

CLOVIS PIOVEZAN

**NOVOS COMPLEXOS BINUCLEARES HOMO E
HETEROBIMETALICOS BIOINSPIRADOS E SEU ESTUDO DA
REATIVIDADE EM MEIO HOMOGÊNEO E HETEROGÊNEO
COMO MODELOS MIMÉTICOS PARA AS HIDROLASES**

Tese 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 Doutor em Química.

Área de concentração: Química Inorgânica Orientador: Prof. Dr. Ademir Neves

Florianópolis
2010

CLOVIS PIOVEZAN

**NOVOS COMPLEXOS BINUCLEARES HOMO E
HETEROBIMETALICOS BIOINSPIRADOS E SEU ESTUDO DA
REATIVIDADE EM MEIO HOMOGÊNIO E HETEROGÊNIO
COMO MODELOS MIMÉTICOS PARA AS HIDROLASES**

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

Florianópolis, 30 de Março de 2010.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ademir Neves
Orientador - UFSC

Prof^ª. Dr^ª. Liane M. Rossi -
USP

Prof. Dr. Adailton J. Bortoluzzi
- UFSC

Prof. Dr. Hernán Terenzi -
UFSC

Prof. Dr. Luis A. S. Madureira -
UFSC

“O único lugar aonde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Primeiramente desejo agradecer a Deus que através do mundo espiritual orientou as minhas mãos iluminando e dando equilíbrio para que eu atravessasse todo esse processo com a maior seriedade possível e obtivesse o controle absoluto para jamais magoar e ofender a quem quer que seja.

A minha família pelo apoio nestes últimos quatro anos.

Ao Prof. Dr. Ademir Neves pela orientação e oportunidade de desenvolver este trabalho.

Você me ensinou tantas coisas.

Ajudou-me dar tantos passos.

Talvez você ache que apenas fez o básico,

Mas para mim você fez o essencial para

Que eu pudesse dar meus passos firmes.

Você me ensinou que cada pergunta

Pode ter mais de uma resposta,

E que a resposta a escolher é aquela

Que mais nos faz bem.

A todos os colegas do laboratório de Química Bioinorgânica e Cristalografia. Sentiremos saudades de todas as conversas jogadas fora, as descobertas que fizemos, dos sonhos que tivemos, dos tantos risos e momentos que compartilhamos.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química.

A Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao CPNPq pelo fomento.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS.....	16
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	17
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	21
CAPÍTULO 1.....	22
INTRODUÇÃO.....	23
A QUÍMICA BIOINORGÂNICA.....	23
METALOENZIMAS.....	25
O NÍQUEL E SEU PAPEL BIOLÓGICO.....	25
O FERRO E SEU PAPEL BIOLÓGICO.....	27
NUCLEASES QUÍMICAS.....	28
IMOBILIZAÇÃO DE METALOCOMPLEXOS E A REAÇÃO EM MEIO HETEROGÊNEO.....	30
NANOPARTICULAS INORGÂNICAS COMO TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS.....	31
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	33
CAPÍTULO 2.....	40
OBJETIVOS.....	41

PARTE EXPERIMENTAL.....	41
MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO.....	41
MATERIAIS.....	41
MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO.....	42
REATIVIDADE.....	45
SÍNTESE DOS LIGANTES.....	47
SÍNTESE DO NÚCLEO BÁSICO 2-CLOROMETIL-4-METIL-6-FORMILFENOL – CMFF.....	47
SÍNTESE DO LIGANTE 2-[(N-BENZIL-N-2-PIRIDILMETILAMINA)-4-METIL-6-[N-(2-PIRIDILMETIL)AMINOMETIL)]-4-METIL-6-FORMILFENOL (H ₂ BPPAMFF).....	48
SÍNTESE DAS NANOESFERAS DE SÍLICA (SiO ₂).....	51
SÍNTESE DAS NANOESFERAS DE SÍLICA MAGNÉTICAS (Fe ₃ O ₄ @SiO ₂).....	51
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	53
CAPÍTULO 3.....	55
UREASE.....	56
SÍNTESE DO COMPLEXO [Ni ₂ (HBPPAMFF)(μ-AcO) ₂ (H ₂ O)]BPh ₄ (1) COMO MODELO FUNCIONAL E/OU ESTRUTURAL PARA A METALOENZIMA UREASE.....	59
CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO [Ni ₂ (HBPPAMFF)(μ-AcO) ₂ (H ₂ O)] BPh ₄ (1).....	59
IMOBILIZAÇÃO DO COMPLEXO 1 EM SÍLICA 3-AMINO FUNCIONALIZADA.....	64

IMOBILIZAÇÃO DO COMPLEXO 1 EM NANOESFERAS DE SÍLICA E NAS NANOESFERAS MAGNÉTICAS.....	65
ESTUDO DA REATIVIDADE DO COMPLEXO 1 FRENTE A HIDRÓLISE HOMOGÊNEA E HETEROGÊNEA DE UM DIESTER FOSFATO COMO MODELO ESTRUTURAL E/OU FUNCIONAL DA UREASE.....	65
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	73
CAPÍTULO 4.....	78
FOSFATASE ÁCIDA PÚRPURA.....	79
SÍNTESE DOS COMPLEXOS [FeNi(BPPAMFF)(μ -AcO) ₂ (H ₂ O)]ClO ₄ (2) E [FeZn(BPPAMFF)(μ -AcO) ₂ (H ₂ O)]ClO ₄ (3).....	80
IMOBILIZAÇÃO DOS COMPLEXOS 2 E 3 EM SÍLICA 3-AMINO FUNCIONALIZADA.....	81
CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS [FeNi(BPPAMFF)(μ -AcO) ₂ (H ₂ O)]ClO ₄ (2) E [FeZn(BPPAMFF)(μ -AcO) ₂ (H ₂ O)]ClO ₄ (3).....	81
CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS SI3AP-2 E SI3AP-3.....	88
ESTUDO DA REATIVIDADE DOS SISTEMAS 2, 3, SI3AP-2 E SI3AP-3 COMO MODELOS ESTRUTURAIIS E/OU FUNCIONAIIS PARA AS FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURA.....	89
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	96
CAPÍTULO 5.....	100
IMOBILIZAÇÃO DO COMPLEXO 4 EM SÍLICA 3-AMINO FUNCIONALIZADA.....	101
ESTUDO DA REATIVIDADE EM MEIO HETEROGÊNEO DOS SISTEMAS SI3AP-4 E SIO ₂ -4.....	103

ESTUDO DA CLIVAGEM DO DNA PLASMIDAL (PBSK II) PELO COMPLEXO 4 E SI3AP-4.....	106
REFERÊNCIAS.....	109
CAPÍTULO 6.....	110
ANEXOS.....	114
ANEXO 1.....	114
ANEXO 2.....	125
ANEXO 3.....	138

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do sítio ativo da desoxi-hemeretrina e oxihemeretrina resolução 2.0 Å. (STENKAMP, 1984).....	28
Figura 2: Mecanismo proposto para a hidrólise de fosfatos nas fosfatases ácidas (KIMURA, 2000; FONTECAVE, 1988; KREBS, 1996)	30
Figura 3: Síntese do ligante H ₂ BPPAMFF	50
Figura 4. MET imagem da sílica (esquerda) e da magnetite recoberta de sílica (direita) preparadas pelo método da microemulsão.	52
Figura 5. Mecanismo proposto para o sítio catalítico da uréase (LIPPARD, 1995).	58
Figura 6. Espectro no infravermelho complexo [Ni ₂ (HBPPAMFF)(μ-AcO) ₂ (H ₂ O)]BPh ₄	60
Figura 7. Espectro eletrônico complexo(1) em acetonitrila em (a) bandas de transferência de carga interna do ligante e em (b) transição d-d	60
Figura 8. Voltamograma cíclico de (1) em acetonitrila (0.1 mol.L ⁻¹) com [Bu ₄ N][PF ₆] como eletrólito suporte trabalhando com eletrodo de ouro padrão do ferroceno, taxa de varredura interna 100 mV.s ⁻¹	61
Figura 9: Espectro de massa (ESI-MS) do complexo 1.	61

Figura 10: Estrutura parcial do cátion complexo $[\text{Ni}_2(\text{Hbppamff})(\mu\text{-C}_6\text{H}_5\text{COO})_2(\text{H}_2\text{O})]$ 63

Figura 11. Estrutura proposta para o complexo $[\text{Ni}_2(\text{Hbppamff})(\mu\text{-OAc})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{BPh}_4$ 64

Figura 12: Espectro UV-vis do complexo 1 e do sistema Si3AP-1 (suspensão em benzeno)..... 64

Figura 13: Espectro UV-vis do complexo 1 e dos sistemas Si0-1 e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -1 em pastilha de KBr..... 65

Figura 14: Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP (v_0) com o pH para o complexo 1 em solução. Condições: $[\text{Complexo}] = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$; $[2,4\text{-BDNPP}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$; $[\text{Tampão}] = 50,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $I = 50,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (LiClO_4) em solução $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (50% V/V) a 25°C 66

Figura 15: Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP com a concentração do substrato para o complexo 1. Condições: $[\text{Complexo}] = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{Tampão}] = 50,0 \times 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$ (CHES, pH = 9,00); $I = 50,0 \times 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$ (LiClO_4) em solução $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (50% V/V) a 25°C 66

Figura 16. Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP (v_0) com o pH para os sistemas Si3AP-1 e Si0-1 na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP. 67

Figura 17: Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP (v_0) com a variação do substrato para os sistemas **Si3AP-1** e **Si0-1** na hidrólise do 2,4-BDNPP..... 68

Figura 18: Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP (v_0) com a variação do substrato para os sistemas **Fe₃O₄@SiO₂-1**..... 68

Figura 19: Dependência da velocidade de reação do 2,4-DNPP com a concentração do substrato para o complexo 1. Condições: [Complexo] = $1,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹; [Tampão] = $50,0 \times 10^{-3}$ mol. L⁻¹ (CHES, pH = 9,00); $I = 50,0 \times 10^{-3}$ mol. L⁻¹ (LiClO₄) em solução H₂O/CH₃CN (50% V/V) a 25 °C. 71

Figura 20: Mecanismo proposto para a hidrólise de fosfomonoesteres pela fosfatase ácida púrpura (HEGG, 1998). O sítio ativo neste mecanismo esta baseado na estrutura cristalina da fosfatase ácida púrpura do feijão vermelho ($M^{2+} = Zn^{2+}$) (STRATER, 1995). 79

Figura 21: Sítio ativo da fosfatase ácida púrpura do feijão vermelho, com resolução de 2.9 Å (STRATER, 1998)..... 80

Figura 22: ORTEP para o cátion complexo [FeNi(bppamff)(μ -AcO)₂(H₂O)]⁺ 82

Figura 23: ORTEP para o cátion complexo [FeZn(bppamff)(μ -AcO)₂(H₂O)]⁺ 84

Figura 24: Espectro vibracional na região do infra-vermelho em pastilha de KBr para os complexos 2 e 3.	85
Figura 25: Espectro eletrônico UV-vis para os complexos 2 e 3 em solução de acetonitrila (10^{-3} mol/L).	85
Figura 26: Voltamograma cíclico do complexo 2 e 3 em diclorometano seco ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ [TBA][PF ₆] eletrólito suporte, eletrodo de trabalho: carbono vítreo; eletrodo de referencia Ag/AgCl; eletrodo suporte Pt; padrão interno: ferroceno; velocidade de varredura 100 mV.s^{-1}).	86
Figura 27: Esquema de distribuição das espécies para os complexos 2 e 3 em função do pH.	87
Figura 28: Espectro UV-vis como função dos valores de pH para 2 e 3 ($2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl).	88
Figura 29: Análise de EPR sólido 298K (A) Si3AP-2 (B) Si3AP-3	89
Figura 30: Espectro UV-vis dos complexos 2 e 3 e dos sistemas Si3AP-2 e Si3AP-3 (suspensão em benzeno).	89
Figura 31 Dependência da velocidade inicial (V_0) em função do pH na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovido pelos complexos 2 e 3. [Complexo] = $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; [2,4-BDNPP] = $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; [tampão] = $50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $I = 50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (LiClO ₄) em H ₂ O/CH ₃ CN (50% v/v) a 25 °C.	90

Figura 32: Dependência da velocidade inicial (V_0) em função da concentração do substrato na hidrólise do 2,4-BDNPP promovido pelos complexos 2 e 3. Condições: [complexo] = $1,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹; [tampão] = 50×10^{-3} mol.L⁻¹ (HEPES pH 7,00; MES, pH 6,00; $I = 50 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (LiClO₄) em H₂O/CH₃CN (50% v/v) a 25 °C. 92

Figura 33: Dependência da velocidade inicial (V_0) em função do pH na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovido pelos sistemas Si3AP-2 e Si3AP-3. [Complexo] = 5 mg; [2,4-BDNPP] = $2,5 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; [tampão] = 50×10^{-3} mol.L⁻¹; $I = 50 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (LiClO₄) em H₂O/CH₃CN (50% v/v) a 25 °C. 93

Figura 34: Dependência da velocidade inicial (V_0) em função da concentração do substrato na hidrólise do 2,4-BDNPP promovido pelos complexos Si3AP-2 e Si3AP-3. Condições: [complexo] = 5 mg; [tampão] = 50×10^{-3} mol.L⁻¹ (HEPES pH 7,00; MES, pH 6,00; $I = 50 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (LiClO₄) em H₂O/CH₃CN (50% v/v) a 25 °C. 93

Figura 35: Estudo da influência da Si3AP na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP [Si3AP] = 3 mg; [2,4-BDNPP] = $2,5 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; [tampão] = 50×10^{-3} mol.L⁻¹ HEPES pH 7,00; $I = 50 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (LiClO₄) em H₂O/CH₃CN (50% v/v) a 25 °C. 94

Figura 36: Interação do suporte Si3AP com o substrato 2,4-BDNPP na estabilização do estado ativo do substrato. 94

Figura 37: Estrutura ORTEP do cátion complexo 4. 101

Figura 38: Caracterização do sistema Si3AP-4: acima espectro infravermelho em pastilha de KBr do sistema Si3AP-4 e da sílica Si3AP; abaixo à esquerda, espectro eletrônico UV-vis sólido suspensão em benzeno; abaixo à direita espectro de EPR sólido 298K. 102

Figura 39: Estudo da reatividade dos sistemas Si3AP-4 e SiO₂-4. (A) Dependência da velocidade inicial (V_0) em função do pH na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovido pelo sistema Si3AP-4. [Complexo] = 3 mg; [2,4-BDNPP] = $2,5 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; [tampão] = 50×10^{-3} mol.L⁻¹; $I = 50 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (LiClO₄) em H₂O/CH₃CN (50% v/v) a 25 °C; (B) e (C) Dependência da velocidade inicial (V_0) em função da concentração do substrato na hidrólise do 2,4-BDNPP promovido pelo complexo Si3AP-4 e SiO₂-4. Condições: [complexo] = 3 mg; [tampão] = 50×10^{-3} mol.L⁻¹ (HEPES pH 7,00 $I = 50 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (LiClO₄) em H₂O/CH₃CN (50% v/v) a 25 °C. 103

Figura 40: Interação do suporte Si3AP com o substrato 2,4-BDNPP na estabilização do estado ativo do substrato. 104

Figura 41: Primeira reutilização do sistema Si3AP-4. Condições: [complexo] = 3 mg; [tampão] = 50×10^{-3} mol.L⁻¹ (HEPES pH 7,00 $I = 50 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (LiClO₄) em H₂O/CH₃CN (50% v/v) a 25 °C. 106

Figura 42: Teste na clivagem do DNA plasmidial pBSK II, 10 mL de tampão HEPES pH 7,00 a 50°C por 16 horas. (A) complexo 4 (B) Si3AP-4. As concentrações estão indicadas nas figuras. 107

Figura 43: Teste na clivagem do DNA plasmidial pBSK II, 10 mL de tampão HEPES pH 7,00 a 50°C por 2 horas na presença e ausência de distamicina para o complexo 4..... 108

LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS

Tabela 1: Dados Cristalográficos e refinamento da estrutura para o complexo 1	62
Tabela 2: Tabela comparativa de distâncias interatômicas (Å) de ligação selecionados para o complexo [NiNi(bppamff)(μ-BzO) ₂ (H ₂ O)]ClO ₄ (1).....	63
Tabela 3: Parâmetros cinéticos para a hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo 1 em solução e imobilizado em pH 9 a 25 °C.....	70
Tabela 4: Dados Cristalográficos e refinamento da estrutura para os complexos 2 e 3	81
Tabela 5: Tabela comparativa de distâncias interatômicas (Å) e ângulos (°) de ligação selecionados para os complexos [FeNi(bppamff)(μ-AcO) ₂ (H ₂ O)]ClO ₄ (2) e [FeZn(bppamff)(μ-AcO) ₂ (H ₂ O)]ClO ₄ (3).....	83
Tabela 6: Constantes de desprotonação para os sistemas 2 , 3 , Si3AP-2 e Si3AP-3.....	87
Tabela 7: Parâmetros cinéticos para a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovido pelos sistemas 2 , 3 , Si3AP-2 e Si3AP-3	91
Tabela 8: Parâmetros cinéticos para a hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo 4 em solução e imobilizado em pH 7,00 a 25 °C.....	104
Esquema 1: Esquema da sistemática utilizada para a síntese de complexos-modelo.....	24
Esquema 2: Proposta mecanística para a hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo.....	70

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.

ϵ	coeficiente de absorvidade molar
ν	estiramento (IV)
δ	deformação angular (IV)
δ_H	deslocamento químico do hidrogênio (RMN 1H)
$\lambda_{m\acute{a}x}$	comprimento de onda, no máximo de absorção
2,4-BDNPP	bis(2,4-dinitrofenil)fosfato
2,4-DNPP	2,4-dinitrofenil fosfato
BPA	N-benzil-N-2-piridilmetilamina
BPAMFF	2-(N-benzil-N-2-piridilmetilamina)-4-metil-6-formilfenol
BPAPyFF	2-[(N-benzil-N-2-piridilmetilamina)]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil]fenol
H ₂ BPPAMFF	2-[(N-benzil-N-2-piridilmetilamina)]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil)]-4-metil-6-formilfenol
CH ₃ CN	Acetonitrila
CHES	ácido 2-[N-cicloexilamino]etanosulfônico
CMFF	2-clorometil-4-metil-6-formilfenol
DNA	ácido desoxirribonucléico
E	Eficiência catalítica

NHE	Eletrodo normal de hidrogênio
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
f	fator catalítico
HEPES	ácido 2-[4-(2-Hidroxi-etil)-1-piperazino]-etanosulfônico
<i>I</i>	Força iônica
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
IV	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho
K_{ass}	Constante de associação
kbPAP	Fosfatase ácida púrpura de feijão vermelho
k_{cat}	Constante catalítica
k_{unc}	Constante da reação não catalisada
K_M	Constante de Michaelis-Menten
MeOH	Metanol
MES	Ácido 2-[N-Morfolino]etanosulfônico
NaBPh ₄	Tetrafenilborato de sódio
NaOAc	Acetato de sódio
P. F.	Ponto de fusão

PAPs	Fosfatases Ácidas Púrpuras
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RPE	Ressonância paramagnética eletrônica
TMS	tetrametilsilano
ufPAP	Fosfatase ácida púrpura de fluido uterino de suínos
UV-Vis	espectroscopia na região do ultravioleta-visível-infravermelho próximo
V ₀	velocidade inicial
V _{máx}	velocidade máxima

RESUMO

A eficiência dos íons metálicos em promover a hidrólise de fosfatos em sistemas biológicos depende de vários fatores, incluindo a natureza dos íons metálicos, do ambiente de coordenação destes íons nas enzimas, da espécie de ester de fosfato e do complexo formado entre ele e a enzima. A disponibilidade de um nucleófilo hidróxido em uma posição favorável para o ataque ao fosfato pode ser considerada a etapa crítica da reação. Os fosforodiesteres são excepcionalmente estáveis ajustando-se assim no papel da formação do material genético.

Nucleases típicas aceleram a velocidade da hidrólise do DNA em um fator que excede 10^{10} . O papel dos íons metálicos em promover a hidrólise de ésteres fosfatos e polifosfatos tem sido objeto de consideráveis estudos para se conhecer as vias pelas quais os metais atuam nestes processos.

Neste estudo, nós reportamos a síntese e caracterização de quatro novos complexos $[\text{Ni}_2(\text{Hbppamff})(\mu\text{-AcO})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{BPh}_4$ (**1**), $[\text{FeNi}(\text{bppamff})(\mu\text{-AcO})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ (**2**), $[\text{FeZn}(\text{bppamff})(\mu\text{-AcO})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ (**3**) e $[\text{FeZn}(\text{L}^1)(\mu\text{-OH})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ (**4**). Suas atividades foram estudadas através da hidrólise do substrato modelo bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato em meio homogêneo e heterogêneo como modelos para a urease (complexo 1) e fosfatase ácida púrpura (complexos 2, 3 e 4). Comparando as atividades dos complexos (k_{cat}) $1 > 2 > 3 \approx 4$. As diferentes atividades observadas para estes complexos mostram uma dependência como o pH reacional para a formação do nucleófilo assim como a disponibilidade de sítios lábeis para a coordenação do substrato como etapas importantes para uma hidrólise eficiente do substrato.

ABSTRACT

The effectiveness of metal ions in promoting the hydrolysis of phosphate species in biological systems is a function of many factors, including the nature of the metal ion (with attached ligands), the phosphate species and the compositions and structures of complexes formed between them. The availability of a nucleophile, such as a suitably positioned coordinated hydroxide, is also critical to an effective hydrolysis process. Phosphodiester are exceptionally stable, making them uniquely suited to their role as the backbone for genetic material. Typical nucleases accelerate the rate of DNA hydrolysis by factors exceeding 10^{10} . Most nucleases use metal ions as cofactors, but the precise role of the metal in the hydrolytic mechanism is unclear. In order to identify possible mechanisms by which metal ions promote phosphodiester hydrolysis, model compounds have been used to study the reactivity or coordinated phosphodiester.

In this study, we report the synthesis and characterization of four heterobinuclear non-heme compounds $[\text{Ni}_2(\text{Hbppamff})(\mu\text{-AcO})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{BPh}_4$ (**1**), $[\text{FeNi}(\text{bppamff})(\mu\text{-AcO})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ (**2**), $[\text{FeZn}(\text{bppamff})(\mu\text{-AcO})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ (**3**) e $[\text{FeZn}(\text{L}^1)(\mu\text{-OH})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ (**4**). Their reactivity was studied towards the hydrolysis of bis-(2,4-dinitrophenyl)phosphate in homogeneous and heterogeneous moiety as models for the purple acid phosphatase and urease activity. Comparing the reactivity towards phosphodiester hydrolysis we observed that compound 1 has shown the higher reactivity, comparatively (k_{cat}) $1 > 2 > 3 \approx 4$. The reactivity difference observed for these complexes clearly shows that the pH and accessibility of the substrate to the reaction site is one of the key steps that determinate the hydrolysis efficiency.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL AO TEMA

INTRODUÇÃO

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

A QUÍMICA BIOINORGÂNICA

A química bioinorgânica, também chamada de bioquímica inorgânica, é o ramo da bioquímica que estuda o papel dos metais (em particular dos metais de transição) em sistemas biológicos. O campo de estudos da Química Bioinorgânica abrange o efeito da adição de metais exteriores aos sistemas vivos (como por exemplo na avaliação da sua toxicidade ou na sua aplicação medicinal) e a determinação da estrutura e função de metaloproteínas. Esta disciplina evoluiu a partir dos estudos da Química Inorgânica aplicada a sistemas vivos. (LIPPARD, 1994).

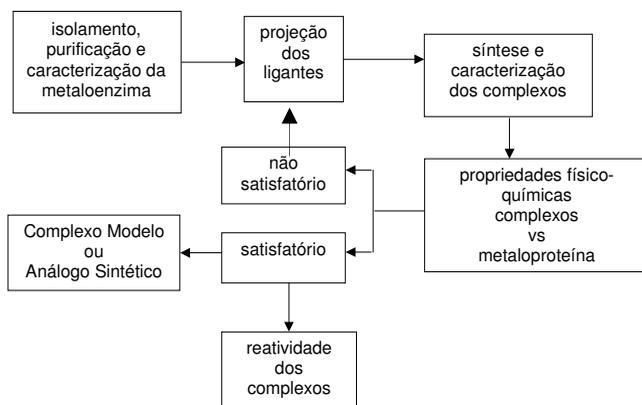
Embora os compostos orgânicos desempenhem a maioria das funções biológicas, a natureza aprendeu a utilizar as propriedades

especiais dos metais, constituintes naturais de algumas enzimas, para exercer uma ampla variedade de funções específicas associadas ao processo da vida. Os elementos de principal interesse na Química Bioinorgânica são os metais alcalinos terrosos, vanádio, manganês, cobalto, cobre, níquel, zinco, ferro, gálio, entre outros.

Sendo um dos objetivos da Química Bioinorgânica o desenvolvimento de compostos modelos, este processo usualmente segue uma sistemática (KAIN, 1994) que se inicia com o isolamento e purificação da enzima de interesse com posterior estudo das propriedades físico-químicas e caracterização preliminar dos constituintes do sítio ativo.

Com base nos dados obtidos a partir da enzima prossegue-se com o projeto de um ligante capaz de mimetizar características dos aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima para então, sintetizar e caracterizar os complexos modelos, analisando também sua estrutura e posteriormente sua reatividade. A seguir, o esquema da sistemática que os químicos bioinorgânicos costumam seguir para o desenvolvimento de novos complexos modelos.

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



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

METALOENZIMAS

Metaloenzimas e metaloproteínas são biomoléculas que contém, no mínimo, um íon metálico em seu sítio ativo (LIPPARD, 1994). Assim, o sítio ativo de uma proteína consiste de um ou mais íons metálicos, toda a cadeia lateral da proteína, pontes exógenas e ligantes terminais que definem a primeira esfera de coordenação de cada íon metálico.

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

As enzimas são internacionalmente classificadas (NC-IUBMB, 2003), de acordo com as reações por elas catalisadas, em:

Oxirredutases : responsáveis pela catálise de transferência de elétrons;

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

Hidrolases: responsáveis pela catálise de reações de hidrólise;

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

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

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

O NÍQUEL E SEU PAPEL BIOLÓGICO

Por um longo tempo o níquel foi o metal de transição 3d menos pesquisado em relação ao seu papel biológico quando comparado aos outros metais da primeira série de transição. As razões para esta omissão são muitas: os íons níquel não exibem uma banda de absorção característica na presença de ligantes fisiológicos, os efeitos da espectroscopia Mössbauer não são em geral acessíveis para isótopos de níquel, e até a espectroscopia de RPE, Ni^{I} (d^9) paramagnético ou Ni^{III} (d^7), pode causar equívoco devido a baixa abundância de isótopos do mesmo (a abundância natural de ^{61}Ni com $I = 3/2$ é apenas 1,25%). Além

disso, o níquel é apenas um entre vários componentes de uma enzima complexa que contém muitas outras coenzimas adicionadas ao material inorgânico (KAIN, 1994).

Por exemplo, centros de níquel remanescentes não foram detectados por um longo tempo porque estavam frequentemente associados a clusters de Fe/S. Entretanto aplicando-se métodos de detecção mais sensíveis como à absorção atômica ou a emissão espectroscópica (AAS ou AES), medidas magnéticas (suceptometro SQUID), ou espectroscopia de RPE usando material enriquecido com ^{61}Ni , foi possível estabilizar e caracterizar parcialmente algumas enzimas de plantas e microorganismos que contém níquel. O níquel não é particularmente raro na litosfera ou na água do mar onde é solúvel e se encontra na forma de Ni^{2+} . Até hoje não foram relatados sintomas de doenças causadas pela falta de níquel em seres humanos por se tratar de um elemento ultratraço (NIELSEN, 1991), porém já foram relatados casos de alergia a níquel pelo excesso deste metal no corpo (PATEL, 1993).

O níquel hoje em dia é reconhecido como um elemento traço essencial para as bactérias, plantas, animais e seres humanos (LANCASTER, 1988). Durante algum tempo os modelos bioquímicos deste metal nos animais não estavam muito bem definidos, até hoje foram encontrados apenas quatro enzimas (em bactérias) que dependem do níquel: Ureases (também encontrada em plantas), monóxido de carbono dextrogenase (CODH), Hidrogenase (H_2 -ase) e metil-S-coenzima M metil redutase (MCR) que empregam um átomo de níquel no grupo prostético (fator 430). O níquel dentro de cada proteína é diferente, por exemplo, em seu número de coordenação (4, 5 ou 6) ou coordenados a ligantes N, O ou S doadores ou até mesmo em seu estado de oxidação; entretanto, os centros de níquel estão ligados a resíduos do sítio ativo das enzimas e intimamente envolvidos no seu ciclo catalítico (NRIAGU, 1980).

Vários aspectos da química biológica do níquel são incomuns no conhecimento da química de coordenação do níquel: três das quatro enzimas são conhecidas por conter centros de níquel redox ativo, cujo estado de oxidação pode variar entre +3, +2 e ou +1 em ligantes ricos em tiolato e tetrapirrois. Sabe-se que as reações catalisadas por estas enzimas; clivagem da ligação C-S (MCR), a oxidação do H_2 e a redução do H^+ (H_2 -ase), e a interconversão do CO em CO_2 e a formação ou clivagem da ligação C-S e C-C (DOCH) são muitíssimo incomuns para complexos inorgânicos de níquel. A exceção é a Urease que é, portanto

o único exemplo do emprego natural do íon Ni^{+2} como um ácido de Lewis catalítico (KAIN, 1994).

Com exceção da uréase (BENINI, 1999; JABRI, 1995) nenhuma das enzimas acima foi caracterizada por cristalografia de raios x e o conhecimento dos seus sítios ativos e modelos de atividade são muito limitados porque os dados foram obtidos por técnicas físico-químicas. Estas incertezas inspiram um grande interesse na química de coordenação do níquel.

O FERRO E SEU PAPEL BIOLÓGICO

Complexos de ferro homo e hetero binucleares com pontes μ -hidroxo e μ -oxo têm recebido muita atenção recentemente na química bioinorgânica devido a sua ocorrência em muitos organismos e seu envolvimento em muitas funções biológicas (SHTEINMAN, 2000; KAIN, 1994). Metaloproteínas com sítios ativos binucleares são essenciais para o transporte de oxigênio em muitos invertebrados marinhos (hemeretrina), para a biossíntese do DNA (ribonucleotídeo redutase) e para a hidrólise de ésteres fosfatos (fosfatases ácidas púrpuras). Destacam-se também as metano-monooxigenases, as quais participam na oxidação biológica de carboidratos normalmente transformados em dióxido de carbono (KAIN, 1994).

Entre outras proteínas que contêm ferro em seus sítios ativos e em cujos centros de ferro encontram-se grupos fenóxidos coordenados, pode-se destacar uma subclasse chamada proteína ferro-tirosinase como a lactoferrina, a transferrina e as fosfatases ácidas púrpuras. Nestas proteínas as interações ferro-fenóxido atuam na estabilização da geometria, bem como na atividade do sítio ativo (WANG, 1997).

A hemeretrina foi à primeira proteína de ferro caracterizada estruturalmente (FONTECAVE, 1998). Ela é uma proteína transportadora de oxigênio em invertebrados marinhos fazendo o papel que a hemoglobina e a mioglobina têm para os mamíferos. O sítio ativo está localizado em uma rede de quatro hélices, que constitui uma subunidade de um complexo protéico tipicamente multimérico. Cada sítio binuclear contém dois grupos μ -1,3-carboxilato e uma ponte oxo. O restante da esfera de coordenação ao redor de cada ferro é preenchido com grupos imidazol de cinco resíduos de histidina (Figura 1) (DU BOIS, 2000).

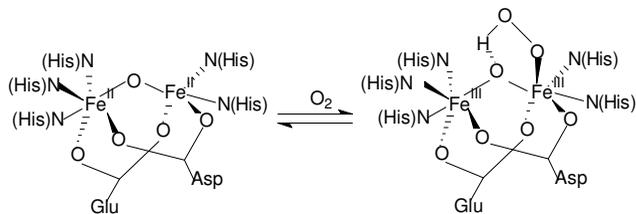


Figura 1: Estrutura do sítio ativo da desoxi-hemereitina e oxi-hemereitina resolução 2.0 Å. (STENKAMP, 1984)

As estruturas de muitas macromoléculas contendo centros binucleares de ferro têm sido elucidadas através de extensivos estudos bioquímicos, espectroscópicos e cristalográficos. Apesar disso, o entendimento de detalhes mecânicos de como a proteína se liga ou ativa o substrato não são bem delineados. A construção de moléculas pequenas, que mimetizem metaloenzimas, oferece um desafio no campo de projeto e síntese de novos ligantes, na química de coordenação, reconhecimento molecular e catálise.

Na natureza, os sítios ativos das proteínas se localizam em uma grande rede de polipeptídios. As diversidades nas estruturas e composições destes sítios ativos contendo metal determinaram diferentes funções das metaloproteínas. O desenvolvimento de complexos binucleares de ferro que reproduzam tanto propriedades estruturais como funcionais destes centros tem sido objeto de pesquisas na área da química bioinorgânica (DU BOIS, 2000).

NUCLEASES QUÍMICAS

A hidrólise biomimética do DNA ou do RNA é de extrema importância na biotecnologia e na medicina. A habilidade de clivar ácidos nucleicos de forma eficiente, e não de maneira degradativa, e com altos níveis de seletividade para sítios ou estruturas podem oferecer diversas aplicações como na manipulação genética terapêutica, no desenvolvimento de novos fármacos e sondas de DNA (COWAN, 2001).

As nucleases catalisam a clivagem hidrolítica da cadeia de fosfodiésteres do DNA e RNA. Por isso há um crescente interesse no desenvolvimento de nucleases químicas, reagentes que possam reconhecer e clivar estruturas ou seqüências específicas do ácido nucleico (BURSTYN, 1993).

O desenvolvimento de nucleases artificiais para o uso em genética molecular e engenharia genética é um desafio para muitos pesquisadores devido à grande estabilidade da cadeia dos diésteres fosfatos do DNA e sua resistência à clivagem hidrolítica (TROGLER, 1990). Nucleases típicas aceleram a velocidade da hidrólise do DNA em um fator que excede 10^{10} (WILLIAMS, 1999; WESTHEIMER, 1987). Muitos catalisadores sintéticos testados exibem uma velocidade baixa para a hidrólise do DNA; (LIU, 2004) e um melhor entendimento das características mecanísticas dessa reação poderia ser útil no desenvolvimento de sistemas mais efetivos.

O papel dos íons metálicos em promover a hidrólise de ésteres fosfatos e polifosfatos tem sido objeto de consideráveis estudos para se conhecer as vias pelas quais os metais atuam nestes processos. Acredita-se que o centro binuclear facilite a hidrólise de fosfodiésteres pelo uso de um sítio metálico para a ativação do substrato e do outro sítio como um ácido de Lewis diminuindo o pK_a da água, liberando o nucleófilo hidróxido para o ataque ao substrato como visto para as PAPs (KIMURA, 2000; FONTECAVE, 1998) (Figura 2). Entretanto, algumas hidrolases sintéticas contendo centros mononucleares também têm sido utilizadas em processo hidrolíticos do DNA (PARIMALA, 2003; RAWJI, 2000; MORROW, 1988; DEAL, 1996).

Uma contribuição crucial para o entendimento das propriedades espectroscópicas e da reatividade dos centros ativos das nucleases é dada pela síntese e caracterização de complexos-modelo binucleares (MITIC, 2006; NEVES, 2005a, 2005b, 2002; KRAMER, 1999; THAN, 1999; SANDLER, 1995).

Muitos estudos são realizados com complexos do tipo $(OH_2)\text{-Fe-O-Fe}(OH_2)$ têm sido demonstrados que a desprotonação sucessiva da ligação Fe-OH_2 ocorre durante o tratamento com bases tanto em solventes orgânicos como em água. Além desses complexos de ferro também foram testados complexos de Co(III) , Ni(II) , Cu(II) , Zn(II) , Pd(II) e Pt(II) na hidrólise de diésteres fosfatos (NEVES, 2007; WILLIAMS, 1999; YOUNG, 1995; BURSTYN, 1993; TROGLER, 1990).

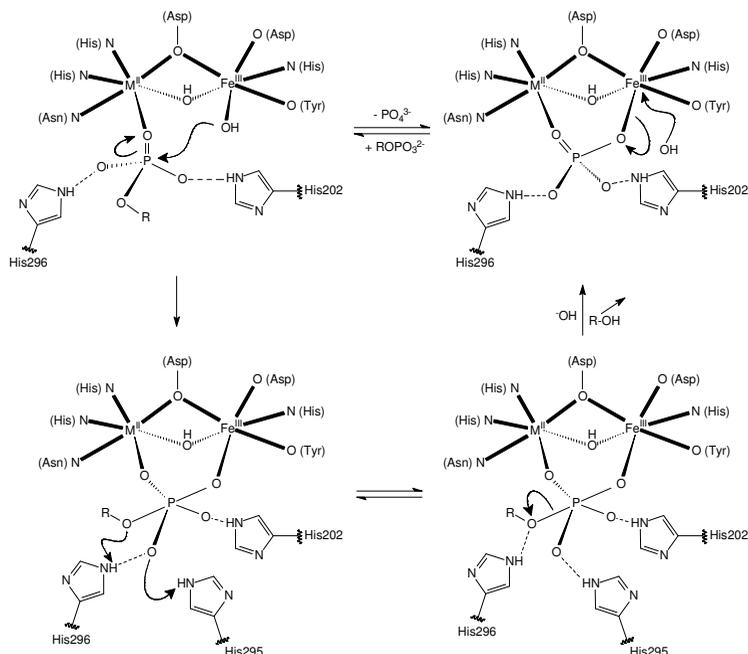


Figura 2: Mecanismo proposto para a hidrólise de fosfatos nas fosfatases ácidas (KIMURA, 2000; FONTECAVE, 1988; KREBS, 1996)

IMOBILIZAÇÃO DE METALOCOMPLEXOS E A REAÇÃO EM MEIO HETEROGÊNEO

O estudo da atividade catalítica de complexos metálicos em solução, inspirado pela atividade catalítica dos sistemas biológicos, tem sido reportado por muitos grupos de pesquisa, sendo estes compostos sistemas catalíticos eficientes para as reações de oxidação de hidrocarbonetos (GUILHERME, 2007; PIOVEZAN, 2005; RYLE, 2002), na liberação controlada de fármacos (MURA, 2007; ZHANG, 2007; TERAQ, 2006), reações de esterificação para a produção de biodiesel (CHEN, 2007; VIEIRA, 2006; OCAIRE, 2006), processo de controle da poluição ambiental (branqueamento) (ZUCCA, 2007; FRUHWIRTH, 2002; HALMA, 2002; SALEN, 2000;) entre outros.

Tem sido estudada também a imobilização de compostos em suportes buscando a formação de estruturas organizadas que permitam

um grande acesso do substrato ao sítio catalítico. A imobilização de complexos metálicos associados com a produção e a facilidade de reciclagem do sólido, como exemplo um suporte inorgânico (argilas ou sílica gel) ou um biopolímero (quitosana ou ciclodextrina), pode fazer com que esses compostos possam ser utilizados diversas vezes. A aplicação imediata deste tipo de material pode resolver problemas de controle da poluição ambiental além de atuarem como liberadores controlados de fármacos.

A combinação de catalisadores eficientes imobilizados em suportes inorgânicos ou biopolímeros tem mostrado eficiência e seletividade na catálise de oxidação de hidrocarbonetos, por exemplo. A matriz do suporte pode impor uma forma seletiva ao catalisador e promover um ambiente favorável para a aproximação do substrato à espécie ativa (BEDIOIU, 1995a, 1995b; BARLOY, 1998). Além disso, a imobilização pode prevenir a agregação molecular ou a destruição do catalisador durante a reação, o qual leva à desativação da espécie catalítica.

NANOPARTICULAS INORGÂNICAS COMO TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS

A introdução de nanopartículas inorgânicas em biofármacos é relativamente nova e pode gerar um novo e promissor aspecto para o transporte de fármacos (BOTTICHE, 1999) e de genes (KNEUER, 2000). Nanopartículas de sílica não estruturada têm sido utilizadas com este propósito, já que SiO_2 é um composto não tóxico presente em uma série de sistemas farmacêuticos, como tabletes, suspensões etc. Uma série de ligantes pode ser inserida na superfície da sílica (que contém uma modificação terminal) alterando, desta forma, suas propriedades, como reatividade frente à hidrólise de ésteres de fosfato.

Nanopartículas magnéticas também tem encontrado uso na vetorização de drogas, diagnóstico e terapia. Na classe de nanomateriais magnéticos a ser estudada encontram-se principalmente os óxidos de ferro (Fe_3O_4 , Fe_2O_3). Estes óxidos são caracterizados pelo superparamagnetismo, que confere a esses materiais grande facilidade de isolamento e separação de meios multifásicos complexos pelo simples uso de um ímã, e sua fácil re-dispersão depois de interrompida a aplicação do campo (SUN, 2004; HYEON, 2001;). Assim, nanomateriais com tais características são excelentes suportes para as mais variadas aplicações: na imobilização de catalisadores para serem facilmente separados do meio reacional e reutilizados, na ligação de

ligantes seletivos para a construção de nanoadsorventes seletivos para metais e na ligação de drogas para a liberação controlada em locais específicos.

O principal problema é a fixação das moléculas de interesse na superfície dos nanomateriais magnéticos através de ligações suficientemente estáveis. Outro problema é que o Fe_3O_4 tende a sofrer oxidação, quando exposto diretamente ao meio biológico, formando grandes agregados e alterando suas propriedades magnéticas. Portanto, torna-se importante o desenvolvimento de metodologias para o revestimento de suas superfícies e a investigação de suas propriedades magnéticas. A presença de uma camada constituída de diferentes tipos de polímeros ou silicatos na superfície das nanopartículas magnéticas contribui para o aumento da dispersão, da estabilidade química, da biocompatibilidade e, sobretudo, a fácil ligação covalente de moléculas de interesse (LU, 2006).

O revestimento das nanopartículas com uma matriz orgânica (ex. polímeros) ou inorgânica (ex. sílica) pode ser realizado através de pelo menos três métodos: (i) silanização direta, (ii) sol-gel ou (iii) microemulsões, onde um grande número de nanopartículas é ocluído numa nanoesfera de um outro material (YI, 2006; HERRICKS, 2005; LU, 2002; PHILIPSE, 1994; OHMORI, 1993; OHMORI, 1992). No caso da sílica, a superfície é composta por grupos silanóis facilmente modificáveis pelo uso de reagentes trialcooxissilanos, podendo ser facilmente geradas superfícies quimicamente modificadas. Tais superfícies com grupos funcionais reativos são ideais para o ancoramento, por ligação covalente, de moléculas alvo (ligantes quelatos) através de ligações suficientemente estáveis. Complexos metálicos bioinspirados podem ser, desta forma, imobilizados na superfície de nanomateriais magnéticos. A imobilização de compostos biomiméticos em nanomateriais magnéticos permitirá o direcionamento, transporte e localização destes pelas propriedades magnéticas, ou mesmo o uso dos mesmos como catalisadores facilmente recuperáveis dos meios reacionais.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BARLOY, L.; LALLIER, J. P.; BATTIONI, P.; MANSUY, D.; PIFFARD, Y.; TOURNOUX, M.; JONES, W., Shape selectivity for alkane hydroxylation with a new class of phosphonate-based heterogenised manganese porphyrins, New Journal Chemistry, v. 8, p. 901, **1998**.

BEDIOIU, F.; DEVYNCK, J.; BIED-CHARRENTON, C., Immobilization of metalloporphyrins in electropolymerized films: design and applications, Accounts of Chemical Research, v. 28, p. 30, **1995**.

BEDIOIU, F; Zeolite-encapsulated and clay-intercalated metal porphyrin, phthalocyanine and Schiff-base complexes as models for biomimetic oxidation catalysts: an overview, Coordination Chemical Reviews, v. 144, p. 39, **1995**.

BENINI, S.; RYPNIEWSKI, W. P.; WILSON, K. S.; MILETTI, S.; CIURLI, S.; MANGANI, S. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels Structure, v. 7, p. 205, **1999**.

BOTTCHER, H.; JAGOTA C.; TREPTE, J.; KALLIES, K.H.; HAUFE, H.; Sol-gel composite films with controlled release of biocides, Journal of Controlled Release, v. 60, p. 57, **1999**.

BURSTYN, J. N.; DEAL, K. A; Selective catalytic hydrolysis of a simple phosphodiester by a macrocyclic copper(II) complex, Inorganic Chemistry, Inorganic Chemistry, v. 32, p. 3585, **1993**.

CHEN X.R., JU Y.H., MOU C.Y., Direct Synthesis of Mesoporous Sulfated Silica-Zirconia Catalysts with High Catalytic Activity for Biodiesel via Esterification, Journal Physical Chemistry C, v. 111 p. 18731, **2007**.

COWAN J. A., Chemical Nucleases, Current Opinion in Chemical Biology, v. 5, p. 634, **2001**.

DEAL K. A., BURSTYN J. N.; Mechanistic Studies of Dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-Catalyzed Phosphate Diester Hydrolysis, Inorganic Chemistry, v. 35, p. 2792, **1996**.

DU BOIS, J.; MIZOGUCHI, T. J.; LIPPARD, S. J., Understanding the dioxygen reaction chemistry of diiron proteins through synthetic modeling studies, Coordination Chemical Reviews, v. 200, p. 443, **2000**.

FONTECAVE, M.; MENAGE S.; DUBOC-TOIA, C., Functional models of non-heme diiron enzymes, Coordination Chemical Reviews, v. 178, p. 1555, **1998**.

FRUHWIRTH G.O., PAAR A., GUDELJ M., CAVACO-PAULO A., ROBRA K.H., GUBITZ G.M.; An immobilised catalase peroxidase from the alkalothermophilic Bacillus SF for the treatment of textile-bleaching effluents, Applied Microbiology Biotechnology, v. 60, p. 313, **2002**.

GUILHERME L.R., DRECHSEL S.M., TAVARES F., DA CUNHA C.J., CASTAMAN S.T., NAKAGAKI S., VENCATO I., BORTOLUZZI A.J.; Synthesis, structural characterization, catalase-like function and epoxidation activity of a mononuclear manganese(II) complex, Journal Molecular Catalysis A – Chemistry, v. 269, p. 22, **2007**.

HALMA, M.; WYPYCH, F.; DRECHSEL, S. M.; NAKAGAKI, S., Synthesis, characterization and catalytic behavior of iron porphyrins immobilized in layered double hydroxides, Journal Porphyrins and Phthalocyanines, v. 6, p. 502, **2002**.

HYEON, T.; LEE S.S.; PARK, J.; CHUNG, Y.; NA H.B.; Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Maghemite Nanocrystallites without a Size-Selection Process, Journal of the American Chemical Society, v. 123, p. 12798, **2001**.

IM S.H.; HERRICKS T., LEE Y.T., XIA Y., Synthesis and characterization of monodisperse silica colloids loaded with superparamagnetic iron oxide nanoparticles, Chemical Physics Letters, v. 401, p. 19, **2005**.

JABRI, E., CARR, M. B.; HAUSINGER, R. P.; KARPLUS, P. A., The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*, Science, v. 268, p. 998, **1995**;

KAIN, W.; SCHWEDEDESKI, B.; Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life, vol. 1, p. 173-186. John Wiley & Sons, New York, **1994**.

KIMURA, E.; Dimetallic hydrolases and their models, Current Opinion in Chemical Biology, v. 4, p. 207, **2000**.

KNEUER, C.; SAMETI, M.; BAKOWSKY, U.; SCHIESTEL, T.; SCHIRRA, H.; SCHMIDT, H.; LEHR, C.M.; A Nonviral DNA Delivery System Based on Surface Modified Silica-Nanoparticles Can Efficiently Transfect Cells in Vitro Bioconjugated Chemistry, v. 11, p. 926, **2000**.

KRÄMER R., Bioinorganic models for the catalytic cooperation of metal ions and functional groups in nuclease and peptidase enzymes, Coordination Chemistry Reviews, v. 182, p. 243, **1999**.

KREBS, B.; STRATER, N.; KLABUNDE, T.; FRÖHLICH, R.; WITZEL, H.; Mechanism of Fe(III)-Zn(II) Purple Acid Phosphatase Based on Crystal Structures, Journal of Molecular Biology, v. 259, p. 737, **1996**.

LANCASTER J.R., Bioinorganic Chemistry of Nickel, VCH, Weinheim, **1988**.

LIPPARD S. J. and J. M BERG, Principles of bioinorganic chemistry, Mill Valley: University Science Books, p.1-20, **1994**.

LIU C., M. WANG , T. ZHANG , H. SUN, DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes Coordination Chemistry Reviews, v. 248, p. 147, **2004**.

LU Y., YIN Y., MAYERS B.T., XIA Y., Modifying the Surface Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles through A Sol-Gel Approach, Nano letters, v. 2, p. 183, **2002**.

LU G.Q., XU Z.P., ZENG Q.H., YU A.B., Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery, Chemical Engineering Science, v. 61, p. 1027, **2006**.

MITIC N., SMITH S. J., NEVES A., GUDDAT L. W., GAHAN L. R., SCHENK G.; The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases, Chemical Review, v. 106, p. 3338, **2006**.

MORROW J. R., TROGLER W.C.; Hydrolysis of phosphate diester with copper(II) catalysts, Inorganic Chemistry, v. 27, p. 3387. **1988**.

MURA P., CORTI G., MAESTRELLI F., CIRRI M.; Physical–chemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl- β -cyclodextrin, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 45, p. 480, **2007**.

NEVES A. LONGHINOTTI E. L., Catalytic effect of a dinuclear $[\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]$ complex in the hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate, Inorganica Chimica Acta, v. 358, p. 2089, **2005**.

NEVES A., LANZNASTER 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 the American Chemical Society, v. 129, p. 7486, **2007**.

NEVES A., ROSSI L. M., Hydrolytic activity of a dinuclear copper(II,II) complex in phosphate diester and DNA cleavage, Inorganica Chimica Acta, v. 337, p. 366, **2002**.

NEVES A., ROSSI L.M., Synthesis, structure and properties of unsymmetrical μ -alkoxo-dicopper(II) complexes: biological relevance to phosphodiester and DNA cleavage and cytotoxic activity, Inorganica Chimica Acta, v. 358, p. 1807, **2005**.

NIELSEN F. H., Nutritional requirements for boron, silicon, vanadium, nickel, and arsenic: current knowledge and speculation, FASEB Journal, v. 5, p. 2661, **1991**.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), maio/**2003**.

NRIAGU J. O., Ed. Nickel in the Environment; Wiley: New York, p. 833, **1980**.

OHMORI M., MATIJEVIC E., Preparation and Properties of Uniform Coated Inorganic Colloidal Particles: 8. Silica on Iron, Journal of Colloid and Interface Science, v. 160, p. 288, **1993**.

OHMORI M.; MATIJEVIC E., Preparation and properties of uniform coated colloidal particles. VII. Silica on hematite, Journal of Colloid and Interface Science, v. 150, p. 594, **1992**.

ORCAIRE O., BUISSON P., PIERRE A.C., Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions, Journal Molecular Catalysis B-Enzimatic, v. 42, p. 106, **2006**.

PARIMALA S., KANDASWAMY M., Mononuclear, dinuclear nickel(II) and heterodinuclear Zn(II)Ni(II) complexes as models for the active site of phosphatase, Inorganic Chemistry Communication, v. 6, p. 1252, **2003**.

PATEL S.U., P.J. SADLER, A. TUCKER AND J. H. VILES, Direct determination of albumin in human blood plasma by ^1H NMR spectroscopy. Complexation of nickel $^{2+}$, Journal of the American Chemical Society, v. 115, p. 9285, **1993**.

PHILIPSE A.P.; van BRUGGEN M.P.B.; PATHMAMANOCHARAN C., Magnetic silica dispersions: preparation and stability of surface-modified silica particles with a magnetic core, Langmuir, vol. 10, p. 92, **1994**.

PIOVEZAN, C.; LISBOA, F; CASTRO K.A.D.F. NUNES, F.S.; NAKAGAKI, S.; DRECHSEL, S.M., Epoxidation using non-heme iron complexes in solution and immobilized on silica gel as catalysts, Applied Catalysis A: General, v. 293, p. 97, **2005**.

RAWJI G. H., YAMADA M., SADLER N. P., MILBURN R. M., Cobalt(III)-promoted hydrolysis of 4-nitrophenyl phosphate: the role of dinuclear species, Inorganica Chimica Acta, v. 303, p. 168, **2000**.

RYLE, M. J.; HAUSINGER, R. P., Non-heme iron oxygenases, Current Opinion in Chemical Biology, v. 6, p. 193, **2002**.

SALEM. I. A.; Kinetics and mechanism of the color removal from congo red with hydrogen peroxide catalyzed by supported zirconium oxide, Transition Metal Chemistry, v. 25, p. 599, **2000**.

SANDLER N.P., CHUANG C.C., MILBURN R.M., Iron(III)-Promoted Hydrolysis of 4-Nitrophenyl Phosphate, Inorganic Chemistry, v. 34, p. 402, **1995**.

SHTEINMAN, A. A.; TURKHAN, V. M.; GRISTSENKO, N.; NORDLANDER, E., Design and synthesis of new models for diiron biosites, Journal of Inorganic Biochemistry, n. 79, p. 41, **2000**.

STENKAMP, R.E.; SIEKER, L.C.; JENSEN, L.H., Binuclear Iron Complexes in Methemerythrin and Oxy Hemerythrin at 2.0 Å Resolution, Journal of the American Chemical Society, v. 106, p. 618, **1984**.

SUN, S.; ZENG, H.; ROBINSON, D.B.; Monodisperse MFe_2O_4 ($M = Fe, Co, Mn$) Nanoparticles, Journal of the American Chemical Society, v. 126, p. 273; **2004**.

TERAO K., NAKATA D., FUKUMI H., SCHMID G., ARIMA H., HIRAYAMA F., UEKAMA K.; Enhancement of oral bioavailability of coenzyme Q_{10} by complexation with δ -cyclodextrin in healthy adults, Nutricional Research, v. 26, p. 503, **2006**,

THAN R., FELDMANN A. A., KREBS B.; Structural and functional studies on model compounds of purple acid phosphatases and catechol oxidases, Coordination Chemical Review, v. 182, p. 211, **1999**.

TROGLER, W. C.; DE ROSCH, M. A.; Hydrolysis of phosphodiester with nickel(II), copper(II), zinc(II), palladium(II), and platinum(II) complexes, Inorganic Chemistry, v. 29, p. 2409, **1990**.

VIEIRA A.P.D.A., DA SILVA M.A.P., LANGONE M.A.P., Biodiesel production via esterification reactions catalyzed by lipase, Latin American Applied Research, v. 36, p. 283, **2006**.

WANG, S.; WANG, L.; WANG, X.; LUO, Q., Synthesis, characterization and crystal structure of a new tripodal ligand containing imidazole and phenolate moieties and its iron(III) complexes, Inorganica Chimica Acta, v. 254, p. 71, **1997**.

WESTHEIMER F.H., Why nature chose phosphates? Science, v. 235, p. 1173, **1987**.

WILLIAMS N.H., B. TAKASAKI, M. WALL, J. CHIN, Structure and Nuclease Activity of Simple Dinuclear Metal Complexes: Quantitative Dissection of the Role of Metal Ions Accounts of Chemical Research, v. 32, p. 485, **1999**.

WILLIAMS, N. H.; LEBUIS, A. M.; CHIN, J., A Structural and Functional Model of Dinuclear Metallophosphatases, Journal of the American Chemical Society, v. 121, p. 3341, **1999**.

YI D.K., LEE S.S., YING J.Y., Synthesis and Applications of Magnetic Nanocomposite Catalysts, Chemistry of Materials, v. 18, p. 2459, **2006**.

YOUNG M. J., WAHNON D., HYNES R. C., CHIN J, Reactivity of Copper(II) Hydroxides and Copper(II) Alkoxides for Cleaving an Activated Phosphate Diester, Journal of the American Chemical Society, v. 117, p. 9441, **1995**.

ZHANG W.F., CHEN X.G., LI P.W., HE Q.Z., ZHOU H.Y.; Chitosan and chitosan/ β -cyclodextrin microspheres as sustained-release drug carriers, Journal Applied Polymer Science, v. 103, p. 1183, **2007**.

ZUCCA P., MOCCI G., RESCIGNO A. , SANJUST E., 5,10,15,20-Tetrakis(4-sulfonato-phenyl)porphine-Mn(III) immobilized on imidazole-activated silica as a novel lignin-peroxidase-like biomimetic catalyst, Journal Molecular Catalysis A-Chemistry, v. 278, p. 220, **2007**.

CAPÍTULO 2

OBJETIVO, MATERIAIS E MÉTODOS, PARTE EXPERIMENTAL

OBJETIVOS

A compreensão da maneira como atuam as metaloenzimas tem sido facilitada pela Química Bioinorgânica. A síntese e caracterização de modelos e análogos sintéticos que mimetizem a estrutura do sítio ativo de enzimas têm fornecido relevantes informações para o trabalho na área biológica. Trata-se de um trabalho em etapas, no qual se busca o ajuste das propriedades físico-químicas dos modelos ou análogos sintéticos com as respectivas propriedades das enzimas de interesse na pesquisa, através da síntese de ligantes, dos respectivos complexos e do estudo da reatividade dos compostos obtidos. Frente a essa abordagem da Química Bioinorgânica são objetivos deste trabalho:

- 1) Síntese e caracterização de um ligante N,O doador com um braço inocente para que pelo menos um dos sítios metálicos possuam um ponto de coordenação lábil.
- 2) Síntese de complexos binucleares de níquel, ferro-níquel, ferro-zinco, ferro-cobre e outros formados com o ligante e a sua caracterização através de técnicas físico-químicas.
- 3) Estudo da reatividade dos complexos formados com os ligantes como modelos para as metaloproteínas que promovem hidrólise (nucleases) frente à hidrólise de ésteres de fosfatos em meio homogêneo e heterogêneo através do ancoramento em partículas inorgânicas.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO.

MATERIAIS

Todos os reagentes e solventes de grau analítico usados eram provenientes dos fabricantes Aldrich, Sigma, Fluka, Acros, Merck, Biotec, Nuclear, Vetec, Synth e Cinética Química e foram utilizados sem purificação prévia. Todos os solventes utilizados nas reações de acompanhamento cinético são de grau espectroscópico e não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento. Sílica 3-Aminopropil (**Si3AP**) (Aldrich; contendo 1 mmol de grupos NH_2/g do suporte ~9% funcionalizada, matrix irregular silica, tamanho da partícula 40-63 μm , tamanho do poro 60 Å , área superficial 550 m^2/g) foi utilizada como recebida.

MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

Análise elementar C H N

A determinação dos percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio foi realizada em um analisador elementar de CHNS Perkin Elmer modelo 2100, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC.

Condutimetria

As análises de condutividade molar foram efetuadas em um condutivímetro Schot CG853, 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 ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ - $\Lambda_M = 1408 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$) (LIDE, 2000) a temperatura de $25,00 \pm 0,05$ °C estabilizada com auxílio de um banho termostaticado.

Espectroscopia no infravermelho - IV

Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR-2000, na região de 4000 a 450 cm^{-1} no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. As amostras sólidas foram analisadas em pastilha de KBr (grau espectroscópico).

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono - RMN ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em um espectrofotômetro Varian 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 clorofórmio deuterado 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. Experimentos no estado sólido (reflectância difusa) foram realizados no mesmo equipamento utilizando pastilha de KBr.

Eletroquímica

O comportamento redox dos complexos foi investigado por voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada em um potenciostato-galvanostato EPSILON, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. Os experimentos foram realizados em soluções de acetonitrila e diclorometano, sob atmosfera de argônio. Nestes experimentos utilizou-se hexafluorofosfato de tetrabutilamônio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) como eletrólito suporte e uma célula eletrolítica com três eletrodos: eletrodo de trabalho – ouro ou carbono vítreo; eletrodo auxiliar – platina; eletrodo de referência – Ag/Ag^+ . Para monitorar o eletrodo de referência utilizou-se o par redox ferrocínio/ferroceno como padrão interno.(GAGNÉ, 1980)

Difratometria de raios X

As análises de difração de raios X de monocristal foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC. Os dados foram coletados em um difratômetro Enraf-Nonius CAD-4 equipado com um tubo de molibdênio ($\text{MoK}\alpha \lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite a temperatura ambiente. As estruturas cristalinas foram resolvidas através de métodos diretos com a utilização do programa SHELXS97 (SHELDRICK, 1990) e refinados pelo método dos mínimos quadrados com matriz completa, com a utilização do programa SHELXL97 (SHELDRICK, 1997) Utilizou-se também a correção SQUEEZE (VAN DER SLUIS, 1990) com o programa PLATON (SPEK, 1997) devido à alta desordem apresentada por moléculas de solvente de cristalização. As representações gráficas das estruturas moleculares foram geradas utilizando o programa PLATON. A coleta de

dados e a resolução das estruturas foram realizadas pelo Prof. Dr. Adailton João Bortoluzzi.

Titulação potenciométrica

As constantes de protonação para os complexos foram determinadas por titulação potenciométrica no Laboratório de Equilíbrio Químico, Departamento de Química – UFSC. Estes experimentos foram realizados em solução acetonitrila/água (50:50 % V/V) devido à baixa solubilidade dos complexos em água. Utilizou-se um pHmetro acoplado a um eletrodo de vidro combinado (Ag/AgCl), calibrado com uma solução de HCl (0,010 mol.L⁻¹) e uma solução padrão de KOH (0,100 mol.L⁻¹) em acetonitrila/água 50/50 %, em uma célula termostatizada a 25,00 ± 0,05 °C para leitura direta de pH ($p[H] = -\log[H^+]$). As soluções foram preparadas com água bidestilada na presença de KMnO₄ e fervida e etanol absoluto. As medidas foram realizadas em uma célula termostatizada a 25,00 ± 0,05 °C contendo uma solução do complexo (0,05 mmol) em 50 mL de solução acetonitrila/água (50:50 % V/V) e a força iônica ajustada para 0,100 mol.L⁻¹ com KCl, sob fluxo de argônio para eliminar a presença de CO₂ atmosférico. As soluções dos complexos tiveram o pH ajustado para próximo de 3,0 pela adição de 20 mL de HCl 0,010 mol.L⁻¹ resultando em um volume final de 70 mL e foram tituladas com uma solução padrão de KOH 0,100 mol.L⁻¹ com a adição de alíquotas de 0,05 mL até pH = 12,5 com o auxílio de uma bureta Schott modelo T 80/20. As adições sucessivas de base foram realizadas após a obtenção de valores constantes de pH. O pK_w da solução acetonitrila/água 50:50 % V/V contendo 0,100 mol.L⁻¹ de KCl utilizado para os cálculos, foi 15,40 (HERRADOR, 2002) 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 (MARTELL, 1992) diagramas de distribuição das espécies presentes em solução em função do pH foram obtidos com os programas SPE (MARTELL, 1992) e SPEPLOT (MARTELL, 1992).

Espectrometria de massa ESI-MS

O espectro de massa (ESI-MS) foi medido com a colaboração do Dr. Flavio L. Benedito no Instituto Max Planck Alemanha no aparelho: Micromass ZMD/ESI, alinhamento da fonte Z-spray (modo

ção positiva); velocidade de fluxo $100 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, voltagem do capilar 3,5 kV; temperatura de desolvatação $150 \text{ }^\circ\text{C}$, concentração da amostra $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$.

REATIVIDADE

A atividade catalítica dos complexos foi avaliada através da reação de hidrólise do substrato bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato [2,4-BDNPP], o qual foi sintetizado de acordo com o método descrito por Bunton (BUNTON, 1969). Os experimentos cinéticos foram realizados em triplicata 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 absorbância ocorrida em 400 nm para a reatividade dos complexos está relacionada à liberação do ânion 2,4-dinitrofenolato (400 nm), como produto da reação de hidrólise. A concentração de 2,4-dinitrofenolato formada foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar em 400 nm ($\epsilon = 12100 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) previamente determinado em pH = 6,50, 7,00 e 9,00 (BATISTA, 2003). As reações foram monitoradas até 5% de conversão de substrato a produto e os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais. 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 a obtenção do pH ótimo de atividade e pK_a cinético para cada complexo, foram realizados em uma faixa de pH entre 5,00 e 10,50 em condições de 100 vezes de excesso do substrato a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ utilizando cubetas de quartzo e/ou vidro óptico com capacidade para 4 mL e caminho óptico de 1 cm, seladas com tampa de teflon, nas quais foram adicionados 1,5 mL de solução aquosa ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) do tampão (MES pH 4,00 a 6,50; HEPES pH 7,00 a 8,50; CHES pH 9,00 a 10,00) com força iônica mantida constante ($I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) com a adição de perclorato de lítio, 0,100 mL de uma solução estoque do complexo ($3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em acetonitrila), 0,300 mL de uma solução estoque do substrato ($1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em acetonitrila), e acetonitrila para completar o volume final de 3,0 mL da mistura reacional. Portanto, as concentrações finais utilizadas de complexo e de substrato foram $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Os experimentos em diferentes concentrações do substrato foram realizados a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ utilizando tampão MÊS pH = 6,50, HEPES pH =

7,00 e CHES, pH = 9,00. Em um experimento típico adicionou-se 1,5 mL de tampão ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em água), 0,100 mL de uma solução estoque do complexo ($3,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em acetonitrila), quantidades adequadas de soluções estoque de substrato de 0,060 mL a 0,600 mL ($1,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em acetonitrila) e acetonitrila para completar o volume final de 3,0 mL da mistura reacional. Foi também realizada, nas mesmas condições descritas acima, para os quatro complexos, a reação com o monoéster 2,4-DNPP para a construção de uma proposta mecanística.

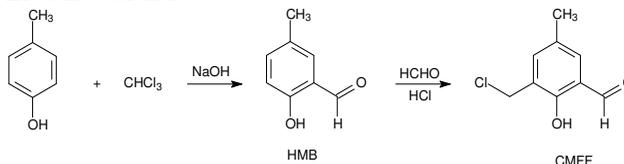
A determinação do número de moléculas de substrato hidrolisadas por molécula de complexo foi realizada para os complexos pelo acompanhamento espectrofotométrico em 400 nm na condição de 50 vezes de excesso do substrato ($5,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em relação ao complexo ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), em pH = 6,50, 7,00 e 9,00 a 25 °C. Realizou-se também o acompanhamento da reação estequiométrica em 400 nm entre os complexos ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e o substrato ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), em pH = 6,50, 7,00 e 9,00 a 25 °C. O estudo do efeito isotópico de deutério na hidrólise do 2,4-BDNPP pelos complexos foi realizado pelo acompanhamento de duas reações paralelas onde as soluções tampões MES, HEPES, CHES pH e pD = 6,50, 7,00 e 9,00 foram previamente preparadas em H₂O e D₂O. As reações foram monitoradas, sob condições de 100 vezes de excesso do substrato, em 400 nm.

As reações em fase heterogêneas foram feitas nas mesmas condições descritas acima. As cinéticas foram medidas em um frasco de 4 mL com agitação magnética. Em um experimento típico foi pesado no frasco de reação massas dos sistemas heterogêneos que variaram entre 3 – 6,5 mg ($1,875 \times 10^{-7} \text{ mol}$). Estes sólidos foram suspensos (1,5 mL de tampão e 1,4 mL de acetonitrila), então, 0,1 mL do substrato 2,4-BDNPP foi adicionado, resultando na proporção catalisador /substrato 1:100 (mol/mol).

A reação de hidrólise foi então acompanhada durante 30 minutos (medidas a cada 5 minutos). O produto da reação, 2,4-dinitrofenolato, foi separado do sistema por centrifugação e o sobrenadante foi analisado por UV-vis (400 nm). Da mesma maneira foi analisada a reação controle utilizando apenas os materiais nanoestruturados + 2,4-BDNPP e 2,4-DNPP.

SÍNTESE DOS LIGANTES

SÍNTESE DO NÚCLEO BÁSICO 2-CLOROMETIL-4-METIL-6-FORMILFENOL – CMFF



O núcleo básico CMFF foi preparado em duas etapas. Em uma primeira etapa preparou-se o 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído (HMB) através de uma reação de formilação do *p*-cresol baseada no procedimento descrito na literatura para a reação de Reimer-Tiemann (THOER, 1988). Em um balão de 3 bocas com capacidade para 5000 mL, equipado com condensador e agitador mecânico, adicionaram-se 1500 mL de clorofórmio e *p*-cresol (21,6 g, 200 mmol). O balão foi colocado em um banho com temperatura controlada entre 56 - 60 °C e, sob agitação, iniciou-se a adição de NaOH (60 g, 150 mmol), solubilizado em 100 mL de água destilada, em pequenas porções durante as 3 primeiras horas de reação. A reação foi mantida por mais 1 hora e após este período deixou-se resfriar até a temperatura ambiente. A seguir, adicionou-se então cerca de 500 mL de água destilada e, sob agitação, iniciou-se a acidificação com HCl concentrado, até pH = 2. A fase orgânica foi então separada, lavada com água destilada, seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente evaporado à pressão reduzida. O material restante (óleo preto viscoso) foi destilado à pressão reduzida com auxílio de uma coluna de vigreux de 40 cm (55 – 65 °C a 0,1 mm Hg). Obteve-se o 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído (HMB) como um sólido branco cristalino P.F.: 56 °C com rendimento de 46% (13 g, 92 mmol) em relação ao *p*-cresol. O HMB foi caracterizado por IV (KBr), em cm⁻¹: ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3024-2864; ν (C-H_{ald}) 2738; ν (C=O) 1658; ν (C=C) 1590-1484; δ (O-H) 1372; ν (C-O_{fenol}) 1282; δ (C-H_{ar}) 742. RMN ¹H - δ_H (200 MHz; CDCl₃), em ppm: 2,34 (s, 3 H, CH₃); 6,90 (d, 1 H, CH_{ar}); 7,34 (dd, 2 H, CH_{ar}); 9,85 (s, 1 H, CH_{ald}); 10,84 (s, 1 H, OH_{fenol}).

O CMFF foi obtido pela reação de clorometilação do HMB com formaldeído e ácido clorídrico como descrito a seguir: Em um balão de 250 mL adicionou-se 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído (6,4 g, 47 mmol), formaldeído 37% (3,81 g, 94 mmol) e ácido clorídrico concentrado (25

mL). Esta mistura foi refluxada durante 15 minutos sob agitação magnética e na seqüência resfriada até 0 °C, formando um precipitado compacto no fundo do balão, que foi triturado, filtrado sob vácuo e recristalizado em diclorometano a quente. O sólido obtido foi deixado secar em dessecador com sílica sob vácuo por 12 horas e estocado sob argônio a temperatura inferior a -10 °C. O produto, 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol (CMFF), foi obtido como sólido verde claro P.F.: 95-96 °C com rendimento de 57% (5 g, 27 mmol) em relação ao HMB e caracterizado por IV (KBr) em cm^{-1} : ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3048-2852; ν (C-H_{ald}) 2749; ν (C=O) 1664; ν (C=C) 1600-1470; δ (O-H) 1378; ν (C-O_{fenol}) 1257; δ (C-H_{ar}) 703; ν (C-Cl) 613. RMN ¹H - δ_{H} (200 MHz; CDCl₃), em ppm: 2,35 (s, 3 H, CH₃); 4,67 (s, 2 H, CH₂); 7,35 (s, 1 H, CH_{ar}); 7,46 (s, 1 H, CH_{ar}); 9,86 (s, 1 H, CH_{ald}); 11,25 (s, 1 H, OH_{fenol}).

ATENÇÃO: Durante essa reação forma-se o composto bis-(clorometil) éter, altamente tóxico e comprovadamente um potente agente carcinogênico. Portanto, essa reação deve ser realizada em capela com boa exaustão, utilizando-se máscara e luvas, e todo o material utilizado deve ser lavado com solução alcalina (por exemplo, etanol/água/KOH: 60 mL/40 mL/5 g, na capela), pois o bis-(clorometil)éter é rapidamente hidrolisado a formaldeído na presença de base. A solução reacional e todos os resíduos devem ser descartados somente após correção do pH (pH>9,0) por adição de hidróxido de sódio ou potássio.

SÍNTESE DO LIGANTE 2-[(N-BENZIL-N-2-PIRIDILMETILAMINA)]-4-METIL-6-[N-(2-PIRIDILMETIL)AMINOMETIL)]-4-METIL-6-FORMILFENOL (H₂BPPAMFF).

(i) **N-benzil-N-2-piridilmetilamina (BPA).** Esta amina foi sintetizada de modo similar ao descrito na literatura (YAGIMA, 2002). 2-(aminometil) piridina (4,9 mL, 47 mmol) foi dissolvida em 20 mL de metanol e resfriada a 0°C. Uma solução de benzaldeído em metanol (5,30 g, 50 mmol, em 30 mL) foi adicionada gota a gota sob agitação magnética. Após 24 h agitando a temperatura ambiente, foi adicionado cuidadosamente, borohidreto de sódio (1,13 g, 30 mmol) sob agitação. A mistura reacional foi agitada por 4 horas a temperatura ambiente. A reação foi concentrada sob pressão reduzida para se eliminar todo metanol e em seguida foi adicionado 30 mL de HCl 2M. A fase aquosa foi lavada com 5 X

10mL de CHCl_3 para remover o excesso de benzaldeído. A fase aquosa foi então alcalinizada com uma solução saturada de Na_2CO_3 (pH 10), a fase orgânica foi extraída com cinco porções de 10 mL de CHCl_3 , seca com Na_2SO_4 , concentrada sob pressão reduzida. Um óleo amarelo palha foi obtido. (Rendimento: 75%) $^1\text{H RMN } \delta\text{H}$ (400 MHz; CDCl_3): 8.5 [1H, Py]; 7.6-7.1 [8H, Ar]; 3.9-3.8 [4H, CH_2] in ppm.

(ii) **2-(N-benzil-N-2-piridilmetilamina)-4-metil-6-formilfenol (BPAMFF)**. Em uma solução de BPA (1,5 g, 7,5 mmol em 20 mL de CH_2Cl_2) foi adicionado lentamente uma solução de 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol (1,38 g, 7,5 mmol em 30 mL de CH_2Cl_2), sob agitação. Após esta adição a reação ficou sob agitação a temperatura ambiente por 24 h. O composto desejado foi lavado com 5 x 30 mL de uma solução aquosa saturada de Na_2CO_3 (pH 10) e a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e concentrada a pressão reduzida. Um óleo amarelo foi obtido. (Rendimento: 92%) $^1\text{H RMN } \delta\text{H}$ (400 MHz; CDCl_3): 10,3 [1H, aldehyde.], 8,5 [1H, Py]; 7,6-7,1 [10H, Ar]; 3,8-3,7 [6H, CH_2], 2,2 [3H, CH_3] em ppm.

(iii) **2-[(N-benzil-N-2-piridilmetilamina)-4-metil-6-*N*-(2-piridilmetil)aminometil]fenol (BPAPyFF)**. Em uma solução de 2-(Aminometil)piridina (0,7 mL, 6,7 mmol em 30 mL de CH_3OH) foi adicionado gota a gota uma solução de BPAMFF (2,4 g, 6,9 mmol, em 20 mL de CH_3OH) e agitada por 4 h. Após 4 h, foi adicionado cuidadosamente, borohidreto de sódio (0,25 g, 6,7 mmol) sob agitação. A mistura reacional foi agitada por 4 horas a temperatura ambiente. A reação foi concentrada sob pressão reduzida para se eliminar todo metanol e em seguida foi adicionado 30 mL de HCl 2 mol/L. A fase aquosa foi lavada com 5 X 10mL de CHCl_3 para remover o excesso do BPAMFF. A fase aquosa foi então alcalinizada com uma solução saturada de Na_2CO_3 (pH 10), a fase orgânica foi extraída com cinco porções de 10 mL de CHCl_3 , seca com Na_2SO_4 , concentrada sob pressão reduzida. Um óleo amarelo foi obtido. (rendimento: 72%) $^1\text{H RMN } \delta\text{H}$ (400 MHz; CDCl_3): 8,5 [2H, Py]; 7,6-6,8 [13H, Ar]; 3,9-3,6 [10H, CH_2], 2,2 [3H, CH_3] em ppm.

(iv) **2-[(N-benzil-N-2-piridilmetilamina)-4-metil-6-*N*-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formilfenol ($\text{H}_2\text{BPPAMFF}$)**. Em

uma solução de BPAPyFF (2,11 g, 4,8 mmol em 20 mL de CH_2Cl_2) foi adicionado gota a gota uma solução de 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol (0,88 g, 4,8 mmol em 30 mL de CH_2Cl_2), sob agitação. Após esta adição o sistema foi posto em agitação a temperatura ambiente por 24 h. O composto foi lavado com 5 x 30 mL de uma solução aquosa saturada de Na_2CO_3 (pH 10) e a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e concentrada a pressão reduzida. Um sólido amarelo foi obtido. (Rendimento: 70%) ^1H RMN δH (400 MHz; CDCl_3): 10,2 [1H, aldeido.], 8,5 [2H, Py]; 7,6-6,8 [15H, Ar]; 3,8-3,6 [12H, CH_2], 2,2 [6H, CH_3] ^{13}C RMN δC (400 MHz; CDCl_3): C1(20,52), C2(20,81), C3(54,24), C4(55,60), C5(56,33), C6(58,22), C7(59,19), C8(59,66), C9(122,19), C10(122,43), C11(122,47), C12(122,63), C13(123,09), C14(123,32), C15(123,41), C16(123,67), C17(125,24), C18(125,27), C19(127,54), C20(127,77), C21(128,33), C22(128,66), C23(129,46), C24(130,07), C25(130,92), C26(136,76), C27(136,91), C28(137,56), C29(138,15), C30(149,05), C31(149,24), C32(153,41), C33(154,13), C34(158,26), C35(158,52), C36(159,60), C37(192,42) em ppm. CHN%($\text{C}_{37}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_3$) enc(calc) C 75,2(75,7), H 6,1(6,5), N 9,5(9,2) P.F. (57-58°C).

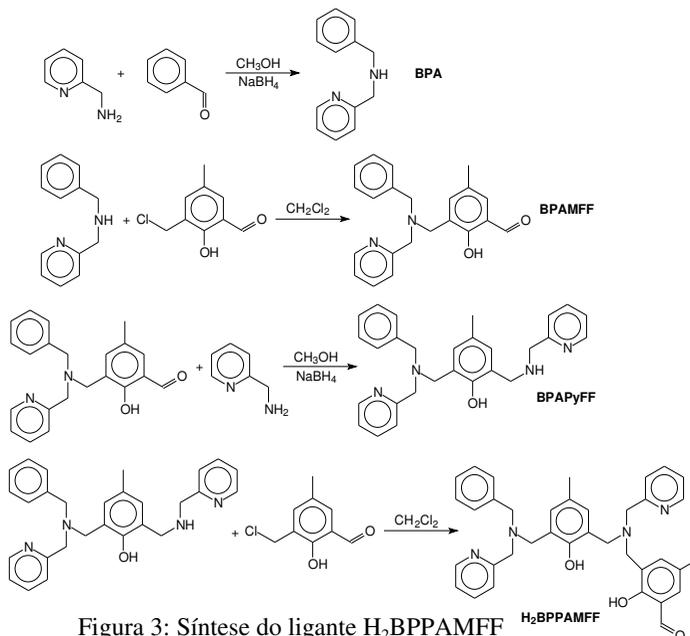


Figura 3: Síntese do ligante $\text{H}_2\text{BPPAMFF}$

Quando se busca a síntese de compostos modelos para metaloenzimas cujo sítio ativo é composto por dois centros metálicos, pode-se utilizar como estratégia a síntese de ligantes que, em compostos de coordenação originem uma ponte endógena. O ligante sintetizado neste trabalho, H₂BPPAMFF satisfaz a condição para a obtenção de compostos binucleares, pois apresentam a unidade estrutural 2,6-diamina-4-metilfenol contendo braços ligantes pendentemente inocente e com grupos N,O-doadores.

Todos os pró-ligantes (BPA, BPAMFF e BPAPyFF) foram caracterizados por RMN ¹H apresentando rendimentos satisfatórios. O ligante final H₂BPPAMFF foi caracterizado por RMN ¹H e ¹³C, CHN e ponto de fusão. Apresentou-se como um sólido amarelo claro com pureza e rendimento satisfatório.

SÍNTESE DAS NANOESFERAS DE SÍLICA (SiO₂).

Esta parte do trabalho foi desenvolvida em conjunto com a Professora Dr^a. Liane M. Rossi (USP – SP) onde foi realizada a síntese dos materiais nano estruturados.

Em um balão de fundo redondo de 500 mL foram adicionados 250 mL de ciclohexano e 15,5 g de polioxietileno nonilfeniléter (IGEPAL CO-520, Aldrich Co.). A mistura foi submetida a um banho de ultrassom por 3 minutos e então 2,5 mL de TEOS (tetrametil ortosilicato) e 5,4 mL de NH₄OH foram adicionados. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por 24 horas. O material foi então precipitado com metanol, lavado com etanol e seco a vácuo.

SÍNTESE DAS NANOESFERAS DE SÍLICA MAGNÉTICAS (Fe₃O₄@SiO₂).

Esta preparação seguiu o método proposto na literatura (ROSSI, 2008). Em um balão de 500 mL foi adicionado 250 mL de ciclohexano, 15,5 g de IGEPAL CO-520. A mistura foi submetida a banho de ultrassom por 3 minutos e então 2,8 mL de TEOS (tetrametil ortosilicato), 2,4 mL de magnetita dispersa em ciclohexano (30,1 mg.mL⁻¹) e 5,4 mL de NH₄OH (29%) foram adicionados. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por 24 horas. O material foi então precipitado com metanol, lavado com etanol e seco a vácuo.

Os nanomateriais utilizados neste estudo consistem em nanoesferas de sílica e nanoesferas magnéticas recobertas por sílica ambas preparadas por microemulsão reversa na presença de ciclohexano

e surfactante não iônico. A microemulsão reversa é uma única fase isotópica e termodinamicamente estável que consiste de nano gotas de água estabilizadas por moléculas de surfactante dispersas em uma fase de óleo. As nano gotas servem como nano reatores para a síntese das nanoesferas de sílica de tamanho controlado. A matrix da sílica é formada pela hidrólise e condensação do TEOS pela adição de hidróxido de amônio que reverte à fase da microemulsão. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos materiais revelaram partículas esféricas de 30 e 40 nm para a sílica (SiO_2) e para a magnetita recoberta de sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$), respectivamente. (Figura 4)

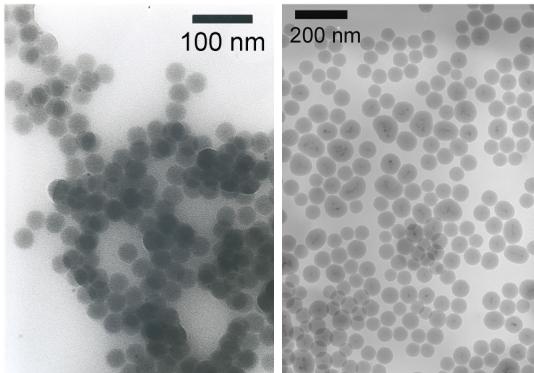


Figura 4. Imagem de TEM da sílica (esquerda) e da magnetita recoberta de sílica (direita) preparadas pelo método da microemulsão.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BATISTA, S.C.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A.J.; VENCATO, I.; PERALTA, R.A.; SZPOGANICZ, B.; AIRES, V.V.E., TEREZI, H.; SEVERINO, P.C., Highly efficient phosphate diester hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical Fe^{III}Ni^{II} model complex Inorganic Chemistry Communications, v.6, p.1161, **2003**.

BUTON, C. A; FARBER, S. J., Hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate, Journal of Organic Chemistry, vol. 34, p. 767, **1969**.

GAGNÉ, R. R.; KOVAL, C. A.; LISENSKY, G. C. Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements. Inorganic Chemistry, v. 19, p. 2854, **1980**.

HERRADOR, M. A.; GONZALEZ, A. G.; Potentiometric titrations in acetonitrile–water mixtures: evaluation of aqueous ionisation constant of ketoprofen, Talanta, v. 56, p. 769, **2002**.

LIDE, D. R., Handbook of inorganic chemistry and physics, 81st ed., CRS Press, **2000**.

MARTELL, A. E.; MOTEKAITIS, R. J. Determination and Use of Stability Constants. 2^a Edição. VHC Publishers, Inc., **1992**.

PIOVEZAN, C.; *et. al.* Heterodinuclear Fe^{III}Zn^{II} Bioinspired Complex Supported on 3 aminopropyl Silica. Efficient Hydrolysis of Phosphate Diester Bonds, Inorganic Chemistry Communications, submetido, **2009**.

ROSSI L. M.; JACINTO, M. J.; KIOYHARA, P. K. ; MASUNAGA, S. H. ; JARDIM, R.F. ; Recoverable rhodium nanoparticles: Synthesis, characterization and catalytic performance in hydrogenation reactions, Applied Catalysis. A, General, v. 338, p. 52, **2008**.

SHELDRIK, G.M., A short history of SHELX, Acta Crystallographica A, v A64, p. 112, **2008**.

SPEK, A., Structure validation in chemical crystallography, Acta Crystallographica D, v D65, p. 148, **2009**.

THOER, A.; DENIS, M.; DELMAS, M.; GASET, A. The Reimer-Tiemann reaction in slightly hydrated solid-liquid medium: a new method for the synthesis of formyl and diformyl phenols. Synthetic Communications, v. 18, p. 2095, **1988**.

VAN DER SLUIS, P., SPEK, A. L. BYPASS: An effective method for the refinement of crystal structures containing disordered solvent regions. Acta Crystallographica, v. A46, 194, **1990**.

YAJIMA, T.; OKAJIMA, M.; ODANI, A.; YAMAUCHI, O.; Attractive ligand–ligand interactions involving aromatic rings in five-coordinate ternary copper(II) complexes with a dipeptide and a bidentate N-donor ligand, Inorganica Chimica Acta., v. 339, p. 445, **2002**.

CAPÍTULO 3

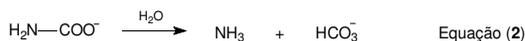
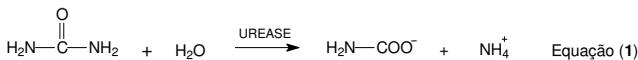
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA REATIVIDADE DE UM COMPLEXO BINUCLEAR DE NÍQUEL COMO MODELO PARA A UREASE

UREASE

A urease (uréia amidohidrolase E.C.3.5.1.5) pertence a uma família de metalohidrolases binucleares e contém íons níquel (II) no sítio catalítico, sendo a mesma denominada de catalisador biológico para a decomposição hidrolítica da uréia. A uréia é formada em grandes quantidades, como um produto do catabolismo de compostos contendo nitrogênio. Cada humano produz, por exemplo, cerca de 10 quilogramas de uréia por ano (MOBLEY, 1989). A decomposição espontânea da uréia ocorre com um tempo de meia-vida em torno de 3,6 anos e este longo período pode levar rapidamente a um grande acúmulo de uréia causando vários problemas ambientais (ZERNER, 1991).

A urease extraída de plantas *Canavalia ensiformis* (extraída de um tipo de feijão japonês, conhecida como Jack bean) foi a primeira enzima a ser isolada na forma cristalina por James B. Summer em 1926 (SUMMER, 1926). O grande avanço na história da urease foi à descoberta da presença de íons níquel em seu sítio ativo (DIXON, 1975). Após aproximadamente 70 anos do isolamento da urease na forma cristalina, obteve-se a estrutura tridimensional da urease da bactéria *Klebsiella aerogenes* por difração de raios X com uma resolução de 2,2 Å, a qual revela detalhes acerca da geometria molecular no sítio ativo (KARPLUS, 1995).

A metaloenzima urease catalisa a hidrólise da uréia em uma grande variedade de bactérias (*Klebsiella aerogenes* - KAU, *Bacillus pasteurii* - BPU), plantas (*Canavalia ensiformes* ou Jack bean - JBU), fungos e alguns invertebrados produzindo amônio e carbamato. Este processo ocorre cerca de 10^{14} vezes mais rápido do que a reação não catalisada, com um tempo de meia-vida de microssegundos. O carbamato produzido durante esta reação se decompõe espontaneamente, a pH fisiológico, gerando amônia e bicarbonato, como representado nas Equações (1) e (2), respectivamente (HALCROW, 1994; BLAKELEY, 1982).



Este mecanismo contrasta com a decomposição da uréia em meio aquoso, a qual se mostra ser não hidrolítica, promovendo uma reação de eliminação produzindo ácido cianico e amônia (KOLODZIEJ, 1994). O

impacto ambiental e na saúde causado pela atividade das ureases é enorme. No entanto o controle da velocidade de hidrólise da uréia pelo uso de inibidores levaria a uma melhora na eficiência da captura de nitrogênio pelas plantas, além de um grande progresso nas estratégias terapêuticas utilizadas para o tratamento de infecções causadas pelas ureases bacteriais.

Nas últimas décadas vários estudos espectroscópicos e estruturais têm sido realizados a fim de elucidar as propriedades e a natureza do sítio ativo das ureases. Estudos de espectroscopia eletrônica realizada com a urease de Jack bean (JBU) mostram que o espectro eletrônico desta enzima caracteriza-se por fracas bandas de absorção na região do visível e infravermelho próximo com $\lambda_{\text{máx}} = 1060 \text{ nm}$ ($\epsilon = 10 \text{ mol. L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 910 nm ($\epsilon = 14 \text{ mol. L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 745 nm ($\epsilon = 46 \text{ mol. L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e 407 nm (ombro). Estas bandas são atribuídas a transições d-d, na sua maioria, proibidas por transição de spin relacionadas com o íon níquel (II) pentacoordenado ou em ambientes octaédricos distorcidos (HALCROW, 1994; DIXON, 1980).

Reforçando estes resultados, estudos de EXAFS com a JBU indicaram que os íons níquel (II) encontram-se em geometria pseudo-octaédrica coordenados a três átomos de nitrogênio a $2,04 \text{ \AA}$ de distância, dois átomos de oxigênio a $2,07 \text{ \AA}$ e um átomo de oxigênio a $2,25 \text{ \AA}$ de distância (ALAGNA, 1984; HASNAIN, 1983). A presença de resíduos de histidina coordenada ao centro metálico também foi sugerida (HASNAIN, 1983). Novos estudos de espectroscopia de absorção de raios X (XAS) definiram uma esfera de coordenação composta de um total de 5-6 átomos N,O doadores com uma média de comprimento de ligação Ni-(N,O) de $2,06 \text{ \AA}$ (CLARK, 1990).

Inspirados nas informações espectroscópicas, estruturais e mecânicas abordadas anteriormente, os químicos bioinorgânicos vêm sintetizando compostos que possam vir a apresentar propriedades similares as metaloenzimas em questão. Os compostos binucleares de níquel, sintetizados com este objetivo, reproduzem algumas características importantes do sítio ativo das ureases e podem fornecer informações importantes do ciclo catalítico. Por exemplo, vários complexos de níquel (II) contêm uréia na esfera de coordenação (GREATTI, 2000; YAMAGUCHI, 1997; WAGES, 1993; KOGA, 1998; BLAKELEY, 1982) e apresentam-se como modelos para a interação do substrato com o sítio ativo. Estes compostos sintéticos mostraram que a uréia coordena-se preferencialmente pelo átomo de oxigênio do grupo carbonila. A coordenação da molécula de uréia nesses compostos está de

acordo com o mecanismo proposto por Lippard (Figura 5) (LIPPARD, 1995), ou seja, o substrato (uréia) coordena-se ao íon níquel na urease através do átomo de oxigênio do grupo carbonila.

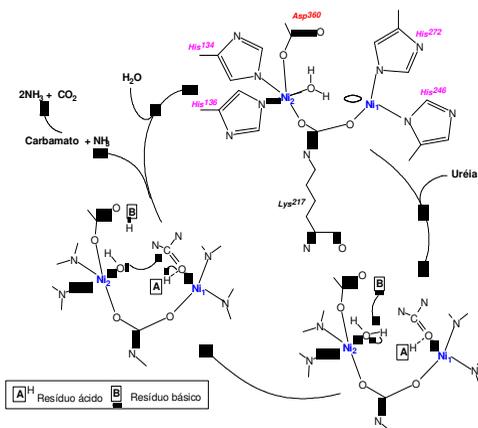


Figura 5. Mecanismo proposto para o sítio catalítico da urease (LIPPARD, 1995).

No entanto, uma outra possibilidade no modo de coordenação da uréia foi demonstrada com a obtenção de dois complexos binucleares de níquel (II) onde a uréia apresenta-se coordenada como ligante ponte através do átomo de oxigênio (do grupo carbonila) e do átomo de nitrogênio de um dos grupos amido (MAYER, 1998; 2000). Esta forma de coordenação vai ao encontro da proposta mecanística reportada por Benini e colaboradores (BENINI, 1999). Até o momento somente dois complexos binucleares de Ni^{II} contendo uréia coordenada como ligante ponte foram relatados na literatura, (MAYER, 1998; 2000) no entanto, há relatos também de um complexo tetranuclear de Ni^{II} (MAYER, 1999) e um complexo binuclear de Fe^{III} (KYATON, 2000) que contém uréia como ligante ponte.

Além desses compostos com uréia coordenada, vários complexos binucleares de níquel (II) têm sido preparados para mimetizar as características estruturais e/ou funcionais do sítio ativo das ureases. Apesar do predomínio de complexos descritos como modelos estruturais, (GREATTI, 2000; MAYER, 2000, 1998; KOGA, 1998; MEYER, 1998b; HOSAKAWA, 1998; YAMAGUCHI, 1997; VOLKER, 1996a; 1996b; STEMMLER, 1995; BUCHANAN, 1989; WAGES, 1983; BLAKELEY, 1982;) nenhum demonstra realizar a

hidrólise direta da uréia (Equações (1) e (2)). No entanto, o complexo relatado por Yamaguchi e colaboradores, (YAMAGUCHI, 1997) catalisa a etanolise da uréia a etil carbamato. Por outro lado, a eliminação de amônia de uréia coordenada a um ou dois íons níquel para formar um cianato complexo tem sido observada em alguns casos (BARRIOS, 2000; 2001; YOSUMI, 1998; BLAKELEY, 1982).

Diante da dificuldade apresentada pelos complexos binucleares de níquel (II) em hidrolisar uréia, alguns complexos modelos para as ureases têm sido testados na hidrólise de ésteres de fosfato, (NORLANDER, 2002; VOLKMER, 1999,1996) visando conhecer a capacidade desses compostos em atuar como modelos funcionais para metaloenzimas hidrolíticas.

SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Ni}_2(\text{HBPPAMFF})(\mu\text{-AcO})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{BPh}_4$ (1) COMO MODELO FUNCIONAL E/OU ESTRUTURAL PARA A METALOENZIMA UREASE

Complexo **1** foi sintetizado em uma solução metanólica pela mistura de $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,73 g, 2 mmol, em 20 mL) e o ligante $\text{H}_2\text{BPPAMFF}$ (0,58 g, 1 mmol, em 20 mL) com agitação magnética e aquecimento (60 °C). Após 5 minutos, $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,16 g, 2 mmol) foi adicionado, e uma solução verde foi obtida. NaBPh_4 (0,34 g, 1 mmol) foi adicionado, imediatamente um sólido verde claro foi formado, filtrado e seco a vácuo por 24 h. Rendimento: 58%. IV (pastilha de KBr), em cm^{-1} : $\nu(\text{C-H}_{\text{Ar}}$ and $\text{C-H}_{\text{Aliph}}$) 3431-2922; $\nu(\text{BPh}_4)$ 1606; $\nu_{\text{ass}}(\text{OAc})$ 1554; $\nu_{\text{sym}}(\text{OAc})$ 1427; $\nu(\text{H-O}_{\text{phen}})$, 1317; $\nu(\text{C-O})$ 1263; $\delta(\text{C-H}_{\text{Ar}})$ 734 and 705. CHN% Calc. para $\text{Ni}_2\text{C}_{65}\text{H}_{67}\text{N}_4\text{O}_8\text{B}$ (Enc.): C 67,2 (67,6); H 5,8 (5,7) N 4,8 (4,9).

CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO $[\text{Ni}_2(\text{HBPPAMFF})(\mu\text{-AcO})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{BPh}_4$ (1)

A condutibilidade molar medida do complexo (**1**) em solução de acetonitrila a 25°C foi de $120 \text{ S} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, característicos de um eletrólito do 1:1 (GEARY, 1973). As porcentagens obtidas na análise de CHN foram próximas às calculadas, CHN% Calc. $\text{Ni}_2\text{C}_{65}\text{H}_{67}\text{N}_4\text{O}_8\text{B}$ exp(calc): C 67,2%(67,6%); H 5,8%(5,7%) N 4,8%(4,9%). O espectro de IV do complexo (Figura 6) mostra bandas $\nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-)$ em 1554 cm^{-1} e $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ em 1427 cm^{-1} com $\Delta = 127 \text{ cm}^{-1}$ que indicam a coordenação de um grupo carboxilato formando ponte entre os centros metálicos.

(NAKAMOTO, 1977). O modo vibracional da ligação do fenol terminal no ligante livre em 1375 cm^{-1} foi observado no complexo (1317 cm^{-1}) o que indica a não desprotonação destes grupos.

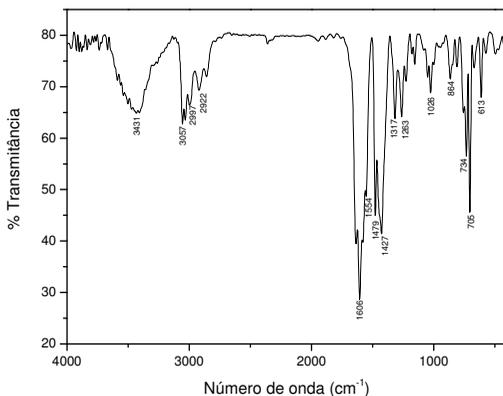


Figura 6. Espectro no infravermelho complexo $[\text{Ni}_2(\text{HBPPAMFF})(\mu\text{-AcO})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{BPh}_4$

O espectro eletrônico de **(1)** (Figura 7) medido em solução de acetonitrila exibe bandas em 308 nm ($\epsilon = 4300\text{ mol.L}^{-1}\text{.cm}^{-1}$) e 390 nm ($\epsilon = 4700\text{ mol.L}^{-1}\text{.cm}^{-1}$) características de transferência de carga interna do ligante e em 604 nm ($\epsilon = 20\text{ mol.L}^{-1}\text{.cm}^{-1}$) transição d-d.

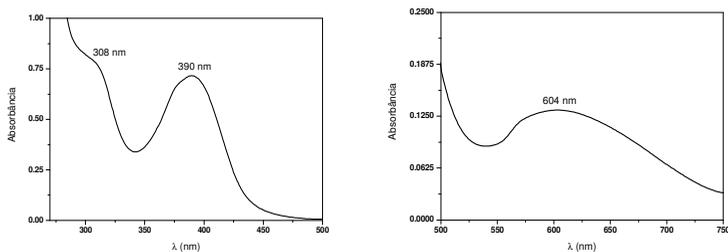


Figura 7. Espectro eletrônico complexo(1) em acetonitrila em (a) bandas de transferência de carga interna do ligante e em (b) transição d-d

Os voltamogramas cíclicos foram realizados em acetonitrila na faixa de potencial $-2,0$ a $2,0\text{ V}$ versus Ag/AgCl , eletrodo de trabalho: ouro, eletrodo de referência: Ag/Ag^+ , eletrodo auxiliar: platina, eletrólito

suporte: hexafluorofosfato de tetrabutílamônio, padrão interno: ferroceno.

No voltamograma cíclico para o complexo **1** (Figura 8) duas ondas catódicas não reversíveis foram observadas – 1,27 V e em -1,64 V versus NHE, com velocidade de varredura de 100 mV.s⁻¹. Estes potenciais redox podem ser tentativamente atribuídos aos processos de transferência do elétron $\text{Ni}^{\text{II}}\text{Ni}^{\text{II}}/\text{Ni}^{\text{II}}\text{Ni}^{\text{I}} \rightarrow \text{Ni}^{\text{II}}\text{Ni}^{\text{I}}/\text{Ni}^{\text{I}}\text{Ni}^{\text{I}}$. A não-reversibilidade destes processos é um indicativo da instabilidade da forma totalmente reduzida do complexo em solução.

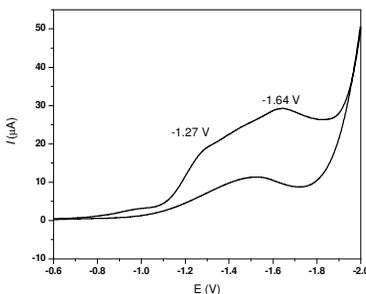


Figura 8. Voltamograma cíclico de (1) em acetonitrila (0,1 mol/L) com $[\text{Bu}_4\text{N}][\text{PF}_6]$ como eletrólito suporte trabalhando com eletrodo de ouro padrão do ferroceno, taxa de varredura interna 100 mV.s⁻¹

A análise de espectrometria de massa (ESI-MS – solvente: acetonitrila/metanol) mostrou o pico do íon molecular em m/z 866 que corresponde ao cátion complexo trocando a água coordenada ao níquel por uma molécula de acetonitrila. A maioria dos picos m/z são compatíveis com os possíveis fragmentos gerados da quebra do complexo.

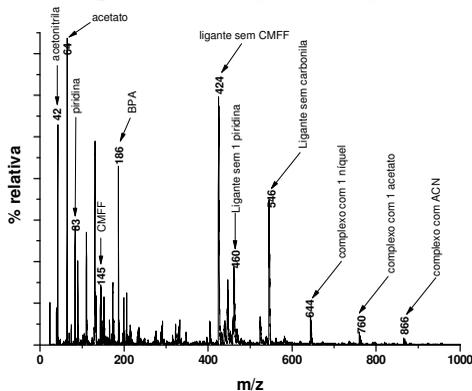


Figura 9: Espectro de massa (ESI-MS) do complexo 1.

Devido a inúmeras tentativas de se cristalizar este sistema foi optado além de se trocar o contra íon também foi trocado a ponte exógena (tetrafenil borato por perclorato e acetato por benzoato). Foi montado um sistema de cristalização por camada utilizando acetonitrila/isopropanol e após um mês houve a formação de monocristais verdes que foram submetidos à análise de raios X.

A análise dos monocristais do complexo contendo pontes benzoato revelou uma estrutura binuclear de níquel (Tabela 1 – Anexo 1).

Tabela 1: Dados Cristalográficos e refinamento da estrutura para o complexo 1.

Complexo	1
Fórmula empírica	C ₅₉ H ₇₀ N ₅ O _{15,5} ClNi ₂
Massa molar (g.mol ⁻¹)	1250,07
Temperatura (K)	293(2)
Comprimento de onda (Å)	0,71073
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /c
Dimensões da cela unitária	a = 14,783(3) Å b = 18,479(6) Å c = 22,901(8) Å β = 97,235(2)°
Volume (Å ³)	6206,2(3)
Z / Densidade calculada (g.cm ³)	4 / 1,338
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,718
F(000)	2624
Tamanho do cristal (mm ³)	0,05×0,02×0,02
Intervalo de θ (°)	2,61-25,00
Intervalo dos índices h, k, l	-17 ≤ h ≤ 17 -21 ≤ k ≤ 18 -24 ≤ l ≤ 27
Reflexões coletadas / únicas	30871 / 10685 (R _{int} = 0,0725)
Correção de absorção	None
Método de refinamento	Mínimos quadrados de
Dados / restrições / parâmetros	10685 / 52 / 764
GOOF (F ²)	1,080
Índice final de R[I>2σ(I)]	R = 0,0915, R _w = 0,2436
Índice de R (todos os dados)	R = 0,1150, R _w = 0,2653

Os átomos de níquel encontram-se coordenados pelos átomos N e O doadores do ligante e através das duas pontes benzoatos. Suas principais distância de ligação e ângulos estão listados na Tabela 2. Ambos átomos de níquel se encontram hexa-coordenados (octaedro distorcido) sendo que um dos átomos encontra-se uma água coordenada fornecendo um sítio lábil. O grupo carbolila não está coordenado a nenhum centro metálico. Todas as análises feitas indicam que o sistema

com ponte acetato seja isoestrutural deste complexo com ponte benzoato.

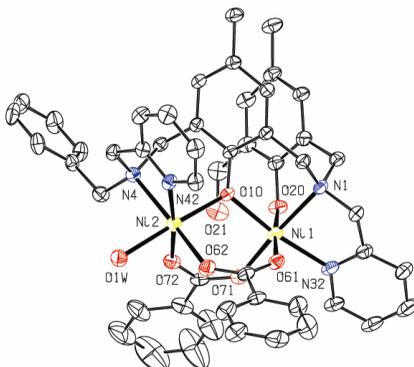
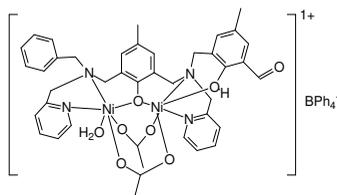


Figura 10: Estrutura ORTEP do cátion complexo $[\text{Ni}_2(\text{Hbppamff})(\mu\text{-C}_6\text{H}_5\text{COO})_2(\text{H}_2\text{O})]$

Tabela 2: Tabela comparativa de distâncias interatômicas (Å) de ligação selecionados para o complexo $[\text{NiNi}(\text{bppamff})(\mu\text{-BzO})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ (1).

Ligações	Distâncias interatômicas (Å)
$\text{Ni}_1\text{-Ni}_2$	3,396(12)
$\text{Ni}_1\text{-O}_{\text{fenolato terminal}}$	2,175(5)
$\text{Ni}_1\text{-O}_{\text{fenolato ponte}}$	1,997(4)
$\text{Ni}_2\text{-O}_{\text{fenolato ponte}}$	2,039(4)
$\text{Ni}_1\text{-O}_{\text{benzoato 1}}$	2,022(5)
$\text{Ni}_1\text{-O}_{\text{benzoato 2}}$	2,028(5)
$\text{Ni}_2\text{-O}_{\text{benzoato 1}}$	2,029(5)
$\text{Ni}_2\text{-O}_{\text{benzoato 2}}$	2,044(5)
$\text{Ni}_1\text{-N}_{\text{amina}}$	2,119(5)
$\text{Ni}_1\text{-N}_{\text{piridina}}$	2,068(6)
$\text{Ni}_2\text{-N}_{\text{amina}}$	2,184(5)
$\text{Ni}_2\text{-N}_{\text{piridina}}$	2,087(6)
$\text{Ni}_2\text{-O1W}$	2,089(5)

A partir das diversas técnicas físico-químicas utilizadas pode-se propor a estrutura do complexo **1**, contendo pontes acetato como sendo:



BPh_4^{-} = tetrafenil borato

Figura 11. Estrutura proposta para o complexo $[Ni_2(Hbppamff)(\mu-OAc)_2(H_2O)]BPh_4$

IMOBILIZAÇÃO DO COMPLEXO 1 EM SÍLICA 3-AMINO FUNCIONALIZADA

Si3AP (1g) foi suspensa em acetonitrila (20 mL) sob agitação magnética. O complexo **1** ($8,6 \times 10^{-5}$ mol \approx 100 mg) foi dissolvido em 5 mL de acetonitrila e então adicionado a sílica. Após 24h de reação (a temperatura ambiente), o sólido foi centrifugado, seco a vácuo e posteriormente lavado em extrator Soxhlet por 12 h utilizando acetonitrila como solvente. A cor da sílica tornou-se verde amarelado. O sobrenadante da solução da imobilização assim como a solução da lavagem do sólido foi avolumada e analisada por espectroscopia UV-vis para se determinar a quantidade de complexo imobilizado na sílica. O material imobilizado foi finalmente seco a vácuo por 24 h. O produto nomeado, **Si3AP-1** foi caracterizado por UV-vis do sólido (suspensão em benzeno – Figura 12). A respectiva quantidade de complexo imobilizado por grama do suporte foi: **Si3AP-1** $7,83 \times 10^{-5}$ mol/g.

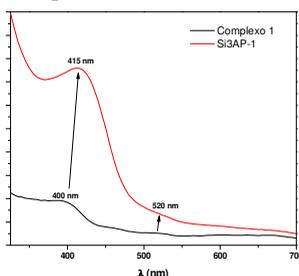


Figura 12: Espectro UV-vis do complexo 1 e do sistema Si3AP-1 (suspensão em benzeno).

IMOBILIZAÇÃO DO COMPLEXO 1 EM NANOESFERAS DE SÍLICA E NAS NANOESFERAS MAGNÉTICAS.

3 mL de (3-aminopropil)trietoxissilano (APTES) foi adicionado a uma solução do complexo **1** ($2,1 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ em acetonitrila), correspondendo a uma proporção 1:1 amina:aldeído. A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 15 minutos para preparar o sílica complexo, então, 100 mg dos suportes SiO₂ ou Fe₃O₄@SiO₂ foram adicionados. A mistura foi mantida sob agitação por 24 horas. Os sólidos obtidos, nomeados SiO-1 e Fe₃O₄@SiO₂-1, foram então centrifugados, separados da solução e lavados com acetonitrila. A solução do sobrenadante foi armazenada quantitativamente e a quantidade do complexo **1** imobilizado foi determinada por UV-vis ($4,42 \times 10^{-6}$ mol/g SiO₂; $7,16 \times 10^{-6}$ mol/g Fe₃O₄@SiO₂). Estes produtos foram caracterizados por UV-vis do sólido (Figura 13).

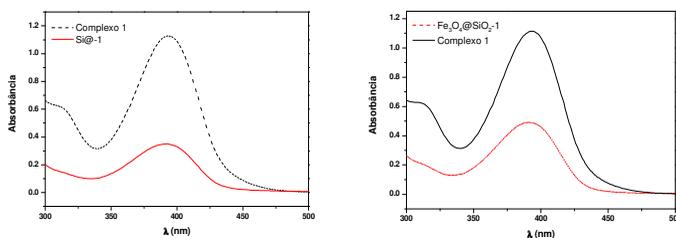


Figura 13: Espectro UV-vis do complexo 1 e dos sistemas SiO-1 e Fe₃O₄@SiO₂-1 em pastilha de KBr

ESTUDO DA REATIVIDADE DO COMPLEXO 1 FRENTE A HIDRÓLISE HOMOGÊNEA E HETEROGÊNEA DE UM DIESTER FOSFATO COMO MODELO ESTRUTURAL E/OU FUNCIONAL DA UREASE

A atividade catalítica do complexo **1** em solução homogênea na clivagem do diéster de fosfato 2,4-BDNPP é fortemente influenciada pelo pH da mistura reacional. Considerando que para o complexo **1** o gráfico da velocidade inicial (V_0) versus o pH tem um crescimento exponencial e foi optado trabalhar em pH 9 para comparar os resultados com a literatura (GREATI 2008) (Figura 14). Este resultado sugere fortemente que a variação na velocidade da reação depende da desprotonação da molécula de água coordenada ao sítio de Ni^{II} gerando a espécie ativa no meio reacional como sugerido para outros análogos de

$\text{Ni}^{\text{II}}\text{Ni}^{\text{II}}$ (LOLOEE, 2008; GREATTI, 2008; 2004;). A dependência da velocidade inicial com a variação da concentração do substrato (0,2–1,8 mM) em pH 9 revelou uma cinética de saturação do tipo Michaelis–Menten (Figura 15). O tratamento dos dados pelo método não linear utilizando a equação de Michaelis–Menten (Tabela) revelou que o complexo **1** hidrolisou cerca de 138.400 mais rápido o substrato 2,4-BDNPP que a reação não catalisada sobre as mesmas condições experimentais (BUNTON, 1969).

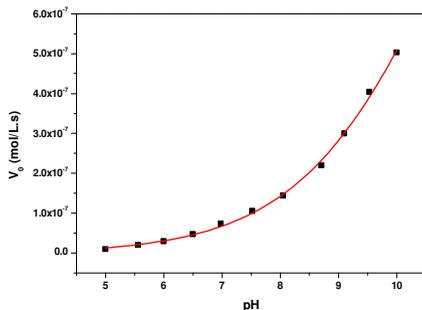


Figura 14: Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP (v_0) com o pH para o complexo **1** em solução. Condições: [Complexo] = $1,0 \times 10^{-5}$ mol. L⁻¹; [2,4-BDNPP] = $1,0 \times 10^{-3}$ mol. L⁻¹; [Tampão] = $50,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; $I = 50,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (LiClO₄) em solução H₂O/CH₃CN (50% V/V) a 25°C.

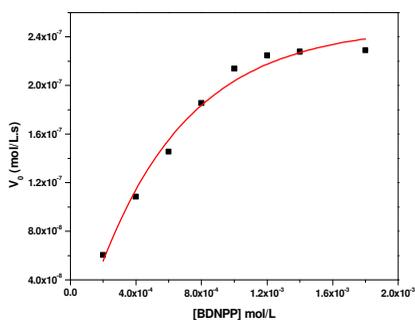


Figura 15: Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP com a concentração do substrato para o complexo **1**. Condições: [Complexo] = $1,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹; [Tampão] = $50,0 \times 10^{-3}$ mol. L⁻¹ (CHES, pH = 9,00); $I = 50,0 \times 10^{-3}$ mol. L⁻¹ (LiClO₄) em solução H₂O/CH₃CN (50% V/V) a 25 °C.

A atividade catalítica do complexo **1** quando imobilizado na sílica 3-amino comercial e nas nanoesferas de sílica (**Si3AP-1** e **Si0-1**) na clivagem do 2,4-BDNPP também é fortemente influenciada pelo pH

da mistura reacional. As curvas nos gráficos de pH mostrados na Figura 16 foram feitos utilizando o modelo de Boltzman e gerou valores de pK_a de 6,6 e 7,9 para **Si3AP-1** e **Si0-1**, respectivamente. A diferença de uma unidade de pK_a entre os dois sistemas pode ser atribuído ao fato que o primeiro sistema (**Si3AP-1**) se trata de um sistema não estruturado onde a molécula de água do sítio ativo do complexo pode estar sendo desprotonada mais facilmente através da interação dos grupos silanóis do suporte que estariam mais próximos do sítio ativo. Já o sistema **Si0-1** por ser mais ordenado o complexo estaria mais afastado da partícula e sofreria menos influencia do suporte.

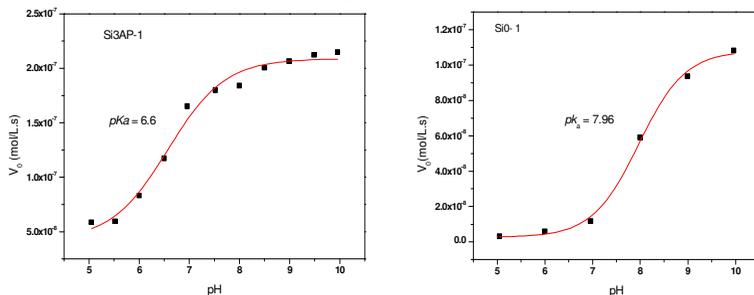


Figura 16. Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP (v_0) com o pH para os sistemas Si3AP-1 e Si0-1 na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP.

A dependência da velocidade inicial com a variação da concentração do substrato (0,2–1,8 mM) considerando o pH 9 como pH ótimo revelou uma cinética de saturação do tipo Michaelis–Menten (Figura 17). O tratamento dos dados pelo método não linear utilizando a equação de Michaelis–Menten (Tabela 3) nos forneceu os principais parâmetros cinéticos. O sistema Si0-1 apresentou um fator catalítico em torno de 118,500 (similar ao sistema homogêneo) e o sistema Si3AP-1 90,700 vezes mais rápido quando comparado à reação não catalisada. Esta diferença de 1,3 vezes entre os sistemas pode ser atribuída a uma melhor exposição do complexo na nanoesfera de sílica que estaria ocupando sua superfície tendo um acesso mais fácil ao substrato.

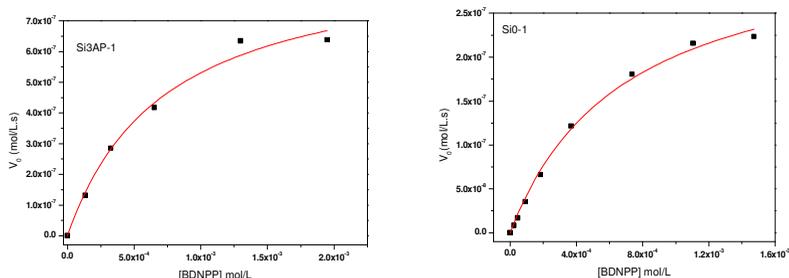


Figura 17: Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP (v_0) com a variação do substrato para os sistemas **Si3AP-1** e **SiO-1** na hidrólise do 2,4-BDNPP.

A atividade catalítica do complexo binuclear de níquel imobilizado na nanopartícula magnética recoberta de sílica (**Fe₃O₄@SiO₂-1**) na clivagem do 2,4-BDNPP também mostrou uma forte dependência com o pH muito similar aos sistemas **Si3AP-1** e **SiO-1**. Em pH 9, no estudo da variação do substrato este revelou comportamento de Michaelis–Menten (Figura 18). O tratamento não linear forneceu os principais parâmetros cinéticos listados na Tabela. Este sistema hidrolisou cerca de 90.700 vezes mais rápido o 2,4-BDNPP quando comparado à reação não catalisada (BUNTON, 1969). Apesar deste sistema ser uma nanopartícula apresentou um resultado igual ao sistema não estruturado. Uma possível explicação pode estar no fato de que as partículas magnéticas estariam se agregando durante a reação bloqueando parcialmente os sítios de níquel impedindo a aproximação do substrato.

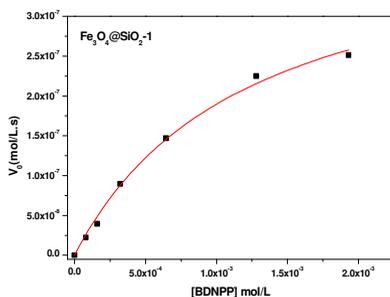


Figura 18: Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP (v_0) com a variação do substrato para os sistemas **Fe₃O₄@SiO₂-1**.

Para investigar a possível hidrólise do monoéster 2,4-DNPP, como um produto formado na hidrólise do diéster 2,4-BDNPP, uma reação estequiométrica entre o complexo **1** e o substrato 2,4-BDNPP, foi monitorada. Foi observado que dois equivalentes do fenolato foram liberados após 12 horas de reação a 25 °C em pH 9, indicando que ambos, monoéster e diéster, estão sendo hidrolisados. Com base nestas informações e assumindo que a reação de hidrólise do diéster leva a formação de um intermediário (presumivelmente o monoéster coordenado ao complexo) nós decidimos investigar a atividade catalítica do complexo **1** na hidrólise do monoéster 2,4-DNPP. Como pode ser observada na Figura 19, a determinação da velocidade inicial como função da concentração do substrato revelou comportamento de Michaelis-Menten. Os parâmetros cinéticos, $k_{cat} = 2,04 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ and $K_{ass} = 33.333 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ nos mostram que a constante de associação do monoéster com o complexo **1** é cerca de 52 vezes maior, enquanto o valor de k_{cat} é cerca de 26 vezes menor quando comparado aos valores obtidos para o diéster 2,4-BDNPP.

Este resultado leva a conclusão de que grupos nucleófilos distintos no complexo **1** podem estar agindo como catalisadores na hidrólise do mono e do diéster de fosfato. É importante ressaltar que a hidrólise espontânea do monoéster 2,4-DNPP é cerca de 50 vezes maior que a hidrólise do diéster 2,4-BDNPP sob as mesmas condições (BUNTON, 1969). Neste caso é observado justamente o contrário, indicando claramente que a reação de hidrólise do monoéster está ocorrendo através do ataque de um nucleófilo mais fraco que aquele responsável pelo ataque no diéster (GREATI, 2000) (Esquema 2).

Tabela 3: Parâmetros cinéticos para a hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo 1 em solução e imobilizado em pH 9 a 25 °C.

	V_0 (mol.L.s ⁻¹)	K_M (mol.L ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	$^a K_{ASS}$ (L.mol ⁻¹)	$^b E$ (L.s.mol ⁻¹)	$^c f$	Turn over (h ⁻¹)
1	$5,37 \times 10^{-7}$	$1,57 \times 10^{-3}$	$5,37 \times 10^{-2}$	637	34,2	138.400	33,4
Si3AP-1	$9,20 \times 10^{-7}$	$7,30 \times 10^{-4}$	$3,52 \times 10^{-2}$	1370	48,2	90.700	33,5
Si0-1	$3,40 \times 10^{-7}$	$6,9 \times 10^{-4}$	$4,6 \times 10^{-2}$	1450	66	118.500	32,7
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1	$4,19 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-3}$	$3,52 \times 10^{-2}$	826	29	90.700	22,7
1 - 2,4-DNPP	$2,04 \times 10^{-9}$	3×10^{-5}	$2,04 \times 10^{-3}$	33.333	68	105	-

^a $K_{ass} = 1/K_M$, ^b $E = k_{cat}/K_M$ (eficiência catalítica), ^c $f = (k_{cat}/k_{uncat}) k_{uncat} = 3,88 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$. (BUNTON, 1969)

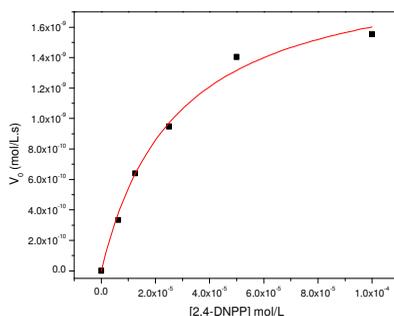
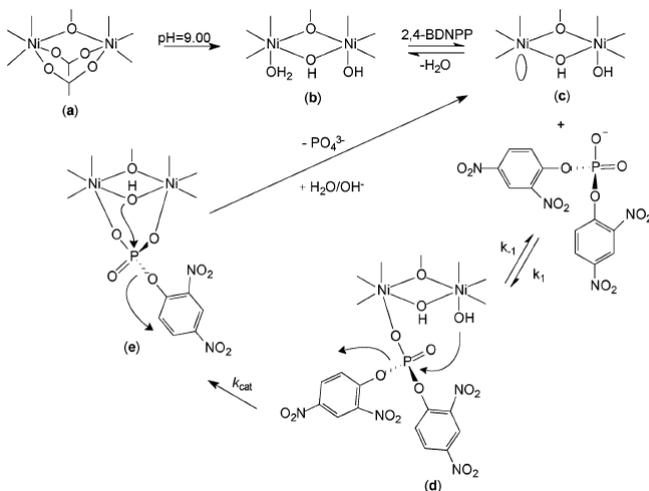


Figura 19: Dependência da velocidade de reação do 2,4-DNPP com a concentração do substrato para o complexo 1. Condições: [Complexo] = $1,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹; [Tampão] = $50,0 \times 10^{-3}$ mol. L⁻¹ (CHES, pH = 9,00); $I = 50,0 \times 10^{-3}$ mol. L⁻¹ (LiClO₄) em solução H₂O/CH₃CN (50% V/V) a 25 °C.

Esquema 2: Proposta mecanística para a hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo 1 como descrito para o complexo análogo Ni^{II}Ni^{II} (GREATI, 2004).



Diante dos resultados obtidos, buscou-se avaliar se o ataque nucleofílico ao átomo de fósforo estaria sendo realizado pelo íon hidróxido terminal ou através de uma catálise básica geral. Neste sentido realizou-se um experimento do efeito isotópico do deutério sobre a velocidade de hidrólise do 2,4-BDNPP pelos sistemas: complexo 1, Si3AP-1, Si0-1 e Fe₃O₄@SiO₂-1.

De acordo com Burstyn e colaboradores (BURSTYN, 1996), se a razão entre as constantes de velocidades de duas reações idênticas, realizadas em H₂O e D₂O (k_H/k_D), estiver entre 0,80 e 1,50 isto seria um indicativo que não há transferência de próton envolvida na etapa determinante da reação, sugerindo um mecanismo envolvendo ataque nucleofílico intramolecular (GOLD, 1967). As razões k_H/k_D obtidas para os sistemas complexo **1**, **Si3AP-1**, **Si0-1** e **Fe₃O₄@SiO₂-1** foram em torno de 0,95. Isto indica que a reação de hidrólise segue um mecanismo intramolecular no qual o átomo de fósforo sofre um ataque nucleofílico do íon hidróxido.

A eficiência na imobilização do complexo **1** em sílica não funcionalizada (sílica gel 70-230 mesh) a qual não há possibilidade da formação de ligações covalentes, foi muito baixa. Somente 20% do complexo utilizado foi imobilizado no suporte quando comparado, por exemplo, aos 80% imobilizado na sílica 3-amino funcionalizada submetido às mesmas condições. Além disso, não foi observada hidrólise significativa do 2,4-BDNPP quando comparada à reação não catalisada. Isto sugere que o processo de imobilização por adsorção e mais provavelmente por interações eletrostáticas contribui para o bloqueio do sítio catalítico, o qual pode estar parcialmente ocupado pela interação com os grupos silanóis da sílica e não permitindo a aproximação do substrato (PIOVEZAN, 2005).

O processo de imobilização por ligação covalente através da formação da ligação imina reportada aqui é mais específica e permite a interação do complexo com o substrato para gerar a espécie cataliticamente ativa com elevado número de turnovers na hidrólise do 2,4-BDNPP.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALAGNA, L., HASNAIN, S. S., WILLIAMS, D. J. The nickel ion environment Jack bean urease. Biochemistry Journal., v. 220, p. 591, **1984**.

BARRIOS, A. M, and LIPPARD, S. J. Phthalazine-based dinucleating ligands afford dinuclear centers often encountered in metalloenzyme active sites Inorganic Chemistry, v. 40, p.1060, **2001**.

BARRIOS, A. M, LIPPARD, S. J. Interation of urea with a hydroxide-bridged dinuclear nickel center: An alternative model for the mechanism of urease. Journal American of Chemical Society, v. 122, p. 9172, **2000**.

BENINI, S., RYPNIEWSKI, W. R., WILSON, K. S., *et al.* A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: Why urea hydrolysis costs two nickels. Structure with Folding & Design, v. 7, p. 205, **1999**.

BLAKELEY, R. L., TRESTON, A. ANDREWS, R.K., *et al.* Nickel (II) – promoted ethanolsysis and hydrolysis of N-(2-pyridilmethyl) urea. A model for urease. Journal of the American Chemical Society, v.1014, p. 612, **1982**.

BUCHANAN, R. M., MASHUTA, M. S., OBERHAUSEN, K. J., Active site model of urease: Syntheses, structure and properties of a binuclear Ni(II) complex containing a polymidazole ligand. Journal American of Chemical Society, v. 111, p. 4497, **1989**.

BURSTYN, J. N. DEAL, K. A., and HENGGE, A. C.; 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, **1996**.

BUTON, C. A; FARBER, S. J., Hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate, Journal of Organic Chemistry, vol. 34, p. 767, **1969**.

CLARK, P. A., WILCOX, D. E., SCOTT, R. A. X - Ray absorption spectroscopic evidence for binding of the competitive inhibitor 2-

mercaptoethanol to the nickel sites of Jack bean urease. A new Ni–Ni interaction in the inhibited enzyme. Inorganic Chemistry, v. 29, p. 579, **1990**.

DIXON, N. E., BLAKELEY, R., L., ZERNER, B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A simple dry ashing procedure for the micro-determination of trace-metals in proteins - the nickel content of urease. Canadian Journal of Biochemistry, v. 58, p. 469, **1980**.

DIXON, N. E., GAZZOLA, C., BLAKELEY, R. L., Metalloenzymes. Simple biological role for nickel. Journal of the American Chemical Society, v. 97, p. 4131, **1975**.

GEARY, W.J.; The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds Coordination Chemistry Reviews, v. 7, p. 81, **1971**.

GOLD, V. Advances in Physical Organic Chemistry. Academic Press, New York, 1967.

GREATTI A., SCARPELLINI M., PERALTA R. A., CASELLATO A., BORTOLUZZI A. J., XAVIER F. R., JOVITO R., DE BRITO M. A., SZPOGANICZ B., TOMKOWICZ Z., RAMS M., HAASE W., AND NEVES A.; Synthesis, Structure, and Physicochemical Properties of Dinuclear Ni^{II} Complexes as Highly Efficient Functional Models of Phosphohydrolases, Inorganic Chemistry, v 47, p.1107, **2008**.

GREATTI, A. Novos complexos binucleares de níquel como modelos para o sítio ativo das ureases. 2000. 104 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, **2000**.

GREATTI, A.; de BRITO, M. A.; BORTOLUZZI, A. J.; CECCATO, A. S.; Synthesis, characterization and structure of a new dinickel(II) complex as model for urease, Journal of Molecular Structure v. 688, p.185, **2004**.

HALCROW, M., CHRISTOU, G. Biomimetic chemistry of nickel. Chemical Review, v. 94, p. 2421, **1994**.

HASNAIN, S. S., PIGGOTT, B. An EXAFS study of Jack bean urease, a nickel metalloenzyme. Biochemical Biophysical Research Communication, v. 112, p. 279, **1983**.

HOSAKAWA, Y., YAMANE, H., NAKAO, Y., Synthesis, structure and characterization of dinuclear nickel (II) complexes containing the derivatives of N,N,N',N'-Tetrakis-[(2-benzimidazolyl)methyl]-2-hidroxy-1,3-diaminopropano and an acetate or propionate ion. Inorganic Chimica Acta, v. 283, p. 118, **1998**.

KARPLUS, P. A., JABRI, E., CARR, M. B., The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. Science, v. 268, p. 998, **1995**.

KOGA, T., FURUTACHI, H., NAKAMURA, H., Dinuclear nickel (II) complexes of phenol-based "end – off" compartmental ligands and their urea adducts relevant to the urease active site. Inorganic Chemistry, v. 37, p. 989, **1998**.

KOŁODZIEJ, A. F. The chemistry of nickel containing enzymes. In: KARLIN, K. D. Progress in Inorganic Chemistry. New York: John Wiley & Sons, v. 41, p. 493, **1994**.

KRYATOU, S. V., NAZARENKO, A. Y., ROBINSON, P. D., A dinuclear iron (III) complex with a bridging urea anion: implications for the urease mechanism. Chemical Communications, v. 11, p. 921, **2000**.

LOLOEE R., CHAVEZ F. A., PAWLAK P. L., MALKHASIAN A. Y. S., SJLIVIC B., TIZA M. J., KUCERA B. E., Synthesis, structure, and magnetic properties of a new binuclear Ni(II) complex supported by 1,4,8-triazacycloundecane, Inorganic Chemistry Communications, v. 11, p. 1023, **2008**.

MEYER, F. and PRITZKOW, H. A bridging coordination mode of urea and carbamate at a dinuclear nickel (II) centre. Chemical Communications, v. 15, p.1555, **1998**.

MEYER, F., JACOBI, A., NUBER, B., A Dinickel (II) complex with readily accessible coordination sites and additional N-functional groups in proximity to the bimetallic core. Inorganic Chemistry, v. 37, p. 1213, **1998**.

MEYER, F., KONRAD, M., KAIFER, E. Novel $\mu(3)$ -coordination of urea at a nickel(II) site: Structure, reactivity and ferromagnetic superexchange. European Journal Inorganic Chemistry, v. 11, p. 1851, **1999**.

MEYER, F.; BUCHLER, S.; KAIFER, E., Tunable TACN/pyrazolato hybrid ligands as dinucleating scaffolds for metallobiosite modeling-dinickel(II) complexes relevant to the urease active site. Inorganic Chimica Acta, v.337, p.371, **2002**.

MOBLEY, H. L. T., HAUSINGER, R. P. Microbial ureases – Significance, regulation , and molecular characterization. Microbiology Review, v. 53, p. 85, **1989**.

NAKAMOTO, K.; Infrared and Raman Spectra of inorganic and coordination compounds, 5th ed. **1977**.

NORDLANDER, E., CARSSON, H., HAUKKA, M., Hydrolytically Active Tetranuclear Nickel Complexes with Structural Resemblance to the Active Site of Urease. Inorganic Chemistry, v.41, p. 4981, **2002**.

PIOVEZAN, C.; LISBOA, F; CASTRO K.A.D.F. NUNES, F.S.; NAKAGAKI, S.; DRECHSEL, S.M., Epoxidation using non-heme iron complexes in solution and immobilized on silica gel as catalysts, Applied Catalysis A: General, vol. 293, p. 97, **2005**.

STEMMLER, A. J., KAMPF, J. W. PECORARO, V. L., A model for the inhibition of urease by hidroxamates. Journal American of Chemical Society, v. 117, p. 6368, **1995**.

SUMMER, J.B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. Journal of Biological Chemistry, v. 69, p.135, **1926**.

VOLKMER, D., HOMMERICH, B., GRIESSAR, K., Dinuclear nickel(II) complexes as models for the active site of urease. Inorganic Chemistry, v. 35, p. 3792, **1996**.

VOLKMER, D., HORSTMANN, A., GRIESSAR, K., $[\text{Ni}_2(\text{ppepO})(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})_2(\text{CH}_3\text{COOH})]\text{ClO}_4 \cdot \text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$: Synthesis and characterization of an assymmetric dinuclear Ni(II) complex showing

unusual coordination behavior with relevance to the active site of urease. Inorganic Chemistry, v. 35, p. 1132, **1996**.

VOLKMER, D., KREBS, B., HOMMERICH, B., Model complex for ureases: A dinickel (II) complex with a novel asymmetric ligand and comparative kinetic studies on catalytically active zinc, cobalt, and nickel complexes. Zeitschrift fuer Anorganische Allgemeine Chemie, v. 625, p. 75, **1999**.

WAGES, H. E., TAFT, K. L., LIPPARD, S. J. $[\text{Ni}_2(\text{OAc})_3(\text{urea})(\text{tmen})_2](\text{OTf})$ and $[\text{Ni}(\text{OAc})(\text{urea})_2(\text{tmen})](\text{OTf})$, model complexes for the enzyme urease. Inorganic Chemistry, v. 32, p. 4985, **1993**.

YAMAGUCHI, K., KOSHINO, S., AKAGI, F., Structures and catalytic activities of carboxylate – bridged dinickel (II) complexes as models for the metal center of urease. Journal American of Chemical Society, v. 119, p. 5752, **1997**.

YOZUMI, S., FURUTACHI, H., OHBA, M., Dinuclear nickel (II) complexes of an unsymmetric “end – off” compartmental ligand: conversion of urea into cyanate at a dinuclear nickel core. Inorganic Chemistry, v. 37, p. 6281, **1998**.

ZERNER, B. Recent advances in the chemistry of an old enzyme, urease. Bioorganic Chemistry, v. 19, p. 116, **1991**.

CAPÍTULO 4

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA REATIVIDADE DE UM COMPLEXO HETEROBINUCLEAR DE FERRO/NÍQUEL E FERRO/ZINCO COMO MODELO PARA A FOSFATASE ÁCIDA PÚRPURA

FOSFATASE ÁCIDA PÚRPURA

As fosfatases ácidas púrpuras são metaloproteínas binucleares que catalisam a hidrólise de certos ésteres fosfatos, incluindo di e trifosfatos e fosfatos arílicos, sob condições ácidas (Figura 20).

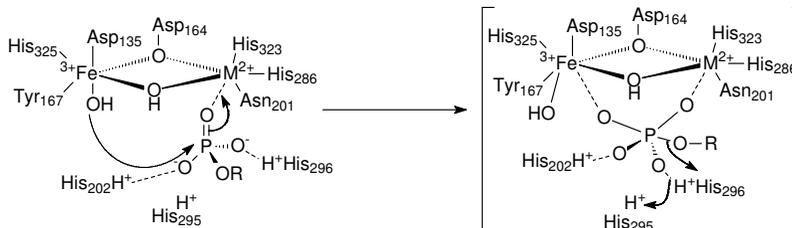


Figura 20: Mecanismo proposto para a hidrólise de fosfomonoésteres pela fosfatase ácida púrpura (HEGG, 1998). O sítio ativo neste mecanismo está baseado na estrutura cristalina da fosfatase ácida púrpura do feijão vermelho ($M^{2+} = Zn^{2+}$) (STRATER, 1995).

Possuem uma coloração característica que se deve à transição de transferência de carga Tiroxina \rightarrow Fe^{III}. As fosfatases ácidas púrpuras foram encontradas nos mais variados tecidos vegetais, como nas sementes, raízes, folhas, caules e bulbos (FGELLATLY, 1994; STASWICK, 1994; BISWAS, 1991; PARANA, 1990). Elas também têm sido estudadas em muitos tecidos animais, como por exemplo, nas células do fígado, baço, eritrócitos e plasma sanguíneo (SCHENCK, 2000; HOLLANDER, 1971;).

Os sítios ativos das fosfatases animais consistem de centros com dois átomos de ferro com dois estados de oxidação acessíveis: uma forma oxidada Fe^{III} Fe^{III} ($\lambda_{\text{máx}} \sim 550$ nm) e uma reduzida Fe^{III} Fe^{II} ($\lambda_{\text{máx}} \sim 510$ nm) (LAMBERT, 1997; NEVES, 1996;). Por outro lado, as enzimas de plantas tem centros Fe^{III} - Zn^{II} (Figura 21), mas as esferas de coordenação das enzimas de plantas e de mamíferos são muito similares. Isto é mostrado por estudos espectroscópicos e pela observação que a troca de Zn^{II} por Fe^{II} nas plantas exibe um comportamento espectroscópico e cinético muito similar ao dos mamíferos (STRATER, 1995).

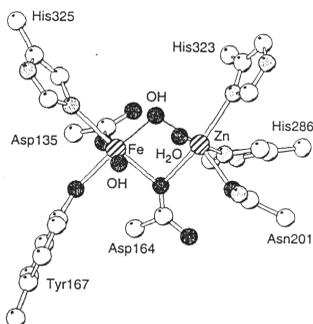


Figura 21: Sítio ativo da fosfatase ácida púrpura do feijão vermelho, com resolução de 2.9 Å (STRATER, 1998).

O estudo de fosfatases ácidas tem um importante significado clínico, pois muitas doenças são associadas ao aumento da sua atividade total, como: a invasão maligna dos ossos por câncer, leucemia e desordens hematológicas, entre outras. (CALVO-MARZAL, 2001; CASTANON-FERNANDES, 2000).

SÍNTESE DOS COMPLEXOS $[\text{FeNi}(\text{BPPAMFF})(\mu\text{-AcO})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ (2) E $[\text{FeZn}(\text{BPPAMFF})(\mu\text{-AcO})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ (3)

Os complexo **2** e **3** foram sintetizados da mesma maneira através da reação entre 1 mmol (0,54 g) of $\text{H}_2\text{BPPAMFF}$ e 1 mmol (0,365 g) de $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_6\text{H}_2\text{O}$ ou (0,336 g) de $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 20 mL de metanol seguido pela adição de 1 mmol (0,510 g) de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0,510 g) e 2 mmol (0,272 g) de $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ com agitação magnética e aquecimento (60°C) ambos formando uma solução púrpura. Depois de deixar estas soluções por alguns dias de repouso a temperatura ambiente um sólido cristalino foi isolado. Rendimento: FeNi 46%. FeZn 43% CHN (Calc). para FeNi - $\text{C}_{41}\text{H}_{48}\text{ClFeN}_4\text{NiO}_{14}$ 970,84 g/mol: C 50,72; H 4,98, N 5,77. Enc: C 50,69; H 4,82; N 5,75. Para FeZn - $\text{C}_{41}\text{H}_{44}\text{ClFeN}_4\text{ZnO}_{12}$ 941,47 g/mol: C 52,30; H 4,71; N 5,95. Enc: C 52,27; H 4,68; N 5,93. A estrutura cristalina por difração de raios x do sistema **2** foi resolvida parcialmente e do sistema **3** totalmente.

IMOBILIZAÇÃO DOS COMPLEXOS 2 E 3 EM SÍLICA 3-AMINO FUNCIONALIZADA

Si3AP (1g) foi suspensa em acetonitrila (20 mL) sob agitação magnética. Complexo **2** ($3,14 \times 10^{-5}$ mol \approx 30 mg) e **3** ($3,27 \times 10^{-5}$ mol \approx 30 mg) foram dissolvidos em 5 mL de acetonitrila e foram adicionados a sílica. Após 24h de reação (a temperatura ambiente), o sólido foi centrifugado e depois de seco a vácuo foi lavado em extrator Soxhlet por 12 h utilizando acetonitrila como solvente. A cor da sílica tornou-se ouro para o complexo **2** e amarelo brilhante para o complexo **3**. O sobrenadante da solução da imobilização assim como a solução da lavagem do sólido foram avolumadas e analisadas por UV-vis para se determinar a quantidade de complexo imobilizado na sílica. Os materiais imobilizados foram finalmente secos a vácuo por 24 h. Os produtos nomeados, **Si3AP-2** e **Si3AP-3**, foram caracterizados por UV-vis de sólido (suspensão em benzeno). As respectivas quantidades de complexo imobilizado por grama do suporte foram: **Si3AP-2** $3,12 \times 10^{-5}$ mol/g e **Si3AP-3** $3,24 \times 10^{-5}$ mol/g.

CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS [FeNi(BPPAMFF)(μ -AcO)₂(H₂O)]ClO₄ (**2**) E [FeZn(BPPAMFF)(μ -AcO)₂(H₂O)]ClO₄ (**3**)

As estruturas cristalinas dos complexos **2** e **3** foram obtidas através da análise de monocristais dos respectivos complexos pelo método de difração de raios X. Os dados cristalográficos e do refinamento da estrutura para os complexos **2** e **3** estão apresentados na Tabela 4 e Anexos 2 e 3.

Tabela 4. Dados Cristalográficos e refinamento da estrutura para os complexos **2** e **3**.

Complexo	2	3
Fórmula empírica	C ₄₁ H ₄₈ N ₄ O ₁₄ ClFeNi	C ₄₁ H ₄₄ N ₄ O ₁₂ ClFeZn
Massa molar (g.mol ⁻¹)	970,84	941,47
Temperatura (K)	296(2)	293(2)
Comprimento de onda (Å)	0,71073	0,71073
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /n	P2 ₁ /n
Dimensões da cela unitária	a = 11,873(1) Å b = 19,195(2) Å c = 20,511(2) Å β = 102,318(5)°	a = 12,388(3) Å b = 19,613(2) Å c = 17,836(2) Å β = 92,45(1)°
Volume (Å ³)	4566,9(8)	4329,6(12)
Z / Densidade calculada (g.cm ³)	4 / 1,412	4 / 1,444
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,856	1,016

F(000)	2020	1948
Tamanho do cristal (mm ³)	0,50×0,18×0,09	0,50×0,30×0,30
Intervalo de θ (°)	2,75-23,68	1,54-25,08
Intervalo dos índices h, k, l	-13 ≤ h ≤ 12 -18 ≤ k ≤ 20 -22 ≤ l ≤ 22	-14 ≤ h ≤ 14 -23 ≤ k ≤ 0 -21 ≤ l ≤ 0
Reflexões coletadas / únicas	13094 / 5388 (R _{int} = 0,0938)	7959 / 7699 (R _{int} = 0,0954)
Correção de absorção	Gaussian	Psi-scan
Máx. e Min. de transmissão	0,9395 e 0,8302	0,750 e 0,631
Método de refinamento	Mínimos quadrados de	matriz completa em F ²
Dados / restrições / parâmetros	5388 / 0 / 663	7699 / 0 / 529
GOOF (F ²)	1,092	1,006
Índice final de R[$I > 2\sigma(I)$]	R = 0,0965, R _w = 0,2465	R = 0,0734, R _w = 0,1796
Índice de R (todos os dados)	R = 0,1553, R _w = 0,3100	R = 0,2059, R _w = 0,2268
Densidade eletrônica residual (e.Å ⁻³)	0,851 e - 0,563	0,959 e - 0,392

A estrutura de raios x do complexo **2** (Figura 22) mostrou que o íon Ni(II) está coordenado ao ligante BPPAMFF²⁻ através de uma amina (N4) e uma piridina (N42). O íon Fe^{III} está coordenado através da amina terciária (N1), piridina (N32) e de um átomo de oxigênio (O 20) desprotonado do fenol. Dois acetatos exógenos e um fenolato endógeno fazem a ligação entre os íons metálicos. A esfera de coordenação em torno dos centros de Fe^{III} e Ni^{II} encontram-se na geometria de um octaedro distorcido onde uma molécula de água completa a esfera de coordenação do Ni^{II}.

As principais distâncias e ângulos de ligação são muito similares a aqueles encontrados para o complexo [FeNi(bppamff)(μ -AcO)₂]ClO₄ (BATISTA, 2003) e estão listados na Tabela 5.

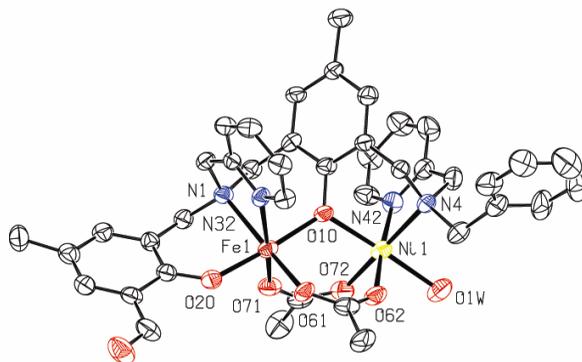


Figura 22: ORTEP para o cátion complexo [FeNi(bppamff)(μ -AcO)₂(H₂O)]⁺

Tabela 5: Tabela comparativa de distâncias interatômicas (Å) e ângulos (°) de ligação selecionados para os complexos [FeNi(bppamff)(μ-AcO)₂(H₂O)]ClO₄ (2) e [FeZn(bppamff)(μ-AcO)₂(H₂O)]ClO₄ (3)

Ligações	Distâncias interatômicas (Å) e ângulos (°) de ligação	
	2	3
Fe-M ^{II}	3,525(2)	3,523(1)
Fe-O _{fenolato} terminal	1,923(9)	1,899(2)
Fe-O _{fenolato} ponte	2,000(8)	1,968(2)
M ^{II} -O _{fenolato} ponte	2,081(7)	2,135(2)
Fe-O _{acetato} 1	1,982(10)	1,986(5)
Fe-O _{acetato} 2	1,991(7)	1,948(5)
M ^{II} -O _{acetato} 1	2,054(9)	2,039(6)
M ^{II} -O _{acetato} 2	2,051(11)	2,067(6)
Fe-N _{amina}	2,237(8)	2,217(3)
Fe-N _{piridina}	2,162(9)	2,185(6)
M ^{II} _{amina}	2,153(10)	2,273(6)
M ^{II} _{piridina}	2,052(9)	2,120(7)
Ângulos		
M ^{II} -O _{fenolato} ponte-Fe	119,5(3)	118,27(12)
N _{amina} -Fe- N _{piridina}	77,2(3)	76,86(17)
N _{amina} -Fe- O _{fenolato} terminal	92,1(4)	88,28(10)
N _{amina} -M ^{II} - N _{piridina} 1	81,7(4)	78,2(2)

O complexo **3** [FeZn(bppamff)(μ-AcO)₂(H₂O)]ClO₄ apresentou um arranjo heterodinuclear onde cada íon metálico encontra-se coordenado por uma das metades do ligante BPPAMFF²⁻, e ponteados pelo grupo fenolato 2,4,6-substituído (Figura 23). O metal divalente (Zn^{II}) está coordenado por um átomo de nitrogênio piridínico e um nitrogênio da amina terciária, enquanto que o íon Fe^{III} encontra-se coordenado a um nitrogênio piridínico, um nitrogênio da amina terciária e pelo oxigênio do fenolato terminal. No complexo **3** as duas posições

de coordenação restantes dos metais são ocupadas por pontes do tipo μ -acetato exógenas, formando um arranjo octaédrico distorcido com a metade do ligante ocupando as faces externas do octaedro e as pontes acetato e fenóxido as faces internas. Nesse complexo, os átomos de oxigênio das pontes acetato estão coordenados ao sítio de Zn^{II} de maneira *trans* a uma das piridinas e à amina terciária, enquanto que uma molécula de água ligada ao sítio divalente encontra-se coordenada de maneira *trans* à ponte fenóxido. As principais distâncias e ângulos de ligação encontram-se na Tabela.

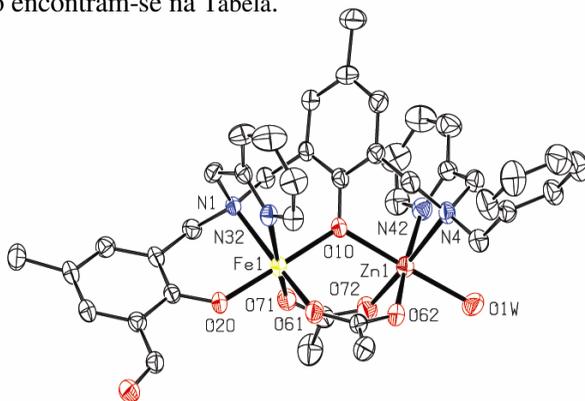


Figura 23: ORTEP para o cátion complexo $[FeZn(bppamff)(\mu-AcO)_2(H_2O)]^+$.

Comparando-se as distâncias metal-metal (Fe-Ni e Fe-Zn) dos complexos **2** e **3** (Tabela) podemos observar valores bastante próximos, 3,525 e 3,523 Å, similares aos valores encontrados para os complexos $[Fe^{III}Fe^{II}L1(OAc)_2]ClO_4$ (3,504 Å) (HORN, 2000) e $[Fe^{III}Mn^{II}L1(OAc)_2]ClO_4$ (3,510 Å) (NEVES, 2002) quando comparados a distância Fe-Zn da kbPAP (3,26 Å) (KLABUNDE, 1996; STRATER, 1995) essas distâncias estariam em média 0,3 Å maiores.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho para **2** e **3** (Figura 24) são muito similares e além dos estiramentos característicos do ligante apresentaram bandas do grupo acetato $\nu_{ass}(COO^-)$ em 1606 cm^{-1} e $\nu_s(COO^-)$ em 1468 cm^{-1} indicando a coordenação do grupo carboxilato no modo ponte ($\Delta=110\text{ cm}^{-1}$) (NAKAMOTO, 1977). O intenso estiramento em 1095 cm^{-1} é atribuído ao modo vibracional do contra íon perclorato, assim como em 626 cm^{-1} . A banda alargada na região de 3450 cm^{-1} podem ser tentativamente atribuída a uma molécula de água $\nu(O-H)$.

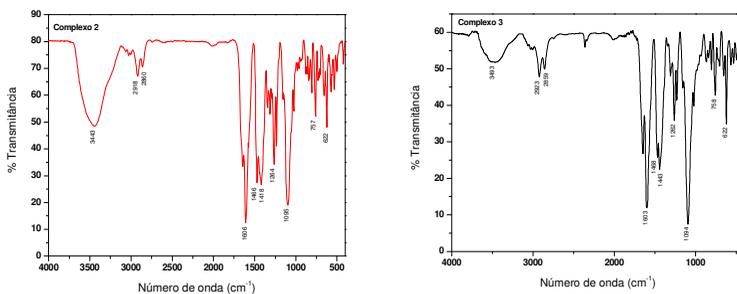


Figura 24: Espectro vibracional na região do infra-vermelho em pastilha de KBr para os complexos 2 e 3.

O espectro eletrônico de **2** e **3** (Figura 25) medido em solução de acetonitrila revelou bandas em 362 nm ($\epsilon = 5770 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e 534 nm ($\epsilon = 7200 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) para **2** e 360 nm ($\epsilon = 5200 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e 540 nm ($\epsilon = 1630 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) para **3**. As bandas destes sistemas podem ser atribuídas como uma transferência de carga do grupo fenolato para o centro de Fe^{III} , como já previsto para sistemas similares de FeNi e FeZn (JOVITO, 2005; BATISTA, 2003; LANZNASTER, 2002).

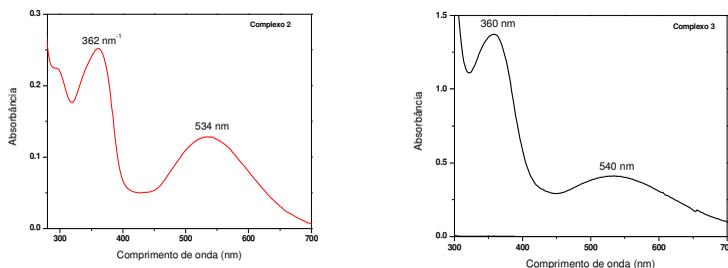


Figura 25: Espectro eletrônico UV-vis para os complexos 2 e 3 em solução de acetonitrila (10^{-3} mol/L).

O comportamento eletroquímico dos complexos **2** e **3** foi estudado por voltametria cíclica (Figura 26). Voltamogramas cíclicos foram obtidos em solução de diclorometano seco em uma faixa de potencial de -2,0 até 2,0 V versus Ag/AgCl , utilizando tetrabutilamônio hexafluorofosfato como eletrólito suporte e ferroceno como padrão interno. Para o complexo **2**, dois processos redox irreversíveis foram observados: O primeiro processo em -0,48 V versus NHE, foi atribuído

ao par $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Ni}^{\text{II}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}\text{Ni}^{\text{II}}$. A segunda onda catódica observada em $-1,12$ V versus NHE pode ser atribuída ao sistema $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Ni}^{\text{II}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}\text{Ni}^{\text{I}}$. A não reversibilidade destes processos redox pode ser um indicativo da instabilidade da forma totalmente reduzida do complexo em solução. Para o complexo **3** um processo redox *quasi* reversível ocorreu em $E_{1/2} = -0,43$ V versus NHE, atribuído ao par $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}\text{Zn}^{\text{II}}$. Este potencial esta de acordo com o esperado para um sistema FeZn quando comparado com complexos análogos (LANZNASTER, 2002; NEVES, 2007).

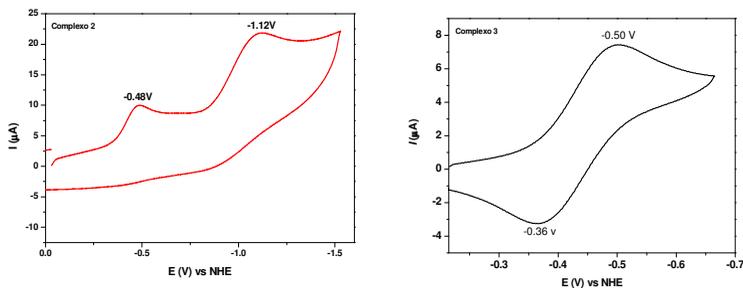


Figura 26: Voltamograma cíclico do complexo 2 e 3 em diclorometano seco ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ [TBA][PF₆] eletrólito suporte, eletrodo de trabalho: carbono vítreo; eletrodo de referencia Ag/AgCl; eletrodo suporte Pt; padrão interno: ferroceno; velocidade de varredura 100 mV.s^{-1}).

Estudos de titulação potenciométrica dos complexos **2** e **3** (acetonitrila/água 50:50 V/V) mostraram a neutralização de 3 mol de KOH/mol de complexo na faixa de pH de 3 até 11. Após o ajuste dos dados experimentais com auxílio do programa BEST7 (Figura 27), as constantes de protonação foram obtidas (Tabela 6). A dissociação dos grupos carboxilato em ponte de **2** e **3** em meio aquoso foi semelhante aquela reportadas pela literatura para complexos análogos onde a ponte exógena é facilmente liberada com o aumento do pH em solução (BATISTA, 2003; LANZNASTER, 2002; LAMBERT, 1997).

A titulação espectrofotométrica foi feita nas mesmas condições da titulação potenciométrica. O estudo da solução de **2** e **3** (acetonitrila/água 50:50 V/V) mostrou que a posição do λ máximo na banda de transferência de carga do ligante para o metal ($\text{pheO} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$) é fortemente dependente da variação do pH da solução. Nas faixas de pH de 2,9- 5,8 (Figura 28 A), 5,8-7,7 (Figura 28 B), e 7,7-9,7 (Figura 28 C), são observados pontos isosbesticos indicando a presença de duas espécies em equilíbrio, durante cada faixa de espectro individual. A

partir das curvas de distribuição das espécies (Figura 27) pode-se determinar os valores de pK_a para as espécies em solução e seus valores estão coerentes com os seguintes equilíbrios: Complexo **2** $[(\text{OH}_2)_2\text{Fe}^{\text{III}}\text{Ni}^{\text{II}}(\text{OH}_2)_2] \leftrightarrow [(\text{OH}_2)(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}\text{Ni}^{\text{II}}(\text{OH}_2)_2] \leftrightarrow [(\text{OH})_2\text{Fe}^{\text{III}}\text{Ni}^{\text{II}}(\text{OH}_2)] \leftrightarrow [(\text{OH})_2\text{Fe}^{\text{III}}\text{Ni}^{\text{II}}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]$ (NEVES, 2008) e complexo **3** $[(\text{OH}_2)\text{Fe}(\mu\text{-OH}_2)\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)] \leftrightarrow [(\text{OH}_2)\text{Fe}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)] \leftrightarrow [(\text{OH})\text{Fe}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)] \leftrightarrow [(\text{OH})\text{Fe}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH})]$ (LANZMASTER, 2002).

Tabela 6: Constantes de desprotonação para os sistemas 2, 3, Si3AP-2 e Si3AP-3

	Titulação potenciométrica			Titulação espectrofotométrica			Cinética	
	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	pK_{a1}	pK_{a2}
2	5,31	6,32	8,69	5,29	6,82	8,50	5,36	8,12
3	4,88	6,70	8,25	4,94	6,87	8,33	5,38	6,67
Si3AP-2	-	-	-	-	-	-	6,40	9,55
Si3AP-3	-	-	-	-	-	-	5,50	-

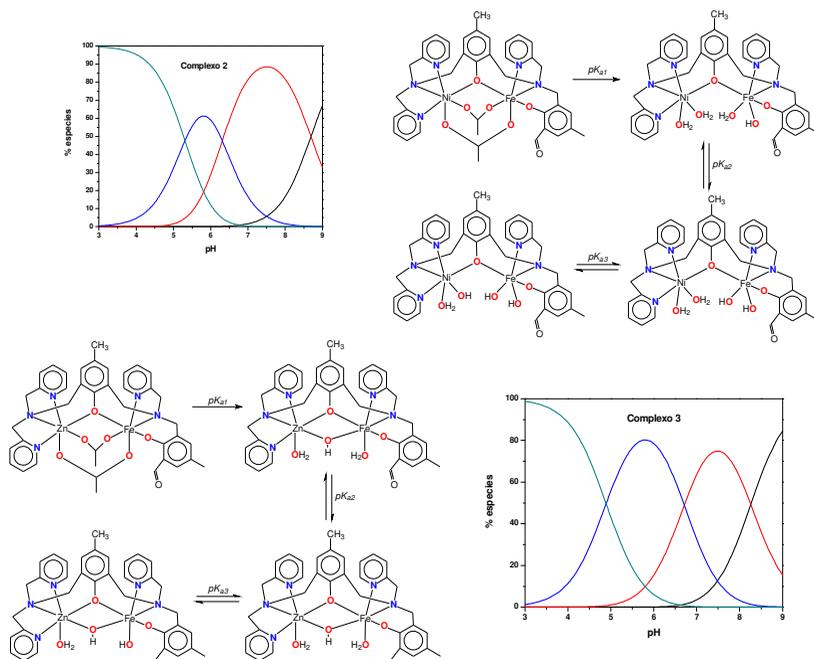


Figura 27: Esquema de distribuição das espécies para os complexos **2** e **3** em função do pH.

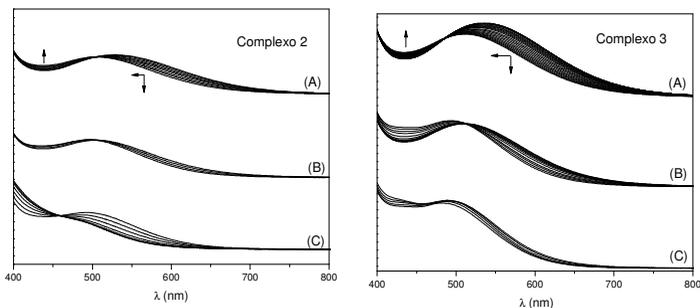


Figura 28: Espectro UV-vis como função dos valores de pH para 2 e 3 ($2,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L) com $I = 0,1$ mol/L (KCl).

CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS Si3AP-2 E Si3AP-3

O espectro de infravermelho do **Si3AP-2** e **Si3AP-3** foram muito similares, apenas uma fraca banda em 1630 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{N}$) pode ser observada indicando a formação da ligação imina. As outras bandas características dos complexos foram encobertas pelo forte estiramento das vibrações $\nu(\text{Si}-\text{O})$. O espectro eletrônico dos sólidos medidos em suspensão de benzeno (Figura 30), mostrou bandas em 374 nm, 426 nm (**Si3AP-2**) e 377 nm, 420 nm (**Si3AP-3**) diferente do observado para o complexo **2** (362 e 534 nm) e para o complexo **3** (360 e 540 nm). O deslocamento da banda de menor energia indica uma possível interação dos complexos **2** e **3** com a formação da ligação imina, entretando, devido às altas taxas de imobilização dos complexos **2** e **3** (95,5% e 99%) indicam também uma interação dos complexos com a sílica através de interações eletrostáticas, mudando os ligantes exógenos, possivelmente via substituição das pontes acetatos por íons hidróxido provenientes dos grupos silanóis (PIOVEZAN, 2005) Esta conclusão está baseada no deslocamento batocromico promovido pela desprotonação de um ligante aquo levando a formação dos complexos: $[\text{FeNi}(\text{bppamff})(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$; $[\text{FeZn}(\text{bppamff})(\mu\text{-OH})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]$.

O espectro de ressonância paramagnética eletrônica do sistema **Si3AP-2** (sólido, temperatura ambiente) mostrou os sinais típicos de Fe^{III} spin alto em simetria rômbrica ($g = 9,5$ e $g = 4,2$) e um sinal largo em $g = 2,0$ (acoplamento antiferromagnético) esse resultado é bastante similar aquele descrito na literatura para um complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Ni}^{\text{II}}$ (QUE, 1990). O sistema **Si3AP-3** (sólido, temperatura ambiente) apresentou apenas os sinais em $g = 8,9$ e $g = 4,2$ Fe^{III} spin alto em simetria rômbrica

como visto para a enzima PAPs (Figura 29) (REITER, 2004; KREBS, 1999; ZERNER, 1988)..

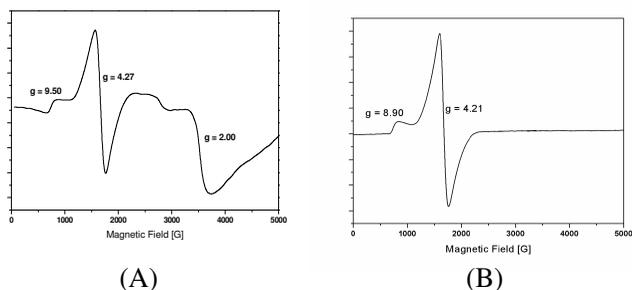


Figura 29: Análise de EPR sólido 298K (A) Si3AP-2 (B) Si3AP-3

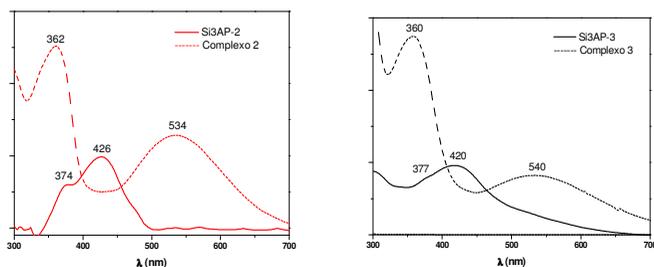


Figura 30: Espectro UV-vis dos complexos 2 e 3 e dos sistemas Si3AP-2 e Si3AP-3 (suspensão em benzeno).

ESTUDO DA REATIVIDADE DOS SISTEMAS 2, 3, SI3AP-2 E SI3AP-3 COMO MODELOS ESTRUTURAIS E/OU FUNCIONAIS PARA AS FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURA

A atividade catalítica dos complexos **2** e **3** na clivagem do 2,4-BDNPP foram fortemente influenciadas pelo pH do meio reacional. Um perfil do tipo sino foi observado para ambos os complexos com pH ótimo em torno de 7,00 para o complexo **2** e 6,50 para o complexo **3** (Figura 31). O ajuste sigmoidal da curava (SEGEL, 1975) revelou valores de pK_a que estão muito próximos aqueles obtidos no experimento da titulação potenciométrica (Tabela 6). Este resultado sugere que a variação na velocidade da reação depende a desprotonação da molécula de água coordenada ao sítio de Fe^{III} para gerar a espécie cataliticamente ativa como já visto para os sistemas $Fe^{III}Mn^{II}$

(NEVES,2002), $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Ni}^{\text{II}}$ (BATISTA, 2003) e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ (LANZNASTER, 2002).

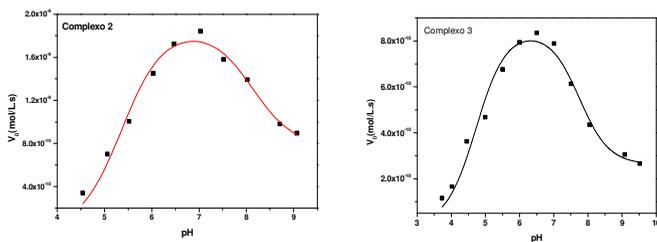


Figura 31 Dependência da velocidade inicial (V_0) em função do pH na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovido pelos complexos 2 e 3. [Complexo] = $1,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹; [2,4-BDNPP] = $1,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; [tampão] = 50×10^{-3} mol.L⁻¹; $I = 50 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (LiClO_4) em $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (50% v/v) a 25 °C.

Tabela 7: Parâmetros cinéticos para a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovido pelos sistemas **2**, **3**, **Si3AP-2** e **Si3AP-3**.

	V_{max} (mol/L.s)	K_M (mol/L)	k_{cat} (s ⁻¹)	^a K_{ass} (L/mol)	^b E (L/mol.s)	^c f (k_{cat}/k_{uncat})	T_{over} (24h)
2	$3,63 \cdot 10^{-9}$	$9,10 \cdot 10^{-4}$	$3,63 \cdot 10^{-4}$	1100	0,4	1940	14
3	$1,51 \cdot 10^{-9}$	$1,66 \cdot 10^{-3}$	$1,51 \cdot 10^{-4}$	602	0,09	840	4
Si3AP-2	$9,30 \cdot 10^{-8}$	$1,16 \cdot 10^{-3}$	$1,78 \cdot 10^{-3}$	862	1,53	10.000	23,8
Si3AP-3	$6,89 \cdot 10^{-9}$	$2,50 \cdot 10^{-4}$	$1,27 \cdot 10^{-4}$	4000	0,5	710	4,3
Si3AP	$2,87 \cdot 10^{-9}$	$1,23 \cdot 10^{-2}$	$8,61 \cdot 10^{-6}$	81	$7 \cdot 10^{-4}$	45	-

^a $K_{ass} = 1/K_M$, ^b $E = k_{cat}/K_M$ (eficiência catalítica), ^c $k_{uncat} = 1,89 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$.

A dependência da velocidade inicial no pH ótimo para a variação na concentração do substrato revelou uma saturação com comportamento de Michaelis-Menten (Figura 32). O ajuste não linear da curva pela equação de Michaelis-Menten apresentou os valores dos principais parâmetros cinéticos listados na Tabela. Os complexos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Ni}^{\text{II}}$ (**2**) e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ (**3**) mostraram uma constante catalítica mais baixa quando comparados aos sistemas análogos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Ni}^{\text{II}}$ $k_{\text{cat}} = 4,47 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (BATISTA, 2003) e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ $k_{\text{cat}} = 7,31 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (LANZNASTER, 2002), assim como, a constante de ligação do substrato ao complexo ($K_{\text{ass}} = 1/K_M$), o qual é cerca de quatro vezes menor para o complexo 2 e cinco vezes menor para o complexo 3 indicando o envolvimento do M^{II} como passo determinante da reação.

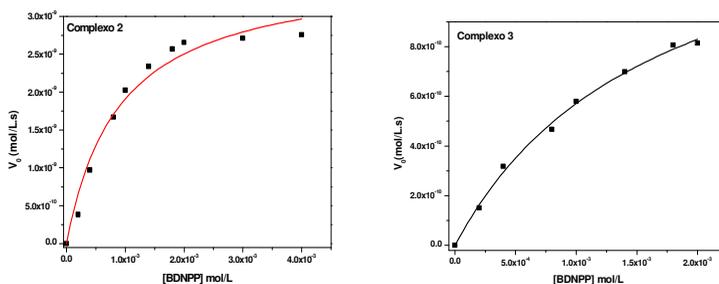


Figura 32: Dependência da velocidade inicial (V_0) em função da concentração do substrato na hidrólise do 2,4-BDNPP promovido pelos complexos 2 e 3. Condições: [complexo] = $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; [tampão] = $50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (HEPES pH 7,00; MES, pH 6,00; $I = 50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (LiClO_4) em $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (50% v/v) a 25 °C.

Para os sistemas heterogêneos, nos experimento da variação do pH entre 5,00 e 10,00 a curva de atividade do sistema **Si3AP-2** revelou um máximo de eficiência em pH 7,00 (formato de sino) e **Si3AP-3** em torno de 6,00 (perfil sigmoidal) (Figura 33). O ajuste das curvas (SEGEL, 1975) mostrou dois valores de pK_a para o sistema **Si3AP-2** e um valor de pK_a para o sistema **Si3AP-3** (Tabela 7).

Estes resultados sugerem que a variação na velocidade de reação também depende da desprotonação da molécula de água ligada ao Fe^{III} para formar a espécie ativa. A determinação das velocidades iniciais nos experimentos da variação do substrato (**Si3AP-2** pH 7,00 e **Si3AP-3** pH 6,00) revelou uma cinética de saturação de Michaelis-Menten igual aos sistemas homogêneos (Figura 34). O ajuste não linear

da curva pela equação de Michaelis–Menten apresentou os valores dos principais parâmetros cinéticos listados na Tabela.

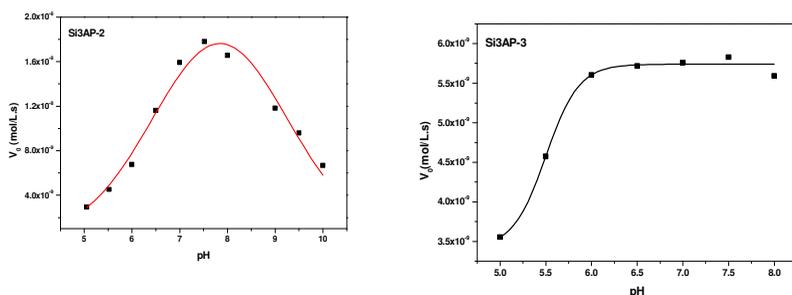


Figura 33: Dependência da velocidade inicial (V_0) em função do pH na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovido pelos sistemas Si3AP-2 e Si3AP-3. [Complexo] = 5 mg; [2,4-BDNPP] = $2,5 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; [tampão] = 50×10^{-3} mol.L⁻¹; $I = 50 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (LiClO₄) em H₂O/CH₃CN (50% v/v) a 25 °C.

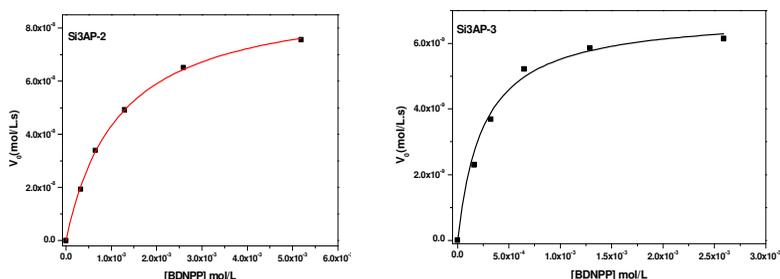


Figura 34: Dependência da velocidade inicial (V_0) em função da concentração do substrato na hidrólise do 2,4-BDNPP promovido pelos complexos Si3AP-2 e Si3AP-3. Condições: [complexo] = 5 mg; [tampão] = 50×10^{-3} mol.L⁻¹ (HEPES pH 7,00; MES, pH 6,00; $I = 50 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (LiClO₄) em H₂O/CH₃CN (50% v/v) a 25 °C.

Quando comparamos as reações homogênea e heterogênea para o complexo **2** (Fe^{III}Ni^{II}) observamos um aumento de cinco vezes no fator catalítico (f) enquanto o valor da constante de associação (K_{ass}) permanece quase o mesmo. Esse aumento na atividade em meio heterogêneo pode ser atribuído a uma interação dos grupos NH₂ livres da sílica com o substrato através de ligações de hidrogênio. Além do sítio de Ni^{II} possuir dois pontos lábeis para coordenação do substrato, visto que, este complexo não forma ponte hidróxido como demonstrado

para um análogo de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Ni}^{\text{II}}$ (SCHENK, 2008). Esta interação do suporte com o 2,4-BDNPP ajudaria a estabilizar o estado penta coordenado do átomo de fósforo do substrato assim como foi previsto para a enzima (STRATER, 1995) (Figura 36).

A titulação potenciométrica da sílica 3-amino funcionalizada revelou um pK_a próximo de 9,5 indicando que os grupos NH_2 remanescentes estariam na forma de NH_3^+ em pH 6,00 e 7,00. Os estudos da variação do pH e variação do substrato para a sílica 3-aminopropil revelaram que ela praticamente não influencia na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP (Figura 35) apresentando tanto um K_{ass} quanto um fator catalítico muito baixo (Tabela).

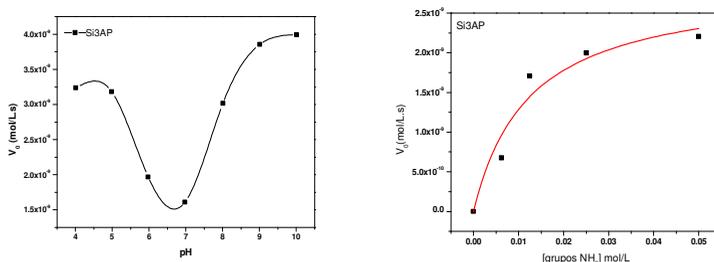


Figura 35: Estudo da influência da Si3AP na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP [Si3AP] = 3 mg; [2,4-BDNPP] = $2,5 \times 10^{-3}$ mol.L $^{-1}$; [tampão] = 50×10^{-3} mol.L $^{-1}$ HEPES pH 7,00; $I = 50 \times 10^{-3}$ mol.L $^{-1}$ (LiClO_4) em $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (50% v/v) a 25 °C.

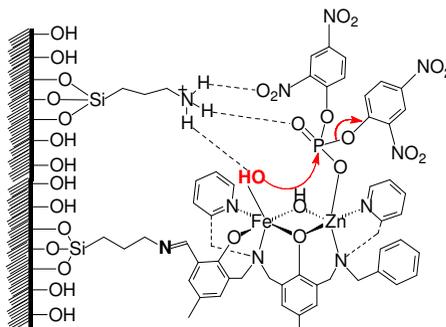


Figura 36: Interação do suporte Si3AP com o substrato 2,4-BDNPP na estabilização do estado ativo do substrato.

Quando observamos as reações em meio homogêneo e heterogêneo para o sistema **3** notamos que praticamente não há diferença significativa entre eles apenas houve um aumento no K_{ass} de cerca de 6,6 vezes. Esse aumento se deve ao fato do substrato estar sendo estabilizado pelo suporte como já discutido acima. Ao contrário do complexo **2**, o complexo **3** não mostrou um aumento na reatividade quando ancorado. Essa diferença observada nestes sistemas pode ser atribuído ao fato de que o complexo **2** não forma ponte do tipo μ -OH entre os sítios metálicos providenciando assim mais pontos lábeis para a coordenação do substrato. Neste caso foi observado apenas um aumento na associação do substrato ao complexo, porém não se refletiu na velocidade em que o nucleófilo ataca o substrato (Figura 36).

Para investigar a possível hidrólise do monoéster 2,4-DNPP, como um produto formado na hidrólise do diéster 2,4-BDNPP, uma reação estequiométrica entre os complexos **2** e **3** e o substrato 2,4-DNPP, foi monitorada e após 3 horas de reação não foi observada mudança no espectro Uv-vis (400 nm). Adicionando-se 1 equivalente de 2,4-BDNPP foi observado um aumento na banda 400 nm. O substrato diéster deslocou o monoéster mostrando que os dois complexos atuam como diesterases. O efeito isotópico de deutério as razões k_H/k_D obtidas para os sistemas complexos **2**, **3**, **Si3AP-2** e **Si3AP-3** foram em torno de 0,95. Isto indica que a reação de hidrólise segue um mecanismo intramolecular no qual o átomo de fósforo sofre um ataque nucleofílico do íon hidróxido.

Como para os sistemas binucleares de níquel, foi estudada a imobilização dos complexos **2** e **3** em sílica não funcionalizada. Não foi observada hidrólise significativa do 2,4-BDNPP quando comparada à reação não catalisada. Isto sugere que o processo de imobilização por adsorção e mais provavelmente por interações eletrostáticas contribui para o bloqueio do sítio catalítico, o qual pode estar parcialmente ocupado pela interação com os grupos silanóis da sílica e não permitindo a aproximação do substrato (PIOVEZAN, 2005).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BATISTA, S. C.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A.J.; VENCATO, I.; PERALTA, R. A.; SZPOGANICZ, B.; AIRES, V.V.E., TEREZI, H.; SEVERINO, P. C., Highly efficient phosphate diester hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical Fe^{III}Ni^{II} model complex Inorganic Chemistry Communications, v.6, p.1161, **2003**.

BISWAS, T. K.; CUNDIFF, C; Multiple forms of acid phosphatase in germinating seeds of *Vigna sinensis*, Phytochemistry, vol. 30, p. 2119, **1991**.

CALVO-MARZAL, P.; ROSSATO, S. S.; GRANJEIRO, P. A.; AOYAMA, H.; KUBOTA, L. T., Electroanalytical determination of acid phosphatase activity by monitoring *p*-nitrophenol, Analytica Chimica Acta, vol. 441, p. 207, **2001**.

CASTANON-FERNANDES, J.; FERNADES-ABEDUL, M. T.; COSTA-GERSIA, A., Kinetic determination of acid phosphatase activity by double injection flow analysis with electrochemical detection, Analytica Chimica Acta, vol. 413, p. 103, **2000**.

FGELLATLY, K. S.; MOORHEAD, G. B. G.; DUFF, S. M. G.; LEFEBVRE, D. D.; PLAXTON, W. C; Purification and Characterization of a Potato Tuber Acid Phosphatase Having Significant Phosphotyrosine Phosphatase Activity, Plant Physiology, vol. 106, p. 223, **1994**.

HEGG, E.L.; BURSTYN, J.N; Toward the Development of Metal-based Synthetic Nucleases and peptidase: a Rationale and Progress Report in Applying the Principles of Coordination Chemistry, Coordination Chemistry Reviews, vol. 173, p. 133, **1998**.

HOLLANDER, V. P., Acid phosphatases, in: P.D. Boyer (Eds.), The Enzymes, Vol. 1V A, Academic Press, New York, p. 449, **1971**.

HORN Jr., A. Síntese e caracterização de novos complexos de ferro com ligantes não simétricos N,O-doadores como modelos para o sítio ativo das fosfatases ácidas púrpuras. Florianópolis, **2000**. Tese de doutorado

em Química – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

JOVITO, R.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A.J.; LANZMASTER, M.; DRAGO, V.; HAASE, W.; A new unsymmetrical dinucleating ligand and its first Fe^{III}Zn^{II} complex: Structure and solid state properties of an unexpected tetranuclear Fe₂^{III}Zn₂^{II} complex containing the [Fe^{III}(μ-OH)₂Fe^{III}] structural motif, Inorganic Chemistry Communications, v. 8, p. 323, **2005**.

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, **1996**.

KREBS, B.; DURMUS, A.; EICKEN, C.; SIFT, B. H.; KRATEL, A.; KAPP R.; HUË, J., The active site of purple acid phosphatase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*). Metal content and spectroscopic characterization, European Journal of Biochemistry, v. 260, p. 709, **1999**.

LAMBERT, E.; CHABUT, B.; CHARDON-NOBLAT, S.; DERONZIER, A.; CHOTTARD, G.; BOUSSEKSOU, A.; TUCHAGUES, J.; LUAGIER, J.; BARDET, M.; LATOUR, J., Synthesis, Structural, Magnetic, and Redox Properties of Asymmetric Diiron Complexes with a Single Terminally Bound Phenolate Ligand. Relevance to the Purple Acid Phosphatase Enzymes, Journal of the American Chemical Society, vol. 19, p. 9424, **1997**.

LAMBERT, E.; CHABUT, B.; CHARDON-NOBLAT, S.; DERONZIER, A.; CHOTTARD, G.; BOUSSEKSOU, A.; TUCHAGES, J. P.; LAUGIER, J.; BARDET, M.; LATOUR, J. M., Synthesis, Structural, Magnetic, and Redox Properties of Asymmetric Diiron Complexes with a Single Terminally Bound Phenolate Ligand. Relevance to the Purple Acid Phosphatase Enzymes, Journal of the American Chemical Society, v.119, p. 9424, **1997**.

LANZMASTER, M.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICZ, B.; AND SCHWINGEL, E.; New Fe^{III}Zn^{II} Complex Containing a Single Terminal Fe–O_{phenolate} Bond as a Structural and

Functional Model for the Active Site of Red Kidney Bean Purple Acid Phosphatase, Inorganic Chemistry, v. 41, p. 5641, **2002**.

NAKAMOTO, K.; Infrared and Raman Spectra of inorganic and coordination compounds, 5th ed. **1977**.

NEVES A., LANZMASTER M., BORTOLUZZI A. J., PERALTA R. A., CASELLATO A., CASTELLANO E. E., HERRALD P., RILEY M. J., SCHENK G.; An Unprecedented Fe^{III}(μ -OH)Zn^{II} Complex that Mimics the Structural and Functional Properties of Purple Acid Phosphatases, Journal of the American Chemical Society, v. 129, p. 7486, **2007**.

NEVES, A.; BRITO, M. A.; VENCATO, I.; DRAGO, V.; GRIESAR, K.; HAASE, W.; Fe^{III}Fe^{III} and Fe^{II}Fe^{III} Complexes as Synthetic Analogues for the Oxidized and Reduced Forms of Purple Acid Phosphatases, Inorganic Chemistry, vol. 35, p. 2360, **1996**.

NEVES, A.; KARSTEN, P.; BORTOLUZZI, A.; DRAGO, V. AND LANZMASTER, M., Synthesis, structure, properties, and phosphatase-like activity of the first heterodinuclear Fe^{III}Mn^{II} complex with the unsymmetry ligand H₂BPBMP as a model for the PAP in Sweet Potato., Inorganic Chemistry, v. 41, p. 4624, **2002**.

PANARA, F.; PASQUALINI, S.; ANTONIELLI, M., Multiple forms of barley root acid phosphatase: purification and some characteristics of the major cytoplasmic isoenzyme, Biochimica Biophysica Acta, vol. 1037, p. 73, **1990**.

PIOVEZAN, C.; LISBOA, F; CASTRO K.A.D.F. NUNES, F.S.; NAKAGAKI, S.; DRECHSEL, S.M., Epoxidation using non-heme iron complexes in solution and immobilized on silica gel as catalysts, Applied Catalysis A: General, v. 293, p. 97, **2005**.

QUE JR, L.; HOLMAN, T.R.; JUAREZ-GARCIA, C.; HENDRICH. M. P., Models for iron-oxo proteins. Moessbauer and EPR study of an antiferromagnetically coupled iron(III)-nickel(III) complex, Journal of the American Chemical Society, v. 112, p. 7611, **1990**.

REITER, T. A.; RUSNAK, F., Electrochemical Studies of the Mono-Fe, Fe-Zn, and Fe-Fe Metalloisoforms of Bacteriophage λ Protein Phosphatase, Biochemistry, v. 43, p. 782, **2004**.

SCHENCK, G.; KORSINCZKY, M. L. J.; HUME, D. A., HAMILTON, S.; DEJERSEY, J.; Purple acid phosphatases from bacteria: similarities to mammalian and plant enzymes, Gene, vol. 255, p. 419, **2000**.

SCHENK, G.; PERALTA, R. A.; BATISTA, S. C.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICZ, B.; DICK, A. K.; HERRALD, P.; HANSON, G. R.; SZILAGYI, R. K.; RILEY, M. J.; GAHAN, L. R.; NEVES, A., Probing the role of the divalent metal ion in uteroferrin using metal ion replacement and a comparison to isostructural biomimetics, Journal Biological Inorganic Chemistry, v. 13, p. 139, **2008**.

SEGEL, I.H.; Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steadystate Enzyme Systems, Willey-Interscience, New York, **1975**.

STASWICK, P. E.; PAPA ,C.; HUANG, J.; RHEE, Y., Purification of the Major Soybean Leaf Acid Phosphatase. That Is Increased by Seed-Pod Removal, Plant Physiology, Plant Physiology, vol. 104, p. 49, **1994**.

STRÄTER, N., KLABUNDE, T., TUCKER, P.; WITZEL, H. and KREBS, B. Crystal structure of a purple acid-phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active-site. Science, v. 268, p. 1489, **1995**.

ZERNER, B.; BECK, J. L.; JERSEY, J., Properties of the Fe(II)-Fe(III) Derivative of Red Kidney Bean Purple Phosphatase. Evidence for a Binuclear Zn-Fe Center in the Native Enzyme, Journal of the American Chemical Society, v. 110, p. 3318, **1988**.

CAPÍTULO 5

COMPLEXO HETEROBINUCLEAR DE Fe^{III}Zn^{II} BIOINSPIRADO IMOBILIZADO EM SÍLICA 3-AMINO FUNCIONALIZADA COMO MODELO ESTRUTURAL E/OU FUNCIONAL PARA AS FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURA

Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com o Doutorando Rafael Jovito e a Dr^a. Rosely A. Peralta. A parte de síntese, caracterização e estudo da reatividade em meio homogêneo não será descrita nesta Tese, sendo que a parte referente à imobilização e os estudos da reatividade em meio heterogêneo será discutida.

O complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\text{L}^1)(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ (**4**) foi sintetizado utilizando o mesmo método descrito na literatura (NEVES, 2007). Após cinco dias em uma solução de metanol/água formaram-se cristais adequados à resolução de raios X (Figura 37) (PIOVEZAN, 2009).

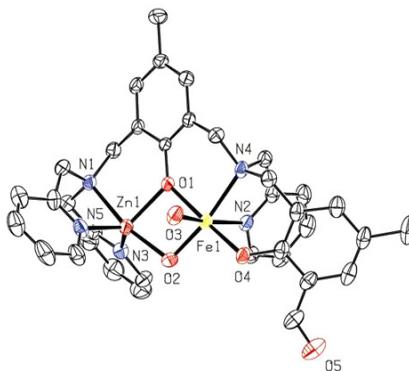


Figura 37: Estrutura ORTEP do cátion complexo 4

IMOBILIZAÇÃO DO COMPLEXO 4 EM SÍLICA 3-AMINO FUNCIONALIZADA

Si3AP (1g) foi suspensa em acetonitrila (20 mL) sob agitação magnética. Complexo **4** ($6,76 \times 10^{-5} \text{ mol} \approx 65 \text{ mg}$) foi dissolvido em 5 mL de acetonitrila e então adicionado a sílica. Após 24h de reação a temperatura ambiente, o sólido foi centrifugado, seco a vácuo e posteriormente lavado em extrator Soxhlet por 12 h utilizando acetonitrila como solvente. A cor da sílica tornou-se vermelho tijolo. O sobrenadante da solução da imobilização assim como a solução da lavagem do sólido foi avolumada e analisada por UV-vis para se determinar a quantidade de complexo imobilizado na sílica. O material imobilizado foi finalmente seco a vácuo por 24 h. O produto foi nomeado, **Si3AP-4**. A respectiva quantidade de complexo imobilizado por grama do suporte foi: $6,25 \times 10^{-5} \text{ mol/g}$.

O complexo **4** foi covalentemente ligado a sílica 3-amino funcionalizada e este material foi caracterizado pelas espectroscopias vibracional na região do infravermelho: apenas uma fraca banda em 1630 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{N}$) pode ser observada indicando a formação da ligação imina. As outras bandas características do complexo foram encobertas pelo forte estiramento das vibrações $\nu(\text{Si-O})$. O espectro eletrônico UV-vis do sólido medido em suspensão de benzeno, mostrou bandas em 420 nm e 520 nm diferente do observado para o complexo **4** (376 e 512 nm). O deslocamento da banda de maior energia indica uma possível interação do complexo **4** com grupos silanóis e com a formação da ligação imina. O espectro de ressonância paramagnética eletrônica do sistema **Si3AP-4** (sólido, temperatura ambiente) mostrou apenas os sinais típicos de Fe^{III} spin alto em simetria rômbrica ($g = 8,9$ e $g = 4,2$) como visto para a enzima PAP (REITER, 2004; KREBS, 1999; ZERNER, 1988).

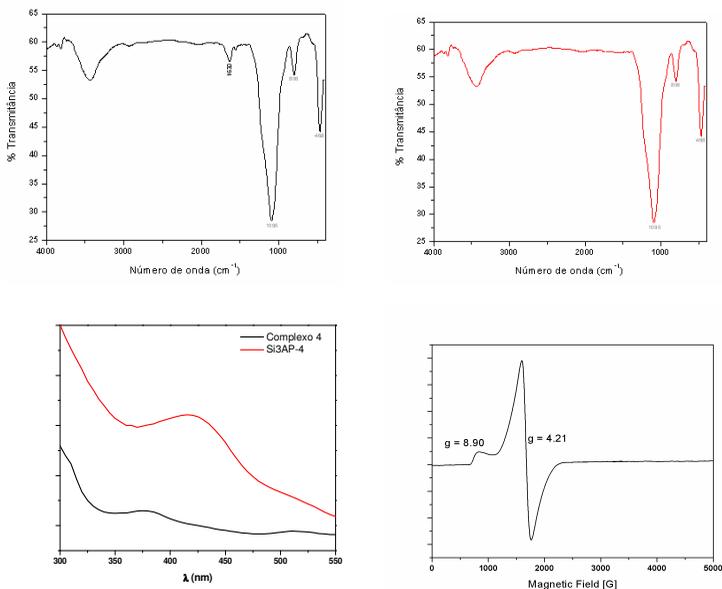


Figura 38: Caracterização do sistema Si3AP-4: acima espectro infravermelho em pastilha de KBr do sistema Si3AP-4 e da sílica Si3AP; abaixo à esquerda, espectro eletrônico UV-vis sólido suspensão em benzeno; abaixo à direita espectro de EPR sólido 298K.

O complexo **4** também foi imobilizado em sílica não funcionalizada nas mesmas condições descritas acima. O produto foi nomeado **SiO₂-4** ($5,28 \cdot 10^{-5}$ mol/g SiO₂). Sua caracterização foi feita através das técnicas de infravermelho e UV-vis de sólido e se mostraram bastantes similares ao descrito para o sistema **Si3AP-4**.

ESTUDO DA REATIVIDADE EM MEIO HETEROGÊNEO DOS SISTEMAS Si3AP-4 E SiO₂-4

Todos os parâmetros cinéticos referentes à reatividade do sistema homogêneo encontram-se na Tabela 8. As reações heterogêneas para os catalisadores Si3AP-4 e SiO₂-4 foram feitas sob as mesmas condições já descritas nesta Tese para os outros sistemas heterogêneos. Em ambos os casos, assim como visto para a reação em meio homogêneo, a dependência da velocidade inicial em função da concentração do substrato 2,4-BDNPP em pH ótimo (pH 7,00) mostrou comportamento cinético de Michaelis-Menten (Figura 39) e o ajuste das curvas pela equação não linear de Michaelis-Menten nos forneceu os principais parâmetros cinéticos listados na Tabela.

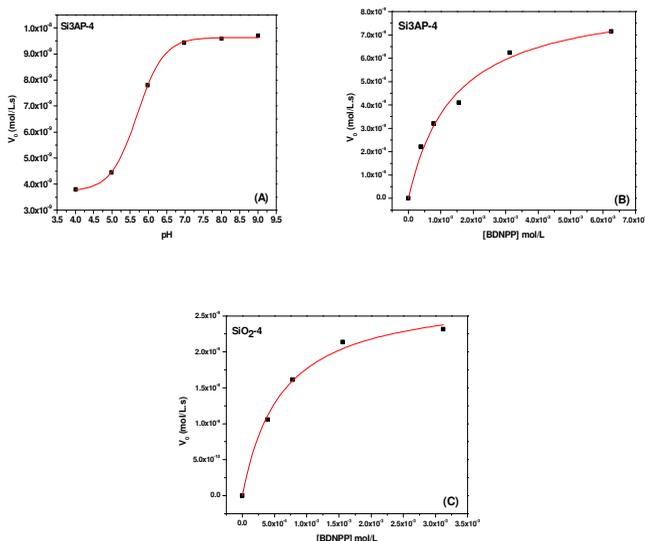


Figura 39: Estudo da reatividade dos sistemas Si3AP-4 e SiO₂-4. (A) Dependência da velocidade inicial (V_0) em função do pH na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP promovido pelo sistema Si3AP-4. [Complexo] = $6,25 \cdot 10^{-5}$ mol/L; [2,4-BDNPP] = $2,5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹; [tampão] = $50 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹; $I = 50 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (LiClO₄) em H₂O/CH₃CN (50% v/v) a 25 °C; (B) e (C)

Dependência da velocidade inicial (V_0) em função da concentração do substrato na hidrólise do 2,4-BDNPP promovido pelo complexo Si3AP-4 e SiO₂-4. Condições: [complexo] = 3 mg; [tampão] = 50×10^{-3} mol.L⁻¹ (HEPES pH 7,00 $I = 50 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (LiClO₄) em H₂O/CH₃CN (50% v/v) a 25 °C.

Tabela 8: Parâmetros cinéticos para a hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo 4 em solução e imobilizado em pH 7,00 a 25 °C.

	V_{max} (mol.L ⁻¹ .s ⁻¹)	K_M (mol.L ⁻¹)	$^a K_{ass}$ (L.mol ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	$^b f$
4	$18,5 \cdot 10^{-9}$	$3,55 \cdot 10^{-3}$	280	$9,02 \cdot 10^{-4}$	5040
Si3AP-4	$8,90 \cdot 10^{-9}$	$1,54 \cdot 10^{-3}$	650	$1,42 \cdot 10^{-4}$	790
SiO₂-4	$2,83 \cdot 10^{-9}$	$6 \cdot 10^{-4}$	1660	$4,5 \cdot 10^{-5}$	250

$$^a K_{ass} = 1/K_M. \quad ^b k_{uncat} = 1,89 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}.$$

De fato, estes parâmetros cinéticos mostram que o K_{ass} é cerca de duas a seis vezes mais alto para Si3AP-4 e SiO₂-4, respectivamente, quando comparado com a reação em meio homogêneo. A alta afinidade do 2,4-BDNPP pelos sistemas ancorados é presumivelmente originada pelo próprio sólido. Particularmente, para Si3AP-4 nós propomos a estabilização do substrato via ligação de hidrogênio com o grupo amino residual da sílica 3-aminopropil (Figura 40), como visto para os sistemas Si3AP-2 e Si3AP-3, onde a diminuição da atividade catalítica, neste caso, se daria pela ocupação parcial dos sítios lábeis de Fe^{III} e Zn^{II} coordenados aos grupos silanóis do suporte. No caso do sistema SiO₂-1 essa interação seria originada pelos grupos silanóis da sílica.

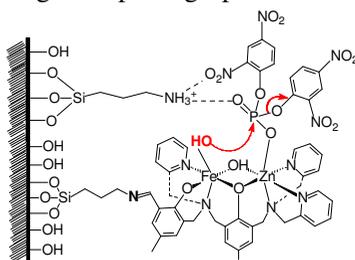


Figura 40: Interação do suporte Si3AP com o substrato 2,4-BDNPP na estabilização do estado ativo do substrato.

O estudo da variação do pH na atividade catalítica do sistema Si3AP-4 mostrou um comportamento sigmoidal com um valor de pK_a de 5,70 (Figura 39) o qual esta de acordo com o pK_{a2} obtido na titulação potenciométrica do complexo 4 (pK_{a2} 5,07) e novamente a espécie $[(OH)Fe(\mu-OH)Zn(OH_2)]$ mostrou-se cataliticamente ativa na hidrólise do 2,4-BDNPP (NEVES, 2007). Além disso, o efeito cinético de deutério revelou um valor de $k_H/k_D = 0,95$ tanto para a reação homogênea quanto para a heterogênea indicando apenas um ataque nucleofílico intramolecular do íon hidróxido ligado ao centro de Fe^{III} em ambas as reações. Finalmente, para investigar a possível hidrólise do monoéster 2,4-DNPP, como um produto formado na hidrólise do diéster 2,4-BDNPP, uma reação estequiométrica entre o complexo 4 e o sistema SiAP-4 e o substrato 2,4-DNPP, foi monitorada e após 3 horas de reação não foi observada mudança no espectro Uv-vis (400 nm). Adicionando-se 1 equivalente de 2,4-BDNPP foi observado um aumento na banda 400 nm onde os sistemas recuperaram suas atividades catalíticas. A detecção de dez turnovers em 24 horas para ambos os sistemas representa uma evidencia que durante o ciclo catalítico onde o intermediário contendo o monoéster de fosfato ligado aos sítios metálicos se dissocia para regenerar a espécie cataliticamente ativa $[(OH)Fe^{III}(\mu-OH)Zn^{II}(OH_2)]$ quando na presença de excesso do diéster fosfato.

Uma das vantagens de se usar um catalisador imobilizado em um suporte é que ele pode ser facilmente removido do meio reacional e possui um grande potencial para ser reciclado. O catalisador Si3AP-4 foi reciclado e reutilizado em uma reação subsequente na hidrólise do 2,4-BDNPP. Este sólido foi recolhido de cada reação de hidrólise, lavado em extrator Soxhlet 48 horas (tampão HEPES pH 7,00/acetonitrila) e seco a vácuo por 24 horas. A primeira reutilização do sólido Si3AP-4 apresentou um decréscimo em torno de 30% quando comparado com o fator catalítico (f) com a primeira utilização na hidrólise do 2,4-BDNPP (Figura 41)

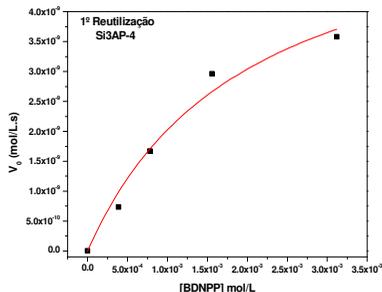


Figura 41: Primeira reutilização do sistema Si3AP-4. Condições: [complexo] = 3 mg; [tampão] = 50×10^{-3} mol.L⁻¹ (HEPES pH 7,00 $I = 50 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (LiClO₄) em H₂O/CH₃CN (50% v/v) a 25 °C.

A redução na atividade pode ser atribuída à perda do catalisador do suporte pela hidrólise do grupo imina durante o processo de recuperação do mesmo.

ESTUDO DA CLIVAGEM DO DNA PLASMIDAL (PBSK II) PELO COMPLEXO 4 E SI3AP-4

Para verificar a habilidade em se clivar as ligações fosfodiéster do DNA ambos, complexo 4 e Si3AP-4 foram testados em diferentes concentrações na presença de DNA plasmidial.

600 ng de DNA plasmidial (pBSK II) superenovelado (FI) foi incubado com o complexo 4 em concentrações de 0, 10, 20, 40 e 80 μ M em 10 mL de tampão HEPES pH 7,00 a 50°C por 16 horas (SCARPELLINI, 2003; LANZMASTER, 2005). As amostras foram submetidas a análise de eletroforese em gel de agarose, fotografadas e analisadas por densitometria pelo programa Lab-WorksTM Software v4.0 (UVP, Inc.) para verificar a formação da forma aberta circular do DNA (FII). Nas mesmas condições (temperatura, tampão, concentração de complexo e DNA) foram realizados os experimentos com o sólido Si3AP-4 (antes da análise de eletroforese o sólido foi removido por centrifugação e o sobrenadante foi analisado). Para se investigar se o complexo 4 estava interagindo com o sulco maior ou menor do DNA experimentos na presença e ausência de distamicina foram feitos. DNA foi pré incubado na presença de 30 μ M distamicina por 30 minutos e então incubado com o complexo 4 nas concentrações de 0, 160 e 360

μM em 10 mL de tampão HEPES pH 7,00 a 50°C por 2 horas. As amostras foram submetidas a eletroforese e analisadas como já descrito.

Ambos os sistemas **4** e **Si3AP-4** (Figura 42) foram capazes de clivar o DNA plasmidial de maneira dependente da concentração. O aumento na forma circular (FII), com uma diminuição proporcional da forma superenovelada (FI) foi observada com o aumento na concentração do complexo.

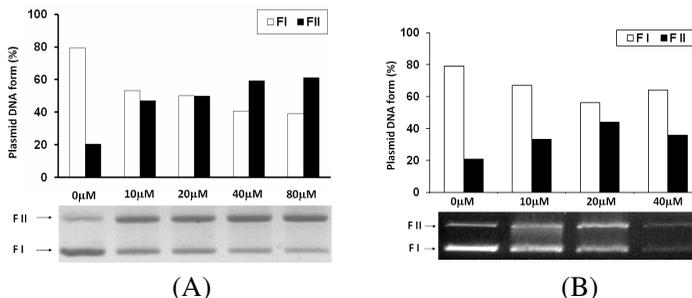


Figura 42: Teste na clivagem do DNA plasmidial pBSK II, 10 mL de tampão HEPES pH 7,00 a 50°C por 16 horas. (A) complexo 4 (B) Si3AP-4. As concentrações estão indicadas nas figuras.

O complexo **4** pode ser considerado um pouco mais ativo quando comparado ao sistema **Si3AP-4** na clivagem do DNA, sendo que se observarmos a clivagem na concentração de $10 \mu\text{M}$, a medida aparente de % da forma II do DNA corresponde a 47% e 33% respectivamente e aparentemente este resultado esta de acordo com as diferentes eficiências catalíticas observadas durante a hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP. Na presença e ausência da distamicina, o complexo **4** mostrou um resultado similar na clivagem do DNA indicando que o complexo não esta sendo inibido e que esta interagindo com o DNA através do sulco maior.

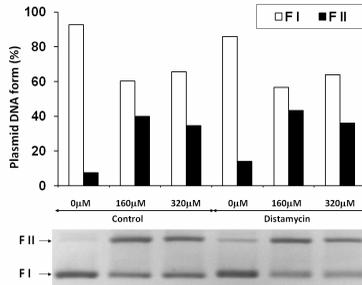


Figura 43: Teste na clivagem do DNA plasmidial pBSK II, 10 mL de tampão HEPES pH 7,00 a 50°C por 2 horas na presença e ausência de distamicina para o complexo 4.

REFERÊNCIAS

KREBS, B.; DURMUS, A.; EICKEN, C.; SIFT, B. H.; KRATEL, A.; KAPP R.; HUÈ, J., The active site of purple acid phosphatase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*). Metal content and spectroscopic characterization, European Journal of Biochemistry, v. 260, p. 709, **1999**.

LANZNASTER, M.; 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, **2005**.

NEVES A., LANZNASTER 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 the American Chemical Society, v. 129, p. 7486, **2007**.

PIOVEZAN, C.; NEVES, A., PERALTA, R.A., JOVITO, R., BORTOLUZZI, A.J., TERENCEZI, H., *et. al*, Heterodinuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ Bioinspired Complex Supported on 3 aminopropyl Silica. Efficient Hydrolysis of Phosphate Diester Bonds, Inorganic Chemistry, v. 49, p. 2580, **2010**.

REITER, T. A.; RUSNAK, F., Electrochemical Studies of the Mono-Fe, Fe-Zn, and Fe-Fe Metalloisoforms of Bacteriophage λ Protein Phosphatase, Biochemistry, v. 43, p. 782, **2004**.

SCARPELLINI, M. Phosphate Diester Hydrolysis and DNA Damage Promoted by New cis-Aqua/Hydroxy Copper(II) Complexes Containing Tridentate Imidazole-rich Ligands, Inorganic. Chemistry, v.42, p. 8353, **2003**.

ZERNER, B.; BECK, J. L.; JERSEY, J., Properties of the Fe(II)-Fe(III) Derivative of Red Kidney Bean Purple Phosphatase. Evidence for a Binuclear Zn-Fe Center in the Native Enzyme, Journal of the American Chemical Society, v. 110, p. 3318, **1988**.

CAPÍTULO 6
CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ligante 2-[(N-benzil-N-2-piridilmetilamina)]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)aminometil)]-4-metil-6-formilfenol ($H_2bppamff$) foi sintetizado e caracterizado como previamente descrito apresentando um rendimento médio de 70%. Trata-se de um ligante heptadentado binucleante que atende a necessidade da síntese de complexos heterobinucleres por apresentar um lado macio, ideal para coordenação de metais em baixo estado de oxidação, e um lado duro onde se pode coordenar metais com alto estado de oxidação. Além disso, este ligante possui um grupo carbonila que foi utilizado para ancorar os respectivos complexos formados em suportes inorgânicos para a criação de catalisadores heterogêneos.

Os materiais nanoestruturados (microesferas de sílica e partícula magnética recoberta de sílica) foram sintetizados e caracterizados pela Prof^a. Dr^a. Liane M. Rossi USP-SP como parte do trabalho desta tese, sendo nossa contra parte o ancoramento dos complexos, suas caracterizações e estudo da reatividade.

Os complexos sintetizados com o ligante $H_2bppamff$ $[Ni_2(Hbppamff)(\mu-AcO)_2(H_2O)]BPh_4$ (**1**), $[FeNi(bppamff)(\mu-AcO)_2(H_2O)]ClO_4$ (**2**), $[FeZn(bppamff)(\mu-AcO)_2(H_2O)]ClO_4$ (**3**) foram caracterizados por técnicas físico-químicas e podem ser considerados modelos funcionais e estruturais das metaloenzimas urease (no caso do complexo **1**) e fosfatase ácida púrpura para os complexos **2** e **3**. O complexo $[FeZn(L^1)(\mu-OH)_2(H_2O)]ClO_4$ (**4**) faz parte da tese de doutorado do aluno Rafael Jovito Souza e neste trabalho foi realizado apenas o estudo do sistema em meio heterogêneo.

Estudo da reatividade do complexo **1** como modelo para urease em meio homogêneo revelaram que este possui excelente capacidade catalítica frente à hidrólise básica do 2,4-BDNPP, com fator de aceleração de 138,4 mil vezes em relação à reação não catalisada. Os sistemas heterogêneos **Si3AP-1**, **Si@-1** e **Fe₃O₄@SiO₂-1** também apresentaram um ótimo resultado na hidrólise do 2,4-BDNPP, em torno de 100 mil vezes quando comparados a reação não catalisada. A partir dos dados estruturais e cinéticos foi possível propor um ciclo catalítico para a hidrólise básica do 2,4-BDNPP. O mecanismo proposto inclui ataques nucleofílicos intramoleculares, envolvendo duas etapas: um ataque do grupo hidróxido terminal coordenado a um centro de Ni^{II} ao

átomo de fósforo do substrato ligado ao outro centro de Ni^{II}; seguido da etapa rápida onde o grupo hidróxido ponte atua como nucleófilo.

No estudo dos complexos [FeNi(bppamff)(μ -AcO)₂(H₂O)]ClO₄ (**2**) e [FeZn(bppamff)(μ -AcO)₂(H₂O)]ClO₄ (**3**) em meio homogêneo como modelos para a fosfatase ácida púrpura o complexo **2** mostrou-se mais ativo quando comparado ao complexo **3**. Este resultado está relacionado com o fato do complexo **2** possuir uma esfera de coordenação aberta, não formando ponte hidróxido (como já descrito), facilitando a aproximação e coordenação do substrato 2,4-BDNPP. Quando comparamos a atividade do complexo **2** na reação heterogênea com a reação em solução temos um aumento de 5 vezes na atividade. Esse aumento pode ser devido a uma estabilização do grupo fosfato pela carga positiva dos grupos NH₂ remanescentes do suporte ajudando a estabilizar o estado pentacoordenado do fósforo. No caso do complexo **3** não houve diferença significativa entre a reação homogênea e heterogênea.

No caso do complexo [Fe^{III}Zn^{II}(L¹)(μ -OH)(H₂O)](ClO₄)₂ este foi ancorado na sílica 3-amino funcionalizada, caracterizado e feito o estudo da reatividade em meio heterogêneo. Esse resultado na hidrólise do 2,4-BDNPP mostrou-se cerca de 6 vezes menor quando comparado a reação em solução. Por se tratar de um complexo μ -OH onde as outras posições lábeis estão ocupadas por moléculas de água, pode ocorrer durante o ancoramento, a coordenação de grupos OH dos silanóis bloqueando parte dos sítios livres. A primeira tentativa de reciclagem do sólido mostrou uma perda de 30% na eficiência quando comparado a primeira reação. Os resultados obtidos apresentados pelos sistemas **4** e **Si4AP-4** na hidrólise do 2,4-BDNPP levaram à investigação de suas reatividades na clivagem do DNA. Estudos preliminares demonstraram que os complexos modelos são capazes de promover a clivagem da forma superenovelada (F I) para a forma circular (F II) de DNA plasmidial elegendo-os como nucleases químicas.

Como perspectivas futuras esperamos realizar:

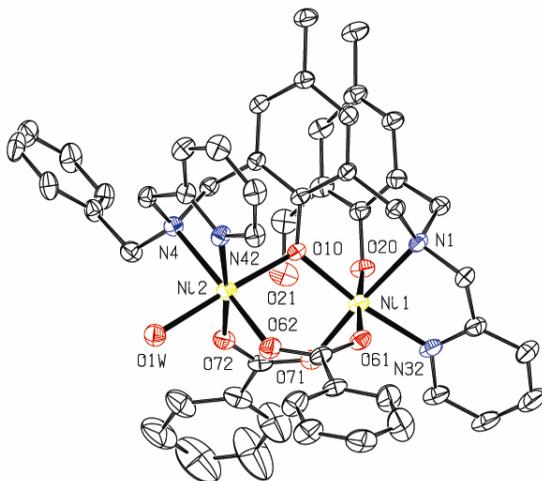
- Os estudos de reciclagem dos sistemas **Si3AP-1**, **Si@-1**, **Fe₃O₄@SiO₂-1**, **Si3AP-2** e **Si3AP-3**.
- Estudo da clivagem do DNA dos complexos **1**, **2** e **3** assim como os sistemas imobilizados em sílica.

- O estudo do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L}^1)(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ em meio heterogêneo.
- O ancoramento dos complexos citados acima em outros suportes nanoestruturados como, microesferas de quitosana, nanopartículas de ouro e prata, β -ciclodextrinas modificadas etc...

ANEXOS

ANEXO 1

[NiNi(bppamff)(μ -BzO)₂(H₂O)]ClO₄ · 2.C₃H₇O.CH₃CN.1,5H₂O



Distâncias interatômicas (Å) e ângulos de ligação (°) para o complexo
[NiNi(bppamff)(μ -BzO)₂(HO₂)]ClO₄ · 2.C₃H₇O.CH₃CN.1,5H₂O

Ni1-Ni2	3,3968(12)
Ni1-O10	1,997(4)
Ni1-O71	2,022(5)
Ni1-O61	2,028(5)
Ni1-N32	2,068(6)
Ni1-N1	2,119(5)
Ni1-O20	2,175(5)
Ni2-O72	2,029(5)
Ni2-O10	2,039(4)

Ni2-O62	2,044(5)
Ni2-N42	2,087(6)
Ni2-O1W	2,089(5)
Ni2-N4	2,184(5)
O10-C12	1,343(7)
O20-C22	1,384(8)
O21-C27	1,247(10)
N1-C30	1,474(8)
N1-C2	1,494(9)
N1-C20	1,498(9)
C2-C11	1,503(9)
C3-N4	1,485(8)
C3-C13	1,493(9)
N4-C40	1,474(8)
N4-C50	1,482(8)
C11-C16	1,362(9)
C11-C12	1,398(9)
C12-C13	1,412(8)
C13-C14	1,391(8)
C14-C15	1,368(9)
C15-C16	1,406(9)
C15-C17	1,515(9)
C20-C21	1,502(10)
C21-C22	1,382(10)
C21-C26	1,394(9)
C22-C23	1,368(10)
C23-C24	1,402(10)

C23-C27	1,460(11)
C24-C25	1,352(11)
C25-C26	1,405(10)
C25-C28	1,506(10)
C30-C31	1,490(11)
C31-N32	1,330(10)
C31-C36	1,381(11)
N32-C33	1,354(9)
C33-C34	1,358(12)
C34-C35	1,373(15)
C35-C36	1,369(14)
C40-C41	1,515(9)
C41-N42	1,330(8)
C41-C46	1,380(10)
N42-C43	1,344(8)
C43-C44	1,371(11)
C44-C45	1,388(12)
C45-C46	1,374(11)
C50-C51	1,519(9)
C51-C52	1,372(11)
C51-C56	1,381(10)
C52-C53	1,391(12)
C53-C54	1,348(13)
C54-C55	1,347(14)
C55-C56	1,392(11)
O61-C60	1,241(8)
O62-C60	1,247(8)

C60-C61	1,519(9)
C61-C66	1,343(12)
C61-C62	1,345(11)
C62-C63	1,395(11)
C63-C64	1,327(14)
C64-C65	1,341(16)
C65-C66	1,402(13)
O71-C70	1,236(9)
O72-C70	1,244(8)
C70-C71	1,525(11)
C71-C76	1,371(16)
C71-C72	1,392(14)
C72-C73	1,455(18)
C73-C74	1,39(3)
C74-C75	1,33(3)
C75-C76	1,389(19)
O80-C81	1,441(12)
C81-C83	1,490(16)
C81-C82	1,566(18)
N100-C101	1,167(14)
C101-C102	1,392(16)
C11-O1P	1,372(8)
C11-O4P	1,403(13)
C11-O2P	1,404(7)
C11-O3P'	1,426(15)
C11-O3P	1,543(10)
C11-O4P'	1,546(12)

O3P-O3P'	1,546(19)
O3P'-O4P	0,91(3)
O4P'-O4P	1,522(19)
O2W-O2W'	1,78(3)
O90-C91	1,451(18)
C91-C93	1,49(2)
C91-C92	1,541(19)
O10-Ni1-O71	96,55(19)
O10-Ni1-O61	93,02(18)
O71-Ni1-O61	100,2(2)
O10-Ni1-N32	171,5(2)
O71-Ni1-N32	91,9(2)
O61-Ni1-N32	86,5(2)
O10-Ni1-N1	90,63(18)
O71-Ni1-N1	165,8(2)
O61-Ni1-N1	91,5(2)
N32-Ni1-N1	80,9(2)
O10-Ni1-O20	91,72(17)
O71-Ni1-O20	79,54(19)
O61-Ni1-O20	175,25(19)
N32-Ni1-O20	88,8(2)
N1-Ni1-O20	88,1(2)
O72-Ni2-O10	90,32(18)
O72-Ni2-O62	94,8(2)
O10-Ni2-O62	94,18(18)
O72-Ni2-N42	173,2(2)

O10-Ni2-N42	92,02(19)
O62-Ni2-N42	91,5(2)
O72-Ni2-O1W	84,2(2)
O10-Ni2-O1W	174,52(19)
O62-Ni2-O1W	86,70(19)
N42-Ni2-O1W	93,4(2)
O72-Ni2-N4	93,15(19)
O10-Ni2-N4	91,07(17)
O62-Ni2-N4	170,5(2)
N42-Ni2-N4	80,42(19)
O1W-Ni2-N4	88,83(19)
C12-O10-Ni1	126,2(4)
C12-O10-Ni2	117,0(4)
Ni1-O10-Ni2	114,62(19)
C22-O20-Ni1	117,9(4)
C30-N1-C2	108,8(5)
C30-N1-C20	108,2(5)
C2-N1-C20	111,9(5)
C30-N1-Ni1	102,8(4)
C2-N1-Ni1	109,3(4)
C20-N1-Ni1	115,2(4)
N1-C2-C11	113,2(5)
N4-C3-C13	116,0(5)
C40-N4-C50	111,9(5)
C40-N4-C3	110,0(5)
C50-N4-C3	110,0(5)
C40-N4-Ni2	105,8(4)

C50-N4-Ni2	110,7(4)
C3-N4-Ni2	108,4(4)
C16-C11-C12	120,1(6)
C16-C11-C2	121,1(6)
C12-C11-C2	118,9(5)
O10-C12-C11	122,8(5)
O10-C12-C13	118,6(6)
C11-C12-C13	118,6(5)
C14-C13-C12	118,9(6)
C14-C13-C3	122,9(5)
C12-C13-C3	118,2(5)
C15-C14-C13	123,1(6)
C14-C15-C16	116,5(6)
C14-C15-C17	121,9(6)
C16-C15-C17	121,7(6)
C11-C16-C15	122,8(6)
N1-C20-C21	115,9(5)
C22-C21-C26	116,8(7)
C22-C21-C20	121,5(6)
C26-C21-C20	121,5(7)
C23-C22-C21	122,3(6)
C23-C22-O20	120,3(6)
C21-C22-O20	117,5(6)
C22-C23-C24	119,0(7)
C22-C23-C27	121,4(7)
C24-C23-C27	119,6(7)
C25-C24-C23	121,6(7)

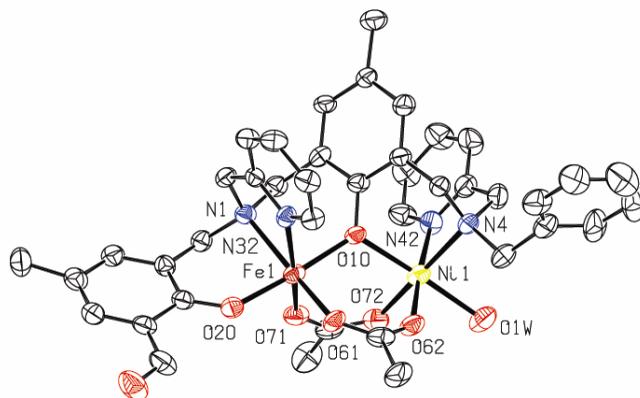
C24-C25-C26	117,8(6)
C24-C25-C28	123,8(7)
C26-C25-C28	118,4(7)
C21-C26-C25	122,5(7)
O21-C27-C23	122,7(8)
N1-C30-C31	111,8(6)
N32-C31-C36	121,2(8)
N32-C31-C30	115,9(6)
C36-C31-C30	122,7(8)
C31-N32-C33	119,7(7)
C31-N32-Ni1	112,7(5)
C33-N32-Ni1	127,6(6)
N32-C33-C34	121,3(9)
C33-C34-C35	119,2(9)
C36-C35-C34	119,7(9)
C35-C36-C31	118,9(10)
N4-C40-C41	112,2(5)
N42-C41-C46	122,7(6)
N42-C41-C40	116,1(6)
C46-C41-C40	121,2(6)
C41-N42-C43	117,7(6)
C41-N42-Ni2	115,0(4)
C43-N42-Ni2	126,3(5)
N42-C43-C44	123,2(7)
C43-C44-C45	118,6(7)
C46-C45-C44	118,5(8)
C45-C46-C41	119,3(7)

N4-C50-C51	115,4(6)
C52-C51-C56	118,3(7)
C52-C51-C50	121,5(6)
C56-C51-C50	120,2(7)
C51-C52-C53	119,9(8)
C54-C53-C52	120,9(8)
C55-C54-C53	120,4(8)
C54-C55-C56	119,7(8)
C51-C56-C55	120,8(8)
C60-O61-Ni1	129,0(4)
C60-O62-Ni2	134,0(4)
O61-C60-O62	126,5(6)
O61-C60-C61	117,3(6)
O62-C60-C61	116,2(6)
C66-C61-C62	118,8(8)
C66-C61-C60	120,0(8)
C62-C61-C60	121,2(7)
C61-C62-C63	120,9(9)
C64-C63-C62	120,7(9)
C63-C64-C65	118,5(9)
C64-C65-C66	121,7(10)
C61-C66-C65	119,3(10)
C70-O71-Ni1	131,1(5)
C70-O72-Ni2	133,7(5)
O71-C70-O72	126,6(7)
O71-C70-C71	118,3(7)
O72-C70-C71	115,2(8)

C76-C71-C72	121,9(10)
C76-C71-C70	120,9(10)
C72-C71-C70	117,3(9)
C71-C72-C73	117,8(14)
C74-C73-C72	117,6(17)
C75-C74-C73	121,0(16)
C74-C75-C76	122,3(19)
C71-C76-C75	118,3(16)
O80-C81-C83	110,4(11)
O80-C81-C82	104,8(9)
C83-C81-C82	112,6(10)
N100-C101-C102	176,9(13)
O1P-C11-O4P	126,5(13)
O1P-C11-O2P	114,0(5)
O4P-C11-O2P	114,4(13)
O1P-C11-O3P'	127,6(14)
O4P-C11-O3P'	37,6(11)
O2P-C11-O3P'	115,3(14)
O1P-C11-O3P	93,4(7)
O4P-C11-O3P	100,1(9)
O2P-C11-O3P	99,0(7)
O3P'-C11-O3P	62,6(8)
O1P-C11-O4P'	90,2(8)
O4P-C11-O4P'	61,9(8)
O2P-C11-O4P'	98,2(7)
O3P'-C11-O4P'	99,3(10)
O3P-C11-O4P'	159,2(9)

Cl1-O3P-O3P'	55,0(7)
O4P-O3P'-Cl1	69,8(13)
O4P-O3P'-O3P	132,0(16)
Cl1-O3P'-O3P	62,4(7)
O4P-O4P'-Cl1	54,4(6)
O3P'-O4P-Cl1	72,5(12)
O3P'-O4P-O4P'	135,8(15)
Cl1-O4P-O4P'	63,7(7)
O90-C91-C93	104(3)
O90-C91-C92	96(3)
C93-C91-C92	103(4)

ANEXO 2



Distâncias interatômicas (Å) e ângulos de ligação ($^{\circ}$) para o complexo
 $[\text{FeNi}(\text{bppamff})(\mu\text{-OAc})_2(\text{OH}_2)]\text{ClO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Ni1-O72	2,051(11)
Ni1-N42	2,052(9)
Ni1-O62	2,054(9)
Ni1-O10	2,081(7)
Ni1-O1W	2,139(9)
Ni1-N4	2,153(10)
Ni1-Fe1	3,525(2)
Fe1-O20	1,923(9)
Fe1-O71	1,982(10)

Fe1-O61	1,991(7)
Fe1-O10	2,000(8)
Fe1-N32	2,162(9)
Fe1-N1	2,237(8)
O10-C12	1,364(12)
O72-C73	1,240(18)
O71-C73	1,302(19)
O62-C63	1,219(17)
O61-C63	1,293(18)
O20-C22	1,325(14)
O28-C28	1,233(18)
N4-C3	1,475(15)
N4-C40	1,477(15)
N4-C50	1,545(12)
N1-C30	1,491(14)
N1-C20	1,503(14)
N1-C2	1,522(15)
N32-C31	1,338(13)
N32-C33	1,365(13)
C73-C74	1,49(2)
C74-H74A	0,9600
C74-H74B	0,9600
C74-H74C	0,9600
C63-C64	1,520(15)
C64-H64A	0,9600
C64-H64B	0,9600
C64-H64C	0,9600

C15-C16	1,367(16)
C15-C14	1,424(14)
C15-C17	1,535(16)
C14-C13	1,377(15)
C14-H14	0,9300
C13-C12	1,398(16)
C13-C3	1,508(14)
C12-C11	1,416(13)
C11-C16	1,381(15)
C11-C2	1,511(16)
C16-H16	0,9300
C17-H17A	0,9600
C17-H17B	0,9600
C17-H17C	0,9600
C2-H2A	0,9700
C2-H2B	0,9700
C3-H3A	0,9700
C3-H3B	0,9700
N42-C43	1,339(16)
N42-C41	1,353(17)
C43-C44	1,370(18)
C43-H43	0,9300
C44-C45	1,33(2)
C44-H44	0,9300
C45-C46	1,37(2)
C45-H45	0,9300
C46-C41	1,414(17)

C46-H46	0,9300
C41-C40	1,507(18)
C40-H40A	0,9700
C40-H40B	0,9700
C50-C51	1,55(2)
C50-H50A	0,9700
C50-H50B	0,9700
C51-C52	1,36(2)
C51-C56	1,38(2)
C56-C55	1,37(3)
C56-H56	0,9300
C55-C54	1,37(4)
C55-H55	0,9300
C54-C53	1,37(3)
C54-H54	0,9300
C53-C52	1,35(2)
C53-H53	0,9300
C52-H52	0,9300
C33-C34	1,363(16)
C33-H33	0,9300
C34-C35	1,389(17)
C34-H34	0,9300
C35-C36	1,375(16)
C35-H35	0,9300
C36-C31	1,381(16)
C36-H36	0,9300
C31-C30	1,482(15)

C30-H30A	0,9700
C30-H30B	0,9700
C21-C26	1,400(17)
C21-C22	1,412(14)
C21-C20	1,511(16)
C22-C23	1,449(18)
C23-C24	1,393(18)
C23-C28	1,485(17)
C24-C25	1,371(16)
C24-H24	0,9300
C25-C26	1,41(2)
C25-C27	1,518(19)
C26-H26	0,9300
C28-H28	0,9300
C27-H27A	0,9600
C27-H27B	0,9600
C27-H27C	0,9600
C20-H20A	0,9700
C20-H20B	0,9700
C11-O4	1,309(17)
C11-O1	1,32(2)
C11-O2	1,434(13)
C11-O3	1,48(3)
O72-Ni1-N42	91,0(4)
O72-Ni1-O62	93,6(3)
N42-Ni1-O62	175,1(4)
O72-Ni1-O10	92,4(4)

N42-Ni1-O10	91,8(3)
O62-Ni1-O10	89,9(3)
O72-Ni1-O1W	86,5(4)
N42-Ni1-O1W	90,5(4)
O62-Ni1-O1W	87,8(4)
O10-Ni1-O1W	177,5(3)
O72-Ni1-N4	172,2(4)
N42-Ni1-N4	81,7(4)
O62-Ni1-N4	93,7(4)
O10-Ni1-N4	90,5(3)
O1W-Ni1-N4	90,9(4)
O20-Fe1-O71	90,4(4)
O20-Fe1-O61	90,5(3)
O71-Fe1-O61	98,4(3)
O20-Fe1-O10	175,6(3)
O71-Fe1-O10	89,5(4)
O61-Fe1-O10	93,9(3)
O20-Fe1-N32	92,1(4)
O71-Fe1-N32	168,2(3)
O61-Fe1-N32	93,1(3)
O10-Fe1-N32	87,1(3)
O20-Fe1-N1	87,1(3)
O71-Fe1-N1	91,5(3)
O61-Fe1-N1	169,9(4)
O10-Fe1-N1	88,5(3)
N32-Fe1-N1	77,2(3)
C12-O10-Fe1	125,1(7)

C12-O10-Ni1	115,3(7)
Fe1-O10-Ni1	119,5(3)
C73-O72-Ni1	130,6(10)
C73-O71-Fe1	138,0(10)
C63-O62-Ni1	138,5(8)
C63-O61-Fe1	132,7(8)
C22-O20-Fe1	136,0(7)
C3-N4-C40	109,3(9)
C3-N4-C50	110,1(10)
C40-N4-C50	111,3(10)
C3-N4-Ni1	112,4(7)
C40-N4-Ni1	105,2(8)
C50-N4-Ni1	108,4(7)
C30-N1-C20	109,6(9)
C30-N1-C2	110,1(8)
C20-N1-C2	108,9(8)
C30-N1-Fe1	110,5(6)
C20-N1-Fe1	108,1(6)
C2-N1-Fe1)	109,5(7)
C31-N32-C33	119,8(10)
C31-N32-Fe1	117,3(7)
C33-N32-Fe1	122,9(7)
O72-C73-O71	127,2(14)
O72-C73-C74	119,3(17)
O71-C73-C74	113,4(16)
C73-C74-H74A	109,5
C73-C74-H74B	109,5

H74A-C74-H74B	109,5
C73-C74-H74C	109,5
H74A-C74-H74C	109,5
H74B-C74-H74C	109,5
O62-C63-O61	125,7(10)
O62-C63-C64	116,1(14)
O61-C63-C64	118,2(14)
C63-C64-H64A	109,5
C63-C64-H64B	109,5
H64A-C64-H64B	109,5
C63-C64-H64C	109,5
H64A-C64-H64C	109,5
H64B-C64-H64C	109,5
C16-C15-C14	117,7(10)
C16-C15-C17	122,4(10)
C14-C15-C17	119,9(12)
C13-C14-C15	122,6(12)
C13-C14-H14	118,7
C15-C14-H14	118,7
C14-C13-C12	117,7(10)
C14-C13-C3	122,7(11)
C12-C13-C3	119,6(9)
O10-C12-C13	119,9(8)
O10-C12-C11	119,0(10)
C13-C12-C11	121,0(10)
C16-C11-C12	118,9(12)
C16-C11-C2	121,6(9)

C12-C11-C2	119,4(10)
C15-C16-C11	122,2(10)
C15-C16-H16	118,9
C11-C16-H16	118,9
C15-C17-H17A	109,5
C15-C17-H17B	109,5
H17A-C17-H17B	109,5
C15-C17-H17C	109,5
H17A-C17-H17C	109,5
H17B-C17-H17C	109,5
C11-C2-N1	112,1(9)
C11-C2-H2A	109,2
N1-C2-H2A	109,2
C11-C2-H2B	109,2
N1-C2-H2B	109,2
H2A-C2-H2B	107,9
N4-C3-C13	113,1(9)
N4-C3-H3A	109,0
C13-C3-H3A	109,0
N4-C3-H3B	109,0
C13-C3-H3B	109,0
H3A-C3-H3B	107,8
C43-N42-C41	116,6(11)
C43-N42-Ni1	127,6(10)
C41-N42-Ni1	114,1(8)
N42-C43-C44	124,7(15)
N42-C43-H43	117,6

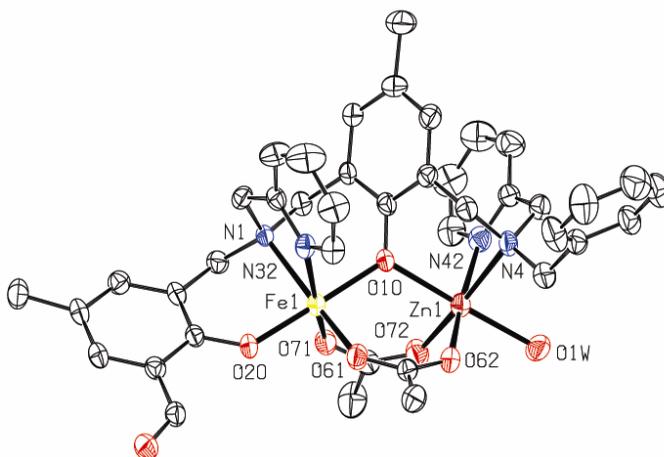
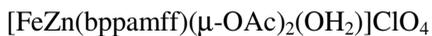
C44-C43-H43	117,6
C45-C44-C43	118,1(14)
C45-C44-H44	120,9
C43-C44-H44	120,9
C44-C45-C46	121,1(14)
C44-C45-H45	119,4
C46-C45-H45	119,4
C45-C46-C41	118,3(16)
C45-C46-H46	120,8
C41-C46-H46	120,8
N42-C41-C46	121,0(13)
N42-C41-C40	115,5(11)
C46-C41-C40	123,4(15)
N4-C40-C41	111,7(11)
N4-C40-H40A	109,3
C41-C40-H40A	109,3
N4-C40-H40B	109,3
C41-C40-H40B	109,3
H40A-C40-H40B	107,9
N4-C50-C51	116,0(10)
N4-C50-H50A	108,3
C51-C50-H50A	108,3
N4-C50-H50B	108,3
C51-C50-H50B	108,3
H50A-C50-H50B	107,4
C52-C51-C56	117,3(18)
C52-C51-C50	122,3(17)

C56-C51-C50	120,3(18)
C55-C56-C51	122(2)
C55-C56-H56	119,2
C51-C56-H56	119,2
C56-C55-C54	118(3)
C56-C55-H55	121,2
C54-C55-H55	121,2
C53-C54-C55	123(3)
C53-C54-H54	118,5
C55-C54-H54	118,5
C52-C53-C54	117(3)
C52-C53-H53	121,6
C54-C53-H53	121,6
C53-C52-C51	124(2)
C53-C52-H52	118,2
C51-C52-H52	118,2
C34-C33-N32	120,6(11)
C34-C33-H33	119,7
N32-C33-H33	119,7
C33-C34-C35	119,6(11)
C33-C34-H34	120,2
C35-C34-H34	120,2
C36-C35-C34	119,7(13)
C36-C35-H35	120,2
C34-C35-H35	120,2
C35-C36-C31	118,6(11)
C35-C36-H36	120,7

C31-C36-H36	120,7
N32-C31-C36	121,7(10)
N32-C31-C30	118,2(11)
C36-C31-C30	120,0(10)
C31-C30-N1	113,9(8)
C31-C30-H30A	108,8
N1-C30-H30A	108,8
C31-C30-H30B	108,8
N1-C30-H30B	108,8
H30A-C30-H30B	107,7
C26-C21-C22	119,6(11)
C26-C21-C20	119,7(10)
C22-C21-C20	120,7(10)
O20-C22-C21	121,6(11)
O20-C22-C23	121,8(10)
C21-C22-C23	116,5(11)
C24-C23-C22	121,1(11)
C24-C23-C28	122,0(13)
C22-C23-C28	116,9(12)
C25-C24-C23	122,5(13)
C25-C24-H24	118,8
C23-C24-H24	118,8
C24-C25-C26	116,7(12)
C24-C25-C27	122,7(13)
C26-C25-C27	120,3(12)
C21-C26-C25	123,5(12)
C21-C26-H26	118,2

C25-C26-H26	118,2
O28-C28-C23	121,6(16)
O28-C28-H28	119,2
C23-C28-H28	119,2
C25-C27-H27A	109,5
C25-C27-H27B	109,5
H27A-C27-H27B	109,5
C25-C27-H27C	109,5
H27A-C27-H27C	109,5
H27B-C27-H27C	109,5
N1-C20-C21	113,5(10)
N1-C20-H20A	108,9
C21-C20-H20A	108,9
N1-C20-H20B	108,9
C21-C20-H20B	108,9
H20A-C20-H20B	107,7
O4-C11-O1	118(2)
O4-C11-O2	112,5(11)
O1-C11-O2	114,1(16)
O4-C11-O3	109(2)
O1-C11-O3	94,2(15)
O2-C11-O3	106,1(14)

ANEXO 3



Distâncias interatômicas (Å) e ângulos de ligação (°) para o complexo
 $[\text{FeZn}(\text{bppamff})(\mu\text{-OAc})_2(\text{OH}_2)]\text{ClO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Fe1-Zn1	3,523(1)
Fe1-O20	1,899(2)
Fe1-O61	1,948(5)
Fe1-O10	1,968(2)
Fe1-O71	1,986(5)
Fe1-N32	2,185(6)
Fe1-N1	2,217(3)
Zn1-O62	2,039(6)

Zn1-O72	2,067(6)
Zn1-N42	2,120(7)
Zn1-O10	2,135(2)
Zn1-O1W	2,166(2)
Zn1-N4	2,273(6)
O10-C12	1,335(7)
O20-C22	1,320(7)
N1-C30	1,482(7)
N1-C2	1,4906
N1-C20	1,504(7)
C2-C11	1,498(7)
C3-C13	1,488(10)
C3-N4	1,506(9)
N4-C40	1,461(9)
N4-C50	1,482(9)
C11-C16	1,386(10)
C11-C12	1,395(9)
C12-C13	1,401(10)
C13-C14	1,397(10)
C14-C15	1,372(11)
C15-C16	1,388(10)
C15-C17	1,523(11)
C20-C21	1,505(10)
C21-C26	1,395(9)
C21-C22	1,399(10)
C22-C23	1,402(10)
C23-C24	1,390(9)

C23-C28	1,465(10)
C24-C25	1,376(10)
C25-C26	1,392(10)
C25-C27	1,520(10)
C30-C31	1,498(10)
C31-N32	1,340(8)
C31-C36	1,367(10)
N32-C33	1,333(9)
C33-C34	1,352(11)
C34-C35	1,366(12)
C35-C36	1,380(12)
C40-C41	1,489(11)
C41-N42	1,345(10)
C41-C46	1,370(11)
N42-C43	1,343(10)
C43-C44	1,363(13)
C44-C45	1,362(14)
C45-C46	1,381(13)
C50-C51	1,510(11)
C51-C52	1,376(12)
C51-C56	1,380(10)
C52-C53	1,393(14)
C53-C54	1,367(15)
C54-C55	1,358(15)
C55-C56	1,354(12)
O61-C63	1,262(8)
O62-C63	1,255(9)

C63-C64	1,474(11)
O71-C73	1,277(9)
O72-C73	1,234(9)
C73-C74	1,486(11)
C28-O28	1,209(8)
C11-O4	1,278(13)
C11-O2	1,298(11)
C11-O3	1,370(10)
C11-O1	1,396(10)
O20-Fe1-O61	90,59(17)
O20-Fe1-O10	178,63(16)
O61-Fe1-O10	90,75(17)
O20-Fe1-O71	89,42(17)
O61-Fe1-O71	100,5(2)
O10-Fe1-O71	90,08(16)
O20-Fe1-N32	96,54(17)
O61-Fe1-N32	90,4(2)
O10-Fe1-N32	83,71(17)
O71-Fe1-N32	167,5(2)
O20-Fe1-N1	88,28(10)
O61-Fe1-N1	167,03(18)
O10-Fe1-N1	90,47(10)
O71-Fe1-N1	92,38(17)
N32-Fe1-N1	76,86(17)
O62-Zn1-O72	95,8(2)
O62-Zn1-N42	169,5(2)
O72-Zn1-N42	94,7(2)

O62-Zn1-O10	91,98(16)
O72-Zn1-O10	90,66(16)
N42-Zn1-O10	88,16(18)
O62-Zn1-O1W	89,60(16)
O72-Zn1-O1W	90,05(17)
N42-Zn1-O1W	90,12(18)
O10-Zn1-O1W	178,19(14)
O62-Zn1-N4	91,3(2)
O72-Zn1-N4	172,8(2)
N42-Zn1-N4	78,2(2)
O10-Zn1-N4	88,11(16)
O1W-Zn1-N4	90,98(16)
C12-O10-Fe1	123,5(3)
C12-O10-Zn1	118,1(3)
Fe1-O10-Zn1	118,27(12)
C22-O20-Fe1	135,0(4)
C30-N1-C2	110,3(3)
C30-N1-C20	110,5(4)
C2-N1-C20	108,9(3)
C30-N1-Fe1	111,6(3)
C2-N1-Fe1	107,24(6)
C20-N1-Fe1	108,2(3)
N1-C2-C11	111,6(3)
C13-C3-N4	113,5(6)
C40-N4-C50	113,7(6)
C40-N4-C3	109,9(6)
C50-N4-C3	109,2(6)

C40-N4-Zn1	105,7(5)
C50-N4-Zn1	109,6(5)
C3-N4-Zn1	108,6(4)
C16-C11-C12	118,6(7)
C16-C11-C2	121,6(6)
C12-C11-C2	119,8(6)
O10-C12-C11	120,7(6)
O10-C12-C13	119,1(6)
C11-C12-C13	120,2(7)
C14-C13-C12	118,8(7)
C14-C13-C3	121,5(7)
C12-C13-C3	119,7(7)
C15-C14-C13	121,8(7)
C14-C15-C16	118,2(7)
C14-C15-C17	121,9(8)
C16-C15-C17	119,8(8)
C11-C16-C15	122,2(7)
N1-C20-C21	112,7(5)
C26-C21-C22	117,3(6)
C26-C21-C20	121,4(7)
C22-C21-C20	121,4(6)
O20-C22-C21	121,0(6)
O20-C22-C23	119,0(6)
C21-C22-C23	120,0(6)
C24-C23-C22	120,1(7)
C24-C23-C28	121,1(7)
C22-C23-C28	118,8(7)

C25-C24-C23	121,2(7)
C24-C25-C26	117,6(7)
C24-C25-C27	122,7(7)
C26-C25-C27	119,7(7)
C25-C26-C21	123,6(7)
N1-C30-C31	112,8(5)
N32-C31-C36	122,7(7)
N32-C31-C30	116,4(6)
C36-C31-C30	120,9(7)
C33-N32-C31	117,7(7)
C33-N32-Fe1	124,3(5)
C31-N32-Fe1	116,9(5)
N32-C33-C34	122,8(8)
C33-C34-C35	119,6(9)
C34-C35-C36	118,6(9)
C31-C36-C35	118,5(8)
N4-C40-C41	113,0(6)
N42-C41-C46	121,4(9)
N42-C41-C40	115,7(7)
C46-C41-C40	122,9(8)
C43-N42-C41	117,9(8)
C43-N42-Zn1	123,3(6)
C41-N42-Zn1	115,8(5)
N42-C43-C44	123,5(10)
C45-C44-C43	118,0(10)
C44-C45-C46	119,8(10)
C41-C46-C45	119,2(10)

N4-C50-C51	117,5(7)
C52-C51-C56	117,1(8)
C52-C51-C50	120,5(8)
C56-C51-C50	122,3(8)
C51-C52-C53	121,7(9)
C54-C53-C52	118,6(11)
C55-C54-C53	120,2(11)
C56-C55-C54	120,8(10)
C55-C56-C51	121,5(9)
C63-O61-Fe1	139,8(5)
C63-O62-Zn1	130,0(5)
O62-C63-O61	126,0(7)
O62-C63-C64	119,4(7)
O61-C63-C64	114,6(7)
C73-O71-Fe1	135,6(5)
C73-O72-Zn1	134,4(5)
O72-C73-O71	125,8(7)
O72-C73-C74	117,9(7)
O71-C73-C74	116,3(8)
O28-C28-C23	126,0(7)
O4-C11-O2	118,2(12)
O4-C11-O3	103,9(9)
O2-C11-O3	110,2(8)
O4-C11-O1	103,1(11)
O2-C11-O1	110,1(7)
O3-C11-O1	111,1(8)
