

TIAGO PACHECO DE CAMARGO

**DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXOS DE  $Al^{III}Zn^{II}$  E  $Al^{III}Cu^{II}$ :  
BIOMIMÉTICOS PARA AS FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS  
SUBSTITUÍDAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Ademir Neves

Co-orientadora: Dra. Rosely A. Peralta

Florianópolis

2009

Camargo, Tiago Pacheco

Desenvolvimento de Complexos de  $Al^{III}-Zn^{II}$  e  $Al^{III}-Cu^{II}$ : Biomiméticos para as Fosfatases Ácidas Púrpuras Substituídas / Tiago Pacheco de Camargo. - Florianópolis: UFSC / Programa de Pós Graduação em Química, 2009.

xxv, 88 f. : il. ; 31 cm.

Orientador: Ademir Neves

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Programa de Pós-graduação em Química, 2009.

Referências Bibliográficas: f 82-87.

1. Bioinorgânica. 2. Fosfatases Ácidas Púrpuras. 3. Complexos Modelos – Dissertação, Neves, Ademir, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Programa de Pós-graduação em Química.

TIAGO PACHECO DE CAMARGO

**DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXOS DE  $Al^{III}Zn^{II}$  E  $Al^{III}Cu^{II}$ :  
BIOMIMÉTICOS PARA AS FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS  
SUBSTITUÍDAS**

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

---

**Prof. Dr. Ademir Neves**  
Coordenador do Programa

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ademir Neves  
Orientador

---

Prof(a). Dra. Rosely A. Peralta  
Co-orientadora

---

Prof. Dr. Faruk J. N. Aguilera

---

Prof. Dr. José R. Bertolino

*Aos meus pais, e minha família.*

*“ Assim como a combinação adequada dos elementos químicos pode resultar em uma fantástica elaboração organizada de moléculas, a combinação adequada de notas musicais pode originar as mais fantásticas melodias. De qualquer forma, para alguém suficientemente sensível, qualquer uma destas alternativas pode nos levar ao êxtase permanente.”*

*Prof. Ademir Neves*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meus dois pilares, pelo amor, pelo incentivo, pela compreensão da ausência e pela paciência que tiveram diante dos muitos fins de semana longe de vocês. A minha irmã Tati, meu cunhado Jonas e ao Vítinho, por sempre me apoiarem nestes longos anos que estou aqui em Floripa.

Ao Professor Dr. Ademir Neves pela amizade, pelo exemplo e entusiasmo de sua orientação e constante presença durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Professora Dra. Rosely A. Peralta pela amizade, interesse e paciência em todo o tempo que tem estado ao meu lado. Sei que as vezes é difícil lidar com um filho “mimado”, mas você tem sido um grande exemplo que vou levar comigo por toda a vida.

Aos Prof. Drs. Adailton J. Bortoluzzi, Bruno Szpoganicz, Eduardo Castellano, Hernán Terenzi e Antonio S. Mangrich pelas inestimáveis colaborações e discussões pertinentes a este trabalho.

Aos Prof. Drs. Faruk J. Aguilera Nome, José R. Bertolino e Valdir Soldi por aceitarem participar desta banca examinadora e pelas valiosas contribuições para o enriquecimento do trabalho.

Aos amigos do LABINC: Bernardo, Fernando Xavier, Rafa, “dos Passos”, Clóvis, Renata, Geovana, Vítinho, Maryene, Everton, Sarinha, Zé, Alfredo, Jaque, Maressa e Vicente pelas conversas, brincadeiras e amizade, fazendo do ambiente de trabalho um local agradável e propício a discussões e fóruns depois do RU. Aos amigos Mauricio, Má, “dos Anjos” e Nenén que de uma forma ou de outra, estarem sempre por perto mesmo à distância.

Aos amigos da graduação: Tiago's, Eduard, Jânio, Michelle, Daí, Jojo, Juliana, pelo companheirismo e festas durante esses anos de estudo. Aos amigos da igreja Juninho, Elias, Anderson, Viana, Gesi e Paula pela amizade, apoio, e pelas orações.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina; Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e a todos que torceram por mim e estiveram presentes em cada conquista nestes anos de UFSC.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO .....	7
LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELAS .....	12
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 A QUÍMICA BIOINORGÂNICA.....	17
1.2 METALENZIMAS: SUPER EFICIÊNCIA .....	18
1.3 METALOHIDROLASES BINUCLEARES .....	19
1.3.1 FOSFATASE ÀCIDA PÚRPURA .....	21
1.4 COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO E O DESENVOLVIMENTO DE HIDROLASES SINTÉTICAS .....	27
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL .....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>31</b>
3.1 MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO .....	31
3.1.1 MATERIAIS.....	31
3.1.2 MÉTODOS DE INSTRUMENTAÇÃO .....	31
3.2 SÍNTESE DO LIGANTE .....	37
3.2.1 SÍNTESE DO 2-[N-BIS-(2-PIRIDILMETIL)AMINOMETIL]-4-METIL-6- N'-[(2-PIRIDILMETIL)(2- HIDRÓXIBENZIL)AMINOMETIL]FENOL – <b>H<sub>2</sub>BPBPMP</b> .....	37
3.3 SÍNTESE DOS COMPLEXOS .....	39
3.3.1 SÍNTESE DO COMPLEXO PERCLORATO DE $\mu$ - HIDRÓXIDO-2- [N-BIS (2-PIRIDILMETIL) AMINOMETIL]-4-METIL-6-[N'-(2-PIRIDILMETIL) (2- HIDRÓXIBENZIL) AMINOMETIL]FENOLATO] ALUMÍNIO(III) ZINCO(II) - <b>[ALZN(<math>\mu</math>-OH)(HO)(BPBPMP)].(CLO<sub>4</sub>).H<sub>2</sub>O (1)</b> .....	39

3.3.2	SÍNTESE DO COMPLEXO PERCLORATO DE $\mu$ - HIDRÓXIDO-2-[N-BIS (2-PIRIDILMETIL) AMINOMETIL]-4-METIL-6-[N'-(2-PIRIDILMETIL) (2-HIDRÓXI-BENZIL)AMINOMETIL] FENOLATO] ALUMÍNIO(III) COBRE(II) - [ALCU( $\mu$ -OH)(H <sub>2</sub> O)(BPBPMP)].(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O (2).....	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO LIGANTE .....	43
4.1.1	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO - IV .....	43
4.1.2	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO - RMN <sup>1</sup> H	43
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS.....	44
4.2.1	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO.....	44
4.2.2	DIFRATOMETRIA DE RAIOS X .....	46
4.2.3	CONDUTIVIDADE .....	53
4.2.4	ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA.....	54
4.2.5	ELETROQUÍMICA .....	57
4.2.6	RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA - RPE.....	59
4.2.7	TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA.....	61
4.3	REATIVIDADE .....	63
4.3.1	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO PH NA HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP	64
4.3.2	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP. ....	66
4.3.3	EFEITO DA COMPOSIÇÃO DOS SOLVENTES NA REATIVIDADE	71
4.3.4	PROPOSTA DE MECANISMO PARA A HIDRÓLISE DO DIÉSTER 2,4-BDNPP.....	73
4.3.5	ESTUDOS PRELIMINARES UTILIZANDO O SUBSTRATO 2,4-DNPP.	76
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>82</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diversidade de propostas mecanísticas para metaloenzimas binucleares: (a) <b>PAPs</b> , (b) urease, (c) leucina amino-peptidase, (d) fosfatase alcalina, (e) endonuclease, (f), inositol monofosfatase (g) fosfotriesterase e (h) EcoRV endonuclease.....	21
Figura 2 - Esquema demonstrativo do sítio ativo da kb-PAP. <sup>29</sup> .....	22
Figura 3 - Estrutura obtida para a spPAP com uma molécula de fosfato coordenada. <sup>30</sup> .....	23
Figura 4 – Propostas de como ocorre o ataque nucleofílico durante o mecanismo das PAPs. <sup>23,34,35</sup> .....	26
Figura 5 – Ligantes utilizados no desenvolvimento de complexos modelo para as PAPs. ....	28
Figura 6 – Esquema demonstrativo da estrutura do ligante H <sub>2</sub> bpbpmp. ....	28
Figura 7 – Esquema da síntese em etapas do ligante H <sub>2</sub> bpbpmp.....	37
Figura 8 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H do ligante H <sub>2</sub> bpbpmp em CD <sub>3</sub> CN. ....	38
Figura 9 – Espectro de Infravermelho do ligante H <sub>2</sub> bpbpmp, em pastilha de KBr.38	
Figura 10 – Espectro no Infravermelho do complexo <b>1</b> , em pastilha de KBr.....	40
Figura 11 – Espectro no Infravermelho do complexo <b>2</b> , em pastilha de KBr.....	41
Figura 12 – Representação da estrutura do ligante não simétrico H <sub>2</sub> bpbpmp.42	
Figura 13 – Representação das estruturas dos cátions complexos <b>1</b> e <b>2</b> . ....	42
Figura 14 - Sobreposição dos espectros no infravermelho do ligante H <sub>2</sub> bpbpmp e dos complexos <b>1</b> e <b>2</b> .....	45
Figura 15 – Ampliação dos espectros no infravermelho para o ligante H <sub>2</sub> bpbpmp e para os complexos <b>1</b> e <b>2</b> na região entre 600 e 1600 cm <sup>-1</sup> .....	45

Figura 16 – Representação ORTEP do cátion complexo <b>1</b> .....	48
Figura 17 – Representação ORTEP do cátion complexo <b>2</b> .....	50
Figura 18 - Diagrama de desdobramento dos níveis de energia dos orbitais d em diferentes simetrias. ....	54
Figura 19 – Espectro Eletrônico do complexo <b>2</b> em acetonitrila: (a) Complexo <b>2</b> ; (b) Após adição 2 equivalentes de NaOH; (c) Após adição 2 equivalentes de HClO <sub>4</sub> – Concentração [2] = 7,5 x 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> . ....	56
Figura 20 - Espectro Eletrônico do complexo <b>2</b> : (a) Sólido; (b) Acetonitrila; (c) Acetona; (d) Metanol; (e) Metanol/água – Concentração [2] = 7,5 x 10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> . ....	57
Figura 21 - Mudança na configuração estrutural que ocorrem em reações de transferência de elétron em sistemas do tipo Cu <sup>II</sup> /Cu <sup>I</sup> .....	58
Figura 22 – Voltamograma cíclico do complexo AlCu no sistema etanol/água (70/30 % v/v) – Eletrodo de trabalho: Carbono – Eletrodo Referência: Ag/Ag <sup>+</sup> – Eletrodo Auxiliar: Platina – Varredura: 250, 500, 750, 1000 mV.s <sup>-1</sup> . O par redox [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-</sup> / [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>4-</sup> foi usado como padrão interno.....	59
Figura 23 – Espectro de RPE na Banda X em solução de acetona para o complexo <b>2</b> : (a) Experimental; (b) Simulado.....	60
Figura 24 - Proposta para os equilíbrios observados para o complexo <b>2</b> em solução.....	62
Figura 25 – Gráfico de distribuição de espécies em função do pH para o complexo <b>2</b> . ....	62
Figura 26. Reação de hidrólise do substrato modelo (2,4-bdnpp) catalisada pelos complexos <b>1</b> e <b>2</b> levando à formação do cromóforo 2,4-dinitrofenolato e outros produtos de reação. ....	63

- Figura 27 - Dependência de  $V_0$  vs pH para as reações de hidrólise do 2,4-bdnpp catalisadas pelos complexos **1** e **2** a 25°C sob as seguintes condições: solução CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 1:1; [complexo] =  $5,2 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>; [2,4-bdnpp] =  $5,0 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>; [tampões] = 0,05 mol.L<sup>-1</sup> (MES, HEPES, CHES);  $I = 0,05$  mol.L<sup>-1</sup> (LiClO<sub>4</sub>). ..... 65
- Figura 28 - Dependência da velocidade de reação de hidrólise com a concentração do substrato para o complexo **1** e **2**. Condições: solução CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 1:1; [complexo] =  $4,3 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>; [bdnpp] = 2,0 à  $10,0 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>; [tampão] = 0,05 mol.L<sup>-1</sup> (MES pH 6,5, HEPES pH 7,0);  $I = 0,05$  mol.L<sup>-1</sup> (LiClO<sub>4</sub>) à 25°C. .... 68
- Figura 29 – Efeito da concentração do substrato em diferentes sistemas de solventes para o complexo **1** – Condições idênticas ao sistema CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (50:50). ..... 72
- Figura 30 – Proposta de mecanismo para a hidrólise do 2,4-bdnpp promovida pelos complexos **1** e **2**. ..... 75
- Figura 31 – Acompanhamento espectroscópico da reação de hidrólise do substrato 2,4-dnpp catalisada pelo complexo **2**: (a) Acompanhamento até 170 min; (b) Acompanhamento de 170 à 650 min. Condições: [complexo] =  $2,4 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, [dnpp] =  $2,8 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, [tampão] = 0,05 mol.L<sup>-1</sup> (MES pH 6,5, HEPES pH 7,0);  $I = 0,05$  mol.L<sup>-1</sup> (LiClO<sub>4</sub>) à 25°C. .... 77
- Figura 32 - Percentual de inibição por íons fosfato da reação de hidrólise do 2,4-bdnpp catalisada pelos complexos **1** e **2** a 25 °C. Condições vide seção 3.1.2, página 34. .... 78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de enzimas hidrolíticas binucleares: Metais presentes no sítio ativo e seus respectivos papéis metabólicos.....	19
Tabela 2 - Comparação da atividade catalítica das $M^{III}Zn^{II}$ -bsPAP e algumas propriedades dos metais trivalentes.....	25
Tabela 3 – Bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante $H_2bpbmp$ . ....	43
Tabela 4 - Dados Cristalográficos selecionados para os complexos <b>1</b> e <b>2</b> .....	47
Tabela 5 - Principais Distâncias (Å) e Ângulos de ligação ( $^{\circ}$ ) para os complexos <b>1</b> e <b>2</b> . ....	51
Tabela 6 – Comparação entre as distâncias de ligação nas esferas de coordenação entre os complexos <b>1</b> e <b>2</b> e seus análogos $FeZn^{43}$ e $FeCu^{66}$ . ....	52
Tabela 7 - Resultados da condutimetria para os complexos <b>1</b> e <b>2</b> . ....	53
Tabela 8 - Valores de Potencial de meia onda ( $E_{1/2}$ ) em várias velocidades de varredura para o complexo <b>2</b> .....	57
Tabela 9 – Valores de $pK_a$ correspondentes à desprotonação de moléculas de água coordenadas aos complexos.....	61
Tabela 10 - Valores de $pK_a$ cinéticos e $pK_a$ potenciométricos para os complexos <b>1</b> e <b>2</b> . ....	65
Tabela 11 - Parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do 2,4-bdnpp, catalisada pelos complexos <b>1</b> e <b>2</b> .....	67
Tabela 12 – Valores de constante de auto-troca de água da primeira esfera de coordenação para os íons metálicos. <sup>4</sup> .....	69

Tabela 13 – Comparação entre os Parâmetros Cinéticos dos complexos <b>1</b> e <b>2</b> com os complexos [FeZn( $\mu$ -OH)(bpbpmp)], [FeCu( $\mu$ -OH)(bpbpmp)] e [GaCu( $\mu$ -OH)(bpbpmp)]. .....	70
Tabela 14 – Parâmetros cinéticos obtidos com a variação da porcentagem de acetonitrila nos experimentos de estudo da variação da concentração do 2,4-bdnpp pelo complexo <b>1</b> . .....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\epsilon$	Coeficiente de absorvidade molar
$\nu$	Estiramento (IV)
$\delta$	Deformação angular (IV)
$\delta_H$	Deslocamento químico do hidrogênio (RMN $^1H$ )
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda, no máximo de absorção
CHES	Ácido 2-[N-cicloexilamino]etanossulfônico
DNA	Deoxiribonucleic acid – ácido desoxirribonucléico
Et <sub>3</sub> N	Trietilamina
EtOH	Etanol
EXAFS	Espectroscopia de Estrutura Fina Estendida de raios x
H <sub>2</sub> bpbmp	2-N-[bis-(2-piridilmetil)aminometil]-6-[(2-piridilmetil)(2-hidroxibenzil)aminometil]-4-metilfenol
HEPES	Ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazino]-etanossulfônico
HOAc	Ácido acético
MES	Ácido 2-[N-Morfolino]etanossulfônico
PAPs	Fosfatases Ácidas Púrpuras
P <sub>i</sub>	Fosfato inorgânico
RMN $^1H$	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RPE	Ressonância Paramagnética eletrônica
THF	Tetrahidrofurano
2,4-bdnpp	bis(2,4-dinitrofenil)fosfato
2,4-dnpp	2,4-dinitrofenil-fosfato

## RESUMO

As Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs) são metalohidrolases que contém um sítio ativo dinuclear do tipo  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$  ( $\text{M}^{\text{II}} = \text{Fe}, \text{Mn}$  ou  $\text{Zn}$ ), capazes de promover a hidrólise de uma variedade de ésteres de fosfato e anidridos numa faixa de pH de 4-7. Nas duas últimas décadas muitos estudos vem sendo reportados com enzimas ou em compostos modelo visando obter informações acerca do mecanismo de ação das PAPs e de sua função nos sistemas biológicos.

Dentre as estratégias empregadas, destacam-se os estudos de substituição dos metais presentes nos sítios ativos das PAPs. Na substituição do metal divalente foram feitos estudos com os íons  $\text{Mn}^{\text{II}}, \text{Co}^{\text{II}}, \text{Ni}^{\text{II}}, \text{Cu}^{\text{II}}, \text{Hg}^{\text{II}}$  e  $\text{Cd}^{\text{II}}$ , e como substituintes do metal trivalente, foram utilizados os cátions  $\text{Al}^{\text{III}}, \text{Ga}^{\text{III}}$  e  $\text{In}^{\text{III}}$ .

Neste trabalho foram sintetizados e caracterizados via análise elementar de CHN; condutivimetria; espectroscopias no infravermelho e eletrônica; eletroquímica e titulação potenciométrica dois novos complexos de  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  empregando-se o ligante  $\text{H}_2\text{bpbpmp}$ , já descrito na literatura.

Todos os complexos sintetizados tiveram suas estruturas cristalinas resolvidas via difratometria de raios X de monocristal. Os complexos são isoestruturais e possuem um núcleo  $[(\text{OH}_2)\text{Al}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{M}^{\text{II}}(\text{bpbpmp})]$ .

Os estudos realizados na hidrólise do substrato modelo bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-bdnpp) para os complexos de  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  resultaram em fatores de aceleração de 2,5 e 4,6 mil vezes, respectivamente, em relação à reação não catalisada. O complexo  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  apresentou ser mais efetivo na hidrólise do substrato 2,4-bdnpp, apresentando uma atividade quase que duas vezes maior que o complexo  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ .

A partir dos dados estruturais, espectroscópicos, eletroquímicos, cinéticos e de titulação potenciométrica foi possível propor um mecanismo de ação para a hidrólise do 2,4-bdnpp, mediada pelos complexos  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  compatível com outros já descritos na literatura.

## ABSTRACT

The purple acid phosphatases (PAPs), dinuclear  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$  ( $\text{M}^{\text{II}} = \text{Fe}, \text{Mn}$  or  $\text{Zn}$  metalohidrolases, are capable of the cleavage of several phosphate esters and anhydrides, in an acidic range of pH (4-7). In the last years many studies have been reported with enzyme or model complexes aiming the understanding the mechanism and the function of PAPs in biological systems.

The native metal substitution have been studied for PAPs. The native  $\text{M}^{\text{II}}$  were substituted by  $\text{Mn}^{\text{II}}, \text{Co}^{\text{II}}, \text{Ni}^{\text{II}}, \text{Cu}^{\text{II}}, \text{Hg}^{\text{II}}$  and  $\text{Cd}^{\text{II}}$ , and the  $\text{M}^{\text{III}}$  were substituted by  $\text{Al}^{\text{III}}, \text{Ga}^{\text{III}}$  and  $\text{In}^{\text{III}}$ .

In this sense, two new complexes,  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  and  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ , were synthesized and characterized via elemental analysis, conductimetry, infrared and electronic spectroscopies, electrochemistry, and potentiometric titration with the already described  $\text{H}_2\text{bpbpmp}$  ligand.

The complexes have been characterized by single-crystal X-ray diffraction. Both complexes are isostructural and have the core  $[(\text{OH}_2)\text{Al}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{M}^{\text{II}}(\text{bpbpmp})]$  in the reactivity conditions.

Reactivity studies with model bis(2,4-dinitrophenylphosphate) (2,4-bdnpp) for complexes  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  and  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  resulted in acceleration factors of 2.5 e 4.6 thousand times the uncatalyzed reaction. From all data obtained for both complexes it was possible to propose a mechanism for the 2,4-bdnpp hydrolysis, catalyzed by complexes  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ .



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A QUÍMICA BIOINORGÂNICA

Embora seja comum relacionar processos biológicos a compostos orgânicos, os elementos inorgânicos são também essenciais ao processo de manutenção da vida em diversos organismos. Neste processo são necessários vários elementos químicos em quantidades específicas. A ausência de um elemento essencial\* ou uma diminuição na sua ingestão causa uma redução na função biológica desempenhada por ele ou até mesmo a morte do indivíduo.<sup>1,2</sup> As funções por estes elementos inorgânicos realizadas podem ser muito variadas podendo ser estruturais, de mensageiros, de transporte de elétrons e de oxigênio e como catalisadores de diversas reações biológicas.<sup>2,3</sup>

Dentre as principais frentes de estudo da química bioinorgânica estão o estudo da ocorrência natural dos íons metálicos em sistemas biológicos (proteínas, enzimas, tecidos, etc) e a introdução de metais nestes sistemas como sondas ou fármacos. Outros focos desta disciplina residem ainda na investigação dos elementos inorgânicos na nutrição humana, na toxicidade destas espécies e ainda no transporte e armazenamento de metais nos sistemas biológicos.<sup>4</sup>

Um sistema muito estudado são as metaloproteínas. Os metais ocorrem naturalmente nestas enzimas, sendo utilizados pela natureza de forma muito eficiente para desempenhar uma gama de funções específicas associados ao processo da vida.<sup>3,5</sup>

Os 20 aminoácidos essenciais podem se organizar de diversas formas, constituindo assim a cadeia estrutural das proteínas. Muitos destes aminoácidos possuem átomos doadores de elétrons adequados à coordenação de íons metálicos. Como se sabe a partir da química de coordenação, a ligação desses íons a sítios ativos pode diminuir os valores de  $pK_a$  de moléculas de água ou de hidrogênios ionizáveis presentes nessas moléculas de forma significativa. As interações entre íons metálicos e biomoléculas são, geralmente, da mesma

---

\* São ditos elementos essenciais quando a sua falta no organismo vai causar algum tipo de disfunção, ou vai debilitar seriamente alguma função orgânica, e a adição desse elemento vai restaurar o funcionamento daquele organismo.

natureza das existentes em complexos, e por isso são tratadas de acordo com as teorias da química de coordenação. Sendo assim, as propriedades das biomoléculas que contém metais dependem da configuração dos elétrons de valência nos orbitais **d**.<sup>4</sup>

## 1.2 METALOENZIMAS: SUPER EFICIÊNCIA

As enzimas são as biomoléculas mais notáveis e especializadas dos sistemas vivos e apresentam como característica principal uma extraordinária eficiência catalítica, sendo então chamadas de catalisadores naturais. Uma característica importante que as diferenciam de outros tipos de catalisadores é o alto grau de especificidade com relação aos seus substratos. Elas aceleram reações químicas específicas em meio aquoso sob condições brandas de temperatura e pH.<sup>4,5,6</sup>

A maior parte do poder catalítico das enzimas vem da sua capacidade de aproximar os substratos em orientações favoráveis que promovam a formação dos estados de transição. Assim, a enzima pode diminuir a energia livre de formação do estado de transição, fazendo com que a energia livre de ativação da reação ( $\Delta G^\ddagger$ ) também diminua. Este efeito aumenta estatisticamente o número de moléculas com essa energia a uma mesma temperatura e, portanto, aumenta a constante catalítica e a velocidade da reação.<sup>1,4</sup>

Para desempenhar suas atividades, algumas enzimas não requerem nenhum outro grupo químico além de seus resíduos de aminoácidos, enquanto que outras necessitam de componentes químicos adicionais conhecidos como cofatores, os quais podem ser íons inorgânicos e/ou moléculas orgânicas (coenzima). Quando o cofator liga-se covalentemente à parte protéica da enzima, este recebe a denominação de grupo prostético.<sup>7</sup>

Sendo assim, as metaloenzimas são biopolímeros constituídos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, organizadas de maneira a formarem um envoltório protéico (sítio ativo) o qual aloja o íon metálico. Logo, no sítio ativo de uma metaloenzima são encontrados um ou mais íons metálicos, a cadeia lateral dos aminoácidos, pontes exógenas e ligantes terminais que compõem a primeira esfera de coordenação de cada íon metálico. Esta composição faz com

que as metaloenzimas sejam consideradas como complexos metálicos altamente elaborados.<sup>8,9</sup>

A partir dessas informações básicas sobre as propriedades estruturais e bioquímicas das metaloenzimas, destacam-se a seguir as enzimas que apresentam atividades catalíticas de hidrólise, as chamadas hidrolases, pois têm relação direta com este trabalho.

### 1.3 METALOHIDROLASES BINUCLEARES

Metalohidrolases binucleares constituem um grande e estruturalmente diverso grupo de enzimas que possuem sítios ativos binucleares para catalisar a hidrólise de amidas, ésteres de fosfato e de ácidos carboxílicos.<sup>10,11</sup> Dentro desta classe enzimática, algumas delas estão listadas na Tabela 1, juntamente com seu conteúdo metálico e seus papéis metabólicos.

Tabela 1 – Exemplos de enzimas hidrolíticas binucleares: Metais presentes no sítio ativo e seus respectivos papéis metabólicos.

<b>Enzima</b>	<b>Sítio ativo</b>	<b>Papel metabólico</b>
<i>Fosfatase ácida púrpura</i> (PAP)	Fe <sup>III</sup> Fe <sup>II</sup> ; Fe <sup>III</sup> Zn <sup>II</sup> ; Fe <sup>III</sup> Mn <sup>II</sup>	Reabsorção óssea, transporte de ferro, geração de espécies reativas do O <sub>2</sub>
<i>Ser/Thr fosfatase</i>	Fe-Fe; Fe-Zn <sup>II</sup> (estados de oxidação do Fe desconhecidos)	Metabolismo do glicogênio, contração muscular, transdução de sinal, atividades neurais.
<i>Urease</i>	Ni <sup>II</sup> -Ni <sup>II</sup>	Hidrólise da uréia
<i>Fosfatase alcalina</i>	Zn <sup>II</sup> -Zn <sup>II</sup>	Desconhecido
<i>Fosfotriesterase</i>	Zn <sup>II</sup> -Zn <sup>II</sup>	Remoção de organofosfatos
<i>Inositol monofosfatase</i>	Mg <sup>II</sup> -Mg <sup>II</sup>	Transdução de sinal

Atualmente sabe-se que os íons metálicos têm efeitos cooperativos atuando de três maneiras distintas em mecanismos enzimáticos. Primeiramente, podem agir diminuindo o valor do  $pK_a$  de moléculas de água ligadas ao metal, podendo gerar nucleófilos em condições de pH fisiológico. No segundo caso, o metal pode agir como sítio de ligação da enzima com o substrato. Finalmente, o centro metálico pode atuar no mecanismo hidrolítico por sua interação com o grupo de saída, desde que este possua uma carga negativa durante o estado de transição.<sup>10,12</sup>

Entretanto um fato curioso é que varias enzimas que possuem atividades similares, ou atuam sobre substratos semelhantes, possuem metais totalmente diferentes em seus sítios ativos, ou ainda apresentam distintos modos de coordenação dos centros metálicos ao longo de uma família inteira de enzimas.

Neste sentido, para compreender o papel dos íons metálicos em diversas enzimas, tem-se estudado o efeito da substituição dos metais que ocorrem naturalmente por outros metais semelhantes.<sup>13,14</sup> Estes estudos visam obter informações estruturais, espectroscópicas e mecanísticas, através das mudanças ocorridas na enzima em função desta substituição. Garmer e colaboradores<sup>15</sup> publicaram um estudo com substituição de metais nas *Anidrases Carbônicas* onde o centro de  $Zn^{II}$  foi substituído por  $Co^{II}$  e a atividade da enzima foi mantida em praticamente 100%.<sup>16</sup> Um outro exemplo interessante foi observado para a enzima *Leucyl Aminopeptidase*, onde através da substituição dos íons  $Zn^{II}$  presentes no sítio ativo por  $Mn^{II}$ ,  $Mg^{II}$ ,  $Co^{II}$ , foi proposto que os dois átomos de  $Zn^{II}$  tinham um papel de se ligar ao substrato e assim promover uma estabilização durante o estado de transição da reação.<sup>17</sup>

Entre as propostas para catálise nas metalohidrolases, a identidade do grupo nucleofílico, a estabilização dos intermediários de reação e a relativa contribuição dos íons metálicos varia substancialmente e podem depender em particular do substrato ou das condições experimentais tais como o pH (Figura 1).

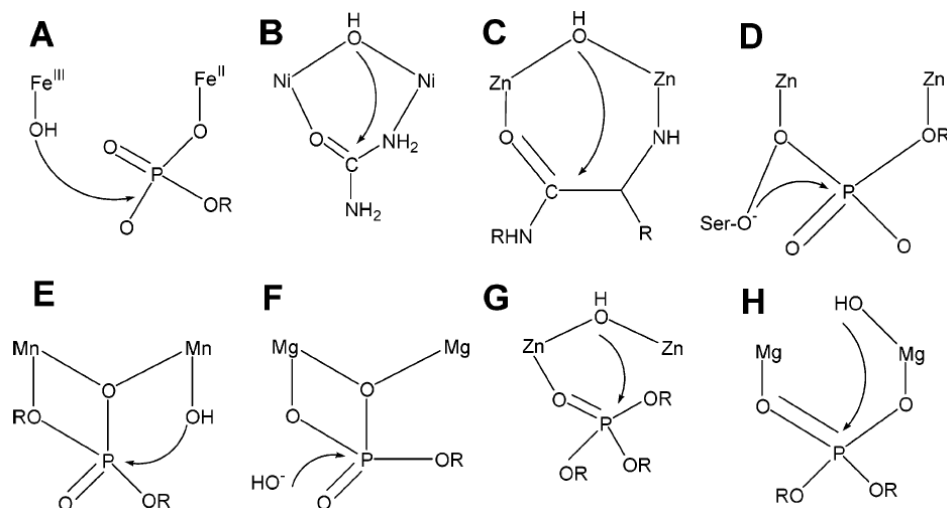


Figura 1 - Diversidade de propostas mecanísticas para metaloenzimas binucleares: (a) **PAPs**, (b) urease, (c) leucina amino-peptidase, (d) fosfatase alcalina, (e) endonuclease, (f), inositol monofosfatase (g) fosfotriesterase e (h) EcoRV endonuclease.

Os centros metálicos binucleares dessas enzimas apresentam diferentes resíduos de aminoácidos em seus respectivos sítios ativos e também diversas moléculas de água coordenadas aos centros metálicos, o que complica ainda mais a elucidação de mecanismos das reações. Desta forma, a compreensão dos fatores que contribuem para a atividade observada nessas enzimas é essencial para o entendimento dos seus mecanismos de ação.

### 1.3.1 FOSFATASE ÁCIDA PÚRPURA

As Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs) são enzimas que catalisam a hidrólise de uma série de ésteres de fosfato *in vitro* em condições de pH de 4 à 7.<sup>18</sup> Elas podem ser isoladas a partir de mamíferos, plantas e fungos, entretanto sua função *in vivo* permanece sem uma definição concreta. Dentre as propostas de ação estão o transporte de Ferro em leitões em fase de gestação, controle de absorção dos ossos, e a homeostase de fosfato em plantas. É ainda proposto que as PAPs tenham alguma ligação no desenvolvimento do mal de Alzheimer.<sup>19-23</sup>

Estas enzimas foram isoladas de diferentes fontes, como ossos de rato (rbPAP), útero de suínos (ufPAP), feijão vermelho (kbPAP) e batata doce (spPAP) e suas estruturas foram determinadas via difratometria de Raios X.<sup>19-25</sup> Os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo são conservados, porém as principais diferenças encontram-se nos metais que compõem o sítio ativo da enzima, onde a kbPAP e a sbPAP possuem um centro heterobinuclear de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}$  respectivamente, enquanto que na ufPAP o sítio ativo é formado por um centro homodivalente de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$  na forma ativa (coloração rósea) e um centro  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$  em sua forma inativa (coloração púrpura) que foi o estado determinado pelos dados cristalográficos.<sup>23-26</sup> O centro de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  encontra-se coordenado por um resíduo de tirosinato que estabiliza o centro *férrico* e que é responsável pela intensa banda de transferência de carga na região de 560 nm que dá a intensa coloração destas enzimas.<sup>27,28</sup>

No sítio ativo da kbPAP (Figura 2) com resolução de 2,65 Å, os centros metálicos  $\text{Fe}^{\text{III}}$  e  $\text{Zn}^{\text{II}}$ , estão separados por uma distância de 3,26 Å, sendo que o íon  $\text{Fe}^{\text{III}}$  encontra-se em uma geometria octaédrica distorcida e está coordenado aos seguintes resíduos de aminoácidos das cadeias laterais: tirosina (Tyr167), histidina (His325), um aspartato (Asp135) e um grupo carboxilato (Asp164) monodentado ponteando os centros metálicos. O centro metálico de  $\text{Zn}^{\text{II}}$  tem seu ambiente de coordenação formado por duas por histidinas (His286) e (His323) e pelo oxigênio amida da asparagina (Asn201).<sup>23,29</sup>

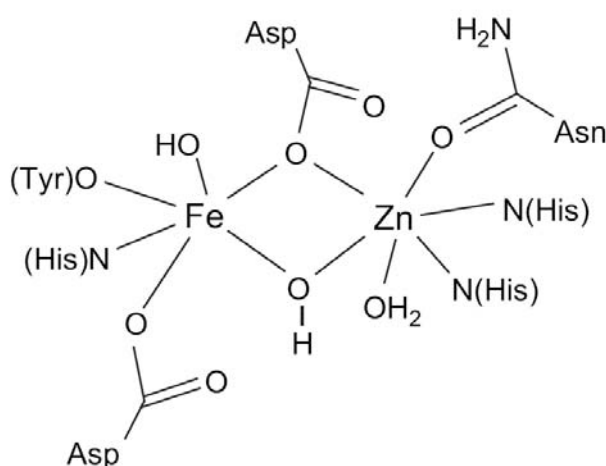


Figura 2 - Esquema demonstrativo do sítio ativo da kb-PAP.<sup>29</sup>

Apesar de não ter sido confirmado pela análise de raios X, Klabunde e colaboradores<sup>24</sup> atribuíram a presença de mais três ligantes exógenos no sítio ativo da kbPAP: um provável íon hidróxido ligado ao centro metálico de Fe<sup>III</sup> (Fe-O: 1,9 Å), uma molécula de água coordenada ao centro de Zn<sup>II</sup> (Zn-O: 2,1 Å) e outro grupo hidróxido como uma segunda ponte entre os centros metálicos (Fe-O: 1,9 Å e Zn-O: 2,1 Å). Existem ainda alguns aminoácidos no sítio ativo das PAPs que não estão ligados aos centros metálicos, porém estão envolvidos diretamente na catálise na ativação do substrato via ligações de hidrogênio constituindo então uma segunda esfera de coordenação .<sup>11,29</sup>

A PAP Fe<sup>III</sup>Mn<sup>II</sup> (spPAP) teve sua estrutura resolvida com uma molécula de fosfato coordenada, conforme apresentado na Figura 3.<sup>30</sup> Na enzima spPAP nativa, é proposto que um grupo  $\mu$ -óxido esteja como ponte entre os centros metálicos, que é evidenciado por um forte acoplamento antiferromagnético observado nas medidas de susceptibilidade magnética e confirmado pelo espectro de RPE silencioso.<sup>26</sup>

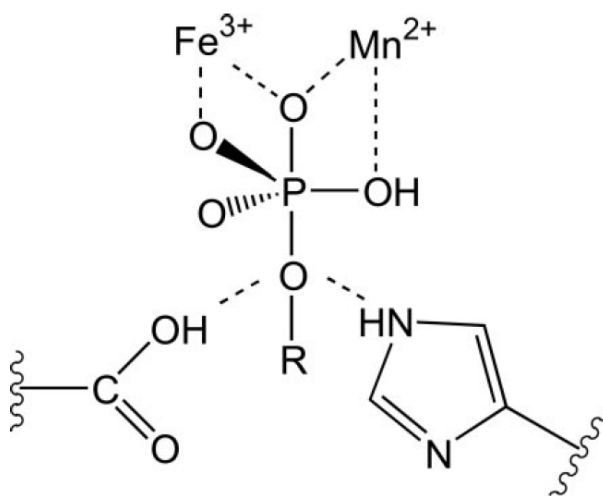


Figura 3 - Estrutura obtida para a spPAP com uma molécula de fosfato coordenada.<sup>30</sup>

É de suma importância salientar que não existem exemplos de enzimas ou compostos modelo binucleares contendo Mn<sup>II</sup> que possuam uma ponte do tipo  $\mu$ -óxido, e também o forte caráter iônico contradiz a presença de um forte acoplamento.

A kbPAP possui um sinal no EPR em  $g = 4,3$ , correspondendo ao íon  $\text{Fe}^{\text{III}}$  alto-spin ( $S = 5/2$ ) no seu estado fundamental. As PAPs extraídas de mamíferos possuem um fraco acoplamento antiferromagnético ( $J = -4,4$  à  $-13 \text{ cm}^{-1}$ ). A forma oxidada destas enzimas é silenciosa no EPR enquanto a forma  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$  apresenta um EPR rômbo e depende do pH.<sup>30,32</sup> Além disto, foi observado uma forte dependência da atividade da enzima em função do pH. Foram atribuídos por diferentes técnicas<sup>11</sup> dois valores de  $pK_a$  para as PAPs. O primeiro em torno de 5,4, atribuído a uma desprotonação de uma molécula de água no centro de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  e o segundo próximo a 7,5, atribuído a desprotonação de um resíduo de Histidina (His-92).<sup>11,18</sup>

Um estudo visando compreender o papel do metal trivalente no mecanismo das PAPs foi publicado por Merks e colaboradores. Foram reportados a preparação e a reatividade de uma série de  $\text{M}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ -bsPAP onde  $\text{M}^{\text{III}} = \text{Al}, \text{Fe}, \text{Ga}$  e  $\text{In}$ , sendo que as propriedades destas enzimas foram fortemente influenciadas pela substituição do metal trivalente.

De modo geral, íons trivalentes são fortes ácidos de Lewis, porém estes cátions possuem uma velocidade de troca de ligantes menor se comparado a cátions divalentes.<sup>4</sup> Este fato tem sido usado para explicar porque a maioria das metalohidrolases contém metais divalentes, em particular Zinco e Magnésio. Todavia, são conhecidas algumas enzimas que possuem metais trivalentes e apresentam um número alto de ciclos catalíticos.

Merks e colaboradores demonstraram que a bsPAP consegue acomodar em sua parte “dura” uma série de metais trivalentes, independentemente de seu raio iônico (Tabela 2) e que suas constantes de formação são significativamente dependentes da natureza do metal trivalente, segundo a ordem  $\text{Ga} \gg \text{Fe} > \text{Al} > \text{In}$ .



Tabela 2 - Comparação da atividade catalítica das  $M^{III}Zn^{II}$ -bsPAP e algumas propriedades dos metais trivalentes

$M^{III}$	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_M$ ( $mol.L^{-1}$ )	Raio iônico (Å)	$k_{auto-troca}$
Al	$1,9 \times 10^3$	$4,2 \times 10^{-3}$	0,54	1,3
Fé	$2,8 \times 10^3$	$3,3 \times 10^{-3}$	0,65	$2,0 \times 10^2$
Ga	$3,1 \times 10^3$	$5,5 \times 10^3$	0,62	$4,0 \times 10^2$
In	< 20	-	0,80	$> 10^7$

Nos estudos de reatividade apresentados, as constantes de velocidade da reação de hidrólise do substrato 4-nitrofenil-fosfato pelas espécies  $Ga^{III}Zn^{II}$  e  $Fe^{III}Zn^{II}$  foram semelhantes ( $k_{cat} = 3000 s^{-1}$ ), porém a atividade da espécie  $Al^{III}Zn^{II}$  foi um pouco inferior ( $k_{cat} = 2000 s^{-1}$ ) e a espécie  $In^{III}Zn^{II}$  é inativa. Os parâmetros cinéticos e o perfil de pH para a enzima  $Al^{III}Zn^{II}$ -bsPAP são similares aos obtidos para as espécies  $Fe^{III}Zn^{II}$  e  $Ga^{III}Zn^{II}$ . Porém, uma das diferenças mais importantes está na inibição por fluoreto que na enzima  $Al^{III}Zn^{II}$  é cerca de 60 vezes maior. Isto sugere que na enzima  $Al^{III}Zn^{II}$  o íon  $F^-$  se liga ao íon de forma mais intensa, impedindo a formação do nucleófilo.

Esses resultados, em primeira instância, não eram esperados se fossem levados em conta os conceitos oriundos da química de coordenação, pois o íon  $Al^{III}$  possui uma velocidade de auto-troca de ligantes muito inferior aos íons  $Fe^{III}$  e  $Ga^{III}$ .<sup>4</sup> Logo, este resultado pode ser explicado assumindo que a proteína de alguma forma modula as propriedades do alumínio de modo a aumentar a sua labilidade na troca de ligantes ou que a etapa determinante da velocidade de reação não envolve uma troca de ligantes no metal trivalente.<sup>13,33</sup>

O íon  $Al^{III}$  não possui um papel biológico definido, mesmo sendo um metal muito abundante. A este fato é atribuído que a sua baixa velocidade de auto-troca de ligantes o impeça de ser usado como um ácido de Lewis em metaloenzimas. Todavia, neste estudo foi demonstrado que o íon  $Al^{III}$  pode ser usado como metal trivalente nestas enzimas. Logo, outros fatores como a dificuldade de transporte e armazenamento, ou ainda a sua toxicidade devem impedir a sua utilização em sistemas biológicos.

Baseado então em diversos estudos, foram propostos três mecanismos para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAPs. Sabe-se que este ocorre via uma substituição nucleofílica sobre o átomo de fósforo, porém nem a identidade do nucleófilo nem o modo de coordenação do substrato ao sítio ativo foram totalmente esclarecidos.

As três propostas de identidade do nucleófilo são (Figura 4): (a) **1** – O hidróxido terminal ligado ao  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ; <sup>23</sup> (b) **2** – O hidróxido ponte; <sup>34</sup> (c) **3** – Um íon hidróxido gerado a partir de uma interação de uma molécula de água na segunda esfera de coordenação do metal pela desprotonação desta pelo hidróxido terminal. <sup>35</sup> Tanto a proposta (a) como a (b) são baseadas nas estruturas de Raios X das PAPs com tetraoxoânions coordenado de modo ponte.

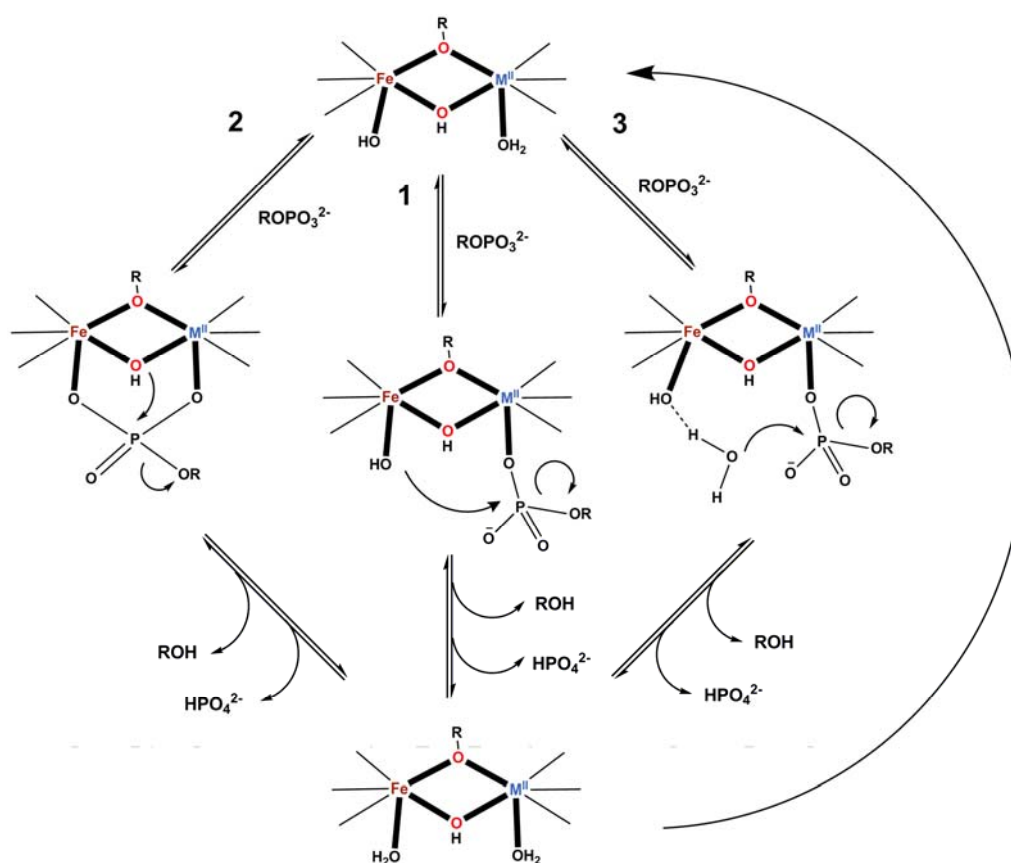


Figura 4 – Propostas de como ocorre o ataque nucleofílico durante o mecanismo das PAPs. <sup>23,34,35</sup>

Estes mecanismos foram assim atribuídos já que no caminho **1** o ataque nucleofílico resultaria em uma estrutura como um intermediário. Já no caso **2** acredita-se que o fosfato coordenado deve mimetizar o modo de coordenação do substrato estando alinhado para receber um ataque nucleofílico pela ponte hidróxido.<sup>36,37</sup>

#### 1.4 COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO E O DESENVOLVIMENTO DE HIDROLASES SINTÉTICAS

Hoje são conhecidas as estruturas cristalinas de diversas metaloenzimas. Estas informações estruturais contribuem imensamente no sentido de facilitar o desenvolvimento de complexos modelos para o estudo das propriedades físico-químicas e de reatividade das mesmas. Com esse objetivo, dezenas de complexos com ligantes contendo átomos de oxigênio e de nitrogênio doadores encontram-se descritos na literatura.<sup>3,4,8</sup> Desta forma, atualmente vem-se buscando, através do estudo destes compostos, maiores informações sobre a reatividade de diversas metaloenzimas, procurando auxiliar na comprovação de seus mecanismos de ação bem como na compreensão de seu papel nos sistemas vivos.<sup>18</sup>

No desenvolvimento de complexos modelos para as PAPs são comumente usados grupos amida, imidazol, benzimidazol, piridinas, fenóis e aminas, entre outros. Estes grupos visam mimetizar os resíduos de aminoácidos encontrados no sítio ativo das PAPs. Outros fatores de relevância na projeção de compostos modelos para as PAPs são: a distância intermetálica, a presença de uma ponte exógena ( $\mu$ -hidróxido), a assimetria e o ambiente de coordenação dos centros metálicos, bem como a presença de sítios lábeis que são essenciais ao processo catalítico.<sup>18,38</sup>

Dentre inúmeros ligantes utilizados na síntese de compostos modelos, são demonstrados, na Figura 5, dois exemplos de ligantes utilizados para este fim.

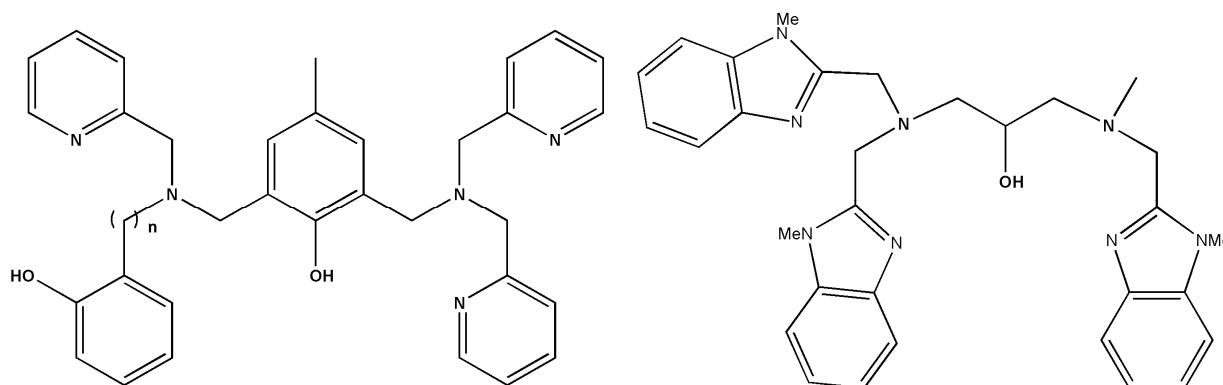


Figura 5 – Ligantes utilizados no desenvolvimento de complexos modelo para as PAPs.

Neves e colaboradores têm reportado uma série de complexos homo e heterobinucleares, com base no ligante não simétrico H<sub>2</sub>bpmp (Figura 6), capazes de atuar na hidrólise de ésteres de fosfato.

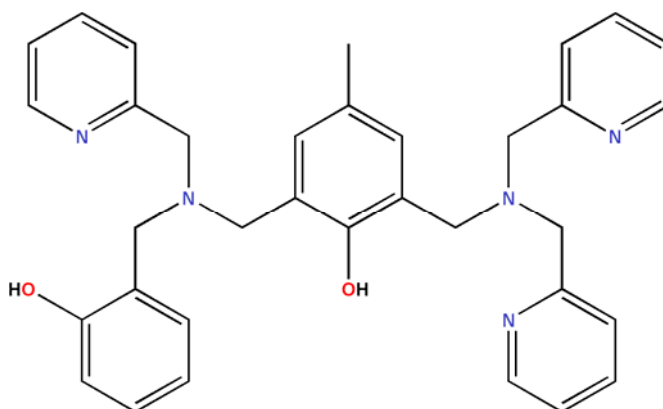


Figura 6 – Esquema demonstrativo da estrutura do ligante H<sub>2</sub>bpmp.

Com este ligante, foram reportados complexos de Fe<sup>III</sup>Mn<sup>II</sup>,<sup>39</sup> Fe<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup>,<sup>40</sup> Fe<sup>III</sup>Ni<sup>II</sup>,<sup>41</sup> Fe<sup>III</sup>Cu<sup>II</sup>,<sup>42</sup> Fe<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup>,<sup>43</sup> Ga<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup>,<sup>44</sup> Ga<sup>III</sup>Cu<sup>II</sup><sup>44</sup> entre outros, envolvendo estudos de reatividade frente à hidrólise do 2,4-bdnpp. Dentre estes, o complexo que apresentou maior atividade na hidrólise do substrato 2,4-bdnpp foi o complexo [Fe<sup>III</sup>Cu<sup>II</sup>(bpmp)(OH)(H<sub>2</sub>O)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, com um fator de aceleração sobre a reação não catalisada de 9.200 vezes. Já o complexo [Fe<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup>(OH)(H<sub>2</sub>O)(bpmp)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, obtido por Lanznaster,<sup>43</sup> representa o

primeiro modelo estrutural para o sítio ativo da kbPAP com somente um grupo fenolato terminal, uma ponte hidróxido e uma molécula de água ligada ao sítio de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  e apresentou os um fator de aceleração de 4.800 vezes.

Desta forma visando o contexto atual do desenvolvimento de novos compostos modelo para as PAPs, esse trabalho visa a exploração das propriedades físico-químicas da substituição dos íons metálicos nativos às PAPs (Fe, Zn, Mn) por íons  $\text{Al}^{\text{III}}$  e  $\text{Cu}^{\text{II}}$  através da obtenção de complexos não-simétricos de  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  como análogos sintéticos para o sítio ativo das PAPs com o ligante  $\text{H}_2\text{bpbmp}$  (Figura 6). Pretende-se ainda avaliar a reatividade dos complexos modelos sintetizados buscando contribuir com informações que possam auxiliar na elucidação do mecanismo desta metaloenzima, e estabelecer uma relação destes complexos com as propriedades da enzima  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ -bsPAP, uma vez não existem compostos heterobinucleares de  $\text{Al}^{\text{III}}$  modelo para esta enzima.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- Sintetizar, caracterizar novos complexos de coordenação heterobimetálicos de  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  para o estudo do papel do metal trivalente no mecanismo de atividade das PAPs.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar o ligante não simétrico  $\text{H}_2\text{bpbmp}$ , segundo metodologia descrita na literatura.<sup>39</sup>
- Sintetizar complexos binucleares de  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  com o ligante não simétrico  $\text{H}_2\text{bpbmp}$ , buscando obter a unidade estrutural  $\text{Al}^{\text{III}}-(\mu\text{-OH})\text{-M}^{\text{II}}$ .
- Caracterizar os complexos sintetizados via espectroscopia no infravermelho, UV-vis-NIR, EPR, eletroquímica, análise elementar, condutivimetria e por difratometria de Raios X.
- Estudar a atividade de catálise dos compostos preparados na hidrólise dos substratos modelo bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato e 2,4-(dinitrofenil)fosfato.

## 3 PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

#### 3.1.1 MATERIAIS

Os seguintes reagentes, materiais, gases e solventes empregados nas sínteses e análises foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia: *p*-cresol, 2-(2-aminometil)piridina, salicilaldeído, trietilamina, hidróxido de sódio, bicarbonato de sódio, paládio/carbono 5%, ácido clorídrico 37%, bicarbonato de sódio, sulfato de sódio anidro, argônio 5.0, borohidreto de sódio, hidróxido de lítio, clorofórmio deuterado, água deuterada, brometo de potássio grau espectroscópico, cloreto de potássio, cloreto de tionila, oxocloreto de fósforo, piridina, perclorato de cobre(II) hexahidratado, nitrato de alumínio(III) nonahidratado, perclorato de zinco(II) hexahidratado, tampões biológicos MES, HEPES, CHES, perclorato de lítio hexahidratado, hexacianoferrato de sódio, acetonitrila UV/HPLC, acetonitrila PA, diclorometano PA, metanol PA, metanol UV/HPLC, THF PA, etanol absoluto, éter etílico PA. Foram purificados antes de utilizados os seguintes reagentes: hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (recristalizado em etanol), 2-piridinocarboxialdeído (destilado à pressão reduzida), 2,4-dinitrofenol (recristalizado em clorofórmio). O composto bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato<sup>45</sup> e o 2,4-dinitrofenil-fosfato<sup>46</sup> foram sintetizados, purificado e caracterizados de acordo com procedimentos descritos na literatura.

#### 3.1.2 MÉTODOS DE INSTRUMENTAÇÃO

- Análise elementar de C, H e N

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

- Espectroscopia no infravermelho - IV

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro VARIAN , na região de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais, Departamento de Química – UFSC. As amostras sólidas foram analisadas em pastilha de KBr (grau espectroscópico).

- Condutivimetria

As análises de condutividade molar foram efetuadas em um condutivímetro SCHOTT, utilizando-se acetonitrila (grau espectroscópico) e concentrações de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  das espécies a serem analisadas, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. As análises foram realizadas após a calibração do equipamento com solução padrão de KCl ( $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  -  $\Lambda_M = 1408 \text{ } \Omega^{-1}.\text{cm}^2.\text{mol}^{-1}$ )<sup>47</sup> à temperatura de  $25,00 \pm 0,05 \text{ } ^\circ\text{C}$  estabilizada com auxílio de um banho termostatizado.

- Difractometria de Raios X

As análises de difração de raios X de monocristal dos complexos **1** e **2** foram realizadas pelo Prof. Dr Eduardo Ernesto Castellano do Departamento de Física da Universidade de São Paulo – São Carlos. Os dados foram coletados em um difratômetro Enraf–Nonius Kappa-CCD equipado com monocromador de grafite e tubo de molibdênio ( $\text{MoK}\alpha \lambda = 0,71073 \text{ } \text{Å}$ ) e a temperatura foi mantida em 120 K. As estruturas cristalinas foram refinadas pelo Prof. Dr. Adailton João Bortoluzzi e resolvidas através de métodos diretos com a utilização do programa SHELXS97<sup>48</sup> e refinados pelo método dos mínimos quadrados com matriz completa, com a utilização do programa SHELXL97.<sup>49</sup> As representações gráficas das estruturas moleculares foram geradas utilizando o programa ORTEP.<sup>50</sup>



- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio RMN  $^1\text{H}$

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram obtidos em um espectrofotômetro VARIAN -FT 400 MHz, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC. Os deslocamentos químicos de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS,  $\delta = 0,00$  ppm) e água, clorofórmio e acetonitrila deuterados como solvente.

- Espectroscopia eletrônica – UV-Vis-NIR

Os espectros eletrônicos nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho próximo foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo Lambda-19, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. As análises foram realizadas utilizando-se acetonitrila (grau espectroscópico) e celas de quartzo com capacidade para 4 mL e 1 cm de caminho óptico.

- Eletroquímica

O comportamento redox do complexo **2** foi investigado por voltametria cíclica em um potenciostato-galvanostato BAS (Bioanalytical Systems, Inc.) modelo Epsilon, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química da UFSC. O experimento foi realizado em solução etanol/água (70:30) sob atmosfera de argônio. Neste experimento, utilizou-se hexafluorofosfato de tetrabutilamônio ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) como eletrólito suporte e uma célula eletrolítica com três eletrodos: eletrodo de trabalho – carbono; eletrodo auxiliar – platina; eletrodo de referência –  $\text{Ag/Ag}^+$ . Para correção do eletrodo de referência utilizou-se hexacianoferrato de sódio como padrão interno.<sup>56</sup>

- Titulação potenciométrica

As constantes de protonação para os complexos foram determinadas por titulação potenciométrica no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia,

Departamento de Química – UFSC. Estes experimentos foram realizados em solução etanol/água (70/30 v/v) devido à baixa solubilidade dos complexos em água. Utilizou-se um pHmetro Corning 350 acoplado a um eletrodo de vidro combinado (Ag/AgCl), calibrado com uma solução de HCl ( $0,010 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e uma solução padrão de KOH ( $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ ) em água em uma célula termostatizada a  $25,00 \pm 0,05 \text{ }^\circ\text{C}$  para leitura direta de pH ( $p[\text{H}] = -\log[\text{H}^+]$ ). As soluções foram preparadas com água bidestilada previamente (na presença de  $\text{KMnO}_4$ ) e depois fervida e etanol de grau espectroscópico. As medidas foram realizadas em uma célula termostatizada a  $25,00 \pm 0,05 \text{ }^\circ\text{C}$  contendo uma solução do complexo ( $0,02 \text{ mmol}$ ) em  $50 \text{ mL}$  de solução etanol/água (70/30 v/v) e a força iônica ajustada para  $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$  com KCl, sob fluxo de argônio para eliminar a presença de  $\text{CO}_2$  atmosférico. As soluções de complexos tiveram o pH ajustado para próximo de 3,50 pela adição de  $0,200 \text{ mL}$  de HCl  $0,16 \text{ mol.L}^{-1}$ , resultando em um volume final de  $50,2 \text{ mL}$ , e foram tituladas com uma solução padrão de KOH  $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$  com a adição de alíquotas de  $0,05 \text{ mL}$  até  $\text{pH} \approx 9,50$  com o auxílio de um pipetador manual ( $20\text{-}200 \text{ }\mu\text{L}$ ) Digipete. As adições sucessivas de base foram realizadas após a obtenção de valores constantes de pH. O  $pK_w$  da solução etanol/água 70:30 % V/V contendo  $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$  de KCl utilizado para os cálculos, foi 14,72 (2).<sup>60</sup> As titulações foram realizadas em duplicata e os valores apresentados referem-se à média dos dois experimentos. As constantes de equilíbrio foram calculadas com o programa BEST7<sup>61</sup> e os diagramas de distribuição das espécies presentes em solução em função do pH foram obtidos com os programas SPE<sup>61</sup> e SPEPLOT<sup>61</sup>, através de uma colaboração com o Prof. Dr. Bruno Szpoganicz.

- Reatividade

A atividade catalítica dos complexos **1** e **2** foi avaliada através da reação de hidrólise do substrato bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-bdnpp)<sup>45</sup> e do respectivo monoéster 2,4-dinitrofenil-fosfato (2,4-dnpp),<sup>46</sup> o qual foi sintetizado de acordo com o método descrito por Bunton. Os experimentos cinéticos foram realizados em duplicata sob condições de excesso de substrato monitorando-se espectrofotometricamente, em um espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostatizado. A variação de absorvância ocorrida em 400 nm para a reatividade do complexo **1** e **2**, foi relacionada à liberação do ânion 2,4-dinitrofenolato, como produto da reação de hidrólise. A concentração de 2,4-dinitrofenolato formado foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar em 400 nm ( $\epsilon = 12100 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )<sup>41</sup> previamente determinado na faixa de pH = 5,00 a 9,00. As reações foram monitoradas até 5% de conversão de substrato a produto e os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais.<sup>62</sup> As velocidades iniciais foram obtidas diretamente do gráfico da concentração de 2,4-dinitrofenolato *versus* o tempo.

Os estudos em função do pH, os quais visam à obtenção do pH ótimo de atividade e  $pK_a$  cinético para cada complexo, foram realizados em uma faixa de pH entre 4,00 e 9,00 em condições de 100 vezes de excesso do substrato a 25 °C utilizando cubetas de quartzo e/ou vidro óptico com capacidade para 4 mL e caminho óptico de 1 cm, fechadas com tampa de teflon, nas quais foram adicionados 1500  $\mu\text{L}$  de solução aquosa (0,1 mol.L<sup>-1</sup>) do tampão (MES pH 4,00 a 6,50; HEPES pH 7,00 a 8,20; CHES pH 9,00 a 9,50) com força iônica mantida constante ( $I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) com a adição de perclorato de lítio, 200  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque do complexo ( $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  em acetonitrila), 500  $\mu\text{L}$  de acetonitrila e para completar o volume final de 3,0 mL da mistura reacional foram adicionados 800  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque do substrato ( $1,87 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  em acetonitrila). Portanto, as concentrações finais utilizadas de complexo e de substrato foram  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente.

Os experimentos para o estudo do efeito da concentração do substrato foram realizados à 25 °C utilizando tampão MES para pH = 6,50 (complexo **2**) e HEPES para pH = 7,00 (complexo **1**). Em um experimento típico adicionaram-se

1500  $\mu\text{L}$  de tampão ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  em água), 100  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque do complexo ( $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  em acetonitrila), quantidades entre 100 a 1200  $\mu\text{L}$  das soluções estoque de substrato ( $1,95 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  em acetonitrila) e acetonitrila para completar o volume final de 3000  $\mu\text{L}$ .

A fim de ser avaliada influência da concentração de íons fosfato (testes de inibição) na reação de hidrólise do 2,4-bdnpp, realizou-se um experimento sob condições de aproximadamente 10 vezes de excesso de substrato ( $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em relação aos complexos ( $4,30 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) estudados, onde na solução de tampão foi adicionado  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ajustados em concentrações de  $1,2 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ . A reação foi iniciada com a adição de volumes variando de: 0  $\mu\text{L}$  a 150  $\mu\text{L}$  de solução tampão com fosfato ([Inibidor] de 0 –  $5,95 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ).

O estudo do efeito isotópico de deutério na hidrólise do 2,4-bdnpp pelos complexos **1** e **2** foi realizado pelo acompanhamento de duas reações paralelas onde as soluções tampões HEPES pH e pD = 7,00 foram previamente preparadas em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{D}_2\text{O}$ . As reações foram monitoradas, sob condições de 100 vezes de excesso do substrato, em 400 nm para os complexos **1** e **2**, respectivamente.

Os experimentos visando o estudo da reação de hidrólise do monoéster de fosfato 2,4-dnpp catalisada pelos complexos **1** e **2**, foram acompanhados espectrofotometricamente com a variação de absorbância ocorrida em 400 nm, em um espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 19, relacionada à liberação do ânion 2,4-dinitrofenolato. As condições do sistema de solvente, pH e temperatura foram idênticas aos experimentos com o diéster 2,4-bdnpp.

Em todos os experimentos cinéticos a correção da hidrólise espontânea do substrato foi realizada através da diferença direta, ou seja, experimentos em condições idênticas exceto pela ausência do complexo foram acompanhados em paralelo, e a constante da reação não catalisada descontada da constante total da reação.

## 3.2 SÍNTESE DO LIGANTE

### 3.2.1 SÍNTESE DO 2-[N-BIS-(2-PIRIDILMETIL)AMINOMETIL]-4-METIL-6-N-[(2-PIRIDILMETIL)(2- HIDRÓXIBENZIL)AMINOMETIL]FENOL – *H<sub>2</sub>bpbpmp*

O ligante *H<sub>2</sub>bpbpmp* foi preparado e caracterizado conforme descrito por Karsten e colaboradores<sup>39</sup> seguindo o esquema demonstrado abaixo:

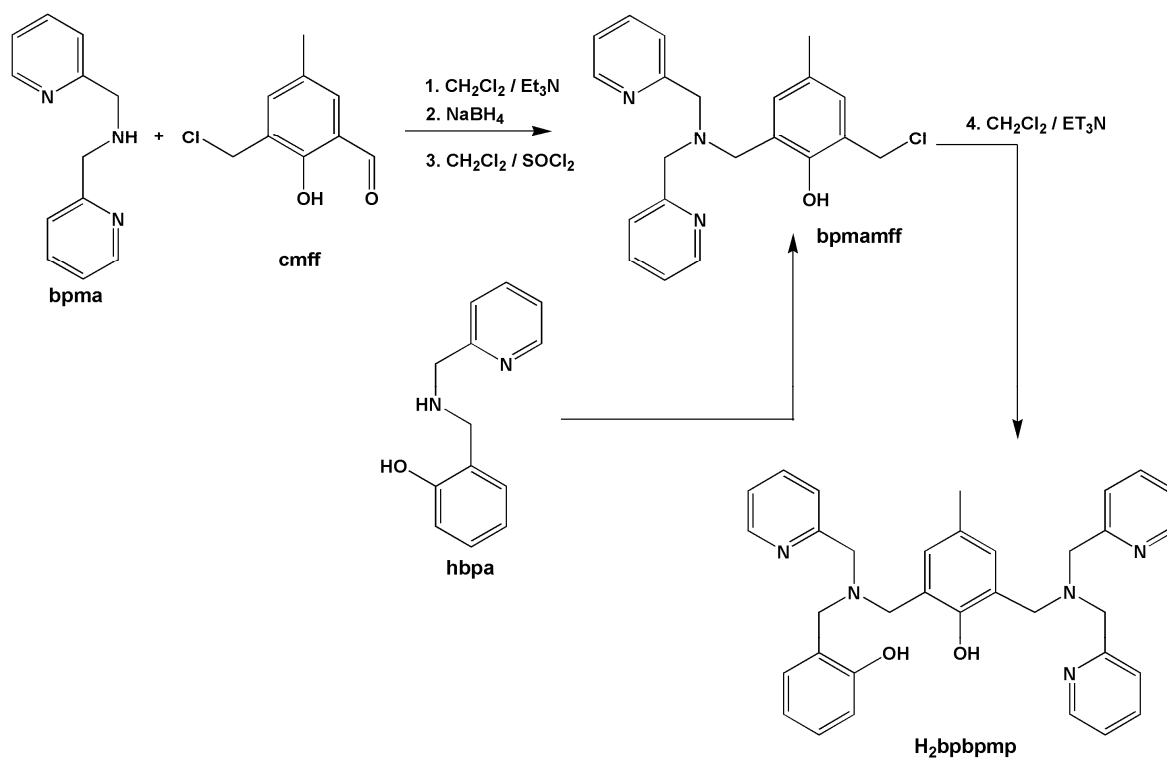


Figura 7 – Esquema da síntese em etapas do ligante *H<sub>2</sub>bpbpmp*.

O ligante foi caracterizado por e ressonância magnética de Hidrogênio e espectroscopia no infravermelho, mostradas nas Figura 8 e Figura 9 respectivamente.

**<sup>1</sup>H NMR, 400 MHz - ppm (CDCl<sub>3</sub>):** 2,16 (s, 3 H); 3,77 (s, 2 H); 3,90 (s, 4 H); 4,15 (s, 2 H); 4,29 (s, 2 H); 6,69-6,77 (m, 2 H); 6,91-6,99 (m, 4 H); 7,08 (d, 1 H); 7,17-7,23 (m, 4 H); 7,36 (d, 2 H); 7,64 (t, 2 H); 8,35 (d, 1 H); 8,65 (d, 2 H), (s, 1 H) 10,91.

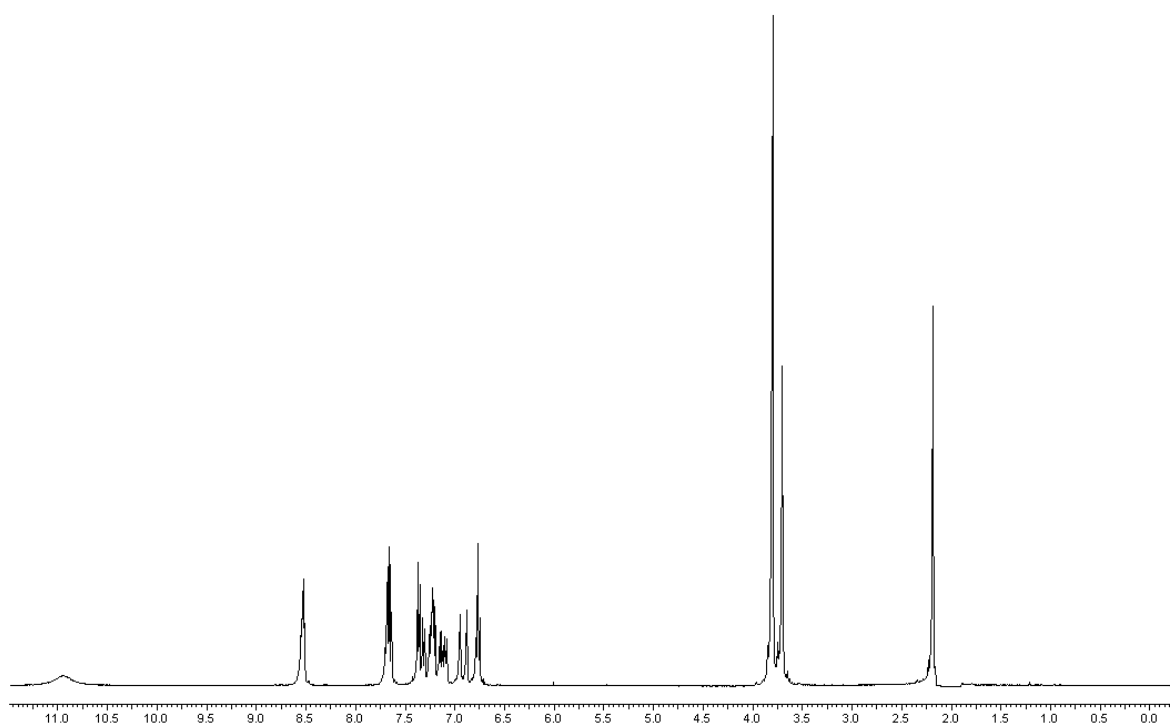


Figura 8 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ligante  $\text{H}_2\text{bbpmp}$  em  $\text{CD}_3\text{CN}$ .

**IV (KBr) em  $\text{cm}^{-1}$ :**  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$  e  $\text{C-H}_{\text{alif}}$ ) 3054-2820;  $\nu(\text{C}=\text{C})$  1595-1432;  $\nu(\text{C}=\text{N}_{\text{Py}})$  185-1440;  $\delta(\text{O-H})$  1375,  $\nu(\text{C-O}_{\text{fenol}})$  1260;  $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$  761.

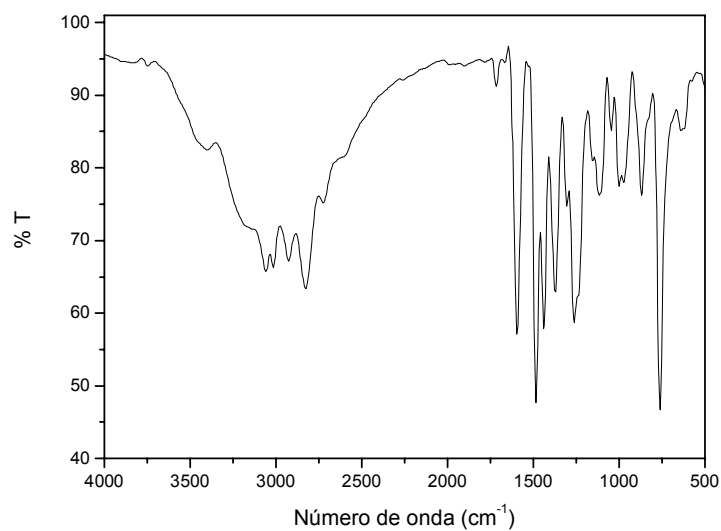
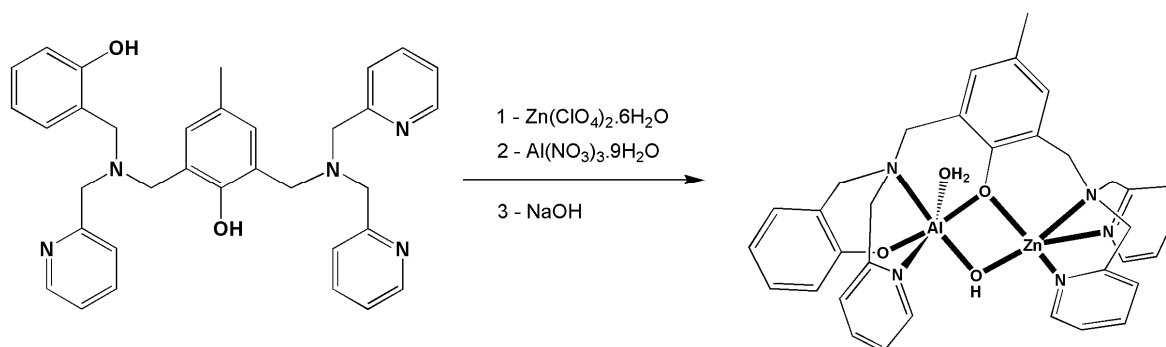


Figura 9 – Espectro de Infravermelho do ligante  $\text{H}_2\text{bbpmp}$ , em pastilha de KBr.

### 3.3 SÍNTESE DOS COMPLEXOS

#### 3.3.1 SÍNTESE DO COMPLEXO PERCLORATO DE $\mu$ - HIDRÓXIDO-2-[N-BIS(2-PIRIDILMETIL) AMINOMETIL]-4-METIL-6-[N'-(2-PIRIDILMETIL) (2-HIDRÓXIBENZIL) AMINOMETIL]FENOLATO] ALUMÍNIO(III) ZINCO(II) - **[AlZn( $\mu$ -OH)(H<sub>2</sub>O)(bpbmp)].(ClO<sub>4</sub>).H<sub>2</sub>O (1)**



O complexo foi preparado de maneira semelhante ao descrito por Neves e colaboradores.<sup>43</sup> Foi preparada uma solução metanólica contendo 0,545 g (1,0 mmol, 545,7 g mol<sup>-1</sup>) do ligante H<sub>2</sub>bpbmp. A esta solução foram adicionados 0,372 g de perclorato de zinco(II) hexahidratado (1,0 mmol, 372,3 g mol<sup>-1</sup>) previamente dissolvidos em 50 mL de metanol. Esta solução foi mantida sob agitação por 15 min. Então foi preparada uma solução metanólica de nitrato de alumínio(III) nonahidratado contendo 0,375 g (1,0 mmol, 375,1 g mol<sup>-1</sup>) dissolvidos em 200 mL de metanol. Esta solução foi adicionada lentamente por aproximadamente 20 h, sempre sob agitação. Ao término da adição manteve-se o sistema sob agitação e leve aquecimento por mais 30 minutos e nenhuma mudança foi observada neste intervalo de tempo. Finalmente foram adicionados 3 mL de uma solução 1 mol.L<sup>-1</sup> de hidróxido de sódio, a solução permaneceu sob agitação por mais 1 h. E novamente nenhuma mudança foi observada. Então a solução foi deixada evaporar a temperatura ambiente obtendo-se 0,450 g (55%) de um sólido branco microcristalino. Análise elementar de CHN calculada para [AlZnC<sub>35</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>Cl] C, 50,69; H, 5,04; N, 8,69%. Encontrada: C, 48,8; H, 5,55; N, 8,79%. A Figura 10 apresenta o espectro no IV para o complexo 1.

**IV (KBr), em cm<sup>-1</sup>:**  $\nu$  (OH) 3435;  $\nu$  (C-H<sub>ar</sub> e C-H<sub>alif</sub>) 3116-2924;  $\nu$  (C=N e C=C), 1612-1485;  $\nu$  (C-O) 1300;  $\nu$  (Cl-O) 1091;  $\delta$  (C-H<sub>ar</sub>) 769.

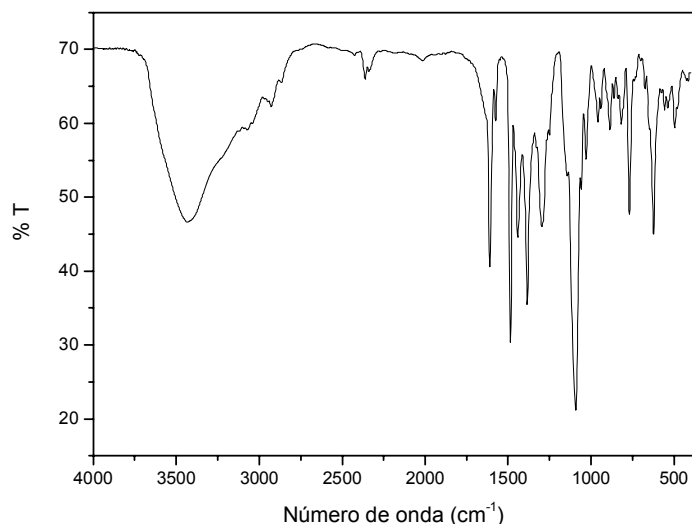
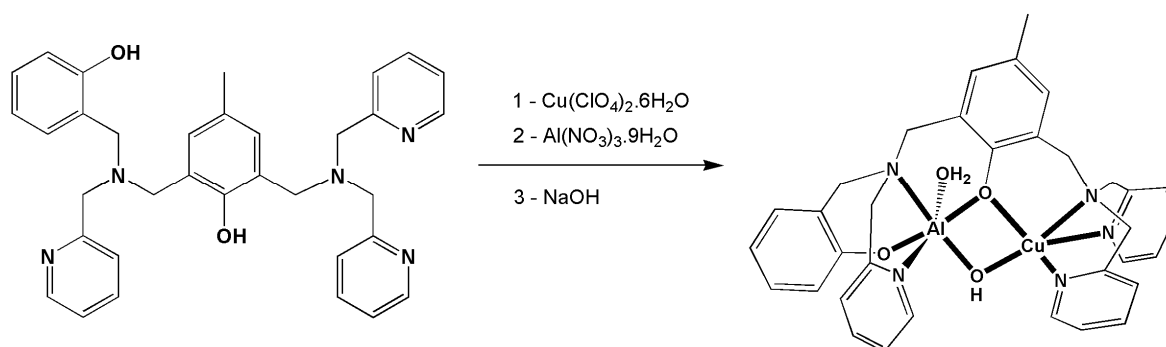


Figura 10 – Espectro no Infravermelho do complexo **1**, em pastilha de KBr.

3.3.2 SÍNTESE DO COMPLEXO PERCLORATO DE  $\mu$  - HIDRÓXIDO-2-[N-BIS (2-PIRIDILMETIL) AMINOMETIL]-4-METIL-6-[N'-(2-PIRIDILMETIL) (2-HIDRÓXI-BENZIL)AMINOMETIL] FENOLATO] ALUMÍNIO(III) COBRE(II) - [AlCu( $\mu$ -OH)(H<sub>2</sub>O)(bpbmp)].(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (**2**)



O complexo **2** foi preparado de maneira semelhante ao complexo **1**. Foi preparada uma solução metanólica contendo 0,545 g (1 mmol, 545,7 g mol<sup>-1</sup>) do ligante H<sub>2</sub>bpbmp. A esta solução foram adicionados 0,371 g de perclorato de cobre(II) hexahidratado (1,0 mmol, 370,5 g mol<sup>-1</sup>) previamente dissolvidos em 50 mL de metanol. Esta solução foi mantida sob agitação por 15 minutos. Então foi preparada uma solução metanólica de nitrato de alumínio(III) nonahidratado contendo 0,375 g (1,0 mmol, 375,1 g mol<sup>-1</sup>) dissolvidos em 200 mL de metanol.



Esta solução foi adicionada lentamente por aproximadamente 16 h, sob agitação. Após a adição foram adicionados 3 equivalentes de NaOH e um equivalente de NaClO<sub>4</sub> a reação permaneceu sob agitação e leve aquecimento por 8 h. Houve a formação de um precipitado verde. Este foi então filtrado e recristalizado em acetonitrila obtendo-se 0,40 g (43 %) de um sólido verde. Análise elementar de CHN calculada para [AlCu(C<sub>34</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>)](H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>: C, 44,33; H, 4,99; N, 7,60%. Encontrada: C, 45,37; H, 4,79; N, 8,05 %. A Figura 11 apresenta o espectro no IV para o complexo **2**.

**IV (KBr), em cm<sup>-1</sup>:**  $\nu$  (OH) 3431;  $\nu$  (C-Har e C-Halif) 3089-2922;  $\nu$  (C=N e C=C), 1608-1483;  $\nu$  (C-O) 1290;  $\nu$  (Cl-O) 1097;  $\delta$  (C-Har) 767.

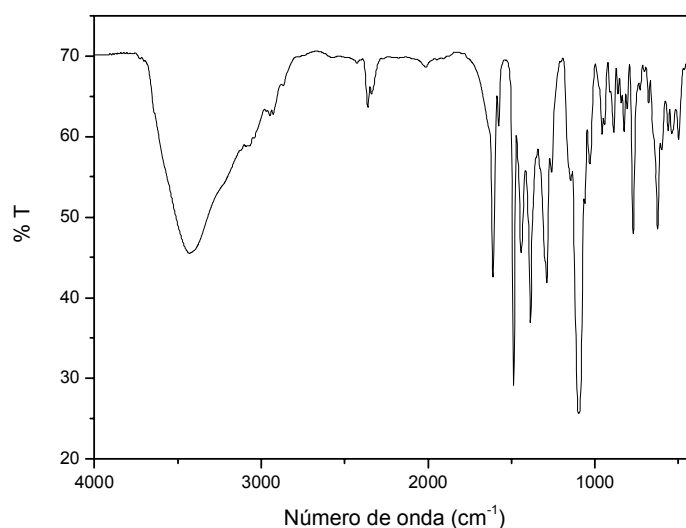


Figura 11 – Espectro no Infravermelho do complexo **2**, em pastilha de KBr.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentadas as discussões relativas à síntese e caracterização do ligante e seus respectivos complexos, bem como os estudos de reatividade dos mesmos frente a substratos modelos. A Figura 12 contém a representação da estrutura do ligante não simétrico binucleante e a Figura 13 contém a representação das estruturas dos complexos sintetizados e estudados no presente trabalho.

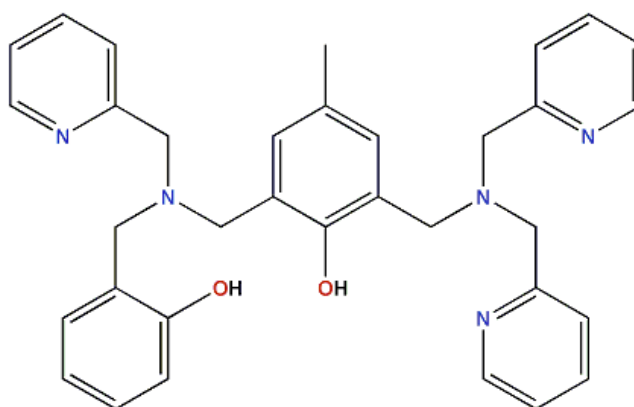


Figura 12 – Representação da estrutura do ligante não simétrico H<sub>2</sub>bbpmp.

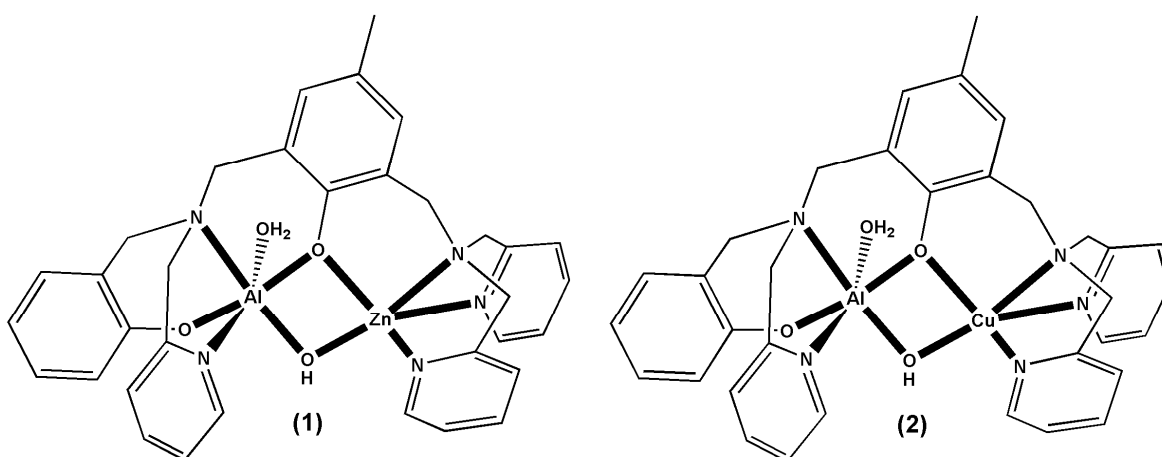


Figura 13 – Representação das estruturas dos cátions complexos 1 e 2.

## 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO LIGANTE

O ligante H<sub>2</sub>bpbmp foi obtido segundo método descrito na literatura<sup>39</sup> e caracterizado por espectroscopia no infravermelho e por ressonância magnética nuclear de Hidrogênio, mostrando um grau de pureza adequado para a síntese dos complexos **1** e **2**.

### 4.1.1 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO - IV

O espectro no infravermelho do ligante H<sub>2</sub>bpbmp está apresentado na Figura 9. As principais bandas observadas nos espectros são apresentadas na Tabela 3. Como observado nesta tabela, as bandas referentes às ligações C=C, C=N e C-H dos fenóis e piridinas, e C-O dos fenóis, estão em concordância com os obtidos na literatura para este ligante.<sup>39</sup>

Tabela 3 – Bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante H<sub>2</sub>bpbmp.

<b>Atribuição</b>	<b>(cm<sup>-1</sup>)</b>
$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{py, fenol}}$	1595
$\nu(\text{C}=\text{N})_{\text{py}}$	1485-1440
$\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{fenol}}$	1260
$\delta(\text{C}-\text{H})_{\text{py, fenol}}$	761

### 4.1.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO - RMN <sup>1</sup>H

Os deslocamentos químicos e a integração dos sinais observados nos espectros de RMN <sup>1</sup>H permitiram determinar o número de prótons presentes em cada ligante e distinguir entre os átomos de hidrogênio metílicos, metilênicos e aromáticos. A comparação dos espectros obtidos no presente trabalho e o obtido por Karsten e colaboradores<sup>39</sup>, permitem confirmar a obtenção dos intermediários e do ligante H<sub>2</sub>bpbmp com pureza adequada à síntese dos complexos.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

Os complexos **1** e **2** foram caracterizados por análise elementar de CHN, Espectroscopia no Infravermelho e Eletrônica, Ressonância Paramagnética Eletrônica, Condutivimetria, Eletroquímica e Titulação Potenciométrica. Ambos os complexos tiveram suas estruturas cristalinas determinadas por Difração de Raios X. Os resultados dessas análises são descritos e discutidos a seguir.

### 4.2.1 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica bastante utilizada na caracterização inicial dos complexos. A partir dos espectros dos complexos pôde-se comparar com o espectro obtido para o ligante livre e ficou evidente a similaridade e algumas diferenças entre ambos indicando a formação dos complexos. Outras bandas adicionais referentes ao contra-íon, moléculas de água coordenadas ou da ponte hidróxido também podem ser observadas. Os espectros de todos os complexos podem ser encontrados na parte experimental (seção 3.3).

A Figura 14 mostra uma sobreposição dos espectros do ligante e dos complexos **1** e **2** onde podem ser observadas as principais similaridades e diferenças entre esses compostos.

O ligante H<sub>2</sub>bbpmp apresenta uma banda intensa em 1595 cm<sup>-1</sup> devido ao estiramento das ligações C=C e C=N dos anéis aromáticos. Nos complexos essas bandas são observadas com intensidades relativas similares em 1600 e 1612 cm<sup>-1</sup>, além de uma banda de menor intensidade em 1576 cm<sup>-1</sup>.

A banda de em 1260 cm<sup>-1</sup> no presente ligante desloca-se para 1298 cm<sup>-1</sup> nos espectros dos complexos, devido ao estiramento da ligação C-O<sub>fenol</sub>, indicando a coordenação dos fenóis ao centro metálico.

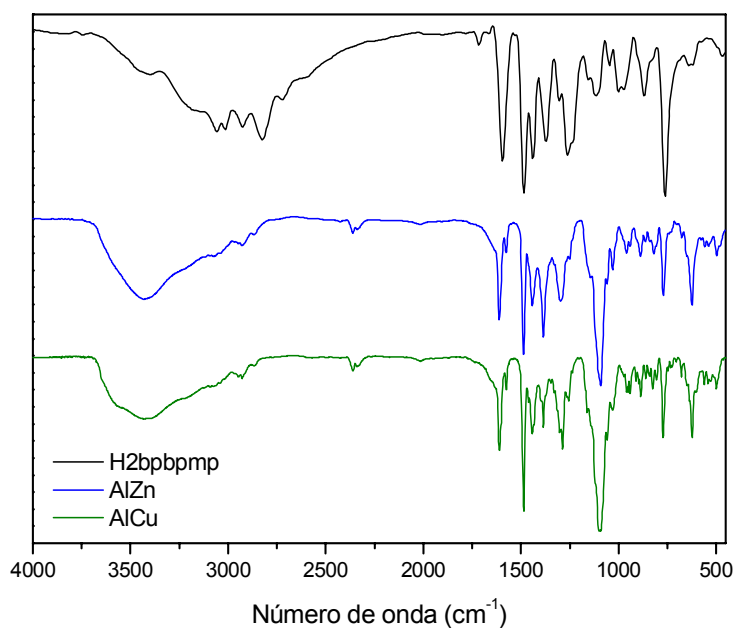


Figura 14 - Sobreposição dos espectros no infravermelho do ligante H2bpbmp e dos complexos **1** e **2**.

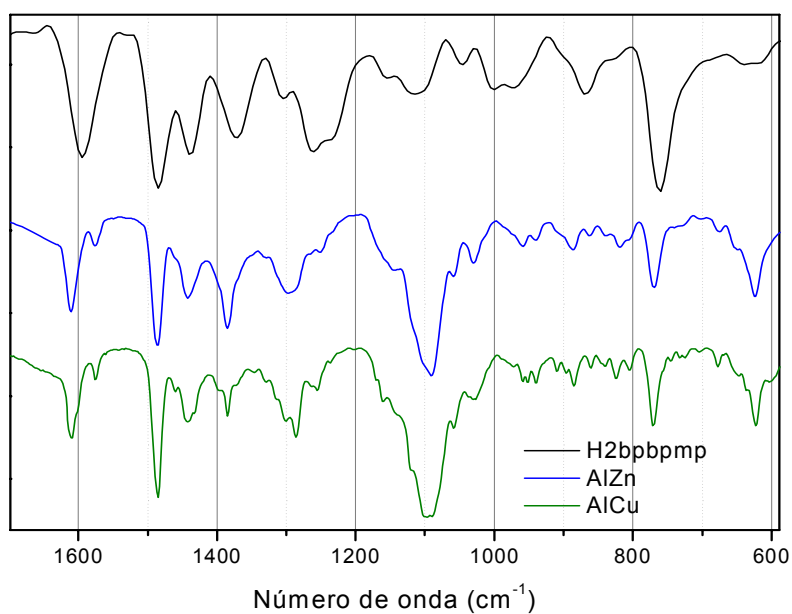


Figura 15 – Ampliação dos espectros no infravermelho para o ligante H2bpbmp e para os complexos **1** e **2** na região entre 600 e 1600 cm<sup>-1</sup>.

Em  $3429\text{ cm}^{-1}$  observa-se a presença de uma banda intensa e bastante alargada para os complexos **1** e **2** devido a presença de moléculas de água de cristalização presente em ambos os complexos. É importante observar que o espectro no infravermelho do complexo **1** é similar ao obtido para o análogo **2**, indicando tratar-se de arranjos estruturais idênticos, exceto pelo  $\text{Cu}^{\text{II}}$  substituindo o átomo de  $\text{Zn}^{\text{II}}$  como é visto na estrutura de raios X.

#### 4.2.2 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

De uma forma geral, os dois complexos apresentam estruturas heterobinucleares similares, onde cada íon metálico está alocado em um dos braços do ligante binucleante  $\text{H}_2\text{bpbpmp}$ . Nos dois complexos, o íon  $\text{Al}^{\text{III}}$  encontra-se na parte dura do ligante  $\text{H}_2\text{bpbpmp}$ , e está coordenado pelo braço tridentado contendo os nitrogênios amínico e piridínico e um átomo de oxigênio fenólico. Um oxigênio da ponte  $\mu$ -fenóxido do ligante, um oxigênio da ponte exógena  $\mu$ -OH e um ligante hidróxido terminal completam a esfera de coordenação octaédrica do  $\text{Al}^{\text{III}}$ . Por outro lado, os íons  $\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Cu}^{\text{II}}$  encontram-se na parte macia do ligante  $\text{H}_2\text{bpbpmp}$  e estão coordenados por um átomo de nitrogênio amínico e por dois átomos de nitrogênio piridínicos. Completando a esfera de coordenação dos centros metálicos estão um átomo de oxigênio da ponte  $\mu$ -fenóxido e um átomo de oxigênio de um grupo hidróxido ponte ( $\mu$ -hidróxido). Os dados cristalográficos das estruturas para os complexos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados Cristalográficos selecionados para os complexos 1 e 2.

	1	2
Massa molar (g.mol <sup>-1</sup> )	819,55	928,15
Temperatura (K)	293(2)	100(2)
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, $P2_1/c$	Monoclínico, $P2_1/c$
<i>a</i>	16.9494(6) Å	16,8220(5) Å
<i>b</i>	10.2074(4) Å	10,1540(3) Å
<i>c</i>	23.2821(9) Å	22,8207(5) Å
$\alpha$	90°	90°
$\beta$	97.849(3)°	97,432(2)°
$\gamma$	90°	90°
Volume Å <sup>3</sup>	3990.3(3)	3865,27(18)
Z, Densidade calculada g/cm <sup>3</sup>	4, 1,538	4, 1,585
Dimensões do cristal (mm)	0,27 x 0,21 x 0,05	0,32 x 0,23 x 0,04
Reflexões coletadas	31468	31662
Máx, e mín, de transmissão	0,9589 e 0,8036	0,9686 e 0,7818
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
GOOF	1,015	1,042
Índice R final [ $ I  > 2\sigma(I)$ ]	R1 = 0,0618, wR2 = 0,1570	R1 = 0,0548, wR2 = 0,1359
Índices R(todos os dados)	R1 = 0,1046, wR2 = 0,1823	R1 = 0,0815, wR2 = 0,1538
Densidade eletrônica residual Å <sup>-3</sup>	0,453 e -0,810	0,608 e -1,225

A estrutura cristalina do complexo 1 foi obtida a partir de monocristais “branco-amarelados” enquanto o complexo 2 apresentou-se sob a forma de monocristais “verde-claro”. Ambos os complexos são pertencentes ao sistema cristalino monoclínico com grupo espacial  $P2_1/c$ .

Para o complexo 1 os dados fornecidos pela resolução da estrutura revelam um arranjo não simétrico constituído de um cátion complexo  $[Al^{III}Zn^{II}(bpbmp)(\mu-OH)(OH_2)]^{+1}$ , dois ânions perclorato como contra-íon e três moléculas de água de cristalização. Uma representação visual do cátion complexo gerada pelo programa ORTEP<sup>50</sup> é apresentada na Figura 16 sendo que seus dados cristalográficos bem como principais comprimentos e ângulos de ligação são listados nas Tabela 4 e Tabela 5, respectivamente.

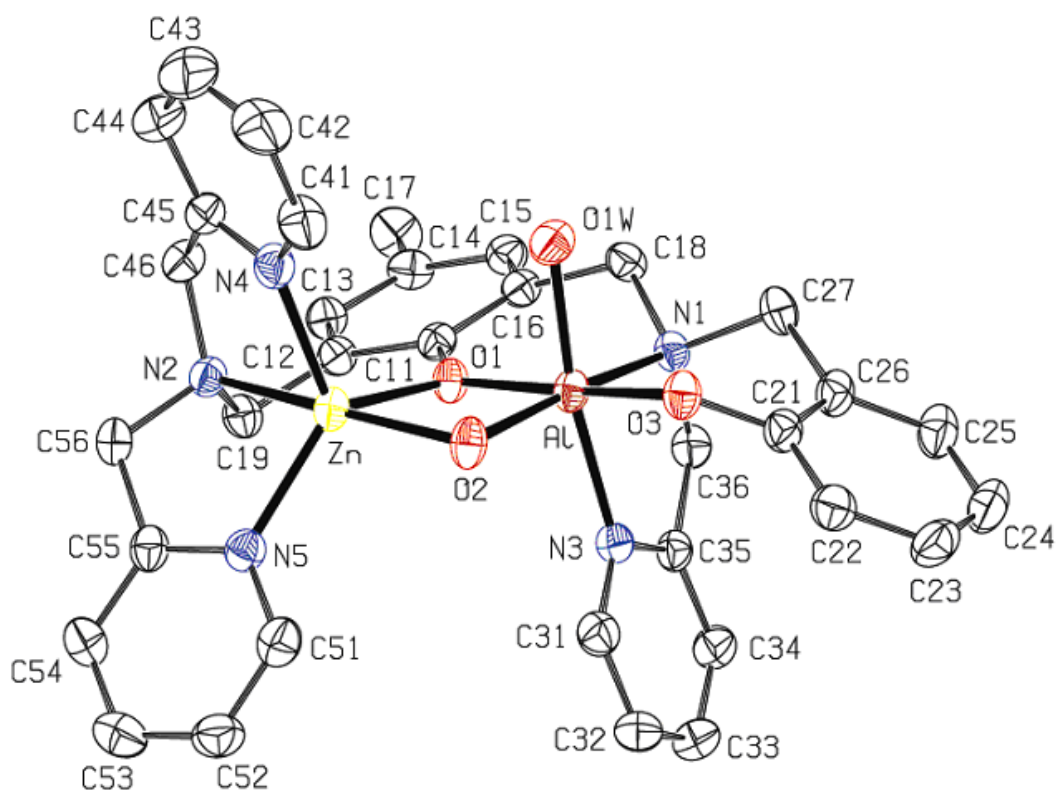


Figura 16 – Representação ORTEP do cátion complexo 1.

A coordenação do ligante H<sub>2</sub>bpbmp ao centro trivalente ocorre de maneira facial. Ao íon Al<sup>III</sup> estão coordenados os átomos de nitrogênio provenientes da amina terciária N1, e da piridina N3, e o átomo de oxigênio O3 proveniente do grupo fenolato terminal. A coordenação N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> é completada pelos átomos de oxigênio provenientes da ponte fenolato (O1), da ponte hidróxido exógena (O2), e ainda por uma molécula de água terminal (O1w). Neste arranjo, a ponte fenolato encontra-se *trans* ao fenolato terminal, a ponte hidróxido está *trans* ao nitrogênio da amina terciária, e ainda o íon hidróxido terminal está *trans* ao nitrogênio piridínico.

O centro de Zn<sup>II</sup> encontra-se pentacoordenado com uma geometria de bipirâmide trigonal distorcida, como determinado usando a equação de Addison<sup>†</sup> obtendo-se um valor de  $\tau$  igual a 0,66.<sup>51</sup> Nas posições axiais estão os átomos O2, da ponte hidróxido, e o nitrogênio N2, da amina terciária. No plano equatorial

<sup>†</sup> A equação de Addison estabelece um cálculo matemático que possibilita a identificação da geometria de coordenação de compostos pentacoordenados (onde  $\beta$  é o maior ângulo e  $\alpha$  o segundo maior ângulo).



estão coordenados os átomos de nitrogênio piridínico N4 e N5 além do átomo de oxigênio O1, da ponte fenolato.

No complexo **2** a estrutura cristalina apresentou um arranjo não simétrico constituído de um cátion complexo  $[Al^{III}Cu^{II}(bpbmp)(\mu-OH)(OH_2)]^{2+}$ , dois ânions perclorato como contra-íon e 3 moléculas de água de cristalização. Uma representação visual do cátion complexo gerada pelo programa ORTEP<sup>50</sup> é apresentada na Figura 17.

O centro metálico de  $Al^{III}$  encontra-se coordenado aos átomos de nitrogênio piridínico N31 e de nitrogênio N3 da amina terciária. Fazem parte ainda da esfera de coordenação o átomo de oxigênio O3 pertencente ao fenolato terminal do ligante e o oxigênio O1w do íon hidróxido exógeno.

O centro de  $Cu^{II}$  está pentacoordenado com uma geometria de bipirâmide trigonal distorcida, conforme calculado pela equação de Addison ( $\tau = 0,62$ ).<sup>51</sup> Nas posições axiais estão o oxigênio O2w, da ponte hidróxido, e o nitrogênio N4, da amina terciária. No plano equatorial estão coordenados os átomos de nitrogênio piridínico N51 e N61 e ainda o átomo de oxigênio O8, da ponte fenolato. As esferas de coordenação dos sítios metálicos são completadas por um íon hidróxido (ligante exógeno) coordenado sob forma de ponte entre os centros metálicos  $Al^{III}Cu^{II}$ .

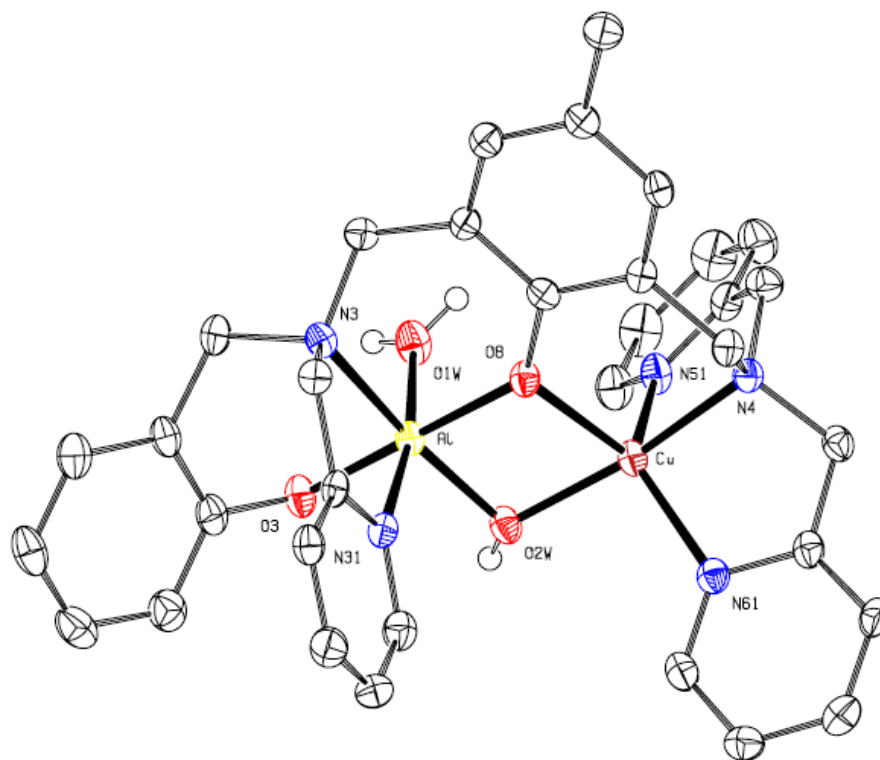


Figura 17 – Representação ORTEP do cátion complexo 2.

O átomo de oxigênio O2w do íon hidróxido ponte está coordenado ao sítio Cu1 de maneira *trans* ao nitrogênio amínico N4, enquanto o nitrogênio N61 do outro braço piridínico ligado ao centro de Cu<sup>II</sup> encontra-se coordenado de maneira *trans* ao oxigênio O8 da ponte  $\mu$ -fenóxido. Já no centro de Al<sup>III</sup> o átomo de oxigênio O2w provenientes da pontes  $\mu$ -hidróxido está coordenado de maneira similar, em posição oposta ao átomo de nitrogênio N3 da amina terciária. O oxigênio O3 do fenolato terminal está coordenado de maneira *trans* ao oxigênio O8 da ponte  $\mu$ -fenóxido.

Tabela 5 - Principais Distâncias (Å) e Ângulos de ligação (°) para os complexos **1** e **2**.

AlZn		AlCu	
Zn – Al	2,9888(12)	Cu – Al	2,9764(12)
Zn – O(2)	1,954(3)	Cu – O(2w)	1,924(3)
Zn – N(5)	2,058(4)	Cu – N(4)	2,006(3)
Zn – N(4)	2,054(4)	Cu – N(61)	2,025(3)
Zn – O(1)	2,097(3)	Cu – N(51)	2,044(3)
Zn – N(2)	2,145(3)	Cu – O(8)	2,111(2)
Al – O(2)	1,828(3)	Al – O(3)	1,832(3)
Al – O(3)	1,828(3)	Al – O(2W)	1,850(3)
Al – O(1)	1,912(3)	Al – O(1W)	1,893(5)
Al – O(1W)	1,904(3)	Al – O(4)	1,921(4)
Al – N(1)	2,089(4)	Al – N(3)	2,086(6)
Al – N(3)	2,054(4)	Al – N(31)	2,055(6)
O(2W)-Zn-N(61)	104,0(2)	O(2W)-Cu-N(4)	166,96(12)
O(2W)-Zn-N(51)	108,5(2)	O(2W)-Cu-N(61)	99,74(12)
N(61)-Zn-N(51)	120,8(2)	N(4)-Cu-N(61)	83,66(13)
O(2W)-Zn-O(4)	74,99(18)	O(2W)-Cu-N(51)	103,73(12)
N(61)-Zn-O(4)	124,9(2)	N(4)-Cu-N(51)	83,14(13)
N(51)-Zn-O(4)	110,8(2)	N(61)-Cu-N(51)	129,70(13)
O(2W)-Zn-N(4)	164,32(19)	O(2W)-Cu-O(8)	74,78(10)
N(61)-Zn-N(4)	81,4(2)	N(4)-Cu-O(8)	92,73(11)
N(51)-Zn-N(4)	80,2(2)	N(61)-Cu-O(8)	122,45(11)
O(4)-Zn-N(4)	89,80(18)	N(51)-Cu-O(8)	106,49(12)
O(2W)-Al-O(3)	96,4(2)	O(3)-Al-O(2W)	96,23(13)
O(2W)-Al-O(1W)	96,2(2)	O(2W)-Al-O(8)	82,29(12)
O(3)-Al-O(1W)	87,5(2)	O(3)-Al-O(1W)	87,88(13)
O(1W)-Al-O(4)	90,2(2)	O(2W)-Al-O(1W)	96,23(13)
O(2W)-Al-N(31)	92,8(2)	O(8)-Al-O(1W)	90,65(12)
O(3)-Al-N(31)	88,3(2)	O(3)-Al-N(31)	88,36(13)
O(1W)-Al-N(31)	170,4(2)	O(2W)-Al-N(31)	93,29(13)
O(4)-Al-N(31)	94,3(2)	O(8)-Al-N(31)	93,36(12)
O(2W)-Al-N(3)	167,6(2)	O(1W)-Al-N(31)	170,09(13)
O(3)-Al-N(3)	93,6(2)	O(3)-Al-N(3)	93,89(13)
O(1W)-Al-N(3)	91,4(2)	O(2W)-Al-N(3)	167,84(13)
O(4)-Al-N(3)	88,0(2)	O(8)-Al-N(3)	87,78(12)
N(31)-Al-N(3)	80,3(2)	O(1W)-Al-N(3)	90,86(13)
Al-O(2W)-Zn(1)	105,0(2)	N(31)-Al-N(3)	80,25(12)

O ambiente de coordenação do centro Zn<sup>II</sup> em **1** apresenta um arranjo N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> com comprimento médio de ligação (2,060 Å), enquanto o centro de Al<sup>III</sup> está inserido em um ambiente do tipo N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> com uma esfera média de coordenação de 1,927 Å. No complexo **2** os mesmos arranjos de átomos N,O-doadores são observados, onde a esfera de coordenação em torno do centro Cu<sup>II</sup> possui uma distância média de 2,022 Å, enquanto o centro de Al<sup>III</sup> possui um

comprimento médio de coordenação de 1,939 Å. Esses resultados estão de acordo com os respectivos raios iônicos de cada centro metálico.

As estruturas dos complexos **1** e **2**, são similares as estruturas obtidas para os complexos análogos de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  <sup>43</sup> e  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  <sup>44</sup> com o mesmo ligante  $\text{H}_2\text{bbpbmp}$ . Uma vez que já são conhecidos vários complexos heterobinucleares do tipo  $\text{M}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$  com este ligante, o arranjo estrutural obtido para os complexos **1** e **2**, em princípio, já era esperado. <sup>39,40,41,42,44</sup>

O complexo **1** é bastante similar ao análogo de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  (Tabela 6), sendo que as principais diferenças se encontram nas distâncias de ligação relacionadas ao íon trivalente. A distância entre os centros metálicos é de 2,988 Å no complexo **1** e de 3,040 Å no complexo de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ . Uma distância que também é alterada significativamente é a distância  $\text{M}^{\text{III}}-\text{O}_{(\text{fenolato terminal})}$  que no complexo **1**, é de 1,828 Å e no complexo de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  esta distância é de 1,923 Å. No lado do metal divalente as alterações não são significativas, o que era esperado já que o íon  $\text{Zn}^{\text{II}}$  possui a mesma geometria nos dois complexos.

Tabela 6 – Comparação entre as distâncias de ligação nas esferas de coordenação entre os complexos **1** e **2** e seus análogos  $\text{FeZn}$  <sup>43</sup> e  $\text{FeCu}$  <sup>66</sup>.

Ligação	AlZn	AlCu	FeZn	FeCu
$\text{M}^{\text{III}}-\text{M}^{\text{II}}$	2,988	2,976	3,040	3,040
$\text{M}^{\text{III}}-\text{O}_{\text{Fenolato terminal}}$	1,828	1,832	1,923	1,920
$\text{M}^{\text{III}}-\text{O}_{\text{Fenolato ponte}}$	1,912	1,880	2,026	2,003
$\text{M}^{\text{III}}-\text{O}_{\text{Ponte Hidróxido}}$	1,828	1,850	1,937	1,942
$\text{M}^{\text{III}}-\text{O}_{\text{Água Terminal}}$	1,904	1,891	2,055	2,035
$\text{M}^{\text{III}}-\text{N}_{\text{Piridina}}$	2,054	2,054	2,133	2,168
$\text{M}^{\text{III}}-\text{N}_{\text{Amina}}$	2,089	2,101	2,176	2,188
$\text{M}^{\text{II}}-\text{O}_{\text{Fenolato Ponte}}$	2,097	2,111	2,059	2,087
$\text{M}^{\text{II}}-\text{O}_{\text{Ponte Hidróxido}}$	1,954	1,924	1,966	1,914
$\text{M}^{\text{II}}-\text{N}_{\text{Amina}}$	2,145	2,006	2,140	1,999
$\text{M}^{\text{II}}-\text{N}_{\text{Piridina trans a ponte}}$	2,058	2,025	2,065	2,022
$\text{M}^{\text{II}}-\text{N}_{\text{Piridina}}$	2,051	2,044	2,048	2,079

Para o complexo **2** a estrutura também é semelhante ao análogo de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ . A distância entre os centros no complexo **2** é de 2,9764 Å, já esta distância no composto  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  é de 3,040 Å, que também é encontrada no composto de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ . Assim como no complexo **1** as distâncias de ligação

referentes ao metal trivalente também sofreram significativas mudanças. A ligação  $M^{III}-O_{(fenolato\ terminal)}$  no complexo **2** é de 1,832 Å, enquanto no composto de  $Fe^{III}Cu^{II}$  esta distância é de 1,920 Å.

Uma mudança estrutural importante entre os complexos de  $Al^{III}Cu^{II}$  e  $Fe^{III}Cu^{II}$  reside no grau de distorção da geometria nestes dois compostos. O complexo de  $Al^{III}Cu^{II}$  o íon  $Cu^{II}$  possui uma geometria de bipirâmide trigonal ( $\tau = 0,62$ ), e o complexo de  $Fe^{III}Cu^{II}$  possui a mesma geometria, porém com valor de  $\tau$  tendendo mais para a geometria de bipirâmide trigonal ( $\tau = 0,72$ ). Esta mudança se deve provavelmente ao raio iônico do íon  $Al^{III}$  (0,535 Å) <sup>52</sup> que é menor que o raio iônico do íon  $Fe^{III}$  (0,645 Å), fazendo com que o átomo do oxigênio da ponte  $\mu$ -fenóxido fique mais próximo do íon  $Al^{III}$  aumentando então o grau de distorção no centro de  $Cu^{II}$ . Logo todas as distâncias encontradas no metal trivalente nos compostos **1** e **2** devem ser menores se comparadas aos análogos de  $Fe^{III}Zn^{II}$  e  $Fe^{III}Cu^{II}$ .

#### 4.2.3 CONDUTIVIDADE

As medidas de condutividade molar para os complexos **1** e **2** foram efetuadas em soluções recém preparadas em acetonitrila com concentrações  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  a 25 °C. Os resultados de condutividade molar ( $\Lambda_M$ ) e as atribuições dos tipos de eletrólitos para os complexos **1** e **2** são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados da condutimetria para os complexos **1** e **2**.

Complexo	$\Lambda_M$ ( $\Omega \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ )	Tipo de Eletrólito
<b>1</b>	213	2:1
<b>2</b>	222	2:1

Segundo Geary, <sup>47</sup> valores de condutividade molar na faixa de 120-160  $\Omega \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$  são típicos de soluções de eletrólito 1:1 em acetonitrila a 25 °C e valores de condutividade entre 220-260  $\Omega \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$  são encontrados em

eletrólitos divalentes em concentração  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ . Portanto pode-se afirmar que os compostos **1** e **2** apresentam cátion de carga +2, o que está de acordo com os resultados obtidos por difratometria de Raios x.

#### 4.2.4 ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA

O complexo **1** não apresenta transições eletrônicas do tipo d-d na faixa do espectro visível uma vez que os íons  $\text{Al}^{\text{III}}$  e  $\text{Zn}^{\text{II}}$  possuem configurações  $d^0$  e  $d^{10}$  respectivamente, portanto apenas o complexo  $\text{AlCu}$  teve suas propriedades espectroscópicas estudadas.

Complexos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  possuem propriedades eletrônicas fortemente dependentes de sua estrutura. Uma vez que em complexos formados por íons  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , o metal apresenta um sistema eletrônico sistema  $d^9$ , os mesmos podem sofrer distorções significativas em sua geometria visando a diminuição da energia do sistema.<sup>1,54</sup> Complexos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  em um ambiente octaédrico normalmente apresentam esterequímicas altamente distorcidas, sendo a mais comum o alongamento tetragonal do eixo z, conhecida como efeito *Jahn-Teller*.<sup>1</sup>

Nesses casos, os espectros eletrônicos podem apresentar até três transições, as quais podem estar encobertas em uma banda única e alargada na região entre 600 e 700 nm.<sup>55</sup>

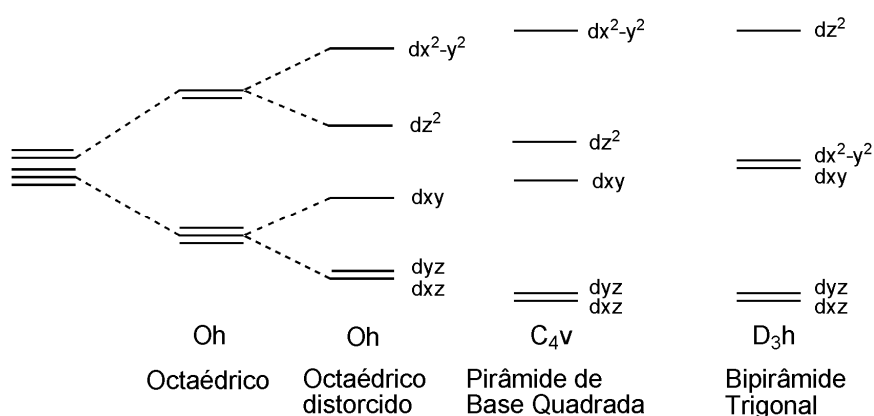


Figura 18 - Diagrama de desdobramento dos níveis de energia dos orbitais d em diferentes simetrias.

Em complexos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  pentacoordenados normalmente são encontrados em dois tipos de geometrias para o íon  $\text{Cu}^{\text{II}}$ : A piramidal de base quadrada e bipirâmide trigonal. Os espectros eletrônicos de complexos de cobre com geometrias **piramidais de base quadrada** apresentam tipicamente uma banda de absorção e um ombro em regiões de maior energia. Já os espectros de complexos **bipirâmides trigonais** apresentam geralmente duas bandas, um menos intensa e uma outra mais intensa em regiões de maior energia em relação a anterior.<sup>54</sup> Logo, o espectro eletrônico para complexos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  podem trazer informações significativas a respeito da geometria adotada pelo íon metálico.

Os espectros de absorção do complexo **2** foram avaliados na região entre 300 e 980 nm, utilizando-se acetonitrila e água como solventes e são apresentados na Figura 19. Em solução de acetonitrila foram observadas três bandas: uma em 394 nm ( $\epsilon = 302 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), atribuída a uma transferência de carga (TCLM) do tipo  $\text{O}_{\text{fenolato ponte}}-\text{Cu}^{\text{II}}$ , além de duas bandas alargadas em 690 (ombro) e 820 nm ( $\epsilon = 313 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) que foram atribuídas como transições d-d do íon  $\text{Cu}^{\text{II}}$ .

Foram realizados ainda experimentos com a adição de 2 equivalentes de NaOH e também de  $\text{HClO}_4$  à solução do complexo (Figura 19). Com a adição de base a solução adquire rapidamente uma coloração marrom e o espectro observado para esta espécie apresenta uma banda em 441 nm ( $\epsilon \cong 995 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) e as duas bandas antes existentes na região entre 650 e 850 nm se sobrepõem formando apenas uma banda alargada com  $\lambda_{\text{máx}}$  em 804 nm. Esta banda em 441 nm pode ser atribuída a uma transferência de carga do tipo  $\text{O}_{\text{hidróxido}} \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}$  (TCLM) pela coordenação de um íon hidróxido ao centro de  $\text{Cu}^{\text{II}}$ .

Quando foram adicionados 2 equivalentes de  $\text{HClO}_4$  e a solução tornou-se azul imediatamente. O espectro eletrônico obtido apresentou apenas uma banda em 652 nm ( $\epsilon \cong 139 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Nenhuma atribuição pode ser feita a esta espécie, o mais provável é que com a adição do ácido o complexo se decomponha e a absorção observada se deva ao íon  $\text{Cu}^{\text{II}}$  livre.

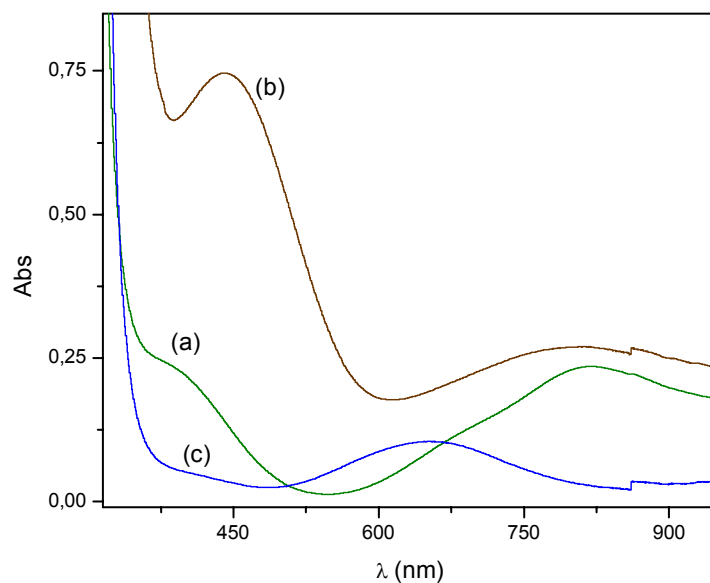


Figura 19 – Espectro Eletrônico do complexo **2** em acetonitrila: (a) Complexo **2**; (b) Após adição 2 equivalentes de NaOH; (c) Após adição 2 equivalentes de HClO<sub>4</sub> – Concentração [2] =  $7,5 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>.

Sabendo que complexos de Cu<sup>II</sup> possuem um espectro eletrônico fortemente dependente de sua estrutura foram medidos espectros Uv-vis do composto **2** em vários solvente e no estado sólido também.<sup>54</sup> Não foram observadas grandes mudanças no espectro eletrônico com a variação do solvente ou no estado sólido. Isto indica que o complexo deve manter sua estrutura em solução, porém a maior mudança observada ocorre quando foi adicionado água ao sistema, como demonstrado no espectro (e) Figura 20, a banda em 820 nm sofre um alargamento indicando uma interação de uma molécula de água ao centro metálico.



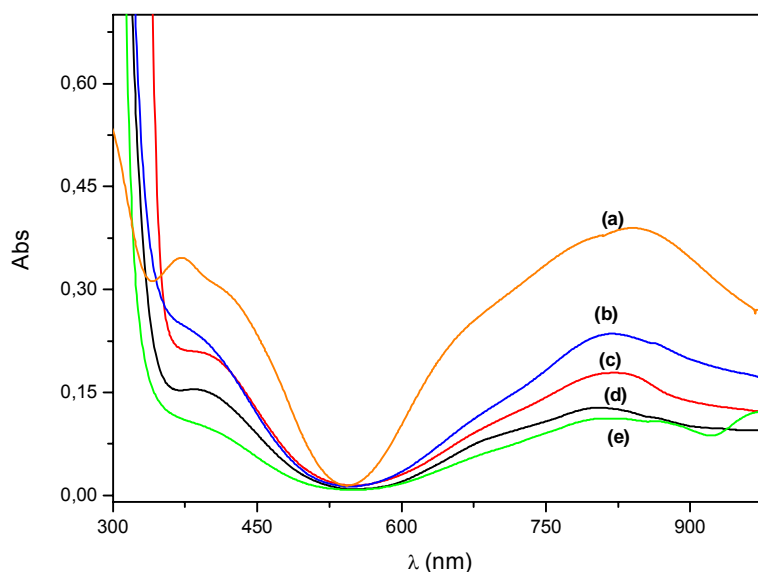


Figura 20 - Espectro Eletrônico do complexo 2: (a) Sólido; (b) Acetonitrila; (c) Acetona; (d) Metanol; (e) Metanol/água – Concentração [2] =  $7,5 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>.

#### 4.2.5 ELETROQUÍMICA

O comportamento redox do complexo **2** foi avaliado através de voltametria cíclica em solução etanol/água (70/30). Os potenciais redox foram referenciados ao eletrodo normal de hidrogênio (ENH) através do padrão interno hexacianoferrato de sódio ( $E_{1/2} = 360$  mV vs ENH).<sup>52</sup> A Tabela 8 (abaixo) apresenta um resumo dos potenciais obtidos para os processos redox no complexo **2**.

Tabela 8 - Valores de Potencial de meia onda ( $E_{1/2}$ ) em várias velocidades de varredura para o complexo 2.

Velocidade de varredura (mV.s <sup>-1</sup> )	$E_{1/2}$ (mV) vs. ENH Par Redox Cu <sup>II</sup> /Cu <sup>I</sup>	$\Delta E$ (mV)
250	-293,3	98
500	-297,3	147
750	-302,5	170
1000	-313,3	184

Reações de transferência de elétrons envolvem uma reorganização interna do metal. Estas modificações se devem a mudanças internas nos comprimentos e ângulos de ligação, bem como na configuração dos orbitais e na densidade eletrônica em torno do centro metálico e ainda na reorganização esfera externa, onde se encontram as moléculas de solvente devido a alterações de dipolo das espécies redox.<sup>57</sup>

Complexos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (sistema  $d^9$ ) tendem a adotar uma configuração de hexacoordenação (geometria octaédrica distorcida) ou pentacoordenação (geometrias piramidal quadrada ou bipirâmide trigonal). Entretanto sistemas de  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , que é um sistema  $d^{10}$ , tendem a adotar geometrias do tipo tetraédricas.<sup>57</sup> A Figura 21 ilustra a transferência de elétrons em um sistema  $\text{Cu}(\text{II/I})$  onde é notável a perda de dois ligantes e a torção sofrida pelas ligações restantes. Este fenômeno explica porque uma grande parte das reações redox envolvendo complexos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  não possuem processos reversíveis.

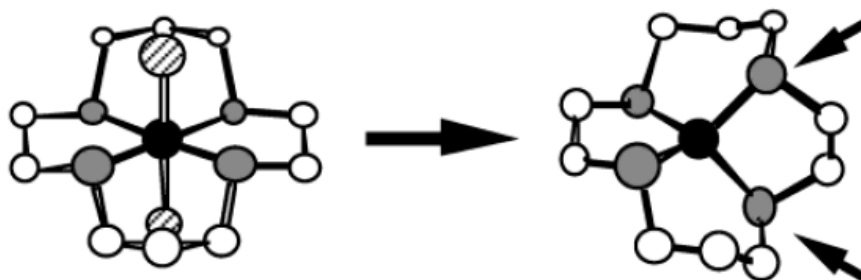


Figura 21 - Mudança na configuração estrutural que ocorrem em reações de transferência de elétron em sistemas do tipo  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ .

O voltamograma cíclico do complexo **2** mostra apenas uma onda *quasi*-reversível em  $E_{1/2} \approx -300$  mV vs. ENH (para  $250 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ), correspondendo ao processo redox  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ . A fim de estudar o comportamento da transferência do elétron neste complexo foi então realizado um experimento variando a velocidade de varredura na voltametria cíclica. Foi observado um deslocamento anódico do pico de redução, de  $-293,1$  à  $-313,3$  mV, (Figura 22) indicando uma maior dificuldade no processo de redução do  $\text{Cu}^{\text{II}}$  a  $\text{Cu}^{\text{I}}$ .

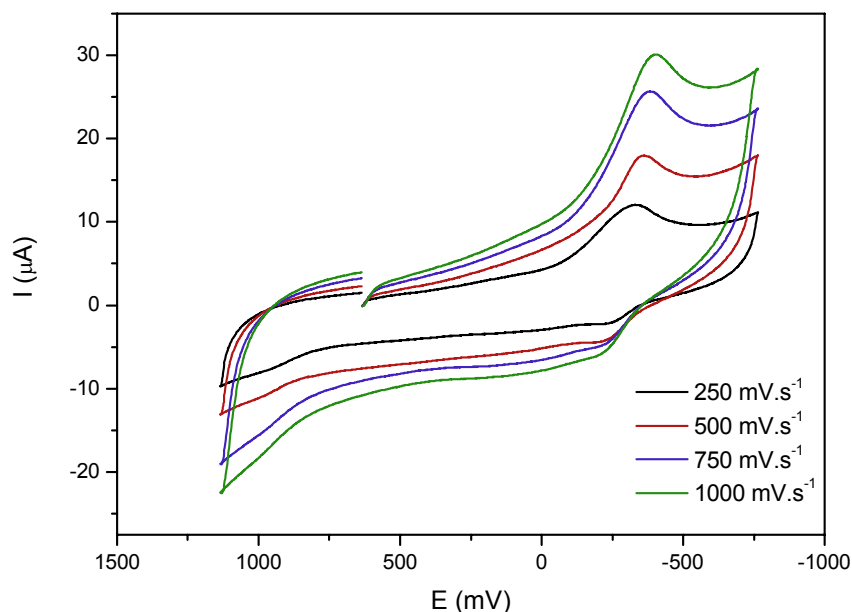


Figura 22 – Voltamograma cíclico do complexo AlCu no sistema etanol/água (70/30 % v/v) – Eletrodo de trabalho: Carbono – Eletrodo Referência: Ag/Ag<sup>+</sup> – Eletrodo Auxiliar: Platina – Varredura: 250, 500, 750, 1000 mV.s<sup>-1</sup>. O par redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/</sup> [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4+</sup> foi usado como padrão interno.

A reação de transferência de elétron neste complexo se mostrou dependente da velocidade de varredura. Como pode ser observado na Tabela 8 o aumento da velocidade aumenta o caráter irreversível da onda de oxidação já que o valor de  $\Delta E_p$  aumenta. Este comportamento observado era esperado, visto que o complexo **2** possui uma estrutura rígida. Isto deve dificultar a mudança estrutural durante a redução de centro de Cu<sup>II</sup> à Cu<sup>I</sup> resultando em um processo *quasi-reversível*.<sup>57,58</sup>

#### 4.2.6 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA - RPE

A espectroscopia de RPE aplicada a compostos de Cu<sup>II</sup> podem fornecer informações referentes ao estado de oxidação, natureza dos ligante e ainda da geometria do composto. O cobre (<sup>63</sup>Cu ou <sup>65</sup>Cu) tem um valor de spin nuclear (I) igual a 3/2, o que dá origem ao desdobramento hiperfino, entre o elétron desemparelhado e o próprio núcleo. Esta interação irá resultar em 2I + 1 linhas, de aproximadamente iguais intensidades e espaçamento. Assim, um espectro de

RPE para complexos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  apresenta quatro linhas largas. Em alguns casos os elétrons d do íon metálico podem estar deslocalizados sobre os ligantes, deste modo se os átomos dos ligantes possuírem spin nuclear diferente de zero, então pode-se esperar por padrões de desdobramento super-hiperfino sobrepostos a estas linhas.

O fator g (constante de Landé) caracteriza o ambiente no qual o centro paramagnético está inserido. Um mesmo centro paramagnético pode apresentar diferentes valores de g, dependendo dos ligantes envolvidos com este centro e da simetria do complexo. O fator g é a “impressão digital” do centro paramagnético e de seu ambiente químico. Ele independe da banda de frequência de microondas na qual é realizado o experimento.

O espectro de RPE é obtido mantendo-se a frequência na região de microondas fixa, e varia-se a força do campo magnético aplicado. Os espectros são usualmente apresentados como primeira derivada, já que as curvas de absorção dos picos de RPE são muito largas.

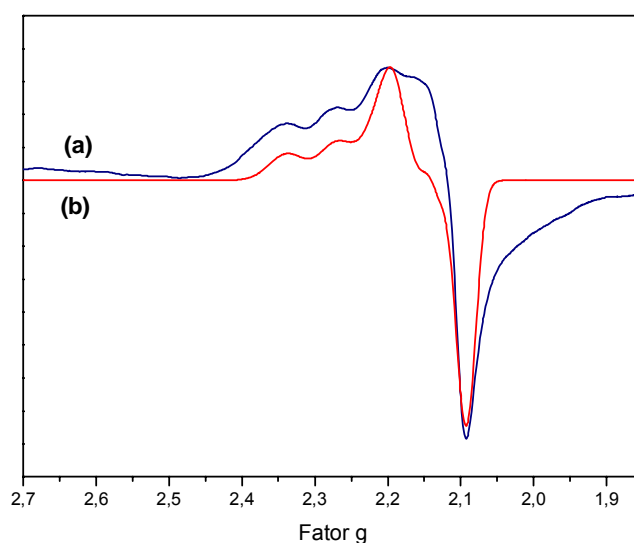


Figura 23 – Espectro de RPE na Banda X em solução de acetona para o complexo **2**: (a) Experimental; (b) Simulado.

O espectro de RPE para o complexo **2** em solução de acetona (Figura 23), apresentou quatro linhas características de  $\text{Cu}^{2+}$  ( $I = 3/2$ ), resultante da interação hiperfina entre o spin eletrônico e o spin nuclear do centro metálico. É observado

então um espectro rômboico, com  $g_x \neq g_y \neq g_z$  e  $A_x \neq A_y \neq A_z$  onde a partir do espectro simulado obtiveram-se os valores  $g_x = 2,1240$ ,  $g_y = 2,1465$ ,  $g_z = 2,2400$ . Os valores de largura de linha são  $A_x = 35,00$ ,  $A_y = 37,00$  e  $A_z = 93,00 \times 10^{-4}$  G.

Conforme reportado por Bencini e colaboradores<sup>59</sup>, para complexos de  $\text{Cu}^{\text{II}}$  pentacoordenados e com geometrias altamente distorcidas, são caracterizados por espectros rômboicos e com todos valores de A mensuráveis. Logo o espectro de EPR está em concordância com a estrutura cristalina do complexo **2**, conforme observado pelo valor de  $\tau$  calculado de 0,62.

#### 4.2.7 TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

Uma vez que os complexos **1** e **2** não são solúveis em meio aquoso os estudos de titulação potenciométrica foram realizados em solução de etanol/água (70/30 v/v). Estes experimentos foram realizados para avaliar a presença de moléculas de água coordenadas aos centros metálicos, quando os complexos se encontram em solução. Esta proposta é bem coerente, uma vez que na estrutura obtida via difratometria de Raios X dos complexos já se encontram coordenados no centro de  $\text{Al}^{\text{III}}$  um íon hidróxido.

Devido a problemas experimentais durante a titulação do composto **1** não foi possível obter os valores de  $\text{pK}_a$  para o mesmo, uma vez que durante a titulação o complexo precipitou impedindo o final da titulação.

O resultado obtido para o composto **2** mostrou a neutralização de 3 mols de KOH por mol de complexo na região de pH entre 3,50 e 9,50. O tratamento destes dados levou à obtenção de três constantes de desprotonação, cujos valores são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores de  $\text{pK}_a$  correspondentes à desprotonação de moléculas de água coordenadas aos complexos

Complexo	$\text{pK}_a$ 1	$\text{pK}_a$ 2	$\text{pK}_a$ 3	Referência
<b>2</b>	2,71	4,31	8,01	-
FeZn-OH	3,01	4,66	8,25	40
GaCu-OH	3,18	5,01	7,58	<b>71</b>

A primeira constante, ou  $pK_a$ , pode ser atribuído à formação de uma espécie contendo uma ponte do tipo hidróxido entre os centros metálicos. A segunda constante é atribuída a uma desprotonação de uma molécula de água coordenada ao centro de  $Al^{III}$ . A terceira constante é atribuída à desprotonação de uma molécula de água coordenada ao centro de  $Cu^{II}$ . Uma proposta para os equilíbrios observados em solução pode ser vista na Figura 24 e os gráficos de distribuição das espécies podem ser vistos na Figura 25.

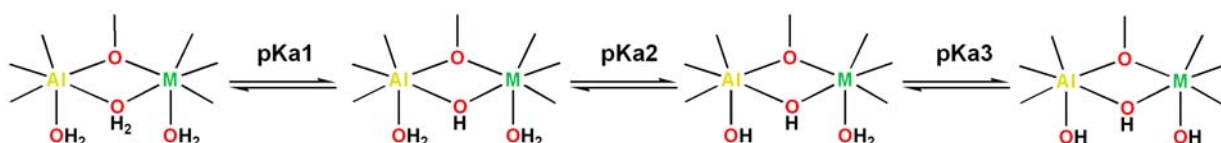


Figura 24 - Proposta para os equilíbrios observados para o complexo **2** em solução.

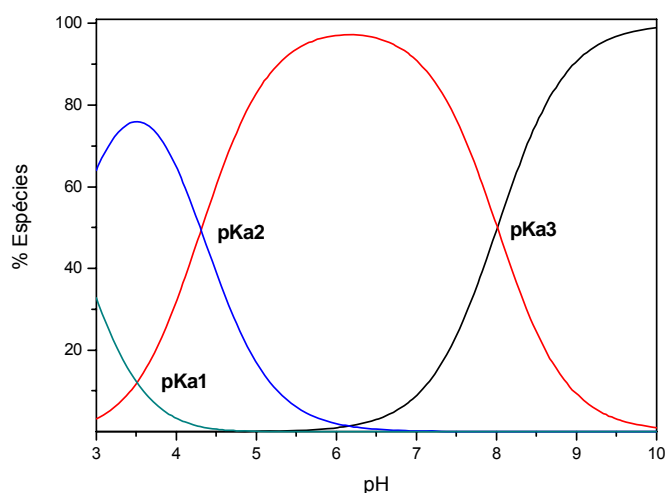


Figura 25 – Gráfico de distribuição de espécies em função do pH para o complexo **2**.

Os valores de  $pK_a1$  e  $pK_a2$  do composto **2** são menores se comparados ao composto  $Fe^{III}Zn^{II}$ . Este resultado já era esperado, já que o íon  $Al^{III}$  possui um caráter ácido mais forte em relação ao íon  $Fe^{III}$ . O mesmo pode ser dito em relação ao composto de  $Ga^{III}Cu^{II}$  que possui valores de  $pK_a1$  e  $pK_a2$  mais elevados. Isto indica que o efeito predominante sobre estes valores de  $pK_a$  realmente é acidez de Lewis do metal trivalente.

O valor de  $pK_a3$  encontrado para o composto **2** também pode ser relacionado com as propriedades ácido-base dos íons  $Cu^{II}$  e  $Zn^{II}$ , já que o íon cobre é levemente mais ácido que o íon zinco. Desta forma como era esperado, o valor encontrado para o  $pK_a3$  no composto de  $Fe^{III}Zn^{II}$  é um pouco maior se comparado ao composto de  $Al^{III}Cu^{II}$ . É importante citar que esta comparação só pode ser feita pois, nestes compostos, não existe nenhum tipo de acoplamento entre os centros metálicos. Não foram feitas comparações com o complexo  $Fe^{III}Cu^{II}$  <sup>44</sup> já que as atribuições para as suas constantes de desprotonação são diferentes das apresentadas para os complexos  $Fe^{III}Zn^{II}$  e  $Al^{III}Cu^{II}$  devido ao fato de ser proposto que o mesmo permaneça pentacoordenado em solução. <sup>44</sup>

### 4.3 REATIVIDADE

A atividade catalítica dos complexos **1** e **2** na hidrólise de ésteres de fosfato ativado foi avaliada na reação de hidrólise do substrato bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-bdnpp), sob condições de excesso de substrato a  $25^\circ C$ , conforme ilustrado na Figura 26. Para obtenção dos parâmetros cinéticos utilizou-se o método das velocidades iniciais, <sup>62</sup> onde as reações foram monitoradas por método espectrofotométrico durante 3 a 5 % da conversão de substrato modelo a produto através do incremento da absorvância em 400 nm <sup>41,63</sup> devido à liberação de 2,4-dinitrofenolato como produto.

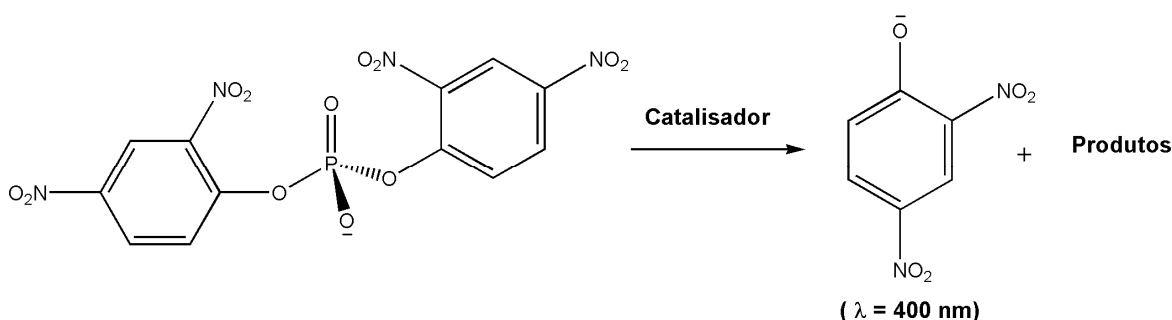


Figura 26. Reação de hidrólise do substrato modelo (2,4-bdnpp) catalisada pelos complexos **1** e **2** levando à formação do cromóforo 2,4-dinitrofenolato e outros produtos de reação.

Considerando os modelos mecanísticos propostos na literatura para reações de hidrólise<sup>33,62</sup> existem alguns pré-requisitos estabelecidos para que complexos metálicos sejam considerados hidrolases sintéticas. Estes compostos modelos devem ser capazes de fornecer um sítio lábil para coordenar o substrato de forma adequada além de possuírem grupo nucleofílico em um sítio adjacente para promover o ataque intramolecular em um pH próximo da neutralidade e dessa forma liberar os produtos a uma velocidade razoável.

#### 4.3.1 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO PH NA HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP

Foram realizados estudos do efeito do pH sobre a atividade catalítica dos complexos na reação de hidrólise, visando à determinação do pH de atividade máxima na hidrólise do 2,4-bdnpp, promovida pelos complexos **1** e **2**. A concentração hidrogeniônica demonstrou ter uma forte influência na atividade dos complexos frente a hidrólise do 2,4-bdnpp.

O perfil dos gráficos das velocidades iniciais ( $V_0$ ) *versus* o pH para o complexo **1** apresenta um formato de sino irregular. Já o complexo **2** tem formato de sino alargado, conforme apresentado na Figura 27. Os valores dos  $pK_a$  cinéticos são determinados na inflexão das curvas para cada metade do sino, através do ajuste sigmoidal dos dados. Os valores encontrados estão sumarizados na Tabela 10.



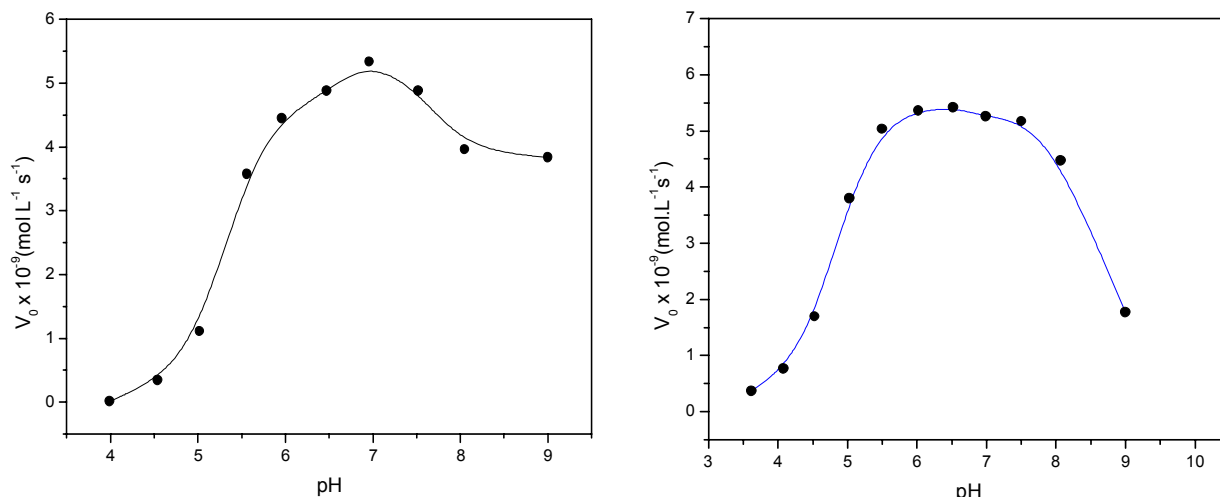


Figura 27 - Dependência de  $V_0$  vs pH para as reações de hidrólise do 2,4-bdnpp catalisadas pelos complexos **1** e **2** a  $25^\circ\text{C}$  sob as seguintes condições: solução  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  1:1;  $[\text{complexo}] = 5,2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ;  $[\text{2,4-bdnpp}] = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ;  $[\text{tampões}] = 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  (MES, HEPES, CHES);  $I = 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  ( $\text{LiClO}_4$ ).

Os perfis de *pseudo-sino* obtido através do estudo da variação do pH contribuem reforçando a atribuição das desprotonações de duas moléculas de água, sendo uma coordenada ao centro de  $\text{Al}^{\text{III}}$  e outra ao centro de  $\text{Zn}^{\text{II}}$  ou  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . Assim, fica evidenciado que a desprotonação da molécula de água coordenada ao centro de  $\text{Al}^{\text{III}}$  em ambos os complexos deva ocorrer para gerar a espécie cataliticamente ativa,  $\{(\text{HO})\text{Al}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH}_2)\}$ .

Tabela 10 - Valores de  $pK_a$  cinéticos e  $pK_a$  potenciométricos para os complexos **1** e **2**.

Complexos	pH Ótimo	Cinéticos		Potenciométricos	
		$pK_1$	$pK_2$	$pK_1$	$pK_2$
<b>1</b>	7,0	5,14	-	-	-
<b>2</b>	6,5	4,82	8,23	4,31	8,01
$\text{FeZn-OH}^{43}$	6,5	5,10	8,10	4,81	8,30
$\text{GaCu-OH}^{71}$	7,0	5,00	7,80	5,01	7,58

Os valores de  $pK_a$  obtidos via medidas potenciométricas, para o complexo **2**, e os  $pK_a$  cinéticos estão em concordância, ainda que tenham sido obtidos em meios diferentes. Esta concordância dos valores de  $pK_a$  vêm sendo observada em compostos heterobinucleares com o ligante  $H_2bpbpmp$  e outros ligantes semelhantes já descritos por Neves e colaboradores.<sup>38,40,63,42</sup>

#### 4.3.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP.

A avaliação da dependência da concentração do substrato, sobre a velocidade da reação de hidrólise do mesmo, promovida pelos complexos **1** e **2** foi investigada em pH 7 e pH 6,5 respectivamente, uma vez que estes valores determinados como pH ótimo de atividade, descritos na seção anterior. Nesses experimentos pôde-se observar que há uma dependência linear da velocidade a baixas concentrações de substrato (dependência de 1ª ordem), porém, com o aumento da concentração de 2,4-bdnpp ocorre um desvio da linearidade tendendo a uma curva de saturação (ordem zero). Esta dependência das velocidades iniciais em função da concentração do substrato sugere que a reação de hidrólise ocorre com a formação de um intermediário complexo-substrato, conforme o modelo de Michaelis-Menten.<sup>62</sup>

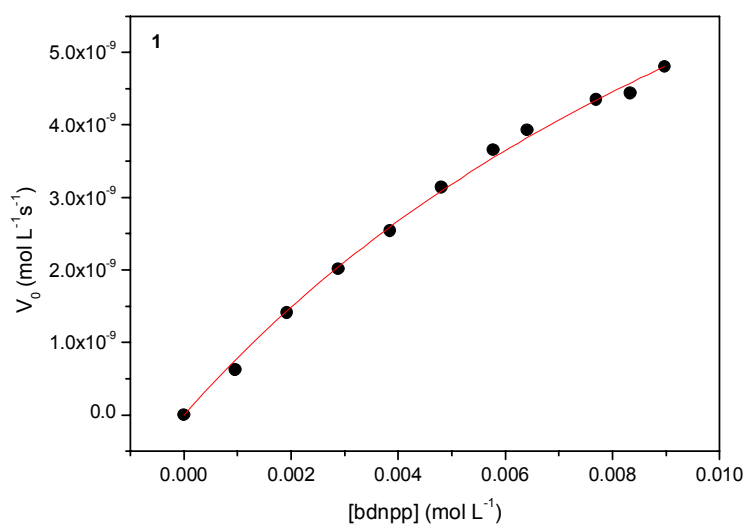
Desta forma, pôde ser aplicado o modelo de cinética enzimática para os dois sistemas de maneira que os dados foram ajustados através da equação de Michaelis-Menten (Equação 1) usando um método não linear, o qual forneceu dados necessários para o cálculo dos parâmetros cinéticos dos complexos estudados. A dependência da velocidade da reação de hidrólise com a concentração do substrato catalisada pelos complexos **1** e **2** é mostrada na Figura 28 e os valores obtidos pelos métodos das velocidades iniciais estão sumarizados na Tabela 11.

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} \times [S]}{K_M + [S]}$$

Equação 1 – Equação de Michaelis-Menten.

Tabela 11 - Parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do 2,4-bdnpp, catalisada pelos complexos **1** e **2**.

Complexo	$V_{Máx}$ (mol.L <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mol.L <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$E=k_{cat}/K_M$ (mol <sup>-1</sup> .L.s <sup>-1</sup> )	$K_{Assoc}$ (mol <sup>-1</sup> .L)	$f = k_{cat}/k_{nc}$
<b>1</b>	$1,70 \times 10^{-8}$	0,023	$4,09 \times 10^{-4}$	0,017	42,6	2506
<b>2</b>	$4,38 \times 10^{-8}$	0,031	$8,34 \times 10^{-4}$	0,026	32,3	4633



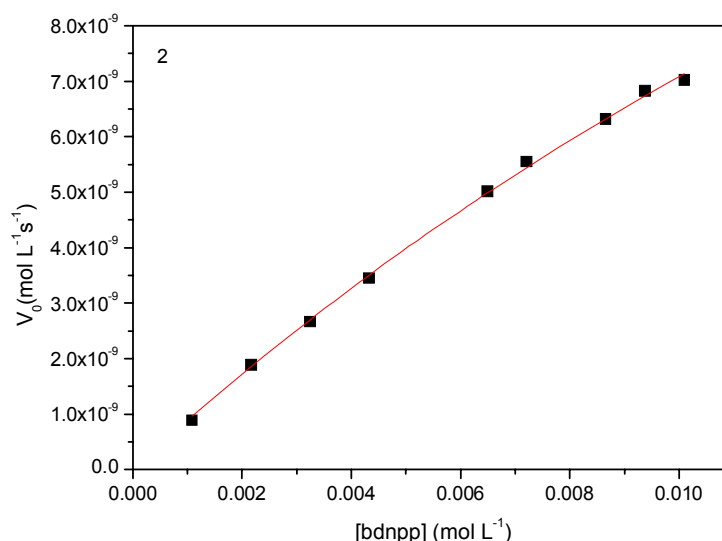


Figura 28 - Dependência da velocidade de reação de hidrólise com a concentração do substrato para o complexo **1** e **2**. Condições: solução CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 1:1; [complexo] = 4,3x10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>; [bdnpp] = 2,0 à 10,0x10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>; [tampão] = 0,05 mol.L<sup>-1</sup> (MES pH 6,5, HEPES pH 7,0); *I* = 0,05 mol.L<sup>-1</sup> (LiClO<sub>4</sub>) à 25°C.

Ao analisar os dados cinéticos obtidos pôde-se observar que os complexos **1** e **2** estudados apresentaram uma aceleração de 2,5 e 4,6 mil vezes, respectivamente frente à reação de hidrólise não catalisada do substrato modelo ( $k_{nc} = 1,8 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  a 25°C).<sup>45</sup> O complexo **2** apresenta uma constante catalítica  $k_{cat} = 8,34 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , sendo praticamente duas vezes maior se comparado à constante do complexo **1** ( $k_{cat} = 4,09 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ), o que reflete a maior eficiência do composto **2** na conversão de reagentes a produtos. Esta maior reatividade do complexo **2** pode estar ligada a maior labilidade do íon Cu<sup>II</sup> se comparado ao íon Zn<sup>II</sup>, já que o íon Cu<sup>II</sup> possui uma constante de auto-troca de ligante cerca de 100 vezes maior que o íon Zn<sup>II</sup> (Tabela 12).

Dentre uma série de compostos Fe<sup>III</sup>M<sup>II</sup> que foram estudados frente a hidrólise de ésteres de fosfato (onde o M<sup>II</sup> = Co<sup>65</sup>, Ni<sup>41</sup>, Cu<sup>42</sup>, Mn<sup>38</sup>, e Zn<sup>63</sup>) o complexo Co-substituído demonstrou ser o composto mais ativo. Neste sentido fica claro então o papel da substituição do íon metálico divalente, pois a variação deste acarretou significativas diferenças de atividade hidrolítica. Entretanto um fato inesperado é que o íon Co<sup>II</sup> não possui a maior constante de auto-troca de ligante (Tabela 12) entre estes metais estudados. Logo outros fatores devem

estar envolvidos, como por exemplo, a constante de associação do sistema complexo-substrato e a força do nucleófilo gerado no metal trivalente.

Tabela 12 – Valores de constante de auto-troca de água da primeira esfera de coordenação para os íons metálicos.<sup>4</sup>

Íon	$K_1$ ( $s^{-1}$ )	Íon	$K_1$ ( $s^{-1}$ )
Al <sup>3+</sup>	1	Ga <sup>3+</sup>	4x10 <sup>2</sup>
Cu <sup>2+</sup>	1x10 <sup>9</sup>	Mn <sup>2+</sup>	2x10 <sup>7</sup>
Co <sup>2+</sup>	3x10 <sup>6</sup>	Ni <sup>2+</sup>	4x10 <sup>4</sup>
Fe <sup>3+</sup>	2x10 <sup>2</sup>	Zn <sup>2+</sup>	2x10 <sup>7</sup>
Fe <sup>2+</sup>	4x10 <sup>6</sup>		

De maneira semelhante buscando entender o papel do metal trivalente na reação de hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAPs, Merkx e colaboradores<sup>33</sup> publicaram um estudo detalhado com PAPs substituídas, no qual as enzimas do tipo M<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup>-bsPAP (onde M<sup>III</sup> = Al, Fé, Ga e In) foram obtidas. As enzimas Fe<sup>II</sup>Zn<sup>II</sup> e Ga<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup> substituídas apresentaram valores de  $k_{cat}$  de 3000 s<sup>-1</sup>, enquanto a enzima Al<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup> apresentou um valor de  $k_{cat}$  de 2000 s<sup>-1</sup> e a In<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup> foi inativa. Conforme descrito por Merkx, este resultado era inesperado, uma vez que o íon Al<sup>III</sup> é tido como um metal ineficiente em reações de hidrólise devido à sua baixa labilidade para a troca de ligantes. A principal explicação para este resultado seria que a etapa determinante da reação não ocorre via uma etapa onde ocorra troca de ligantes no metal trivalente.

Um resultado interessante observado é que nos compostos modelo esse comportamento também é reproduzido. Pois o composto Al<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup> possui uma reatividade de 45% em relação ao análogo de Fe<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup>. Na enzima esta relação é de 65% da Al<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup>-bsPAP se comparada a FeZn-bsPAP, porém os efeitos causados pela substituição do íon Fe<sup>III</sup> por Al<sup>III</sup> devem ser os mesmos. Esta diminuição na atividade do composto Al<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup> se deve provavelmente a formação do íon hidróxido terminal em pH mais baixo o que o torna um nucleófilo mais fraco.

Uma comparação é feita na Tabela 13 em relação aos parâmetros cinéticos entre os compostos **1**, **2** e os compostos  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})(\text{bpbmp})]$ ,  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})(\text{bpbmp})]$  e  $[\text{Ga}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})(\text{bpbmp})]$ . Uma tendência é observada para estes compostos assim como ocorre nos complexos de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ , o complexo de  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  possui uma atividade aproximadamente duas vezes maior que o complexo de  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ . Para os análogos de FeZn e FeCu, a maior atividade da espécie FeCu é atribuída ao acoplamento antiferromagnético entre os íons  $\text{Fe}^{\text{III}}$  e  $\text{Cu}^{\text{II}}$  ( $-30 \text{ cm}^{-1}$ ) e o nucleófilo proposto é a ponte hidróxido/óxido, uma vez que o íon  $\text{Fe}^{\text{III}}$  se encontra pentacoordenado (confirmado por dados de EXAFS).<sup>66</sup>

Porém os complexos de alumínio não possuem acoplamento entre os centros metálicos. Logo, esta diferença entre a atividade entre os complexos  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  deve ser influenciada pelos íons  $\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . Porém, para uma discussão mais aprofundada, ainda serão necessários outros experimentos.

Tabela 13 – Comparação entre os Parâmetros Cinéticos dos complexos **1** e **2** com os complexos  $[\text{FeZn}(\mu\text{-OH})(\text{bpbmp})]$ ,  $[\text{FeCu}(\mu\text{-OH})(\text{bpbmp})]$  e  $[\text{GaCu}(\mu\text{-OH})(\text{bpbmp})]$ .

	AlZn	AlCu	FeZn	FeCu	GaCu
$V_{\text{máx}}$ ( $\text{mol.L}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$1,7 \times 10^{-8}$	$4,38 \times 10^{-8}$	$3,50 \times 10^{-8}$	$7,68 \times 10^{-8}$	$3,98 \times 10^{-8}$
$K_{\text{M}}$ ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	0,023	0,031	0,0042	0,0085	0,0056
$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$4,09 \times 10^{-4}$	$8,34 \times 10^{-4}$	$9,13 \times 10^{-4}$	$1,90 \times 10^{-3}$	$7,16 \times 10^{-4}$
$K_{\text{Assoc}}$ ( $\text{mol}^{-1}.\text{L}$ )	42,6	32,3	238	117	64
f	2506	4633	4800	10100	4700

O acompanhamento da reação estequiométrica (1:1) entre os complexos **1** e **2** e o substrato 2,4-bdnpp, foi realizado buscando avaliar se o monoéster 2,4-dinitrofenilfosfato (2,4-dnpp) também estaria sendo hidrolisado a 2,4-dinitrofenolato (2,4-dnp) e fosfato inorgânico (Pi). Através deste experimento observou-se que para ambos os complexos após um período de 25 horas, a 50°C, menos de um equivalente de 2,4-dnp foi liberado. Este resultado reflete os baixos valores de  $K_{\text{Assoc}}$  encontrados para os complexos **1** e **2** demonstrando que os complexos não possuem uma grande afinidade pelo substrato, e desta maneira apenas o diéster deve ser hidrolisado.

Para verificar se os complexos em estudo apresentam um ciclo catalítico, realizou-se um experimento com uma estequiometria (50:1) entre o substrato modelo 2,4-bdnpp ( $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ), e os complexos **1** e **2** ( $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ). O experimento (Figura 43) foi monitorado espectrofotometricamente (445 nm;  $\epsilon = 3600 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ), a pH 7,00 com temperatura constante (25 °C). Dessa forma, observou-se que em 80 min os complexos **1** e **2** foram capazes de hidrolisar uma molécula de substrato.

Com o intuito de avaliar a origem do ataque nucleofílico ao átomo de fósforo, se este ocorre via catálise básica geral ou é promovido via ataque intramolecular do grupo Al-OH, realizou-se um experimento de efeito isotópico de deutério sobre a velocidade de hidrólise do 2,4-bdnpp pelos complexos **1** e **2**. De acordo com Deal e colaboradores,<sup>67</sup> caso a razão entre as constantes de velocidades de duas reações de hidrólise do 2,4-bdnpp, sob as mesmas condições realizadas em H<sub>2</sub>O e D<sub>2</sub>O ( $k_H/k_D$ ), estiver entre 0,80 e 1,50 indica que não há transferência de próton envolvida na etapa determinante da reação, sugerindo um ataque nucleofílico intramolecular. Os valores encontrados para a razão  $k_H/k_D$  para os complexos **1** e **2** foram 1,02 e 1,07, respectivamente. Isto indica que a reação de hidrólise, catalisada por estes complexos, ocorre através de um mecanismo intramolecular no qual um íon hidróxido presente no complexo promove o ataque nucleofílico ao átomo de fósforo.

#### 4.3.3 EFEITO DA COMPOSIÇÃO DOS SOLVENTES NA REATIVIDADE

Em todos os experimentos cinéticos de variação da concentração de substrato as concentrações de substrato ficaram abaixo da constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ), devido à limitação da solubilidade do substrato em acetonitrila. Desta forma foram feitos experimentos visando atingir uma concentração de substrato maior ou igual ao valor de  $K_M$  aumentando a quantidade de CH<sub>3</sub>CN nos estudos cinéticos de variação do substrato.

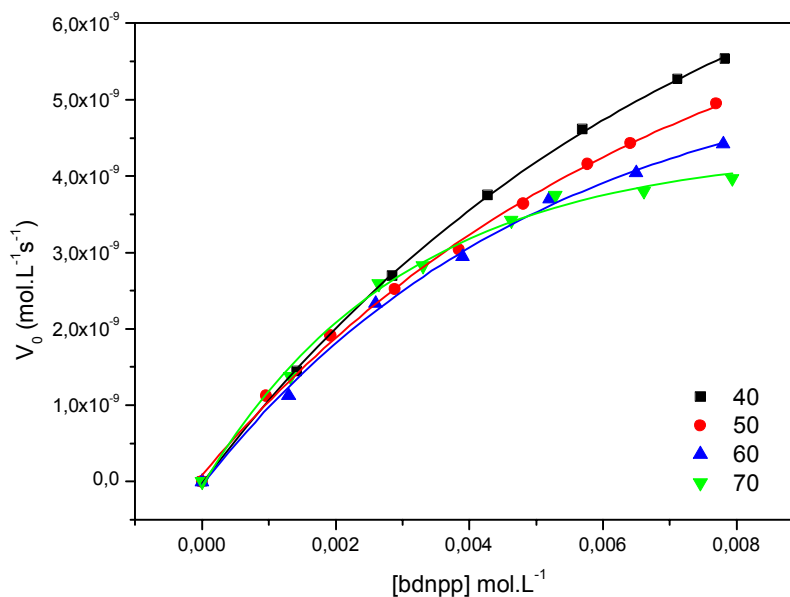


Figura 29 – Efeito da concentração do substrato em diferentes sistemas de solventes para o complexo **1** – Condições idênticas ao sistema CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (50:50).

Tabela 14 – Parâmetros cinéticos obtidos com a variação da porcentagem de acetoneitrila nos experimentos de estudo da variação da concentração do 2,4-bdnpp pelo complexo **1**.

	% Acetonitrila			
	40	50	60	70
$V_{\text{máx}}$ (mol.L <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	1,59 × 10 <sup>-8</sup>	1,78 × 10 <sup>-8</sup>	8,72 × 10 <sup>-9</sup>	9,13 × 10 <sup>-9</sup>
$K_M$ (mol.L <sup>-1</sup> )	0,0159	0,023	0,0071	0,0051
$k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> )	4,46 × 10 <sup>-4</sup>	4,09 × 10 <sup>-4</sup>	2,17 × 10 <sup>-4</sup>	2,24 × 10 <sup>-4</sup>
$K_{\text{Assoc}}$ (mol <sup>-1</sup> .L)	62,3	42,6	140,8	196,1



Conforme demonstrado na Figura 29 e na Tabela 14 observa-se que o aumento da quantidade de acetonitrila no sistema aumenta a afinidade do complexo pelo substrato, refletido nos valores obtidos de  $K_{\text{Assoc}}$ . Ao mesmo tempo, os valores de  $k_{\text{cat}}$  diminuem e a eficiência catalítica é mantida aproximadamente constante ( $0,03-0,04 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Isto se deve provavelmente ao fato de que uma maior quantidade de acetonitrila no meio reacional deve contribuir para que aumente a labilidade do metal divalente (conforme dados de espectroscopia Uv-vis) facilitando a entrada do substrato.

A fim de se estabelecer uma relação deste comportamento aqui observado com o complexo análogo de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ , foi realizado um experimento de efeito de substrato para a hidrólise do diéster 2,4-bdnpp na relação 70:30 (acetonitrila/água). Os dados obtidos são semelhantes aos encontrados para os complexos **1** e **2**. O valor de  $K_{\text{Assoc}}$  para o complexo  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  passa de  $238 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}$  no sistema 50:50, para  $714 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}$  neste sistema.

Logo, conclui-se que os resultados obtidos no sistema 50:50 são confiáveis, mas que comparações envolvendo a associação do substrato ao catalisador e a constante catalítica, apenas podem ser feitas para os diversos complexos na medida em que os estudos tenham sido realizados sob as mesmas condições experimentais. Certamente, estudar todos esses sistemas em meio aquoso sem a presença de qualquer quantidade de solvente orgânico se constitui na melhor alternativa porém, a baixa solubilidade de alguns dos complexos em água impedem tal realização.

#### 4.3.4 PROPOSTA DE MECANISMO PARA A HIDRÓLISE DO DIÉSTER 2,4-bdnpp.

Levando-se em conta todos os resultados obtidos e discutidos nas seções anteriores, propõe-se que os complexos **1** e **2** atuem na hidrólise do substrato 2,4-bdnpp via um mecanismo comum.

Com base em estudos no estado sólido como análise estrutural por cristalografia de raios X em monocristal, espectroscopia no infravermelho, reflectância difusa e técnicas em solução tais como medidas de condutividade, espectroscopia eletrônica UV-Vis-IVP e eletroquímica de **1** e **2**, propõe-se que ambos os complexos possuem a espécie  $[(\text{OH})\text{Al}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{M}^{\text{II}}(\text{bpbmp})(\text{OH}_2)]$  como

espécie responsável pela hidrólise do substrato 2,4-bdnpp nas condições de concentração e pH estudados.

Nos estudos de reatividade realizados manteve-se o controle da concentração dos complexos, do pH do meio, da força iônica, e grande excesso de substrato. Ambos os sistemas apresentaram uma cinética de saturação do tipo Michaelis-Menten. Portanto, propõe-se que a coordenação do substrato deva ocorrer por deslocamento da molécula de água, de modo que o substrato se oriente em posição *cis* ao íon hidróxido para que ocorra o ataque nucleofílico do mesmo sobre o átomo de fósforo.

No mecanismo proposto, apresentado na Figura 30, inicialmente o substrato coordena-se ao M(II) pelo deslocamento de uma molécula de água, em uma etapa rápida. A seguir, o íon hidróxido presente no centro de Fe(III) atua como nucleófilo, atacando o átomo de fósforo do substrato, ocorrendo então a clivagem da ligação fosfodiéster e a conseqüente liberação do 2,4-dinitrofenolato. O monoéster, 2,4-dinitrofenilfosfato, permanece coordenado ao complexo, podendo ser deslocado pela presença de excesso do substrato 2,4-bdnpp, reiniciando o processo catalítico.

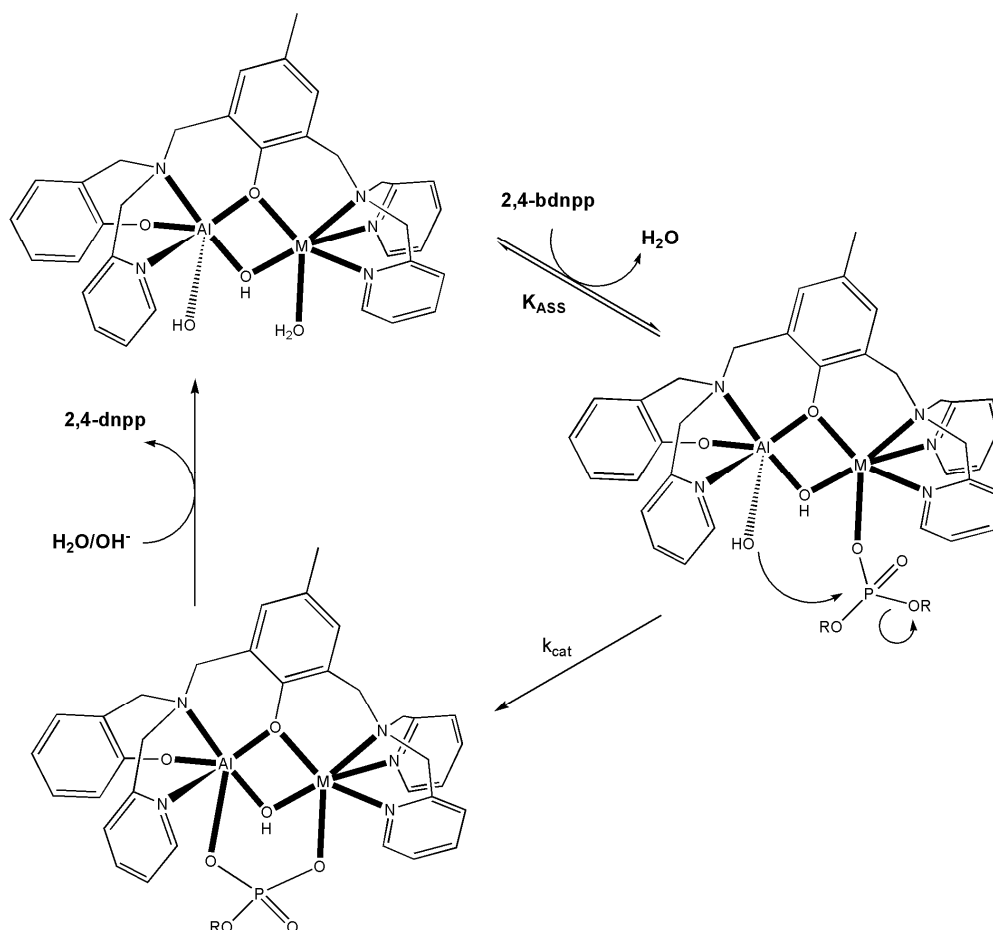


Figura 30 – Proposta de mecanismo para a hidrólise do 2,4-bdnpp promovida pelos complexos 1 e 2.

Esta proposta mecanística é reforçada em virtude dos estudos realizados por Neves e colaboradores na reação de hidrólise do 2,4-bdnpp catalisada pelo complexo  $[FeZn(\mu-OH)(bpbmp)]$ .<sup>42,43,68</sup> A atividade do composto  $Fe^{III}Zn^{II}$  frente ao monoéster 2,4-dnpp foi testada diretamente, e nenhuma atividade catalítica foi observada. Isto demonstra que estes compostos possuem apenas atividade como diesterases. Porém para que se possa comprovar a veracidade desta proposta, estudos espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) e de Raios X em solução (EXAFS) para os complexos 1 e 2 devem ser realizados. Estes estudos devem auxiliar na identificação da espécie ativa e também no modo de coordenação do substrato ao complexo.

Uma série de trabalhos, visando o estudo da hidrólise do 2,4-bdnpp, tem sido reportados atualmente.<sup>39,42,43,69,70</sup> Dentre estes, os que apresentaram maior atividade são os complexos heterobinucleares  $Fe^{III}Cu^{II}$ <sup>66</sup> e  $Fe^{III}Zn^{II}$ <sup>43</sup>, ambos

reportados por Neves e colaboradores, os quais aceleram a reação por um fator de 10 mil e 4,8 mil vezes, respectivamente. Neste trabalho, os complexos **1** e **2** apresentaram uma atividade catalítica com uma aceleração de 2,5 mil e 4,6 mil vezes, respectivamente, na velocidade de reação de hidrólise do 2,4-dnpp em relação à reação não catalisada.

É relevante estabelecer uma comparação do comportamento apresentado pelos complexos modelo de  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ ,  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  e os análogos de Ferro e o observado para a enzima bsPAP substituída. Na enzima foram obtidos valores de  $k_{\text{cat}}$  em torno de  $3000 \text{ s}^{-1}$  para as enzimas  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Ga}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  substituídas e de  $2000 \text{ s}^{-1}$  para enzima  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  substituída. Nesta comparação a enzima  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  tem uma atividade de 66% em relação as demais. Este comportamento pode ser verificado também nos complexos  $\text{Al}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$ , onde estes possuem uma reatividade em torno 45% em relações aos análogos de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$ . Obviamente na enzima, devido sua complexidade outros fatores devem estar envolvidos, porém nos complexos modelo, este efeito observado na diminuição da atividade deve se dar diretamente pela influência do íon  $\text{Al}^{\text{III}}$ . Estes estudos demonstram a influência do metal trivalente na hidrólise de ésteres de fosfato promovido pelas PAPs e também que os complexos **1** e **2** podem ser descrito como modelos funcionais para a enzima  $\text{AlZn-bsPAP}$ .

#### 4.3.5 ESTUDOS PRELIMINARES UTILIZANDO O SUBSTRATO 2,4-dnpp.

Foi estudada também a reatividade dos complexos **1** e **2** na reação de hidrólise do monoéster 2,4-dinitrofenil fosfato (2,4-dnpp). Para tal, a reação foi monitorada espectrofotometricamente por um período de 10 h, observando-se a conversão de substrato a produtos através do aumento da absorbância em 400 nm devido à liberação de 2,4-dinitrofenolato durante a reação.

No período analisado, observou-se um crescimento de 0,3 unidades de absorbância, indicando que a reação ocorreu e que uma molécula de 2,4-dinitrofenolato foi liberada. Na Figura 31 está demonstrada o acompanhamento da reação de hidrólise do 2,4-dnpp pelo complexo **2**.

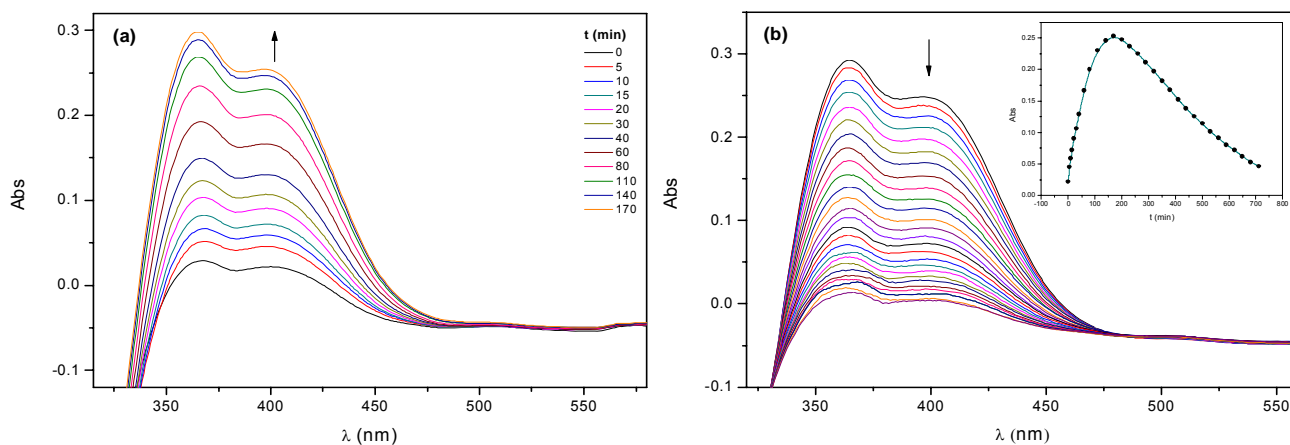


Figura 31 – Acompanhamento espectroscópico da reação de hidrólise do substrato 2,4-dnpp catalisada pelo complexo **2**: (a) Acompanhamento até 170 min; (b) Acompanhamento de 170 à 650 min. Condições: [complexo] =  $2,4 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, [dnpp] =  $2,8 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, [tampão] = 0,05 mol.L<sup>-1</sup> (MES pH 6,5, HEPES pH 7,0);  $I = 0,05$  mol.L<sup>-1</sup> (LiClO<sub>4</sub>) à 25°C.

Observou-se que a partir de 170 min houve um decréscimo na absorvância até que em 650 min o valor de absorvância tende à zero. Este fato indica que o complexo deve estar sofrendo uma inibição pelas moléculas de fosfato inorgânico (P<sub>i</sub>) geradas na solução, ou ainda que o íon fenolato pode estar sofrendo uma reação secundária (sendo consumido). Para verificar então este efeito inibitório de íons fosfato da reação, foram feito experimentos monitorando a hidrólise do 2,4-bdnpp com adições crescentes de P<sub>i</sub> à reação.

De acordo com a Figura 32, as interações entre os complexos estudados e o P<sub>i</sub> são, de fato, intensas uma vez que com apenas 3 equivalente de HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> os percentuais de inibição para as reações catalisadas pelos complexos **1** e **2** são de aproximadamente 25%.

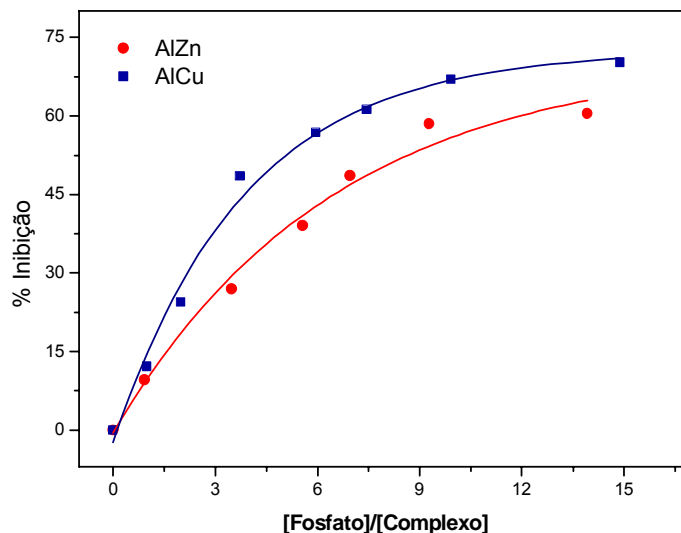


Figura 32 - Percentual de inibição por íons fosfato da reação de hidrólise do 2,4-bdnpp catalisada pelos complexos **1** e **2** a 25 °C. Condições vide seção 3.1.2, página 34.

Apesar da pequena diferença entre os índices de inibição dos complexos estudados, o complexo **1** se mostra mais resistente à inibição por fosfato. Dessa forma o aumento da concentração de  $P_i$  durante o curso da reação pode estar relacionado com a ausência de “turnovers” ou ciclos catalíticos. Pois ao passo que o mesmo é formado como produto da hidrólise completa do 2,4-dnpp sua coordenação definitiva sob a forma de ponte entre os sítios metálicos pode impedir a associação de uma nova molécula de substrato.

Entretanto, baseando-se nos dados cinéticos da hidrólise do substrato 2,4-bdnpp era esperado que os complexos **1** e **2** não fossem ativos na hidrólise do monoéster 2,4-dnpp. Conforme reportado por Neves e colaboradores<sup>43</sup>, para a hidrólise do 2,4-bdnpp, propõe-se então que o monoéster gerado a partir da hidrólise do diéster fique ligado como ponte ao complexo, e a ponte hidróxido não é um nucleófilo forte o bastante para promover a hidrólise do monoéster. Desta forma, o monoéster 2,4-dnpp, quando testado diretamente, deve ligar-se aos complexos **1** e **2** de maneira monodentada e o íon hidróxido terminal deve agir como nucleófilo, o que explicaria como os complexos de  $Al^{III}Zn^{II}$  e  $Al^{III}Cu^{II}$  são ativos na hidrólise do monoéster 2,4-dnpp.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi sintetizado e caracterizado por IV e RMN  $^1\text{H}$  o ligante não simétrico  $\text{H}_2\text{bpbmp}$  e seus precursores com bons rendimentos e grau de pureza adequado para a síntese de complexos, de acordo com a rota sintética descrita por Neves e colaboradores.<sup>39</sup>

Foram sintetizados dois novos complexos binucleares de  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  empregando-se o ligante  $\text{H}_2\text{bpbmp}$  obtendo-se então a unidade estrutural  $[\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\text{bpbmp})(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$  para o complexo **1** e  $[\text{Al}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{bpbmp})(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$  para o complexo **2**.

Os complexos **1** e **2** tiveram suas estruturas cristalinas resolvidas via difratometria de raios X em monocristal, apresentando-se isoestruturais entre si. Eles foram apontados como modelos estruturais para as PAPs, pois possuem um arranjo heterobinuclear ( $\text{M}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$ ) contendo grupos ligantes N,O-doadores, os quais mimetizam os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo das PAPs.

Estudos de reatividade frente à clivagem hidrolítica do substrato modelo 2,4-bdnpp catalisada pelos complexos **1** e **2** revelaram que estes atuam como catalisadores, apresentando valores de aceleração de 2,5 e 4,6 mil vezes, respectivamente, em relação à reação não catalisada. O complexo **2** ( $\text{Al}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ ) apresenta maior atividade na hidrólise do substrato e formação de produtos. Vale ainda salientar que, estes são os primeiros compostos heterobinucleares de  $\text{Al}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$  descritos na literatura.

A reatividade dos complexos **1** e **2** frente à hidrólise do substrato 2,4-bdnpp é de 45% em relação aos análogos  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  e  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ . Esta proporção também é encontrada quando se faz à mesma substituição na enzima. Assim, este comportamento revela que a substituição do íon  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , presente na enzima nativa, por  $\text{Al}^{\text{III}}$  influencia de maneira significativa o processo de hidrólise, ressaltando assim o papel da substituição metálica em complexos modelos e na enzima nativa.

A partir dos dados estruturais, espectroscópicos, eletroquímicos, cinéticos e de titulação potenciométrica foi possível propor um ciclo catalítico para a hidrólise do 2,4-bdnpp, mediada pelos complexos **1** e **2**. O mecanismo proposto inclui ataques nucleofílicos intramoleculares, envolvendo duas etapas: a primeira,

onde o substrato se liga ao metal divalente, seguida de um ataque do íon hidróxido ligado ao centro de  $Al^{III}$  ( $Al^{III}-OH$ ) ao átomo de fósforo do substrato, liberando uma molécula de 2,4-dinitrofenolato.



## 6 PERSPECTIVAS

Para uma maior e melhor elucidação do ciclo catalítico, e o caminho mais provável pelo qual a reação de hidrólise do 2,4-bdnpp esteja ocorrendo, seria de extrema relevância a obtenção de estruturas cristalinas dos complexos modelos ligados ao substrato modelo. Compostos como esses auxiliariam na investigação de passos determinantes do mecanismo reacional como o modo de coordenação do substrato ao catalisador.

A determinação dos produtos formados durante a hidrólise também pode fornecer valiosas informações a respeito do mecanismo envolvido nessas reações. Os produtos poderão ser caracterizados através da técnica cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), onde alíquotas de uma reação serão injetadas em intervalos de tempo determinados. A identificação dos produtos da reação de hidrólise também poderá ser realizada através de ressonância magnética nuclear de fósforo, onde a ausência de sinais referentes ao fosfato inorgânico pode indicar se o diéster é hidrolisado totalmente.

A utilização de substratos com apenas um grupo de saída, como por exemplo, o diéster, sal de lítio do 2,4-dinitrofeniletilfosfato, e o triéster de fosfato 2,4-dinitrofenil-dietilfosfato, permitirão um estudo mais simplificado da reação de hidrólise catalisada pelos complexos modelo e provavelmente facilitarão a identificação dos produtos finais da reação. E também a determinação dos parâmetros termodinâmicos para a reação de hidrólise de uma série de substratos similares poderá ser útil, tentando avaliar se o mecanismo de hidrólise de ésteres de fosfatos pelos complexos **1** e **2** segue um mecanismo comum.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 HUHEEY, J. E., *Inorganic Chemistry*, 3rd Edition, New York – NY, Harper & Row Pub. Inc., 1983.
- 2 FARIAS, R. F. *Química de Coordenação: fundamentos e atualidades*, Campinas – SP, Ed. Átomo, 2005.
- 3 KAIN, W., SCHWEDERSKI, B. *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of life*, New York, John Wiley & Sons, Inc., p 6-36, 1994.
- 4 LIPPARD, S. J. and BERG, J. M. *Principles of bioinorganic chemistry*, Mill Valley: University Science Books, p. 1-20, 1994.
- 5 ROAT-MALONE, R. M. *Bioinorganic Chemistry – A Short Course*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, p. 25-36, 2002.
- 6 REEDIJK, J. Introduction to bioinorganic chemistry. In *Bioinorganic Catalysis*, New York: Marcel Dekker, Inc. p. 1-11, 1993.
- 7 COWAN, J. A. *Inorganic Biochemistry – an introduction*. 2<sup>a</sup> Ed. New York: Ed. Wiley-VCH, 1993.
- 8 HOLM, R. H., KENNEPOHL, P. e SOLOMON, E. I. Structural and functional aspects of metal sites in biology. *Chemical Reviews*, v. 96, p. 2239 - 2314, 1996.
- 9 BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L. *Biochemistry*, New York: W. H. Freeman and Company, 5th edition, p. 189-221, 2001.
- 10 KIMURA, E. Dimetallic hydrolases and their models. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 4, p. 207–213, 2000.
- 11 MITIĆ, N., SMITH, S. J., NEVES, A., GUDDAT, L. W., GAHAN, L. R. e SCHENK, G. The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases. *Chemical Reviews*. v. 106, p. 3338-3363, 2006.
- 12 WILCOX, D. E. Binuclear hidrolases. *Chemical Reviews*, v. 96, p. 2435-2458, 1996.
- 13 MERKX, M. e AVERILL, B. A. Ga<sup>III</sup> as a functional substitute for Fe<sup>III</sup> preparation and characterization of the Ga<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup> and Ga<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup> forms of bovine spleen purple acid phosphatase. *Biochemistry*. v. 37, p. 8490-8497, 1998.

- 14 TWITCHETT, M., SCHENK, G., AQUINO, M. A. et al. Reactivity of MII metal-substituted derivatives of pig purple acid phosphatases (Uteroferrin) with phosphate. *Inorganic Chemistry*. v. 41, p. 5787-5794, 2002.
- 15 GARMER, D. R. AND KRAUSS, M. Metal substitution and the active site of carbonic anhydrase. *Journal of the American Chemical Society*, v. 114 , p. 6487-6493, 1992.
- 16 COLEMAN, J. E. Human Carbonic Anhydrase. Protein Conformation and Metal Ion Binding. *Biochemistry*, p. 4 , p. 2644-2655, 1965.
- 17 CAPPIELLO, M., ALTERIO, V., AMODEO, P., et. al. Metal Ion Substitution in the Catalytic Site Greatly Affects the Binding of Sulfhydryl-Containing Compounds to Leucyl Aminopeptidase. *Biochemistry*, v. 45, p. 3226-3234, 2006.
- 18 THAN, R., FELDMANN, A. A., KREBS, B. Structural and functional studies on model compounds of purple acid phosphatases and catechol oxidases. *Coordination Chemistry Reviews*. v. 182. p. 211-241, 1999.
- 19 KLABUNDE, T. and KREBS, B. The dimetal center in purple acid phosphatases. *Structure and Bonding*, v. 89, p. 177-198, 1997.
- 20 STRÄTER, N.; KLABUNDE, T.; TUCKER, P.; WITZEL, H.; KREBS, B. Crystal structure of a purple acid-phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active-site. *Science*, v. 268, p. 1489-1492, 1995.
- 21 UPPENBERG, J.; LINDQVIST, F.; SVENSSON, C.; EK-RYLANDER, B., ANDERSSON, G. Crystal structure of a mammalian purple acid phosphatase. *Journal of Molecular Biology*, v. 290, p. 201-211, 1999.
- 22 BUHI, W.C., DUCSAY, C.A., BAZER, F.W., Roberts, R.M. Iron transfer between the purple phosphatase uteroferrin and transferrin and its possible role in iron metabolism of the fetal pig. *Journal of Biological Chemistry*. V. 257, p. 1712, 1982.
- 23 NUTTLEMAN, P.R., ROBERTS, R.M., Transfer of iron from uteroferrin (purple acid phosphatase) to transferrin related to acid phosphatase activity. *Journal of Biological Chemistry*. v. 265, p. 12192, 1990.
- 24 KLABUNDE, T.; STRÄTER, N.; FRÖHLICH, R.; WITZEL, H. AND KREBS, B. Mechanism of Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase based on crystal structures. *Journal of Molecular Biology*, v. 259, p. 737-748, 1996.

- 25 GUDDAT, L. W.; McALPINE, A. S.; HUME, D.; HAMILTON, S.; De JERSEY, J. MARTIN, J.L. Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase. **Structure**, v. 7, n. 7, p. 757-767, 1999.
- 26 LINDQVIST, Y., JOHANSSON, E., KAIJA, H., VIHKO, P., SCHNEIDER, G. Three-dimensional structure of a mammalian purple acid phosphatase at 2.2 Å resolution with a  $\mu$ -(hydroxo) bridged di-iron center. **Journal of Molecular Biology**. v. 291, p. 135, 1999.
- 27 SCHENK, G.; GE, Y.; CARRINGTON, L. E.; WYNNE, C.J.; SEARLE, I.R.; CARROLL, B.J.; HAMILTON, S. and De JERSEY, J. Binuclear metal centers in purple acid phosphatases: Fe-Mn in sweet potato and Fe-Zn in soybean. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 370, n. 2, p. 183-189, 1999.
- 28 THAN, R.; FELDMANN A.; KREBS, B. Structural and functional studies on model compounds of purple acid phosphatases and catechol oxidases, **Coordination Chemistry Reviews**, v. 182, p. 211-241, 1999.
- 29 KLABUNDE, T. and KREBS, B. The dimetal center in purple acid phosphatases. **Structure and Bonding**, v. 89, p. 177-198, 1997.
- 30 SCHENK, G.; GAHAN, L. R.; CARRINGTON, L. E.; MITIĆ N.; VALIZADEH, M.; HAMILTON, S. E.; JERSEY, J. DE; GUDAT, L. W. Phosphate forms an unusual tripodal complex with the Fe-Mn center of sweet potato purple acid phosphatase. **Proceedings of The National Academy of Sciences of United States of America**, v. 102, p. 273-278, 2005.
- 31 BECK, J. L., JERSEY, J., ZERNER, B., HENDRICH, M.P., DEBRUNNER, P.G. Properties of the Fe(II)-Fe(III) derivative of Red Kidney Bean Purple Acid Phosphatase. Evidence for a binuclear Zn-Fe center in native enzyme. **Journal of American Chemical Society**, v. 110, p. 3317-3318, 1988.
- 32 GEHRING, S., FLEISCHHAUER, P., BEHLENDORF, M., HUBER, M., LOROSCH, J., HAASE, W., DIETRICH, M., WITZEL, H., LOCKE, R., KREBS, B. Magnetic susceptibility studies on the diiron forms of the metalloprotein purple acid phosphatase from bovine spleen and kidney bean. **Inorganica Chimica Acta**, v. 252, p. 13-17, 1996.
- 33 MERKX, M., AVERILL, B. A. Probing the Role of the Trivalent Metal in Phosphate Ester Hydrolysis: Preparation and Characterization of Purple Acid Phosphatases Containing  $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  and  $\text{In}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$  Active Sites, Including the First

- Example of an Active Aluminum Enzyme. *Journal of American Chemical Society*, v. 121, p. 6683-6689, 1999.
- 34 EGLOFF, M. P., COHEN, P. T. W., REINEMER, P., BARFORD, D. Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Human Protein Phosphatase and its Complex with Tungstate. *Journal of Molecular Biology*. v. 254, p. 942-959, 1995.
- 35 HUANG, W. J., JIA, J., CUMMINGS, J., NELSON, M., SCHNEIDER, G., LINDQVIST, Y. Crystal structure of nitrile hydratase reveals a novel iron center in a novel fold. *Structure*. v. 5, p. 691-699, 1997.
- 36 DIKIY, A., FUNHOFF, E. G., AVERILL, B. A., CIURLI, S. New Insights into the mechanism of Purple Acid Phosphatase through  $^1\text{H}$  RMN Spectroscopy of the recombinant human enzyme. *Journal of the American Chemical Society*, v. 124, p. 13974-13975, 2002.
- 37 E.G. MUELLER, M.W. CROWDER, B.A. AVERILL, J.R. KNOWLES, Purple acid phosphatase: a diiron enzyme that catalyzes a direct phospho group transfer to water. *Journal of the American Chemical Society*. v. 115, p. 2914, 1993.
- 38 JARENMARK, M., CARLSSON, H., NORDLANDER, E. Asymmetric dinuclear metal complexes as models for active sites in hydrolases and redox enzymes. *Comptus Rendus Chimie*, v. 10, p. 433-462, 2007.
- 39 KARSTEN, P., NEVES, A., BORTOLUZZI, A. J., LANZMASTER, M., DRAGO, V. Synthesis, Structure, Properties, and Phosphatase-Like Activity of the First Heterodinuclear  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}$  Complex with the Unsymmetric Ligand  $\text{H}_2\text{bpbmp}$  as a Model for the PAP in Sweet Potato. *Inorganic Chemistry*, v. 41, p. 4624-4626, 2002.
- 40 BRITO, M. A. Análogos sintéticos para a estrutura do sítio ativo das fosfatases ácidas púrpuras. *Tese de doutorado em Química* – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1994.
- 41 BATISTA, S. C.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J.; VENCATO, I.; PERALTA, R. A.; SZPOGANICZ, B.; AIRES, V. E.; SEVERINO, P. A.; Highly efficient phosphate diester hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Ni}^{\text{II}}$  model complex, *Inorganic Chemistry Communications*, v. 6, p. 1161-1165, 2003.

- 42 LANZMASTER, M., NEVES, A., BORTOLUZZI, A. J., AIRES, V. V. E., SZPOGANICZ, B., TERENCE, H., SEVERINO, P. C., FULLER, J. M., DREW, S. C., GAHAN, L. R., HANSON, G. R., RILEY, M. J., SCHENK, G. A new heterobinuclear  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$  complex with a single terminal  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O}(\text{phenolate})$  bond. Relevance to purple acid phosphatases and nucleases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 10, p. 319–332, 2005.
- 43 NEVES, A., LANZMASTER, M., BORTOLUZZI, A. J., PERALTA, R. A., CASELLATO, A., CASTELLANO, E. E., HERRALD, P., RILEY, M. J., SCHENK, G. An Unprecedented  $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}$  Complex that Mimics the Structural and Functional Properties of Purple Acid Phosphatases. *Journal of American Chemical Society*, v. 129, p. 7486-7487, 2007.
- 44 CASELLATO, A. Síntese, Caracterização e Reatividade de Complexos Modelos para as Fosfatases Ácidas Púrpuras Ga-substituídas, *Dissertação de mestrado em Química*, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.
- 45 BUNTON, C. A., FARBER, S. J., The hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate. *Journal of Organic Chemistry*, v. 34, n. 4, p. 767-772, 1969.
- 46 RAWJI, G., and MILBURN, M. 2,4-Dinitrophenyl Dihydrogen Phosphate: A New Synthesis of Its Mono-2,6-lutidinium Salt. *Journal of Organic Chemistry*, v. 46, p. 1205-1206, 1981.
- 47 GEARY, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 7, p. 81-122, 1971.
- 48 SHELDRIK, G. M. SHELXS-97: *Program for the solution of crystal structures*. University of Göttingen, Germany, 1990.
- 49 SHELDRIK, G. M. SHELXL-97: *Program for the refinement of crystal structures*. University of Göttingen, Germany, 1997.
- 50 FARRUGIA, L. J. ORTEP3 for Windows. *Journal of Applied Crystallography*, v. 30, p. 565, 1997.
- 51 ADDISON, A. W.; RAO, T. N.; REEDIJK, J.; VANRIJN, J., VERSCHOOR, G. C. Synthesis, structure, and spectroscopic properties of copper(II) compounds containing nitrogen-sulfur donor ligands; the crystal and molecular structure of  $\text{aqua}[1,7\text{-bis}(\text{N-methylbenzimidazol-2'-yl})\text{-2,6-}$

- dithiaheptane]copper(II) perchlorate. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, p. 1349-1356, 1984.
- 52 LEE, J. D. *Química Inorgânica não tão concisa*, 5ª edição, São Paulo – SP, Ed. Edgard Blucher Ltda. 1999.
- 53 HATHAWAY, B. J. Copper. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 35, p. 211-227, 1981.
- 54 LEVER, A. B. P. *Inorganic Electronic Spectroscopy*, 2ª Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 553-572, 1984.
- 55 HATHAWAY, B. J., BILLING, D. E. The electronic properties and stereochemistry of mono-nuclear complexes of the copper(II) ion. *Coordination Chemistry Reviews*, v.5, p.143-207,1970.
- 56 GAGNÉ, R. R.; KOVAL, C. A. and LISENSKY, G. C. Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements. *Inorganic Chemistry*, v. 19, p. 2854- 2855, 1980.
- 57 RORABACHER, D. B. Electron Transfer by Copper Centers. *Chemical Reviews*, v. 104, p. 651-698, 2004.
- 58 BARD, A. J., FAULKNER, L. R. *Electrochemical Methods – Fundamentals and Applications*. New York – John Wiley & Sons, 1980.
- 59 BENCINI, A. BERTINI, I., GATTESCHI, D. E. SCOZZAFAVA, A. Single-crystal ESR spectra of copper(II) complexes with geometries intermediate between a square pyramid and a trigonal bipyramid. *Inorganic Chemistry*, v. 17, p. 3194-3197, 1978.
- 60 SCHWINGEL, E.W.; AREND, K.; ZARLING, J.; NEVES, A. and SZPOGANICZ, B. Protonation equilibrium studies of H<sub>2</sub>BBPEN, H<sub>2</sub>BBPPN and H<sub>2</sub>BBPBN. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 7, p. 31-37, 1996.
- 61 MARTELL, A. E., MOTEKAITIS, R. J. *Determination and use of stability constants*. VCH, New York, 2nd ed, 1992.
- 62 PISZKIEWICZ, D. *Kinetics of Chemical and Enzyme-Catalyzed Reactions*. New York: Oxford University Press, cap. 5, p. 81-116, 1977.
- 63 LANZMASTER, M., NEVES, A., BORTOLUZZI, A. J., SZPOGANICZ, B., SCHWINGEL, E. New Fe<sup>III</sup>Zn<sup>II</sup> Complex Containing a Single Terminal Fe-O<sub>phenolate</sub> Bond as a structural and Functional Model for the Active Site of Red

- Kidney Bean Purple Acid Phosphatase. **Inorganic Chemistry**, v. 41, p. 5641-5643, 2002.
- 64 MERKX M., PINKSE M. W. H., AVERILL B. A: Evidence for nonbridged coordination of p-nitrophenyl phosphate to the dinuclear Fe(III)–M(II) center in bovine spleen purple acid phosphatase during enzymatic turnover **Biochemistry**, v. 38, p. 9914-9925, 1999.
- 65 XAVIER, F. R., Novos Complexos Binucleares Não-Simétricos de Ferro(III)Cobalto(II) e de Gálio(III)Cobalto(II) Como Modelos Miméticos Para As Fosfatases Ácidas Púrpuras Metalo-Substituídas. **Dissertação de Mestrado em Química** – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
- 66 CASELLATO, A., Síntese de complexos biomiméticos para as Fosfatases Ácidas Púrpuras. **Tese de Doutorado em Química** – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- 67 DEAL, K. A.; HENGGE, A. C. and BURSTYN, J. N. Characterization of transition states in dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-catalyzed activated phosphate diester hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, p. 1713-1718, 1996.
- 68 PERALTA, R. A. Novos complexos binucleares de Cobre(II) e de Ferro(III) Zinco(II): Biomiméticos sintéticos para Catecol Oxidase e para Fosfatases Ácidas Púrpuras. **Tese de doutorado em Química**, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.
- 69 HARTMAN, J. R.; RARDIN, R. L.; CHAUDHURI, P.; POHL, K.; WIEGHARDT, K.; NUBER, B.; WEISS, J.; PAPAETHYMIU, G. C.; FRANKEL, R. B., LIPPARD, S. J. Synthesis and characterization of ( $\mu$ -hydroxo)bis( $\mu$ -acetato)diiron(II) and ( $\mu$ -oxo)bis( $\mu$ -acetate) diiron(III) 1,4,7-trimethyl-1,4,7-triazacyclononane complexes as models for binuclear iron centers in biology; properties of the mixed valence diiron(II,III) species. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, p. 7387-7396, 1987.
- 70 NEVES, A.; ROSSI, L. M.; VENCATO, I.; HAASE, W., WERNER, R. A new bis( $\mu$ -alkoxo) diiron (III) complex and its implications regarding the number of Fe(III)-phenolate bonds and redox potential in Uteroferrin. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, p. 707-712, 2000.
- 71 Manuscrito em preparação.