pela reação de formação da base de Schiff correspondente, seguida ou não de redução com boridreto de sódio. Já o braço secundário bpma foi acoplado através da reação de substituição nucleofílica do cloro, no precursor cmff, pelo grupo amina.

Síntese da 6-amino-6-metilperidro-1,4-diazepina (AAZ)



Este braço primário N_3 -doador foi sintetizado em duas etapas, conforme descrito na literatura ⁽⁸⁶⁾. A primeira delas constitui a etapa-chave e envolve a formação do anel de sete

membros através de um protocolo do tipo nitro-Mannich. Numa segunda instância, foi feita a hidrogenação catalítica para se chegar ao composto desejado.

Ao fim da primeira etapa, é obtido o intermediário 1,4-dibenzil-6-metil-6-nitroperidro-1,4-diazepina. Num balão de reação de 250 mL, foram dissolvidos em 50 mL de etanol 5,41 g (15 mmol) de diacetato de *N,N'*-di(benzil)etilenodiamina e 1,08 mL (15 mmol) de nitroetano. Então, paraformaldeído (1,47 g; 49 mmol; excesso de ~63%) foi adicionado, aos poucos, sob agitação constante e a suspensão resultante foi aquecida até o refluxo. Após alguns minutos de refluxo, o qual foi mantido por 3 horas, o paraformaldeído dissolveu-se completamente no etanol. Ao término deste período, o solvente da mistura reacional foi totalmente evaporado e o resíduo resultante foi então dissolvido em ~75 mL de diclorometano, transferido para um funil de separação e lavado exaustivamente (8 x 20 mL) com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio. A fase aquosa foi lavada com diclorometano para se obter uma maior quantidade do produto. As frações orgânicas foram então misturadas, lavadas uma vez com água deionizada, secas com sulfato de sódio anidro e filtradas em algodão. O diclorometano foi evaporado no rotaevaporador, a 40 °C. O óleo viscoso de coloração âmbar resultante foi purificado em coluna cromatográfica empacotada com sílica-gel (70-230 mesh, 60 Å), usando-se diclorometano como eluente. Ao final do processo, foram obtidos 4,79 g (14,1 mmol; 339,48 g mol⁻¹; rendimento de 94%) de óleo amarelo-pálido, identificado como 1,4-dibenzil-6-metil-6-nitroperidro-1,4-diazepina (C₂₀H₂₅O₂N₃) por RMN de ¹H.

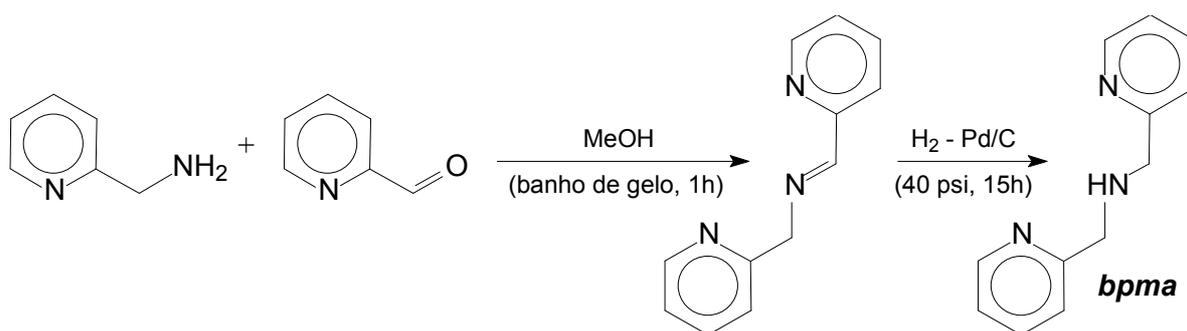
RMN de ¹H - (CDCl₃, 200 MHz): 7,32 (m, 10H); 3,78 (d, 2H, *J* = 13,2 Hz); 3,65 (d, 2H, 13,2 Hz); 3,60 (d, 2H, 14,1 Hz); 2,96 (d, 2H, 14,1 Hz); 2,60 (m, 4H) e 1,35 (s, 3H).

Na segunda etapa da reação, toda a massa de 1,4-dibenzil-6-metil-6-nitroperidro-1,4-diazepina obtida foi dissolvida, com o auxílio de leve aquecimento, numa mistura de etanol (135 mL) / água (15 mL) dentro de um recipiente de hidrogenação. Então, 1,0 g de catalisador de paládio (10%) suportado em carbono foi adicionado em pequenas porções. A mistura foi carregada numa bomba do tipo Parr e hidrogenada a 28 psi, à temperatura ambiente, durante 12 horas. A solução contendo o AAZ foi separada do catalisador por filtração em Celite[®] 545 e o solvente, evaporado no rotaevaporador, a 70-80 °C, no período de 2 horas. Obtiveram-se 1,46 g (11,3 mmol; 129,24 g mol⁻¹; com rendimento igual a 80% em relação à 1,4-dibenzil-6-metil-6-nitroperidro-1,4-diazepina) de 6-amino-6-metilperidro-1,4-diazepina (C₆H₁₅N₃) pura, como um óleo cuja tonalidade pode variar de incolor a amarelo-pálido.

RMN de ¹H - (CDCl₃, 200 MHz): 2,82 (m, 4H); 2,63 (d, 2H, *J* = 13,6 Hz); 2,57 (d, 2H, 13,6 Hz); 1,86 (s largo, 4H) e 0,96 (s, 3H).

ATENÇÃO: O manuseio do catalisador Pd/C deve ser cauteloso devido à possibilidade de combustão espontânea e explosão.

Síntese da bis(2-piridilmetil)amina (bpma)



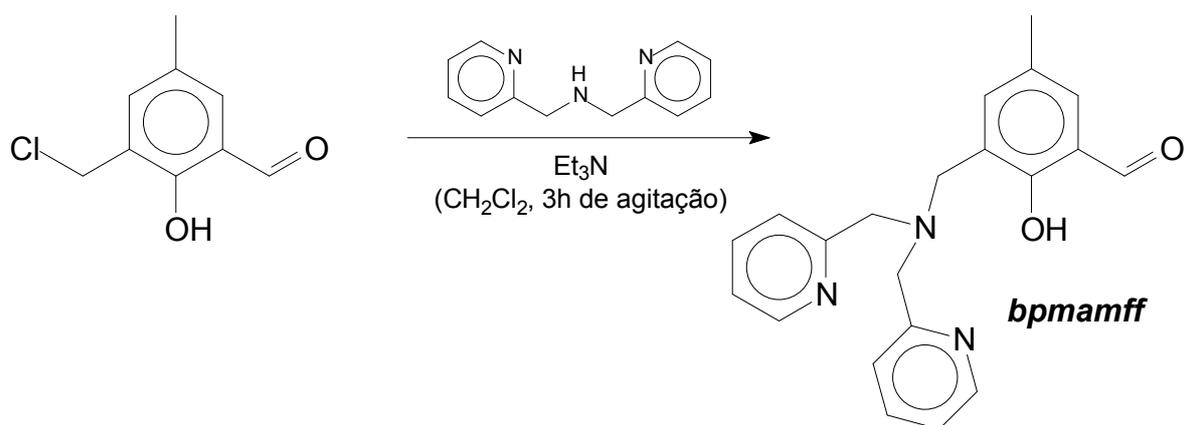
O braço secundário N₃-doador bpma foi obtido através de uma reação de aminação redutiva entre a 2-(aminometil)piridina e o 2-piridinacetaldeído, seguindo-se, com pequenas modificações, o procedimento descrito na literatura⁽⁸⁴⁾.

Solubilizaram-se 10,8 g (100 mmol) de 2-(aminometil)piridina em 50 mL de metanol, e a solução resultante foi mantida em banho de gelo. Adicionaram-se então, lentamente e sob agitação constante, 10,7 g (100 mmol) de 2-piridinacetaldeído. Após a adição, retirou-se o banho de gelo e a reação permaneceu sob agitação por mais 1 hora. Em seguida, a solução foi transferida para um recipiente de hidrogenação, ao qual foi acrescentado, aos poucos, 1,0 g de catalisador de paládio (5%) suportado em carbono. O sistema foi submetido a hidrogenação no aparelho Parr a 40 psi (temperatura ambiente) ao longo de 15 horas. A solução foi então separada do catalisador por filtração e o solvente, evaporado em rotaevaporador. Para a eliminação completa do metanol, deixou-se o balão sob vácuo (0,1 mmHg) durante 12 horas, aquecido a 40 °C. Foram obtidos 19,7 g (99 mmol; 199,26 g mol⁻¹; rendimento de 99%) de bis(2-piridilmetil)amina (C₁₂H₁₃N), na forma de um óleo amarelo.

IV (filme): 3300, 3062-2828, 1592-1434, 1148 e 758 cm⁻¹.

RMN de ¹H - (CDCl₃, 200 MHz): 8,56 (d, 2H, 4,0 Hz); 7,63 (t, 2H, 8,0 Hz); 7,35 (d, 2H, 8,0 Hz); 7,15 (dd, 2H, 8,0 e 4,0 Hz); 3,99 (s, 4H) e 2,90 (s largo, 1H).

Preparação do intermediário sintético 3-[*N,N*-bis(2-piridilmetil)aminometil]-5-metilsalicilaldeído (bpmamff)



O intermediário 3-[*N,N*-bis(2-piridilmetil)aminometil]-5-metilsalicilaldeído, bpmamff, foi sintetizado através de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular de acordo com uma rota modificada, desenvolvida a partir do protocolo experimental publicado ^(103,104).

Colocaram-se, num balão de reação de 250 mL, 5,54 g de cmff (30 mmol) dissolvidos em 80 mL de diclorometano. A esta solução, resfriada a 0 °C em banho de gelo, adicionou-se, vagorosamente (com o auxílio de um funil de adição) e sob agitação constante, outra solução contendo bpma (5,98 g; 30 mmol) e trietilamina (3,04 g; 30 mmol) dissolvidos em 80 mL de diclorometano. Terminada a adição, retirou-se o banho de gelo e deixou-se a mistura reacional sob agitação por mais 3 horas à temperatura ambiente. A solução resultante foi transferida para um funil de separação e lavada exaustivamente (8 x 50 mL) com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente, evaporado no rotaevaporador, a 40 °C. Obteve-se um óleo amarelo, que foi dissolvido em 40 mL de isopropanol a quente, transferido para um béquer de 100 mL e levado ao freezer para favorecer a precipitação. Após algumas horas, o produto, um sólido cristalino de coloração amarela, foi filtrado em funil de Büchner, lavado com isopropanol gelado e guardado sob vácuo em dessecador contendo sílica. Isolaram-se 8,00 g (23,0 mmol;

347,42 g mol⁻¹) de 3-[*N,N*-bis(2-piridilmetil)aminometil]-5-metilsalicilaldeído (C₂₁H₂₁O₂N₃), com rendimento igual a 77%. p.f.: 127-130 °C / literatura: 135 °C ⁽¹⁰³⁾.

IV (KBr): 3038-2849, 1680, 1591-1437, 1378, 1276, 1114 e 773 cm⁻¹.

RMN de ¹H - (CDCl₃, 200 MHz): 10,43 (s, 1H); 8,58 (m, 2H); 7,65 (m, 2H); 7,44 (m, 3H); 7,21 (m, 3H); 3,89 (s, 4H); 3,80 (s, 2H) e 2,27 (s, 3H). OBS.: o sinal referente ao hidrogênio fenólico não foi observado no espectro.

c) Preparação dos ligantes binucleantes

Síntese do 4-metil-2,6-bis[(6-metil-1,4-diazepan-6-il)iminometil]fenol (HL1)

Este ligante binucleante simétrico heptadentado diazepínico foi preparado e utilizado no processo de complexação sem prévio isolamento. Por esse motivo, sua síntese será tratada junto com a de seu complexo metálico [Cu₂(-OH)(L1)](ClO₄)₂·H₂O.

Síntese do 2-[*N,N*-bis(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[(6-metil-1,4-diazepan-6-il)iminometil]fenol (HL2)

O ligante binucleante não-simétrico heptadentado diazepínico HL2 também foi gerado e utilizado na complexação sem isolamento prévio. Por isso, a exemplo do que foi feito para HL1, discutir-se-á sua obtenção na próxima seção deste trabalho, juntamente com aquela de seu complexo metálico [Cu₂(-OH)(L2)(ClO₄)]ClO₄.

Síntese do 2-[*N,N*-bis(2-piridilmetil)aminometil]-6-[(2-hidroxifenil)iminometil]-4-metilfenol (H₂L3)

Este ligante binucleante não-simétrico hexadentado foi preparado a partir do precursor 3-[*N,N*-bis(2-piridilmetil)aminometil]-5-metilsalicilaldeído. Uma solução metanólica (10 mL) de 2-aminofenol (0,32 g; 2,9 mmol) foi gotejada, sob agitação constante, numa outra solução de bpmamff (1,0 g; 2,9 mmol) em metanol / tetraidrofurano (10 mL / 10 mL), previamente preparada num balão de reação de 50 mL. A mistura foi deixada reagir por 30 minutos. Nesse período, a solução foi adquirindo progressivamente uma forte coloração alaranjada devido à formação da base de Schiff. Ao término da reação, transferiu-se o conteúdo do balão para um béquer de 100 mL e deixou-se o mesmo em repouso para que, com a evaporação gradual do solvente, o produto pudesse precipitar. Dessa maneira, foi isolada uma grande quantidade de cristais, porém de reduzido tamanho e muito geminados, os quais foram recristalizados em acetonitrila a quente. Este novo material foi filtrado em papel e lavado com acetonitrila e éter

etílico gelados. Obtiveram-se então 0,68 g (~1,6 mmol; 438,52 g mol⁻¹; rendimento: 54%) do pró-ligante 2-[*N,N*-bis(2-piridilmetil)aminometil]-6-[(2-hidroxifenil)iminometil]-4-metilfenol (C₂₇H₂₆O₂N₄), na forma de pequenos monocristais de cor laranja adequados ao processo de determinação estrutural. p.f.: 154 °C. Análise elementar Porcentagens encontradas: C 73,41; H 5,76; N 12,62. Porcentagens calculadas com base na fórmula C₂₇H₂₆O₂N₄: C 73,95; H 5,98; N 12,78. OBSERVAÇÃO: Os espectros de IV e RMN de ¹H deste ligante serão apresentados e discutidos em detalhe no Capítulo 4 do presente trabalho.

Síntese do 2-[*N,N*-bis(2-piridilmetil)aminometil]-6-[(2-hidroxifenil)aminometil]-4-metilfenol (H₂L4)

A versão reduzida de H₂L3 também foi sintetizada a partir do composto intermediário bpmamff. De início, o protocolo experimental seguido foi idêntico ao acima descrito para o ligante imina. Entretanto, após deixar o 2-aminofenol reagir com o bpmamff pelo período de 30 minutos, a mistura reacional foi resfriada a 0 °C num banho de gelo e a redução da imina, realizada pela adição, aos poucos e sob agitação, de boridreto de sódio (0,11 g; 2,9 mmol). Uma vez terminada a etapa de redução, o pH do meio reacional era de aproximadamente 10. Esse valor foi então cuidadosamente ajustado para 6,0-7,0 com HCl 4 mol L⁻¹ e o solvente, evaporado até metade do seu volume inicial no rotaevaporador. Filtrou-se a solução resultante em papel com o intuito de se eliminar qualquer tipo de impureza sólida indesejável. Depois de algumas horas, monocristais de H₂L4 de qualidade para a determinação estrutural pela técnica de difração de raios-X foram separados por filtração, lavados com pequenas quantidades de metanol e éteretílico gelados e secos ao ar. Obtiveram-se 0,56 g (~1,3 mmol; 440,53 g mol⁻¹; rendimento de 44%) de 2-[*N,N*-bis(2-piridilmetil)aminometil]-6-[(2-hidroxifenil)aminometil]-4-metilfenol (C₂₇H₂₈O₂N₄), como placas cristalinas superpostas de coloração amarelo-pálida. p.f.: 142-143 °C. Análise elementar Porcentagens encontradas: C 73,56; H 6,33; N 12,55. Calculadas com base na fórmula C₂₇H₂₈O₂N₄: C 73,61; H 6,41; N 12,72. OBSERVAÇÃO: Os espectros de IV e RMN de ¹H deste ligante serão apresentados e discutidos em detalhe no Capítulo 4 do presente trabalho.

SÍNTESE DOS COMPLEXOS METÁLICOS

Síntese do perclorato de -hidroxo-{4-metil-2,6-bis[(6-metil-1,4-diazepan-6-il)iminometil]fenoxo}bis[cobre(II)] monoidratado – [Cu₂(-OH)(L1)](ClO₄)₂·H₂O

Num balão de reação de 50 mL, foram dissolvidos 0,17 g (1,0 mmol) de 2-hidroxi-5-metilisofaldeído em 20 mL de álcool metílico. A essa solução, adicionou-se, gota a gota e sob agitação constante, uma outra solução metanólica (10 mL) de AAZ (0,26 g; 2,0 mmol). A mistura foi então refluxada durante 2 horas e, ao término desse período, o aquecimento foi interrompido, mantendo-se apenas a agitação. Foram adicionados então 0,74 g (2,0 mmol) de perclorato de cobre(II) hexaidratado e, 20 minutos depois, 2,0 mL (2,0 mmol) de uma solução aquosa 1 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio (gotejamento lento). Uns 10 minutos após a adição da base, a agitação foi desligada e o balão, deixado à temperatura ambiente durante 15 minutos antes de se filtrar em papel a solução de tom verde-escuro nele contida. A finalidade desta última etapa foi a de se eliminar eventuais impurezas sólidas presentes no meio. Algumas horas depois, verificou-se a precipitação de um material cristalino, o qual foi filtrado em funil de Büchner, lavado com pequenas alíquotas de metanol e éter etílico gelados e seco no vácuo. Foram isolados 0,33 g (0,44 mmol; 746,54 g mol⁻¹; rendimento: 44%) de monocristais verdes, correspondentes ao composto perclorato de -hidroxo-{4-metil-2,6-bis[(6-metil-1,4-diazepan-6-il)iminometil]fenoxo}bis[cobre(II)] monoidratado (C₂₁H₃₆O₁₁N₆Cl₂Cu₂). Análise elementar

Porcentagens encontradas: C 33,37; H 4,73; N 10,94. Porcentagens calculadas com base na fórmula C₂₁H₃₆O₁₁N₆Cl₂Cu₂: C 33,79; H 4,86; N 11,26. OBSERVAÇÃO: O espectro de IV deste complexo será apresentado e discutido em detalhe no Capítulo 3 do trabalho.

ATENÇÃO: Apesar de não ter sido enfrentado nenhum problema maior no processo de síntese dos compostos de coordenação aqui descritos, caberia lembrar que percloratos de complexos metálicos contendo ligantes de natureza orgânica são potencialmente explosivos e devem ser manuseados em pequenas quantidades e tomando-se as devidas precauções.

Síntese do perclorato de -hidroxo-{2-[N,N-bis(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[(6-metil-1,4-diazepan-6-il)iminometil]fenoxo}(perclorato)bis[cobre(II)] – [Cu₂(-OH)(L₂)(ClO₄)]ClO₄

Para a obtenção deste complexo, foi adotado um procedimento muito similar àquele descrito acima para a preparação de [Cu₂(-OH)(L₁)](ClO₄)₂·H₂O. Num balão de reação de 50 mL, dissolveram-se 0,35 g (1,0 mmol) de bpmamff numa mistura metanol / tetraidrofurano (10 mL / 10 mL). A essa solução, adicionou-se, gota a gota e sob agitação constante, uma outra solução metanólica (10 mL) de AAZ (0,13 g; 1,0 mmol). A mistura foi então refluxada durante 2 horas e, ao término desse período, o aquecimento foi interrompido, mantendo-se a agitação. Adicionaram-se 0,74 g (2,0 mmol) de perclorato de cobre(II) hexaidratado e, 20

minutos depois, 2,0 mL (2,0 mmol) de uma solução aquosa 1 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio (gotejamento lento). Uns 10 minutos após a adição da base, a agitação foi desligada e o balão, deixado à temperatura ambiente durante 15 minutos antes de se filtrar em papel a solução nele contida. Algumas horas depois, verificou-se a precipitação de um material microcristalino, o qual foi filtrado em funil de Büchner, lavado com pequenas alíquotas de metanol e éter etílico gelados e seco no vácuo. Este sólido verde, sendo formado em sua maior parte por pequenos cristais extremamente geminados, foi re-cristalizado em acetonitrila a quente para fornecer monocristais de coloração verde-escura adequados à determinação estrutural por difração de raios-X. Isolaram-se 0,22 g (~0,28 mmol; 800,58 g mol⁻¹; rendimento: 28%) do sal perclorato de -hidroxo-{2-[N,N-bis(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[(6-metil-1,4-diazepan-6-il)iminometil]fenoxo}(perclorato)bis[cobre(II)] (C₂₇H₃₄O₁₀N₆Cl₂Cu₂) puro. Análise elementar Porcentagens encontradas: C 40,59; H 4,08; N 10,50. Porcentagens calculadas com base na fórmula C₂₇H₃₄O₁₀N₆Cl₂Cu₂: C 40,51; H 4,28; N 10,50. OBSERVAÇÃO: O espectro de IV deste complexo será apresentado e discutido em detalhe no Capítulo 3 do trabalho.

Síntese do perclorato de -hidroxo-{2-[N,N-bis(2-piridilmetil)aminometil]-6-[(2-oxofenil)iminometil]-4-metilfenoxo}bis[cobre(II)] – [Cu₂(-OH)(L3)]ClO₄

Num balão de reação de 50 mL, foram dissolvidos 0,22 g (0,5 mmol) de 2-[N,N-bis(2-piridilmetil)aminometil]-6-[(2-hidroxifenil)iminometil]-4-metilfenol (H₂L3) em aproximados 20 mL de metanol. A essa solução, adicionou-se 0,37 g (1,0 mmol) de perclorato de cobre(II) hexaidratado e, 20 minutos depois, foram lentamente gotejados 1,5 mL (1,5 mmol) de NaOH aquoso de concentração igual a 1 mol L⁻¹. Após 10 minutos, o sistema reacional apresentava coloração marrom-esverdeada com um fino sólido em suspensão, o qual foi eliminado através de filtração em papel. 5 dias depois, foram isolados da solução resultante grande quantidade de pequenos cristais, os quais mostraram-se extremamente intercrescidos. Este material foi recristalizado em acetonitrila a quente e os novos monocristais assim formados, filtrados em funil de Büchner, lavados com pequenas quantidades de acetonitrila e éter etílico gelados e secos sob vácuo. Foram obtidos 0,12 g (0,18 mmol; 680,04 g mol⁻¹; rendimento de 36%) de perclorato de -hidroxo-{2-[N,N-bis(2-piridilmetil)aminometil]-6-[(2-oxofenil)iminometil]-4-metilfenoxo}bis[cobre(II)] (C₂₇H₂₅O₇N₄ClCu₂) puro. Análise Porcentagens encontradas: C 47,55; H 3,55; N 8,18. Porcentagens calculadas com base na fórmula C₂₇H₂₅O₇N₄ClCu₂: C 47,69; H 3,71; N 8,24. OBSERVAÇÃO: O espectro de IV deste complexo será apresentado e discutido em detalhe no Capítulo 4 do trabalho.

Surpreendentemente, quando se tentou preparar o composto binuclear de cobre(II) do ligante reduzido (contendo a função amina secundária ao invés de imina) H₂L₄, foi isolado novamente o complexo [Cu₂(-OH)(L₃)]ClO₄: num balão de reação, foram dissolvidos, com o auxílio de leve aquecimento, 0,22 g (0,5 mmol) de 2-[N,N-bis(2-piridilmetil)aminometil]-6-[(2-hidroxifenil)aminometil]-4-metilfenol (H₂L₄) em 20 mL de metanol. Adicionou-se a essa solução 0,37 g (1,0 mmol) de perclorato de cobre(II) hexaidratado e, uns 20 minutos depois, foram lentamente gotejados 1,5 mL (1,5 mmol) de solução aquosa 1 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio. Após 10 minutos de reação, o sistema apresentava uma coloração marrom-esverdeada. É oportuno salientar aqui a quase inexistência de sólido em suspensão. Filtrou-se a mistura em papel e, uma semana depois, foram isolados da mesma um sólido amorfo e alguns cristais intercrescidos de reduzido tamanho. Este material foi recristalizado em acetonitrila a quente, formando rapidamente pequenos monocristais verdes adequados à determinação estrutural por difração de raios-X, que foram filtrados em funil de Büchner, lavados com pequenas alíquotas de acetonitrila e éter etílico gelados e secos sob vácuo. Sintetizaram-se 0,053 g (0,078 mmol; rendimento de ~16%) de C₂₇H₂₅O₇N₄ClCu₂ puro. Assim, estamos apresentando em esta Tese duas rotas sintéticas diferentes para a obtenção do composto [Cu₂(-OH)(L₃)]ClO₄.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

LIGANTES BINUCLEANTES DIAZEPÍNICOS E SEUS COMPLEXOS BIMETÁLICOS DE COBRE(II)

SÍNTESES

Ambos os ligantes binucleantes heptadentados derivados da 6-amino-6-metilperidro-1,4-diazepina foram gerados e empregados *in situ*, isto é, não foram isolados antes da sua utilização na síntese dos complexos metálicos. O método utilizado na preparação dos ligantes foi rápido e simples: uma típica reação de condensação, na qual a formação da base de Schiff é acompanhada pela eliminação de uma molécula de água. Este procedimento mostrou-se bastante efetivo para a obtenção dos sistemas binucleares de cobre, fornecendo os compostos $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{L1})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{L2})(\text{ClO}_4)]\text{ClO}_4$ em sua forma cristalina e com rendimentos satisfatórios. Durante a tentativa de síntese dos análogos binucleares de zinco(II), entretanto, houve inesperadas complicações e os complexos isolados foram, respectivamente, $[\text{Zn}(\text{AAZ})_2](\text{ClO}_4)_2$ e $[\text{Zn}_2(\text{bpmamff})_2](\text{ClO}_4)_2$. Estes últimos correspondem a compostos de fragmentos utilizados na geração dos ligantes binucleantes, e não a complexos dos ligantes desejados. Portanto, para a obtenção das espécies binucleares de zinco(II), acreditamos seja mister o prévio isolamento de HL1 e HL2.

HL1 é um ligante simétrico diimínico contendo duas unidades tridentadas diazepínicas a modo de braços pendentes. O objetivo inicial era o de verificar até que ponto os nitrogênios amínicos e de imina poderiam mimetizar os nitrogênios imidazólicos que atuam como átomos doadores no sítio ativo da catecol oxidase. Seria conveniente lembrar neste momento que a própria enzima também apresenta um arranjo simétrico de ligantes ao redor dos seus centros metálicos. HL2, por sua vez, é um ligante imínico não-simétrico, no qual uma das unidades AAZ é substituída por um braço pendente constituído por dois anéis metilpiridínicos e um nitrogênio de amina terciária. Espera-se que os anéis piridínicos possam mimetizar de forma bastante satisfatória os grupos imidazol dos resíduos de histidina. Além disso, há um interesse em observar o efeito que a assimetria do ligante possa causar nas propriedades físico-químicas e na atividade do complexo.

CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS (ESTADO SÓLIDO)

Os compostos $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{L1})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1**) e $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{L2})(\text{ClO}_4)]\text{ClO}_4$ (**2**) foram caracterizados por análise elementar, espectroscopia vibracional, reflectância difusa (UV-vis no estado sólido), EPR e magnetoquímica. Ambos os complexos sintetizados tiveram a sua estrutura determinada por difração de raios-X em monocristal. Os dados decorrentes dessas análises serão discutidos a seguir, com exceção do CHN, cujos resultados já foram tratados na parte experimental do trabalho.

a) Estruturas cristalinas

Na Figura 3.1, pode ser observada a estrutura do cátion complexo $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{L1})]^{2+}$. Já a Figura 3.2 mostra a estrutura do cátion complexo $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{L2})(\text{ClO}_4)]^+$. A Tabela 3.1, por sua vez, apresenta alguns dados dos cristais utilizados e outros relacionados com a coleta e o refinamento das estruturas. Comprimentos e ângulos de ligação selecionados podem ser observados na Tabela 3.2. Nesta última incluímos, como referência, três outros compostos binucleares de cobre(II) publicados na literatura contendo simultaneamente pontes -hidroxo e -fenoxo entre os metais, a saber, **A**⁽¹⁰⁵⁾, **B**⁽⁶³⁾ e **C**⁽¹⁰⁶⁾.

Tabela 3.1. Seleção de dados cristalográficos para os complexos **1** e **2**

Complexo	1	2
Fórmula empírica	$\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_{11}\text{N}_6\text{Cl}_2\text{Cu}_2$	$\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_{10}\text{N}_6\text{Cl}_2\text{Cu}_2$
Massa fórmula	746,54 g/mol	800,58 g/mol
Temperatura de coleta	293(2) K	293(2) K
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	$P 2_1/c$	$P 2_1/n$
Cela unitária	$a = 14,452(1) \text{ \AA}$	$a = 16,607(1) \text{ \AA}$
	$b = 13,254(1) \text{ \AA}$	$b = 11,022(2) \text{ \AA}$
	$c = 16,386(3) \text{ \AA}$	$c = 17,330(1) \text{ \AA}$
	$\beta = 109,158(9)^\circ$	$\beta = 91,561(5)^\circ$
Volume da cela	$2964,9(6) \text{ \AA}^3$	$3170,9(6) \text{ \AA}^3$
Z	4	4

Tabela 3.1. Seleção de dados cristalográficos para os complexos **1** e **2** (continuação)

Complexo	1	2
Densidade (calculada)	1,672 g/cm ³	1,677 g/cm ³
Tamanho do cristal utilizado	0,43 x 0,30 x 0,26 mm ³	0,50 x 0,40 x 0,13 mm ³
Reflexões coletadas	5468	5829
Únicas	5265 [R(int) = 0,0315]	5633 [R(int) = 0,0263]
Parâmetros refinados	373	451
“Goodness-of-fit on F ² ”	1,048	1,065
Índices R finais [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0598; wR2 = 0,1637	R1 = 0,0508; wR2 = 0,1268
Índices R (todos os dados)	R1 = 0,1223; wR2 = 0,1880	R1 = 0,1118; wR2 = 0,1449

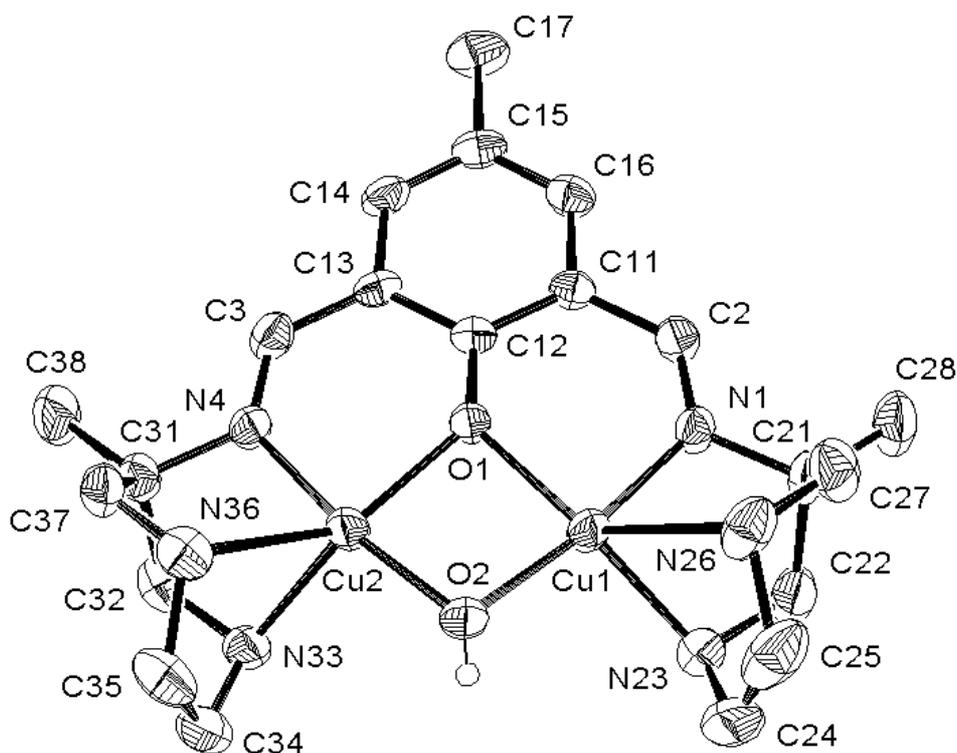


Figura 3.1. ORTEP para o cátion complexo $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{ON}_6)]^{2+}$. Todos os átomos de hidrogênio, com exceção daquele presente na ponte -hidroxo , foram omitidos por motivos de simplificação.

O cátion bivalente do complexo **1** possui dois íons cúpricos pentacoordenados, os quais encontram-se ponteados pelo oxigênio O1 do grupo fenolato presente no ligante e por um hidróxido exógeno (O2). O hidrogênio deste grupo OH^- foi localizado no correspondente mapa de Fourier. Os átomos que constituem aquelas duas pontes ocupam posições relativas “*cis*” no plano equatorial da esfera de coordenação dos núcleos Cu1 e Cu2. A geometria de coordenação para os centros pentacoordenados de cobre foi atribuída com base na equação descrita por Addison e colaboradores⁽¹⁰⁷⁾, com a qual pode-se distinguir entre uma geometria piramidal quadrada e uma do tipo bipiramidal trigonal. O índice τ , que representa o grau de trigonalidade da geometria, é dado por $\tau = \frac{\alpha - \beta}{60}$, onde α corresponde ao maior ângulo e β ao segundo maior ângulo na esfera de coordenação do metal. Segundo essa equação, uma geometria piramidal quadrada perfeita é caracterizada por $\tau = 0$, enquanto que uma geometria bipiramidal trigonal perfeita é caracterizada por $\tau = 1$. No caso do composto **1**, a geometria em torno de cada cobre(II) é a de uma pirâmide de base quadrada distorcida, com valores para o parâmetro de Addison τ de 0,19 (Cu1) e 0,34 (Cu2). O Cu1 completa a base de seu poliedro com dois átomos de nitrogênio (N1 e N23) provenientes do braço pendente AAZ. Pela sua característica mais macia, devido à hidridação sp^2 do átomo doador, a ligação do nitrogênio imínico, N1, ao centro de cobre(II) é ligeiramente mais curta [Cu1–N1 = 1,928(6) Å] do que aquela formada entre a espécie central e N23 [2,041(7) Å]. Essa diferença será ainda mais marcante no caso do centro Cu2. A distância média de ligação Cu1–ligante equatorial é de 1,961 ± 0,055 Å. Conforme esperado, a porção diazepínica AAZ atua como quelante facial, fornecendo o átomo doador que ocupa a posição axial da pirâmide. Trata-se do nitrogênio N26 [Cu1–N26 = 2,524(7) Å]. Por sua vez, o plano de coordenação equatorial do Cu2 é completado pelos átomos doadores N4 e N33, da segunda unidade AAZ. A distância média de ligação Cu2–ligante equatorial é 1,970 ± 0,085. O nitrogênio N36 ocupa a posição apical, completando assim a esfera de coordenação de Cu2 [Cu2–N36 = 2,372(6) Å]. Sem lugar a dúvidas, uma das características mais importantes deste complexo é a sua curta distância intermetálica de 2,896(1) Å, a qual se encontra, de fato, entre as menores já descritas na literatura para compostos do tipo $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{-hidroxo})\text{Cu}^{\text{II}}$ ^(64,106). As distâncias de ligação N1–C2 e C3–N4 são, respectivamente, iguais a 1,256(9) e 1,258(9) Å, em concordância com a natureza imínica de tais junções. Cada cela unitária possui quatro unidades assimétricas do

complexo, sendo que fazem parte ainda do arranjo cristalino oito contra-íons perclorato e quatro moléculas de água por cela. O ângulo $\text{Cu1-O}_{\text{hidroxila}}\text{-Cu2}$ é igual a $98,1(2)^\circ$.

Pelo que foi discutido acima, **1** possui uma posição de coordenação livre em cada átomo de cobre, sendo que as duas posições ocorrem segundo eixos paralelos e na mesma face do complexo, o que permitiria, eventualmente, uma coordenação em ponte por parte de um ligante bidentado. Isto não acontece no complexo **2** e nem em nenhum dos outros três compostos da literatura que estamos usando para efeitos de comparação.

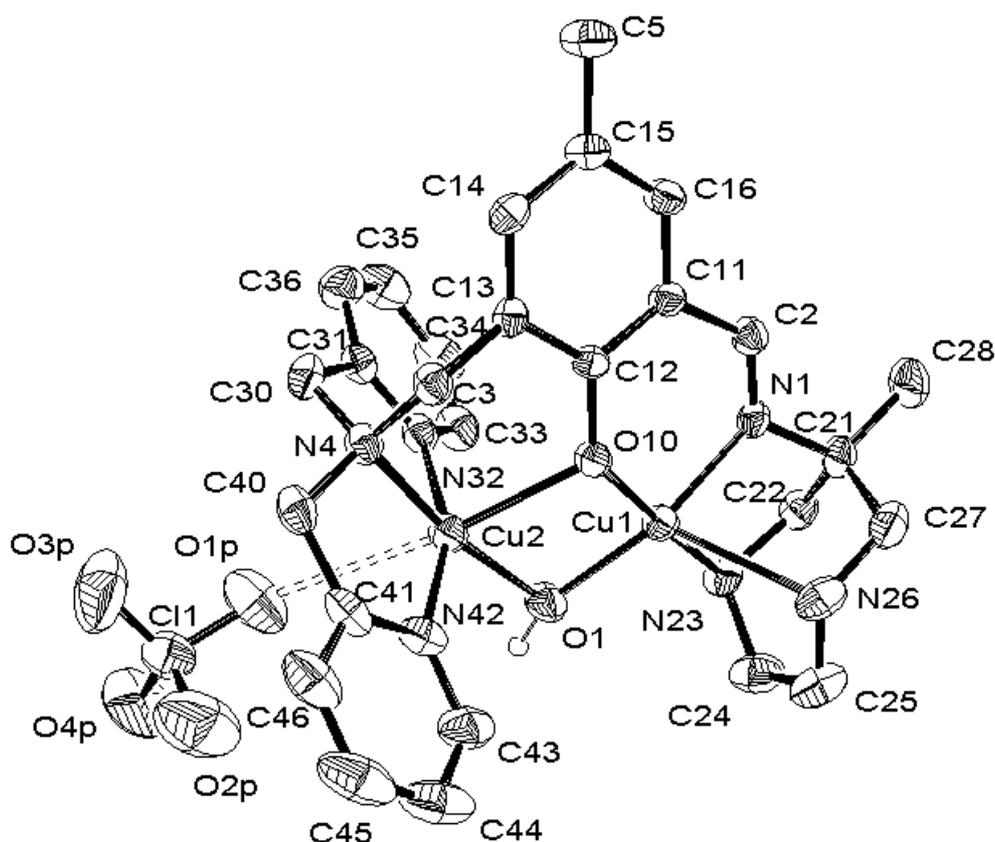


Figura 3.2. ORTEP para o cátion complexo $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{ON}_6)(\text{ClO}_4)]^+$. Todos os átomos de hidrogênio, com exceção daquele presente na ponte -hidroxo , foram omitidos por motivos de simplificação.

A estrutura molecular do cátion monovalente presente em **2** também apresenta dois centros cúpricos, com o oxigênio do grupo fenolato e um íon hidróxido exógeno como pontes. Aqui, novamente, o hidrogênio da ponte exógena OH^- foi localizado de forma inequívoca no respectivo mapa de Fourier. O braço pendente constituído pela unidade AAZ atua, a exemplo do que foi observado para o composto anterior, como um ligante de coordenação facial. Já o lado contendo os grupos 2-metilpiridina atua como ligante meridional, o que acaba causando uma assimetria bastante pronunciada no complexo. Isto fica em evidência ao compararmos entre si as esferas de coordenação dos metais (Cu1 e Cu2). A distância intermetálica aumenta

para 3,0302(11) Å e o ângulo Cu1–O_{hidroxila}–Cu2, para 103,7(2)°. A esfera de coordenação de Cu1 é praticamente idêntica nos dois complexos. O parâmetro de Addison assume, neste caso, um valor de 0,16 e a distância média de ligação Cu1–ligante equatorial é de 1,960 ± 0,052 Å. Como no caso anterior, o nitrogênio N26 ocupa a posição axial [Cu1–N26 = 2,498(6) Å]. O comprimento da ligação N1–C2 é 1,260(8) Å, de acordo com a natureza imínica da mesma. Já o centro Cu2 apresenta um ambiente de coordenação completamente diferente, exibindo uma geometria tetragonal distorcida (NC = 6). O aumento no número de coordenação, de 5 para 6, é ocasionado pela ligação de um dos percloratos ao centro de Cu2 segundo o eixo z. Essa interação, entretanto, é extremamente fraca (pseudo-coordenação) [Cu2–O1p = 2,979(6) Å] e esse contra-íon deve estar completamente dissociado em solução, tornando Cu2 um centro pentacoordenado de geometria piramidal quadrada distorcida ($\tau = 0,17$). O eixo z, como é de se esperar para um composto hexacoordenado de cobre(II), apresenta um pronunciado efeito Jahn-Teller. O outro ligante axial é o oxigênio do fenolato, o qual se encontra a uma distância de 2,262(4) Å da espécie central. No plano equatorial, a ponte μ -hidroxo parece exercer um forte efeito *trans* sobre o nitrogênio N4, uma vez que a ligação Cu2–O1 é 0,102 Å mais curta do que a ligação Cu2–N4. A distância média de ligação Cu2–ligante equatorial é aqui igual a 1,986 ± 0,042 Å. Cada cela unitária possui quatro unidades assimétricas do complexo, sendo que fazem parte ainda do arranjo cristalino quatro contra-íons perclorato por cela.

Tabela 3.2. Principais distâncias interatômicas e ângulos de ligação para os compostos **1** e **2**, sintetizados neste trabalho, e os complexos da literatura **A**, **B** e **C**, relacionados aqui para efeito de comparação

LIGAÇÕES	Distâncias interatômicas (Å) e ângulos de ligação (°)				
	1	2	A ⁽¹⁰⁵⁾	B ⁽⁶³⁾	C ⁽¹⁰⁶⁾
Cu1–Cu2	2,8957(13)	3,0302(11)	3,082(3)	2,966(1)	3,0107(8)
Cu1–N _{imina}	1,928(6)	1,936(5)	–	–	–
Cu1–O _{fenolato ponte}	1,954(4)	1,944(4)	1,979(10)	1,962(7)	1,965(3)
Cu1–O _{hidroxo ponte}	1,920(5)	1,923(4)	1,938(10)	1,891(8)	1,956(3)
Cu1–N _{trans-fenolato ponte}	2,041(7)	2,036(5)	2,006(16)	–	1,991(4)
Cu2–N _{imina}	1,912(6)	–	–	–	–
Cu2–O _{fenolato ponte}	1,963(4)	2,262(4)	1,972(11)	2,039(7)	1,981(3)
Cu2–O _{hidroxo ponte}	1,914(5)	1,930(5)	1,962(10)	1,922(8)	1,963(3)
Cu2–N _{trans-fenolato ponte}	2,092(6)	–	2,027(14)	–	2,002(3)
Cu1–O _{fenolato ponte} –Cu2	95,33(19)	91,87(16)	102,5(5)	95,7(2)	–
Cu1–O _{hidroxo ponte} –Cu2	98,1(2)	103,7(2)	104,4(5)	102,1(3)	–
Geometria Cu1	Pirâmide tetragonal distorcida	Pirâmide tetragonal distorcida	Pirâmide tetragonal	Bipirâmide trigonal distorcida	Pirâmide tetragonal distorcida

Geometria Cu ₂	Pirâmide tetragonal distorcida	Tetragonal distorcida	Pirâmide tetragonal	Bipirâmide trigonal distorcida	Pirâmide tetragonal distorcida
---------------------------	--------------------------------	-----------------------	---------------------	--------------------------------	--------------------------------

b) Espectroscopia vibracional

Os espectros de infravermelho dos compostos **1** e **2** podem ser observados nas Figuras 3.3 e 3.4, respectivamente. Como os ligantes diazepínicos aqui descritos não foram isolados e caracterizados previamente à sua utilização, não é possível fazer aqui uma comparação direta entre os espectros destes e os de seus complexos de cobre. Em virtude da similaridade estrutural entre os compostos **1** e **2**, os seus espectros são muito parecidos, apresentando bandas provenientes de vibrações características dos ligantes, bandas referentes aos contra-íons perclorato e bandas relacionadas com o ligante exógeno (hidróxido em ponte) e água de cristalização (no caso de **1**). A seguir, uma listagem completa de todas as absorções referentes a esses complexos (F, banda forte; m, banda média; f, banda fraca; o, ombro):

Composto 1: 3410 (F), 3275 (F), 3210 (o), 2976 (m), 2947 (m), 2924 (m), 2890 (m), 2878 (o), 2855 (m), 1643 (F), 1635 (o), 1614 (o), 1551 (m), 1476 (m), 1458 (m), 1444 (m), 1392 (m), 1371 (f), 1329 (m), 1311 (m), 1261 (f), 1234 (m), 1186 (o), 1175 (o), 1148 (F), 1119 (F), 1080 (F), 1068 (F), 1014 (m), 990 (m), 967 (m), 909 (o), 887 (m), 825 (m), 793 (f), 768 (m), 659 (f), 636 (m), 625 (m), 589 (m), 571 (m), 557 (m), 542 (m), 509 (m), 484 (m), 464 (m), 437 (f), 422 (f) e 410 (f) cm⁻¹.

Composto 2: 3422 (m), 3352 (m), 3274 (m), 3081 (m), 3034 (m), 3000 (m), 2978 (m), 2956 (m), 2946 (m), 2920 (m), 2887 (m), 2854 (m), 1642 (F), 1638 (o), 1625 (o), 1608 (m), 1572 (m), 1560 (m), 1550 (o), 1484 (m), 1479 (m), 1465 (o), 1456 (m), 1446 (m), 1438 (m), 1422 (o), 1390 (m), 1374 (f), 1371 (o), 1356 (f), 1340 (f), 1318 (m), 1304 (m), 1284 (m), 1270 (m), 1258 (o), 1242 (f), 1236 (o), 1220 (f), 1178 (m), 1158 (o), 1142 (o), 1117 (o), 1091 (F), 1080 (F), 1028 (m), 1010 (m), 998 (m), 990 (o), 974 (m), 958 (m), 934 (m), 892 (m), 872 (m), 840 (m), 818 (m), 810 (m), 780 (m), 770 (m), 728 (f), 656 (f), 636 (m), 622 (F), 583 (f), 572 (m), 560 (f), 536 (f), 518 (m), 501 (f), 484 (m), 469 (m), 460 (m), 453 (m) e 420 (m) cm⁻¹.

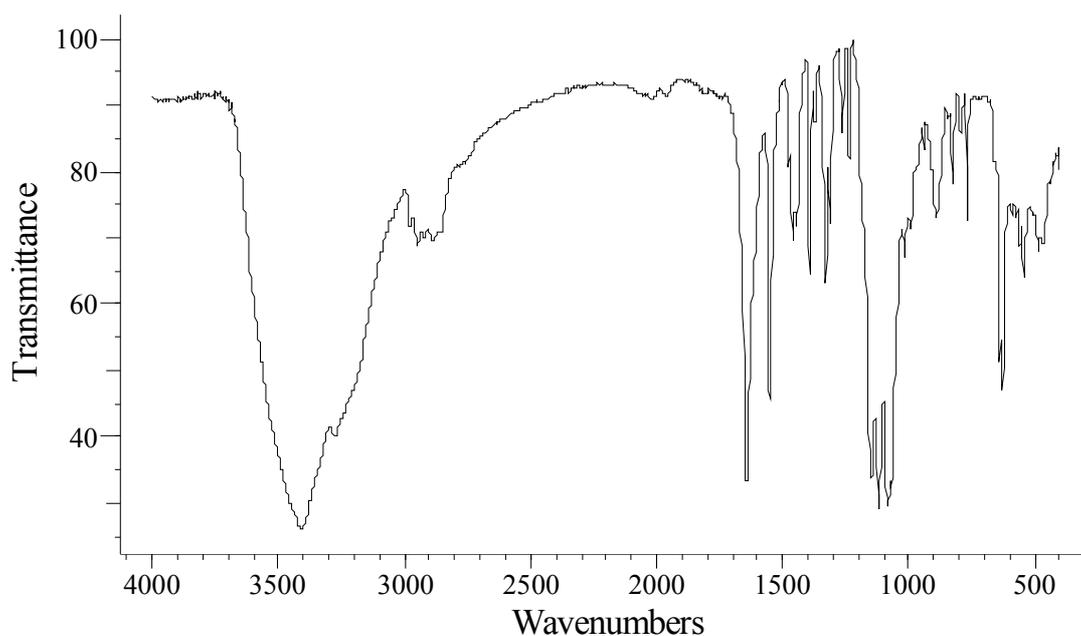


Figura 3.3. Espectro vibracional do composto **1** (amostragem: pastilha de KBr).

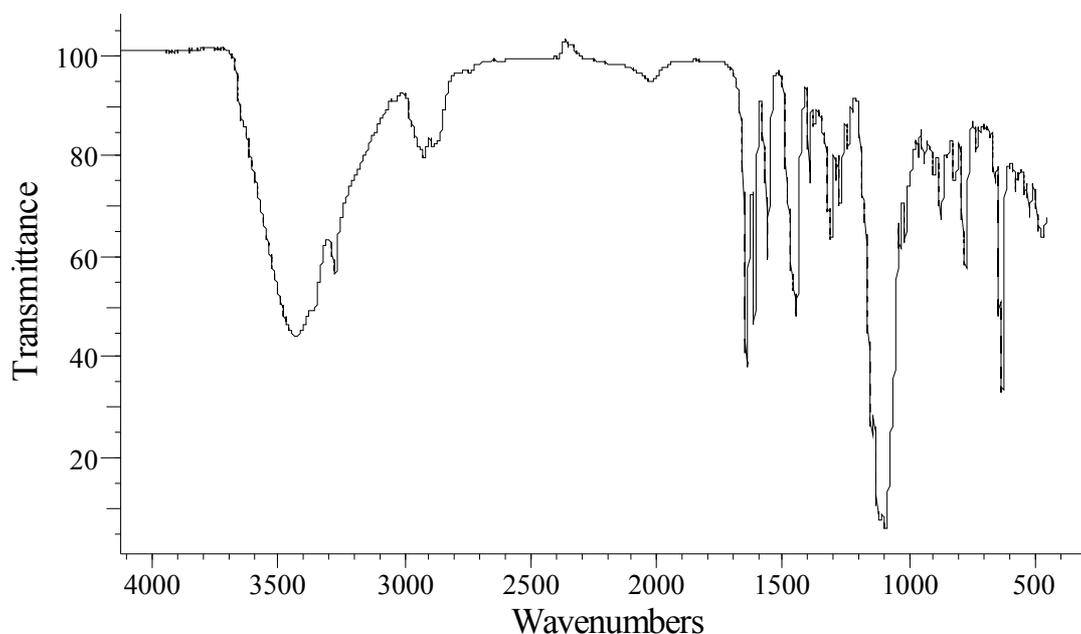


Figura 3.4. Espectro vibracional do composto **2** (amostragem: pastilha de KBr).

A absorção de estiramento C=N da função imina é muito característica em ambos os complexos, aparecendo como uma banda fina e intensa em 1643 cm^{-1} e 1642 cm^{-1} para **1** e **2**, respectivamente. Essas bandas apresentam um ombro no sentido de menores frequências, possivelmente relacionado às vibrações de estiramento assimétrico da ligação. O composto **2** é mais rico em bandas na região aromática de estiramentos C=C e C=N, em virtude dos anéis piridínicos presentes em L2. As absorções referentes aos grupos perclorato aparecem como uma única banda em 1080 cm^{-1} para **1** (onde ambos os grupos ClO_4^- atuam como contra-íons)

e como um par de bandas muito próximas em 1091 e 1080 cm^{-1} para **2** (onde um dos percloratos encontra-se fracamente coordenado ao centro Cu^{2+}).

c) EPR e reflectância difusa (espectroscopia eletrônica no estado sólido)

À temperatura ambiente, ambos os complexos são silenciosos no EPR, indicando um forte acoplamento entre os centros de cobre. Isto está em plena concordância com estruturas duplamente ponteadas e curtas distâncias intermetálicas, características estas observadas nas análises de difração de raios-X. Quando os experimentos são realizados a 77 K, entretanto, espectros bem definidos, consistindo de sinais de baixa intensidade, são observados. Estes sinais foram atribuídos à presença de pequenas quantidades de impurezas paramagnéticas incorporadas às amostras durante o processo de síntese dos complexos metálicos. No caso do composto **1**, não existe absorção a “meio-campo”, o que indica inexistência de interação magnética entre os núcleos de cobre e, portanto, a presença de um complexo mononuclear como impureza. Por outro lado, o complexo **2** exibe um sinal adicional a “meio-campo”, sugerindo interação magnética cobre-cobre e a presença de um sistema do tipo binuclear como impureza.

A espectroscopia eletrônica no estado sólido de **1** (Figura 3.5), por sua vez, mostra uma absorção simétrica centrada em 368 nm, a qual pode ser atribuída a um par de bandas de transferência de carga (do tipo ligante-metal) superpostas: $\text{Cu}^{II} - \text{OH}^-$ e $\text{Cu}^{II} - \text{OPh}^-$ (105). A contribuição de absorções provenientes das iminas, entretanto, não pode, a princípio, ser completamente descartada. Há também uma absorção assimétrica muito larga (indicativo de mais de uma transição eletrônica com energias relativamente próximas), com um máximo em 608 nm, que pode ser associada a transições d-d características dos cátions cobre(II). No caso do complexo **2**, é verificada a presença da absorção simétrica relacionada com os processos de transferência de carga em 370 nm (Figura 3.6). Na região visível do espectro, observam-se duas bandas largas parcialmente superpostas com máximos em 606 e 702 nm. Elas podem ser atribuídas às transições d-d de cada um dos centros cúpricos não-equivalentes. Através de comparação direta com a posição da banda assimétrica em **1**, pode-se afirmar que a absorção em 702 nm está relacionada com o centro de cobre(II) ligado às piridinas.

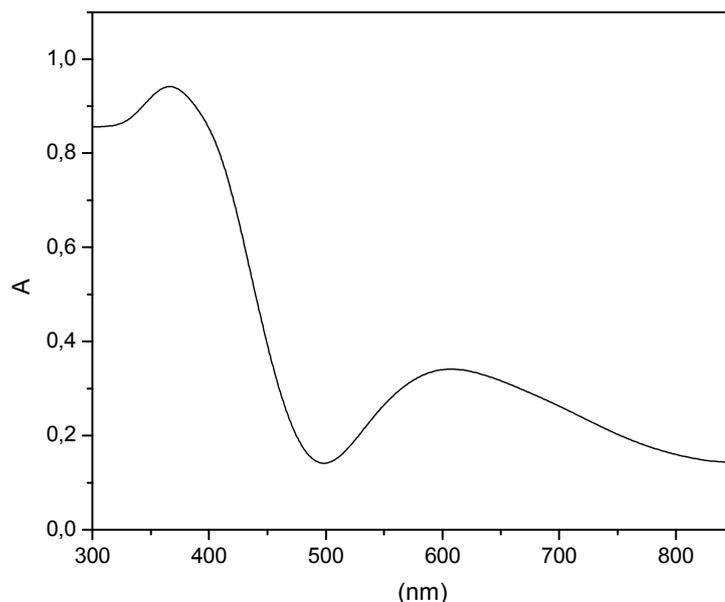


Figura 3.5. Espectro eletrônico do complexo **1** no estado sólido (reflectância difusa).

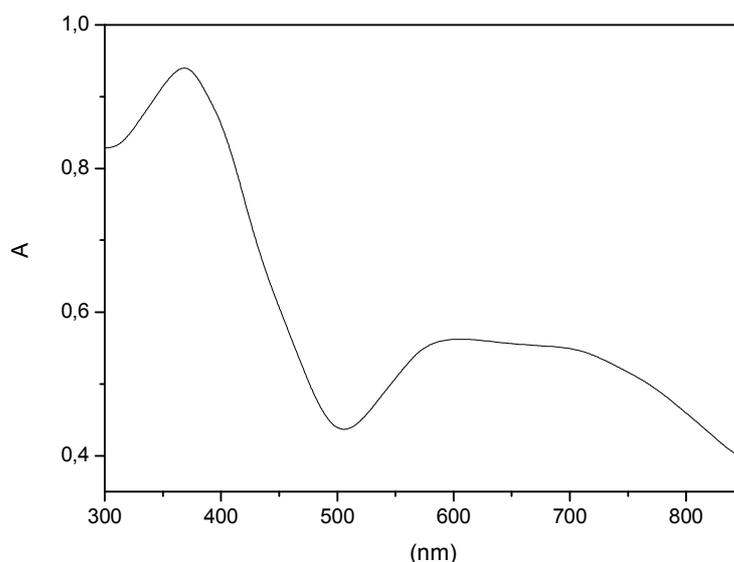


Figura 3.6. Espectro eletrônico do complexo **2** no estado sólido (reflectância difusa).

d) Propriedades magnéticas

A dependência da susceptibilidade magnética e do momento magnético efetivo (μ_{eff}) com a temperatura é mostrada na Figura 3.7 (para o composto **1**) e na Figura 3.8 (para **2**). Em ambos os casos, efetuaram-se correções diamagnéticas utilizando-se dados padrões relativos às constantes de Pascal extraídos da literatura⁽⁹⁴⁾. O valor de μ_{eff} é igual a 2,192 μ_B para o composto **1** e a 2,531 μ_B para o complexo **2** a 300 K e cai para 0,190 μ_B e 0,150 μ_B a 2 K para **1** e **2**, respectivamente. Isto está em concordância com uma interação antiferromagnética entre os dois centros de cobre(II). A análise das curvas de susceptibilidade foi realizada de duas

formas diferentes: (a) através da fórmula de Bleaney-Bowers e (b) utilizando um programa universal desenvolvido pelo nosso colaborador, o Dr. Z. Tomkowicz (Institute of Physics – Jagiellonian University, Polônia). Neste último caso, também as impurezas foram levadas em consideração. Apesar das referidas impurezas, os valores de J foram bem determinados para ambos os complexos. Para **1**, os parâmetros que forneceram o melhor ajuste entre os dados experimentais e aqueles calculados foram $J = -344,2 \pm 0,6$ K, $g = 2,12 \pm 0,3$ e, finalmente, $C = 3,270 \pm 0,007$ emu/mol. Por outro lado, cálculos efetuados com o complexo **2** levaram aos parâmetros $J = -146,5 \pm 0,5$ K, $g = 1,97 \pm 0,1$ e $C = 2,820 \pm 0,007$ emu/mol. Nos dois casos, os resultados obtidos por ambos os métodos encontram-se em plena concordância. Pode ser observado que a constante de acoplamento apresentada pelo composto **1** é aproximadamente o dobro do valor correspondente determinado para **2**, o que indica uma interação antiferromagnética muito mais efetiva na espécie simétrica **1**. Este comportamento não pode ser explicado em termos das distâncias intermetálicas ou da natureza dos ligantes envolvidos na formação das pontes entre os centros de cobre, já que em ambos os compostos os íons cúpricos encontram-se separados por distâncias similares (2,896 Å para **1** e 3,030 Å, no caso de **2**) e apresentam uma ponte fenoxo e uma ponte hidroxó exógena em suas esferas de coordenação. A diferença no ângulo Cu1–O(H)–Cu2, o qual assume um valor de 98,1 ° no complexo **1** e é levemente maior para **2** (103,7 °), a princípio, deveria apontar para um maior acoplamento antiferromagnético em **2** e, portanto, também não pode ser responsável pelo efeito observado. Em vista do exposto acima, uma possível explicação para os resultados obtidos pode emergir do arranjo dos orbitais magnéticos nos complexos sintetizados. Em **1**, ambos os centros de cobre(II) possuem geometrias de pirâmides de base quadrada distorcidas e, por esse motivo, os orbitais magnéticos são do tipo $d_{x^2-y^2}$, com os seus lobos direcionados para os átomos de oxigênio das pontes -hidroxó e -fenoxo, as quais ocupam posições equatoriais nas esferas de coordenação. Em **2**, entretanto, Cu1 tem uma geometria de pirâmide de base quadrada distorcida enquanto Cu2 apresenta uma geometria do tipo tetragonal. Neste último caso, o orbital magnético $d_{x^2-y^2}$ possui densidade eletrônica desemparelhada orientada no sentido do átomo de oxigênio da ponte hidroxó e do nitrogênio de piridina N32. Assim, a interação magnética entre Cu1 e Cu2 se vê dificultada no composto **2**. Além disso, diferentes geometrias implicam que os orbitais magnéticos terão também diferentes energias. Em outras palavras, no complexo **1**, os centros de cobre interagem através de ambas as pontes enquanto no composto **2** a interação só acontece via ponte hidroxó. Portanto, **1** e **2** nos permitem avaliar as contribuições individuais de ambos os tipos de ponte (isto é, -hidroxó e -fenoxo) para o

acoplamento antiferromagnético, resguardado o fato de que esses dois complexos possuem geometrias semelhantes porém arranjos diferentes em torno dos sítios de coordenação dos seus íons cobre(II).

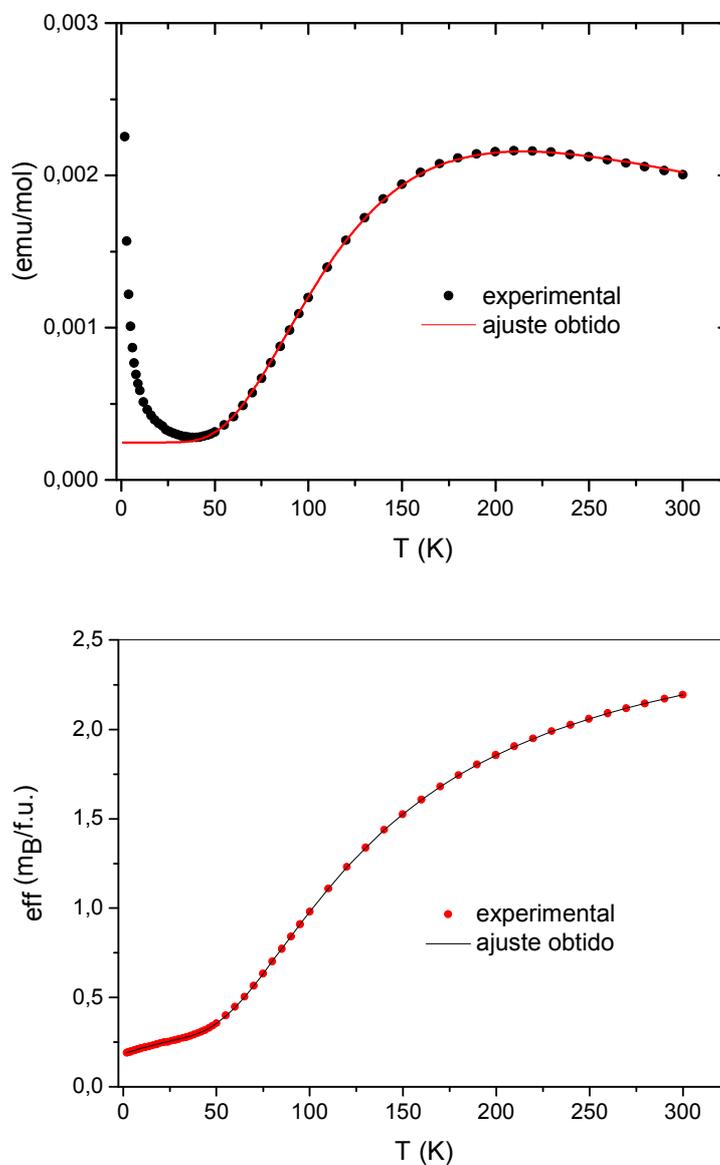


Figura 3.7. Dependência da susceptibilidade magnética, gráfico superior, e do momento magnético efetivo (μ_{eff}), gráfico inferior, do composto **1** com a temperatura.

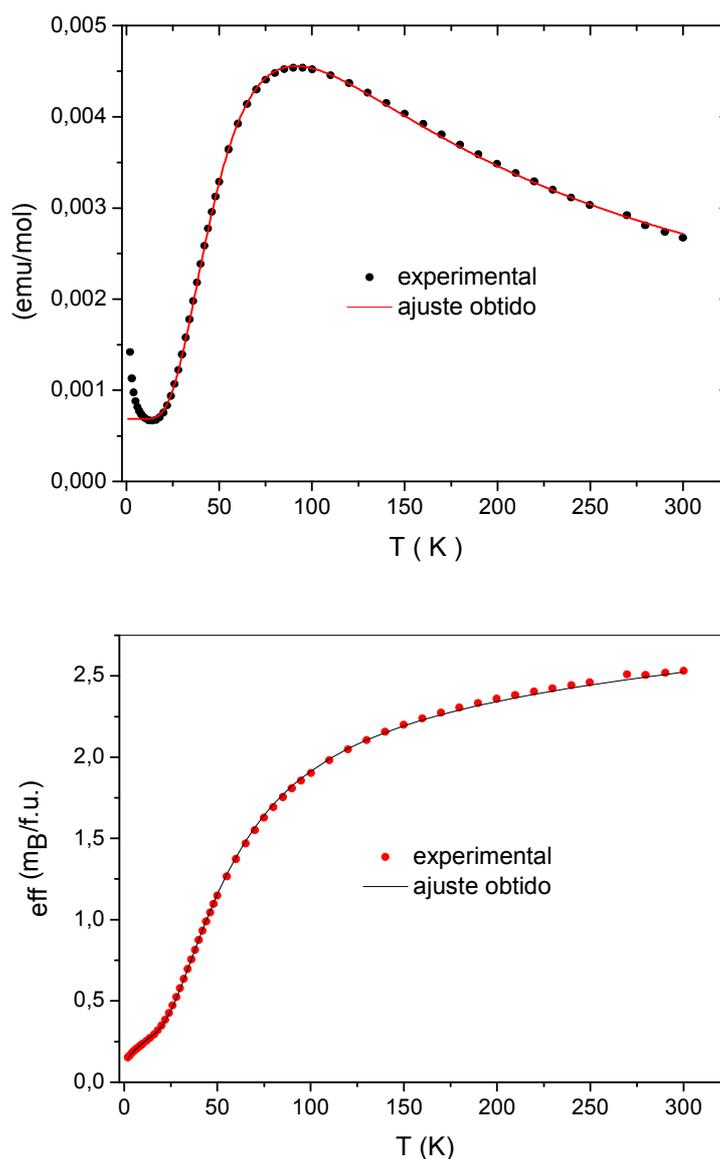


Figura 3.8. Dependência da susceptibilidade magnética, gráfico superior, e do momento magnético efetivo (μ_{eff}), gráfico inferior, do composto **2** com a temperatura.

CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS (SOLUÇÃO)

a) Propriedades espectroscópicas (UV-vis e EPR)

O espectro obtido para **1** em solução é idêntico àquele observado no estado sólido, o que sugere que a estrutura molecular do complexo é mantida após dissolução. Por exemplo, utilizando-se acetonitrila como solvente, foi registrado um espectro com bandas em 366 nm ($7700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e 607 nm ($165 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). No caso de **2**, uma solução deste composto em acetonitrila mostra um leve deslocamento hipsocrômico, para 364 nm ($4350 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), na banda de transferência de carga localizada a 370 nm no espectro da amostra sólida. As

transições d-d foram observadas na forma de uma única banda larga, cujo máximo sofre um importante deslocamento batocrômico para 757 nm ($165 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Esta banda apresenta um ombro em 606 nm ($145 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As mudanças espectrais descritas para **2** estão provavelmente relacionadas com a saída do perclorato da esfera de coordenação do centro Cu²⁺ durante o processo de solvatação.

Tanto **1** quanto **2**, em solução de acetonitrila, mostram-se silenciosos no EPR à temperatura ambiente. Isto constitui um indicativo de que a ponte -hidroxo permanece inalterada após o processo de dissolução em ambos os complexos.

b) Eletroquímica

O comportamento eletroquímico dos compostos sintetizados foi avaliado em solução de acetonitrila à temperatura ambiente. Os voltamogramas cíclicos de **1** e **2** podem ser vistos na Figura 3.9.

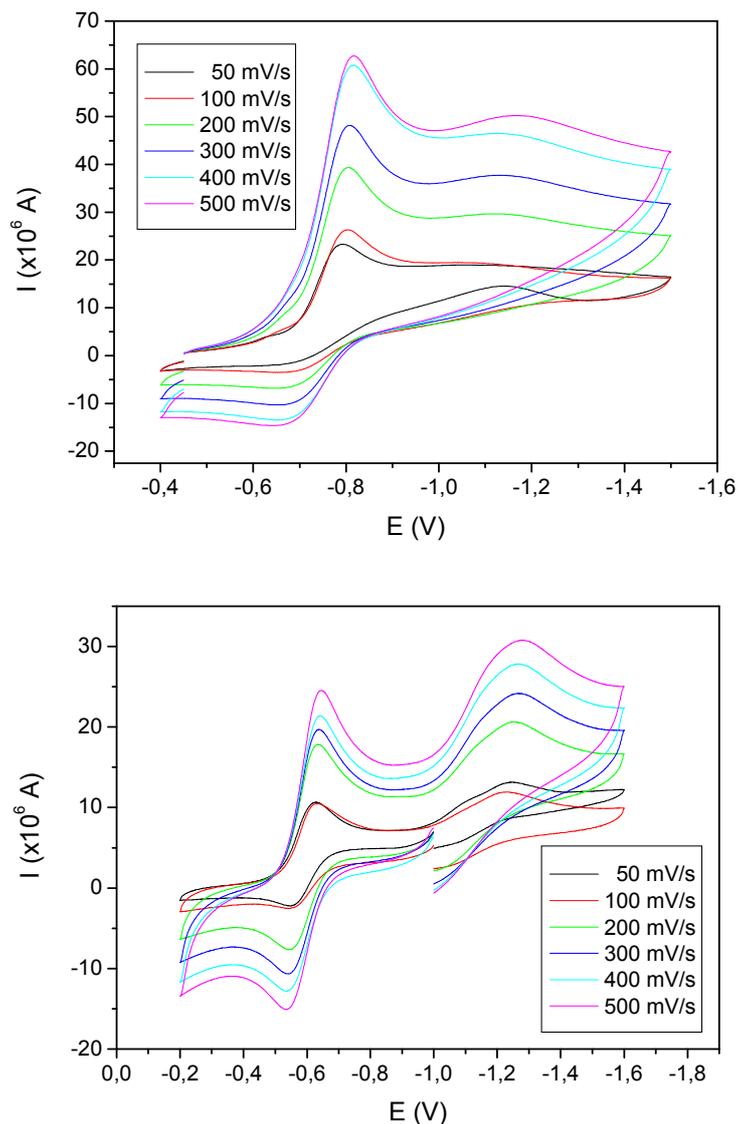


Figura 3.9. Voltamogramas cíclicos, obtidos a diferentes velocidades de varredura, para os complexos **1** (gráfico superior) e **2** (gráfico inferior) em acetonitrila, a 25 °C. Eletrólito suporte: 0,1 mol L⁻¹ TBAP; trabalho: eletrodo de carbono vítreo; referência: Ag/AgCl (NaCl 3 mol.L⁻¹); contra-eletrodo: fio de Pt; padrão interno: ferroceno.

Ambos se caracterizam pela presença de dois processos bem definidos. No caso de **1**, o primeiro sinal é uma onda *quasi*-reversível a $E_{1/2} = -0,70$ V versus NHE, a qual pode ser atribuída ao par redox Cu^{II}Cu^{II}/Cu^{II}Cu^I. Quando a velocidade de varredura é aumentada, um segundo processo, evidenciado por um pico catódico a $-1,08$ V versus NHE, aparece. Este último pico pode ser atribuído à formação da espécie Cu^ICu^I. O fato do processo ser completamente irreversível sugere uma rápida decomposição da espécie Cu^ICu^I, como evidenciado por Torelli *et al.* ⁽⁶³⁾ para um composto binuclear de cobre do ligante simétrico H-BPMP. O complexo **2**, por sua vez, apresenta uma onda a $E_{1/2} = -0,60$ V versus NHE que, se bem não chega a ser totalmente reversível, mostra uma reversibilidade muito maior do que aquela observada para a primeira onda do composto **1**. Esse processo foi atribuído ao par

redox $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}}$, o qual corresponde, muito provavelmente, a mudanças no estado de oxidação do centro de cobre ligado às piridinas. Um segundo processo, praticamente irreversível, é caracterizado pela presença de um pico catódico intenso a $-1,24$ V versus NHE. O pico parece apresentar um ombro no sentido dos potenciais menos negativos, o que poderia ser um indicativo da ocorrência simultânea de mais de uma redução. Apesar disso, acreditamos que a principal contribuição aqui seja aquela da redução da espécie $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}}$ para $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{I}}$. Um parâmetro importante a ser considerado é a diferença entre $E_{1/2}$ e E_{pc} (E). Foi observado um valor de $0,38$ V em **1** contra $0,64$ V em **2**, o que mostra que a assimetria imposta por L2 aumenta a faixa de estabilidade da espécie de valência mista $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}}$. Estes resultados foram confirmados por voltametria de onda quadrada (Figura 3.10) e estão em boa concordância com dados obtidos por outros autores^(63,108).

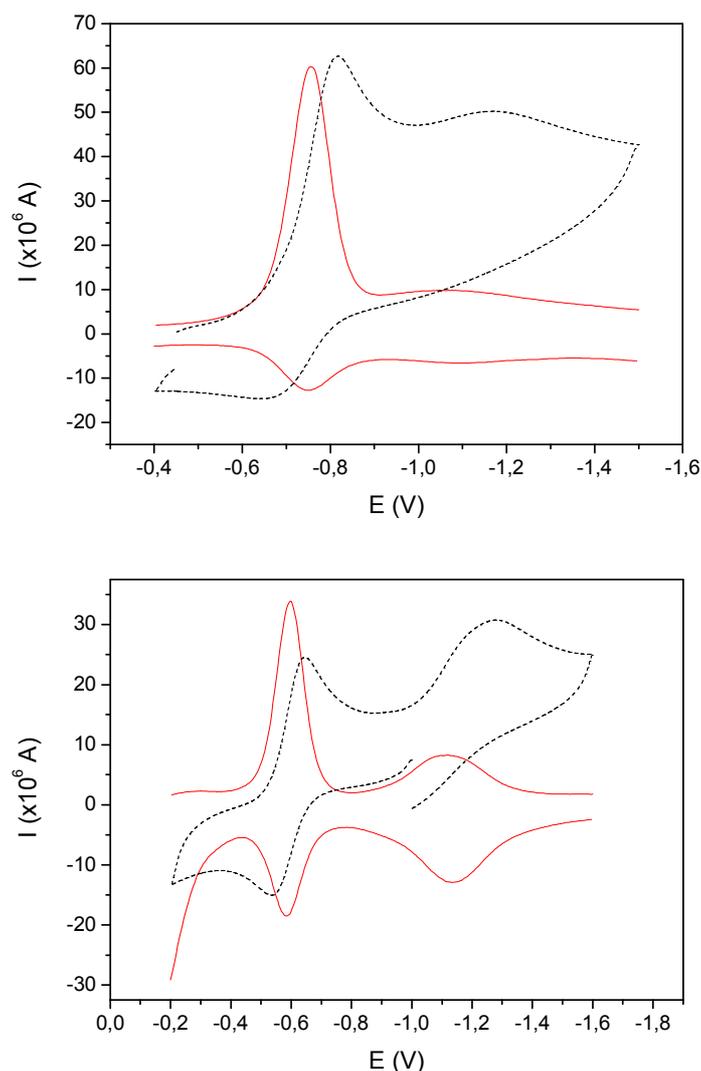


Figura 3.10. Voltamogramas de onda quadrada para os complexos **1** (gráfico superior) e **2** (gráfico inferior) em acetonitrila, a 25 °C. Eletrólito suporte: 0,1 mol L⁻¹ TBAP; trabalho: eletrodo de carbono vítreo; referência: Ag/AgCl (NaCl 3 mol.L⁻¹); contra-eletrodo: fio de Pt; padrão interno: ferroceno. Os respectivos voltamogramas cíclicos foram adicionados na figura (linha pontilhada) para efeito de comparação.

c) Condutimetria

A condutividade elétrica molar de soluções dos compostos **1** e **2** também foi avaliada em acetonitrila, à temperatura ambiente. Para o composto **1**, foi encontrado um valor igual a 358,6 cm² mol⁻¹, bastante acima da faixa típica esperada para eletrólitos do tipo 2:1 neste solvente (220-300 cm² mol⁻¹)⁽¹⁰⁹⁾. O complexo **2**, por sua vez, apresentou um valor de 345,4 cm² mol⁻¹. Este valor é muito similar àquele determinado para **1**, o que indica que ambos os compostos pertencem ao mesmo tipo eletrolítico. Tem-se, desta maneira, um forte indicativo de que o ligante perclorato axial dissocia-se completamente de **2** em solução, como já era esperado em virtude dos dados cristalográficos discutidos anteriormente.

d) Titulações potenciométricas

As especiações dos sistemas constituídos, separadamente, pelos compostos **1** e **2** em solução aquosa foram estudadas pelos métodos potenciométrico e espectrofotométrico. Para o complexo **1**, o melhor ajuste entre os dados potenciométricos e os calculados pelo algoritmo do programa SUPERQUAD⁽⁹⁷⁾, ver Figura 3.11, foi obtido com a proposição de um sistema contendo sete diferentes estados de protonação, os quais são susceptíveis a interconversão pH-direcionada através de seis constantes de equilíbrio (Tabela 3.3).

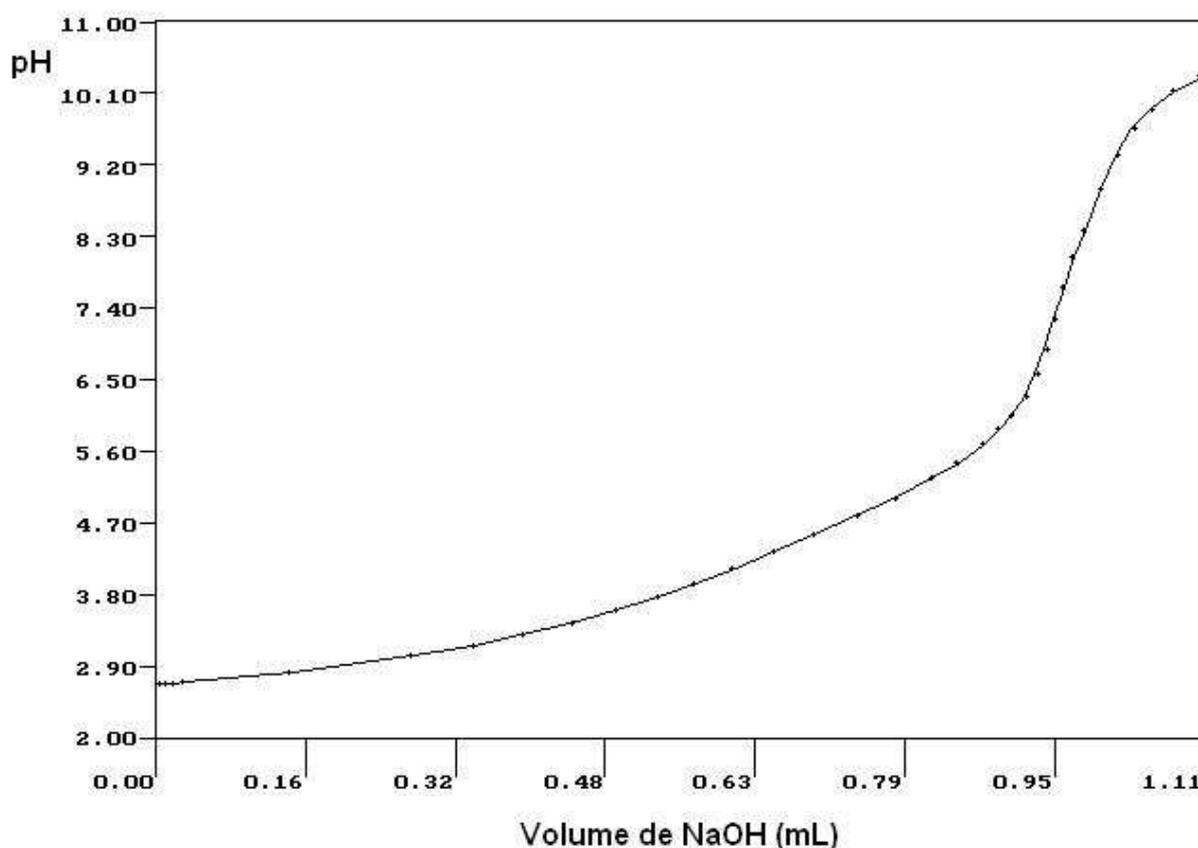
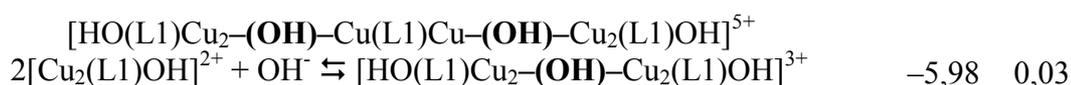


Figura 3.11. Curvas de titulação experimental (---) e calculada (· · ·) correspondentes a uma solução aquosa de **1** de concentração igual a 10^{-3} mol L⁻¹, utilizando-se como titulante uma solução aquosa padronizada de hidróxido de sódio 0,10164 mol L⁻¹. Temperatura: 25,0 °C; $I = 0,10$ mol L⁻¹ (NaCl).

Tabela 3.3. Constantes cumulativas de protonação / desprotonação para **1** em solução aquosa, obtidas a partir de dados potenciométricos com o auxílio do programa SUPERQUAD. Os respectivos equilíbrios químicos também são mostrados. Temperatura: 25,0 °C; $I = 0,10$ mol L⁻¹ (NaCl)

Equilíbrio	- log	
$[\text{Cu}_2(\text{L1})\text{OH}]^{2+} + \text{H}_3\text{O}^+ \rightleftharpoons [\text{Cu}_2(\text{L1})(\text{OH}_2)_2]^{3+}$	5,40	0,01
$[\text{Cu}_2(\text{L1})\text{OH}]^{2+} + 2\text{H}_3\text{O}^+ \rightleftharpoons [\text{Cu}_2(\text{HL1})(\text{OH}_2)_2]^{4+} + \text{H}_2\text{O}$	9,72	0,01
$[\text{Cu}_2(\text{L1})\text{OH}]^{2+} + 3\text{H}_3\text{O}^+ \rightleftharpoons [\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{L1})(\text{OH}_2)_2]^{5+} + 2\text{H}_2\text{O}$	12,82	0,01
$2[\text{Cu}_2(\text{L1})\text{OH}]^{2+} + \text{H}_3\text{O}^+ \rightleftharpoons [(\text{L1})\text{Cu}_2-(\text{OH})-\text{Cu}_2(\text{L1})(\text{OH}_2)_2]^{5+}$	8,05	0,08
$3[\text{Cu}_2(\text{L1})\text{OH}]^{2+} + \text{OH}^- \rightleftharpoons$	-3,2	0,1



As curvas de distribuição das espécies foram calculadas a partir das constantes obtidas através do programa SCECS⁽¹¹⁰⁾ e são mostradas na Figura 3.12.

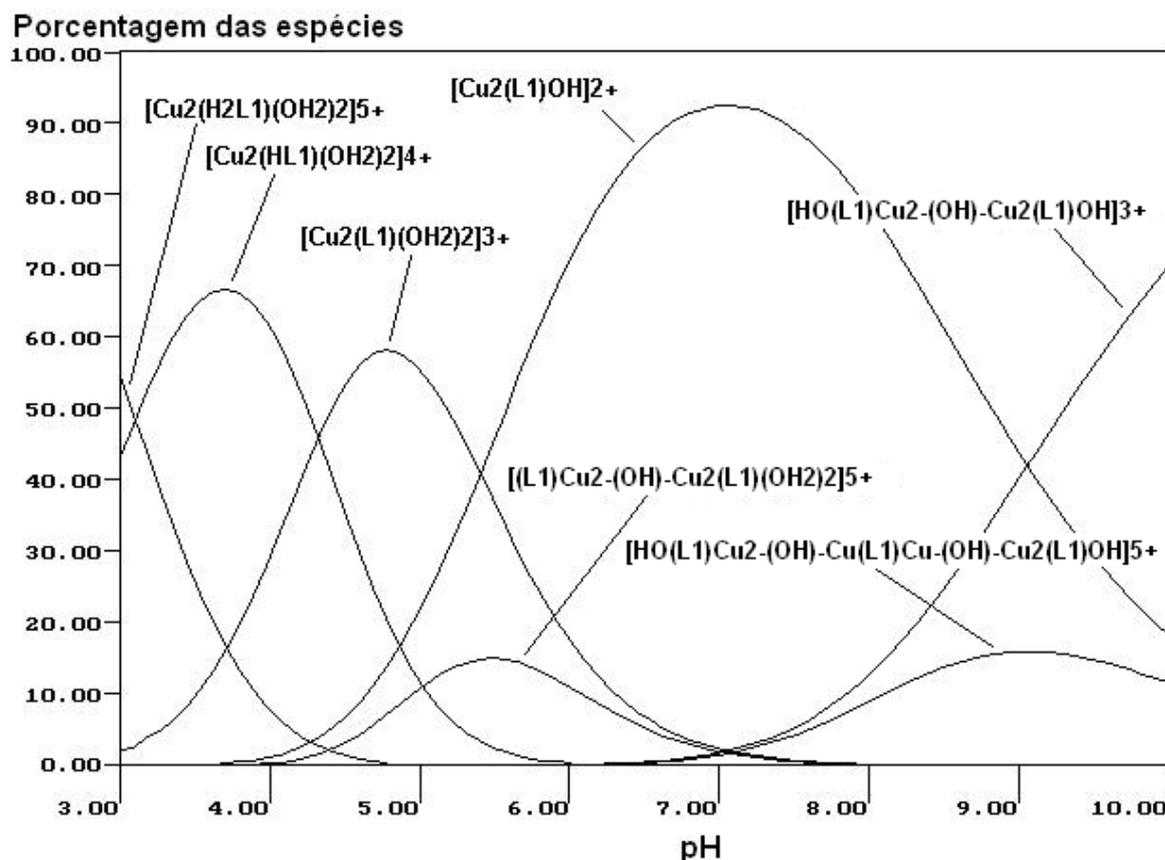


Figura 3.12. Curvas de distribuição das espécies para **1**, calculadas pelo programa computacional SCECS. As porcentagens foram determinadas em relação à quantidade total de complexo **1** em solução. $[\mathbf{1}] = 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Pode ser observado que a espécie do tipo β -hidroxo $[\text{Cu}_2(\text{L1})\text{OH}]^{2+}$, cuja estrutura foi determinada por difratometria de raios-X, predomina numa ampla faixa de pH (de 5,4 a 9,0) e apresenta um máximo de concentração (acima de 90%) em torno de pH 7. Em meio ácido, $[\text{Cu}_2(\text{L1})\text{OH}]^{2+}$ reage com íons H_3O^+ em diversas estequiometrias, fornecendo uma série de formas protonadas. Inicialmente, o cátion $[\text{Cu}_2(\text{L1})\text{OH}]^{2+}$ aceita um próton gerando o diáqua-complexo $[\text{Cu}_2(\text{L1})(\text{OH}_2)_2]^{3+}$, que se torna a principal espécie do sistema por volta de pH 5. Este comportamento foi observado também por Torelli *et al.* e Belle *et al.* para uma série de complexos simétricos do tipo $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$ ^(63,64). A título de exemplo, Torelli encontrou um pK_a de 4,95 \pm 0,05 para a formação da espécie β -hidroxo no composto do ligante simétrico H-BPMP, o qual é condizente com o valor aqui obtido de 5,40 \pm 0,01. Entretanto, um ponto de diferença reside no fato de que, nos sistemas estudados por S. Torelli, C. Belle e seus colaboradores, o

diáqua-complexo constituía a espécie com maior grau de protonação detectada. No presente trabalho, verificou-se que $[\text{Cu}_2(\text{L1})(\text{OH}_2)_2]^{3+}$, por sua vez, é capaz de reagir novamente (uma ou até duas vezes) com íons hidrônio para protonar o(s) braço(s) pendente(s) AAZ de L1 no(s) átomo(s) de nitrogênio que ocupam as posições de coordenação apicais (N26 e N36). Isto implica que esses átomos doadores devem deixar as esferas de coordenação dos centros cúpricos no processo. Em virtude deste fato, é provável que as espécies $[\text{Cu}_2(\text{HL1})(\text{OH}_2)_2]^{4+}$ e $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{L1})(\text{OH}_2)_2]^{5+}$ possuam, respectivamente, um e dois centros de cobre(II) de geometria quadrática planar em suas estruturas.

Outra característica interessante deste sistema é que, além das espécies monoméricas binucleares discutidas acima, foi necessária a proposição de espécies diméricas e trimérica [contendo quatro e seis íons cobre(II), respectivamente] para se conseguir um ajuste adequado entre os dados experimentais e o modelo teórico de equilíbrio. A formação de dímeros não é fato raro na Química dos compostos binucleares de cobre. Apenas para citar um exemplo, na sua Tese de Doutorado, R. Peralta ⁽¹⁰²⁾ descreve o isolamento de duas espécies diméricas de cobre(II) na tentativa de síntese de complexos binucleares monoméricos desse metal. Estes dímeros foram caracterizados cristalograficamente como $[\text{Cu}_2(\text{bpbmp-CH}_3)\text{OH}]_2^{2+}$, no qual duas pontes do tipo -hidroxo conectam ambas as subunidades, e $[\text{Cu}_2(\text{bpbmp})\text{OH}]_2^{2+}$, onde o dímero em questão é estabilizado através de duas pontes -hidroxo e duas pontes -fenoxo inter-monômero. Voltando ao sistema de nosso interesse, envolvendo compostos do ligante diazepínico HL1, a primeira forma dimérica, $[(\text{L1})\text{Cu}_2-(\text{OH})-\text{Cu}_2(\text{L1})(\text{OH}_2)_2]^{5+}$, aparece em pH 4, atinge a sua máxima concentração (15% de abundância relativa) em torno de pH 5,5 e se mantém presente em solução até pH 7,7. Este complexo provavelmente apresenta o seu ligante hidroxilo atuando como ponte intermolecular e conectando assim ambas subunidades. Em meio neutro a fracamente básico, uma outra espécie dimérica e uma trimérica são geradas simultaneamente pela reação de $[\text{Cu}_2(\text{L1})\text{OH}]^{2+}$ com íons hidróxido, cuja concentração se vê aumentada nesta faixa de pH. O complexo trimérico $[\text{HO}(\text{L1})\text{Cu}_2-(\text{OH})-\text{Cu}(\text{L1})\text{Cu}-(\text{OH})-\text{Cu}_2(\text{L1})\text{OH}]^{5+}$ parece ser menos estável e não contribui de forma significativa para o esquema de especiação (nunca ultrapassa 20% de abundância relativa). O dímero $[\text{HO}(\text{L1})\text{Cu}_2-(\text{OH})-\text{Cu}_2(\text{L1})\text{OH}]^{3+}$, entretanto, é a mais importante dentre as formas poliméricas descritas e torna-se a espécie predominante do sistema acima de pH 9. É plausível que este composto possua duas ou três pontes -hidroxo inter-monômero.

No caso do complexo **2**, o melhor ajuste entre os dados experimentais e os calculados entre pH 2,6 e 9,5 (Figura 3.13) foi obtido através da proposição de um esquema de equilíbrio contendo quatro espécies (Tabela 3.4).

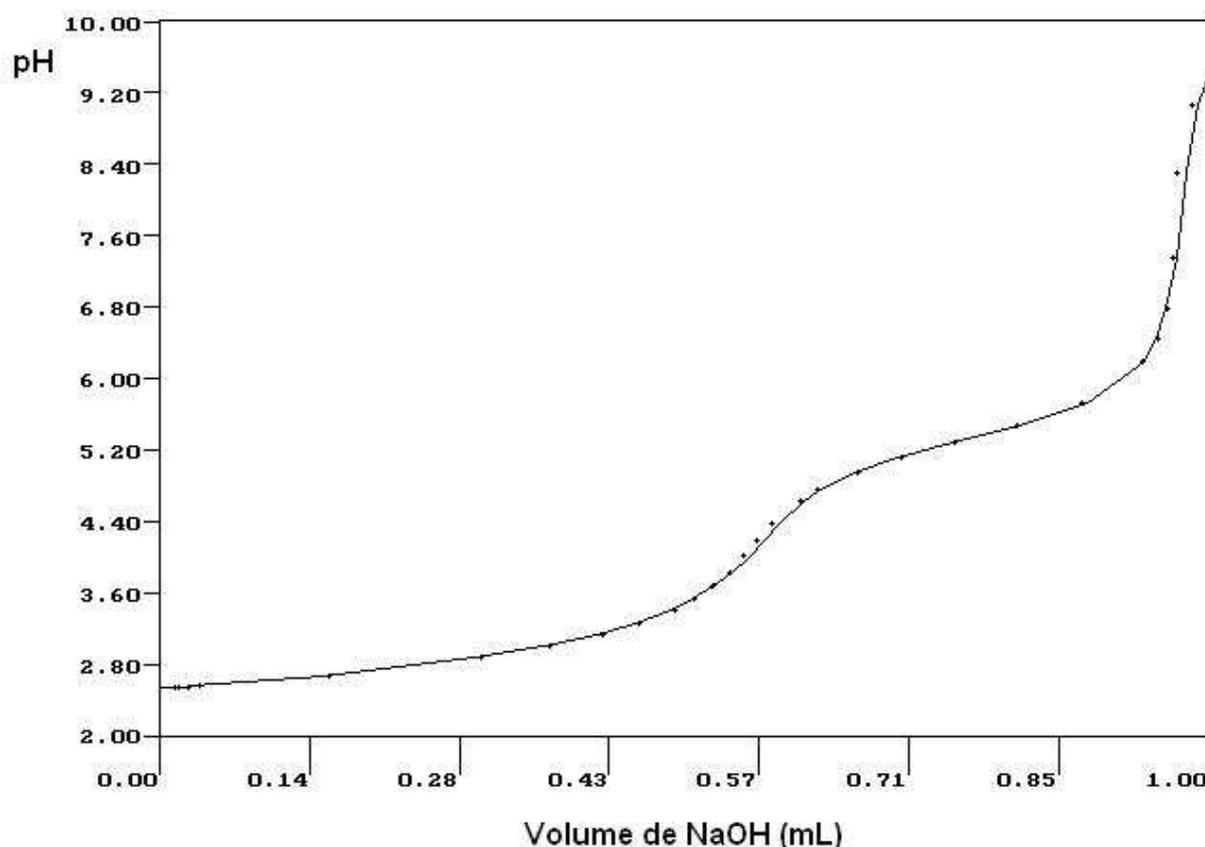


Figura 3.13. Curvas de titulação experimental (---) e calculada (· · ·) correspondentes a uma solução aquosa de **2** de concentração igual a $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando-se como titulante uma solução aquosa padronizada de hidróxido de sódio $0,10164 \text{ mol L}^{-1}$. Temperatura: $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (NaCl).

Tabela 3.4. Constantes cumulativas de protonação / desprotonação para **2** em solução aquosa, obtidas a partir de dados potenciométricos com o auxílio do programa SUPERQUAD. Os respectivos equilíbrios químicos também são mostrados. Temperatura: $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (NaCl)

Equilíbrio	- log
$[\text{Cu}_2(\text{L}2)\text{OH}]^{2+} + \text{H}_3\text{O}^+ \rightleftharpoons [\text{Cu}_2(\text{L}2)(\text{OH}_2)_2]^{3+}$	5,34 0,04
$[\text{Cu}_2(\text{L}2)\text{OH}]^{2+} + 2\text{H}_3\text{O}^+ \rightleftharpoons [\text{Cu}_2(\text{HL}2)(\text{OH}_2)_2]^{4+} + \text{H}_2\text{O}$	10,63 0,02
$[\text{Cu}_2(\text{L}2)\text{OH}]^{2+} + \text{OH}^- \rightleftharpoons [\text{Cu}_2(\text{L}2)(\text{OH})_2]^+$	-10,2 0,1

As curvas de distribuição das espécies, como calculadas pelo algoritmo do programa SCECS, são mostradas na Figura 3.14.

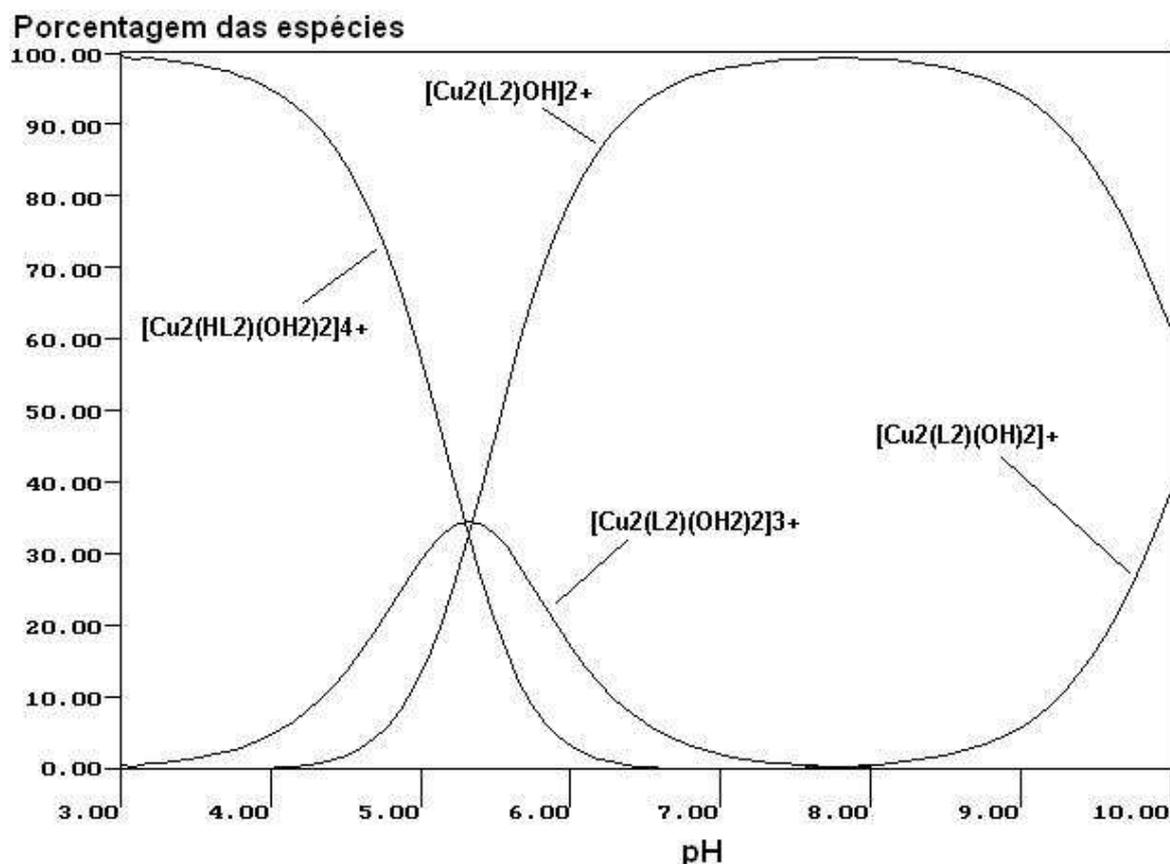


Figura 3.14. Curvas de distribuição das espécies para **2**, calculadas pelo programa computacional SCECS. As porcentagens foram determinadas em relação à quantidade total de complexo **2** em solução. $[2] = 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Pode ser observado que, em comparação com **1**, o composto **2** apresenta um conjunto reduzido de espécies, provavelmente como consequência de duas particularidades estruturais desse sistema: (i) a presença de apenas uma unidade AAZ em L2, e (ii) a grande assimetria apresentada pelo complexo **2**, a qual parece prevenir a formação dos agregados diméricos e triméricos observados no caso de **1**. A principal espécie do sistema, predominando de meio fracamente ácido a básico, é aquela contendo a ponte -hidroxo $[Cu_2(L_2)OH]^{2+}$, que teve a sua estrutura resolvida por cristalografia de raios-X. Ela começa a predominar em solução a partir de pH 5,4 e mantém essa condição por sobre toda a faixa de pHs estudada. À medida que o pH decresce, $[Cu_2(L_2)OH]^{2+}$ reage com íons hidrônio para originar um par de estados protonados diferentes: o diáqua-complexo $[Cu_2(L_2)(OH_2)_2]^{3+}$ e a espécie $[Cu_2(HL_2)(OH_2)_2]^{4+}$, em que o braço pendente AAZ encontra-se protonado no nitrogênio N26. As constantes de equilíbrio macroscópicas determinadas para ambas as formas são praticamente idênticas, o que significa que há uma sobreposição entre os processos de dissociação por elas descritos. Assim, essas constantes macroscópicas são compostas e, a rigor, não podem ser atribuídas a equilíbrios individuais. $[Cu_2(L_2)(OH_2)_2]^{3+}$ nunca chega a se tornar a principal espécie dentro do seu sistema, outro ponto de diferença em relação ao comportamento de especiação de **1**.

Abaixo de pH 5,4, $[\text{Cu}_2(\text{HL}_2)(\text{OH}_2)_2]^{4+}$ predomina. Por outro lado, em meio básico (acima de pH 8), a reação de $[\text{Cu}_2(\text{L}_2)\text{OH}]^{2+}$ com íons OH^- fornece a espécie $[\text{Cu}_2(\text{L}_2)(\text{OH})_2]^+$, na qual propomos a presença de dois ligantes hidroxó exógenos terminalmente coordenados, um para cada centro de cobre(II).

e) Títulações espectrofotométricas

A espectroscopia eletrônica também foi utilizada na caracterização dos equilíbrios de especiação dos complexos **1** e **2** em solução aquosa. Os melhores resultados foram obtidos monitorando-se a banda de transferência de carga ligante-metal na faixa de 300 a 500 nm. Testes preliminares mostraram que os sistemas em questão apresentavam um comportamento muito mais estável em meio ácido que em meio básico. Acima de pH 7,0, para o complexo **1**, e acima de pH 5,5, para **2**, as medidas da concentração hidrogeniônica não estabilizaram e uma diminuição progressiva no valor do pH foi verificada com o passar do tempo. Isto sugere a ocorrência de algum tipo de reação paralela indesejada que libera H^+ para o meio, ou que consome OH^- . Em vista disso, as títulações espectrofotométricas foram realizadas somente abaixo de pH 7.

Composto 1. Por motivos de simplificação, o conjunto de espectros obtido para o composto **1** foi dividido em três diferentes seções de acordo com as faixas de pH estudadas, o que permite a melhor visualização das principais mudanças espectrais ocorridas quando o pH é aumentado progressivamente de 2,56 a 6,98 (Figura 3.15).

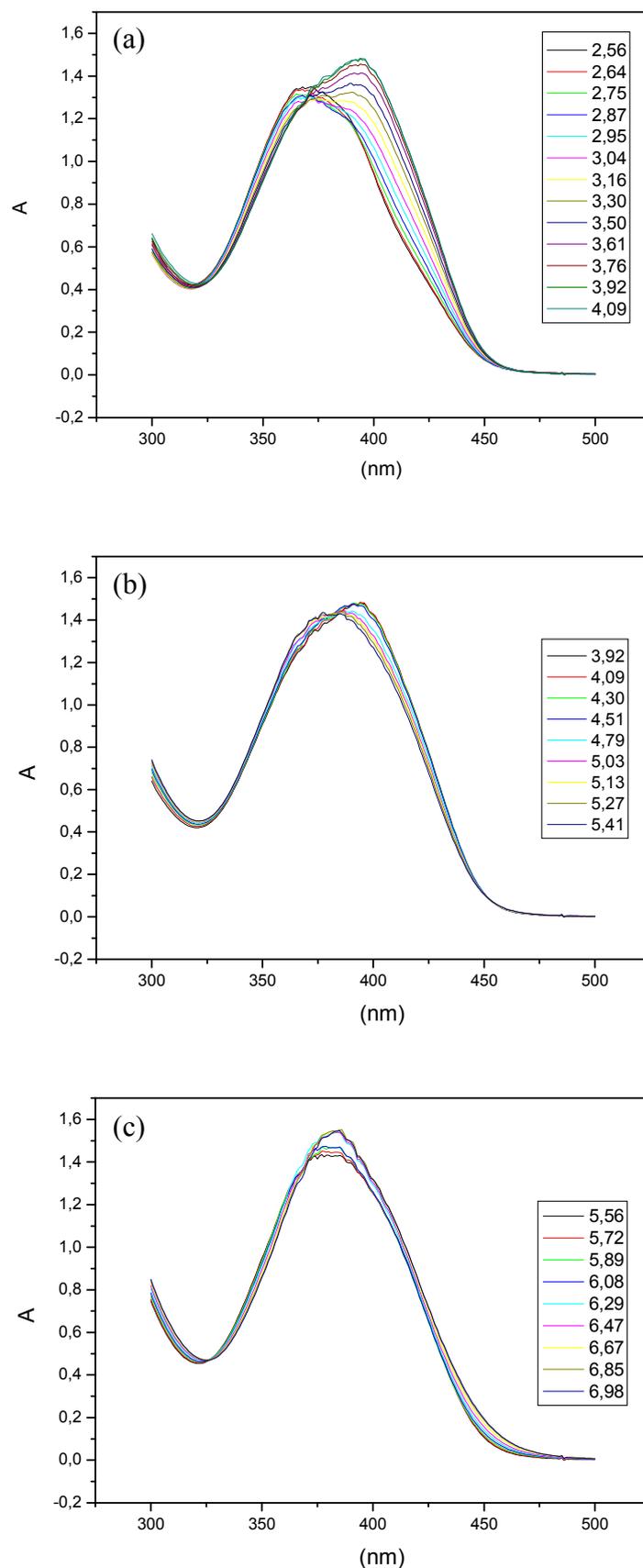


Figura 3.15. Espectros eletrônicos registrados durante a titulação de uma solução aquosa $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de **1**. (a) pH 2,56 a 4,09; (b) pH 3,92 a 5,41; (c) pH 5,56 a 6,98. Temperatura: $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (NaCl).

A Figura 3.15(a) mostra a seção que vai de pH 2,56 a pH 4,09. As curvas relacionadas com os menores valores de pH se caracterizam pela presença de banda a aproximadamente 370 nm, com um ombro em frequências um pouco menores. À medida que o pH aumenta, a absorção se intensifica e um progressivo deslocamento batocrômico é observado, resultando num espectro que possui uma banda a aproximadamente 395 nm e um ombro em frequências maiores. A não existência de um ponto isobéptico bem definido constitui indicativo de que mais de duas espécies coexistem no equilíbrio. Uma análise direta através do método gráfico, colocando-se a absorvância a 394 nm em função do pH, forneceu um pK_a de $3,26 \pm 0,03$, o qual encontra-se em boa concordância com aquele obtido via titulação potenciométrica (isto é, $12,82 - 9,72 = 3,10$). A seção compreendida entre pH 3,92 e pH 5,41 pode ser vista na Figura 3.15(b). Neste caso, o aumento no pH do meio provoca um deslocamento hipsocrômico com uma concomitante porém leve diminuição na intensidade da absorção. O último espectro (pH 5,41) apresenta uma banda simétrica a aproximadamente 380 nm. Um pK_a de $4,81 \pm 0,06$ foi obtido graficamente a partir deste conjunto de curvas (absorvância a 394 nm), o qual, dentro de um erro de 10%, está de acordo com os dados potenciométricos ($9,72 - 5,40 = 4,32$). A última seção, que vai de pH 5,56 a pH 6,98 encontra-se representada na Figura (3.15c). As mudanças espectrais observadas com a elevação do pH não são muito significativas neste caso: somente um acréscimo na intensidade e um pequeno deslocamento batocrômico foram detectados. Um valor de “ pK_a ” igual a $6,10 \pm 0,05$ pode ser derivado a partir desses pontos experimentais (absorvância a 385 nm). Provavelmente, trata-se de uma constante composta, descrevendo dois fenômenos que ocorrem simultaneamente, a saber, a formação do diáqua-complexo $[Cu_2(L1)(OH_2)_2]^{3+}$ e a dimerização de **1**, a gerar $[(L1)Cu_2-(OH)-Cu_2(L1)(OH_2)_2]^{5+}$. O espectro a pH 6,98 consiste em uma banda bastante simétrica centrada a aproximadamente 385 nm, bem diferente daquele obtido após dissolução direta do complexo em meio aquoso (ou seja, sem abaixar o pH até 2,56 para depois voltar à neutralidade titulando com NaOH), o qual é constituído de uma banda simétrica centrada em 367 nm. Isto sugere a existência de uma certa irreversibilidade em um ou mais dos processos descritos acima para **1**.

Composto 2. Para este composto, as mudanças espectrais decorrentes do aumento de pH, as quais podem ser observadas na Figura 3.16, ocorrem numa única e contínua etapa ao longo do intervalo 2,98-7,02. O espectro a pH 2,98 caracteriza-se pela presença de uma banda bastante simétrica, com máximo em aproximadamente 390 nm. Um aumento no pH do meio provoca uma diminuição progressiva na intensidade desta absorção e o concomitante aparecimento de

uma outra, igualmente simétrica, centrada a aproximadamente 360 nm. Pelo método gráfico (absorvância a 388 nm), um único pK_a de 5,462 ± 0,003 foi determinado, o qual está em ótima concordância com os valores de 5,34 e 5,29 obtidos potenciométricamente. Apesar de não se ter um ponto isobéstico perfeitamente definido, o que indica a coexistência de mais de duas espécies no equilíbrio, acredita-se, dentro da faixa de erro, estar observando principalmente dois compostos: $[Cu_2(HL_2)(OH_2)_2]^{4+}$ e $[Cu_2(L_2)OH]^{2+}$. A espécie $[Cu_2(L_2)(OH_2)_2]^{3+}$, por sua vez, se encontraria presente em baixas concentrações. Diferentemente do observado para **1**, o sistema constituído pelo complexo **2** e suas formas protonadas apresenta-se completamente reversível. O composto binuclear de cobre contendo apenas grupos metilpiridina como braços pendentes, descrito por Torelli *et al.*, também mostra esta característica, o que pode sugerir que a irreversibilidade observada em **1** esteja relacionada com a presença de duas unidades AAZ no ligante e a conseqüente possibilidade de protonação múltipla deste no complexo.

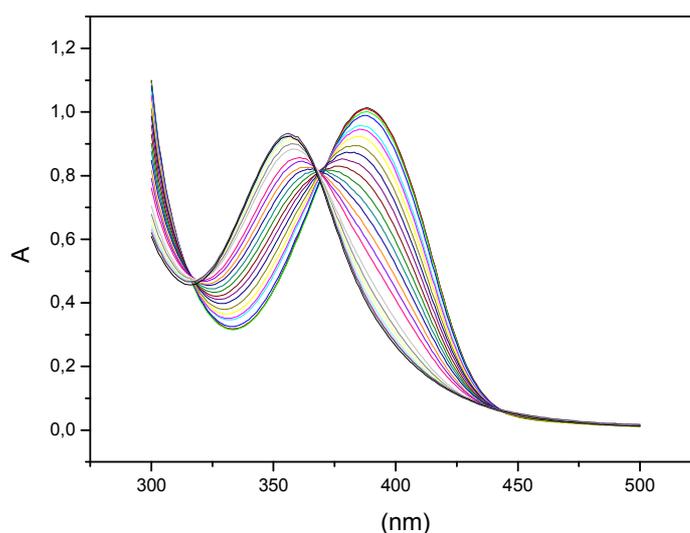


Figura 3.16. Espectros eletrônicos registrados durante a titulação de uma solução aquosa $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de **2**. Valores de pH variando entre 2,98 e 7,02. Temperatura: $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (NaCl).

Uma forma muito mais acurada e elegante de se empregar os dados provenientes das titulações espectrofotométricas na obtenção de informações sobre o sistema em equilíbrio é mediante a utilização de programas computacionais especialmente desenvolvidos para esse fim. Neste trabalho, optou-se pelo programa SQUAD, publicado originalmente por Leggett e McBryde em 1975⁽⁹⁸⁾. O algoritmo do SQUAD permite calcular constantes de estabilidade de espécies em equilíbrio químico a partir de dados espectrofotométricos nas regiões do visível e ultravioleta, onde a absorvância total medida é resultante das contribuições individuais dos constituintes do sistema. Ele também é capaz de estimar os espectros teóricos (absortividades molares) de cada uma das espécies absorventes envolvidas nos modelos de equilíbrio. Uma

vantagem deste programa é que nem todas as constantes de estabilidade e absorvidades molares precisam ser calculadas simultaneamente, podendo algumas delas ser mantidas fixas a critério do usuário. Assim, caso as constantes de formação sejam conhecidas, o programa pode ser usado para calcular somente as absorvidades molares. Analogamente, sendo as absorvidades conhecidas, pode-se calcular apenas constantes de formação. Para o caso do composto **1**, o melhor ajuste entre os dados experimentais obtidos na faixa de pH 2,87-6,98 e aqueles calculados pelo programa foi conseguido pela proposição de um modelo que inclui todos os quatro equilíbrios identificados potenciométricamente em meio ácido, o que reforça a validade do sistema proposto. As absorvidades molares das quatro espécies monoméricas envolvidas foram calculadas simultaneamente, assim como três das quatro constantes de equilíbrio. Somente a constante de formação do dímero $[(L1)Cu_2-(OH)-Cu_2(L1)(OH_2)_2]^{5+}$ foi fixada em 8,05, valor este calculado via titulações potenciométricas. Na Figura 3.17, podem ser apreciados os espectros teóricos das espécies monoméricas presentes em meio ácido. Para o complexo **2**, o modelo de equilíbrio proposto com suporte nos dados espectrofotométricos registrados entre pH 2,90 e 7,02 também está em perfeita concordância com aquele obtido via potenciometria. Neste caso, as duas constantes de equilíbrio e as absorvidades molares das três espécies envolvidas foram calculadas de forma concomitante. A Figura 3.18 mostra os espectros teóricos das três espécies presentes em meio ácido para o sistema **2**. Cabe destacar ainda que os valores obtidos através dos programas SUPERQUAD (dados potenciométricos) e SQUAD (espectrofotométricos) estão em boa concordância mútua. A Tabela 3.5 apresenta um panorama geral comparativo das constantes calculadas pelas técnicas potenciométrica e espectrofotométrica (métodos gráfico e computacional) para os sistemas **1** e **2**.

Tabela 3.5. Panorama geral comparativo das constantes cumulativas de protonação / desprotonação calculadas a partir de dados potenciométricos e espectrofotométricos (método gráfico e computacional) para os sistemas **1** e **2** em solução aquosa. Temperatura: 25,0 °C; $I = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (NaCl)

	ESPÉCIE	POTENCIOMETRIA		ESPECTROFOTOMETRIA			
				Gráfico		SQUAD	
1	$[Cu_2(L1)(OH_2)_2]^{3+}$	5,40	0,01	6,10	0,05	5,79	0,01
	$[Cu_2(HL1)(OH_2)_2]^{4+}$	9,72	0,01	10,91	0,06	9,97	0,04
	$[Cu_2(H_2L1)(OH_2)_2]^{5+}$	12,82	0,01	14,17	0,06	12,98	0,03
	$[(L1)Cu_2-(OH)-Cu_2(L1)(OH_2)_2]^{5+}$	8,05	0,08	–		–	
	$[HO(L1)Cu_2-(OH)-Cu(L1)Cu-(OH)-Cu_2(L1)OH]^{5+}$	–3,2	0,1	–		–	
	$[HO(L1)Cu_2-(OH)-Cu_2(L1)OH]^{3+}$	–5,98	0,03	–		–	
2	$[Cu_2(L2)(OH_2)_2]^{3+}$	5,34	0,04	5,462	0,003	5,066	0,004
	$[Cu_2(HL2)(OH_2)_2]^{4+}$	10,63	0,02			10,956	0,004
	$[Cu_2(L2)(OH_2)]^+$	–10,2	0,1	–		–	

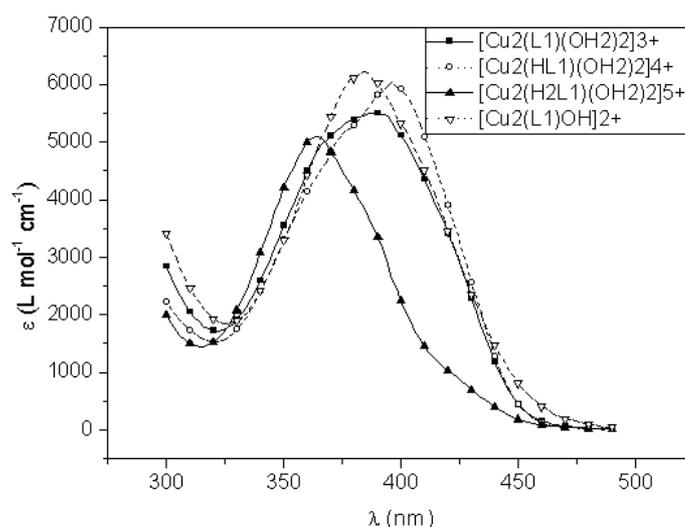


Figura 3.17. Espectros teóricos (absortividades molares), calculados pelo programa computacional SQUAD, do complexo **1** e das suas formas protonadas monoméricas presentes em equilíbrio abaixo de pH 7.

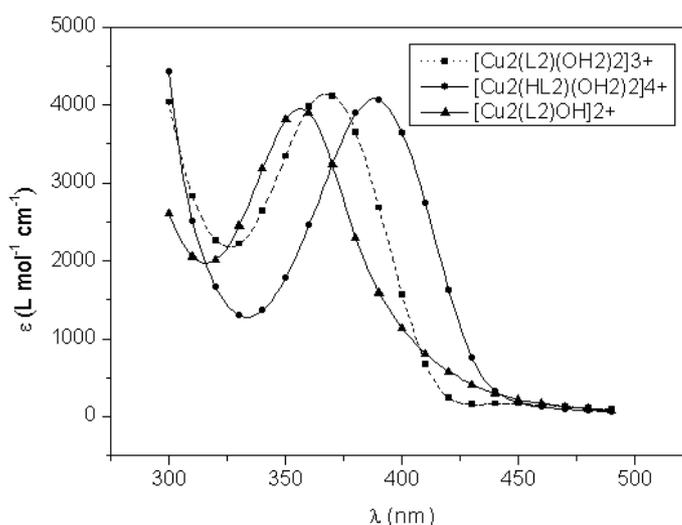


Figura 3.18. Espectros teóricos (absortividades molares), calculados pelo programa computacional SQUAD, do complexo **2** e das suas formas protonadas monoméricas presentes em equilíbrio abaixo de pH 7.

REATIVIDADE QUÍMICA E TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

a) Atividade de catecolase

Efeito do pH e determinação dos parâmetros cinéticos

Como era de se esperar em virtude da sua semelhança estrutural com o sítio ativo das catecol oxidases, tanto o composto **1** quanto **2** são capazes de catalisar a oxidação do substrato modelo 3,5-di-*terc*-butilcatecol (3,5-dtbc) à correspondente *o*-quinona 3,5-dtbq (Figura 3.19). Este substrato foi escolhido para esses estudos por apresentar um baixo potencial redox, o que facilita a formação da 3,5-di-*terc*-butilquinona, além de possuir substituintes volumosos que impedem a ocorrência de outras reações de oxidação-redução e polimerização indesejadas.

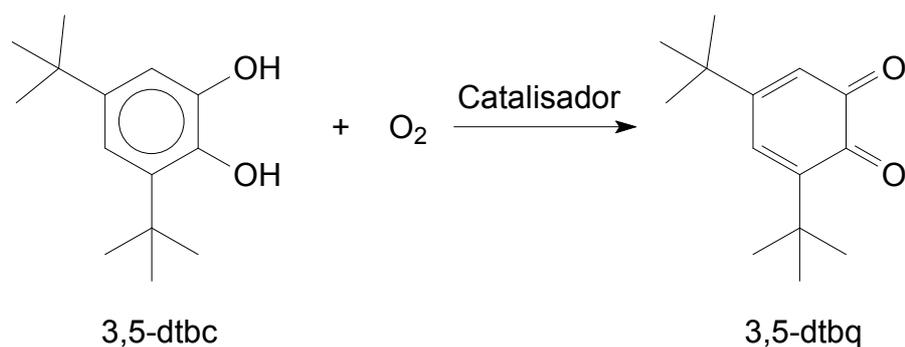


Figura 3.19. Esquema ilustrativo mostrando a reação de oxidação do substrato modelo 3,5-di-*tert*-butilcatecol.

Inicialmente, um estudo sobre a dependência da velocidade da reação com o pH foi realizado para se determinar a faixa de concentrações hidrogeniônicas em que cada complexo mostra a sua máxima atividade catalítica. Ambos os compostos apresentaram perfis cinéticos semelhantes (Figuras 3.20 e 3.21, respectivamente).

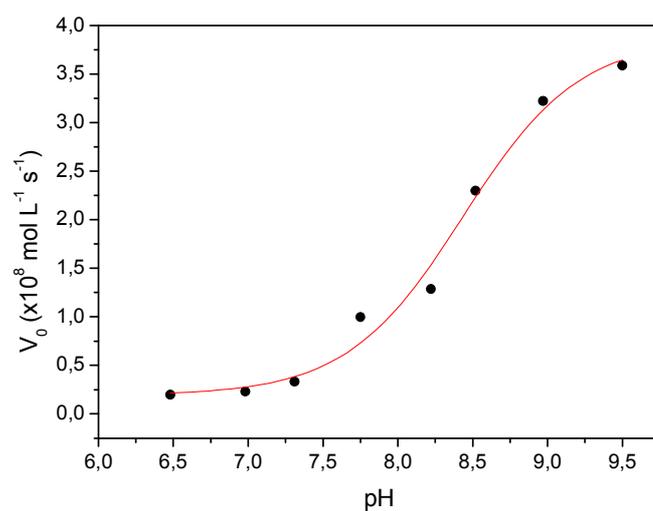


Figura 3.20. Dependência, em relação ao pH, da atividade oxidativa de **1** frente ao substrato modelo 3,5-dtbc, numa mistura solvente metanol / água (32:1 v/v). Condições experimentais usadas: $[\mathbf{1}]_{\text{final}} = 2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{S}]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura: 25,0 °C.

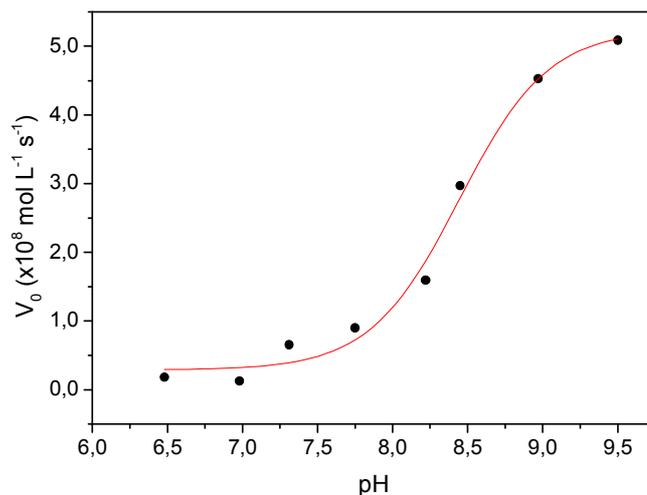


Figura 3.21. Dependência, em relação ao pH, da atividade oxidativa de **2** frente ao substrato modelo 3,5-dtbc, numa mistura solvente metanol / água (32:1 v/v). Condições experimentais usadas: $[2]_{\text{final}} = 2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[S]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura: 25,0 °C.

Para o complexo **1**, um pK_a cinético de $8,36 \pm 0,06$ foi encontrado. Quando cruzamos esse valor com a curva de distribuição das espécies obtida a partir dos dados das titulações potenciométricas, duas possíveis hipóteses surgem. A primeira: que a espécie cataliticamente ativa seja a forma trimérica $[\text{HO}(\text{L1})\text{Cu}_2-(\text{OH})-\text{Cu}(\text{L1})\text{Cu}-(\text{OH})-\text{Cu}_2(\text{L1})\text{OH}]^{5+}$, presente a baixas concentrações em solução e de detalhes estruturais desconhecidos (o que praticamente impossibilitaria a proposição de um mecanismo para a reação). Já a outra possibilidade, mais plausível, seria a de que a espécie ativa fosse, de fato, o próprio composto **1**, cuja estrutura foi elucidada por difração de raios-X. Neste caso, o pK_a cinético encontrado estaria relacionado com a desprotonação da primeira hidroxila do substrato, o qual, de início, se coordenaria a **1** em forma monodentada a apenas um dos centros cúpricos. Os pK_a s para a primeira e segunda desprotonações do 3,5-di-*terc*-butilcatecol “livre” são, respectivamente, iguais a 10,3 e 14,7. Assim, a coordenação abaixaria o primeiro pK_a do substrato de 10,3 para o valor observado de $\sim 8,4$. Para o complexo **2**, por outro lado, um pK_a cinético igual a $8,47 \pm 0,09$ foi obtido. Aqui, a única possibilidade a ser aventada é a de que o valor encontrado se relacione com a primeira desprotonação do substrato, coordenado de modo monodentado a apenas um dos centros de cobre, uma vez que a curva de distribuição de espécies para **2** não mostra nenhuma forma desprotonada sendo gerada em quantidades apreciáveis nessa faixa de pH. Neste caso, uma coordenação bidentada em ponte a **2** seria impensável, já que a posição de coordenação livre existente no centro Cu1 ocorre segundo um eixo perpendicular ao eixo z da espécie central Cu2. Como o substrato não estava presente na realização dos experimentos potenciométricos, a sua desprotonação não pôde ser registrada nos mesmos. Levando-se em consideração os

pK_a s cinéticos encontrados, a dependência da velocidade da reação em relação à concentração de substrato foi estudada em pH 9,0 para ambos os compostos. Para efeito de comparação, a atividade das catecol oxidases é observada entre pH 5 e 8, com um máximo em pH 8⁽¹¹¹⁾. É importante salientar que, abaixo de pH 4 ou acima de pH 9, a enzima sofre perda irreversível da sua atividade. As velocidades iniciais obtidas para a faixa de concentrações de substrato utilizadas seguem uma cinética de saturação (Figuras 3.22 e 3.23 para **1** e **2**, respectivamente). Sendo assim, a equação de Michaelis-Menten pôde ser utilizada com o intuito de se ajustar os dados experimentais a um modelo de reação enzimática. A linearização foi realizada através do método de Lineweaver-Burk (“inset” nas Figuras), para se obter os parâmetros cinéticos de cada um dos sistemas.

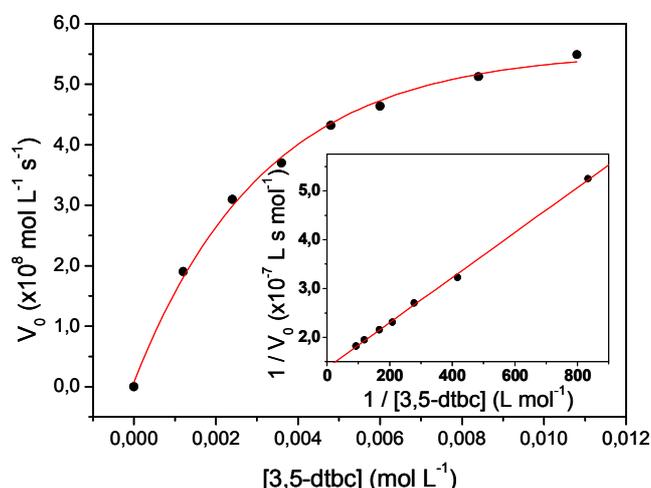


Figura 3.22. Dependência da velocidade da reação de oxidação catalisada pelo complexo **1** com a concentração de substrato a pH 9,0, numa mistura solvente metanol / água (32:1 v/v). “Inset”: gráfico dos duplos recíprocos. Condições experimentais: $[1]_{\text{final}} = 2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[S]_{\text{final}} = 1,2 \times 10^{-3}$ a $1,1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; 25,0 °C.

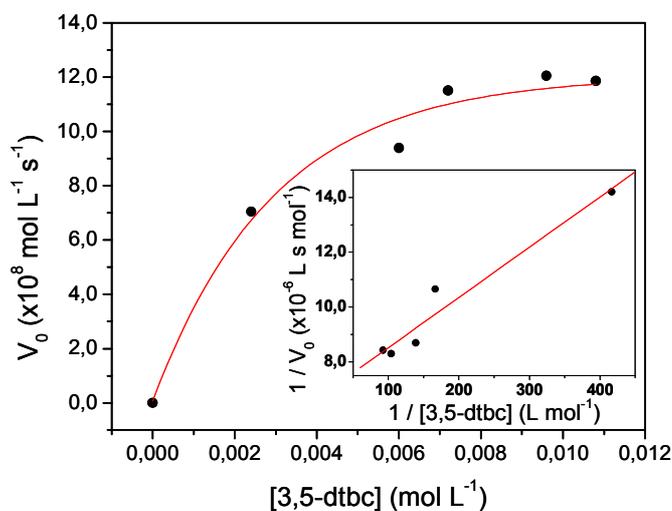


Figura 3.23. Dependência da velocidade da reação de oxidação catalisada pelo complexo **2** com a concentração de substrato a pH 9,0, numa mistura solvente metanol / água (32:1 v/v). “Inset”: gráfico dos duplos recíprocos. Condições experimentais: $[2]_{\text{final}} = 2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[S]_{\text{final}} = 2,4 \times 10^{-3}$ a $1,1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; 25,0 °C.

Os parâmetros cinéticos encontrados para **1** e **2** são apresentados na Tabela 3.6. Dados pertencentes a outros compostos binucleares de cobre(II) publicados na literatura também são incluídos a modo de referência. Entre eles, estão dois dos complexos com melhor desempenho sintetizados nos laboratórios do Prof. Ademir Neves: $[\text{Cu}_2(\text{HLdtb})(-\text{OCH}_3)](\text{ClO}_4)_2$ (**D**)⁽¹⁰²⁾ e $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{bbppnol})(-\text{CH}_3\text{COO})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**E**)⁽¹¹²⁾; assim como o composto mais ativo de todos os reportados até o momento (**F**)⁽⁶¹⁾.

Tabela 3.6. Parâmetros cinéticos para a reação de oxidação do substrato 3,5-dtbc promovida por **1** e **2** a pH 9,0 e 25,0 °C. Dados referentes aos complexos da literatura **B**, **D**, **E** e **F** são incluídos aqui para efeito de comparação. No caso de **F**, os valores referem-se à primeira e segunda etapas de reação, respectivamente

Complexo	K_M (mol L ⁻¹)	$V_{\text{máx}}$ (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat} / K_M (L mol ⁻¹ s ⁻¹)
1	$4,0 \times 10^{-3}$	$8,3 \times 10^{-8}$	$3,46 \times 10^{-3}$	0,88
2	$2,7 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-7}$	$6,25 \times 10^{-3}$	2,31
B ^{a (63)}	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-6}$	–	–
D ^b	$4,0 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-7}$	$5,33 \times 10^{-3}$	1,35
E ^c	$7,9 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-7}$	$7,90 \times 10^{-3}$	10,0
F ^d	$1,5 \times 10^{-3}$	–	1,40	~900
	$2,4 \times 10^{-3}$	–	0,33	~140

Condições experimentais utilizadas: *a*- 25 °C (acetonitrila); *b*- 25 °C e pH 8,5 (metanol / água); *c*- 25 °C e pH 8,0 (metanol / água); *d*- 20 °C e pH 5,1 (metanol / água).

É interessante notar que o complexo não-simétrico, **2**, é o mais efetivo na oxidação do substrato 3,5-dtbc à correspondente quinona, apresentando uma eficiência catalítica (k_{cat} / K_M) de 2,31 L mol⁻¹ s⁻¹. Isto contesta alguns resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa para outros compostos modelos do tipo Cu₂^(75,102). Nesses complexos, foi verificado um aumento da atividade catalítica com a diminuição da diferença de potencial para a redução dos centros de cobre (*E*). Este comportamento é o inverso daquele apresentado por **1** e **2**. Em termos comparativos, a isoforma da ibCO com massa igual a 39 kDa apresenta valores de K_M (constante de Michaelis) de $2,5 \times 10^{-3}$, $3,8 \times 10^{-3}$ e $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para os difenóis catecol, 4-metilcatecol e ácido caféico, respectivamente⁽²³⁾. Em relação aos mesmos substratos, foram reportados valores para a constante catalítica k_{cat} de 2293, 3756 e 7852 s⁻¹, respectivamente. Do exposto acima, pode-se concluir que os compostos modelos aqui sintetizados apresentam uma interação muito forte com o substrato 3,5-dtbc, com valores de K_M da mesma ordem de grandeza do que aqueles apresentados pela ibCO. Entretanto, uma vez formado o complexo catalisador-substrato, a reação catalítica ocorre muito mais lentamente nos modelos descritos aqui que na enzima, com constantes k_{cat} algumas centenas de milhares de vezes menores.

Outro experimento importante para a compreensão do mecanismo envolvido na reação foi efetuado através de modificação do método de iodometria⁽⁷⁵⁾, estudando-se a formação de

peróxido de hidrogênio durante a oxidação do 3,5-dtbc catalisada pelos complexos **1** e **2**. Para ambos os casos, foi detectado o acúmulo de peróxido de hidrogênio no meio reacional, em comparação com experimentos feitos na ausência do catalisador. Assim, a reação segue uma estequiometria $3,5\text{-dtbc} + \text{O}_2 \rightarrow 3,5\text{-dtbcq} + \text{H}_2\text{O}_2$, e não $3,5\text{-dtbc} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow 3,5\text{-dtbcq} + \text{H}_2\text{O}$.

Proposição de mecanismo

Os resultados cinéticos obtidos permitiram a formulação de um possível mecanismo para a reação de oxidação do substrato 3,5-dtbc mediada pelos complexos **1** e **2**, o qual está esquematizado na Figura 3.24.

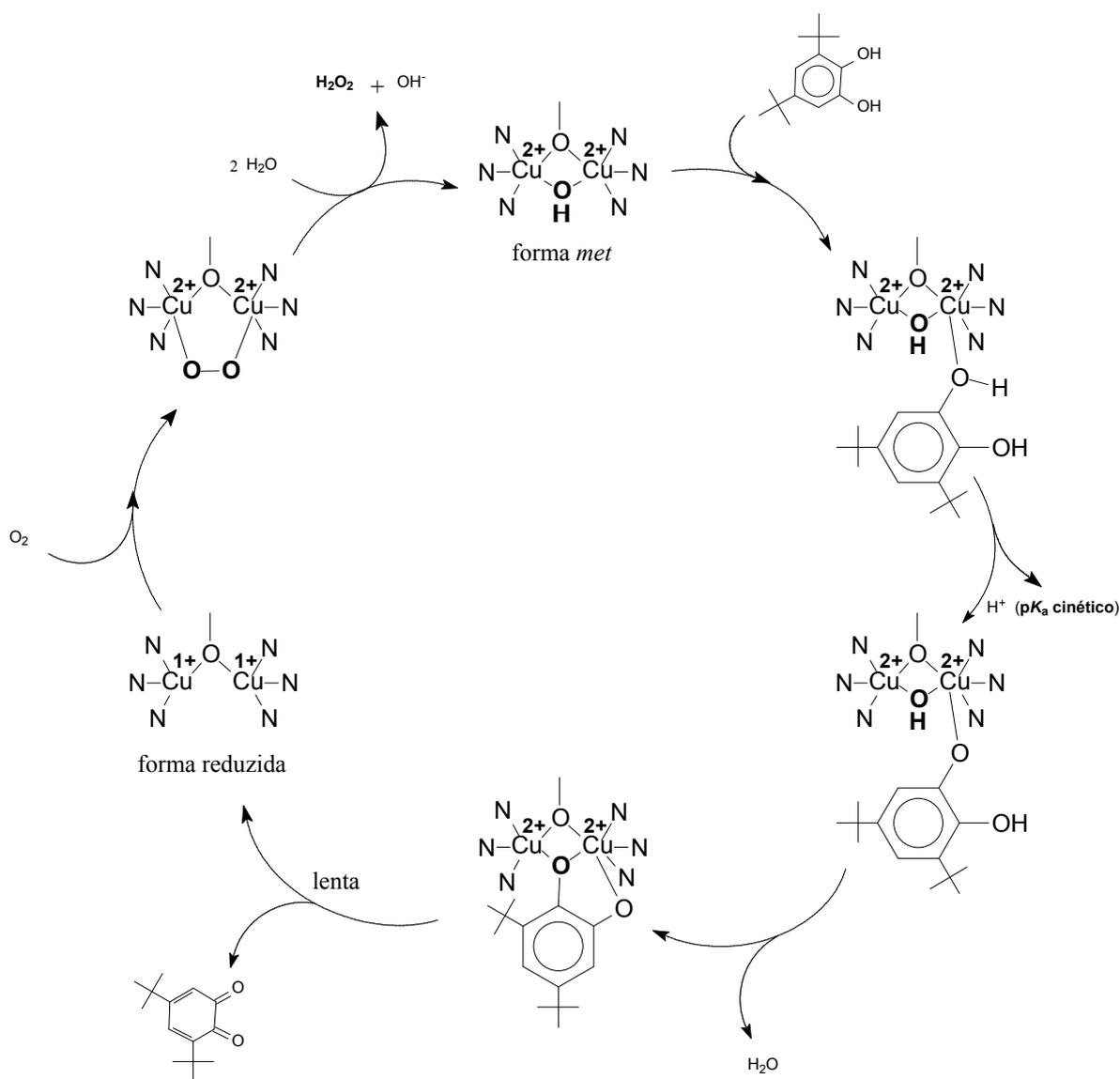


Figura 3.24. Mecanismo proposto para a oxidação do substrato 3,5-dtbc catalisada pelos compostos **1** e **2**.

O ciclo catalítico começa a partir do estado *met* dos complexos, o qual, tanto para **1** quanto para **2**, foi caracterizado por difração de raios-X. A fixação do substrato ocorreria em duas etapas. Inicialmente, uma molécula do 3,5-dtbc se coordenaria, de modo monodentado, a apenas um dos centros de cobre(II) do composto, gerando assim o primeiro aduto catalisador-substrato. No caso de **2** propõe-se, por questões de geometria, que a espécie central envolvida seja, especificamente, Cu₂. Como mencionado anteriormente, os pK_as cinéticos observados em 8,36 (complexo **1**) e 8,47 (**2**) corresponderiam então à primeira desprotonação do 3,5-dtbc coordenado. Cabe salientar que a ponte -hidroxo permanece no composto após a entrada do substrato. Essa ponte exógena tem papel fundamental na próxima etapa do ciclo, ajudando a desprotonar a segunda hidroxila do catecol, o qual mudaria a sua forma de coordenação para -²⁻:¹⁻, conforme proposição de Casella⁽²⁵⁾. Com o substrato completamente desprotonado, ocorre a reação de transferência de elétrons, o que resulta na liberação da quinona 3,5-dtbq e na conseqüente redução dos centros cúpricos, produzindo a forma reduzida do catalisador. A seguir, oxigênio molecular se coordena aos íons cuprosos presentes no complexo, levando a um estado intermediário cuja estrutura é tão somente uma proposição, uma vez que a assim chamada forma *oxy* não foi identificada experimentalmente no presente trabalho. Isto traz consigo a re-oxidação dos centros de cobre. Finalmente, duas moléculas de água reagiriam com o sistema formando peróxido de hidrogênio (subproduto este detectado quimicamente no meio) e regenerando o estado *met* do complexo, o que completaria o ciclo catalítico.

b) Atividade de fosfatase: promiscuidade catalítica

Como os compostos **1** e **2** apresentam em suas estruturas um potencial nucleófilo, constituído pelo ligante hidroxilo em ponte, a habilidade dos mesmos em promover a hidrólise do diéster de fosfato ativado bis(2,4-dinitrofenil)fosfato, ou BDNPP, foi também investigada (Figura 3.25). Muitas vezes, ésteres de fosfato ativados contendo bons grupos abandonadores são usados como modelos para ésteres de fosfato não-ativados de grande relevância biológica, tais como o DNA e o RNA.

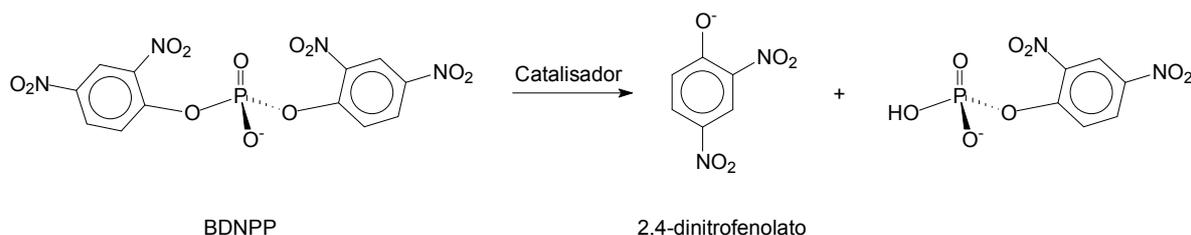


Figura 3.25. Esquema ilustrativo para a reação de hidrólise do substrato bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (BDNPP).

A possibilidade dos complexos aqui sintetizados clivarem diésteres de fosfato possui interessantes implicações no âmbito do fenômeno conhecido como promiscuidade catalítica. A promiscuidade catalítica é definida como a habilidade de um único sítio ativo de catalisar mais de uma transformação química diferente. Ela constitui uma importante propriedade de muitas enzimas e desempenha um papel natural na evolução e, ocasionalmente, na biossíntese de metabólitos secundários ⁽¹¹³⁾.

Efeito do pH e determinação dos parâmetros cinéticos

Tanto **1** quanto **2** foram capazes de hidrolisar a molécula de BDNPP. Assim, pode-se afirmar que ambos compostos exibem promiscuidade catalítica pelo fato de catalisarem não somente reações redox, mas também de hidrólise.

A atividade hidrolítica desses complexos mostrou uma forte dependência em relação ao pH do meio reacional (Figuras 3.26 e 3.27 para **1** e **2**, respectivamente). Contudo, os perfis desses gráficos são completamente diferentes nos dois compostos estudados. Por um lado, **1** apresenta perfil cinético em formato de duplo sino, podendo o menor deles ser considerado desprezível em relação ao maior. A atividade máxima é observada por volta de pH 7. A partir dos dados obtidos em meio ácido, pôde ser calculado um pK_a cinético de $6,2 \pm 0,1$. Este valor encontra-se em ótima concordância com aquele determinado para a formação da espécie do tipo -hidroxo ($6,10 \pm 0,05$ pelo método gráfico, utilizando-se dados espectrofotométricos). Além disso, o pico de atividade coincide de forma precisa com o valor de pH no qual a concentração de $[\text{Cu}_2(\text{L1})\text{OH}]^{2+}$ é máxima (comparar as Figuras 3.26 e 3.12). Estas evidências apontam $[\text{Cu}_2(\text{L1})\text{OH}]^{2+}$ como sendo a espécie cataliticamente ativa na hidrólise de BDNPP. Por outro lado, o complexo **2** mostra um perfil sigmoidal clássico, com um pK_a cinético de aproximadamente 10,5. Comportamento este similar ao observado por Rossi para uma série de compostos binucleares do tipo $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$ ⁽¹¹²⁾. Ao cruzarmos estas informações com aquelas contidas na Figura 3.14, foi possível se inferir que $[\text{Cu}_2(\text{L2})(\text{OH})_2]^+$, no qual não há pontes exógenas mas um ligante hidroxilo terminalmente coordenado a cada centro de cobre, constitui a espécie cataliticamente ativa. Desta maneira, pode-se concluir que a natureza das espécies que catalisam a hidrólise do substrato BDNPP é diferente para os compostos **1** e **2**.

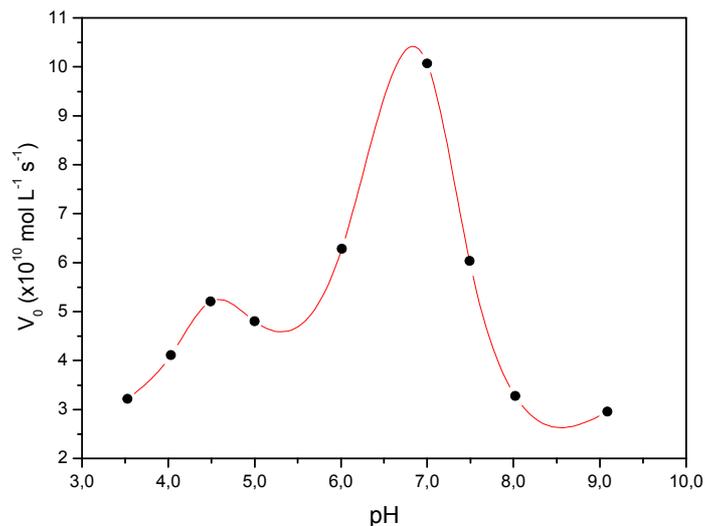


Figura 3.26. Dependência, em relação ao pH, da atividade hidrolítica de **1** frente ao substrato modelo BDNPP, numa mistura solvente água / acetonitrila (1:1 v/v). Condições experimentais usadas: $[1]_{\text{final}} = 4,0 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$; $[S]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$; temperatura: 50,0 °C.

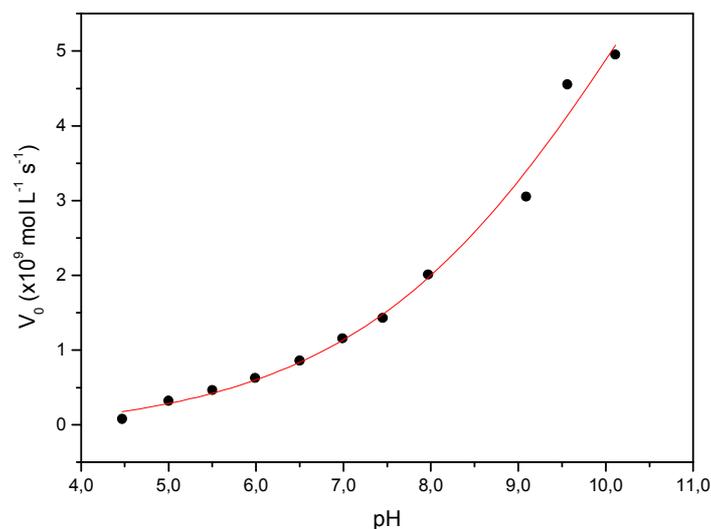


Figura 3.27. Dependência, em relação ao pH, da atividade hidrolítica de **2** frente ao substrato modelo BDNPP, numa mistura solvente água / acetonitrila (1:1 v/v). Condições experimentais usadas: $[2]_{\text{final}} = 4,0 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$; $[S]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$; temperatura: 50,0 °C.

Em virtude dos complexos serem ativos em diferentes faixas de pH, a dependência da velocidade da reação de hidrólise com a concentração de catalisador foi estudada em pH 6,0 para **1**, enquanto a dependência em relação à concentração de substrato foi avaliada em pH 9,6 para **2**. Alguns inconvenientes de ordem experimental enfrentados durante as cinéticas de hidrólise envolvendo o composto **1** obrigaram a optar-se pela realização do estudo em função da concentração de complexo, ao invés da concentração de BDNPP. Desta maneira, obteve-se uma constante de velocidade de segunda ordem igual a $2,1 \times 10^{-2}$ L mol $^{-1}$ s $^{-1}$, comparável às

constantes publicadas por Young *et al.* para a clivagem hidrolítica do mesmo BDNPP por dois complexos mononucleares de cobre(II) ⁽¹¹⁴⁾.

No caso do composto **2**, as velocidades iniciais obtidas para a faixa de concentrações de substrato utilizadas seguem uma cinética de saturação característica (Figura 3.28). Isto possibilitou o uso da equação de Michaelis-Menten, com linearização via Lineweaver-Burk (Figura 3.28, “inset”), para se determinar os parâmetros cinéticos $K_M = 8,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $V_{\text{máx}} = 7,7 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $k_{\text{cat}} = 1,93 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, o que resulta num valor para a eficiência catalítica k_{cat} / K_M de $2,17 \times 10^{-2} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A catálise mediada pelo complexo **2** apresenta uma taxa de aceleração de aproximadamente 500 vezes em relação à velocidade de hidrólise da reação não-catalisada, a pH 9,0 e 25,0 °C de temperatura ($k = 3,88 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$) ⁽⁹⁰⁾.

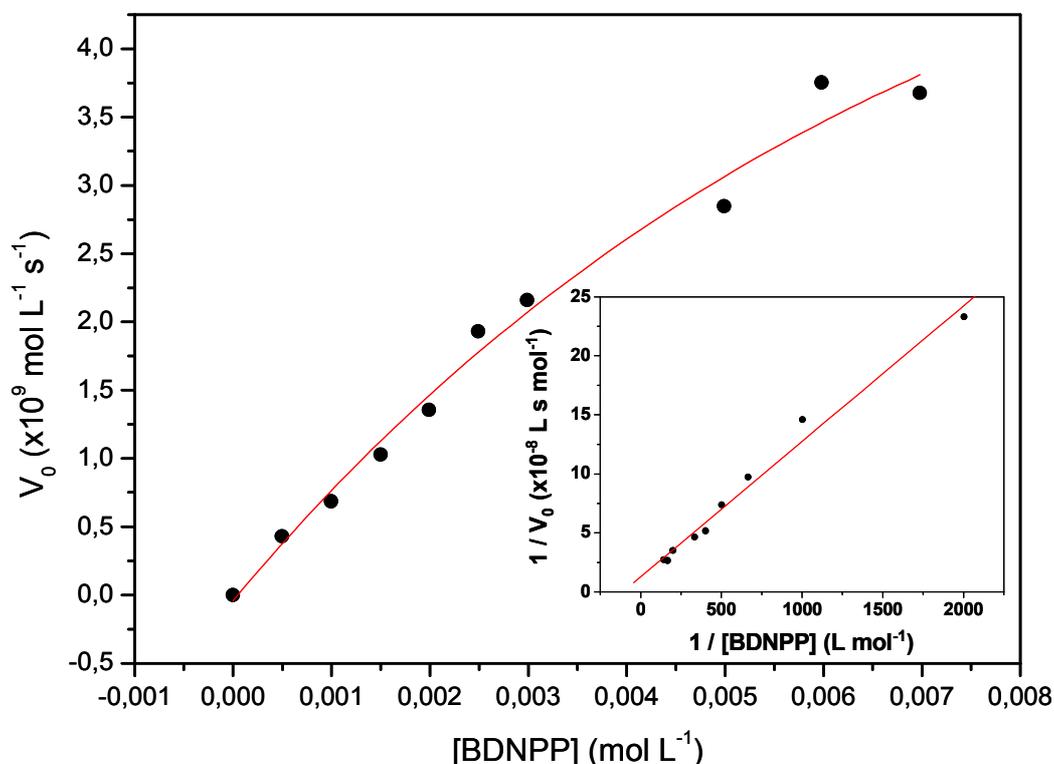


Figura 3.28. Dependência da velocidade da reação de hidrólise com a concentração de substrato a pH 9,6, numa mistura solvente água / acetonitrila (1:1 v/v). “Inset”: gráfico dos duplos recíprocos. Condições experimentais usadas: $[\mathbf{2}]_{\text{final}} = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{S}]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-4}$ a $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura: 50,0 °C.

Cálculos de modelagem computacional (composto 1)

Apesar de possuímos informações bastante detalhadas, obtidas através da difração de raios-X em monocristal, sobre os parâmetros estruturais do complexo **1**, não podemos dizer a mesma coisa em relação ao aduto CS (catalisador-substrato) formado quando o diéster de fosfato BDNPP se coordena ao cátion complexo presente em **1** (“cátion **1**”). Pela sua própria natureza, a de intermediário numa reação catalítica, a espécie CS tem existência relativamente

efêmera, o que dificulta o seu estudo por técnicas espectroscópicas e impossibilita totalmente a sua análise difratométrica, devido ao fato de não ser possível se cristalizar tal sistema. Neste contexto, os métodos de modelagem molecular podem se mostrar extremamente úteis como uma ferramenta que permite explorar os parâmetros estruturais de tais adutos transitentes, assim como também os parâmetros energéticos relacionados à sua formação. Esta constitui uma abordagem muito interessante, e que tem sido bastante usada nos últimos anos, na qual métodos *ab initio* complementam resultados obtidos experimentalmente ^(115,31).

Nesta parte do trabalho, realizada em colaboração com o Dr. Luiz Antônio S. Costa, empregou-se a teoria do funcional de densidade (DFT) para calcular a estrutura do “cátion **1**” e a do aduto CS formado quando este cátion reage com o substrato BDNPP em fase gasosa. O funcional DFT mais amplamente utilizado para aplicações bioquímicas é o B3LYP ^(115,116,117), sendo a nossa escolha para a realização dos cálculos.

A estrutura em fase gasosa otimizada para o “cátion **1**” é mostrada na Figura 3.29 e os dados relacionados aos principais distâncias e ângulos de ligação envolvendo os átomos de cobre (além dos comprimentos C=N de imina) são listados na Tabela 3.7.

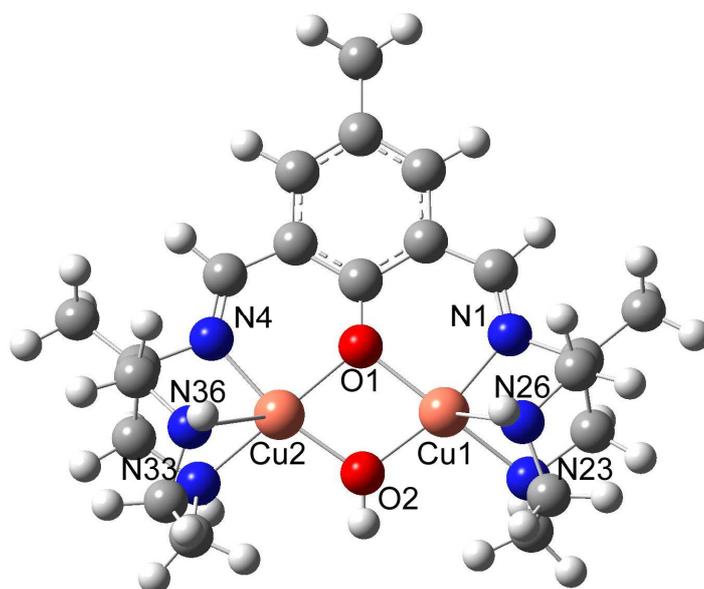


Figura 3.29. Estrutura otimizada [nível de teoria usado: B3LYP/6-311G*/LanL2DZ(f)] para o cátion complexo $[Cu_2(-OH)(C_{21}H_{33}ON_6)]^{2+}$ em fase gasosa. Note-se a grande semelhança existente com o ORTEP da Figura 3.1.

Tabela 3.7. Principais comprimentos e ângulos de ligação calculados para o cátion $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{ON}_6)]^{2+}$ em fase gasosa. Valores experimentais, obtidos por difração de raios-X, também são incluídos

Distâncias inter-atômicas (Å)	Estrutura de raios-X	B3LYP/6-311G*/LanL2DZ(f)
Cu(1)–Cu(2)	2,896	3,117
Cu(1)–O(2)	1,920	1,924
Cu(1)–N(1)	1,928	1,949
Cu(1)–O(1)	1,954	2,045
Cu(1)–N(23)	2,041	2,169
Cu(1)–N(26)	2,524	2,361
Cu(2)–O(2)	1,914	1,924
Cu(2)–N(4)	1,911	1,949
Cu(2)–O(1)	1,964	2,045
Cu(2)–N(33)	2,093	2,169
Cu(2)–N(36)	2,372	2,361
N(1)–C(2)	1,256	1,283
N(4)–C(3)	1,258	1,283
Ângulos (°)		
Cu(1)–O(1)–Cu(2)	95,3	99,3
Cu(2)–O(2)–Cu(1)	98,1	108,2
O(2)–Cu(1)–N(1)	172,2	165,2
O(2)–Cu(1)–O(1)	81,3	76,2
N(1)–Cu(1)–O(1)	90,9	89,0
O(2)–Cu(1)–N(23)	100,6	107,3
N(1)–Cu(1)–N(23)	86,8	84,5
O(1)–Cu(1)–N(23)	160,8	150,2
O(2)–Cu(1)–N(26)	108,4	110,0
N(1)–Cu(1)–N(26)	76,3	81,7
O(1)–Cu(1)–N(26)	127,7	135,7
N(23)–Cu(1)–N(26)	70,2	72,0
N(4)–Cu(2)–O(2)	172,1	165,2
O(2)–Cu(2)–O(1)	81,2	76,2
N(4)–Cu(2)–O(1)	91,1	89,0
O(2)–Cu(2)–N(33)	102,1	107,3

Tabela 3.7. Principais comprimentos e ângulos de ligação calculados para o cátion $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{ON}_6)]^{2+}$ em fase gasosa. Valores experimentais, obtidos por difração de raios-X, também são incluídos (continuação)

Distâncias inter-atômicas (Å)	Estrutura de raios-X	B3LYP/6-311G*/LanL2DZ(f)
N(4)–Cu(2)–N(33)	85,3	84,5
O(1)–Cu(2)–N(33)	151,7	150,2
O(2)–Cu(2)–N(36)	104,1	110,0
N(4)–Cu(2)–N(36)	80,5	81,7
O(1)–Cu(2)–N(36)	134,9	135,7
N(33)–Cu(2)–N(36)	72,1	72,0

Pode ser observado que, quando comparada com a obtida por cristalografia de raios-X, a estrutura calculada parece ser muito mais simétrica. Rey e colaboradores⁽¹¹⁸⁾ mostraram que há uma diferença razoável entre as distâncias de ligação Cu–N_{apical} determinadas para ambos os centros metálicos (2,524 e 2,372 Å, relativas aos átomos Cu1 e Cu2, respectivamente). Tais diferenças são inexistentes na estrutura teórica. O parâmetro de Addison τ , índice angular que descreve o grau de trigonalidade de centros pentacoordenados, também mostra esse aumento na simetria da estrutura calculada (0,25 para ambos os centros de cobre) em relação à de raios-X (0,19 para Cu1 e 0,34 para Cu2). Estas variações poderiam ser esperadas, já que o cálculo em fase gasosa não levou em consideração os dois contra-íons perclorato nem a molécula de água de cristalização presente no arranjo cristalino de **1**. Além disso, no estado sólido, interações intermoleculares podem causar distorções estruturais como as acima citadas. Entretanto, apesar destas pequenas discrepâncias em torno da simetria da molécula, os cálculos aqui descritos indicam que a estrutura em fase gasosa pode ser utilizada como um bom modelo para a conformação adotada pelo “cátion **1**” em solução, onde as moléculas não mais estão presas a uma rede cristalina e os cátions encontram-se completamente dissociados dos seus contra-íons.

Como foi mencionado antes, a distância Cu^{II}–Cu^{II} constitui um importante parâmetro estrutural quando se considera a Química das metaloenzimas binucleares e de seus modelos biomiméticos. Para o “cátion **1**”, o método B3LYP forneceu um valor igual a 3,117 Å para a distância intermetálica, o qual é um pouco maior do que aquele obtido experimentalmente (2,896 Å). Os ângulos teóricos Cu1–O1–Cu2 (99,3°) e Cu1–O2–Cu2 (108,2°) também são algo maiores que aqueles observados na estrutura de raios-X (95,3° e 98,1°, respectivamente). Estas variações podem ser explicadas pela conformação encontrada para o “cátion **1**” em fase

gasosa e estão relacionadas com as razões acima discutidas. De uma forma geral, as distâncias e ângulos calculados, mostrados na Tabela 3.7, apresentam boa concordância com os dados de raios-X. Concordância esta também observada nos comprimentos de ligação C=N dos grupos imina presentes no complexo [1,256(9) e 1,258(9) Å], quando comparados ao valor calculado (1,283 Å). Essas distâncias são fundamentais na caracterização da natureza imínica do ligante.

A estrutura otimizada para o “cátion 1” em fase gasosa foi utilizada como ponto de partida numa investigação envolvendo o modo de coordenação do substrato BDNPP a esse cátion. A Figura 3.30 mostra a estrutura otimizada para o aduto CS.

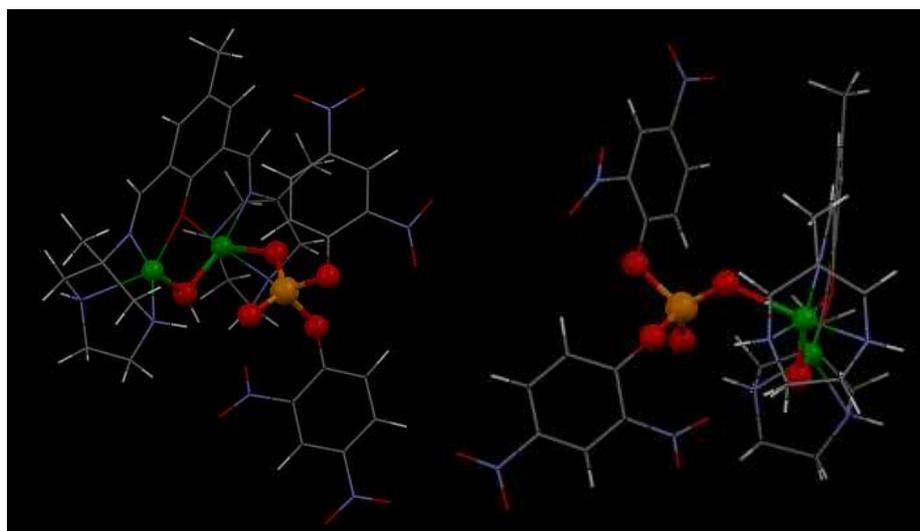


Figura 3.30. Estrutura otimizada [nível de teoria usado: B3LYP/6-311G*/LanL2DZ(f)] para o aduto catalisador-substrato gerado quando o diéster de fosfato BDNPP se coordena a $[\text{Cu}_2(\text{-OH})(\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{ON}_6)]^{2+}$, em fase gasosa. A estrutura é apresentada sob duas perspectivas diferentes com o intuito de facilitar a visualização da mesma.

Pode ser observado que o substrato coordena-se de forma monodentada a apenas um dos átomos de cobre(II) do complexo ($\text{Cu2-O1fosfato} = 2,413 \text{ \AA}$). Isto, a princípio, é motivo de surpresa uma vez que existe a possibilidade de uma coordenação bidentada em ponte a ambos os metais, que parece não se concretizar. A interação com o substrato afeta seriamente a esfera de coordenação do centro Cu2: a distância Cu2-N36 aumenta para $2,815 \text{ \AA}$, muito possivelmente devido ao efeito *trans* induzido pelo oxigênio O1fosfato do diéster BDNPP. A distância intermetálica não sofre grandes alterações, apresentando o valor de $3,049 \text{ \AA}$ (o que representa uma diminuição de $0,068 \text{ \AA}$ em relação à observada no “cátion 1”). O parâmetro de Addison para o centro Cu1 aumenta ligeiramente para 0,26. Com este modo de coordenação, a distância entre o nucleófilo (oxigênio da ponte -hidroxo) e o átomo de fósforo do substrato assume um valor igual a $3,706 \text{ \AA}$. Essa distância, relativamente curta, possibilitaria um ataque nucleofílico intramolecular, de acordo com os mecanismos já propostos para a clivagem de

ésteres de fosfato pelas fosfatases ácidas púrpuras^(37,38,40,44). Uma característica extremamente interessante da estrutura otimizada reside no valor do ângulo $O_{\text{hidroxo}}\text{-P-O2fosfato}$ (em que O2fosfato é o átomo de oxigênio que liga o grupo abandonador ao átomo de fósforo), igual a $166,3^\circ$. Este valor é muito próximo de 180° , ângulo esperado para o estado de transição decorrente de um ataque nucleofílico numa reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2). Isto significa que o nucleófilo, o átomo de fósforo e o grupo abandonador já se encontram “em linha” antes mesmo de dito ataque acontecer (Figura 3.30). Uma conclusão importante que emerge destes cálculos é o fato de não ser necessária a presença de dois sítios lábeis, ou vãos, em posições relativas *cis* para que um composto seja capaz de catalisar a hidrólise de ésteres de fosfato, um dos paradigmas atuais na síntese de complexos metálicos que possam atuar como hidrolases químicas. Contudo, a conclusão fundamental deste trabalho de modelagem computacional diz respeito ao mecanismo envolvido na reação de hidrólise. A etapa relativa ao ataque nucleofílico aqui proposta apresenta uma novidade em relação à dos mecanismos descritos anteriormente^(40, ver o Capítulo 1 desta Tese), pois um substrato terminalmente ligado a APENAS UM dos centros metálicos é atacado por um íon hidróxido (nucleófilo) coordenado em ponte.

Duas ligações de hidrogênio estabilizam o aduto CS e contribuem para a orientação do substrato, a saber, $N23\text{-H O3fosfato}$ (de tipo moderada, $N\text{ O} = 2,912 \text{ \AA}$) e $O2\text{-H N1nitro}$ (moderada, $O\text{ N} = 2,885 \text{ \AA}$). É possível que estas interações estejam diretamente envolvidas no direcionamento do substrato para o ataque por parte da hidroxila. Orientações de substratos via ligações de hidrogênio constituem uma característica de muitos sítios ativos enzimáticos, a qual foi possível reproduzir parcialmente neste trabalho por meio de um composto modelo de relativa simplicidade estrutural.

Proposição de mecanismo

Os resultados cinéticos obtidos, aliados à otimização estrutural do aduto CS em fase gasosa, permitiram a formulação de um mecanismo para a reação de hidrólise do BDNPP mediada pelo complexo **1**, o qual encontra-se esquematizado na Figura 3.31.

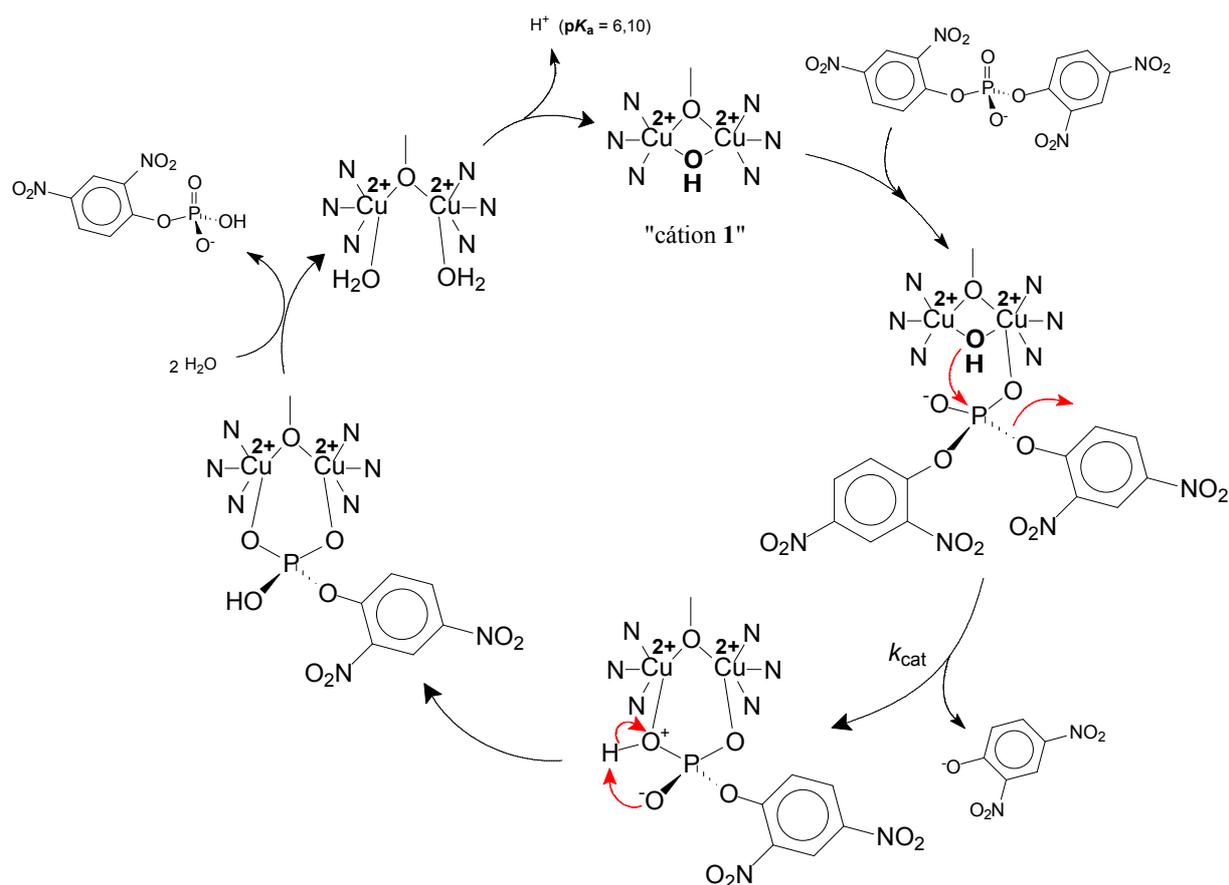


Figura 3.31. Mecanismo proposto para a reação de hidrólise do substrato BDNPP catalisada pelo composto 1.

O ciclo catalítico tem início com a coordenação do BDNPP ao “cátion 1”. O modo de interação catalisador-substrato, proposto com suporte em cálculos de modelagem molecular, seria do tipo monodentado e a apenas um dos centros de cobre(II). Como a ponte -hidroxo se mantém intacta após a entrada do substrato na esfera de coordenação de Cu₂, sugere-se que seja esse ligante exógeno quem inicia a segunda etapa do ciclo, atuando como nucleófilo num ataque intramolecular ao átomo de fósforo do BDNPP. Isto ocasiona a clivagem da ligação fosfodiéster e a conseqüente liberação do íon 2,4-dinitrofenolato. Cabe ressaltar novamente que essa hipótese mecanística, isto é, coordenação monodentada do substrato e subsequente ataque por um nucleófilo que faz ponte entre os metais, é completamente inédita em termos de compostos homobinucleares de cobre(II). Até o momento, alguns mecanismos haviam sido propostos para a hidrólise de mono- e diésteres de fosfato por sistemas bimetalícos^(37,38,40,44), mas a maior parte deles pode ser enquadrada dentro de duas possibilidades: i) coordenação monodentada do substrato e ataque de um nucleófilo terminalmente ligado a um dos centros metálicos, ou ii) coordenação bidentada, em ponte, do substrato e ataque por parte de um nucleófilo também ligado em ponte. Proposições mecanísticas semelhantes à nossa só foram feitas anteriormente para os sistemas binucleares de zinco(II) presentes nos sítios ativos das

enzimas fosfotriesterase^(119,120) e 5'-nucleotidase⁽¹²¹⁾. Dando continuidade ao ciclo catalítico, segue uma etapa relacionada à transferência intramolecular de H⁺ entre dois oxigênios do monoéster 2,4-dinitrofenilfosfato, que permanece coordenado ao complexo após o ataque. Finalmente, esse monoéster pode ser deslocado da esfera de coordenação dos metais por duas moléculas de água. O diáqua-complexo formado perde facilmente um próton para o meio em pH 6,0 (pK_a de 5,40 ± 0,01 determinado por potenciometria), regenerando assim a espécie cataliticamente ativa. É importante salientar aqui que o estado de oxidação dos centros de cobre não sofre nenhuma alteração ao longo do ciclo catalítico, como seria esperado para um processo estritamente hidrolítico.

Para o composto **2**, a espécie ativa é completamente diferente, não apresentando a ponte -hidroxo entre os metais e sim duas hidroxilas terminalmente ligadas aos centros de cobre. Assim, pode-se prever um mecanismo de outra natureza para a reação de hidrólise promovida por esse complexo, talvez até envolvendo um modo de coordenação diferente por parte do substrato. Por este motivo, optou-se por não fazer uma proposta mecanística para o sistema. Contudo, cálculos de otimização estrutural do aduto formado quando **2** reage com o diéster BDNPP, em fase gasosa, estão em andamento e poderão vir a fornecer informações importantes, levando à proposição de um mecanismo melhor fundamentado para a reação.

c) Clivagem de DNA plasmidial

O fato de **1** e **2** serem capazes de hidrolisar a ligação fosfodiéster presente na molécula de BDNPP, serviu como incentivo para a realização de testes visando avaliar o efeito que esses complexos poderiam causar nos ácidos nucleicos. Estes ensaios são importantes para o desenvolvimento de novas nucleases sintéticas, um campo de pesquisa que tem se mostrado extremamente promissor, com possíveis aplicações médicas e biotecnológicas.

Todos os sistemas vivos contêm nucleases, enzimas capazes de interagir com os ácidos nucleicos e hidrolisar as suas ligações fosfodiéster.

Na Química dos compostos biomiméticos, a hidrólise de DNA e RNA promovida por complexos metálicos mono-, bi- ou multinucleares, de forma não degradativa e com elevados níveis de seletividade para um determinado sítio, seqüência ou estrutura, vem se tornando matéria de grande importância em biotecnologia e medicina, pela enorme gama de possíveis aplicações desses sistemas na manipulação de genes, projeção de sondas estruturais e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Além disso, a hidrólise de ésteres de fosfato

mediada por complexos metálicos tem fornecido valiosas informações na modelagem e elucidação da reatividade das metalonucleases ⁽¹²²⁾.

Uma grande parte desses testes de hidrólise é realizada utilizando-se plasmídios como substratos. Os plasmídios são moléculas circulares de DNA, covalentemente ligadas, extraídas de fontes bacterianas. Eles são de mil a dez vezes menores que o cromossomo bacteriano. Os genes que eles carregam não são essenciais à sobrevivência da bactéria, mas podem condicionar características adicionais, tais como fatores de virulência, resistência a agentes antimicrobianos e fixação de nitrogênio. Muitas das características condicionadas por genes plasmidiano contribuem para a adaptabilidade da bactéria em condições especiais ⁽¹²³⁾. Sob condições normais, os plasmídios encontram-se majoritariamente na forma superenovelada (ou forma I). Entretanto, na presença de agentes de clivagem, estes podem assumir as formas circular relaxada (forma II) ou linear (forma III), segundo seja clivada uma única fita ou as duas fitas do DNA em pontos próximos da seqüência, respectivamente. Por este motivo, a capacidade de linearização do DNA constitui um indicativo de que o agente de clivagem usado apresenta certa especificidade na sua região de atuação. Nos estudos descritos a seguir, realizados em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Hernán Terenzi (Laboratório de Expressão Gênica – Departamento de Bioquímica – UFSC) pelo doutorando Claus Tröger Pich, foi utilizado o DNA plasmidial pBSKII.

Inicialmente, foi efetuado um estudo com o intuito de determinar a atividade dos compostos em função do pH. Para isto, os complexos foram incubados nas concentrações de 0, 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em presença de DNA plasmidial superenovelado (600 ng) nos pHs 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 por um período de 16 horas a 50 °C. Todas as incubações foram submetidas a eletroforese em gel de agarose e fotografadas, sendo observada a transformação da forma superenovelada em circular relaxada e linear, cujas proporções foram calculadas com o auxílio do programa LabWorks[®] para análise de intensidade e tamanho de bandas.

Ambos os compostos descritos neste capítulo demonstraram atividade nucleásica diretamente correlacionada à concentração em todos os pHs testados, sendo o complexo **2** mais ativo do que **1** (Figura 3.32). Assim, eles podem ser considerados nucleases químicas.

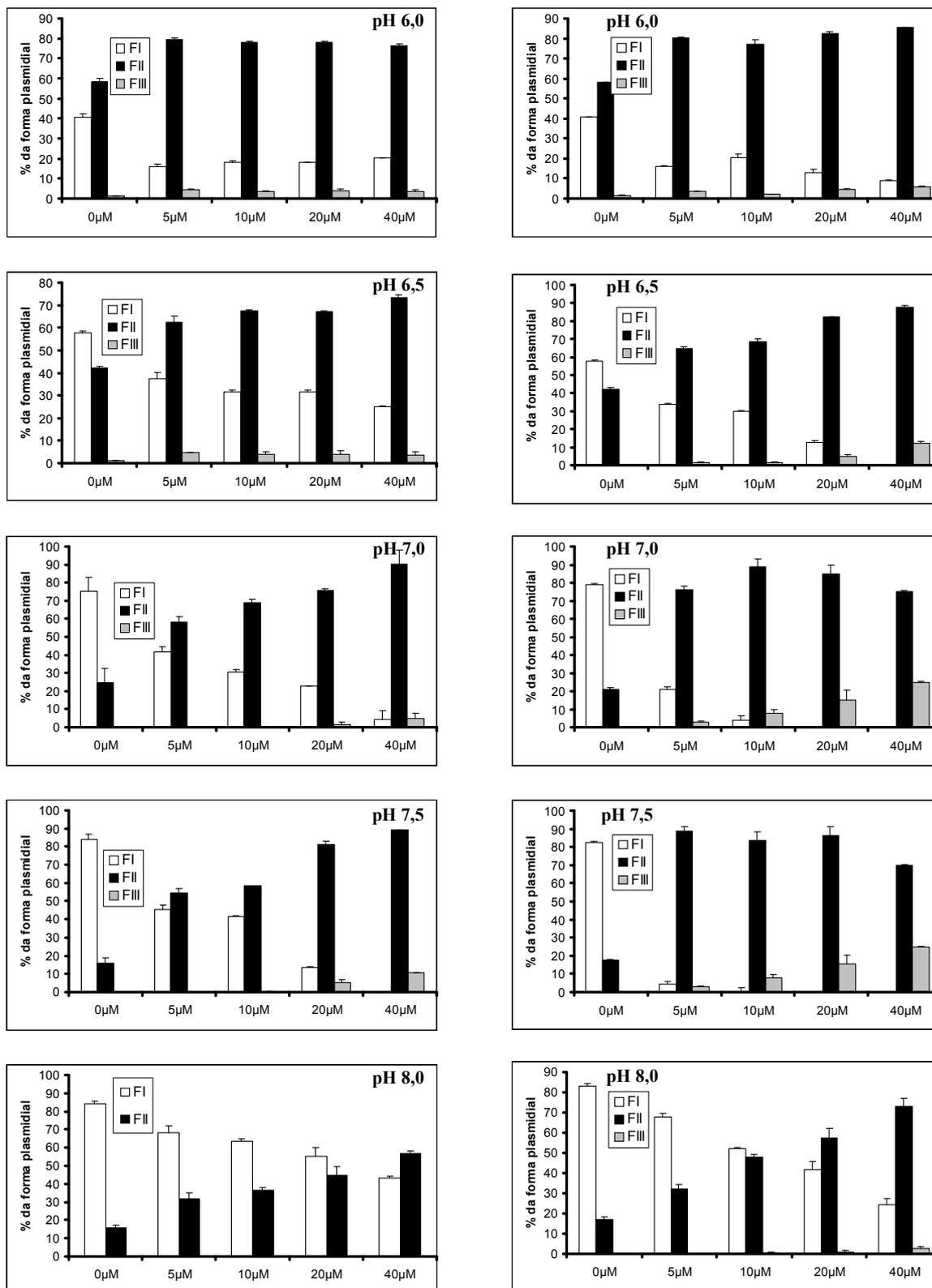


Figura 3.32. Clivagem do DNA plasmidial pBSKII promovida pelos complexos 1 (esquerda) e 2 (direita), após 16 horas de incubação em diferentes valores de pH. FI: forma superenovelada; FII: forma circular relaxada; FIII: forma linear. Resultados expressos como porcentagem da forma plasmidial. Condições experimentais: $[1 \text{ e } 2]_{\text{final}}$ variando de ZERO (controle) a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura: $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tanto para o complexo **1** quanto para **2**, a atividade nucleásica é mais pronunciada em pH 7,5. Nestas condições, e na ausência do agente de clivagem, aproximadamente 85% dos plasmídios encontram-se na forma superenovelada e apenas 15%, na forma circular relaxada. A incubação com o composto **1**, na concentração de 40 mol L^{-1} , hidrolisa completamente a forma I nas formas II (90%) e III (10%). No caso do complexo **2**, uma concentração de apenas 20 mol L^{-1} já é capaz de transformar a forma plasmidial I nas formas II (85%) e III (15%). Para este último composto, utilizando-se uma concentração de 40 mol L^{-1} , obteve-se 25% da forma linear. Como mencionado acima, a capacidade de linearização do DNA apresentada, inclusive a baixas concentrações, pelos sistemas **1** e **2** sugere uma especificidade sítio-dirigida na clivagem. Em pH 8,0, observa-se uma súbita e acentuada diminuição da atividade para ambos os compostos, a qual possivelmente está relacionada à inativação dos mesmos.

A determinação dos parâmetros cinéticos, através da equação de Michaelis-Menten, foi realizada a pH 7,5. Para isto, cinéticas de clivagem foram medidas nas concentrações de complexo 0, 5, 10, 15, 20 e $25 \mu\text{mol L}^{-1}$, coletando-se alíquotas do meio reacional a cada 15 minutos no intervalo de 0 a 90 minutos. O composto **1** mostrou K_M igual a $136 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, uma eficiência catalítica de $7.232,17 \text{ L mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e um valor para o k_{cat} de $2,73 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Isto representa uma aceleração total de $2,73 \times 10^7$ vezes em relação à velocidade de degradação espontânea (não-catalisada) do DNA dupla-fita, para o qual estima-se k da ordem de 10^{-11} s^{-1} . O complexo **2**, por sua vez, apresentou K_M de $15,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, eficiência catalítica igual a $72.752,8 \text{ L mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e um k_{cat} de $3,11 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, implicando assim um aumento de $3,11 \times 10^7$ vezes sobre a velocidade da reação não-catalisada. Como parâmetro de comparação, a enzima Mg-*EcoRV* exibe, na hidrólise de oligodesoxinucleotídeos, valores para as constantes K_M e k_{cat} iguais a $5,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $0,75 \text{ s}^{-1}$, respectivamente ⁽¹²⁴⁾.

d) Efeito citotóxico e acumulação dos compostos em células tumorais

Entre os complexos de metais de transição com atividade antitumoral, os compostos de platina(II) são os mais ativos. Entretanto, o aparecimento de linhagens celulares resistentes a essa classe de drogas e os efeitos colaterais tóxicos associados às mesmas têm estimulado a procura por novos compostos ⁽¹²⁵⁾.

Efeito citotóxico em células de leucemia mielóide crônica K562

Estes ensaios foram realizados pela aluna de doutorado Flávia Cristina Silva de Paula, do grupo de pesquisa da Profª. Dra. Elene Cristina Pereira-Maia (Departamento de Química –

UFMG). A linhagem celular utilizada, K562, foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro (número CR083 da coleção BCRJ). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com soro fetal bovino 10% (CULTLAB, São Paulo, SP, Brasil) a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. A cultura é iniciada a uma concentração de 1 x 10⁵ células mL⁻¹; as células se multiplicam exponencialmente e, após três dias, atingem uma concentração de aproximadamente 8 x 10⁵ células mL⁻¹. A viabilidade celular foi determinada por exclusão com azul de Tripán.

A sensibilidade aos compostos foi avaliada pela concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50%, parâmetro este conhecido como CI₅₀. Para isto, 10⁵ células mL⁻¹ foram incubadas durante 72 horas na ausência e na presença de diferentes concentrações dos complexos **1** ou **2** (Figura 3.33). Após este período, as células foram contadas e o valor da CI₅₀, calculado. Prepararam-se soluções-estoque de ambos compostos em acetonitrila. Testes controle foram realizados incubando-se as células apenas com o solvente e foi verificado que ele não afeta o crescimento nem a viabilidade celular nas condições destes estudos.

As concentrações dos complexos **1** e **2** necessárias para provocar uma inibição de 50% no crescimento das células K562 são mostradas na Tabela 3.8.

Tabela 3.8. Valores de CI₅₀ frente à linhagem celular K562 determinados para **1** e **2**, usando-se mistura solvente água / acetonitrila (37 °C). Os valores representam a média de três experiências independentes

Complexo metálico	CI ₅₀ (mol L ⁻¹)
1	44,70
2	95,20

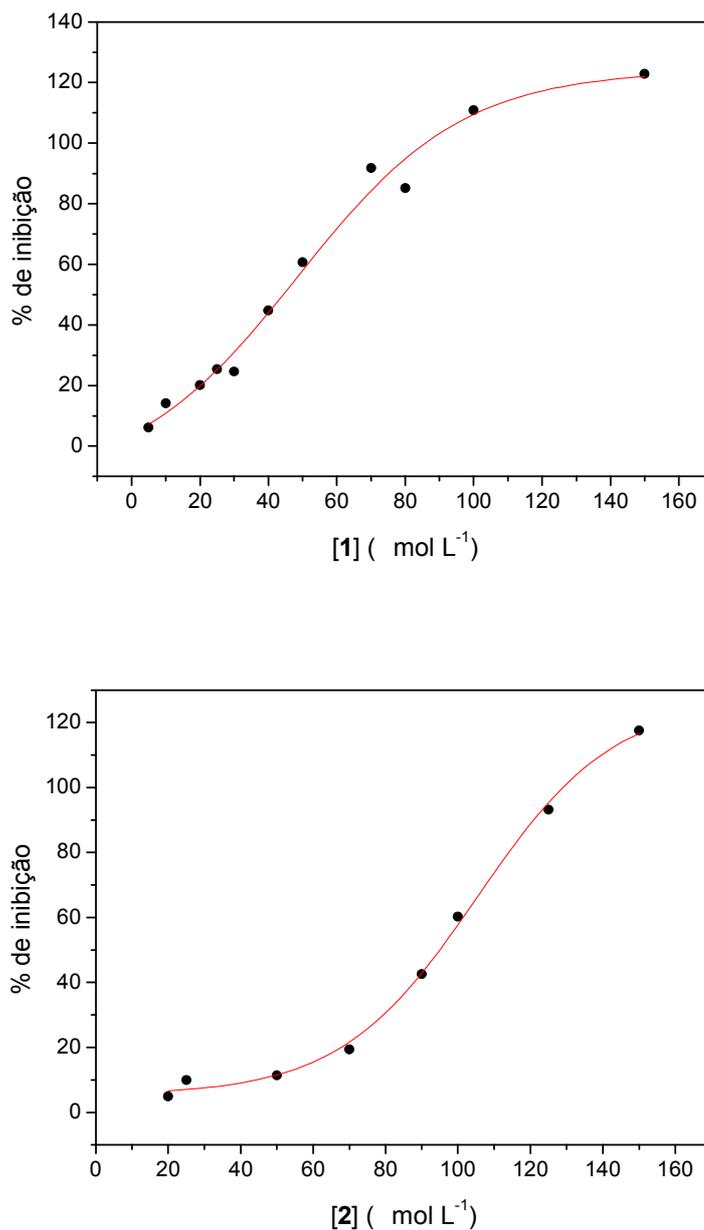


Figura 3.33. Inibição do crescimento celular em células de leucemia mielóide crônica da linhagem K562 em função da concentração dos complexos **1** (gráfico superior) e **2** (gráfico inferior), após incubação por 72 horas. Resultados expressos como porcentagem de inibição.

Pode ser observado que a atividade exibida pelo composto **2** é praticamente a metade daquela apresentada por **1**, a despeito de o complexo **2** ter se mostrado mais ativo nos testes oxidativos e de clivagem do DNA.

Incorporação dos compostos nas células K562

Para atingir o seu alvo, uma droga precisa, inicialmente, passar pela membrana celular e esta etapa é crucial para a atividade farmacológica. A maior parte dos casos de resistência

celular aos antitumorais parece estar relacionada com uma diminuição do teor intracelular de droga. A acumulação celular dos complexos foi aqui determinada através de espectroscopia de absorção atômica (AAS) em forno de grafite. Resumidamente, as células foram incubadas em presença e ausência de diferentes concentrações do composto por 3 dias e a concentração intracelular de cobre foi medida usando-se um espectrômetro Varian[®], modelo Zeeman 220, equipado com forno de grafite, atomizador e amostrador automático com a colaboração da Profa. Josianne N. Silveira (Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Faculdade de Farmácia – UFMG).

A concentração de cobre na ausência dos complexos estudados foi igual a $1,30 \times 10^{-16}$ mol célula⁻¹, o que supostamente corresponde à concentração fisiológica do metal nas células da linhagem K562. Considerando-se um volume celular médio igual a $1,0 \times 10^{-12}$ L⁽¹²⁶⁾, a concentração intracelular de cobre seria de $1,30 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O teor intracelular de cobre determinado sem a adição do complexo foi subtraído dos valores encontrados nas amostras que foram incubadas na presença dos compostos.

Foi obtida uma boa correlação entre o efeito citotóxico exibido pelos complexos e a concentração intracelular de cobre, como mostra a Figura 3.34. A incubação das células K562 com doses equivalentes às CI₅₀ leva a uma incorporação de cobre de $4,00 \times 10^{-14}$ mol célula⁻¹ para o composto **1** e $5,52 \times 10^{-14}$ mol célula⁻¹ para o composto **2**. Considerando-se o fato de os complexos serem binucleares, e aceitando-se a hipótese de que eles não sofram dissociação no ambiente intracelular, pode-se calcular uma quantidade acumulada de **1** igual a $2,00 \times 10^{-14}$ mol célula⁻¹ e de **2** igual a $2,76 \times 10^{-14}$ mol célula⁻¹. É interessante notar que as concentrações intracelulares de cobre atingidas após incubação das células com concentrações equitóxicas dos compostos não são muito diferentes. Isto representa uma concentração molar intracelular de **1** igual a $2,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ e de **2** igual a $2,76 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹. Esses valores correspondem a ~450 vezes a concentração extracelular do complexo **1** e 290 vezes a do complexo **2**! Os gradientes observados sugerem que os compostos devem estar sendo levados para o interior das células através de alguma proteína transportadora. O principal transportador de cobre para o meio intracelular é a proteína Ctr1⁽¹²⁷⁾.

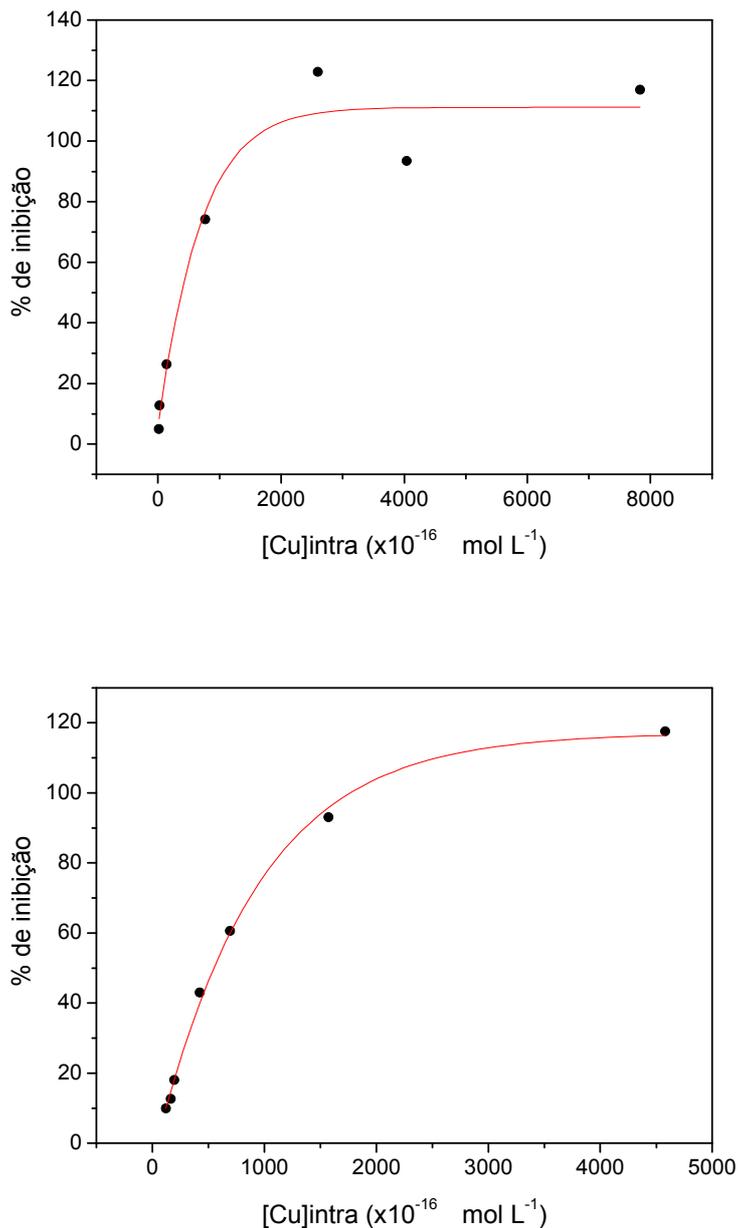


Figura 3.34. Inibição do crescimento celular em células de leucemia mielóide crônica da linhagem K562 em função da concentração intracelular de cobre, após incubação pelo período de 72 horas na presença de diferentes concentrações de **1** (gráfico superior) e **2** (gráfico inferior). Resultados expressos como porcentagem de inibição.

e) Efeito sobre a viabilidade celular em macrófagos peritoneais inflamatórios

Como os macrófagos desempenham um papel importante na imunidade antitumoral, o efeito do composto **1** (aquele que mostrou maior atividade nas células da linhagem K562) em macrófagos peritoneais inflamatórios foi estudado. Estes ensaios foram feitos em colaboração com as professoras Elene Cristina Pereira-Maia e Leda Quércia Vieira (do Departamento de Bioquímica – UFMG). Obtiveram-se os macrófagos inflamatórios da cavidade peritoneal de camundongos da linhagem C57BL/6 (CEBIO – UFMG), 5 dias após a injeção de 2 mL de

tioglicolato 2%. Para a avaliação da viabilidade celular, $\sim 2 \times 10^5$ células foram incubadas na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações do complexo **1** por 72 horas. O parâmetro de interesse foi então avaliado pelo ensaio de redução, utilizando-se como corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).

A Figura 3.35 mostra que, aumentando-se a concentração do complexo até o valor de $32,0 \text{ mol L}^{-1}$ (isto é, um pouco abaixo da CI_{50}), a viabilidade celular não é afetada, ou seja, nas concentrações em que o composto inibe o crescimento das células tumorais ele não resulta tóxico para os macrófagos.

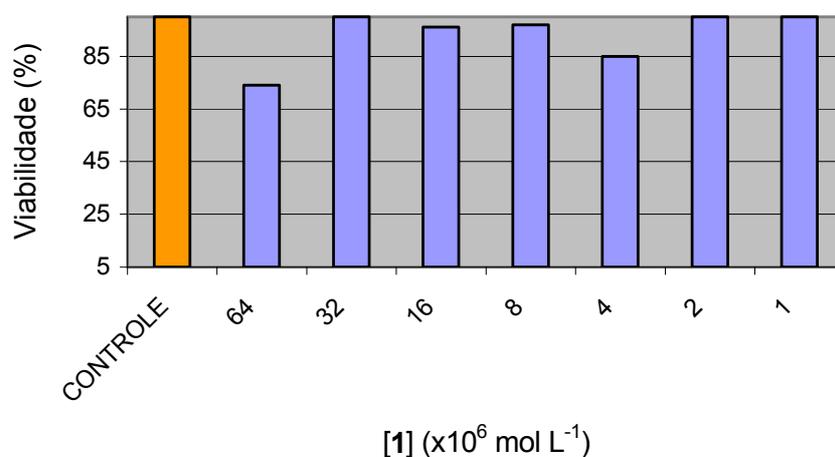


Figura 3.35. Viabilidade celular de **1** em macrófagos peritoneais inflamatórios, após incubação por 72 horas. Resultados expressos como porcentagem de células vivas. [**1**] variando de ZERO (controle) a $6,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

LIGANTES BINUCLEANTES CONTENDO 2-AMINOFENOL COMO BRAÇO PENDENTE - ESTRUTURA E REATIVIDADE DO COMPLEXO



SÍNTESES

Os ligantes binucleantes hexadentados derivados de 2-aminofenol foram sintetizados seguindo-se um protocolo experimental relativamente simples e direto, o qual envolveu o acoplamento de um braço fenólico via formação de imina (pela reação de condensação entre a carbonila de aldeído do precursor bpmamff e a função amina aromática presente na molécula de 2-aminofenol). No caso de H₂L₄, a formação da base de Schiff foi seguida de redução, a baixas temperaturas, com NaBH₄. Em contrapartida ao descrito no capítulo anterior para os ligantes diazepínicos, tanto H₂L₃ quanto H₂L₄ foram isolados em sua forma cristalina e com bons rendimentos. A partir desses ligantes, foi obtido um único composto binuclear de cobre, $[Cu_2(-OH)(L3)]ClO_4$. Isto significa que, independentemente da utilização de H₂L₃ ou H₂L₄ na síntese do complexo de coordenação, o produto resultante apresenta exclusivamente L₃ como ligante. Assim, durante o processo de complexação, o ligante L₄ deve ser oxidado a L₃, possivelmente numa reação redox intramolecular envolvendo ambos os centros de cobre(II).

H₂L₃ e H₂L₄ são ligantes não-simétricos especialmente desenvolvidos para mimetizar os grupos doadores presentes no sítio ativo da metaloenzima calcineurina⁽⁵⁸⁾. O lado macio desses compostos é constituído por duas unidades de 2-metilpiridina, uma amina terciária e o grupo fenol central que, uma vez desprotonado, atuará como ponte entre os metais. Já o lado duro apresenta um grupo 2-(hidroxifenil)iminometil (H₂L₃) ou 2-(hidroxifenil)aminometil (H₂L₄); além, é claro, do fenol central (que é considerado constituinte de ambos os lados). Uma característica importante desses compostos é a ligação direta entre o anel fenólico terminal e o átomo de nitrogênio N1, o que permite a formação de um quelato mais rígido, de cinco membros, durante o processo de complexação. A constrição induzida ao se passar de um anel de seis membros para um de cinco membros pode dar origem a modificações nas propriedades espectroscópicas e eletroquímicas dos compostos de coordenação sintetizados. Foi encontrado, na literatura, um único exemplo prévio de ligante binucleante apresentando essa característica estrutural⁽¹²⁸⁾.

Apesar de a calcineurina possuir um cluster metálico binuclear do tipo Fe^{III}Zn^{II} em seu sítio ativo, optou-se aqui pela síntese do complexo Cu^{II}Cu^{II}, o que permite traçar um paralelo com os compostos que foram tratados no capítulo anterior deste trabalho. Nesse contexto, o intuito final foi o de verificar a influência que uma posição de coordenação vaga poderia causar no modo de coordenação dos ligantes binucleantes e na reatividade dos complexos gerados a partir dos mesmos.

CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES

Os ligantes H₂L3 e H₂L4 foram caracterizados por análise elementar, espectroscopias vibracional e eletrônica e RMN de ¹H e ¹³C. Ambos os compostos tiveram a sua estrutura determinada por difração de raios-X em monocristal. Os dados decorrentes dessas análises serão discutidos a seguir, com exceção do CHN, técnica que já foi abordada no capítulo que trata da parte experimental.

a) Estruturas cristalinas

A Tabela 4.1 apresenta alguns dados cristalográficos referentes aos processos de coleta e refinamento das estruturas para H₂L3 e H₂L4. Na Tabela 4.2, por sua vez, é listada uma seleção de parâmetros geométricos (ângulos e comprimentos de ligação) relevantes. As Figuras 4.1 e 4.2 mostram, respectivamente, as estruturas dos ligantes H₂L3 e H₂L4.

Tabela 4.1. Seleção de dados cristalográficos para os ligantes H₂L3 e H₂L4

Ligante	H ₂ L3	H ₂ L4
Fórmula empírica	C ₂₇ H ₂₆ O ₂ N ₄	C ₂₇ H ₂₈ O ₂ N ₄
Massa fórmula	438,52 g/mol	440,53 g/mol
Temperatura de coleta	293(2) K	293(2) K
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P 2 ₁ /n	P 2 ₁ /c
Cela unitária	a = 15,081(2) Å	a = 12,651(1) Å
	b = 7,687(1) Å	b = 21,071(5) Å
	c = 21,765(2) Å	c = 9,262(1) Å
	= 104,738(7) °	= 106,09(1) °

Tabela 4.1. Seleção de dados cristalográficos para os ligantes H₂L3 e H₂L4 (continuação)

Ligante	H ₂ L3	H ₂ L4
Volume da cela	2440,2(5) Å ³	2372,2(7) Å ³
Z	4	4
Densidade (calculada)	1,194 g/cm ³	1,233 g/cm ³
Tamanho do cristal utilizado	0,50 x 0,26 x 0,13 mm ³	0,46 x 0,30 x 0,23 mm ³
Reflexões coletadas	4431	4338
Únicas	4310 [R(int) = 0,0234]	4142 [R(int) = 0,0390]
Parâmetros refinados	327	305
“Goodness-of-fit on F ² ”	1,007	1,022
Índices R finais [I>2σ(I)]	R1 = 0,0513; wR2 = 0,1184	R1 = 0,0571; wR2 = 0,1344
Índices R (todos os dados)	R1 = 0,1727; wR2 = 0,1499	R1 = 0,1557; wR2 = 0,1650

Tabela 4.2. Parâmetros geométricos selecionados para os ligantes H₂L3 e H₂L4

Comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°)	H ₂ L3	H ₂ L4
O1–C12	1,349(4)	1,374(3)
O20–C22	1,352(3)	1,362(3)
N1–C21	1,417(4)	1,408(4)
N1–C2	1,290(4)	1,474(4)
N4–C40	1,462(4)	1,465(4)
N4–C30	1,471(3)	1,466(4)
N4–C3	1,472(3)	1,475(4)
C2–C11	1,454(4)	1,511(4)
C21–N1–C2	122,6(3)	119,0(3)
C40–N4–C30	110,3(2)	111,0(2)
C40–N4–C3	111,7(2)	109,6(2)
C30–N4–C3	110,0(2)	110,2(2)
N1–C2–C11	120,5(3)	116,1(2)
N4–C3–C13	112,6(2)	112,7(2)

Em ambos os ligantes, as distâncias e ângulos de ligação para os anéis aromáticos e heteroaromáticos não apresentam grandes discrepâncias quando comparados aos encontrados em compostos similares descritos na literatura ^(128,129). Um importante ponto de desigualdade entre os parâmetros estruturais determinados para H₂L3 e H₂L4 encontra-se no comprimento da ligação N1–C2, que é 0,184 Å maior no caso deste último ligante, refletindo a diferença existente nas suas ordens de ligação (a OL diminui de 2 para 1 na passagem da base de Schiff presente em H₂L3 para a amina secundária em H₂L4). A diferente hibridação apresentada pelo carbono C2 em H₂L3 (sp²) e H₂L4 (sp³) afeta também o comprimento da ligação C2–C11, o qual se vê aumentado de 0,057 Å, cerca de 4%, no ligante de natureza amínica. Em H₂L3, os ângulos C21–N1–C2 e N1–C2–C11 são, respectivamente, iguais a 122,6(3) e 120,5(3)°, em concordância com o valor “ideal” de 120°. Já para o composto H₂L4, esses mesmos ângulos apresentam valores de 119,0(3) e 116,1(2)°, respectivamente, bem diferentes do esperado para centros tetraédricos “clássicos” (109,5°).

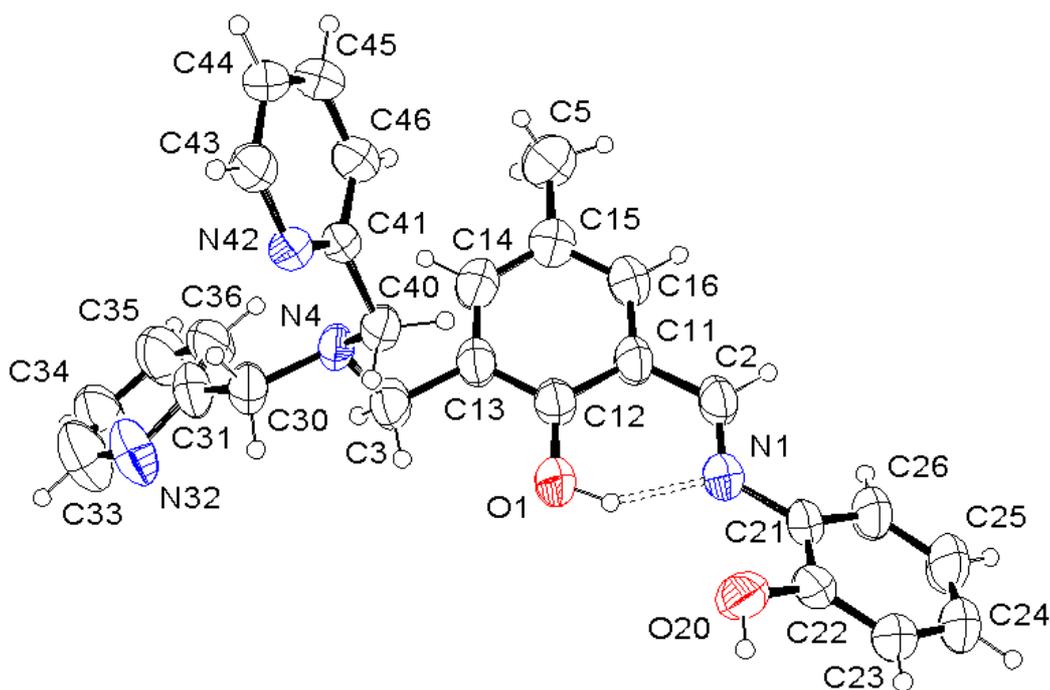


Figura 4.1. ORTEP para o ligante binucleante imínico H₂L3, de fórmula molecular C₂₇H₂₆O₂N₄.

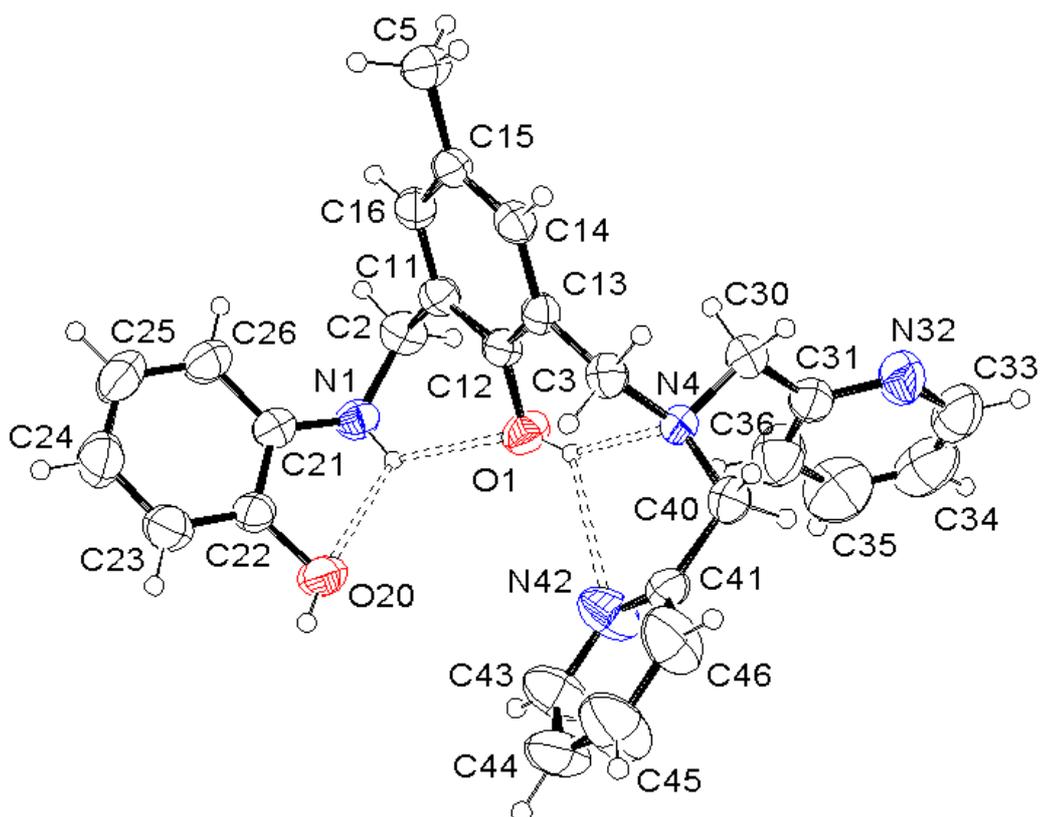


Figura 4.2. ORTEP para o ligante binucleante aminico H_2L_4 , de fórmula molecular $C_{27}H_{28}O_2N_4$.

Em termos geométricos, H_2L_3 e H_2L_4 apresentam conformações moleculares muito distintas. Uma característica bastante interessante no arranjo tridimensional de H_2L_4 é que este ligante mostra uma pré-organização espacial auto-induzida para a coordenação, ou seja, com exceção de N32, todos os átomos doadores da molécula apontam em direção ao oxigênio central de fenol, O1. As respectivas distâncias $O20 \cdots O1$ e $N42 \cdots O1$ são iguais a 3,622(3) e 3,310(4) Å, valores estes muito similares aos obtidos por Neves *et al.* ⁽¹³⁰⁾ para um complexo $Fe^{III}Zn^{II}$ -hidroxo do ligante binucleante não-simétrico H_2bpbmp [3,950(8) e 3,354(8) Å, respectivamente]. Esta tendência não se verifica na base de Schiff H_2L_3 , em que os átomos de nitrogênio do lado macio parecem distribuir-se aleatoriamente no espaço. Neste ligante, há uma disposição relativa *trans* dos grupos em torno da dupla ligação de imina C=N.

As conformações moleculares das unidades assimétricas nas celas unitárias de H_2L_3 e H_2L_4 , descritas no parágrafo anterior, são influenciadas por ligações de hidrogênio intra- e intermoleculares envolvendo ambos grupamentos fenol. O padrão de ligações de H é bastante diferente de um ligante para outro, com H_2L_4 apresentando uma rede muito mais complexa de interações (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Geometria das ligações de hidrogênio nos ligantes H₂L3 e H₂L4 (Å, °)

	$D-H\cdots A$	$D-H$	$H\cdots A$	$D\cdots A$	$D-H\cdots A$
H ₂ L3	O1–H1O \cdots N1	0,89	1,76	2,547(3)	145,7
	O20–H20O \cdots N42 ⁱ	0,88	1,86	2,736(3)	174,4
H ₂ L4	N1–H1N \cdots O1	0,86(1)	2,32(2)	2,896(3)	124(2)
	N1–H1N \cdots O20	0,86(1)	2,22(3)	2,662(3)	113(2)
	O1–H1O \cdots N4	0,82	2,04	2,758(3)	145
	O1–H1O \cdots N42	0,82	2,68	3,309(4)	134
	O20–H20O \cdots N1 ⁱ	0,82	2,03	2,813(3)	160

Códigos de simetria: H₂L3 \rightarrow (i) $-x + 1, -y, -z + 1$; H₂L4 \rightarrow (i) $x, -y + \frac{1}{2}, z - \frac{1}{2}$.

Em H₂L3, o átomo O1 atua como doador de hidrogênio na interação O1–H1O \cdots N1, a única do tipo intramolecular apresentada por este ligante (Figuras 4.1 e 4.3). No cristal, as moléculas de H₂L3 interagem aos pares através de uma ligação de hidrogênio moderada, O20–H20O \cdots N42ⁱ, na qual o oxigênio de fenol terminal O20 de uma das moléculas doa hidrogênio para o nitrogênio piridínico N42 da outra (Figura 4.3). A conformação do ligante H₂L4, por sua vez, é mantida por um par de ligações de H bifurcadas do tipo intramolecular (Figura 4.2). Numa delas, o nitrogênio de amina secundária N1 é o doador de hidrogênio nas interações N1–H1N \cdots O1 e N1–H1N \cdots O20, em que os oxigênios de fenol O1 e O20 atuam como receptores. O átomo O1 está também envolvido, na condição de doador de H, na ligação de hidrogênio bifurcada composta pelas interações O1–H1O \cdots N4 (moderada) e O1–H1O \cdots N42 (fraca). É interessante notar que a componente mais curta desta ligação de H (isto é, O1–H1O \cdots N4) pode ser associada ao menor valor apresentado pelo ângulo N4–C3–C13 [112,7(2)°] quando comparado a N1–C2–C11 [116,1(2)°]. Ligações de H intermoleculares O20–H20O \cdots N1ⁱ, de tipo moderado, conectam as moléculas de H₂L4 formando cadeias em “zigue-zague”, as quais correm paralelas ao eixo cristalográfico *c* (Figura 4.4).

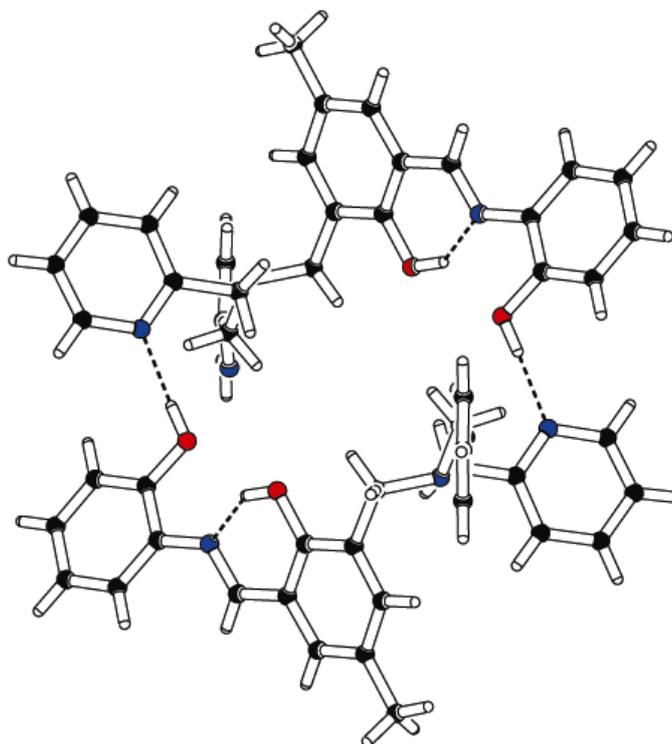


Figura 4.3. Padrão de ligações de hidrogênio (intra- e intermoleculares) apresentado pelos cristais de H₂L3.

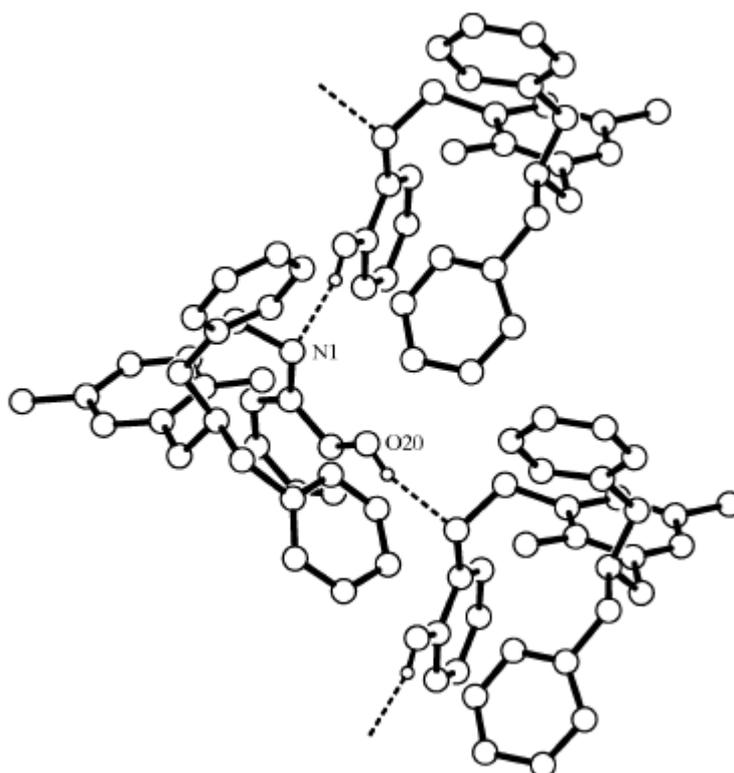


Figura 4.4. Rede de ligações de hidrogênio intermoleculares presentes no cristal de H₂L4. Apenas os átomos de H que participam das interações são mostrados, para efeito de simplificação.

b) Espectroscopia vibracional

O espectro de infravermelho do ligante H_2L3 pode ser visto na Figura 4.5. Em virtude da similaridade estrutural entre H_2L3 e H_2L4 , seus IVs são muito parecidos e, por essa razão, a figura correspondente ao espectro deste último não será apresentada.

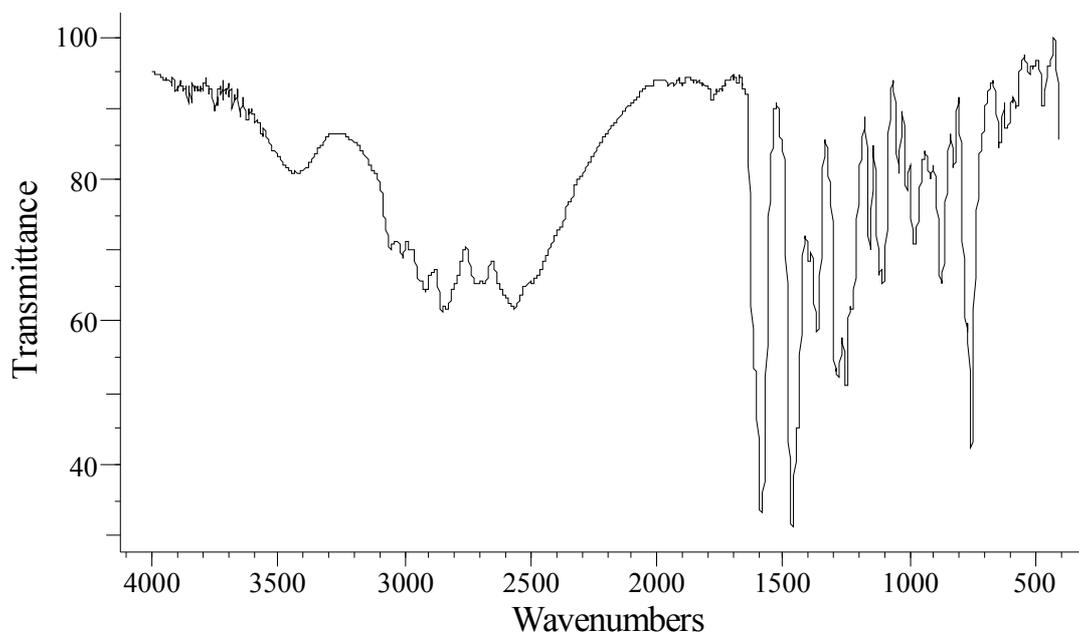


Figura 4.5. Espectro vibracional do ligante H_2L3 (amostragem: pastilha de KBr).

A seguir, uma listagem completa de todas as absorções:

Ligante H_2L3 : 3447 (f), 3426 (f), 3056 (m), 3008 (m), 2940 (o), 2916 (m), 2852 (m), 2828 (m), 2799 (o), 2716 (m), 2684 (m), 2562 (m), 2495 (o), 1615 (o), 1595 (o), 1584 (F), 1580 (o), 1462 (F), 1440 (o), 1394 (m), 1362 (m), 1311 (o), 1288 (m), 1280 (m), 1275 (o), 1248 (m), 1225 (m), 1186 (o), 1154 (m), 1114 (m), 1104 (m), 1040 (f), 1006 (f), 982 (o), 976 (m), 915 (f), 870 (m), 820 (f), 780 (o), 770 (m), 754 (F), 642 (f), 634 (o), 612 (f), 607 (o), 585 (f), 573 (f), 529 (o), 520 (f), 508 (f), 464 (f), 446 (f), 440 (f) e 402 (o) cm^{-1} .

Ligante H_2L4 : 3415 (m), 3342 (m), 3054 (F), 3012 (F), 2918 (F), 2824 (F), 2797 (o), 2716 (F), 2588 (o), 1592 (F), 1570 (m), 1508 (m), 1480 (F), 1443 (F), 1365 (m), 1347 (m), 1301 (m), 1276 (m), 1246 (F), 1229 (o), 1186 (m), 1156 (m), 1110 (m), 1046 (m), 1026 (f), 997 (m), 976 (m), 952 (f), 909 (f), 880 (m), 853 (m), 824 (m), 760 (F), 738 (F), 725 (o), 635 (m), 612 (m), 581 (f), 569 (f), 542 (f), 502 (f), 487 (f), 461 (f) e 448 (f) cm^{-1} .

Entre 3550 e 3200 cm^{-1} , é observado um par de absorções com intensidades variando de média a baixa para cada composto, a saber, 3447 e 3426 cm^{-1} (ligante H_2L3) e 3415 e 3342 cm^{-1} (H_2L4). Essas frequências estão associadas às vibrações de estiramento O–H dos fenóis.

Na faixa de 1600 a 1400 cm^{-1} há uma série de cinco bandas, algumas delas em sobreposição, relacionadas aos estiramentos C=C e C=N próprios dos anéis aromáticos e heteroaromáticos (piridínicos) da molécula. No caso de H₂L3, as frequências são 1595, 1584, 1580, 1462 e 1440 cm^{-1} . Para H₂L4, essas absorções aparecem em 1592, 1570, 1508, 1480 e 1443 cm^{-1} .

Os compostos fenólicos absorvem normalmente entre 1390-1330 cm^{-1} e entre 1260-1180 cm^{-1} . Estas bandas resultam aparentemente da interação entre a deformação angular de O-H e o estiramento de C-O. A banda de maior comprimento de onda é mais forte⁽¹³¹⁾. Esses modos vibracionais foram observados em 1362 e 1248 cm^{-1} para H₂L3 e em 1365 e 1246 cm^{-1} para H₂L4. Finalmente, é importante destacar uma diferença fundamental entre os espectros de H₂L3 e H₂L4, que diz respeito à absorção observada em 1615 cm^{-1} para o ligante H₂L3, banda esta não apresentada por H₂L4. Esta frequência encontra-se associada à vibração de estiramento (C=N) da imina. Normalmente, as absorções de iminas localizam-se acima de 1650 cm^{-1} ; entretanto, em H₂L3, a dupla ligação C=N está conjugada com ambos os anéis de fenol, o que desloca a banda para regiões de menores frequências.

c) Espectroscopia eletrônica em solução

A Figura 4.6 apresenta o espectro eletrônico do ligante H₂L3 em solução metanólica, solvente este escolhido por ser o mesmo usado na síntese do complexo $[Cu_2(-OH)(L3)]ClO_4$. O espectro é constituído de dois conjuntos de absorções bem definidos. Em primeiro lugar, na região UV localizada abaixo de 300 nm, há uma banda em 237 nm (17300 L mol⁻¹ cm⁻¹), a qual está parcialmente superposta a uma outra de intensidade um pouco menor, centrada em 262 nm (16900 L mol⁻¹ cm⁻¹). Essas bandas podem ser relacionadas a transições eletrônicas originárias dos anéis aromáticos e heteroaromáticos, principalmente do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Na faixa UV próximo-vis, um outro par de absorções menos intensas que as anteriores, localizadas em 358 (12900 L mol⁻¹ cm⁻¹) e 466 nm (1050 L mol⁻¹ cm⁻¹), estão provavelmente associadas a excitações eletrônicas da dupla ligação C=N de imina.

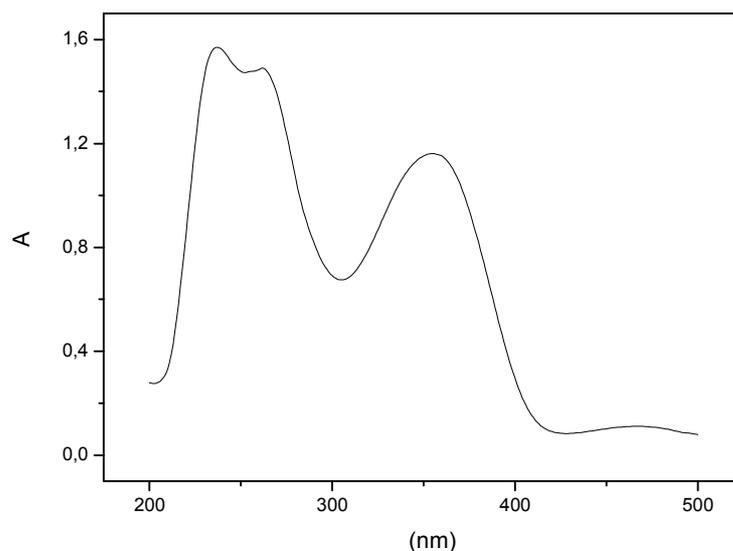


Figura 4.6. Espectro eletrônico do ligante H_2L3 em solução metanólica (concentração: $9,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

Por outro lado, o espectro eletrônico de H_2L4 , o qual não é aqui mostrado, apresenta apenas o primeiro conjunto de bandas (abaixo de 300 nm). Contudo, o espectro deste ligante não pôde ser avaliado em termos quantitativos pela ocorrência de uma reação de oxidação na molécula, possivelmente envolvendo a função amina secundária do braço pendente derivado do grupo 2-aminofenol. Essa oxidação acontece quando uma solução da amostra é exposta à atmosfera e pode ser acompanhada pelo aparecimento progressivo de uma banda em 379 nm.

d) Ressonância magnética nuclear de 1H e ^{13}C

Os ligantes H_2L3 e H_2L4 foram também caracterizados pela técnica de RMN de 1H e ^{13}C , utilizando-se $CDCl_3$ como solvente e TMS como padrão interno de calibração. A atribuição total dos espectros 1D foi realizada com o auxílio de experimentos bidimensionais. Para o asinalamento dos hidrogênios, foram usados mapas de contornos COSY (Homonuclear Correlation Spectroscopy), que correlacionam hidrogênios geminais ($^2J_{HH}$) e vicinais ($^3J_{HH}$) acoplados entre si. A atribuição dos carbonos, por sua vez, foi efetuada via experimentos 2D com detecção inversa, a saber, HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), mediante o qual é possível se realizar correlações entre hidrogênios e os heteronúcleos, C, diretamente ligados a eles ($^1J_{CH}$) e HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence), que detecta, com grande sensibilidade, acoplamentos carbono-hidrogênio de longa distância ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$).

As Tabelas 4.4 e 4.5 resumizam os resultados obtidos e as atribuições decorrentes para H_2L3 e H_2L4 , respectivamente. Uma seleção de espectros uni- e bidimensionais referentes a H_2L4 , o composto com maior número de hidrogênios, é mostrada nas Figuras 4.7 a 4.11.

Tabela 4.4. Dados de RMN de 1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) para H_2L3 , em $CDCl_3$ à temperatura ambiente

C/H	c	H	$^1H \times ^{13}C$ -HMBC
2	156,66	9,10 (s, 1H)	H-16 ($^3J_{CH}$)
3	55,51	3,81 (s, 2H)	H-14, H-30, H-40 ($^3J_{CH}$)
5	20,38	2,29 (s, 3H)	H-14 ($^3J_{CH}$)
11	121,36	–	H-2 ($^2J_{CH}$)
12; 31 e 41	158,28	–	H-30, H-36, H-40, H-46 ($^2J_{CH}$); H-3 (C12), H-33, H-35, H-43, H-45 ($^3J_{CH}$)
13	124,59	–	H-3 ($^2J_{CH}$)
14	135,24	7,11 (s, 1H)	H-3, H-5, H-16 ($^3J_{CH}$)
15	127,67	–	H-5 ($^2J_{CH}$)
16; 24	128,21	7,59 (s, 1H) 7,16 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 7,9$ e 6,8)	H-25 ($^2J_{CH}$); H-2 e H-14 (C16), H-26 ($^3J_{CH}$)
21	135,83	–	H-2, H-23, H-25 ($^3J_{CH}$)
22	151,56	–	H-23 ($^2J_{CH}$); H-24, H-26 ($^3J_{CH}$)
23	115,23	7,05 (d, 1H, $^3J_{HH} = 7,9$)	H-25 ($^3J_{CH}$)
25	120,10	6,91 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 7,7$ e 6,8)	H-23 ($^3J_{CH}$)
26	116,83	7,32 (d, 1H, $^3J_{HH} = 7,7$)	H-25 ($^2J_{CH}$); H-24 ($^3J_{CH}$)
30 e 40	59,14	3,92 (s, 4H)	H-3, H-30, H-36, H-40, H-46 ($^3J_{CH}$)
33 e 43	148,70	8,59 (d, 2H, $^3J_{HH} = 4,5$)	H-34, H-44 ($^2J_{CH}$); H-35, H-45 ($^3J_{CH}$)
34 e 44	122,39	7,20 (dd, 2H, $^3J_{HH} = 6,3$ e 4,5)	H-33, H-43 ($^2J_{CH}$); H-36, H-46 ($^3J_{CH}$)
35 e 45	137,00	7,65 (dd, 2H, $^3J_{HH} = 7,7$ e 6,3)	H-33, H-43 ($^3J_{CH}$)
36 e 46	123,13	7,40 (d, 2H, $^3J_{HH} = 7,7$)	H-35, H-45 ($^2J_{CH}$); H-30, H-34, H-40, H-44 ($^3J_{CH}$)

As multiplicidades dos sinais referentes aos hidrogênios, respectivas integrações e constantes de acoplamento (J , em Hz) estão entre parênteses.

Tabela 4.5. Dados de RMN de 1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) para H_2L4 , em $CDCl_3$ à temperatura ambiente

C/H	c	H	$^1H \times ^{13}C$ -HMBC
2	45,77	4,33 (s, 2H)	H-16 ($^3J_{CH}$)
3	57,32	3,75 (s, 2H)	H-14, H-30, H-40 ($^3J_{CH}$)
5	20,69	2,18 (s, 3H)	H-14, H-16 ($^3J_{CH}$)
11	126,34	–	H-2 ($^2J_{CH}$)
12	153,41	–	H-2, H-3, H-14, H-16 ($^3J_{CH}$)
13; 34 e 44	122,61	7,13 (dd, 2H, $^3J_{HH} = 7,6$ e 4,8)	H-3 (C13), H-33, H-43 ($^2J_{CH}$); H-36, H-46 ($^3J_{CH}$)
14	130,08	6,76 – 6,78 (m, 1H)*	H-3, H-5, H-16 ($^3J_{CH}$)
15	127,92	–	H-5 ($^2J_{CH}$)
16	129,65	6,99 (s, 1H)	H-2, H-5, H-14 ($^3J_{CH}$)
21	137,29	–	H-2 ($^3J_{CH}$)
22	146,48	–	H-26 ($^3J_{CH}$)
23	114,86	6,76 – 6,78 (m, 1H)*	H-24 ($^2J_{CH}$)
24	120,92	6,76 – 6,78 (m, 1H)*	H-23 ($^2J_{CH}$)
25	119,24	6,64 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 7,7$ e 7,2)	H-26 ($^2J_{CH}$)
26	115,17	6,84 (d, 1H, $^3J_{HH} = 7,7$)	H-25 ($^2J_{CH}$)
30 e 40	59,29	3,85 (s, 4H)	H-3, H-30, H-36, H-40, H-46 ($^3J_{CH}$)
31 e 41	158,32	–	H-30, H-36, H-40, H-46 ($^2J_{CH}$); H-33, H-35, H-43, H-45 ($^3J_{CH}$)
33 e 43	148,98	8,55 (d, 2H, $^3J_{HH} = 4,8$)	H-34, H-44 ($^2J_{CH}$); H-35, H-45 ($^3J_{CH}$)
35 e 45	137,66	7,61 (dd, 2H, $^3J_{HH} = 7,8$ e 7,6)	H-33, H-43 ($^3J_{CH}$)
36 e 46	123,70	7,33 (d, 2H, $^3J_{HH} = 7,8$)	H-30, H-34, H-40, H-44 ($^3J_{CH}$)

As multiplicidades dos sinais referentes aos hidrogênios, respectivas integrações e constantes de acoplamento (J , em Hz) estão entre parênteses. * Sinais sobrepostos num multiplete de integração total 3.

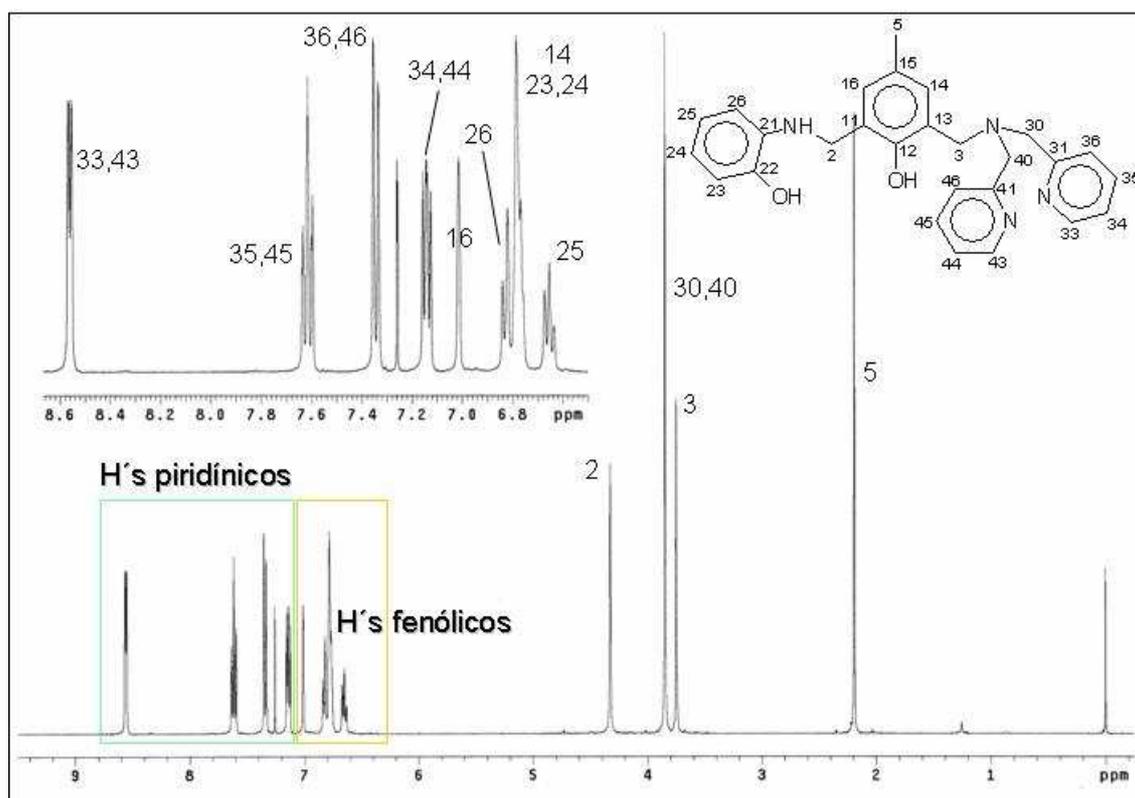


Figura 4.7. Espectro de RMN de 1H para o ligante H_2L_4 em solução de $CDCl_3$ à temperatura ambiente.

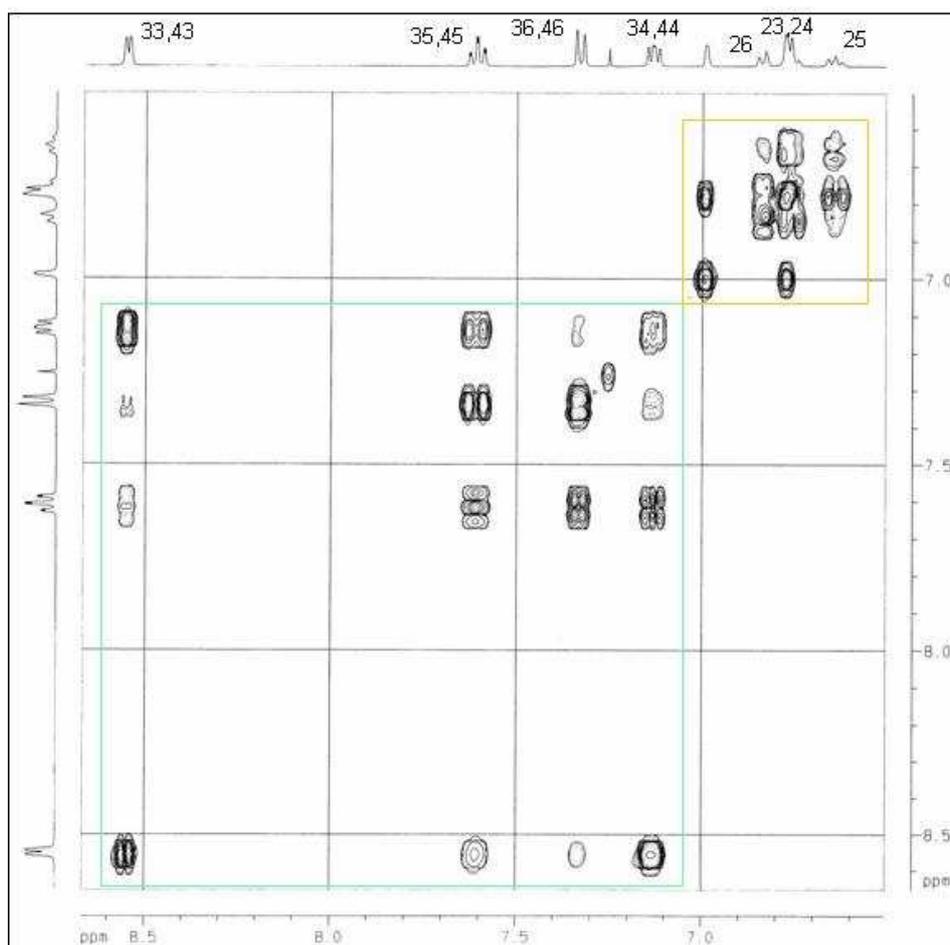


Figura 4.8. Mapa de contornos COSY para o ligante H_2L_4 em solução de $CDCl_3$ à temperatura ambiente.

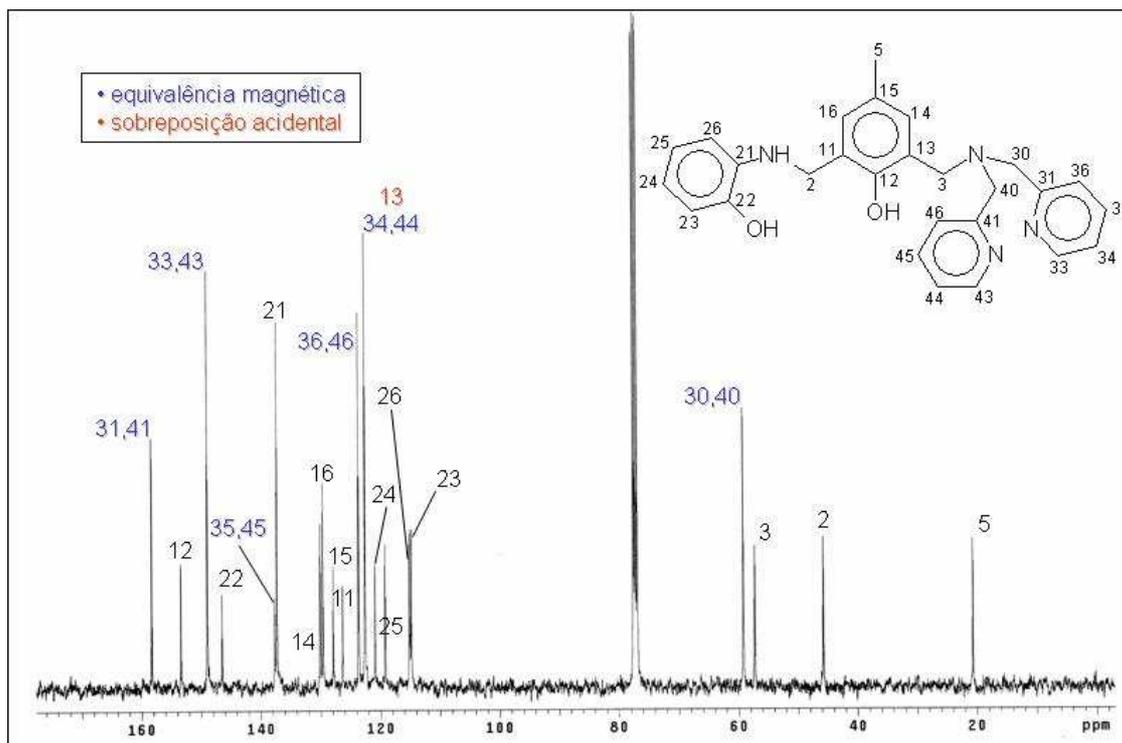


Figura 4.9. Espectro de RMN de ^{13}C para o ligante H_2L4 em solução de $CDCl_3$ à temperatura ambiente.

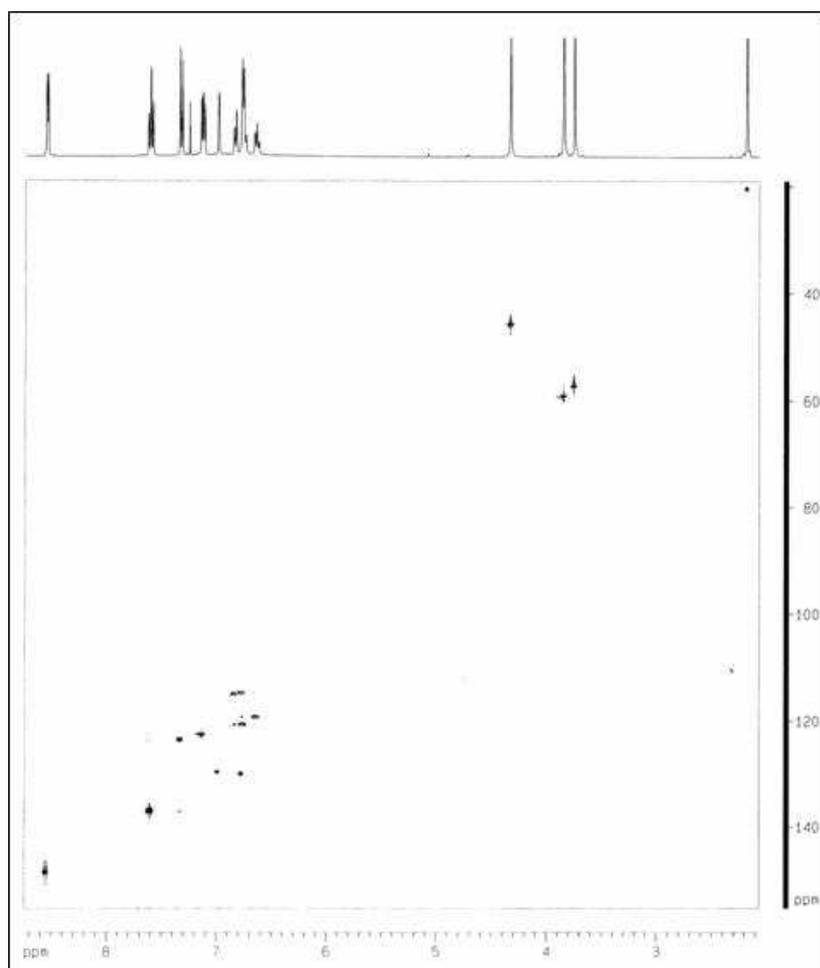


Figura 4.10. Mapa de contornos HSQC para o ligante H_2L4 em solução de $CDCl_3$ à temperatura ambiente.

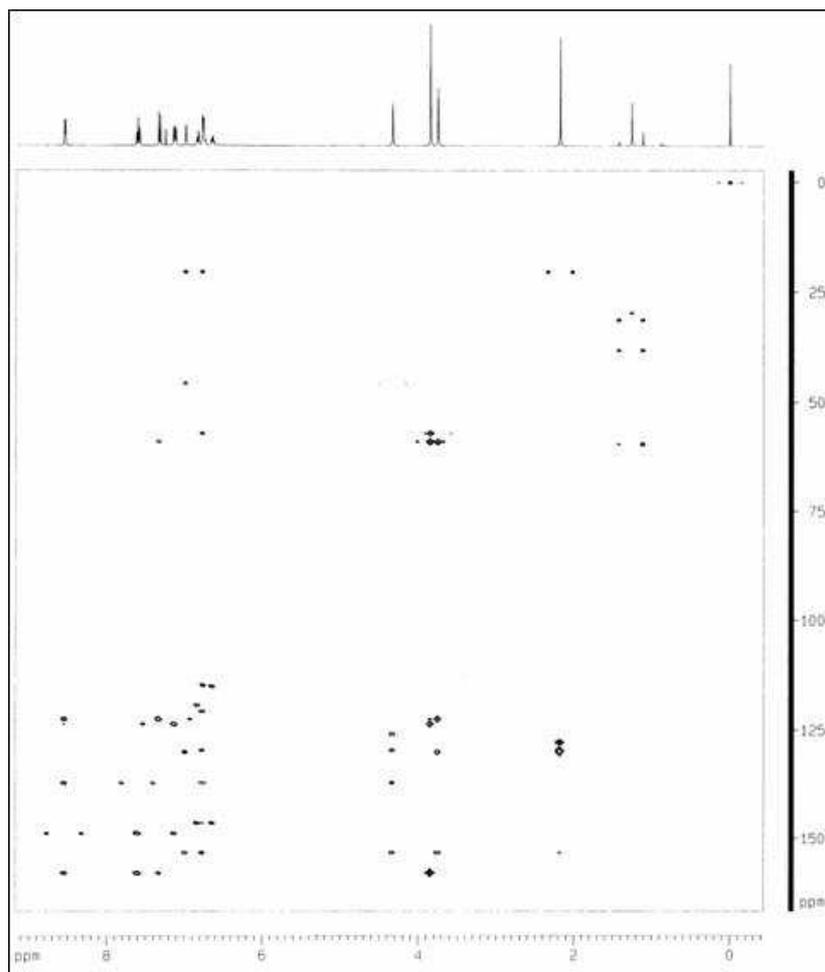


Figura 4.11. Mapa de contornos HMBC para o ligante H_2L_4 em solução de $CDCl_3$ à temperatura ambiente.

Os sinais referentes aos hidrogênios fenólicos e amínico, este último no caso de H_2L_4 , aparecem muito alargados em ambas substâncias, o que não permitiu a análise dos mesmos. Para o ligante H_2L_3 , o espectro de ^{13}C mostra apenas 19 sinais para 27 átomos de carbono, sendo seis os casos de equivalência magnética na molécula. Já o sinal de C12 sobrepõe-se de forma acidental ao de C31 e C41 e o sinal referente a C16 faz o mesmo com o de C24. Por outro lado, são observados 20 sinais para 27 átomos de carbono no espectro de H_2L_4 . Além dos seis casos de equivalência magnética, há a superposição acidental do sinal de C13 ao de C34 e C44 (Figura 4.9).

A principal diferença entre os espectros de H_2L_3 e H_2L_4 está relacionada aos sinais dos átomos C2 e H-2. Na molécula de amina, eles mostram deslocamentos químicos iguais a 45,77 e 4,33 ppm, respectivamente. Já na imina, a presença da dupla ligação $C=N$ causa um acentuado efeito de desproteção, sendo C2 observado em 156,66 ppm e H-2, por sua parte, a 9,10 ppm. Este fenômeno acaba afetando, em menor grau, todos os hidrogênios aromáticos de H_2L_3 , com exceção daqueles pertencentes aos braços piridínicos. No anel fenólico central, por

exemplo, H-16 (posição *orto* em relação ao grupo imina) sofre uma desproteção de 0,60 ppm e H-14 (posição *para*), uma desproteção igual a 0,34 ppm. Já no braço pendente derivado de 2-aminofenol, as posições mais afetadas foram a *orto* (H-26, desproteção de 0,48 ppm) e *para* (H-24, desproteção de 0,39 ppm). Os hidrogênios *meta* H-23 e H-25 mostraram desproteções de 0,28 e 0,27 ppm, respectivamente. Entre os carbonos, além do já discutido C2, é também bastante afetado C24 (cujo deslocamento químico aumenta de 120,92 ppm, em H₂L4, para 128,21 ppm, no espectro de H₂L3). É interessante notar que, a diferença do que acontece com os átomos de hidrogênio, alguns átomos de carbono mostram um efeito inverso, de proteção, como é o caso de C11 (126,34 ppm na amina versus 121,36 ppm na imina) e C3 (57,32 ppm na amina versus 55,51 ppm na imina).

CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO (ESTADO SÓLIDO)

O composto de coordenação $[Cu_2(-OH)(L3)]ClO_4$ (**3**) foi caracterizado por análise elementar, espectroscopia vibracional, reflectância difusa (UV-vis no estado sólido) e EPR. Resultados preliminares de magnetoquímica também foram obtidos. Além disso, o complexo teve a sua estrutura determinada por difração de raios-X em monocristal. Os dados extraídos dessas análises, com exceção do CHN, serão discutidos a continuação.

a) Estrutura cristalina

Na Figura 4.12, pode ser observada a estrutura do cátion complexo $[Cu_2(-OH)(L3)]^+$. Dados do cristal utilizado e outros relacionados com a coleta e o refinamento da estrutura são apresentados na Tabela 4.6. Uma seleção de comprimentos e ângulos de ligação é mostrada na Tabela 4.7.

Tabela 4.6. Seleção de dados cristalográficos para o complexo **3**

Complexo	3
Fórmula empírica	C ₂₇ H ₂₅ O ₇ N ₄ ClCu ₂
Massa fórmula	680,04 g/mol
Temperatura de coleta	294(2) K
Sistema cristalino	Monoclínico

Tabela 4.6. Seleção de dados cristalográficos para o complexo **3** (continuação)

Complexo	3
Grupo espacial	P 2 ₁ /c
	a = 12,6996(8) Å
	b = 14,611(1) Å
Cela unitária	c = 15,8840(9) Å
	$\beta = 113,146(2)^\circ$
Volume da cela	2710,0(3) Å ³
Z	4
Densidade (calculada)	1,667 g/cm ³
Tamanho do cristal utilizado	0,12 x 0,10 x 0,02 mm ³
Reflexões coletadas	21938
Únicas	6727 [R(int) = 0,0721]
Parâmetros refinados	408
“Goodness-of-fit on F ² ”	0,980
Índices R finais [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0474; wR2 = 0,0900
Índices R (todos os dados)	R1 = 0,1115; wR2 = 0,1082

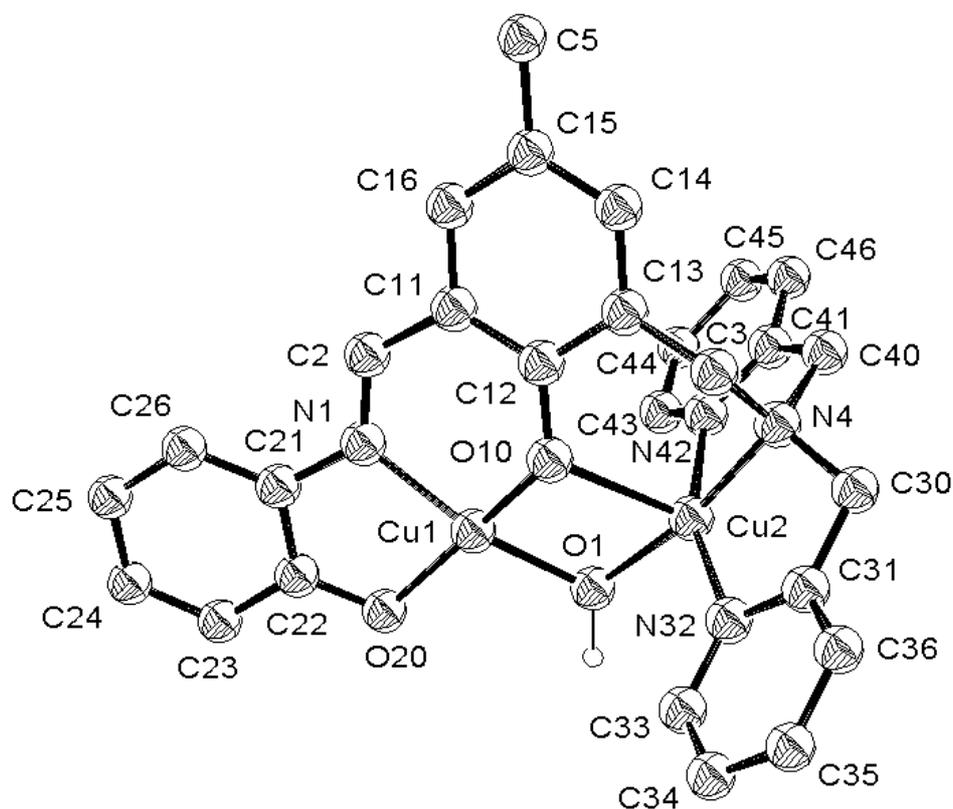


Figura 4.12. ORTEP para o cátion complexo $[Cu_2(\text{-OH})(C_{27}H_{24}O_2N_4)]^+$. Todos os átomos de hidrogênio, com exceção daquele presente na ponte -OH , foram omitidos por motivos de simplificação.

A estrutura molecular do cátion complexo presente em **3** mostra dois centros cúpricos, bastante próximos um do outro, ponteados pelo oxigênio O10 do grupo fenolato do ligante e por um íon hidróxido exógeno (O1). O átomo de hidrogênio deste grupo OH^- foi encontrado no correspondente mapa de Fourier. A distância intermetálica, Cu1–Cu2, assume o valor de 3,0235(6) Å, muito similar àquele observado para **2**. A geometria de coordenação em torno de Cu1 é do tipo quadrática planar distorcida, com os átomos de oxigênio das pontes ocupando posições relativas *cis* e a esfera de coordenação da espécie central sendo completada com o oxigênio do fenolato terminal O20 e o nitrogênio de imina N1. A distância média de ligação Cu1–ligante é de 1,923 ± 0,014 Å. A coordenação em torno do centro Cu2, por sua vez, possui uma enorme identidade estrutural com a descrita para o Cu2 presente no complexo **2**, apesar da ausência, em **3**, do perclorato coordenado. A geometria é a de uma pirâmide de base quadrada distorcida, com o átomo de oxigênio O10 ocupando a posição apical da esfera de coordenação [Cu2–O10 = 2,219(2) Å]. Neste caso, o parâmetro de Addison apresenta um valor igual a 0,16. Cu2 completa a base de seu poliedro com os átomos de nitrogênio N4 (de amina terciária) e N32 e N42 (de piridina). Como foi também verificado para o composto **2**, a ponte -OH parece exercer um forte efeito *trans* sobre o nitrogênio N4, uma vez que a

ligação Cu2–O1 é 0,116 Å mais curta do que a ligação Cu2–N4. A distância média de ligação Cu2–ligante equatorial é de 1,993 ± 0,048 Å. O comprimento da ligação N1–C2 é igual a 1,291(4) Å, praticamente idêntica à observada para o ligante H₂L3 isolado, o que confirma a natureza imínica de tal junção no complexo obtido. Cada cela unitária possui quatro unidades assimétricas do complexo, sendo que fazem parte ainda do arranjo cristalino da cela quatro contra-íons perclorato. O ângulo Cu1–O_{hidroxila}–Cu2 é igual a 103,95(12)°.

Tabela 4.7. Principais distâncias interatômicas e ângulos de ligação para o composto de coordenação **3**

LIGAÇÕES	Distâncias interatômicas (Å) e ângulos de ligação (°)
Cu1–Cu2	3,0235(6)
Cu1–N _{imina}	1,939(3)
Cu1–O _{fenolato ponte}	1,926(2)
Cu1–O _{hidroxo ponte}	1,905(3)
Cu1–O _{trans-fenolato ponte}	1,922(2)
Cu2–O _{fenolato ponte}	2,219(2)
Cu2–O _{hidroxo ponte}	1,933(2)
Cu1–O _{fenolato ponte} –Cu2	93,38(9)
Cu1–O _{hidroxo ponte} –Cu2	103,95(12)
Geometria Cu1	Quadrado-planar distorcida
Geometria Cu2	Pirâmide tetragonal distorcida

b) Espectroscopia vibracional

O espectro de infravermelho do composto **3** encontra-se representado na Figura 4.13. As características espectrais deste complexo são bastante próximas daquelas mostradas pelo ligante H₂L3, indicando a sua presença no composto de coordenação isolado. Outras bandas adicionais, referentes ao contra-íon ClO₄⁻ e ao ligante exógeno -hidroxo, também podem ser observadas. A seguir, uma listagem completa de todas as absorções: 3360 (m), 3120 (o), 3070 (f), 3050 (f), 3034 (o), 2984 (f), 2932 (f), 2904 (f), 2858 (f), 1608 (m), 1595 (o), 1580 (m), 1546 (m), 1476 (m), 1442 (m), 1380 (m), 1313 (m), 1298 (o), 1290 (m), 1262 (m), 1236 (o), 1223 (o), 1181 (f), 1170 (f), 1148 (m), 1108 (F), 1086 (F), 1066 (o), 1038 (m), 1027 (o), 1009 (m), 980 (m), 966 (f), 954 (o), 937 (f), 928 (o), 892 (f), 879 (f), 870 (f), 862 (o), 834 (o), 822 (o), 816 (f), 768 (o), 752 (m), 727 (f), 714 (o), 706 (o), 654 (o), 646 (f), 620 (m), 578 (f), 572 (o), 546 (f), 518 (f), 482 (m), 463 (o) e 418 (f) cm⁻¹.

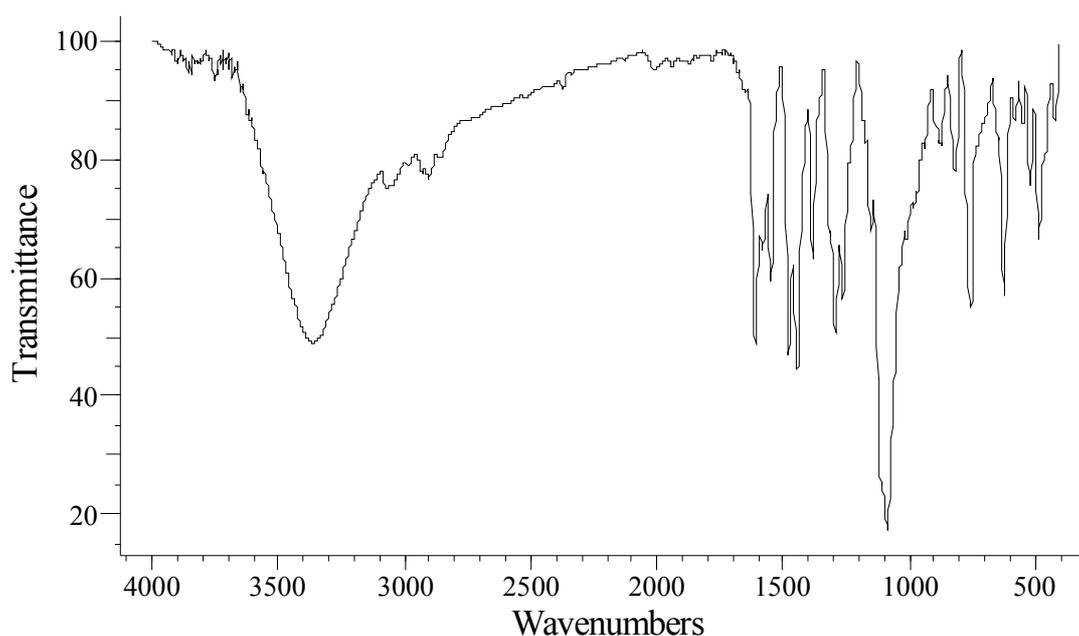


Figura 4.13. Espectro vibracional do composto **3** (amostragem: pastilha de KBr).

As absorções presentes em 3447 e 3426 cm^{-1} no espectro de H_2L3 , as quais foram atribuídas às vibrações de estiramento O–H dos fenóis, desaparecem no espectro de **3** dando lugar a uma única banda, mais intensa e alargada, com centro em 3360 cm^{-1} (provavelmente associada com a presença da ponte -hidroxo). Isto, aliado à ausência da banda de média intensidade em 1362 cm^{-1} no espectro do complexo, observada no ligante devido à interação entre a deformação angular de O–H e o estiramento de C–O dos grupos fenol, sugere que a coordenação de ambos os fenóis se dá na forma desprotonada (isto é, como ânions fenolato), confirmando assim resultados obtidos via difração de raios-X em monocristal.

Dentre as bandas relacionadas aos estiramentos C=C e C=N dos anéis aromáticos e heteroaromáticos do ligante, observadas entre 1600 a 1400 cm^{-1} , aquelas centradas em 1595 , 1580 e 1440 cm^{-1} não apresentaram maiores variações, sendo observadas, respectivamente, a 1595 , 1580 e 1442 cm^{-1} . A absorção localizada em 1584 cm^{-1} , entretanto, foi deslocada para região de menores frequências (1546 cm^{-1}) com a coordenação, enquanto a banda presente em 1462 cm^{-1} é registrada a 1476 cm^{-1} (região de maiores frequências) no espectro de **3**.

Por sua vez, o modo de estiramento C–O dos fenóis, observado no ligante livre como uma absorção em 1248 cm^{-1} , desloca-se para regiões de maiores frequências (1262 cm^{-1}) no espectro do complexo **3**. Comportamento semelhante foi observado por Peralta⁽¹⁰²⁾ para um composto binuclear de Cu(II) do ligante H_2bpbmp contendo uma ponte do tipo -acetato . Já

a banda observada em 1615 cm^{-1} no ligante H_2L3 , associada à vibração de estiramento da ligação $C=N$ imínica, sofre um leve deslocamento para 1608 cm^{-1} com a coordenação.

Finalmente, os modos relativos às vibrações de estiramento $(Cl-O)$ do contra-íon perclorato aparecem como uma única absorção intensa centrada em 1086 cm^{-1} .

c) EPR e espectroscopia eletrônica (reflectância difusa)

O complexo **3** mostrou-se silencioso no EPR, tanto à temperatura ambiente quanto a 77 K . Isto indica, assim como foi observado para os compostos **1** e **2**, um forte acoplamento entre os centros de cobre. É interessante salientar aqui o fato do complexo **3** ser silencioso em ambas as temperaturas estudadas, o que não acontece com **1** e **2**, que mostram sinais de baixa intensidade a 77 K . Isto pode ser explicado pelo fato dos ligantes H_2L3 e H_2L4 terem sido isolados e re-cristalizados previamente à sua utilização na síntese do complexo. Já no caso de **1** e **2**, em que os ligantes foram gerados *in situ*, a formação e incorporação à matriz do cristal de subprodutos (impurezas) de natureza paramagnética pode se ver favorecida.

O espectro de reflectância difusa de **3** (Figura 4.14) é constituído de uma absorção de média intensidade a aproximadamente 330 nm acompanhada por uma banda simétrica mais intensa centrada em 459 nm . Este conjunto pode ser atribuído a uma série de transferências de carga (do tipo ligante-metal) superpostas, a saber, $Cu^{II}-OH^-$, $Cu^{II}-OPh^-$ (em ponte) e $Cu^{II}-OPh^-$ (terminal) ⁽¹⁰⁵⁾. Merece destaque o fato da maior dessas bandas mostrar nítido deslocamento para a região visível do espectro quando comparada às respectivas absorções presentes em **1** e **2**. Neste caso, conforme mencionado no capítulo anterior, uma contribuição de transições envolvendo orbitais da imina (observadas numa solução metanólica do ligante na forma de duas bandas centradas em 358 e 466 nm) deve ser levada em consideração. As transições d-d relativas aos centros de cobre(II) não-equivalentes, por sua vez, aparecem na forma de um par de ombros sucessivos localizados em aproximadamente 600 e 710 nm . Isto indica a presença de, pelo menos, duas bandas largas sobrepostas. As posições e intensidades relativas destas absorções lembram aquelas apresentadas pelo complexo **2**.

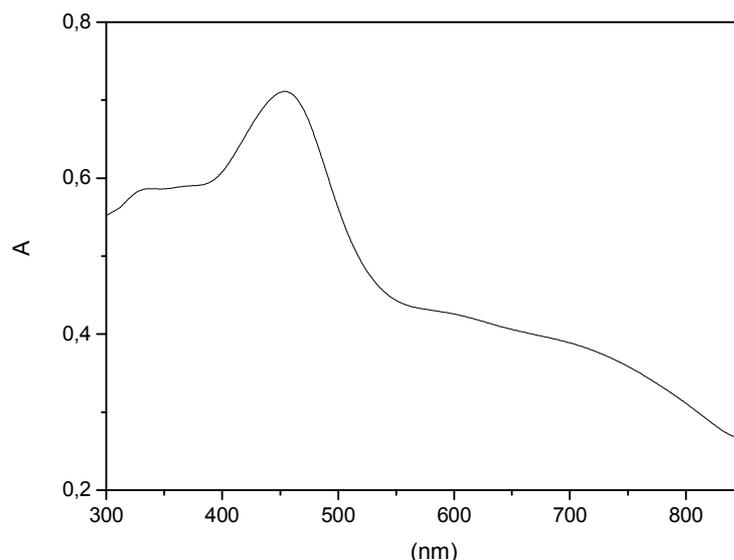


Figura 4.14. Espectro eletrônico do complexo **3** no estado sólido (reflectância difusa).

d) Propriedades magnéticas

A dependência da susceptibilidade magnética e do momento magnético efetivo (μ_{eff}) de **3** com a temperatura é mostrada na Figura 4.15. Como no caso dos complexos anteriores, correções diamagnéticas foram efetuadas. O valor de μ_{eff} é igual a $2,245 \mu_B$ a 298 K e cai para $0,225 \mu_B$ a 4 K. Isto está em concordância com uma forte interação antiferromagnética entre ambos os centros de cobre(II), a exemplo do observado para **1** e **2**, que apresentam constantes de acoplamento antiferromagnético J iguais a $-344,2 \mu_B$ e $-146,5 \mu_B$, respectivamente. Entretanto, a análise das curvas de susceptibilidade não forneceu um ajuste adequado entre os dados experimentais e aqueles calculados com base em modelos teóricos. Sendo assim, os parâmetros J , g e C não puderam ser obtidos e os resultados aqui apresentados para **3** são, portanto, apenas preliminares.

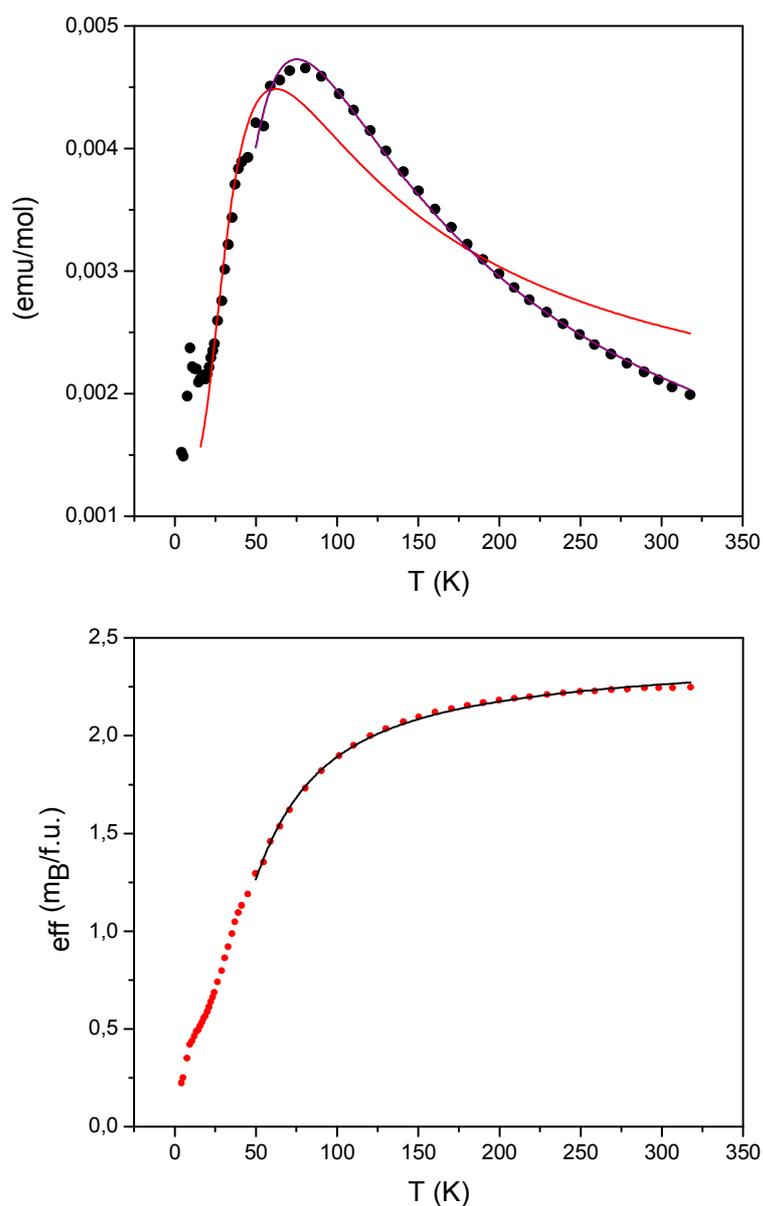


Figura 4.15. Dependência da susceptibilidade magnética e do momento magnético efetivo (μ_{eff}) do composto **3** com a temperatura. As linhas sólidas representam tentativas de ajuste entre os dados experimentais e calculados.

CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO (SOLUÇÃO)

a) Propriedades espectroscópicas (UV-vis e EPR)

O espectro eletrônico do complexo **3** em solução de acetonitrila pode ser observado na Figura 4.16 (a qual inclui uma curva de reflectância difusa para comparação). Conforme mostra essa figura, a dissolução afeta de forma acentuada as propriedades espectroscópicas do composto, o que se reflete num espectro cuja principal banda apresenta um considerável deslocamento hipsocrômico, para 429 nm ($10600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), na absorção observada em 459 nm no estado sólido. Essa banda possui um ombro a 392 nm ($8900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As

transições d-d foram, por sua vez, registradas na forma de uma absorção bastante larga e muito pouco intensa, com máximo em aproximadamente 620 nm. As mudanças espectrais aqui descritas estão provavelmente relacionadas com a entrada de uma ou, talvez, até duas moléculas de solvente nas posições axiais da esfera de coordenação do centro Cu1 durante o processo de solvatação.

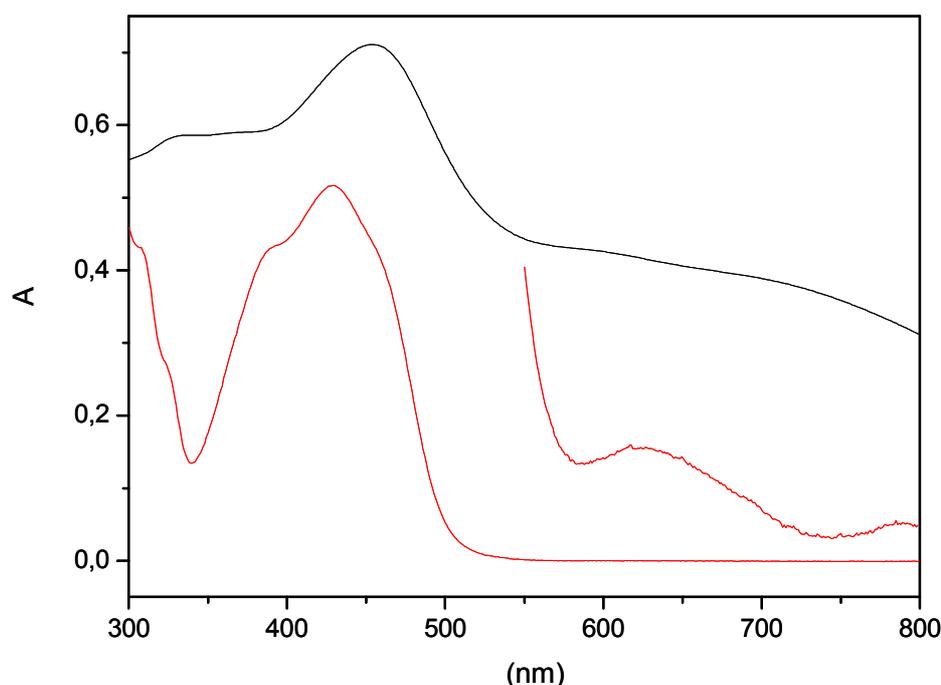


Figura 4.16. Espectros eletrônicos para o complexo **3** no estado sólido (linha preta) e dissolvido em acetonitrila (linhas vermelhas). Neste último caso, a concentração da solução é igual a $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Ainda em acetonitrila, uma solução de **3** apresenta-se silenciosa no EPR à temperatura ambiente. Isto constitui um forte indicativo de que a ponte -hidroxo permanece inalterada após o processo de dissolução (a exemplo do que foi descrito para os compostos **1** e **2**), o que reforça a hipótese das mudanças espectrais observadas na região do UV-vis serem causadas pela coordenação de moléculas do solvente.

b) Eletroquímica

O comportamento eletroquímico do complexo foi avaliado em solução de acetonitrila à temperatura ambiente. Um conjunto representativo de voltamogramas cíclicos obtidos para **3** podem ser vistos na Figura 4.17.

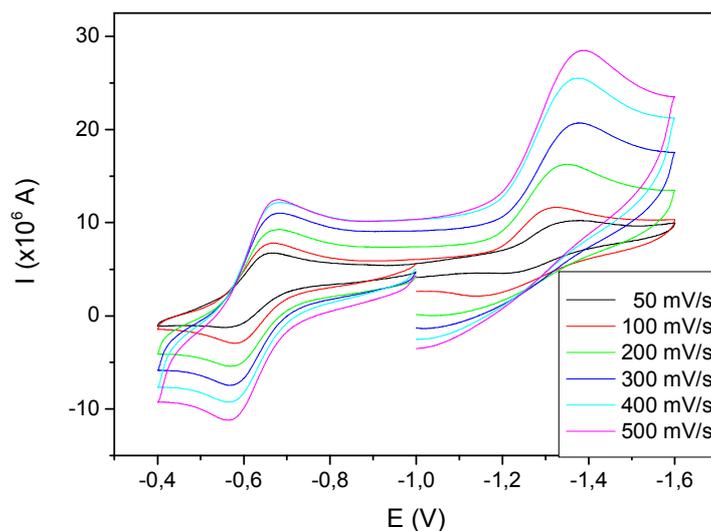


Figura 4.17. Série de voltamogramas cíclicos, obtidos a diferentes velocidades de varredura, para o composto **3** em acetonitrila, a 25 °C. Eletrólito suporte: 0,1 mol L⁻¹ TBAP; trabalho: eletrodo de carbono vítreo; referência: Ag/AgCl (NaCl 3 mol.L⁻¹); contra-eletrodo: fio de Pt; padrão interno: ferroceno.

Observa-se um par de processos redox bem definidos. O primeiro sinal é uma onda *quasi-reversível* a $E_{1/2} = -0,60$ V versus NHE, com características idênticas àquelas descritas, no capítulo anterior, para o primeiro processo envolvendo o complexo **2** (o qual corresponde ao par redox $Cu^{II}Cu^{II}/Cu^{II}Cu^I$). Como tanto **3** quanto **2** apresentam, em solução, um cátion de cobre pentacoordenado (isto é, Cu2) contendo a mesma disposição de átomos doadores ao seu redor, a identidade dessas ondas acaba por confirmar a atribuição realizada previamente, que associa as mesmas a mudanças no estado de oxidação do centro de cobre ligado às piridinas, ou seja, Cu2. O segundo processo, praticamente irreversível, é caracterizado pela presença de um pico catódico intenso a $-1,30$ V versus NHE. Este sinal pode ser atribuído à redução da espécie $Cu^{II}Cu^I$ para $Cu^I Cu^I$, sendo o centro quadrático planar Cu1 o encarregado, esta vez, de receber o elétron. Como discutido anteriormente, um importante parâmetro a ser considerado é a diferença entre $E_{1/2}$ e E_{pc} . Foi observado para **3** um valor de 0,70 V, o maior dentre todos os compostos descritos no presente trabalho. Isto reforça a idéia de que a assimetria do complexo constitui fator fundamental no aumento da faixa de estabilidade da espécie de valência mista $Cu^{II}Cu^I$. Aqui, novamente, os resultados foram confirmados por voltametria de onda quadrada (Figura 4.18) e estão em concordância com dados da literatura^(63,108).

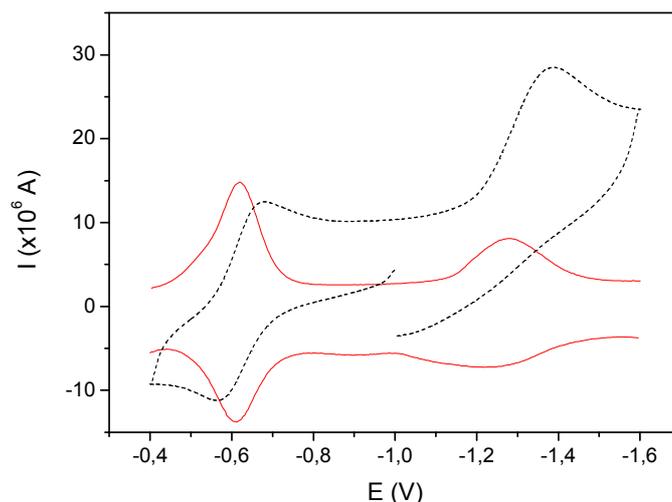


Figura 4.18. Voltamograma de onda quadrada para uma solução de **3** em acetonitrila, a 25 °C. Eletrólito suporte: 0,1 mol L⁻¹ TBAP; trabalho: eletrodo de carbono vítreo; referência: Ag/AgCl (NaCl 3 mol.L⁻¹); contra-eletrodo: fio de Pt; padrão interno: ferroceno. O voltamograma cíclico (linha pontilhada) foi adicionado para comparação.

c) Condutimetria

A condutividade elétrica molar do composto **3** também foi medida em acetonitrila e à temperatura ambiente. Encontrou-se um valor igual a 169,1 cm² mol⁻¹, um pouco acima da faixa típica esperada para eletrólitos 1:1 no solvente usado (120-160 cm² mol⁻¹)⁽¹⁰⁹⁾. Apesar da pequena discrepância, isto constitui um indicativo de que o complexo em questão pertence, de fato, ao tipo eletrolítico 1:1 e assim, conseqüentemente, a estrutura do mesmo não deve sofrer grandes modificações no processo de dissolução.

REATIVIDADE QUÍMICA E TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

a) Atividade de catecolase

Surpreendentemente, o composto **3** mostrou-se INATIVO como catalisador da reação de oxidação do substrato modelo 3,5-dtbc à correspondente *o*-quinona. Este é um resultado completamente inesperado, já que o complexo em questão apresenta considerável identidade estrutural com o sítio ativo das catecol oxidases. A princípio, poderia se tentar atribuir o fato à presença, na molécula, do centro de geometria quadrática planar Cu1, pois as suas posições de coordenação livres ocorrem segundo um eixo perpendicular ao eixo z da espécie central Cu2, pentacoordenada, o que impossibilitaria a coordenação bidentada em ponte do substrato. Há na literatura, entretanto, exemplos de compostos com características estruturais semelhantes que se mostraram ativos na oxidação do 3,5-di-*terc*-butilcatecol. Pode ser citado o caso de um complexo homobinuclear de cobre(II) do ligante hexadentado não-simétrico Htppnol⁽⁷³⁾, que

apresentou um k_{cat} igual a $3,12 \times 10^{-3} s^{-1}$ para a reação. Uma explicação mais plausível para o fenômeno estaria então relacionada com o elevado valor da diferença entre $E_{1/2}$ e E_{pc} (E) exibido por **3**, de 0,70 V. Rossi *et al.* ⁽⁷⁵⁾ encontraram uma forte correlação inversa entre esse parâmetro eletroquímico e o parâmetro cinético k_{cat} / K_M para uma série de compostos binucleares de cobre, isto é, quanto maior E , menor a eficiência catalítica do complexo. Nesse sentido, E constitui parâmetro importante, uma vez que representa a facilidade com que os centros metálicos aceitam os dois elétrons do substrato no processo oxidativo.

b) Atividade de fosfatase

Da mesma forma que os compostos **1** e **2**, o complexo **3** apresenta em sua estrutura um potencial nucleófilo constituído pela ponte -hidroxo, característica esta mantida em solução. Por esse motivo, a habilidade de **3** na catálise da hidrólise do diéster de fosfato BDNPP foi investigada. Os resultados obtidos são discutidos a seguir.

Efeito do pH e determinação dos parâmetros cinéticos

O composto **3** mostrou-se capaz de hidrolisar a molécula de BDNPP. A sua atividade hidrolítica apresentou uma forte dependência em relação ao pH (Figura 4.19). Foi observado um perfil em formato de sino, muito similar àquele determinado para **1**, porém algo menos simétrico. A atividade máxima foi registrada um pouco abaixo de pH 8. A partir dos dados obtidos até pH 7,97, pôde ser calculado um pK_a cinético igual a $6,91 \pm 0,06$ (provavelmente relacionado à formação da espécie -hidroxo). Entretanto, a ausência de uma caracterização completa de **3** em solução impede a identificação inequívoca da espécie cataliticamente ativa na reação de hidrólise do diéster de fosfato.

Estudos envolvendo titulações potenciométricas e espectrofotométricas encontram-se em andamento e, certamente, irão fornecer informações importantes a respeito da natureza da forma ativa do complexo.

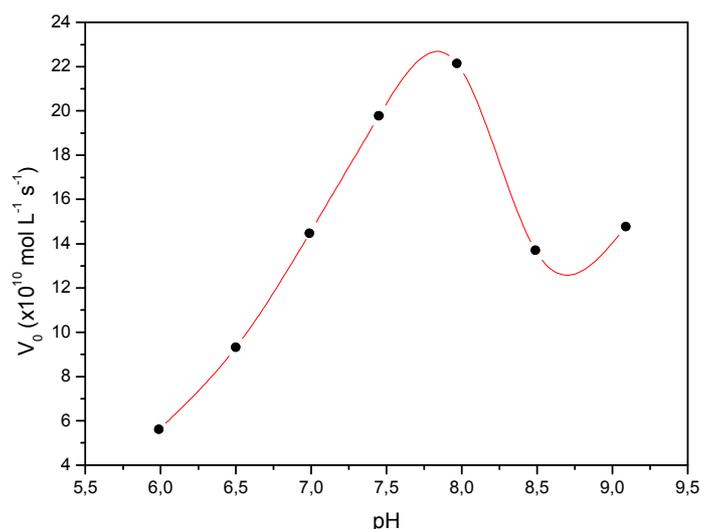


Figura 4.19. Dependência, em relação ao pH, da atividade hidrolítica de **3** frente ao substrato modelo BDNPP, numa mistura solvente água / acetonitrila (1:1 v/v). Condições experimentais usadas: $[3]_{\text{final}} = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[S]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura: 50,0 °C.

Em virtude do perfil cinético acima descrito, a dependência da velocidade da reação de hidrólise com a concentração de substrato foi estudada em pH 8,0. O conjunto de velocidades iniciais obtidas para a faixa de concentrações de BDNPP utilizadas segue uma cinética de saturação típica (Figura 4.20). Isto possibilitou o uso da equação de Michaelis-Menten, com linearização através do método de Lineweaver-Burk (Figura 4.20, “inset”), para se determinar os parâmetros cinéticos $K_M = 8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $V_{\text{máx}} = 5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$; a constante catalítica $k_{\text{cat}} = 6,67 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ e $k_{\text{cat}} / K_M = 8,34 \times 10^{-4} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A catálise mediada por **3** apresenta uma aceleração de aproximadamente 28 vezes em relação à velocidade de hidrólise da reação não-catalisada, a pH 7,5 e 25,0 °C ($k = 2,42 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$)⁽⁹⁰⁾. Acelerações de 26 e 27 vezes foram medidas por Rossi⁽¹¹²⁾ para dois compostos binucleares de cobre(II) dos ligantes simétricos *N,N'*-bis(2-hidroxibenzil)-*N,N'*-bis(2-piridilmetil)-2-ol-1,3-propanodiamina e *N,N,N',N'*-tetraquis(2-piridilmetil)-2-ol-1,3-propanodiamina, respectivamente.

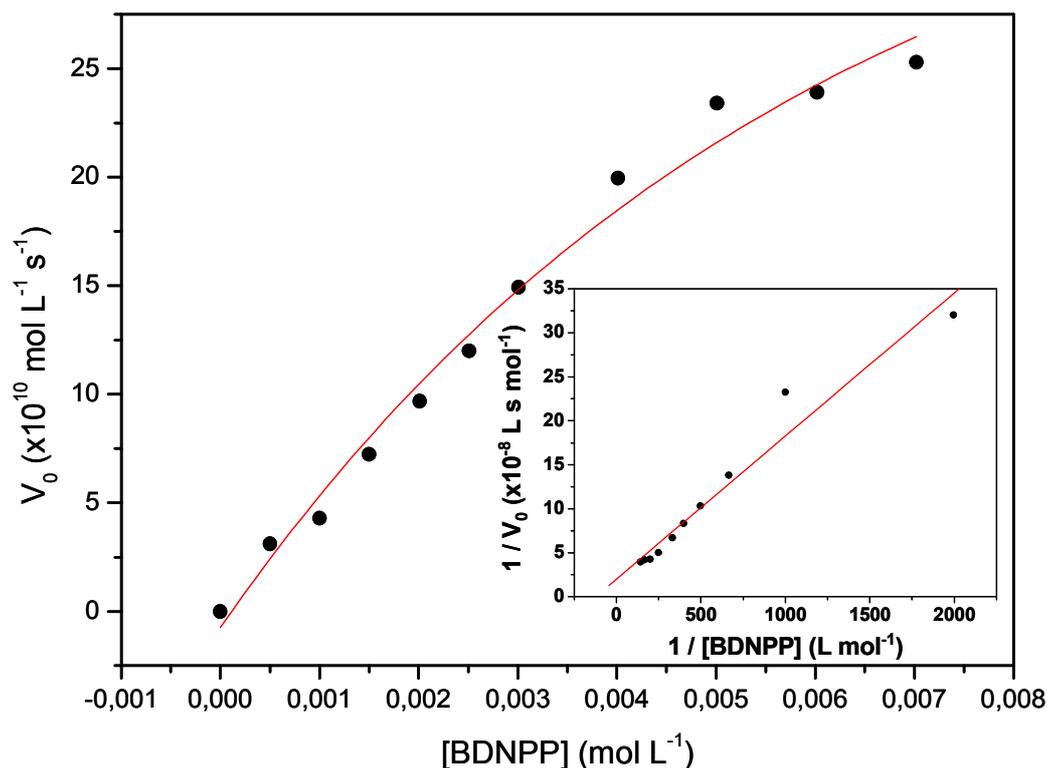


Figura 4.20. Dependência da velocidade da reação de hidrólise com a concentração de substrato a pH 8,0, numa mistura solvente água / acetonitrila (1:1 v/v). “Inset”: gráfico dos duplos recíprocos. Condições experimentais usadas: $[3]_{\text{final}} = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[S]_{\text{final}} = 5,0 \times 10^{-4}$ a $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura: $50,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

A exemplo do ocorrido com o complexo **2**, optou-se por não fazer aqui uma proposta mecanística para o sistema. Como mencionado acima, a falta de uma caracterização completa em solução impossibilita apontar a espécie cataliticamente ativa. Isto, por sua vez, implica o desconhecimento do modo de coordenação do substrato a **3**. Entretanto, uma vez identificada, via métodos potenciométricos e espectrofotométricos, a forma ativa do composto, cálculos de otimização estrutural em fase gasosa poderão ser realizados. Os dados assim obtidos levarão, certamente, à proposição de um mecanismo melhor fundamentado para a reação.

Num teste paralelo, foi feita a substituição dos íons cobre(II) presentes em **3** por íons zinco(II). O novo composto, cuja estrutura provavelmente seja do tipo $[Zn_2(-OH)(L3)]ClO_4$, apresentou um aumento significativo de atividade. Estes resultados sugerem que o complexo binuclear de zinco é um promissor candidato a sínteses e estudos futuros.

c) Clivagem de DNA plasmidial

Apesar do composto **3** ser menos ativo, por exemplo, do que o composto **2** na hidrólise da ligação fosfodiéster presente na molécula de BDNPP, decidiu-se efetuar, igualmente, testes visando avaliar o desempenho daquele na clivagem de ácidos nucleicos.

Como anteriormente, os estudos descritos a seguir foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Hernán Terenzi, usando-se o DNA plasmidial pBSKII. A metodologia, condições experimentais e concentrações de **3** utilizadas foram exatamente as mesmas detalhadas para os experimentos envolvendo os complexos **1** e **2**.

O composto **3** mostrou atividade nucleásica diretamente correlacionada à concentração somente a partir de pH 6,5-7,0, sendo o menos ativo dentre todos os complexos sintetizados neste trabalho (Figura 4.21). Apesar de sua baixa atividade, **3** pode também ser considerado uma nuclease química.

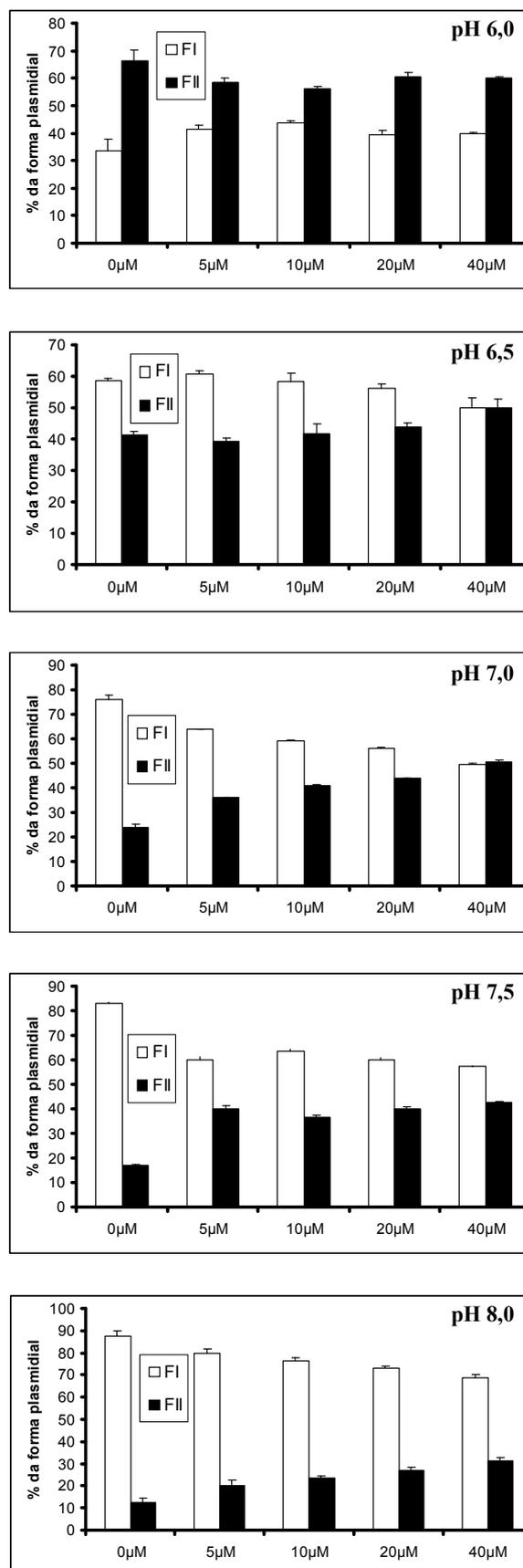


Figura 4.21. Clivagem do DNA plasmidial pBSKII pelo complexo **3**, após 16 horas de incubação em diferentes pHs. FI: forma superenovelada; FII: forma circular relaxada. Resultados expressos como porcentagem da forma plasmidial. Condições: $[3]_{\text{final}}$ variando de ZERO (controle) a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; temperatura: $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

A atividade nucleásica de **3** é mais pronunciada em pH 7,5. Neste pH, e na ausência do complexo, observa-se aproximadamente 83% dos plasmídios na forma superenovelada (ou I) e apenas 17% na forma circular relaxada. A incubação com o composto **3**, na concentração de 40 mol L^{-1} , hidrolisa parcialmente a forma I (que ainda predomina, com 57% do total) na forma II (43%). Não foi observada linearização (produção da forma III) do DNA em nenhum dos experimentos realizados.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ligantes

- 1) Foram sintetizados quatro novos ligantes binucleantes, a saber, HL1 (do tipo simétrico heptadentado), HL2 (não-simétrico heptadentado), H₂L3 e H₂L4 (hexadentados não-simétricos). Todos esses compostos, com exceção de H₂L4, possuem a função imina em suas estruturas. HL1 e HL2 não foram isolados, isto é, foram gerados no próprio meio em que seriam posteriormente utilizados. Os ligantes H₂L3 e H₂L4, por sua vez, foram isolados com rendimentos satisfatórios e caracterizados através de seus pontos de fusão, análise elementar e espectroscopias vibracional (IV) e eletrônica (UV-vis). Foi realizado ainda um estudo que possibilitou atribuição total dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C desses compostos. Cristais adequados para a determinação estrutural pela técnica de difração de raios-X foram obtidos em ambos os casos e, assim, as estruturas dos dois ligantes puderam ser determinadas.

Complexos

- 2) A partir desses ligantes, três complexos binucleares de cobre(II) inéditos, todos eles contendo uma ponte -hidroxo entre os metais, foram preparados e caracterizados por análise elementar, espectroscopias vibracional e eletrônica, EPR, medidas magnéticas, eletroquímica (voltametria cíclica e de onda quadrada) e condutimetria. Os compostos em questão são: [Cu₂(-OH)(L1)](ClO₄)₂·H₂O (**1**), [Cu₂(-OH)(L2)(ClO₄)]ClO₄ (**2**) e [Cu₂(-OH)(L3)]ClO₄ (**3**). Os três tiveram as suas estruturas elucidadas por difração de raios-X em monocristal. Caberia destacar aqui que não são muitos os complexos de cobre contendo simultaneamente pontes -hidroxo e -fenoxo descritos na literatura. Além disso, a presença da ponte -hidroxo torna esses compostos excelentes modelos estruturais para a forma *met* do sítio ativo das metaloenzimas catecol oxidases^(21,22). Os sistemas constituídos por **1** e **2** e suas formas protonadas e desprotonadas foram também caracterizados via titulações potenciométricas e espectrofotométricas, o que forneceu informações de grande utilidade na identificação das espécies cataliticamente ativas. Um fato bastante curioso reside nas dificuldades enfrentadas durante as várias tentativas de isolamento do complexo contendo o ligante hexadentado H₂L4: todas as reações resultaram na obtenção da espécie [Cu₂(-OH)(L3)]ClO₄ (**3**), o que sugere que a amina aromática secundária presente em H₂L4 seja oxidada à correspondente imina (ligante H₂L3) no decorrer do processo sintético.

Atividade de Catecolase

- 3) Estudos da reatividade desses compostos na reação de oxidação do substrato modelo 3,5-dtbc demonstraram que **1** e **2** são capazes de catalisar a mesma, podendo ser então considerados modelos funcionais para as catecol oxidases. O melhor desempenho foi obtido pelo complexo **2**, que apresentou, para a reação a 25,0 °C, $k_{\text{cat}} = 6,25 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e uma eficiência catalítica $k_{\text{cat}} / K_{\text{M}}$ de $2,31 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Em ambos os casos, as espécies ativas na catálise são aquelas de tipo -hidroxo , caracterizadas cristalograficamente. Com base nessas informações, propôs-se um mecanismo para a reação promovida por **1** e **2**, o qual envolve uma coordenação final do substrato 3,5-dtbc ao catalisador no modo $\text{-}^2: ^1$. O composto **3**, por outro lado, mostrou-se completamente inativo, o que pode estar relacionado com o elevado valor da diferença entre $E_{1/2}$ e E_{pc} para os seus centros de cobre ($E = 0,70 \text{ V}$, o maior dentre os três complexos sintetizados).

Atividade de Fosfatase

- 4) A presença de um potencial nucleófilo (a saber, o ligante exógeno hidroxilo coordenado em ponte) nas estruturas dos compostos **1**, **2** e **3**, serviu como incentivo à realização de testes catalíticos frente à reação de hidrólise do diéster de fosfato ativado BDNPP. Todos os três complexos, de fato, demonstraram ser ativos. Novamente, **2** foi aquele que apresentou a maior atividade, com uma constante catalítica $k_{\text{cat}} = 1,93 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $k_{\text{cat}} / K_{\text{M}}$ de $2,17 \times 10^{-2} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 50,0 °C, o que representa uma taxa de aceleração de ~500 vezes em relação à velocidade de hidrólise da reação não-catalisada. Para o caso específico de **1** e **2**, que possuem também atividade de tipo oxidativa (conforme descrito no parágrafo anterior), a mencionada atividade hidrolítica os transforma num interessante e raro exemplo de promiscuidade catalítica em sistemas biomiméticos. Entretanto, pelo perfil de dependência em relação ao pH observado, é possível se inferir que as espécies cataliticamente ativas não são as mesmas nos sistemas **1** e **2**. Para este último, propõe-se uma espécie poli-hidroxilada como principal responsável pela catálise. Foi feito ainda um estudo envolvendo cálculos teóricos em fase gasosa para o composto **1**, utilizando-se a teoria do funcional de densidade (DFT). A partir deste trabalho, foi possível se atribuir o modo de coordenação do BDNPP ao cátion complexo presente em **1** como sendo do tipo monodentado a apenas um dos centros cúpricos. Isto traz importantes implicações mecanísticas (coordenação monodentada

do substrato e subsequente ataque por um nucleófilo que faz ponte entre os metais), levando à proposição de um ciclo catalítico completamente inédito para a reação.

Clivagem de DNA Plasmidial

- 5) Em virtude da atividade hidrolítica apresentada pelos compostos **1**, **2** e **3** frente ao substrato modelo BDNPP, foram realizados testes visando avaliar o efeito que esses complexos poderiam causar nos ácidos nucléicos (mais especificamente, sobre o DNA plasmidial pBSKII). Observou-se que os três compostos possuem atividade nucleásica diretamente correlacionada à concentração para todos os pHs testados na faixa 6,0-8,0, o que os torna verdadeiras nucleases químicas. A ordem de reatividade foi **2** > **1** > **3**. O mais ativo deles, **2**, apresentou uma taxa de aceleração de 31 milhões de vezes! sobre a velocidade da reação não-catalisada. É importante salientar que os complexos **1** e **2** mostraram ainda capacidade de linearização do DNA, o que sugere a existência de certa especificidade sítio-dirigida na clivagem e faz desses dois compostos sérios candidatos a ferramentas biotecnológicas.

Ensaio em Células Tumorais e Macrófagos

- 6) Finalmente, pela sua capacidade de ocasionar danos ao DNA, o efeito citotóxico dos complexos **1** e **2** (aqueles que apresentaram maior atividade) foi testado em células de leucemia mielóide crônica pertencentes à linhagem K562. Ambos os compostos foram ativos, com **1** apresentando uma maior citotoxicidade (CI_{50} de $44,70 \text{ mol L}^{-1}$). Este resultado é, a princípio, surpreendente, já que o complexo **2** mostrou-se mais eficiente tanto nos testes oxidativos quanto nos de clivagem do DNA. Ensaio de acumulação celular indicaram que **1** e **2** são incorporados de forma muito efetiva nas células da linhagem K562, com concentrações intracelulares ~450 e 290 vezes maiores do que as extracelulares, respectivamente! Para avaliar-se o efeito do composto **1** em células normais, testes de viabilidade celular foram realizados com macrófagos peritoneais inflamatórios. Verificou-se que, a concentrações em que **1** já é tóxico para as células de leucemia, ele não afeta de forma significativa os macrófagos. Os resultados obtidos indicam então que o complexo apresenta seletividade em relação às células tumorais e, portanto, constitui um composto promissor para a realização de testes futuros.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS E CONTINUIDADE DO TRABALHO

Os sistemas descritos no presente trabalho de Tese (isto é, compostos **1**, **2** e **3**) são de enorme interesse no âmbito da Química de biomiméticos para as proteínas de cobre do tipo 3, com ênfase para as catecol oxidases. Devido à sua grande semelhança estrutural com o sítio ativo destas enzimas, espera-se que os modelos sintetizados possam contribuir para um maior entendimento sobre o mecanismo envolvido na reação de oxidação de catecóis mediada pelas COs. Entretanto, e apesar da importância intrínseca de **3**, os complexos **1** e **2** merecem uma atenção especial. O composto **2**, por exemplo, apresentou dentre os sistemas obtidos a maior atividade na oxidação do 3,5-dtbc e na hidrólise do BDNPP e de DNA plasmidial, o que faz dele uma potencial ferramenta industrial e/ou biotecnológica. Já o complexo **1**, que foi duas vezes mais ativo do que **2** na inibição do crescimento de células de leucemia mielóide crônica não afetando de forma significativa os macrófagos, perfila-se como um promissor candidato para a realização de novos ensaios. Trabalhos subseqüentes deverão ser realizados no intuito de explorar ao máximo as principais potencialidades destes compostos.

Para se ter uma caracterização completa e inequívoca dos sistemas **1** e **2** em solução, principalmente das espécies diméricas e triméricas como $[\text{HO}(\text{L}1)\text{Cu}_2-(\text{OH})-\text{Cu}_2(\text{L}1)\text{OH}]^{3+}$, um estudo por ESI-MS pode ser efetuado. Os resultados dele decorrentes poderão fornecer evidências confirmatórias sobre a presença e estequiometria dessas formas associadas.

O modo de coordenação do substrato ao sítio ativo das COs constitui ainda motivo de controvérsias na literatura científica. Assim, tentativas de síntese dos complexos catecolados, utilizando-se para isto o substrato desativado tetraclorocatecol (tcc), podem resultar de grande valia ao propósito de identificação do tipo de interação catalisador-substrato presente. Testes preliminares com o produto da reação entre **1** e o tcc, um fino sólido verde-claro que pôde ser isolado do meio reacional após ajuste do pH para 8,5 pela adição de NaOH aquoso, indicam (via dados de espectroscopia IV) que o mesmo não apresenta perclorato como contra-íon. Isto pode evidenciar que o aduto em questão é neutro. Por outro lado, a banda de estiramento das iminas é deslocada para 1651 cm^{-1} no espectro do aduto e há o aparecimento de uma absorção forte em 1448 cm^{-1} mostrando que, de fato, o substrato tcc encontra-se coordenado a **1**. Outro estudo importante a ser realizado diz respeito à obtenção dos peroxo-complexos, a partir dos quais seria possível se estabelecer o modo de coordenação do O_2 aos centros de cobre. Isto representa uma outra etapa crucial no ciclo catalítico e pode ser conseguido mediante a reação de **1**, **2** ou **3** com peróxido de hidrogênio. Atenção especial será dada às tentativas de obtenção

de monocristais dessas espécies, pois estes podem ser analisados de forma muito precisa pelas técnicas de difração de raios-X.

Em relação à promiscuidade catalítica apresentada pelos compostos **1** e **2**, de forma mais específica na hidrólise do diéster de fosfato BDNPP, existiria ainda a possibilidade de um mecanismo envolvendo catálise básica geral, o qual, para ser definitivamente descartado, requer a realização de um estudo do efeito isotópico de deutério sobre a velocidade da reação de hidrólise. Além disso, o acompanhamento das cinéticas de hidrólise, por exemplo, através de RMN de ^{31}P poderia indicar a presença de intermediários de reação, permitir a atribuição do modo de coordenação do substrato ao complexo e auxiliar na identificação dos produtos.

Os cálculos teóricos efetuados forneceram resultados muito satisfatórios e dão suporte à proposta mecanística no processo de hidrólise do BDNPP. Pretende-se dar continuidade a este trabalho de colaboração com a avaliação via DFT, tanto estrutural quanto energética, de outros intermediários e estados de transição importantes no contexto do ciclo catalítico. Estes estudos possuem também implicações no âmbito da oxidação de catecóis já que, se a estrutura contendo o substrato BDNPP ligado de maneira monodentada faz com que a ponte -hidroxo seja mantida, poderia se pensar da mesma forma para a entrada do 3,5-dtbc como uma outra alternativa mecanística. O processo de transferência eletrônica, inclusive, poderia dar-se com o substrato ligado de forma monodentada pois os sítios de cobre estão fortemente acoplados conforme demonstrado por EPR e medidas magnéticas.

O aluno de doutorado Claus Tröger Pich, sob orientação do Prof. Dr. Hernán Terenzi, pesquisou vários aspectos da clivagem de ácidos nucleicos pelos compostos **1** e **2** como parte de seu trabalho de Tese. Os dados decorrentes dessas investigações deverão ser comparados com aqueles obtidos a partir dos experimentos envolvendo o substrato modelo BDNPP com o objetivo de se chegar a um mecanismo único e geral, se é que ele de fato existe, para a quebra hidrolítica de ésteres de fosfato promovida por esses complexos.

O sistema constituído pelo composto **3** requer caracterizações adicionais em solução. Dentre elas, podemos citar as titulações (tanto potenciométricas quanto espectrofotométricas), as quais foram feitas para os sistemas **1** e **2**, e estudos de ESI-MS. Como foi mencionado no Capítulo 4, a substituição dos íons cobre(II) presentes em **3** por zinco(II) provoca um aumento significativo na atividade hidrolítica sobre o BDNPP. Os resultados sugerem que o complexo

binuclear de zinco é um promissor candidato a síntese e estudos futuros, tais como titulações, ESI-MS e diversos testes catalíticos.

Isolamento e purificação dos ligantes HL1 e HL2. Apesar de terem sido caracterizados estruturalmente em seus compostos de coordenação (**1** e **2**, respectivamente), HL1 e HL2 não foram separados do meio em que foram gerados. O isolamento e a purificação desses ligantes seriam fundamentais para a síntese de novos complexos utilizando-se outros metais, já que foi demonstrado aqui que, ao menos com o zinco(II), o método de geração *in situ* não apresentou resultados satisfatórios. Além disso, como citado na Introdução, A. Neves *et al.* mostraram recentemente que o AAZ surge como um substituto barato e de fácil obtenção para o versátil 1,4,7-triazaciclono-nano (1,4,7-tacn)⁽⁸⁷⁾. Um novo ligante não-simétrico funcionalizado com o AAZ (H₂AAZBPMP) e a estrutura de seu primeiro composto Fe^{III}Zn^{II} foram reportados no mesmo artigo, mas não há nele dados cinéticos envolvendo o sistema. Assim, HL1 e HL2 são o segundo e terceiro exemplos de funcionalização de um ligante através da unidade estrutural AAZ, e os seus complexos **1** e **2** foram extensivamente estudados nesta Tese, tanto no estado sólido quanto em solução. As propriedades catalíticas e biológicas de **1** e **2** foram investigadas e resultaram extremamente interessantes.

Um outro passo lógico seria a síntese dos análogos reduzidos (amina) desses ligantes, assim como os respectivos compostos binucleares de cobre(II) do tipo -hidroxo.

Por último, o ligante heptadentado inédito H₂L5 (Figura 6.1) e seu complexo binuclear de cobre(II) (**4**), cuja provável fórmula é [Cu₂(-OH)(L5)]ClO₄·6H₂O e baseia-se em dados de CHN e IV, foram sintetizados. Apesar da não obtenção de monocristais de qualidade para **4**, motivo pelo qual resolveu-se deixar este sistema fora do corpo principal da Tese, o composto pode ser muito interessante do ponto de vista estrutural, espectroscópico e catalítico devido à presença do grupo imidazol no ligante L5.

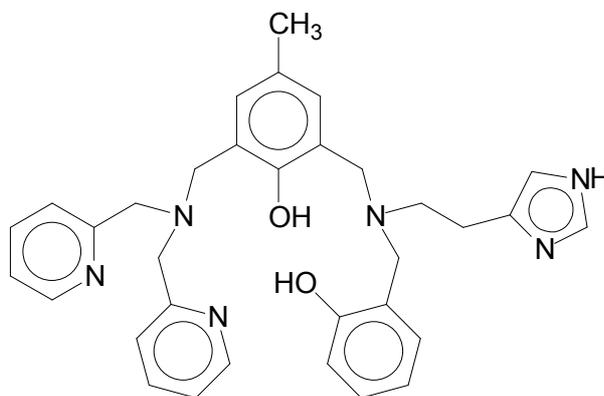


Figura 6.1. Estrutura do ligante binucleante não-simétrico H₂L5, o qual contém o grupo N-doador etil-imidazol.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ D. L. NELSON and M. M. COX. Lehninger. Princípios de Bioquímica. 3 Ed. Sarvier, São Paulo. p. 189-221 (2002).
- ² D. VOET, J. G. VOET and C. W. PRATT. Fundamentos de Bioquímica. Artmed, Porto Alegre. p. 281-320 (2002).
- ³ L. STRYER. Bioquímica. 4 Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p. 171-194 (1996).
- ⁴ D. F. SHRIVER and P. W. ATKINS. Química Inorgânica. 3 Ed. Bookman, Porto Alegre. p. 684-685 (2003).
- ⁵ R. H. HOLM, P. KENNEPOHL and E. I. SOLOMON. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. Chem. Rev., v. 96, p. 2239-2314 (1996).
- ⁶ E. L. HEGG and J. N. BURSTYN. Toward the Development of Metal-Based Synthetic Nucleases and Peptidases: A Rationale and Progress Report in Applying the Principles of Coordination Chemistry. Coord. Chem. Rev., v. 173, p. 133-165 (1998).
- ⁷ N. STRÄTER, W. N. LIPSCOMB, T. KLABUNDE and B. KREBS. Two-Metal Ion Catalysis in Enzymatic Acyl- and Phosphoryl-Transfer Reactions. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., v. 35, p. 2024-2055 (1996).
- ⁸ C. BELLE and J. L. PIERRE. Asymmetry in Bridged Binuclear Metalloenzymes: Lessons for the Chemist. Eur. J. Inorg. Chem., p. 4137-4146 (2003).
- ⁹ Vários autores. R. F. de FARIAS (organizador). Química de Coordenação: Fundamentos e Atualidades. Editora Átomo, Campinas. p. 157-193 (2005).
- ¹⁰ A. R. AMUNDSEN, J. WHELAN and B. BOSNICH. Biological Analogues. On the Nature of the Binding Sites of Copper-Containing Proteins. J. Am. Chem. Soc., v. 99, p. 6730-6739 (1977).
- ¹¹ A. VOLBEDA and W. G. J. HOL. Crystal Structure of Hexameric Haemocyanin from *Panulirus interruptus* Refined at 3.2 Å Resolution. J. Mol. Biol., v. 209, p. 249-279 (1989).
- ¹² A. VOLBEDA and W. G. J. HOL. Pseudo 2-fold Symmetry in the Copper-Binding Domain of Arthropodan Haemocyanins: Possible Implications for the Evolution of Oxygen Transport Proteins. J. Mol. Biol., v. 206, p. 531-546 (1989).
- ¹³ Y. MATOBA, T. KUMAGAI, A. YAMAMOTO, H. YOSHITSU and M. SUGIYAMA. Crystallographic Evidence that the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase is Flexible during Catalysis. J. Biol. Chem., v. 281, p. 8981-8990 (2006).
- ¹⁴ E. I. SOLOMON, U. M. SUNDARAM and T. E. MACHONKIN. Multicopper Oxidases and Oxygenases. Chem. Rev., v. 96, p. 2563-2605 (1996).
- ¹⁵ I. A. KOVAL, P. GAMEZ, C. BELLE, K. SELMECZI and J. REEDIJK. Synthetic Models of the Active Site of Catechol Oxidase: Mechanistic Studies. Chem. Soc. Rev., v. 35, p. 814-840 (2006).
- ¹⁶ A. M. MAYER and E. HAREL. Polyphenol Oxidases in Plants. Phytochemistry, v. 18, p. 193-215 (1979).
- ¹⁷ J. W. CARY, A. R. LAX and W. H. FLURKEY. Cloning and Characterization of cDNAs Coding for *Vicia faba* Polyphenol Oxidase. Plant Mol. Biol., v. 20, p. 245-253 (1992).

- ¹⁸ J. Sci. Food Agric., v. 18, p. 125-129 (1959).
- ¹⁹ B. J. DEVERALL. Phenolase and Pectic Enzyme Activity in the Chocolate Spot Disease of Beans. Nature, v. 189, p. 311 (1961).
- ²⁰ J. R. WALKER and P. H. FERRAR. Diphenol Oxidases, Enzyme-Catalysed Browning and Plant Disease Resistance. Biotechnol. Genet. Eng. Rev., v. 15, p. 457-498 (1998).
- ²¹ T. KLABUNDE, C. EICKEN, J. C. SACCHETTINI and B. KREBS. Crystal Structure of a Plant Catechol Oxidase Containing a Dicopper Center. Nat. Struct. Biol., v. 5, p. 1084-1090 (1998).
- ²² C. GERDEMANN, C. EICKEN and B. KREBS. The Crystal Structure of Catechol Oxidase: New Insight into the Function of Type-3 Copper Proteins. Acc. Chem. Res., v. 35, p. 183-191 (2002).
- ²³ C. EICKEN, F. ZIPPEL, K. BÜLDT-KARENTZOPOULOS and B. KREBS. Biochemical and Spectroscopic Characterization of Catechol Oxidase from Sweet Potatoes (*Ipomoea batatas*) Containing a Type-3 Dicopper Center. FEBS Letters, v. 436, p. 293-299 (1998).
- ²⁴ S. TORELLI, C. BELLE, S. HAMMAN and J. L. PIERRE. Substrate Binding in Catechol Oxidase Activity: Biomimetic Approach. Inorg. Chem., v. 41, p. 3983-3989 (2002).
- ²⁵ A. GRANATA, E. MONZANI and L. CASELLA. Mechanistic Insight into the Catechol Oxidase Activity by a Biomimetic Dinuclear Copper Complex. J. Biol. Inorg. Chem., v. 9, p. 903-913 (2004).
- ²⁶ P. E. M. SIEGBAHN. The Catalytic Cycle of Catechol Oxidase. J. Biol. Inorg. Chem., v. 9, p. 577-590 (2004).
- ²⁷ A. BASSAN, T. BOROWSKI and P. E. M. SIEGBAHN. Quantum Chemical Studies of Dioxygen Activation by Mononuclear Non-Heme Iron Enzymes with the 2-His-1-Carboxylate Facial Triad. Dalton Trans., p. 3153-3162 (2004).
- ²⁸ M. GÜELL and P. E. M. SIEGBAHN. Theoretical Study of the Catalytic Mechanism of Catechol Oxidase. J. Biol. Inorg. Chem., v. 12, p. 1251-1264 (2007).
- ²⁹ M. M. WHITTAKER and J. W. WHITTAKER. The Active Site of Galactose Oxidase. J. Biol. Chem., v. 263, p. 6074-6080 (1988).
- ³⁰ D. A. PROSHLYAKOV, M. A. PRESSLER and G. T. BABCOCK. Dioxygen Activation and Bond Cleavage by Mixed-Valence Cytochrome *c* Oxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 95, p. 8020-8025 (1998).
- ³¹ K. BORN, P. COMBA, A. DAUBINET, A. FUCHS and H. WADEPOHL. Catecholase Activity of Dicopper(II)-Bispidine Complexes: Stabilities and Structures of Intermediates, Kinetics and Reaction Mechanism. J. Biol. Inorg. Chem., v. 12, p. 36-48 (2007).
- ³² D. E. WILCOX. Binuclear Metallohydrolases. Chem. Rev., v. 96, p. 2435-2458 (1996).
- ³³ H. AOYAMA, T. M. ARAÚJO SILVA, M. A. MIRANDA e C. V. FERREIRA. Proteínas Tirosina Fosfatases: Propriedades e Funções Biológicas. Quím. Nova, v. 26(6), p. 896-900 (2003) e referências nele citadas.
- ³⁴ M. A. BRITO. Models for the Active Site Structure of Purple Acid Phosphatases. South. Braz. J. Chem., v. 4(4), p. 19-26 (1996) e referências nele citadas.

- ³⁵ D. GANI and J. WILKIE. Metal Ions in the Mechanism of Enzyme-Catalysed Phosphate Monoester Hydrolyses. Structure and Bonding, v. 89, p. 133-175 (1997).
- ³⁶ G. SCHENK, L. R. GAHAN, L. E. CARRINGTON, N. MITIC, M. VALIZADEH, S. E. HAMILTON, J. de JERSEY and L. W. GUDDAT. Phosphate Forms an Unusual Tripodal Complex with the Fe-Mn Center of Sweet Potato Purple Acid Phosphatase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 102, p. 273-278 (2005).
- ³⁷ T. KLABUNDE, N. STRÄTER, R. FRÖHLICH, H. WITZEL and B. KREBS. Mechanism of Fe(III)-Zn(II) Purple Acid Phosphatase Based on Crystal Structures. J. Mol. Biol., v. 259, p. 737-748 (1996).
- ³⁸ Y. LINDQVIST, E. JOHANSSON, H. KAIJA, P. VIHKO and G. SCHNEIDER. Three-Dimensional Structure of a Mammalian Purple Acid Phosphatase at 2.2 Å Resolution with a -(Hydr)oxo Bridged Di-Iron Center. J. Mol. Biol., v. 291, p. 135-147 (1999).
- ³⁹ X. WANG, R. Y. N. HO, A. K. WHITING and L. QUE, Jr. Spectroscopic Characterization of a Ternary Phosphatase-Substrate-Fluoride Complex. Mechanistic Implications for Dinuclear Hydrolases. J. Am. Chem. Soc., v. 121, p. 9235-9236 (1999).
- ⁴⁰ S. K. SMOUKOV, L. QUARONI, X. WANG, P. E. DOAN, B. M. HOFFMAN and L. QUE, Jr. Electron-Nuclear Double Resonance Spectroscopic Evidence for a Hydroxo-Bridge Nucleophile Involved in Catalysis by a Dinuclear Hydrolase. J. Am. Chem. Soc., v. 124, p. 2595-2603 (2002).
- ⁴¹ X. WANG and L. QUE, Jr. Extended X-ray Absorption Fine Structure Studies of the Anion Complexes of FeZn Uteroferrin. Biochemistry, v. 37, p. 7813-7821 (1998).
- ⁴² A. E. TRUE, R. C. SCARROW, C. R. RANDALL, R. C. HOLZ and L. QUE, Jr. EXAFS Studies of Uteroferrin and its Anion Complexes. J. Am. Chem. Soc., v. 115, p. 4246-4255 (1993).
- ⁴³ M. B. TWITCHETT and A. G. SYKES. Structure, Properties and Reactivity of the Fe^{II}Fe^{III} and Zn^{II}Fe^{III} Purple Acid Phosphatases. Eur. J. Inorg. Chem., p. 2105-2115 (1999).
- ⁴⁴ M. LANZMASTER, A. NEVES, A. J. BORTOLUZZI, V. E. AIRES, B. SZPOGANICZ, H. TERENCEZI, P. C. SEVERINO, J. M. FULLER, S. C. DREW, L. R. GAHAN, G. R. HANSON, M. J. RILEY and G. SCHENK. A New Heterobinuclear Fe^{III}Cu^{II} Complex with a Single Terminal Fe^{III}-O(phenolate) Bond. Relevance to Purple Acid Phosphatases and Nucleases. J. Biol. Inorg. Chem., v. 10, p. 319-332 (2005).
- ⁴⁵ N. MITIĆ, S. J. SMITH, A. NEVES, L. W. GUDDAT, L. R. GAHAN and G. SCHENK. The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases. Chem. Rev., v. 106, p. 3338-3363 (2006).
- ⁴⁶ J. E. VILLAFRANCA, C. R. KISSINGER and H. E. PARGE. Protein Serine/Threonine Phosphatases. Curr. Opin. Biotechnol., v. 7, p. 397-402 (1996).
- ⁴⁷ F. RUSNAK and P. MERTZ. Calcineurin: Form and Function. Physiol. Rev., v. 80, p. 1483-1521 (2000).
- ⁴⁸ D. GUERINI and C. B. KLEE. Structural Diversity of Calcineurin, a Ca²⁺ and Calmodulin-Stimulated Protein Phosphatase. Adv. Protein Phosphatases, v. 6, p. 391-410 (1991).

- ⁴⁹ M. M. KING and C. Y. HUANG. Activation of Calcineurin by Nickel Ions. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 114, p. 955-961 (1983).
- ⁵⁰ C. J. PALLEN and J. H. WANG. Regulation of Calcineurin by Metal Ions. J. Biol. Chem., v. 259, p. 6134-6141 (1984).
- ⁵¹ H.-C. LI. Activation of Brain Calcineurin Phosphatase towards Non-Protein Phosphoesters by Ca^{2+} , Calmodulin, and Mg^{2+} . J. Biol. Chem., v. 259, p. 8801-8807 (1984).
- ⁵² M. M. KING and C. Y. HUANG. The Calmodulin-Dependent Activation and Deactivation of the Phosphoprotein Phosphatase, Calcineurin, and the Effect of Nucleotides, Pyrophosphate, and Divalent Metal Ions. J. Biol. Chem., v. 259, p. 8847-8856 (1984).
- ⁵³ D. J. WOLFF and D. W. SVED. The Divalent Cation Dependence of Bovine Brain Calmodulin-Dependent Phosphatase. J. Biol. Chem., v. 260, p. 4195-4202 (1985).
- ⁵⁴ M. SCHWANINGER, R. BLUME, E. OETJEN, G. LUX and W. KNEPEL. Inhibition of cAMP-Responsive Element-Mediated Gene Transcription by Cyclosporin A and FK506 After Membrane Depolarization. J. Biol. Chem., v. 268, p. 23111-23115 (1993).
- ⁵⁵ H. ENSLEN and T. R. SODERLING. Roles of Calmodulin-Dependent Protein Kinases and Phosphatase in Calcium-Dependent Transcription of Immediate Early Genes. J. Biol. Chem., v. 269, p. 20872-20877 (1994).
- ⁵⁶ S. SHENOLIKAR and A. C. NAIRN. Protein Phosphatases: Recent Progress. Adv. Second. Messenger Phosphoprotein Res., v. 23, p. 3-121 (1991).
- ⁵⁷ J. LIU, J. D. FARMER, Jr., W. S. LANE, J. FRIEDMAN, I. WEISSMAN and S. L. SCHREIBER. Calcineurin is a Common Target of Cyclophilin-Cyclosporin A and FKBP-FK506 Complexes. Cell, v. 66, p. 807-815 (1991).
- ⁵⁸ C. R. KISSINGER, H. E. PARGE, D. R. KNIGHTON, C. T. LEWIS, L. A. PELLETIER, A. TEMPCZYK, V. J. KALISH, K. D. TUCKER, R. E. SHOWALTER, E. W. MOOMAW, L. N. GASTINEL, N. HABUKA, X. CHEN, F. MALDONADO, J. E. BARKER, R. BACQUET and J. E. VILLAFRANCA. Crystal Structures of Human Calcineurin and the Human FKBP12-FK506-Calcineurin Complex. Nature, v. 378, p. 641-644 (1995).
- ⁵⁹ J. REEDIJK. Introduction to Bioinorganic Chemistry. In: Bioinorganic Catalysis. Marcel Dekker, Inc., New York. p. 1-11 (1993).
- ⁶⁰ L. CASELLA, E. MONZANI, M. GULLOTTI, D. CAVAGNINO, G. CERINA, L. SANTAGOSTINI and R. UGO. Functional Modeling of Tyrosinase. Mechanism of Phenol *ortho*-Hydroxylation by Dinuclear Copper Complexes. Inorg. Chem., v. 35, p. 7516-7525 (1996).
- ⁶¹ E. MONZANI, L. QUINTI, A. PEROTTI, L. CASELLA, M. GULLOTTI, L. RANDACCIO, S. GEREMIA, G. NARDIN, P. FALESCHINI and G. TABBI. Tyrosinase Models. Synthesis, Structure, Catechol Oxidase Activity, and Phenol Monooxygenase Activity of a Dinuclear Copper Complex Derived from a Triamino Pentabenzimidazole Ligand. Inorg. Chem., v. 37, p. 553-562 (1998).
- ⁶² P. GENTSHEV, N. MÖLLER and B. KREBS. New Functional Models for Catechol Oxidases. Inorg. Chim. Acta, v. 300-302, p. 442-452 (2000).

- ⁶³ S. TORELLI, C. BELLE, I. GAUTIER-LUNEAU, J. L. PIERRE, E. SAINT-AMAN, J. M. LATOUR, L. Le PAPE and D. LUNEAU. pH-Controlled Change of the Metal Coordination in a Dicopper(II) Complex of the Ligand H-BPMP: Crystal Structures, Magnetic Properties, and Catecholase Activity. *Inorg. Chem.*, v. 39, p. 3526-3536 (2000).
- ⁶⁴ C. BELLE, C. BEGUIN, I. GAUTIER-LUNEAU, S. HAMMAN, C. PHILOUZE, J. L. PIERRE, F. THOMAS, S. TORELLI, E. SAINT-AMAN and M. BONIN. Dicopper(II) Complexes of H-BPMP-Type Ligands: pH-Induced Changes of Redox, Spectroscopic (¹⁹F NMR Studies of Fluorinated Complexes), Structural Properties, and Catecholase Activity. *Inorg. Chem.*, v. 41, p. 479-491 (2002).
- ⁶⁵ J. KAIZER, J. PAP, G. SPEIER, L. PARKANYI, L. KORECZ and A. ROCKENBAUER. Synthesis, Structure and Catecholase Activity of Dinuclear Copper and Zinc Complexes with an N₃-ligand. *J. Inorg. Biochem.*, v. 91, p. 190-198 (2002).
- ⁶⁶ J. MUKHERJEE and R. MUKHERJEE. Catecholase Activity of Dinuclear Copper(II) Complexes with Variable Endogenous and Exogenous Bridge. *Inorg. Chim. Acta*, v. 337, p. 429-438 (2002).
- ⁶⁷ K. SELMECZI, M. RÉGLIER, M. GIORGI and G. SPEIER. Catechol Oxidase Activity of Dicopper Complexes with N-donor Ligands. *Coord. Chem. Rev.*, v. 245, p. 191-201 (2003).
- ⁶⁸ J. KAIZER, R. CSONKA, G. SPEIER, M. GIORGI and M. RÉGLIER. Synthesis, Study and Catecholase-like Activity of a New Dicopper(II) Complex with Benzoylacetate Ligand. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 235, p. 81-87 (2005).
- ⁶⁹ D. M. BOGHAEI, M. BEHZAD and A. BEZAATPOUR. Synthesis, Characterization, Electrochemical Studies and Catecholase-like Activity of a Series of Mononuclear Cu(II), Homodinuclear Cu(II)Cu(II) and Heterodinuclear Cu(II)Ni(II) Complexes of a Phenol-based Compartmental Ligand. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 241, p. 1-7 (2005).
- ⁷⁰ A. JANCÓS, Z. PAKZI, N. JAKAB, B. GYURCZIK, A. ROCKENBAUER and T. GAJDA. Solution Chemical Properties and Catecholase-like Activity of the Copper(II)-Ac-His-His-Gly-His-OH System, a Relevant Functional Model for Copper Containing Oxidases. *Dalton Trans.*, p. 3187-3194 (2005).
- ⁷¹ I. A. KOVAL, C. BELLE, K. SELMECZI, C. PHILOUZE, E. SAINT-AMAN, A. M. SCHUITEMA, P. GAMEZ, J. L. PIERRE and J. REEDIJK. Catecholase Activity of a -Hydroxodicopper(II) Macrocyclic Complex: Structures, Intermediates and Reaction Mechanism. *J. Biol. Inorg. Chem.*, v. 10, p. 739-750 (2005).
- ⁷² C.-H. WENG, S.-C. CHENG, H.-M. WEI, H.-H. WEI and C.-J. LEE. Magnetostructural Correlations and Catecholase-like Activities of -Alkoxo- -carboxylato Double Bridged Dinuclear and Tetranuclear Copper(II) Complexes. *Inorg. Chim. Acta*, v. 359, p. 2029-2040 (2006).
- ⁷³ C. FERNANDES, A. NEVES, A. J. BORTOLUZZI, A. S. MANGRICH, E. RENTSCHLER, B. SZPOGANICZ and E. SCHWINGEL. A New Dinuclear Unsymmetric Copper(II) Complex as Model for the Active Site of Catechol Oxidase. *Inorg. Chim. Acta*, v. 320, p. 12-21 (2001).
- ⁷⁴ A. NEVES, L. M. ROSSI, A. J. BORTOLUZZI, A. S. MANGRICH, W. HAASE and R. WERNER. Synthesis, Structure, Physicochemical Properties and Catecholase-Like Activity of a New Dicopper(II) Complex. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 12, p. 747-754 (2001).

- ⁷⁵ A. NEVES, L. M. ROSSI, A. J. BORTOLUZZI, B. SZPOGANICZ, C. WIEZBICKI and E. SCHWINGEL. Catecholase Activity of a Series of Dicopper(II) Complexes with Variable Cu-OH(phenol) Moieties. Inorg. Chem., v. 41, p. 1788-1794 (2002).
- ⁷⁶ R. A. PERALTA, A. NEVES, A. J. BORTOLUZZI, A. dos ANJOS, F. R. XAVIER, B. SZPOGANICZ, H. TERENCEZI, M. C. B. de OLIVEIRA, E. CASTELLANO, G. R. FRIEDERMANN, A. S. MANGRICH and M. A. NOVAK. New Unsymmetric Dinuclear Cu^{II}Cu^{II} Complexes and Their Relevance to Copper(II) Containing Metalloenzymes and DNA Cleavage. J. Inorg. Biochem., v. 100, p. 992-1004 (2006).
- ⁷⁷ P. KAMAU and R. B. JORDAN. Kinetic Study of the Oxidation of Catechol by Aqueous Copper(II). Inorg. Chem., v. 41, p. 3076-3083 (2002).
- ⁷⁸ R. THAN, A. A. FELDMANN and B. KREBS. Structural and Functional Studies on Model Compounds of Purple Acid Phosphatases and Catechol Oxidases. Coord. Chem. Rev., v. 182, p. 211-241 (1999).
- ⁷⁹ C. BELLE, K. SELMECZI, S. TORELLI and J. L. PIERRE. Chemical Tools for Mechanistic Studies Related to Catechol Oxidase Activity. C. R. Chimie, v. 10, p. 271-283 (2007).
- ⁸⁰ M. JARENMARK, H. CARLSONN and E. NORDLANDER. Asymmetric Dinuclear Metal Complexes as Models for Active Sites in Hydrolases and Redox Enzymes. C. R. Chimie, v. 10, p. 433-462 (2007).
- ⁸¹ C. FERNANDES, A. NEVES, I. VENCATO, A. J. BORTOLUZZI, V. DRAGO, T. WEYHERMÜLLER and E. RENTSCHLER. Crystal Structure, Spectroscopy and Magnetic Properties of a Novel Fe^{III} Unsymmetric Tetranuclear Complex: A Model for *met*-Hemerythrin. Chem. Lett., p. 540-541 (2000).
- ⁸² A. NEVES, L. M. ROSSI, I. VENCATO, V. DRAGO, W. HAASE and R. WERNER. Crystal Structure, Spectral and Magnetic Properties of a New (-Acetate) (-Alkoxide) Dicopper(II) Complex as a Model for Tyrosinase. Inorg. Chim. Acta, v. 281, p. 111-115 (1998).
- ⁸³ A. NEVES, L. M. ROSSI, A. HORN, I. VENCATO, A. J. BORTOLUZZI, C. ZUCCO and A. S. MANGRICH. Synthesis, Structure and Properties of the First Dinuclear Copper(II) Complex as a Structural Model for the Phenolic Intermediate in Tyrosinase-Cresolase Activity. Inorg. Chem. Commun., v. 2, p. 334-337 (1999).
- ⁸⁴ A. NEVES, S. M. D. ERTHAL, V. DRAGO, K. GRIESAR and W. HAASE. A New N,O-donor Binucleating Ligand and Its First Iron(III) Complex as a Model for the Purple Acid Phosphatases. Inorg. Chim. Acta, v. 197, p. 121-124 (1992).
- ⁸⁵ A. L. GAVRILOVA and B. BOSNICH. Principles of Mononucleating and Binucleating Ligand Design. Chem. Rev., v. 104, p. 349-383 (2004).
- ⁸⁶ S. AIME, L. CALABI, C. CAVALLOTTI, E. GIANOLIO, G. V. GIOVENZANA, P. LOSI, A. MAIOCCHI, G. PALMISANO and M. SISTI. [Gd-AAZTA]: A New Structural Entry for an Improved Generation of MRI Contrast Agents. Inorg. Chem., v. 43, p. 7588-7590 (2004).

- ⁸⁷ R. A. PERALTA, A. NEVES, A. J. BORTOLUZZI, A. CASELLATO, A. dos ANJOS, A. GREATTI, F. R. XAVIER and B. SZPOGANICZ. First Transition Metal Complexes Containing the Ligands 6-amino-6-methylperhydro-1,4-diazepine (AAZ) and a New Functionalized Derivative: Can AAZ be a Mimetic Ligand for 1,4,7-triazacyclononane? Inorg. Chem., v. 44, p. 7690-7692 (2005).
- ⁸⁸ H. KOYAMA and T. YOSHINO. Synthesis of Some Medium Sized Cyclic Triamines and Their Cobalt(III) Complexes. Bull. Chem. Soc. Jpn., v. 45, p. 481-484 (1972).
- ⁸⁹ Catálogo Aldrich (2003/2004).
- ⁹⁰ C. A. BUNTON and S. J. FARBER. The Hydrolysis of Bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate. J. Org. Chem., v. 34, p. 767-772 (1969).
- ⁹¹ A. ALTOMARE, M. C. BURLA, M. CAMALLI, G. L. CASCARANO, C. GIACOVAZZO, A. GUAGLIARDI, A. G. G. MOLITERNI, G. POLIDORI and R. SPAGNA. *SIR97*: A New Tool for Crystal Structure Determination and Refinement. J. Appl. Cryst., v. 32, p. 115-119 (1999).
- ⁹² G. M. SHELDRICK. SHELXL-97: Program for the Refinement of Crystal Structures. University of Göttingen, Germany (1997).
- ⁹³ L. J. FARRUGIA. *ORTEP-3* for Windows – A Version of *ORTEP-III* with a Graphical User Interface (GUI). J. Appl. Cryst., v. 30, p. 565 (1997).
- ⁹⁴ R. L. CARLIN. Magnetochemistry. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. p. 3 (1986).
- ⁹⁵ M. MOLINA, C. MELIOS, J. O. TOGNOLLI, L. C. LUCHIARI and M. JAFELICCI. A Simple and Accurate Evaluation of Hydrogen-Ion Concentrations in Aqueous-Solutions of Fixed Ionic-Strength. J. Electroanal. Chem., v. 105(2), p. 237-246 (1979).
- ⁹⁶ R. T. YAMAKI. Interação de Vanádio(V) com Ácidos Hidroxâmicos em Solução Aquosa. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (1999).
- ⁹⁷ P. GANS, A. SABATINI and A. VACCA. SUPERQUAD: An Improved General Program for Computation of Formation Constants from Potentiometric Data. J. Chem. Soc., Dalton Trans., p. 1195-1200 (1985).
- ⁹⁸ D. J. LEGGETT and W. A. E. McBRYDE. General Computer Program for the Computation of Stability Constants from Absorbance Data. Anal. Chem., v. 47, p. 1065–1070 (1975).
- ⁹⁹ S. C. BATISTA, A. NEVES, A. J. BORTOLUZZI, I. VENCATO, R. A. PERALTA, B. SZPOGANICZ, V. E. AIRES and P. C. SEVERINO. Highly Efficient Phosphate Diester Hydrolysis and DNA Interaction by a New Unsymmetrical Fe^{III}Ni^{II} Model Complex. Inorg. Chem. Commun., v. 6, p. 1161-1165 (2003).
- ¹⁰⁰ C. N. VERANI. Rational Synthesis and Characterization of Paramagnetic Heteropolynuclear Systems Containing [M_A-M_B-M_C], [M_A-M_B]₂ and [M₁₋₂(R)₁₋₂₋₃] Cores. 169 p. Dissertation (Doktor der Naturwissenschaft) - Fakultät für Chemie, Ruhr-Universität Bochum, Mülheim an der Ruhr (2000).

- ¹⁰¹ A. THOER, M. DENIS, M. DELMAS and A. GASET. The Reimer-Tiemann Reaction in Slightly Hydrated Solid-Liquid Medium: a New Method for the Synthesis of Formyl and Diformyl Phenols. Synthetic Communications, v. 18, p. 2095-2101 (1988).
- ¹⁰² R. A. PERALTA. Novos Complexos Binucleares de Cobre(II) e de Ferro(III) Zinco(II): Biomiméticos Sintéticos para Catecol Oxidase e para Fosfatases Ácidas Púrpuras. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (2005).
- ¹⁰³ S. UOZUMI, H. FURUTACHI, M. OHBA, H. ŌKAWA, D. E. FENTON, K. SHINDO, S. MURATA and D. J. KITKO. Dinuclear Nickel(II) Complexes of an Unsymmetric “End-Off” Compartmental Ligand: Conversion of Urea into Cyanate at a Dinuclear Nickel Core. Inorg. Chem., v. 37, p. 6281-6287 (1998).
- ¹⁰⁴ P. KARSTEN, A. NEVES, A. J. BORTOLUZZI, M. LANZNASTER and V. DRAGO. Synthesis, Structure, Properties, and Phosphatase-like Activity of the First Heterodinuclear Fe^{III}Mn^{II} Complex with the Unsymmetric Ligand H₂BPBPMP as a Model for the PAP in Sweet Potato. Inorganic Chemistry, v. 41, p. 4624-4626 (2002).
- ¹⁰⁵ K. D. KARLIN, J. C. HAYES, Y. GULTNEH, R. W. CRUSE, J. W. MCKOWN, J. P. HUTCHINSON and J. ZUBIETA. Copper-Mediated Hydroxylation of an Arene: Model System for the Action of Copper Monooxygenases. Structures of a Binuclear Cu(I) Complex and Its Oxygenated Product. J. Am. Chem. Soc., v. 106, p. 2121-2128 (1984).
- ¹⁰⁶ P. DAPPORTO, M. FORMICA, V. FUSI, M. MICHELONI, P. PAOLI, R. PONTELLINI and P. ROSSI. Synthesis of a Flexible Ligand for Assembling Two Metal Ions in Close Proximity. Crystal Structures of Binuclear Nickel and Copper Complexes. Inorg. Chem., v. 39, p. 4663-4665 (2000).
- ¹⁰⁷ A. W. ADDISON, T. N. RAO, J. REEDIJK, J. VANRIJN and G. C. VERSCHOOR. Synthesis, Structure, and Spectroscopic Properties of Copper(II) Compounds Containing Nitrogen-Sulfur Donor Ligands; the Crystal and Molecular Structure of Aqua[1,7-bis(N-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane]copper(II) Perchlorate. J. Chem. Soc., Dalton Trans., p. 1349-1356 (1984).
- ¹⁰⁸ R. KANNAPPAN, R. MAHALAKSHMY, T. M. RAJENDIRAN, R. VENKATESAN and P. SAMBASIVA RAO. Magnetic, Catalytic, EPR and Electrochemical Studies on Binuclear Copper(II) Complexes Derived from 3,4-Disubstituted Phenol. Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.), v. 115, p. 1-14 (2003).
- ¹⁰⁹ W. J. GEARY. The Use of Conductivity Measurements in Organic Solvents for the Characterisation of Coordination Compounds. Coord. Chem. Rev., v. 7, p. 81-122 (1971).
- ¹¹⁰ H. A. DUARTE, S. CARVALHO, F. F. CAMPOS FILHO and E. B. PANIAGO. SCECS – Um Sistema Computacional para Cálculo e Exibição Gráfica de Complexos em Solução. Quím. Nova, v. 17(5), p. 397-404 (1994).
- ¹¹¹ A. ROMPEL, H. FISCHER, D. MEIWES, K. BULDT-KARENTZOPOULOS, R. DILLINGER, F. TUCZEK, H. WITZEL and B. KREBS. Purification and Spectroscopic Studies on Catechol Oxidases from *Lycopus europaeus* and *Populus Nigra*: Evidence for a Dinuclear Copper Center of Type 3 and Spectroscopic Similarities to Tyrosinase and Hemocyanin. J. Biol. Inorg. Chem., v. 4, p. 56-63 (1999).

- ¹¹² L. M. ROSSI. Novos Complexos Binucleares de Cobre de Relevância Bioinorgânica. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (2001).
- ¹¹³ R. J. KAZLAUSKAS. Enhancing Catalytic Promiscuity for Biocatalysis. Curr. Opin. Chem. Biol., v. 9, p. 195-201 (2005).
- ¹¹⁴ M. J. YOUNG, D. WAHNON, R. C. HYNES and J. CHIN. Reactivity of Copper(II) Hydroxides and Copper(II) Alkoxides for Cleaving an Activated Phosphate Diester. J. Am. Chem. Soc., v. 117, p. 9441-9447 (1995).
- ¹¹⁵ P. E. M. SIEGBAHN and M. R. A. BLOMBERG. Transition-Metal Systems in Biochemistry Studied by High-Accuracy Quantum Chemical Methods. Chem. Rev., v. 100, p. 421-437 (2000).
- ¹¹⁶ A. D. BECKE. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. J. Chem. Phys., v. 98, p. 5648-5652 (1993).
- ¹¹⁷ P. J. STEPHENS, F. J. DEVLIN, C. F. CHABALOWSKI and M. J. FRISCH. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. J. Phys. Chem., v. 98, p. 11623-11627 (1994).
- ¹¹⁸ N. A. REY, A. NEVES, A. J. BORTOLUZZI, C. T. PICH and H. TERENZI. Catalytic Promiscuity in Biomimetic Systems: Catecholase-like Activity, Phosphatase-like Activity, and Hydrolytic DNA Cleavage Promoted by a New Dicopper(II) Hydroxo-Bridged Complex. Inorg. Chem., v. 46, p. 348-350 (2007).
- ¹¹⁹ S. D. AUBERT, Y. LI and F. M. RAUSHEL. Mechanism for the Hydrolysis of Organophosphates by the Bacterial Phosphotriesterase. Biochemistry, v. 43, p. 5707-5715 (2004).
- ¹²⁰ C. JACKSON, H.-K. KIM, P. D. CARR, J.-W. LIU and D. L. OLLIS. The Structure of an Enzyme-Product Complex Reveals the Critical Role of a Terminal Hydroxide Nucleophile in the Bacterial Phosphotriesterase Mechanism. Biochim. Biophys. Acta, v. 1752, p. 56-64 (2005).
- ¹²¹ T. KNÖFEL and N. STRÄTER. Mechanism of Hydrolysis of Phosphate Esters by the Dimetal Center of 5'-Nucleotidase Based on Crystal Structures. J. Mol. Biol., v. 309, p. 239-254 (2001).
- ¹²² C. LIU, M. WANG, T. ZHANG and H. SUN. DNA Hydrolysis Promoted by Di- and Multi-nuclear Metal Complexes. Coord. Chem. Rev., v. 248, p. 147-168 (2004).
- ¹²³ www.fam.br/microrganismos/bacteriologia_genoma_bacteriano.htm, sítio web acessado em 11/09/2007.
- ¹²⁴ S. G. ERSKINE and S. E. HALFORD. Interactions of the *EcoRV* Restriction Endonuclease with Fluorescent Oligodeoxynucleotides. Gene, v. 157, p. 153-156 (1995).
- ¹²⁵ L. M. ROSSI, A. NEVES, A. J. BORTOLUZZI, R. HÖRNER, B. SZPOGANICZ, H. TERENZI, A. S. MANGRICH, E. PEREIRA-MAIA, E. E. CASTELLANO and W. HAASE. Synthesis, Structure and Properties of Unsymmetrical μ -Alkoxo-dicopper(II) Complexes: Biological Relevance to Phosphodiester and DNA Cleavage and Cytotoxic Activity. Inorg. Chim. Acta, v. 358, p. 1807-1822 (2005).

- ¹²⁶ E. PEREIRA-MAIA and A. GARNIER-SUILLEROT. Impaired Hydrolysis of Cisplatin Derivatives to Aquated Species Prevents Energy-dependent Uptake in GLC4 Cells Resistant to Cisplatin. J. Biol. Inorg. Chem., v. 8, p. 626-634 (2003).
- ¹²⁷ S. ISHIDA, J. LEE, D. J. THIELE and I. HERSKOWITZ. From the Cover: Uptake of the Anticancer Drug Cisplatin Mediated by the Copper Transporter Ctr1 in Yeast and Mammals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 99, p. 14298-14302 (2002).
- ¹²⁸ V. D. CAMPBELL, E. J. PARSONS and W. T. PENNINGTON. Diiron and Dicobalt Complexes of a Phenolate-Bridged Binucleating Ligand with Mixed Phenolate and Pyridine Podands. Inorg. Chem., v. 32, p. 1773-1778 (1993).
- ¹²⁹ S. S. S. RAJ, D. VELMURUGAN, E. SUBRAMANIAN and M. KANDASWAMY. 4-*tert*-Butyl-2,6-bis[(4-methyl-1-piperazinyl)methyl]phenol. Acta Cryst. C, v. 50, p. 2007-2009 (1994).
- ¹³⁰ A. NEVES, M. LANZMASTER, A. J. BORTOLUZZI, R. A. PERALTA, A. CASELLATO, E. E. CASTELLANO, P. HERRALD, M. J. RILEY and G. SCHENK. An Unprecedented Fe^{III}(-OH)Zn^{II} Complex that Mimics the Structural and Functional Properties of Purple Acid Phosphatases. J. Am. Chem. Soc., v. 129, p. 7486-7487 (2007).
- ¹³¹ R. M. SILVERSTEIN and F. X. WEBSTER. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 6 Ed. LTC Editora S.A., Rio de Janeiro. p. 67-135 (2000).

APÊNDICES

Apêndice A – Dados Cristalográficos Suplementares para o Ligante H₂L3

Tabela A.1. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros térmicos isotrópicos ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o ligante H₂L3. OBSERVAÇÃO: U(eq) é definido como 1/3 do traço do tensor U^{ij} ortogonalizado

	x	y	z	U(eq)
N(1)	8114(2)	-541(4)	6158(1)	71(1)
C(2)	8533(2)	937(5)	6225(1)	71(1)
C(3)	6969(2)	2555(4)	3979(1)	75(1)
N(4)	6240(2)	3874(3)	3810(1)	68(1)
C(5)	9263(2)	6655(5)	5359(2)	94(1)
O(1)	7344(2)	212(3)	5006(1)	86(1)
C(11)	8393(2)	2155(4)	5698(1)	66(1)
C(12)	7794(2)	1745(4)	5102(1)	67(1)
C(13)	7648(2)	2936(5)	4607(1)	67(1)
C(14)	8120(2)	4497(5)	4705(2)	73(1)
C(15)	8736(2)	4948(4)	5282(2)	70(1)
C(16)	8850(2)	3760(5)	5772(1)	69(1)
O(20)	6778(2)	-2747(3)	6199(1)	92(1)
C(21)	8281(2)	-1824(4)	6641(1)	70(1)
C(22)	7577(2)	-2990(4)	6642(1)	73(1)
C(23)	7718(2)	-4312(4)	7092(2)	85(1)
C(24)	8553(3)	-4497(5)	7519(2)	103(1)
C(25)	9256(3)	-3381(6)	7513(2)	105(1)
C(26)	9123(2)	-2035(5)	7076(1)	88(1)
C(30)	5651(2)	3520(4)	3171(1)	81(1)
C(31)	6098(3)	3820(6)	2644(2)	91(1)
N(32)	5772(2)	2923(5)	2121(1)	101(1)
C(33)	6136(3)	3131(8)	1626(2)	128(2)
C(34)	6948(6)	3970(12)	1628(4)	104(3)
C(34')	6435(13)	4930(20)	1620(7)	161(7)
C(35)	7356(9)	4798(13)	2184(4)	131(4)
C(35')	6769(12)	5870(30)	2154(7)	152(6)
C(36)	6954(7)	4710(11)	2693(3)	106(3)
C(36')	6406(10)	5562(18)	2672(6)	108(5)
C(40)	5690(2)	3940(4)	4274(1)	67(1)
C(41)	5206(2)	5658(4)	4240(1)	59(1)
N(42)	4294(2)	5665(3)	4035(1)	65(1)
C(43)	3866(2)	7209(5)	4005(1)	75(1)
C(44)	4311(3)	8752(4)	4174(1)	79(1)
C(45)	5241(3)	8726(5)	4388(2)	85(1)
C(46)	5698(2)	7172(5)	4420(1)	76(1)

Tabela A.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o ligante H₂L3

N(1)–C(2)	1,290(4)	C(2)–N(1)–C(21)	122,6(3)
N(1)–C(21)	1,417(4)	N(1)–C(2)–C(11)	120,5(3)
C(2)–C(11)	1,454(4)	N(4)–C(3)–C(13)	112,6(2)
C(3)–N(4)	1,472(3)	C(40)–N(4)–C(30)	110,3(2)
C(3)–C(13)	1,514(4)	C(40)–N(4)–C(3)	111,7(2)
N(4)–C(40)	1,462(4)	C(30)–N(4)–C(3)	110,0(2)
N(4)–C(30)	1,471(3)	C(16)–C(11)–C(12)	118,8(3)
C(5)–C(15)	1,521(4)	C(16)–C(11)–C(2)	120,4(3)
O(1)–C(12)	1,349(4)	C(12)–C(11)–C(2)	120,7(3)
C(11)–C(16)	1,403(4)	O(1)–C(12)–C(13)	118,8(3)
C(11)–C(12)	1,414(4)	O(1)–C(12)–C(11)	121,1(3)
C(12)–C(13)	1,389(4)	C(13)–C(12)–C(11)	120,2(3)
C(13)–C(14)	1,384(4)	C(14)–C(13)–C(12)	118,6(3)
C(14)–C(15)	1,402(4)	C(14)–C(13)–C(3)	120,7(3)
C(15)–C(16)	1,382(4)	C(12)–C(13)–C(3)	120,7(3)
O(20)–C(22)	1,352(3)	C(13)–C(14)–C(15)	123,4(3)
C(21)–C(26)	1,387(4)	C(16)–C(15)–C(14)	116,9(3)
C(21)–C(22)	1,390(4)	C(16)–C(15)–C(5)	121,7(3)
C(22)–C(23)	1,389(4)	C(14)–C(15)–C(5)	121,4(3)
C(23)–C(24)	1,370(4)	C(15)–C(16)–C(11)	122,1(3)
C(24)–C(25)	1,367(5)	C(26)–C(21)–C(22)	119,4(3)
C(25)–C(26)	1,385(5)	C(26)–C(21)–N(1)	123,2(3)
C(30)–C(31)	1,489(5)	C(22)–C(21)–N(1)	117,3(3)
C(31)–N(32)	1,315(4)	O(20)–C(22)–C(23)	123,6(3)
C(31)–C(36')	1,414(12)	O(20)–C(22)–C(21)	116,9(3)
C(31)–C(36)	1,441(8)	C(23)–C(22)–C(21)	119,6(3)
N(32)–C(33)	1,337(5)	C(24)–C(23)–C(22)	120,3(4)
C(33)–C(34)	1,382(8)	C(25)–C(24)–C(23)	120,6(4)
C(33)–C(34')	1,459(13)	C(24)–C(25)–C(26)	119,9(3)
C(34)–C(35)	1,367(8)	C(25)–C(26)–C(21)	120,2(4)
C(34')–C(35')	1,352(12)	N(4)–C(30)–C(31)	114,6(3)
C(35)–C(36)	1,394(9)	N(32)–C(31)–C(36')	125,5(6)
C(35')–C(36')	1,393(13)	N(32)–C(31)–C(36)	116,4(5)
C(40)–C(41)	1,502(4)	C(36')–C(31)–C(36)	43,0(5)
C(41)–N(42)	1,333(3)	N(32)–C(31)–C(30)	116,3(4)
C(41)–C(46)	1,382(4)	C(36')–C(31)–C(30)	108,8(6)
N(42)–C(43)	1,345(4)	C(36)–C(31)–C(30)	126,1(4)
C(43)–C(44)	1,366(4)	C(31)–N(32)–C(33)	119,7(4)
C(44)–C(45)	1,361(4)	N(32)–C(33)–C(34)	126,8(5)
C(45)–C(46)	1,372(4)	N(32)–C(33)–C(34')	108,2(8)
		C(34)–C(33)–C(34')	44,0(6)
		C(35)–C(34)–C(33)	114,7(7)
		C(35')–C(34')–C(33)	123,1(13)
		C(34)–C(35)–C(36)	119,5(8)
		C(34')–C(35')–C(36')	117,9(14)
		C(35)–C(36)–C(31)	121,7(6)
		C(35')–C(36')–C(31)	108,7(11)
		N(4)–C(40)–C(41)	110,5(2)

Tabela A.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o ligante H₂L3 (continuação)

N(42)–C(41)–C(46)	121,7(3)
N(42)–C(41)–C(40)	117,8(3)
C(46)–C(41)–C(40)	120,4(3)
C(41)–N(42)–C(43)	117,5(3)
N(42)–C(43)–C(44)	123,8(3)
C(45)–C(44)–C(43)	118,2(3)
C(44)–C(45)–C(46)	119,4(3)
C(45)–C(46)–C(41)	119,4(3)

Tabela A.3. Parâmetros térmicos de deslocamento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para $\text{H}_2\text{L3}$. OBSERVAÇÃO: O fator exponencial tem a forma: $-2^{-2} \times [h^2 a^2 \times U^{11} + \dots + 2hka \times b \times U^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
N(1)	80(2)	69(2)	54(2)	2(1)	0(1)	0(2)
C(2)	71(2)	84(3)	49(2)	2(2)	-1(2)	5(2)
C(3)	88(2)	85(2)	49(2)	-1(2)	13(2)	23(2)
N(4)	89(2)	67(2)	41(1)	4(1)	4(1)	22(2)
C(5)	92(3)	95(3)	101(3)	10(2)	33(2)	-6(2)
O(1)	100(2)	78(2)	60(1)	7(1)	-14(1)	-4(1)
C(11)	62(2)	77(2)	51(2)	4(2)	2(2)	5(2)
C(12)	71(2)	71(2)	56(2)	0(2)	9(2)	7(2)
C(13)	70(2)	80(2)	48(2)	1(2)	11(2)	18(2)
C(14)	74(2)	83(3)	65(2)	13(2)	23(2)	18(2)
C(15)	64(2)	80(2)	71(2)	3(2)	24(2)	4(2)
C(16)	61(2)	86(3)	58(2)	-2(2)	10(2)	1(2)
O(20)	93(2)	61(1)	98(2)	11(1)	-19(1)	-8(1)
C(21)	89(2)	68(2)	42(2)	0(2)	-5(2)	5(2)
C(22)	90(2)	61(2)	56(2)	-7(2)	-7(2)	1(2)
C(23)	111(3)	66(2)	65(2)	4(2)	-3(2)	-7(2)
C(24)	140(4)	91(3)	57(2)	13(2)	-12(2)	-10(3)
C(25)	110(3)	109(3)	69(2)	20(2)	-23(2)	-1(3)
C(26)	98(3)	91(3)	58(2)	11(2)	-11(2)	-7(2)
C(30)	98(2)	81(2)	51(2)	3(2)	-3(2)	20(2)
C(31)	118(3)	98(3)	45(2)	4(2)	-2(2)	-6(3)
N(32)	88(2)	155(3)	56(2)	-19(2)	9(2)	-3(2)
C(33)	129(4)	183(5)	69(3)	-20(3)	18(3)	-33(4)
C(34)	120(7)	120(7)	69(5)	-3(5)	20(5)	-28(6)
C(34')	164(14)	263(18)	53(7)	17(11)	23(9)	-77(13)
C(35)	185(9)	127(7)	76(5)	6(5)	21(6)	-64(7)
C(35')	136(12)	221(16)	103(10)	11(11)	39(9)	-63(11)
C(36)	178(8)	83(5)	53(4)	4(4)	23(5)	-46(6)
C(36')	111(10)	138(13)	79(8)	19(8)	33(7)	1(9)
C(40)	82(2)	62(2)	51(2)	4(2)	5(2)	17(2)
C(41)	77(2)	49(2)	43(2)	-4(1)	3(2)	11(2)
N(42)	78(2)	52(2)	57(2)	-3(1)	1(1)	11(2)
C(43)	82(2)	70(2)	63(2)	-8(2)	1(2)	20(2)
C(44)	114(3)	50(2)	62(2)	-8(2)	2(2)	19(2)
C(45)	118(3)	54(2)	69(2)	-12(2)	1(2)	-2(2)
C(46)	85(2)	63(2)	69(2)	-10(2)	-1(2)	-1(2)

Tabela A.4. Ligações de hidrogênio para o ligante H₂L3 [Å e °]

D–H···A	d(D–H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
O(1)–H(1)···N(1)	0,89	1,76	2,547(3)	145,7
O(20)–H(20)···N(42) ⁱ	0,88	1,86	2,736(3)	174,4

Códigos de simetria: (i) $-x + 1, -y, -z + 1$.

Apêndice B – Dados Cristalográficos Suplementares para o Ligante H₂L4

Tabela B.1. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros térmicos isotrópicos ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o ligante H₂L4. OBSERVAÇÃO: U(eq) é definido como $\frac{1}{3}$ do traço do tensor U^{ij} ortogonalizado

	x	y	z	U(eq)
O(1)	6823(2)	1280(1)	7041(3)	60(1)
O(20)	4786(2)	2424(1)	5095(2)	64(1)
N(1)	4876(2)	1812(1)	7641(3)	51(1)
N(4)	8406(2)	591(1)	6194(3)	49(1)
N(32)	11004(3)	334(2)	8827(4)	80(1)
N(42)	8029(3)	1714(2)	4450(3)	79(1)
C(2)	5232(3)	1249(2)	8595(3)	55(1)
C(3)	7420(2)	219(2)	5442(3)	51(1)
C(5)	4781(3)	-1095(2)	7337(4)	64(1)
C(11)	5522(2)	669(1)	7822(3)	45(1)
C(12)	6327(2)	702(1)	7071(3)	45(1)
C(13)	6613(2)	170(1)	6364(3)	43(1)
C(14)	6101(2)	-402(1)	6476(3)	47(1)
C(15)	5310(2)	-460(1)	7243(3)	46(1)
C(16)	5027(2)	82(2)	7886(3)	49(1)
C(21)	3899(2)	1780(1)	6457(3)	46(1)
C(22)	3845(3)	2121(1)	5142(4)	49(1)
C(23)	2884(3)	2143(2)	3998(4)	67(1)
C(24)	1961(3)	1835(2)	4132(5)	79(1)
C(25)	1997(3)	1505(2)	5411(5)	78(1)
C(26)	2960(3)	1469(2)	6563(4)	62(1)
C(30)	9078(3)	246(2)	7502(4)	62(1)
C(31)	10032(3)	631(2)	8409(4)	63(1)
C(33)	11866(4)	661(3)	9666(5)	96(2)
C(34)	11802(5)	1264(3)	10107(5)	110(2)
C(35)	10820(5)	1573(3)	9664(6)	122(2)
C(36)	9915(4)	1240(2)	8817(5)	98(1)
C(40)	9037(3)	730(2)	5122(4)	63(1)
C(41)	8518(2)	1231(2)	3990(4)	51(1)
C(43)	7592(4)	2165(2)	3444(4)	84(1)
C(44)	7633(4)	2172(2)	2025(5)	86(1)
C(45)	8102(4)	1662(3)	1551(5)	120(2)
C(46)	8540(4)	1176(2)	2534(4)	94(1)

Tabela B.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o ligante H₂L4

O(1)–C(12)	1,374(3)	C(12)–O(1)–H(1O)	109,5
O(1)–H(1O)	0,8200	C(22)–O(20)–H(20O)	109,5
O(20)–C(22)	1,362(3)	C(21)–N(1)–C(2)	119,0(3)
O(20)–H(20O)	0,8200	C(21)–N(1)–H(1N)	108(2)
N(1)–C(21)	1,408(4)	C(2)–N(1)–H(1N)	109(2)
N(1)–C(2)	1,474(4)	C(40)–N(4)–C(30)	111,0(2)
N(1)–H(1N)	0,86(1)	C(40)–N(4)–C(3)	109,6(2)
N(4)–C(40)	1,465(4)	C(30)–N(4)–C(3)	110,2(2)
N(4)–C(30)	1,466(4)	C(31)–N(32)–C(33)	117,6(4)
N(4)–C(3)	1,475(4)	C(41)–N(42)–C(43)	117,5(3)
N(32)–C(31)	1,337(4)	N(1)–C(2)–C(11)	116,1(2)
N(32)–C(33)	1,341(5)	N(1)–C(2)–H(2A)	108,3
N(42)–C(41)	1,322(4)	C(11)–C(2)–H(2A)	108,3
N(42)–C(43)	1,338(4)	N(1)–C(2)–H(2B)	108,3
C(2)–C(11)	1,511(4)	C(11)–C(2)–H(2B)	108,3
C(2)–H(2A)	0,9700	H(2A)–C(2)–H(2B)	107,4
C(2)–H(2B)	0,9700	N(4)–C(3)–C(13)	112,7(2)
C(3)–C(13)	1,505(4)	N(4)–C(3)–H(3A)	109,0
C(3)–H(3A)	0,9700	C(13)–C(3)–H(3A)	109,0
C(3)–H(3B)	0,9700	N(4)–C(3)–H(3B)	109,0
C(5)–C(15)	1,509(4)	C(13)–C(3)–H(3B)	109,0
C(5)–H(5A)	0,9600	H(3A)–C(3)–H(3B)	107,8
C(5)–H(5B)	0,9600	C(15)–C(5)–H(5A)	109,5
C(5)–H(5C)	0,9600	C(15)–C(5)–H(5B)	109,5
C(5)–H(5D)	0,9600	H(5A)–C(5)–H(5B)	109,5
C(5)–H(5E)	0,9600	C(15)–C(5)–H(5C)	109,5
C(5)–H(5F)	0,9600	H(5A)–C(5)–H(5C)	109,5
C(11)–C(12)	1,385(4)	H(5B)–C(5)–H(5C)	109,5
C(11)–C(16)	1,396(4)	C(15)–C(5)–H(5D)	109,5
C(12)–C(13)	1,396(4)	H(5A)–C(5)–H(5D)	141,1
C(13)–C(14)	1,384(4)	H(5B)–C(5)–H(5D)	56,3
C(14)–C(15)	1,384(4)	H(5C)–C(5)–H(5D)	56,3
C(14)–H(14)	0,9300	C(15)–C(5)–H(5E)	109,5
C(15)–C(16)	1,380(4)	H(5A)–C(5)–H(5E)	56,3
C(16)–H(16)	0,9300	H(5B)–C(5)–H(5E)	141,1
C(21)–C(26)	1,384(4)	H(5C)–C(5)–H(5E)	56,3
C(21)–C(22)	1,399(4)	H(5D)–C(5)–H(5E)	109,5
C(22)–C(23)	1,374(4)	C(15)–C(5)–H(5F)	109,5
C(23)–C(24)	1,371(5)	H(5A)–C(5)–H(5F)	56,3
C(23)–H(23)	0,9300	H(5B)–C(5)–H(5F)	56,3
C(24)–C(25)	1,363(5)	H(5C)–C(5)–H(5F)	141,1
C(24)–H(24)	0,9300	H(5D)–C(5)–H(5F)	109,5
C(25)–C(26)	1,382(5)	H(5E)–C(5)–H(5F)	109,5
C(25)–H(25)	0,9300	C(12)–C(11)–C(16)	117,8(3)
C(26)–H(26)	0,9300	C(12)–C(11)–C(2)	120,4(3)
C(30)–C(31)	1,503(5)	C(16)–C(11)–C(2)	121,7(3)
C(30)–H(30A)	0,9700	O(1)–C(12)–C(11)	117,2(3)
C(30)–H(30B)	0,9700	O(1)–C(12)–C(13)	121,6(3)

Tabela B.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o ligante H₂L4 (continuação)

C(31)–C(36)	1,357(5)	C(11)–C(12)–C(13)	121,2(3)
C(33)–C(34)	1,342(7)	C(14)–C(13)–C(12)	118,4(3)
C(33)–H(33)	0,9300	C(14)–C(13)–C(3)	120,4(3)
C(34)–C(35)	1,362(7)	C(12)–C(13)–C(3)	121,1(3)
C(34)–H(34)	0,9300	C(15)–C(14)–C(13)	122,4(3)
C(35)–C(36)	1,386(6)	C(15)–C(14)–H(14)	118,8
C(35)–H(35)	0,9300	C(13)–C(14)–H(14)	118,8
C(36)–H(36)	0,9300	C(16)–C(15)–C(14)	117,4(3)
C(40)–C(41)	1,504(4)	C(16)–C(15)–C(5)	122,4(3)
C(40)–H(40A)	0,9700	C(14)–C(15)–C(5)	120,3(3)
C(40)–H(40B)	0,9700	C(15)–C(16)–C(11)	122,8(3)
C(41)–C(46)	1,362(5)	C(15)–C(16)–H(16)	118,6
C(43)–C(44)	1,330(5)	C(11)–C(16)–H(16)	118,6
C(43)–H(43)	0,9300	C(26)–C(21)–C(22)	118,0(3)
C(44)–C(45)	1,358(6)	C(26)–C(21)–N(1)	123,5(3)
C(44)–H(44)	0,9300	C(22)–C(21)–N(1)	118,3(3)
C(45)–C(46)	1,379(5)	O(20)–C(22)–C(23)	123,6(3)
C(45)–H(45)	0,9300	O(20)–C(22)–C(21)	115,9(3)
C(46)–H(46)	0,9300	C(23)–C(22)–C(21)	120,5(3)
		C(24)–C(23)–C(22)	120,5(4)
		C(24)–C(23)–H(23)	119,7
		C(22)–C(23)–H(23)	119,7
		C(25)–C(24)–C(23)	119,7(4)
		C(25)–C(24)–H(24)	120,2
		C(23)–C(24)–H(24)	120,2
		C(24)–C(25)–C(26)	120,6(3)
		C(24)–C(25)–H(25)	119,7
		C(26)–C(25)–H(25)	119,7
		C(25)–C(26)–C(21)	120,6(3)
		C(25)–C(26)–H(26)	119,7
		C(21)–C(26)–H(26)	119,7
		N(4)–C(30)–C(31)	112,7(3)
		N(4)–C(30)–H(30A)	109,1
		C(31)–C(30)–H(30A)	109,1
		N(4)–C(30)–H(30B)	109,1
		C(31)–C(30)–H(30B)	109,1
		H(30A)–C(30)–H(30B)	107,8
		N(32)–C(31)–C(36)	121,5(4)
		N(32)–C(31)–C(30)	116,2(4)
		C(36)–C(31)–C(30)	122,2(4)
		N(32)–C(33)–C(34)	123,7(5)
		N(32)–C(33)–H(33)	118,2
		C(34)–C(33)–H(33)	118,2
		C(33)–C(34)–C(35)	119,2(5)
		C(33)–C(34)–H(34)	120,4
		C(35)–C(34)–H(34)	120,4
		C(34)–C(35)–C(36)	117,9(6)
		C(34)–C(35)–H(35)	121,0

Tabela B.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o ligante H₂L4 (continuação)

C(36)–C(35)–H(35)	121,0
C(31)–C(36)–C(35)	120,0(5)
C(31)–C(36)–H(36)	120,0
C(35)–C(36)–H(36)	120,0
N(4)–C(40)–C(41)	113,4(2)
N(4)–C(40)–H(40A)	108,9
C(41)–C(40)–H(40A)	108,9
N(4)–C(40)–H(40B)	108,9
C(41)–C(40)–H(40B)	108,9
H(40A)–C(40)–H(40B)	107,7
N(42)–C(41)–C(46)	121,6(3)
N(42)–C(41)–C(40)	117,9(3)
C(46)–C(41)–C(40)	120,5(3)
C(44)–C(43)–N(42)	125,0(4)
C(44)–C(43)–H(43)	117,5
N(42)–C(43)–H(43)	117,5
C(43)–C(44)–C(45)	116,8(4)
C(43)–C(44)–H(44)	121,6
C(45)–C(44)–H(44)	121,6
C(44)–C(45)–C(46)	120,3(4)
C(44)–C(45)–H(45)	119,8
C(46)–C(45)–H(45)	119,8
C(41)–C(46)–C(45)	118,5(4)
C(41)–C(46)–H(46)	120,8
C(45)–C(46)–H(46)	120,8

Tabela B.3. Parâmetros térmicos de deslocamento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para $\text{H}_2\text{L4}$. OBSERVAÇÃO: O fator exponencial tem a forma: $-2^{-2} \times [h^2 a^2 \times U^{11} + \dots + 2hka \times b \times U^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
O(1)	58(2)	45(1)	84(2)	-8(1)	33(1)	-7(1)
O(20)	64(2)	66(2)	62(2)	11(1)	16(1)	-17(1)
N(1)	57(2)	49(2)	51(2)	-2(1)	23(2)	-3(1)
N(4)	37(1)	53(2)	56(2)	14(1)	14(1)	1(1)
N(32)	54(2)	106(3)	73(2)	23(2)	6(2)	4(2)
N(42)	116(3)	66(2)	56(2)	6(2)	27(2)	29(2)
C(2)	67(2)	57(2)	44(2)	-2(2)	20(2)	3(2)
C(3)	48(2)	51(2)	54(2)	1(2)	16(2)	4(2)
C(5)	64(2)	58(2)	69(2)	9(2)	18(2)	-7(2)
C(11)	48(2)	49(2)	37(2)	1(1)	11(1)	-1(2)
C(12)	45(2)	42(2)	47(2)	4(1)	10(2)	-1(2)
C(13)	39(2)	44(2)	44(2)	0(1)	8(1)	0(1)
C(14)	47(2)	43(2)	47(2)	-1(2)	7(2)	2(2)
C(15)	43(2)	47(2)	44(2)	8(2)	5(1)	-1(2)
C(16)	48(2)	61(2)	40(2)	9(2)	15(1)	2(2)
C(21)	52(2)	40(2)	52(2)	-8(2)	23(2)	-1(2)
C(22)	51(2)	40(2)	58(2)	-1(2)	17(2)	-1(2)
C(23)	71(3)	60(2)	67(2)	8(2)	11(2)	-1(2)
C(24)	56(2)	76(3)	98(3)	-2(2)	8(2)	-4(2)
C(25)	54(2)	73(3)	113(3)	-11(3)	34(2)	-16(2)
C(26)	62(2)	62(2)	72(2)	1(2)	33(2)	-7(2)
C(30)	48(2)	64(2)	74(2)	21(2)	15(2)	5(2)
C(31)	54(2)	74(3)	59(2)	17(2)	15(2)	1(2)
C(33)	57(3)	149(5)	74(3)	28(3)	4(2)	-10(3)
C(34)	99(4)	148(5)	77(3)	-2(4)	15(3)	-44(4)
C(35)	133(5)	107(4)	124(4)	-31(3)	30(4)	-26(4)
C(36)	78(3)	88(3)	124(4)	-20(3)	22(3)	-7(3)
C(40)	50(2)	69(2)	78(2)	16(2)	31(2)	11(2)
C(41)	49(2)	50(2)	62(2)	7(2)	27(2)	1(2)
C(43)	129(4)	54(2)	66(3)	0(2)	24(3)	24(2)
C(44)	119(4)	73(3)	75(3)	25(2)	44(3)	17(3)
C(45)	155(5)	155(5)	71(3)	42(3)	63(3)	75(4)
C(46)	111(3)	108(4)	75(3)	7(3)	47(3)	53(3)

Tabela B.4. Coordenadas de hidrogênio ($\times 10^4$) e parâmetros de deslocamento isotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para H₂L4

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	U(eq)
H(1O)	7370	1234	6741	90
H(20O)	4700	2585	4264	96
H(2A)	4649	1134	9040	66
H(2B)	5869	1365	9409	66
H(3A)	7644	-205	5241	61
H(3B)	7059	415	4485	61
H(5A)	4261	-1052	7914	76
H(5B)	5336	-1396	7814	76
H(5C)	4408	-1239	6343	76
H(5D)	5076	-1406	6800	76
H(5E)	4000	-1062	6900	76
H(5F)	4929	-1219	8371	76
H(14)	6296	-759	6019	56
H(16)	4483	54	8383	59
H(23)	2860	2368	3126	81
H(24)	1314	1851	3353	95
H(25)	1367	1303	5508	93
H(26)	2978	1233	7418	75
H(30A)	9355	-140	7162	75
H(30B)	8619	124	8138	75
H(33)	12546	460	9959	116
H(34)	12421	1467	10708	132
H(35)	10758	1996	9921	147
H(36)	9228	1433	8528	118
H(40A)	9115	343	4594	76
H(40B)	9769	870	5673	76
H(43)	7233	2500	3763	101
H(44)	7354	2510	1387	103
H(45)	8128	1640	558	144
H(46)	8843	820	2209	112
H(1N)	5396(17)	1931(13)	7280(30)	50(9)

Tabela B.5. Ligações de hidrogênio para o ligante H₂L4 [Å e °]

D–H···A	d(D–H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
N(1)–H(1N)···O(1)	0,86(1)	2,32(2)	2,896(3)	124(2)
N(1)–H(1N)···O(20)	0,86(1)	2,22(3)	2,662(3)	113(2)
O(1)–H(1O)···N(4)	0,82	2,04	2,758(3)	145,4
O(1)–H(1O)···N(42)	0,82	2,68	3,309(4)	134,4
O(20)–H(20O)···N(1) ⁱ	0,82	2,03	2,813(3)	160,3

Códigos de simetria: (i) $x, -y + \frac{1}{2}, z - \frac{1}{2}$.

Apêndice C – Dados Cristalográficos Suplementares para o Complexo 1

Tabela C.1. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros térmicos isotrópicos ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o complexo 1.
OBSERVAÇÃO: $U(\text{eq})$ é definido como $\frac{1}{3}$ do traço do tensor U^{ij} ortogonalizado

	x	y	z	U(eq)
Cu(1)	7875(1)	474(1)	6673(1)	40(1)
Cu(2)	6515(1)	1228(1)	5068(1)	42(1)
O(1)	7125(3)	1705(3)	6259(3)	38(1)
O(2)	6980(4)	-38(3)	5610(3)	45(1)
N(1)	8680(4)	1158(4)	7698(4)	40(1)
C(2)	8659(5)	2074(5)	7888(5)	41(2)
C(3)	6267(5)	3369(6)	5116(5)	45(2)
N(4)	6101(4)	2566(4)	4683(4)	39(1)
C(11)	8049(5)	2853(5)	7345(4)	36(2)
C(12)	7343(5)	2645(5)	6530(4)	36(2)
C(13)	6883(5)	3474(5)	6004(5)	39(2)
C(14)	7067(5)	4444(5)	6346(5)	46(2)
C(15)	7702(6)	4656(5)	7163(5)	46(2)
C(16)	8186(5)	3853(5)	7646(5)	44(2)
C(17)	7848(7)	5731(6)	7475(6)	63(2)
C(21)	9298(5)	393(6)	8280(5)	45(2)
C(22)	9731(6)	-228(7)	7706(5)	66(2)
N(23)	8961(5)	-582(5)	6921(4)	59(2)
C(24)	8591(11)	-1603(7)	6997(7)	95(4)
C(25)	8080(7)	-1655(7)	7619(8)	82(3)
N(26)	7806(5)	-663(5)	7887(5)	59(2)
C(27)	8593(7)	-226(7)	8592(5)	62(2)
C(28)	10134(7)	809(7)	9038(6)	68(3)
C(31)	5496(6)	2493(6)	3756(5)	47(2)
C(32)	6176(6)	1940(7)	3362(5)	57(2)
N(33)	6532(4)	991(5)	3810(4)	45(2)
C(34)	5930(6)	112(7)	3414(6)	63(2)
C(35)	4976(7)	67(7)	3610(6)	66(2)
N(36)	4887(5)	883(5)	4175(4)	50(2)
C(37)	4625(5)	1858(6)	3740(5)	52(2)
C(38)	5171(8)	3493(7)	3309(6)	75(3)
O(1W)	7995(6)	-1224(6)	4756(6)	111(3)
Cl(1)	3792(2)	3363(2)	5738(2)	85(1)
O(1P)	4306(10)	2440(9)	5889(10)	143(7)
O(1P')	4805(12)	3538(16)	6027(19)	268(19)
O(2P)	4251(10)	3947(10)	5204(9)	130(6)
O(2P')	3405(17)	3073(16)	4880(10)	140(11)
O(3P)	2804(9)	3289(12)	5297(10)	156(7)
O(3P')	3360(16)	4354(12)	5793(17)	182(14)
O(4P)	3996(12)	3932(11)	6495(9)	152(7)
O(4P')	3488(16)	2757(14)	6299(12)	123(10)
Cl(2)	9380(2)	1781(2)	5375(2)	80(1)
O(5P)	9951(9)	1660(10)	4797(8)	87(4)
O(5P')	10205(11)	2166(14)	5257(12)	114(8)

Tabela C.1. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros térmicos isotrópicos ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o complexo **1**.
 OBSERVAÇÃO: $U(\text{eq})$ é definido como $\frac{1}{3}$ do traço do tensor U^{ij} ortogonalizado (continuação)

	x	y	z	U(eq)
O(6P)	8412(8)	1719(13)	4818(8)	115(6)
O(6P')	8594(12)	2476(15)	4974(13)	133(9)
O(7P)	9549(15)	911(13)	5902(12)	194(10)
O(7P')	9090(18)	836(12)	5206(17)	224(15)
O(8P)	9595(15)	2627(13)	5851(13)	198(10)
O(8P')	9552(15)	1968(18)	6285(9)	139(9)

Tabela C.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o complexo **1**

Cu(1)–O(2)	1,920(5)	O(2)–Cu(1)–N(1)	172,2(2)
Cu(1)–N(1)	1,928(6)	O(2)–Cu(1)–O(1)	81,26(19)
Cu(1)–O(1)	1,954(4)	N(1)–Cu(1)–O(1)	90,9(2)
Cu(1)–N(23)	2,041(7)	O(2)–Cu(1)–N(23)	100,6(2)
Cu(1)–N(26)	2,524(7)	N(1)–Cu(1)–N(23)	86,8(3)
Cu(1)–Cu(2)	2,8957(13)	O(1)–Cu(1)–N(23)	160,8(3)
Cu(2)–N(4)	1,912(6)	O(2)–Cu(1)–N(26)	108,4(2)
Cu(2)–O(2)	1,914(5)	N(1)–Cu(1)–N(26)	76,3(2)
Cu(2)–O(1)	1,963(4)	O(1)–Cu(1)–N(26)	127,7(2)
Cu(2)–N(33)	2,092(6)	N(23)–Cu(1)–N(26)	70,2(3)
Cu(2)–N(36)	2,372(6)	N(4)–Cu(2)–O(2)	172,1(2)
O(1)–C(12)	1,326(8)	N(4)–Cu(2)–O(1)	91,1(2)
N(1)–C(2)	1,256(9)	O(2)–Cu(2)–O(1)	81,16(19)
N(1)–C(21)	1,477(9)	N(4)–Cu(2)–N(33)	85,3(2)
C(2)–C(11)	1,456(10)	O(2)–Cu(2)–N(33)	102,1(2)
C(3)–N(4)	1,258(9)	O(1)–Cu(2)–N(33)	151,7(2)
C(3)–C(13)	1,442(10)	N(4)–Cu(2)–N(36)	80,5(2)
N(4)–C(31)	1,487(9)	O(2)–Cu(2)–N(36)	104,1(2)
C(11)–C(16)	1,406(9)	O(1)–Cu(2)–N(36)	134,9(2)
C(11)–C(12)	1,416(9)	N(33)–Cu(2)–N(36)	72,1(2)
C(12)–C(13)	1,418(9)	C(12)–O(1)–Cu(1)	128,7(4)
C(13)–C(14)	1,393(10)	C(12)–O(1)–Cu(2)	128,0(4)
C(14)–C(15)	1,380(11)	Cu(1)–O(1)–Cu(2)	95,33(19)
C(15)–C(16)	1,373(10)	Cu(2)–O(2)–Cu(1)	98,1(2)
C(15)–C(17)	1,505(10)	C(2)–N(1)–C(21)	124,2(6)
C(21)–C(27)	1,521(11)	C(2)–N(1)–Cu(1)	127,9(5)
C(21)–C(28)	1,523(11)	C(21)–N(1)–Cu(1)	107,7(4)
C(21)–C(22)	1,530(12)	N(1)–C(2)–C(11)	126,3(7)
C(22)–N(23)	1,474(11)	N(4)–C(3)–C(13)	126,3(7)
N(23)–C(24)	1,475(13)	C(3)–N(4)–C(31)	124,9(6)
C(24)–C(25)	1,444(16)	C(3)–N(4)–Cu(2)	128,2(5)
C(25)–N(26)	1,481(12)	C(31)–N(4)–Cu(2)	107,0(4)
N(26)–C(27)	1,450(11)	C(16)–C(11)–C(12)	119,3(6)
C(31)–C(37)	1,507(11)	C(16)–C(11)–C(2)	117,8(6)
C(31)–C(38)	1,513(11)	C(12)–C(11)–C(2)	122,9(6)
C(31)–C(32)	1,528(11)	O(1)–C(12)–C(11)	121,1(6)
C(32)–N(33)	1,463(10)	O(1)–C(12)–C(13)	120,8(6)
N(33)–C(34)	1,471(10)	C(11)–C(12)–C(13)	118,1(6)
C(34)–C(35)	1,516(12)	C(14)–C(13)–C(12)	118,7(7)
C(35)–N(36)	1,455(11)	C(14)–C(13)–C(3)	117,9(6)
N(36)–C(37)	1,465(10)	C(12)–C(13)–C(3)	123,3(6)
Cl(1)–O(3P)	1,376(12)	C(15)–C(14)–C(13)	123,8(7)
Cl(1)–O(2P')	1,386(15)	C(16)–C(15)–C(14)	116,9(7)
Cl(1)–O(4P')	1,395(14)	C(16)–C(15)–C(17)	123,3(8)
Cl(1)–O(4P)	1,398(12)	C(14)–C(15)–C(17)	119,8(7)
Cl(1)–O(1P')	1,403(15)	C(15)–C(16)–C(11)	122,8(7)
Cl(1)–O(1P)	1,411(11)	N(1)–C(21)–C(27)	104,9(6)
Cl(1)–O(3P')	1,470(15)	N(1)–C(21)–C(28)	115,4(6)

Tabela C.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o complexo **1** (continuação)

Cl(1)–O(2P)	1,478(11)	C(27)–C(21)–C(28)	111,1(7)
O(1P)–O(4P')	1,59(2)	N(1)–C(21)–C(22)	104,8(6)
O(1P)–O(1P')	1,607(17)	C(27)–C(21)–C(22)	111,8(7)
O(1P')–O(2P)	1,43(3)	C(28)–C(21)–C(22)	108,8(7)
O(1P')–O(4P)	1,68(3)	N(23)–C(22)–C(21)	111,3(7)
O(2P)–O(2P')	1,640(17)	C(22)–N(23)–C(24)	114,2(7)
O(2P')–O(3P)	1,30(2)	C(22)–N(23)–Cu(1)	105,5(5)
O(3P)–O(3P')	1,695(17)	C(24)–N(23)–Cu(1)	111,7(7)
O(3P)–O(4P')	1,76(2)	C(25)–C(24)–N(23)	112,7(8)
O(3P')–O(4P)	1,34(2)	C(24)–C(25)–N(26)	114,5(8)
O(4P)–O(4P')	1,706(16)	C(27)–N(26)–C(25)	112,0(7)
Cl(2)–O(7P')	1,320(14)	C(27)–N(26)–Cu(1)	99,6(5)
Cl(2)–O(8P)	1,343(13)	C(25)–N(26)–Cu(1)	102,3(6)
Cl(2)–O(5P')	1,369(13)	N(26)–C(27)–C(21)	112,6(7)
Cl(2)–O(6P)	1,399(11)	N(4)–C(31)–C(37)	105,1(6)
Cl(2)–O(7P)	1,413(13)	N(4)–C(31)–C(38)	115,0(6)
Cl(2)–O(6P')	1,443(14)	C(37)–C(31)–C(38)	110,8(7)
Cl(2)–O(8P')	1,450(14)	N(4)–C(31)–C(32)	102,7(6)
Cl(2)–O(5P)	1,455(11)	C(37)–C(31)–C(32)	112,0(7)
O(5P)–O(5P')	0,985(16)	C(38)–C(31)–C(32)	110,9(7)
O(5P')–O(8P)	1,63(2)	N(33)–C(32)–C(31)	111,6(6)
O(6P)–O(6P')	1,048(17)	C(32)–N(33)–C(34)	113,6(6)
O(6P)–O(7P')	1,52(2)	C(32)–N(33)–Cu(2)	104,5(4)
O(6P')–O(8P)	1,68(2)	C(34)–N(33)–Cu(2)	110,9(5)
O(7P)–O(7P')	1,120(19)	N(33)–C(34)–C(35)	112,6(7)
O(7P)–O(8P')	1,53(2)	N(36)–C(35)–C(34)	112,4(7)
O(8P)–O(8P')	1,142(18)	C(35)–N(36)–C(37)	114,2(7)
		C(35)–N(36)–Cu(2)	105,0(5)
		C(37)–N(36)–Cu(2)	100,1(4)
		N(36)–C(37)–C(31)	113,7(6)
		O(3P)–Cl(1)–O(2P')	56,3(10)
		O(3P)–Cl(1)–O(4P')	78,9(11)
		O(2P')–Cl(1)–O(4P')	113,5(9)
		O(3P)–Cl(1)–O(4P)	112,6(8)
		O(2P')–Cl(1)–O(4P)	161,3(11)
		O(4P')–Cl(1)–O(4P)	75,3(8)
		O(3P)–Cl(1)–O(1P')	167,9(13)
		O(2P')–Cl(1)–O(1P')	114,7(12)
		O(4P')–Cl(1)–O(1P')	113,0(11)
		O(4P)–Cl(1)–O(1P')	73,6(12)
		O(3P)–Cl(1)–O(1P)	115,2(8)
		O(2P')–Cl(1)–O(1P)	87,2(12)
		O(4P')–Cl(1)–O(1P)	69,3(10)
		O(4P)–Cl(1)–O(1P)	111,5(8)
		O(1P')–Cl(1)–O(1P)	69,7(8)
		O(3P)–Cl(1)–O(3P')	73,0(8)
		O(2P')–Cl(1)–O(3P')	105,8(11)
		O(4P')–Cl(1)–O(3P')	104,0(10)

Tabela C.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o complexo **1** (continuação)

O(4P)–Cl(1)–O(3P')	55,5(10)
O(1P')–Cl(1)–O(3P')	104,4(9)
O(1P)–Cl(1)–O(3P')	167,0(11)
O(3P)–Cl(1)–O(2P)	108,5(8)
O(2P')–Cl(1)–O(2P)	69,8(7)
O(4P')–Cl(1)–O(2P)	172,0(10)
O(4P)–Cl(1)–O(2P)	103,8(7)
O(1P')–Cl(1)–O(2P)	59,5(11)
O(1P)–Cl(1)–O(2P)	104,2(7)
O(3P')–Cl(1)–O(2P)	81,5(11)
Cl(1)–O(1P)–O(4P')	54,9(7)
Cl(1)–O(1P)–O(1P')	54,9(7)
O(4P')–O(1P)–O(1P')	93,6(11)
Cl(1)–O(1P')–O(2P)	62,9(9)
Cl(1)–O(1P')–O(1P)	55,4(6)
O(2P)–O(1P')–O(1P)	97,1(12)
Cl(1)–O(1P')–O(4P)	53,0(8)
O(2P)–O(1P')–O(4P)	93,1(12)
O(1P)–O(1P')–O(4P)	89,9(10)
O(1P')–O(2P)–Cl(1)	57,6(8)
O(1P')–O(2P)–O(2P')	99,5(11)
Cl(1)–O(2P)–O(2P')	52,5(6)
O(3P)–O(2P')–Cl(1)	61,5(8)
O(3P)–O(2P')–O(2P)	103,3(11)
Cl(1)–O(2P')–O(2P)	57,7(6)
O(2P')–O(3P)–Cl(1)	62,3(8)
O(2P')–O(3P)–O(3P')	98,1(11)
Cl(1)–O(3P)–O(3P')	56,0(7)
O(2P')–O(3P)–O(4P')	97,7(12)
Cl(1)–O(3P)–O(4P')	51,0(7)
O(3P')–O(3P)–O(4P')	81,6(9)
O(4P)–O(3P')–Cl(1)	59,5(8)
O(4P)–O(3P')–O(3P)	98,5(11)
Cl(1)–O(3P')–O(3P)	51,0(6)
O(3P')–O(4P)–Cl(1)	65,0(8)
O(3P')–O(4P)–O(1P')	97,1(14)
Cl(1)–O(4P)–O(1P')	53,3(8)
O(3P')–O(4P)–O(4P')	95,1(11)
Cl(1)–O(4P)–O(4P')	52,3(6)
O(1P')–O(4P)–O(4P')	87,2(9)
Cl(1)–O(4P')–O(1P)	55,8(7)
Cl(1)–O(4P')–O(4P)	52,4(6)
O(1P)–O(4P')–O(4P)	89,3(9)
Cl(1)–O(4P')–O(3P)	50,1(7)
O(1P)–O(4P')–O(3P)	88,9(10)
O(4P)–O(4P')–O(3P)	83,4(9)
O(7P')–Cl(2)–O(8P)	155,7(12)
O(7P')–Cl(2)–O(5P')	123,7(12)

Tabela C.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o complexo **1** (continuação)

O(8P)–Cl(2)–O(5P')	74,0(10)
O(7P')–Cl(2)–O(6P)	68,1(10)
O(8P)–Cl(2)–O(6P)	114,8(9)
O(5P')–Cl(2)–O(6P)	131,3(10)
O(7P')–Cl(2)–O(7P)	48,2(9)
O(8P)–Cl(2)–O(7P)	111,5(9)
O(5P')–Cl(2)–O(7P)	114,1(11)
O(6P)–Cl(2)–O(7P)	106,7(8)
O(7P')–Cl(2)–O(6P')	111,2(10)
O(8P)–Cl(2)–O(6P')	74,2(11)
O(5P')–Cl(2)–O(6P')	106,8(9)
O(6P)–Cl(2)–O(6P')	43,2(7)
O(7P)–Cl(2)–O(6P')	138,8(11)
O(7P')–Cl(2)–O(8P')	108,3(10)
O(8P)–Cl(2)–O(8P')	48,1(8)
O(5P')–Cl(2)–O(8P')	102,6(9)
O(6P)–Cl(2)–O(8P')	118,6(10)
O(7P)–Cl(2)–O(8P')	64,8(9)
O(6P')–Cl(2)–O(8P')	101,7(9)
O(7P')–Cl(2)–O(5P)	88,1(12)
O(8P)–Cl(2)–O(5P)	113,4(8)
O(5P')–Cl(2)–O(5P)	40,7(7)
O(6P)–Cl(2)–O(5P)	103,1(7)
O(7P)–Cl(2)–O(5P)	106,7(8)
O(6P')–Cl(2)–O(5P)	107,7(9)
O(8P')–Cl(2)–O(5P)	138,2(9)
O(5P')–O(5P)–Cl(2)	64,9(9)
O(5P)–O(5P')–Cl(2)	74,4(10)
O(5P)–O(5P')–O(8P)	124,9(14)
Cl(2)–O(5P')–O(8P)	52,3(7)
O(6P')–O(6P)–Cl(2)	70,6(9)
O(6P')–O(6P)–O(7P')	123,9(13)
Cl(2)–O(6P)–O(7P')	53,5(7)
O(6P)–O(6P')–Cl(2)	66,2(9)
O(6P)–O(6P')–O(8P)	113,5(13)
Cl(2)–O(6P')–O(8P)	50,2(7)
O(7P')–O(7P)–Cl(2)	61,5(9)
O(7P')–O(7P)–O(8P')	114,7(14)
Cl(2)–O(7P)–O(8P')	58,8(7)
O(7P)–O(7P')–Cl(2)	70,2(10)
O(7P)–O(7P')–O(6P)	116,2(16)
Cl(2)–O(7P')–O(6P)	58,4(8)
O(8P')–O(8P)–Cl(2)	70,9(9)
O(8P')–O(8P)–O(5P')	103,6(14)
Cl(2)–O(8P)–O(5P')	53,7(7)
O(8P')–O(8P)–O(6P')	103,5(14)
Cl(2)–O(8P)–O(6P')	55,6(7)
O(5P')–O(8P)–O(6P')	85,9(10)

Tabela C.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o complexo **1** (continuação)

O(8P)–O(8P')–Cl(2)	61,0(8)
O(8P)–O(8P')–O(7P)	115,9(13)
Cl(2)–O(8P')–O(7P)	56,4(7)

Tabela C.3. Parâmetros térmicos de deslocamento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o complexo 1. OBSERVAÇÃO: O fator exponencial tem a forma: $-2^{-2} \times [h^2 a^2 \times U^{11} + \dots + 2hka \times b \times U^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
Cu(1)	45(1)	27(1)	43(1)	0(1)	5(1)	1(1)
Cu(2)	55(1)	29(1)	37(1)	-2(1)	6(1)	0(1)
O(1)	47(3)	23(2)	35(2)	-2(2)	4(2)	0(2)
O(2)	53(3)	29(2)	46(3)	-7(2)	8(2)	2(2)
N(1)	44(3)	33(3)	37(3)	6(3)	7(3)	-1(3)
C(2)	47(4)	36(4)	37(4)	1(3)	10(3)	-4(3)
C(3)	45(4)	37(4)	49(4)	7(4)	11(4)	6(3)
N(4)	46(3)	29(3)	40(3)	3(3)	9(3)	2(3)
C(11)	40(4)	29(4)	40(4)	-5(3)	15(3)	-7(3)
C(12)	40(4)	31(4)	40(4)	-5(3)	16(3)	0(3)
C(13)	46(4)	25(4)	50(4)	-2(3)	19(4)	5(3)
C(14)	47(4)	28(4)	59(5)	-4(3)	13(4)	7(3)
C(15)	53(5)	29(4)	64(5)	-9(4)	28(4)	-4(3)
C(16)	44(4)	44(4)	45(4)	-10(4)	15(3)	-7(3)
C(17)	68(6)	33(4)	88(7)	-19(4)	26(5)	-12(4)
C(21)	47(4)	44(4)	38(4)	15(3)	4(3)	6(4)
C(22)	61(5)	76(6)	54(5)	15(5)	12(4)	24(5)
N(23)	74(5)	53(4)	47(4)	3(3)	17(4)	18(4)
C(24)	165(12)	39(5)	69(7)	-2(5)	23(8)	27(6)
C(25)	62(6)	41(5)	121(9)	5(6)	-3(6)	-1(4)
N(26)	49(4)	40(4)	77(5)	10(3)	8(4)	-3(3)
C(27)	79(6)	60(6)	44(5)	14(4)	16(4)	-5(5)
C(28)	66(6)	59(5)	55(5)	9(4)	-13(4)	-4(5)
C(31)	56(5)	40(4)	37(4)	5(3)	6(4)	2(4)
C(32)	60(5)	69(6)	40(4)	-1(4)	14(4)	-7(4)
N(33)	38(3)	54(4)	45(4)	-9(3)	15(3)	4(3)
C(34)	57(5)	71(6)	57(5)	-25(5)	12(4)	4(5)
C(35)	69(6)	71(6)	54(5)	-22(5)	15(4)	-24(5)
N(36)	50(4)	56(4)	49(4)	-2(3)	21(3)	-6(3)
C(37)	41(4)	67(6)	42(4)	-1(4)	5(3)	10(4)
C(38)	99(8)	57(6)	50(5)	12(4)	-2(5)	14(5)
O(1W)	99(6)	113(7)	130(7)	-40(6)	49(5)	2(5)
Cl(1)	105(2)	82(2)	72(2)	-2(1)	35(2)	4(2)
Cl(2)	59(1)	106(2)	65(2)	15(1)	7(1)	-29(1)

Tabela C.4. Coordenadas de hidrogênio ($\times 10^4$) e parâmetros de deslocamento isotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para **1**

	x	y	z	U(eq)
H(2O)	7202	-371	5399	54
H(2)	9072	2274	8429	49
H(3)	5964	3951	4837	54
H(14)	6745	4980	6004	55
H(16)	8623	3976	8196	53
H(17A)	7434	6167	7039	94
H(17B)	8520	5919	7590	94
H(17C)	7683	5792	7994	94
H(22A)	10198	181	7542	79
H(22B)	10078	-805	8028	79
H(23)	9125	-521	6451	70
H(24A)	8151	-1812	6436	114
H(24B)	9137	-2070	7165	114
H(25A)	8491	-2007	8128	99
H(25B)	7489	-2052	7375	99
H(26)	7216	-661	7975	71
H(27A)	8953	-763	8964	74
H(27B)	8316	202	8932	74
H(28A)	10567	1195	8825	102
H(28B)	10489	260	9383	102
H(28C)	9873	1233	9385	102
H(32A)	5826	1802	2757	68
H(32B)	6730	2370	3393	68
H(33)	7159	885	3826	54
H(34A)	6301	-499	3625	76
H(34B)	5787	138	2793	76
H(35A)	4433	102	3073	79
H(35B)	4936	-574	3882	79
H(36)	4687	779	4509	60
H(37A)	4230	2231	4015	63
H(37B)	4226	1741	3144	63
H(38A)	4747	3827	3567	113
H(38B)	4826	3379	2707	113
H(38C)	5734	3907	3369	113
H(1WA)	7582	-1466	4268	133
H(1WB)	8444	-882	4625	133

Tabela C.5. Ligações de hidrogênio para o complexo **1** [Å e °]

D–H···A	d(D–H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
O(2)–H(2O)···O(1W)	0,70	2,12	2,816(9)	172,7
N(23)–H(23)···O(7P)	0,88	2,27	2,890(16)	127,4
N(26)–H(26)···O(4P) ⁱ	0,91	2,26	3,134(17)	127,4
N(26)–H(26)···O(3P') ⁱ	0,91	2,42	3,15(3)	136,7
N(33)–H(33)···O(6P)	0,91	2,28	2,846(13)	119,7
N(36)–H(36)···O(2) ⁱⁱ	0,71	2,55	3,046(8)	128,9
O(1W)–H(1WA)···O(4P') ⁱⁱ	0,89	2,29	3,05(2)	143,3
O(1W)–H(1WB)···O(5P) ⁱⁱⁱ	0,87	2,43	2,873(14)	112,1
O(1W)–H(1WB)···O(7P')	0,87	2,53	3,121(17)	125,9

Códigos de simetria: (i) $-x + 1, y - \frac{1}{2}, -z + 1\frac{1}{2}$; (ii) $-x + 1, -y, -z + 1$; (iii) $-x + 2, -y, -z + 1$.

Apêndice D – Dados Cristalográficos Suplementares para o Complexo 2

Tabela D.1. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros térmicos isotrópicos ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o complexo 2.
OBSERVAÇÃO: $U(\text{eq})$ é definido como $\frac{1}{3}$ do traço do tensor U^{ij} ortogonalizado

	x	y	z	U(eq)
Cu(1)	1553(1)	3876(1)	10204(1)	34(1)
Cu(2)	2468(1)	5468(1)	9104(1)	38(1)
O(1)	2117(3)	3816(4)	9250(3)	47(1)
O(10)	1550(3)	5621(4)	10040(2)	34(1)
N(1)	1242(3)	4079(5)	11265(3)	33(1)
C(2)	1256(4)	5041(6)	11659(4)	36(2)
C(3)	2030(4)	7923(6)	9552(3)	37(2)
N(4)	2666(3)	7286(5)	9093(3)	36(1)
C(5)	2017(5)	9253(6)	12332(4)	53(2)
C(11)	1545(4)	6206(5)	11384(3)	32(1)
C(12)	1696(4)	6431(5)	10591(3)	29(1)
C(13)	1969(4)	7604(5)	10390(3)	31(1)
C(14)	2093(4)	8466(6)	10956(4)	38(2)
C(15)	1929(4)	8269(6)	11734(4)	38(2)
C(16)	1654(4)	7138(6)	11927(4)	39(2)
C(21)	867(4)	2933(6)	11524(4)	40(2)
C(22)	1432(4)	1931(6)	11270(4)	41(2)
N(23)	1639(3)	2071(5)	10443(3)	40(1)
C(24)	1115(5)	1352(7)	9906(5)	61(2)
C(25)	264(5)	1854(8)	9841(5)	70(2)
N(26)	167(4)	3002(5)	10247(4)	50(2)
C(27)	64(4)	2885(7)	11073(4)	52(2)
C(28)	740(5)	2830(7)	12389(4)	61(2)
C(30)	3483(4)	7538(6)	9423(4)	44(2)
C(31)	3743(4)	6542(6)	9976(4)	37(2)
N(32)	3393(3)	5461(5)	9861(3)	37(1)
C(33)	3660(5)	4525(7)	10289(4)	49(2)
C(34)	4260(5)	4634(8)	10846(4)	57(2)
C(35)	4593(5)	5746(8)	10974(4)	59(2)
C(36)	4334(4)	6719(8)	10540(4)	53(2)
C(40)	2571(4)	7692(6)	8278(4)	46(2)
C(41)	1975(4)	6900(7)	7834(4)	49(2)
N(42)	1850(3)	5794(5)	8127(3)	45(1)
C(43)	1375(5)	5016(8)	7728(5)	58(2)
C(44)	1016(6)	5313(10)	7024(5)	77(3)
C(45)	1162(6)	6466(11)	6727(5)	85(3)
C(46)	1636(5)	7282(10)	7138(5)	70(3)
Cl(1)	4083(1)	5707(2)	7270(1)	62(1)
O(1P)	3837(4)	5398(6)	8029(3)	94(2)
O(2P)	3357(8)	5700(30)	6823(9)	141(8)
O(2P')	3676(17)	4920(19)	6738(8)	131(9)
O(3P)	4394(15)	6858(14)	7314(12)	143(10)
O(3P')	3886(15)	6888(12)	7047(11)	99(8)
O(4P)	4590(14)	4891(15)	6972(10)	117(8)

Tabela D.1. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros térmicos isotrópicos ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o complexo **2**.
OBSERVAÇÃO: $U(\text{eq})$ é definido como $\frac{1}{3}$ do traço do tensor U^{ij} ortogonalizado (continuação)

	x	y	z	U(eq)
O(4P ^a)	4917(8)	5510(30)	7218(12)	129(9)
Cl(2)	1116(1)	5928(2)	4288(1)	54(1)
O(5P)	1620(4)	6691(7)	3862(4)	111(3)
O(6P)	954(7)	4928(11)	3813(7)	110(5)
O(6P ^a)	1019(12)	4700(12)	4104(14)	72(8)
O(7P)	1651(6)	5611(10)	4939(5)	84(4)
O(7P ^a)	1395(15)	5980(30)	5075(9)	220(20)
O(8P)	461(6)	6500(10)	4586(8)	109(5)
O(8P ^a)	332(9)	6494(17)	4224(16)	88(9)

Tabela D.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o complexo 2

Cu(1)–O(1)	1,923(4)	O(1)–Cu(1)–N(1)	165,7(2)
Cu(1)–N(1)	1,936(5)	O(1)–Cu(1)–O(10)	84,65(18)
Cu(1)–O(10)	1,944(4)	N(1)–Cu(1)–O(10)	91,46(19)
Cu(1)–N(23)	2,036(5)	O(1)–Cu(1)–N(23)	96,2(2)
Cu(1)–N(26)	2,498(6)	N(1)–Cu(1)–N(23)	86,5(2)
Cu(1)–Cu(2)	3,0302(11)	O(10)–Cu(1)–N(23)	175,0(2)
Cu(2)–O(1)	1,930(5)	O(1)–Cu(1)–N(26)	118,9(2)
Cu(2)–N(42)	1,989(6)	N(1)–Cu(1)–N(26)	75,3(2)
Cu(2)–N(32)	1,994(5)	O(10)–Cu(1)–N(26)	112,79(19)
Cu(2)–N(4)	2,032(5)	N(23)–Cu(1)–N(26)	71,2(2)
Cu(2)–O(10)	2,262(4)	O(1)–Cu(2)–N(42)	97,6(2)
Cu(2)–O(1P)	2,979(6)	O(1)–Cu(2)–N(32)	98,1(2)
O(10)–C(12)	1,325(7)	N(42)–Cu(2)–N(32)	158,7(2)
N(1)–C(2)	1,260(8)	O(1)–Cu(2)–N(4)	168,9(2)
N(1)–C(21)	1,483(8)	N(42)–Cu(2)–N(4)	83,9(2)
C(2)–C(11)	1,456(8)	N(32)–Cu(2)–N(4)	83,5(2)
C(3)–C(13)	1,501(8)	O(1)–Cu(2)–O(10)	76,37(17)
C(3)–N(4)	1,512(8)	N(42)–Cu(2)–O(10)	104,8(2)
N(4)–C(30)	1,484(8)	N(32)–Cu(2)–O(10)	92,87(18)
N(4)–C(40)	1,485(8)	N(4)–Cu(2)–O(10)	92,62(18)
C(5)–C(15)	1,505(9)	O(1)–Cu(2)–O(1P)	107,23(19)
C(11)–C(16)	1,401(8)	N(42)–Cu(2)–O(1P)	81,8(2)
C(11)–C(12)	1,425(8)	N(32)–Cu(2)–O(1P)	79,88(19)
C(12)–C(13)	1,417(8)	N(4)–Cu(2)–O(1P)	83,9(2)
C(13)–C(14)	1,377(9)	O(10)–Cu(2)–O(1P)	172,23(17)
C(14)–C(15)	1,400(9)	Cu(1)–O(1)–Cu(2)	103,7(2)
C(15)–C(16)	1,372(9)	C(12)–O(10)–Cu(1)	124,1(4)
C(21)–C(22)	1,522(9)	C(12)–O(10)–Cu(2)	117,0(4)
C(21)–C(28)	1,524(9)	Cu(1)–O(10)–Cu(2)	91,87(16)
C(21)–C(27)	1,529(10)	C(2)–N(1)–C(21)	123,7(5)
C(22)–N(23)	1,491(8)	C(2)–N(1)–Cu(1)	127,6(4)
N(23)–C(24)	1,486(9)	C(21)–N(1)–Cu(1)	108,3(4)
C(24)–C(25)	1,519(11)	N(1)–C(2)–C(11)	124,5(6)
C(25)–N(26)	1,458(10)	C(13)–C(3)–N(4)	117,9(5)
N(26)–C(27)	1,452(9)	C(30)–N(4)–C(40)	112,5(5)
C(30)–C(31)	1,513(9)	C(30)–N(4)–C(3)	110,8(5)
C(31)–N(32)	1,338(8)	C(40)–N(4)–C(3)	107,6(5)
C(31)–C(36)	1,379(9)	C(30)–N(4)–Cu(2)	109,1(4)
N(32)–C(33)	1,339(8)	C(40)–N(4)–Cu(2)	107,0(4)
C(33)–C(34)	1,374(10)	C(3)–N(4)–Cu(2)	109,7(4)
C(34)–C(35)	1,360(11)	C(16)–C(11)–C(12)	119,8(6)
C(35)–C(36)	1,373(11)	C(16)–C(11)–C(2)	117,7(5)
C(40)–C(41)	1,514(10)	C(12)–C(11)–C(2)	122,5(5)
C(41)–N(42)	1,338(9)	O(10)–C(12)–C(13)	119,4(5)
C(41)–C(46)	1,383(10)	O(10)–C(12)–C(11)	123,0(5)
N(42)–C(43)	1,344(9)	C(13)–C(12)–C(11)	117,5(5)
C(43)–C(44)	1,383(11)	C(14)–C(13)–C(12)	119,8(6)
C(44)–C(45)	1,395(14)	C(14)–C(13)–C(3)	121,0(6)

Tabela D.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o complexo 2 (continuação)

C(45)–C(46)	1,381(13)	C(12)–C(13)–C(3)	118,8(5)
Cl(1)–O(4P)	1,345(10)	C(13)–C(14)–C(15)	123,3(6)
Cl(1)–O(3P)	1,371(11)	C(16)–C(15)–C(14)	116,8(6)
Cl(1)–O(3P')	1,394(10)	C(16)–C(15)–C(5)	121,0(6)
Cl(1)–O(4P')	1,407(11)	C(14)–C(15)–C(5)	122,2(6)
Cl(1)–O(2P)	1,415(11)	C(15)–C(16)–C(11)	122,7(6)
Cl(1)–O(2P')	1,423(11)	N(1)–C(21)–C(22)	105,3(5)
Cl(1)–O(1P)	1,430(6)	N(1)–C(21)–C(28)	115,6(6)
O(2P)–O(2P')	1,025(18)	C(22)–C(21)–C(28)	109,5(6)
O(2P)–O(3P')	1,62(2)	N(1)–C(21)–C(27)	104,0(5)
O(2P')–O(4P)	1,56(2)	C(22)–C(21)–C(27)	111,3(6)
O(3P)–O(3P')	0,951(18)	C(28)–C(21)–C(27)	110,9(6)
O(3P)–O(4P')	1,73(2)	N(23)–C(22)–C(21)	111,3(5)
O(4P)–O(4P')	0,967(18)	C(24)–N(23)–C(22)	113,6(6)
Cl(2)–O(8P)	1,369(9)	C(24)–N(23)–Cu(1)	110,9(4)
Cl(2)–O(6P')	1,399(12)	C(22)–N(23)–Cu(1)	106,2(4)
Cl(2)–O(6P)	1,399(9)	N(23)–C(24)–C(25)	112,3(6)
Cl(2)–O(5P)	1,410(6)	N(26)–C(25)–C(24)	113,3(6)
Cl(2)–O(7P')	1,430(13)	C(27)–N(26)–C(25)	114,6(6)
Cl(2)–O(8P')	1,445(13)	C(27)–N(26)–Cu(1)	101,3(4)
Cl(2)–O(7P)	1,460(8)	C(25)–N(26)–Cu(1)	101,9(5)
O(6P)–O(6P')	0,57(2)	N(26)–C(27)–C(21)	112,1(6)
O(7P)–O(7P')	0,64(3)	N(4)–C(30)–C(31)	110,6(5)
O(8P)–O(8P')	0,66(2)	N(32)–C(31)–C(36)	121,9(6)
		N(32)–C(31)–C(30)	115,9(6)
		C(36)–C(31)–C(30)	122,1(7)
		C(31)–N(32)–C(33)	117,9(6)
		C(31)–N(32)–Cu(2)	114,7(4)
		C(33)–N(32)–Cu(2)	127,2(5)
		N(32)–C(33)–C(34)	123,0(7)
		C(35)–C(34)–C(33)	118,5(7)
		C(34)–C(35)–C(36)	119,7(8)
		C(35)–C(36)–C(31)	118,9(8)
		N(4)–C(40)–C(41)	111,2(5)
		N(42)–C(41)–C(46)	123,0(8)
		N(42)–C(41)–C(40)	116,0(6)
		C(46)–C(41)–C(40)	120,8(8)
		C(41)–N(42)–C(43)	118,8(7)
		C(41)–N(42)–Cu(2)	113,9(5)
		C(43)–N(42)–Cu(2)	127,2(6)
		N(42)–C(43)–C(44)	122,4(9)
		C(43)–C(44)–C(45)	117,8(9)
		C(46)–C(45)–C(44)	120,4(9)
		C(45)–C(46)–C(41)	117,7(10)
		O(4P)–Cl(1)–O(3P)	113,7(9)
		O(4P)–Cl(1)–O(3P')	131,5(10)
		O(3P)–Cl(1)–O(3P')	40,2(8)
		O(4P)–Cl(1)–O(4P')	41,1(7)

Tabela D.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o complexo 2 (continuação)

O(3P)–Cl(1)–O(4P')	76,9(10)
O(3P')–Cl(1)–O(4P')	110,3(8)
O(4P)–Cl(1)–O(2P)	108,7(8)
O(3P)–Cl(1)–O(2P)	110,4(8)
O(3P')–Cl(1)–O(2P)	70,2(9)
O(4P')–Cl(1)–O(2P)	142,3(10)
O(4P)–Cl(1)–O(2P')	68,6(9)
O(3P)–Cl(1)–O(2P')	140,5(10)
O(3P')–Cl(1)–O(2P')	106,6(8)
O(4P')–Cl(1)–O(2P')	108,5(8)
O(2P)–Cl(1)–O(2P')	42,3(8)
O(4P)–Cl(1)–O(1P)	113,1(7)
O(3P)–Cl(1)–O(1P)	106,6(8)
O(3P')–Cl(1)–O(1P)	114,0(7)
O(4P')–Cl(1)–O(1P)	109,2(8)
O(2P)–Cl(1)–O(1P)	104,0(7)
O(2P')–Cl(1)–O(1P)	108,0(7)
Cl(1)–O(1P)–Cu(2)	144,3(4)
O(2P')–O(2P)–Cl(1)	69,3(9)
O(2P')–O(2P)–O(3P')	115,7(13)
Cl(1)–O(2P)–O(3P')	54,3(6)
O(2P)–O(2P')–Cl(1)	68,4(9)
O(2P)–O(2P')–O(4P)	118,9(12)
Cl(1)–O(2P')–O(4P)	53,3(6)
O(3P')–O(3P)–Cl(1)	71,2(10)
O(3P')–O(3P)–O(4P')	115,1(15)
Cl(1)–O(3P)–O(4P')	52,5(7)
O(3P)–O(3P')–Cl(1)	68,5(10)
O(3P)–O(3P')–O(2P)	123,9(13)
Cl(1)–O(3P')–O(2P)	55,5(7)
O(4P')–O(4P)–Cl(1)	73,0(10)
O(4P')–O(4P)–O(2P')	129,1(14)
Cl(1)–O(4P)–O(2P')	58,1(7)
O(4P)–O(4P')–Cl(1)	66,0(9)
O(4P)–O(4P')–O(3P)	111,8(13)
Cl(1)–O(4P')–O(3P)	50,6(6)
O(8P)–Cl(2)–O(6P')	116,3(10)
O(8P)–Cl(2)–O(6P)	116,3(7)
O(6P')–Cl(2)–O(6P)	23,6(9)
O(8P)–Cl(2)–O(5P)	114,3(6)
O(6P')–Cl(2)–O(5P)	121,6(9)
O(6P)–Cl(2)–O(5P)	105,6(6)
O(8P)–Cl(2)–O(7P')	82,1(11)
O(6P')–Cl(2)–O(7P')	106,8(9)
O(6P)–Cl(2)–O(7P')	130,3(11)
O(5P)–Cl(2)–O(7P')	107,1(9)
O(8P)–Cl(2)–O(8P')	26,8(9)
O(6P')–Cl(2)–O(8P')	107,6(9)

Tabela D.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o complexo 2 (continuação)

O(6P)–Cl(2)–O(8P')	97,9(11)
O(5P)–Cl(2)–O(8P')	104,4(8)
O(7P')–Cl(2)–O(8P')	108,9(8)
O(8P)–Cl(2)–O(7P)	107,0(6)
O(6P')–Cl(2)–O(7P)	90,5(10)
O(6P)–Cl(2)–O(7P)	111,7(6)
O(5P)–Cl(2)–O(7P)	100,9(5)
O(7P')–Cl(2)–O(7P)	25,6(11)
O(8P')–Cl(2)–O(7P)	133,8(10)
O(6P')–O(6P)–Cl(2)	78,2(17)
O(6P)–O(6P')–Cl(2)	78,2(16)
O(7P')–O(7P)–Cl(2)	74,5(14)
O(7P)–O(7P')–Cl(2)	79,9(15)
O(8P')–O(8P)–Cl(2)	83,1(15)
O(8P)–O(8P')–Cl(2)	70,1(14)

Tabela D.3. Parâmetros térmicos de deslocamento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o complexo 2. OBSERVAÇÃO: O fator exponencial tem a forma: $-2^{-2} \times [h^2 a^2 \times U^{11} + \dots + 2hka \times b \times U^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
Cu(1)	42(1)	27(1)	34(1)	1(1)	2(1)	-2(1)
Cu(2)	49(1)	31(1)	34(1)	1(1)	5(1)	1(1)
O(1)	66(3)	33(3)	44(3)	-9(2)	16(2)	-1(2)
O(10)	47(3)	26(2)	29(2)	2(2)	4(2)	-2(2)
N(1)	36(3)	29(3)	34(3)	5(2)	3(2)	-7(2)
C(2)	37(4)	37(4)	33(3)	4(3)	2(3)	-2(3)
C(3)	43(4)	30(3)	37(4)	6(3)	4(3)	1(3)
N(4)	41(3)	32(3)	35(3)	7(2)	6(2)	3(2)
C(5)	78(6)	38(4)	43(4)	-7(3)	-8(4)	3(4)
C(11)	41(4)	25(3)	30(3)	1(3)	0(3)	-3(3)
C(12)	30(3)	25(3)	30(3)	-3(3)	1(3)	4(3)
C(13)	31(3)	27(3)	36(3)	5(3)	3(3)	2(3)
C(14)	41(4)	25(3)	47(4)	3(3)	-1(3)	-2(3)
C(15)	44(4)	33(4)	35(4)	-5(3)	-5(3)	3(3)
C(16)	49(4)	36(4)	30(3)	-1(3)	1(3)	0(3)
C(21)	43(4)	35(4)	42(4)	10(3)	5(3)	-7(3)
C(22)	45(4)	31(4)	47(4)	7(3)	-1(3)	-3(3)
N(23)	46(3)	26(3)	50(3)	4(2)	3(3)	2(3)
C(24)	83(6)	40(4)	58(5)	-10(4)	-8(4)	-3(4)
C(25)	64(6)	66(6)	80(6)	-13(5)	-18(5)	-11(5)
N(26)	45(4)	39(3)	65(4)	0(3)	-16(3)	0(3)
C(27)	43(4)	46(4)	67(5)	1(4)	6(4)	-10(4)
C(28)	78(6)	51(5)	55(5)	12(4)	19(4)	-14(4)
C(30)	42(4)	38(4)	51(4)	6(3)	7(3)	-6(3)
C(31)	33(4)	45(4)	34(4)	3(3)	5(3)	2(3)
N(32)	42(3)	32(3)	37(3)	1(3)	11(2)	3(3)
C(33)	61(5)	39(4)	48(4)	8(3)	8(4)	9(4)
C(34)	67(5)	58(5)	45(4)	11(4)	-3(4)	23(5)
C(35)	61(5)	72(6)	45(5)	1(4)	-8(4)	20(5)
C(36)	43(4)	59(5)	56(5)	-5(4)	-2(4)	-1(4)
C(40)	55(5)	44(4)	39(4)	13(3)	9(3)	1(4)
C(41)	52(5)	64(5)	31(4)	3(4)	9(3)	16(4)
N(42)	47(3)	52(4)	34(3)	-7(3)	0(3)	9(3)
C(43)	58(5)	55(5)	60(5)	-23(4)	1(4)	10(4)
C(44)	69(6)	98(8)	62(6)	-37(6)	-17(5)	33(6)
C(45)	79(7)	126(10)	48(5)	-19(6)	-16(5)	51(7)
C(46)	70(6)	98(7)	41(5)	12(5)	6(4)	26(5)
Cl(1)	68(1)	64(1)	55(1)	-1(1)	-4(1)	8(1)
O(1P)	110(5)	110(6)	62(4)	16(4)	14(4)	38(5)
O(2P)	131(14)	200(20)	94(11)	-14(14)	-23(10)	29(15)
O(2P')	210(20)	88(14)	89(11)	9(10)	-51(13)	-73(14)
O(3P)	160(20)	68(12)	210(20)	-23(12)	107(17)	-29(12)
O(3P')	161(19)	39(8)	100(12)	20(8)	64(13)	35(10)
O(4P)	153(17)	78(11)	121(13)	-28(9)	63(13)	45(11)
O(4P')	85(12)	160(20)	150(18)	26(16)	48(12)	25(14)
Cl(2)	57(1)	48(1)	57(1)	-4(1)	13(1)	5(1)

Tabela D.3. Parâmetros térmicos de deslocamento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o complexo **2**. OBSERVAÇÃO: O fator exponencial tem a forma: $-2^{-2} \times [h^2 a^2 \times U^{11} + \dots + 2hka \times b \times U^{12}]$ (continuação)

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
O(5P)	100(6)	143(7)	91(5)	21(5)	25(4)	-33(5)

Tabela D.4. Ligações de hidrogênio para o complexo **2** [Å e °]

D–H···A	d(D–H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
N(23)–H(23)···O(5P) ⁱ	0,98	2,34	3,129(9)	136,1
N(23)–H(23)···O(7P) ⁱ	0,98	2,38	3,345(11)	165,8
N(23)–H(23)···O(7P') ⁱ	0,98	2,65	3,62(2)	168,9
N(26)–H(26)···O(10) ⁱⁱ	0,91	2,48	3,256(7)	144,4

Códigos de simetria: (i) $-x + 1/2, y - 1/2, -z + 1/2$; (ii) $-x, -y + 1, -z + 2$.

Apêndice E – Dados Cristalográficos Suplementares para o Complexo 3

Tabela E.1. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros térmicos isotrópicos ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o complexo 3.
OBSERVAÇÃO: $U(\text{eq})$ é definido como $\frac{1}{3}$ do traço do tensor U^{ij} ortogonalizado

	x	y	z	U(eq)
Cu(1)	3845(1)	4309(1)	3381(1)	30(1)
Cu(2)	5773(1)	2980(1)	3639(1)	32(1)
O(1)	5199(2)	3818(2)	4301(2)	38(1)
O(10)	4325(2)	3666(2)	2534(2)	30(1)
O(20)	3411(2)	5210(2)	4068(2)	39(1)
N(1)	2330(3)	4494(2)	2434(2)	31(1)
C(2)	1867(3)	4005(2)	1704(3)	34(1)
C(3)	5436(3)	2491(2)	1761(2)	34(1)
N(4)	6105(3)	2169(2)	2720(2)	32(1)
C(11)	2449(3)	3311(2)	1405(3)	34(1)
C(12)	3648(3)	3182(2)	1823(2)	29(1)
C(13)	4161(3)	2525(2)	1445(2)	31(1)
C(14)	3473(3)	2004(2)	707(2)	34(1)
C(15)	2295(4)	2130(2)	276(3)	39(1)
C(16)	1808(3)	2789(2)	634(3)	37(1)
C(5)	1583(4)	1609(3)	-582(3)	55(1)
C(21)	1752(3)	5205(2)	2684(3)	30(1)
C(22)	2391(3)	5550(2)	3572(3)	32(1)
C(23)	1891(4)	6261(2)	3883(3)	42(1)
C(24)	837(4)	6611(3)	3337(3)	46(1)
C(25)	239(4)	6281(3)	2453(3)	44(1)
C(26)	702(3)	5584(2)	2130(3)	38(1)
C(30)	7343(3)	2299(2)	2922(3)	37(1)
C(31)	7668(3)	3278(3)	3175(3)	35(1)
N(32)	7083(3)	3716(2)	3605(2)	35(1)
C(33)	7351(4)	4585(3)	3873(3)	44(1)
C(34)	8212(4)	5044(3)	3720(3)	60(1)
C(35)	8800(4)	4606(3)	3290(3)	61(1)
C(36)	8515(4)	3713(3)	3002(3)	51(1)
C(40)	5831(3)	1205(2)	2838(3)	37(1)
C(41)	5027(3)	1137(2)	3314(3)	34(1)
N(42)	4870(3)	1895(2)	3724(2)	37(1)
C(43)	4171(4)	1860(3)	4174(3)	47(1)
C(44)	3633(4)	1080(3)	4248(4)	67(2)
C(45)	3794(4)	295(3)	3834(4)	66(1)
C(46)	4491(4)	320(3)	3360(3)	52(1)
Cl(1)	8250(1)	1094(1)	5253(1)	59(1)
O(1P)	7388(10)	1761(8)	4950(7)	83(4)
O(1P')	7265(11)	1576(12)	5176(13)	137(7)
O(2P)	8727(15)	1109(11)	6201(6)	111(5)
O(2P')	8792(14)	787(13)	6155(7)	92(5)
O(3P)	7794(13)	256(7)	4900(11)	133(6)
O(3P')	7936(13)	346(8)	4647(11)	115(6)
O(4P)	9082(9)	1337(13)	4941(12)	170(7)

Tabela E.1. Coordenadas atômicas ($\times 10^4$) e parâmetros térmicos isotrópicos ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o complexo **3**.
 OBSERVAÇÃO: $U(\text{eq})$ é definido como $\frac{1}{3}$ do traço do tensor U^{ij} ortogonalizado (continuação)

	x	y	z	U(eq)
O(4P')	8953(15)	1670(13)	5023(13)	176(8)

Tabela E.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o complexo **3**

Cu(1)–O(1)	1,905(3)	O(1)–Cu(1)–O(20)	101,33(10)
Cu(1)–O(20)	1,922(2)	O(1)–Cu(1)–O(10)	85,04(10)
Cu(1)–O(10)	1,926(2)	O(20)–Cu(1)–O(10)	165,89(10)
Cu(1)–N(1)	1,939(3)	O(1)–Cu(1)–N(1)	165,57(11)
Cu(1)–Cu(2)	3,0235(6)	O(20)–Cu(1)–N(1)	85,80(11)
Cu(2)–O(1)	1,933(2)	O(10)–Cu(1)–N(1)	90,90(11)
Cu(2)–N(42)	1,992(3)	O(1)–Cu(2)–N(42)	96,77(11)
Cu(2)–N(32)	1,999(3)	O(1)–Cu(2)–N(32)	99,76(12)
Cu(2)–N(4)	2,049(3)	N(42)–Cu(2)–N(32)	159,52(12)
Cu(2)–O(10)	2,219(2)	O(1)–Cu(2)–N(4)	168,82(12)
O(1)–H(1)	1,0610	N(42)–Cu(2)–N(4)	82,70(12)
O(10)–C(12)	1,324(4)	N(32)–Cu(2)–N(4)	83,38(12)
O(20)–C(22)	1,320(4)	O(1)–Cu(2)–O(10)	76,83(10)
N(1)–C(2)	1,291(4)	N(42)–Cu(2)–O(10)	95,35(11)
N(1)–C(21)	1,417(4)	N(32)–Cu(2)–O(10)	100,11(11)
C(2)–C(11)	1,441(5)	N(4)–Cu(2)–O(10)	92,08(10)
C(2)–H(2)	0,9300	Cu(1)–O(1)–Cu(2)	103,95(12)
C(3)–C(13)	1,497(5)	Cu(1)–O(1)–H(1)	120,1
C(3)–N(4)	1,498(4)	Cu(2)–O(1)–H(1)	131,7
C(3)–H(3A)	0,9700	C(12)–O(10)–Cu(1)	125,3(2)
C(3)–H(3B)	0,9700	C(12)–O(10)–Cu(2)	119,5(2)
N(4)–C(40)	1,481(4)	Cu(1)–O(10)–Cu(2)	93,38(9)
N(4)–C(30)	1,488(5)	C(22)–O(20)–Cu(1)	110,7(2)
C(11)–C(16)	1,400(5)	C(2)–N(1)–C(21)	123,7(3)
C(11)–C(12)	1,414(5)	C(2)–N(1)–Cu(1)	125,7(2)
C(12)–C(13)	1,419(5)	C(21)–N(1)–Cu(1)	110,5(2)
C(13)–C(14)	1,382(5)	N(1)–C(2)–C(11)	125,0(4)
C(14)–C(15)	1,391(5)	N(1)–C(2)–H(2)	117,5
C(14)–H(14)	0,9300	C(11)–C(2)–H(2)	117,5
C(15)–C(16)	1,381(5)	C(13)–C(3)–N(4)	117,3(3)
C(15)–C(5)	1,512(5)	C(13)–C(3)–H(3A)	108,0
C(16)–H(16)	0,9300	N(4)–C(3)–H(3A)	108,0
C(5)–H(5A)	0,9600	C(13)–C(3)–H(3B)	108,0
C(5)–H(5B)	0,9600	N(4)–C(3)–H(3B)	108,0
C(5)–H(5C)	0,9600	H(3A)–C(3)–H(3B)	107,2
C(21)–C(26)	1,392(5)	C(40)–N(4)–C(30)	112,0(3)
C(21)–C(22)	1,415(5)	C(40)–N(4)–C(3)	111,1(3)
C(22)–C(23)	1,404(5)	C(30)–N(4)–C(3)	107,9(3)
C(23)–C(24)	1,375(6)	C(40)–N(4)–Cu(2)	109,6(2)
C(23)–H(23)	0,9300	C(30)–N(4)–Cu(2)	105,6(2)
C(24)–C(25)	1,393(6)	C(3)–N(4)–Cu(2)	110,4(2)
C(24)–H(24)	0,9300	C(16)–C(11)–C(12)	119,1(3)
C(25)–C(26)	1,373(5)	C(16)–C(11)–C(2)	118,3(4)
C(25)–H(25)	0,9300	C(12)–C(11)–C(2)	122,4(3)
C(26)–H(26)	0,9300	O(10)–C(12)–C(11)	123,3(3)
C(30)–C(31)	1,499(5)	O(10)–C(12)–C(13)	118,0(3)
C(30)–H(30A)	0,9700	C(11)–C(12)–C(13)	118,7(3)
C(30)–H(30B)	0,9700	C(14)–C(13)–C(12)	119,3(3)

Tabela E.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o complexo **3** (continuação)

C(31)–N(32)	1,352(4)	C(14)–C(13)–C(3)	120,4(3)
C(31)–C(36)	1,367(5)	C(12)–C(13)–C(3)	119,8(3)
N(32)–C(33)	1,340(4)	C(13)–C(14)–C(15)	122,9(3)
C(33)–C(34)	1,383(6)	C(13)–C(14)–H(14)	118,6
C(33)–H(33)	0,9300	C(15)–C(14)–H(14)	118,6
C(34)–C(35)	1,355(6)	C(16)–C(15)–C(14)	117,3(4)
C(34)–H(34)	0,9300	C(16)–C(15)–C(5)	121,1(4)
C(35)–C(36)	1,383(6)	C(14)–C(15)–C(5)	121,6(3)
C(35)–H(35)	0,9300	C(15)–C(16)–C(11)	122,6(4)
C(36)–H(36)	0,9300	C(15)–C(16)–H(16)	118,7
C(40)–C(41)	1,494(5)	C(11)–C(16)–H(16)	118,7
C(40)–H(40A)	0,9700	C(15)–C(5)–H(5A)	109,5
C(40)–H(40B)	0,9700	C(15)–C(5)–H(5B)	109,5
C(41)–N(42)	1,338(4)	H(5A)–C(5)–H(5B)	109,5
C(41)–C(46)	1,390(5)	C(15)–C(5)–H(5C)	109,5
N(42)–C(43)	1,341(4)	H(5A)–C(5)–H(5C)	109,5
C(43)–C(44)	1,359(6)	H(5B)–C(5)–H(5C)	109,5
C(43)–H(43)	0,9300	C(26)–C(21)–C(22)	121,4(3)
C(44)–C(45)	1,377(6)	C(26)–C(21)–N(1)	126,0(3)
C(44)–H(44)	0,9300	C(22)–C(21)–N(1)	112,5(3)
C(45)–C(46)	1,368(6)	O(20)–C(22)–C(23)	122,9(4)
C(45)–H(45)	0,9300	O(20)–C(22)–C(21)	120,3(3)
C(46)–H(46)	0,9300	C(23)–C(22)–C(21)	116,8(4)
Cl(1)–O(3P)	1,375(8)	C(24)–C(23)–C(22)	121,1(4)
Cl(1)–O(4P')	1,376(10)	C(24)–C(23)–H(23)	119,5
Cl(1)–O(4P)	1,377(9)	C(22)–C(23)–H(23)	119,5
Cl(1)–O(2P)	1,385(9)	C(23)–C(24)–C(25)	121,1(4)
Cl(1)–O(2P')	1,397(10)	C(23)–C(24)–H(24)	119,5
Cl(1)–O(1P')	1,398(10)	C(25)–C(24)–H(24)	119,5
Cl(1)–O(1P)	1,402(8)	C(26)–C(25)–C(24)	119,3(4)
Cl(1)–O(3P')	1,407(9)	C(26)–C(25)–H(25)	120,3
O(1P)–O(1P')	0,52(2)	C(24)–C(25)–H(25)	120,3
O(3P)–O(3P')	0,52(2)	C(25)–C(26)–C(21)	120,2(4)
O(4P)–O(4P')	0,55(2)	C(25)–C(26)–H(26)	119,9
		C(21)–C(26)–H(26)	119,9
		N(4)–C(30)–C(31)	109,6(3)
		N(4)–C(30)–H(30A)	109,7
		C(31)–C(30)–H(30A)	109,7
		N(4)–C(30)–H(30B)	109,7
		C(31)–C(30)–H(30B)	109,7
		H(30A)–C(30)–H(30B)	108,2
		N(32)–C(31)–C(36)	121,0(4)
		N(32)–C(31)–C(30)	116,0(3)
		C(36)–C(31)–C(30)	123,0(3)
		C(33)–N(32)–C(31)	119,1(3)
		C(33)–N(32)–Cu(2)	127,7(3)
		C(31)–N(32)–Cu(2)	112,9(2)
		N(32)–C(33)–C(34)	121,6(4)

Tabela E.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o complexo **3** (continuação)

N(32)–C(33)–H(33)	119,2
C(34)–C(33)–H(33)	119,2
C(35)–C(34)–C(33)	119,4(4)
C(35)–C(34)–H(34)	120,3
C(33)–C(34)–H(34)	120,3
C(34)–C(35)–C(36)	119,2(4)
C(34)–C(35)–H(35)	120,4
C(36)–C(35)–H(35)	120,4
C(31)–C(36)–C(35)	119,8(4)
C(31)–C(36)–H(36)	120,1
C(35)–C(36)–H(36)	120,1
N(4)–C(40)–C(41)	111,6(3)
N(4)–C(40)–H(40A)	109,3
C(41)–C(40)–H(40A)	109,3
N(4)–C(40)–H(40B)	109,3
C(41)–C(40)–H(40B)	109,3
H(40A)–C(40)–H(40B)	108,0
N(42)–C(41)–C(46)	121,0(4)
N(42)–C(41)–C(40)	116,9(3)
C(46)–C(41)–C(40)	122,0(3)
C(41)–N(42)–C(43)	119,0(3)
C(41)–N(42)–Cu(2)	115,2(2)
C(43)–N(42)–Cu(2)	125,8(3)
N(42)–C(43)–C(44)	122,6(4)
N(42)–C(43)–H(43)	118,7
C(44)–C(43)–H(43)	118,7
C(43)–C(44)–C(45)	118,9(4)
C(43)–C(44)–H(44)	120,6
C(45)–C(44)–H(44)	120,6
C(46)–C(45)–C(44)	119,3(4)
C(46)–C(45)–H(45)	120,3
C(44)–C(45)–H(45)	120,3
C(45)–C(46)–C(41)	119,2(4)
C(45)–C(46)–H(46)	120,4
C(41)–C(46)–H(46)	120,4
O(3P)–Cl(1)–O(4P')	130,5(10)
O(3P)–Cl(1)–O(4P)	110,0(7)
O(4P')–Cl(1)–O(4P)	22,9(9)
O(3P)–Cl(1)–O(2P)	113,1(7)
O(4P')–Cl(1)–O(2P)	103,1(13)
O(4P)–Cl(1)–O(2P)	108,5(8)
O(3P)–Cl(1)–O(2P')	95,3(10)
O(4P')–Cl(1)–O(2P')	111,0(8)
O(4P)–Cl(1)–O(2P')	108,2(12)
O(2P)–Cl(1)–O(2P')	20,2(7)
O(3P)–Cl(1)–O(1P')	101,2(11)
O(4P')–Cl(1)–O(1P')	108,6(7)
O(4P)–Cl(1)–O(1P')	128,7(9)

Tabela E.2. Comprimentos (Å, esquerda) e ângulos (°, direita) de ligação para o complexo **3** (continuação)

O(2P)–Cl(1)–O(1P')	94,6(10)
O(2P')–Cl(1)–O(1P')	108,3(7)
O(3P)–Cl(1)–O(1P)	109,4(7)
O(4P')–Cl(1)–O(1P)	89,1(10)
O(4P)–Cl(1)–O(1P)	107,7(6)
O(2P)–Cl(1)–O(1P)	108,1(6)
O(2P')–Cl(1)–O(1P)	125,3(7)
O(1P')–Cl(1)–O(1P)	21,4(8)
O(3P)–Cl(1)–O(3P')	21,4(8)
O(4P')–Cl(1)–O(3P')	109,4(6)
O(4P)–Cl(1)–O(3P')	90,3(10)
O(2P)–Cl(1)–O(3P')	129,9(8)
O(2P')–Cl(1)–O(3P')	110,2(6)
O(1P')–Cl(1)–O(3P')	109,2(8)
O(1P)–Cl(1)–O(3P')	109,4(8)
O(1P')–O(1P)–Cl(1)	78,9(17)
O(1P)–O(1P')–Cl(1)	79,7(18)
O(3P')–O(3P)–Cl(1)	82,7(17)
O(3P)–O(3P')–Cl(1)	75,9(16)
O(4P')–O(4P)–Cl(1)	78,5(18)
O(4P)–O(4P')–Cl(1)	78,6(17)

Tabela E.3. Parâmetros térmicos de deslocamento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para o complexo 3. OBSERVAÇÃO: O fator exponencial tem a forma: $-2^{-2} \times [\text{h}^2 \text{a}^2 \times \text{U}^{11} + \dots + 2\text{hka} \times \text{b} \times \text{U}^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
Cu(1)	34(1)	26(1)	32(1)	-3(1)	16(1)	3(1)
Cu(2)	37(1)	29(1)	33(1)	-4(1)	18(1)	5(1)
O(1)	43(2)	39(1)	32(1)	-10(1)	14(1)	10(1)
O(10)	29(2)	33(1)	29(1)	-5(1)	11(1)	3(1)
O(20)	46(2)	35(1)	34(2)	-7(1)	16(1)	12(1)
N(1)	35(2)	24(2)	40(2)	-2(1)	20(2)	1(1)
C(2)	31(2)	31(2)	41(2)	-1(2)	16(2)	1(2)
C(3)	42(2)	34(2)	29(2)	-4(2)	18(2)	4(2)
N(4)	37(2)	31(2)	33(2)	-2(1)	17(2)	7(1)
C(11)	38(2)	29(2)	36(2)	-2(2)	18(2)	0(2)
C(12)	35(2)	26(2)	26(2)	1(2)	14(2)	0(2)
C(13)	39(2)	29(2)	27(2)	4(2)	16(2)	2(2)
C(14)	45(3)	31(2)	32(2)	-1(2)	22(2)	7(2)
C(15)	52(3)	32(2)	33(2)	-5(2)	16(2)	-2(2)
C(16)	33(2)	37(2)	37(2)	-2(2)	9(2)	1(2)
C(5)	53(3)	57(3)	48(3)	-21(2)	10(2)	4(2)
C(21)	37(2)	22(2)	40(2)	1(2)	25(2)	-2(2)
C(22)	41(2)	24(2)	39(2)	3(2)	25(2)	2(2)
C(23)	58(3)	34(2)	42(2)	-2(2)	29(2)	8(2)
C(24)	57(3)	30(2)	70(3)	1(2)	44(3)	9(2)
C(25)	35(3)	35(2)	66(3)	3(2)	24(2)	5(2)
C(26)	36(2)	33(2)	48(2)	-3(2)	19(2)	-6(2)
C(30)	38(2)	41(2)	35(2)	-3(2)	17(2)	8(2)
C(31)	32(2)	40(2)	34(2)	3(2)	15(2)	7(2)
N(32)	38(2)	33(2)	38(2)	-2(2)	18(2)	2(1)
C(33)	52(3)	35(2)	47(3)	-5(2)	23(2)	-2(2)
C(34)	73(4)	38(2)	77(4)	-5(2)	37(3)	-11(2)
C(35)	66(3)	58(3)	73(4)	5(3)	44(3)	-9(3)
C(36)	53(3)	52(3)	59(3)	6(2)	32(2)	9(2)
C(40)	46(3)	29(2)	38(2)	-4(2)	20(2)	7(2)
C(41)	37(2)	32(2)	31(2)	-2(2)	13(2)	3(2)
N(42)	45(2)	32(2)	39(2)	-5(2)	21(2)	3(2)
C(43)	61(3)	40(2)	54(3)	-4(2)	37(3)	4(2)
C(44)	87(4)	61(3)	81(4)	-10(3)	63(3)	-15(3)
C(45)	77(4)	49(3)	89(4)	-10(3)	52(3)	-16(3)
C(46)	60(3)	39(2)	63(3)	-9(2)	30(3)	-3(2)
Cl(1)	58(1)	66(1)	49(1)	8(1)	16(1)	-2(1)
O(1P)	100(9)	74(6)	51(6)	-22(4)	3(5)	44(6)
O(1P')	55(8)	93(9)	234(19)	7(10)	25(10)	6(7)
O(2P)	188(13)	72(8)	43(6)	-3(4)	13(6)	66(7)
O(2P')	125(10)	97(11)	51(6)	22(6)	33(6)	82(9)
O(3P)	192(12)	92(8)	114(10)	-30(7)	59(9)	-79(9)
O(3P')	202(15)	63(7)	58(7)	-13(5)	27(7)	56(9)
O(4P)	44(7)	327(18)	150(13)	84(13)	49(8)	-2(10)
O(4P')	193(19)	238(15)	85(10)	2(11)	42(11)	-140(14)

Tabela E.4. Ligações de hidrogênio para o complexo **3** [Å e °]

D–H···A	d(D–H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
O(1)–H(1)···O(20) ⁱ	1,06	1,83	2,873(4)	167,9

Códigos de simetria: (i) $-x + 1, -y + 1, -z + 1$.

Apêndice F – Artigos Publicados

Catalytic Promiscuity in Biomimetic Systems: Catecholase-like Activity, Phosphatase-like Activity, and Hydrolytic DNA Cleavage Promoted by a New Dicopper(II) Hydroxo-Bridged Complex

Nicolás A. Rey,[†] Ademir Neves,^{*†} Adailton J. Bortoluzzi,[†] Claus T. Pich,[‡] and Hernán Terenzi[‡]

Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, and Laboratório de Expressão Gênica, Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Received July 14, 2006

Presented in this Communication are the structure, physicochemical properties, and catalytic promiscuity of a new dinuclear Cu^{II}(μ -OH)Cu^{II} complex containing a novel N,O-donor symmetric dinucleating ligand.

Catalytic promiscuity, defined as the ability of a single active site to catalyze more than one chemical transformation, constitutes a very important property of many enzymes, having a natural role in evolution and, occasionally, in the biosynthesis of secondary metabolites.¹ An illustrative example of this interesting feature is chymotrypsin, which catalyzes the hydrolysis of several chemically different substrates, such as amides, thiol esters, acid chlorides, and anhydrides. Thus, chymotrypsin exhibits catalytic promiscuity by catalyzing both amidase and phosphotriesterase reactions at its active site.²

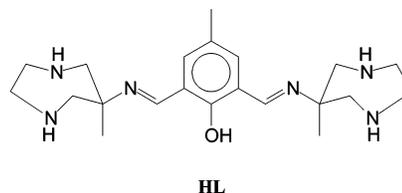
Catechol oxidases are ubiquitous plant enzymes belonging to the oxidoreductase class. They contain a dinuclear Cu center in their active site, which catalyzes the two-electron oxidation of a broad range of *o*-diphenols (catechols) to the corresponding *o*-quinones, coupled with the reduction of molecular oxygen to water. The structure of the sweet potato catechol oxidase (ibCO) has been previously described and possesses, in its resting Cu^{II}Cu^{II} (*met*) state, two cupric ions separated by a very short distance (2.9 Å), bridged by an exogenous hydroxo ligand. Each of the Cu^{II} centers completes its four-coordinate trigonal-pyramidal coordination with three N atoms from histidine residues.³

The development of synthetic analogues for the active sites of metalloenzymes containing dinuclear Cu centers has

become an attractive approach to obtaining information concerning the mechanisms involved in their catalytic cycles.

In this Communication, we report the synthesis and structural characterization of a new dicopper(II) μ -hydroxo complex (**1**) containing a symmetric Schiff base derived from the recently described facial tridentate ligand AAZ,^{4,5} as a model for the *met* form of the active site of catechol oxidase. We also show that, in addition to the expected catecholase-like activity, this system is able to catalyze the hydrolysis reaction of the phosphate diester 2,4-bis(dinitrophenyl)-phosphate (BDNPP) and to cause hydrolytic damage in plasmid DNA, exhibiting, in this way, a broad spectrum of catalytic activities.

The precursor 2,6-diformyl-4-methylphenol was obtained by modifying the method published by Gagné et al.⁶ The heterocyclic compound AAZ was synthesized as described in the literature.⁴ The Schiff base ligand HL was prepared *in situ* by reacting 2,6-diformyl-4-methylphenol (170 mg, 1 mmol) and AAZ (260 mg, 2 mmol) in MeOH under reflux.



The molecular structure of the dinuclear cation in complex **1**^{7,8} (Figure 1) reveals two pentacoordinated cupric ions, which are bridged by the phenolate oxygen O1 of the ligand HL and by an exogenous hydroxo ion. Bridging atoms

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: ademir@qmc.ufsc.br.

[†] Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC), Departamento de Química.

[‡] Laboratório de Expressão Gênica, Departamento de Bioquímica.

(1) Kazlauskas, R. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 195–201.

(2) O'Brien, P. J.; Herschlag, D. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R91–R105.

(3) Klabunde, T.; Eicken, C.; Sacchettini, J. C.; Krebs, B. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 1084–1090.

(4) Aime, S.; Calabi, L.; Cavallotti, C.; Gianolio, E.; Giovenzana, G. B.; Losi, P.; Maiocchi, A.; Palmisano, G.; Sisti, M. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 7588–7590.

(5) Peralta, R. A.; Neves, A.; Bortoluzzi, A. J.; Casellato, A.; dos Anjos, A.; Greatti, A.; Xavier, F. R.; Szpoganicz, B. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 7690–7692.

(6) Gagné, R. R.; Spiro, C. L.; Smith, T. J.; Hamann, C. A.; Thies, W. R.; Shiemke, A. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4073–4081.

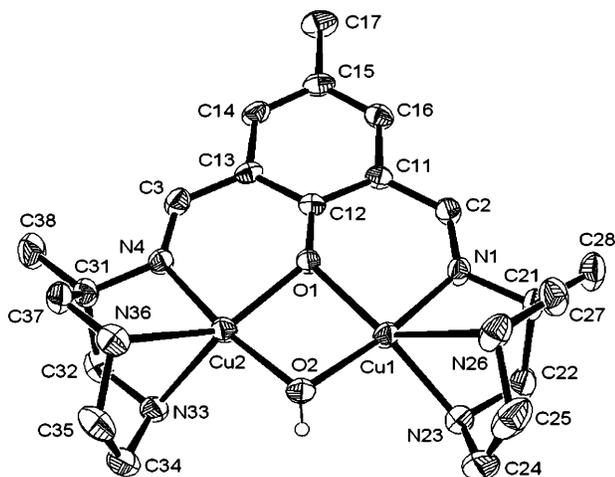


Figure 1. ORTEP plot of the cation $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{ON}_6)]^{2+}$. Ellipsoid at the 40% probability level. Selected bond lengths and angles (\AA and deg): Cu1–Cu2, 2.896(1); Cu1–O2, 1.920(5); Cu1–N1, 1.928(6); Cu1–O1, 1.954(4); Cu1–N23, 2.041(7); Cu1–N26, 2.524(7); Cu2–N4, 1.912(6); Cu2–O2, 1.914(5); Cu2–O1, 1.963(4); Cu2–N33, 2.092(6); Cu2–N36, 2.372(6); N1–C2, 1.256(9); C3–N4, 1.258(9); Cu1–O1–Cu2, 95.3(2); Cu2–O2–Cu1, 98.1(2); O2–Cu1–N1, 172.2(2); O2–Cu1–O1, 81.3(2); N1–Cu1–O1, 90.9(2); O2–Cu1–N23, 100.6(2); N1–Cu1–N23, 86.8(3); O1–Cu1–N23, 160.8(3); O2–Cu1–N26, 108.4(2); N1–Cu1–N26, 76.3(2); O1–Cu1–N26, 127.7(2); N23–Cu1–N26, 70.2(3); N4–Cu2–O2, 172.1(2); N4–Cu2–O1, 91.1(2); O2–Cu2–O1, 81.2(2); N4–Cu2–N33, 85.3(2); O2–Cu2–N33, 102.1(2); O1–Cu2–N33, 151.7(2); N4–Cu2–N36, 80.5(2); O2–Cu2–N36, 104.1(2); O1–Cu2–N36, 134.9(2); N33–Cu2–N36, 72.1(2).

occupy equatorial positions in the coordination sphere of the metals. The geometry around each Cu^{II} is distorted square-pyramidal, with values for the Addison⁹ parameter τ of 0.19 for Cu1 and of 0.34 for Cu2. Cu1 completes its equatorial coordination plane with two N atoms (N1 and N23) from the AAZ pendent arm. The average Cu1–equatorial ligand bond length is 1.96 \AA . The apical position is occupied by N26, the other AAZ nitrogen atom [Cu1–N26 = 2.524(7) \AA]. On the other hand, the equatorial coordination plane of Cu2 is completed by the second AAZ unit N4 and N33 atoms. The average Cu2–equatorial ligand bond length is 1.97 \AA . The N36 atom, from AAZ, occupies the apical position, completing thus the Cu2 coordination sphere [Cu2–N36 = 2.372(6) \AA]. One of the outstanding features of this complex is the short intermetallic distance of 2.896(1) \AA , which is, in fact, among the shortest $\text{Cu}^{\text{II}}\cdots\text{Cu}^{\text{II}}$ distances

reported in the literature for hydroxo-bridged dicopper compounds.¹⁰ It should be emphasized that this value is very similar to that determined for the *met* form of ibCO. In view of the crystallographic data discussed above, complex **1** can be considered to be one of the best structural models for the *met* form of the active site of catechol oxidases reported to date.

The reflectance spectrum of **1** (Figure S1 in the Supporting Information) shows a symmetrical absorption centered at 368 nm, assigned to a pair of different overlapped ligand-to-metal charge-transfer bands, namely, $\text{Cu}^{\text{II}} \leftarrow \text{OH}^-$ and $\text{Cu}^{\text{II}} \leftarrow \text{O}^-\text{Ph}$, and an asymmetrical absorption at 608 nm, related to d–d transitions. The same feature is observed in MeOH [364 nm ($\epsilon = 12\,100\text{ mol L}^{-1}\text{ cm}^{-1}$); 606 nm (145)] and MeCN [366 (7700); 607 (165)] solutions, suggesting that the molecular structure of the complex is maintained under these experimental conditions.

The cyclic voltammogram of **1** (Figure S2 in the Supporting Information) was measured in a MeCN solution and is characterized by two electrochemical signals. The first of them is a *quasi*-reversible wave at $E_{1/2} = -0.70\text{ V}$ vs NHE, which can be assigned to the redox couple $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{I}}$. When the scan rate is increased, a second process, evidenced by a cathodic peak at -1.08 V vs NHE, appears. This can be attributed to the formation of the $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{I}}$ species. The fact that this process is completely irreversible suggests a fast decomposition of the $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{I}}$ species, as evidenced by Torelli et al.^{10c} for a Cu_2 compound of the symmetric ligand H–BPMP. These results, confirmed by square-wave voltammetry (Figure S3 in the Supporting Information) and chronoamperometric experiments, are in agreement with those obtained by other authors.^{10c,11}

Complex **1** is able to catalyze the oxidation of the model substrate 3,5-di-*tert*-butylcatechol (3,5-dtbc) at 25.0 $^\circ\text{C}$ in a methanolic solution saturated with O_2 . The reaction was monitored by means of UV–vis spectroscopy (400 nm) and shows a saturation kinetics pattern. To take into account the spontaneous oxidation of the substrate, correction was carried out using a reference cell under identical conditions but without addition of the catalyst. Initially, a pH-dependence study was carried out to determine the pH value at which catecholase activity is at a maximum (Figure S4 in the Supporting Information). A kinetic $\text{p}K_a$ of 8.36 ± 0.06 , probably related to the formation of a deprotonated form of **1**, was found, and therefore the dependence of the reaction on the substrate concentration was investigated under optimum activity conditions, i.e., at pH 9.0. For comparison, the activity of catechol oxidases¹² has been observed between

(7) HL readily reacts with copper(II) perchlorate hexahydrate (740 mg, 2 mmol) and sodium hydroxide (2 mmol) to give a dark-green solution, which was allowed to stand at room temperature for 30 min prior to being filtered off to eliminate any undesirable precipitate. After a few hours, green crystals suitable for X-ray analysis were formed. They were separated by vacuum filtration, washed with small amounts of cold methanol and diethyl ether, and dried in vacuo. Yield: 330 mg (44%). Found: C, 33.37; H, 4.73; N, 10.94. Calcd for $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{ON}_6)](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 33.79; H, 4.86; N, 11.26. Selected IR data (KBr): 3404, 3272, 1643, 1550, 1458, 1445, 1329, 1147, 1117, 1082, 888, 627 cm^{-1} . **Caution!** Perchlorate salts of metal complexes with organic ligands are potentially explosive and should be handled in small quantities and with care.

(8) X-ray analysis: $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{Cu}_2\text{N}_6\text{O}_{11}$, fw 746.54, monoclinic, $P2_1/c$, $a = 14.452(1)\text{ \AA}$, $b = 13.254(1)\text{ \AA}$, $c = 16.386(3)\text{ \AA}$, $\beta = 109.158(9)^\circ$, $V = 2964.9(6)\text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $\mu = 1.680\text{ mm}^{-1}$, unique 5265 [$R(\text{int}) = 0.0315$], parameters 373, $\text{GOF}(F^2) = 1.048$, $R1 [I > 2\sigma(I)] = 0.0598$, $wR2$ (all data) = 0.1880.

(9) Addison, A. W.; Rao, T. N.; Reedijk, J.; van Rijn, J.; Verschoor, G. C. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1984**, 1349–1356.

(10) (a) Belle, C.; Beguin, C.; Gautier-Luneau, I.; Hamman, S.; Philouze, C.; Pierre, J. L.; Thomas, F.; Torelli, S. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 479–491. (b) Dapporto, P.; Formica, M.; Fusi, V.; Micheloni, M.; Paoli, P.; Pontellini, R.; Rossi, P. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 4663–4665. (c) Torelli, S.; Belle, C.; Gautier-Luneau, I.; Pierre, J. L.; Saint-Aman, E.; Latour, J. M.; Le Pape, L.; Luneau, D. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 3526–3536 and references cited therein.

(11) Kannappan, R.; Mahalakshmy, R.; Rajendiran, T. M.; Venkatesan, R.; Sambasiva Rao, P. *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)* **2003**, *115*, 1–14.

(12) Rompel, A.; Fischer, H.; Meiwes, D.; Buldt-Karentzopoulos, K.; Dillinger, R.; Tuzek, F.; Witzel, H.; Krebs, B. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 56–63.

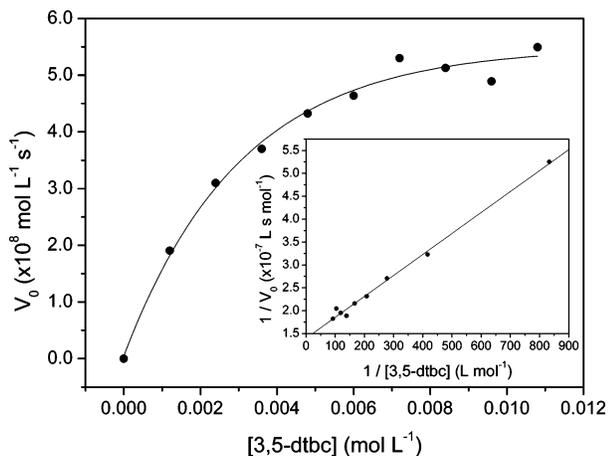


Figure 2. Oxidation of 3,5-dtbc catalyzed by **1**: Dependence of the reaction rates on [3,5-dtbc] at pH 9.0, in a methanol/water (32:1, v/v) mixture solution. Inset: double reciprocal plot. Conditions: $[I]_{\text{final}} = 2.4 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$; $[3,5\text{-dtbc}]_{\text{final}} = 1.2 \times 10^{-3}$ – 1.1×10^{-2} mol L $^{-1}$; at 25.0 °C.

pH 5 and 8, with maximum activity at pH 8. The initial rates obtained for the range of 3,5-dtbc concentrations used were fitted to the Michaelis–Menten equation (Figure 2) and linearized by means of the Lineweaver–Burk method (Figure 2, inset) to give the kinetic parameters $K_M = 4.0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$, $V_{\text{max}} = 8.3 \times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$ s $^{-1}$, the catalytic constant $k_{\text{cat}} = 3.46 \times 10^{-3}$ s $^{-1}$, and $k_{\text{cat}}/K_M = 0.88$ L mol $^{-1}$ s $^{-1}$. These values are in the range of those commonly observed for other dinuclear Cu^{II}Cu^{II} complexes.^{10a,13} Thus, although complex **1** is not particularly active in the oxidation of 3,5-dtbc, it can be considered as a functional model for the active site of catechol oxidases. The reason for the low activity of **1** may be related to the geometry of the Cu centers. In a square-pyramidal arrangement, the steric bulk around the Cu atoms is increased, thus preventing the catechols from approaching.^{10c} In this particular case, the intermetallic distance seems not to be a preponderant factor for activity.

Because complex **1** possesses in its structure a potential nucleophile constituted by the metal-bridging hydroxyl group, its ability to promote the hydrolysis of the activated phosphate diester BDNPP was investigated. In many cases, activated phosphate esters with good leaving groups are used as models of biologically relevant, unactivated phosphate esters, such as DNA. This study was performed in a 50% water/acetonitrile medium at 50.0 °C. We monitored the hydrolysis of BDNPP spectrophotometrically by following the absorption increase at 400 nm due to the formation of 2,4-dinitrophenolate over time. The pH-dependence plot for this reaction indicates optimum activity conditions around pH 7 (Figure S5 in the Supporting Information). A kinetic pK_a of 6.0 ± 0.2 was obtained from the acidic part of the curve, which is related to the formation of the μ -hydroxo species (**1**). At lower pH values, the diaqua (H₂O)₂Cu^{II}(μ -phenoxo)Cu^{II}(OH₂) complex should predominate.^{10c} The hydrolysis dependence on the complex concentration was

studied at pH 6.0, and a second-order rate constant of 2.1×10^{-2} L mol $^{-1}$ s $^{-1}$ was found, which is comparable to the constants published by Young et al.¹⁴ for the hydrolytic cleavage of BDNPP by two mononuclear Cu^{II} compounds.

Encouraged by the results obtained in the hydrolysis of BDNPP, we decided to evaluate the effect of **1** toward nucleic acid degradation. In fact, **1** is active as a DNA cleavage agent. Several Cu complexes were demonstrated to cleave DNA¹⁵ and, in the vast majority of cases, an oxidative reaction pathway was suggested. Complex **1** should mediate DNA phosphodiester cleavage through a hydrolytic mechanism because a classical radical scavenger, such as dimethyl sulfoxide (DMSO), was not capable of inhibiting the activity (Figure S6 in the Supporting Information).

In summary, complex **1** shows both oxidoreductase and hydrolase activities. However, the catalytically active species are not the same: in the presence of catechols and a weakly basic medium, a deprotonated form of **1** acts by means of an oxidative mechanism. On the other hand, when the phosphate diester BDNPP is the substrate, complex **1** itself (which predominates in the solution from pH 6.0 to 7.5) breaks the P–O linkage following a hydrolytic pathway rather than an oxidative one. This is of great interest because the catalytic promiscuity of the system can be modulated by controlling the pH of the medium. Additional work is in progress to identify unequivocally the catecholase-like active species and to elucidate the mechanisms involved. The results obtained will be the subject of a full paper.

Acknowledgment. Financial support was received from CNPq, FINEP, and PRONEX (Brazil). The authors thank Prof. Túlio Matêncio and Dr. Hállen D. R. Calado (Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil) for their assistance during the electrochemical experiments. N.A.R. is grateful to CNPq for a doctoral grant.

Supporting Information Available: X-ray crystallographic details in CIF format and Figures S1–S6 showing a solid-state UV–vis spectrum, cyclic voltammograms, a square-wave voltammogram, pH-dependence plots for the oxidation of 3,5-dtbc and the hydrolysis of BDNPP, and a plasmid DNA cleavage experiment in the presence of DMSO, respectively (PDF). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>. CIF data can also be obtained free of charge as CCDC 613432 from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif or 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, U.K. (tel +44 1223 336408, fax +44 1223 336033).

IC0613107

(13) Peralta, R. A.; Neves, A.; Bortoluzzi, A. J.; dos Anjos, A.; Xavier, F. R.; Szpoganicz, B.; Terenzi, H.; Oliveira, M. C. B.; Castellano, E.; Friedermann, G. R.; Mangrich, A. S.; Novak, M. A. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 992–1004.

(14) Young, M. J.; Wahnou, D.; Hynes, R. C.; Chin, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9441–9447.
(15) (a) Oliveira, M. C. B.; Couto, M. S. R.; Severino, P. C.; Foppa, T.; Martins, G. T. S.; Szpoganicz, B.; Peralta, R. A.; Neves, A.; Terenzi, H. *Polyhedron* **2005**, *24*, 495–499. (b) Rossi, L. M.; Neves, A.; Bortoluzzi, A. J.; Hörner, R.; Szpoganicz, B.; Terenzi, H.; Mangrich, A. S.; Pereira-Maia, E. C.; Castellano, E. E.; Haase, W. *Inorg. Chim. Acta* **2005**, *358*, 1807–1822. (c) Liu, C.; Wang, M.; Zhang, T.; Sun, H. *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 147–168. (d) Mitić, N.; Smith, S. J.; Neves, A.; Guddat, L. W.; Gahan, L. R.; Schenk, G. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3338–3363.

Acta Crystallographica Section C

**Crystal Structure
Communications**

ISSN 0108-2701

Editor: **George Ferguson**

2-{[Bis(2-pyridylmethyl)amino]methyl}-6-[(2-hydroxyanilino)methyl]-4-methylphenol: a novel binucleating asymmetric ligand as a precursor to synthetic models for metalloenzymes

Adailton J. Bortoluzzi, Ademir Neves and Nicolás A. Rey

Copyright © International Union of Crystallography

Author(s) of this paper may load this reprint on their own web site provided that this cover page is retained. Republication of this article or its storage in electronic databases or the like is not permitted without prior permission in writing from the IUCr.

2-[[Bis(2-pyridylmethyl)amino]-methyl]-6-[(2-hydroxyanilino)methyl]-4-methylphenol: a novel binucleating asymmetric ligand as a precursor to synthetic models for metalloenzymes

Adailton J. Bortoluzzi,* Ademir Neves and Nicolás A. Rey

Departamento de Química—UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

Correspondence e-mail: adajb@qmc.ufsc.br

Received 2 October 2006

Accepted 23 November 2006

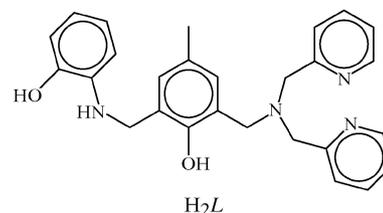
Online 13 January 2007

The title compound (H_2L), $C_{27}H_{28}N_4O_2$, is an asymmetric binucleating ligand with well defined soft (N_3O -donor) and hard (NO_2 -donor) sides. H_2L was designed as a ligand for the preparation of heterodinuclear mixed-valence M^{III}/M^{II} complexes which are models for heterobimetallic active sites of enzymes, principally calcineurin. The molecular structure of H_2L shows a spatial pre-organization of the donor groups for coordination. This conformation is stabilized by bifurcated intra- and intermolecular $O-H\cdots N$ hydrogen bonds involving both phenol groups. The intermolecular hydrogen bonds link molecules of H_2L into chains running parallel to the crystallographic c axis.

Comment

Many enzymes contain bimetallic cores within their catalytic sites and can be classified as either homobinuclear [*e.g.* catechol oxidase, with its $Cu^{II}Cu^{II}$ centre (Klabunde *et al.*, 1998)] or heterobinuclear [*e.g.* kbPAP, with its $Fe^{III}Zn^{II}$ centre (Sträter *et al.*, 1995)] metalloenzymes, depending on the nature of the metals present. Recent X-ray crystallographic studies have indicated that, even for homobinuclear sites, the two metal centres usually reside in chemically different environments, an asymmetry that may also involve the coordination numbers and the geometry of the metal centres (Belle & Pierre, 2003). Calcineurin, a phosphatase found predominantly in neural tissues, constitutes an interesting example of total asymmetry in heterobinuclear sites: the metal, coordination number, donor and geometry all exhibit asymmetry. This enzyme contains an $Fe^{III}Zn^{II}$ bimetallic core in its active centre, which comprises an octahedral Fe^{III} nucleus coordinated by one O atom from Asp90, one N atom from His92, an O-bridging carboxylate from Asp118 and three water molecules, one of which acts as an exogenous bridge. On

the other hand, the Zn^{II} centre shows a distorted trigonal-bipyramidal geometry formed by three O atoms from Asp118, Asn150 and the bridging water molecule, and two N atoms from His199 and His281 (Kissinger *et al.*, 1995).



In recent years, the study of models based on simple dinuclear metal complexes has become an important tool for gaining insight into the biological functions of such bimetallic cores. In this context, the design of binucleating ligands capable of providing asymmetric dinuclear complexes is a subject of great interest. It is convenient to classify binucleating ligands by the bridging groups that are used for assembling the two metal ions in close proximity (Gavrilova & Bosnich, 2004). Our research group has extensive experience in the development of asymmetric binucleating ligands containing alkoxide (Rossi *et al.*, 2005) and phenoxide (Mitić *et al.*, 2006) bridging units, which have been used in the synthesis of numerous bimetallic complexes. We report here the structure of a new phenoxide-based binucleating hexadentate ligand, H_2L , which presents donor, geometry and coordination-number asymmetries, thereby constituting a versatile precursor to synthetic models for the active sites of asymmetric metalloenzymes, with a special focus on calcineurin. It should be emphasized that H_2L possesses a softer N_3O -donor side, defined by the tertiary amine, both pyridine rings and the bridging phenolate group, capable of accommodating divalent metal ions, and a harder NO_2 -donor side,

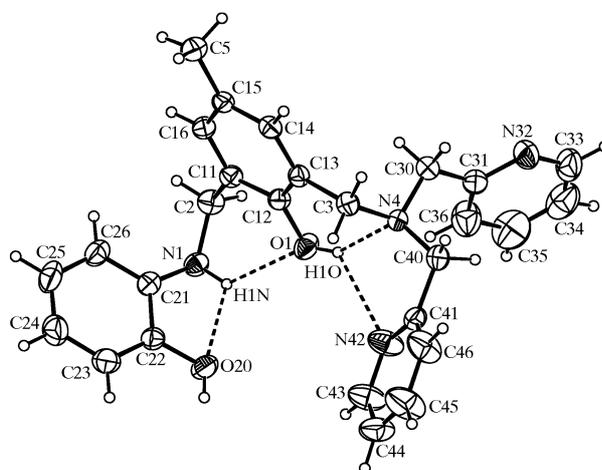


Figure 1

The molecular structure of H_2L , showing the atom-labelling scheme. Displacement ellipsoids are drawn at the 40% probability level. All H atoms are shown and the intramolecular hydrogen bonds are drawn as dashed lines.

comprising the secondary amine and the terminal and bridging phenol moieties, which binds preferentially to trivalent cations. This represents a convenient strategy for the attainment of mixed-valence heterobimetallic systems.

The structure of H_2L is shown in Fig. 1, and selected bond lengths and angles are given in Table 1. The bond distances and angles for the aromatic and heteroaromatic rings are not significantly different from those found in similar compounds containing these groups, for example, 2,6-bis-[[2-(hydroxyphenyl)(2-pyridylmethyl)amino]methyl]-4-methylphenol (Campbell *et al.*, 1993) and 4-*tert*-butyl-2,6-bis[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]phenol (Shanmuga Sundara Raj *et al.*, 1994). An interesting trend in the three-dimensional arrangement of the molecule is that H_2L shows a self-induced spatial pre-organization of the donor groups for coordination: with the exception of atom N32, all donor atoms point towards bridging atom O1. The respective O20...O1 and N42...O1 distances are 3.622 (3) and 3.310 (4) Å, very similar to the values observed for a hydroxo-bridged $Fe^{III}Zn^{II}$ complex [3.950 (8) and 3.354 (8) Å, respectively] of the asymmetric ligand 2-[bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl]-6-[[2-(hydroxybenzyl)(2-pyridylmethyl)amino]methyl]-4-methylphenol (Neves *et al.*, 2007).

The molecular conformation is influenced by intra- and intermolecular hydrogen bonds involving both phenol groups (Table 2). Within each molecule, the N1—H1N donor interacts with the acceptors O1 [$N\cdots O = 2.896$ (3) Å] and O20 [$N\cdots O = 2.662$ (3) Å], although the latter only achieves a less favourable five-membered ring. The bridging phenol acts as an acceptor in the N1—H1N...O1 interaction, and as a donor in

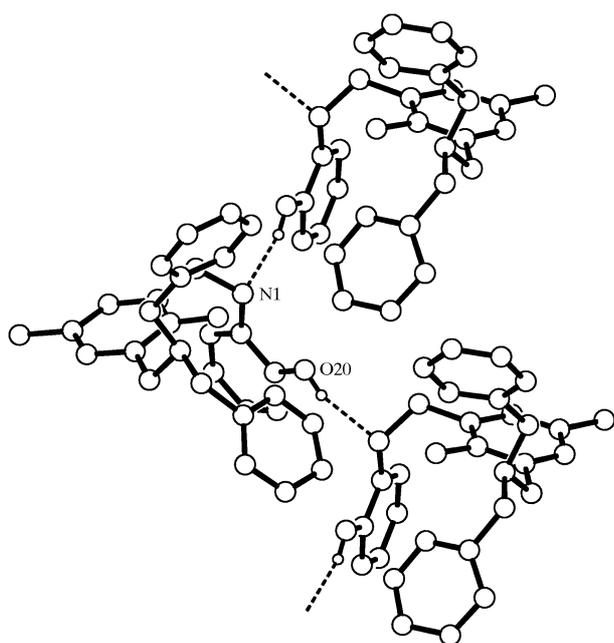


Figure 2
A view of H_2L , showing the hydrogen-bonding network. Intermolecular hydrogen bonds are drawn as dashed lines.

a second bifurcated hydrogen bond involving the interactions O1—H1O...N4 [moderate, $O\cdots N = 2.758$ (3) Å] and O1—H1O...N42 [weak, $O\cdots N = 3.309$ (4) Å]. It is interesting to note that the shorter component of this bifurcated hydrogen bond is associated with a narrower angle [$N4—C3—C13 = 112.7$ (2)°] compared with $N1—C2—C11$ [116.1 (2)°].

The title ligand has a direct linkage between the terminal phenolic ring and the secondary amine, allowing the formation of a more rigid five-membered chelate during the complexation process. The constriction induced in the complexes by going from a six-membered to a five-membered ring can give rise to modified spectroscopic and electrochemical properties. This was observed by Neves *et al.* (1992) for a mononuclear Mn^{III} complex with the ligand *N,N'*-bis(2-hydroxybenzyl)-*N,N'*-bis(2-methylpyridyl)ethylenediamine. As far as we know, there is only one previous example in the literature of a phenoxide-bridging ligand with such a structural feature (Campbell *et al.*, 1993).

Moderate intermolecular hydrogen bonds (Table 2) of the type O20—H2O...N1ⁱ [2.814 (3) Å; symmetry code: (i) $x, \frac{1}{2} - y, z - \frac{1}{2}$] link the molecules of H_2L into zigzag chains (Fig. 2) which run parallel to the crystallographic *c* axis.

Experimental

H_2L was synthesized from the precursor compound 3-[*N,N*-bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl]-5-methylsalicylaldehyde (bpmamff), which was prepared as described by Uozumi *et al.* (1998) by nucleophilic substitution of bis(2-pyridylmethyl)amine in 3-chloromethyl-5-methylsalicylaldehyde. A methanolic solution (10 ml) of 2-aminophenol (0.32 g, 2.9 mmol) was added dropwise to a stirred solution of bpmamff (1.0 g, 2.9 mmol) in methanol–tetrahydrofuran (1:1, 20 ml) and the mixture was left to react for 30 min. A strong orange colour appeared progressively due to the formation of the Schiff base. Reduction of the imine was performed by the addition, in portions, of $NaBH_4$ (0.11 g, 2.9 mmol) in an ice bath. The pH of the medium was then carefully adjusted to 6.0–7.0 with 4 M HCl, and the solvent was evaporated to half of its initial volume. The solution was then filtered to eliminate any undesirable precipitate. After a few hours, crystals of H_2L suitable for X-ray determination were isolated by filtration, washed with small amounts of cold methanol and diethyl ether, and dried *in vacuo* (yield 0.56 g, 44%; m.p. 416 K). Analysis found: C 73.56, H 6.33, N 12.55%; calculated for $C_{27}H_{28}N_4O_2$: C 73.61, H 6.41, N 12.72%.

Crystal data

$C_{27}H_{28}N_4O_2$
 $M_r = 440.53$
Monoclinic, $P2_1/c$
 $a = 12.651$ (1) Å
 $b = 21.071$ (5) Å
 $c = 9.262$ (1) Å
 $\beta = 106.09$ (1)°
 $V = 2372.2$ (7) Å³

$Z = 4$
 $D_x = 1.233$ Mg m⁻³
Mo $K\alpha$ radiation
 $\mu = 0.08$ mm⁻¹
 $T = 293$ (2) K
Irregular block, pale yellow
 $0.46 \times 0.30 \times 0.23$ mm

Data collection

Enraf–Nonius CAD-4
diffractometer
 $\omega/2\theta$ scans
4338 measured reflections
4142 independent reflections
2138 reflections with $I > 2\sigma(I)$

$R_{int} = 0.039$
 $\theta_{max} = 25.1^\circ$
3 standard reflections
every 200 reflections
intensity decay: 1%

Refinement

Refinement on F^2	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.056P)^2 + 0.792P]$
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.053$	where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
$wR(F^2) = 0.155$	$(\Delta/\sigma)_{\max} < 0.001$
$S = 1.02$	$\Delta\rho_{\max} = 0.23 \text{ e } \text{Å}^{-3}$
4142 reflections	$\Delta\rho_{\min} = -0.18 \text{ e } \text{Å}^{-3}$
305 parameters	Extinction correction: <i>SHELXL97</i>
H atoms treated by a mixture of independent and constrained refinement	(Sheldrick, 1997)
	Extinction coefficient: 0.0072 (11)

Table 1
Selected geometric parameters (Å, °).

O1—C12	1.374 (3)	N4—C40	1.465 (4)
O20—C22	1.362 (3)	N4—C30	1.466 (4)
N1—C21	1.408 (4)	N4—C3	1.475 (4)
N1—C2	1.474 (4)	C2—C11	1.511 (4)
C21—N1—C2	119.0 (3)	C30—N4—C3	110.2 (2)
C40—N4—C30	111.0 (2)	N1—C2—C11	116.1 (2)
C40—N4—C3	109.6 (2)	N4—C3—C13	112.7 (2)

Table 2
Hydrogen-bond geometry (Å, °).

$D-H \cdots A$	$D-H$	$H \cdots A$	$D \cdots A$	$D-H \cdots A$
N1—H1N \cdots O1	0.86 (1)	2.32 (2)	2.896 (3)	124 (2)
N1—H1N \cdots O20	0.86 (1)	2.22 (3)	2.662 (3)	113 (2)
O1—H1O \cdots N4	0.82	2.04	2.758 (3)	145
O1—H1O \cdots N42	0.82	2.68	3.309 (4)	134
O20—H2O \cdots N1 ⁱ	0.82	2.03	2.813 (3)	160

Symmetry code: (i) $x, -y + \frac{1}{2}, z - \frac{1}{2}$.

The phenol hydroxyl H atoms were found from ΔF maps and were then refined as part of rigid rotating groups, with $O-H = 0.82 \text{ Å}$ and $U_{\text{iso}}(H) = 1.5U_{\text{eq}}(O)$. The amine H atom was found in a ΔF map and thereafter refined with $N-H$ restrained to $0.86 (1) \text{ Å}$. The remaining H atoms were added in their geometrically calculated positions and refined with $C-H = 0.93 \text{ Å}$ (0.96 Å for methyl groups) and $U_{\text{iso}}(H) = 1.2U_{\text{eq}}(C)$, with the H atoms on C5 being treated as an idealized methyl group equally disordered over two orientations separated by a rotation of 60° . The slightly high displacement parameters observed for atoms N42, C43, C44, C45 and C46 indicate possible disorder of this aromatic ring, but the ΔF peaks near C45 and C46 are small, and no valid disorder model could be developed. We therefore accepted the ordered model with high U values.

Data collection: *CAD-4 EXPRESS* (Enraf-Nonius, 1994); cell refinement: *SET4* in *CAD-4 EXPRESS*; data reduction: *HELENA*

(Spek, 1996); program(s) used to solve structure: *SIR97* (Altomare *et al.*, 1999); program(s) used to refine structure: *SHELXL97* (Sheldrick, 1997); molecular graphics: *PLATON* (Spek, 2003); software used to prepare material for publication: *SHELXL97*.

The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) for financial support of this work. NAR is grateful to CNPq for a fellowship.

Supplementary data for this paper are available from the IUCr electronic archives (Reference: BM3018). Services for accessing these data are described at the back of the journal.

References

Altomare, A., Burla, M. C., Camalli, M., Cascarano, G. L., Giacovazzo, C., Guagliardi, A., Moliterni, A. G. G., Polidori, G. & Spagna, R. (1999). *J. Appl. Cryst.* **32**, 115–119.

Belle, C. & Pierre, J. L. (2003). *Eur. J. Inorg. Chem.* pp. 4137–4146.

Campbell, V. D., Parsons, E. J. & Pennington, W. T. (1993). *Inorg. Chem.* **32**, 1773–1778.

Enraf-Nonius (1994). *CAD-4 EXPRESS*. Version 5.1/1.2. Enraf-Nonius, Delft, The Netherlands.

Gavrilova, A. L. & Bosnich, B. (2004). *Chem. Rev.* **104**, 349–383.

Kissinger, C. R., Parge, H. E., Knighton, D. R., Lewis, C. T., Pelletier, L. A., Tempczyk, A., Kalish, V. J., Tucker, K. D., Showalter, R. E., Moomaw, E. W., Gastinel, L. N., Habuka, N., Chen, X., Maldonado, F., Barker, J. E., Bacquet, R. & Villafranca, J. E. (1995). *Nature*, **378**, 641–644.

Klabunde, T., Eicken, C., Sacchetti, J. C. & Krebs, B. (1998). *Nat. Struct. Biol.* **5**, 1084–1090.

Mitić, N., Smith, S. J., Neves, A., Guddat, L. W., Gahan, L. R. & Schenk, G. (2006). *Chem. Rev.* **106**, 3338–3363.

Neves, A., Erthal, S. M. D., Vencato, I., Ceccato, A. S., Mascarenhas, Y. P., Nascimento, O. R., Hörner, M. & Batista, A. A. (1992). *Inorg. Chem.* **31**, 4749–4755.

Neves, A., Lanznaster, M., Herrald, P., Schenk, G., Castellano, E. E. & Bortoluzzi, A. J. (2007). Unpublished results.

Rossi, L. M., Neves, A., Bortoluzzi, A. J., Hörner, R., Szpoganicz, B., Terenzi, H., Mangrich, A. S., Pereira-Maia, E. C., Castellano, E. E. & Haase, W. (2005). *Inorg. Chim. Acta*, **358**, 1807–1822.

Shanmuga Sundara Raj, S., Velmurugan, D. & Subramanian, E. (1994). *Acta Cryst.* **C50**, 2007–2009.

Sheldrick, G. M. (1997). *SHELXL97*. University of Göttingen, Germany.

Spek, A. L. (1996). *HELENA*. University of Utrecht, The Netherlands.

Spek, A. L. (2003). *J. Appl. Cryst.* **36**, 7–13.

Sträter, N., Klabunde, T., Tucker, P., Witzel, H. & Krebs, B. (1995). *Science*, **268**, 1489–1492.

Uozumi, S., Furutachi, H., Ohba, M., Ōkawa, H., Fenton, D. E., Shindo, K., Murata, S. & Kitko, D. J. (1998). *Inorg. Chem.* **37**, 6281–6287.