



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

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DE
HIDROLASE DE UM COMPLEXO MONONUCLEAR DE
FERRO(III) COM LIGANTE N,O-DOADOR**

GIOVANA SCHMITT WECKER

Florianópolis

Junho/2018

GIOVANA SCHMITT WECKER

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DE HIDROLASE DE UM
COMPLEXO MONONUCLEAR DE FERRO(III) COM LIGANTE N,O-
DOADOR**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio II (QMC 5512)

Orientador: Prof. Dr. Ademir Neves

Co-Orientadora: Msc. Renata da Silva Heying

Florianópolis

Junho/2018

Giovana Schmitt Wecker

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DE HIDROLASE DE UM
COMPLEXO MONONUCLEAR DE FERRO(III) COM LIGANTE N,O-
DOADOR**

Prof. Dr. Luciano Vitali

Coordenador de Estágio do Curso de Química - Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ademir Neves

Orientador

Prof. Dr. Adailton João Bortoluzzi

Prof^a. Dr^a. Rosely Aparecida Peralta

Florianópolis

Junho/2018

AGRADECIMENTOS

Nesses anos de graduação amadureci, aprendi a correr atrás dos meus interesses e me determinar a completá-los. Aprendi a pesquisar e a exigir que meu trabalho fosse bem feito. Essa transição só aconteceu graças à pessoas que tive o prazer de conhecer.

Primeiramente, agradeço aos meus pais - Nara e Sérgio -, por sempre me apoiarem e confiarem nas minhas decisões. Por me darem liberdade para fazer minhas próprias escolhas e errar com elas, sempre com conselhos vindos da experiência.

Agradeço aos meus amigos Jennifer, Matheus, Ana, Heloisa, Natália e Renan que desde o primeiro semestre avaçamos juntos apoiando uns aos outros. Obrigada por todos os momentos: as festas, os estudos e o companheirismo nas épocas finais de sofrimento. Tenho um carinho enorme por vocês e muito orgulho ao ver cada um migrar para seus caminhos profissionais. Agradeço também aos demais amigos que me apoiaram durante todos esses anos.

Agradeço ao pessoal do LABINC, principalmente à Renata, Filipy, André e Cacau, que foram meus maiores contatos. Vocês são grandes inspirações a quem eu quero me tornar um dia. Aprendi com vocês “os princípios do químico” e que trabalhar em equipe é sempre melhor! Ao pai Filipy, obrigada pelos momentos descontraídos, pelas sínteses e pela paciência na iniciação ao laboratório. À mãe Renata, agradeço muito por todo o conhecimento compartilhado, pela ajuda nos momentos desesperadores e, principalmente, pela amizade. És extremamente inteligente e bondosa, e fico muito feliz em ter tido a oportunidade de trabalhar contigo.

Ao professor Ademir, agradeço pelos ensinamentos e pela confiança. Suas palavras de apoio foram essenciais para seguir motivada durante todo o período e sua paixão pela pesquisa me inspira a trabalhar cada vez mais.

Agradeço aos outros professores do LABINC - Bernardo, Rosely e Adailton - que foram fundamentais na minha escolha de trabalhar com a química inorgânica.

Também sou muito grata ao professor Vanderlei e à Rafaela, do Polissol, com quem tive as primeiras experiências no meio científico e aprendi muito.

Agradeço também à UFSC e ao CNPq pela oportunidade, fomento e incentivo à pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	10
RESUMO.....	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Enzimas.....	14
2.2 Fosfatases Ácidas Púrpuras.....	14
2.2.1 Estrutura e Características Físico-Químicas.....	15
2.2.2 Mecanismo de hidrólise.....	16
2.3 Compostos Biomiméticos.....	17
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo Geral.....	20
3.2 Objetivos Específicos.....	20
4 METODOLOGIA.....	21
4.1 Materiais e Reagentes.....	21
4.2 Métodos e Instrumentação.....	21
4.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	21
4.2.2 Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (F AAS).....	22
4.2.3 Espectroscopia na região do Infravermelho (IV).....	22
4.2.4 Espectrometria de Massa.....	22
4.2.5 Condutimetria.....	22
4.2.6 Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	23
4.2.7 Titulação Espectrofotométrica e Potenciométrica.....	23
4.2.8 Eletroquímica.....	24
4.2.9 Estudo cinético de hidrólise de diésteres de fosfatos.....	24

4.3 Resíduos.....	26
4.4 Procedimento Experimental.....	27
4.4.1 <i>Síntese do ligante H₂Lmet.....</i>	<i>27</i>
4.4.2 <i>Síntese do complexo Cmet.....</i>	<i>34</i>
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Síntese do ligante H₂Lmet.....	35
5.2.1 <i>Caracterização do ligante H₂Lmet – RMN de ¹H.....</i>	<i>35</i>
5.2.2 <i>Caracterização do ligante H₂Lmet – Espectrometria de Massa.....</i>	<i>36</i>
5.2 Síntese do complexo Cmet.....	37
5.3 Caracterização do complexo Cmet.....	38
5.3.1 <i>Espectroscopia na região do Infravermelho (IV).....</i>	<i>38</i>
5.3.2 <i>Espectrometria de Massa.....</i>	<i>40</i>
5.3.3 <i>Condutimetria.....</i>	<i>41</i>
5.3.4 <i>Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....</i>	<i>42</i>
5.3.5 <i>Titulação Espectrofotométrica e Potenciométrica.....</i>	<i>43</i>
5.3.6 <i>Eletroquímica.....</i>	<i>44</i>
5.4 Estudo cinético de hidrólise de diésteres de fosfatos.....	46
5.4.1 <i>Hidrólise com efeito de pH.....</i>	<i>47</i>
5.4.2 <i>Hidrólise com efeito de concentração de substrato.....</i>	<i>49</i>
6 CONCLUSÕES	53
7 PERSPECTIVAS.....	54
8 REFERÊNCIAS.....	56
9 APÊNDICE.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Série de compostos biomiméticos com ligantes N,O-doadores de ambiente macio tri-dentado, incluindo o complexo Cmet proposto neste trabalho.....	13
Figura 2. Representação do sítio ativo da PAP do feijão vermelho (kbPAP) ¹³	16
Figura 3. Mecanismo proposto por Klabunde para a esterólise catalisada pelas kbPAPs ¹⁵	17
Figura 4. Complexos [(BPBPMP)(H ₂ O)Fe(μ-OH)Zn] ²⁺ e [(bppamff)Fe(μ-AcO) ₂ Zn(H ₂ O)] ⁺ . ^{20,1}	18
Figura 5. Complexos [Fe ^{III} ₂ (L3)(μ-OH)(H ₂ O) ₂](ClO ₄) ₄ ²³ e FeZnLP2 ²⁴	19
Figura 6. Esquema da síntese do ligante H2Lmet	27
Figura 7. Espectro de IV (ATR) do composto 1met.....	28
Figura 8. Espectro de RMN de ¹ H em 200 MHz e CDCl ₃ do composto 1met.....	29
Figura 9. Espectro de IV (ATR) do composto 2met.....	30
Figura 10. Espectro de RMN de ¹ H em 200 MHz e CDCl ₃ do composto 2met.....	30
Figura 11. Espectro de IV (ATR) do composto 3met.....	31
Figura 12. Espectro de RMN de ¹ H em 200 MHz e CDCl ₃ do composto 3met.....	32
Figura 13. Espectro de IV (ATR) do composto H₂Lmet	33
Figura 14. Espectro de RMN de ¹ H em 200 MHz e CDCl ₃ do composto H₂Lmet	33
Figura 15. Esquema da síntese do complexo Cmet	34
Figura 16. Espectro de ESI-MS do ligante H2Lmet com assinalada distribuição isotópica teórica (vermelho) para as espécies em m/z = 899,3 e 511,3 no modo positivo.....	36
Figura 17. Espectros na região do IV do ligante final H₂Lmet e do complexo Cmet	38
Figura 18. Espectro de ESI-MS do complexo Cmet e assinalada distribuição isotópica teórica (vermelho) das espécies em m/z = 282,3 e 322,4 no modo positivo.....	40
Figura 19. Estrutura proposta para o complexo Cmet em estado sólido.....	41
Figura 20. Espectros eletrônicos do complexo Cmet (2,9x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹) em CH ₃ CN (vermelho) e na mistura CH ₃ CN/H ₂ O (50:50, % v/v) (preto).....	42
Figura 21. Proposta de espécies formadas durante a titulação espectrofotométrica com o aumento do pH da solução em CH ₃ CN/H ₂ O (50:50, %v/v).....	43

Figura 22. Titulação espectrofotométrica do complexo Cmet em CH ₃ CN/H ₂ O (50:50, % v/v) a 25°C, em 0,1 mol L ⁻¹ de KCl; [C] = 3x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	44
Figura 23. Voltamogramas Cíclico e de Onda Quadrada do complexo Cmet (5x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹) em CH ₃ CN/H ₂ O (50:50 %v/v, KCl 0,1 mol L ⁻¹) a 25°C, com velocidades de varredura de 25, 50, 100, 150, 200, 250, 350 mV s ⁻¹ em pH 4,5 . Os potenciais estão representados versus ENH.....	45
Figura 24. Voltamogramas de onda quadrada do complexo Cmet (5x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹) nos pHs 4,5 (preto), 7,0 (vermelho) e 9,0 (azul) em CH ₃ CN/H ₂ O (50:50, %v/v, KCl 0,1 mol L ⁻¹) a 25°C. Os potenciais estão representados versus ENH.....	45
Figura 25. Esquema de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP.....	47
Figura 26. Gráfico da dependência das velocidades iniciais com o pH da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada pelo complexo Cmet em CH ₃ CN/H ₂ O (50:50, %v/v) nas condições: [C] = 4x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; [Substrato] = 3x10 ⁻³ mol L ⁻¹ ; [tampão] = 5x10 ⁻² mol L ⁻¹ ; Força iônica (I) = 5x10 ⁻² mol L ⁻¹ (LiClO ₄), a 25°C.....	47
Figura 27. Diagrama de distribuição de espécies para o complexo Cmet em CH ₃ CN/H ₂ O (50:50, % v/v), com sobreposição do perfil obtido na cinética de hidrólise para a dependência das velocidades iniciais com o pH.....	49
Figura 28. Gráfico da dependência das velocidades iniciais com a concentração de substrato para o complexo Cmet em CH ₃ CN/H ₂ O (50:50, %v/v) nas condições: [C] = 4x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; [tampão] = 5x10 ⁻² mol L ⁻¹ ; I = 5x10 ⁻² mol L ⁻¹ (LiClO ₄), a 25°C, em pH 7,0.....	50
Figura 29. Proposta de mecanismo cooperativo de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisado pelo complexo Cmet em pH 7,0, sugerindo também a hidrólise do 2,4-DNPP gerado.....	51
Figura 30. Proposta de ataque do nucleófilo por meio de catálise básica.....	52
Figura 31. Espectro de ESI-MS do ligante H₂Lmet contendo distribuição isotópica e estrutura dos fragmentos em m/z = 389,2 e 659,3. A distribuição isotópica teórica para essas espécies está assinalada em vermelho.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais valores de número de onda (cm^{-1}) para as bandas e suas atribuições nos espectros de IV do ligante H₂Lmet e do complexo Cmet	39
Tabela 2. Comparação entre os valores de pK_a espectrofotométricos e potenciométricos para o complexo Cmet	43
Tabela 3. Parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada a 25°C pelo complexo Cmet e outros compostos da literatura.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ϵ	Coeficiente de absorção
ν	Estiramento (IV)
δ	Deformação angular (IV)
δ_H	Deslocamento químico do hidrogênio (RMN de 1H)
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo
1met	(2-piridilmetil) metilamina
2met	2-[N-(2-piridilmetil)(metil)aminometil]-4-metil-6-formilfenol
2,4-DNP	2,4-dinitrofenolato
2,4-DNPP	2,4-dinitrofenil fosfato
2,4-BDNPP	bis(2,4-dinitrofenil) fosfato
3met	2-[N-(2-piridilmetil)(metil)aminometil]-4-metil-6-(2-piridilmetil)amina
CHES	Ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfônico
Cmet	[Lmet(H ₂ O) ₂ Fe(III)]ClO ₄ .AcO
Cmff	2-clorometil-4-metil-6-formilfenol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Eff	Eficiência catalítica
ENH	Eletrodo normal de hidrogênio
E_{pa}	Energia potencial do pico anódico
E_{pc}	Energia potencial do pico catódico
ESI-MS	Espectrometria de massa com ionização via electrospray
EtOH	Etanol
H ₂ Lmet	2-[N-(2-piridilmetil)(metil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol
HEPES	Ácido (4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinoetanosulfônico
I	Força iônica
IV	Infravermelho
K_{ass}	Constante de associação
k_{cat}	Constante catalítica

kbPAP	Fosfatase ácida púrpura do feijão vermelho
K_M	Constante de Michaelis-Menten
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico
MeOH	Metanol
PAP	Fosfatase ácida púrpura
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN de ^1H	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio
S_N2	Substituição nucleofílica bimolecular
TMS	Tetrametilsilano
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
v_0	Velocidade inicial
$v_{\text{máx}}$	Velocidade máxima

RESUMO

O estudo da atuação de enzimas pode ser realizado através de compostos biomiméticos, simulando características estruturais e eletrônicas do sítio ativo das metaloenzimas, a fim de avaliar diferentes aspectos desse ambiente de coordenação e a influência dele na atividade catalítica de hidrólise.

Compreender a função e atuação catalítica de metaloenzimas é fundamental para entender os processos bioquímicos de organismos vivos. Uma das classes de metaloenzimas binucleares mais estudada é das Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs), capazes de hidrolisar ésteres de fosfato. Seu sítio ativo binuclear é composto por Fe(III)M(II), onde M(II) pode variar entre Fe, Zn ou Mn dependendo da fonte biológica.

Neste trabalho foi sintetizado e caracterizado um novo complexo de Fe(III) com o ligante **H₂Lmet** – 2-[N-(2-piridilmetil)(metil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol. As caracterizações do complexo **Cmet** – [Lmet(H₂O)₂Fe(III)]ClO₄.AcO envolvem: espectroscopia na região do infravermelho e na região do ultravioleta-visível, espectrometria de absorção atômica em chama, espectrometria de massa, condutimetria, titulação espectrofotométrica e potenciométrica, e técnicas voltamétricas. Esse complexo foi testado frente a hidrólise do substrato bis(2,4-dinitrofenil) fosfato (2,4-BDNPP) e apresentou alta eficiência catalítica em pH 7,0 - fator atrelado a características estruturais deste complexo. Dessa forma, o complexo **Cmet** pode ser considerado um modelo funcional para as Fosfatases Ácidas Púrpuras.

Palavras-chave: hidrolases, fosfatase ácida púrpura, complexos de ferro(III), compostos biomiméticos.

1 INTRODUÇÃO

Um dos focos da Química Bioinorgânica é o desenvolvimento de complexos biomiméticos a fim de estudar sistemas metaloenzimáticos. Os compostos modelo são desenvolvidos de forma a simular propriedades estruturais e eletrônicas do ambiente de coordenação das metaloenzimas. Dessa forma, eles podem ser estudados para elucidar detalhes ainda desconhecidos na atuação da metaloenzima, assim como a aplicabilidade dos compostos para catálise ou para fins medicinais.

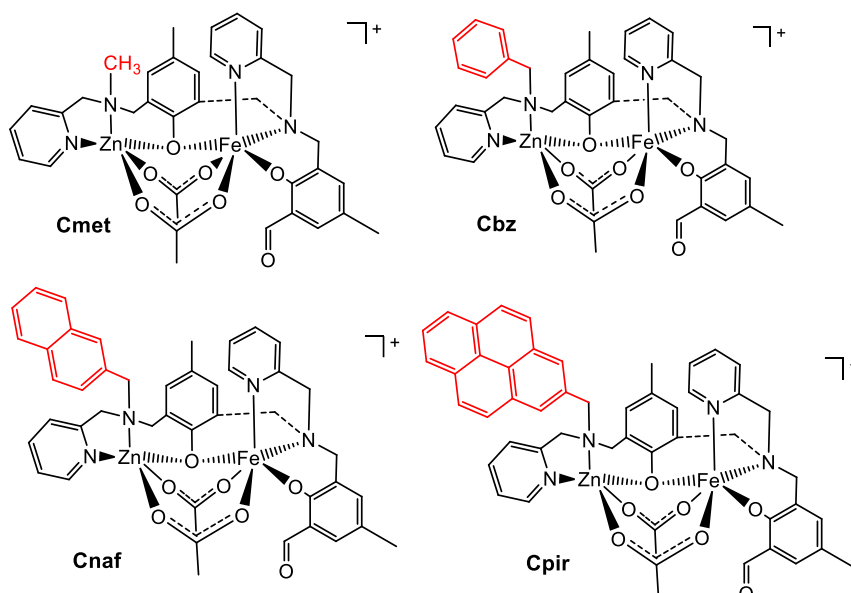
Nosso grupo de pesquisa (LABINC), ao longo dos anos vem desenvolvendo diversos compostos modelo para as metaloenzimas binucleares Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs), hidrolases de ésteres de fosfato e anidridos, com centros metálicos de Fe(III)M(II), onde M(II) = Fe, Zn ou Mn. O interesse em estudar as PAPs envolve a sua possível influência destrutiva no metabolismo dos ossos, que causa situações patológicas como a osteoporose. Dessa forma, entender o funcionamento das PAPs pode proporcionar a criação de novos compostos quimioterapêuticos.

No estudo de complexos biomiméticos para PAPs utilizando ligantes N,O-doadores com um ambiente tri-dentado, é possível observar que a esfera octaédrica do metal bivalente é completada com a coordenação de três ligantes provenientes do meio. A coordenação mais livre do metal, em comparação a ligantes análogos com ambiente tetra-dentado, pode resultar em diferentes características na sua atuação catalítica. O complexo **Cbz** - [(bppamff)Fe(μ -AcO)₂Zn(H₂O)](ClO₄), reportado na literatura,¹ contém um ligante N,O-doador com um ambiente macio tri-dentado com um grupo benzeno não coordenante. Além do complexo Cbz, o nosso grupo está com estudos em desenvolvimento de complexo com ligantes similares substituídos com hidrocarbonetos poliaromáticos, naftaleno e pireno (Figura 1).

A permanência de um grupo não coordenante de forma adjacente a esse metal bivalente pode, dependendo de sua estrutura, proporcionar efeitos estéricos e eletrônicos na atuação catalítica do complexo, principalmente vinculados a aproximação do substrato e interações não covalentes com o mesmo durante o processo catalítico. Com isso, é interessante entender melhor qual a contribuição eletrônica e estérica desses grupos não coordenantes separadamente do efeito que uma esfera mais livre no metal (II) tem sobre a atividade catalítica do complexo.

Logo, foi proposto para este trabalho o desenvolvimento de um novo ligante com ambiente tri-dentado contendo um grupo metil não coordenante adjacente ao metal bivalente. Este trabalho teria como objetivo auxiliar na compreensão do efeito que esses grupos não coordenantes tem sobre a atividade catalítica, considerando que efeitos eletrônicos e o volume pequeno desse grupo metila substituído podem ser considerados desprezíveis se comparados com os demais, tornando possível interpretar melhor a atuação da esfera de coordenação do zinco(II) nesse sistema.

Figura 1. Série de compostos biomiméticos com ligantes N,O-doadores de ambiente macio tri-dentado, incluindo o complexo **Cmet** proposto neste trabalho.



Contudo, ao final do desenvolvimento deste trabalho, foi detectada a formação de um complexo sem a presença do metal (II), não sendo aplicada a proposta desenvolvida inicialmente para esse trabalho. Portanto, todos os resultados foram rediscutidos com base no complexo mononuclear de Fe(III) obtido, o qual foi caracterizado e estudado frente a hidrólise de diésteres de fosfato.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Química Bioinorgânica é uma área da ciência em rápido crescimento, a qual estuda a atuação de elementos inorgânicos em sistemas biológicos através de uma vasta contribuição interdisciplinar de físicos, químicos, biólogos, médicos, toxicologistas, entre outros. A dependência desses elementos traço em processos biológicos é observada de diversas formas, estando presentes em metaloenzimas, coenzimas (vitaminas), ácidos nucleicos, hormônios, antibióticos, biominerais, etc.²

2.1 Enzimas

As enzimas são fundamentais para o adequado funcionamento dos organismos vivos, pois são responsáveis por catalisar reações metabólicas de forma altamente seletiva e eficiente, capazes de obter acelerações de 10^6 a 10^{12} comparada a reações não catalisadas.³

As metaloenzimas são enzimas que apresentam em sua estrutura íons metálicos com direta influência na sua atuação como catalisador. Essas catálises podem envolver, por exemplo, transferência de elétrons, reação redox ou uma simples reação ácido-base. São exemplos de metaloenzimas: a citocromo *c* oxidase, enzima contendo cobre em seu sítio ativo, a qual atua na redução de oxigênio através de transferências eletrônicas; e a álcool desidrogenase, uma proteína de zinco que catalisa a oxidação de álcoois a aldeídos ou cetonas.^{4,5}

A presença de dois ou mais metais no sítio ativo da enzima confere uma vantagem adicional em termos de delocalização de cargas, menores barreiras de ativação, habilidade de se ligar a substratos maiores, assim como melhoria na ativação eletrostática dos substratos.⁶ Esse é o caso das metaloenzimas binucleares, catalisadores dependentes da atuação de dois metais em seu sítio ativo e inclui as enzimas foco desse trabalho, que são as Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs).

2.2 Fosfatases Ácidas Púrpuras

As Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs) são metaloenzimas heterobinucleares que catalisam a hidrólise de ésteres de fosfato e anidridos, atuando em condições de

pH de 4,9-6,0.^{7,8} Suas fontes biológicas são diversas: animais, (humanos, porcos, vacas, ratos e camundongos), plantas (feijão vermelho, batata doce, soja, lentilhas de água “duckweed”, tomate e batata) e em alguns micro-organismos (*Aspergillus ficuum*).⁷

As funções biológicas das PAPs ainda não foram totalmente desvendadas. Em animais, há indícios de sua atuação no transporte de ferro e no desequilíbrio do metabolismo dos ossos, provocando o aumento da reabsorção óssea.⁹ A remodelação óssea é um fenômeno naturalmente ocorrente ao longo da vida, onde as células do tecido ósseo realizam constantes ciclos de reabsorção e formação, renovando o esqueleto e preservando sua qualidade. Quando ocorre excessiva reabsorção da matriz mineral dos ossos, estados patológicos, como a osteoporose podem se desenvolver.¹⁰ Dessa forma, diversas pesquisas estão sendo destinadas ao estudo de inibidores da metaloenzima PAP a fim de desenvolver novos quimioterapêuticos para tratamento de osteoporose.⁶

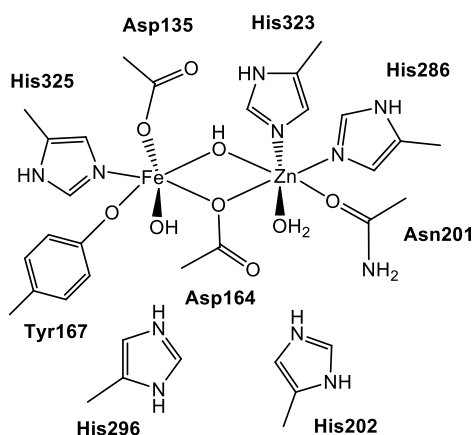
2.2.1 Estrutura e Características Físico-Químicas

O sítio ativo das PAPs apresenta um íon de Fe(III) coordenado a um resíduo tirosinato, grupo comum a todas as fontes biológicas estudadas e responsável pela coloração rosa/púrpura dessas enzimas, proporcionada pela transferência de carga tirosinato \rightarrow Fe(III) na região do visível ($\lambda_{\text{máx}} = 510 - 560 \text{ nm}$; $\epsilon = \sim 3000 - 4000 \text{ mol L}^{-1}$).^{11,12}

Além do Fe(III), as PAPs apresentam um metal bivalente em seu sítio ativo. Em animais são encontrados centros de Fe(III)Fe(II), enquanto em plantas são registrados centros de Fe(III)Zn(II) ou Fe(III)Mn(II). Nenhuma outra classe de metaloenzimas binucleares necessita um sítio ativo de valência mista para sua atuação catalítica.¹³

Apesar de PAPs de origem vegetal e animal diferirem em massa e centro metálico, seus sítios ativos são estabilizados de forma similar por sete resíduos aminoácidos invariantes. Resíduos tirosina, histidina e aspartato (monodentado) coordenam ao Fe(III), enquanto duas histidinas e uma asparagina coordenam ao íon M(II). Um último aminoácido aspartato atua como ponte entre os dois metais.⁹ A Figura 2 ilustra o sítio ativo da PAP do feijão vermelho (kbPAP), identificado através de difratometria de raios X.¹⁴

Figura 2. Representação do sítio ativo da PAP do feijão vermelho (kbPAP).¹³

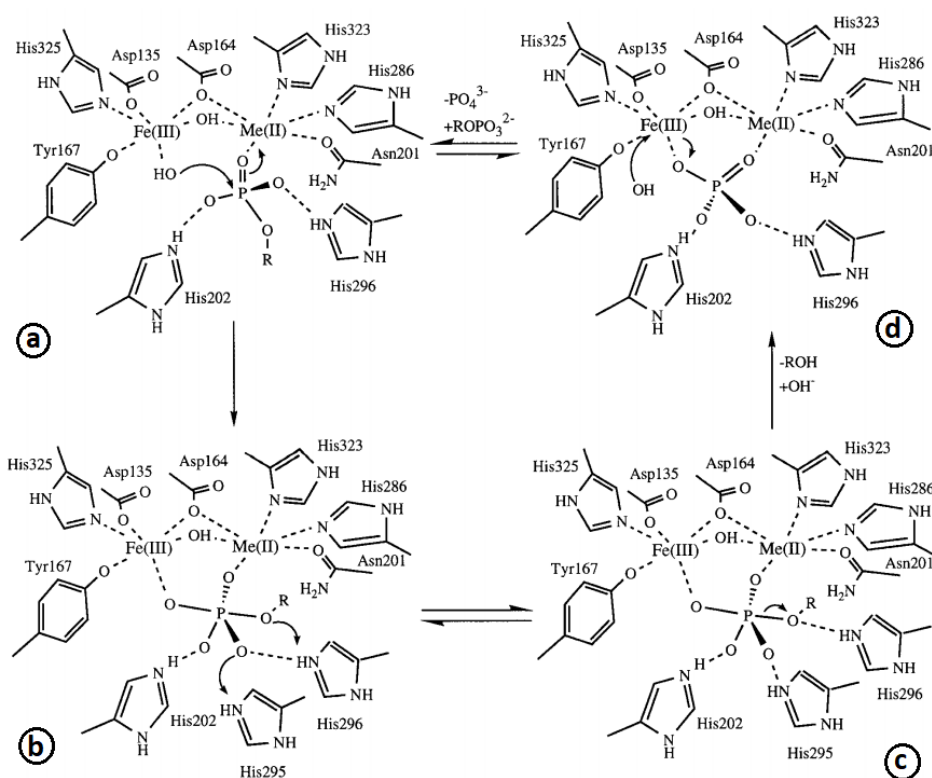


2.2.2 Mecanismo de hidrólise

Acredita-se que todas as PAPs atuam com variações de um mesmo mecanismo básico para catalisar a hidrólise de ésteres de fosfato. Na literatura há diversos mecanismos propostos para essas metaloenzimas. Dentre os mecanismos modelados, o de Klabunde, *et. al.*¹⁵ é um dos mais aceitos. Considerando o sítio ativo binuclear das PAPs, o mecanismo sugere a atuação de um ligante hidroxila coordenado ao Fe(III) como nucleófilo na hidrólise (Figura 3). Além dessa proposta, há também trabalhos na literatura que indicam a atuação da ponte μ -hidroxila existente entre os centros metálicos como nucleófilo ou até mesmo catálise básica do meio.⁹

A etapa inicial do mecanismo de Klabunde *et. al.* consiste na troca de um ligante aquo coordenado ao M(II) pela coordenação monodentada do substrato fosfato. Essa coordenação do substrato ao ácido de Lewis retira a densidade eletrônica do átomo de fósforo, facilitando o ataque nucleofílico pelo ligante hidroxila coordenado ao Fe(III) (a). No estado intermediário o substrato encontra-se coordenado como ponte entre os dois metais, com o átomo de fósforo pentacoordenado (b). Em seguida, há a clivagem da ligação P-OR (c) e a permanência do fosfato ligado ao centro metálico de forma bidentada (d). A etapa de liberação do fosfato e a regeneração do sítio ativo ainda não é totalmente compreendida. Durante todo o mecanismo, resíduos histidina estabilizam as espécies formadas através de interações intermoleculares.

Figura 3. Mecanismo proposto por Klabunde para a esterólise catalisada pelas PAPs.¹⁵



2.3 Compostos Biomiméticos

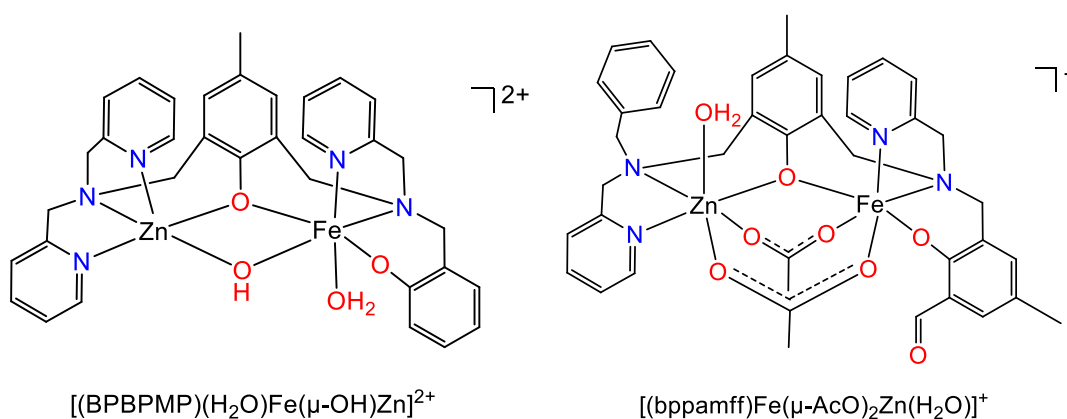
O estudo de compostos biomiméticos tem grande benefício para o entendimento das reações enzimáticas. O termo biomimético se refere ao composto que mimetiza propriedades estruturais, funcionais e espectroscópicas da enzima. As estruturas dos compostos modelo possuem um maior potencial de cristalização, tornando acessíveis informações estruturais da coordenação desses centros metálicos.¹⁶

A projeção do complexo biomimético segue alguns conceitos base como (i) a utilização do mesmo centro metálico presente na enzima; (ii) a projeção de um ligante binucleante, promovendo a aproximação dos metais através de ligações ponte; (iii) utilização de um ligante contendo grupos piridina ou pirazol de forma a mimetizar os resíduos histidina presentes no ambiente de coordenação da enzima, assim como os grupos fenol, carboxilato, pirazolato ou moléculas de água servem para mimetizar resíduos ponte como aspartato e lisina.^{16,17}

Diversos compostos modelo para PAPs já foram reportados na literatura, variando a estrutura do ligante e os centros metálicos de forma a estudar diferentes aspectos estruturais e/ou funcionais da enzima, como a distância entre os centros metálicos, a presença de um grupo ponte exógeno, a assimetria e o ambiente de coordenação dos centros metálicos, assim como a presença de sítios lábeis, essenciais ao processo catalítico. A união de tal estudos permitiu compreender etapas do mecanismo catalítico, como a interação enzima-substrato e a proveniência do nucleófilo.¹⁸ O bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP) é o substrato mais utilizado nos estudos de hidrólise para biomiméticos de diesterases. O 2,4-BDNPP é um substrato ativado, pois a presença de diversos grupos nitro *para* e *orto* substituídos nos anéis aromáticos do substrato aumenta a labilidade da ligação P-O, tornando-o mais suscetível a hidrólise.¹⁹

Neves, *et. al.*²⁰ e Clóvis, *et. al.*¹, reportam compostos biomiméticos contendo os ligantes assimétricos H₂BPBPMP e H₂bppamff, respectivamente (Figura 4). Ambos apresentam resultados satisfatórios frente a hidrólise de diéster de fosfato e são considerados bons modelos para PAPs, evidenciando as vantagens da primeira esfera de coordenação assimétrica do sítio ativo, bem como a influência de pontes μ -fenóxo na estabilização dos metais.

Figura 4. Complexos $[(BPBPMP)(H_2O)Fe(\mu-OH)Zn]^{2+}$ e $[(bppamff)Fe(\mu-AcO)_2Zn(H_2O)]^+$.^{20,1}

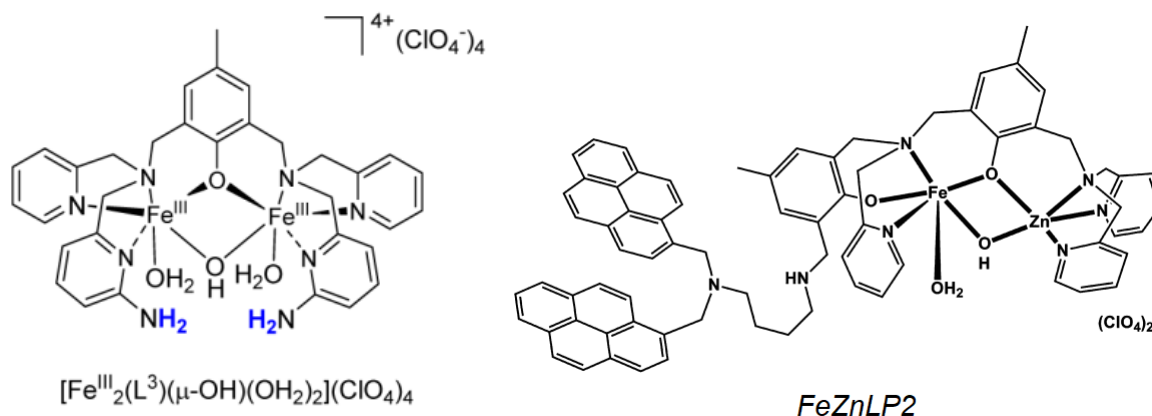


A partir da compreensão de como a primeira esfera de coordenação atua na atividade dos biomiméticos, estudos dos aspectos de segunda esfera de coordenação através de ligantes contendo grupos não coordenantes mimetizam a atuação de

resíduos aminoácidos que não estão ligados aos metais do sítio ativo, mas que participam através de interações não covalentes no mecanismo de catálise. Esses resíduos aminoácidos são fundamentais para a eficiência e seletividade das enzimas. Dentre suas diversas funções, há o aumento da associação dos metais ao substrato, a estabilização do intermediário e de grupos de saída através de interações intermoleculares.²² O modelo para PAPs desenvolvido por Comba *et. al.*²³ com centro binuclear de Fe(III)Fe(III) (Figura 5) apresenta efeito de segunda esfera através de um ligante que possui grupos básicos livres, os quais podem interagir com o substrato coordenado ao centro metálico proporcionando condições favoráveis para a hidrólise do monoéster 2,4-dinitrofenil fosfato (2,4-DNPP).

Alguns sistemas também podem ser estudados na clivagem da ligação diéster de fosfato de ácidos nucleicos, com potencial aplicação antitumoral ou antibiótica. O complexo FeZnLP2²⁴ (Figura 5) possui um ligante com grupos pireno não coordenantes, o qual é conhecido por atuar como grupo intercalante no DNA.²⁵ Portanto, tem potencial tanto como biomimético para fosfatases quanto para nucleases.

Figura 5. Complexos $[\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{L}^3)(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4$ ²³ e FeZnLP2²⁴.



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar a síntese e caracterização de um complexo biomimético com o novo ligante proposto (**H₂Lmet**) como modelo para PAPs na catálise de processos de hidrólise de diésteres de fosfato.

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar o ligante 2-[N-(2-piridilmetil)(metil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol (**H₂Lmet**);
- Caracterizar o ligante **H₂Lmet** por espectroscopia na região do infravermelho (IV), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H) e espectrometria de massas (ESI-MS);
- Síntese do complexo de Fe(III)(μ-OAc)Zn(II) utilizando o ligante **H₂Lmet** - Perclorato de μ-acetato-2-[N-(2-piridilmetil)(metil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol Ferro (III) Zinco (II);
- Caracterizar o complexo **Cmet** por espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS), espectroscopia na região do infravermelho (IV), espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), espectrometria de massas (ESI-MS), titulação espectrofotométrica, titulação potenciométrica e voltametrias;
- Realizar estudos cinéticos de hidrólise do substrato modelo 2,4-BDNPP com o complexo sintetizado e avaliar as propriedades catalíticas do mesmo.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais e Reagentes

Os seguintes reagentes, materiais, gases e solventes foram empregados nas sínteses e análises. Foram adquiridos de fontes comerciais e sem purificação prévia: acetato de zinco dihidratado (Aldrich), acetona PA, acetonitrila grau espectroscópico (Vetec), acetonitrila PA, ácido clorídrico 37% (Vetec), água deuterada, argônio 5.0, bicarbonato de sódio (Nuclear), boro-hidreto de sódio (Aldrich), brometo de potássio grau espectroscópico (Aldrich), carbonato de sódio (Vetec), carvão ativo (Vetec), cloridrato de metilamina 98% (Acros), cloreto de potássio (Nuclear), clorofórmio deuterado (Aldrich), clorofórmio PA, diclorometano PA, etanol absoluto, éter etílico PA, hexacianoferrato(III) de potássio, hidróxido de lítio monohidratado (Aldrich), hidróxido de potássio (Nuclear), hidróxido de sódio (Vetec), hidrogênio, isopropanol PA, metanol PA, nitrogênio 2.0, paládio carbono 10% (Aldrich), perclorato de ferro (III) nonahidratado (Aldrich), perclorato de lítio (Aldrich), sílica gel azul, sulfato de sódio anidro (Lafan), tampões biológicos MES (hidratado), HEPES e CHES (Acros/Aldrich), tetra-hidrofurano PA.

Foram adquiridos de fontes comerciais e purificados antes de utilizados: 2-(aminometil)piridina (destilada à pressão reduzida), 2-piridilcarboxialdeído (destilado à pressão reduzida), 2,4-dinitrofenol (recristalizado em clorofórmio), piridina (destilada), trietilamina (destilada à pressão reduzida). O composto bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP) foi sintetizado, purificado e caracterizado de acordo com o procedimento descrito na literatura.¹⁹

4.2 Métodos e Instrumentação

4.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ¹H foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker AC 200, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC, em 200 MHz. Os deslocamentos químicos de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS) e como solvente clorofórmio deuterado.

4.2.2 Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (F AAS)

A espectrometria de absorção atômica de ferro e zinco foi realizada em modo chama com composição estequiométrica ar-acetileno, em um espectrômetro modelo PerkinElmer Pinnacle900T, na Central de Análises do Departamento de Química - UFSC. Foram utilizadas as condições recomendadas pelo fabricante, com a fixação dos comprimentos de onda em 238,33 nm para análise do ferro e 213,86 nm para o zinco.

4.2.3 Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho dos ligantes e do complexo foram obtidos por Refletância Total Atenuada (ATR) em um espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum 100, na região de 4000 a 600 cm^{-1} no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, no Departamento de Química da UFSC.

4.2.4 Espectrometria de Massa

O ligante final e o complexo foram analisados por espectrometria de massas com ionização via electrospray (ESI-MS) em um equipamento Amazon – Ion Trap MS no Centro de Biologia Molecular Estrutural – UFSC. As análises foram realizadas em acetonitrila em grau espectroscópico, com concentração aproximada de 500 ppb e vazão de 18 $\mu\text{L min}^{-1}$.

4.2.5 Condutimetria

O valor condutimétrico do complexo foi obtido em um condutivímetro Bante 950 no Laboratório de Ensino de Química Analítica no Departamento de Química – UFSC. A leitura foi realizada em uma solução de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do complexo em acetonitrila (grau espectroscópico).

4.2.6 Espectroscopia na região do Ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os espectros eletrônicos nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho próximo foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 750, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, no Departamento de Química – UFSC.

As análises foram realizadas em cubetas de quartzo com capacidade para 1,0 mL e caminho óptico de 1,0 cm. Como solventes foram utilizados acetonitrila em grau espectroscópico e água deionizada.

4.2.7 Titulação Espectrofotométrica e Potenciométrica

As constantes de protonação foram obtidas por titulação espectrofotométrica no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. Os experimentos foram realizados em uma célula termoequilibrada a $25,0 \pm 0,1$ °C por um banho da Visomes Plus. Foi utilizada uma quantidade aproximada de 3×10^{-4} mol L⁻¹ de complexo em 25 mL de solução CH₃CN/H₂O (50:50, % v/v) - pK_w = 15,19 a 25°C²⁶ – onde a força iônica foi ajustada com a adição de KCl 0,1 mol L⁻¹.

Com o uso de um pHmetro Oakton pH 2700 com um eletrodo de vidro combinado, foram medidos os valores de potencial e pH da célula em uma faixa de pH 2,9 – 10,0 com uma variação de 0,1 a cada leitura com a adição de KOH 0,1 mol L⁻¹. Em cada leitura, uma alíquota da célula termostabilizada foi transferida a uma cubeta de quartzo - com capacidade para 1,0 mL e caminho óptico de 1,0 cm – e realizado um espectro eletrônico de UV-Vis em um espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 750. Após a espectroscopia, a alíquota foi devolvida à célula para a próxima medida de pH. Os valores foram tratados com curvas sigmoidais e os pK_as foram obtidos do ponto de inflexão.

As constantes de protonação também foram determinadas por titulação potenciométrica no Laboratório de Química Bioinorgânica e Cristalografia – UFSC. Os experimentos foram realizados sob as mesmas condições utilizadas na titulação espectrofotométrica. Foi utilizado um titulador automatizado Metrohm modelo Titrino Plus 848 acoplado a um eletrodo combinado com referência de Ag/AgCl, calibrado com soluções diluídas de HCl. As medidas foram feitas em volume de solução final de 50 mL, com aproximadamente $2,5 \times 10^{-5}$ mol do composto presente. A força iônica foi ajustada com KCl à 0,1 mol L⁻¹ e a solução foi titulada sob atmosfera de argônio com

KOH 0,1 mol L⁻¹. Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e fervida. As constantes de equilíbrio foram calculadas com o programa BEST7²⁷ e os diagramas de espécies presentes em solução em funções do pH foram obtidos com o programa SPECIES.

4.2.8 Eletroquímica

O comportamento redox do complexo foi analisado por voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada através de um potenciostato/galvanostato BAS (Bioanalytical Systems Inc.) modelo Epsilon, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, no Departamento de Química – UFSC. Os experimentos foram realizados em atmosfera de argônio à 25 °C no meio de dispersão CH₃CN/H₂O (50:50, % v/v) com KCl 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte. Foram feitas análises nos pHs 4,5, 7,0 e 9,0 – utilizando tampões MES, HEPES e CHES como volume aquoso e completando com volume equivalente de CH₃CN.

Os voltamogramas foram obtidos utilizando um sistema padrão de três componentes na célula eletrolítica, consistido dos eletrodos de Ag/Ag⁺ (referência), platina (auxiliar) e carbono vítreo (trabalho). Foi adicionado o complexo em uma concentração de 5x10⁻⁴ mol L⁻¹. O padrão interno hexacianoferrato de potássio foi utilizado ($E_{1/2}$ vs ENH = 369 mV).²⁸

4.2.9 Estudo cinético de hidrólise de diésteres de fosfatos

A atividade catalítica do complexo **Cmet** foi monitorada através da hidrólise do substrato bis(2,4-dinitrofenil) fosfato (2,4-BDNPP) em um espectrofotômetro UV-vis Varian Cary 50 BIO – acoplado a um banho termostatizado à 25°C - em cubetas de vidro com capacidade para 4,0 mL e caminho óptico de 1,0 cm.

Foram realizados experimentos cinéticos em triplicata com efeito de pH, efeito de substrato, cinética equivalente e efeito isotópico de deutério acompanhando a alteração da banda de absorvância em 400 nm, referente a formação do íon 2,4-dinitrofenolato (2,4-DNP) como produto do processo hidrolítico e os dados foram tratados através do método das velocidades iniciais.²⁹

O experimento de efeito de pH foi realizado sob condições de 75 vezes de excesso de substrato em relação ao complexo **Cmet** ($[C]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em meio $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50, % v/v). Foram utilizadas soluções aquosas de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ dos tampões biológicos MES (pH 4,0 a 6,5), HEPES (pH 7,0 a 8,0) e CHES (pH 8,5 a 9,5) com a força iônica mantida constante na presença de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de LiClO_4 . Com a adição de $750 \mu\text{L}$ de tampão aquoso à cubeta, a proporção 1:1 de CH_3CN foi mantida adicionando $100 \mu\text{L}$ da solução de complexo $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $400 \mu\text{L}$ de CH_3CN e $250 \mu\text{L}$ da solução de substrato $1,8 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Em todas as medidas foram realizadas correções de hidrólise espontânea do substrato (branco) nas mesmas condições. O gráfico das velocidades iniciais (v_0) em função do pH permitiu a obtenção do pH ótimo (onde a atividade catalítica é máxima) e do valor de pK_a cinético para as espécies em equilíbrio.

Os experimentos de efeito de substrato foram realizados sob as mesmas condições, apenas em pH 7,0. A proporção $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ foi mantida, alternando os volumes adicionados de CH_3CN e solução de substrato para que a concentração desse variasse de $0,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a $4,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Realizou-se também o acompanhamento em 400 nm da reação estequiométrica entre o complexo e o substrato ($[C]_{\text{final}} = [S]_{\text{final}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) durante 55 horas a 50°C liberando 1,8 equivalentes de 2,4-dinitrofenolato. Em todos os experimentos cinéticos a correção da hidrólise espontânea do substrato foi realizada.

Os gráficos de velocidades iniciais (v_0) em função da concentração de substrato resultou em perfis de saturação com comportamento de Michaelis-Menten. Onde foi possível obter os valores de velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) e a constante de Michaelis-Menten (K_M). Com esses valores é possível obter a constante catalítica ($k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{máx}}}{[C_{\text{met}}]_{\text{final}}}$), a constante de associação ($K_{\text{ass}} = \frac{1}{K_M}$) e a eficiência catalítica ($E = \frac{k_{\text{cat}}}{K_M}$) do complexo no processo hidrolítico.

O estudo do efeito isotópico de deutério na hidrólise do 2,4-BDNPP pelo complexo **Cmet** foi realizado com solução tampão HEPES $pD = 7,0$ previamente preparada em D_2O . A reação foi monitorada em 400 nm a 25°C sob condições de 75 vezes de excesso de substrato. A razão k_H/k_D pode ser obtida pela comparação entre as constantes catalíticas de hidrólise em meio aquoso e em meio deuterado, permitindo avaliar a influência de moléculas do meio na hidrólise.

4.3 Resíduos

A síntese dos ligantes envolve reagentes com alta toxicidade, portanto deve ser realizado um tratamento adequado de seus resíduos. Grande parte dos resíduos é armazenada e destinada a empresas de tratamento. Os resíduos líquidos armazenados em bombonas são divididos em: aquoso, orgânico não-halogenado, acetonitrila, halogenados. Os resíduos sólidos resultantes do desenvolvimento do projeto foram divididos em: sulfato de sódio e celite.

A síntese do pró-ligante 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol (cmff) possui alta periculosidade e, dessa forma, é realizada sob supervisão dos orientadores e em grande escala para suprir a necessidade anual do laboratório. Essa reação envolve a formação de bis-(clorometil)éter como subproduto, o qual é muito tóxico e carcinogênico. Portanto, a síntese deve ser realizada com adequado manuseio de reagentes, vidrarias e equipamentos (experimento realizado em capelas com exaustão com o uso de máscaras e luvas) e todas as vidrarias e resíduos gerados devem ser tratados com solução alcalina (KOH 5 % (m/V) em EtOH/H₂O (3:2, v/v)).

Nessa reação também são utilizados NaOH e HCl concentrado, seus resíduos são neutralizados antes de serem destinados à bombonas de descarte aquoso.

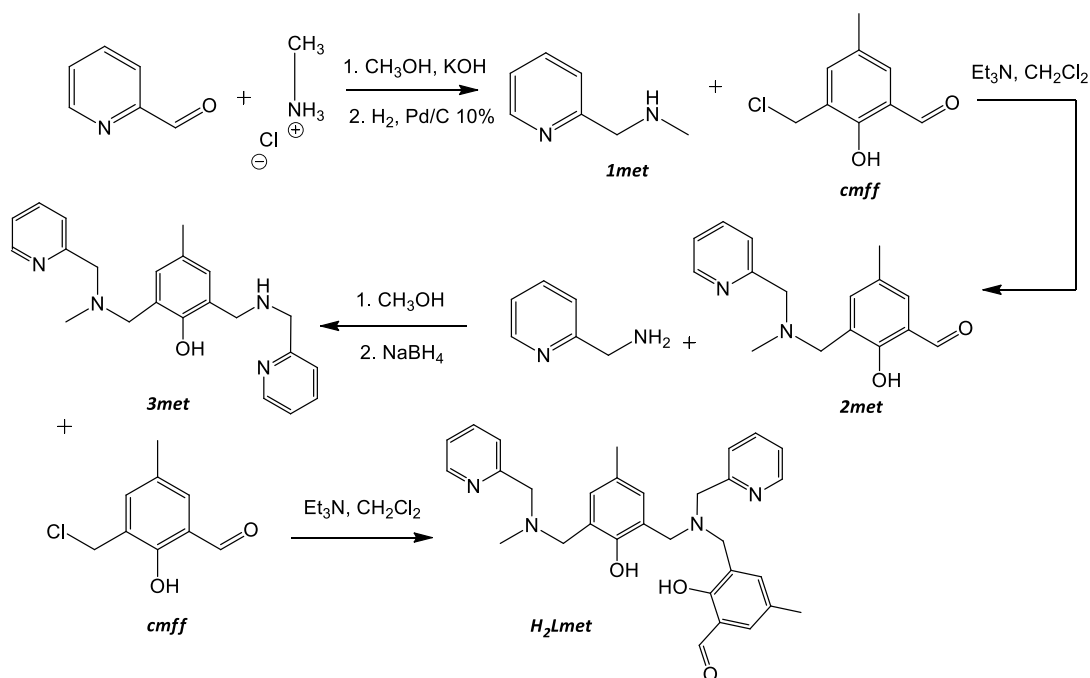
4.4 Procedimento Experimental

4.4.1 Síntese do ligante H_2Lmet

A síntese do ligante H_2Lmet envolve uma série de etapas, as quais foram desenvolvidas a partir de ligantes semelhantes já reportados pelo grupo de pesquisa.¹ A rota sintética completa está apresentada na Figura 6. Em cada etapa, os produtos foram caracterizados por RMN de 1H e IV, atestando o grau de pureza dos pró-ligantes para dar continuidade à síntese.

O reagente 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol (cmff) foi sintetizado através do procedimento já descrito na literatura por Lanznaster⁴, e devidamente caracterizado por RMN de 1H e IV antes de sua utilização na síntese do ligante H_2Lmet .

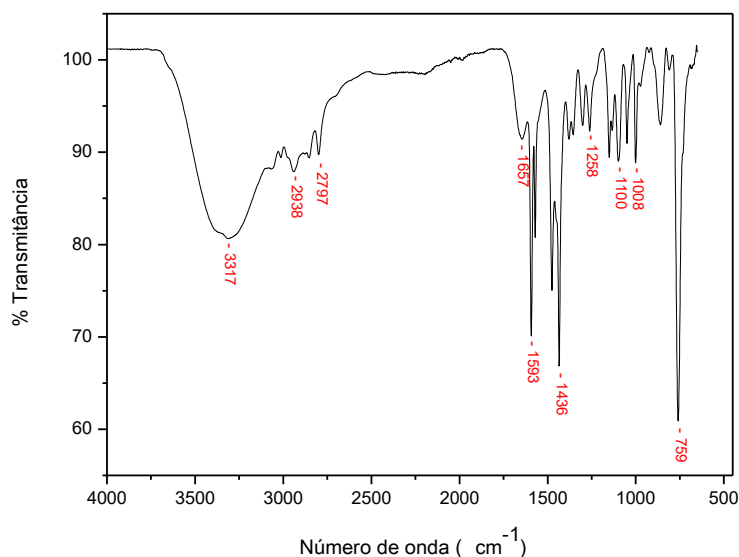
Figura 6. Esquema da síntese do ligante H_2Lmet .



Etapa 1: O pró-ligante 1met foi sintetizado a partir de 0,56 g de hidróxido de potássio (10 mmol; 56,11 g mol⁻¹), dissolvidos em 20 mL de metanol. Essa solução foi misturada a 0,48 g de cloridrato de metilamina (7 mmol; 67,52 g mol⁻¹) dissolvidos em 20 mL de metanol. O sal precipitado (KCl) foi removido por filtração a gravidade. O filtrado foi transferido a um balão de fundo redondo de 250 mL. A esse, foram

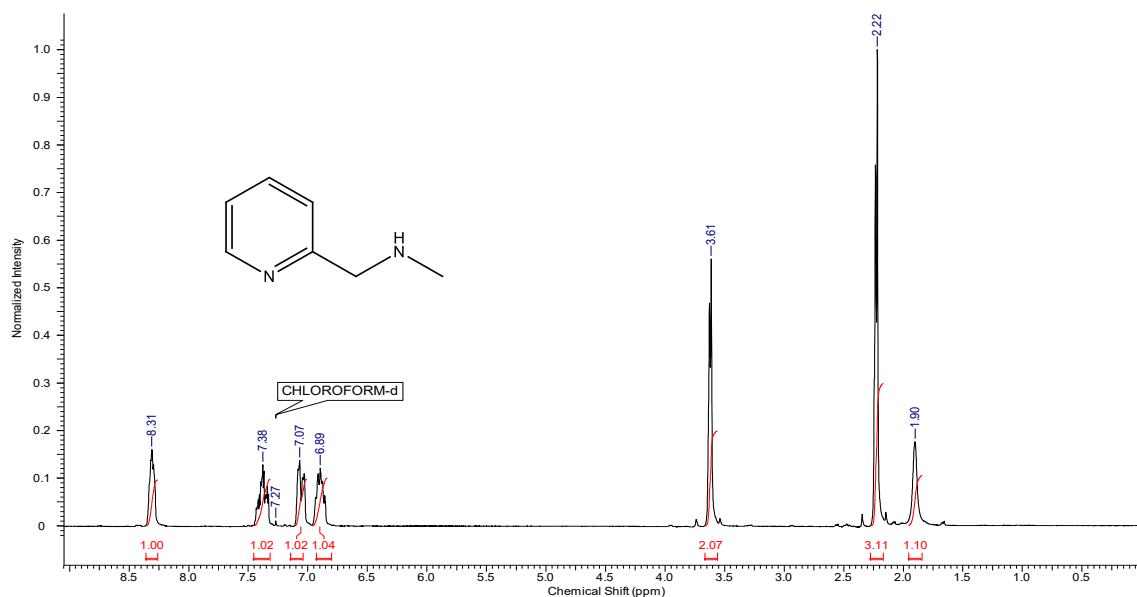
adicionados 0,5 mL de 2-piridilcarboxaldeído (5 mmol; 107,11 g mol⁻¹; 1,126 g mL⁻¹) e a mistura reacional foi mantida em agitação à temperatura ambiente por 24 horas. A imina formada foi reduzida através de hidrogenação a 40 psi com o catalisador de Pd/C 10% por 15 horas. O conteúdo foi então filtrado em celite para remoção do catalisador e o solvente foi retirado à pressão reduzida. O produto obtido foi solubilizado em diclorometano, observando a precipitação do KCl ainda presente no meio. O sal foi retirado por filtração e o solvente retirado à pressão reduzida. O produto oleoso amarelo 1met foi obtido com 62% de rendimento em relação ao cloridrato de metilamina (4,40 mmol, 122,08 g mol⁻¹).

Figura 7. Espectro de IV (ATR) do composto 1met.



IV (ATR) / cm⁻¹ (Figura 7): ν (N-H) 3317; ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3068 a 2771; δ (N-H) 1593; ν (C=N e C=C) 1593 a 1436; ν (C-N) 1156; δ (C-H_{ar}) 759.

Figura 8. Espectro de RMN de ^1H em 200 MHz e CDCl_3 do composto 1met.



RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm (Figura 8): 1,90 (s, 1H, NH); 2,22 (s, 3H, CH_3); 3,61 (d, 2H, CH_2); 6,89 (t, 1H, CH_{ar}); 7,05 (d, 1H, CH_{ar}); 7,38 (t, 1H, CH_{ar}); 8,31 (d, 1H, CH_{ar}).

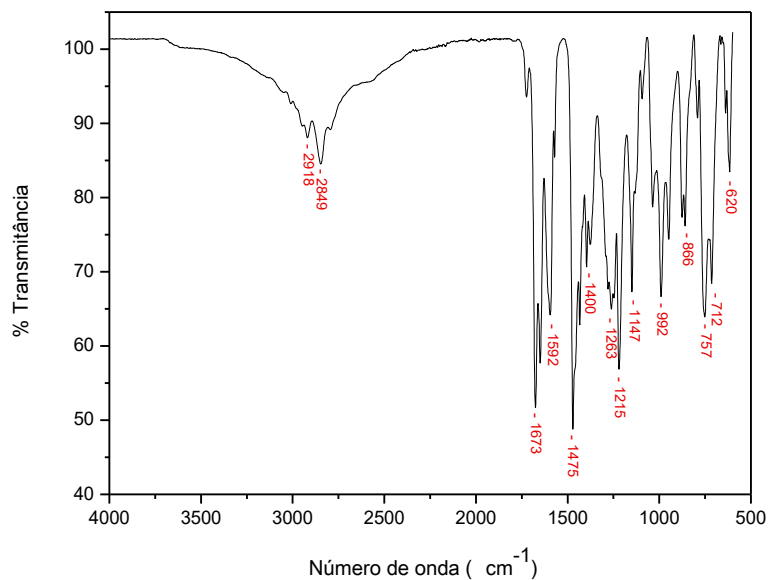
Cuidado: O manuseio do catalisador Pd/C 10% em metanol deve ser feito cautelosamente, pois há possibilidade de combustão espontânea.

Etapa 2: A fim de sintetizar o 2met, foram transferidos 0,54 g de 1met (4,40 mmol, $122,08 \text{ g mol}^{-1}$) dissolvidos em 40 mL de diclorometano, a um balão de fundo redondo de 125 mL. Com o balão em resfriamento com banho de gelo e sob agitação, foram adicionados 0,62 mL de trietilamina (4,40 mmol; $101,19 \text{ g mol}^{-1}$; $0,72 \text{ g mL}^{-1}$). Em seguida, foi adicionada gota a gota, com o auxílio de um funil de adição, uma solução contendo 0,81 g de 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol (cmff) (4,40 mmol; $184,62 \text{ g mol}^{-1}$) dissolvido em 30 mL de diclorometano.

Após completa adição do cmff, o balão reacional permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por mais 24 horas. O solvente foi retirado à pressão reduzida, a fim de eliminar resíduos de trietilamina ainda presentes em solução. O sólido obtido foi redissolvido em diclorometano e transferido para um funil de extração. A fase orgânica foi lavada com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (6 x 30 mL). A fase orgânica coletada foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente

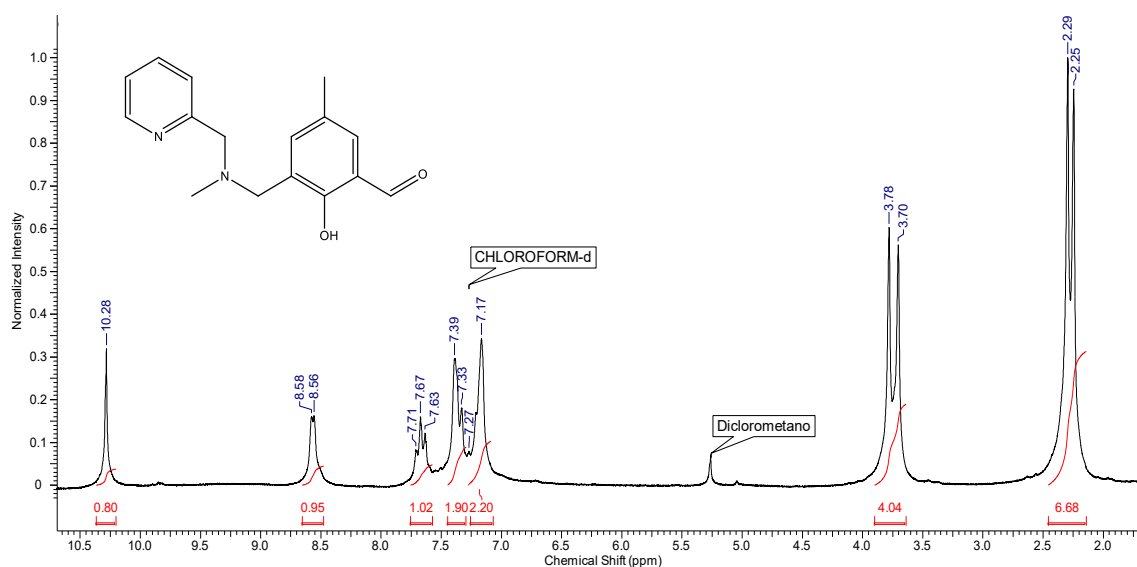
retirado à pressão reduzida, obtendo-se um óleo amarelo com 70% de rendimento em relação ao pró-ligante 1met (3,04 mmol, 270,14 g mol⁻¹).

Figura 9. Espectro de IV (ATR) do composto 2met.



IV (ATR) / cm⁻¹ (Figura 9): ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3055 a 2849; ν (C=O) 1673; ν (C=N e C=C) 1592 a 1434; δ (O-H_{fenol}) 1397; ν (C-O_{fenol}) 1265; ν (C-N) 1147; δ (C-H_{ar}) 757.

Figura 10. Espectro de RMN de ¹H em 200 MHz e CDCl₃ do composto 2met.



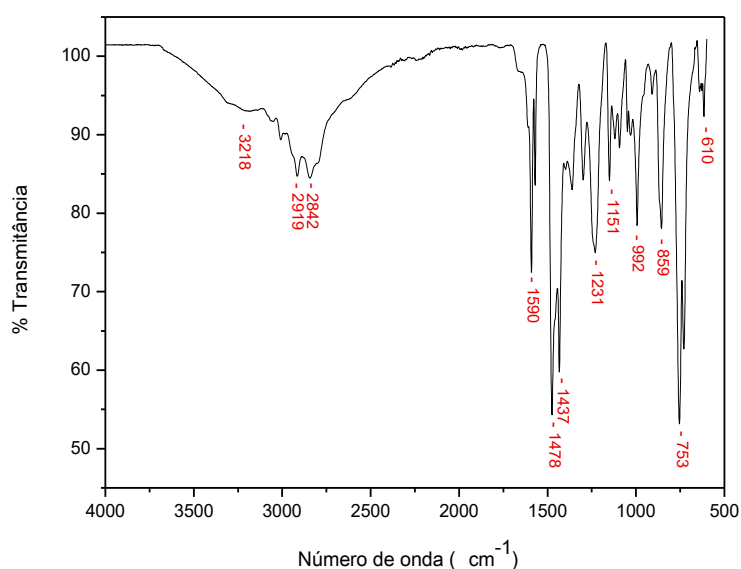
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm (Figura 10): 2,25 (s, 3H, CH_3); 2,29 (s, 3H, CH_3); 3,70 (s, 2H, CH_2); 3,78 (s, 2H, CH_2); 7,17 (m, 2H, CH_{ar}); 7,33 (s, 1H, CH_{ar}); 7,39 (m, 1H, CH_{ar}); 7,67 (t, 1H, CH_{ar}); 8,57 (d, 1H, CH_{ar}); 10,28 (s, 1H, CH_{ald}).

Etapa 3: Para a síntese do **3met**, 0,82 g de **2met** (3,04 mmol; 270,14 g mol^{-1}), dissolvido em 50 mL de metanol, foi colocado em um balão de 125 mL. A solução foi mantida sob agitação em temperatura ambiente e em seguida, foi adicionado 0,31 mL (3,04 mmol; 108,14 g mol^{-1} ; 1,049 g mL^{-1}) de 2-(aminometil) piridina, mantendo essa mistura em agitação por uma hora.

Após esse período, a imina produzida foi reduzida em banho de gelo com a adição de 0,12 g (3,04 mmol; 37,8 g mol^{-1}) de boro-hidreto de sódio em pequenas porções durante 30 minutos. Após total adição do agente redutor, a mistura reacional permaneceu em agitação à temperatura ambiente por mais 5 horas.

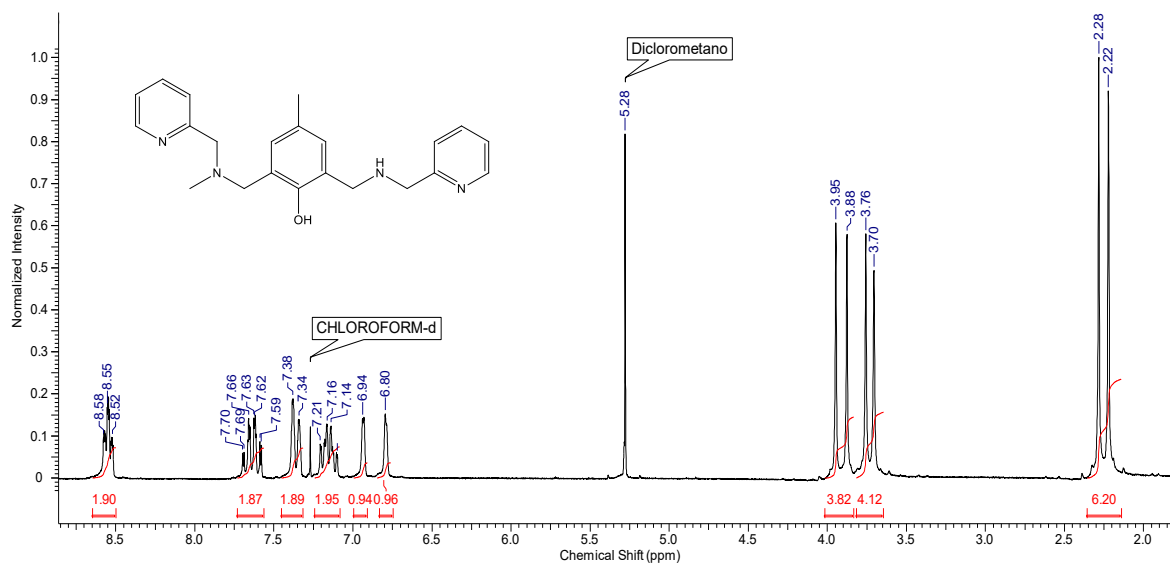
A mistura foi então neutralizada com a adição de HCl 4 mol L^{-1} . O solvente foi então retirado à pressão reduzida e o sólido resultante dissolvido em 40 mL de diclorometano. Esse conteúdo foi transferido para um funil de separação e a fase orgânica foi lavada com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (6 x 40 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente retirado à pressão reduzida, obtendo um óleo amarelo com 72% de rendimento em relação ao pró-ligante 2met (2,20 mmol; 362,21 g mol^{-1}).

Figura 11. Espectro de IV (ATR) do composto 3met.



IV (ATR) / cm^{-1} (Figura 11): ν (N-H) 3218; ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3056 a 2842; ν (C=N e C=C) 1593 a 1437; δ (N-H) 1590; δ (O-H_{fenol}) 1361; ν (C-O_{fenol}) 1231; ν (C-N) 1151; δ (C-H_{ar}) 753;.

Figura 12. Espectro de RMN de ^1H em 200 MHz e CDCl_3 do composto 3met.



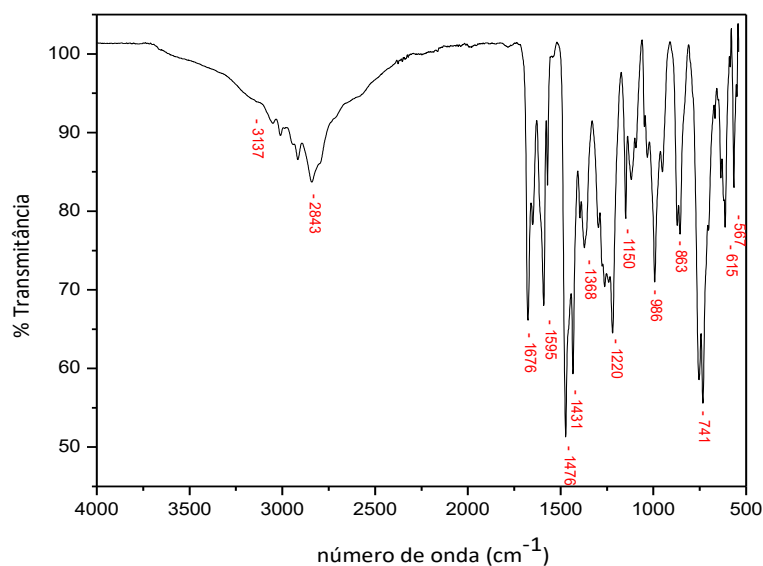
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm (Figura 12): 2,22 (s, 3H, CH_3); 2,28 (s, 3H, CH_3); 3,70 (s, 2H, CH_2); 3,76 (s, 2H, CH_2); 3,88 (s, 2H, CH_2); 3,95 (s, 2H, CH_2); 6,80 (s, 1H, CH_{ar}); 6,94 (s, 1H, CH_{ar}); 7,15 (m, 2H, CH_{ar}); 7,36 (d, 2H, CH_{ar}); 7,63 (m, 2H, CH_{ar}); 8,55 (m, 2H, CH_{ar}).

Etapa 4: Por fim, para sintetizar o ligante final **H₂Lmet**, 0,81 g de **3met** (2,20 mmol; 362 g mol^{-1}) foi dissolvidos em 40 mL de diclorometano. Essa solução foi transferida para um balão de fundo redondo de 125 mL e mantida sob agitação. Foi adicionado 0,3 mL de trietilamina (2,20 mmol; 101,19 g mol^{-1} ; 0,72 g mL^{-1}) e em seguida, com o auxílio de um funil de adição, à temperatura ambiente e com agitação, foi adicionado 0,41 g (2,20 mmol; 184,62 g mol^{-1}) de cmff dissolvido em 40 mL de diclorometano. Essa mistura permaneceu em agitação à temperatura ambiente por 3 dias.

Após esse período, a mistura reacional foi transferida para um funil de separação e a fase orgânica foi lavada com uma solução aquosa saturada de

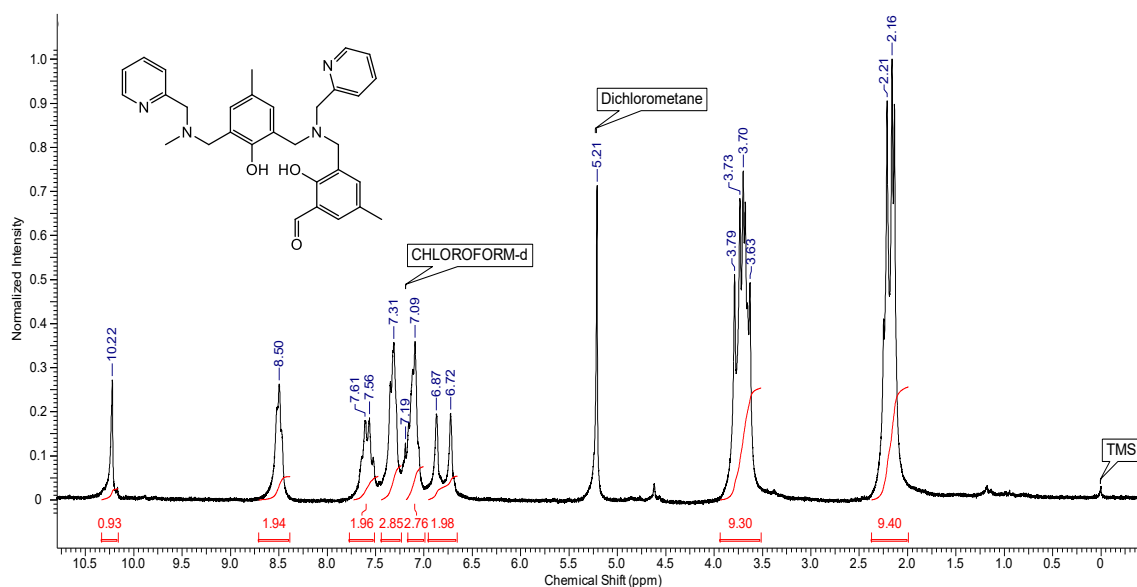
bicarbonato de sódio (8 x 40 mL). A fase orgânica recolhida foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi retirado à pressão reduzida. Foi obtido um óleo amarelo escuro viscoso com 53% de rendimento em relação ao pró-ligante 3met (1,16 mmol; 510,26 g mol⁻¹).

Figura 13. Espectro de IV (ATR) do composto **H₂Lmet**.



IV (ATR) / cm⁻¹ (Figura 13): ν (C-H_{ar} e C-H_{alif}) 3137 a 2843; ν (C=O) 1676; ν (C=N e C=C) 1595 a 1436; δ (O-H_{fenol}) 1368; ν (C-O_{fenol}) 1300 a 1220; ν (C-N) 1150 a 1095; δ (C-H_{ar}) 741.

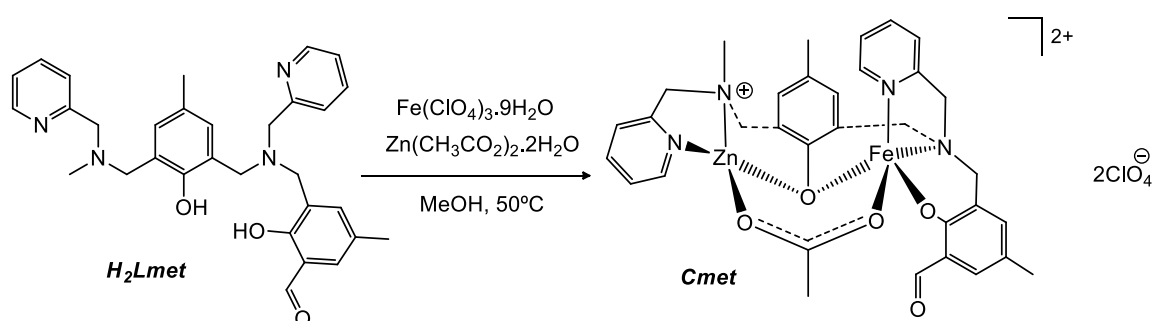
Figura 14. Espectro de RMN de ¹H em 200 MHz e CDCl₃ do composto **H₂Lmet**.



RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm (Figura 14): 2,14 (s, 3H, CH_3); 2,16 (s, 3H, CH_3); 2,21 (s, 3H, CH_3); 3,63 (s, 2H, CH_2); 3,68 (s, 2H, CH_2); 3,70 (s, 2H, CH_2); 3,73 (s, 2H, CH_2); 3,79 (s, 2H, CH_2); 6,72 (s, 1H, CH_{ar}); 6,87 (s, 1H, CH_{ar}); 7,09 (m, 3H, CH_{ar}); 7,31 (m, 3H, CH_{ar}); 7,69 (d, 2H, CH_{ar}); 8,50 (d, 2H, CH_{ar}); 10,22 (s, 1H, CH_{ald}).

4.4.2 Síntese do complexo **Cmet**

Figura 15. Esquema da síntese do complexo **Cmet**.



O complexo **Cmet** foi preparado de forma similar ao procedimento descrito por Lanznaster⁴ (Figura 15). Em um béquer de 100 mL foi adicionado 0,269 g (0,53 mmol) do ligante **H₂Lmet** dissolvido em 50 mL de metanol. Essa solução foi constantemente aquecida a 40-50°C enquanto foi adicionado 0,116 g (0,53 mmol) de acetato de zinco dihidratado. Posteriormente, ainda em aquecimento, o perclorato de ferro nonahidratado em solução metanólica (20 mL) (0,53 mmol) foi adicionado lentamente ao béquer com o auxílio de um funil de adição. A solução roxa resultante foi concentrada até aproximadamente 15 mL, não sendo observada a formação de precipitado. Portanto, foi mantida em temperatura ambiente por alguns dias até a formação de um sólido roxo intenso. O sólido foi seco em estufa e lavado com água gelada e éter etílico para remoção de impurezas. Não foi possível obter monocristais adequados para estudo de difração de raios X. Rendimento: 70% em relação ao ligante **H₂Lmet** (0,37 mmol, $940,06 \text{ g mol}^{-1}$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese do ligante H₂Lmet

A síntese em multi-etapas do ligante **H₂Lmet** inicia-se com a formação do pró-ligante 1met, por meio da reação de formação de imina entre o grupo amino da metilamina e a carbonila do 2-piridilcarboxaldeído. A adição da base aumenta o rendimento da reação pois auxilia na dissolução do reagente cloridrato de metilamina a partir desprotonação da amina, tornando-a um nucleófilo adequado. A redução da imina formada foi realizada a partir de hidrogenação catalítica com Pd/C 10%, não sendo efetiva utilizando o agente redutor boro-hidreto de sódio – causa a formação de sub-produtos boranos.

Em seguida, o pró-ligante 2met é formado através de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) entre a amina do 1met e o carbono ligado ao cloro do reagente cmff. A utilização da base trietilamina também auxilia na eficiência da reação nucleofílica. Esse produto foi lavado com uma solução saturada de bicarbonato de sódio para remover todos os reagentes em excesso assim como os subprodutos indesejados da reação.

Para a síntese do pró-ligante 3met é realizado novamente uma aminação redutiva, com a adição de 2-(aminometil)piridina ao 2met. A redução da imina foi realizada com boro-hidreto de sódio e, após neutralização do pH da solução e eliminação dos reagente em excesso com uma lavagem com solução de bicarbonato de sódio, o produto foi obtido.

O ligante final **H₂Lmet** foi sintetizado de forma semelhante ao pró-ligante 2met, através de uma reação S_N2 entre 3met e cmff com adição da base trietilamina.

5.1.1 Caracterização do ligante H₂Lmet – RMN de ¹H

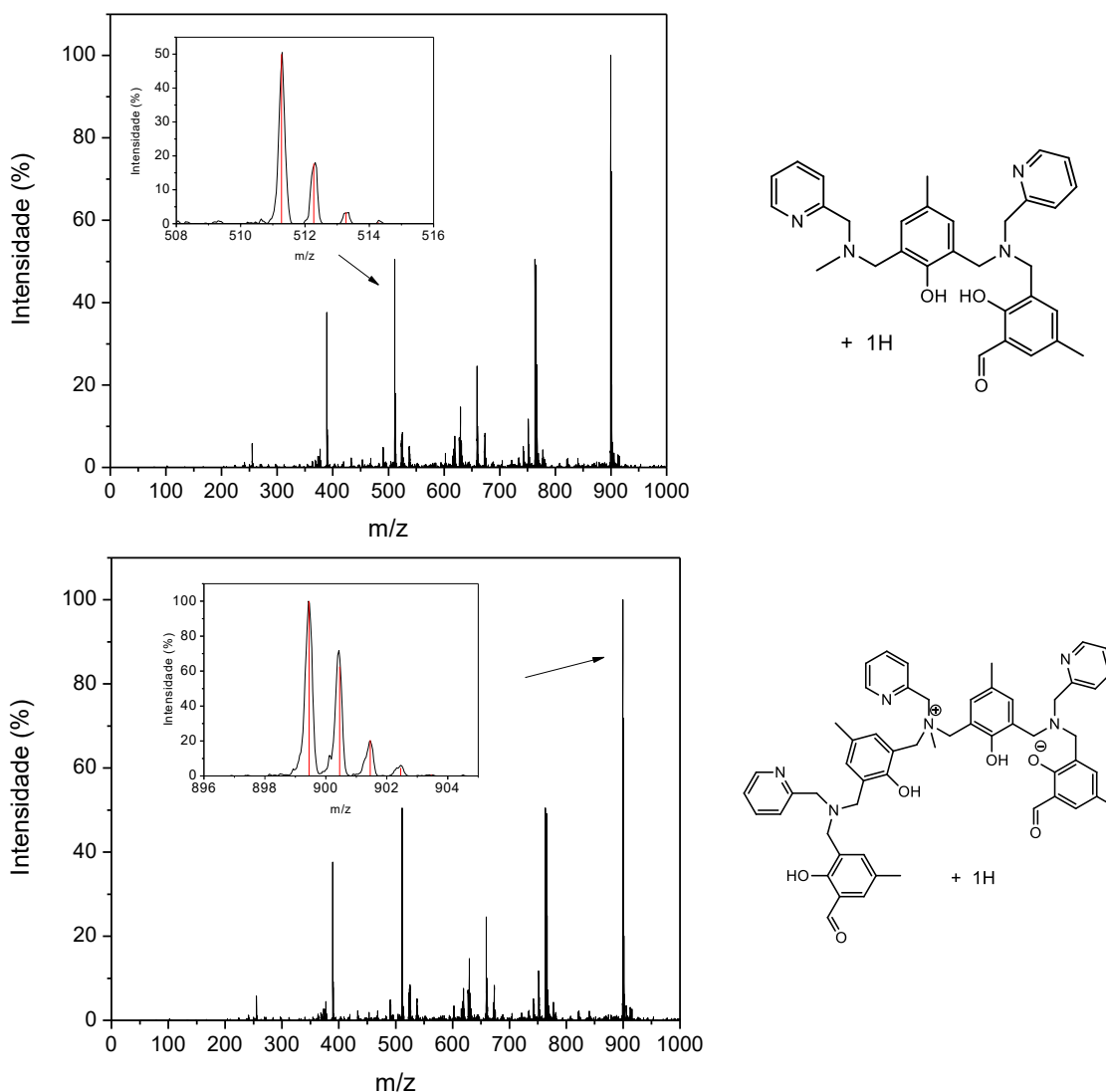
Para o ligante final, observa-se em seu RMN de ¹H (Figura 14) a sobreposição dos singletos correspondentes aos 9 átomos de hidrogênio dos grupos metil entre 2,0 e 2,5 ppm, assim como a sobreposição dos picos referentes aos hidrogênios dos grupos metileno na faixa de 3,5 a 4,0 ppm. Além disso, a presença de um singlete em 10,22 ppm correspondente ao hidrogênio do grupo aldeído e um singlete intenso em

5,21 ppm correspondente a hidrogênio de diclorometano, utilizado como solvente na síntese desse ligante.

5.1.2 Caracterização do ligante H_2Lmet – Espectrometria de Massa

A análise de espectrometria de massa com ionização via electrospray (ESI-MS) do ligante H_2Lmet resulta em um espectro com uma série de fragmentos e, portanto, revela que o ligante não se mantém em sua estrutura original (Figura 8).

Figura 16. Espectro de ESI-MS do ligante H_2Lmet com assinalada distribuição isotópica teórica (vermelho) para as espécies em $m/z = 899,3$ e $511,3$ no modo positivo.



Seu pico base possui um conjunto de sinais em $m/z = 899,3$, com uma unidade de distância entre eles, correspondente a uma espécie monovalente. A formação de uma estrutura do ligante **H₂Lmet** com a união de fragmentos de cmff e 2-(aminometil)piridina não é viabilizada pela rota sintética utilizada, portanto, é uma estrutura formada apenas sob as condições do experimento de ionização.

Dentre os demais fragmentos presentes no espectro, encontra-se um pico em $m/z = 511,3$ correspondente a uma espécie monovalente com perfil isotópico compatível à estrutura [**H₂Lmet** + 1H].

5.2 Síntese do complexo Cmet

A etapa inicial da síntese consiste na reação estequiométrica do ligante **H₂Lmet** com o sal acetato de zinco (II). A solução metanólica, amarelada pela presença do ligante, não sofre alteração de cor na adição de zinco, pois o complexo gerado não possui transição eletrônica entre os orbitais do metal nem transferências de carga entre metal e ligante na região do visível. Ao adicionar lentamente o sal perclorato de ferro (III), é observada a transformação da coloração da solução a roxo escuro conforme é formado o complexo com ferro – possuindo transição de carga ligante-metal (TCLM) entre orbitais $p\pi$ do fenolato e orbitais do Fe(III) em um comprimento de onda na região do visível.²⁰

A complexação pode ser explicada a partir dos conceitos de acidez e basicidade de Lewis. O ligante assimétrico **H₂Lmet** possui 6 sítios de coordenação através dos grupos piridina, amina e fenolato, atuando como base de Lewis. Esses grupamentos doam pares de elétrons de seus orbitais de fronteira a orbitais desocupados dos metais, ácidos de Lewis.

A disposição desses sítios no ligante tem influência na complexação preferencial dos metais trivalente e bivalente de forma específica. Os conceitos de maciez e dureza de Person explicam a interação preferencial do Fe(III) com o ambiente menos polarizável (maior presença de grupos fenolato), enquanto o Zn(II) coordenaria ao ambiente mais polarizável.³⁰

Porém, ao realizar o experimento de espectrometria de absorção atômica, foi observada apenas uma quantidade traço de zinco, com presença majoritária de Ferro em uma concentração correspondente a uma proporção 1:1 Ferro/ligante.

Duas hipóteses são levantadas para a não coordenação do zinco: (i) a amina terciária com o grupo metil substituído pode estar protonada, perdendo sua capacidade de coordenação; e (ii) a presença de apenas uma ponte pode não ser suficiente para aprisionar o zinco na esfera de coordenação.

5.3 Caracterização do complexo Cmet

5.3.1 Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)

A espectroscopia no IV pode ser utilizada para obter resultados preliminares sobre a complexação através da comparação dos espectros do ligante e do complexo. Para o ligante estão presentes bandas correspondentes a vibração das ligações: C-H_{ar}, C-H_{alif}, C-O_{fenol}, O-H_{fenol}, C=N, C=C, C=O e C-N. No espectro do complexo são observadas alterações de intensidade e deslocamento das bandas de vibração do ligante, assim como também estão presentes bandas adicionais referentes ao contra-íon e ligantes aquo ou hidroxio. A sobreposição desses espectros está apresentada na Figura 17 e as principais bandas foram atribuídas³¹ na Tabela 1.

Figura 17. Espectros na região do IV do ligante final **H₂Lmet** e do complexo **Cmet**.

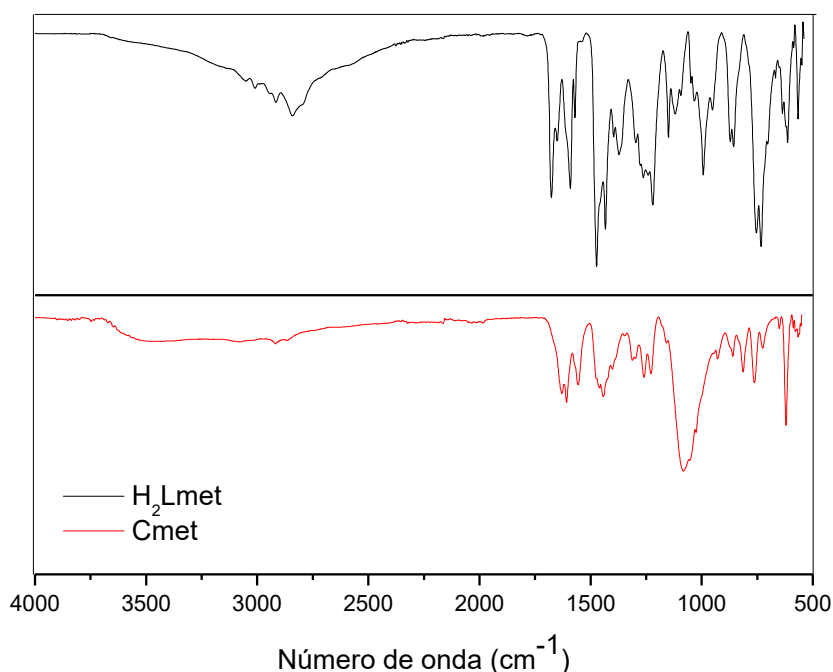


Tabela 1. Principais valores de número de onda (cm^{-1}) para as bandas e suas atribuições nos espectros de IV do ligante **H₂Lmet** e do complexo **Cmet**.

Atribuições	H ₂ Lmet	Cmet
ν (C-H _{ar} e C-H _{alif})	3137 a 2843	3100 a 2840
δ (C-H _{ar})	741	766
ν (C-H _{ald})	2843	2840
ν (C=N e C=C)	1648 a 1431	1630 a 1449
δ (O-H _{fenol})	1368	-
ν (O-H e N-H)	-	3450
ν (C-O _{fenol})	1300 a 1220	1313 a 1228
ν (C=O)	1676	1630
ν (C-N)	1150 a 1095	1160 a 930
ν_{sim} (OAc)	-	1440
ν_{ass} (OAc)	-	1554
ν (Cl-O)	-	1088

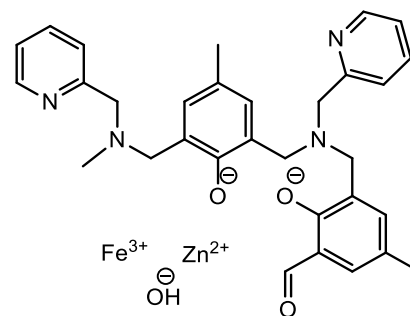
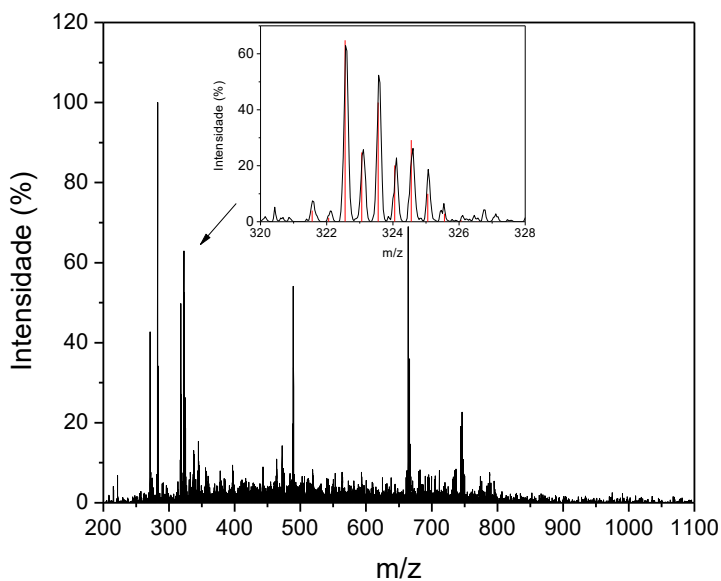
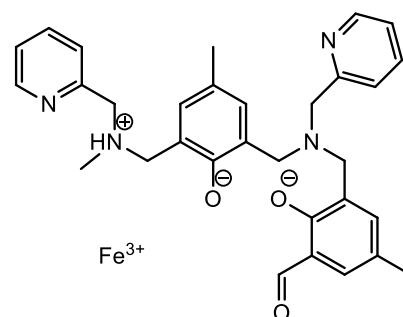
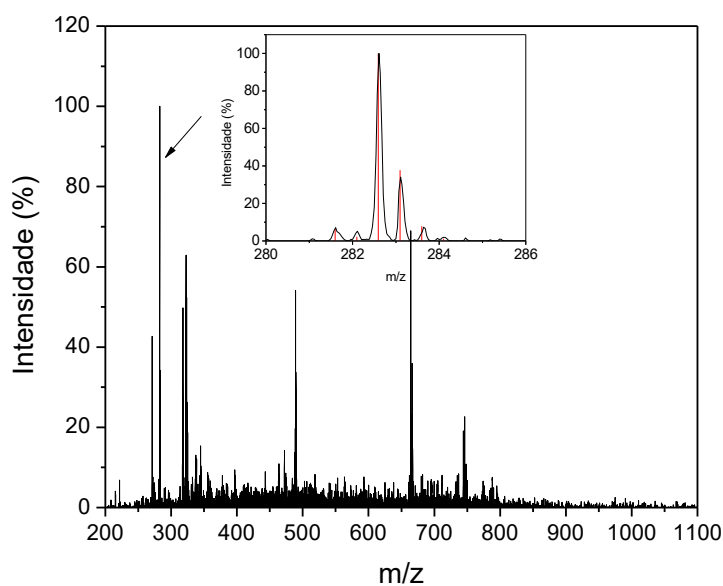
As bandas de estiramento do ligante: C-O_{fenol} (1300 a 1220 cm^{-1}), C-N (1150 a 1095 cm^{-1}), C-H_{ald} (2843 cm^{-1}), C-H_{ar} e C-H_{alif} (3137 a 2843 cm^{-1}) e C=N e C=C (1648 a 1431 cm^{-1}) são suprimidas e deslocadas em energia na complexação. Isso ocorre pois parte da força das ligações intraligante é suprimida através do deslocamento da densidade eletrônica para o metal.

No espectro do complexo, a banda de deformação angular O-H_{fenol} é inexistente, sinalizando que na coordenação os grupos fenolatos estão desprotonados. A presença de uma banda alargada em 3450 cm^{-1} pode corresponder a ligação O-H, com ligantes aquo coordenados ou na forma hidratada, assim como a presença de ligação N-H proveniente da protonação da amina terciária livre do ligante. A presença de acetato é observada através dos estiramentos simétricos e assimétricos de acetato (OAc) em 1440 e 1554 cm^{-1} . O acetato poderia estar coordenado ao centro de Fe(III) de forma monodentada ou bidentada, porém a distância entre as bandas de estiramento simétrico e assimétrico do grupo COO⁻ do acetato não indicam essas formas de coordenação, propondo-se a presença do grupo acetato de forma não coordenada.³² A banda intensa em 1088 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação Cl-O do contra-íon perclorato.

5.3.2 Espectrometria de Massa

A análise de ESI-MS do complexo **Cmet** resultou em um espectro com vários fragmentos (Figura 18). Somente foi possível atribuir estruturas para dois sinais, devido a complexidade estrutural e de estabilização dos fragmentos nas condições de análise.

Figura 18. Espectro de ESI-MS do complexo **Cmet** e assinalada distribuição isotópica teórica (vermelho) das espécies em $m/z = 282,3$ e $322,4$ no modo positivo.



O pico base desse espectro encontra-se em $m/z = 282,6$ e corresponde a uma espécie bivalente. Sua massa e perfil isotópico são compatíveis à espécie $[\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{Lmet}]$. O segundo fragmento atribuído ($m/z = 322,4$) possui perfil isotópico característico de uma espécie contendo ferro e zinco e a distância de 0,54 entre seus sinais revela uma estrutura bivalente compatível com $[\text{Fe}^{3+} + \text{Zn}^{2+} + \text{OH}^- + \text{H}_2\text{Lmet}^2]$. A presença de hidróxido é justificada pelo uso do mesmo na síntese do complexo, proveniente do solvente metanol ou na lavagem do complexo em água.

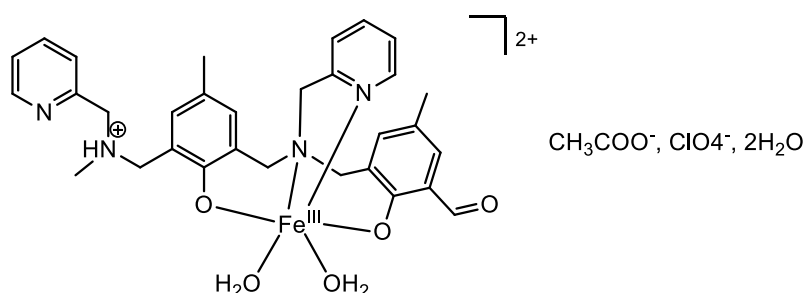
Embora a amostra não apresente quantidade significativa de zinco, a sensibilidade da técnica de espectrometria de massa permite observar um pico relativo a espécie contendo zinco.

5.3.3 Condutimetria

A condutimetria do complexo **Cmet** foi realizada em acetonitrila em uma concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e mostrou condutividade molar de $277,8 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. Quando comparado com a literatura,³³ esse valor indica a proporção 1:2 entre complexo e contra-íon. A partir da identificação de bandas de estiramento das ligações acetato e perclorato na técnica de espectroscopia no infravermelho, propoe-se a presença de acetato e perclorato como contra-íon, mantendo a proporção: $[\text{Cmet}]^{2+}/n\text{OAc}m\text{ClO}_4$, onde $n+m = 2$.

Baseado na característica do centro metálico e no ligante sintetizado, levando em consideração os resultados de caracterização, propoe-se, para a obtenção de valores aproximados de coeficiente de absorção e parâmetros cinéticos – para a comparação com complexos semelhantes na literatura -, uma estrutura para o complexo **Cmet** no estado sólido (Figura 19), sabendo que mais caracterizações são necessárias para garantir as espécies realmente existentes.

Figura 19. Estrutura proposta para o complexo **Cmet** em estado sólido.



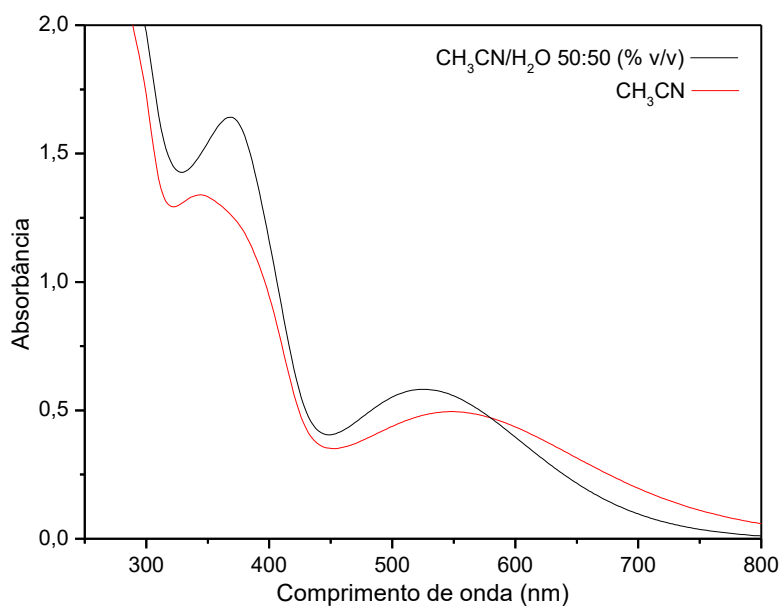
5.3.4 Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Os espectros de absorção na região UV-Vis para o complexo **Cmet** foram obtidos de 250 a 800 nm, utilizando CH₃CN e a mistura CH₃CN/H₂O (50:50, % v/v) como solventes (Figura 20). Em ambos, observa-se uma banda intensa na região de 500-600 nm e outra de maior intensidade, na forma de um ombro, na região de 345-370 nm. Ambas são atribuídas ao processo de transferência de carga ligante → metal (TCLM), a qual ocorre entre os orbitais pπ do fenolato para os orbitais d do íon Fe³⁺.⁴

Para o espectro do complexo em acetonitrila, uma banda é observada com máximo de absorção em 547 nm ($\epsilon = 1483 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e na mistura CH₃CN/H₂O (50:50, % v/v) essa mesma banda aparece deslocada para 526 nm ($\epsilon = 1802 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O deslocamento hipsocrômico em meio aquoso é atribuído ao efeito solvatocrômico e também ao aumento do campo ligante no deslocamento do equilíbrio das espécies aquo a hidroxio coordenados ao Fe(III).

Os resultados encontrados para o **Cmet** estão de acordo com os valores típicos de comprimento de onda e coeficiente de absorção para complexos contendo ligação Fe(III)-O_{fenolato}.^{1,4,18,21,22,23,34}

Figura 20. Espectros eletrônicos do complexo **Cmet** ($2,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em CH₃CN (vermelho) e na mistura CH₃CN/H₂O (50:50, % v/v) (preto).



5.3.5 Titulação Espectrofotométrica e Potenciométrica

Foram realizadas titulação espectrofotométrica e potenciométrica do complexo **Cmet** na mistura CH₃CN/H₂O (50:50, % v/v) e os pK_as obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Comparação entre os valores de pK_a espectrofotométricos e potenciométricos para o complexo **Cmet**.

	pK _{a1}	pK _{a2}	pK _{a3}
Titulação Espectrofotométrica	5,55	7,50	-
Titulação Potenciométrica	5,29	8,03	11,01

Os pK_as 1 e 2 são atribuídos à desprotonação das águas coordenadas ao Fe(III) e o terceiro pK_a encontrado, observado apenas na titulação potenciométrica, foi atribuído à amina terciária protonada do ligante (Figura 21).

A titulação espectrofotométrica (Figura 22) inicia-se em pH 2,9 e acredita-se que o Fe(III) encontra-se coordenado ao ligante **H₂Lmet** através de quatro sítios de coordenação e duas moléculas de água completam a esfera octaédrica do metal. O deslocamento hipsocrômico das bandas no espectro eletrônico conforme o aumento do pH é resultado da desprotonação de ligantes aquo, promovendo o aumento da diferença de energia entre os orbitais π do fenolato e dπ* do metal Fe(III) e o aumento da energia da banda de transferência de carga.²²

Figura 21. Proposta de espécies formadas durante a titulação espectrofotométrica com o aumento do pH da solução em CH₃CN/H₂O (50:50, %v/v).

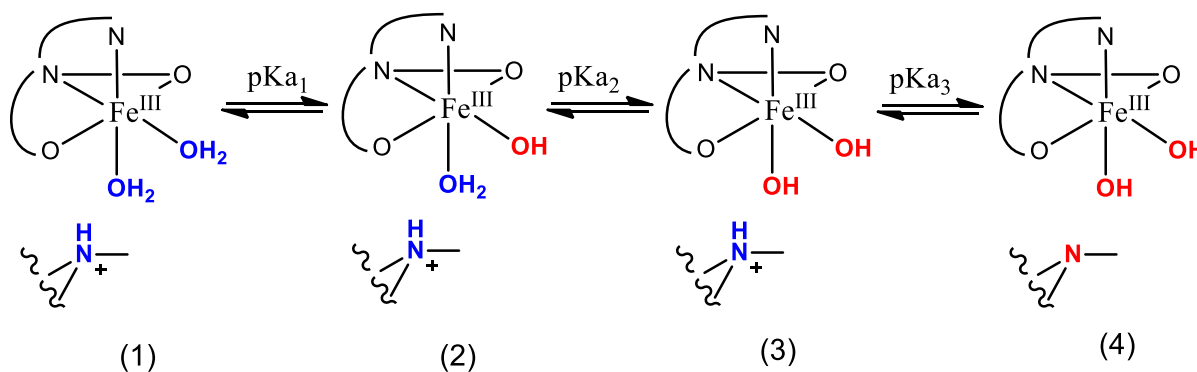
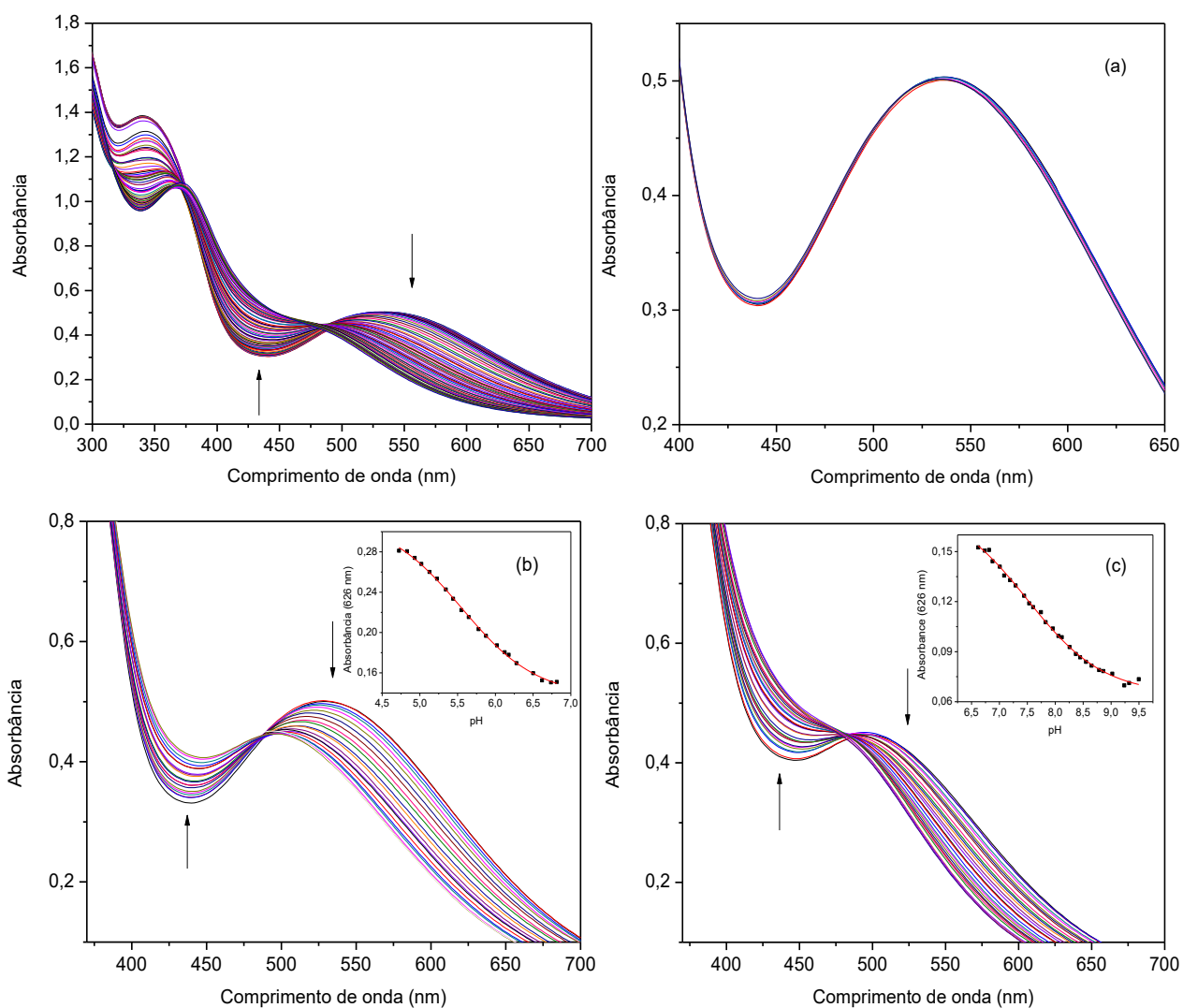


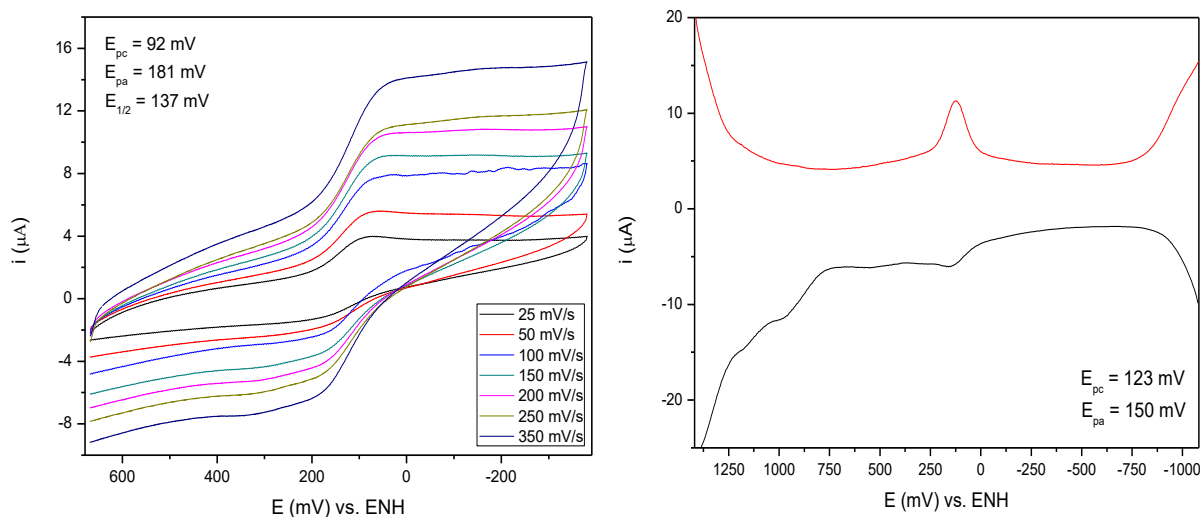
Figura 22. Titulação espectrofotométrica do complexo **Cmet** em CH₃CN/H₂O (50:50, % v/v) a 25°C, em 0,1 mol L⁻¹ de KCl; [C] = 3x10⁻⁴ mol L⁻¹.



5.3.6 Eletroquímica

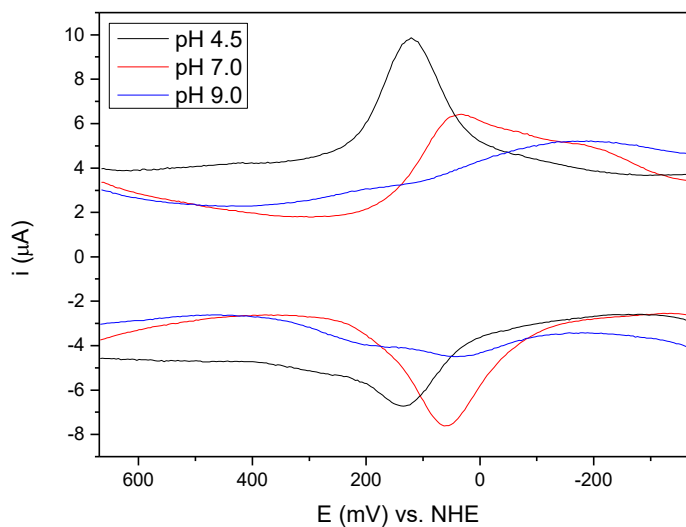
O comportamento eletroquímico do complexo **Cmet** foi estudado por meio de Voltametria Cíclica (VC) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) nos pHs 4,5, 7,0 e 9,0. O experimento avalia o comportamento redox dos complexos, sendo observados processos correspondentes ao equilíbrio redox *quasi-reversível*: $Fe^{3+} + 1e^{-} \rightleftharpoons Fe^{2+}$.

Figura 23. Voltamogramas Cíclico e de Onda Quadrada do complexo **Cmet** (5×10^{-4} mol L $^{-1}$) em CH $_3$ CN/H $_2$ O (50:50 %v/v, KCl 0,1 mol L $^{-1}$) a 25°C, com velocidades de varredura de 25, 50, 100, 150, 200, 250, 350 mV s $^{-1}$ em pH 4,5. Os potenciais estão representados versus ENH.



Na voltametria cíclica (Figura 23), para todos os valores de pH, foram observados valores crescentes de ΔE_p com o aumento da velocidade de varredura, em concordância com o processo *quasi-reversível* da reação.³⁵ Os valores de potenciais do processo ($E_{1/2} = 137$ mV em pH 4,5) estão de acordo com outros sistemas miméticos estudados sob as mesmas condições.^{22,36}

Figura 24. Voltamogramas de Onda Quadrada do complexo **Cmet** (5×10^{-4} mol L $^{-1}$) nos pHs 4,5 (preto), 7,0 (vermelho) e 9,0 (azul) em CH $_3$ CN/H $_2$ O (50:50, %v/v, KCl 0,1 mol L $^{-1}$) a 25°C. Os potenciais estão representados versus ENH.



A comparação dos voltamogramas de onda quadrada do complexo **Cmet** em cada pH (Figura 24) mostra um deslocamento dos potenciais de redução para valores mais negativos conforme o aumento do pH. A desprotonação de moléculas de água coordenadas aos metais aumenta a densidade eletrônica desses, dificultando o processo de redução do par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ e conseqüentemente diminuindo o potencial de redução do mesmo.

Em pH 4,5 a espécie (1) é majoritária, e pode ser observada pelo processo de redução único e bem definido ($E_{pc} = 123 \text{ mV}$). Em pH 7,0 - valor próximo ao pK_{a2} - há uma mistura das espécies (2) e (3), caracterizada por dois distintos processos de redução ($E_{pc1} = 45 \text{ mV}$ e $E_{pc2} = -140 \text{ mV}$). Já em pH 9,0, observa-se um processo com potencial de redução próximo ao observado para um dos processos em pH 7,0, a qual é atribuída à espécie (3). Essa onda é bastante alargada e pode estar associada com a espécie (2) (ainda presente em pequenas proporções), assim como uma possível degradação do complexo nesse pH, considerando a forte interação entre Fe(III) e ligantes hidróxido²⁷. Esses resultados estão em concordância com as propostas de coordenações apresentadas nas técnicas anteriores.

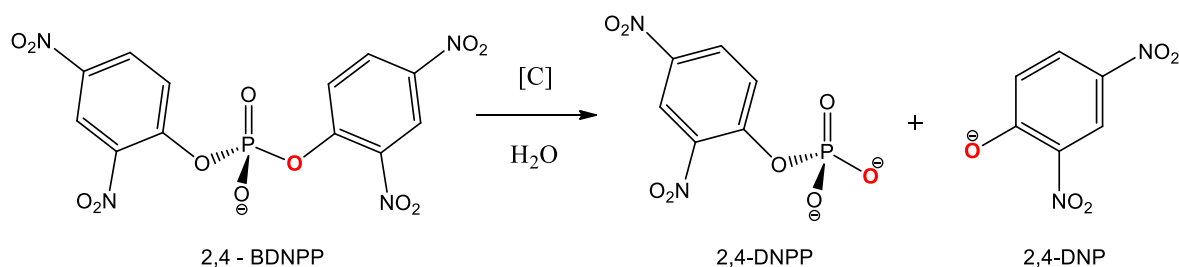
Os resultados obtidos nas análises espectrofotométricas e nos estudos eletroquímicos para o complexo **Cmet** são muito similares aos obtidos para sistemas Fe(III)Zn(II) com grupos amino não coordenados.^{22,36} Tal comportamento é esperado se considerada a semelhança de esfera de coordenação do Fe(III) e as interações intermoleculares com a mesma em ambos os sistemas, não diferindo significativamente nas características eletrônicas do Fe(III) .

5.4 Estudo cinético de hidrólise de diésteres de fosfatos

Para avaliar o comportamento do complexo **Cmet** como biomimético para PAPs, foram realizados estudos cinéticos de hidrólise de diésteres de fosfato com o substrato ativado bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP). O estudo da atividade catalítica do complexo frente ao substrato modelo é realizado através de experimentos que seguem uma cinética de pseudo-primeira ordem a partir do uso de um excesso de substrato em relação ao complexo. A reação de hidrólise do substrato pode ser acompanhada espectrofotometricamente a partir da formação do produto 2,4-dinitrofenolato (Figura 25) que absorve a radiação eletromagnética na região do

visível, possuindo uma banda com máximo de absorção em 400 nm. Foram realizados estudos de efeito de pH e efeito de concentração de substrato para obtenção dos parâmetros cinéticos da reação.

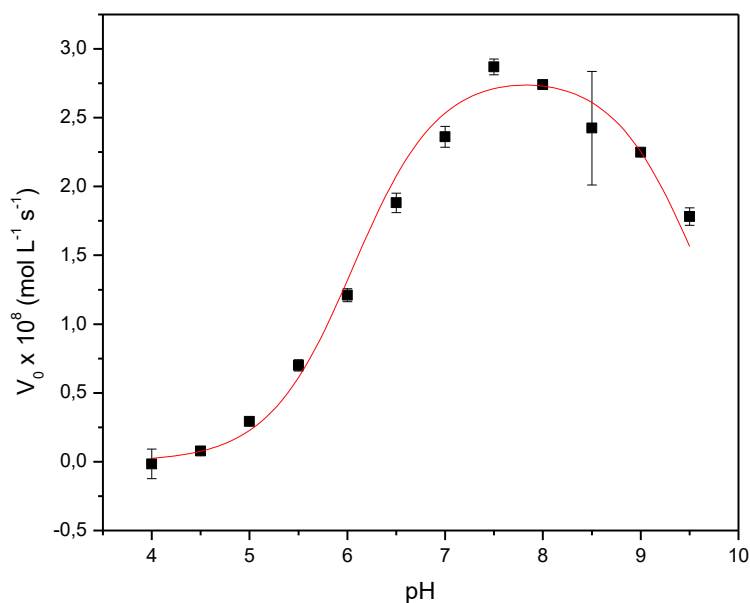
Figura 25. Esquema de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP.



5.4.1 Hidrólise com efeito de pH

O estudo do efeito de pH sobre a velocidade da reação de hidrólise catalisada pelo **Cmet** é realizado para obter o pH ótimo de hidrólise e os pK_a s cinéticos do complexo. Esses pK_a s cinéticos são úteis, quando comparados com os valores de pH potenciométricos a fim de estabelecer espécies cataliticamente ativas.

Figura 26. Gráfico da dependência das velocidades iniciais com o pH da reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada pelo complexo **Cmet** em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50, %v/v) nas condições: $[\text{C}] = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Substrato}] = 3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{tampão}] = 5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; Força iônica (I) = $5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (LiClO_4), a 25°C .



O complexo apresenta máxima atividade em pH 7,5 (Figura 26), e a dependência da atividade em relação ao pH apresenta um comportamento de sino. Foi realizado o ajuste dos pontos obtidos a partir da aplicação de uma aproximação com a Equação 1^{37,38} e o valor de pK_a cinético de 6,05 foi obtido a partir do ponto de inflexão da função, indicando que a espécie ativa na hidrólise é a espécie (2) - $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{HLmet})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]$.

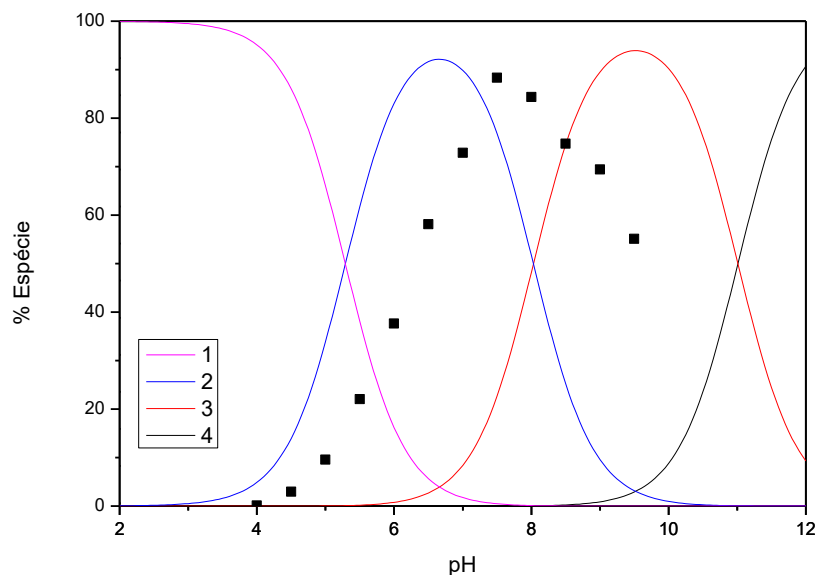
$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_{a1}} + \frac{K_{a2}}{[\text{H}^+]}} \quad \text{Equação 1}$$

A atividade desse complexo é explicada através da dependência de associação substrato-complexo e da atuação do nucleófilo na etapa de hidrólise. Inicialmente a presença da espécie (1) - na faixa de pH entre 4,0 e 5,5 – apresenta baixa atividade de hidrólise. Em pH baixo a coordenação do substrato é facilitada, pois o ligante aquo é mais lábil do que o ligante hidroxido, porém, não há a presença de um nucleófilo forte o suficiente para promover a hidrólise.

Com o aumento do pH ocorre a desprotonação de um ligante aquo coordenado ao metal, gerando o nucleófilo proposto para a hidrólise e levando a um grande aumento da atividade catalítica. A espécie (2) é a forma cataliticamente ativa, possuindo uma água coordenada, que é substituída pelo substrato e, o grupo hidroxido responsável pelo ataque nucleofílico. A partir do pH ótimo é observada queda na atividade devido à formação da espécie (3), dificultando a entrada do substrato no sítio ativo pela ausência do ligante aquo.

A Figura 27 apresenta a distribuição de espécies para o complexo **Cmet** com a variação do pH. É possível observar que o perfil cinético do complexo em função do pH, não se sobrepõe a distribuição da forma cataliticamente ativa – espécie (2). Esse comportamento é observado para outros complexos que utilizam aminas protonadas para simular efeitos de segunda esfera de coordenação.^{22,23,24,37} A partir da coordenação do substrato ao sítio ativo, a amina protonada deixa de interagir com as águas coordenadas ao metal para interagir com o substrato, levando a uma variação do pK_a dessas águas quando comparado ao complexo mononuclear na ausência do substrato.

Figura 27. Diagrama de distribuição de espécies para o complexo **Cmet** em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50, % v/v), com sobreposição do perfil obtido na cinética de hidrólise para a dependência das velocidades iniciais com o pH.



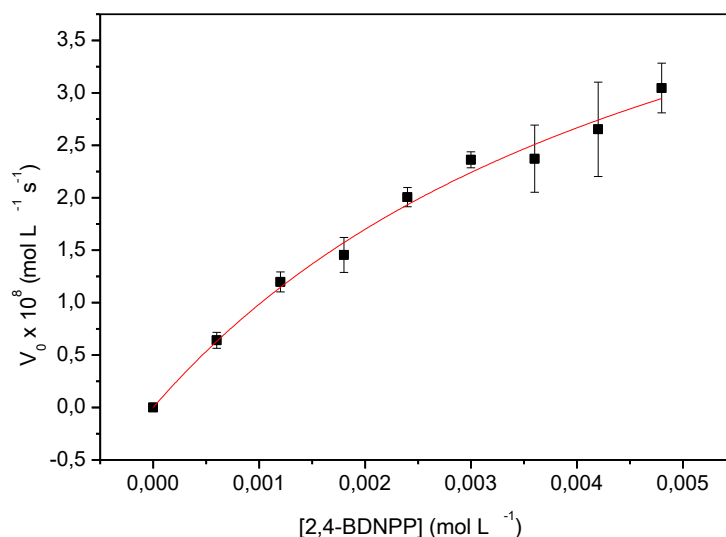
A influência do ambiente de coordenação do complexo com a atividade catalítica foi avaliada de forma mais aprofundada através da variação de concentração de substrato, gerando os parâmetros cinéticos da reação.

5.4.2 Hidrólise com efeito de concentração de substrato

A dependência da atividade catalítica com a concentração de 2,4-BDNPP (Figura 28), apresenta perfil de saturação e pode ser utilizada para retirar os parâmetros cinéticos a partir da equação não-linear de Michaelis-Menten. O experimento foi realizado em pH 7,0 à 25 °C.

A eficiência catalítica do complexo (E) é o parâmetro mais utilizado para avaliar os resultados do estudo cinético. Ela envolve a razão entre o k_{cat} e o K_{M} , considerando ambos os efeitos de atuação do nucleófilo e associação complexo-substrato na atividade de hidrólise.

Figura 28. Gráfico da dependência das velocidades iniciais com a concentração de substrato para o complexo **Cmet** em CH₃CN/H₂O (50:50, %v/v) nas condições: [C] = 4x10⁻⁵ mol L⁻¹; [tampão] = 5x10⁻² mol L⁻¹; I = 5x10⁻² mol L⁻¹ (LiClO₄), a 25°C, em pH 7,0.



Os parâmetros cinéticos obtidos para o complexo **Cmet** estão listados na Tabela 3. O valor de K_M indica uma boa associação do substrato ao complexo, provavelmente auxiliada pela interação do substrato com a amina protonada do ligante e o valor de k_{cat} foi obtido considerando a atuação da espécie mononuclear de Fe(III).

Não foram encontrados estudos de atividade de hidrólise de ésteres de fosfato para complexos mononucleares de Fe(III) na literatura. Porém, os resultados obtidos se encontram na magnitude de valores encontrados para complexos binucleares de Fe(III), como apresentado na Tabela 3.

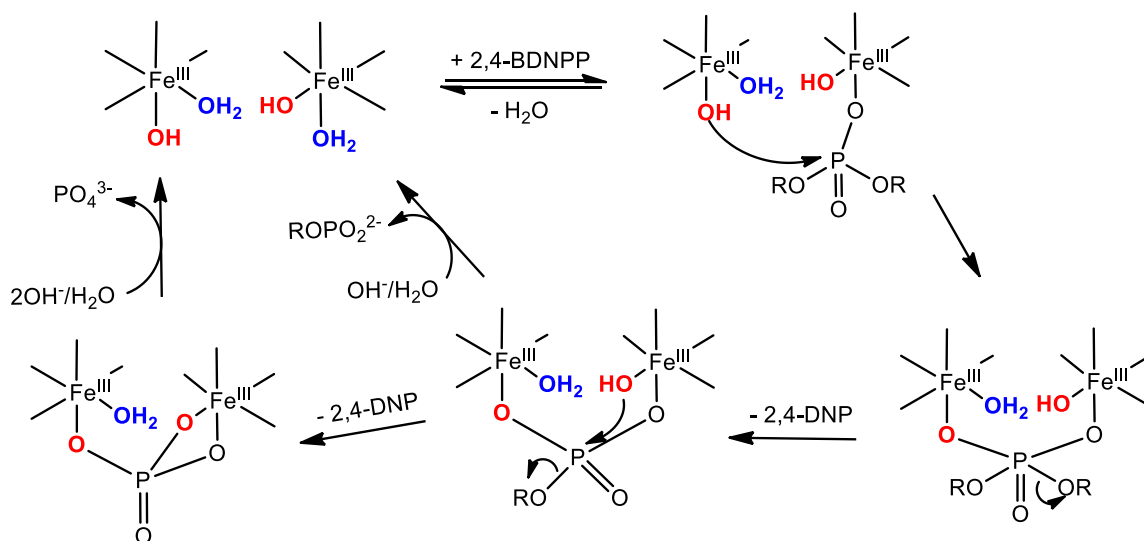
Tabela 3. Parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisada a 25°C pelo complexo **Cmet** (monômero) e outros compostos da literatura.

Complexo	k_{cat} (x10 ⁻³) (s ⁻¹)	K_M (x10 ⁻³) (mol L ⁻¹)	K_{ass} (L mol ⁻¹)	E (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	f (x10 ³)	pH
Cmet	1,55	5,29	189	0,29	8,61	7,0
Fe ₂ L ¹³⁹	1,33	1,90	515	0,68	7,39	6,2
Fe ₂ L ³²³	0,65	7,38	135	0,09	3,61	7,4
Fe ₂ bbmp ³⁴	1,21	7,20	139	0,17	6,72	6,5

L1 = 4,11-dimetil-1,8-bis{2-[N-(di-2-piridilmetil)amino]etil}ciclâm. **L3** = 2,6-bis{[(6-amino-2-piridinil)metil](2-piridinilmetil)amino}metil}-4-metilfenol. **bbmp** = 2,6-bis{(2-hidroxibenzil)(piridin-2-il)metilamino}metil}-4-metilfenol.

Com base nos resultados de experimentos cinéticos, diversas propostas de mecanismo se mostram viáveis – inclusive que esses ocorram de forma simultânea. Uma das propostas é um mecanismo cooperativo na hidrólise do substrato (Figura 29), no qual uma molécula de substrato se coordena ao sítio ativo de Fe(III) e o nucleófilo atuante é proveniente de outra unidade de complexo. Nesse mecanismo, o intermediário formado após o ataque do nucleófilo formaria uma ponte entre dois monômeros, tornando possível, após a liberação do primeiro equivalente de 2,4-DNP, o ataque de um segundo hidroxila ainda disponível na esfera de coordenação de um dos monômeros, hidrolisando o monoéster. Esse mecanismo justificaria o resultado obtido na reação 1:1 complexo/substrato, que mostra a formação de 1,8 equivalentes do 2,4-dinitrofenolato (2,4-DNP), indicando a hidrólise do 2,4-DNPP (monoéster) pelo complexo após a liberação do primeiro equivalente de 2,4-DNP.

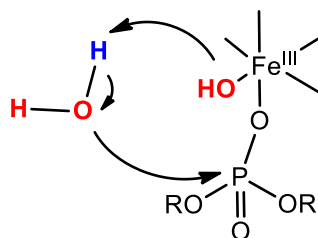
Figura 29. Proposta de mecanismo cooperativo de hidrólise do 2,4-BDNPP catalisado pelo complexo **Cmet** em pH 7,0, sugerindo também a hidrólise do 2,4-DNPP gerado.



Outro mecanismo proposto é com atuação do monômero com coordenação do substrato ao centro metálico e ataque intramolecular pelo nucleófilo OH⁻, formando um intermediário pentacoordenado coordenado de forma bidentada ao centro metálico. O experimento cinético de efeito isotópico de deutério apresentou k_H/k_D de 1,8, indicando um possível ataque realizado pelo meio (catálise básica), como demonstrado na Figura 30. Todos esses mecanismos podem estar ocorrendo

simultaneamente e mais experimentos são necessários para investigar a atuação do complexo na hidrólise de ésteres de fosfato.

Figura 30. Proposta de ataque do nucleófilo por meio de catálise básica.



6 CONCLUSÕES

O ligante **H₂Lmet** foi sintetizado de forma satisfatória, com bons rendimentos e adequada caracterização através de RMN de ¹H, IV e ESI-MS. A síntese do complexo não resultou em cristais para análise estrutural de difração de raio X, dessa forma, diversas técnicas foram utilizadas para a caracterização do complexo sintetizado, a fim de avaliar a estrutura e as características físico-químicas do mesmo: (i) a espectrometria de absorção atômica revelou a ausência de Zn(II) no centro metálico, indicando a formação de um complexo mononuclear de Fe(III); (ii) a espectroscopia no IV e a condutimetria trouxeram indícios da coordenação do ligante ao metal, a presença de acetato e perclorato e também a proporção complexo/contra-íon; (iii) a espectrometria de massa concordou com a presença majoritária de uma espécie mononuclear de Fe(III); (iv) a espectroscopia no UV-vis confirmou a presença de transferência de carga O_{fenolato}-Fe em concordância com a coordenação de grupo fenolato a centro de Fe(III); (v) as titulações espectrofotométrica e potenciométrica revelaram valores próximos de pK_a, sendo o pK_{a3} atribuído à desprotonação da amina livre do ligante **H₂Lmet**, em concordância a complexos na literatura com esse grupo livre; e (vi) a eletroquímica revelou ondas referentes ao processo redox do ferro – em um comportamento similar a compostos binucleares contendo Fe(III) com esfera de coordenação similar.

Os estudos de hidrólise do substrato 2,4-BDNPP mostraram que o complexo apresenta atividade frente ao substrato modelo, com possíveis efeitos de segunda esfera de coordenação proporcionados pela amina terciária não coordenada do ligante **H₂Lmet**. Os resultados de cinética em reação estequiométrica indicam que o complexo é capaz de hidrolisar o monoéster formado durante a reação de hidrólise do diéster. O efeito isotópico de deutério indica atuação do meio através de um possível mecanismo de catálise básica na atividade de hidrólise.

7 PERSPECTIVAS

As estruturas do complexo em forma sólida e em solução foram propostas baseando-se nos resultados mencionados acima, sendo necessárias diversas outras técnicas para identificar propriamente a estrutura do complexo **Cmet**, desvendando o mecanismo atuante na hidrólise de diésteres de fosfato.

Como perspectivas, pretende-se realizar novos procedimentos de síntese do complexo heterobinuclear de Fe(III) e Zn(II), dessa vez usando uma base para garantir que a amina terciária substituída com o grupo metil esteja desprotonada e possa coordenar ao metal (II). Será adicionado um excesso de acetato pela adição de acetato de sódio, para forçar a formação de duas pontes acetato entre os dois centros metálicos.

Além disso, a síntese do complexo mononuclear de ferro é necessária para estudos mais precisos sobre a atuação do mesmo na hidrólise de ésteres de fosfato. A fim de obter a cristalização do complexo mononuclear e analisar sua estrutura por difração de raios X, podem ser utilizados ligantes rígidos bidentados – como a 2,2-bipiridina – para substituição de ligantes aquo, conferindo uma coordenação menos livre ao centro metálico.

Para analisar as espécies existentes em solução para o complexo obtido neste trabalho, poderão ser utilizadas as técnicas de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) e espectroscopia Mossbauer que permitem diferenciar espécies que confirmam natureza diferente ao centro de ferro (III).

Para avaliar a formação de estruturas monoméricas ou diméricas do complexo **Cmet** são propostos quatro experimentos: (i) acompanhamento das espécies formadas em diferentes valores de pH por meio de espectrometria de massa (ESI-MS), permitindo compreender quais as possíveis espécies em equilíbrio no meio estudado; (ii) através da mesma técnica, observar a formação de espécies na presença do substrato 2,4-BDNPP nas mesmas condições dos experimentos cinéticos para identificação do aduto complexo-substrato e de possíveis intermediários; (iii) estudo do efeito da concentração do complexo na atividade do substrato 2,4-BDNPP, obtendo a ordem da reação em relação ao complexo, útil para compreender qual a espécie atuante; e, (iv) estudos cinéticos de hidrólise de substratos *o*-difenóis, que ajudaria a compreender a forma de coordenação do substrato ao centro de ferro – a

coordenação do difenol como ponte entre os dois ferros é necessária para oxidação do mesmo e formação da quinona correspondente, sendo necessário um mecanismo cooperativo para oxidação do substrato ou mesmo a existência de uma espécie dimérica no meio.

Uma pesquisa mais detalhada na literatura será feita em busca de outros experimentos que contribuam para elucidar os questionamentos gerados nesse trabalho.

8 REFERÊNCIAS

- ¹ PIOVEZAN, C.; JOVITO, R.; BORTOLUZZI, A. J.; TEREZI, H.; FISCHER, F. L.; SEVERINO, P. C.; PICH, C. T.; AZZOLINI, G. G.; PERALTA, R. A.; ROSSI, L. M.; NEVES, A. Heterodinuclear Fe^{III}Zn^{II} - Bioinspired complex supported on 3-Aminopropyl silica. Efficient hydrolysis of phosphate diester bonds. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2580–2582, 2010.
- ² KAIM, W.; SCHWEDERSKI, B.; KLEIN, A. **Bioinorganic chemistry - Inorganic elements in the chemistry of life: An introduction and guide**. 2 ed., John Wiley & Sons, p.1-4, 2013.
- ³ SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. **Organic chemistry**. 11 ed, John Wiley & Sons, p. 1090, 2014.
- ⁴ LANZMASTER, M. Desenvolvimento de novos modelos estruturais e funcionais para as fosfatases ácidas púrpuras. 2003. **Tese de Doutorado em Química** - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.
- ⁵ Banco de dados da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB): **EC 1.1.1.1 e EC 1.9.3.1**. Disponível em: <<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/>>. Acesso em: 03 jun. 2018.
- ⁶ MITIĆ, N.; MIRAULA, M.; SELLECK, C.; HADLER, K. S.; URIBE, E.; PEDROSO, M. M.; SCHENK, G. Catalytic mechanisms of metallohydrolases containing two metal ions. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 97, p. 49-81, 2014.
- ⁷ SCHENK, G.; KORSINCZKY, M. L. J.; HUME, D. A.; HAMILTON, S.; DEJERSEY, J. Purple acid phosphatases from bacteria: similarities to mammalian and plant enzymes. **Gene**, v. 255, n. 2, p. 419-429, 2000.
- ⁸ WILCOX, DE. Binuclear metallohydrolases. **Chemical reviews**, v. 96, n. 7, p. 2435-2458, 1996.
- ⁹ SCHENK, G.; MITIĆ, N.; HANSON, G. R.; COMBA, P. Purple acid phosphatase: a journey into the function and mechanism of a colorful enzyme. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 2, p. 473-482, 2013.
- ¹⁰ SARAIVA, G. L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 72-78, 2002.
- ¹¹ VOGEL, A.; SPENER, F.; KREBS, B. Purple acid phosphatase. In: **Encyclopedia of inorganic and bioinorganic chemistry**. John Wiley & Sons, p. 1-17, 2001.

- ¹² DOI, K.; ANTANAITIS, B. C.; AISEN, P. The binuclear iron centers of utoferrin and the purple acid phosphatases. In: **Bioinorganic Chemistry**. Springer, Berlin, Heidelberg; p.1-26, 1988.
- ¹³ MITIĆ, N.; SMITH, S. J.; NEVES, A.; GUDDAT, L. W.; GAHAN, L. R.; SCHENK, G. The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. **Chemical reviews**, v. 106, n. 8, p. 3338-3363, 2006.
- ¹⁴ 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.
- ¹⁵ KLABUNDE, T.; STRÄTER, N.; FRÖHLICH, R.; WITZEL, H.; KREBS, B. Mechanism of Fe (III)–Zn (II) purple acid phosphatase based on crystal structures. **Journal of molecular biology**, v. 259, n. 4, p. 737-748, 1996.
- ¹⁶ DAUMANN, L. J.; SCHENK, G.; OLLIS, D. L.; GAHAN, L. R. Spectroscopic and mechanistic studies of dinuclear metallohydrolases and their biomimetic complexes. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 3, p. 910-928, 2014.
- ¹⁷ GAHAN, L. R.; SMITH, S. J.; NEVES, A.; SCHENK, G. Phosphate ester hydrolysis: Metal complexes as purple acid phosphatase and phosphotriesterase analogues. **European journal of inorganic chemistry**, v. 2009, n. 19, p. 2745-2758, 2009.
- ¹⁸ 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. 2005. **Tese de Doutorado em Química** – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.
- ¹⁹ BUNTON, C. A.; FARBER, S. J. Hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 34, n. 4, p. 767-772, 1969.
- ²⁰ NEVES, A.; LANZMASTER, M.; BORTOLUZZI, A. J.; PERALTA, R. A.; CASELLATO, A.; CASTELLANO, E. E.; HERRALD, P.; RILEY, M. J.; SCHENK, G. An unprecedented Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II} complex that mimics the structural and functional properties of purple acid phosphatases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 24, p. 7486-7487, 2007.
- ²¹ SOUZA, R. J. Síntese, caracterização e avaliação da promiscuidade catalítica de complexos binucleares bioinspirados. 2010. **Tese de Doutorado em Química** – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.
- ²² HEYING, R. S. Síntese, caracterização e atividade diesterase de novos modelos biomiméticos com efeito de segunda esfera de coordenação para fosfatases ácidas púrpuras. 2014. **Dissertação de Mestrado em Química** – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.

- ²³ COMBA, P.; GAHAN, L. R.; MEREACRE, V.; HANSON, G. R.; POWELL, A. K.; SCHENK, G.; ZAJACZKOWSKI-FISCHER, M. Spectroscopic characterization of the active Fe^{III}Fe^{III} and Fe^{III}Fe^{II} forms of a purple acid phosphatase model system. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 12195-12209, 2012.
- ²⁴ CAMARGO, T. P. Desenvolvimento de complexos heterobinucleares de Fe^{III}Zn^{II} a partir de ligantes contendo o grupo pireno para estudo de interação com ésteres de fosfato e ácidos nucleicos. **Tese de Doutorado em Química** – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.
- ²⁵ LAIB, S.; KRIEG, A.; HAFLIGER, P.; AGORASTOS, N. DNA-intercalation on pyrene modified surface coatings. **Chemical Communications**, n. 44, p. 5566-5568, 2005.
- ²⁶ MITRA, R.; PETERS, M. W.; SCOTT, M. J. Synthesis and reactivity of a C₃-symmetric trinuclear zinc(II) hydroxide catalyst efficient at phosphate diester transesterification. **Dalton Transactions**, n. 35, p. 3924-3935, 2007.
- ²⁷ MARTEL, A. E.; MOTEKAITIS, R. J. **Determination and use of stability constants**. 2 ed, VCH publishers, p. 45, 1992.
- ²⁸ ROCK, P. A. The journal of physical chemistry. **American Chemical Society**, v. 70, p. 76-580, 1966.
- ²⁹ NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5 ed., W. H. Freeman and Company, p.194-205, 2008.
- ³⁰ MIESSLER, G. L.; FISCHER, P. J.; TARR, D. A. **Inorganic Chemistry**. 5 ed., Pearson, p. 203, 2014.
- ³¹ SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7 ed., John Wiley & Sons, p. 80-108, 2005.
- ³² NAKAMOTO, K. **Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds. Part A: Theory and applications in inorganic chemistry**. 5 ed., John Wiley & Sons, p. 185-202, 2009.
- ³³ GEARY, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 81-122, 1971.
- ³⁴ CAMARGO, T. P.; MAIA, F. F.; CHAVES, C.; DE SOUZA, B.; BORTOLUZZI, A. J.; CASTILHO, N.; BORTOLOTTI, T.; TERENCEZI, H.; CASTELLANO, E. E.; HAASE, W.; TOMKOWICZ, Z.; PERALTA, R. A.; NEVES, A. Synthesis, characterization, hydrolase and cathecolase activity of a dinuclear iron (III) complex: Catalytic promiscuity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 146, p. 77-88, 2015.

- ³⁵ ELGRISHI, N.; ROUNTREE, K. J.; MCCARTHY, B. D.; ROUNTREE, E. S.; EISENHART, T. T.; DEMPSEY, J. L. A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197-206, 2018.
- ³⁶ DOS SANTOS SILVA, G. A.; AMORIM, A. L.; DE SOUZA, B.; GABRIEL, P.; TEREZI, H.; NORDLANDER, E.; PERALTA, R. A. Synthesis and characterization of $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}$ complexes : effects of a second coordination sphere and increase in the chelate ring size on the hydrolysis of a phosphate diester and DNA. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 34, p. 11380-11394, 2017.
- ³⁷ DE SOUZA, B. Estudo de novos catalisadores biomiméticos com efeitos de segunda esfera de coordenação: Síntese, caracterização e catálise. **Tese de Doutorado em Química** – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.
- ³⁸ SMITH, S. J.; CASELLATO, A.; HADLER, K. S.; MITIĆ, N.; RILEY, M. J.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICZ, B.; SCHENK, G.; NEVES, A.; GAHAN, L. R. The reaction mechanism of the Ga(III)Zn(II) derivative of uteroferrin and corresponding biomimetics. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 1207-1220.
- ³⁹ COMBA, P.; GAHAN, L. R.; HANSON, G. H.; MEREACRE, V.; NOBLE, C. J.; POWELL, A. K.; PRISECARU, I.; SCHENK, G.; ZAJACZKOWSKI-FISCHER, M. Monoesterase activity of a purple acid phosphatase mimic with a cyclam platform. **Chemistry-A European Journal**, v. 18, n. 6, p.1700-1710, 2012.

9 APÊNDICE

Figura 31. Espectro de ESI-MS do ligante **H₂Lmet** contendo distribuição isotópica e estrutura dos fragmentos em $m/z = 389,2$ e $659,3$. A distribuição isotópica teórica para essas espécies está assinalada em vermelho.

