

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - CFM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Vicente Rodrigues de Almeida

**Atividade *In vitro* e *In vivo* de Um Novo Complexo Binuclear
Não-simétrico de Cu(II) Contendo Um Ligante Derivado do
1,4,7-Triazaciclononano: Promiscuidade Catalítica de Fosfatase
e Antioxidante**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal
de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestre em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Ademir Neves

Florianópolis - SC

2012

A447a Almeida, Vicente Rodrigues de

Atividade in vitro e in vivo de um novo complexo binuclear não-simétrico de cu(ii) contendo um ligante derivado do 1,4,7-triazaciclono-nano [dissertação] : promiscuidade catalítica de fosfatase e antioxidante / Vicente Rodrigues de Almeida ; orientador, Ademir Neves. - Florianópolis, SC, 2012.
100 p.: il., tabs., grafs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Fosfatase ácida. 3. Cobre. I. Neves, Ademir. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

Vicente Rodrigues de Almeida

**Atividade *In vitro* e *In vivo* de Um Novo Complexo Binuclear
Não-simétrico de Cu(II) Contendo Um Ligante Derivado do
1,4,7-Triazaciclononano: Promiscuidade Catalítica de Fosfatase
e Antioxidante**

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

Florianópolis, 5 de março de 2012

Coordenador do Programa Prof. Dr. Almir Spinelli

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ademir Neves
Orientador QMC/CFM/UFSC

Prof^a.Dr^a Rosely A. Peralta
QMC/CFM/UFSC

Prof. Dr. Josiel B. Domingos
QMC/CFM/UFSC

Prof. Dr. Hernán Terenzi
BQA/CCB/UFSC

AGRADECIMENTOS

Às minhas famílias, em especial meus pais Léo e Carmen.

Ao orientador prof. Dr. Ademir Neves pela oportunidade e apoio.

Aos amigos e colaboradores do LABINC-UFSC pelo longo acompanhamento durante o trabalho também realizado por Bel. Luiza M. Bessa e Bel. Eduardo L. Schilling e pelo professor Dr. Adáilton J. Bortoluzzi.

Aos amigos e colaboradores do LIFE-UFRJ pelo apoio nos estudos de atividade biológica antioxidante com células *S. cerevisiae* sob supervisão do doutorando Frederico A. Vieira Castro e dos professores Dr. Marcos Dias Pereira e Dra Elis C. A. Eleutherio.

Aos colaboradores do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas – RJ pelas medidas de EPR realizadas pelo professor Dr. Odivaldo Cambraia Alves.

Aos colegas e colaboradores do CEBIME-UFSC pelos estudos de clivagem de material nucléico realizados pelo doutorando Tiago Bortolotto.

Aos amigos e colaboradores do Laboratório de Equilíbrio – UFSC pelo acompanhamento e apoio em estudo potenciométrico realizado em conjunto com Msc. Tiago G. Costa.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES, INCT-Catálise e Fapesc.

“Los poderosos pueden matar una, dos o tres rosas, pero nunca
podrán detener la primavera entera”

Ernesto Guevara

RESUMO

Apresenta-se a síntese do complexo binuclear $[Cu_2(L)Cl_3]$ (**1**) onde L é a forma desprotonada do ligante 3-[(4,7-diisopropil-1,4,7-triazaciclononan-1-il)metil]-2-hidróxi-5-metilbenzaldeído ou $tacn-^1pr_2mff$. O complexo foi caracterizado por difratometria de raios-X por monocristal, titulação potenciométrica, espectrometria de massa, medidas eletroquímicas, EPR, UV-Vis e IR. O complexo **1** é capaz de aumentar a velocidade da hidrólise do diéster de fosfato bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP) em 2700 vezes e promover a clivagem de DNA plasmidial em meio aquoso neutro e ainda inibir a formação do cromóforo formazan em processos redox envolvendo radical superóxido. Usando o modelo celular eucariótico *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741 wt) observou-se que o complexo é não citotóxico. Além disso, o tratamento de células da linhagem wt e mutantes deficientes em CuZn-Superóxido Dismutase (Sod1) e Catalase citosólica (Ctt1) com o complexo **1** aumenta a viabilidade celular após estresse com H_2O_2 ou menadiona (gerador intracelular de O_2^{\bullet}), indicando que **1** pode atuar como um modelo biomimético de Sod1 e Ctt1. Unidos os resultados suportam considerações acerca de um comportamento dinâmico de um complexo não

simétrico binuclear de Cu(II) em estado sólido e em equilíbrios aquosos pH-dependentes.

Palavras-chave: Modelos Biomiméticos, Promiscuidade Catalítica, Complexos de Cu(II).

ABSTRACT

Here we present the synthesis of the dinuclear complex $[\text{Cu}_2(\text{L})\text{Cl}_3]$ (**1**) where L is the deprotonated form of the 3-[(4,7-diisopropyl-1,4,7-triazacyclononan-1-yl)methyl]-2-hydroxy-5-methylbenzaldehyde ligand. The complex was characterized by single crystal x-ray diffraction, potentiometric titration, mass spectrometry, electrochemical measurements, EPR, UV-Vis and IR. Complex **1** is capable of increase the hydrolysis rate of the diéster bis-(2,4-dinitrophenyl)phosphate (2,4-BDNPP) in 2700 times, promote the plasmidial DNA cleavage at pH 6 and inhibit the formazan chromophore formation in redox processes at pH 7 as well. Using *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741) as eukaryotic cellular model, we observed that **1** presented reduced cytotoxicity. In addition, treatment of Wild-type and mutant cells lacking Cu/Zn-superoxide dismutase (Sod1) and cytoplasmic Catalase (Ctt1) with **1** promotes an increase of survival after H_2O_2 and menadione ($\text{O}_2^{\bullet-}$ generator) stresses indicating that **1** might be acting as Sod1 and Ctt1 mimics. Taken together the results give support to considerations about the dynamic

behavior of an unsymmetrical copper(II) dimer complex in solid state and aqueous pH-dependent solution.

Keywords: Biomimetic Models, Catalytic Promiscuity, Copper Complexes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	28
2.1	METALOENZIMAS.....	30
2.1.1	<i>Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs)</i>	30
2.1.2	<i>CuZn-Superóxido Dismutase (CuZn-SOD) e Catalase (CAT).....</i>	32
2.1.3	<i>Outras Metaloenzimas de Cobre.....</i>	34
2.2	MODELOS BIOMIMÉTICOS	38
2.2.1	<i>Modelos Fosfatase-miméticos</i>	39
2.2.2	<i>Modelos SOD e CAT-miméticos.....</i>	41
2.2.3	<i>Outros Modelos Biomiméticos de Cobre ...</i>	43
2.3	<i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	45
3	OBJETIVOS.....	47
3.1	METAS.....	47
4	PARTE EXPERIMENTAL	48
4.1	MATERIAIS, INSTRUMENTAÇÃO E PROCEDIMENTOS	48
4.1.1	<i>Titulação Potenciométrica.....</i>	50

4.1.2	<i>Medidas Cinéticas: hidrólise do 2,4-BDNPP</i>	50
4.1.3	<i>Clivagem de DNA</i>	52
4.1.4	<i>Atividade SOD-mimética In vitro</i>	53
4.1.5	<i>Citotoxicidade</i>	54
4.1.6	<i>Atividade SOD e CAT-mimética In vivo</i>	54
4.1.7	<i>Oxidação Intracelular</i>	55
4.1.8	<i>Síntese do ligante tacn-ⁱpr₂mff</i>	56
4.1.9	<i>Síntese do complexo [Cu₂(tacn-ⁱpr₂mff)Cl₃] – (1)</i>	57
4.1.10	<i>Cristalografia</i>	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1	ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE Cu₂(TACN-ⁱPR₂MFF)Cl₃ (1)	60
5.2	ESPECTROSCOPIAS ELETRÔNICA E VIBRACIONAL	62
5.3	TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA	67
5.4	ESPECTRO DE MASSA	69
5.5	RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA - EPR	72
5.6	MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	76
5.7	HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP	82
5.7	CLIVAGEM DE DNA	87
5.8	ATIVIDADE SOD-MIMÉTICA IN VITRO	95

5.9 ATIVIDADE SOD E CAT-MIMÉTICA <i>IN VIVO</i>	97
6 CONCLUSÕES	101
7 REFERÊNCIAS	102
ANEXO A – ROTA DE SÍNTESE DOS PRÓ-LIGANTES DE TACN ¹ PR ₂ MFF (L)	113
1 SÍNTESE DO 1,2-BIS(P-TOLUENOSULFONIL)ETILENOGLICOL – EG- TS ₂	113
3 SÍNTESE DO 1,4,7-TRIS-(P-TOLUENOSULFONIL)-1,4,7- TRIAZACICLONONANO – TACN-TS ₃	117
4 SÍNTESE DO 1-(P-TOLUENOSULFONIL)-1,4,7- TRIAZACICLONONANO – TACN-TS	120
5 SÍNTESE DO 1,4-DIISOPROPIL-7-(P-TOLUENOSULFONIL)-1,4,7- TRIAZACICLONONANO – TACN ¹ PR ₂ -TS.....	122
6 SÍNTESE DO 1,4-DIISOPROPIL-1,4,7-TRIAZACICLONONANO – TACN ¹ PR ₂	125
7 SÍNTESE DO 2-CLOROMETIL-4-METIL-6-FORMIL-FENOL – CMFF	128
ANEXO B – SÍNTESE DO LIGANTE 2-[(4,7-DIISOPROPIL- 1,4,7-TRIAZACICLONONAN-1-IL)METIL]-6-(FORMIL)-4- METILFENOL – TACN ¹ PR ₂ MFF (L).	134

**ANEXO C – CURVAS DE LAMBERT-BEER E PERFIL DAS
TRANSIÇÕES OBSERVADAS NO ESPECTRO ELETRÔNICO
UV-VISÍVEL DO COMPLEXO 1.....137**

LISTA DE ESQUEMAS E FIGURAS

ESQUEMA 1 – EQUAÇÃO QUÍMICA PARA O DESPROPORCIONAMENTO DE H_2O_2 POR UMA CATALASE MONOFUNCIONAL.....	34
ESQUEMA 2 – SÍNTESE DE 1.....	58
ESQUEMA 3 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DO EQUILÍBRIO PH-DEPENDENTE DE 1 EM ÁGUA.	69
ESQUEMA 4 – PROPOSTA DO MECANISMO DE HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP PELA ESPÉCIE 1B.....	87
FIGURA 1 - INTERMEDIÁRIO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE DE MONOÉSTER DE FOSFATO PELAS PAPS.....	31
FIGURA 2 – MECANISMO PARA A DISMUTAÇÃO DE SUPERÓXIDO PELA ENZIMA CUZn-SOD.....	32
FIGURA 3 – ESPECTROS ELETRÔNICO (ESQUERDA) E DE EPR (DIREITA) DA OXI- HEMOCIANINA (LINHA CHEIA) E Cu(II) TETRAGONAL (LINHA PONTILHADA).	35
FIGURA 4 – ESPECTROS ELETRÔNICOS DAS FORMAS MET E DIMÉRICA DA HEMOCIANINA. L_1 E L_2 = LIGANTES EXÓGENOS, R = PONTE ENDÓGENA.....	36
FIGURA 5 – ESPECTROS DE EPR PARA SÍTIO BINUCLEAR DE Cu(II): NÃO ACOPLADO (ESQUERDA); COM ACOPLAMENTO DIPOLAR FRACO (CENTRO); COM ACOPLAMENTO DIPOLAR FORTE (DIREITA). R = DISTÂNCIA INTERMETÁLICA.....	37
FIGURA 6 – MECANISMO DE <i>o</i> -HIDROXILAÇÃO E OXIDAÇÃO DE CATECOL PELO SITO ATIVO DA TIROSINASE.....	38

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO PARA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO BNPP PELA ESPÉCIE $[Cu(TACN-PR_3)(OH)(H_2O)]^+$	40
FIGURA 8 – INTERMEDIÁRIO RESPONSÁVEL PELA HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP.	41
FIGURA 9 – COMPLEXOS DE Fe(III) (ESQUERDA) E DE Mn(II) (CENTRO) COM O LIGANTE HPCINOL E REPRESENTAÇÃO GENÉRICA DOS COMPLEXOS BINUCLEARES DE Mn(III) (DIREITA).	43
FIGURA 10 – REPRESENTAÇÕES ESTRUTURAIS DA OXI-HEMOCIANINA E O DÍMERO $[Cu(II)(TACN-PR_3)]_2O_2$	45
FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO ORTEP DO COMPLEXO $[Cu_2(TACN-PR_2MFF)Cl_3]$ (1) MOSTRANDO ELIPSÓIDES COM 40 % DE PROBABILIDADE DE DENSIDADE ELETRÔNICA. ÁTOMOS DE HIDROGÊNIO FORAM OMITIDOS.	60
FIGURA 12 - ESPECTRO DE REFLECTÂNCIA DIFUSA DE 1 DILUÍDO EM PASTILHAS DE KBR.	63
FIGURA 13 – ESPECTRO ELETRÔNICO DE 1 EM SOLUÇÃO AQUOSA EM DIVERSOS VALORES DE PH. GRÁFICO MOSTRANDO TCLM ($[1] = 0,20 \text{ MMOL.L}^{-1}$). TRANSIÇÕES D-D NO GRÁFICO INSERIDO ($[1] = 1,6 \text{ MMOL.L}^{-1}$): PH 3,0 (PRETO), 6,0 (CINZA ESCURO), 8,8 (CINZA) E 10,4 (CINZA CLARO). $I =$ $0,1 \text{ MOL.L}^{-1} \text{ KCl}$	65
FIGURA 14 – ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (ESQUERDA) DO LIGANTE LIVRE TACN-PR ₂ MFF (A) E COMPLEXO 1 (B) EM PASTILHAS DE KBR. À DIREITA EXPANSÃO DA REGIÃO DE MENORES FREQUÊNCIAS (1900 A 500 CM^{-1}).	66
FIGURA 15 – CURVA DE TITULAÇÃO DO COMPLEXO 1 ($51 \mu\text{MOL.L}^{-1}$) EM ÁGUA (20 ML). $I = 0,1 \text{ MOL.L}^{-1} \text{ KCl}$	68
FIGURA 16 – DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES VS PH (LINHAS) E V_0 (HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP) VS PH (*) (SEÇÃO 5.7).	69

FIGURA 17 – ESPECTRO DE MASSA EXPERIMENTAL DE 400 A 550 DALTONS DE SOLUÇÃO DE 1 AQUOSO EM PH 6 DILUÍDO EM CH ₃ CN (MS) ATÉ 5 PPM (M/V). NO GRÁFICO INSERIDO APRESENTAM-SE O PICO AMPLIADO EM 521,1 DALTONS, A DISTRIBUIÇÃO ISOTÓPICA E A REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL PROPOSTA PARA O ÍON 1E.	71
FIGURA 18 - ESPECTROS DE EPR: EXPERIMENTAL (CINZA) E SIMULADOS (PRETO); SOLUÇÃO AQUOSA PH 4,0 A 10,4 (TOPO: ESQUERDA = 77 K; DIREITA = T.A.).....	73
FIGURA 19 - VALORES DE G VS PH A TEMPERATURA AMBIENTE (T.A.) E 77 K.	76
FIGURA 20 – VOLTAMOGRAMA CÍCLICO (CV) DE 1 EM CH ₃ CN. ELETRÓLITO SUPORTE N-BU ₄ NPF ₆ 0.1 MOL.L ⁻¹ , ELETRODOS: CARBONO VÍTREO (TRABALHO), PLATINA (AUXILIAR) E AG/AG ⁺ (REFERÊNCIA), PADRÃO INTERNO FERROCENO (E ⁰ = 400 mV vs NHE).....	77
FIGURA 21 – MEDIDAS ELETROQUÍMICAS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA (PRETO) E ONDA QUADRADA (CINZA = REDUÇÃO; CINZA CLARO = OXIDAÇÃO) DE 1 EM ÁGUA E PHS SELECIONADOS. ELETRÓLITO SUPORTE KCl 0.1 MOL.L ⁻¹ , ELETRODOS: CARBONO VÍTREO (TRABALHO), PLATINA (AUXILIAR) E AG/AG ⁺ (REFERÊNCIA), PADRÃO INTERNO K ₃ [(Fe(CN) ₆] (E ⁰ = 358 mV vs NHE).	79
FIGURA 22 - POTENCIAS DE ONDA DETERMINADOS POR VOLTAMETRIAS CÍCLICA (CV) E DE ONDA QUADRADA (SW) EM ÁGUA EM PHS SELECIONADOS E EM CH ₃ CN.	82
FIGURA 23 – CURVA DE V ₀ (HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP) VS PH. CONDIÇÕES: CH ₃ CN/H ₂ O (50% v/v): [1] = 37 μMOL.L ⁻¹ ; [2,4-BDNPP] = 0,44 MMOL.L ⁻¹ ; [TAMPÃO] = 50 MMOL.L ⁻¹ MES (PH 4 A 7), HEPES (PH 7,5 A 8,0) TRIS (8,5) E CHES (PH 9,0 A 10) E LiClO ₄ 0,10 MOL.L ⁻¹	84

FIGURA 24– CURVA DE SATURAÇÃO [2,4-BDNPP] VS V_0 EM PH 6. [MES] _{FINAL} = 50 MMOL.L ⁻¹ , [1] _{FINAL} = 9,2 μMOL.L ⁻¹ E [2,4-BDNPP] _{FINAL} = 0,93 A 9,3 MMOL.L ⁻¹ EM CH ₃ CN/H ₂ O (50% V/V). FORÇA IÔNICA 0,05 MOL.L ⁻¹	85
FIGURA 25 – CLIVAGEM DE DNA SUPERNOVELADO PELO COMPLEXO 1 (0,5 MMOL.L ⁻¹) POR 16 H A 37 °C EM DIFERENTES TAMPÕES (10 MMOL.L ⁻¹ ; MES, PH 5,5-6,5; HEPES, PH 7,0-8,0; CHES, PH 8,5-9,0).	89
FIGURA 26 – CINÉTICA PSEUDO-MICHAELLIANA DE CLIVAGEM DE DNA SUPERNOVELADO POR 1 (0,5 MMOLL ⁻¹) EM PH 6,0 (MES 10 MMOLL ⁻¹).	90
FIGURA 27 – CLIVAGEM DE DNA SUPERNOVELADO PELO COMPLEXO 1 POR 16 H A 37 °C EM PH 6 E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COMPLEXO.	92
FIGURA 28 – EFEITO DE LIGANTES DE SULCO DISTAMICINA (50 MMOL.L ⁻¹) E VERDE DE METILA (50 MMOL.L ⁻¹) NA CLIVAGEM DE DNA SUPERNOVELADO PELO COMPLEXO 1 (0,5 MMOL.L ⁻¹) POR 16 H A 37 °C EM MES (10 MMOL.L ⁻¹ , PH 6,0).	93
FIGURA 29 – EFEITO DE SEQUESTRADORES DE EROS NA CLIVAGEM DE DNA SUPERNOVELADO PELO COMPLEXO 1 (0,5 MM) POR 16 H A 37 °C EM TAMPÃO MES (10 MMOLL ⁻¹ , PH 6,0). OS SEQUESTRADORES DE EROS USADOS FORAM: DMSO (10%), KI (10 MMOLL ⁻¹), SOD (15 UNIDADES), E NAN ₃ (10 MMOLL ⁻¹).	95
FIGURA 30 – INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO NBT. ABSORÇÃO DE FORMAZAN (560 NM) VS TEMPO.	96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DADOS CRISTALOGRAFÍCOS E DO REFINAMENTO DA ESTRUTURA DE 1.	59
TABELA 2 – DISTANCIAS (Å) E ÂNGULOS (°) DA ESFERA DE COORDENAÇÃO DOS CENTROS DE CU(II) EM 1.	62
TABELA 3 – VALORES DE G PARA CU1 E CU2 EM SOLUÇÃO AQUOSA E PHS SELECIONADOS. OS VALORES DE A_{\parallel} PARA CU1 APRESENTAM-SE DIVIDIDOS POR 10^{-4} CM^{-1}	75
TABELA 4 – POTENCIAIS DE REDUÇÃO/OXIDAÇÃO (mV vs NHE; CV E SW) PARA CU1 E CU2 EM SOLUÇÃO AQUOSA E PHS SELECIONADOS.....	81
TABELA 5 – PARÂMETROS CINÉTICOS PARA A HIDRÓLISE DO 2,4-BDNPP CATALISADA PELO COMPLEXO 1 E OUTROS COMPLEXOS, MONO E BINUCLEAR, DE CU(II).....	86
TABELA 6 – AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE 1 ($25 - 500 \mu\text{MOLL}^{-1}$)	97
TABELA 7 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE 1 ($25 \mu\text{MOLL}^{-1}$)	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-DNP – 2,4-dinitrofenolato

2,4-BDNPP - bis(2,4-dinitrofenil)fosfato

2%YPD – meio de cultivo 2% dextrose (metabolismo fermentativo)

4%YPGly – meio de cultivo 4% glicerol (metabolismo respiratório)

BBPMP - ânion 2,6-bis[(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)aminometil]-4-metilfenol

BNPP – bis(nitrofenil)fosfato

BPBPMP – ânion bivalente do 2-[N-bis(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N'-(2-piridilmetil)(2-hidroxibenzil)aminometil]fenol

BY4741 ou **wt** – levedura de panificação linhagem “selvagem” ou “wild type” (*MATa*; *his3Δ1*; *leu2 Δ 0*; *met15 Δ 0*; *ura3 Δ 0*)

CAT ou **Ctt1** – catalase

CHES – ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfônico

cmff - 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol

ctt1Δ - levedura isogênica da **wt** deficiente de Ctt1

CuZn-SOD ou **Sod1** – CuZn-superóxido dismutase

CV – voltametria cíclica

DCFH – 2',7'-diclorofluoresceína

DMSO - dimetilsulfóxido

EDTA – ânion etilenodiamino tetraacético

EPR – ressonância paramagnética eletrônica

EROs – espécies reativas de oxigênio

HEPES - ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)1-piperazinil]-etanosulfônico

HISMIMA - [(2-(imidazol-4-il)etil)(1-metilimidazol-2-il)metil]amina

HPCINOL - 1-[bis(piridin-2-ilmetil)amino]-3-cloropropan-2-ol

MES – ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico

***n*-Bu₄NPF₆** – hexafluoreto de tetrabutílamônio

NBT – azul de nitrotetraazólio

NHE – eletrodo normal de hidrogênio

PAPs – fosfatases ácidas púrpuras

sod1Δ - levedura isogênica da **wt** deficiente de Sod1

SW – voltametria de onda quadrada

t.a. – temperatura ambiente

tacn – 1,4,7-triazaciclono-nano

tacnⁱpr₂ – 1,4-diisopropil-1,4,7-triazaciclono-nano

tacnⁱpr₃ – 1,4,7-triisopropil-1,4,7-triazaciclono-nano

tacnⁱpr₂mff - 3-[(4,7-diisopropil-1,4,7-triazaciclono-nano-1-il)metil]-2-hidróxi-5-metilbenzaldeído

TBE – tris(borato)edta

TCLM – transição de transferência de carga do tipo ligante para o metal

TMS – tetrametilsilano

TRIS - tris(hidroximetil)aminometano

XaO – xantina oxidase

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história, cientistas descobriram que íons metálicos apresentam forte interação com os organismos e com o meio ambiente. Correlações entre modos de coordenação, estrutura eletrônica, reatividade e o papel dos íons metálicos em complexos modelos podem ser muito úteis para compreensão sobre os fenômenos que ocorrem nos sítios ativos de metaloenzimas (Kaim and Schwederski 1994; Lippard and Berg 1994; Beinert 2002; Valko, Morris et al. 2005). Ainda, complexos de baixa massa molecular são importantes ao desenvolvimento de novos materiais como dispositivos eletrônicos, sondas moleculares, catalisadores seletivos bem como agentes de biorremediação e compostos farmacologicamente ativos (Solomon 1983; Fujimori, Yamada et al. 2005; Danford, Dobrowolski et al. 2009; Gahan, Smith et al. 2009; Hadler, Mitić et al. 2010). Muitos são os exemplos de complexos de Cu(II) que apresentam atividade antitumoral, antibacteriana, antifúngica e antioxidante além de outras aplicações (Ciuffi, Cellai et al. 1998; Fujimori, Yamada et al. 2005; Alvarez, Alzuet et al. 2005; Psomas, Tarushi et al. 2006; Fernandes, Horn Jr et al. 2010; Bousourani, Geromichalos et al. 2011; Harinath, Reddy et al. 2011). Por outro lado, quando metais de transição são aplicados como novos fármacos, existe uma tênue linha de separação entre citoproteção e citotoxicidade, tornando difícil a descoberta de compostos ideais para o uso médico (Psomas, Tarushi et al. 2006; Bousourani, Geromichalos et al. 2011; Perron, García et al. 2011). Em

adição, na literatura recente, complexos mono e binucleares de Cu, Co, Fe e Mn apresentam atividade catalítica ou propriedades de reatividade em diferentes sistemas, tais como: hidrólise de fosfodiésteres, DNA e proteínas, oxidação de catecóis, desproporcionamento de peróxido e ou superóxido bem como citoproteção antioxidante ou citotoxicidade (Biava, Palopoli et al. 2006; Lessa, Horn et al. 2009; Oliveira, Mazera et al. 2009; Souza, Castro et al. 2009; Horn, Parrilha et al. 2010; Yan, Mu et al. 2010). Pequenas mudanças na estrutura ou qual o metal é utilizado pode levar a mudanças substanciais nas propriedades catalíticas e na atividade biológica dos complexos.

Vários exemplos podem ser encontrados acerca do uso de moléculas sabidamente bioativas para a síntese de complexos, especialmente de Cu(II), almejando a obtenção de um aumento nas características desejáveis em fármacos, tais como diminuição de efeitos colaterais ou mudanças em propriedades de solubilidade (Ruiz, Ortiz et al. 1997; Fujimori, Yamada et al. 2005; Psomas, Tarushi et al. 2006; Gómez-Saiz, Gil-García et al. 2008; Klanicová, Trávníček et al. 2010; Patel, Gandhi et al. 2011).

Neste trabalho apresenta-se um novo complexo binuclear de Cu(II), $[Cu_2(L)Cl_3]$ (**1**), com o ligante N_3O_2 -doador **tacnⁱ-pr₂mff** (L), um derivado do macrocíclico do largamente empregado 1,4,7-triazaciclononano (Chaudhuri and Wieghardt 1987; Ellis, Farrugia et al. 1999; Giesbrecht, Cui et al. 2002; Castro-Rodriguez, Olsen et al. 2003; Kreher, Hearn et al. 2007; Bar-Nahum, Gupta et al. 2009). O ligante L é

capaz de estabilizar dois íons Cu(II) com ambientes de coordenação distintos entre si, formando uma estrutura peculiar. Encontrou-se que, além de interessantes propriedades eletroquímicas e espectroscópicas em solução, o complexo exibe significativa atividade catalítica frente à clivagem do substrato ativado bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP) e o próprio DNA em condições de pH próximas as fisiológicas. Ainda, demonstra-se que o complexo **1** pode atuar em processos redox inibindo a ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) tanto *In vitro* quanto *In vivo* utilizando células de *S. cerevisiae*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A química Bioinorgânica começou a se desenvolver com os primeiros estudos acerca da composição dos organismos, das proteínas ou até mesmo antes quando do estudo de tecidos e órgãos. Embora não com o nome “Bioinorgânica”, a base deste campo de estudo se construiu com atividades de médicos, fisiologistas, biólogos, químicos entre outros cientistas de diversas áreas. Um objetivo em comum era a busca por respostas acerca da presença de metais em concentrações definidas, muitas vezes encontradas em concentrações traço, em sistemas vivos. Muitas proteínas e enzimas apresentam fortes interações com metais, alguns destes metais denominados como cofatores ou coenzimas necessários nos processos de catálise biológica. No último século, os avanços a favor da química Bioinorgânica, principalmente em medidas de propriedades físicas, espectroscópicas e cristalográficas, possibilitaram um rápido desenvolvimento e aumento significativo na produção científica em torno deste campo. Atualmente além de se “auto-alimentar” o interdisciplinar estudo de metaloenzimas inspira diversas idéias para solucionar problemas ambientais, médicos, energéticos entre outros, ainda contribuem intensamente em ciência de base como em espectroscopia, engenharias genética e proteômica, geologia e etc (Lippard and Berg 1994; Beinert 2002; Valko, Morris et al. 2005).

Neste trabalho enfatizo a contribuição de Edward Solomon e o estudo de metaloenzimas de Cu, modelos biomiméticos e materiais

contendo sítios de Cu acoplados. De fato o metal Cu compõe o sítio ativo de diversas enzimas e apresenta características eletrônicas, espectroscópicas, importantes para a investigação do complexo de Cu(II) obtido neste trabalho, e principalmente de reatividade que interessam no ramo científico e tecnológico (Solomon 1983; Solomon, Ginsbach et al. 2011).

A enzima CuZn-Superóxido dismutase (CuZn-SOD ou Sod1), por exemplo, é uma das principais responsáveis pelo metabolismo de radical superóxido no meio intracelular de eucariotos. Outras enzimas contendo diferentes cátions metálicos como as Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs) também são exemplo da versatilidade e reatividade dos metais no meio biológico e serão abordadas adiante juntamente com a CuZn-SOD e Catalase (CAT).

Paralelamente ao estudo de metaloenzimas, o estudo de modelos biomiméticos tem apresentado importantes contribuições para: o entendimento de como funcionam muitas metaloenzimas e desenvolvimento de novos compostos com aplicações diversas desde medicinal até quimiorremediação. Neste contexto depara-se com a necessidade de conhecer as propriedades físico-químicas e também toxicológicas dos modelos quando submetidos ao ambiente. Para este ultimo item, envolvendo toxicidade e atividade biológica de novos compostos, podem ser usados modelos celulares tal como o usado neste trabalho, o modelo celular eucariótico *Saccharomyces cerevisiae*, descrito adiante nas seções 2.3, 4.1.5-7 e 5.9.

Dentro do contexto da bioinorgânica, portanto, é de importância primária um amplo conhecimento acerca das metaloenzimas, abordado mais especificamente na seção a seguir 2.1. Ramificações da bioinorgânica como a química de modelos biomiméticos serão abordadas na seção 2.2.

2.1 Metaloenzimas

2.1.1 Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs)

O primeiro exemplo de metaloenzima a ser abordado são as PAPs. Sabe-se que este grupo de enzimas é capaz de hidrolisar ésteres de fosfato numa faixa de pH entre 4 e 7. Compostas por um sítio heterobinuclear Fe(III)Me(II) (onde Me = Fe, Zn e Mn) as PAPs se utilizam de cooperação entre ácidos de Pearson duros e macios para geração de um nucleófilo hidróxido e ativação do substrato respectivamente. A Figura 1 a seguir mostra um intermediário proposto para o processo de hidrólise de um éster de fosfato por um sítio ativo de PAP (Klabunde and Krebs 1997; Mitić, Smith et al. 2006).

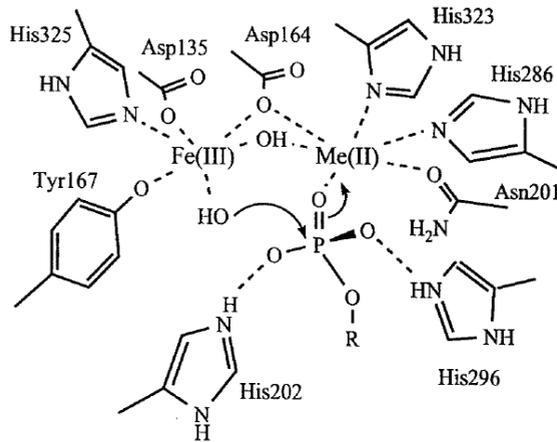


Figura 1 - Intermediário do processo de hidrólise de monoéster de fosfato pelas PAPs.

Embora sua função ainda não seja completamente conhecida, as PAPs são alvos na pesquisa e desenvolvimento de substâncias que atuem contra varias disfunções humanas como osteoporose, fibrose cística, câncer e depressão. Este tipo de sítio ativo binuclear cooperativo, encontrado em outras esterases, di ou triesterases, alavancam também o estudo acerca da degradação de pesticidas e agentes neurotóxicos (Gahan, Smith et al. 2009).

2.1.2 CuZn-Superóxido Dismutase (CuZn-SOD) e Catalase (CAT)

A enzima CuZn-Superóxido Dismutase é uma das principais componentes do metabolismo de espécies reativas de oxigênio, responsável pelo consumo de dois equivalentes de ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) transformando-os em O_2 e H_2O_2 . A enzima apresenta um sítio redox-ativo de Cu(II) ponteadado a um íon Zn(II) por um resíduo de histidina. Embora não participe diretamente da catálise o íon de Zn(II) tem importância para a dinâmica estrutural e de carga na cavidade do sítio ativo desta enzima (Kaim and Schwederski 1994).

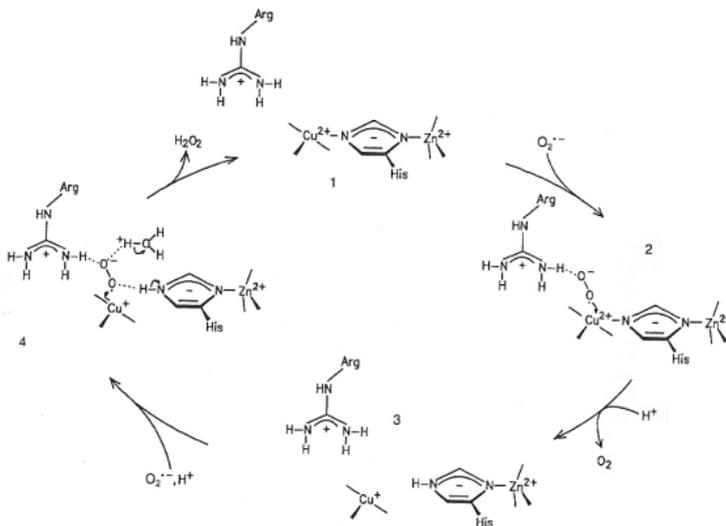
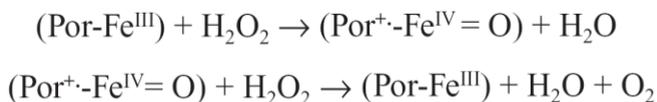


Figura 2 – Mecanismo para a dismutação de superóxido pela enzima CuZn-SOD.

Durante o processo de catálise realizado pela CuZn-SOD (Figura 2) ocorre inicialmente a oxidação de $O_2^{\bullet-}$ para O_2 associada à redução do íon Cu(II) para Cu(I) que se desliga da ponte histidina. Quando um segundo radical $O_2^{\bullet-}$ se aproxima, ocorre sua redução para H_2O_2 e a reoxidação do íon Cu(I) para Cu(II). A ponte histidina retorna e o sítio ativo pode realizar um novo ciclo catalítico (Kaim and Schwederski 1994). Perturbações na expressão ou mutações da enzima CuZn-SOD parecem estar relacionadas com uma série de problemas para o controle do estresse oxidativo nos tecidos, como por exemplo, o tecido cerebral e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Costa and Moradas-Ferreira 2001; Warner, Sheng et al. 2004)

De acordo com o mecanismo mostrado na Figura 2 observa-se a geração de H_2O_2 na segunda etapa do mecanismo de dismutação de $O_2^{\bullet-}$. Sabe-se que o H_2O_2 é o principal gerador de radical hidroxil (OH^{\bullet}) sendo este o agente oxidante mais agressivo para os tecidos celulares e biomoléculas. Para evitar o estresse oxidativo no interior das células de diversos organismos eucarióticos, existe um grande grupo de enzimas denominadas Catalases (CAT) responsáveis pelo metabolismo do subproduto das SOD, o H_2O_2 . Com um sítio ativo do tipo heme coordenado a Fe(III) (Por-Fe(III)), uma enzima catalase monofuncional é capaz de reduzir um equivalente de H_2O_2 transformando-o em H_2O gerando o produto oxiferril $Por^{\bullet+}-Fe(IV)=O$. Depois de oxidado o produto $Por^{\bullet+}-Fe(IV)=O$ é reduzido à forma inicial Por-Fe(III) por mais um equivalente de H_2O_2 e liberando H_2O e O_2 , a partir daí a enzima pode realizar novamente o processo. O esquema abaixo demonstra as

equações químicas que representam o processo de catálise de uma catalase monofuncional contendo um sítio de Fe(III) (Chelikani, Fita et al. 2004).



Esquema 1 – Equação química para o desproporcionamento de H_2O_2 por uma catalase monofuncional.

Muitas outras formas de catalase foram descritas na literatura, algumas com atividade bifuncional catalase-peroxidase e também apresentando sítios não-heme contendo Manganês como íon metálico ativo (Chelikani, Fita et al. 2004).

2.1.3 Outras Metaloenzimas de Cobre

Diversas são as metaloenzimas contendo sítio ativo de cobre. Enzimas azuis de Cobre (Tipo 1), enzimas normais ou “não-azuis” de cobre (Tipo 2) e enzimas contendo sítios diméricos de cobre (Tipo 3)(Kaim and Schwederski 1994; Gerdemann, Eicken et al. 2002) são grandes classes das quais nos ateremos as do Tipo 3 devido ao caráter estrutural apresentado em seus sítios ativos.

Em 1983, Edward Solomon apresentou a investigação minuciosa acerca de correlações função/estrutura com o comportamento eletrônico e geométrico dos sítios ativos binucleares

de Cobre do Tipo 3. Nesta publicação, Solomon destaca o primeiro perfil espectroscópico elucidativo de centros binucleares com atividade de transporte de oxigênio tal como a hemocianina e atividade em diferentes reações redox como as realizadas por enzimas como tirosinase e lacase (Solomon 1983).

Diferentes formas derivadas do sítio ativo da hemocianina apresentam diferentes perfis espectrais em EPR e espectroscopia eletrônica. Primeiramente, comparando-se os espectros eletrônico e de EPR da forma **oxi-hemocianina** com o íon cúprico tetragonal observa-se uma grande diferença nos perfis de absorção assim como mostrado na Figura 3 (Solomon 1983; Solomon, Ginsbach et al. 2011).

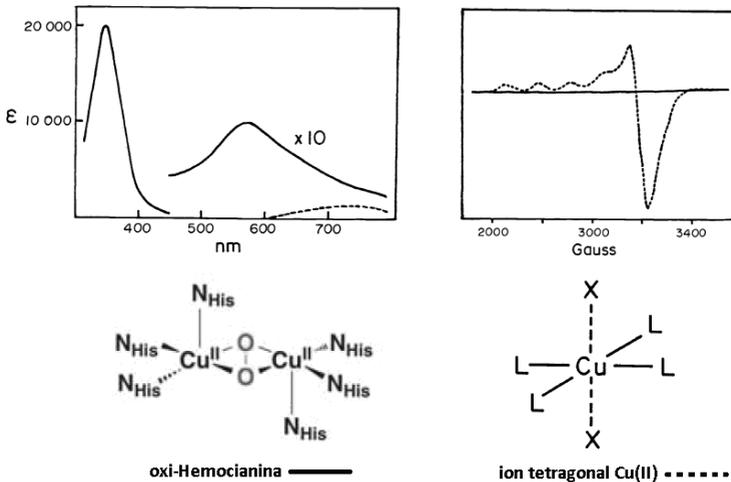


Figura 3 – Espectros eletrônico (esquerda) e de EPR (direita) da oxi-hemocianina (linha cheia) e Cu(II) tetragonal (linha pontilhada).

O estudo espectroscópico permite ainda a observação de pequenas diferenças no centro bimetálico da hemocianina, a variação na absortividade molar das transições observadas no espectro eletrônico das formas **met** e **dimérica** mostram pequenas mudanças conformacionais nos orbitais *d*. Os valores de λ_{\max} se mantêm sem deslocamentos perceptíveis (Figura 4)(Solomon 1983).

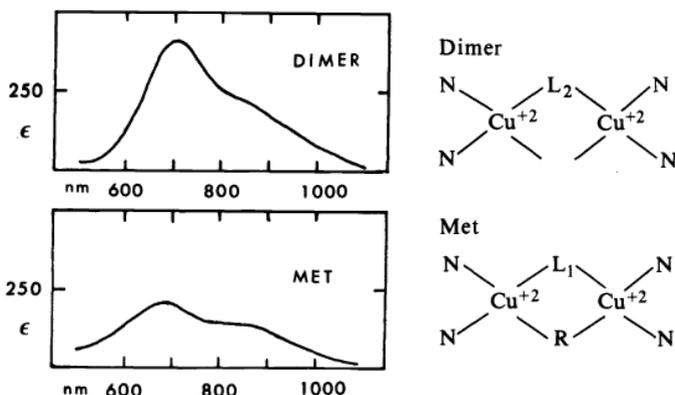


Figura 4 – Espectros eletrônicos das formas **met** e **dimérica** da hemocianina. L_1 e L_2 = ligantes exógenos, R = ponte endógena.

Ainda o espectro de EPR da forma **dimérica** apresenta acoplamento dipolar alterando de forma significativa o perfil de absorção, devido desdobramento dipolar, em comparação a formas binucleares não acopladas, que exibem apenas transições $\Delta M_s = \pm 1$ discretas, ou acopladas antiferromagneticamente, que exibem transições $\Delta M_s = \pm 2$ também discretas. A Figura 5 mostra três formas

diferentes de sítios binucleares de Cu(II) evidenciando o efeito significativo do acoplamento dipolar no espectro de EPR.

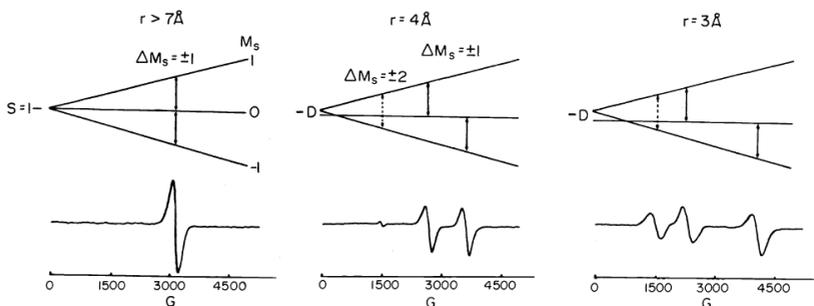


Figura 5 – Espectros de EPR para sítio binuclear de Cu(II): não acoplado (esquerda); com acoplamento dipolar fraco (centro); com acoplamento dipolar forte (direita). r = distância intermetálica.

Por ultimo coloca-se o exemplo da enzima binuclear de Cu(II) tirosinase. Esta enzima é responsável pela catálise de *o*-hidroxilação de fenóis e a subsequente oxidação do catecol formado gerando quinona. Esta enzima inspira o desenvolvimento de diversos complexos voltados à área tecnológica de degradação e funcionalização de compostos orgânicos, tal como será mostrado nas seções 2.2.2-3. A Figura 6 mostra o mecanismo de ação da tirosinase (Fontecave and Pierre 1998).

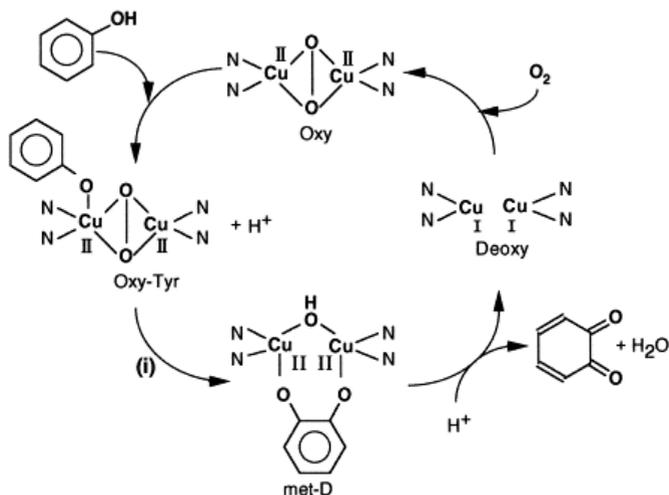


Figura 6 – Mecanismo de *o*-hidroxilação e oxidação de catecol pelo sítio ativo da tirosinase.

2.2 Modelos Biomiméticos

Observando as características estruturais das metaloenzimas e a versatilidade dos íons metálicos em seus sítios ativos percebeu-se a possibilidade de obtenção de compostos de baixa massa molar com atividade similar as das metaloenzimas. Embora com algumas desvantagens no que se diz respeito à atividade catalítica ou especificidade, os modelos biomiméticos se prestam a uma série de fins, como: suas características estruturais podem ser comparadas aos sítios ativos de metaloenzimas e estudadas em paralelo via espectroscopias diversas, medidas cinéticas se utilizando de inibidores

e etc, podendo contribuir para o entendimento de como as próprias metaloenzimas funcionam; os modelos biomiméticos são normalmente mais simples de se obter, são menos susceptíveis às condições não fisiológicas ou quando se trabalha fora das condições ótimas determinadas para as enzimas, são substâncias mais facilmente cristalizáveis e estruturalmente menos complexas e ainda; se prestam ao desenvolvimento de novos materiais voltados a diversas áreas tecnológicas, substâncias com atividade farmacológica, sondas moleculares etc (Lippard and Berg 1994).

2.2.1 Modelos Fosfatase-miméticos

De acordo com o desenvolvimento da química bioinorgânica e dos complexos biomiméticos muitos modelos capazes de promover hidrólise de ésteres de fosfato foram reportados, destacando-se os descritos a seguir. Complexos mononucleares de Cu(II) são conhecidos por interagir com DNA e promover a quebra deste biopolímero. Um importante exemplo do avanço deste tipo de complexo foi a síntese do $\text{Cu}(\text{pr}3[9]\text{aneN}3)^{2+}$ ou $\text{Cu}(\text{tacn}-\text{pr}_3)^{2+}$. Este complexo mononuclear de Cu(II) contendo um derivado triisopropilado do ligante macrociclo 1,4,7-triazaciclononano (tacn) é capaz de promover a hidrólise tanto do modelo de fosfodiéster BNPP quanto do próprio DNA (Figura 7) (Deck, Tseng et al. 2002). Podem ser encontrados complexos mononucleares

de Cu(II) ainda mais eficientes e capazes de promover hidrólise também de proteínas (Oliveira, Mazera et al. 2009).

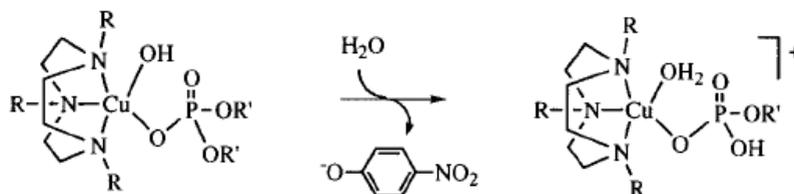


Figura 7 - Representação para reação de hidrólise do BNPP pela espécie $[\text{Cu}(\text{tacn}^i\text{-pr}_3)(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^+$.

Talvez um dos exemplos mais interessantes que podem ser encontrados é a série de complexos binucleares modelos da rkbPAP $[\text{Fe}(\text{III})\text{Zn}(\text{II})(\text{BPBPMP-X})(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (onde $X = \text{H}, \text{CH}_3, \text{Br}$ e NO_2) (Peralta, Bortoluzzi et al. 2010). Nesta publicação foram encontradas diversas correlações entre estrutura e atividade hidrolítica a partir de métodos experimentais e computacionais mostrando a influência do grupamento $\text{Fe}(\text{III})\text{-O}(\text{fenolato})$ com diferentes substituintes nos processos de hidrólise, tal como o exemplo da Figura 8.

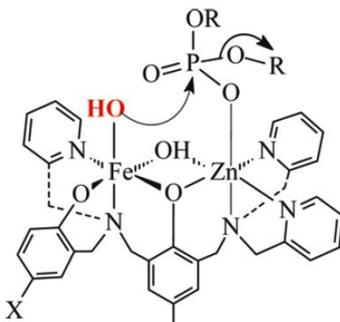


Figura 8 – Intermediário responsável pela hidrólise do 2,4-BDNPP.

Nessa série de complexos observou-se, ainda, atividade de hidrólise do DNA e também citotoxicidade frente a células de leucemia e de câncer de pulmão.

Neste contexto compreende-se que o estudo de complexos biomiméticos ultrapassa a química de metaloenzimas e passa a mostrar relevância biotecnológica, farmacológica e até mesmo em processos de biorremediação (Gahan, Smith et al. 2009).

2.2.2 Modelos SOD e CAT-miméticos

Dentre os modelos biomiméticos parece razoável que os que mimetizam metaloenzimas responsáveis pelo metabolismo antioxidante como SOD e CAT são prováveis candidatos a aplicação farmacológica vista a problemática envolvida na expressão acima e/ou abaixo dos níveis normais deste grupo de enzimas, podendo ocorrer uma fuga da homeostase celular e o aumento do estresse oxidativo

(Warner, Sheng et al. 2004; Batinic'-Haberle, Rebouc et al. 2010). Compostos como $[\text{Fe(III)(HPCINOL)Cl}_2]\text{NO}_3$ (Horn, Parrilha et al. 2010), $[\text{Mn(II)(HPCINOL)(}\eta_1\text{-NO}_3\text{)(}\eta_2\text{-NO}_3\text{)]}$ (Lessa, Horn et al. 2009) e outros complexos binucleares $[\text{Mn(III)}_2(\text{L}^{1,2})(\mu\text{-OAc})(\mu\text{-OMe})]^+$ (Biava, Palopoli et al. 2006) (onde $\text{L}^{1,2}$ são ligantes N_2O_3 doadores, Figura 9) são exemplos de complexos metálicos com atividade de SOD e CAT (Figura 9). O complexo $[\text{Fe(III)(HPCINOL)Cl}_2]\text{NO}_3$ apresenta ambas as atividades miméticas de SOD e CAT tanto *In vitro* como *In vivo* (*S. cerevisiae*). Este é provavelmente o primeiro complexo de Fe(III) capaz de desempenhar este tipo de atividade. Já o complexo $[\text{Mn(II)(HPCINOL)(}\eta_1\text{-NO}_3\text{)(}\eta_2\text{-NO}_3\text{)]}$ apresenta atividade multifuncional catalase-peroxidase e abre oportunidade ainda para a ativação e oxidação de ligações C-H. Os complexos binucleares $[\text{Mn(III)}_2(\text{L}^{1,2})(\mu\text{-OAc})(\mu\text{-OMe})]^+$ são relevantes no que diz respeito ao estudo do desproporcionamento de H_2O_2 por enzimas MnCAT, fenômeno onde ainda não se tem grande clareza mecanística.

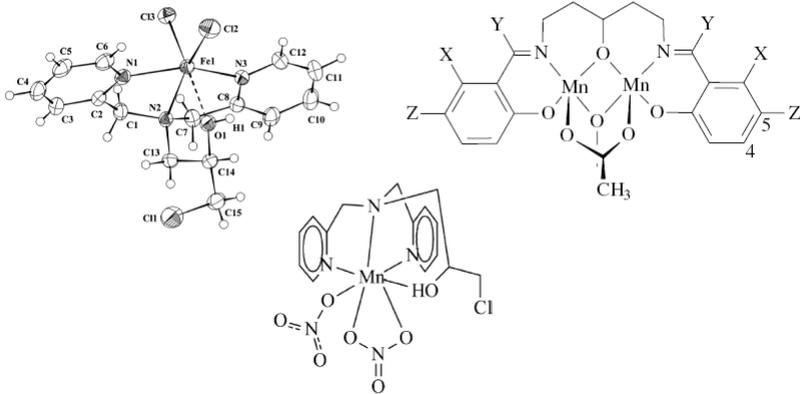


Figura 9 – Complexos de Fe(III) (esquerda) e de Mn(II) (centro) com o ligante HPCINOL e representação genérica dos complexos binucleares de Mn(III) (direita).

2.2.3 Outros Modelos Biomiméticos de Cobre

Diversos metais como Fe e Mn são usados para a síntese de complexos de baixa molar para variados fins, contudo, os complexos de Cu também têm se destacado podendo realizar funções tanto hidrolíticas como de transferência de elétrons e reações redox. Um exemplo recente é o trabalho reportado onde centros $[\text{Cu(II)}(\mu\text{-OAc})(\mu\text{-OMe})\text{Cu(II)}]$ (Osório, Peralta et al. 2012) realizam oxidação de catecol, hidrólise de fosfodiéster modelo 2,4-BDNPP e clivagem mista oxidativa/hidrolítica de DNA plasmidial. Em 2006 foram apresentados centros $[\text{Cu(II)}(\mu\text{-Ofenolato})(\mu\text{-OMe})\text{Cu(II)}]$ (Peralta, Neves et al. 2006)

com atividade de oxidação de catecol e de clivagem mista oxidativa/hidrolítica de DNA.

Particularmente, complexos de Cu(II) têm se mostrado importantes alternativas para o desenvolvimento de compostos bioativos: antitumorais, antibacterianos, antifúngicos e antioxidantes (Ciuffi, Cellai et al. 1998; Fujimori, Yamada et al. 2005; Ivarez, Alzuet et al. 2005; Psomas, Tarushi et al. 2006; Fernandes, Horn Jr et al. 2010; Boulsourani, Geromichalos et al. 2011; Harinath, Reddy et al. 2011).

O intenso estudo acerca deste metal permitiu a descrição de variadas formas de complexação e correlações estruturais, físico-químicas. Muitos trabalhos atentam as propriedades físico-químicas, estruturais e de reatividade da subunidade [Cu(II)(tacn)] e demonstram estabilidade, a característica orientação estrutural piramidal-quadrática e reatividade em diversos processos hidrolíticos e de oxido-redução (Hegg and Burstyn 1995; Tolman 1997; Fry, Moubaraki et al. 2003; Fry, Spiccia et al. 2003). A Figura 10 mostra as representações estruturais de metaloenzima e modelo comparadas em trabalho realizado por Tolman (Tolman 1997).

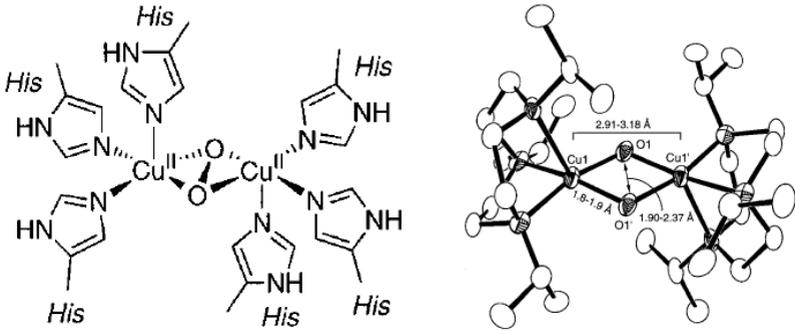


Figura 10 – Representações estruturais da **oxi-hemocianina** e o dímero $[\text{Cu}(\text{II})(\text{tacn-pr}_3)_2\text{O}_2$.

2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Uma maneira interessante de investigar aspectos bioquímicos da atividade de novos compostos tais como os complexos metálicos biomiméticos é o emprego do modelo celular eucariótico *Saccharomyces cerevisiae*.

Embora mais primitivo que uma célula humana, este modelo unicelular pode fornecer importantes informações acerca da citotoxicidade, metabolismo, influências na expressão gênica, danos celulares, viabilidade celular e atividade protetora de novos compostos. Um grande número de proteínas e biomoléculas encontradas em células humanas são encontradas nestas leveduras e propiciam correlações interessantes acerca de estresse oxidativo, desenvolvimento de doenças, como as disfunções neurodegenerativas,

e alternativas para o combate das mesmas, além de diversos outros aspectos de relevância bioquímica e biomédica (Costa and Moradas-Ferreira 2001).

Este modelo apresenta algumas vantagens em comparação aos modelos celulares humanos como maior robustez e resistência a contaminação. É possível também o emprego de diferentes meios de crescimento das células de *S. cerevisiae* tanto em metabolismo fermentativo (2%YPD), podendo ser avaliadas respostas de células em hipóxia onde alguns mecanismos de defesa antioxidante não estão ativados como a catalase citosólica, quanto em metabolismo respiratório (4%YPGly), o qual propicia células adaptadas à difusão de oxigênio e ao estresse oxidativo gerado durante a respiração (Costa and Moradas-Ferreira 2001).

De fato substâncias orgânicas como algumas naftoquinonas (Castro, Mariani et al. 2008) ou complexos metálicos como o [Fe(III)(HPCINOL)NO₃] (Horn, Parrilha et al. 2010) são exemplos da utilização de leveduras *S. cerevisiae* para observação de aspectos biológicos e de resposta celular ao emprego de novas substâncias *In vivo*.

3 OBJETIVOS

Almejando o estudo de novos complexos metálicos com aplicação bioinorgânica os objetivos do trabalho se enquadram na proposta de projeção e síntese de ligantes que mimetizam os resíduos de aminoácidos de sitio ativo de metaloenzimas como por exemplo as Fosfatases Ácidas Púrpuras e CuZn-Superóxido Dismutase. Em sequência se dá a obtenção e caracterização do complexo metálico utilizando o íon Cu(II) e o ligante sintetizado. Por último as propostas de atividade e aplicabilidade do complexo são testadas e os resultados interpretados em termos da estrutura do complexo e do sistema utilizado.

3.1 Metas

- Síntese do ligante tacn-ⁱpr₂mff (L).
- Síntese e caracterização estrutural e físico-química do complexo [Cu₂(L)Cl₃] (**1**).
- Avaliação da atividade catalítica do complexo **1** em processos de hidrólise de fosfodiésteres, modelo e DNA, e na dismutação de radicais superóxido.
- Avaliação da atividade biológica do complexo **1** usando o modelo celular *S. cerevisiae*: citotoxicidade e atividade antioxidante.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais, instrumentação e procedimentos

Todos reagentes de alta pureza foram obtidos de fontes comerciais e usados sem purificação prévia. Na caracterização e estudos cinéticos foram utilizados solventes espectroscópicos. Composição elementar de **1** foi analisada usando o equipamento Carlo-Erba E-1110. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos utilizando o equipamento Bruker-FT400 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) de ^1H e ^{13}C foram registrados em ppm empregando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno em clorofórmio deuterado. O espectro eletrônico de **1** foi registrado em água deionizada em valores de pH selecionados usando o espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda-19. As varreduras espectrais foram realizadas usando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Transições *d-d* e transferências de carga do ligante para o metal (TCLM) foram monitorados com concentrações de **1** de 1,6 e 0,20 mmol.L⁻¹ respectivamente. Medidas espectrais na região do infravermelho foram realizadas usando o espectrofotômetro FT-IR Varian 3100 Excalibur Series para o registro da transmitância (%T) do complexo diluído em pastilha de KBr. O comportamento eletroquímico de **1** foi investigado com o potenciostato BAS-Epsilon EC/2000. Voltamogramas cíclicos foram obtidos a temperatura ambiente em acetonitrila ou água sob atmosfera de argônio. O eletrólito suporte usado foi *n*-Bu₄NPF₆ ou KCl para cada solvente, respectivamente. A cela

eletroquímica empregada foi montada com três eletrodos: carbono vítreo (trabalho), platina (auxiliar) e Ag/Ag⁺ (referência). Os padrões internos ferroceno ($E^0 = 400$ mV vs NHE) e K₃[(Fe(CN)₆] ($E^0 = 358$ mV vs NHE) foram utilizados em acetonitrila e água respectivamente. O espectro de massa de **1** foi registrado usando o espectrômetro 3200 Q-TRAP MS/MS (Applied BioSystems MDS Sciex) no modo positivo ESI(+)-MS sob as seguintes condições: 298 K; voltagem do capilar -4.5 kV; potencial de desagregação 45 V; fluxo de infusão 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e [**1**] (CH₃CN/H₂O pH 6) = 15,0 ppm. Espectros de EPR foram adquiridos usando o equipamento BRUKER ESP 300E com fonte de microondas de 9,332 GHz, potência de 10 mW a 77 K e 2 mW a temperatura ambiente. A faixa de campo magnético medida foi de 1,2 a 501,2 mT a 77 K e de 283,7 a 353,7 mT a temperatura ambiente. Alíquotas de 1 mL de solução de **1** (1,0 mmolL⁻¹) em pHs selecionados (4, 6, 8,2 e 10,4) foram utilizadas para medidas em ambas as temperaturas, 77 K e ambiente (25 °C). Plasmídeo pBSK II (2961 bp, Stratagene) foi utilizado como substrato para os ensaios de clivagem de DNA. O plasmídeo foi transformado em células competentes DH5 α *E. coli*, amplificado tal como descrito (Ausubel, Brent et al. 1999) e então purificado de células *E. coli* de acordo com as orientações do protocolo Qiagen Plasmid Maxi Kit. Superóxido Dismutase (SOD) de eritrócito bovino foi adquirida a partir de Sigma (MO, USA).

4.1.1 Titulação Potenciométrica

As constantes de protonação de **1** foram investigadas usando o titulador automático Methron 848 Titrino Plus com eletrodo combinado de vidro (Ag/AgCl) calibrado para medir $-\log[\text{H}^+]$ diretamente, designado pH. A temperatura do experimento foi estabilizada a 25 °C e as soluções foram preparadas com água livre de gases e duplamente destilada em presença de KMnO_4 . O eletrodo foi calibrado com dados obtidos da titulação de um volume conhecido de padrão de HCl $0,0100 \text{ molL}^{-1}$ com padrão KOH $0,100 \text{ molL}^{-1}$. A força iônica foi mantida constante a $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pela adição de KCl e as soluções contendo $0,025 \text{ mmol}$ do complexo **1** foram tituladas com KOH $0,100 \text{ molL}^{-1}$ livre de CO_2 de pH 2,6 a 12 pela adição de alíquotas de $0,03 \text{ mL}$. Os experimentos foram analisados com o programa BEST7. O diagrama de espécies foi obtido utilizando os programas SPE e SPELOT (Motekaitis and Martell 1982; Martell and Motekaitis 1992).

4.1.2 Medidas Cinéticas: hidrólise do 2,4-BDNPP

A atividade mimética de hidrolase de **1** frente o fosfodiéster ativado 2,4-BDNPP (Bunton and Farber 1969) foi avaliada espectrofotometricamente utilizando o espectrofotômetro Varian Cary50 Bio, pelo aumento da absorvância em 400 nm respectiva a geração do íon 2,4-dinitrofenolato (2,4-DNP) a 25 °C (Peralta, Bortoluzzi et al. 2010). O efeito do pH sobre as velocidades iniciais (V_0) foi

monitorado usando solução CH₃CN/H₂O (50% v/v) sob as seguintes condições: [1] = 37 μmol.L⁻¹; [2,4-BDNPP] = 440 μmol.L⁻¹; [Tampão] = 50 mmol.L⁻¹ MES (pH 4 a 7), HEPES (pH 7,5 a 8,0) TRIS (8.5) e CHES (pH 9,0 a 10) com força iônica controlada com LiClO₄ 0,10 mol.L⁻¹ em cubeta contendo um volume final de 3 mL e caminho óptico de 1 cm. Os experimentos sob condições de excesso de substrato foram realizados nas seguintes condições: CH₃CN/H₂O (50% v/v), [1]=9,2 μmol.L⁻¹, [Tampão]_{final} = 50 mmol.L⁻¹ MES (pH 6.0). As reações são iniciadas com a adição de volumes fixos de substrato ([2,4-BDNPP]_{final} = 0,93 a 9,3 mmol.L⁻¹). O efeito isotópico de deutério ²D sobre o processo de hidrólise foi realizado em condições idênticas usando tampão previamente preparado MES em pH 6,0 ou pD 6,5, de acordo com diferença de acidez em meios de H₂O e D₂O descrito na literatura (Glasoe and Long 1960), e excesso de substrato de 475 vezes em comparação ao complexo 1 ([1] = 9,5 μmol.L⁻¹; [2,4-BDNPP] = 4,5 mmol.L⁻¹). A correção para hidrólise espontânea do substrato (Bunton and Farber 1969) foi monitorada pela diferença direta usando uma cela de referência sob condições idênticas privando a adição de complexo. As velocidades iniciais foram obtidas a partir do coeficiente angular da absorvância vs tempo durante a faixa retilínea de reação sobre os primeiros 10 minutos. A conversão das velocidades de reação foi calculada usando os valores específicos de ε do produto 2,4-DNP (pH {ε / L mol⁻¹ cm⁻¹): 4,0 {3410}; 4,5 {7180}; 5,0 {10080}; 5,5 {11400}; 6 {12000}; 6,5-10 {12100}(Peralta, Bortoluzzi et al. 2010). Para o

tratamento cinético aplicou-se a equação da aproximação de Michaelis-Menten de cinética enzimática.

4.1.3 Clivagem de DNA

A capacidade de **1** em promover a clivagem do DNA foi avaliada no Centro de Biologia Molecular e Estrutural pelo doutorando Tiago Bortolotto, analisando a conversão de DNA forma pBSK II superenovelado (F I) em forma circular aberta (F II) e forma linear (F III), as quais representam formas contendo uma ou duas clivagens respectivamente. (Neves, Terenzi et al. 2001; Scarpellini, Neves et al. 2003) As reações foram conduzidas usando 400 ng de DNA pBSK II (~30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em bp) em 10 mmol.L^{-1} de tampão (MES, HEPES ou CHES apropriadamente) com 10 mmol.L^{-1} de NaCl. A reação foi iniciada com a adição de **1** (em diferentes concentrações dependendo do ensaio) durante 16 h a 37 °C. Cada reação foi paralisada com adição de 5 μL de uma solução tampão Tris-HCl 50 mmol.L^{-1} pH 7,5 contendo azul de bromofenol 0,01%, glicerol 50% e EDTA 250 mmol.L^{-1} sendo subsequentemente submetida à eletroforese em gel de agarose 1,0 % contendo brometo de etídio 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 0,5 x de tampão TBE (Tris 44,5 mmol.L^{-1} , ácido bórico 44,5 mmol.L^{-1} e 1 mmol.L^{-1} de EDTA a pH 8,0) a 90 V por 90 minutos. Os géis resultantes foram visualizados e digitalizados usando sistema de documentação DigiDoc-It (UVP, USA). A proporção de DNA plasmidial em cada banda foi quantificada usando o programa Molecular Imaging Software 5.0 (Carestream Health, USA). A

52

quantificação de DNA superenovelado (F I) foi corrigida pelo fator de 1,47, desde que a capacidade de intercalação do brometo de etídio nesta forma topoisomérica do DNA é menor em relação às formas de DNA circular aberta (F II) e linear (F III)(Bernadou, Pratviel et al. 1989).

A fim de determinar o mecanismo pelo qual **1** cliva o DNA alguns agentes externos foram adicionados ao DNA antes do complexo e os procedimentos prosseguidos. Dentre os agentes estão incluídos: cloreto de sódio (variação de força iônica no meio), sequestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ligantes de sulcos do DNA. A quantidade de cada agente e/ou modificações procedimentais serão detalhados na seção de resultados e discussão.

4.1.4 Atividade SOD-mimética *In vitro*

A determinação da atividade de Sod de **1** *In vitro* foi realizada usando o sistema enzimático gerador de $O_2^{\bullet-}$ Xantina/Xantina Oxidase (Horn, Parrilha et al. 2010) responsável pela redução do NBT (azul de nitro-tetrazólio) e geração do cromóforo formazan (560 nm). Em t_0 , o sistema contendo Xantina $0,15 \text{ mmol}^{-1}$, NBT $56 \text{ } \mu\text{mol}^{-1}$ e tampão (K_2HPO_4/KH_2HPO_4) 50 mmol^{-1} , na ausência e na presença de complexo **1** ($1,3 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$), é iniciado com a adição da enzima Xantina Oxidase (0,2 U) e a absorvância monitorada durante 5,5 minutos.

4.1.5 Citotoxicidade

A citotoxicidade de **1** foi avaliada usando células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Castro, Mariani et al. 2008; Horn, Parrilha et al. 2010) das linhagens selvagem (wt) BY4741 (*MATa; his3Δ1; leu2 Δ0; met15 Δ0; ura3 Δ0*). Leveduras na metade da primeira fase exponencial de crescimento (1,0 mg peso seco/mL) foram tratadas com **1** (0 - 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) durante 1 hora e, após diluição apropriada, plaqueadas em 2%YPD sólido. As placas foram incubadas a 28 °C durante 48 horas e as colônias contadas. A viabilidade celular foi determinada em escala percentual entre células tratadas e não tratadas com o complexo.

4.1.6 Atividade SOD e CAT-mimética *In vivo*

A atividade mimética de superóxido dismutase e catalase de **1** foi avaliada em células de *S. cerevisiae*, BY4741 e suas mutantes isogênicas *sod1Δ* e *ctt1Δ*, expostas a estresse oxidativo gerado por H_2O_2 (2 mmol.L^{-1}) ou menadiona (10 mmol.L^{-1}) por 1 hora. Células em crescimento exponencial em glucose (2%YPD) ou glicerol (4%YPGly) submetidas ou não ao complexo **1** (25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) durante 1 hora foram expostas ao estresse oxidativo direto. A sobrevivência sob condições de

estresse foi analisada por plaqueamento das células em 2%YPD sólido após diluição apropriada. As placas foram incubadas a 28 °C por 72 horas e as colônias contadas e a viabilidade celular expressa como porcentagem.

4.1.7 Oxidação Intracelular

Níveis de oxidação intracelular foram medidos usando a sonda fluorescente 2',7'-Diclorofluoresceína (DCFH)(Pereira, Eleutherio et al. 2001). Células BY4741 (wt) em meia fase de crescimento exponencial foram tratadas com DCFH ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) durante 15 minutos a 28 °C e 160 rpm. Após incorporação da DCFH as células, tratadas ou não com **1** ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) por 1 hora, foram expostas a estresse oxidativo com menadiona (20mmol.L^{-1}) por 1 hora. Para medição da fluorescência 50 mg de células foram resfriadas em gelo, coletadas por centrifugação e lavadas duas vezes com água destilada. As células foram ressuspensas em 500 μL de água destilada com 1,5 g de pérolas de vidro. As células foram lisadas em 3 ciclos de agitação em vortex e banho de gelo durante um minuto cada. A fluorescência do sobrenadante, obtido por centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos e diluídos 6 vezes com água, foi medida usando o espectrofluorímetro Cary Eclipse Varian (ex. 504 nm; em. 524 nm). Os resultados foram expressos como a relação entre a fluorescência de células diretamente estressadas ou estressadas após pré-tratamento com **1** e células controle tratadas apenas com DCFH.

4.1.8 Síntese do ligante $\text{tacn}^i\text{-pr}_2\text{mff}$

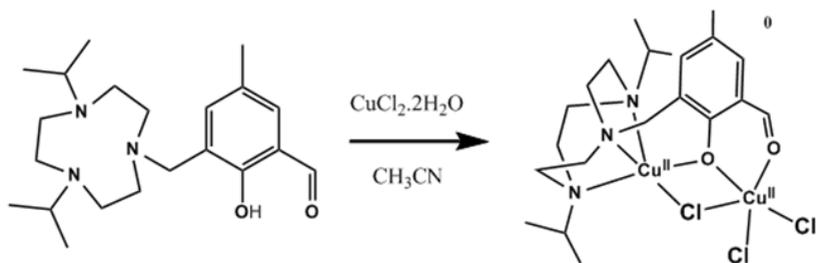
A rota sintética para obtenção dos pró-ligantes tacn^ipr_2 e cmff está apresentada no Anexo A e descrita anteriormente (Almeida 2009).

Foram adicionados em um balão de 125 mL 2,95 g (16,0 mmol; $184,62 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) de 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol (cmff) dissolvidos em 40 mL de diclorometano. A esta solução, adicionou-se lentamente e sob agitação, uma solução contendo 3,41 g de 1,4-diisopropil-1,4,7-triazaciclononano ($\text{tacn}^i\text{-pr}_2$) (16,0 mmol; $213,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e 4,50 mL de trietilamina (3,24 g, 32,0 mmol; $101,19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $0,72 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) dissolvidos em 30 mL de diclorometano, com auxílio de um funil de adição. A mistura foi refluxada por 24 h e a solução resultante foi transferida para um funil de separação onde foi lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (5 porções de 40 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada, e o solvente evaporado a pressão reduzida. O óleo amarelo resultante foi dissolvido em 30 mL de acetonitrila aquecida, transferido para um béquer e levado ao freezer para precipitação. Após algumas horas o produto sólido cristalino amarelo foi filtrado, lavado com acetonitrila gelada e acondicionado em dessecador com sílica. Obtiveram-se 2,57 g (7,10 mmol; $361,53 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) do 2-[(4,7-diisopropil-1,4,7-triazaciclononan-1-il)metil]-6-(formil)-4-metilfenol ($\text{tacn}^i\text{-pr}_2\text{mff}$) com rendimento de 45 %. P.F.: 85 °C. IV (KBr, cm^{-1}): ν (O-H) 3428; ν (C-H_{arom}) 3054; ν (C-H_{alif}) 2958-2814; ν (C-H_{ald}) 2736; ν (C=O) 1671; ν_s (C=C) 1595; δ_s (C-H_{alif}) 1464; δ_{ass} (C-H_{alif}) 1379; δ (O-H) 1356; ν (C-O_{phen}) 1270; ν_s (C-N) 1087; δ (C-H_{ar}) 56

716. RMN-¹H - δ_{H} (400 MHz, CDCl₃), in ppm: 0,97 (d, 12H, CH₃); 2,23 (s, 3H, CH₃); 2,47 (s, 4H, CH₂); 2,71 (m, 4H, CH₂); 2,89 (h, 2H, CH_{iPr}); 2,99 (s, 4H, CH₂); 3,81 (s, 2H, CH₂); 7,00 (s, 1H, CH_{ar}); 7,45 (s, 1H, CH_{ar}); 8,60 (s, 1H, OH); 10,47 (s, 1H, CH_{ald}). RMN-¹³C - δ_{C} (100,60 MHz, CDCl₃) in ppm: 18,53 (CH₃, ⁱpr); 20,48 (CH₃, metil); 52,89 (CH, ⁱpr); 53,47, 53,75, 55,04 (CH₂, tacn); 60,18 (CH₂, metileno); 123,26, 124,69, 126,90, 127,34, 135,96, 161,53 (C, anel aromático); 191,36 (CH, aldeído).

4.1.9 Síntese do complexo [Cu₂(tacn-ⁱpr₂mff)Cl₃] – (1)

Num béquer contendo 20 mL de uma solução de acetonitrila com 0,180 g do ligante tacn-ⁱpr₂mff (0,5 mmol; 361,53 g.mol⁻¹) foi adicionado 0,170 g de Cu.Cl₂.2H₂O (0,5 mmol; 170,48 g mol⁻¹) dissolvidos em 10 mL do mesmo solvente. A mistura foi mantida sob agitação durante 15 minutos, filtrada por gravidade e a solução resultante deixada em repouso. Após 24 horas, foi detectada a presença de monocristais castanho-escuros adequados à resolução estrutural via difratometria de raios X (Esquema 1). IV (KBr, cm⁻¹): ν (C-H_{arom}) 2997; ν (C-H) 2956-2863; ν (C=O) 1620; ν_s (C=C) 1567; δ_s (CH₂) 1465; ν_s (C-N) 1089. Cálculo da Análise Elementar para C₂₁H₃₄Cl₃Cu₂N₃O₂: C 42,46 %, H 5,69 %, N 7,07 %. Experimental C 41,94 %; H 7,02 %; N 6,94 %.



Esquema 2 – Síntese de **1**.

4.1.10 Cristalografia

Para o complexo **1** os dados de intensidade foram coletados com o difratômetro Enraf-Nonius CAD4 com radiação $K\alpha$ de Mo e monocromador de grafite a temperatura ambiente. Os parâmetros de cela foram determinados a partir de 25 reflexões cuidadosamente centradas usando o procedimento padrão já descrito (CAD4 EXPRESS version. 5.1/1.2 1994). As intensidades foram coletadas utilizando a técnica de escaneamento ω - 2θ . Todos os dados foram tratados via correções por efeitos de Lorentz e polarização (Spek 1996). Uma correção semi-empírica por absorção baseada no escaneamento azimutal de sete reflexões apropriadas também foi aplicada às intensidades coletadas usando o programa PLATON (Spek 2003). A estrutura do complexo **1** foi resolvida por métodos diretos e refinada pelo método de mínimos-quadrados usando os programas SIR97

(Altomare, Burla et al. 1999) e SHELXL97 (Sheldrick 2008) respectivamente. Átomos de hidrogênio do ligante foram incluídos na lista de átomos usando critérios geométricos padronizados. Outros átomos foram refinados anisotropicamente. Outros parâmetros cristalográficos estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados cristalográficos e do refinamento da estrutura de 1.

Formula empírica	$C_{21} H_{34} Cl_3 Cu_2 N_3 O_2$
Massa molar	593,94
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	C c
Dimensões da cela unitária	$a = 13,1157(8) \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ$. $b = 16,0029(10) \text{ \AA}$ $\beta = 94,323(12)^\circ$. $c = 12,0041(19) \text{ \AA}$ $\gamma = 90^\circ$.
Volume	$2512.4(5) \text{ \AA}^3$
Z	4
Densidade	$1,570 \text{ Mg/m}^3$
Dimensões do cristal	$0,50 \times 0,43 \times 0,40 \text{ mm}^3$
Reflexões coletadas	4274
Reflexões únicas	3406
Goodness-of-fit on F^2	1,103
Índices finais [$ I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0299$, $wR_2 = 0,0751$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estrutura Cristalográfica de $\text{Cu}_2(\text{tacn-}^i\text{pr}_2\text{mff})\text{Cl}_3$ (**1**)

O arranjo molecular do complexo **1** (Figura 11) foi obtida através da análise por difração de raios-X de monocristal castanho-escuro adequado à técnica. O sistema monoclinico mostra a unidade assimétrica neutra onde dois centros cúpricos estão coordenados pelo ligante dinucleante e duplamente ponteados por μ -fenoxo e μ -cloro. Dados cristalográficos e do refinamento apresentam-se na Tabela 1. A representação ORTEP e os parâmetros métricos de distancia e ângulos de ligação estão apresentados na Figura 11 e na Tabela 2, respectivamente.

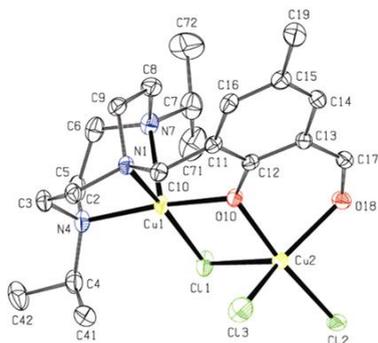


Figura 11 – Representação ORTEP do complexo $[\text{Cu}_2(\text{tacn-}^i\text{pr}_2\text{mff})\text{Cl}_3]$ (**1**) mostrando elipsóides com 40 % de probabilidade de densidade eletrônica. Átomos de Hidrogênio foram omitidos.

O complexo **1** apresenta uma estrutura binuclear onde o centro Cu1 é coordenado facialmente pelo macrociclo tacn (N1, N4 e N7) e pelo oxigênio fenólico (O10) enquanto o centro Cu2 é ligado pelos átomos O10 e O18 do aldeído do ligante. Os dois centros são ponteados pela ponte μ -fenoxo com um ângulo de ligação Cu1-O10-Cu2 de $111,52(14)^\circ$ e pela ponte μ -cloro com um ângulo de ligação Cu1-Cl1-Cu2 de $83,00(4)^\circ$. Dois ligante cloro (Cl2 e Cl3) a distâncias de 2,2071(12) e 2,2468(13)Å, respectivamente, completam a esfera de coordenação do centro Cu2. As distâncias médias de ligação para os centros Cu1 e Cu2 bem como a distância intermetálica são de 2,134, 2,225 e 3,241 Å, respectivamente. As distâncias Cu1-O10 (1,978(3) Å) e Cu2-O10 (1,943(3) Å) são comparáveis com outros complexos μ -fenoxo-Cu(II) já descritos na literatura (Peralta, Neves et al. 2006; Rey, Neves et al. 2007). Enquanto a geometria em torno de Cu1 é de pirâmide-quadrada pouco distorcida ($\tau = 0,054$), a geometria em torno de Cu2 apresenta-se bastante distorcida, entre bipiramidal trigonal e piramidal quadrática ($\tau = 0,452$) (Addison, Rao et al. 1984). Ambos os centros apresentam distorção Jahn-Teller com alongamento apical (Cu1-N7 = 2,300(4) Å e Cu2-Cl1 = 2,5945(14) Å) e também com encurtamento de ligações equatoriais. Por último, o caráter fortemente doador do ligante através do macrociclo tacn- l pr₂ que coordena Cu1, as curtas ligações Cu2-O10 (1,943 Å) e Cu2-O18 (2,133 Å) e a formação do anel de seis membros -O10-C12-C13-C17-C18-Cu2- contendo a porção 2-hidroxi-5-metilbenzaldeído em volta de Cu2 fornecem ambos,

Referências

densidade eletrônica e geometria, adequadas para estabilizar o complexo binuclear **1**.

Tabela 2 – Distancias (Å) e ângulos (°) da esfera de coordenação dos centros de Cu(II) em **1**.

Cu1-O10	1,978(3)	Cu2-O10	1,943(3)
Cu1-N1	2,035(4)	Cu2-O18	2,133(3)
Cu1-N4	2,071(4)	Cu2-Cl2	2,2071(12)
Cu1-Cl1	2,2844(12)	Cu2-Cl3	2,2468(13)
Cu1-N7	2,300(4)	Cu2-Cl1	2,5945(14)
O10-Cu1-N1	91,56(13)	O10-Cu2-Cl2	168,10(10)
O10-Cu1-N4	170,80(15)	O18-Cu2-Cl2	88,61(9)
N1-Cu1-N4	85,51(15)	O10-Cu2-Cl3	91,27(10)
O10-Cu1-Cl1	83,37(9)	O18-Cu2-Cl3	140,98(11)
N1-Cu1-Cl1	167,52(11)	Cl2-Cu2-Cl3	100,46(6)
N4-Cu1-Cl1	97,72(11)	O10-Cu2-Cl1	76,13(9)
O10-Cu1-N7	103,89(14)	O18-Cu2-Cl1	114,68(10)
N1-Cu1-N7	85,12(14)	Cl2-Cu2-Cl1	99,36(5)
N4-Cu1-N7	84,57(16)	Cl3-Cu2-Cl1	101,28(6)
Cl1-Cu1-N7	107,14(11)	Cu1-Cl1-Cu2	83,00(4)
O10-Cu2-O18	83,46(12)	Cu2-O10-Cu1	111,52(14)

5.2 Espectroscopias eletrônica e vibracional

O espectro eletrônico de **1** registrado em estado sólido (Figura 12) apresenta absorção como uma banda bastante alargada na região

de 500-650 nm atribuída a transições *d-d* de íons Cu(II) com ambientes de coordenação distintos tal como observado nos dados cristalográficos. Um aumento na absorvância abaixo de 500 nm sugere a presença de uma transferência de carga do tipo ligante para o metal (TCLM: Cu(II) ← μ -fenoxo) (Koval, Huisman et al. 2004) porém, a TCLM não pode ser observada de forma completa devido a problemas com a medida de reflectância abaixo de 400 nm.

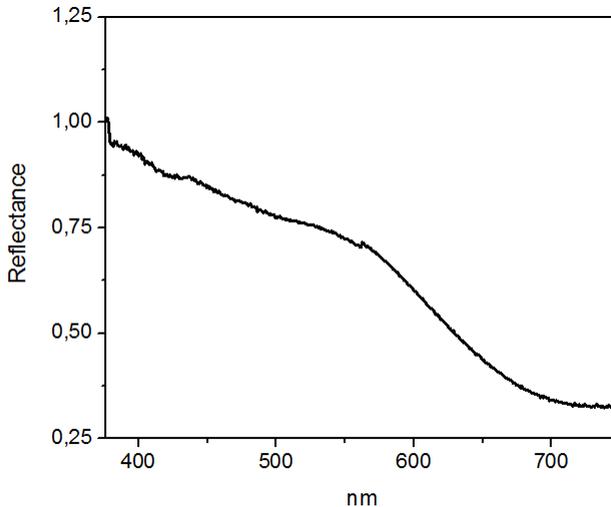


Figura 12 - Espectro de reflectância difusa de **1** diluído em pastilhas de KBr.

Em água o espectro eletrônico (Figura 3 Anexo C) é definido por uma TCLM em 375 nm ($\epsilon = 6609 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$; pH $\sim 4,5$), uma banda alargada composta por transições *d-d* com máximo em 702 nm ($\epsilon = 168 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pH $\sim 3,5$) e um ombro em 477 nm ($\epsilon = 704 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pH \sim

4,0) possivelmente devido a transições *d-d* adicionais de alta energia e absorvidade em geometria piramidal quadrática. Monitorando o espectro eletrônico em função do pH em solução aquosa (Figura 13) pode-se observar um interessante perfil o qual deve envolver espécies derivadas de **1**. Em pH 3 (Figura 13) a TCLM pode ser observada em 375 nm indicando que o fenolato ponte está desprotonado até mesmo em condições ácidas estabilizando a espécie binuclear **1a** (Seção 5.3). Quando o pH da solução é aumentado para 6,0 (Figura 13) a intensidade da TCLM diminui juntamente com um deslocamento hipsocrômico da banda de transições *d-d* de 704 nm para 658 nm aproximadamente, provavelmente devido à formação da espécie duplamente ponteadada $\{\text{Cu}(\mu\text{-fenoxo})(\mu\text{-OH})\text{Cu}\}$ **1b**, interferindo no processo de transferência de carga e aumentando a densidade eletrônica sobre os íons Cu(II). O espectro registrado em pH 8,8 apresenta deslocamento batocrômico das transições *d-d* para 675 e 470 nm, onde os valores de ϵ aumentam cerca de 3 vezes sugerindo uma mudança na esfera de coordenação dos centros metálicos assim como proposto para estrutura da espécie $\{\text{Cu}(\mu\text{-fenoxo})(\mu\text{-OH})\text{Cu}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})\}$ **1c** onde o centro Cu₂ está coordenado por ligantes terminais hidroxó e aquo, podendo adotar uma geometria mais próxima a piramidal quadrática. Finalmente, quando o pH é aumentado para 10,4 observa-se um deslocamento hipsocrômico na banda *d-d* para 640 nm e um aumento do valor de ϵ da TCLM com valor de λ_{max} de 385 nm. A partir daí propõe-se que uma segunda molécula de água coordenada ao centro Cu₂ é desprotonada para geração da espécie

{Cu(μ -fenoxo)(μ -OH)Cu(OH)₂} **1d**. Comparando λ_{max} das transições *d-d* das espécies aquosas de **1** com outros complexos contendo porções (Cu(II)tacn) notamos transições menos energéticas para **1** e outro complexo piramidal-quadrático distorcido (689 nm) (Fry, Moubaraki et al. 2003) e transições *d-d* mais energéticas para complexos contendo um grupo tacn em cada íon Cu(II) com pequenas distorções da geometria piramidal-quadrática (690 – 595 nm) (Brudenell, Spiccia et al. 1998).

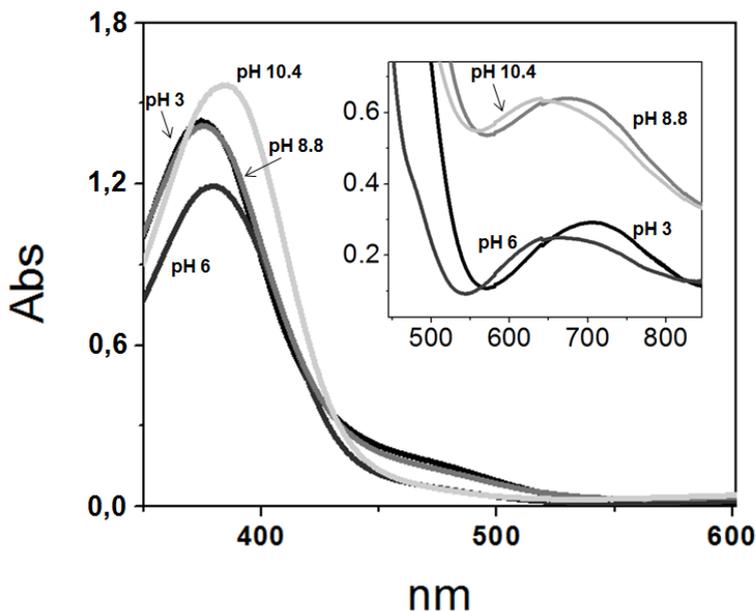


Figura 13 – Espectro eletrônico de **1** em solução aquosa em diversos valores de pH. Gráfico mostrando TCLM ($[1] = 0,20 \text{ mmol.L}^{-1}$). Transições *d-d* no gráfico inserido ($[1] = 1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$): pH 3,0 (preto), 6,0 (cinza escuro), 8,8 (cinza) e 10,4 (cinza claro). $I = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ KCl.

O espectro vibracional na região do infravermelho registrado em pastilhas de KBr contendo os cristais de **1** (Figura 14) apresentam as mesmas bandas observadas para o ligante livre com alguns deslocamentos principalmente: estiramentos C-H em 2997 cm^{-1} e C=O bandas em 1620 cm^{-1} ambas menos energéticas que para o ligante livre. Este resultado corrobora com a estrutura binuclear não simétrica encontrada no estudo cristalográfico onde o ligante coordena dois centros metálicos Cu(II) e torna-se parte de uma estrutura mais rígida, principalmente no macrocíclico tacn^1pr_2 , no carbono metilênico e na função aldeído. A densidade eletrônica disponível para os centros metálicos através do sistema conjugado formil-fenolato diminui a força da ligação C=O causando o deslocamento batocrômico da respectiva banda para 1620 cm^{-1} .

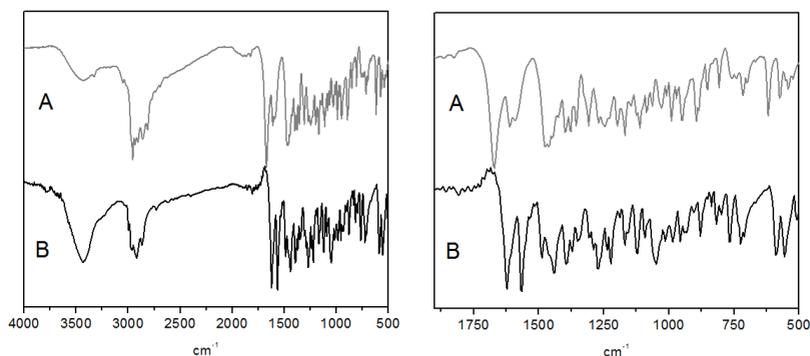


Figura 14 – Espectro na região do infravermelho (esquerda) do ligante livre $\text{tacn}^1\text{pr}_2\text{mff}$ (A) e complexo **1** (B) em pastilhas de KBr. À direita expansão da região de menores frequências ($1900\text{ a }500\text{ cm}^{-1}$)

5.3 Titulação potenciométrica

A titulação potenciométrica de **1** foi realizada em solução aquosa ($I = 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ KCl}$) e apresenta a neutralização de 3 mols de KOH por mol de complexo na faixa de pH de 2 a 12 (Figura 15). A partir da curva e utilizando o programa BEST7 (Motekaitis and Martell 1982; Martell and Motekaitis 1992) foram calculados os valores de pK_a . Os equilíbrios de protonação/desprotonação e a correspondente distribuição de espécies estão propostas no Esquema 3 e na Figura 16, respectivamente.

Para o complexo **1** em água o equilíbrio de protonação podem ser interpretados em termos da dissociação dos três grupos cloro, terminais e ponte. Uma vez em solução a $\text{pH} \sim 2$ o complexo é imediatamente hidrolisado formando a espécie $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{H}_2\text{O})_4]^{3+}$ (**1a**) que apresenta o centro Cu1 coordenado pelo macrociclo tacn, pela ponte μ -fenoxo e por uma molécula de água provavelmente adotando um geometria próxima a piramidal-quadrática enquanto o centro Cu2 é também coordenado por μ -fenoxo, pelo aldeído e provavelmente mais três moléculas de água, de acordo com técnicas de EPR e espectroscopia eletrônica para soluções em $\text{pH} \sim 4$. Após a desprotonação de uma molécula de água coordenada ao centro Cu2 na espécie

1a

atribuída ao pK_{a1} (4,60), forma-se um ligante hidroxio gerando a espécie duplamente ponteada $[\text{Cu}_2\text{L}(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (**1b**). A segunda constante pK_{a2} (7,16) pode ser atribuída à formação de um ligante hidroxio

terminal sobre Cu₂ provavelmente em um posição similar a Cl₂ encontrada na estrutura cristalina de **1**. Esta desprotonação leva a formação do complexo monocatiônico [Cu₂L(μ-OH)(OH)(H₂O)]⁺ (**1c**). Por ultimo, a constante pK_{a3} (9,91) foi atribuída à desprotonação de uma segunda molécula de água terminal coordenada ao centro Cu₂ formando a espécie neutra [Cu₂L(μ-OH)(OH)₂]⁰ (**1d**) assim como mostrado no Esquema 3.

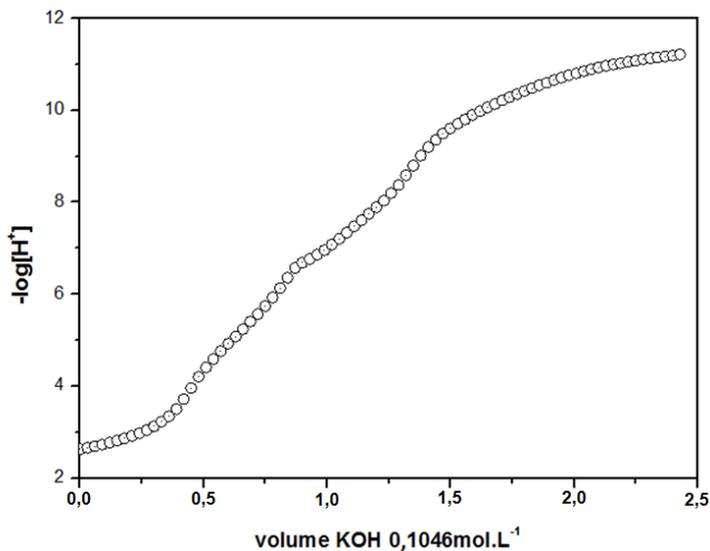
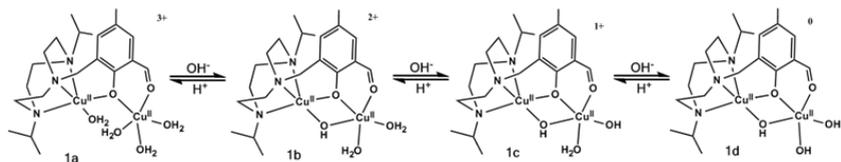


Figura 15 – Curva de titulação do complexo **1** (51 μmol.L⁻¹) em água (20 mL). *I* = 0,1 mol.L⁻¹ KCl.



Esquema 3 – Representação estrutural do equilíbrio pH-dependente de **1** em água.

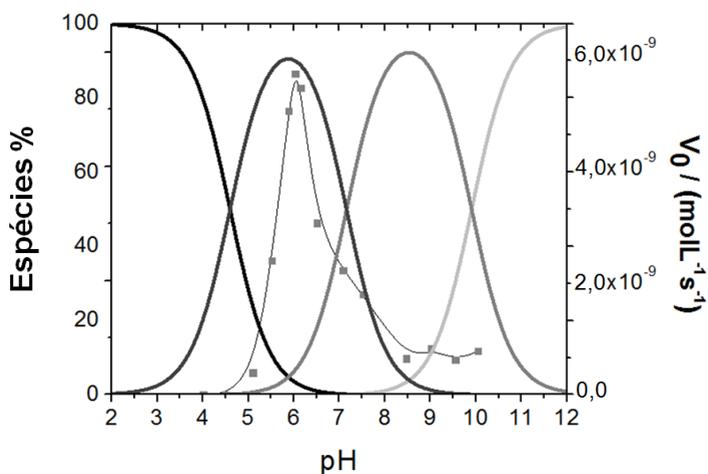


Figura 16 – Distribuição de espécies vs pH (linhas) e V_0 (hidrólise do 2,4-BDNPP) vs pH (*) (seção 5.7).

5.4 Espectro de Massa

A fim de se obter o espectro de massa de espécies aquosas do complexo **1** utilizou-se o mesmo dissolvido em água pH 6, diluído em acetonitrila. Na faixa entre 400 e 550 Daltons podem ser observados

picos referentes a íons de relação massa/carga menor que as espécies propostas na seção anterior 5.3 como, por exemplo, a espécie monocatiônica **1c** $[\text{Cu}_2(\text{L})(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^+$ de massa molar de $538,1 \text{ g.mol}^{-1}$. Provavelmente espécies mononucleares são geradas e detectadas no experimento, tal como o pico em 439,2 Daltons e o pico mais intenso por volta de 423 Daltons cujas estruturas não são conhecidas em detalhes. Porém, foi encontrado um interessante pico em 521,1 Daltons atribuído a espécie semi reduzida $[\text{Cu}(\text{II})\text{Cu}(\text{I})(\text{L}^1)(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})]^+$ denominada **1e**. Os perfis de distribuição isotópica dos espectros experimental e calculado para o íon **1e** em 521,1 são similares confirmando a existência de um complexo binuclear em solução. Durante o experimento a espécie **1b** pode ser reduzida no interior do capilar pela alta voltagem utilizada resultando num espectro que contém uma importante informação acerca do comportamento redox do complexo binuclear. Coordenado pelo ligante desprotonado, por uma molécula de água e um ligante hidroxilo, a espécie detectada **1e** deve apresentar valência mista onde Cu^{2+} apresenta uma geometria provavelmente tetraédrica, esperada para íons $\text{Cu}(\text{I})$. A Figura 17 mostra o espectro experimental de 400 a 550 Daltons, o pico ampliado em 521,1 Daltons, a distribuição isotópica calculada e a estrutura mais provável para o íon **1e**.

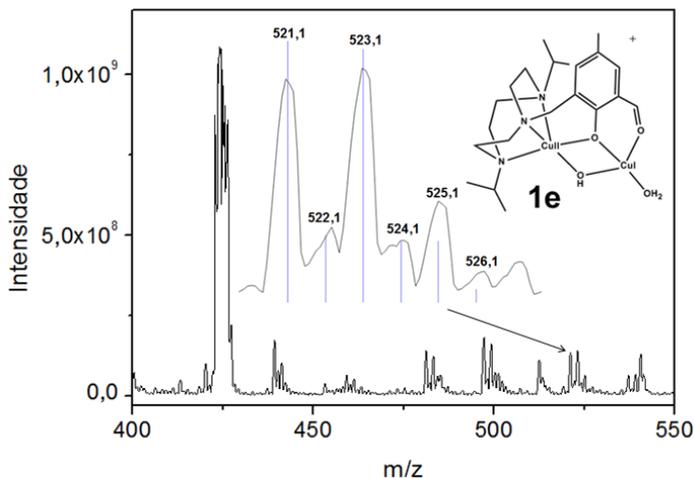


Figura 17 – Espectro de massa experimental de 400 a 550 Daltons de solução de **1** aquoso em pH 6 diluído em CH₃CN (MS) até 5 ppm (m/v). No gráfico inserido apresentam-se o pico ampliado em 521,1 Daltons, a distribuição isotópica e a representação estrutural proposta para o íon **1e**.

O íon **1e** apresenta uma estrutura que pode ser obtida pela redução monoelétrica da espécie **1b** assim como mostrado na seção eletroquímica. Apresentando um campo de coordenação relativamente fraco, o centro Cu²⁺ é susceptível a redução durante a medida espectrométrica sendo a espécie **1e** considerada um possível produto intermediário da interação do complexo com radical superóxido (O₂^{•-}) em experimentos *In vitro* e *In vivo*, os quais serão discutidos adiante nas seções 5.8 e 5.9.

5.5 Ressonância paramagnética eletrônica - EPR

O espectro de EPR do complexo **1** foi registrado em água em diferentes valores de pH em temperaturas ambiente (t.a. = 25 °C) e de 77 K (Figura 18 e Tabela 3). Em pH 4,0 t.a. a espécie **1a** pode ser observada no espectro como uma soma de dois sinais: axial com desdobramento hiperfino e isotrópico, atribuídas a Cu1 e Cu2 respectivamente, com valores característicos de g e A . No mesmo pH a 77 K o tensor g de Cu2 desdobra-se em um sinal rômbo com componentes g_x , g_y e g_z e ainda pode-se detectar transições proibidas ($\Delta M_s = \pm 2$; $g = 4,3$) com acoplamento dipolar ($D = 0,093 \text{ cm}^{-1}$) na região de meio-campo do espectro, tal como esperado para dímeros em coordenação específica (hemocianina forma **dimérica**)(Solomon 1983) com não mais do que 1 ligante ponte, no caso de **1a** μ -fenoxo (O10).

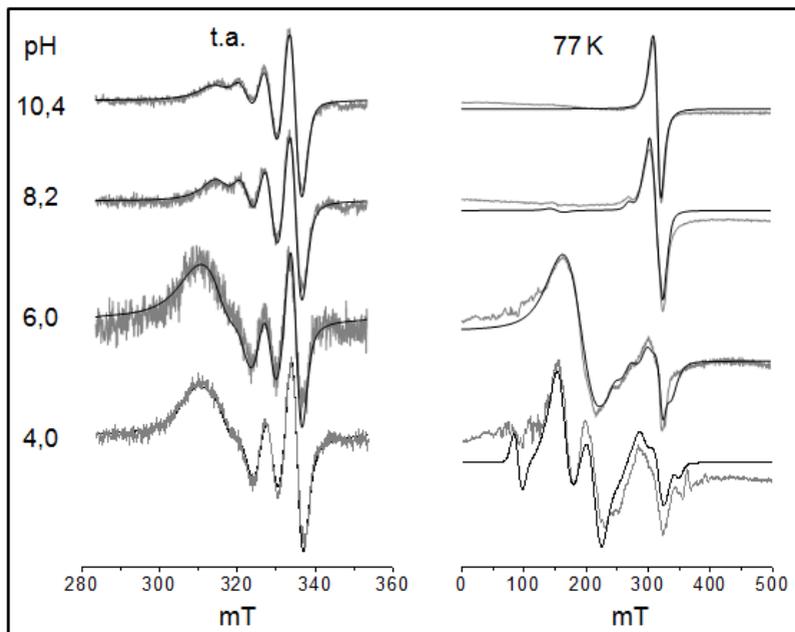


Figura 18 - Espectros de EPR: experimental (cinza) e simulados (preto); solução aquosa pH 4,0 a 10,4 (topo: esquerda = 77 K; direita = t.a.).

Em pH 6,0 t.a. a formação de uma ponte μ -hidroxo causa uma aproximação nos valores de g_{\perp} e g_{\parallel} para Cu1 que acopla com Cu2 através das duas pontes. O sinal isotrópico de Cu2 a t.a. mostra um decréscimo no valor de g como resultado do aumento do campo ligante e densidade eletrônica sobre Cu2 na espécie **1b**. A absorção total de microondas é 2,7 vezes menor em pH 6,0 do que em pH 4,0, ambos os espectros a t.a., sugerindo um aumento no acoplamento antiferromagnético que pode ser notado em região de meio campo ($g \cong 4,05$) no espectro registrado a 77 K pH 6,0. Interpretando

mudanças estruturais da espécie **1a** para espécie **1b** notamos uma interconversão da orientação dos eixos z e y no centro Cu2 devido à mudança na orientação do campo ligante causada pela formação da ponte μ -hidroxo. No gráfico da Figura 19 o valor de g_z para Cu2 é de 2,3 em **1b** (pH 6,0 ; 77 K) e 2,23 em **1a** (pH 4,0; 77 K). Provavelmente na espécie **1b** a melhor orientação para o alongamento do centro Cu2, representado pelo parâmetro g_z , é sobre a posição do ligante aldeído (O18). Já para espécie **1a**, a posição provável para o alongamento é sobre uma molécula de água.

Em pH 8,2 os valores de g diminuem e se aproximam levemente, com exceção do valor g_{\perp} de Cu1 que continua a aumentar suavemente, como também pode ser observado no gráfico da Figura 19. A disposição de densidade eletrônica de Cu1 para Cu2 através das duas pontes pode ser responsável pelo comportamento do deslocamento da linha de g_{\perp} . Sinais isotrópico (t.a.), rômboico e de meio campo (77 K) tiveram suas intensidades diminuídas substancialmente como possível resultado da formação de um ligante hidroxó terminal sobre Cu2, provavelmente posicionado trans a ponte μ -hidroxo.

Em pH 10,4 o espectro em ambas as condições de temperatura mostra linhas axiais com valores de g_{\perp} e g_{\parallel} de 2,121; 2,160 (t.a.) e 2,090; 2,145 (77 K) com ínfimas contribuições de sinal isotrópico ou rômboico em cada temperatura. Como um todo o comportamento paramagnético de Cu1 em solução aquosa pode ser comparado com outros complexos com macrociclo tacn como componente estrutural (Brudenell, Spiccia et al. 1996; Brudenell, Spiccia et al. 1998).

Tabela 3 – Valores de g para Cu1 e Cu2 em solução aquosa e pHs selecionados. Os valores de A_{\parallel} para Cu1 apresentam-se divididos por 10^{-4} cm^{-1} .

Temperatura ambiente (t.a.)					
pH	Cu1				Cu2
	g_{\perp}	g_{\parallel}	A_{\perp}	A_{\parallel}	g_{iso}
4	2,031	2,342	30	123	2,2
6	2,065	2,278	27	137	2,195
8,2	2,0976	2,204	37	105	2,139
10,4	2,121	2,16	50	80	2,135

T = 77 K					
	Cu1		Cu2		
	g_{\perp}	g_{\parallel}	g_x	g_y	g_z
4	2,105	2,3	2,19	2,21	2,23
6	2,065	2,261	2,095	2,15	2,3
8,2	2,105	2,165	2,095	2,13	2,219
10,4	2,09	2,145	-	-	-

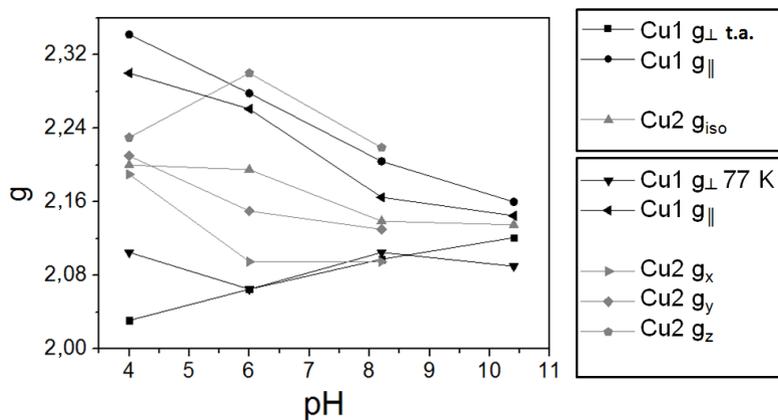


Figura 19 - Valores de g vs pH a temperatura ambiente (t.a.) e 77 K.

5.6 Medidas eletroquímicas

Voltamogramas de **1** apresentam diferentes comportamentos eletroquímicos de acordo com o sistema utilizado como corpo de prova na superfície do eletrodo de carbono vítreo. Em acetonitrila (Figura 20 e 22) pode-se observar ambos os centros de Cu(II) em ondas distintas em -518 mV (E_{pc}) e 478 mV ($E_{1/2}$) vs NHE, atribuídas a processos envolvendo Cu1 e Cu2 respectivamente. Estes valores estão de acordo com a diferença de densidade eletrônica imposta pela ligante em cada centro metálico e também estão de acordo com os estudos estruturais apresentando dois processos eletroquímicos muito bem distinguíveis.

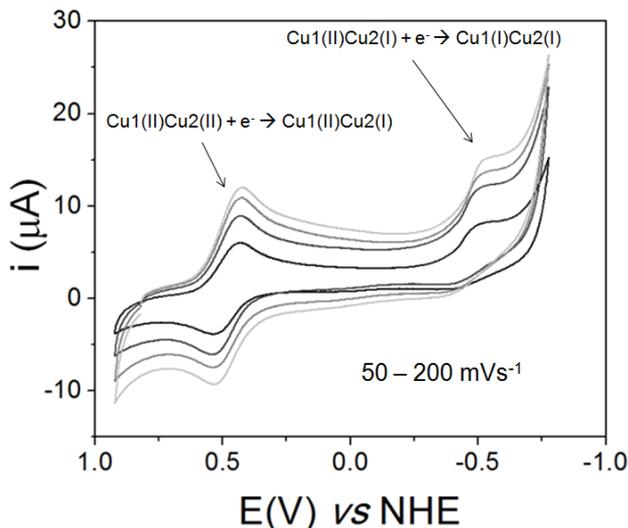


Figura 20 – Voltamograma cíclico (CV) de **1** em CH₃CN. Eletrólito suporte *n*-Bu₄NPF₆ 0.1 mol.L⁻¹, eletrodos: carbono vítreo (trabalho), platina (auxiliar) e Ag/Ag⁺ (referência), padrão interno ferroceno (E⁰ = 400 mV vs NHE).

Em solução aquosa (Figura 21 e Tabela 4), as ondas eletroquímicas se aproximam entre si em comparação ao voltamograma registrado em acetonitrila. Em pH 4, moléculas de água coordenadas ao centro Cu2 causam um decréscimo nos valores de potenciais de onda para este centro (E_{1/2} = 240 mV vs NHE). Em pH 6,4, a maioria dos picos de onda ficam menores, comparados com os processo observados em pH 4,0, como resultado da formação da ponte μ -hidroxo. Em adição pode-se notar processo de redissolução anódica Cu⁰/Cu⁺ na superfície do eletrodo em voltametrias cíclica (CV) e de

onda quadrada (SW) ($E_{pa} = 106$ mV, pH 4,0 ; 69 mV, pH 6,4). Em pH 8,2 os voltamogramas mostram que a formação de um ligante hidróxido sobre Cu2 causa um decréscimo de aproximadamente 385 mV no valor de E_{pc} sendo que para o Cu1 a variação foi de apenas 23 mV (E_{pa} em CV), ambos em comparação com voltamograma em pH 6,4. Quando registrado a pH 10,4 novamente pode-se observar um declínio nos potenciais de onda de Cu1 e Cu2. Embora Cu2 não apresente uma onda reversível, E_{pc} diminui 13 mV. Cu2 provavelmente encontra-se numa estrutura rígida **1d** a qual não suportaria as distorções necessárias para a dupla redução $Cu1(II)Cu2(II) + 2e^- \rightarrow Cu1(I)Cu2(I)$.

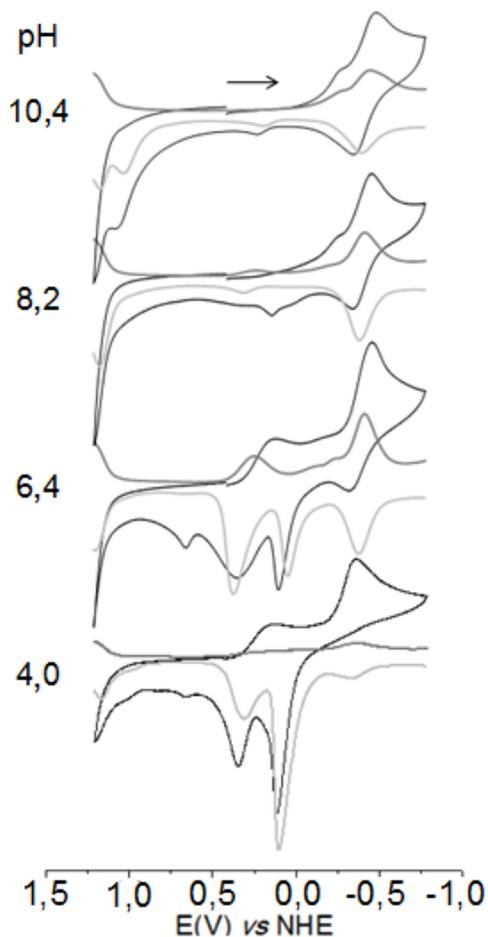


Figura 21 – Medidas eletroquímicas de voltametria cíclica (preto) e onda quadrada (cinza = redução; cinza claro = oxidação) de **1** em água e pHs selecionados. Eletrólito suporte KCl 0.1 mol.L⁻¹, eletrodos: carbono vítreo (trabalho), platina (auxiliar) e Ag/Ag⁺ (referência), padrão interno K₃[(Fe(CN)₆] ($E^0 = 358$ mV vs NHE).

De acordo com estes resultados considera-se que a espécie **1b**, observada no voltamograma a pH 6,4, é um sistema redox adequado para transferências de elétrons favoráveis entre o íon Cu²⁺ e EROs como radical superóxido. Neste pH o voltamograma de onda quadrada (SW) apresenta E_{pc} em 239 mV e corrente de pico de 7,6 µA atribuído a redução **1b** + 1 e⁻ → **1e** ([Cu(II)Cu(II)(L)(µ-OH)(H₂O)₂]²⁺ + e⁻ → [Cu(II)Cu(I)(L¹)(µ-OH)(H₂O)]⁺). No sentido de oxidação (SW) em pH 6,4 E_{pa} de Cu²⁺ aparece em 368 mV e corrente de pico de - 29,3 µA, demonstrando que, após a redução, a espécie **1e** pode oferecer alta corrente de elétrons como agente redutor. Pode-se esperar que o complexo **1** apresente atividade redox em outros sistemas como dismutação de superóxido. Batinic'-Haberle e colaboradores (Batinic'-Haberle, Rebouc et al. 2010) apresentam que os complexos de Mn(III) mais ativos e a enzima nativa Mn(III)-SOD, encontrada em mitocôndria, são redox ativos na faixa de potencial entre 200 e 400 mV. O centro Cu²⁺ em **1b** pH 6,4 apresenta processos redox nesta mesma faixa de potencial. Outra similaridade encontrada é com o complexo acoplado antiferromagnético [Fe₂(BBPMP)(µ-OAc)(µ-X)] (Neves, de Brito et al. 1996). Embora com potenciais mais positivos, a espécie **1b** também apresenta ondas referentes a dois centros metálicos distanciadas de 600 a 700 mV, mostrando influências da formação de dímeros em processos eletroquímicos e como estas influências aumentam a reatividade de complexos binucleares. Valores de potencial encontrados para Cu¹ são comparáveis a outros complexos de Cu(II)

contendo o grupo tacn já citados no texto (Brudenell, Spiccia et al. 1998).

Tabela 4 – Potenciais de redução/oxidação (mV vs NHE; CV e SW) para Cu1 e Cu2 em solução aquosa e pHs selecionados.

Cu1						
pH	E_{pc}		E_{pa}		$E_{1/2}$	
	CV	SW	CV	SW	CV	SW
4.0	-361	-364	-	-333	-	-348
6.4	-464	-420	-328	-385	-396	-403
8.2	-462	-422	-351	-388	-407	-405
10.4	-491	-455	-355	-404	-423	-430

Cu2						
	E_{pc}		E_{pa}		$E_{1/2}$	
	CV	SW	CV	SW	CV	SW
4.0	+131	-	+349	+312	+240	-
6.4	+118	+239	+348	+368	+233	+304
8.2	-267	-	-	-	-	-
10.4	-280	-285	+224	-	-28	-

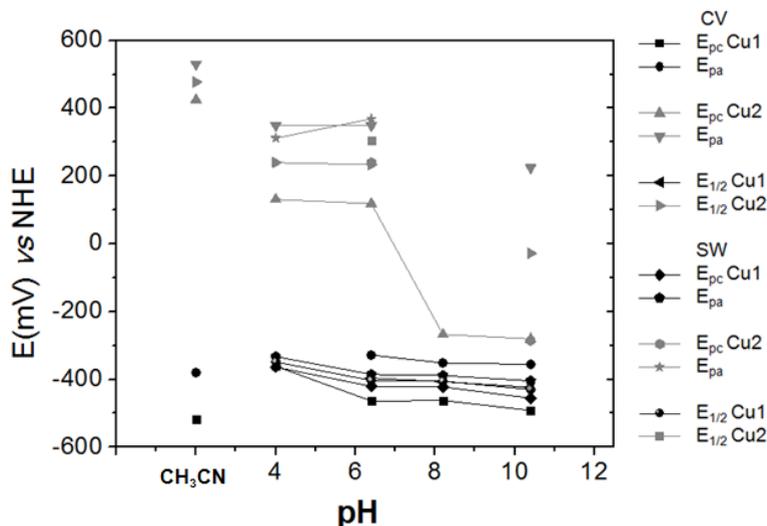


Figura 22 - Potencias de onda determinados por voltamtrias cíclica (CV) e de onda quadrada (SW) em água em pHs selecionados e em CH_3CN .

5.7 Hidrólise do 2,4-BDNPP

Muitos são os trabalhos encontrados na literatura reportando complexos binucleares capazes de catalisar a hidrólise de fosfodiésteres (Fry, Spiccia et al. 2003; Peralta, Neves et al. 2006; Peralta, Bortoluzzi et al. 2010). As fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) são exemplo de substâncias contendo sítios ativos binucleares que atuam de forma cooperativa para promover a ligação e ativação de substratos fosfodiésteres no centro metálico ácido de Pearson macio e a

subseqüente hidrólise do éster através do ataque de um nucleófilo hidróxio, coordenado ao centro metálico ácido de Pearson duro, sobre o átomo de fósforo (Lippard and Berg 1994; Mitić, Smith et al. 2006).

Observar a atividade de **1** frente a hidrólise do 2,4-BDNPP torna-se interessante por duas razões. Primeiro o complexo binuclear **1** apresenta características favoráveis para a catálise deste tipo de reação tal como a distância e a diferença de densidade eletrônica entre os ions. Segundo, este tipo de atividade pode ser útil em aplicações biotecnológicas, quimiorremediação e para o tratamento de câncer. Ainda, o estudo da atividade de **1** em função do pH pode ser útil para elucidação do comportamento estrutural do complexo em solução. De fato, as medidas cinéticas estão de acordo com resultados de outras técnicas.

Inicialmente foi avaliada a atividade de **1** em função do pH (Figura 23). Em pHs ácidos não é observado aumento na velocidade de hidrólise provavelmente pela falta de nucleófilos. A medida que o pH é aumentado a velocidade de hidrolise aumenta e atinge um máximo em pH 6,0, onde a espécie **1b** é majoritária. Após pH 6,0 uma diminuição abrupta na velocidade da reação é observada parando em pH 8,5. Após este pH a atividade é baixa até pH 10. Com este perfil nota-se que **1b** deve ser a espécie mais ativa seguida de **1c** e **1d**. Isto ocorre pois **1b** é coordenado pelo substrato, aumenta a eletrofilicidade do atomo de fosforo e ainda é capaz de fornecer um hidróxido gerado a partir da ponte μ -hidroxo. As espécies **1c** e **1d** também podem oferecer um hidróxido e pH pouco básicos porém, o efeito das cargas negativas

pode diminuir a atração do substrato aniônico. Ainda assim considera-se que as espécies **1c** e **1d** têm atividade hidrolítica detectável.

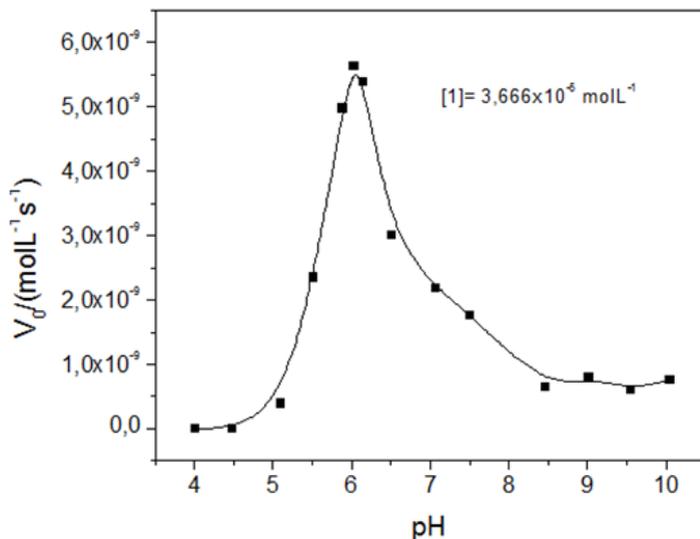


Figura 23 – Curva de V_0 (hidrólise do 2,4-BDNPP) vs pH. Condições: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50% v/v): $[1] = 37 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $[2,4\text{-BDNPP}] = 0,44 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{Tampão}] = 50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MES (pH 4 a 7), HEPES (pH 7,5 a 8,0) TRIS (8,5) e CHES (pH 9,0 a 10) e LiClO_4 $0,10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Uma vez detectado o pH ótimo para a reação, o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação possibilitou a obtenção de dados cinéticos acerca da atividade da espécie **1b**. O perfil de saturação para a velocidade da reação foi determinado usando uma razão complexo/substrato de 100 a 1000 vezes e os dados tratados de acordo com o modelo cinético de Michaelis-Menten (Figura 24). A

partir deste tratamento, foram obtidos os parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 5.

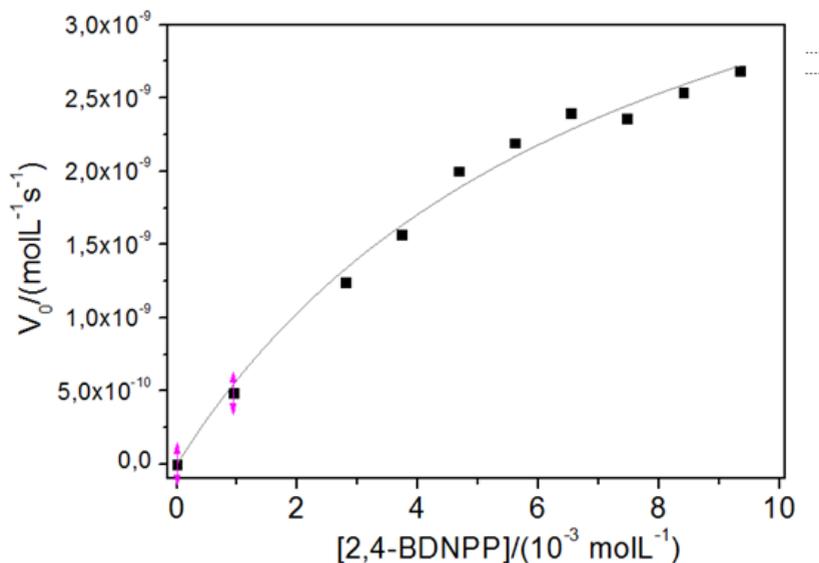


Figura 24– Curva de saturação [2,4-BDNPP] vs V_0 em pH 6. $[\text{MES}]_{\text{final}} = 50 \text{ mmol.L}^{-1}$, $[\mathbf{1}]_{\text{final}} = 9,2 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $[\text{2,4-BDNPP}]_{\text{final}} = 0,93 \text{ a } 9,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50% v/v). Força iônica $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$.

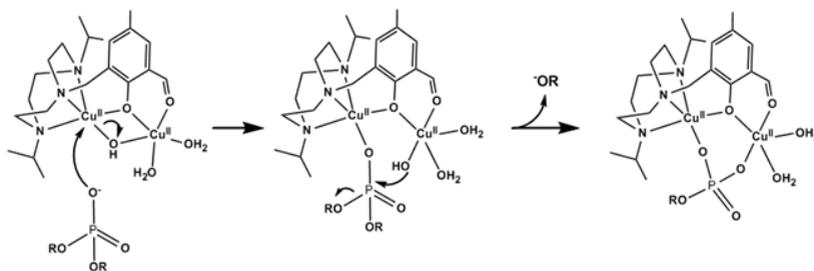
Tabela 5 – Parâmetros cinéticos para a hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada pelo complexo **1** e outros complexos, mono e binuclear, de Cu(II).

	$V_{\max}/\text{molL}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{cat}}/\text{s}^{-1}$	K_M/molL^{-1}	${}^1k_{\text{cat}}/k_{\text{esp}}$
1	$4,9 \times 10^{-9}$	$5,3 \times 10^{-4}$	$7,0 \times 10^{-3}$	2739
${}^2[\text{Cu}(\text{L})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^+$	$7,0 \times 10^{-9}$	$1,4 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-3}$	52
${}^3[\text{CuCu}(\mu\text{-Alcoxo})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^{2+}$	$2,1 \times 10^{-8}$	$5,2 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-3}$	1329

${}^1k_{\text{esp}}$ = constante de hidrólise espontânea em pH 6, $1,93 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ (Bunton and Farber 1969). 2 Complexo **2**, pH 9, 50 °C, L = ligante tridentado HISMIMA (Scarpellini, Neves et al. 2003). 3 Complexo **2**, pH 8, 25 °C (Osório, Peralta et al. 2012).

A atividade 2700 vezes mais rápida que a reação não catalisada corrobora com a proposta de um processo de clivagem a partir de um sítio binuclear cooperativo, desde que complexos mononucleares normalmente não aumentam a velocidade da reação mais do que duas ordens de grandeza mesmo a 50 °C (Deck, Tseng et al. 2002). Por ultimo, estudo de efeito isotópico k_H/k_D sobre a reação performada a pH 6,0 e pD 6,5 foi realizado e o valor encontrado de 1,64 sugere ataque nucleofílico de um ligante hidroxó gerado a partir da ponte $\mu\text{-}$

hidroxo. Embora 1,64 seja um fator relativamente alto, acima de 1,5, para um processo independente de transferência de próton, o valor pode ser atribuído a ocorrência de um efeito isotópico secundário sem a quebra de ligação envolvendo D-O (Deal, Hengge et al. 1996; Anslyn and Dougherty 2006). Com os resultados obtidos até então se propõe o Esquema 4 como etapa onde o fosfodiéster é hidrolisado, muito similar ao que se apresenta para outros complexos biomiméticos (Fry, Spiccia et al. 2003; Peralta, Bortoluzzi et al. 2010).



Esquema 4 – Proposta do mecanismo de hidrólise do 2,4-BDNPP pela espécie **1b**.

5.7 Clivagem de DNA

Ensaio iniciais foram realizados para determinar o pH ótimo para a clivagem do DNA pelo complexo **1** (Figura 25). A quantidade de DNA clivado indicado foi previamente subtraída da fragmentação espontânea do DNA em cada pH. Nos ensaios o DNA plasmidial foi tamponado com 10 mmol.L⁻¹ de MES (pH 5,5 a 6,5), HEPES (pH 7,0 a

8,0) e CHES (pH 8,5 e 9,0). Em seguida, **1** foi adicionado em excesso, concentração final de $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$, e as reações de clivagem conduzidas por 16 h a 37°C . Observando o perfil de pH para a reação de clivagem, o complexo **1** apresenta uma atividade ótima numa faixa de pH próximo a 6,0-6,5. Nestas condições a clivagem do DNA é quase completa (95 % de DNA clivado). Em outras condições de pH observa-se uma atividade basal de 40 a 60 % de clivagem. A cinética da clivagem do DNA (F I) em pH 6,0 é apresentada na Figura 26. Estes resultados concordam com o encontrado para a hidrólise do 2,4-BDNPP por **1**, sugerindo que a espécie **1b** é responsável pela hidrólise tanto DNA quanto o substrato ativado.

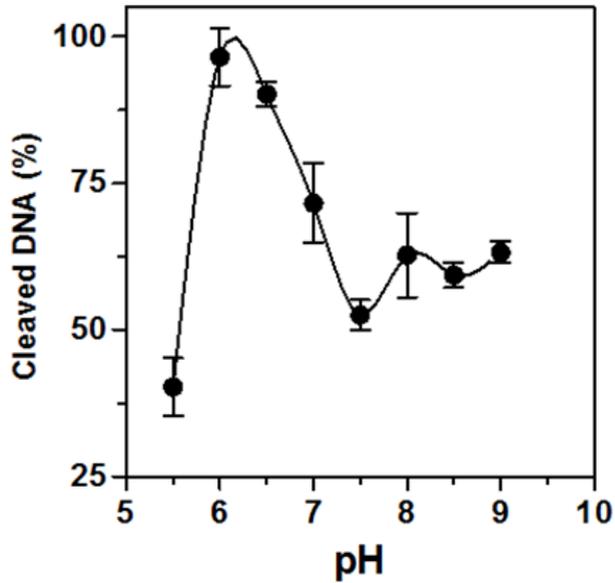


Figura 25 – Clivagem de DNA superenovelado pelo complexo **1** ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) por 16 h a 37°C em diferentes tampões (10 mmol.L^{-1} ; MES, pH 5,5-6,5; HEPES, pH 7,0-8,0; CHES, pH 8,5-9,0).

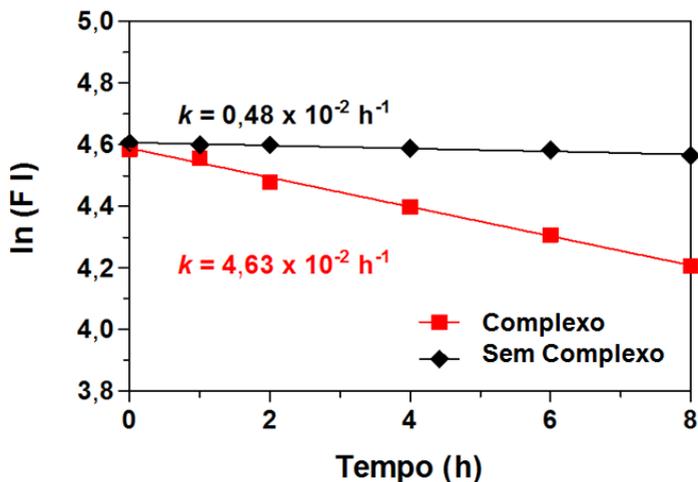


Figura 26 – Cinética pseudo-Michaeliana de clivagem de DNA superenovelado por **1** ($0,5 \text{ mmol}^{-1}$) em pH 6,0 (MES 10 mmol^{-1}).

Ainda, a clivagem do DNA apresenta-se dependente da concentração de **1** assim como mostrado na Figura 27. À medida que a concentração de **1** aumenta de $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ to $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ a clivagem de DNA também aumenta. A $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, o DNA clivado apresenta-se nas formas circular aberta (F II) e linear (F III), indicando que **1** pode promover a clivagem da dupla-fita, podendo ter muitas aplicações em biologia molecular. Em pH 6,0, a espécie predominante **1b** comporta-se como um cátion duplamente carregado enquanto a estrutura do polinucleotídeo DNA atua como um ânion. Nestas condições é razoável entender que a atração eletrostática entre complexo e DNA contribui

com a interação e a consequente clivagem. Para confirmar esta proposta, reações de clivagem do DNA foram realizadas com concentrações crescentes de NaCl (de 10 mmol.L⁻¹ a 1 mol.L⁻¹) a fim de modular a força iônica no meio reacional. De fato, o aumento da força iônica reduz a atividade do complexo frente à clivagem do DNA. Os íons Na⁺ podem ser atraídos pela porção aniônica do DNA bloqueando a interação com o complexo e prevenindo a clivagem. No entanto este resultado não é representativo para outros tipos de interações complexo-DNA tal como interações entre os sulcos do DNA. Para isto foram realizadas reações utilizando ligante de sulco menor distamicina (Van Dyke, Hertzberg et al. 1982) (50 μmol.L⁻¹) e ligante de sulco maior verde de metila (Kim and Norden 1993) (50 μmol.L⁻¹) (Figura 28).

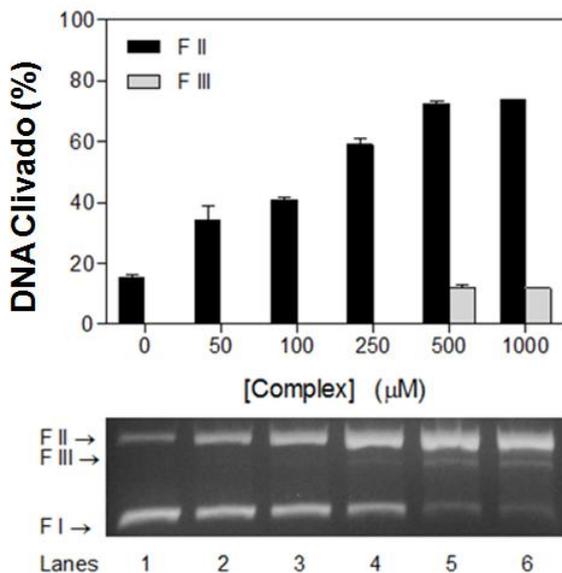


Figura 27 – Clivagem de DNA superenovelado pelo complexo **1** por 16 h a 37 °C em pH 6 e diferentes concentrações de complexo.

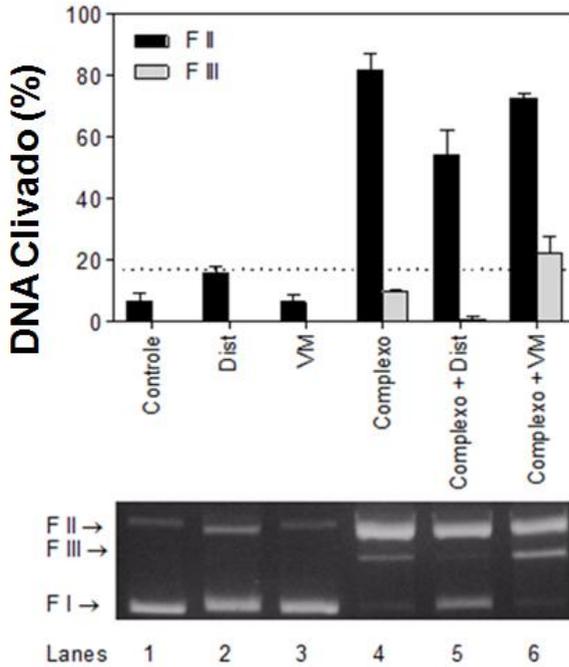


Figura 28 – Efeito de ligantes de sulco distamicina ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e verde de metila ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) na clivagem de DNA superenovelado pelo complexo **1** ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) por 16 h a 37°C em MES (10 mmol.L^{-1} , pH 6,0).

O DNA plasmidial foi pré tratado durante 30 minutos com os ligantes de sulco antes da adição do complexo **1** ($500 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e as reações conduzidas durante 16 h a 37°C . A presença de verde de metila não alterou a atividade de **1**, enquanto que a distamicina diminuiu suavemente a atividade de **1**. Este último resultado ainda não é suficiente para sugerir que **1** possa agir como ligante de sulco menor. A

diminuição da atividade do complexo poder estar relacionada a mudanças na estrutura do DNA depois da ação da distamicina dificultando o acesso de espécies difusíveis que podem iniciar a quebra da fita, sem necessariamente bloquear a interação do complexo (Ferrer, Ballesteros et al. 2004). A última proposta é possível se **1** cliva o DNA com a produção de espécies difusíveis do tipo reativas de oxigênio (EROs), principal via oxidativa para a clivagem do DNA (Jiang, Xiao et al. 2007). Contudo, antes da adição de **1** ($500 \mu\text{mol.L}^{-1}$) sequestradores de EROs foram adicionadas nas misturas reacionais, entre eles: DMSO (10 % v/v), sequestrador de OH^\bullet ; KI (10 mmol.L^{-1}), indutor de desproporcionamento de H_2O_2 ; SOD (20 Unidades), sequestrador de O_2^\bullet ; e NaN_3 (10 mmol.L^{-1}), sequestrador de $^1\text{O}_2$. As reações de clivagem foram conduzidas por 16 h a 37 °C. Assim como mostrado, todos os sequestradores de EROs inibiram parcialmente a clivagem do DNA plasmidial promovida por **1**. A razoável inibição pode estar relacionada com a mistura de mecanismos oxidativos e hidrolítico no processo de clivagem do DNA, assim como já reportado na literatura (Peralta, Bortoluzzi et al. 2010).

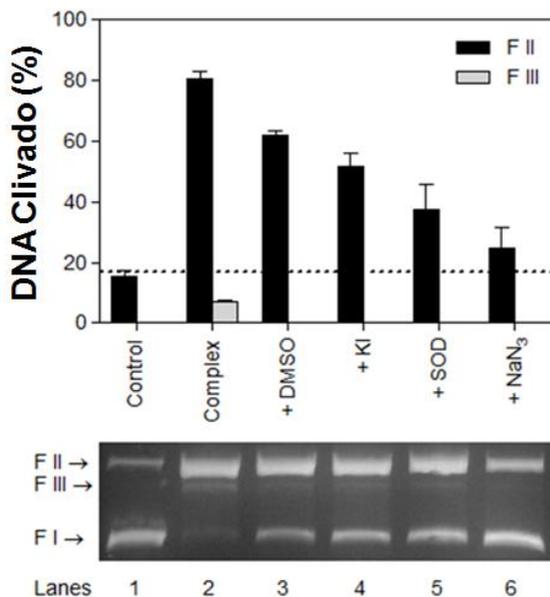


Figura 29 – Efeito de sequestradores de EROs na clivagem de DNA superenovelado pelo complexo **1** (0,5 mM) por 16 h a 37 °C em tampão MES (10 mmolL⁻¹, pH 6,0). Os sequestradores de EROs usados foram: DMSO (10%), KI (10 mmolL⁻¹), SOD (15 unidades), e NaN₃ (10 mmolL⁻¹).

5.8 Atividade SOD-mimética *In vitro*

Comparando propriedades estruturais e eletroquímicas de **1** com outros complexos e também com metaloenzimas (Kaim and Schwederski 1994; Zhou, Fu et al. 2007; Lessa, Horn et al. 2009; Horn, Parrilha et al. 2010) considerou-se interessante avaliar a influência de **1** em processos redox envolvendo NBT e O₂^{•-}. Usando o sistema

Xantina/XaO para a produção de radicais superóxido $O_2^{\bullet-}$ observamos que **1** impede a redução do NBT. Inicialmente na ausência do complexo a Xantina Oxidase promove $O_2^{\bullet-}$ e a absorção relativa ao formazan aumenta em 560 nm. Com o consumo da xantina, a velocidade da reação diminui até 5,5 minutos. Quando o complexo **1** é empregado ao meio a velocidade da reação é lenta durante todo o tempo de medida, como pode ser observado na Figura 30. Isto indica que **1** pode atuar na dismutação de $O_2^{\bullet-}$ mimetizando a enzimas SOD. É possível que a espécie **1b** reaja com $O_2^{\bullet-}$ gerando O_2 através da redução do centro Cu_2 , transformando-se na espécie **1e**.

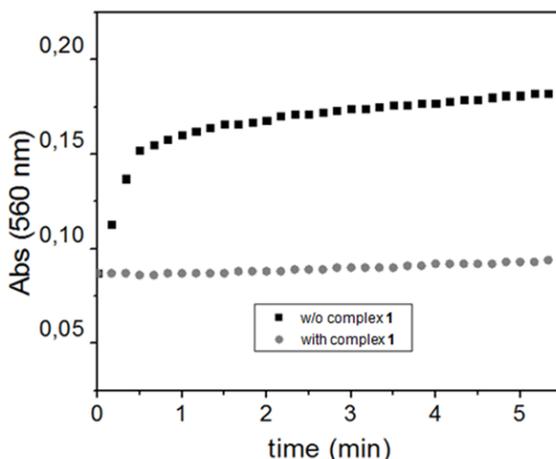


Figura 30 – Inibição da redução do NBT. Absorção de formazan (560 nm) vs tempo.

5.9 Atividade SOD e CAT-mimética *In vivo*

Inicialmente foi realizado um estudo de citotoxicidade de **1** em células de levedura *S. cerevisiae* de linhagem selvagem BY4741 (wt) onde o complexo não se mostrou citotóxico até concentração de 0,5 mmolL⁻¹ (Tabela 6).

Tabela 6 – Avaliação da Citotoxicidade de **1** (25 – 500 μmolL⁻¹)

BY4741 cultivadas em meio 2% YPD (metabolismo fermentativo)					
[1]/μM	0	25	50	100	500
Viabilidade	100	95 ± 4	100	100	94 ± 6

A partir desta informação o caráter citoprotetor de **1** em ensaios de estresse oxidativo induzido foi testado. A fim de avaliar esta propriedade foram utilizadas células das linhagens BY4741 e mutantes isogênicas: *ctt1Δ* (deficiente em catalase citosólica) em 4%YPGly (metabolismo respiratório) e *sod1Δ* (deficiente em CuZn-SOD) em 2%YPD (metabolismo fermentativo). Os oxidantes usados foram H₂O₂ (wt e *ctt1Δ*) e gerador intracelular de O₂^{•-} menadiona (wt e *sod1Δ*). Embora experimentos *In vitro* para atividade CAT-mimética não tenham sido realizados, experimentos *In vivo* utilizando H₂O₂ e *ctt1Δ* foram realizados para a análise da atividade biológica de **1** tal como mostrado na Tabela 7. Estressadas com H₂O₂, a viabilidade das células aumentou de 2 % para 17 % com a presença do complexo 25 μmolL⁻¹ (BY4741 wt; 2%YPD metabolismo fermentativo). Em metabolismo

respiratório ambas as linhagens wt e *ctt1Δ* apresentaram maior resistência ao estresse com H₂O₂, sendo a atividade CAT-mimética de **1** detectada e certa extensão como mostrado em porcentagem na Tabela 7 (com complexo – sem complexo: (BY4741) 50 % - 67 % ; (*ctt1Δ*) 40 % - 67 %).

Em experimentos utilizando estresse oxidativo gerado com menadiona também pode ser observado influencia do complexo **1** na viabilidade celular. Menadiona é um agente redox cíclico envolvido na produção direta de O₂^{•-}. Portanto, é esperado que menadiona aumente o estresse oxidativo no interior das células via geração de superóxido (Castro, Mariani et al. 2008). Resultados mostram que quando na presença do complexo **1** a viabilidade das células da linhagem wt aumentou de 62 % para 89 % e para linhagem *sod1Δ* este aumento foi de 0 % para 15 % (Tabela 7). Este é um indicativo de que o estresse causado pela ação intracelular da menadiona foi parcialmente inibido pelo complexo **1** desempenhando atividade no metabolismo de radical superóxido. Embora menos ativo que outro exemplo de complexo metálico [Fe(HPCINOL)Cl₂]NO₃ (Horn, Parrilha et al. 2010), que mostra aumento de 11 % para 97 % em viabilidade em experimento similar, considera-se o complexo **1** um modelo bem sucedido para CuZn-SOD.

Tabela 7 - Atividade antioxidante de **1** ($25 \mu\text{molL}^{-1}$)

Meio de cultivo linhagem	Viabilidade Celular %			
	2% YPD		4% YPGly	
	BY4741	sod1 Δ	BY4741	ctt1 Δ
controle	100	x	100	100
Estresse H ₂ O ₂	2 ± 3^a	x	50 ± 2^b	40 ± 6^b
Tratamento ^e	17 ± 3^a	x	67 ± 8^b	67 ± 7^b
Controle	100	100	x	x
Estresse	62 ± 10^c	0.0^c	x	x
Tratamento ^e	90 ± 8^c	15 ± 1^c	x	x

Fluorescência / Fluorescência Controle	
Controle	1
Estresse menadiona	3.4 ± 0.5^d
Tratamento ^e	0.7 ± 0.2^d

Estresse oxidativo (1h; 28°C; 180 rpm): ^a 2 mmolL^{-1} de H₂O₂; ^b 20 m molL^{-1} H₂O₂; ^c 10 m molL^{-1} menadiona; ^d 20 m molL^{-1} menadiona. ^e Tratamento com $25 \mu\text{molL}^{-1}$ de complexo **1** (1h; 28 °C; 180 rpm).

Outra observação pode ser realizada acerca da oxidação intracelular usando a sonda 2'7'-Diclorofluoresceína (DCFH). Esta sonda é uma molécula capaz de permear a membrana celular por difusão passiva. Uma vez dentro da célula, a sonda torna-se susceptível ao ataque de espécies radicalares, produzindo um composto mais

fluorescente (Yurkow and McKenzie 1993; Tsuchiya and Suematsu 1994). Como apresentado na Tabela 7, observa-se um aumento de 3,4 vezes na fluorescência causada pela oxidação intracelular quando células da linhagem selvagem BY4741 são submetidas ao estresse direto com menadiona (20 mmolL^{-1}). Por outro lado, quando o estresse com menadiona é aplicado em células pré-tratadas com complexo **1** ($25 \text{ }\mu\text{molL}^{-1}$) por 1h, uma significativa diminuição na oxidação intracelular, de 3,4 para 0,7 vezes *versus* experimento controle, foi observada. Presumivelmente, este resultado é indicativo de que **1** pode agir como um catalisador de superóxido eliminando o ânion radical do meio intracelular.

6 CONCLUSÕES

Com os resultados deste trabalho mostrou-se que o ligante tacn-ⁱpr₂mff tem grande capacidade de estabilizar dois centros de Cu(II) formando um complexo não simétrico binuclear com versatilidades estrutural, eletroquímica e catalítica pH-dependente. O complexo é capaz de hidrolisar fosfodiéster ativado e clivar DNA plasmidial a pH 6. Em ambiente de *S. cerevisiae* o complexo é não-citotóxico. Por outro lado o complexo exibe atividade antagônica a H₂O₂ e O₂^{•-}. Mesmo a atividade antioxidante sendo mediana considera-se que o projeto e preparação de uma molécula complexa que atua de forma interativa com substratos em diferentes ambientes podem contribuir para o desenvolvimento de substâncias com menor incidência de efeitos colaterais no tratamento de doenças e que proteja eficientemente os organismos contra agentes de estresse oxidativo, doenças neurodegenerativas e câncer.

7 REFERÊNCIAS

- Addison, A. W., T. N. Rao, et al. (1984). "Synthesis, structure, and spectroscopic properties of copper(II) compounds containing nitrogen-sulphur donor ligands; the crystal and molecular structure of aqua[1,7-bis(N-methylbenzimidazol-2[prime or minute]-yl)-2,6-dithiaheptane]copper(II) perchlorate." Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions(7): 1349-1356.
- Almeida, V. R. (2009). Síntese, Caracterização e Estudos em Solução de Um Complexo de Cu(II) com o Ligante tacn¹pr₂mff: Potencial Biomimético para Nucleases/Proteases. Departamento de Química, Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina. Trabalho Conclusão de Curso: p. 56.
- Altomare, A., M. C. Burla, et al. (1999). "SIR97: a new tool for crystal structure determination and refinement." Journal of Applied Crystallography **32**: 115-119.
- Anslyn, E. V. and D. A. Dougherty (2006). Modern Organic Physical Chemistry, University Science Books.
- Ausubel, F. M., R. Brent, et al. (1999). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. New York, Wiley.
- Bar-Nahum, I., A. K. Gupta, et al. (2009). "Reduction of Nitrous Oxide to Dinitrogen by a Mixed Valent Tricopper-Disulfido Cluster." Journal of American Chemical Society Communications **131**(2812).
- Batinic-Haberle, I., J. S. Rebouc, et al. (2010). "Superoxide Dismutase Mimics: Chemistry, Pharmacology, and

- Therapeutic Potential." Antioxidants & Redox Signaling **13**(6): 877.
- Beinert, H. (2002). "Bioinorganic Chemistry: A New Field or Discipline? Words, Meanings, and Reality." Journal of Biological Chemistry **277**(41): 37967-37972.
- Bernadou, J., G. Pratviel, et al. (1989). "Potassium monopersulfate and a water-soluble manganese porphyrin complex, [Mn(TMPyP)](OAc)₅, as an efficient reagent for the oxidative cleavage of DNA." Biochemistry **28**(18): 7268-7275.
- Biava, H., C. Palopoli, et al. (2006). "New dimanganese(III) complexes of pentadentate (N₂O₃) Schiff base ligands with the [Mn₂(μ-OAc)(μ-OR)₂]³⁺ core: Synthesis, characterization and mechanistic studies of H₂O₂ disproportionation." Journal of Inorganic Biochemistry **100**(10): 1660-1671.
- Boulsourani, Z., G. D. Geromichalos, et al. (2011). "Preparation and pharmacochemical evaluation of mixed ligand copper(II) complexes with triethanolamine and thiophenyl-2 saturated carboxylic acids." Journal of Inorganic Biochemistry **105**(6): 839-849.
- Brudenell, S. J., L. Spiccia, et al. (1998). "Structural, EPR, and Electrochemical Studies of Binuclear Copper(II) Complexes of Bis(pentadentate) Ligands Derived from Bis(1,4,7-triazacyclonane) Macrocycles." Inorganic Chemistry **37**(15): 3705-3713.
- Brudenell, S. J., L. Spiccia, et al. (1996). "Binuclear Copper(II) Complexes of Bis(pentadentate) Ligands Derived from Alkyl-Bridged Bis(1,4,7-triazacyclonane) Macrocycles." Inorganic Chemistry **35**(7): 1974-1979.

- Bunton, C. A. and S. J. Farber (1969). "Hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate." The Journal of Organic Chemistry **34**(4): 767-772.
- CAD4 EXPRESS version. 5.1/1.2 (1994). Enraf Nonius: Delft, The Netherlands.
- Castro-Rodriguez, I., K. Olsen, et al. (2003). "Uranium Tri-aryloxide Derivatives Supported by Triazacyclononane: Engendering a Reactive Uranium(III) Center with a Single Pocket for Reactivity." Journal of American Chemical Society **125**: 4565.
- Castro, F. A. V., D. Mariani, et al. (2008). "Cytotoxicity Mechanism of Two Naphthoquinones (Menadione and Plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*." PLoS ONE **3**(12): e3999.
- Chaudhuri, P. and K. Wieghardt (1987). "The Chemistry of 1,4,7-Triazacyclononane and Related Tridentate Macrocyclic Compounds." Progress in Inorganic Chemistry **35**.
- Chelikani, P., I. Fita, et al. (2004). "Diversity of structures and properties among catalases." Cellular and Molecular Life Sciences **61**(2): 192-208.
- Ciuffi, M., C. Cellai, et al. (1998). "AN IN VIVO, EX VIVO AND IN VITRO COMPARATIVE STUDY OF ACTIVITY OF COPPER OLIGOPEPTIDE COMPLEXES VS Cu(II) IONS." Pharmacological Research **38**(4): 279-287.
- Costa, V. and P. Moradas-Ferreira (2001). "Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases." Molecular Aspects of Medicine **22**(4-5): 217-246.
- Danford, J. J., P. Dobrowolski, et al. (2009). "Thioester Hydrolysis Reactivity of an Fe(III)Zn(II) Complex." Inorganic Chemistry **48**(23): 11352-11361.

- Deal, K. A., A. C. Hengge, et al. (1996). "Characterization of Transition States in Dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-Catalyzed Activated Phosphate Diester Hydrolysis." Journal of the American Chemical Society **118**(7): 1713-1718.
- Deck, K. M., T. A. Tseng, et al. (2002). "Triisopropyltriazacyclononane Copper(II): An Efficient Phosphodiester Hydrolysis Catalyst and DNA Cleavage Agent." Inorganic Chemistry **41**(4): 669-677.
- Ellis, D., L. J. Farrugia, et al. (1999). "N,N',N''-1,4,7-Triazacyclononane with pendant alkyne arms: Crystal structures of $[\text{CuL}_2][\text{PF}_6]_2$, $[\text{NiL}_2][\text{ClO}_4]_2$ and $\text{CuL}''\text{Cl}_2$ ($\text{L}'=\text{N}-(4\text{-but-2-yne})-1,4,7\text{-triazacyclononane}$, $\text{L}''=\text{N}-(5\text{-pent-2-yne})-1,4,7\text{-triazacyclononane}$)." Polyhedron **18**(8-9): 1229-1234.
- Fernandes, C., A. Horn Jr, et al. (2010). "Synthesis, characterization and antibacterial activity of FeIII, CoII, CuI and ZnII complexes probed by transmission electron microscopy." Journal of Inorganic Biochemistry **104**(11): 1214-1223.
- Ferrer, S., R. Ballesteros, et al. (2004). "Syntheses, crystal structures, and oxidative DNA cleavage of some Cu(II) complexes of 5-amino-3-pyridin-2-yl-1,2,4-triazole." Journal of Inorganic Biochemistry **98**(8): 1436-1446.
- Fontecave, M. and J.-L. Pierre (1998). "Oxidations by copper metalloenzymes and some biomimetic approaches." Coordination Chemistry Reviews **170**(1): 125-140.
- Fry, F. H., B. Moubaraki, et al. (2003). "Asymmetry in endogenously bridged binuclear copper(ii) and zinc(ii) complexes formed by 1,2-bis[1,4,7-triazacyclonon-1-yl]propan-2-ol." Dalton Transactions(5): 866-871.

- Fry, F. H., L. Spiccia, et al. (2003). "Binuclear Copper(II) Complexes of Xylyl-Bridged Bis(1,4,7-triazacyclononane) Ligands." Inorganic Chemistry **42**: 5594-5603.
- Fujimori, T., S. Yamada, et al. (2005). "Orally active antioxidative copper(II) aspirinate: synthesis, structure characterization, superoxide scavenging activity, and in vitro and in vivo antioxidative evaluations." Journal of Biological Inorganic Chemistry **10**(8): 831-841.
- Gahan, L. R., S. J. Smith, et al. (2009). "Phosphate Ester Hydrolysis: Metal Complexes As Purple Acid Phosphatase and Phosphotriesterase Analogues." European Journal of Inorganic Chemistry **2009**(19): 2745-2758.
- Gerdemann, C., C. Eicken, et al. (2002). "The Crystal Structure of Catechol Oxidase: New Insight into the Function of Type-3 Copper Proteins." Accounts of Chemical Research **35**(3): 183-191.
- Giesbrecht, G. R., C. Cui, et al. (2002). "Divalent Lanthanide Metal Complexes of a Triazacyclononane-Functionalized Tetramethylcyclopentadienyl Ligand: X-ray Crystal Structures of $[C_5Me_4SiMe_2(iPr_2-tacn)]LnI$ (Ln) Sm, b; tacn) 1,4-Diisopropyl-1,4,7-triazacyclononane)." Organometallics **21**: 3841.
- Glusoe, P. K. and F. A. Long (1960). "Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide." The Journal of Physical Chemistry **64**(1): 188-190.
- Gómez-Saiz, P., R. Gil-García, et al. (2008). "Structure, magnetic properties and nuclease activity of pyridine-2-carbaldehyde thiosemicarbazonecopper(II) complexes." Journal of Inorganic Biochemistry **102**(10): 1910-1920.

- Hadler, K. S., N. a. Mitić, et al. (2010). "Electronic Structure Analysis of the Dinuclear Metal Center in the Bioremediator Glycerophosphodiesterase (GpdQ) from *Enterobacter aerogenes*." *Inorganic Chemistry* **49**(6): 2727-2734.
- Harinath, Y., D. H. K. Reddy, et al. (2011). "Copper(II), Nickel(II) complexes of N-heteroaromatic hydrazone: Synthesis, Characterization and in vitro antimicrobial evaluation." *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **3**(1): 698.
- Hegg, E. L. and J. N. Burstyn (1995). "Hydrolysis of Unactivated Peptide Bonds by a Macrocyclic Copper(II) Complex: Cu([9]aneN3)Cl₂ Hydrolyzes Both Dipeptides and Proteins." *Journal of the American Chemical Society* **117**(26): 7015-7016.
- Horn, A., G. L. Parrilha, et al. (2010). "An Iron-Based Cytosolic Catalase and Superoxide Dismutase Mimic Complex." *Inorganic Chemistry* **49**(4): 1274-1276.
- Jiang, Q., N. Xiao, et al. (2007). "Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism." *Coordination Chemistry Reviews* **251**(15-16): 1951-1972.
- Kaim, W. and B. Schwederski (1994). *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, Wiley.
- Kim, S. K. and B. Norden (1993). "Methyl green: A DNA major-groove binding drug." *FEBS Letters* **315**(1): 61-64.
- Klabunde, T. and B. Krebs (1997). "The Dimetal Center in Purple Acid Phosphatases " *Struct. Bonding* **89**: 177-198.
- Klanicová, A., Z. Trávníček, et al. (2010). "Dinuclear copper(II) perchlorate complexes with 6-(benzylamino)purine

- derivatives: Synthesis, X-ray structure, magnetism and antiradical activity." Polyhedron **29**(13): 2582-2589.
- Koval, Iryna A., M. Huisman, et al. (2004). "Dinuclear CuII Complexes with a New Phenol-Based Ligand Bearing Pyridine and Thiophene Substituents: Synthesis, Characterization and Interaction with Catechol Substrates." European Journal of Inorganic Chemistry **2004**(20): 4036-4045.
- Kreher, U., M. T. W. Hearn, et al. (2007). "Coordination chemistry of 1,4-bis(carboxymethyl)-1,4,7-triazacyclononane: Synthesis and characterization of mononuclear and binuclear μ -oxo-bridged iron(III) complexes, and a 1D-helical copper(II) chain." Polyhedron **26**(13): 3205-3216.
- Lessa, J. A., A. Horn, et al. (2009). "Catalase vs Peroxidase Activity of a Manganese(II) Compound: Identification of a Mn(III)–(μ -O)₂–Mn(IV) Reaction Intermediate by Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy." Inorganic Chemistry **48**(10): 4569-4579.
- Lippard, J. S. and J. M. Berg (1994). Principles of Bioinorganic Chemistry, Mill Valley: University Science Books.
- Ivarez, M. G.-A., G. Alzuet, et al. (2005). "Comparison of Protective Effects against Reactive Oxygen Species of Mononuclear and Dinuclear Cu(II) Complexes with N-Substituted Benzothiazolesulfonamides." Inorganic Chemistry **44**: 9424.
- Martell, A. E. and R. J. Motekaitis (1992). Determinations of Stability Constants, VHC Publishers, Weinheim, Germany.

-
- Mitić, N., S. J. Smith, et al. (2006). "The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases." Chemical Reviews **106**(8): 3338-3363.
- Motekaitis, R. j. and A. E. Martell (1982). "BEST — A new program for rigorous calculation of equilibrium parameters of complex multicomponent systems." Canadian Journal of Chemistry **60**(19): 2403-2409.
- Neves, A., M. A. de Brito, et al. (1996). "FeIII/FeIII and FeII/FeII Complexes as Synthetic Analogues for the Oxidized and Reduced Forms of Purple Acid Phosphatases." Inorganic Chemistry **35**(8): 2360-2368.
- Neves, A., H. Terenzi, et al. (2001). "Hydrolytic DNA cleavage promoted by a dinuclear iron(III) complex." Inorganic Chemistry Communications **4**(8): 388-391.
- Oliveira, M. C. B., D. Mazera, et al. (2009). "Mononuclear CuII–Phenolate Bioinspired Complex is Catalytically Promiscuous: Phosphodiester and Peptide Amide Bond Cleavage." Inorganic Chemistry **48**(7): 2711-2713.
- Osório, R. E. H. M. B., R. A. Peralta, et al. (2012). "Synthesis, Magnetostructural Correlation, and Catalytic Promiscuity of Unsymmetric Dinuclear Copper(II) Complexes: Models for Catechol Oxidases and Hydrolases." Inorganic Chemistry.
- Patel, M. N., D. S. Gandhi, et al. (2011). "Synthesis, biological aspects and SOD mimic activity of square pyramidal copper(II) complexes with the 3rd generation quinolone drug sparfloxacin and phenanthroline derivatives." Inorganic Chemistry Communications **14**(1): 128-132.
- Peralta, R. A., A. J. Bortoluzzi, et al. (2010). "Electronic Structure and Spectro-Structural Correlations of FeIII/FeII Biomimetics for Purple Acid Phosphatases:

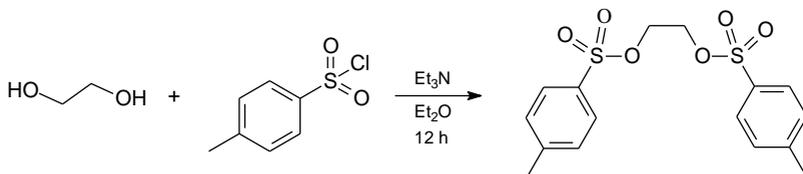
- Relevance to DNA Cleavage and Cytotoxic Activity." Inorganic Chemistry **49**(24): 11421-11438.
- Peralta, R. A., A. J. Bortoluzzi, et al. (2010). "Catecholase and DNase activities of copper(II) complexes containing phenolate-type ligands." Journal of Physical Organic Chemistry **23**(10): 1000-1013.
- Peralta, R. A., A. Neves, et al. (2006). "New unsymmetric dinuclear CuIICuII complexes and their relevance to copper(II) containing metalloenzymes and DNA cleavage." Journal of Inorganic Biochemistry **100**(5-6): 992-1004.
- Pereira, M. D., E. C. Eleutherio, et al. (2001). "Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*." BMC Microbiology **1**(11).
- Perron, N. R., C. R. García, et al. (2011). "Antioxidant and prooxidant effects of polyphenol compounds on copper-mediated DNA damage." Journal of Inorganic Biochemistry **105**(5): 745-753.
- Psomas, G., A. Tarushi, et al. (2006). "Synthesis, structure and biological activity of copper(II) complexes with oxolinic acid." Journal of Inorganic Biochemistry **100**(11): 1764-1773.
- Rey, N. A., A. Neves, et al. (2007). "Catalytic Promiscuity in Biomimetic Systems: Catecholase-like Activity, Phosphatase-like Activity, and Hydrolytic DNA Cleavage Promoted by a New Dicopper(II) Hydroxo-Bridged Complex." Inorganic Chemistry Communications **46**: 348.
- Ruiz, M., R. Ortiz, et al. (1997). "Potentiometric and spectroscopic studies of transition-metal ions complexes with a quinolone derivative (cinoxacin). Crystal structures of new Cu(II) and Ni(II) cinoxacin

- complexes." Journal of Inorganic Biochemistry **65**(2): 87-96.
- Scarpellini, M., A. Neves, et al. (2003). "Phosphate Diester Hydrolysis and DNA Damage Promoted by New cis-Aqua/Hydroxy Copper(II) Complexes Containing Tridentate Imidazole-rich Ligands." Inorganic Chemistry **42**(25): 8353-8365.
- Sheldrick, G. M. (2008). "A short history of SHELX." Acta Crystallographica, Section A: Foundations of Crystallography **A64**: 112-122.
- Solomon, E. I. (1983). "Electronic and geometric structure-function correlations of the coupled binuclear copper active site." Pure and Applied Chemistry **55**(7): 1059-1068.
- Solomon, E. I., J. W. Ginsbach, et al. (2011). "Copper dioxygen (bio)inorganic chemistry." Faraday Discussions **148**: 11.
- Souza, E. T., L. C. Castro, et al. (2009). "Synthesis, characterization and biological activities of mononuclear Co(III) complexes as potential bioreductively activated prodrugs." Journal of Inorganic Biochemistry **103**(10): 1355-1365.
- Spek, Anthony L. (1996). HELENA, CAD-4 Data Reduction Program, University of Utrecht, The Netherlands.
- Spek, Anthony L. (2003). "Single-crystal structure validation with the program PLATON." Journal of Applied Crystallography **36**: 7-13.
- Thoer, A., M. Denis, et al. (1988). "The Reimer-Tiemann reaction in slightly hydrated solid-liquid medium: a new method for the synthesis of formyl and diformyl phenols." Synthetic Communications **18**: 2095-2101.
- Tolman, W. B. (1997). "Making and Breaking the Dioxygen O-O Bond: New Insights from Studies of Synthetic Copper

- Complexes." Accounts of Chemical Research **30**(6): 227-237.
- Tsuchiya, M. and M. Suematsu (1994). "In vivo visualization of oxygen radicaldependent photoemission." Methods in Enzymology **233**: 128.
- Valko, M., H. Morris, et al. (2005). "Metals Toxicity and Oxidative stress." Current Medicinal Chemistry **12**: 1161-1208.
- Van Dyke, M. W., R. P. Hertzberg, et al. (1982). "Map of distamycin, netropsin, and actinomycin binding sites on heterogeneous DNA: DNA cleavage-inhibition patterns with methidiumpropyl-EDTA-Fe(II)." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **79**(18 I): 5470-5474.
- Warner, D. S., H. Sheng, et al. (2004). "Oxidants, antioxidants and the ischemic brain." The journal of Experimental Biology **207**: 3221-3231.
- Yan, F., Y. Mu, et al. (2010). "Antioxidant Enzyme Mimics with Synergism." Mini-Reviews in Medicinal Chemistry **10**: 342.
- Yurkow, E. J. and M. A. McKenzie (1993). "Characterization of hypoxia-dependent peroxide production in cultures of *Saccharomyces cerevisiae* using flow cytometry: a model for ischemic tissue destruction." Cytometry **14**: 287.
- Zhou, Y.-H., H. Fu, et al. (2007). "Synthesis, Structure, and Activity of Supramolecular Mimics for the Active Site and Arg141 Residue of Copper, Zinc-Superoxide Dismutase." Inorganic Chemistry **46**(3): 734-739.

ANEXO A – Rota de síntese dos pró-ligantes de $\text{tacn}^1\text{pr}_2\text{mff}$ (L)

1 Síntese do 1,2-bis(*p*-toluenosulfonil)etilenoglicol – eg-ts₂



Uma solução levemente aquecida de cloreto de tosila (80,1 g; 0,420 mol; 190,70 g.mol⁻¹) em 300 mL de éter dietílico foi adicionada gota a gota em um erlenmeyer de 1 L contendo 11,2 mL de etilenoglicol (1,11 g.mL⁻¹; 12,4 g; 0,200 mol; 62,07 g.mol⁻¹) em 128 mL trietilamina (92,9 g; 0,918 mol; 101,19 g.mol⁻¹). A reação foi mantida sob vigorosa agitação por 12 horas. O precipitado branco formado foi filtrado em funil de placa porosa, lavado com etanol e éter etílico gelado e seco sob vácuo. O composto com elevado grau de pureza pode ser obtido pela recristalização do composto em etanol. Foram obtidos 70,4 g (0,190 mol; 370,44 g.mol⁻¹) de 1,2-bis(*p*-toluenosulfonil)etilenoglicol, com rendimento 95 %. P.F.: 116-118 °C.

IV (KBr, cm⁻¹): ν (C-H_{ar}) 3100; ν (C-H_{alif}) 2994-2876; ν (C=C) 1596; ν_s (O-S-O) 1360; ν_{ass} (O-S-O) 1175; ν (S-O-C) 1027-820; δ (C-H_{ar}) 769.

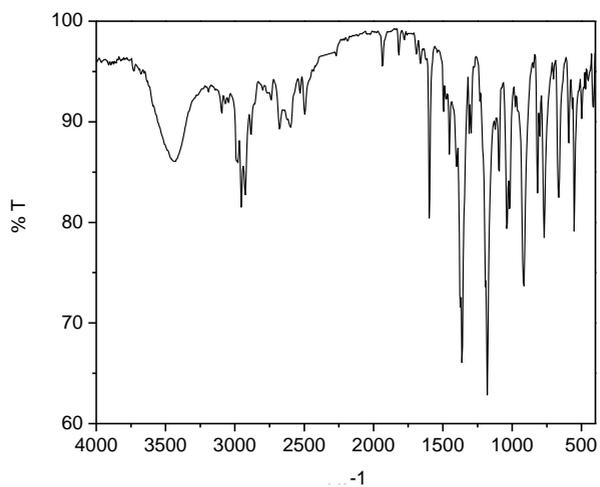


Figura 1A – Espectro vibracional IV do eg-ts₂ em pastilha de KBr.

RMN ¹H - δ_H (400 MHz, CDCl₃), em ppm: 2,45 (s, 6H, CH₃);
4,18 (s, 4H, CH₂); 7,34 (d, 2H, CH_{ar}); 7,73 (d, 2H, CH_{ar}).

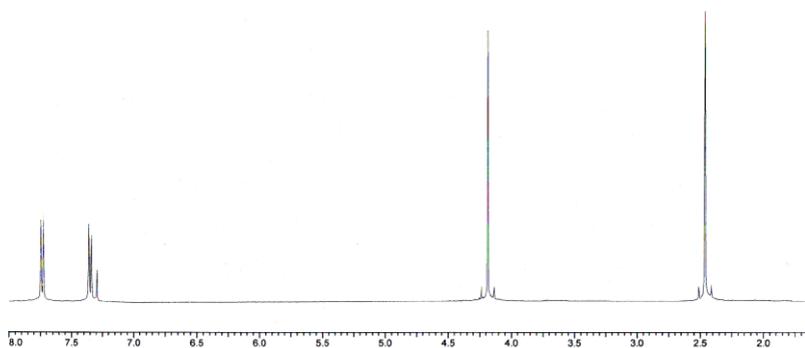
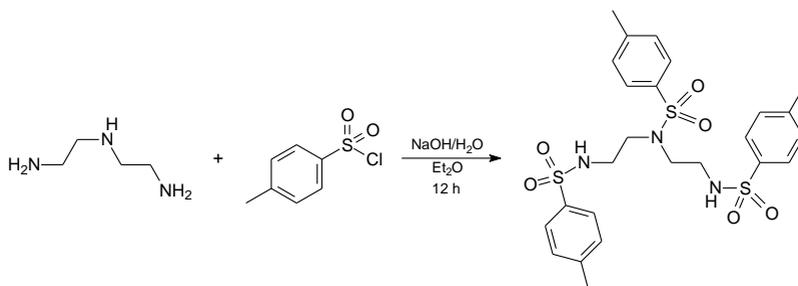


Figura 2A – Espectro RMN ¹H do eg-ts₂ em CDCl₃

2 Síntese do *N,N',N''*-tris(*p*-toluenosulfonil)-dietilenotriamina – *detats₃*



Uma solução levemente aquecida de cloreto de tosila (125,48 g; 0,658 mol; 190,70 g.mol⁻¹) em 400 mL de éter dietílico foi adicionada gota a gota em um erlenmeyer de 1 L contendo 21,6 mL de dietilenotriamina (0,955 g.mL⁻¹; 20,6 g; 0,200 mol; 103,17 g.mol⁻¹) e 100 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio (25,0 g; 0,625 mol; 40,0 g.mol⁻¹). A reação foi mantida sob vigorosa agitação por 12 horas. O precipitado branco formado foi filtrado em funil de placa porosa, lavado com etanol e éter etílico gelado e seco sob vácuo. O composto com elevado grau de pureza pode ser obtido pela recristalização do composto em etanol. Foram obtidos 101,82 g (0,180 mol; 565,72 g.mol⁻¹) de *N,N',N''*-tris(*p*-toluenosulfonil)-dietilenotriamina, com rendimento de 90 %. P.F.: 174-176 °C.

IV (KBr, cm⁻¹): ν (N-H) 3292; ν (C-H_{ar}) 3073-3020; ν (C-H_{alif}) 2988-2840; ν (C=C) 1605 e 1444; δ_s (C-H_{alif}) 1493; δ_{ass} (C-H_{alif}) 1375; ν_s (O-S-O) 1326; ν_{ass} (O-S-O) 1158; ν (S-O-C) 1091-832; ν_s (C-N) 1073; δ (C-H_{ar}) 810.

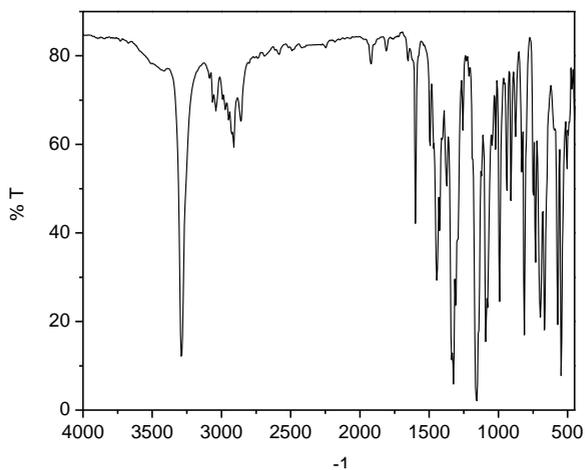


Figura 3A – Espectro vibracional IV do deta-ts₃ em pastilha de KBr.

RMN-¹H - δ_H (400 MHz, CDCl₃), em ppm: 1,60 (s, 2H, NH); 2,43 (s, 9H, CH₃); 3,15 (m, 8H, CH₂); 7,31 (m, 6H, CH_{ar}); 7,61 (d, 2H, CH_{ar}); 7,76 (d, 3H, CH_{ar}); 7,84 (d, 1H, CH_{ar}).

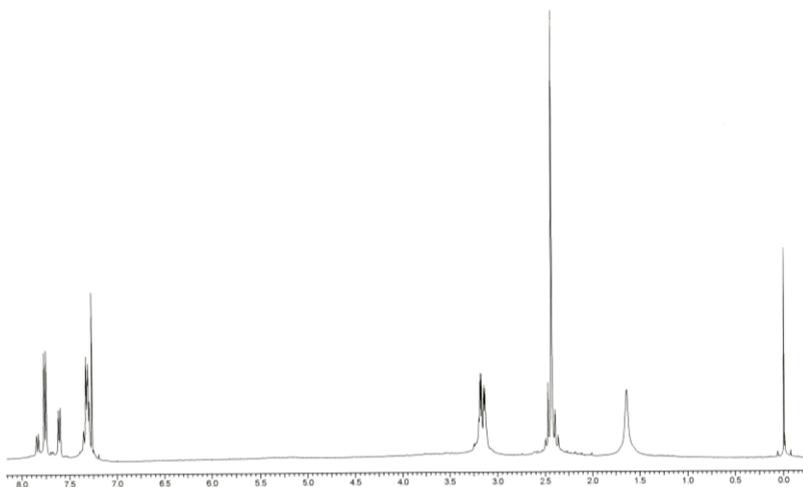
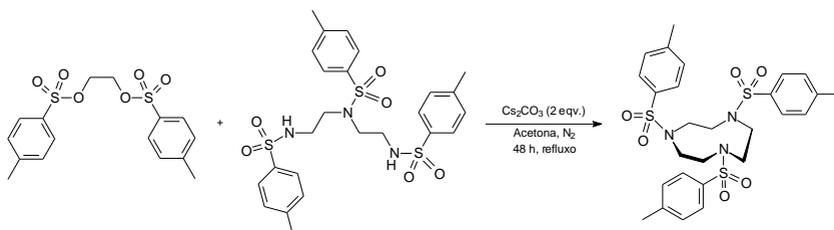


Figura 4A – Espectro RMN ^1H do δts_3 em CDCl_3 .

3 Síntese do 1,4,7-tris-(*p*-toluenosulfonil)-1,4,7-triazaciclono-nano – tacn-ts_3



Em um balão de 2 L foram adicionados 65,2 g de carbonato de céσιο (0,200 mol; $325,82 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) em 600 mL de acetona tratada com 100 g de sulfato de sódio, sob nitrogênio. Em seguida, 53,7 g de, *N,N',N''*-tris(*p*-toluenosulfonil)-

dietilenotriamina (95 mmol; 565,72 g.mol⁻¹) foram adicionados ao sistema sob fluxo de nitrogênio e deixado em refluxo durante 1 hora. À suspensão formada, adicionou-se 35,2 g de 1,2-bis(*p*-toluenosulfonyl)etilenoglicol (95 mmol; 370,44 g.mol⁻¹) sólido, seguido de 600 mL de acetona previamente tratada e a reação foi deixada em refluxo por 48 h. O solvente foi então rotaevaporado a pressão reduzida e ao sólido branco restante foram adicionados 800 mL de água. A suspensão foi mantida sob vigorosa agitação durante 1 hora e posteriormente filtrada em funil de placa porosa, sendo o sólido branco lavado três vezes com água, etanol gelado e éter gelado. Foram obtidos 47,8 g (80,8 mmol; 591,76 g.mol⁻¹) de 1,4,7-tris-(*p*-toluenosulfonyl)-1,4,7-triazaciclono-nano, com rendimento de 85 %. P.F.: 210 °C.

IV (KBr, cm⁻¹): ν (C-H_{ar}) 3091-3015; ν (C-H_{alif}) 2985-2848; ν (C=C) 1599 e 1448; δ_s (C-H_{alif}) 1497; δ_{ass} (C-H_{alif}) 1384; ν_s (O-S-O) 1327; ν_{ass} (O-S-O) 1158; ν (S-O-C) 1089-859; ν_s (C-N) 1087; δ (C-H_{ar}) 815.

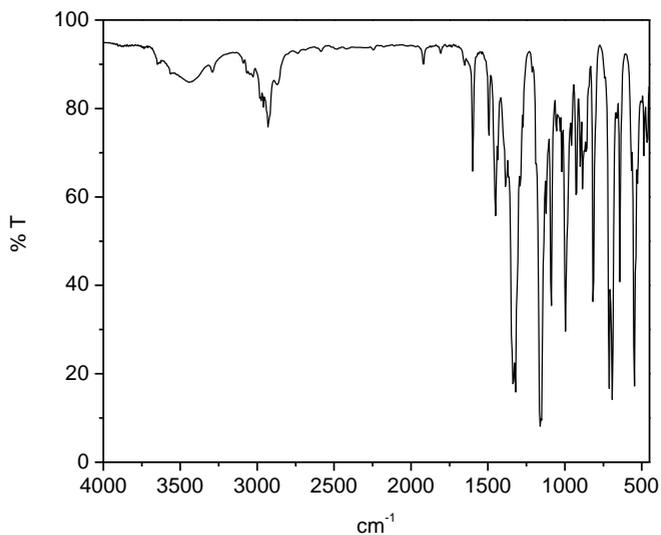


Figura 5A – Espectro vibracional IV do tacn-ts₃ em pastilha de KBr.

RMN-¹H - δ_H (400 MHz, CDCl₃), em ppm: 2,44 (s, 9H, CH₃);
3,42 (s, 12H, CH₂); 7,33 (d, 6H, CH_{ar}); 7,70 (d, 6H, CH_{ar}).

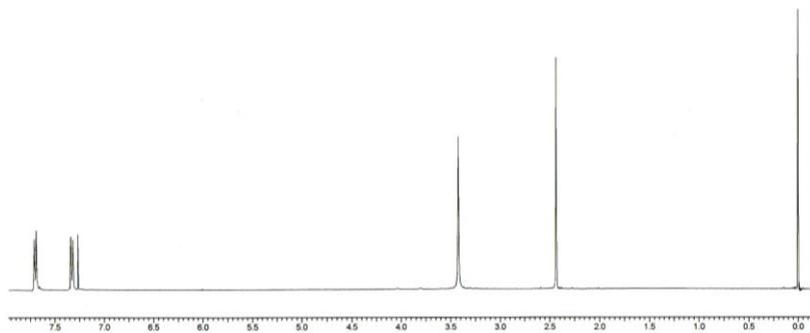
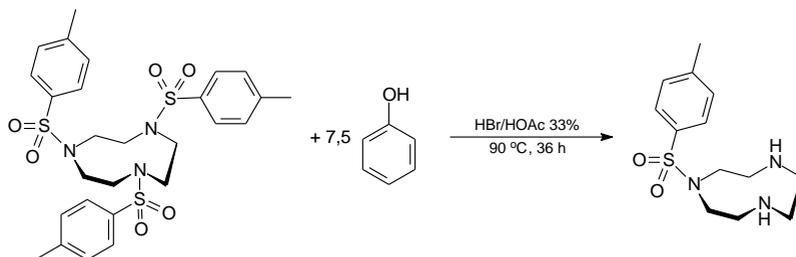


Figura 6A – Espectro RMN ¹H do tacn-ts₃ em CDCl₃.

4 Síntese do 1-(*p*-toluenosulfonil)-1,4,7-triazaciclononano – tacn-ts



Em um balão de 1 L foram dissolvidos 37,3 g de 1,4,7-tris-(*p*-toluenosulfonil)-1,4,7-triazaciclononano (63 mmol; 591,76 g.mol⁻¹) e 44,4 g de fenol (0,472 mol; 94,11 g.mol⁻¹) em 500 mL de HBr/CH₃COOH 33%. A mistura foi aquecida a 90° C por 36 horas. O precipitado formado foi então filtrado em funil de placa porosa, lavado com etanol e éter gelado. O produto branco coletado foi dissolvido em 125 mL de hidróxido sódico 1,0 mol.L⁻¹, mantendo-se o pH acima de 12. O composto foi extraído com 10 porções de 50 mL de clorofórmio, e as fases orgânicas foram combinadas e secas com sulfato de sódio anidro. O solvente foi removido por evaporação rotatória e um óleo levemente avermelhado que cristaliza a pressão reduzida foi obtido. Foram obtidos 13,4 g (47,2 mmol; 283,39 g.mol⁻¹) de 1-(*p*-toluenosulfonil)-1,4,7-triazaciclononano, com rendimento de 75 %. P.F.: 86 °C.

IV (KBr, cm⁻¹): ν (N-H) 3300; ν (C-H_{ar}) 3095-3027; ν (C-H_{alif}) 2929-2835; ν (C=C) 1606 e 1454; δ_s (C-H_{alif})1482; δ_{ass} (C-H_{alif})1384; ν_s (O-S-O) 1333; ν_{ass} (O-S-O) 1158; ν (S-O-C) 1087-859; ν_s (C-N) 1095; δ (C-H_{ar}) 820.

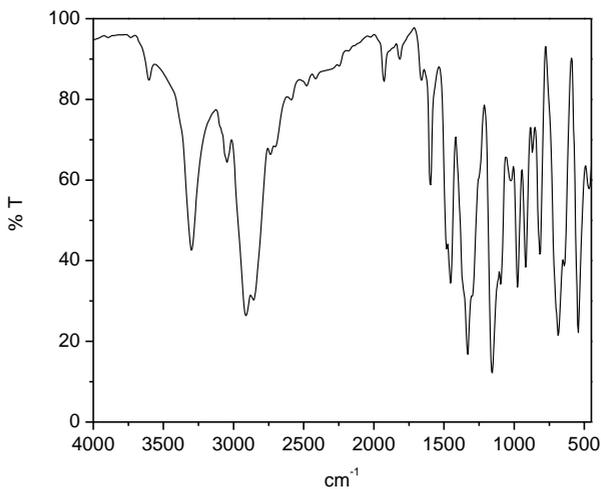
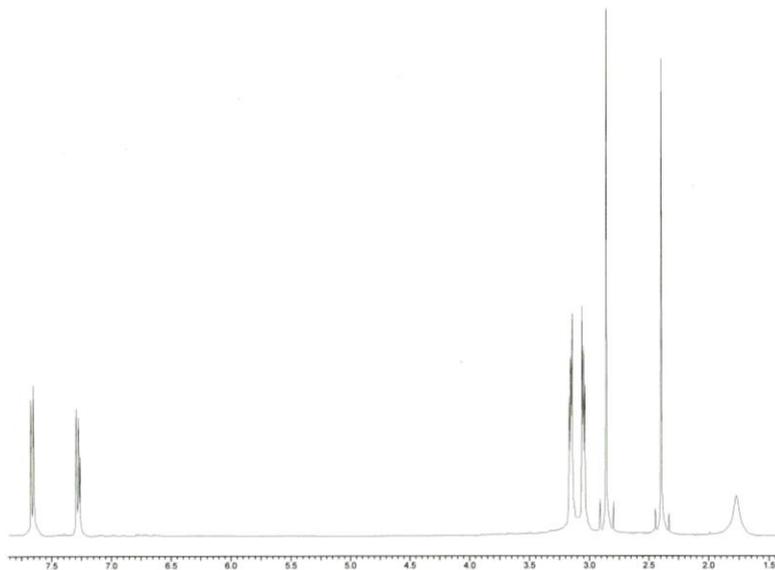
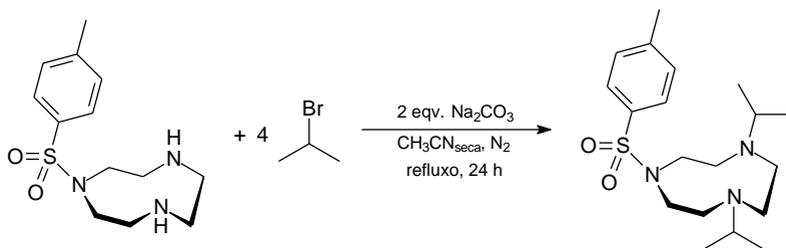


Figura 7A – Espectro vibracional IV do tacn-ts em pastilha de KBr.

RMN-¹H - δ_{H} (400 MHz, CDCl₃), em ppm: 1,77 (s, 2H, NH); 2,40 (s, 3H, CH₃); 2,86 (s, 4H, CH₂); 3,05 (m, 4H, CH₂); 3,16 (m, 4H, CH₂); 7,28 (d, 2H, CH_{ar}); 7,66 (d, 2H, CH_{ar}).

Figura 8A – Espectro RMN ^1H do tacn-ts em CDCl_3 .

5 Síntese do 1,4-diisopropil-7-(p-toluenosulfonil)-1,4,7-triazaciclonoano – tacnⁱPr₂-ts



Foram dissolvidos em um balão de 100 mL 13,4 g de 1-(p-toluenosulfonil)-1,4,7-triazaciclonoano (47,2 mmol; 283,39 g.mol⁻¹) em 40 mL de acetonitrila seca. O sistema foi desgaseificado com purga de nitrogênio por 10 minutos. Esta

solução foi transferida sob atmosfera inerte para um balão de três bocas de 125 mL contendo 20,0 g de carbonato de sódio (0,189 mol; 105,99 g.mol⁻¹). Uma solução de 17,7 mL de 2-bromopropano (1,31 g.mL⁻¹; 23,2 g; 0,189 mol; 122,99 g.mol⁻¹) e 30 mL de acetonitrila seca foi preparada em um balão de 50 mL, onde por 5 minutos foi desgaseificado com nitrogênio e transferido ao balão de três bocas inicial. O sistema foi mantido sob fluxo de nitrogênio constante até a temperatura de refluxo ser atingida. O sistema foi então lacrado e mantido sob agitação por 24 horas. O meio reacional foi resfriado a temperatura ambiente, o precipitado removido por filtração e lavado com acetonitrila gelada. O solvente foi evaporado a pressão reduzida restando um óleo amarelado o qual foi dissolvido em 100 mL de clorofórmio e lavado com uma solução aquosa (20 mL) de NaOH 1,0 mol.L⁻¹. A solução aquosa foi extraída com clorofórmio (6x 50mL), as fases orgânicas foram combinadas e secas com sulfato de sódio anidro. O solvente foi removido à pressão reduzida produzindo um óleo amarelado que foi utilizado sem maior purificação. Foram obtidos 17,0 g (46,3 mmol; 367,55 g.mol⁻¹) de 1,4-diisopropil-7-(*p*-toluenosulfonil)-1,4,7-triazaciclonoano, com rendimento de 98 %.

IV (KBr, cm⁻¹): ν (C-H_{ar}) 3064 e 3028; ν (C-H_{alif}) 2962-2871; ν (C=C) 1598 e 1448; δ_s (C-H_{alif}) 1495; δ_{ass} (C-H_{alif}) 1384; ν_s (O-S-O) 1337; ν_{ass} (O-S-O) 1158; ν (S-O-C) 1090-878; ν_s (C-N) 1091; δ (C-H_{ar}) 818.

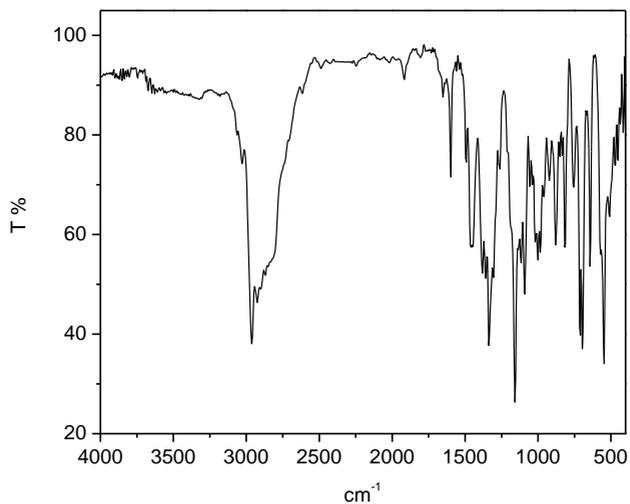


Figura 9A – Espectro vibracional IV do $\text{tacn}^{\text{iPr}}\text{Pr}_2\text{-ts}$ em pastilha de KBr.

RMN- ^1H - δ_{H} (400 MHz, CDCl_3), em ppm: 0,93 (d, 12H, CH_3); 2,41 (s, 3H, CH_3); 2,45 (s, 4H, CH_2); 2,77 (h, 2H, CH_{iPr}) ; 2,85 (m, 4H, CH_2); 3,29 (m, 4H, CH_2) ; 7,28 (d, 2H, CH_{ar}); 7,67 (d, 2H, CH_{ar}).

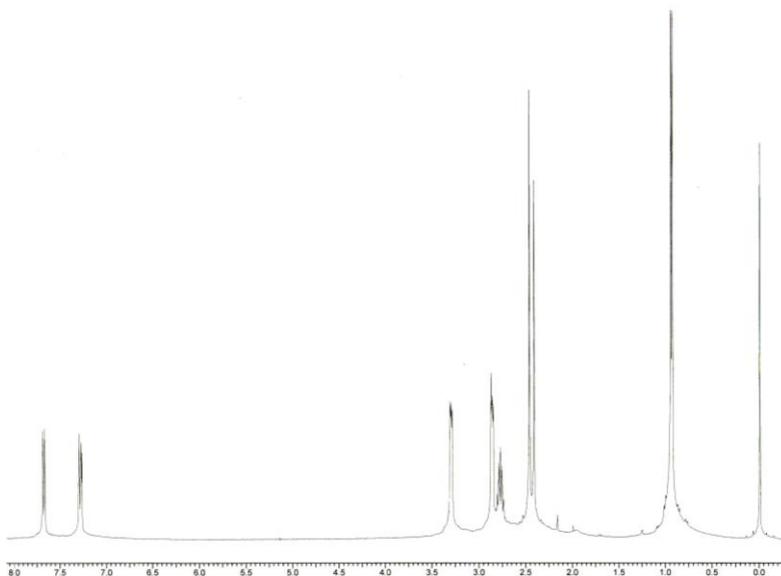
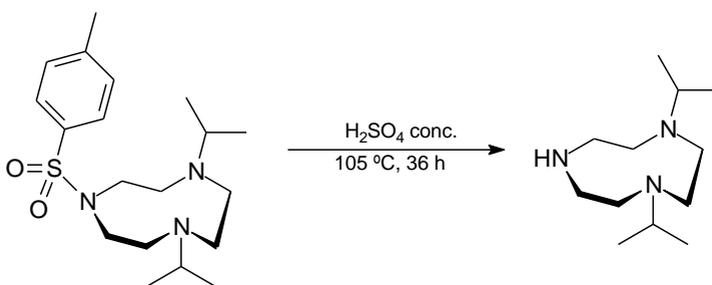


Figura 20A – Espectro RMN ^1H do $\text{tacn}^i\text{Pr}_2\text{-ts}$ em CDCl_3 .

6 Síntese do 1,4-diisopropil-1,4,7-triazaciclononano – tacn^ipr_2



Foram adicionados em um balão de 250 mL 19,6 g (53,3 mmol; $367,55 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) de 1,4-diisopropil-7-(*p*-toluenosulfonil)-1,4,7-triazaciclononano e, lentamente gotejados 70,9 mL de ácido sulfúrico concentrado sob agitação e a mistura foi aquecida

a 105 °C por 36 horas. A solução foi então resfriada e transferida lentamente sobre gelo picado. A suspensão escura intensa foi agitada com carvão ativo por 2 horas, filtrada sobre celite. O béquer foi colocado em banho de gelo e o pH elevado acima de 12 com a adição de hidróxido de sódio. O sulfato de sódio foi removido por filtração e o produto extraído da fase aquosa com diclorometano (10 x 50 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas com sulfato de sódio anidro. A mistura foi filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida produzindo um óleo âmbar que foi utilizado sem maiores purificações. Foram obtidos 10,0 g (46,9 mmol; 213,37 g.mol⁻¹) de 1,4-diisopropil-1,4,7-triazaciclonoano, com rendimento de 88 %.

IV (KBr, cm⁻¹): ν (N-H) 3257; ν (C-H_{alif}) 2962-2822; δ (C-H_{alif}) 1467; δ_{ass} (C-H_{alif}) 1384; ν_s (C-N) 1093.

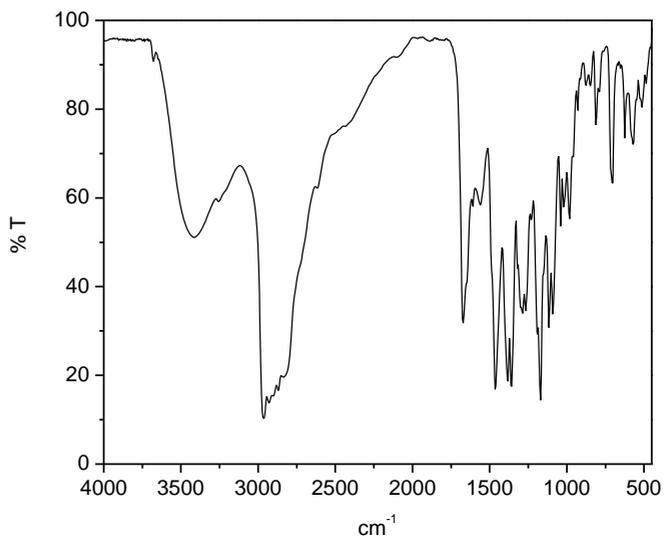


Figura 21A – Espectro vibracional IV do tacn¹Pr₂ em pastilha de KBr.

RMN-¹H - δ_H (400 MHz, CDCl₃), em ppm: 0,98 (d, 12H, CH₃); 2,46 (s, 4H, CH₂); 2,56 (m, 4H, CH₂); 2,66 (m, 4H, CH₂); 2,84 (h, 2H, CH_{iPr}).

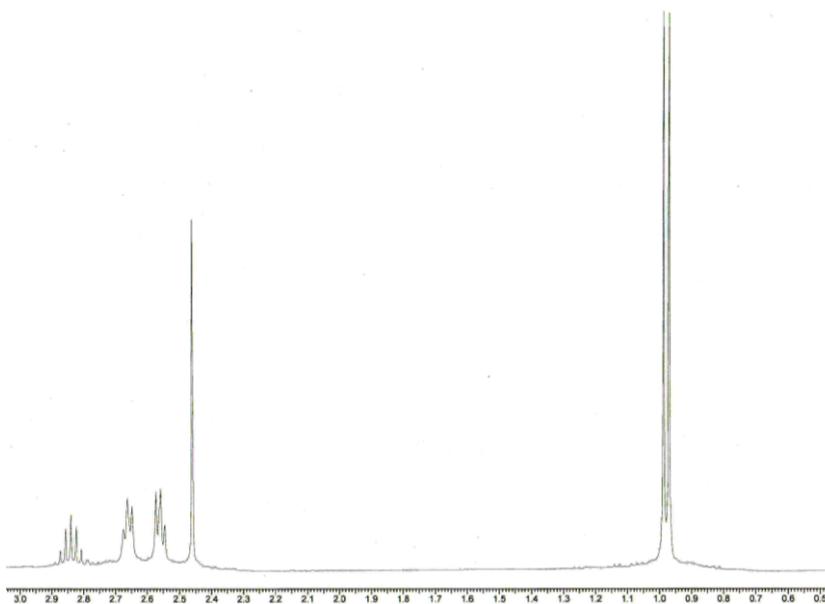
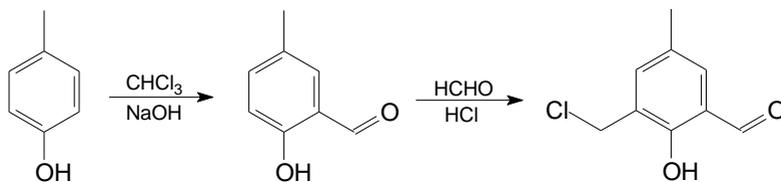


Figura 22A – Espectro RMN ^1H do tacn^iPr_2 em CDCl_3 .

7 Síntese do 2-clorometil-4-metil-6-formil-fenol – cmff



O reagente 2-hidroxi-5-metilbenzaldeído (Hmb) foi obtido submetendo-se p-cresol ao procedimento de formilação de Reimer-Tiemann com adaptações (Thoer, Denis et al. 1988).

Em um balão de 5 L, equipado com condensador e agitador mecânico, adicionaram-se 3 L de clorofórmio e 173,71 g

de p-cresol (1,6 mol, 108,14 g.mol⁻¹, 1,034 g.mL⁻¹). O balão de três bocas foi colocado em um banho com temperatura controlada entre 56 e 60 °C e, sob agitação, adicionaram-se 480 g de NaOH (12 mol, 40 g.mol⁻¹), previamente dissolvidos em 300 mL de água destilada, em pequenas porções durante as 3 primeiras horas de reação. (A adição do NaOH deve ser feita de forma lenta e cuidadosa, pois a reação é muito exotérmica). A mistura reacional foi mantida sob agitação e refluxo por mais uma hora e então deixou-se resfriar até a temperatura ambiente. A seguir, adicionou-se cerca de 1,5 L de água destilada e, ainda sob agitação, iniciou-se a acidificação com HCl concentrado até pH = 2. A fase orgânica foi então separada, lavada com água destilada, seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente evaporado à pressão reduzida. O material restante (óleo escuro viscoso) foi destilado à pressão reduzida com auxílio de uma coluna vigreux de 40 cm (55 – 65 °C a 0,1 mmHg). Obteve-se 100,0 g (0,73 mol, 136,15 g.mol⁻¹) de 2-hidróxi-5-metilbenzaldeído (Hmb) como um sólido branco cristalino com rendimento de 46% em relação ao p-cresol. P.F.: 56 °C.

IV (KBr), em cm⁻¹: ν (O-H) 3350; ν (C-H_{ar}) 3029; ν (C-H_{alif}) 2990-2864; 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.

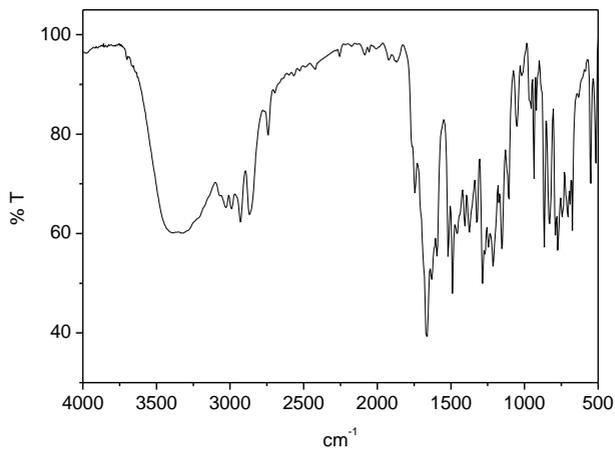


Figura 23A – Espectro vibracional IV do Hmb em pastilha de KBr.

RMN ^1H - δ_{H} (200 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,32 (s, 3 H, CH_3); 6,88 (d, 1 H, CH_{ar}); 7,32 (dd, 2 H, CH_{ar}); 9,83 (s, 1 H, CH_{ald}); 10,83 (s, 1 H, OH_{fenol} – troca com D_2O).

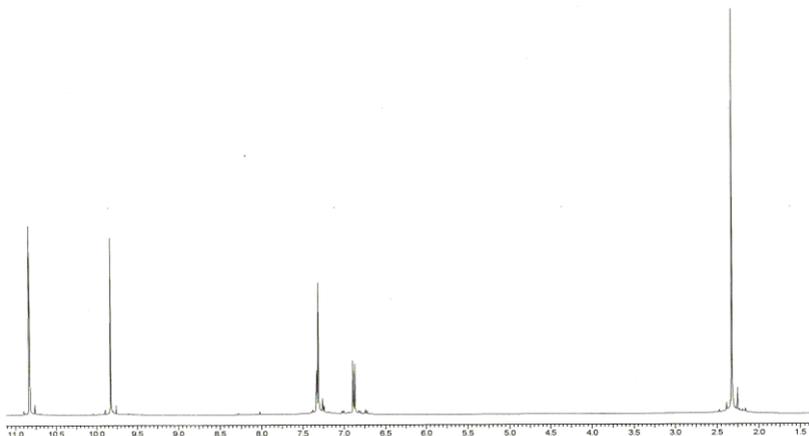


Figura 24A – Espectro RMN ^1H do Hmb em CDCl_3 .

Para obtenção do cmff adotou-se o seguinte procedimento. Em um balão de 250 mL foram acondicionados 6,4 g de Hmb (4,7 mmol, $136,15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), 7,5 mL de formaldeído 37% e 25 mL de ácido clorídrico concentrado. Essa 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 etanol absoluto 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 . Obtiveram-se 5 g do produto 2-clorometil-4-metil-6-formil-fenol (cmff) ($184,62 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) com 70 % de rendimento. P.F.: $95-96^\circ\text{C}$.

CUIDADO: 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 na presença de base. A solução reacional e todos os resíduos devem ser descartados somente após correção do pH (pH>9,0) por adição hidróxido de sódio ou potássio.

IV (KBr), em cm^{-1}): ν (O-H) 3350; ν (C-H_{ar}) 3024; ν (C-H_{alif}) 2989-2864; 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.

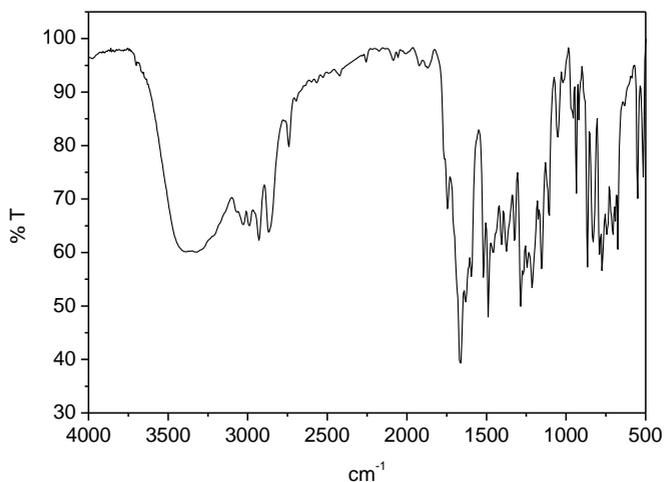


Figura 25A – Espectro vibracional IV do cmff em pastilha de KBr.

^1H NMR, ppm (CDCl_3): 2,35 (s, 3H, CH_3); 4,67 (s, 2 H, CH_2); 7,40 (2s, 2H, CH_{ar}); 9,86 (s, 1 H, CH_{ald}); 11,25 (s, 1 H, OH).

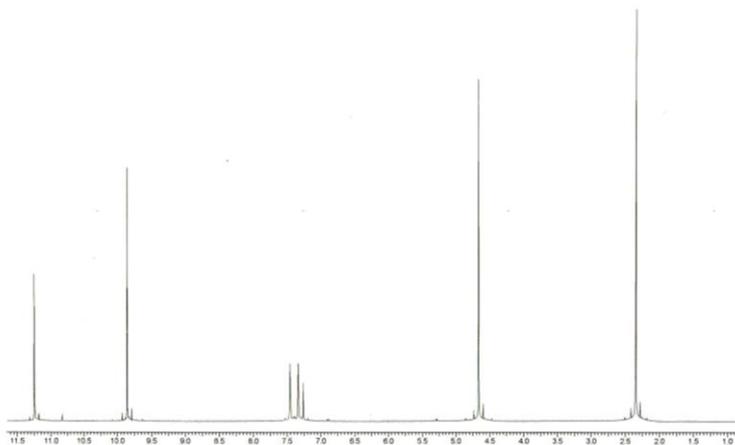
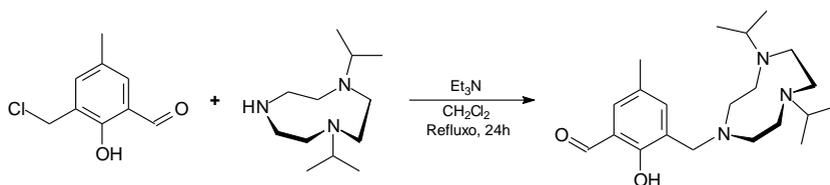


Figura 26A – Espectro RMN ^1H do cmff em CDCl_3 .

ANEXO B – Síntese do ligante 2-[(4,7-diisopropil-1,4,7-triazacilonon-1-il)metil]-6-(formil)-4-metilfenol – tacn-ⁱpr₂mff (L).

IV (KBr, cm^{-1}): ν (O-H) 3428; ν (C-H_{arom}) 3054; ν (C-H_{alif}) 2958-2814; ν (C-H_{ald}) 2736; ν (C=O) 1671; ν_s (C=C) 1595; δ_s (C-H_{alif}) 1464; δ_{ass} (C-H_{alif}) 1379; δ (O-H) 1356; ν (C-O_{fenol}) 1270; ν_s (C-N) 1087; δ (C-H_{ar}) 716.

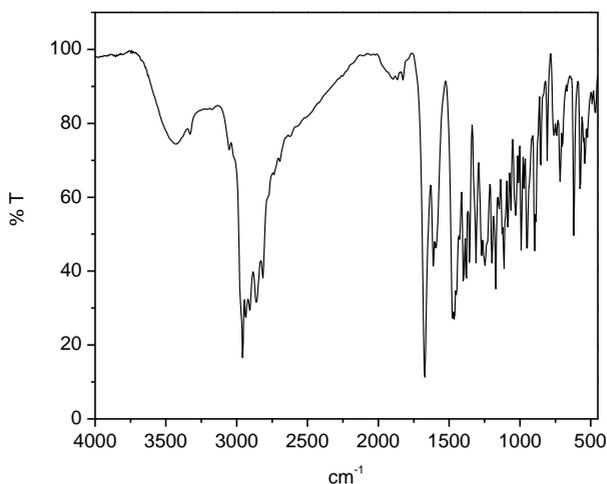


Figura 1B – Espectro vibracional IV do tacn-ⁱpr₂mff em pastilha de KBr.

RMN-¹H - δ_H (400 MHz, CDCl₃), em ppm: 0,97 (d, 12H, CH₃); 2,23 (s, 3H, CH₃); 2,47 (s, 4H, CH₂); 2,71 (m, 4H, CH₂); 2,89 (h, 2H, CH_{iPr}); 2,99 (s, 4H, CH₂); 3,81 (s, 2H, CH₂); 7,00 (s, 1H, CH_{ar}); 7,45 (s, 1H, CH_{ar}); 8,60 (s, 1H, OH); 10,47 (s, 1H, CH_{ald}).

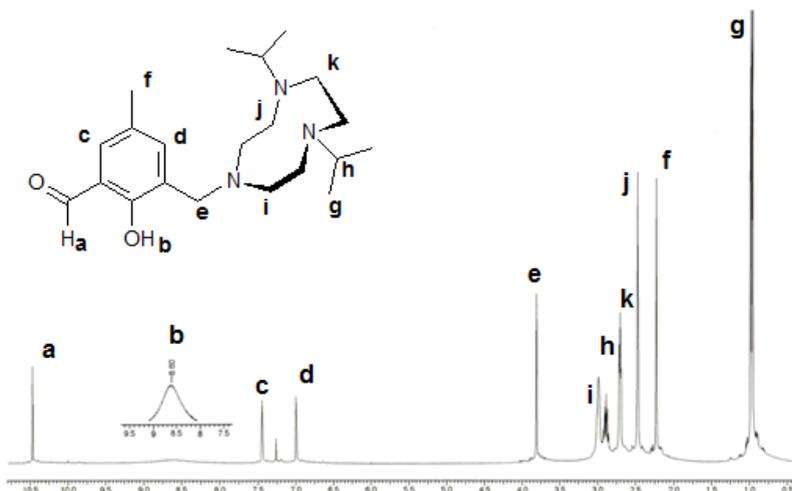


Figura 2B – Espectro RMN ¹H do tacn-ⁱpr₂mff em CDCl₃.

RMN-¹³C - δ_C (100,60 MHz, CDCl₃) em ppm: 18,53 (CH₃, ⁱPr); 20,48 (CH₃, metil); 52,89 (CH, ⁱPr); 53,47, 53,75, 55,04 (CH₂, tacn); 60,18 (CH₂, metileno); 123,26, 124,69, 126,90, 127,34, 135,96, 161,53 (C, anel aromático); 191,36 (CH, aldeído).

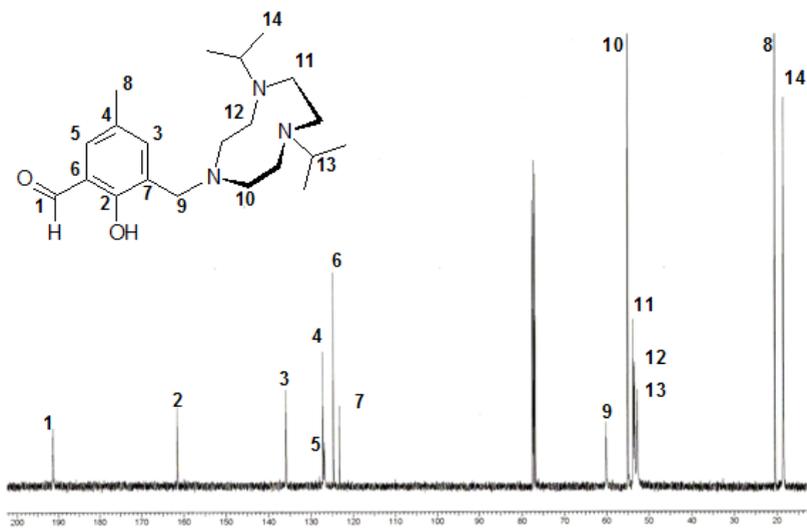


Figura 3B – Espectro RMN ¹³C do tacn-ⁱpr₂mff em CDCl₃.

Anexo C – Curvas de Lambert-Beer e perfil das transições observadas no espectro eletrônico UV-Visível do complexo 1.

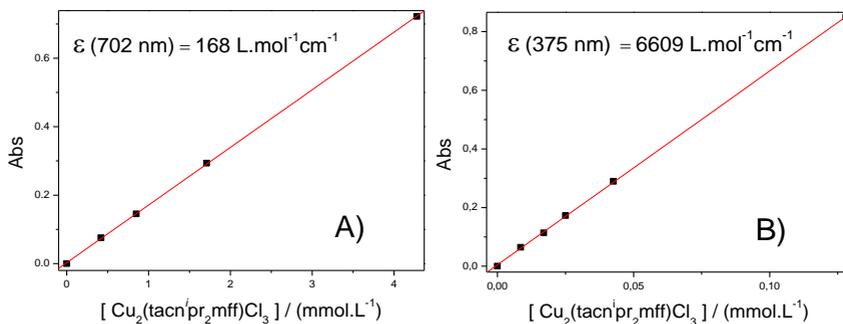


Figura 1C – Curvas de calibração de **1** em água deionizada pH ~ 3,5 – 4,5: a) 702 nm (*d-d*); b) 375 nm (TCLM). $[1] = 0,01- 4,50 \text{ mmol.L}^{-1}$. Cubetas de quartzo de 4 mL e 1 cm de caminho óptico.

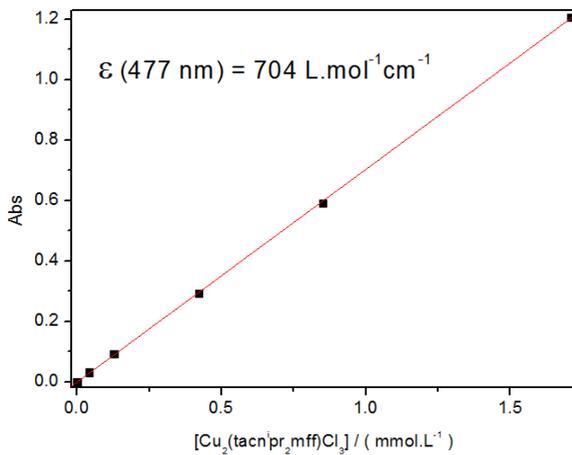


Figura 2C – Curva de Calibração de **1** em água deionizada pH ~ 4,0: ombro em 477 nm (transições *d-d*). [1] = 0,04 – 1,71 mmol.L⁻¹. Cubetas de quartzo de 4 mL e 1 cm de caminho óptico.

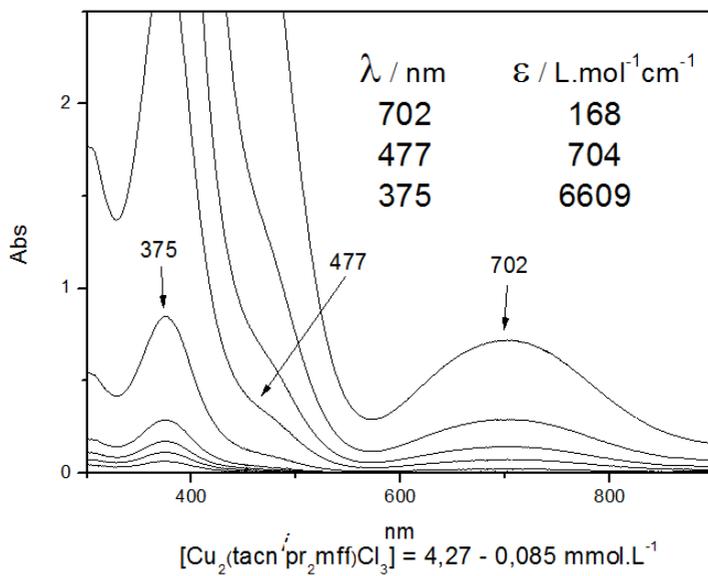


Figura 3C – Perfil espectral de **1** em água deionizada em pH de dissolução entre 3,5 e 4,5, de acordo com a diminuição da concentração do complexo em solução.