



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ESTUDO DE PROMISCUIDADE CATALÍTICA DE
COMPLEXOS DE FERRO COM O LIGANTE H₃bbmp**

FERNANDA FRANCISCA MAIA

Florianópolis

2009

FERNANDA FRANCISCA MAIA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE PROMISCUIDADE CATALÍTICA
DE COMPLEXOS DE FERRO COM O LIGANTE H₃bbpmp**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de Química,
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Ademir Neves

Co-orientadora: Prof. Dr. Rosely Peralta

Florianópolis

2009

FERNANDA FRANCISCA MAIA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE PROMISCUIDADE CATALÍTICA
DE COMPLEXOS DE FERRO COM O LIGANTE H₃bbpmp**

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

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ademir Neves
Orientador

Dra. Maryene Alves Camargo

Prof^a. Dra. Tereza Cristina Rozone de Souza

Florianópolis

2009

Dedico este trabalho a minha mãe Sônia, que me ensinou que a única coisa que não pode ser tirada de nós na vida é o conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pela perspicácia de quisermos entender o mundo em que vivemos e assim desvendar e desenvolver cada vez mais a ciência.

A minha mãe, Sônia, por me apoiar sempre nos estudos e também por financiá-los por todo esse tempo. Agradeço a ela principalmente pela fé em mim, pois quando nem mesmo eu acreditava que seria capaz ela tinha certeza.

A Família Golinski pela hospitalidade, amor e por todos os favores a mim prestados quando retornava a Joinville nos fins de semana. Ao namorado Leandro Golinski pela compreensão, apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Ademir Neves pelas idéias, incentivo ao trabalho, amizade e oportunidade de fazer parte da família Labinc.

A Prof^a. Dra. Rosely Peralta, basicamente uma mãe, pelo carinho, orientação ao longo deste trabalho, pela exigência, paciência e delicadeza nos ensinamentos comigo. Importante agradecer-lá também pela sua grande dedicação ao laboratório.

Ao Simon Harbs, parceiro de bancada e irmão mais novo da família Labinc por permitir que eu aprendesse ainda mais ao ensinar e também por suas indescritíveis perguntas que iniciavam sempre com por que.

Ao Tiago, Fernando, Rafael e Clóvis pelo constante esclarecimento de dúvidas quando já tinha vergonha de pedir a Rô, pelas imagens geradas dos complexos neste trabalho e nos painéis de congresso e principalmente pela amizade.

A todos os demais colegas e amigos do Labinc pela ajuda ao longo desse aprendizado, conversas, brincadeiras, café que com certeza fizeram o desenvolvimento deste projeto muito mais alegre.

Aos professores colaboradores do Labinc, Adailton pelas estruturas, Faruk pelas análises de espectroscopia de infravermelho e Bruno pelo tratamento das titulações.

Aos professores que tive a oportunidade de ter aula e que invariavelmente acrescentaram muito ao meu crescimento pessoal e intelectual.

Ao Departamento de Química da UFSC pelo apoio institucional e a Universidade pelo tempo de bolsa concedida no estágio 1 e 2.

“O pensamento lógico pode levar você de A a B, mas
a imaginação te leva a qualquer parte do Universo.”

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vii
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Catálise enzimática: não é diferente, apenas melhor	15
2.2 Promiscuidade catalítica: evolução das enzimas	16
2.3 Modelagem enzimática: ciência imitando a natureza	17
2.3.1 Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs)	17
2.3.2 Catecol Oxidase	19
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivos Gerais	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 EXPERIMENTAL	22
4.1 Materiais, Métodos e Instrumentação	22
4.1.1 Materiais	22
4.1.2 Métodos e Instrumentação	22
4.1.2.1 Espectroscopia no infravermelho	22
4.1.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio	23
4.1.2.3 Espectroscopia eletrônica	23
4.1.2.4 Eletroquímica	23
4.1.2.5 Difratomia de Raios X	24
4.1.2.6 Titulação Potenciométrica	24
4.1.2.7 Reatividade	25
4.2 Síntese do ligante	27
4.3 Síntese dos complexos	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Caracterizações do ligante	31

5.2	Caracterizações dos complexos.....	31
5.2.1	Infravermelho.....	31
5.2.2	Estruturas de raios X.....	32
5.2.3	Espectroscopia Eletrônica.....	35
5.2.4	Eletroquímica.....	37
5.3	Titulação potenciométrica.....	37
5.4	Reatividade.....	39
5.4.1	Hidrólise do Éster de Fosfato 2,4-BDNPP.....	39
5.4.1.1	Estudo da Influência do pH na hidrólise do 2,4-BDNPP.....	39
5.4.1.2	Efeito da concentração do substrato na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP.....	41
5.4.1.3	Proposta de mecanismo para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP.....	43
5.4.2	Oxidação do 3,5-di-terc-butilcatecol.....	44
5.4.2.1	Estudo da Influência do pH na oxidação do 3,5-DTBC.....	45
5.4.2.2	Efeito da concentração do substrato na reação de oxidação do 3,5-DTBC.....	46
6	CONCLUSÕES.....	48
7	PERSPECTIVAS.....	49
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
9	ANEXOS.....	liv
9.1	Anexo 1 – Esquema de síntese para o ligante H ₃ bbpmp de acordo com Brito e colaboradores.....	lv
9.2	Anexo 2 – Dados cristalográficos suplementares do complexo 1.....	lvi
9.3	Anexo 3 – Dados cristalográficos suplementares do complexo 2.....	lviii

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs.	Absorvância
Å	Ângstrons (1 Å = 10 ⁻⁸ cm)
2,4-BDNPP	bis(2,4-dinitrofenil)fosfato
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
ε	Coeficiente de absorção molar
K _{ass}	Constante de associação
k _{cat}	Constante catalítica
k _{nc}	Constante da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP não catalisada
K _M	Constante de Michaelis-Menten
λ	Comprimento de onda
δ	Deformação angular (IV)
DNA	<i>Deoxiribonucleic acid</i> - ácido desoxirribonucléico
E	Eficiência catalítica
UV-Vis	Espectroscopia na região do ultravioleta visível
IV	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho
f	Fator catalítico
ν	Frequência de vibração (IV)
P.F.	Ponto de fusão
%T	Porcentagem em transmitância
E _{1/2}	Potencial Redox
PAP's	<i>Purple Acid Phosphatases</i> - Fosfatases Ácidas Púrpuras
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
THF	Tetrahidrofurano
Et ₃ N	Trietilamina
V ₀	Velocidade inicial
V _{max}	Velocidade máxima
3,5-DTBC	3,5-di-terc-butilcatecol
H ₃ bbpmp	2,6-bis{[(2-,etilpiridil)-aminometil]-6[(2-hidroxibenzil)(2-metilpiridil)]-aminometil}-4-metilfenol
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> - Ácido ribonucleico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Hidrólise de éster de fosfato.....	18
Figura 2 Representação esquemática do sítio ativo das PAPs $Fe^{III}M^{II}$, onde $M^{2+} = Zn$ (feijão vermelho, soja), Mn (batata doce) e Fe (mamíferos).....	18
Figura 3 Estrutura geral para ligantes binucleantes, onde R corresponde aos braços pendentes contendo grupos N,O-doadores.	19
Figura 4 Reação catalisada pela catecol oxidase.	20
Figura 5 Estrutura cristalina do sítio ativo da forma oxidada da catecol oxidase.	20
Figura 6 Síntese do ligante H_3bbpmp	27
Figura 7 Espectroscopia no Infravermelho do ligante H_3bbpmp em pastilha de KBr .	28
Figura 8 Ressonância Magnética Nuclear de 1H do ligante em $CDCl_3$	28
Figura 9 Síntese do complexo 1 e 2	29
Figura 10 Espectros no infravermelho do ligante (vermelho) e do complexo 1 (preto) (A) e do complexo 2 (azul) (B).....	32
Figura 11 ORTEP do complexo 1 (A) e 2 (B).	33
Figura 12 Vista da geometria tipo adamantano exibida pelo complexo 1	34
Figura 13 Espectroscopia eletrônica do complexo 1 em acetonitrila ($1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e 2 em diclorometano ($3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$).....	35
Figura 14 Acompanhamento da mudança espectral com o tempo de uma solução $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em metanol do complexo 1 através de espectroscopia eletrônica. Inserções: Espectro Eletrônico da espécie vermelha (complexo 1) em acetonitrila ($1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e da espécie púrpura após 15h de incubação.....	36
Figura 15 Aparecimento da espécie binuclear, baseado no acompanhamento do espectro eletrônico. Concentração do complexo 1 : $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	36
Figura 16 A. Voltametria cíclica. Condições: solvente: acetonitrila/água (1:1 v/v). eletrólito: KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$; eletrodo de trabalho: carbono, eletrodo auxiliar: platina, eletrodo de referência - $Ag/AgCl$). B. Voltametria de onda quadrada. Condições: solvente: acetonitrila/água (1:1 v/v). eletrólito: KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$; eletrodo de trabalho: carbono, eletrodo auxiliar: platina, eletrodo de referência - $Ag/AgCl$)	37
Figura 17 Proposta para os equilíbrios observados para o complexo 1 e 2 em solução.....	38

Figura 18 Gráfico de distribuição de espécies em função do pH para o complexo 1.	38
Figura 19 Reação de hidrólise de um substrato modelo (2,4-BDNPP) catalisada por 1.	39
Figura 20 Dependência da velocidade de reação de hidrólise do 2,4-BDNPP com o pH para o complexo. Condições: [Complexo] = $3,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, [2,4-BDNPP] = $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, [Tampões] = $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, solução acetonitrila/água (1:1) a 25°C	40
Figura 21 Sobreposição do gráfico de distribuição das espécies em função do pH e dependência da velocidade de reação de hidrólise do 2,4-BDNPP com o pH para o complexo 1.	41
Figura 22 Dependência da velocidade de reação de hidrólise do 2,4-BDNPP com a concentração do substrato para o complexo 1. Condições: $[C]_{\text{final}} = 3,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $[2,4\text{-BDNPP}]_{\text{final}} = 0,9 \cdot 10^{-3} - 6,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{MES}]_{\text{final}} = 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 6,5); em solução Acetonitrila/Água (1:1) a 25°C	42
Figura 23 Complexo $[(\text{BPBPMP})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})_2\text{Fe}^{\text{III}}](\text{ClO}_4)_2$	43
Figura 24 Proposta para o mecanismo de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada pelos complexo 1.	44
Figura 25 Esquema ilustrativo para reação de oxidação do substrato 3,5-DTBC.	45
Figura 26 Dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5-DTBC com o pH para o complexo. Condições: [Complexo] = $2,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, [3,5-DTBC] = $5,0 \cdot 10^{-3}$ mol.L^{-1} , [Tampões] = $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$, solução metanol/água (30:1) a 25°C	45
Figura 27 Gráfico de distribuição de espécies em função do pH e dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5-DTBC com o pH para o complexo 1.	46
Figura 28 Dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5-DTBC com a concentração do substrato para o complexo. Inserção: Gráficos de Lineweaver-Burk. Condições: $[C]_{\text{final}} = 2,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $[3,5\text{-DTBC}]_{\text{final}} = 1,7 \cdot 10^{-3} - 11 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{CHES}]_{\text{final}} = 1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 9,5); em solução MeOH/H ₂ O (30:1) a 25°C , incubação de 24h.	47
Figura 29 Esquema de síntese do ligante H ₃ bbpmp. (BRITO <i>et al.</i> , 1993).	lv
Figura 30 ORTEP do complexo 1.	lvi
Figura 31 ORTEP do complexo 2.	lviii

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tipos de Promiscuidade Enzimática.....	16
Tabela 2 Comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°) do centro de ferro selecionados para o complexo 1 e 2.....	34
Tabela 3 Valores de pK_a obtidos para o complexo 1.....	40
Tabela 4 Parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise estudada.....	42
Tabela 5 Parâmetros cinéticos para a reação de oxidação do 3,5-DTBC.....	47
Tabela 6 Dados cristalográficos para o complexo 1.....	lvi
Tabela 7 Comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados para o complexo 1.....	lvii
Tabela 8 Dados cristalográficos para o complexo 2.....	lviii
Tabela 9 Comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados para o complexo 2.....	lix

RESUMO

A promiscuidade catalítica está relacionada tem relação direta com a evolução das enzimas e dessa forma desenvolver de catalisadores que também sejam promíscuos tem sido um novo campo de estudo para químicos bioinorgânicos visto que podem fornecer novas vias de síntese e melhor aproveitamento dos catalisadores. Alguns análogos sintéticos para as fosfatases ácidas púrpuras desenvolvidos por Neves e colaboradores tem tido sua promiscuidade investigada frente à oxidação de catecóis.

Assim, apresenta-se no presente trabalho a síntese, a estrutura de raios X, caracterizações espectroscópicas e eletroquímica, estudos cinéticos e de promiscuidade catalítica do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}_4(\text{bbpmp})(\mu\text{-OH})_2(\mu\text{-O})_2]$ (**1**), contendo o ligante binucleante simétrico H_3bbpmp . Apresenta-se também a estrutura de raios X e caracterizações espectroscópicas do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{bbpmp})\text{Cl}_2\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}$ (**2**)

Estudos de titulações potenciométricas e cinéticos mostraram que o complexo **1** gera espécies ativas capazes de hidrolisar o éster de fosfato modelo bis(2,4-dinitrofenil)fosfato, com um fator catalítico de seis mil e quarenta vezes, em comparação a reação não catalisada, e oxidar o 3,5-di-*terc*-butilcatecol, com $k_{\text{cat}} = 30,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e $K_{\text{M}} = 3,95 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Assim, o complexo **1** apresenta atividades de hidrolase e catecolase, sendo um interessante modelo sintético para estudos de promiscuidade catalítica.

Palavras chave: Complexo de Fe^{III} , ligante simétrico, promiscuidade catalítica, hidrolase e catecolase.

1 INTRODUÇÃO

Cursos de introdução à bioquímica ensinam que as enzimas são específicas para os seus substratos e as reações que catalisam, mas na verdade muitas não procedem desta maneira e, por isso, são chamadas de promíscuas. Esta especificidade alargada em relação ao substrato e ao tipo de reação pode ter um papel importante na evolução da enzima e desta forma a promiscuidade enzimática tem sido explorada.

A promiscuidade enzimática é dividida em três classes, a saber: promiscuidade de condição, de substrato e catalítica. Esta última é subdividida em acidental e induzida. Essas classes de promiscuidade, que serão mais bem discutidas ao longo deste trabalho, têm sido estudadas em diversas enzimas, mas muito pouco foi feito com modelos enzimáticos.

Assim, este trabalho procura enfatizar que o estudo da promiscuidade catalítica induzida em complexos biomiméticos pode ser muito vantajoso, pois pode fornecer, além de novas vias de síntese que não estão disponíveis atualmente, um melhor aproveitamento dos catalisadores já existentes.

Nesse contexto, desenvolver catalisadores promíscuos como as enzimas e/ou estudar a promiscuidade em catalisadores já existentes tornou-se um novo campo de estudo para químicos bioinorgânicos.

Uma vez que os modelos sintéticos não têm todo o conteúdo protéico envolvendo o sítio ativo, como nas metaloenzimas, espera-se que mesmos sejam muito mais suscetíveis às mudanças de condições e acessíveis a uma maior variedade de substratos. Estes fatos, que normalmente são considerados obstáculos na busca de melhores modelos e de maiores reatividades, podem tornar compostos inspirados em um sistema protéico, catalisadores eficientes para outras reações.

Dessa forma, se faz necessário o estudo dos modelos sintéticos frente a substratos para os quais não foram inicialmente planejados. Os resultados obtidos com estes estudos podem, além de tudo, servir para o entendimento de como a promiscuidade catalítica se processa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Catálise enzimática: não é diferente, apenas melhor

A aceleração das reações promovidas por uma enzima é muito alta devido ao abaixamento da energia de ativação necessária para converter o substrato a produto. O fator de aceleração de reações enzimáticas pode ser até mesmo da ordem de milhões de vezes como, por exemplo, no caso da enzima orotidina-5'-fosfato descarboxilase que diminui o tempo da reação de descarboxilação do ácido orotidílico na biossíntese de nucleotídeos pirimídicos de 78 milhões de anos para 25 milissegundos. (RADZICKA; WOLFENDEN, 1995).

A estrutura tridimensional das enzimas, mantida por ligações covalentes, forças eletrostáticas, coordenação a metais e ligações de hidrogênio, entre outras, dá às mesmas uma forma característica e exclusiva. Esta configuração é essencial para a função biológica das enzimas. (MURRAY *et al.*, 2003).

Em algumas enzimas, a participação direta ou indireta de determinadas moléculas (chamadas cofatores) pode influenciar extraordinariamente a atividade das mesmas. Geralmente esses cofatores são íons metálicos ou uma molécula orgânica. (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

As enzimas que contêm íons metálicos em seu sítio ativo são chamadas metaloenzimas. O papel desses íons metálicos pode ser associado ao favorecimento da: orientação e ligação do substrato à metaloenzima, formação de ligações covalentes com os intermediários de reação, ou ainda da interação com substratos para torná-los mais eletrofílicos ou nucleofílicos. (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

A especificidade ao substrato e elevada eficiência catalítica das enzimas reflete a existência de um ambiente que primorosamente adaptado, teoricamente, para uma única reação. Enzimas que divergem desta declaração, ou seja, que produzem metabólitos secundários são descritas como *promíscuas*, visto que podem atuar num largo espectro de substratos. (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006), (HOLLFERDER *et al.*, 2008).

2.2 Promiscuidade catalítica: evolução das enzimas

O termo *promiscuidade catalítica* tem sido utilizado para descrever a habilidade de uma enzima em realizar induzida ou acidentalmente uma segunda atividade catalítica no mesmo sítio ativo responsável por sua atividade primária. Assim, a promiscuidade catalítica pode ser útil para o organismo em algum processo evolutivo, e dessa forma a enzima pode ser recrutada para fornecer essa atividade secundária. (STEELE *et al.* 1998), (COOPER *et al.*, 2002)

Há um crescente interesse em promiscuidade catalítica, visto que este pode ser um ponto de partida para a evolução de enzimas. Esta evolução pode ser essencial quando se deseja, por exemplo, promover a desintoxicação de novos antibióticos e agrotóxicos, eliminando assim substâncias indesejadas das células, ou em um pensamento ainda mais positivo, se possa degradar poluentes antropogênicos no ambiente e na evolução *in vitro* de novos catalisadores em laboratório. (COOPER *et al.*, 2002), (FONG; BERGHUIS, 2002)

A promiscuidade é classificada em três tipos: promiscuidade de condição, de substrato e catalítica como descrito na Tabela 1 (HULT; BERGLUND, 2007)

Tabela 1 Tipos de Promiscuidade Enzimática

Tipo de promiscuidade	Características
De condição	Apresentado por enzimas com atividade catalítica em reações de condições variadas das naturais, tais como temperatura ou pH extremos.
De substrato	Apresentado por enzimas com especificidade de substrato alargado/relaxado.
Catalítica	Apresentado por enzimas que catalisam reações químicas distintas com estados de transição diferentes. Este tipo de promiscuidade é dividido em: Acidental - Uma reação paralela catalisada por uma enzima natural. Induzida - Uma nova reação estabelecida por uma ou várias mutações que re-encaminham a reação catalisada por uma enzima natural.

Segundo Hult e Berglund, a promiscuidade de condição foi primeiramente explorada por Rona e colaboradores no início da década de 30 em uma série de experiências com lipase de fígado de porco e pancreática em solventes orgânicos para a resolução de álcoois quirais e ésteres. Um bom exemplo de promiscuidade de substratos e catalítica é o uso de descarboxilase do piruvato para formar ligações

carbono-carbono, o que foi inicialmente estudado em 1921 e é, hoje, uma atividade industrial. Dentre as muitas enzimas que apresentam promiscuidade de substrato, a metano monooxigenase é a que catalisa a reação de um maior número de substratos (150). (HULT; BERGLUND, 2007), (COPLEY, 2003).

Diante disso, explorar a promiscuidade catalítica induzida em metaloenzimas artificiais pode oferecer grandes oportunidades no desenvolvimento de novas vias de síntese, que não estão atualmente disponíveis, ou de novas funções catalíticas ou ainda gerar melhorias em catalisadores já existentes. (HULT; BERGLUND, 2007).

2.3 Modelagem enzimática: ciência imitando a natureza

A modelagem enzimática é a ciência imitando a natureza de um sítio de ligação, seja em termos de forma, tamanho e ambiente microscópico, como o sítio ativo em termos de identidade de grupos, estereoquímica, distâncias interatômicas de diferentes grupos ou mesmo do mecanismo de ação da enzima. (BENDER; D'SOUZA, 1987)

Várias são as enzimas de interesse científico para modelagem, dentre elas estão as fosfatases, que catalisam a reação de hidrólise de diversos ésteres de fosfato. A importância em mimetizar fosfatases está no entendimento do mecanismo da hidrólise de ácidos nucleicos tais como DNA e RNA através da quebra das ligações fosfodiéster, cujas aplicações são inúmeras, como na manipulação de genes, no desenvolvimento de sondas moleculares e ainda no desenvolvimento de novos fármacos com finalidades terapêuticas. (LIU *et al.*, 2004)

2.3.1 Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs)

As fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) são metaloenzimas que catalisam a hidrólise de uma ampla faixa de ésteres de fosfato (Figura 1) com atividade máxima em pH entre 4,0 e 7,0. (NEVES *et al.*, 2006)

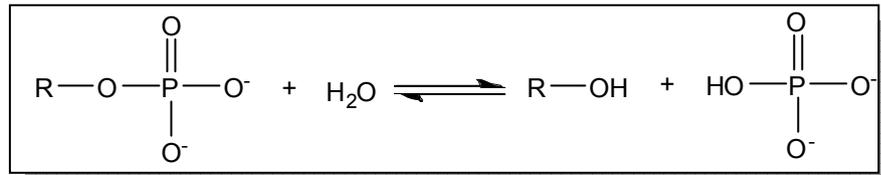


Figura 1 Hidrólise de éster de fosfato.

Todas as PAPs (sejam elas de fontes vegetais ou animais) que tiveram suas estruturas de raios X resolvidas possuem no seu sítio ativo a mesma esfera de coordenação aos centros metálicos. Uma representação esquemática do sítio ativo das PAPs está representada na Figura 2. (KLABUNDE; KREBS, 1997)

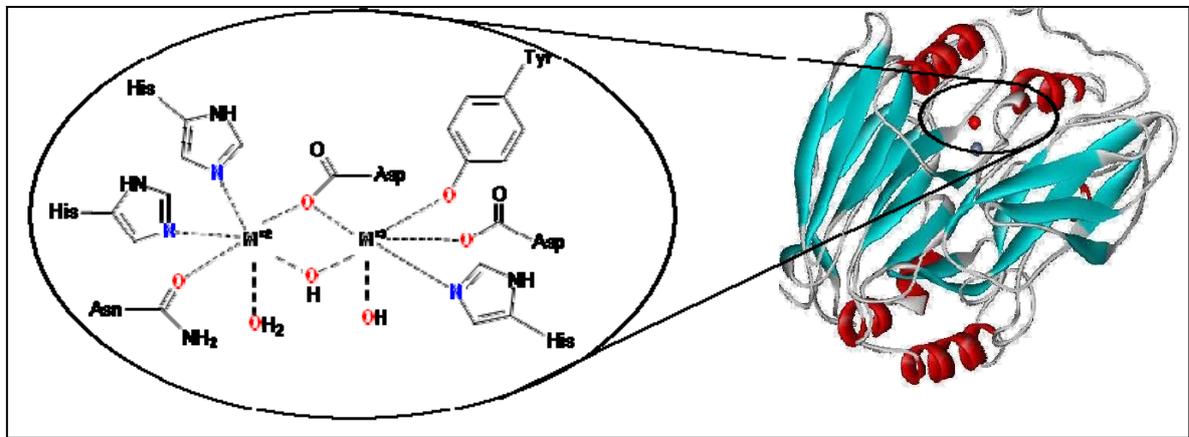


Figura 2 Representação esquemática do sítio ativo das PAPs $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$, onde $\text{M}^{2+} = \text{Zn}$ (feijão vermelho, soja), Mn (batata doce) e Fe (mamíferos).

Os centros metálicos dos sítios ativos das fosfatases de animais consistem de dois átomos de ferro com dois estados de oxidação acessíveis: uma forma oxidada $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$, cataliticamente inativa conhecida como forma púrpura, e uma reduzida $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$, forma ativa, ou rosa. (STRATER *et al.*, 1995)

De acordo com os mecanismos propostos para as PAPs, para ser capaz de hidrolisar ésteres de fosfato os complexos devem possuir um sítio lábil de coordenação ($\text{M}^{\text{II}}\text{-OH}_2$), no qual o substrato possa ser fixado e ativado. O complexo deve conter ainda um grupo $\text{M}^{\text{III}}\text{-OH}$ para que o ataque nucleofílico sobre o átomo de fósforo possa ser realizado. (PERALTA *et al.*, 2005). Para tanto, os ligantes devem ser estrategicamente escolhidos.

Os ligantes com as unidades centrais alcóxido e fenóxido têm sido empregados para este fim devido ao efeito quelato e a previsível formação de centros binucleares, dando origem a complexos com as pontes μ -alcoxo e μ -fenoxo

(Figura 3). Os resíduos de aminoácidos presentes nas metaloenzimas têm sido mimetizados pelos grupos benzimidazol, fenol, piridina e alquilas. (SCHENK *et al.*, 2008).

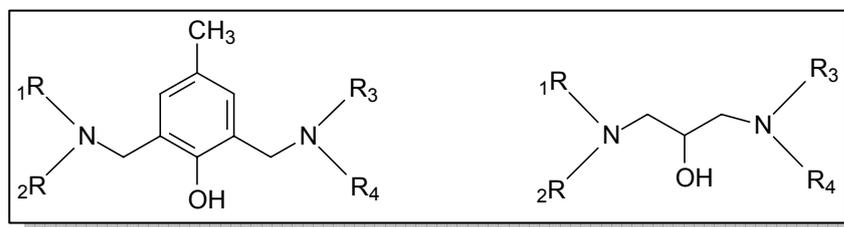


Figura 3 Estrutura geral para ligantes binucleantes, onde R corresponde aos braços pendentes contendo grupos N,O-doadores.

Assim, os complexos desenvolvidos têm sido estudados frente a substratos modelo, como o bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato, a fim de obter possíveis modelos funcionais para as PAPs. (JARENMARK; CARLSSON; NORDLANDER, 2007), (BATISTA *et al.*, 2003), (PERALTA, 2005), (REY, 2008).

De maneira análoga, a promiscuidade catalítica dos sistemas biomiméticos tem sido estudada com substratos modelo de outras transformações químicas, ou reações com estado de transição diferente da reação para qual o modelo enzimático foi desenvolvido. O complexo $[(BPBPMP)Fe^{III}(\mu-OAc)_2Fe^{II}](ClO_4)$, modelo para hidrolase, por exemplo, teve sua promiscuidade catalítica estudada frente a reação de oxidação de catecóis, por Neves e colaboradores, onde o análogo sintético apresentou-se como promíscuo. (NEVES *et al.*, 2009)

2.3.2 Catecol Oxidase

A catecol oxidase pertence à classe das oxirredutases (classe de enzimas que catalisam reações de transferência de elétrons) e é uma enzima binuclear de cobre. Essa enzima catalisa a oxidação de catecóis as correspondentes o-quinonas com redução do oxigênio molecular a água, (Figura 4). (LIPPARD; BERG, 1994), (NEVES, 2001)

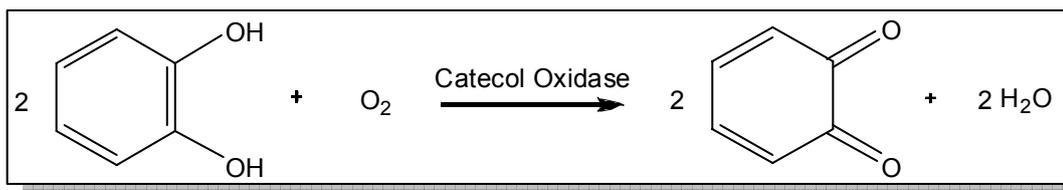


Figura 4 Reação catalisada pela catecol oxidase.

As estruturas cristalinas das formas oxidadas ou *met* (Cu(II)-Cu(II)) e reduzida ou *deoxy* (Cu(I)-Cu(I)) da catecol oxidase isolada da batata-doce foram determinadas por cristalografia de raios X. (Figura 5) (EICKEN; KREBS; SACCHETTINI, 1999)

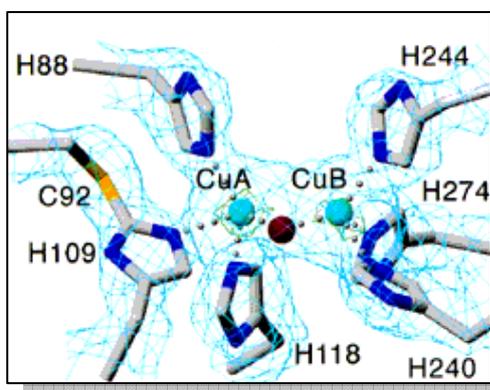


Figura 5 Estrutura cristalina do sítio ativo da forma oxidada da catecol oxidase.

A oxidação de substratos orgânicos pelo oxigênio molecular sob condições brandas constitui uma reação de grande interesse para muitos processos sintéticos e industriais, tanto de um ponto de vista econômico quanto ambiental. (REY, 2008).

Embora a reação de substâncias orgânicas com o oxigênio molecular seja termodinamicamente favorável, ela é cineticamente impedida devido ao estado fundamental triplete do O_2 . Neste contexto, e também com o intuito de se obter um maior entendimento da química das metaloenzimas de cobre, um grande número de análogos biomiméticos (tanto estruturais quanto funcionais) para o sítio ativo da catecol oxidase foram desenvolvidos. (BORN *et al.*, 2007), (REY, 2008), (PERALTA *et al.*, 2006).

O estudo da promiscuidade catalítica de biomiméticos sintéticos ganhou importância a partir do momento que se tornou clara a relação da promiscuidade com a evolução das enzimas. Assim, um novo desafio para químicos bioinorgânicos é o de desenvolver modelos enzimáticos que também sejam promíscuos. (NEVES *et al.*, 2009)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Sintetizar e caracterizar novos complexos de Fe^{III} com o ligante H₃bbmpmp modelos para as fosfatases ácidas púrpurase e investigar sua promiscuidade catalítica frente a oxidação de catecóis.

3.2 Objetivos específicos

- ✚ Síntese e caracterização do ligante simétrico H₃bbmpmp que contém grupos piridínicos e fenólicos e a unidade μ -fenoxo.
- ✚ Síntese e caracterização de novos complexos de Fe^{III} utilizando o ligante H₃ppmp.
- ✚ Estudos comparativos das propriedades físico-químicas dos complexos sintetizados com o sítio ativo das metalohidrolases.
- ✚ Estudos de reatividade do biomimético frente ao substrato modelo 2,4-BDNPP.
- ✚ Estudo da promiscuidade catalítica do complexo frente ao 3,5-DTBC, substrato modelo para reações de oxidação de catecóis.

4 EXPERIMENTAL

4.1 Materiais, Métodos e Instrumentação

4.1.1 *Materiais*

Os reagentes, materiais, gases de grau analítico e solventes utilizados nas sínteses foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia. Para as análises foram utilizados solventes espectroscópicos e para a análise de ressonância magnética nuclear foram utilizados solventes deuterados. O substrato bis(2,4-dinitrofenilfosfato) e o ligante H₃bbpmp foram sintetizados de acordo com as rotas sintéticas descritas na literatura. (BUNTON; FARDER, 1969), (BRITO *et al.*, 1993).

4.1.2 *Métodos e Instrumentação*

4.1.2.1 Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro FTIR – 2000, Perkin Elmer, na região de 4000 a 400 cm⁻¹. As amostras foram preparadas por dispersão em KBr de grau espectroscópico e prensadas (~10 toneladas), formando pastilhas com cerca de 1 cm de diâmetro e 0,5 mm de espessura. Estas pastilhas foram introduzidas no caminho óptico do equipamento para leitura do percentual de transmitância (%T). As análises foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera do Departamento de Química da UFSC.

4.1.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

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

4.1.2.3 Espectroscopia eletrônica

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

4.1.2.4 Eletroquímica

O comportamento redox do complexo **1** foi investigado por voltametria cíclica e onda quadrada em um potenciostato-galvanostato BAS (Bioanalytical Systems, Inc.) modelo Epsilon, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química da UFSC. O experimento foi realizado em solução de acetonitrila/água (1:1) em pH 6,5 sob atmosfera de argônio. Neste experimento, utilizou-se KCl ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) como eletrólito suporte e uma célula eletrolítica com três eletrodos: eletrodo de trabalho – carbono; eletrodo auxiliar – platina; eletrodo de referência – Ag/Ag⁺. Para correção do potencial utilizou-se hexacianoferrato de potássio como padrão interno. (GAGNÉ; KOVAL; LISENSKY, 1980)

4.1.2.5 Difratometria de Raios X

A análise de difração de raios X de monocristal do complexo foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC. Os dados foram coletados em um difratômetro Enraf-Nonius CAD-4 equipado com um tubo de molibdênio ($\text{MoK}\alpha$ $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite à temperatura ambiente. As estruturas cristalinas foram resolvidas através de métodos diretos com a utilização do programa SHELXS97 e os dados foram refinados pelo método dos mínimos quadrados com matriz completa, com a utilização do programa SHELXL97. As representações gráficas das estruturas moleculares foram geradas utilizando o programa PLATON. (SHELDRICK, 2008), (SPEK,2003)

4.1.2.6 Titulação Potenciométrica

As constantes de protonação para os complexos foram determinadas por titulação potenciométrica no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. Os experimentos foram realizados em solução etanol/água (70/30 v/v) devido à baixa solubilidade dos complexos em água. Utilizou-se um pHmetro Corning 350 acoplado a um eletrodo de vidro combinado (Ag/AgCl), calibrado com uma solução de HCl ($0,010 \text{ mol.L}^{-1}$) e uma solução padrão de KOH ($0,100 \text{ mol.L}^{-1}$) em água em uma célula termostatizada a $25,00 \pm 0,05 \text{ }^\circ\text{C}$ para leitura direta de pH ($\text{p[H]} = -\log[\text{H}^+]$). As soluções foram preparadas com água bidestilada fervida e etanol de grau espectroscópico. As medidas foram realizadas em uma célula termostatizada a $25,00 \pm 0,05^\circ\text{C}$ contendo uma solução do complexo ($0,02 \text{ mmol}$) em 50 mL de solução etanol/água (70/30 v/v) e a força iônica ajustada para $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ com KCl, sob fluxo de argônio para eliminar a presença de CO_2 atmosférico. As soluções de complexos tiveram o pH ajustado para próximo de 3,50 pela adição de $0,100 \text{ mL}$ de HCl $0,16 \text{ mol.L}^{-1}$, resultando em um volume final de $50,1 \text{ mL}$, e foram tituladas com uma solução padrão de KOH $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ com a adição de alíquotas de $0,02 \text{ mL}$ até pH 10,50 com o auxílio de um pipetador manual (20-200 μL) Digipete. As adições sucessivas de base foram realizadas após a obtenção de

valores constantes de pH. O pK_w da solução etanol/água 70:30 % V/V contendo $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl utilizado para os cálculos, foi 14,72(2). As titulações foram realizadas em duplicata e os valores apresentados referem-se à média dos dois experimentos. As constantes de equilíbrio foram calculadas com o programa BEST7 e os diagramas de distribuição das espécies presentes em solução em função do pH foram obtidos com os programa Species. (SCHWINGEL *et al.*, 1996), (MARTELL; MOTEKAITIS, 1992)

4.1.2.7 Reatividade

As atividades catalíticas do complexo foram avaliadas através da reação de oxidação do substrato 3,5-di-*terc*-butilcatecol (3,5-DTBC) e de hidrólise do substrato bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP), o qual foi sintetizado de acordo com o método descrito por Bunton. Os experimentos cinéticos foram realizados em triplicata sob condições de excesso de substrato monitorando-se espectrofotometricamente, em um espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostatizado, a variação de absorvância ocorrida em 400 nm ($\epsilon = 1900 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) devido à formação da 3,5-di-*terc*-butilquinona e também relacionada à liberação do ânion 2,4-dinitrofenolato ($\epsilon = 12100 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), como produto da reação de oxidação e hidrólise, respectivamente. As reações foram monitoradas entre 2 a 5% de conversão de substrato a produto e os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais. (BUNTON; FARDER; 1969), (FERNANDES *et al.*, 2001), (BATISTA *et al.*, 2003)

Os estudos em função do pH para atividade de catecolase, o qual visa a obtenção do pH ótimo de atividade frente à oxidação do substrato 3,5-di-*terc*-butilcatecol e o pK_a cinético para cada complexo, foram realizados em uma faixa de pH entre 5,50 e 10,00 a 25°C. Utilizaram-se cubetas de quartzo e/ou vidro óptico com capacidade para 4000 μL e caminho óptico de 1 cm, seladas com tampa de teflon, nas quais foram adicionados 100 μL de solução aquosa ($[T]_{\text{final}} = 3.10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) dos tampões: (MES pH 5,50 a 6,50; TRIS pH 7,00 a 8,50 e CHES pH 9,00 a 10,00), 200 μL de uma solução do complexo ($[C]_{\text{final}} = 2,9.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e 2900 μL de

metanol saturado com oxigênio. A reação foi iniciada com a adição de 100 μL de uma solução metanólica do substrato ($[\text{S}]_{\text{final}} = 5,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) e monitorada durante 20 minutos a 25°C.

Os experimentos cinéticos em condições de excesso de substrato foram realizados como descrito a seguir: 100 μL de solução aquosa de tampão CHES, pH 9,50 ($[\text{T}]_{\text{final}} = 3 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$), 200 μL de uma solução metanólica do complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 2,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e metanol saturado com oxigênio foram adicionados em cubetas de quartzo ou vidro, com 1 cm de caminho óptico, a 25°C. A reação foi iniciada com a adição de volumes variando de 30 μL a 200 μL de solução metanólica do substrato 3,5-DTBC ($[\text{S}]_{\text{final}} = 1,5 \cdot 10^{-3}$ - $9,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$). Em todos os experimentos, o volume final da mistura reacional na cubeta foi de 3,3 mL. Correções da oxidação espontânea do substrato 3,5-DTBC foram realizadas sob condições idênticas, sem a adição do complexo. As velocidades iniciais foram obtidas da inclinação da curva da absorvância versus tempo nos primeiros 20 minutos de reação, pelo método das velocidades iniciais.

Os estudos em função do pH para a atividade de hidrólise do complexo, o qual visa a obtenção do pH ótimo de atividade frente à hidrólise do substrato bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP) e o pK_a cinético, foram realizados em uma faixa de pH entre 3,50 e 9,50 a 25°C. Utilizaram-se cubetas de quartzo e/ou vidro óptico com capacidade para 4000 μL e caminho óptico de 1 cm, seladas com tampa de teflon, nas quais foram adicionados 1500 μL de solução aquosa (0,1 mol.L^{-1}) do tampão (MES pH 3,50, a 6,50; HEPES pH 7,00 a 8,50; CHES pH 9,00 a 10,00) com força iônica mantida constante ($I = 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, LiClO_4), 400 μL de uma solução em acetonitrila do complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 3,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), e 300 μL de acetonitrila. A reação foi iniciada com a adição de 800 μL de uma solução em acetonitrila do substrato ($[\text{S}]_{\text{final}} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$).

Os experimentos cinéticos em condições de excesso de substrato foram realizados como descrito a seguir: 1,5 mL de solução aquosa de tampão MES pH 6,50 ($[\text{T}]_{\text{final}} = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$), 400 μL de uma solução, em acetonitrila, do complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 3,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e acetonitrila foram adicionados em cubetas de quartzo ou vidro, com 1 cm de caminho óptico, a 25°C. A reação foi iniciada com a adição de volumes variando de 150 μL a 1100 μL de solução em acetonitrila, do substrato 2,4-BDNPP ($[\text{S}]_{\text{final}} = 9,4 \cdot 10^{-4}$ – $6,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$). Em todos os experimentos realizados

para a reação de hidrólise, o volume final da mistura reacional na cubeta foi de 3,0 mL. Correções da hidrólise espontânea do substrato 2,4-BDNPP foram realizadas sob condições idênticas, sem a adição do complexo. As velocidades iniciais foram obtidas da inclinação da curva da absorvância *versus* tempo nos primeiros 15 minutos de reação.

4.2 Síntese do ligante

A síntese do ligante H₃bbpmp foi realizada através do precursor Hbpa de acordo com Brito e colaboradores como ilustrado na Figura 6 e descrito abaixo. Um esquema da rota completa de síntese do ligante pode ser observado no anexo 1. (BRITO *et al.*, 1993)

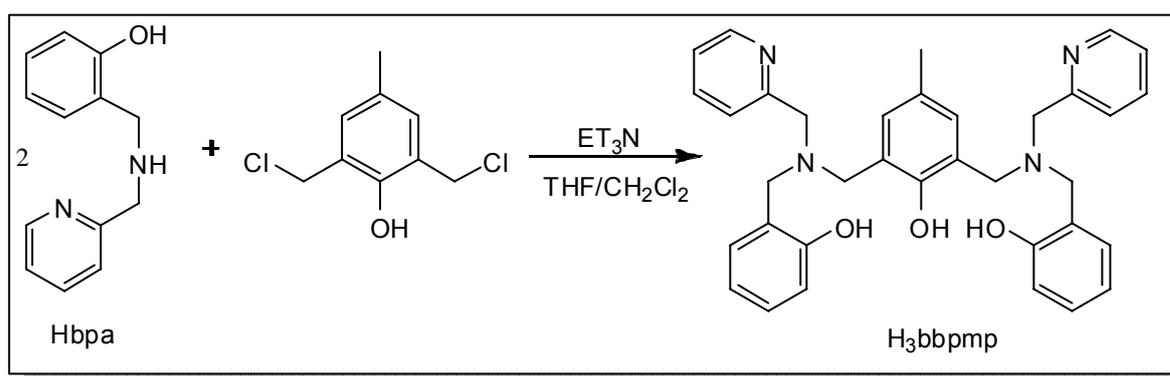


Figura 6 Síntese do ligante H₃bbpmp

Foram adicionados Hbpa (10g; 46,7mmol) e trietilamina (9,38g; 92,8mmol) em 30 mL de THF. À esta solução foi adicionado 2,6-bis(clorometil)-4-metilfenol (4,76g; 23,2mmol em 20 mL de diclorometano) gota a gota e sob agitação magnética. A reação foi mantida em agitação por trinta minutos a temperatura ambiente. Em seguida acrescentou-se 500 mL de água destilada, filtrou-se o ligante, dissolvendo-o posteriormente em diclorometano.

A solução foi então lavada com Brine (solução 0,1 mol.L⁻¹ de NaHCO₃ saturada com NaCl), seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada à pressão reduzida em evaporador rotatório. O ligante H₃bbpmp foi recristalizado em isopropanol e seco sob vácuo, obtendo-se 6,5 g (11,6 mmol), com rendimento de 50% em relação ao Hbpa. P.F. =167-168°C. Literatura: 167-168°C. (BRITO, 1994)

O ligante foi caracterizado por espectro no IV (Figura 7) e RMN ^1H (Figura 8) IV (KBr), em cm^{-1} : ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}) 3015-2817; ν (C=N e C=C) 1590-1483; δ (O-H_{fenol}) 1371; ν (C-O_{fenol}) 1255; ν (C-N) 1101; δ (C-H_{Ar}) 751.

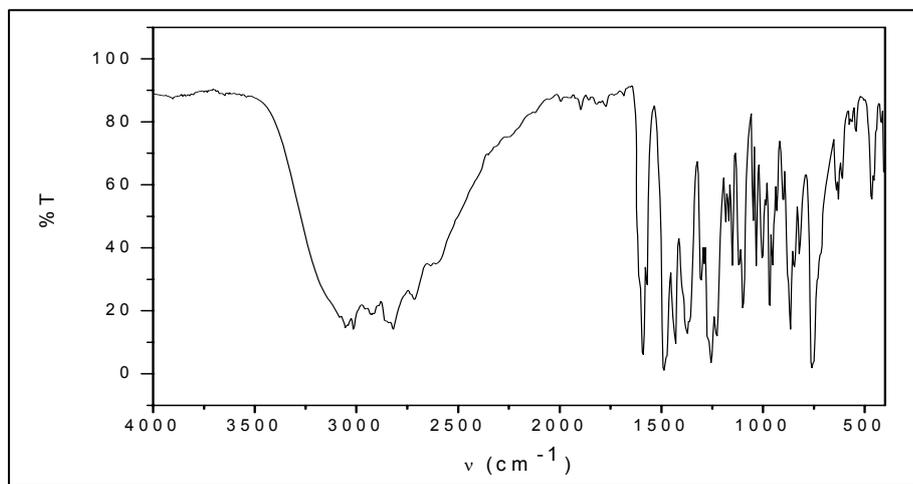


Figura 7 Espectroscopia no Infravermelho do ligante H₃bbmp em pastilha de KBr.

RMN ^1H - δ_{H} (400 MHz; CDCl_3), em ppm: 2,2 (s, 3H, CH₃); 3,74 (s, 4H, CH₂); 3,79 (s, 4H, CH₂), 3,83 (s, 4H, CH₂); 6,75 (t, 2H, CH_{ar}); 6,80 (d, 2H, CH_{ar}); 6,87 (s, 2H, CH_{ar}); 7,00 (d, 2H, CH_{ar}); 7,13 (t, 2H, CH_{ar}); 7,19-7,21 (4H, CH_{ar}); 7,64 (t, 2H, CH_{ar}), 8,60 (d, 2H, CH_{ar}); 10,64 (s, 2H, OH_{ph}).

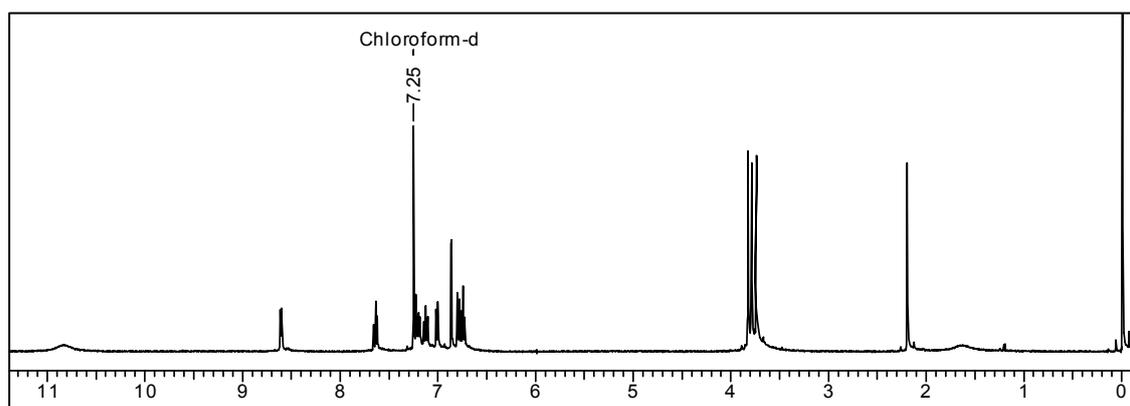


Figura 8 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H do ligante em CDCl_3 .

4.3 Síntese dos complexos

O complexo **1** foi sintetizado pela adição, gota a gota, de dois equivalentes de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ dissolvidos em metanol sobre uma solução também metanólica contendo o ligante, sob agitação e leve aquecimento. Foi adicionado uma solução de NaOH $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ até obter coloração vermelha.

A síntese do complexo **2** foi realizada de maneira análoga à do complexo anterior, usando $\text{FeCl}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ como sal do metal de partida e sem a adição de base. A Figura 9 ilustra o esquema da síntese dos complexos.

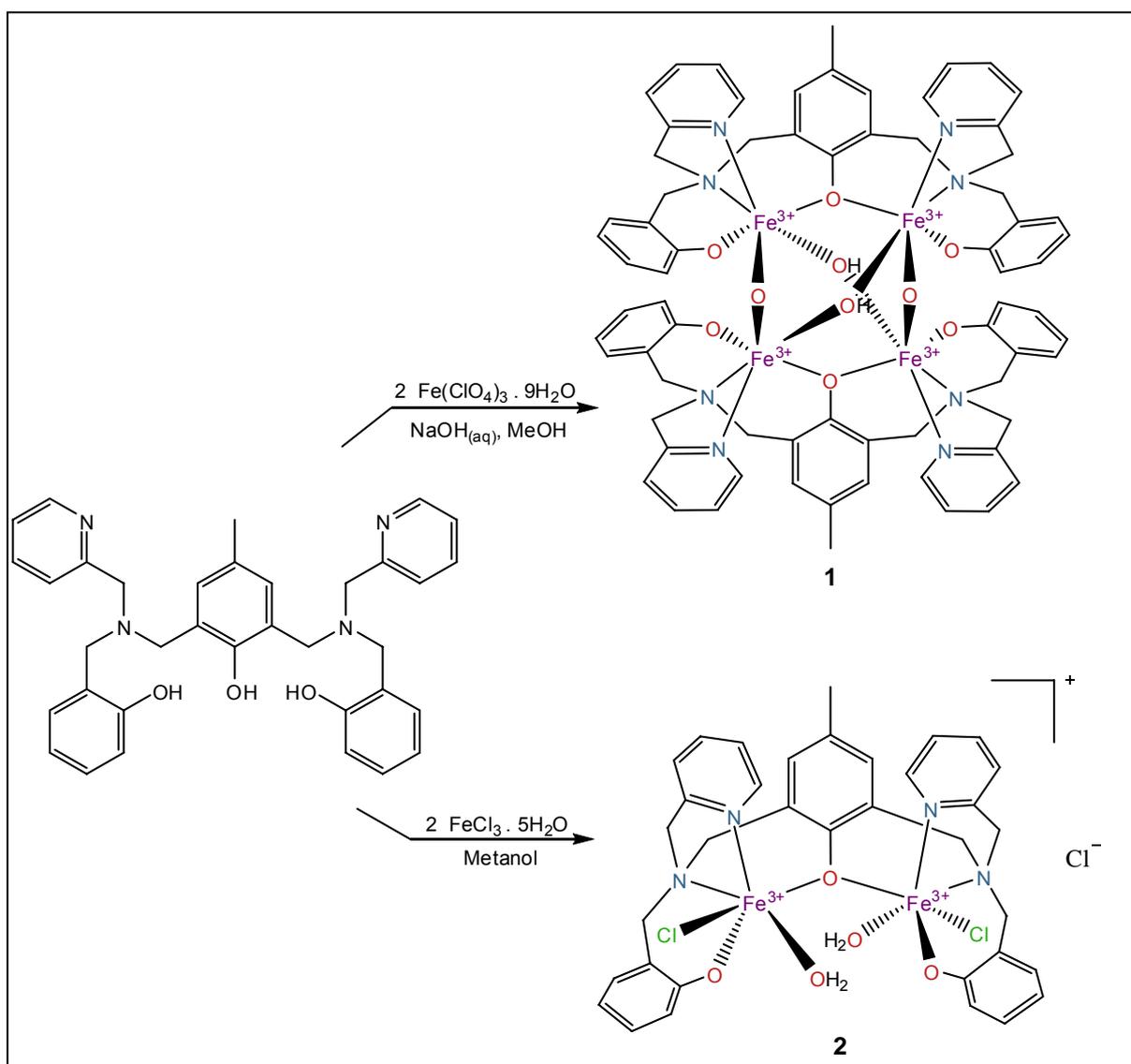


Figura 9 Síntese do complexo **1** e **2**.

Os complexos foram inicialmente caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho. Os gráficos podem ser observados na seção 5.2.1 de resultados e discussão.

Complexo 1. IV (KBr), em cm^{-1} : ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}) 3050-2843; ν (C=N e C=C) 1596,1482; ν ($\text{C-O}_{\text{fenol}}$) 1297; ν (C-N) 1101; δ (C-H_{Ar}) 758.

Complexo 2. IV (KBr), em cm^{-1} : ν 3582 e 3395 (O-H_{w}); ν (C-H_{Ar} e C-H_{Alif}) 3105-2865; ν (C=N e C=C) 1606,1485; ν ($\text{C-O}_{\text{fenol}}$) 1292; ν (C-N) 1078; δ (C-H_{Ar}) 769.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterizações do ligante

O ligante foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de Hidrogênio. Os espectros obtidos foram comparados aos reportados por Brito e colaboradores e comprovaram a sua formação e pureza adequada para a síntese do complexo. (BRITO *et al.*, 1993)

5.2 Caracterizações dos complexos

5.2.1 Infravermelho

Os espectros no infravermelho dos complexos **1** e **2** apresentaram as mesmas bandas típicas do ligante (Figura 10), porém com deslocamentos no comprimento de onda que indicaram complexação. A banda correspondente à ligação C-N das piridinas deslocou-se de 1255 no ligante livre para 1297 cm^{-1} no complexo **1** e para 1292 cm^{-1} no complexo **2**, bem como a ausência da banda δ (O-H_{ferro}) em 1371 cm^{-1} nos complexos indica a coordenação dos fenóis na forma desprotonada. A ausência de uma banda em torno de 1100 cm^{-1} demonstra a ausência do contra-íon perclorato (presente no sal de partida) no espectro do complexo **1**. É observado ainda no complexo **2**, duas bandas de água de coordenação em 3582 e 3395 cm^{-1} .

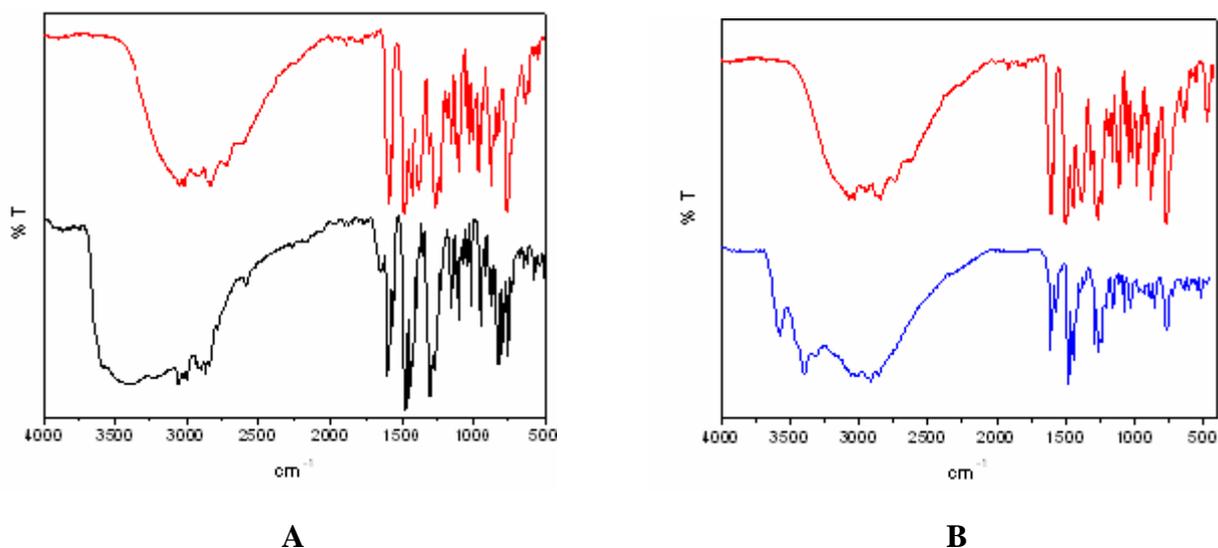


Figura 10 Espectros no infravermelho do ligante (vermelho) e do complexo 1 (preto) (A) e do complexo 2 (azul) (B).

5.2.2 Estruturas de raios X

As estruturas dos complexos 1 e 2 foram resolvidas a partir da obtenção de monocristais vermelhos e azuis, respectivamente, segundo a técnica de difratometria de raios X. A Figura 11 mostra os diagramas ORTEP para as estruturas e os dados cristalográficos do complexo 1 e 2 estão resumidos no Anexo 2 e Anexo 3.

As principais distâncias de ligação e ângulos para o complexo 1 apresentados na Tabela 2 e observáveis na Figura 11 mostram que o comprimento de ligação Fe-O_{oxo} nas pontes μ -oxo (dos átomos de oxigênio centrais) é de 1,78Å. Esta distância está na faixa de 1,76-1,82Å, observada em caracterizações cristalográficas das unidades [Fe-O-Fe]⁴⁺ em complexos di- e tetranucleares. (LIPPARD, 1988)

Os comprimentos de ligação Fe-O _{μ -oxo} são significativamente mais curtos quando comparados aos observados para Fe-O _{μ -hidroxo}, cujo comprimento encontrado foi de 1,96Å, e Fe-O _{μ -fenoxo} de comprimento 2,13Å e trazem como consequências imediatas, uma maior sobreposição dos orbitais nas unidades Fe-oxo-Fe em decorrência de efeitos eletrônicos e estéricos. Tais efeitos têm sido atribuídos em outros complexos de Ferro também. Portanto as separações Fe...Fe são 0,13Å menores através das pontes μ -oxo em relação às μ -hidroxo e 0,37Å

menores em relação as μ -fenoxo, mesmo sendo o ângulo $\text{Fe}(\mu\text{-oxo})\text{Fe}$ de $144,02^\circ$ maior que o ângulo $\text{Fe}(\mu\text{-hidroxo})\text{Fe}$ que é de $127,51^\circ$. (METRAN, 1995), (DICKSON; BERRY, 1986)

Observa-se ainda que todos os átomos de Nitrogênio estão em posição *trans* aos átomos de oxigênio nos complexos **1** e **2**. Com relação às distâncias Fe-N, no complexo **1**, existe uma pequena, mas significativa influência estrutural das ligações, referente ao tipo de ponte que se situa *trans* em relação aos nitrogênios. Nota-se que o comprimento de $2,24\text{\AA}$ das ligações Fe-N *trans* às ligações Fe-O $_{\mu\text{-oxo}}$ são mais longos que Fe-N de $2,21\text{\AA}$ a Fe-O $_{\mu\text{-hidroxo}}$. Este fato pode ser interpretado como sendo resultado da maior influência *trans* exercida pelas ligações Fe-O $_{\mu\text{-oxo}}$. Com relação ao complexo **2** a influência *trans* também é observada, pois o comprimento das ligações Fe-N *trans* ao Fe-O $_w$ de $2,19\text{\AA}$ são maiores que das ligações Fe-O $_{\text{fenolato}}$ de $2,16\text{\AA}$ e este é ainda maior que a ligação Fe-O $_{\mu\text{-fenoxo}}$ de $2,13\text{\AA}$. (METRAN, 1995)

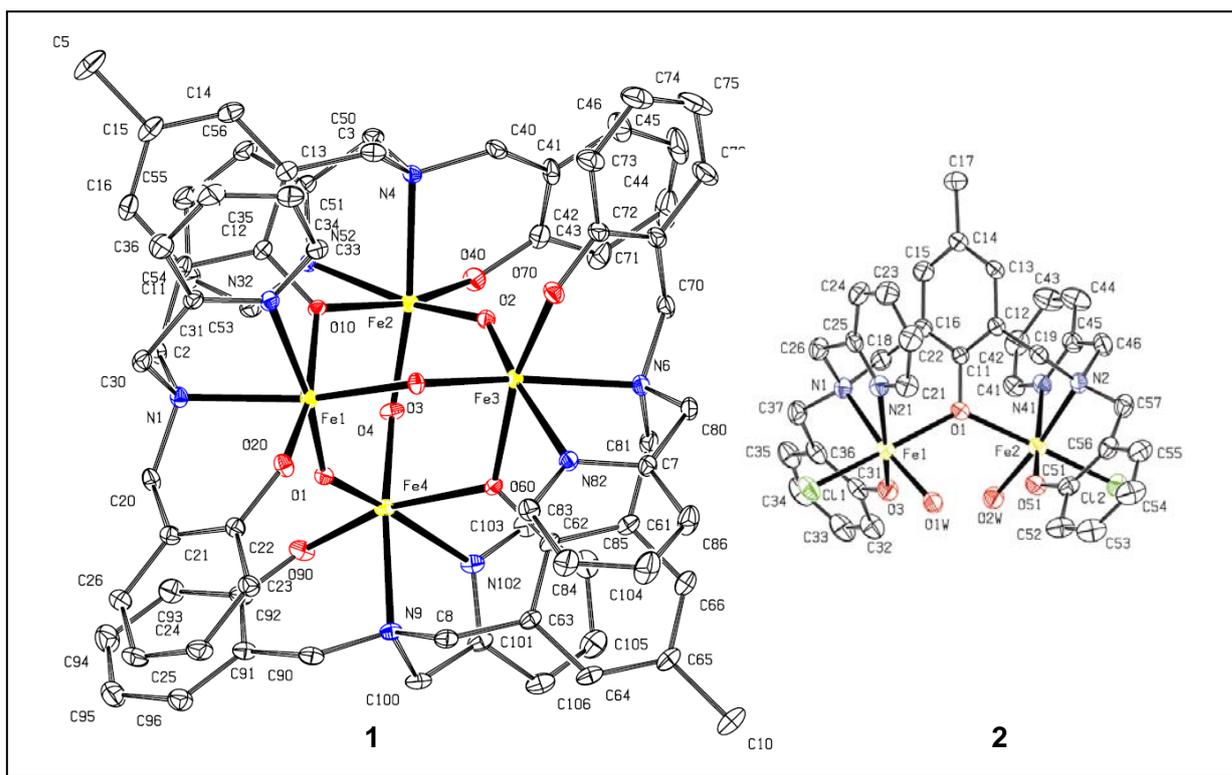


Figura 11 ORTEP do complexo **1** e **2**.

Tabela 2 Comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°) do centro de ferro selecionados para o complexo 1 e 2.

Complexo 1		Complexo 2	
Fe(1)-O(1)	1,782(3)	Fe(1)-O(3)	1,899(5)
Fe(1)-O(3)	1,964(3)	Fe(1)-O(1W)	2,034(5)
Fe(1)-O(20)	2,004(3)	Fe(1)-O(1)	2,132(4)
Fe(1)-O(10)	2,129(3)	Fe(1)-N(21)	2,155(6)
Fe(1)-N(1)	2,206(4)	Fe(1)-N(1)	2,187(5)
Fe(1)-N(32)	2,240(4)	Fe(1)-Cl(1)	2,314(2)
O(1)-Fe(1)-O(3)	101,15(14)	O(3)-Fe(1)-O(1W)	95,0(2)
O(1)-Fe(1)-O(20)	98,32(15)	O(3)-Fe(1)-O(1)	91,7(2)
O(3)-Fe(1)-O(20)	89,60(14)	O(1W)-Fe(1)-O(1)	84,5(2)
O(1)-Fe(1)-O(10)	93,74(13)	O(3)-Fe(1)-N(21)	163,8(2)
O(3)-Fe(1)-O(10)	94,66(13)	O(1W)-Fe(1)-N(21)	99,7(2)
O(20)-Fe(1)-O(10)	166,20(14)	O(1)-Fe(1)-N(21)	82,9(2)
O(1)-Fe(1)-N(1)	95,32(16)	O(3)-Fe(1)-N(1)	86,2(2)
O(3)-Fe(1)-N(1)	162,70(15)	O(1W)-Fe(1)-N(1)	173,5(2)
O(20)-Fe(1)-N(1)	82,78(15)	O(1)-Fe(1)-N(1)	89,09(19)
O(10)-Fe(1)-N(1)	89,46(13)	N(21)-Fe(1)-N(1)	78,5(2)
O(1)-Fe(1)-N(32)	170,59(16)	O(3)-Fe(1)-Cl(1)	98,56(17)
O(3)-Fe(1)-N(32)	88,15(15)	O(1W)-Fe(1)-Cl(1)	89,98(17)
O(20)-Fe(1)-N(32)	82,99(15)	O(1)-Fe(1)-Cl(1)	168,74(15)
O(10)-Fe(1)-N(32)	84,02(13)	N(21)-Fe(1)-Cl(1)	88,46(18)
N(1)-Fe(1)-N(32)	75,55(16)	N(1)-Fe(1)-Cl(1)	96,20(16)
Fe(1)-O(1)-Fe(4)	144,0(2)	C(11)-O(1)-Fe(1)	117,5(3)
Fe(3)-O(3)-Fe(1)	127,62(17)	C(31)-O(3)-Fe(1)	133,7(4)

Analisando o sítio ativo do complexo observa-se que a geometria exibida por Fe_4O_6 é do tipo adamantano como destacado na Figura 12.

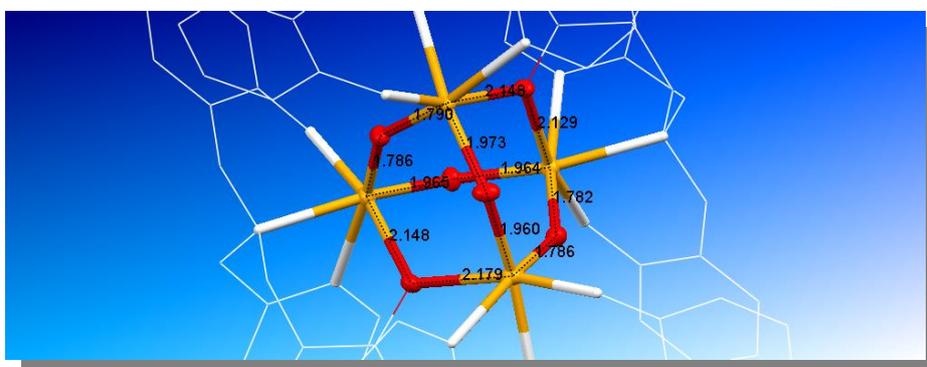


Figura 12 Vista da geometria tipo adamantano exibida pelo complexo 1.

5.2.3 Espectroscopia Eletrônica

O íon ferro no estado de oxidação 3+ possui configuração d^5 e apresenta geometria octaédrica, como é observado na Figura 11 para os dois complexos. O efeito Jahn-Teller não é observado devido os átomos de ferro serem spin alto. Esta atribuição é feita baseada nas análises de espectroscopia Mössbauer de vários complexos semelhantes de Fe^{III} , inclusive com o mesmo ligante por Brito e colaboradores. (BRITO, 1994)

Os espectros eletrônicos dos complexos **1** e **2** são apresentados na Figura 13. O complexo **1** apresenta duas transições eletrônicas, um ombro em 448nm atribuído a um processo de transferência de carga do tipo ligante→metal (TCLM), proveniente dos orbitais $p\pi_{\text{fenolato}} \rightarrow d\pi^*$ do íon Fe^{III} , e uma banda centrada em 295 nm de transição intraligante. O complexo **2** apresenta uma banda em 548 nm ($\epsilon=5468 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) da mesma TCLM do complexo **1** e um ombro em 355 nm de uma TCLM dos orbitais $p\pi_{\text{fenolato}} \rightarrow d\sigma^*$ do íon Fe^{III} , e também um ombro em 274nm de transição intraligante.

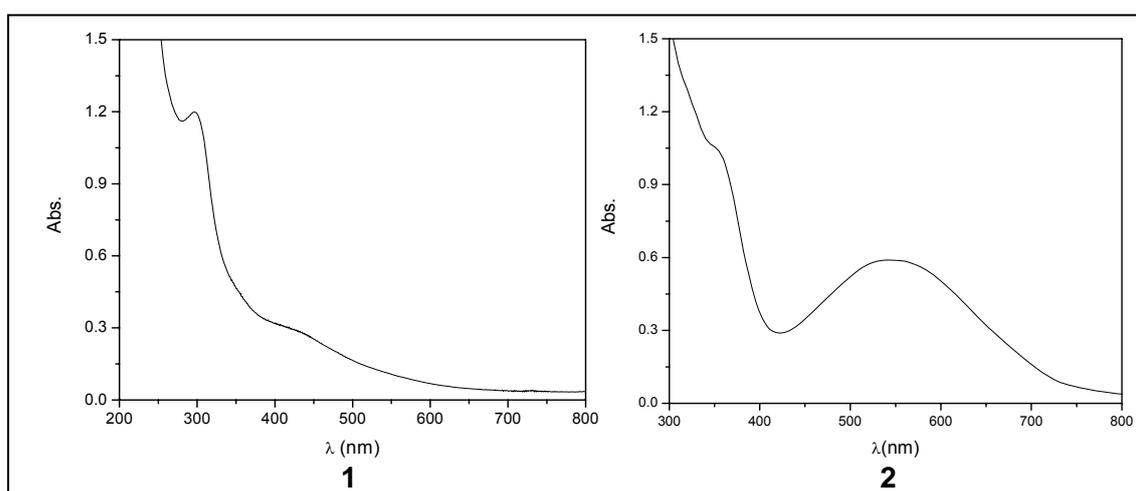


Figura 13 Espectroscopia eletrônica do complexo **1** em acetonitrila ($1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e **2** em diclorometano ($3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Comparando-se as energias para os espectros eletrônicos dos complexos **1** e **2** pode-se observar um deslocamento batocrômico, que está relacionado à diferença na densidade eletrônica sobre os átomos de Ferro. Esse deslocamento também pode estar relacionado ao solvatocromismo.

Através de um acompanhamento por espectroscopia eletrônica do complexo **1** em metanol, Figura 14, foi possível observar a conversão deste no complexo **2** em solução.

Os pontos isobésticos observados no gráfico indicam um equilíbrio das duas espécies. Através dos dados desse acompanhamento foi calculado o tempo de aparecimento da espécie púrpura (binuclear), onde se pode verificar na Figura 15 que a partir de 8h aproximadamente já não há maiores variações de absorvância.

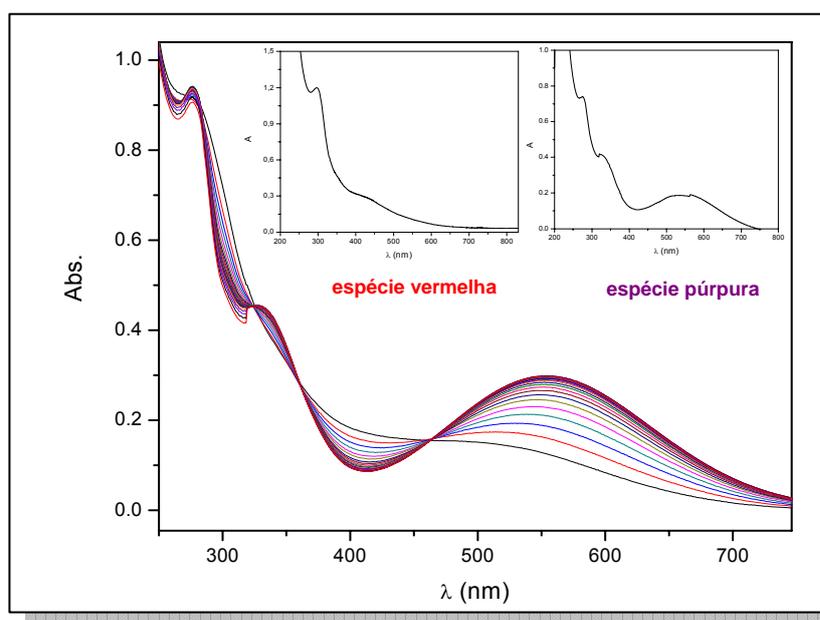


Figura 14 Acompanhamento da mudança espectral com o tempo de uma solução $1,2 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ em metanol do complexo **1** através de espectroscopia eletrônica. Inserções: Espectro Eletrônico da espécie vermelha (complexo **1**) em acetonitrila ($1,2 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹) e da espécie púrpura após 15h de incubação.

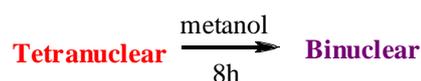
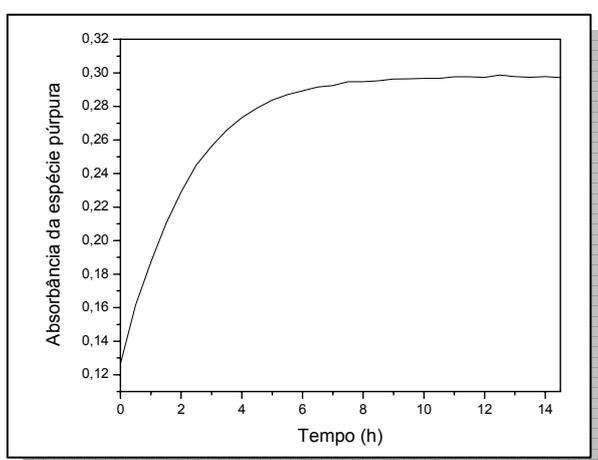


Figura 15 Aparecimento da espécie binuclear, baseado no acompanhamento do espectro eletrônico em $\lambda = 552$ nm. Concentração do complexo **1**: $1,2 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹.

5.2.4 Eletroquímica

A eletroquímica foi realizada em acetonitrila/água (1:1 v/v) em pH 6,5 com o intuito de se caracterizar a espécie ativa na catálise da reação de hidrólise. O comportamento redox do complexo **1** foi investigado através da técnica de voltametria cíclica e onda quadrada. Na voltametria de onda quadrada observou-se um processo *quasi*-reversível com $-0,02\text{V}$ vs NHE atribuída ao sistema redox $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{III}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ e uma segunda onda em $E_{1/2} = -0,28\text{V}$ vs NHE, referente ao sistema $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{II}}$. As mesmas ondas referentes à oxidação e apenas uma onda da redução são observadas na voltametria cíclica, porém com menor intensidade porque a técnica da onda quadrada é mais sensível. (Figura 16).

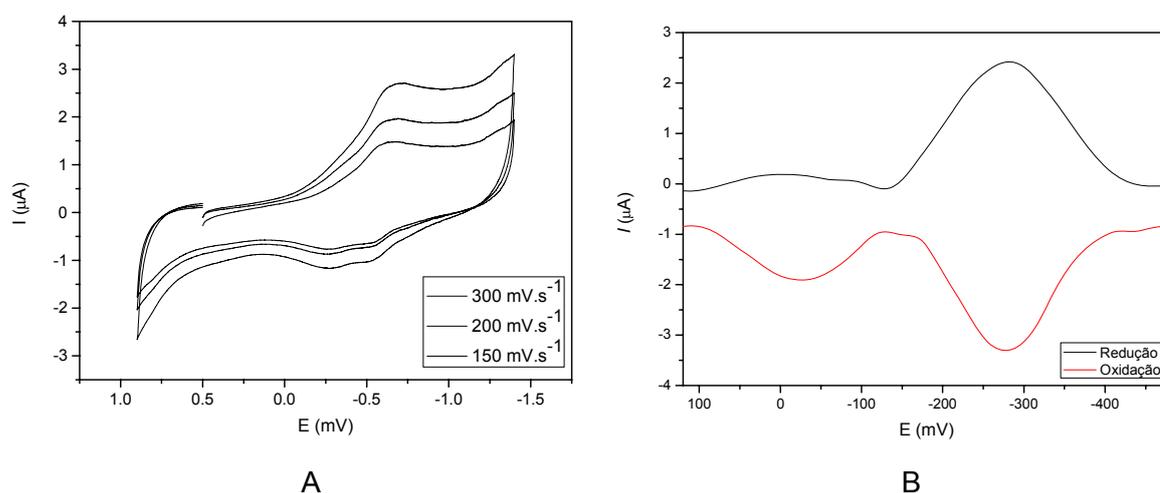


Figura 16 A. Voltametria cíclica. Condições: solvente: acetonitrila/água (1:1 v/v). eletrólito: KCl $0,1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; eletrodo de trabalho: carbono, eletrodo auxiliar: platina, eletrodo de referência - Ag/AgCl). B. Voltametria de onda quadrada. Condições: solvente: acetonitrila/água (1:1 v/v). eletrólito: KCl $0,1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; eletrodo de trabalho: carbono, eletrodo auxiliar: platina, eletrodo de referência - Ag/AgCl)

5.3 Titulação potenciométrica

Devido à baixa solubilidade do complexo **1** em meio aquoso, os estudos de titulação potenciométrica foram realizados em solução de etanol/água (70/30 v/v). Estes experimentos foram realizados para avaliar a presença de moléculas de água

coordenadas aos centros metálicos, quando os complexos se encontram em solução e também com o intuito de confirmar a conversão do complexo **1** no **2**.

O resultado obtido mostrou a neutralização de 3 mols de KOH por mol de complexo na região de pH entre 3,50 e 10,50. O tratamento destes dados levou à obtenção de três constantes de desprotonação, cujos valores são: 3,19; 6,16 e 9,09.

O mesmo procedimento foi realizado para o complexo **2**, o qual apresentou as seguintes constantes: 3,51; 6,17 e 8,81. Estes valores são muito semelhantes aos obtidos para o complexo **1**, corroborando a interconversão dos complexos em solução, apresentados na seção de espectroscopia eletrônica.

A primeira constante, ou pK_a , pode ser atribuída à formação de uma espécie contendo uma ponte oxo entre os dois centros metálicos. A segunda constante pode ser atribuída à desprotonação de uma molécula de água coordenada a um centro de Fe^{III} e a terceira constante pode estar relacionada à formação da espécie tetranuclear. Na Figura 17 é apresentada uma proposta para os equilíbrios observados em solução e o gráfico de distribuição das espécies pode ser observado na Figura 18.

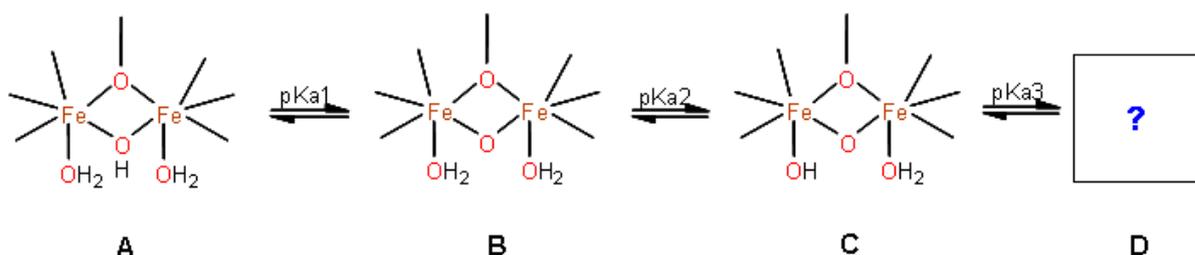


Figura 17 Proposta para os equilíbrios observados para o complexo **1** e **2** em solução.

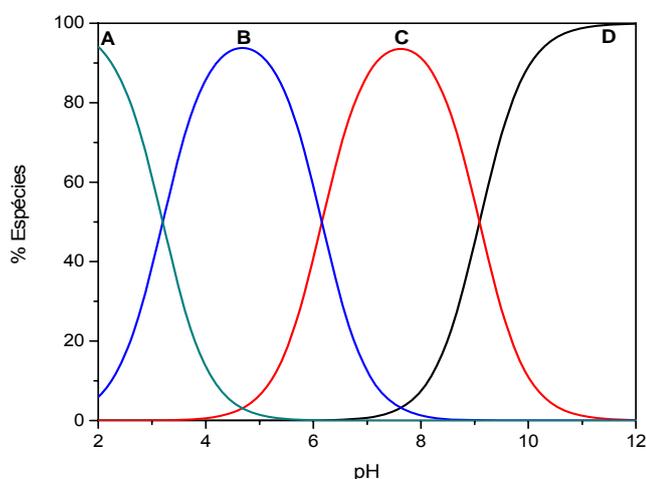


Figura 18 Gráfico de distribuição de espécies em função do pH para o complexo **1**.

5.4 Reatividade

5.4.1 Hidrólise do Éster de Fosfato 2,4-BDNPP

A atividade catalítica do complexo **1** na hidrólise de ésteres de fosfato foi avaliada na reação de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP, sob condições de excesso de substrato a 25°C, conforme ilustrado na Figura 19. Para obtenção dos parâmetros cinéticos utilizou-se o método das velocidades iniciais, onde as reações foram monitoradas por método espectrofotométrico durante 3 a 5 % da conversão de substrato modelo à produto através do incremento da absorvância em 400 nm devido à liberação de 2,4-dinitrofenolato como produto. (PISZKIEWICZ, 1977), (BATISTA *et al.*, 2003)

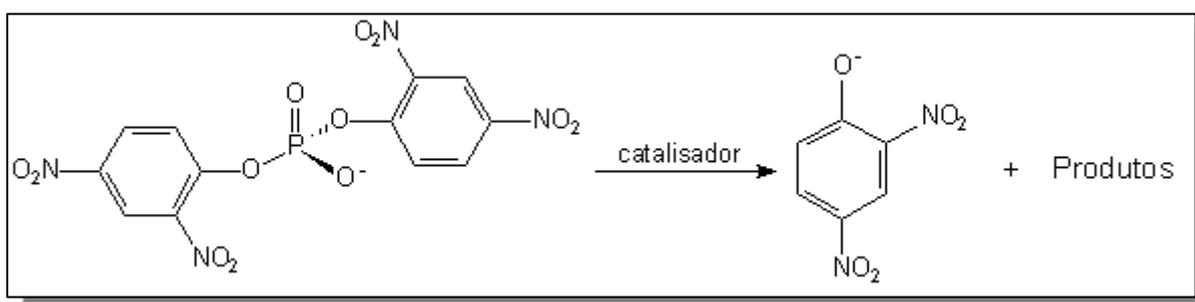


Figura 19 Reação de hidrólise de um substrato modelo (2,4-BDNPP) catalisada por **1**.

5.4.1.1 Estudo da Influência do pH na hidrólise do 2,4-BDNPP

Foram realizados estudos do efeito do pH sobre a atividade catalítica do complexo na reação de hidrólise, visando à determinação do pH de atividade máxima. O perfil do gráfico das velocidades iniciais (V_0) *versus* o pH apresenta um formato de sino, apresentando valor de pH máximo em 6,5 como ilustrado na Figura 20.

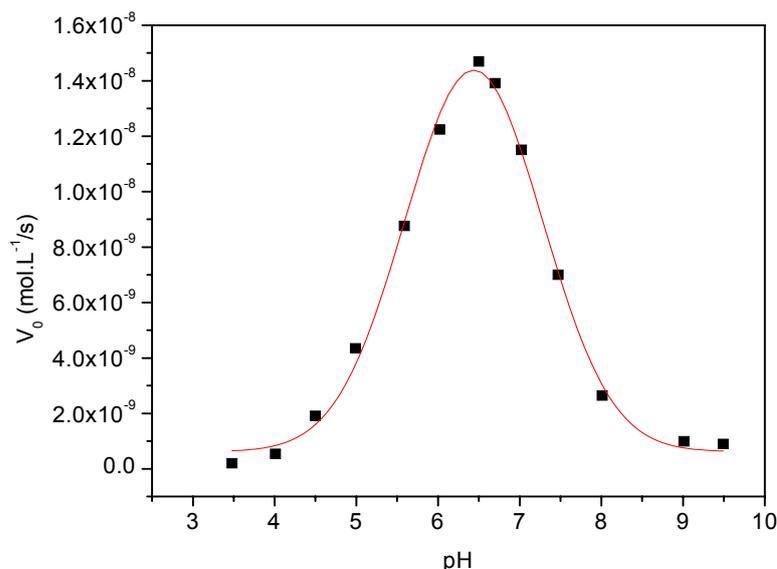


Figura 20 Dependência da velocidade de reação de hidrólise do 2,4-BDNPP com o pH para o complexo. Condições: [Complexo] = $3,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, [2,4-BDNPP] = $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, [Tampões] = $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, solução acetonitrila/água (1:1) a 25°C.

Os valores dos pK_a cinéticos foram determinados na inflexão das curvas para cada metade do sino, através do ajuste sigmoideal dos dados. Os valores encontrados foram: 5,53 e 7,33.

Os valores de pK_a obtidos via potenciometria e os pK_a cinéticos estão sumarizados na Tabela 3, onde pode ser observado que o pK_{a1} cinético e o pK_{a2} potenciométrico estão em concordância. No entanto, o pK_{a2} cinético e pK_{a3} potenciométrico apresentam uma diferença significativa (1,76 unidades de pK_a). Uma explicação para este resultado pode estar relacionada à influência da formação da espécie tetranuclear em inibir a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP.

Tabela 3 Valores de pK_a obtidos para o complexo 1.

Cinéticos		Potenciométrico	
pK_{a1} 5,53	pK_{a2} 7,33	pK_{a2} 6,16	pK_{a3} 9,09

Avaliando o perfil de pH da reação de hidrólise juntamente com a distribuição das espécies (Figura 21) verifica-se que assim que o sino é formado logo em seguida a atividade na hidrólise diminui não ocorrendo à formação de um *plateau* característico dos perfis de pH na forma de sino regular. Assim, a formação da

espécie tetranuclear pode estar relacionada à brusca diminuição na atividade hidrolítica já que esta inibe a reação.

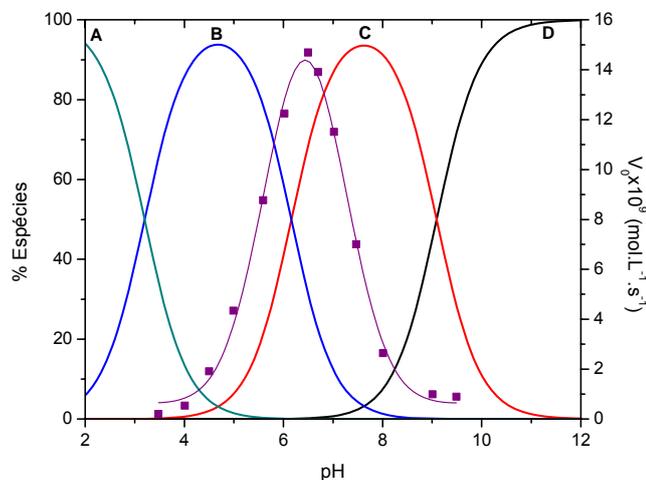


Figura 21 Sobreposição do gráfico de distribuição das espécies em função do pH e dependência da velocidade de reação de hidrólise do 2,4-BDNPP com o pH para o complexo 1.

Dessa forma é a espécie C a provável espécie cataliticamente ativa na reação de hidrólise por conter um sítio de coordenação lábil $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OH}_2$ para fixar e ativar o substrato e um grupo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OH}$ para realizar o ataque nucleofílico sobre o átomo de fósforo do substrato.

5.4.1.2 Efeito da concentração do substrato na reação de hidrólise do 2,4-BDNPP

A avaliação da dependência da concentração do substrato, sobre a velocidade da reação de hidrólise do mesmo foi investigada em pH 6,5, pH ótimo de atividade, descrito na seção anterior. Nesses experimentos pôde-se observar que há uma dependência linear da velocidade a baixas concentrações de substrato (dependência de 1ª ordem), porém, com o aumento da concentração de 2,4-BDNPP ocorre um desvio da linearidade tendendo a uma curva de saturação (ordem zero). Esta dependência das velocidades iniciais em função da concentração do substrato sugere que a reação de hidrólise ocorre com a formação de um intermediário

complexo-substrato, conforme o modelo de Michaelis-Menten. (PISZKIEWICZ, 1977).

Desta forma, pôde ser aplicado o modelo de cinética através da equação de Michaelis-Menten (Equação 1) usando um método não linear, o qual forneceu dados necessários para o cálculo dos parâmetros cinéticos do complexo estudado. A dependência da velocidade da reação de hidrólise com a concentração do substrato catalisada pelo complexo **1** é mostrada na Figura 22 e os valores obtidos pelos métodos das velocidades iniciais na Tabela 4.

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (01)$$

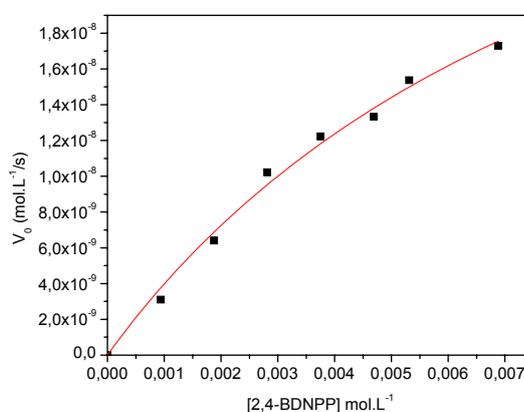


Figura 22 Dependência da velocidade de reação de hidrólise do 2,4-BDNPP com a concentração do substrato para o complexo **1**. Condições: $[C]_{\text{final}} = 3,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $[2,4\text{-BDNPP}]_{\text{final}} = 0,9 \cdot 10^{-3} - 6,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $[MES]_{\text{final}} = 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 6,5); em solução Acetonitrila/Água (1:1) a 25 °C.

Conforme se observa na Tabela 4, o complexo **1** é efetivo na conversão do substrato a produtos, apresentando uma aceleração de aproximadamente 6040 vezes em relação a velocidade de hidrólise da reação não catalisada ($k_{nc} = 1,8 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$). (BUNTON; FARBER, 1969)

Tabela 4 Parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise estudada. (JOVITO, 2009)

Complexo	$V_{m\acute{a}x}$ (mol.L ⁻¹ .s ⁻¹)	K_M (mol.L ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_{ass} (mol ⁻¹ .L)	f	E
1	$4,19 \cdot 10^{-8}$	$9,56 \cdot 10^{-3}$	$1,08 \cdot 10^{-3}$	104,6	6042,5	0,11
Fe ^{III} Fe ^{III}	$3,36 \cdot 10^{-9}$	$0,19 \cdot 10^{-3}$	$8,40 \cdot 10^{-5}$	5263,1	466,6	0,44

Comparando-se os valores apresentados na Tabela 4 para o complexo **1** e o complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ com ligante não simétrico (H_2bpbmp), ilustrado na Figura 23, verifica-se que a constante de associação do complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ é muito maior que o obtido pelo complexo **1**, e apesar de ligantes não simétricos mimetizarem melhor os resíduos de aminoácidos presente no sítio ativo das PAP's essa grande diferença entre as constantes pode indicar que os mecanismos sejam diferentes para os dois complexos. Já a constante catalítica do complexo **1** é maior que do complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ e assim pode-se dizer que, apesar do complexo **1** não ter muita afinidade pelo substrato, este é um melhor catalisador para a reação.

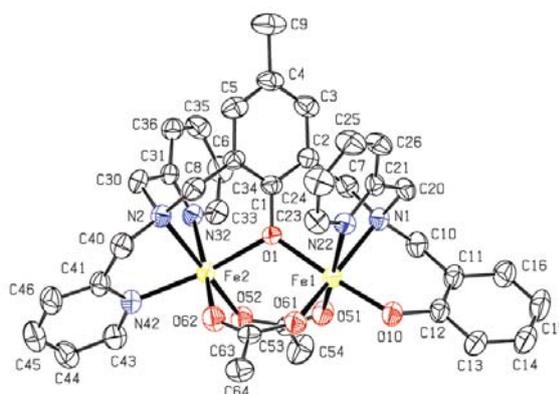


Figura 23 Complexo $[(\text{BPBPMP})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})_2\text{Fe}^{\text{III}}](\text{ClO}_4)_2$. (JOVITO, 2009)

Vale lembrar que conforme dados de titulação potenciométrica, espectroscopia eletrônica e eletroquímica para o complexo **1**, este se apresentou como uma espécie homobinuclear, sendo esta a espécie ativa na hidrólise do substrato 2,4-BDNPP. Assim, todos os cálculos dos parâmetros e condições cinéticas já se encontram corrigidas para uma concentração do complexo em solução múltipla de 2, uma vez que uma espécie homotetranuclear gera dois equivalentes da espécie homobinuclear.

5.4.1.3 Proposta de mecanismo para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP

Com base nas informações obtidas nos estudos de efeito de pH e de substrato, além dos dados de potenciometria é possível propor um mecanismo de catálise do diéster de fosfato 2,4-BDNPP.

Os estudos do efeito do pH na reação de hidrólise, juntamente com os dados da titulação potenciométrica, evidenciam que a espécie ativa seja a espécie $(\text{OH})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-O})\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH}_2)$.

No mecanismo proposto, apresentado na Figura 24, o substrato desloca uma molécula de água coordenada a um centro de Fe^{III} em uma etapa rápida.

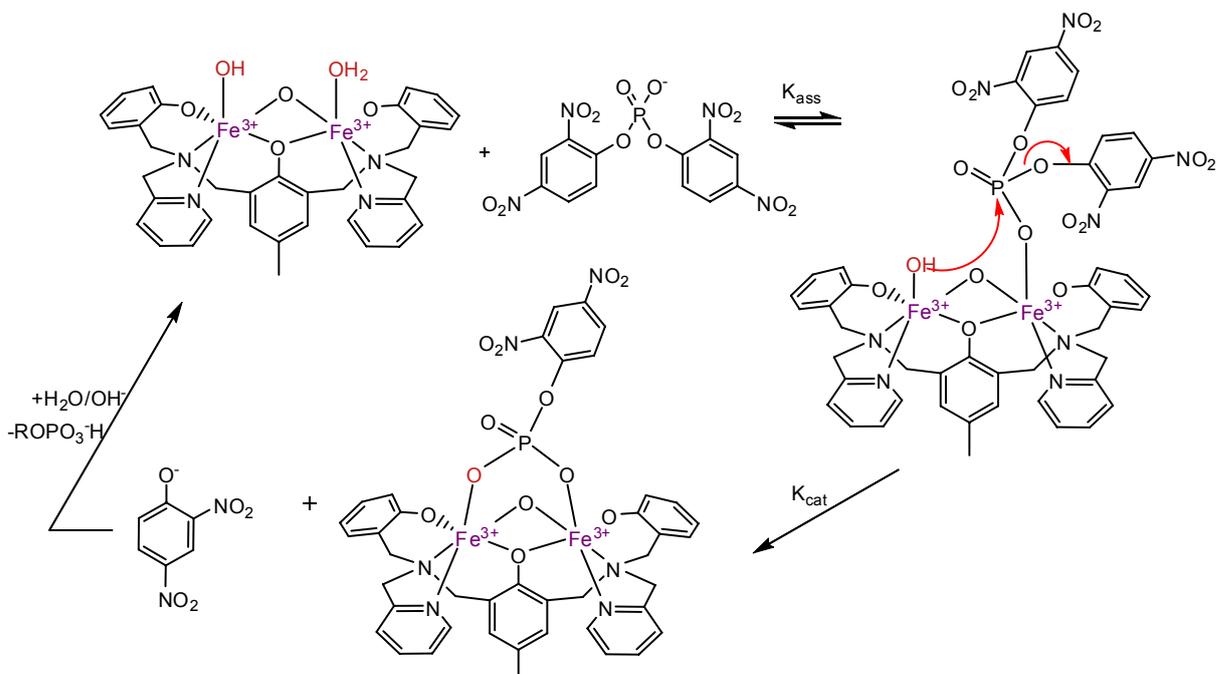


Figura 24 Proposta para o mecanismo de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada pelo complexo 1.

A seguir, o íon hidróxido coordenado ao outro centro de Fe^{III} atua como nucleófilo, atacando o átomo de fósforo do substrato, ocorrendo então a hidrólise da ligação fosfodiéster e a liberação do produto 2,4-dinitrofenolato. O monoéster, 2,4-dinitrofenilfosfato, permanece coordenado ao complexo, podendo ser deslocado pela presença de excesso do substrato 2,4-BDNPP, reiniciando o processo catalítico.

5.4.2 Oxidação do 3,5-di-terc-butilcatecol

Com o objetivo de estudar a promiscuidade catalítica do complexo 1, foi analisado a reatividade deste com um substrato modelo para catecol oxidase, o 3,5-DTBC. Um esquema ilustrativo para essa reação é apresentado na Figura 25.

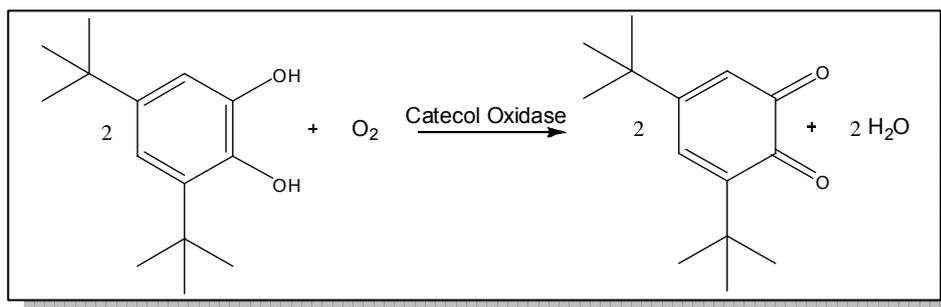


Figura 25 Esquema ilustrativo para reação de oxidação do substrato 3,5-DTBC.

5.4.2.1 Estudo da Influência do pH na oxidação do 3,5-DTBC

A fim de investigar a dependência da reação de oxidação em função do pH do meio, realizou-se a oxidação do 3,5-DTBC na presença do complexo **1** em várias soluções tamponadas. A partir da curva das velocidades iniciais (V_0) versus os valores de pH, pôde-se obter tanto o pH ótimo para a reação como o pK_a cinético. O gráfico obtido pode ser observado na Figura 26.

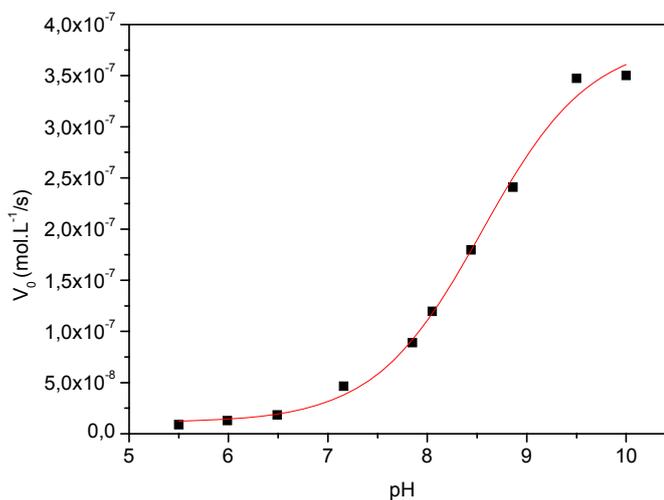


Figura 26 Dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5-DTBC com o pH para o complexo. Condições: [Complexo] = $2,9 \cdot 10^{-5}$ mol.L^{-1} , [3,5-DTBC] = $5,0 \cdot 10^{-3}$ mol.L^{-1} , [Tampões] = $1,0$ mol.L^{-1} , solução metanol/água (30:1) a 25°C .

O perfil obtido no efeito do pH indica que em valores de pH mais baixos não houve praticamente atividade de oxidação promovida pelo complexo e, à medida

que o pH foi aumentado, houve um significativo aumento na reatividade. A partir de um ajuste sigmoidal à curva, obteve-se na inflexão um valor pK_a cinético de 8,55 que está em concordância com o valor obtido para o terceiro pK_{a3} por titulação potenciométrica, 9,09.

Avaliando o perfil de pH da reação de oxidação juntamente com a distribuição das espécies (Figura 27) verifica-se que a espécie ativa é a D que provavelmente está relacionada a formação da espécie tetranuclear.

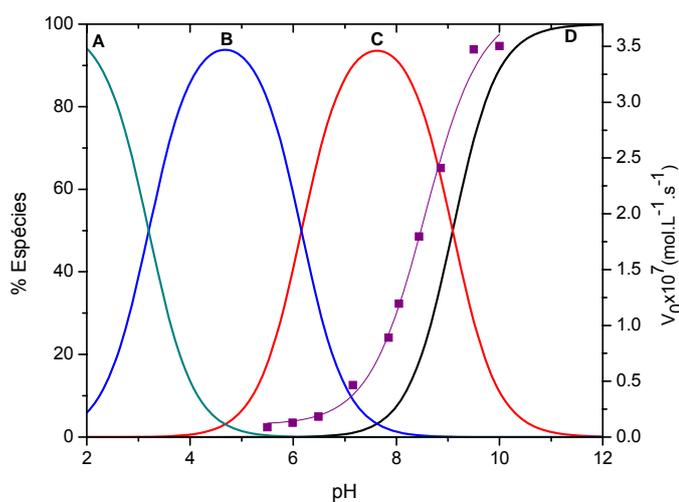


Figura 27 Gráfico de distribuição de espécies em função do pH e dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5-DTBC com o pH para o complexo 1.

5.4.2.2 Efeito da concentração do substrato na reação de oxidação do 3,5-DTBC

Com o objetivo de determinar os parâmetros cinéticos da reação de oxidação do 3,5-DTBC catalisada pelo complexo 1, estudos do efeito da concentração do substrato 3,5-DTBC sobre a velocidade de oxidação do mesmo foram investigados em pH 9,5. A Figura 28 apresenta os gráficos de velocidade inicial (V_0) em função da concentração do 3,5-DTBC para a reação de oxidação catalisada e a Tabela 5 os parâmetros cinéticos obtidos através da equação de Michaelis-Menten (Equação 1).

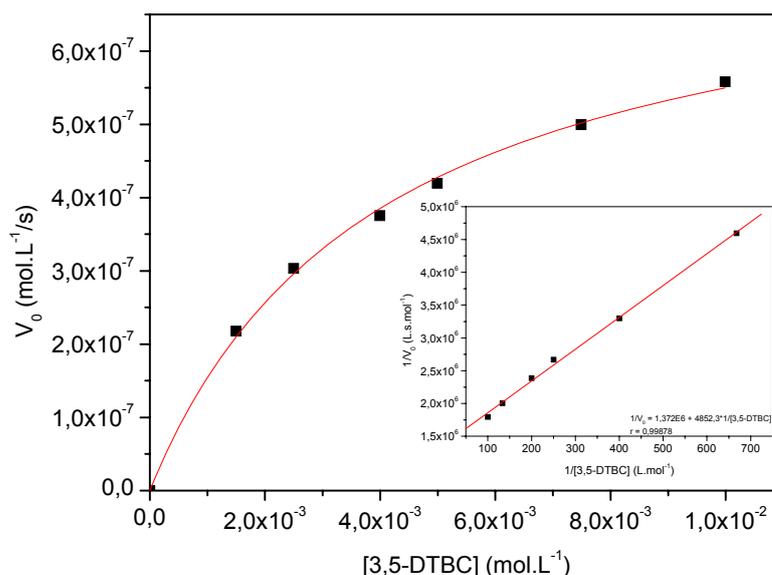


Figura 28 Dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5-DTBC com a concentração do substrato para o complexo. Inserção: Gráficos de Lineweaver-Burk. Condições: $[C]_{\text{final}} = 2,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $[3,5\text{-DTBC}]_{\text{final}} = 1,7 \cdot 10^{-3} - 11 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{CHES}]_{\text{final}} = 1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 9,5); em solução MeOH/H₂O (30:1) a 25 °C, incubação de 24h.

Analisando a Tabela 5, verifica-se que a constante de associação do complexo Fe^{III}Fe^{III}, ilustrado anteriormente na Figura 23, é muito maior do que do complexo **1** na reação de oxidação do substrato 3,5-DTBC.

Tabela 5 Parâmetros cinéticos para a reação de oxidação do 3,5-DTBC. (JOVITO, 2009)

Cinética	$V_{\text{máx}}$ ($\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	K_{M} (mol.L^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	K_{ass} ($\text{mol}^{-1}.\text{L}$)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
1	$8,75 \cdot 10^{-7}$	$39,5 \cdot 10^{-4}$	0,0302	253,2	7,64
Fe ^{III} Fe ^{III}	$1,69 \cdot 10^{-7}$	$7,1 \cdot 10^{-4}$	0,0116	1408,5	16,34

Essa diferença indica uma menor afinidade da espécie tetranuclear com o substrato ou ainda pode indicar que os mecanismos de reação sejam diferentes para os complexos **1** e Fe^{III}Fe^{III} referenciado na Tabela 5.

6 CONCLUSÕES

Foi sintetizado e caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio o ligante já descrito na literatura H₃bbpmp.

Foram sintetizados dois novos complexos de Fe^{III} empregando-se o ligante H₃bbpmp. Os complexos foram caracterizados por infravermelho, de onde foi possível identificar as bandas provenientes do ligante, por espectroscopia eletrônica, de onde se atribuíram bandas de transferência de carga, e eletroquímica, cujos experimentos forneceram os valores dos potenciais redox. Os complexos tiveram sua estrutura resolvida pela técnica de difração de raios x e estudos de titulação potenciométrica permitiram propor algumas espécies presentes em solução.

Estudos de reatividade do complexo frente à hidrólise do substrato 2,4-BDNPP revelaram que o complexo possui capacidade catalítica com aceleração de aproximadamente seis mil vezes em relação à reação não catalisada.

Estudos da reatividade do complexo frente à oxidação do substrato 3,5-DTBC revelaram que o complexo possui capacidade catalítica com $k_{\text{cat}} = 30,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e $E = 7,64$ na conversão do substrato a produtos.

Dessa forma os novos complexos sintetizados, apesar de não serem modelo estrutural para as PAPs na forma oxidada, em solução apresentam atividade na hidrólise de éster de fosfato além de apresentarem promiscuidade catalítica em reação de transferência de elétrons.

7 PERSPECTIVAS

Apesar dos esforços de se obter dados suficientes para a proposta do mecanismo de ação do complexo na catálise dos substratos modelos alguns experimentos ainda são necessários, como:

Acompanhamento da reação de hidrólise do 2,4-DNPP (2,4-dinitrofenilfosfato) para verificar se o complexo é também capaz de catalisar a hidrólise do monoéster de fosfato.

Para avaliar a possibilidade de uma catálise geral na reação de hidrólise é necessário o estudo do efeito isotópico de deutério.

Estudos de espectrometria de massa de elétron spray (ESI) em diferentes pHs são absolutamente necessários para os complexos obtidos no presente trabalho. Estes estudos têm o objetivo de verificar se os complexos formam as mesmas espécies em solução, corroborando a idéia de interconversão dos mesmos e para a elucidação das espécies ativas na reação de oxidação.

A utilização de substratos com apenas um grupo de saída, como por exemplo, o diéster, sal de lítio do 2,4-dinitrofeniletilfosfato, permitirá um estudo mais adequado dos produtos da reação de hidrólise.

Estudos das propriedades magnéticas e de Mössbauer dos complexos também permitirão uma melhor caracterização dos mesmos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATISTA, S., C., NEVES, A., BORTOLUZZI, A. J., VENCATO, I., PERALTA, R. A., SZPOGANICZ, B., AIRES, V. E., SEVERINO, P. C., Highly efficient phosphate diester hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical Fe^{III}Ni^{II} model complex. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 6, p. 1161-1165, 2003.
- BENDER, Myron L.; D'SOUZA, Valerian T. Miniature Organic Models of Enzymes. **Accounts of Chemical Research**, n.20, p.146-152, 1987
- BORN, K.; COMBA, P.; DAUBINET A.; FUCHS A.; WADEPOHL H. Catecholase Activity of Dicopper(II)-Bispidine Complexes: Stabilities and Structures of Intermediates, Kinetics and Reaction Mechanism. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, p. 36-48, 2007.
- BRITO, M. A.; NEVES, A.; VENCATO Ivo; DRAGO, Valderes; KLAUS, Griesar; HAASE, Wolfgang; MASCARENHAS, Yvonne P. Synthesis, crystal structure and properties of a new binuclear iron(III) complex as a model for the purple acid phosphatases. **Inorgânica Chimica Acta**. v. 214, p. 5-8, 1993
- BRITO, Marcos A. Análogos Sintéticos para a Estrutura do Sítio Ativo das Fosfatases Ácidas Púrpuras. **Tese de doutorado em Química**, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1994.
- BUNTON, C. A.; FARBER, S. J. The hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 34, p. 767-772, 1969.
- COOPER, A. J. L.; BRUSCHI, S. A.; IRIARTE, A.; MARTINEZ-CARRION, M. Mitochondrial aspartate aminotransferase catalyzes cysteine S-conjugate b-lyase reactions. **Biochemical Journal**, n. 368, p. 253-261, 2002.
- COPLEY, Shelley D. Enzymes with extra talents: moonlights functions and catalytic promiscuity. **Current Opinion in Chemical Biology**, n. 7, p.265-272, 2003.
- DICKSON, D. P. E., BERRY, F.J. **Mossbauer spectroscopy**. Cambridge: Ed. John Wiley & Sons, 1986.
- EICKEN, C.; KREBS, B.; SACCHETTINI, J. C. Cathecol oxidase – structure and activity. *Current Opinion in Structural Biology*, v.9,p.677-683, 1999.)
- FERNANDES, C., NEVES, A., BORTOLUZZI, A. J., MANGRICH, A. RENTSCHLER, E., SZPOGANICZ, B., SCHWINGEL, E., A new dinuclear unsymmetric

- copper(II) complex as model for the active site of catechol oxidase. **Inorganica Chimica Acta**, v. 320, p. 12-21, 2001.
- FONG, D.H.; BERGHUIS, A. M. Substrate promiscuity of an aminoglycoside antibiotic resistance enzyme via target mimicry. **EMBO Journal**, n. 10, p. 2323-2331, 2002.
- GAGNÉ, R. R.; KOVAL, C. A.; LISENSKY, G. C. Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements. **Inorganic Chemistry**, v. 19, p. 2854-2855, 1980.
- HOLLFERDER, Florian; OLGUIN, Luis F.; ASKEW, Sarah E.; O'DONOGHUE, AnnMarie C. Efficient Catalytic Promiscuity in an Enzyme Superfamily: An Arylsulfatase Sows a Rate Acceleration of 10^{13} for Phosphate Monoester Hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 49, p. 16547-16555, 2008.
- HULT, Karl; BERGLUND, Per. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. **Elsevier**, v. 25, n.5, 2007
- JARENMARK, M., CARLSSON, H., NORDLANDER, E. Asymmetric dinuclear metal complexes as models for active sites in hydrolases and redox enzymes. **Comptus Rendus Chimie**, v. 10, p. 433-462, 2007.
- JOVITO, Rafael. Síntese, estudos de reatividade e promiscuidade catalítica de complexos binucleares. **Tese de doutorado em Química**, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009, em andamento.
- KLABUNDE, T.; KREBS, B. The dimetal center in purple acid phosphatases. **Structure and Bonding**, v. 89, p. 177-198, 1997.
- LEHNINGER, Albert L.; NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202p.
- LIPPARD, S. J.; BERG, J. M. **Principles of Bioinorganic Chemistry**, Mill Valley, California, 1994.
- LIPPARD, S. J. –Oxo-Bridged Centers in Biology and Chemistry. **Angew Chem., Int. Ed. Engl.**, v.27, p.344-353, 1988.
- LIU, C.; WANG, M.; ZHANG, T.; SUN, H. DNA hydrolysis promoted by di- and multinuclear metal complexes. **Coordination Chemistry reviews**, v. 248, p. 147-168, 2004.
- MARTELL, A. E., MOTEKAITIS, R. J. **Determination and use of stability constants**. VCH, New York, 2nd ed, 1992.

- METRAN, Alexandre. Síntese e Caracterização de Novos Compostos de Relevância Bioinorgânica. **Dissertação de mestrado em Química**, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1995.
- MURRAY, Robert K.; GRANNER, Daryl K; MAYES, Peter A.; RODWELL, Victor W. **Harper's Illustrated Biochemistry**. 26^a ed. Nova York:Mc Graw-Hill, 2003. 693p.
- NEVES, Ademir. **Química Bioinorgânica**. Florianópolis: Laboratório de Ensino a Distância, Universidade Federal de Santa Catarina, 2001, 138p.
- NEVES, A.; MITIC, Natasa; SMITH, Sarah; GUDDAT, Luke. W.; GAHAN, Lawrence R.; SCHENK, Gerhard. The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases. **Chemical Reviews**. n. 106, p. 3338-3363, 2006.
- NEVES, Ademir; BORTOLUZZI, Adailton; JOVITO, Rafael; PERALTA, Rosely; SOUZA, Bernardo; SZPOGANICZ, Bruno; JOUSSEF, Antônio C.; TERENCEZI, Hernán; SEVERINO, Patrícia C.; FISCHER, Franciele L.; SCHENK, Gerhard; RILEY, Mark J.; SMITH, Sarah J.; GAHAN, Lawrence R. Catalytic Promiscuity: Catecholase-like Activity and Hydrolytic DNA Cleavage Promoted by a Mixed-Valence Fe^{III}Fe^{II} complex . **Journal of Brazilian Chemical Society**, 2009, submetido.
- RADZICKA, A.; WOLFENDE, R. A proficient enzyme. **Science**, v. 6, n. 267, p. 90-931, 1995
- PERALTA, R. A. Novos complexos binucleares de Cobre(II) e de Ferro(III) Zinco(II): Biomiméticos sintéticos para Catecol Oxidase e para Fosfatases Ácidas Púrpuras. **Tese de doutorado em Química**, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.
- PERALTA, R. A.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A.J.; CASELLATO, A.; GREATTI, A.; XAVIER, F.R.; SZPOGANICZ, B. First Transition Metal Complexes Containing the Ligands 6-amino-6-methylperhydro-1,4-diazepine (AAZ) and a New Functionalized Derivative: Can AAZ act as a Mimetic Ligand for 1,4,7-triazacyclononane? **Inorganic Chemistry**, 2005.
- PERALTA Rosely A.; NEVES A.; BORTOLUZZI, Adailton J.; ANJOS, Ademir dos; XAVIER, Fernando R.; SZPOGANICZ, Bruno; TERENCEZI, Hernán; OLIVEIRA de, M. C. B.; CASTELLANO, E.; FRIEDERMANN, G. R.; MANGRICH A. S.; NOVAK, M. A. New Unsymmetric Dinuclear CuIICuII Complexes and Their

Relevance to Copper(II) Containing Metalloenzymes and DNA Cleavage. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, p. 992-1004, 2006.

PISZKIEWICZ, D. **Kinetics of Chemical and Enzyme-Catalyzed Reactions**. New York: Oxford University Press, cap. 5, p. 81-116, 1977.

REY, Nicolas A. Novos Ligantes Binucleantes e seus Complexos Metálicos do tipo $\text{Cu}^{\text{II}}-(\mu\text{-OH})-\text{Cu}^{\text{II}}$: 1) Modelos Estruturais para o Sítio Ativo das Catecol Oxidases e 2) Análogos Sintéticos com Atividade Redox e/ou Hidrolítica. **Tese de doutorado em Química**, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

SCHENK, G.; PERALTA, R. A.; BATISTA, S. C.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICZ, B. DICK, A. K.; HERRALD, P. HANSON, G. R. SZILAGYI, R. K.; RILEY, M. J.; GAHAN, L. R.; NEVES, A. Probing the role of the divalent metal ion in uteroferrin using metal ion replacement and a comparison to isostructural biomimetics. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, p. 139-155. 2008

SCHWINGEL, E.W.; AREND, K.; ZARLING, J.; NEVES, A. and SZPOGANICZ, B. Protonation equilibrium studies of H_2BBPEN , H_2BBPPN and H_2BBPBN . **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 7, p. 31-37, 1996.

SHELDRIK, G. M. A short history of SHELX. **Acta Cryst.** v. A64, p.112-122, 2008.

SPEK, A. L. Single-crystal structure validation with the program PLATON. **J Appl. Cryst.** v. 36, p. 7-13, 2003.

STEELE, C. L.; CROCK J.; BOHLMANN, J.; CROTEAU, R. Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). **Journal of Biological Chemistry**, n. 273, p. 2078-2089, 1998.

STRÄTER, N.; KLABUNDE, T.; TUCKER, P.; WITZEL, H.; KREBS, B. Crystal structure of a purple acid-phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active-site. **Science**, v. 268, p. 1489-1492, 1995.

9 ANEXOS

9.1 Anexo 1 – Esquema de síntese para o ligante H₃bbpmp de acordo com Brito e colaboradores

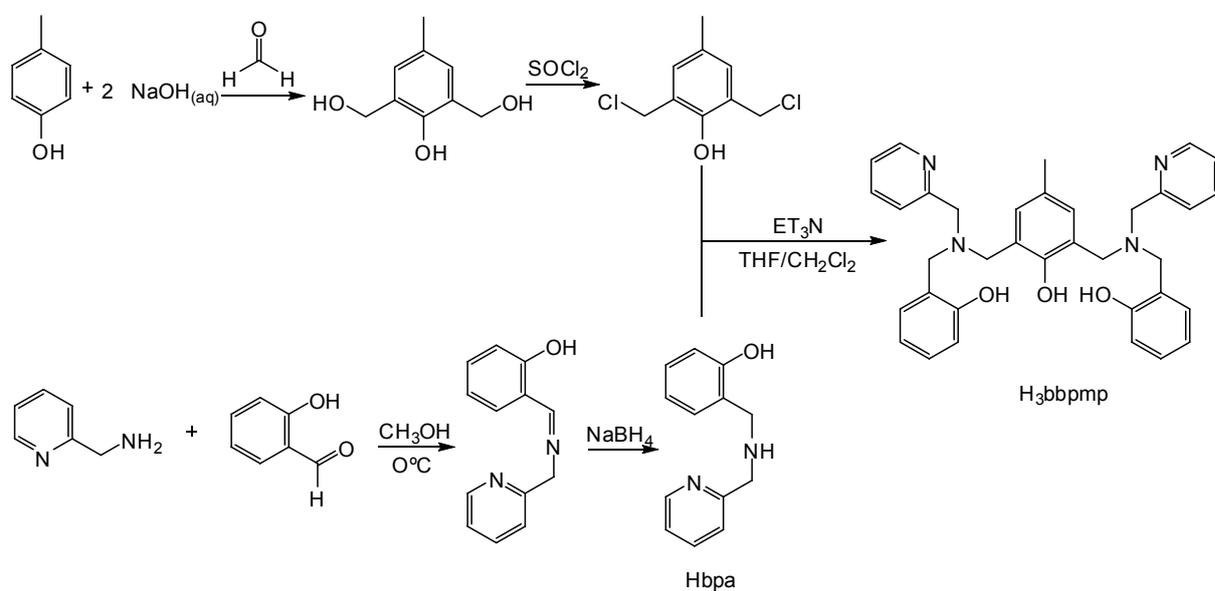


Figura 29 Esquema de síntese do ligante H₃bbpmp. (BRITO *et al.*, 1993).

9.2 Anexo 2 – Dados cristalográficos suplementares do complexo 1

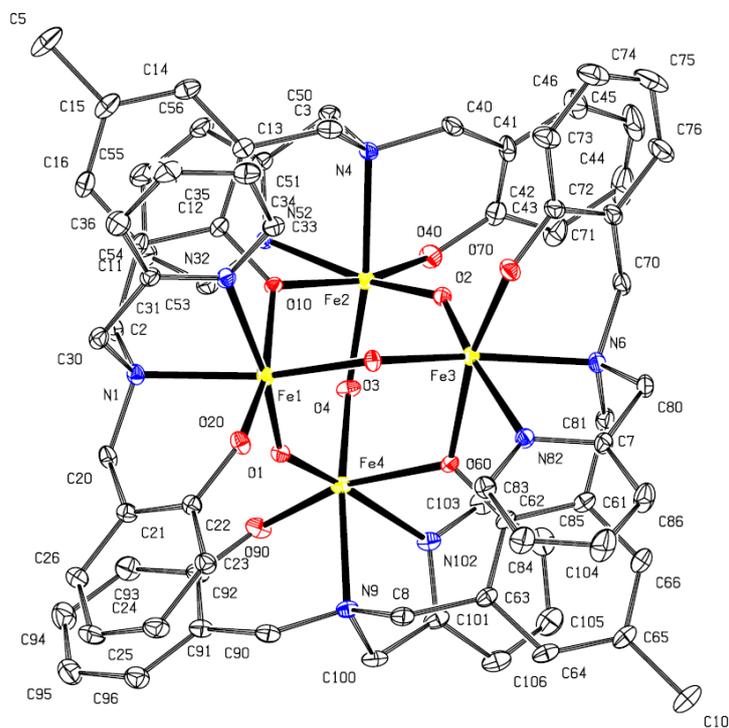


Figura 30 ORTEP do complexo 1

Tabela 6 Dados cristalográficos para o complexo 1

Fórmula empírica	$C_{70}H_{80}Fe_4N_8O_{16}$	
Massa molecular	$1512,82 \text{ g.mol}^{-1}$	
Temperatura	293(2) K	
Comprimento de onda	0,71069 Å	
Sistema cristalino	Monoclinico	
Grupo espacial	P 21/c	
Dimensões da célula unitária	$a = 13,2970(10) \text{ Å}$ $b = 22,002(3) \text{ Å}$ $c = 25,3550(10) \text{ Å}$	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 101,324(7)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$
Volume	$7273,5(12) \text{ Å}^3$	
Z	4	
Densidade (calculada)	$1,382 \text{ Mg/m}^3$	
Coeficiente de absorção	$0,852 \text{ mm}^{-1}$	
Tamanho do cristal	$0,40 \times 0,26 \times 0,16 \text{ mm}^3$	
Reflexões coletadas	13215	
Reflexões independentes	12899 [R(int) = 0,0450]	
Método de refinamento	Mínimos quadrados com matriz completa F^2	

Tabela 7 Comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados para o complexo 1

Fe(1)-O(1)	1,782(3)	Fe(2)-O(2)	1,790(3)
Fe(1)-O(3)	1,964(3)	Fe(2)-O(4)	1,973(3)
Fe(1)-O(20)	2,004(3)	Fe(2)-O(40)	2,001(3)
Fe(1)-O(10)	2,129(3)	Fe(2)-O(10)	2,149(3)
Fe(1)-N(1)	2,206(4)	Fe(2)-N(4)	2,213(4)
Fe(1)-N(32)	2,240(4)	Fe(2)-N(52)	2,222(4)
Fe(3)-O(2)	1,786(3)	Fe(4)-O(1)	1,788(3)
Fe(3)-O(3)	1,963(3)	Fe(4)-O(4)	1,960(3)
Fe(3)-O(70)	2,000(4)	Fe(4)-O(90)	1,996(4)
Fe(3)-O(60)	2,148(3)	Fe(4)-O(60)	2,180(3)
Fe(3)-N(6)	2,214(4)	Fe(4)-N(9)	2,215(4)
Fe(3)-N(82)	2,261(4)	Fe(4)-N(102)	2,265(5)
O(1)-Fe(1)-O(3)	101,15(14)	O(2)-Fe(2)-O(4)	101,14(15)
O(1)-Fe(1)-O(20)	98,32(15)	O(2)-Fe(2)-O(40)	99,82(16)
O(3)-Fe(1)-O(20)	89,60(14)	O(4)-Fe(2)-O(40)	89,91(15)
O(1)-Fe(1)-O(10)	93,74(13)	O(2)-Fe(2)-O(10)	93,70(14)
O(3)-Fe(1)-O(10)	94,66(13)	O(4)-Fe(2)-O(10)	95,15(13)
O(20)-Fe(1)-O(10)	166,20(14)	O(40)-Fe(2)-O(10)	164,39(14)
O(1)-Fe(1)-N(1)	95,32(16)	O(2)-Fe(2)-N(4)	93,41(15)
O(3)-Fe(1)-N(1)	162,70(15)	O(4)-Fe(2)-N(4)	164,63(15)
O(20)-Fe(1)-N(1)	82,78(15)	O(40)-Fe(2)-N(4)	82,69(15)
O(10)-Fe(1)-N(1)	89,46(13)	O(10)-Fe(2)-N(4)	88,77(13)
O(1)-Fe(1)-N(32)	170,59(16)	O(2)-Fe(2)-N(52)	168,84(16)
O(3)-Fe(1)-N(32)	88,15(15)	O(4)-Fe(2)-N(52)	89,32(15)
O(20)-Fe(1)-N(32)	82,99(15)	O(40)-Fe(2)-N(52)	83,95(16)
O(10)-Fe(1)-N(32)	84,02(13)	O(10)-Fe(2)-N(52)	81,35(13)
N(1)-Fe(1)-N(32)	75,55(16)	N(4)-Fe(2)-N(52)	76,56(15)
O(2)-Fe(3)-O(3)	101,69(14)	O(1)-Fe(4)-O(4)	101,29(14)
O(2)-Fe(3)-O(70)	98,02(16)	O(1)-Fe(4)-O(90)	99,32(16)
O(3)-Fe(3)-O(70)	89,80(15)	O(4)-Fe(4)-O(90)	90,95(15)
O(2)-Fe(3)-O(60)	92,70(14)	O(1)-Fe(4)-O(60)	92,92(14)
O(3)-Fe(3)-O(60)	95,04(13)	O(4)-Fe(4)-O(60)	94,99(14)
O(70)-Fe(3)-O(60)	167,11(14)	O(90)-Fe(4)-O(60)	165,08(14)
O(2)-Fe(3)-N(6)	94,91(16)	O(1)-Fe(4)-N(9)	94,59(15)
O(3)-Fe(3)-N(6)	162,57(15)	O(4)-Fe(4)-N(9)	163,65(15)
O(70)-Fe(3)-N(6)	82,62(16)	O(90)-Fe(4)-N(9)	82,58(15)
O(60)-Fe(3)-N(6)	89,38(15)	O(60)-Fe(4)-N(9)	88,02(14)
O(2)-Fe(3)-N(82)	169,80(16)	O(1)-Fe(4)-N(102)	169,03(16)
O(3)-Fe(3)-N(82)	87,97(15)	O(4)-Fe(4)-N(102)	88,24(15)
O(70)-Fe(3)-N(82)	85,16(15)	O(90)-Fe(4)-N(102)	85,81(17)
O(60)-Fe(3)-N(82)	83,09(14)	O(60)-Fe(4)-N(102)	80,72(14)
N(6)-Fe(3)-N(82)	75,81(16)	N(9)-Fe(4)-N(102)	76,37(17)
Fe(1)-O(1)-Fe(4)	144,0(2)	Fe(3)-O(2)-Fe(2)	143,4(2)
Fe(3)-O(3)-Fe(1)	127,62(17)	Fe(4)-O(4)-Fe(2)	126,91(17)

9.3 Anexo 3 – Dados cristalográficos suplementares do complexo 2

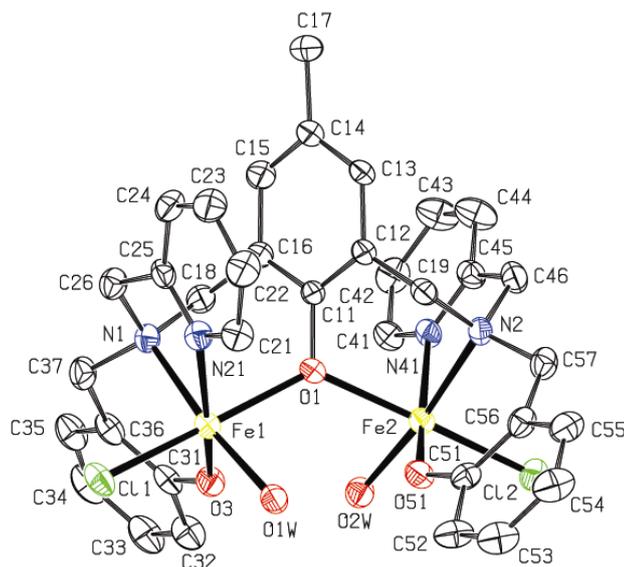


Figura 31 ORTEP do complexo 2

Tabela 8 Dados cristalográficos para o complexo 2

Fórmula empírica	$C_{35}H_{43}Cl_3Fe_2N_4O_8$
Massa molecular	865,78 g.mol ⁻¹
Temperatura	296(2) K
Comprimento de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Orthorhombic
Grupo espacial	Pna2 ₁
Dimensões da célula unitária	a = 20,6940(4) Å b = 10,6140(6) Å c = 17,7040(8) Å
Volume	3888,6(3) Å ³
Z	4
Densidade (calculada)	1,479 Mg/m ³
Coeficiente de absorção	1,006 mm ⁻¹
Tamanho do cristal	0,27 x 0,13 x 0,09 mm ³
Reflexões coletadas	20568
Reflexões independentes	7240 [R(int) = 0,0925]
Método de refinamento	Mínimos quadrados com matriz completa F ²

Tabela 9 Comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados para o complexo 2

Fe(1)-O(3)	1,899(5)	Fe(2)-O(51)	1,896(5)
Fe(1)-O(1W)	2,034(5)	Fe(2)-O(2W)	2,016(5)
Fe(1)-O(1)	2,132(4)	Fe(2)-N(41)	2,131(5)
Fe(1)-N(21)	2,155(6)	Fe(2)-O(1)	2,153(4)
Fe(1)-N(1)	2,187(5)	Fe(2)-N(2)	2,182(6)
Fe(1)-Cl(1)	2,314(2)	Fe(2)-Cl(2)	2,3257(19)
O(3)-Fe(1)-O(1W)	95,0(2)	O(51)-Fe(2)-O(2W)	99,2(2)
O(3)-Fe(1)-O(1)	91,7(2)	O(51)-Fe(2)-N(41)	163,1(2)
O(1W)-Fe(1)-O(1)	84,5(2)	O(2W)-Fe(2)-N(41)	96,0(2)
O(3)-Fe(1)-N(21)	163,8(2)	O(51)-Fe(2)-O(1)	90,30(19)
O(1W)-Fe(1)-N(21)	99,7(2)	O(2W)-Fe(2)-O(1)	84,06(19)
O(1)-Fe(1)-N(21)	82,9(2)	N(41)-Fe(2)-O(1)	83,83(18)
O(3)-Fe(1)-N(1)	86,2(2)	O(51)-Fe(2)-N(2)	86,4(2)
O(1W)-Fe(1)-N(1)	173,5(2)	O(2W)-Fe(2)-N(2)	172,4(2)
O(1)-Fe(1)-N(1)	89,09(19)	N(41)-Fe(2)-N(2)	77,8(2)
N(21)-Fe(1)-N(1)	78,5(2)	O(1)-Fe(2)-N(2)	90,79(18)
O(3)-Fe(1)-Cl(1)	98,56(17)	O(51)-Fe(2)-Cl(2)	96,59(16)
O(1W)-Fe(1)-Cl(1)	89,98(17)	O(2W)-Fe(2)-Cl(2)	90,23(16)
O(1)-Fe(1)-Cl(1)	168,74(15)	N(41)-Fe(2)-Cl(2)	90,79(15)
N(21)-Fe(1)-Cl(1)	88,46(18)	O(1)-Fe(2)-Cl(2)	171,69(14)
N(1)-Fe(1)-Cl(1)	96,20(16)	N(2)-Fe(2)-Cl(2)	94,27(15)
Fe(1)-O(1)-Fe(2)	128,8(2)	C(51)-O(51)-Fe(2)	134,0(5)
C(31)-O(3)-Fe(1)	133,7(4)	C(11)-O(1)-Fe(2)	113,8(4)
C(11)-O(1)-Fe(1)	117,5(3)		