



UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
CFM - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química
Laboratório de Equilíbrio Químico

**ESTUDOS DOS EQUILÍBRIOS DE COMPLEXAÇÃO DO ÍON Zn(II)
COM O LIGANTE ÁCIDO CARBOXÍLICO (α , γ , DICARBONÍLICO) E
HIDRÓLISE DO DNA.**

Aluno: Ana Paula Gonçalves Bohm
Orientador: Prof. Dr. Bruno Szpoganicz

Florianópolis, novembro de 2010.

Ana Paula Gonçalves Bohm

**ESTUDOS DOS EQUILÍBRIOS DE COMPLEXAÇÃO DO ÍON Zn(II)
COM O LIGANTE ÁCIDO CARBOXÍLICO (α , γ , DICARBONÍLICO) E
HIDRÓLISE DO DNA.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Química sob orientação do Prof. Dr. Bruno Szpoganicz.

Florianópolis, 2010.

Ana Paula Gonçalves Bohm

**ESTUDOS DOS EQUILÍBRIOS DE COMPLEXAÇÃO DO ÍON Zn(II)
COM O LIGANTE ÁCIDO CARBOXÍLICO (α , γ , DICARBONÍLICO) E
HIDRÓLISE DO DNA.**

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Bruno Szpoganicz.
Orientador

Prof. Dra. Maria Marta de Souza Sierra

Dra. Maryene Alves Camago

Florianópolis, 2010.

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

Albert Einstein

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

Herbert de Souza

Agradecimentos:

- A minha família, em especial aos meus pais, meu irmão Alexandre, por apoiarem meus sonhos e acreditarem na minha capacidade.
- Ao professor Bruno Szpoganicz pela orientação, amizade e confiança.
- Aos meus colegas de laboratório de equilíbrio químico: Anderson, Bruna, Camila, Fabiana, Fabio, Julio, Suéli, Thiago, pela agradável convivência.
- A professora Neiva Rosso que me abriu caminhos nunca antes pensados, além de me apresentar, na prática, outras possibilidades imprescindíveis a este trabalho.
- A Gledir Martins pela oportunidade de realização deste trabalho.
- Aos meus amigos que fiz no decorrer do curso Thamara, Graziela, Rosiane, Danilo e em especial a Adrielle que sempre esteve ao meu lado e fez com que essa jornada se tornasse muito mais agradável.
- As minhas amigas Cristiane, Juliana e minha prima Marcela pelos momentos de conforto, amizade e apoio.
- A todos os professores do Departamento de Química da UFSC que me ajudaram nessa formação.
- Ao laboratório de Expressão Gênica do Departamento de Bioquímica – UFSC.
- À Central de Análises e aos técnicos que colaboraram para obtenção dos resultados.
- Ao Departamento de Química da UFSC pelo suporte estrutural.
- E a todos de que, de alguma maneira, estiveram do meu lado, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	RESUMO.....	11
1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1	Enzimas.....	14
2.2	DNA.....	15
2.3	Hidrolases - Nucleases.....	16
2.4	Química Bioinorgânica do Zn.....	17
2.5	ligantes ácidos carboxílicos (α , γ -dicarbonílico).....	18
3.	OBJETIVOS	19
3.1	Objetivo Geral	19
3.2	Objetivo Específico	19
4.	METODOLOGIA.....	20
4.1	Materiais	20
4.2	Métodos e Instrumentação	20
4.2.1	<i>Síntese do ligante</i>	20
4.2.2	<i>Espectroscopia de Infravermelho – IV</i>	21
4.2.3	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear RMN 1H</i>	21
4.2.4	Estudos de equilíbrio químico	22
4.2.5	<i>Síntese do Complexo</i>	23
4.2.6	<i>Testes com DNA</i>	23
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1	Caracterização do ligante	25
5.1.1	<i>Espectroscopia de Infravermelho – IV</i>	25
5.1.2	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear RMN 1H</i>	26
5.2	Caracterizações da interação com Zn(II).....	27
5.2.1	<i>Estudos de equilíbrio potenciométrico</i>	27
5.2.1.1	<u>Constantes de protonação do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)-2,4-dionabutanóico</u>	27
5.2.1.2	<u>Estudo de equilíbrio potenciométrico do sistema ácido 4-(4-metoxifenil)-2,4-dionabutanóico – Zn(II)</u>	30
5.2.3.1	<u>Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)</u>	33
5.2.3	<i>Testes com DNA</i>	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A dupla hélice proposta por Watson e Crick.....	16
Figura 2. Estrutura do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)-2,4-dionabutanóico....	18
Figura 3. Etapas da síntese do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico - 2,4 – diona.....	20
Figura 4. Espectro de I.V. (KBr) do composto ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4-diona.....	25
Figura 5. Espectro de ¹ H RMN (200MHz, DMSO-d ₆) do composto ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4-diona.....	26
Figura 6. Curva de equilíbrio potenciométrico do Ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico -2,4 – diona.....	27
Figura 7. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico -2,4 – diona.....	29
Figura 8. Curvas de equilíbrio potenciométrico: A - 0,050 mmol do Ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4–diona, B – 0,050mmol do Ligante ácido 4-(4-/metoxifenil)butanóico-2,4–diona e 0,050 mmol Zn(II) e C - 0,10 mmol do Ligante ácido 4-(4-/metoxifenil)butanóico-2,4–diona e 0,050 mmol Zn(II).....	31
Figura 9. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o sistema ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico -2,4 – diona : Zn (II), (1:1).....	32
Figura 10. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o sistema ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico -2,4 – diona : Zn (II), (2:1).....	33
Figura 11. Espectro de IV, A - ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4–diona e B - complexo ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4–diona – Zn (II) na proporção 2:1.....	34
Figura 12. Teste de clivagem de DNA plasmidial por Complexo, em diferentes pHs a 50 °C e incubação de 48 horas. Poço 1: controle – somente DNA em 25 mM de PIPES pH 7.0 ; poços 2: DNA + complexo 250 µM em 25 mM de PIPES pH 7.0; Poço 3: controle – somente DNA em 25 mM de PIPES pH 8.; poços 4: DNA + complexo 250 µM em 25 mM de CHES pH 8,0; poço 5: controle – somente DNA em 25 mM de CHES pH 10; poços 6: DNA + complexo 250 µM em 25 mM de CHES pH 10.....	36

Figura 13. Teste de clivagem de DNA plasmidial por Complexo, em diferentes pHs a 50 °C e incubação de 48 horas. Poço 1: controle – somente DNA em 25 mM de PIPES pH 7.5 ; poços 2: DNA + complexo 250 µM em 25 mM de PIPES pH 7.5; Poço 3: controle – somente DNA em 25 mM de CHES pH 9.5 ; poços 4: DNA + complexo 250 µM em 25 mM de CHES pH 9.5.....

36

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Logaritmos das constantes de desprotonação do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico -2,4 – diona em solução aquosa.....	28
Tabela 2. Logaritmos das constantes de estabilidade dos complexos ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico -2,4 – diona – Zn(II).....	31
Tabela 3. Comparação das bandas do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico -2,4 – diona com as bandas do complexo ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico -2,4 – diona – Zn (II) na proporção 2:1.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA – ácido desoxirribonucleico

Zn – Zinco

pH – potencial hidrogênionico

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

IV – Infravermelho

s - singleto

d - duplete

t - tripleto

δ – deslocamento químico

RESUMO

O reconhecimento de complexos metálicos capazes de interagir com DNA e proteínas tem atraído grande atenção devido ao avanço da ciência biomédica. Neste trabalho apresentamos um procedimento sintético para o desenvolvimento de complexos de relevância biológica. Com base nesse procedimento, sintetizamos o ligante ácido 4-(3-metoxifenil)-2,4-dionabutanóico, anteriormente descrito na literatura. Foram realizados estudos de equilíbrio potenciométrico do ligante na presença e na ausência do íon metálico Zn(II) em diferentes proporções. As constantes de formação de todas as espécies foram determinadas e a distribuição das espécies detectadas em solução foi calculada. Foi feita a síntese do complexo L_2Zn (Ligante:Metal) em sua caracterização, foi utilizada a técnica de espectroscopia de infravermelho. A realização de testes com DNA revelou que não houve clivagem hidrolítica do DNA na presença dos complexos em solução nas diferentes proporções estudadas.

Palavras-chave: complexos metálicos, zinco(II), DNA.

1. Introdução

As enzimas são os mais eficientes catalisadores dos sistemas vivos, sendo muitas vezes a força motora da sua existência. Sua complexidade tem inspirado vários pesquisadores a tentar imitá-las, como Crahm¹, quando percebeu que as estruturas enzimáticas poderiam ser substituídas por compostos menos complexos.

Com a finalidade de sintetizar enzimas artificiais, muitas configurações têm sido propostas. Uma área de grande interesse são os estudos de complexos metálicos capazes de interagir com o DNA e proteínas. Esses complexos que possuem essa interação são chamados de nucleases e proteases artificiais, ou seja, compostos de baixa massa molar que mimetizem uma enzima natural.

As nucleases são enzimas capazes de clivar, ou cortar, a ligação fosfodiéster da molécula de DNA.² Sua descoberta foi fundamental no desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, em técnicas de sequenciamento de DNA, mapeamento genético e mapeamento de cromossomos humanos.³ Por esta razão, cada vez mais se tem buscado o desenvolvimento e síntese de enzimas-modelo.⁴

Complexos de zinco(II) fazem parte destes compostos em estudos. E muitos^{5,6} têm demonstrado alta atividade em relação à clivagem de biomoléculas. Numerosas enzimas e proteínas utilizam o íon zinco(II) como principal sítio da sua atividade biológica. Suas propriedades químicas e físicas, incluindo sua facilidade de ligação estável com macromoléculas, fazem-no altamente adaptável a se associar com diversas enzimas de funções biológicas. Estas e outras propriedades formam a base para sua extensa participação no controle da transcrição genética e outros processos biológicos fundamentais.

O ligante em estudo, um ácido carboxílico (α , γ -dicarbonílico), tem atraído grande atenção. E vários estudos mostram a sua eficiência biológica como inibidor na replicação viral do HIV, e sua interação direta com íons metálicos presentes no sítio ativo da enzima NS5B polimerase do HCV (virus da hepatite C), inibe também a replicação desse vírus.^{7,8} Nesse projeto serão realizados estudos dos equilíbrios de complexação do ligante ácido 4-(3-metoxifenil)-2,4-dionabutanóico com o íon Zn(II) para determinar as espécies existentes em função do pH, e realizar testes com DNA.

2. Revisão da Literatura

As formas como íons metálicos influenciam o seu ambiente de coordenação, e como esse ambiente influencia suas propriedades intrínsecas, requerem o conhecimento da química de coordenação, surgida no final do século XIX, através de estudos de complexos coloridos de cobalto, de Werner.

A química de coordenação em solução surgiu na década de 1950, com os trabalhos de equilíbrio em solução, de Bjerrum e Schwarzenbach.^{9,10} Uma realização específica foi o reconhecimento do efeito quelato.¹¹ Outra constatação, foi a de padrões presentes na preferência de íons metálicos por ligantes com átomos doadores com diferentes eletronegatividades, baseada nas classificações de ácidos e bases dos tipos A e B, de Schwarzenbach, e nos princípios de ácidos e bases ‘duros e macios’, de Pearson.⁹

O interesse pelo estudo de íons metálicos relacionados aos sistemas vivos surgiu após a constatação de que vários metais desempenham papéis essenciais à vida. Esse interesse abriu espaço para uma nova área de pesquisa: química bioinorgânica.¹² Nas últimas décadas surgiram inúmeros trabalhos cujo objetivo principal é a busca por compostos de baixa massa molecular que sejam capazes de modelar características estruturais e/ou funcionais de inúmeros sistemas biológicos. Desde então a química bioinorgânica passou a ser uma ciência multidisciplinar que promove a interação de diversas áreas da ciência como: química, bioquímica, física, biologia, farmacologia, medicina, entre outras, a fim de desenvolver a compreensão do modo de ação dos metais nos sistemas vivos e de suas interações a níveis moleculares.¹³ Graças a essa interdisciplinaridade, inúmeros progressos nessa área têm sido feitos comprovando que a química bioinorgânica promove o desenvolvimento científico de muitas áreas afins, através da assimilação de novos conhecimentos.

Uma de suas subáreas que está em constante desenvolvimento é o campo que engloba a mimetização de enzimas. Esse campo no qual tentamos “imitar a vida” é chamado “química biomimética”. Em particular, as enzimas artificiais.

Esta catálise enzimática altamente efetiva existente na natureza, tem inspirado muitos pesquisadores a tentar imitá-la há quase meio século, quando Crahm percebeu que as estruturas enzimáticas, altamente complexas, poderiam ser

substituídas por compostos mais simples.¹ O uso das enzimas artificiais não está relacionado com a estrutura das enzimas naturais, mas sim com estruturas menos complexas que são capazes de realizarem catálises de espécies importantes.¹⁴

Diversos complexos de metais de transição, como ferro(III), zinco(II) e cobre(II)^{15,16,17} foram utilizados como enzimas artificiais, sendo muitos deles testados como nucleases e proteases químicas.

Em decorrência do relevante papel dos complexos metálicos como possíveis fármacos, percebe-se a importância dos estudos de interação de complexos metálicos com DNA e proteínas, visando o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares.

2.1 Enzimas

As enzimas são as biomoléculas mais notáveis e especializadas dos sistemas vivos, e apresentam uma extraordinária eficiência catalítica comparada aos demais catalisadores. Todas as enzimas são proteínas globulares solúveis em água, e tendem a ter formas esféricas. Praticamente, todas as reações que caracterizam o metabolismo celular são catalisadas por enzimas. Além de acelerar as reações químicas, as enzimas apresentam um alto grau de especificidade por seus substratos, e atuam em soluções aquosas em condições suaves de temperatura e pH.^{23,24}

A efetividade de uma enzima como catalisador é denominada de atividade enzimática. Esta atividade vai depender do formato tridimensional da proteína, particularmente do seu sítio ativo que é responsável pela catálise. Em geral, o sítio ativo é uma abertura na qual o substrato se encaixa e se liga especificamente. Todas as etapas de quebra e formação de ligações ocorrem enquanto o substrato está nessa condição.²³ A especificidade de uma enzima por seu substrato é um exemplo do fenômeno conhecido por “reconhecimento molecular”. A habilidade de uma molécula em reconhecer outra depende em grande parte da estrutura da região do sítio ativo.²⁵

As principais propriedades que caracterizam as enzimas como catalisadores são:^{23,24,25}

- ✓ Aumento da velocidade das reações em 10^{10} a 10^{23} vezes em relação às não catalisadas;

- ✓ Em geral, as reações ocorrem em condições suaves de temperatura (20°-40°C), sob pressão atmosférica e na faixa de pH de 5-8;
- ✓ A atividade catalítica pode variar de acordo com a concentração do substrato, produto ou outras espécies do meio reacional;
- ✓ Quimiosseletividade – podem atuar em somente um tipo de grupo funcional, mesmo na presença de outros grupos reativos;
- ✓ Catalisam diversos tipos de reações químicas.

Em geral as enzimas são classificadas segundo a comissão de enzimas da União Internacional de Bioquímica em seis grandes grupos, de acordo com o tipo de reação que catalisam, que são: ^{26,27}

1. Oxidorredutases: catalisam reações de oxidação-redução;
2. Transferases: catalisam a transferência de um grupo de uma molécula doadora para uma aceptora;
3. Hidrolases: catalisam a clivagem hidrolítica de ligações C-O, C-N, C-C e ligações envolvendo anidrido fosfórico;
4. Liases: catalisam a clivagem de ligações C-O, C-N, C-C e outras ligações por eliminação, clivagem de duplas ligações ou anéis, e adição de grupos a duplas ligações;
5. Isomerases: catalisam transferências de grupos dentro de uma molécula promovendo variações estruturais e geométricas;
6. Ligases: catalisam a formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à clivagem de ATP.

Neste trabalho será proposta uma mimetização de enzimas hidrolases, capazes de catalisar a hidrólise das ligações fosfodiéster do DNA.

2.2 DNA

A hidrólise do DNA é uma importante reação enzimática e uma das mais difíceis de reproduzir em laboratório, por causa da estabilidade desse ácido nucléico à hidrólise.²⁹ Esta hidrólise é impedida principalmente pela grande carga negativa que inibe o ataque dos nucleófilos no esqueleto do DNA.³² As ligações encontradas nos fosfodiésteres podem ser muito estáveis. A hidrólise espontânea do DNA em solução neutra é tão lenta que a constante de velocidade para esse processo é

desconhecida.³³ Em algumas citações estima-se em um milhão de anos para o tempo de meia-vida da hidrólise de DNA.²⁹

A estrutura tridimensional do DNA foi resolvida e publicada por Watson e Crick há mais de 50 anos.³⁴ A estrutura é composta por duas cadeias polinucleotídicas, de sentidos opostos, enrolados em torno de um eixo, formando uma dupla hélice. Estas duas cadeias são mantidas unidas através de ligações de hidrogênio entre as bases de cada fita, mas sempre pareando uma adenina com uma timina e uma citosina com uma guanina (Figura 1).

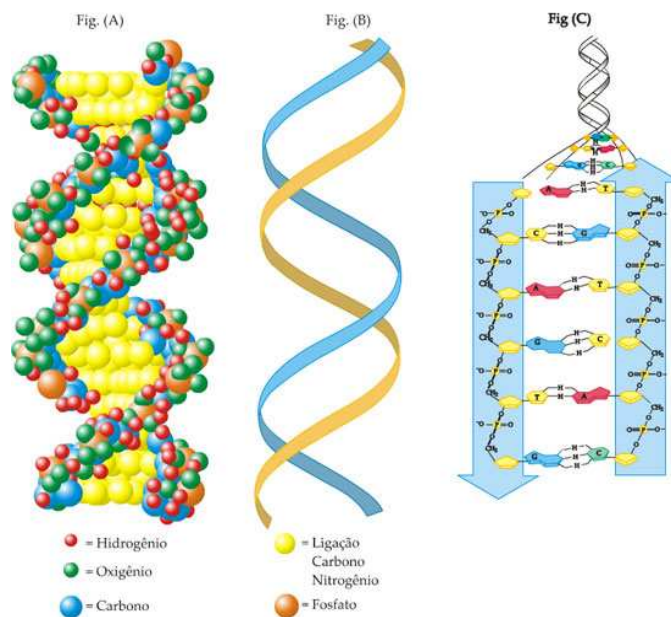


Figura 1 – A dupla hélice proposta por Watson e Crick.

2.3 Hidrolases – Nucleases

Como mencionado acima, as hidrolases são enzimas capazes de clivar hidroliticamente uma série de ligações químicas, como: amidas, ésteres, éteres, nitrilas, entre outras. Neste trabalho a classe de interesse é das fosfodrolases, onde se encontram as nucleases. São chamadas de nucleases as enzimas que catalisam a hidrólise das ligações fosfodiéster do DNA e RNA²⁸.

Entre as suas funções destacam-se a de proteção do código genético, pois clivam partes mutantes do DNA que poderiam levar à multiplicação de células com atividades fora do padrão previsto. Um grande número de nucleases apresenta

atividade dependente da presença de íons metálicos²⁹. O papel dos metais nas nucleases varia de acordo com a estrutura do sítio ativo, existindo fortes correlações entre a utilização de íons metálicos para aumento de afinidade da enzima por sítios específicos dos ácidos nucléicos, e estabilização dos grupos fosfato no esqueleto de ligações fosfodiéster³⁰. A dependência está relacionada com a capacidade dos metais em formarem nucleófilos (OH^-) em condições suaves de pH, de atuarem como suporte para o substrato (grupo fosfato), de neutralizarem a carga do substrato, de ativarem as ligações de ésteres de fosfato e estabilizarem o estado de transição.²⁹

Embora um grande número de nucleases naturais seja conhecido, o desenvolvimento de nucleases sintéticas tornou-se de grande utilidade e interesse. Um desses interesses pode ser exemplificado pelo uso desses compostos como enzimas de restrição sintéticas, compostos capazes de reconhecer pequenas seqüências na dupla hélice do DNA, e catalisar a hidrólise da dupla fita nestes sítios, auxiliando na elucidação da seqüência do genoma humano.³¹

2.4 Química Bioinorgânica do Zn

O zinco é um dos metais mais utilizados em seres vivos. Numerosas enzimas e proteínas utilizam o zinco como principal sítio de sua atividade biológica, catalisando reações como as da hidrólise de ésteres e peptídeos. A importância biológica do zinco origina-se basicamente da sua falta de química de oxirredução, por possuir em seu subnível **d** todos os orbitais preenchidos (d^{10}).¹⁸

Como o objetivo deste trabalho é a clivagem do DNA de maneira hidrolítica, optou-se pelo íon Zn(II) , que é bastante lábil, inerte quanto à oxirredução, possui boa afinidade eletrônica e flexibilidade na geometria de coordenação. Logo, o Zn(II) se ajusta bem ao seu papel de catalisador de reações ácido-base específicas.

As interações entre os íons metálicos e ligantes inorgânicos (ânions) ou orgânicos, obedecem ao princípio de ácidos e bases, moles e duros, sugerido por Pearson, em 1963.¹¹ Baseado no conceito de ácido e base de Lewis, no qual o primeiro é uma substância receptora de um par de elétrons e a segunda uma substância doadora de um par de elétrons, a classificação de Pearson estabelece que ácidos duros interagem melhor com bases duras. Os ácidos moles preferem

bases moles. Portanto, o Zn, segundo Pearson, é um ácido intermediário, forma complexos estáveis com doadores duros e moles.

2.5 ligantes ácidos carboxílicos (α, γ -dicarbonílicos)

O ligante em estudo, um ácido carboxílico (α, γ -dicarbonílico), tem apresentado grande eficiência nas interações com íons metálicos^{7,8,19}. Seu nome convencional (IUPAC) é ácido 4-(4-metoxifenil)-2,4-dionabutanóico, apresenta um grupo carboxílico e duas carboxilas presentes na dicetona (figura 1). É um ligante bidentado que pode se coordenar de duas maneiras, formando um anel de quatro ou cinco membros. A presença do anel aromático e de substituintes como o p-metoxi pode ser uma possibilidade de interação direta com o DNA.

Esse ligante apresenta ponto de fusão entre 157-159°C, e possui pouca solubilidade em água. Uma das propriedades físicas mais conhecidas dos ácidos carboxílicos é a formação de dímeros, que lhe confere uma maior rigidez molecular e linearidade pela presença das ligações duplas.^{20, 21,22}

Além disso, esse ligante tem atraído grande atenção, e vários estudos mostram a sua eficiência biológica.

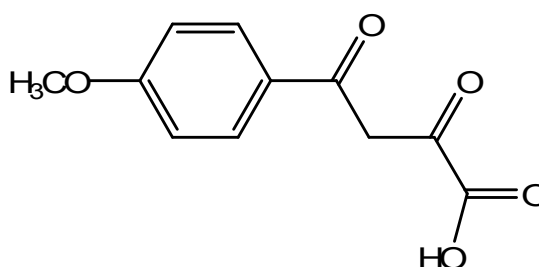


Figura 2 - Estrutura do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)-2,4-dionabutanóico

3. Objetivos

3.1 Geral

Caracterizar os equilíbrios do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)-2,4-dionabutanóico na complexação com o íon Zn(II), para identificar as espécies existentes em solução, em função do pH. E realizar testes de clivagem com DNA.

3.2 Específicos

- ✓ Síntese do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)-2,4-dionabutanóico;
- ✓ Caracterização do ligante a partir de técnicas espectroscópicas de NMR ^1H , IV.
- ✓ Determinar as constantes de protonação dos ligantes;
- ✓ Realizar titulações potenciométricas do ligante na ausência e na presença do íon Zn(II) nas proporções 1:1 e 2:1 ligante:metal;
- ✓ Calcular as constantes de formação dos complexos 1:1 e 2:1 (ligante:metal);
- ✓ Caracterização do complexo por espectroscopia de IV.
- ✓ Verificar a capacidade dos complexos em soluções nas diferentes proporções de clivar moléculas de DNA.

4. Metodologia

4.1 Materiais

Os seguintes reagentes, materiais, gases e solventes foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia: álcool etílico Absoluto (vetec), Ácido clorídrico 37% PA, cloreto de potássio PA (Carlos Erba reagentes), Cloreto de Zinco, p-metoxi acetofenona (Vetec), 1,2dimetoxietano (Fluka), hidreto de sódio, dietil oxalato.

4.2 Métodos e Instrumentação

4.2.1 Síntese do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico -2,4 – diona

O ligante foi sintetizado conforme a metodologia descrita por Luciano Silva.²⁰ O método sintético descreve uma reação clássica de condensação entre uma arilcetona e um diéster (em razão molar 2:1). Sendo realizada em duas etapas distintas, onde a primeira obteve-se o éster 4-(4-alcóxifenil)butano-2,4-diona-1-ato de etila, correspondente ao produto da monocondensação, com rendimento aproximadamente de 70%. Como mostra a figura 3.

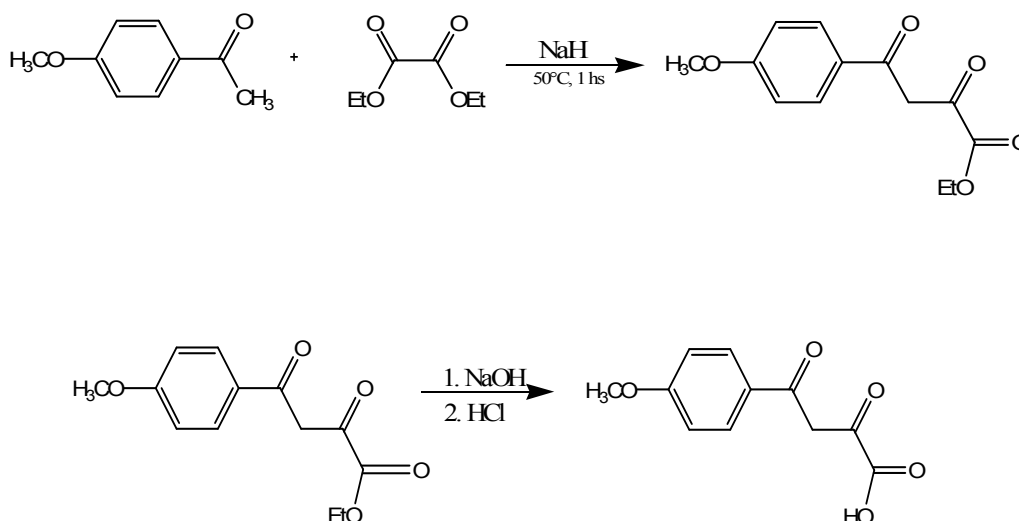


Figura 3 - Etapas da síntese do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico -2,4 – diona.

Em um balão de 25ml equipado com condensador de refluxo e agitador magnético, colocou-se 4-metoxiacetofenona (20 g, 0,072 moles), dietileno glicoldimetileter (50 ml) e hidreto de sódio (2,0g, 0,08 moles). Eleva-se a temperatura, lentamente, até 50°C, mantendo-se por 20 minutos. Adiciona-se dietil oxalato (10,5 g, 0,072 moles). Mantem-se o aquecimento e a agitação até formar uma massa densa (~ 1 hora). Resfria-se a solução, adiciona-se em água e gelo (300 ml) e neutraliza-se com HCl 2M. O sólido obtido é separado por filtração e recristalizado em etanol. Obtém-se um sólido amarelo.

Na segunda etapa foi realizado a hidrólise básica do éster obtendo um único produto, o ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4-diona.

Em um balão de 250ml equipado com agitador magnético e condensador de refluxo, adiciona-se 4-(4-alcóxifenil)butano-2,4-diona-1-ato de etila (1g, 2,9mmol), hidróxido de potássio (0,3g, 6 mmol), etanol (50 ml) e água (10 ml). Aquece-se a mistura a refluxo por uma hora, resfria-se a temperatura ambiente, verte-se sobre água e gelo, neutraliza-se com solução de HCl 2M. Obtém-se um sólido amarelo que é separado por filtração e recristalizado em etanol.

4.2.2 Espectroscopia de Infravermelho – IV

As análises de infravermelho (IV) foram feitas em um espectrofotômetro da Perkin Elmer FTIR 16PC, na região 4000 a 400 cm^{-1} na central de análises do Departamento de Química – UFSC. As amostras foram analisadas em pastilhas de KBr.

4.2.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio RMN ^1H .

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram obtidos em um espectrômetro Varian (200MHz), na central de análises do Departamento de Química – UFSC. Utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ ppm), e D_2O como solvente.

4.2.4 Estudos de equilíbrio químico

Serão realizados estudos de equilíbrio químico no ligante, ácido 4-(3-metoxifenil)-2,4-dionabutanóico, a fim de determinar suas constantes de protonação. Os equilíbrios de complexação desse ligante com o íon Zn(II) serão caracterizados e as constantes de formação dos complexos 1:1 e 2:1 ligante:metal serão determinadas por titulação.

A técnica de titulação potenciométrica é muito empregada para estudos de medidas de equilíbrio de complexos metálicos em solução. Foi utilizado um titulador automático Metrohm 848 Titrino Plus, acoplado com um eletrodo combinado do tipo Ag/AgCl. Todas as titulações foram realizadas em meio de etanol e água (70:30% v/v)³⁵, devido à solubilidade do ligante, em uma célula termostatizada ($25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) e selada com capacidade de 50 mL. Durante a titulação a solução experimental foi mantida sob constante agitação com o uso de um agitador magnético. O titulante KOH (0,100 mol/L) isento de CO_2 foi adicionado em alíquotas de 0,03 mL. A força iônica foi mantida $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ com KCl e sob fluxo de argônio para eliminar a presença de CO_2 atmosférico. As soluções foram preparadas com água/etanol (70/30% v/v), bidestilada, na presença de KMnO_4 e fervida. A calibração do eletrodo foi ajustada através de diversas titulações com soluções diluídas de HCl aquoso e HCl água/etanol (70/30% v/v), para se obterem leituras diretas de $-\log[\text{H}^+]$ e os erros na faixa alcalina são minimizados com o ajuste da inclinação. A faixa de pH considerada para as medidas compreende o intervalo de 2 a 11. Sempre que possível, 10 pares de dados (volume de base e pH) por equivalente foram obtidos. Cada experimento foi realizado em triplicata e cada constante uma média dos valores obtidos nos cálculos. O pK_w da água contendo $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl utilizado para os cálculos é de 13,78,³⁶ e, para a solução contendo água/etanol (70/30% v/v) com $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl, é de 14,87.³⁶

No arquivo de entrada para o cálculo das constantes de estabilidade dos sistemas em estudo, envolvendo metal, é necessário também fornecer as constantes de hidrólise do metal. Os valores dessas constantes foram calculados para as condições experimentais desse trabalho. A solução metálica de Zn(II) foi preparada a partir do sal metálico comercial e padronizada por titulação com EDTA (ácido etinloditetracético).³⁷

As constantes foram determinadas com auxílio do programa BEST7 e os diagramas de distribuição de espécies presentes em solução, em função do pH, foram obtidos com o programa SPECIES.^{36,38}

O programa BEST7 utiliza os dados das curvas de titulação para calcular as constantes de estabilidade e as constantes de protonação dos ligantes e complexos. Os dados para o programa consistem em fornecer o número de milimoles de cada componente, as constantes de equilíbrio inicialmente estimadas de cada espécie que pode ser formada a partir dos componentes da solução, e o perfil de pH determinado experimentalmente versus a composição da solução. O programa emprega equações de balanço de massa para todas as espécies presentes a cada incremento de base adicionada, e resolve a concentração de cada espécie presente. Nos cálculos deve-se sempre buscar a minimização do desvio padrão do sistema entre os valores experimentais de pH encontrados na titulação, e os calculados.³⁸

4.2.5 Síntese do complexo

A partir dos dados obtidos na titulação potenciométrica e da curva de distribuição das espécies, do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4-diona e o metal Zn(II) foi possível determinar a faixa de pH onde o complexo L_2Zn é formado que compreende a faixa de pH 5 a 8. O ligante foi dissolvido em 5ml de etanol:água (70:30), em seguida foram adicionadas lentamente pequenas porções de uma solução de Zinco 0,01005mol/l sob agitação constante. Assim, depois da adição do metal, foi ajustado o pH na faixa de 7,0. Em seguida, o composto foi colocado em repouso para evaporação do solvente resultando em um pó amarelo. A caracterização foi feita através da técnica de espectroscopia de infravermelho (IV).

4.2.6 Testes cinéticos com DNA

Estudos de reatividade dos complexos nas diferentes proporções na clivagem do DNA foram realizados em colaboração com o doutorando Tiago Bortolotto, sob a supervisão do Prof. Hernán Terenzi, do laboratório de Expressão Gênica do Departamento de Bioquímica – UFSC.

O procedimento foi feito a partir do DNA plasmidial, incubado em diferentes concentrações do complexo, em diferentes pHs e tempos de reação, com o objetivo de encontrar o pH ótimo de atividade do complexo.

Após o período de incubação, as reações foram interrompidas pela adição de tampão de corrida seis vezes concentrado (EDTA 0,25 M, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01% - pH 8,0). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. (0,8%) contendo brometo de etídio ($0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 1 h a 90 V em tampão TBE 0,5x (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM - pH 8,0). Os géis foram fotografados utilizando-se um sistema de fotodocumentação e as frações de cada forma serão quantificadas por densitometria. Os ensaios tiveram um controle negativo em condições iguais às misturas reacionais. Porém, sem adição dos complexos.

5. Resultados e Discussão

5.1 Caracterização do ligante

5.1.1 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

O espectro de I.V. (figura 4), apresenta uma banda em 3250 cm^{-1} proveniente da deformação axial da ligação O-H provavelmente de um equilíbrio ceto-enólico. Observa-se uma banda em 1720 cm^{-1} da carbonila do ácido carboxílico. Uma banda larga na região de 1620 cm^{-1} de mesma intensidade que a absorção normal de uma carbonila de uma cetona.

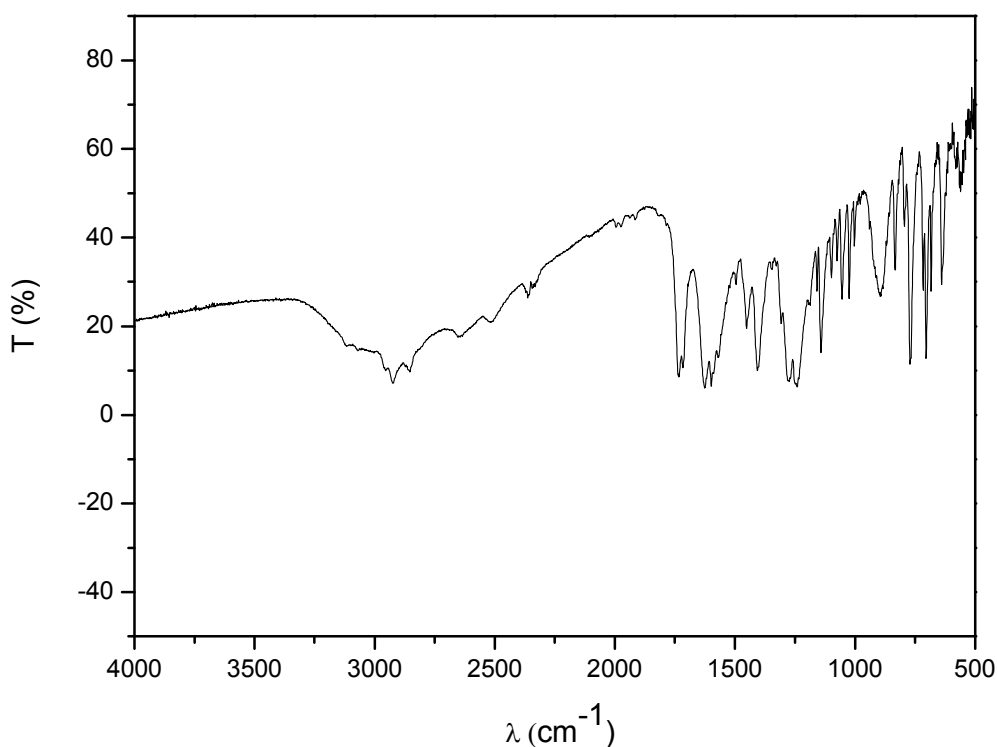


Figura 4 - Espectro de I.V. (KBr) do composto ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4-diona.

5.1.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)

O espectro de ^1H RMN (200 MHz, DMSO $-d_6$), figura 5, apresentou em 3,95 ppm um singleto de integração três, correspondente aos prótons do grupo metóxi; em 4,76 ppm um sinal largo corresponde ao próton do grupo ácido (associados com moléculas de água); em 7,13 ppm um singleto com integração um, corresponde ao próton metínico da forma enólica; em 7,16 ppm um dubleto de integração dois, com $J = 8,9$ Hz, corresponde aos prótons aromáticos vizinhos ao grupo do metoxi; e em 8,12 ppm, um dubleto de integração dois, com $J = 8,9$ Hz, corresponde aos outros prótons do sistema aromático.

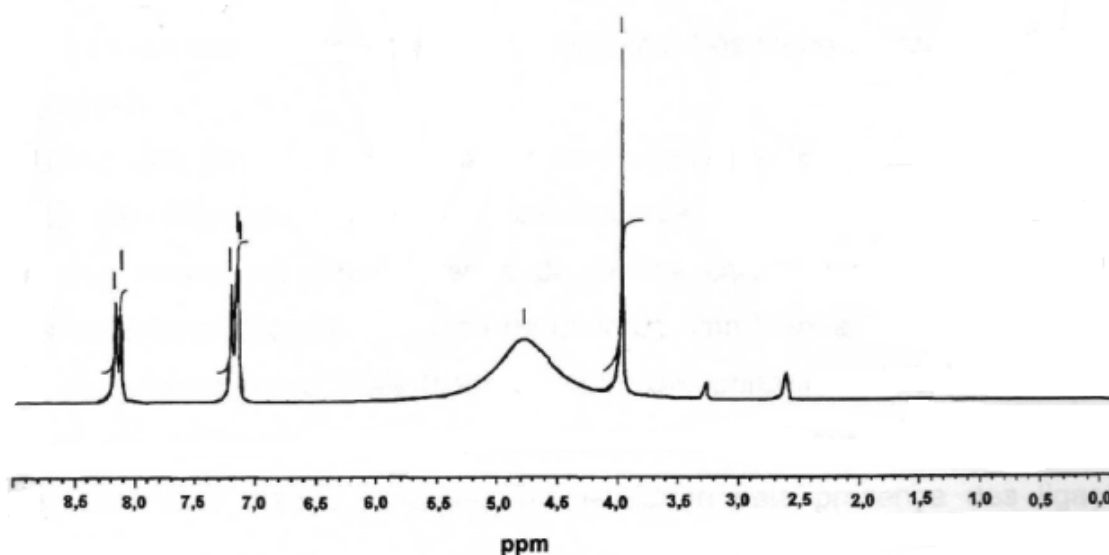


Figura 5 – Espectro de ^1H RMN (200MHz, DMSO- d_6) do composto ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4-diona.

5.2 Caracterizações da interação com Zn(II)

5.2.1 Estudos de equilíbrio potenciométrico

5.2.1.1 Constantes de protonação do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico - 2,4 – diona.

A curva de equilíbrio potenciométrico do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4–diona (Figura 6), apresenta duas regiões tamponadas sendo que a primeira região consumiu 0,9 ml de KOH e localiza-se na faixa de pH de 3 a 4. A segunda região tamponada parte de pH 10 a 11 e consumiu mais 0,5 mL de KOH. A primeira região tamponada corresponde à desprotonação do hidrogênio do grupo carboxílico presente no ligante. A segunda região corresponde à desprotonação do hidrogênio do grupo CH_2 , localizado entre os dois grupos carboxila presentes na dicetona. Observa-se uma inflexão que aparece na região de pH 4 a 10, esta informa que não existe hidrogênios ionizáveis presentes no ligante nesta faixa de pH.

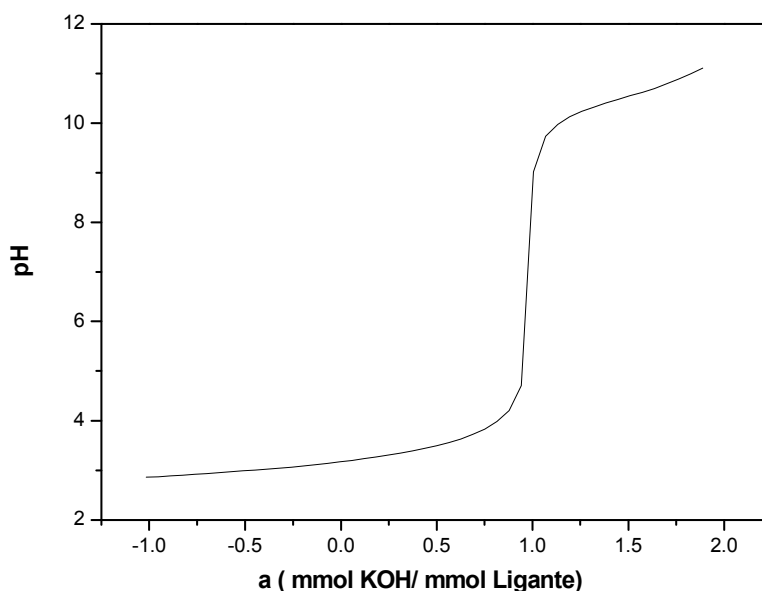


Figura 6 - Curva de equilíbrio potenciométrico do Ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico -2,4 – diona (0,050mmol).

Este ligante contém um grupo carboxílico e um grupo dicetona que podem complexar íons metálicos. Os logaritmos das constantes de desprotonação (log K) para esse ligante foram obtidos sob as condições experimentais deste trabalho, e definidos pela Equação 1 (Tabela 1).



Tabela 1 - Logaritmos das constantes de desprotonação do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4-diona em solução aquosa.

Quociente de Equilíbrio	-Log K
$[\text{HL}^-] [\text{H}^+] / [\text{H}_2\text{L}]$	2,823
$[\text{L}^{2-}] [\text{H}^+] / [\text{HL}^-]$	10,382

A porcentagem das espécies desprotonadas em função do pH foram calculadas utilizando as constantes acima. Analisando o diagrama de distribuição das espécies, Figura 7, observa-se dois equilíbrios de protonação/desprotonação. Em pH 2 observa-se a formação da espécie totalmente protonada (H_2L) com o máximo de formação de 88%. À medida que o pH aumenta, a concentração desta espécie diminui enquanto ocorre a formação da espécie HL^- . Esta espécie atinge sua concentração máxima de formação em pH 4 e permanece até pH 9. A partir de pH 9 há uma queda na sua concentração, dando espaço formação do ligante totalmente desprotonado.

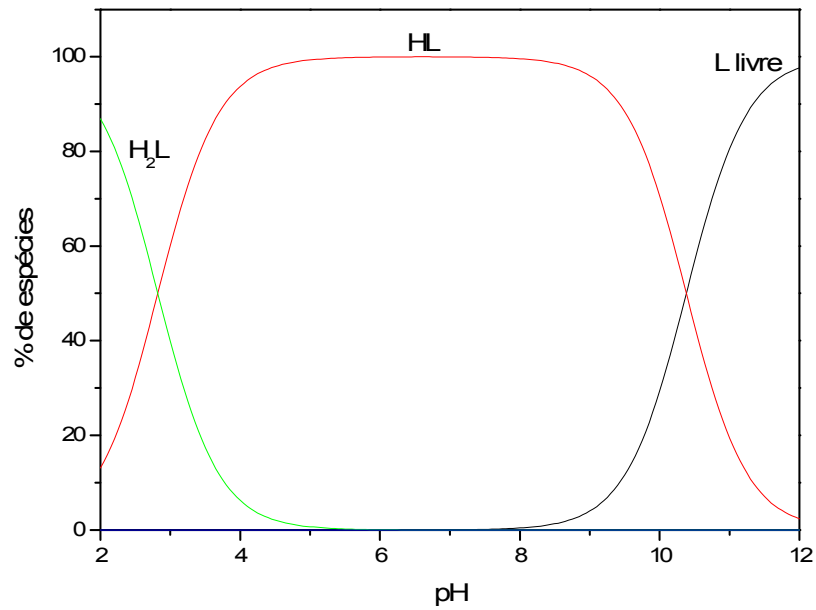
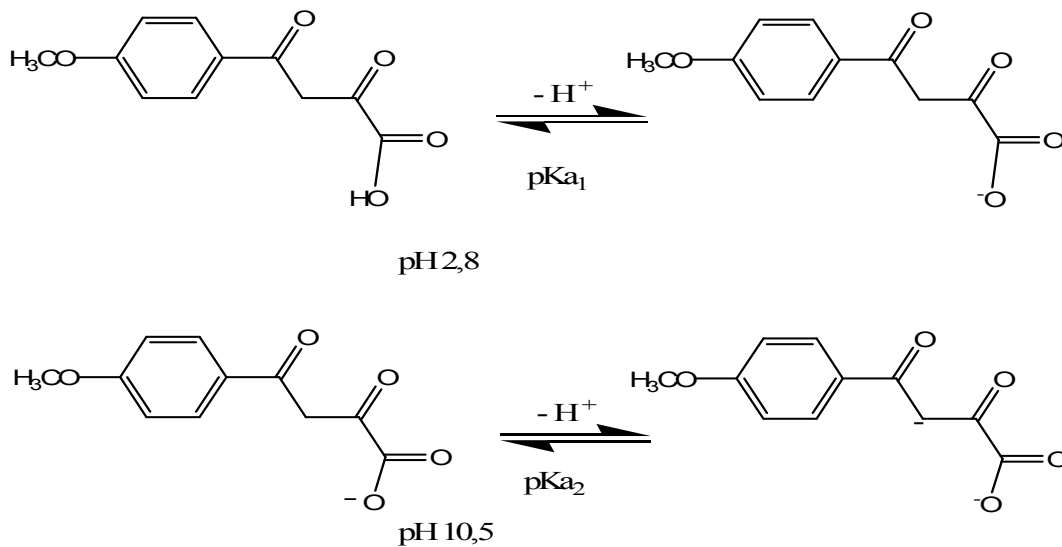


Figura 7 - Diagrama de distribuição de espécies em função do pH do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4-diona.

Esquema 1 - Proposta para os equilíbrios observados para o ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4-diona.



5.2.1.2 Estudo de equilíbrio potenciométrico do sistema ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4-diona-Zn(II).

A formação dos complexos de Zinco (II) – Ligante, nas proporções 1:1(ML) e 2:1 (ML₂), protonados, não-protonados e espécies hidróxidas foram investigados sob as condições experimentais desse trabalho. Ambas as proporções formam espécies hidróxidas. O pKa da molécula de água coordenada ao centro metálico no complexo ML é 10,02 e, da água no complexo ML₂ é 11,97, como mostra a tabela 2. É importante observar as espécies hidróxidas em sistemas modelos semelhantes, pois elas são responsáveis pela atividade catalítica, e a faixa de pH na qual se formam é investigada em trabalhos cinéticos.³⁸

A curva de equilíbrio potenciométrico do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4-diona com o íon Zn(II) na proporção 1:1 (Figura 8), apresenta duas regiões tamponadas. Uma no intervalo de pH 3-4, e outra de 9-11. A primeira região tamponada ocorre na mesma faixa de pH da curva do ligante, consumindo os dois prótons do ligante. A segunda região tamponada indica que, além da neutralização dos dois prótons do ligante, uma quantidade adicional de base foi gasta, formando uma espécie hidróxida. A espécie hidróxida se forma pela dissociação de uma molécula de água coordenada ao centro metálico.

A curva de equilíbrio potenciométrico na proporção 2:1 (ligante:metal), apresenta um consumo maior de base, devido ao uso do dobro da concentração do ligante. Esse deslocamento também nos mostra que houve uma interação efetiva com o íon Zn(II). Essa curva apresenta duas regiões tamponadas. A inflexão que aparece em pH 10,5 indica a formação de uma espécie hidróxida.

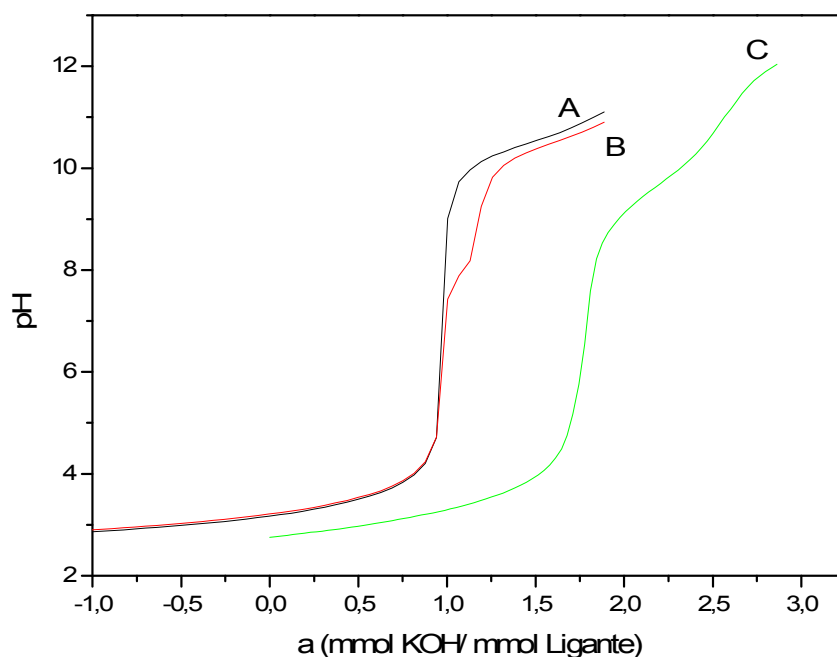


Figura 8 - Curvas de equilíbrio potenciométrico: A - 0,050 mmol do Ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4-diona, B - 0,050mmol do Ligante ácido 4-(4-/metoxifenil)butanóico-2,4-diona e 0,050 mmol Zn(II) e C - 0,10 mmol do Ligante ácido 4-(4-/metoxifenil)butanóico-2,4-diona e 0,050 mmol Zn(II).

Tabela 2 - Logaritmos das constantes de estabilidade dos complexos ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico -2,4 - diona - Zn(II).

Quociente de Equilíbrio	Log K
$[ZnL] / [Zn^{2+}] [L^2]$	11,63
$[Zn(OH) L] [H^+] / [ZnL]$	-10,02
$[ZnL_2] / [Zn] [L]^2$	21.20
$[Zn(OH) L_2] [H^+] / [ZnL_2]$	-11.97

Analisando o diagrama de distribuição das espécies na proporção 1:1 Ligante:Metal na Figura 10, observa-se a diminuição da concentração de Zn (II) livre, à medida que o pH aumenta, dando espaço para a formação do complexo LZn(II), tendo o seu máximo de formação (100%) em pH 7. Em valores de pH mais alcalinos, a concentração desta espécie diminui, enquanto ocorre a formação da espécie hidróxida Zn(II)(OH)L. Esta espécie atinge sua máxima concentração (98%) em pH 11,5.

O diagrama de distribuição das espécies na proporção 2:1 (ligante:metal), Figura 11, mostra que a formação do complexo L₂Zn(II) está presente numa faixa de pH de 4 a 11 tendo o seu máximo de formação (86,62%) em pH 7,5. Essa estequiometria favorece a formação dos complexos binucleares com esse ligante. Nesse sistema, a espécie hidróxida forma-se em valores de pH acima de 7,5, atingindo o máximo de formação em pH 11 quando está 94,72% formada.

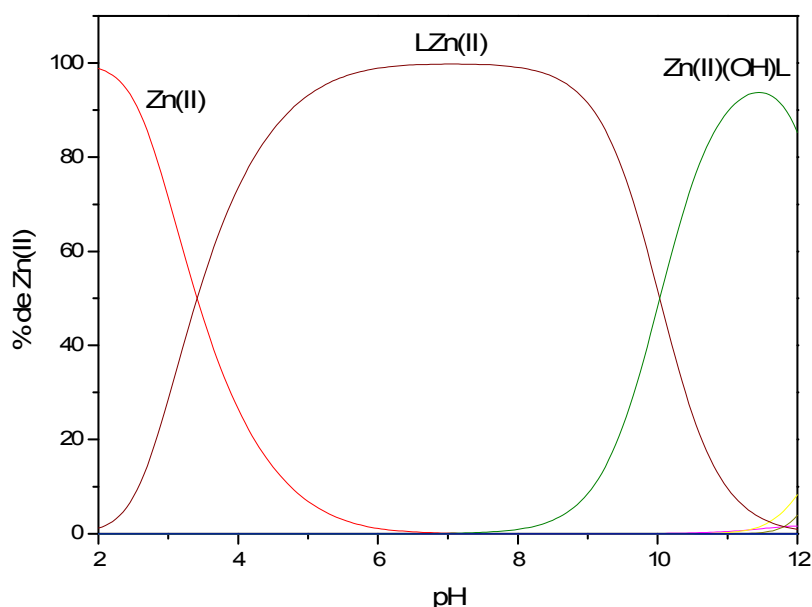


Figura 9 - Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o sistema ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico -2,4 – diona : Zn (II), (1:1).

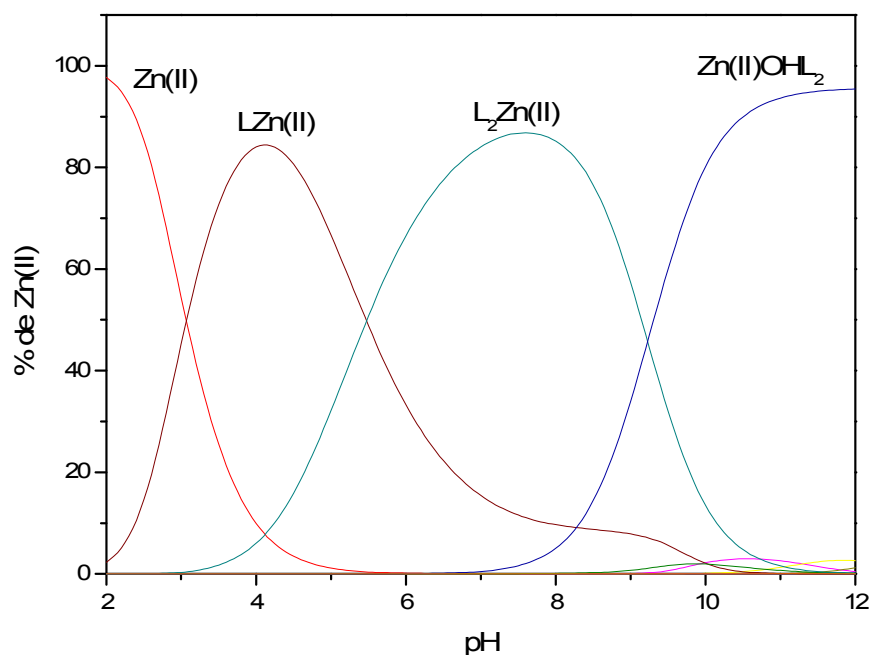


Figura 10 - Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o sistema ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico -2,4-diona : Zn (II), (2:1)

5.2.3 Caracterização do complexo L_2Zn

5.2.3.1 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Tabela 3. Comparação das bandas do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico -2,4-diona com as bandas do complexo ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico -2,4-diona-Zn (II) na proporção 2:1.

Amostras	O-H (cm^{-1})	C=O (cm^{-1})	C-O (cm^{-1})
Ligante	3250	1720	1120
Ligante – Zn 2:1	3400	1613	1000

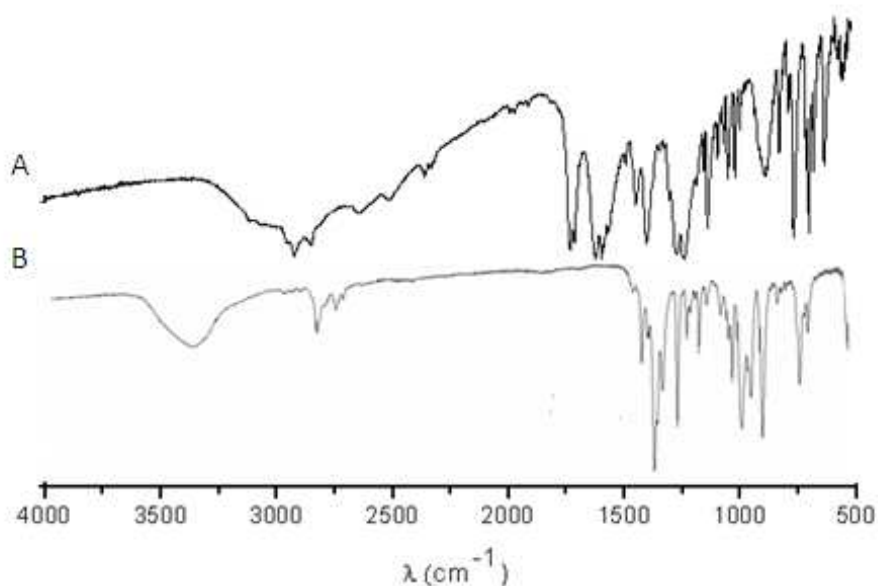


Figura 11 – Espectro de IV, A - ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4–diona e B - complexo ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4–diona – Zn (II) na proporção 2:1.

A partir do espectro do ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4–diona, observamos que houve um deslocamento de bandas proveniente da complexação com o íon Zn(II). A banda referente a deformação axial da ligação OH do ligante se encontra aproximadamente em 3250 cm^{-1} já no complexo ela está localizada em 3400 cm^{-1} apresentando um deslocamento bem significativo. Para as bandas C=O (carbonila) o deslocamento foi de 1720 cm^{-1} para o ligante livre e 1613 cm^{-1} para o complexo, isso indica um acentuada interação entre o ligante com o íon Zn(II).

5.3 Testes cinéticos com DNA

Os testes foram realizados a partir de soluções contendo diferentes concentrações 1:1e 2:1 (L:M) e diferentes pHs, devido a formação do complexo e as espécies hidróxidas se encontrarem em faixas de pHs distintas. As soluções foram incubadas por 48 horas a 50°C em tampão PIPES 25 mM e CHES 25mM.

Os plasmídeos assumem diferentes formas após as quebras de suas fitas. Quando intactas, as fitas do DNA plasmidial estão altamente tensionadas mantendo-se na forma superenovelada (FI). Quando o plasmídeo superenovelado sofre uma ou mais quebras em uma das fitas, há um afrouxamento em sua estrutura “super helicoidal”, convertendo o plasmídeo para sua forma circular aberta (FII). No entanto, caso ocorra uma quebra dupla ou duas quebras simples, o plasmídeo assume uma forma linear (FIII).²⁸

A figura 12 apresenta o resultado dos experimentos de clivagem do DNA pelo complexo ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4-diona – Zn (II) na proporção 1:1 (L:M). As soluções foram feitas em diferentes pHs: 7,0, 8,0 e 10, pois as espécies de interesse, como observado no diagrama de espécies (Figura 10), se encontram nesta faixa de pH.

A figura 13 mostra o resultado do experimento de clivagem do DNA pelo complexo ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4-diona – Zn (II) na proporção 2:1 (L:M), nos pHs 7,5 e 9,5.

Nas duas figuras, o controle que é somente o DNA (pBSK-II 25 μ M pb), apresenta o mesmo deslocamento que o complexo nos diferentes pHs e concentrações. Isto nos mostra que não houve clivagem do DNA. Uma das alternativas que pode ser levado em consideração é devido as espécies hidróxidas se encontrarem em pHs alto e os complexos formados serem negativos, ou seja pouco nucleófilo.

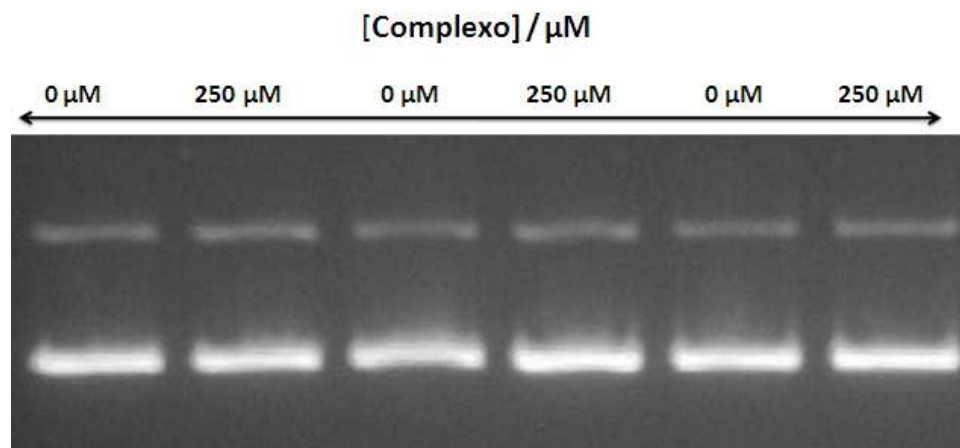


Figura 12. Teste de clivagem de DNA plasmidial por Complexo, em diferentes pHs a 50 °C e incubação de 48 horas. Poço 1: controle – somente DNA em 25 mM de PIPES pH 7.0 ; poços 2: DNA + complexo 250 μ M em 25 mM de PIPES pH 7.0; poço 3: controle – somente DNA em 25 mM de PIPES pH 8.; poços 4: DNA + complexo 250 μ M em 25 mM de CHES pH 8,0; poço 5: controle – somente DNA em 25 mM de CHES pH 10; poços 6: DNA + complexo 250 μ M em 25 mM de CHES pH 10.

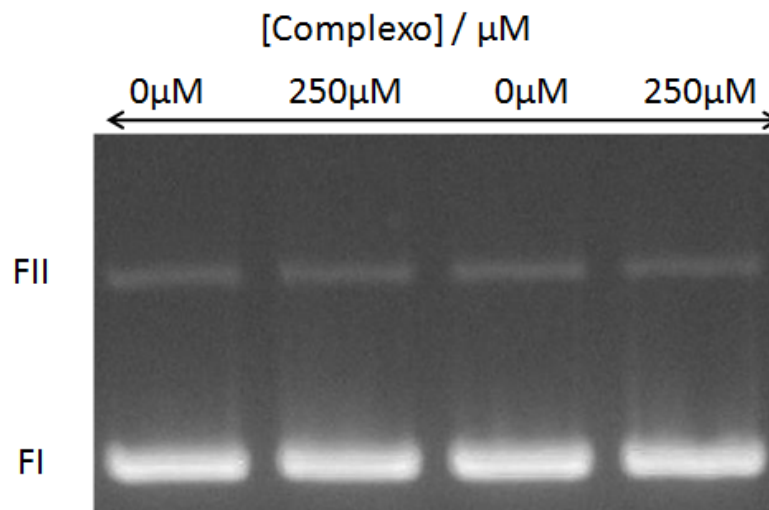


Figura 13. Teste de clivagem de DNA plasmidial por Complexo, em diferentes pHs a 50 °C e incubação de 48 horas. Poço 1: controle – somente DNA em 25 mM de PIPES pH 7.5 ; poços 2: DNA + complexo 250 μ M em 25 mM de PIPES pH 7.5; poço 3: controle – somente DNA em 25 mM de CHES pH 9.5 ; poços 4: DNA + complexo 250 μ M em 25 mM de CHES pH 9.5.

6. Conclusões

Neste trabalho estudou-se a coordenação do íon Zn(II) com o ligante ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4-diona, sintetizado a partir de uma reação de condensação entre uma arilcetona e um diéster. O ligante foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

Os equilíbrios existentes em solução no sistema Zn(II)-ácido 4-(4-metoxifenil)butanóico-2,4-diona foram caracterizados por estudos potenciométricos, mostrando as espécies formadas em diferentes pHs. Esses estudos foram realizados nas proporções 1:1 e 2:1 (ligante:metal), onde se observou a formação das espécies ZnL, ZnL₂, Zn(II)OHL e Zn(II)OHL₂, sendo as espécies hidróxidas potenciais nucleófilos nas reações de hidrólise. As elevadas constantes de formação são atribuídas ao efeito quelato do ligante. Essas interações também foram caracterizadas por espectroscopia no IV, correlacionando o deslocamento das bandas de absorção dos grupamentos, em ausência e presença do íon metálico.

Os testes de DNA foram realizados através de eletroforese em gel de agarose. Foram analisadas cinco soluções com diferentes pHs e diferentes concentrações. Os testes mostraram que não houve clivagem do DNA com o complexo em condições de temperatura a 50 °C, com um tempo de incubação de 48 horas, em ausência de luz UV.

Como perspectiva deste trabalho será realizada a clivagem de DNA em presença de luz UV, devido a alguns complexos apresentarem atividade catalítica em presença de radiação UV. Havendo a clivagem, outros testes podem ser propostos como o uso de inibidores de radicais livres para tentar compreender o mecanismo de clivagem de DNA comprovando que é por via hidrolítica e determinar os parâmetros cinéticos da clivagem de DNA pelo complexo. O dicroísmo circular é uma técnica que também pode fornecer informações relevantes sobre a interação de pequenas moléculas com o DNA, através da avaliação de alterações estruturais e/ou conformacionais desta molécula.

7. Referências Bibliográficas

1. CRAHM, D.J.; ANGEW. Chem., Int. Ed. 1988, 27, 1009.
2. SIGMAN, D. S.; MAZUMDER, A.; PERRIN, D. M. Chemical nucleases. Chemical Reviews, v. 93, n.6, p.2295-2316, 1993.
3. MISHRA, N. Nucleases: Molecular Biology and Applications.ed., Wiley Publisher, 2002.

344 p.
4. BASHKIN, J. K. Hydrolysis of phosphates, esters and related substrates by models of biological catalysts. Current Opinion in Chemical Biology, v. 3, n. 6, p. 752-758, 1999.
5. BORDIGNON, L. M. T.; SZPOGANICZ B., RIZZOTO, M.; BASALLOTE, M. G.; MARTELL A. E.; Molecular recognition of dipeptides. Catalysis of deuteration and hydrolysis of glycyglycine by dinuclear OBISDIEN Zn(II), 1998.
6. BATISTA, S. C.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J.; VENCATO, I. ; PERALTA, R. A. ; SZPOGANICZ, B.; AIRES, V.V.E.; TERENCEZ, H.; SEVERINO, P. C.Highly efficient phosphate diester hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical FeIIINill model complex, 2003.
7. LONG, Y.; JIANG, X.; DAYAM, R.; SANCHEZ, T.; SHOEMAKER, R.; SEI, S. and NEAMATI, N.; Rational Design and Synthesis of Novel Dimeric Diketoacid-Containing Inhibitors of HIV-1 Integrase: Implication for Binding to Two Metal Ions on the Active Site of Integrase, 2003.
8. SUMMA, V.; PETROCCHI, A.; PACE, P.; MATASSA, V.G.; FRANCESCO, R.; ALTAMURA, S.; TOMEI, L.; KOCH, U.; NEUNER, P.; Discovery of α,β -Diketo Acids as Potent Selective and Reversible Inhibitors of Hepatitis C Virus NS5b RNA-Dependent RNA Polymerase, 2003.
9. BJERRUM, J. Metal Ammine Formation in Aqueous Solution, Thesis 1941, reprinted P. Haase & Son, Copenhagen, 1957.
10. SCHWARZENBACH, G., MEIER, J. Formation and investigation of unstable protonation and deprotonation products of complexes in aqueous solution, Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, v.8, p. 302-312, 1958.

11. SCHWARZENBACH, G. Chelate complex formation as a basis for titration processes Analytica Chimica Acta, v.7, p141-155, 1952.
12. REEDIJK, J. Introduction to bioinorganic chemistry. In REEDIJK, J. Bioinorganic Catalysis, New York: Marcel Dekker, Inc., 1993. P. 1-11.
13. KARLIN, K. D., BARTON, J. K., Bio-inorganic chemistry: New advances, new directions and new investigators, Current Opinion in Chemical Biology, v. 5, p. 165-167, 2001.
14. PILAR, M.D.; SOTOMAYOR, T.; KUBOTA, L. T.; Enzymeless Biosensors: uma nova área para desenvolvimento de sensores amperométricos, 2001.
15. LIU, C.; WANG, M.; ZHANG, T.; SUN, H.: DNA hydrolysis promoted by di-and multi-nuclear metal complexes. Coord. Chem. Rev. 248, 147–168 (2004).
16. NEVES, A. ; TERENCEZI, H. ; HORNER, R. ; HORN J., A.; SPOGANICZ, B. ; SUGAI, J. K. . Hydrolytic DNA cleavage promoted by a dinuclear iron(III) complex. Inorganic Chemistry Communications, Holanda, v. 4, p. 388-391, 2001.
17. SHENG, X. et al. DNA Binding, Cleavage, and Cytotoxic Activity of the Preorganized Dinuclear Zinc(II) Complex of Triazacyclononane Derivatives. Bioconjugate Chemistry, v.19, n.2, p.490-498, 2008.
18. SHRIVER & ATKINS, Química Inorgânica, 4^a Ed, Cap 4, 2008.
19. CHAEWOON, L.; JIN MOO, L.; NA-RA, L.; BONG-SUK, J.; KYOUNG, J.; DONG-EUN, K.; Aryl diketoacids (ADK) selectively inhibit duplex DNA-unwinding activity of SARS coronavirus NTPase/helicase, 2009.
20. SILVA, L., Síntese de cristais líquidos convencionais derivados do fenilisoxazol. Florianópolis, UFSC, Tese de doutorado em Química, 101 p., 1997.
21. GRAY, G. W. and JONES, B.; J. Chem. Soc., 12, 4179, 1953.
22. SIDERATOU, Z., TSIOURVAS, D., PALEOS, C. M. and SKOULIOS, A.; Liq. Cryst., 22 (1), 51, 1997.
23. BUICE P. Y.: Química Orgânica, 4^a Ed, Volume 2, Cap 24, 2006.
24. LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 2^a ed.: São Paulo, Sarvier Editorade Livros Médicos, 1995.

25. WHITE A.; PHILIP H.; EMIL L. S.; Princípios de Bioquímica, 5ª Ed, Rio de Janeiro, 211, 1976.
26. VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J., J.; *Mol. Catal. B: Enzym.*, 9(4), 113-148, 2000.
27. VOET, D. and VOET, J. G. Biochemistry, Somerset: John Wiley & Sons, Inc. 1995. P. 332-344.
28. OLIVEIRA, M. C. B. Nucleases Sintéticas: Caracterização bioquímica e mecanismo de ação sobre DNA. Florianópolis, UFSC, Tese de doutorado em Química, 2006.
29. COWAN, J. A., Chemical nucleases, *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 5, n. 6, p. 634-642, 2001.
30. DUPUREUR, C. M. Roles of metal ions in nucleases. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.12, n.2, p. 250-255, 2008.
31. SIGMAN, D. S.; MAZUMDER, A.; PERRIN, D. M. Chemical nucleases. *Chemical Reviews*, v. 93, n.6, p.2295-2316, 1993.
32. WESTHEIMER, F. H., Why nature chose phosphatases, *Science*, v. 235, p.1173-1178, 1987.
33. DOMINGOS, J.B.; ELISANE L.; VANDERLEI, M.G.; FARUK, N.; A química dos estéres de fosfato, 2003.
34. WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, v. 171, p. 737-738, 1953.
35. LAGOWSKI, J.J.; Titrations in nonaqueous solvents. *Anal. Chem.*, 1974, 46 (5), 460-469.
36. MARTELL, A.E.; determination and use of stabilities constants. 2ed., New York, VHC Publishers, 200p, 1992.
37. SCHWARZENBACH, G., FLASCHKA, H., Complexometric Titrations, Methuen & Co., London, 1967.
38. MOTEKAITIS, R. J.; MARTELL, A. E.; BEST – A new program for rigorous calculation of equilibrium parameters of complex multicomponent systems, *Canadian journal of chemistry*, v. 82, p.299-308, 1985.

39. LUIZ, M. T. B., SZPOGANICZ, B., MARTELL, A. E. et al., Molecular recognition of dipeptides. Catalysis of deuteration and hydrolysis of glycylglycine by dinuclear OBISDIEN-Zn(II) complexes Inorganica Chimica Acta, v. 287, p. 134-141, 1999.