

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PPGQ - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE Cu(II), Ag(I) E
Zn(II) COM TRIPEPTÍDEOS: AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE COM
XANTHOMONAS CITRI SUBSP. CITRI.**

Carlos André Ferreira Moraes*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

***Bolsista CAPES**

São Carlos – SP

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Carlos André Ferreira Moraes, realizada em 06/09/2019:



Prof. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva
UFSCar



Prof. Dr. Aizir Azevedo Batista
UFSCar



Prof. Dra. Adriana Aparecida Lopes
UNAERP

Dedico a Deus, pelo dom da vida e por sempre estar comigo. Quero dedicar, também, aos meus pais, Maria do Socorro e Antônio Carlos, aos meus irmãos, irmãs, sobrinho e sobrinhas. Dedico a Cristiane (*in memoriam*).

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes”

Isaac Newton

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, saúde e por todas as bênçãos;

A Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, pelo aceite no grupo de pesquisa, orientação e por não medir esforços para o desenvolvimento da pesquisa;

Ao Dr. Wilmer José Villarreal Peña, por todo apoio, orientação, paciência nos ensinamentos e amizade;

Ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista, por ceder espaço no laboratório para o desenvolvimento desta pesquisa;

Ao corpo docente, técnico e administrativo do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos- UFSCar;

Aos colegas e amigos dos laboratórios: LERCI (Analu, João, Celis, Jocely, Letícia, Tamyres, Gregory, Vanessa, Gabriel, Legna), PN (Jéssica, Alany, Luciano, Gabriel, Ricardo) e LabMeeB (Letícia, Caio, Milena, Katiana);

Aos amigos Luciano Pinto, Artur Cruz, Paloma Prata, Fernanda Amaral, Sean Araújo, Luís Felipe e Douglas;

Ao Prof. Dr. Otaciro, pelas medidas de EPR;

Ao Dr. Flávio, pelas análises de RMN ¹H em janela expandida;

A Dra. Danielle, responsável pelos testes biológicos;

Ao Dr. Hugo Cesar, pelos experimentos de espectrometria de massas, juntamente com a Dra. Paloma Prata.

A Renata Doricci, por sempre ajudar nas articulações administrativas;

Aos órgãos de fomento: CNPq, FAPESP e CAPES;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Processo 001

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
IES	Ionização por Eletrospray
eV	Eletrovolt
GGH	Tripeptídeo Glicina-Glicil-L-Histidina
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IV	Infravermelho
mL	Mililitro
TCML	Transferência de Carga do Metal para o Ligante
MS	Espectro de massas (<i>fullscan</i>)
MS/MS	Espectro de massas da fragmentação de um íon selecionado
PAMs	Peptídeos Antimicrobianos
PGG	Tripeptídeo L-Fenilalanina-Glicil-Glicina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica

UFC	Unidade Formadora de Colônia
Uv-Vis	Espectro eletrônico na região do ultravioleta-visível
δ	Dobramento
δ	Deslocamento químico
ϵ	Coefficiente de absorvidade molar
λ	Comprimento de onda
μ	Micro
ν	Estiramento

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1 - Manifestação do ataque de bactérias do gênero *Xanthomonas* em plantas: (A) feijão e (B) algodoeiro. Fonte: (www.agrolink.com.br). 4
- FIGURA 1.2 – Ampliação ilustrativa do tecido vegetal para a visualização do sistema vascular simplificado, local de invasão da *Xanthomonas citri subsp. citri*. Figura retirada e adaptada de Nature Reviews Microbiology, v 9, p 344–355 (2011).¹² 5
- FIGURA 1.3 - Representação dos danos causados pelo cancro cítrico nas folhas na manifestação de pigmentos amarelos (A) e as lesões causadas nos frutos (B). Figuras retiradas e adaptadas da agrolink (A) (www.agrolink.com.br) e SNA/Reprodução (B) (www.sna.agr.br). 5
- FIGURA 1.4 - A transmissão do cancro cítrico de uma árvore contaminada para uma não contaminada por ações da natureza, iniciando em uma única árvore e rapidamente contagiando grande parte do pomar. Figura retirada e adaptada do manual técnico de maio de 2008 da FUNDECITRUS.¹¹ 6
- FIGURA 1.5 - *Chrysanthemum cinerariaefolium* em (A), piretrina em (B), destacando o esqueleto básico da piretrina em vermelho, que não sofre modificações, piretróides em (C). 8
- FIGURA 1.6 - Complexo Cu-GHK isolado do plasma sanguíneo. 11
- FIGURA 1.7 - Estrutura do tripeptídeo PGG, demonstrando suas extremidades e os pontos de coordenação propostos nesta pesquisa estão destacados em vermelho. 12
- FIGURA 1.8 - Estrutura do tripeptídeo GGH, demonstrando suas extremidades, ligações peptídicas, os pontos de coordenação propostos para os complexos sintetizados nessa pesquisa (em vermelho) para esse ligante e a nomenclatura usada para o aminoácido do resíduo L-histidina. 13
- FIGURA 1.9 - Algumas possíveis geometrias para complexos de Cu(II). 14

FIGURA 1.10 - Geometrias adotadas pelos complexos de prata.	15
FIGURA 1.11 – Estrutura química da sulfadiazina de prata.	16
FIGURA 1.12 – Geometrias adotados pelos complexos de zinco.....	16
FIGURA 1.13 - Estrutura química do produto comercial Ziram.....	17
FIGURA 3.1 - Mudanças na coloração no processo reacional do PGG com $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, na solução incolor têm-se o PGG (A), na solução azul clara o PGG + $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (B), por fim, a solução azul escura o PGG + $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ + NaHCO_3 (C).	21
FIGURA 3.2 - Esquema simplificado da síntese do $[\text{Cu}(\text{PGG})]\text{NO}_3$	21
FIGURA 3.3 - Esquema simplificado da síntese do $[\text{Cu}(\text{PGG})]\text{BF}_4$	22
FIGURA 3.4 - Esquema simplificado da síntese do $[\text{Zn}(\text{PGG})]\text{CH}_3\text{COO}$	23
FIGURA 3.5 - Esquema simplificado da síntese do $[\text{Ag}(\text{PGG})]$	24
FIGURA 3.6 - Esquema simplificado da síntese do $[\text{Cu}(\text{GGH})](\text{NO}_3)_2$	25
FIGURA 3.7 - Esquema simplificado da síntese do $[\text{Cu}(\text{GGH})](\text{BF}_4)_2$	25
FIGURA 3.8 - Mecanismo simplificado da síntese do $[\text{Zn}(\text{GGH})](\text{CH}_3\text{COO})_2$	26
FIGURA 3.9 - Esquema simplificado da síntese do $[\text{Ag}(\text{GGH})]\text{BF}_4$	27
FIGURA 3.10 - Ilustração da metodologia utilizada em placa Eliza de 96 poços para a medida da CIM. Imagem retirada e adaptada de SILVA, D. F. ¹⁶	33
FIGURA 4.1 - Espectro de absorção na região do infravermelho do PGG feito em KBr.	35
FIGURA 4.2 - Espectro de absorção na região do UV-Vis do PGG em DMSO em diluições seriadas.....	37
FIGURA 4.3 - Espectro de absorção na região do Uv-Vis do PGG obtido em água. Ao lado estão as concentrações das várias diluições.	38

- FIGURA 4.4 - Espectro de RMN de ^1H do tripeptídeo PGG em DMSO-d_6 (9,4 T), com os valores das integrais abaixo do espectro, deslocamento acima e atribuição dos hidrogênios para cada sinal referente as posições da estrutura do PGG mostrada no espectro..... 39
- FIGURA 4.5 - Espectro COSY do tripeptídeo PGG em DMSO-d_6 (9,4 T), destacando as correlações dos prótons das amidas ($\text{H}_{\text{N}'}$ e $\text{H}_{\text{N}''}$) com os hidrogênios (2H-2 e 2H-4). 40
- FIGURA 4.6 - Espectro de RMN ^{13}C do tripeptídeo PGG em DMSO-d_6 (9,4 T), com ampliação da região 35 ppm a 45 ppm para diferenciar os sinais dos carbonos C-4 e C-2. 41
- FIGURA 4.7 - Espectro de DEPT 135 do tripeptídeo PGG em DMSO-d_6 (9,4 T), mostrando os sinais de carbonos hidrogenados, na região aromática os carbonos do anel aromático. Na região alifática, o sinal do C-6 em δ 55.5 mostrado para cima, na ampliação da região de 38 ppm a 43 ppm têm-se os carbonos metilênicos, onde o carbono C-7 está junto do sinal residual do solvente. 42
- FIGURA 4.8 - Espectros de absorção na região do infravermelho, onde: (A) PGG, (B) **PGG-1**, (C) **PGG-2**, (D) **PGG-3** e (E) **PGG-4**. As mudanças nas bandas vibracionais indicam a formação dos complexos. 45
- FIGURA 4.9 - Espectro de Uv-Vis, em água, com várias diluições do complexo **PGG-1**. 47
- FIGURA 4.10 - Espectro de absorção na região do Uv-Vis, feito em DMSO, do **PGG-1**. 49
- FIGURA 4.11 - Espectro de absorção na região do Uv-Vis do **PGG-4**. 49
- FIGURA 4.12 - Espectro de RMN de ^1H do **PGG-1** em DMSO-d_6 (9,4 T), com os valores das integrais abaixo do espectro, deslocamento acima e atribuição dos hidrogênios para cada sinal referente as posições da estrutura do complexo. 51

- FIGURA 4.13 - Comparação dos espectros de RMN de ^1H do tripeptídeo PGG, em vermelho, com o complexo **PGG-1**, em azul, [DMSO- d_6 (9,4 T)], onde os deslocamentos dos hidrogênios em cada sinal do espectro indica a formação do complexo. Dando ênfase ao sinal do próton 2H-4 que tem multiplicidade de d no **PGG** e dd no complexo..... 52
- FIGURA 4.14 - Em vermelho mapa de contorno HSQC do **PGG** e em azul mapa de contorno HSQC do **PGG-1**, [DMSO- d_6 (9,4 T)], onde pode ser observado desdobramento de sinais do 2H-4 e o deslocamento do hidrogênio metínico H-6. 54
- FIGURA 4.15 - Mapa de contorno HSQC do **PGG-2**, [DMSO- d_6 (9,4 T)]..... 55
- FIGURA 4.16 - Sobreposição dos espectros de RMN de ^{13}C do **PGG** com o **PGG-1** (vermelho e azul, respectivamente), [DMSO- d_6 (9,4 T)]. Na ampliação da região dos carbonos alifáticos, o sinal do C-7 é observado no complexo, C-2 e C-4 deslocam para δ maiores, C-2 com maior desblindagem. Na ampliação da região de carbono acila, C-1, destacado em vermelho, tem maior deslocamento, indicando a coordenação pelo carboxilato. 56
- FIGURA 4.17 - Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H dos complexos **PGG-3** em preto e **PGG-4** em azul, [DMSO- d_6 (9,4 T)], destacando a região do espectro onde o complexo [Cu(PGG)] BF_4 apresenta um sinal diferente do seu análogo. 59
- FIGURA 4.18 - Mapa de contorno HSQC, [DMSO- d_6 (9,4 T)], para o complexo **PGG-4** mostrando as correlações não observadas no complexo **PGG-3**..... 60
- FIGURA 4.19 - Espectro de RMN de ^1H , [DMSO- d_6 (9,4 T)], para o complexo **PGG-4** em janela expandida, mostrando que não há sinais de hidrogênios fora da região de 0 – 20 ppm. 61
- FIGURA 4.20 - Espectro de massas MS com ampliação da região m/z 368-408 para visualização dos sinais com complexo **PGG-1**. O padrão isotópico teórico é demonstrado no quadro cinza..... 63

FIGURA 4.21 - Espectro de MS/MS do complexo PGG-1	64
FIGURA 4.22 – Algumas propostas de fragmentações para o PGG-1	65
FIGURA 4.23 - Espectro de MS do PGG-2 com ampliação da região de 335-357, para comparação dos padrões isotópicos teóricos e observados, caracterizando a formação do complexo.....	66
FIGURA 4.24 - Espectro MS/MS do complexo de PGG-2	67
Figura 4.25 - Algumas propostas de fragmentações do PGG-2	68
FIGURA 4.26 - Espectro MS do PGG-3	69
FIGURA 4.27 - Espectro de massas MS/MS do complexo PGG-3	70
FIGURA 4.28 - Espectro de absorção na região do infravermelho do GGH feito em KBr.	72
FIGURA 4.29 - Espectro de absorção na região do UV-Vis do GGH obtido em água. Ao lado estão as concentrações das várias diluições.....	72
FIGURA 4.30 - Espectro de RMN de ^1H do tripeptídeo GGH em DMSO- d_6 (9,4 T) com os valores das integrais abaixo do espectro, deslocamento acima e atribuição dos hidrogênios para cada sinal.	74
FIGURA 4.31 - Correlações observados no COSY.....	74
FIGURA 4.32 - Espectro de RMN de ^{13}C do tripeptídeo GGH em DMSO- d_6 (9,4T), com ampliação da região de 41 ppm a 43 ppm.....	75
FIGURA 4.33 - Comparação dos espectros na região do infravermelho, obtidos em KBr, onde as mudanças nas bandas de absorção dão indicio da formação do complexo. Os espectros são referentes a: (A) GGH , (B) GGH-3 , (C) GGH-4 , (D) GGH-1 , (E) GGH-2	79
FIGURA 4.34 - Espectro de absorção na região do UV-Vis do GGH-1 obtido em água.	81

- FIGURA 4.35 - Comparação dos espectros de absorção na região do UV-Vis do GGH com o $[Ag(GGH)]BF_4$, dando ênfase para região próxima a 400 nm, onde têm-se o aparecimento da banda TCML. 82
- FIGURA 4.36 - Espectro de absorção na região do UV-Vis do **GGH-2**. 82
- FIGURA 4.37 - Espectro de absorção na região do UV-Vis **GGH-3**. 83
- FIGURA 4.38 - Espectro de absorção na região do UV-Vis **GGH-4**. 83
- FIGURA 4.39 - Sobreposição dos espectros de RMN 1H , DMSO- d_6 (9,4T), do **GGH** em vermelho com o complexo **GGH-1** em azul, na qual pode-se visualizar os diferentes deslocamentos dos hidrogênios do GGH livre e quando é complexado. 84
- FIGURA 4.40 - Correlações no COSY do **GGH-1**. 85
- FIGURA 4.41 - Comparação do espectro de RMN 1H do **GGH-1** em DMSO- d_6 (9,4T), mostrado em azul, com o espectro do adquirido em DMSO- d_6 + D_2O , em preto, onde ocorreu a troca dos hidrogênios ácido por deutério, o que indica a diminuição dos sinais para esse hidrogênio. 85
- FIGURA 4.42 - Sobreposição dos espectros de RMN ^{13}C do GGH em vermelho, com o complexo em azul. Destacando os carbonos das posições C-6 e C-3', os quais tiverem maior deslocamento na formação do complexo. 86
- FIGURA 4.43 - Mapa de contorno HSQC do **GGH-1**, DMSO- d_6 (9,4T), destacando a correlação dos hidrogênios da posição 2H-3 ligados aos carbono C-3, o qual teve baixa intensidade do seu sinal no RMN ^{13}C , e a não visualização da correlação do H-5 com o C-5. 87
- FIGURA 4.44 - Espectro obtido em expansão de janela de ppm para o complexo **GGH-4**, DMSO- d_6 (9,4T), para verificar a presença de sinais fora da janela comum de aquisição. 88
- FIGURA 4.45 - Espectro MS do complexo **GGH-1**. 89

FIGURA 4.46 – Espectro de massas MS/MS do GGH-1 para visualização do padrão isotópicos nos fragmentos do íon positivo m/z 376.	90
FIGURA 4.47 – Proposta de fragmentação para a formação dos íons m/z 330 e 285 do GGH-1	91
FIGURA 4.48 – Proposta de fragmentação para a formação dos íons m/z 216 e 262 do GGH-1	92
FIGURA 4.49 – Espectro de massas MS do GGH-2	93
FIGURA 4.50 – Espectro de massas MS/MS do íon m/z 332.	94
FIGURA 4.51 - Propostas de fragmentações do GGH-2	95
FIGURA 4.52 – Espectro de massas MS do GGH-3	96
FIGURA 4.53 – Espectro de massas MS/MS do íon m/z 331.	97
FIGURA 4.54 – Proposta de fragmentação para a formação do íon m/z 301.....	98
FIGURA 4.55 – Propostas de fragmentações na formação dos íons m/z 286, 200 e 172.	99
FIGURA 4.56 – (A) Leitura do teste CIM, coloração azul indica que não ocorreu o crescimento bacteriano e a cor rósea indica o crescimento bacteriano. (B) Mecanismo simplificado da redução da resazurina(púrpura) em resorufina(rósea) no meio bacteriano	100
FIGURA 4.57 – Valores das menores concentrações que inibiram o crescimento bacteriano, as colunas de mesmas cores fazem referência ao sal de cobre usado na síntese de cada complexo	101
FIGURA 4.58 - Valores das menores concentrações que inibiram o crescimento bacteriano, as colunas de mesmas cores fazem referência ao sal de cobre usado na síntese de cada complexo	102

FIGURA 4.59 - Valores das menores concentrações que inibiram o crescimento bacteriano, as colunas de mesmas cores fazem referência ao sal de cobre usado na síntese de cada complexo 103

FIGURA 4.60 - Valores das menores concentrações que inibiram o crescimento bacteriano, as colunas de mesmas cores fazem referência ao sal de cobre usado na síntese de cada complexo 103

FIGURA 4.61 - Percentual dos metais de transição para os sais usados nas sínteses e complexos formados usando a plataforma ChemCalc, de Patiny, L. & Borel.⁵¹ 104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Distribuição de hectares no Brasil, atualizado em 18 de janeiro de 2019	2
TABELA 1.2- Doenças e Vetores que atacam os citros	3
TABELA 1.3 - Concentrações de metais na planta <i>Cyperus Rotunus</i> . Em (A) planta na área de mineração, (B) planta longe da área de mineração	9
TABELA 1.4 - Fármacos baseados em peptídeos	11
TABELA 3.1 - Isolados de <i>Xanthomonas citri subsp. citri</i>	31
TABELA 4.1 - Tentativa de atribuições das bandas do PGG na espectroscopia de IV.....	36
TABELA 4.2 - Análise Elementar	43
TABELA 4.3 - Susceptibilidade magnética dos complexos PGG-3 e PGG-4 ..	44
TABELA 4.4 - Tentativa de atribuição de algumas bandas observadas	46
TABELA 4.5 – Atribuição das transições do PGG e dos complexos, em água, com os respectivos valores de (ϵ) nos (λ).	48
TABELA 4.6 - Atribuição das transições do PGG e dos complexos, em DMSO, com os respectivos valores de (ϵ) com relação a (λ).....	50
Tabela 4.7 - Valores dos deslocamentos químicos dos prótons do PGG e dos complexos [Ag (PGG)], [Zn(PGG)]CH ₃ COO e [Cu(PGG)]NO ₃	53
TABELA 4.8 - Deslocamento químico dos carbonos do PGG e dos complexos	57
TABELA 4.9 – Dados de RMN de ¹³ C e HMBC para o PGG-1 :	58
TABELA 4.10 - Valores das massas teóricas e calculadas para os complexos [Metal(PGG)]	62

TABELA 4.11 - Informações sobre os deslocamentos dos carbonos e dos prótons	76
Tabela 4.12 - Correlações observadas no mapa de contorno HMBC do GGH ..	76
TABELA 4.13 - Análise Elementar dos complexos [Metal(GGH)] e valores de condutividade obtidos em água	77
TABELA 4.14 - Susceptibilidade magnética dos complexos GGH-3 e GGH-4	78
TABELA 4.15 - Tentativa de atribuição dos valores dos números de ondas dos principais grupos do ligante GGH e dos complexos [Metal(GGH)]	80
TABELA 4.16 - Valores das massas teóricas e calculadas para os complexos [Metal(GGH)].....	88

RESUMO

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE COBRE (II), PRATA (I) E ZINCO (II) COM LIGANTES TRIPEPTÍDEOS: AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE EM *XANTHOMONAS CITRI SUBSP. CITRI*. Na busca por novas substâncias ativas frente a fitopatógenos foram sintetizados e caracterizados complexos metálicos com o tripeptídeo L-Fenilalanina-Glicil-Glicina (PGG), com fórmula geral [Metal(PGG)]contra-íon, (**PGG-1**, **PGG-2**, **PGG-3** e **PGG-4**), e com o tripeptídeo Glicina-Glicil-L-Histidina (GGH), de fórmula geral [Metal(GGH)], (**GGH-1**, **GGH-2**, **GGH-3** e **GGH-4**). Estes complexos foram caracterizados por Análise Elementar (C, H e N), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, unidimensional e bidimensional, espectrometria de massas de alta resolução e espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível. Os complexos **PGG-1**, **PGG-2**, **PGG-3** e **PGG-4**, em água, apresentaram transições $n-\pi^*$, o **PGG-3** e **PGG-4** mostraram transições $d-d$. Os complexos **GGH-1** e **GGH-2** apresentaram transições $n-\pi^*$, os complexos **GGH-3** e **GGH-4** exibiram bandas de transferência de carga (TCML) e transição $d-d$. As diferenças encontradas nas bandas dos espectros de absorção na região do infravermelho (ligante e complexo) foram um número menor de bandas, inferido a rigidez causada pela formação dos quelatos. Os complexos de cobre(II) foram caracterizados por susceptibilidade magnética, os quais são mononucleares. Os complexos foram testados em bactérias causadoras do cancro cítrico, os quais tiveram atividades bacteriostática, avaliada pela técnica de microdiluição seriada, na qual obteve-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM), houve a inibição do crescimento da *Xanthomonas citri subsp. citri* em concentração menor em alguns dos complexos (**PGG-1**, **GGH-1** e **PGG-3**) comparados aos sais usados na síntese. Os tripeptídeos usados não possuem atividade bacteriostática, relacionou-se a atividade de inibição do crescimento das bactérias aos complexos sintetizados.

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF Cu (II), Ag (I) AND Zn (II) COMPLEXES WITH TRIPEPTIDE LIGANDS: ACTIVITY EVALUATION IN *XANTHOMONAS CITRI SUBSP. CITRI*. In the search for new active substances against phytopathogens, were synthesized and characterized metal complexes with tripeptide L-Phenylalanine-Glycyl-Glycine (PGG), with general formula [Metal (PGG)]counterion, (**PGG-1**, **PGG-2**, **PGG-3** and **PGG-4**), and the tripeptide Glycine-Glycyl-L-Histidine (GGH) of general formula [Metal (GGH)] (**GGH-1**, **GGH-2**, **GGH-3** and **GGH-4**). These complexes were characterized by Elemental Analysis (C, H and N), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) of ^1H , ^{13}C $\{^1\text{H}\}$, one-dimensional and two-dimensional, high resolution mass spectrometry, absorption spectroscopy in ultraviolet-visible. The complexes **PGG-1**, **PGG-2**, **PGG-3** and **PGG-4**, in water showed transitions $n-\pi^*$, **PGG-3** and **PGG-4** exhibited $d-d$ transitions. The **GGH-1** and **GGH-2** presented $n-\pi^*$ transitions, the complex **GGH-3** and **GGH-4** exhibited charge transfer bands (MLCT) and $d-d$ transition. The differences found in the absorption spectrum bands in the infrared region (ligand and complex) were a smaller number of bands, inferring the rigidity caused by chelate formation. The copper (II) complexes were characterized by magnetic susceptibility, which are mononuclear. The complexes were tested on bacteria causing citrus canker, which had bacteriostatic activities, evaluated by technique serial microdilution, in which we obtained the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), there was inhibited the growth of *Xanthomonas citri subsp. citri*, in lower concentration in some of the complexes (**PGG-1**, **GGH-1** e **PGG-3**) compared to the salts used in the synthesis. The tripeptides used did not have bacteriostatic activity, related to the inhibition activity of bacterial growth to the synthesized complexes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	AGRONEGÓCIO BRASILEIRO E CITRICULTURA	1
1.2	PRAGAS AGRÍCOLAS E DOENÇAS EM CITROS.....	3
1.3	<i>XANTHOMONAS CITRI SUBSP. CITRI</i>	4
1.4	CANCRO CÍTRICO.....	5
1.5	BUSCA POR SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE BIOLÓGICA	7
1.6	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	10
1.7	TRIPLEPTÍDEOS, FENILALANINA-GLICIL-GLICINA E GLICINA-GLICIL-HISTIDINA, NA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS METÁLICOS	12
1.8	PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO COBRE	13
1.9	PROPRIEDADES QUÍMICA E BIOLÓGICAS DA PRATA	15
1.10	PROPRIEDADES QUÍMICA E BIOLÓGICAS DO ZINCO.....	16
2	OBJETIVO GERAL	18
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	19
3.1	SOLVENTES	19
3.2	ATMOSFERA INERTE.....	19
3.3	REAGENTES	19
3.4	BALANÇA ANALÍTICA	20
3.5	SÍNTESE DOS COMPLEXOS [METAL(PEPTÍDEO)].....	20
3.5.1	Síntese do complexo [Cu(PGG)]NO ₃	20
3.5.2	Síntese do complexo [Cu(PGG)]BF ₄	22
3.5.3	Síntese do complexo [Zn(PGG)]CH ₃ COO	22

3.5.4	Síntese do complexo [Ag(PGG)]	23
3.6	SÍNTESE COM O GGH	24
3.6.1	Síntese do complexo [Cu(GGH)](NO ₃) ₂	24
3.6.2	Síntese do complexo [Cu(GGH)](BF ₄) ₂	25
3.6.3	Síntese do complexo [Zn(GGH)](CH ₃ COO) ₂	26
3.6.4	Síntese do complexo [Ag(GGH)]BF ₄	26
3.7	ANÁLISE ELEMENTAR.....	27
3.8	CONDUTIVIDADE MOLAR	27
3.9	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	28
3.10	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL	28
3.11	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	29
3.12	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	29
3.13	SUSCEPTIBILIDADE MAGNÉTICA.....	29
3.14	TESTE BIOLÓGICO	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	LIGANTE PGG E SEUS COMPLEXOS	34
4.1.1	Caracterização por espectroscopia de absorção na região do infravermelho	34
4.1.2	Caracterização por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível.....	36
4.1.3	Caracterização do PGG por RMN	38

4.2	COMPLEXOS [Metal(PGG)]	42
4.2.1	Susceptibilidade magnética.....	43
4.2.2	Caracterização por espectroscopia no infravermelho	44
4.2.3	Caracterização por UV-Vis.....	46
4.2.4	Caracterização do [Metal(PGG)] por RMN.....	50
4.2.5	Caracterização por espectrometria de massas.....	61
4.3	CARACTERIZAÇÃO GGH.....	71
4.3.1	Caracterização por infravermelho.....	71
4.3.2	Caracterização por UV-Vis.....	72
4.3.3	Caracterização por RMN	73
4.4	Caracterização [Metal(GGH)].....	77
4.4.1	Caracterização por infravermelho.....	78
4.4.2	Caracterização por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta ao visível	80
4.4.3	Caracterização por RMN	83
4.4.4	Caracterização por Espectrometria de Massas.....	88
4.5	TESTE BIOLÓGICO	100
5	CONCLUSÃO	105
6	REFERÊNCIA	106
	APÊNDICE	110

1 INTRODUÇÃO

Esta dissertação foi desenvolvida na expectativa de que tripeptídeos quando complexados a metais de transição, podem ser usados no combate de fitopatógenos. Para uma melhor compreensão dos passos que levaram ao desenvolvimento desta pesquisa, é apresentado um referencial teórico abordando a importância do agronegócio brasileiro, dando destaque a citricultura, danos causados por pragas agrícolas, dentre estas, é enfatizado o cancro cítrico e a busca por moléculas com atividade biológica frente a *Xanthomonas citri subsp. citri*. Este último tópico baseado em fitoquelatinas e os centros metálicos cobre(II), prata(I) e zinco(II).

1.1 AGRONEGÓCIO BRASILEIRO E CITRICULTURA

O agronegócio brasileiro é um dos responsáveis pela manutenção da economia do país, mantendo aproximadamente 22% do Produto Interno Bruto (PIB), no qual a cada três empregos, um vem do agronegócio.¹ O faturamento dentro da propriedade rural na safra de 2018 foi de R\$ 569,9 bilhões, mais da metade desse valor advindo da agricultura, R\$ 383,9 bilhões.

A agricultura e pecuária, juntas, dispõem atualmente de 28,7% do território nacional. No qual 18,6% é utilizado para pastagens, e 10,1% é utilizado principalmente em culturas como café, soja, cana-de-açúcar, citros, etc. A Tabela 1.1, exhibe as principais atividades econômicas subdivididas por hectares no Brasil, o qual é um dos principais produtores agrícolas no mundo.²

Atualmente, na agricultura brasileira, o cultivo de grãos, como a soja, milho e café, é responsável por aproximadamente 7,30% da distribuição territorial, e pode ser considerado a principal produção que movimenta a economia da agricultura brasileira.³ Embora a produção de citros ocupe a quinta

posição no ranking,⁴ atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de laranja, responsável por 34% da produção e 56 % da exportação.⁵

TABELA 1.1 - Distribuição de hectares no Brasil, atualizado em 18 de janeiro de 2019.

Distribuição Territorial (2018)	Milhões de hectares	%
Agropecuária em produção	244,5	28,70%
Grãos	62,5	7,30%
Pecuária (Pastagens)	158,6	18,60%
Florestas Plantadas com Essências Florestais	8,5	1%
Cana de Açúcar	8,6	1%
Banana, Café, Mandioca, Cacao, Citrus, demais permanentes	6,3	0,70%
Áreas protegidas pela legislação	548	64,40%
Unidades de Conservação	133	15,60%
Terras Indígenas	121	14,20%
Áreas de Reserva Legal e Preservação Permanente	268	31,50%
Cidades, estradas e hidroelétricas	26	3,10%
Áreas disponíveis para a agropecuária	56,6	6,70%
Outros	1,9	0,20%
Área territorial brasileira	851	100%

Fonte: IBGE, EMBRAPA, CONAB. Elaboração AGE/ Mapa.

A citricultura movimentou, em 2017, um PIB de US\$ 6,5 bilhões, e uma contribuição de mais de 45.000 novos empregos no interior paulista.⁵ Essa alta produção tem extrema importância (econômica e social), entretanto fatores como a variação climática e principalmente o surgimento de doenças e pragas agrícolas são responsáveis por acometer os pomares, resultando em perdas de bilhões de R\$ em toda produção agrícola.⁶ Nesse sentido, estudo de doenças e pragas agrícolas que atacam pomares possuem importância e devem ser explorados.

1.2 PRAGAS AGRÍCOLAS E DOENÇAS EM CITROS

A capacidade de insetos, plantas invasoras, fungos, bactérias, vírus, etc., de invadirem plantações e/ou organismos, gera perdas significativas,⁷ cerca de 7,7 % da agricultura brasileira é perdido todos os anos.⁸

Na citricultura, uma diversidade de patógenos são responsáveis por perdas na produção, Tabela 1.2. A Federação paulista já sofreu grandes problemas em sua história, o primeiro foi em 1940, quando aproximadamente 82% de laranjeiras foram erradicadas por uma doença conhecida como tristeza dos citros, causada pelo *Citrus tristeza vírus* (CTV). Em 1987, quando o Estado de São Paulo já detinha o título de maior produtor do mundo, a clorose variegada dos citros (CVC), conhecida como “amarelinho”, levou à uma perda de 100 milhões de laranjeiras,⁹ quando essa doença chegou ao seu nível de contaminação máxima, ocasionou um prejuízo de 1 bilhão de reais aos cofres da cadeia citrícola.⁹

TABELA 1.2- Doenças e Vetores que atacam os citros.

Doença	Causador/vetor	Agente
Cancro Cítrico	<i>Xanthomonas citri subsp. citri</i> ,	Bactéria
CVC	<i>Xylella fastidiosa</i>	Bactéria
Greening	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	Bactéria
	Vetor: <i>Diaphorina citri</i>	Psílideo
Leprose	<i>Citrus leprosis vírus (CiLV)</i>	Vírus
	Vetor: <i>Brevipalpus phoenicis</i>	Ácaro
Morte Súbita	Não tem causa confirmada	Vírus
Mancha preta	<i>Phyllosticta citricarpa</i> (<i>Guignardia citricarpa</i>)	Fungo

Fonte: Fundecitrus.

Na década atual, mais de 40 milhões de laranjeiras foram erradicadas, ocorrendo um aumento na mortalidade de 4% para 7,5%, acarretando na perda de R\$ 80 milhões de reais por ano.¹⁰ Dentre os principais fitopatógenos causadoras

de perdas na citricultura, a bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri*, está presente nos pomares brasileiros desde 1957, e ataca uma ampla variedade de citros (laranja doce, tangerinas, limões e limas ácidas).¹¹

1.3 *XANTHOMONAS CITRI SUBSP. CITRI*

O gênero *Xanthomonas* provoca doenças em outras culturas economicamente importantes (arroz, feijão, algodão, cana-de-açúcar, tomate, repolho e pimenta)¹², aparecendo, inicialmente, como pigmentos amarelos nas folhas, por isso a origem de seu nome, do grego, *xanthos*, que significa “amarelo”, e *monas* significa “entidade”.¹² As plantas atacadas por bactérias desse gênero podem apresentar necrose, as folhas murcham, caem prematuramente e em casos mais agravantes observa-se apodrecimento da planta, Figura 1.1.

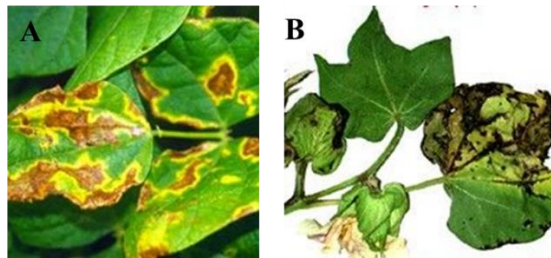


FIGURA 1.1 - Manifestação do ataque de bactérias do gênero *Xanthomonas* em plantas: (A) feijão e (B) algodoeiro. Fonte: (www.agrolink.com.br).

A *Xanthomonas citri subsp. citri* é uma bactéria Gram-negativa, que afeta todas as variedades cítricas comerciais, possui uma especificidade para o tecido da planta, invadindo o sistema vascular, principalmente o xilema,¹² Figura 1.2. O controle dessa bactéria é baseado em sprays contendo cobre,¹³ o uso desordenado de sais de cobre provocou o aparecimento de bactérias resistentes a este metal, apesar do conhecimento dessa resistência, o cobre ainda é utilizado na forma de hidróxido de cobre, oxicloreto de cobre e óxido cuproso, os quais são

pulverizados no pomar, na prevenção da doença em plantas jovens,¹⁴ pois esses sais são insolúveis em água, permanecendo por mais tempo sobre o tecido vegetal.

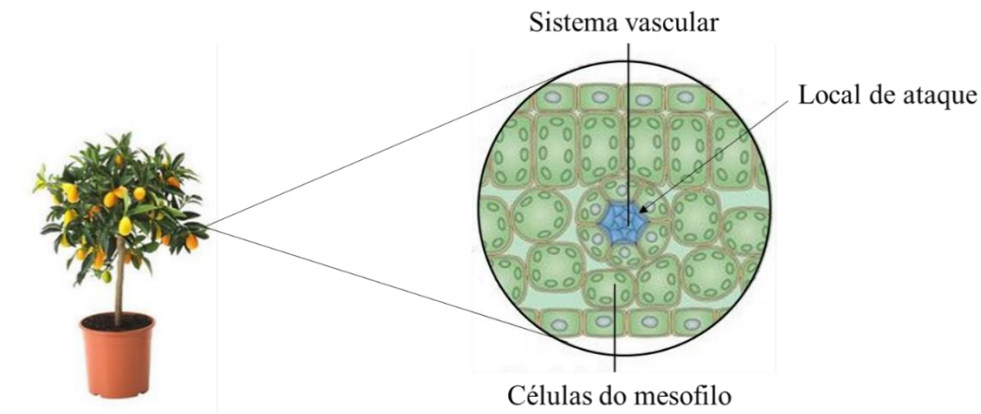


FIGURA 1.2 – Ampliação ilustrativa do tecido vegetal para a visualização do sistema vascular simplificado, local de invasão da *Xanthomonas citri subsp. citri*. Figura retirada e adaptada de Nature Reviews Microbiology, v 9, p 344–355 (2011).¹²

1.4 CANCRO CÍTRICO

O cancro cítrico tem origem na Ásia, onde é considerada uma epidemia para os produtores, ocasiona desfolhação, pigmentação amarela nas folhas e lesões nos frutos e a queda prematura dos mesmos,¹⁴ Figura 1.3.

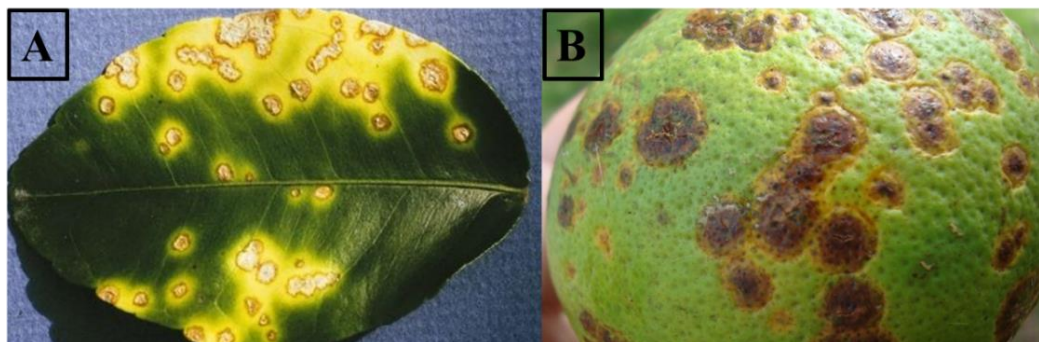


FIGURA 1.3 - Representação dos danos causados pelo cancro cítrico nas folhas na manifestação de pigmentos amarelos (A) e as lesões causadas nos frutos (B). Figuras retiradas e adaptadas da agrolink (A) (www.agrolink.com.br) e SNA/Reprodução (B) (www.sna.agr.br).

Toda a produção de citros é suscetível ao cancro cítrico, e conhecer o ciclo desta doença, auxilia nas medidas a serem tomadas pelo agricultor. Essa patogenicidade é dividida em quatro fases: **Disseminação**, ocorrendo o contágio da doença; **Infecção**, penetração no sistema vascular; **Colonização**, aparecimento dos primeiros sintomas e **Sobrevivência**, permanência da bactéria em lesões.¹⁴

A contaminação, geralmente, é iniciada em árvores nas bordas dos talhões, e através de ações humanas, ventos, chuvas, etc., a bactéria é transmitida para grupamentos de árvores próximas, conforme a Figura 1.4. Essa propagação se inicia lentamente e caso não seja detectada, pode ocorrer uma contaminação desenfreada,¹¹ levando a perda do pomar.

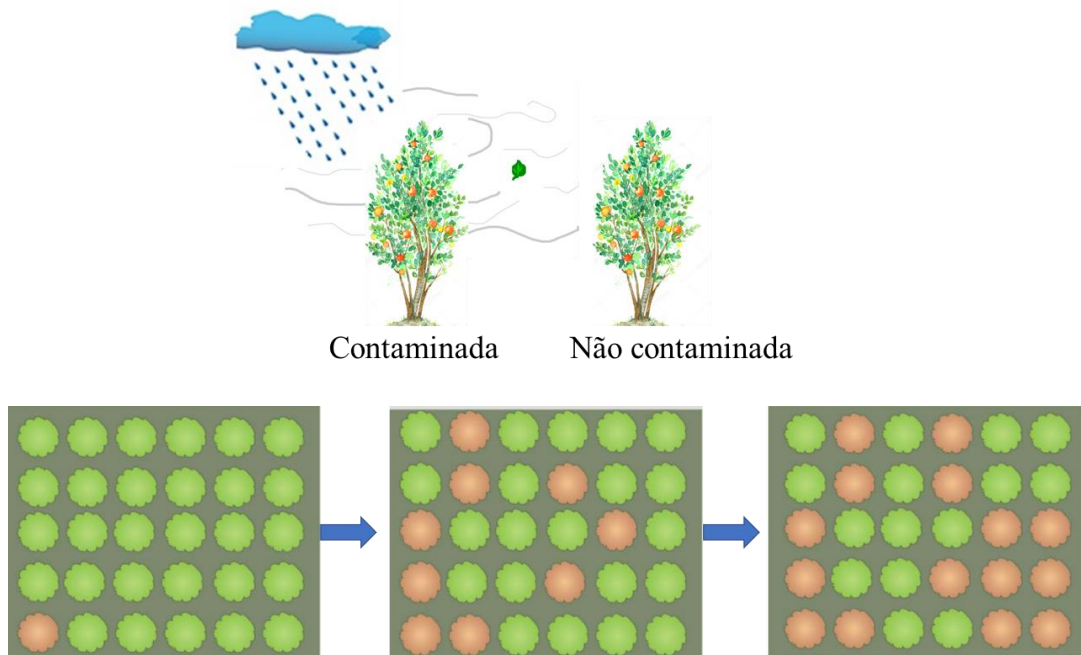


FIGURA 1.4 - A transmissão do cancro cítrico de uma árvore contaminada para uma não contaminada por ações da natureza, iniciando em uma única árvore e rapidamente contagiando grande parte do pomar. Figura retirada e adaptada do manual técnico de maio de 2008 da FUNDECITRUS.¹¹

O levantamento feito pela FUNDECITRUS em 2018, revelou que o cancro cítrico está presente em 16,4% dos talhões pertencentes ao Estado de São

Paulo e do Triângulo/Sudoeste Mineiro, revelando que 11,7% das árvores continham cancro cítrico.¹⁵ Apesar do avanço tecnológico, ainda não há um método de cura para as plantas contaminadas com essa doença.¹⁶

A profilaxia gerada pelo uso de cobre fixo (insolúvel em água) não ajuda na descontaminação de plantas que contém o patógeno, as quais são retiradas dos talhões. Para essa alternativa, há grande necessidade na busca por moléculas (orgânicas e/ou inorgânicas), com atividade inibitória de fitopatógenos, solúveis em água e que possam ser absorvidas pelas plantas, auxiliando no controle do cancro cítrico e outras doenças agrícolas.

1.5 BUSCA POR SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os estudos para a identificação de substâncias bioativas podem ser embasados na observação da natureza, como por exemplo, a inibição de uma planta por outra, onde o pesquisador tem um direcionamento em buscar a molécula responsável pela ação herbicida. Por outro lado, moléculas isoladas em estudos fitoquímicos, podem ser testadas em patógenos e predadores não naturais da planta em estudo, para inferir a atividade biológica da molécula na comprovação de hipóteses ou embasar cientificamente um conhecimento etnobotânico, fazendo com que a química de produtos naturais (PN) desempenhe um papel importante na descoberta de novos medicamentos e agroquímicos,¹⁷ ou servindo de inspiração para o desenvolvimento sintético de novas moléculas com potencial biológico, como por exemplo, os piretróides.

Os piretróides, Figura 1.5(C), são substâncias que tiveram sua origem nos estudos sobre as piretrinas, um produto natural que tem seu uso datado em 400 a.C, quando o extrato da planta conhecida como piretro, *Chrysanthemum cinerariaefolium* Figura 1.5(A), era usado no combate de piolhos.¹⁸ Do piretro foram isoladas as piretrinas, Figura 1.5(B), as quais foram testadas como

praguicidas, mas a instabilidade dessas moléculas em condições ambientes, inviabilizavam seu uso como agroquímico. Modificações sintéticas foram desenvolvidas e deram origem aos piretróides,¹⁹ os quais são estáveis em condições ambientes e são usados na agricultura até os dias atuais.

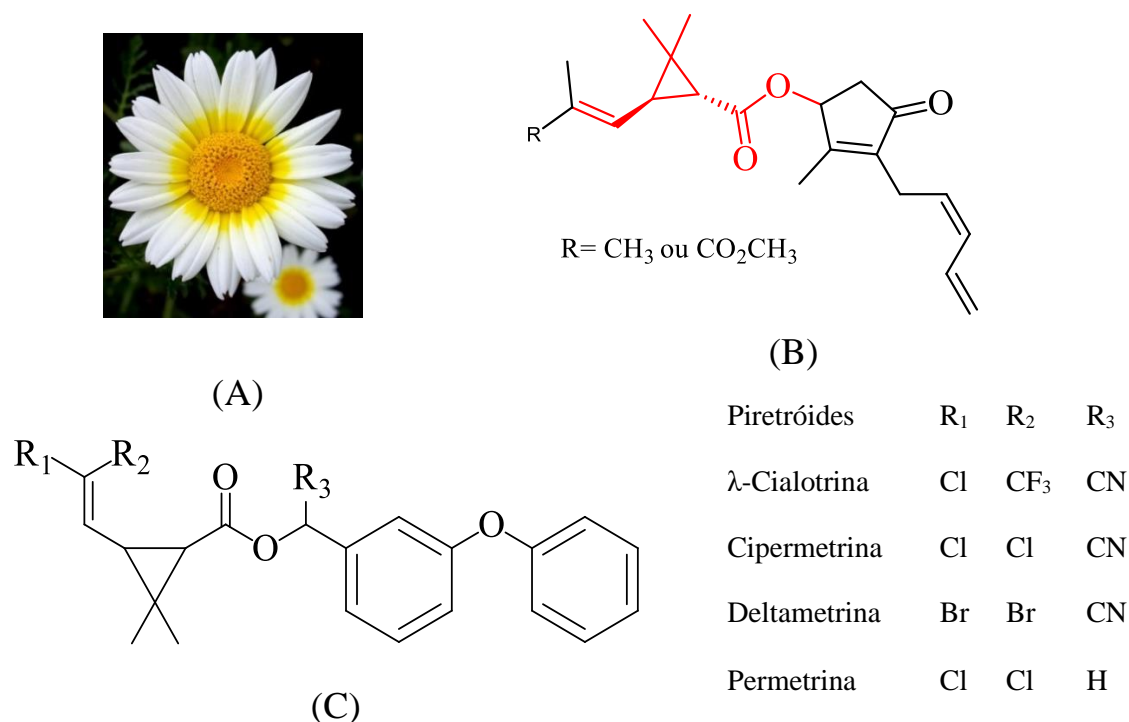


FIGURA 1.5 - *Chrysanthemum cinerariaefolium* em (A), piretrina em (B), destacando o esqueleto básico da piretrina em vermelho, que não sofre modificações, piretróides em (C).

A natureza, desde os primórdios é a principal geradora de conhecimento, fornecendo modelos moleculares que geram pesquisas buscando a relação de atividade e estrutura,²⁰ como citado anteriormente com os piretróides. Desse modo, uma pesquisa desenvolvida pelo grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (PN-UFSCar), sobre o estudo fitoquímico da planta *Cyperus Rotunus*, usada na fitorremediação na área da Mina do Sossego, localizada na região de Carajás -PA, pertencente a empresa Vale S. A, mostrou que essa planta quela metais na rizosfera usando fitoquelatinas (pequenos peptídeos) e transloca esses complexos para as partes aéreas,²¹ caracterizando-se

como hiperacomuladora. A tabela 1.3 mostra onde têm-se uma maior concentração de metais nas plantas da região de mineração (A), em comparação com a mesma espécie coletada em outra localidade longe da mineração (B).

TABELA 1.3 - Concentrações de metais na planta *Cyperus Rotunus*. Em (A) planta na área de mineração, (B) planta longe da área de mineração

Concentração	Rizoma (A)	Rizoma (B)	Parte aérea (A)	Parte aérea (B)
Al (mg/g)	3,6 ± 0,2	4,7 ± 0,1	5,7 ± 0,6	0,54 ± 0,05
Fe (mg/g)	2,97 ± 0,07	2,08 ± 0,03	6,4 ± 0,6	0,60 ± 0,01
Cr (mg/Kg)	112 ± 1	58 ± 3	24 ± 4	< 0,3
Cu (mg/Kg)	138 ± 2	11 ± 1	921 ± 69	3,7 ± 0,1
Zn (mg/Kg)	24 ± 1	17 ± 7	45 ± 1	11 ± 1

Fonte: SOUSA, P. P., Dissertação de mestrado, UFSCar, 2016.²¹

Os estudos sobre plantas hiperacumuladores de metais são voltados na comprovação de danos causados pelo metal na espécie, entretanto, um outro questionamento pode ser feito: Pequenos peptídeos quando quelados a metais, podem ser ativos contra fitopatógenos?

Os estudos voltados principalmente à química inorgânica, mostram que a formação de complexos metálicos com produtos naturais/sintéticos, exibem atividades biológicas.²² Nesse sentido, há possibilidade de que os tripeptídeos quando quelados a metais possam ser candidatos promissores contra fitopatógenos. Esse modelo de complexo peptídeo-metal, baseado na planta *Cyperus Rotunus*, é um objeto de estudo interessante na busca por moléculas bioativas, de modo a entender a relação estrutura dos tripeptídeos quelados a metais com sua atividade biológica, pois além da atividade dos complexos metálicos, tem-se o conhecimento de que muitos peptídeos têm atividade antimicrobiana, chamados de Peptídeos Antimicrobianos (PAMs) e peptídeos bioativos usados na formulação de fármacos.

1.6 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) foram reconhecidos como uma importante estratégia de defesa contra invasores, tendo uma ação defensiva imediata nos mais variados microrganismos,^{23, 24} em casos de resistência a antibióticos, os PAMs são considerados uma ótima alternativa.²⁵ Devido a essa ampla atividade, no ano de 2008 ocorreu o primeiro “International Meeting on Antimicrobial Peptides” (IMAP), para discutir alguns questionamentos como: estrutura, função e projeto de PAMs, aplicações terapêuticas de PAMs, biomateriais e polímeros peptídicos, teste de suscetibilidade de PAMs.²⁶

Os PAMs são formados, tipicamente, de 10-50 resíduos de aminoácidos,²⁷ e são encontrados nos mais diversos organismos, o ser humano, por exemplo, contém 133 PAMs.²⁸ O número atualizado de peptídeos antimicrobianos encontrados até o momento é de 3098 peptídeos,²⁸ segundo a base de dados do “Department of Pathology & Microbiology” da “University of Nebraska Medical Center” no endereço (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>).

Os estudos sobre peptídeos possibilitaram desenvolvimentos de muitos fármacos, alguns apresentados na Tabela 1.4. Porém, quando se trata de tripeptídeos, apesar da variedade dessas moléculas, com diferentes estruturas e diferentes funções biológicas, poucos estudos visando a atividade contra patógenos e modificações estruturais com a mesma finalidade estão disponíveis na literatura.

TABELA 1.4 - Fármacos baseados em peptídeos

Medicamento	Resíduos de aminoácidos	Doença alvo	Ano de registro
Captopril (Capoten)	3	Hipertensão	1982
Tirofiban (Aggrastat)	3	Anticoagulante	1998
Epifibatide (Integrilin)	7	Síndrome coronariana aguda e angina instável	1998
Bivalirudinrub (Angiomax)	20	angina instável	2000
Ziconotide (Prialt)	26	Dor neuropática	2004
Exenatide (Byetta)	39	Diabetes tipo 2	2005

Fonte: Chem Biol Drug Des, v. 81, p 136–147, 2013.

Pode ser citado o complexo formado pelo tripeptídeo Glicina-Histidina-Lisina (GHK) coordenado ao centro metálico Cu^{2+} (Cu-GHK), Figura 1.6, o qual foi o primeiro relato de um tripeptídeos quelado ao centro metálico de cobre no estado de oxidação 2+ com uma variada ação biológica. Esse complexo foi isolado naturalmente do plasma sanguíneo humano em 1973, para tal é atribuído principalmente a função protetora e regenerativa da pele humana.²⁹

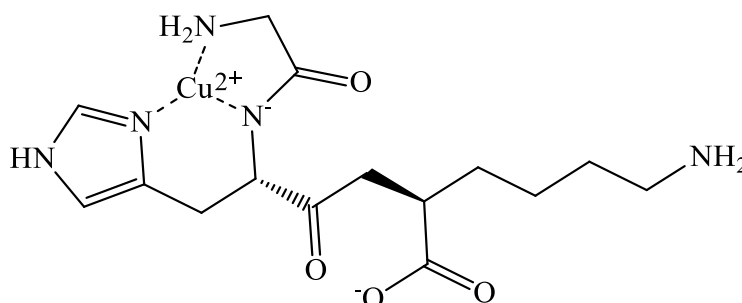


FIGURA 1.6 - Complexo Cu-GHK isolado do plasma sanguíneo.

1.7 TRIPEPTÍDEOS, FENILALANINA-GLICIL-GLICINA E GLICINA-GLICIL-HISTIDINA, NA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS METÁLICOS

Os tripeptídeos são biomoléculas formadas por três resíduos de aminoácidos mediante duas ligações peptídicas, por uma reação de condensação de um grupo amino com um ácido carboxílico. De modo geral, uma cadeia peptídica aberta possui duas terminações, a *N*-terminal, quando em uma das extremidades o grupo amino está ligado ao carbono na posição alfa-carboxila, e *C*-terminal, extremidade que contém o ácido carboxílico.

Por definição, uma cadeia peptídica é iniciada da extremidade contendo o grupo amino, assim, na Figura 1.7 é apresentada a estrutura do tripeptídeo L-Fenilalanina-Glicil-Glicina (PGG) destacando os pontos de coordenação (propostos nesta pesquisa para a formação dos complexos metálicos com esse ligante), as extremidades *N* e *C*-terminal e as ligações peptídicas, mostrando o anel aromático com uma numeração sistêmica.³⁰

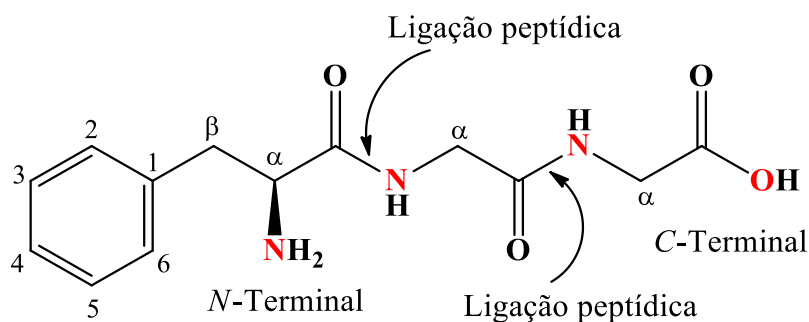


FIGURA 1.7 - Estrutura do tripeptídeo PGG, demonstrando suas extremidades e os pontos de coordenação propostos nesta pesquisa estão destacados em vermelho.

O GGH, possui um resíduo de aminoácido L-histidina, seguindo as recomendações da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)

e JCBN (Joint Commission on Biochemical Nomenclature),³⁰ para que não haja erro na nomenclatura, os nitrogênios do anel imidazol são chamados de π (próximo a cadeia lateral do imidazol) e τ (longe da cadeia lateral do imidazol), como demonstrado na Figura 1.8.

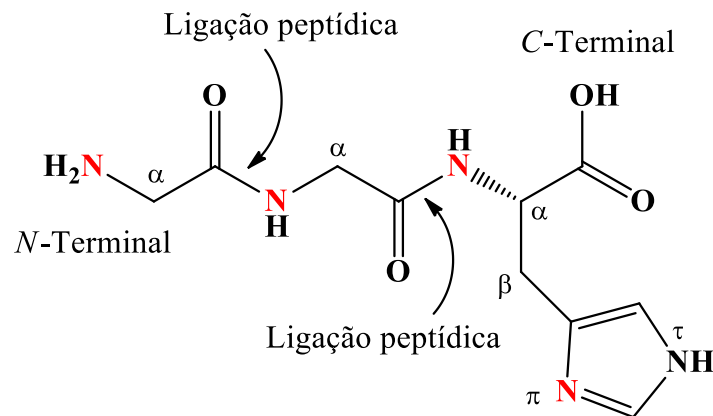


FIGURA 1.8 - Estrutura do tripeptídeo GGH, demonstrando suas extremidades, ligações peptídicas, os pontos de coordenação propostos para os complexos sintetizados nessa pesquisa (em vermelho) para esse ligante e a nomenclatura usada para o aminoácido do resíduo L-histidina.

Ambos os peptídeos, PGG e GGH, possuem mais de um ponto de coordenação em sua estrutura, similares as fitoquelatinas, proporcionando a formação de quelatos com os metais Cobre(II), Prata(I) e Zn(II). A formação de quelatos são promissores antibacterianos ou com outras atividade biológicas.³¹

1.8 PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO COBRE

O cobre (Cu) é o elemento 29 da tabela periódica, pertencente ao grupo 11, fazendo parte da primeira série de transição. É um dos metais mais abundantes na Terra, a crosta terrestre é constituída de 0,0068% do elemento cobre, o qual possui importância para a metalúrgica, eletrônica e principalmente em sistemas biológicos, essencial para o desenvolvimento e manutenção da vida, denominado como um elemento-traço, pois está presente em baixa concentração,

mas desempenha funções essenciais, como por exemplo, na superóxido dismutase (SOD), convertendo ânions superóxidos em peróxido de hidrogênio, preservando o meio intracelular.^{32, 33, 34} Apesar de possuir outros estados de oxidação, sua química está governada pelos compostos de Cu(I) e Cu(II).

No estado de oxidação 1+, o cobre é uma espécie diamagnética (íon d^{10}), seus complexos são, geralmente, incolores, mas podem apresentar cores por fatores como natureza do ligante e bandas de transferência de carga. Adota, comumente, as geometrias lineares, trigonal e tetraédrica, com os respectivos números de coordenação II, III e IV.

No estado 2+, é um íon paramagnético (d^9) e seus complexos apresentam coloração azul ou verde, devido a transição $d-d$ por absorção na região de 600 nm a 900 nm, pode apresentar outras cores devido aos mesmos fatores mencionados para o cobre(I). Considerando o(s) ligante(s) e o número de coordenação, complexos de cobre(II) podem assumir geometrias variadas.³⁵ Na Figura 1.9, é demonstrado algumas das geometrias encontradas em complexos de cobre (II).

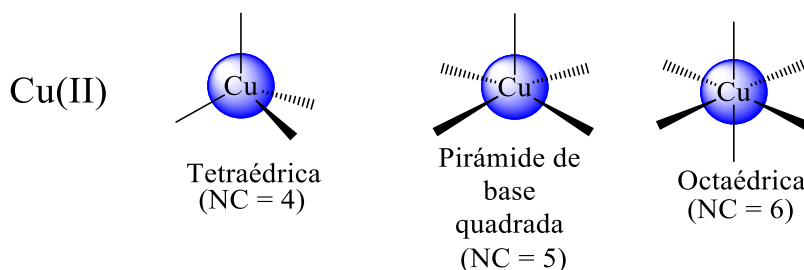


FIGURA 1.9 - Algumas possíveis geometrias para complexos de Cu(II).

O cobre possui ação farmacológica, seus complexos dispõem de potenciais atividades antimicrobianas, antifúngicas, antivirais, etc.³⁶ Na agricultura, é utilizado frequentemente como calda bordalesa, mistura de cal e sulfato de cobre, um defensivo químico ministrado em culturas diversas, como: banana, uva, manga, figo, jabuticaba, goiaba, laranja, abacate, maçã, etc.³⁷

1.9 PROPRIEDADES QUÍMICA E BIOLÓGICAS DA PRATA

A prata (Ag) tem número atômico 47, faz parte do grupo 11 da tabela periódica, juntamente com o cobre e o ouro. Integra a segunda série de transição e possui três estados de oxidação, Ag(I), Ag(II) e Ag(III), estes últimos são bastantes raros e instáveis,³⁸ seu único estado estável é o Ag(I), o qual é facilmente reduzido a prata metálica Ag(0) em condições normais de luz. Este metal, juntamente com o ouro (Au) e o cobre (Cu), é usado pela humanidade a mais de 7500 anos.³⁸

O íon de Ag^+ atua como um ácido de Lewis mole com um elevado poder polarizador, e apresenta uma forte tendência para a formação de complexos com ligantes com átomos doadores como C, N, P, As, O e S.³⁹ Possui uma esfera de coordenação muito flexível (números de coordenação de 2 até 6), capaz de assumir diferentes geometrias como mostra a Figura 1.10.

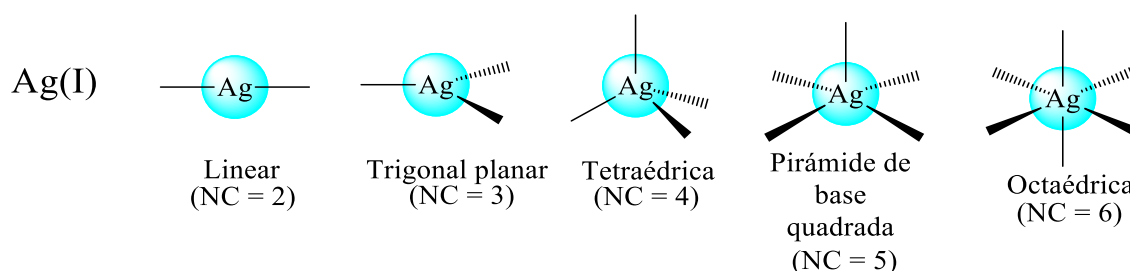


FIGURA 1.10 - Geometrias adotadas pelos complexos de prata.

Os íons Ag^+ estão sendo cada vez mais estudados, devido ser um agente antimicrobiano,⁴⁰ como exemplos, o nitrato de prata 1% usado em colírios na profilaxia da oftalmia neonatal, e a sulfadiazina de prata, Figura 1.11, usada para evitar a proliferação de microrganismos oportunistas em ferimentos na pele. Apesar da prata não ser um metal essencial, estes medicamentos não apresentam efeitos colaterais nas doses usadas nos medicamentos citados.^{41, 40}

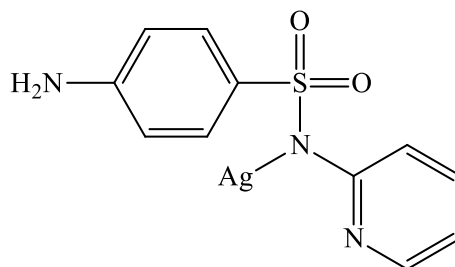


FIGURA 1.11 – Estrutura química da sulfadiazina de prata.

1.10 PROPRIEDADES QUÍMICA E BIOLÓGICAS DO ZINCO

O zinco possui número atômico 30, localizado no grupo 12 da tabela periódica, juntamente com o cádmio e o mercúrio, faz parte da primeira série dos metais de transição. Sua química é governada por sua forma iônica Zn^{2+} , possui configuração $[Ar]3d^{10}$, com um raio comparável ao do Mg^{2+} , porém um ácido de Lewis semelhante ao íon $Cu(II)$.⁴²

O Zn^{2+} forma complexos com ligantes doadores de elétrons (oxigênio, nitrogênio, enxofre e haletos). Em sua maioria, os complexos de zinco adotam a geometria tetraédrica⁴³, podendo ser encontrados estruturas octaédricas, Figura 1.12.

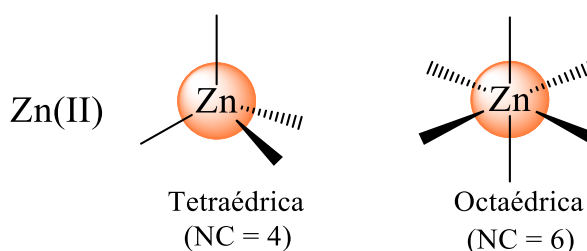


FIGURA 1.12 – Geometrias adotados pelos complexos de zinco.

Em sistemas biológicos, o zinco faz parte de metaloenzimas e metaloproteínas, considerado um elemento essencial, vital para a saúde humana e metabolismo.⁴⁴ Na agricultura, o zinco é utilizado no fungicida Ziram em hortaliças, no controle da pinta preta no tomateiro e na batata desde 1940, no

controle de verrugose e melenose em laranja pêra.⁴⁵ Sua estrutura é demonstrada na Figura 1.13.

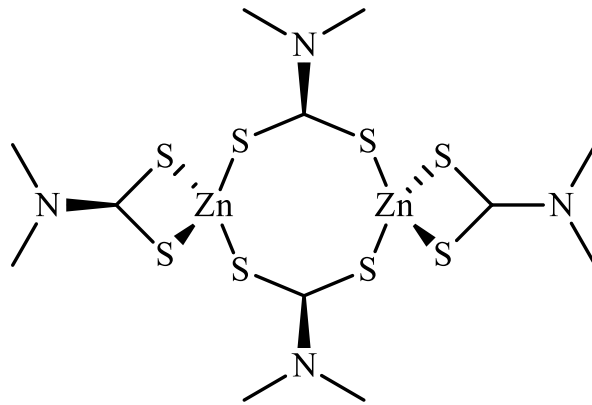


FIGURA 1.13 - Estrutura química do produto comercial Ziram.

2 OBJETIVO GERAL

- Síntese e caracterização de complexos de Cobre (II), Zinco (II) e Prata (I), com os ligantes tripeptídeos (PGG e GGH), de modo similar aos quelatos formados por fitoquelatina, com avaliação da atividade bacteriostática e bactericida em *Xanthomonas citri subsp. citri*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese dos complexos [metal(peptídeo)], (metal = Cu(II), Ag(I) e Zn(II)) e (peptídeo = PGG e GGH);
- Análise elementar (C, H e N)
- Caracterização por Espectroscopia de absorção nas regiões do Infravermelho (IV) e Ultravioleta-Visível (Uv-Vis);
- Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Caracterização por Espectrometria de massas de alta resolução;
- Caracterização por condutividade molar
- Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em *Xanthomonas citri subsp. citri*.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Neste capítulo são descritos os solventes, reagentes, técnicas de sínteses, instrumentação e caracterizações realizadas no decorrer da pesquisa.

3.1 SOLVENTES

Em todas as reações para obtenção dos complexos apresentados nesta dissertação foi utilizado um único solvente, água (ultrapura), a qual foi tratada em atmosfera de argônio (inerte); na caracterização por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível os solventes foram água e dimetilsulfóxido (DMSO), para análise espectrométrica de massas e condutividade, os complexos foram solubilizados em água (ultrapura), para obtenção dos espectros de ressonância nuclear (RMN) foi utilizado Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6).

3.2 ATMOSFERA INERTE

O argônio utilizado oriundo da White Martins, foi desaerado e seco através de um sistema de colunas contendo sílica gel na primeira coluna para remoção da umidade do gás. Na segunda coluna têm-se cloreto de cálcio e na terceira o catalisador BTS-R-3-11 (Fluka Chemika), mantidos em temperatura de 60° C, para remoção do O₂.

3.3 REAGENTES

Os ligantes tripeptídeos PGG e GGH, juntamente com os sais tetrafluoroborato de prata hidratado, nitrato de cobre trihidratado e tetrafluoroborato de cobre hidratado foram de procedência comercial, Sigma-Aldrich. O acetato de zinco II dihidratado e o bicarbonato de sódio, foram adquiridos da Synth.

3.4 BALANÇA ANALÍTICA

As massas dos reagentes utilizados nas reações dos complexos de cobre e zinco foram pesadas na balança analítica METTLER AE 240, aqueles cuja síntese envolve a prata foram mensurados em uma balança SARTORIUS BP211D, a qual fica dentro da sala apropriada para manusear a prata no seu estado de oxidação 1+.

3.5 SÍNTESE DOS COMPLEXOS [METAL(PEPTÍDEO)]

Todas as reações foram executadas em Schlenk e durante a adição do solvente (água) e dos reagentes, os schlenks estavam conectados ao sistema de passagem de fluxo de argônio. Para a redução do solvente foi utilizada uma bomba de vácuo buchi, modelo B-169 Vacuum-System, um agitador magnético e um banho de aquecimento, onde foi montado um sistema de redução de solvente (a quente). Após a redução da água, o sólido formado no schlenk foi seco novamente utilizando uma bomba alto vácuo EDWARDS, modelo RV8, a qual é acoplada a um recipiente dewar com nitrogênio líquido.

As reações com os ligantes PGG e GGH foram repetidas inúmeras vezes, para sua otimização, utilizando o mínimo de água. Desse modo, são descritas as quantidades, em mmol, de cada reagente de apenas uma das várias reações desenvolvidas.

3.5.1 Síntese do complexo [Cu(PGG)]NO₃

Em 2 mL de água foram solubilizados 0,281 mmol de PGG, a solução permaneceu incolor, com a adição de 2 mL de nitrato de cobre na proporção 1:1 com o ligante, a solução passou para uma coloração azul clara, quando o bicarbonato de sódio foi adicionado, houve uma mudança na coloração para um azul escuro. As mudanças na coloração podem ser observadas na Figura 3.1.



FIGURA 3.1 - Mudanças na coloração no processo reacional do PGG com $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, na solução incolor têm-se o PGG (A), na solução azul clara o PGG + $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (B), por fim, a solução azul escura o PGG + $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ + NaHCO_3 (C).

A síntese teve duração de 12 horas, em refluxo e agitação, ao final da reação a solução apresentou uma cor verde. Após a redução do solvente o sólido verde formado foi seco na bomba de alto vácuo e sua massa foi mensurada em uma balança analítica. A reação teve rendimento de 79,95%, com uma perda de massa durante a raspagem do Schlenk. Na Figura 3.2, é demonstrado o esquema simplificado de síntese.

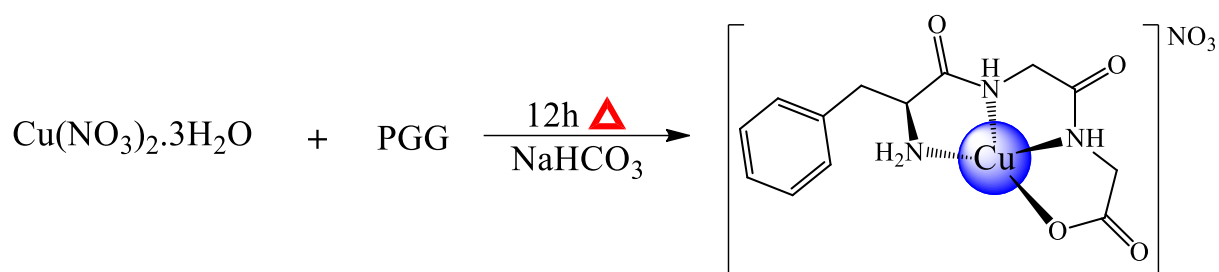


FIGURA 3.2 - Esquema simplificado da síntese do $[\text{Cu}(\text{PGG})]\text{NO}_3$.

IV (cm^{-1}): 1662,5 $\nu(\text{C}_1=\text{O})$, 1627,8 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1546,7 $\delta(\text{NH}_2)$, 1383 cm^{-1} (NO_3). Uv-Vis: Em água, transições $n-\pi^*$ nos (λ) de 194 nm e 212 nm, com ϵ [$\text{Log } \epsilon$ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)] = 4,39 e 4,29, respectivamente. Transições $d-d$ do centro metálico com absorção máxima em 664 nm com ϵ [$\text{Log } \epsilon$ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)] = 1,71.

3.5.2 Síntese do complexo [Cu(PGG)]BF₄

Um segundo sal de cobre, Cu(BF₄)₂, foi utilizado para a formação do complexo, com mudança do contra-íon. Tal mudança possibilitou uma diferença na coloração do sólido final, com a metodologia e condições. Nessa segunda reação foram utilizados 0,182 mmol de PGG e de Cu(BF₄)₂. Sólido azul, com rendimento de 80%, com perda de massa no processo de raspagem. Na Figura 3.3, é demonstrado o esquema simplificado de síntese.

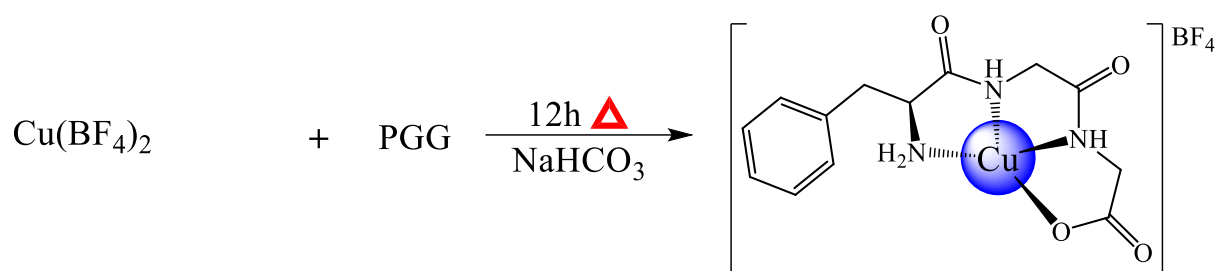


FIGURA 3.3 - Esquema simplificado da síntese do [Cu(PGG)]BF₄.

IV(cm⁻¹): 1668 cm⁻¹ ν (C₁=O), 1625,8 cm⁻¹ δ (C=O), 1398 δ (C-H).

Uv-Vis: Em água, transições n- π^* do ligante nos (λ) de 194 nm e 212 nm com os respectivos valores de ϵ [Log e (M⁻¹ cm⁻¹)] = 4,14 e 3,85. Transição d-d do centro metálico com absorção máxima em 650 nm, com ϵ [Log ϵ (M⁻¹ cm⁻¹)] = 1,82.

3.5.3 Síntese do complexo [Zn(PGG)]CH₃COO

Uma massa de 0,175 mmol do peptídeo foi solubilizado em 2 mL água, com a adição do acetato de zinco, em excesso na solução, não ocorreu mudança na coloração, mesmo após a adição do bicarbonato de sódio na reação. A reação tem duração de 12 horas, sob agitação. Com a redução do solvente e secagem na bomba alto vácuo, um sólido branco é formado. Rendimento igual a 80%. Na Figura 3.4, é demonstrado o esquema simplificado de síntese.

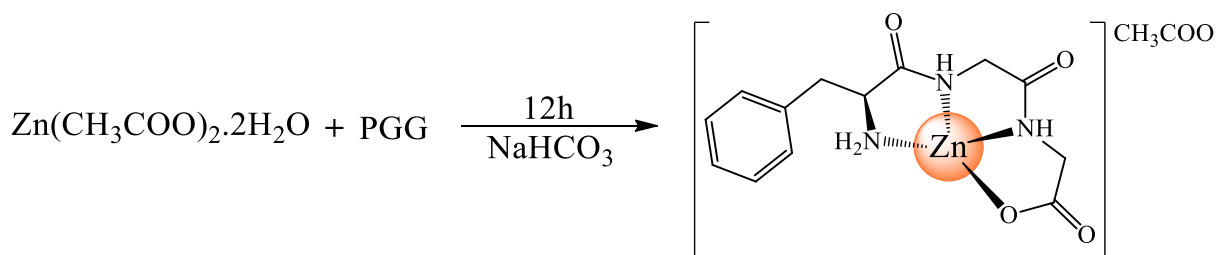


FIGURA 3.4 - Esquema simplificado da síntese do $[\text{Zn}(\text{PGG})]\text{CH}_3\text{COO}$.

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 9,4 T) 2,69 (*dd*, $J= 8,5$ e $13,4$ Hz, 1H), 2,96 (*dd*, $J= 5,2$ e $13,4$ Hz, 1H), 3,56 (*dd*, $J= 5,2$ e $8,5$ Hz, 1H), 3,62 (*dd*, $J= 3,62$ e $16,8$ Hz, 1H), 3,72 (*dd*, $J= 3,82$ e $16,8$ Hz, 1H), 3,51 (*s*, 2H), 7,25 (*m*, 5H), 7,63 (*s*, 1H) e 8,44 (*s*, 1H). IV (cm^{-1}): 1656 $\nu(\text{C}_1=\text{O})$, 1608,5 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 3296 $\nu(\text{N}-\text{H}_2)$, 3406 $\delta(\text{N}-\text{H})$. Uv-Vis: Em água, transição do tipo $n-\pi^*$ com valores de ϵ [$\text{Log } \epsilon (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$] = 4,44 e 3,96 respectivamente.

3.5.4 Síntese do complexo $[\text{Ag}(\text{PGG})]$

A síntese foi feita em uma sala escura, apropriada para se manusear a prata com seu estado de oxidação 1+. Em um Schlenk, conectado ao sistema de argônio, foi adicionado o peptídeo, 0,18 mmol, o qual foi solubilizado em 2 mL água, adicionou-se tetrafluoroborato de prata na solução, em proporção de 1:1 ligante-metal, o bicarbonato de sódio foi adicionado e não houve mudanças na coloração. O solvente foi reduzido, formando um sólido amarelado. A massa do complexo formado foi dividida em duas porções, uma foi guardada em tubos envolvidos com papel alumínio, e a outra parte foi armazenada em um tubo sem proteção contra luz. O complexo armazenado no tubo sem o papel alumínio escureceu gradativamente no período de 7 dias. A reação teve rendimento de 75,4%. Na Figura 3.5, é demonstrado o esquema simplificado de síntese.

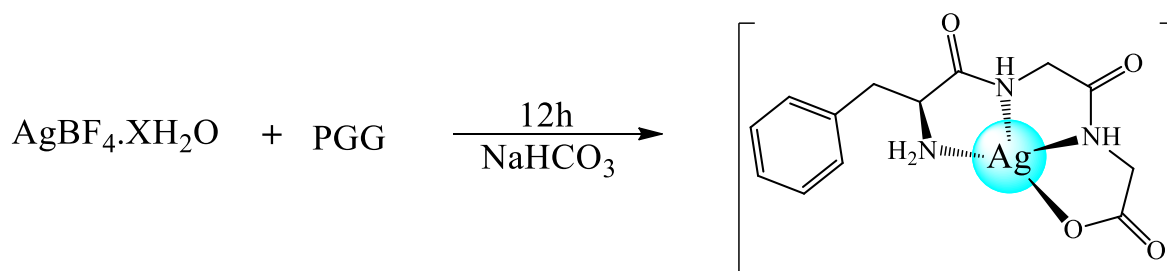


FIGURA 3.5 - Esquema simplificado da síntese do [Ag(PGG)].

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 9,4 T): 2,72 (*dd*, $J= 7,9$ e $13,5$ Hz, 1H), 2,99 (*dd*, $J= 5,3$ e $13,5$ HZ, 1H), 3,70 (*t*, $J= 6,8$ e $6,8$ Hz, 1H), 3,55 (*d*, $J= 5,1$ Hz, 2H), 3,64 (*d*, $J= 5,3$ e $16,5$ Hz, 1H), 3,79 (*d*, $J= 5,9$ e $16,5$ Hz, 1H), 7,25 Ph, 5H), 7,71 (*t*, $J= 5,2$ e $5,2$ Hz, 1H), 8,72 (*t*, $J= 5,8$ Hz, 1H). IV: 1658,6 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1604,6 - 1541 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1546,7 $\delta(\text{NH}_2)$, 1396,3 $\delta(\text{C}-\text{H})$. UV-Vis: Em água, transições do ligante, em 194 nm e 196 nm são as transições $n-\pi^*$ com os respectivos valores de ϵ [$\text{Log } \epsilon (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$] = 3,85 e 3,91. Em 260 nm, transição $\pi-\pi^*$.

3.6 SÍNTESE COM O GGH

Em todas as repetições em busca da otimização para cada reação com o ligante GGH, buscou-se a utilização do mínimo de solvente, 4 mL de água.

3.6.1 Síntese do complexo [Cu(GGH)](NO_3) $_2$

Em um schlenk, foram adicionados 0,16 mmol do peptídeo GGH, o qual foi solubilizado em 2 mL de água, adicionou-se 2 mL de uma solução de 0,16 mol/L de nitrato de cobre, aparecendo uma cor rosada, que mudou para azul em poucos segundos. Para o peptídeo GGH não se faz necessário desprotonar o ácido carboxílico da parte L-histidina, pois o anel imidazol da L-histidina tem um nitrogênio disponível para servir como ponto de coordenação. A reação teve seu volume reduzido a vácuo, formando um sólido esverdeado. Rendimento de 96,7%. Na Figura 3.6, é demonstrado o esquema simplificado de síntese.

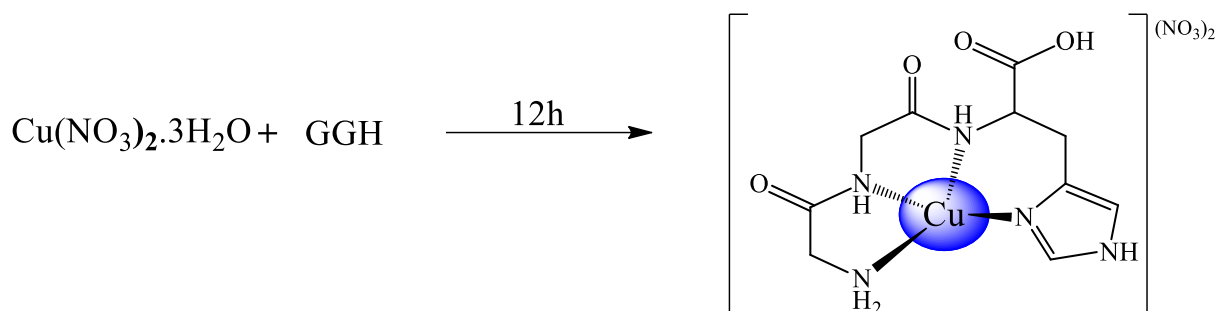


FIGURA 3.6 - Esquema simplificado da síntese do $[\text{Cu}(\text{GGH})](\text{NO}_3)_2$.

IV (cm^{-1}): 1626 $\nu(\text{HNC}=\text{O})$, 1265 $\nu(\text{O}-\text{H})$, 1111 $\nu(\text{C}-\text{N})$, 653 e 625 (imidazol monossustituído). Uv-Vis: Em água, transições $n-\pi^*$ do ligante, em 196 nm e 218 nm, com os respectivos valores de ϵ [$\text{Log } \epsilon (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$] = 4,21 e 3,87, transição d-d em 756 nm e banda (TCML) em 536 nm.

3.6.2 Síntese do complexo $[\text{Cu}(\text{GGH})](\text{BF}_4)_2$

Um segundo complexo de cobre com o GGH foi sintetizado, usando 0,15 mmol de ambos os reagentes, a mesma metodologia foi empregada, observando-se mudanças nas cores entre as duas reações e do sólido final. Rendimento de 80,8%. Na Figura 3.7, é demonstrado o esquema simplificado de síntese.

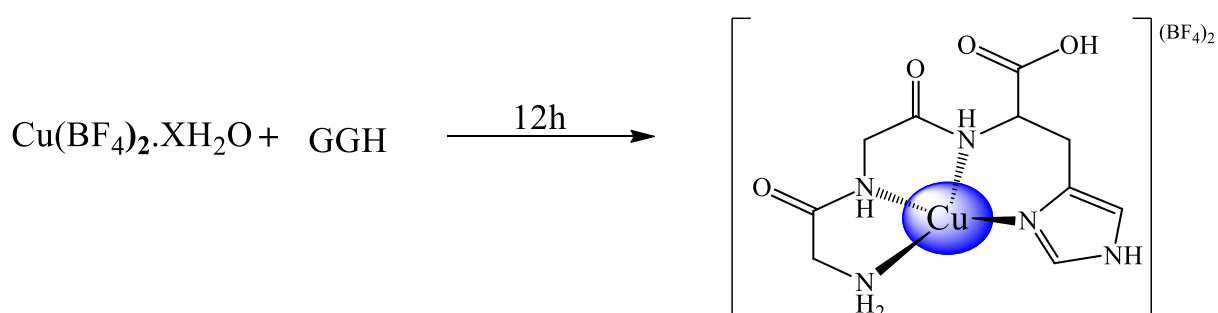


FIGURA 3.7 - Esquema simplificado da síntese do $[\text{Cu}(\text{GGH})](\text{BF}_4)_2$.

IV (cm^{-1}): 1628 $\nu(\text{HNC}=\text{O})$, 1406 $\delta(\text{CH}_2)$, 1261 $\nu(\text{O}-\text{H})$, 654, 532 e 224 (imidazol monossustituído). Uv-Vis: Em água, transições $n-\pi^*$ do ligante,

em 198 nm e 216 nm, com os respectivos valores de ϵ [$\text{Log } \epsilon (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$] = 4,11 e 3,88, transição *d-d* em 766 nm e banda (TCML) em 536 nm.

3.6.3 Síntese do complexo $[\text{Zn}(\text{GGH})](\text{CH}_3\text{COO})_2$

Uma quantidade de 0,15 mmol de GGH foi solubilizada em 2 mL de água. O sal de zinco, na proporção 1:1 com o ligante, foi solubilizado em 2 mL do mesmo solvente e inserido a solução com o peptídeo. Após ~12 horas de reação, a mesma foi seca a quente e o Schlenk com o sólido formado foi posto na bomba alto vácuo, após a raspagem a reação teve rendimento de 84,35%. Na Figura 3.8, é demonstrado o mecanismo simplificado de síntese.

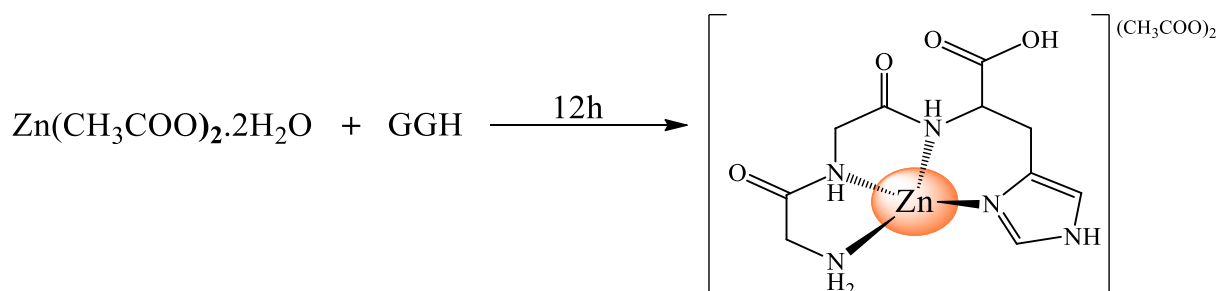


FIGURA 3.8 - Mecanismo simplificado da síntese do $[\text{Zn}(\text{GGH})](\text{CH}_3\text{COO})_2$.

IV (cm^{-1}): 1575 cm^{-1} $\nu(\text{HNC}=\text{O})$, 1400 cm^{-1} $\delta(\text{CH}_2)$, 1269 cm^{-1} $\nu(\text{OH})$, 1113 cm^{-1} $\nu(\text{C-N})$, 677 cm^{-1} , 657 cm^{-1} e 621 cm^{-1} (imidazol monossustituído). Uv-Vis: Em água, 196 nm e 210 nm, transições $n-\pi^*$ intramolecular, com os respectivos valores de ϵ [$\text{Log } \epsilon (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$] = 4,40 e 3,96.

3.6.4 Síntese do complexo $[\text{Ag}(\text{GGH})]\text{BF}_4$

Em um schlenk, conectado ao sistema de argônio, foi adicionado o peptídeo (GGH), solubilizado em água destilada, adicionou-se tetrafluoroborato de prata a solução, não havendo mudanças na coloração. O solvente foi reduzido, e um sólido branco amarelado formou-se. Rendimento de 73,6%. Na Figura 3.9, é demonstrado o esquema simplificado de síntese.

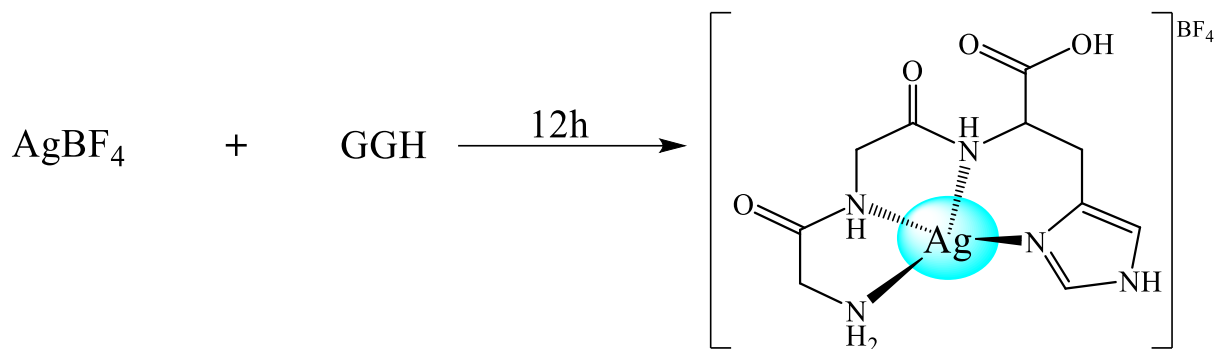


FIGURA 3.9 - Esquema simplificado da síntese do $[\text{Ag}(\text{GGH})]\text{BF}_4$.

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 9,4 T) 3,02 (*dd*, $J= 6,3$ e $14,5$ Hz, 1H), 3,10 (*dd*, $J= 5,0$ e $14,5$ Hz, 1H), 3,51 (*s*, 2H), 3,79 (*d*, $J= 5,6$ Hz, 2H), 4,37 (*q*, $J= 6,22$, $6,22$, $6,32$ Hz, 1H), 7,04 (*s*, 1H), 7,89 (*d*, $8,52$ Hz, 1H), 7,91 (*s*, 1H), 8,86 (*t*, $5,8$, $5,8$ Hz, 1H). IV (cm^{-1}): 1658 – 1595 $\nu(\text{HNC}=\text{O})$, 1396 $\delta(\text{CH}_2)$, 1265 $\nu(\text{O}-\text{H})$, 623, 532 e 212 (imidazol monossubstituído), 1083 cm^{-1} (BF_4). Uv-Vis: Em água, transições nos (λ) 196 nm e 216 nm, $n-\pi^*$, com os seguintes valores de ϵ [$\text{Log } \epsilon$ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)] = 4,23 e 3,94, respectivamente.

3.7 ANÁLISE ELEMENTAR

As medidas de teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas pela técnica do Laboratório de Microanálise do Departamento de Química da UFSCar no equipamento CHNS-O modelo CE 1108 da Fisons Instruments.

3.8 CONDUTIVIDADE MOLAR

As medidas de condutividade molar foram feitas apenas para os complexos com o ligante GGH, utilizando-se um condutímetro Meter Lab, modelo CDM230. As soluções foram preparadas em concentração de $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

3.9 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Os espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho médio foram obtidos em um espectrofotômetro Bomem-Michelson FT, com resolução de 4 cm^{-1} , modelo MB-102. Foi utilizado brometo de potássio (KBr), grau espectroscópio, como suporte. O KBr foi mantido em estufa a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de ser usado na fabricação das pastilhas. Antecedendo a obtenção dos espectros de cada amostra, fez-se o espectro com 100 mg de KBr, denominado branco, para correção de ruídos.

As pastilhas contendo os complexos, sais e ligantes foram preparadas na proporção 1:100 amostra/KBr em mg, macerando a amostra junto com o KBr no almofariz com um pistilo de ágata, até que houvesse total trituração e homogeneização. Em seguida, foram colocados no pastilhador, o qual foi posto em uma prensa para fabricação das pastilhas sob pressão.

3.10 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível foram obtidos em dois equipamentos, um espectrofotômetro de arranjo de diodo da Hewlett Packard (HP) 8452A, e o segundo espectrofotômetro UV-1800 (UV spectrophotometer) da Shimadzu. Os espectros foram obtidos em H_2O ultrapura e DMSO, ambos em várias diluições, em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm e capacidade de 4 mL, nas faixas de 190 nm a 800 nm (água) e 250 nm a 800 nm (DMSO).

Os valores de absorvidade molar (ϵ) foram determinados pela equação da Lei de Beer, e de posse dos valores foi aplicado a propriedade logarítmica (\log_{10}), e o valor da absorvidade molar (ϵ) foi obtido em \log de ϵ .

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

A= Absorbância, b = caminho ótico (cm) e c = concentração molar (mol L⁻¹).

3.11 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹H, ¹³C{¹H}, e os mapas de contorno COSY, HSQC e HMBC foram obtidos em um espectrômetro BRUKER DRX 400 MHz (9,4 T) pertencente ao Departamento de Química da UFSCar.

3.12 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massas Waters Xevo G2-XS QToF, localizado no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), com analisador quadrupolo / Tempo de vôo. As análises foram realizadas por infusão direta com fluxo variando entre 1 e 10 mL.min⁻¹, com ionização por Eletrospray (IES) em modo positivo com varredura na faixa de 50 – 2000 Da. Para alguns íons selecionados, foram realizados experimentos de MS/MS, através da fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID).

3.13 SUSCEPTIBILIDADE MAGNÉTICA

As medidas do momento magnético efetivo (μ_{ef}), foram realizadas em uma balança Johnson Matthey-AUTO MSB, seguindo as etapas abaixo:

- Ajustou-se a altura do tubo capilar, de forma que 4,5 cm do mesmo permanecesse no interior da balança;
- Com a opção de tara da balança, as metrologias do tubo foram abatidas;

- O tubo foi retirado da balança de susceptibilidade, nele foram adicionados a quantidade de analito necessária para preencher 1,5 cm do capilar;
- A massa em gramas da amostra foi mensurada em uma balança analítica e o tubo foi posicionado novamente a 4,5 cm de seu tamanho para o interior da balança;
- As medidas de altura de amostra em milímetros (mm), massa de analito usada para preencher os 15 mm foram programadas na calculadora acoplada a balança;
- O valor da susceptibilidade magnética por unidade de massa para cada complexo foi fornecido pela balança de susceptibilidade magnética, esse valor foi substituído nas fórmulas destacadas em negrito para o cálculo do número de elétrons desemparelhados.

$$xm = xg \cdot MM$$

$$\mu ef = K(xm \cdot T)^{1/2} = 2,84\sqrt{xm \cdot T}$$

$$4 + (4 \cdot \mu ef^2) = \Delta$$

$$n = \frac{-b \pm \sqrt{\Delta}}{2a}$$

xm = Suscetibilidade magnética molar; xg = Suscetibilidade magnética por unidade de massa; MM = Massa molecular; T = Temperatura em Kelvin; μef = Momento magnético efetivo; n = Número de elétrons desemparelhados; K = Constante de Boltzman.

3.14 TESTE BIOLÓGICO

Para os experimentos microbiológicos, foram utilizadas bactérias *Xanthomonas citri* ssp. *citri*, sensíveis ao cobre(II), Tabela 3.1. Todas as bactérias utilizadas nos testes biológicos, foram disponibilizadas pela FUNDECITRUS, os

ensaios foram desenvolvidos pelo Laboratório de Pesquisa de Microbiologia Aplicada-UNIFRAN.

TABELA 3.1 - Isolados de *Xanthomonas citri subsp. citri*.

Isolado	Local de origem	Ano de isolamento	Cu
12	Paranavaí-Paraná	1997	S
75	Casa Branca-SP	1998	S
316	Presidente Prudente-SP	2002	S
621	Chapecó-SC	2001	S
10	Guararapes-SP	1980	S

S= Sensível.

O crescimento das culturas de *Xanthomonas citri ssp. citri* foram desenvolvidos em caldo nutriente da marca Kasvi, em sua composição têm-se: extrato de carne (1,0 g.L⁻¹), extrato de leveduras (2,0 g.L⁻¹), extrato de peptona (5,0 g.L⁻¹) e cloreto de sódio (5,0 g.L⁻¹). Os isolados foram deixados em um tempo de 72 horas de crescimento (período em que as bactérias estão em completa atividade metabólica). Após esse crescimento ocorreu a suspensão das células em solução salina 0,9% para o preparo do inóculo, o qual foi padronizado por leitura ótica em um densitômetro (espectrofotômetro da densimat com leitura a 550 nm), o qual mediu a opacidade da solução bacteriana por espalhamento de luz. Essa turbidez medida equivale a concentração bacteriana, padronizada para a concentração de 10⁵ UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia), dessa solução uma alíquota foi retirada e diluída em solução salina e caldo com nutrientes, deixando o inóculo com 5 x 10⁵ UFC.

Nas atividades biológicas, os complexos foram avaliados pela Concentração Inibitória Mínima (CIM), a qual foi medida por microdiluição seriada em microplacas de 96 poços, seguindo o protocolo estabelecido pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)”, antiga “National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCSL).” Os ensaios foram desenvolvidos em triplicatas, para uma maior confiabilidade das atividades dos complexos,

ligantes (PGG e GGH), sais dos metais usados nas sínteses e sais formados nos processos reacionais com o PGG.

A solução mãe (SM) de cada amostra testada foi preparada com a adição de 1 mg (amostra) em 125 μL de DMSO (solvente), a solução gerada teve concentração de 8000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a qual foi diluída com mais 375 μL de caldo nutriente, a solução resultante teve concentração de 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Na placa de 96 poços, exemplificada na Figura 3.10, pipetou-se 50 μL de caldo nutriente em todos os poços. Na fileira B, foram pipetados 59 μL do antibiótico estreptomicina para o controle positivo, a atividade bactericida do DMSO foi avaliada nos poços da fileira C, nos volumes de 75 μL , 76 μL , 77 μL , 78 μL e 79 μL . A viabilidade do caldo nutriente foi testada em três poços da fileira D. A solução mãe foi avaliada em três poços da fileira F, não ocorreu contaminação dessa solução. Foi realizado o controle da solução salina usada no preparo do inóculo. Na fileira A, foram pipetados 50 μL da SM no primeiro poço, e pelo fator de diluição, a concentração da SM no primeiro poço foi de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e deste foram retirados 50 μL e pipetado no segundo poço, essa microdiluição foi realizada até o último poço, no qual a concentração foi de 1,95 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após a microdiluição, 20 μL do inóculo foi adicionado em cada poço. As placas foram armazenadas em uma câmara incubadora (BOD) por 72 horas a 28°C.

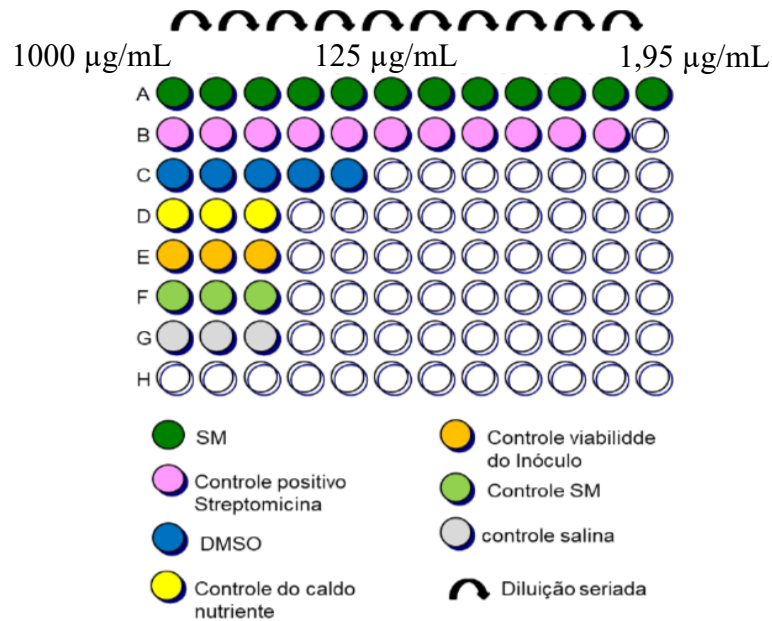


FIGURA 3.10 - Ilustração da metodologia utilizada em placa Eliza de 96 poços para a medida da CIM. Imagem retirada e adaptada de SILVA, D. F.¹⁶

O resultado da CIM foi obtido pelo teste de coloração com resazurina 0,02%, de procedência Sigma-Aldrich. Para esse teste, 30 µL de resazurina foram pipetados em cada poço, a qual possui coloração púrpura, mas na presença de células bacterianas vivas sofre uma reação de redução para resorufina, a qual tem coloração rósea.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o norteamento das caracterizações se fez necessário a complementação de dados referentes aos ligantes, por isso optou-se por fazer uma caracterização de ambos os tripeptídeos.

No teste para solubilidade com alguns solventes presentes no laboratório, metanol (MeOH), acetonitrila (ACN), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), acetona e água. Os ligantes PGG e GGH foram solúveis em água, com uma solubilidade média do PGG e uma solubilidade baixa para o GGH em DMSO. Nos demais solventes, ambos foram insolúveis, desse modo, os resultados experimentais em solução são apresentados em água e/ou DMSO.

A apresentação dos resultados e, conseqüentemente, discussão será realizada em ordem de ligantes, primeiramente para o PGG, onde é demonstrado seus dados de RMN, infravermelho e ultravioleta. Após essas três técnicas, os complexos com PGG são analisados em comparação com o ligante livre. Na seqüência, o ligante GGH com suas caracterizações por RMN, infravermelho e ultravioleta, fazendo a discussão dos complexos sintetizados em comparação com o GGH livre.

4.1 LIGANTE PGG E SEUS COMPLEXOS

4.1.1 Caracterização por espectroscopia de absorção na região do infravermelho

O espectro de absorção na região do infravermelho médio (4000 cm^{-1} a 200 cm^{-1}) é apresentado na Figura 4.1, são demonstradas algumas atribuições de bandas para o PGG, baseadas nas tabelas de Socrates.⁴⁶ Em 3394 cm^{-1} tem-se o estiramento da ligação $\nu(\text{OH})$, essa banda aguda fornece a informação de que esse tripeptídeo não faz ligação de hidrogênio intramolecular ou com moléculas

vizinhas. O estiramento do $\nu(\text{NH})$ das amidas, apresenta uma banda de média a forte intensidade em 3244 cm^{-1} , o estiramento assimétrico do $\nu(\text{NH}_2)$ em 3072 cm^{-1} . O dobramento $\delta(\text{NH}_2)$ fica na região de $1650\text{ cm}^{-1} - 1520\text{ cm}^{-1}$, nessa região do espectro ocorre a absorção dos grupos $\nu(\text{C}=\text{O})$ das carboxilas.

O estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$ do ácido carboxílico não conjugado tem uma banda em aproximadamente em 1700 cm^{-1} , já as carboxilas das amidas, apresentam duas bandas conjugadas na faixa de $1680\text{ cm}^{-1} - 1620\text{ cm}^{-1}$. Como essas bandas caem na mesma região de dobramento do NH_2 , há uma dificuldade em atribuir cada grupamento. O anel benzeno monossustituído do PGG, tem o dobramento $\delta\text{ C-H}$ característico, uma banda em 748 cm^{-1} e a segunda banda em 702 cm^{-1} . Abaixo dessas absorções, apresentam-se três bandas referente ao $\delta\text{ O-CO}$, em 613 cm^{-1} , 596 cm^{-1} e 573 cm^{-1} . Na Tabela 4.1 é apresentada a atribuição tentativa das bandas para o PGG na região do infravermelho médio.

As absorções para C-H, aparecem abaixo de 3000 cm^{-1} , a deformação assimétrica $\delta_{\text{ass}}(\text{C-H})$ possui bandas em $2940\text{--}2915\text{ cm}^{-1}$, porém podem ser observadas em maiores frequências, como em $2870\text{--}2840\text{ cm}^{-1}$ e $2890\text{--}2880\text{ cm}^{-1}$, pois os átomos mais eletronegativos deixam a ligação C-H mais enfraquecida.

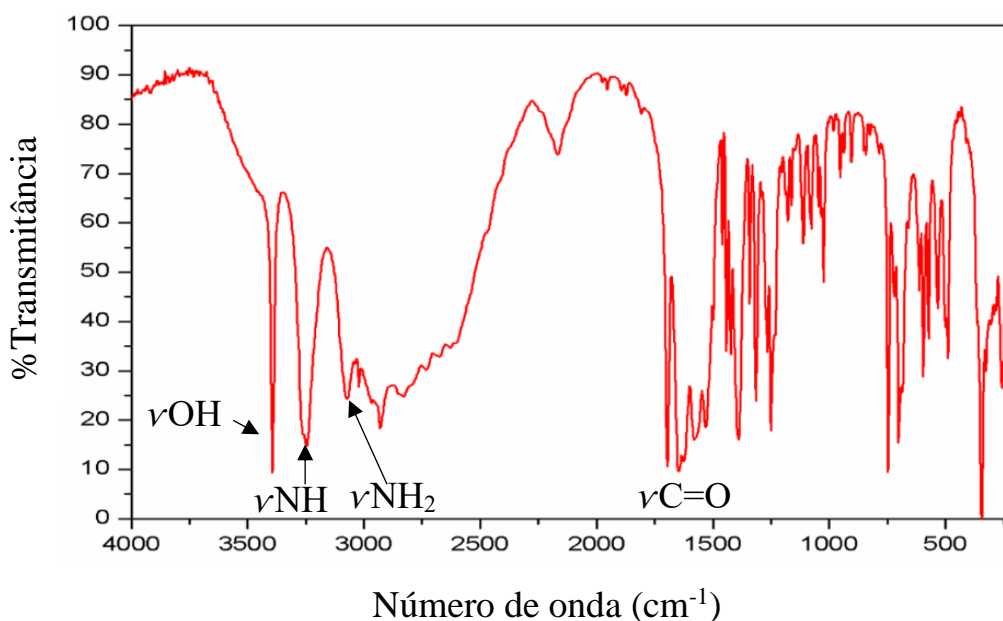


FIGURA 4.1 - Espectro de absorção na região do infravermelho do PGG feito em KBr.

TABELA 4.1 – Atribuição tentativa das bandas do PGG na espectroscopia de IV

Atribuição	PGG (cm ⁻¹)
ν O-H	3394
ν N-H amida	3244
ν N-H ₂ amina	3072
δ C-H alifático	Dobramento assimétrico 2940-2915 cm ⁻¹ , Dobramento simétrico em 1395 cm ⁻¹ – 1380 cm ⁻¹ . Vibração tesoura em 1480-1440 cm ⁻¹ (média a forte)
ν C ₁ =O	1695
ν C=O amida	1647-1581
ν C=C aromático	1625 – 1430 cm ⁻¹
δ O-H	1250
δ (NH ₂)	1240
ν C-N	1090-1020 cm ⁻¹
δ C-H aromático	Tem duas bandas conjugadas entre 900-650 cm ⁻¹ de média a forte referente a dobramento fora do plano
δ O-CO	Três banda entre 675 – 570

4.1.2 Caracterização por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

O espectro eletrônico (UV-Vis), Figura 4.2, mostrou uma banda em 262 nm e um ombro 272 nm, atribuídas a transições $n-\pi^*$ das carboxilas das amidas e do ácido carboxílico, possuindo um coeficiente de absorvidade molar [$\log \epsilon$ (M⁻¹ cm⁻¹)] de 2,15 e 1,99, respectivamente.

Uma banda bem fraca próximo a 305 nm é observada no espectro, porém devido a sua baixa intensidade não foi possível calcular sua absorbância, sendo essa banda alargada característica de transições $\pi-\pi^*$ de sistemas aromáticos.

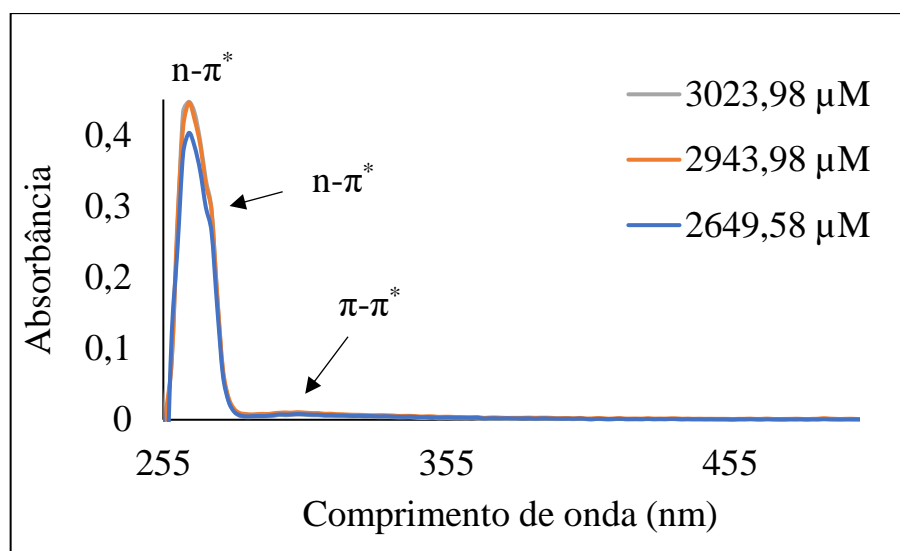


FIGURA 4.2 - Espectro de absorção na região UV-Vis do PGG em DMSO em diluições seriadas.

O espectro de UV-Vis, Figura 4.3, obtido em água ultrapura, apresentou absorções no comprimento de onda 194 nm e um ombro em 212 nm, possuindo coeficiente de absorvidade molar em $[\log \epsilon (M^{-1} \text{ cm}^{-1})]$ de 4,63 e 4,15 respectivamente.

A água é um solvente que faz ligações de hidrogênio com o tripeptídeo, o que desloca as transições $n-\pi^*$ para o azul (menor comprimento de onda), efeito hipsocrômico e aumenta a energia transição (efeito hipercrômico), favorecendo as transições do tipo $n-\pi^*$. As transições $\pi-\pi^*$ em água são deslocadas para o vermelho, maior comprimento de onda (efeito batocrômico) e há uma diminuição na energia de transição (efeito hipocrômico). Em DMSO as transições $n-\pi^*$ são favoráveis pela polaridade do solvente, porém a baixa intensidade das bandas é justificada por ser um solvente aprótico.

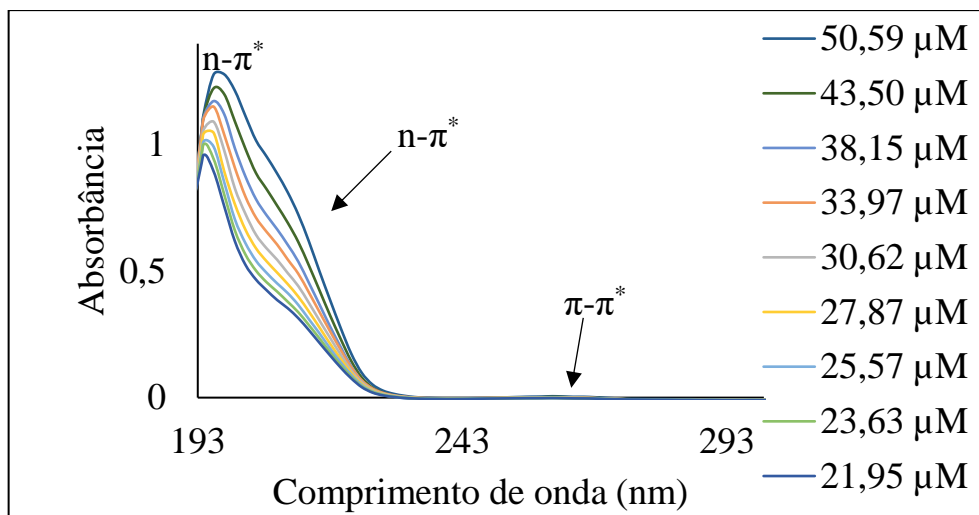


FIGURA 4.3 - Espectro de absorção na região do Uv-Vis do PGG obtido em água. Ao lado estão as concentrações das várias diluições.

4.1.3 Caracterização do PGG por RMN

Os espectros de RMN ^1H , ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e os mapas de contorno de COSY, HSQC e HMBC, foram obtidos em $\text{DMSO-}d_6$, pois nesse solvente são observados os sinais dos hidrogênios lábeis das amidas, o que não poderia ser verificado se os ligantes fossem solubilizados em água deuterada (D_2O), pois haveria a troca dos hidrogênios lábeis por deutério⁴⁷.

No espectro do tripeptídeo **PGG**, Figura 4.4, os primeiros sinais na região alifática são referentes aos hidrogênios da posição 2H-7, vizinhos ao centro estereogênico no resíduo de aminoácido da L-fenilalanina, os quais aparecem como um duplo duplete em δ 2,67 e outro duplo duplete em δ 3,02, ambos integrando para 1H em cada sinal. O próton da posição H-6 tem multiplicidade de duplo duplete δ 3,58, sua integral ficou prejudicada, pois parte do sinal está junto da água. Em δ 3,68, o duplete integrando para 2H é referente aos hidrogênios da posição 2H-2. Os hidrogênios da posição 2H-4 aparecem como um duplete em δ 3,75 integrando para 2H.

Na região aromática têm-se um multipeto integrando para 5H em δ 7,25, estes são referentes aos hidrogênios da fenila. Os sinais mais desblindados são dos hidrogênios ligados aos nitrogênios das amidas, seus sinais aparecem como um tripleto em δ 7,99 integrando para 1H e o outro sinal tem aparência de um simpleto largo em δ 8,37 integrando para 1H. Os sinais dos hidrogênios do ácido carboxílico e da amina não foram observados.

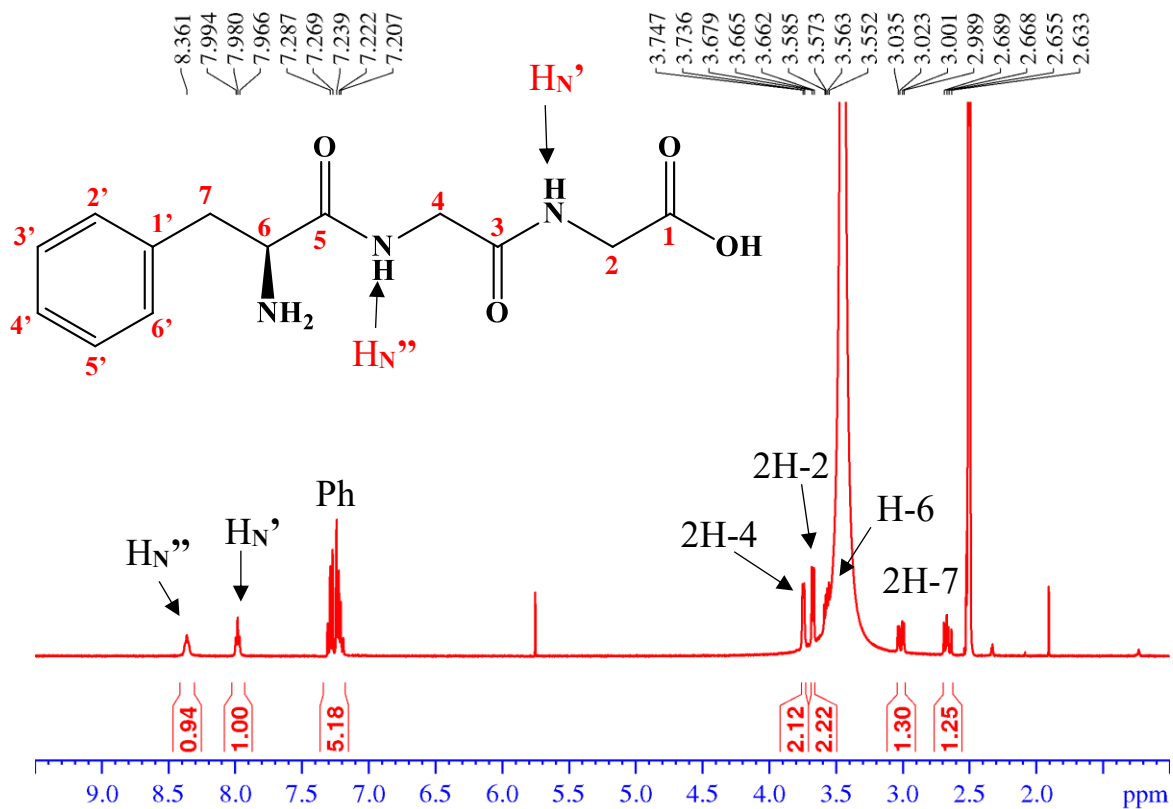


FIGURA 4.4 - Espectro de RMN de ^1H do tripeptídeo PGG em DMSO-d_6 (9,4 T), com os valores das integrais abaixo do espectro, deslocamento acima e atribuição dos hidrogênios para cada sinal referente as posições da estrutura do PGG mostrada no espectro.

Os hidrogênios dos nitrogênios das amidas foram distinguidos no experimento COSY, o sinal do hidrogênio da posição $\text{H}_{\text{N}'}$ tem acoplamento vicinal com os prótons da posição 2H-2, enquanto os hidrogênios da posição 2H-

4 tem acoplamento vicinal com o próton $H_{N''}$, como pode ser observado no mapa de correlações COSY na Figura 4.5.

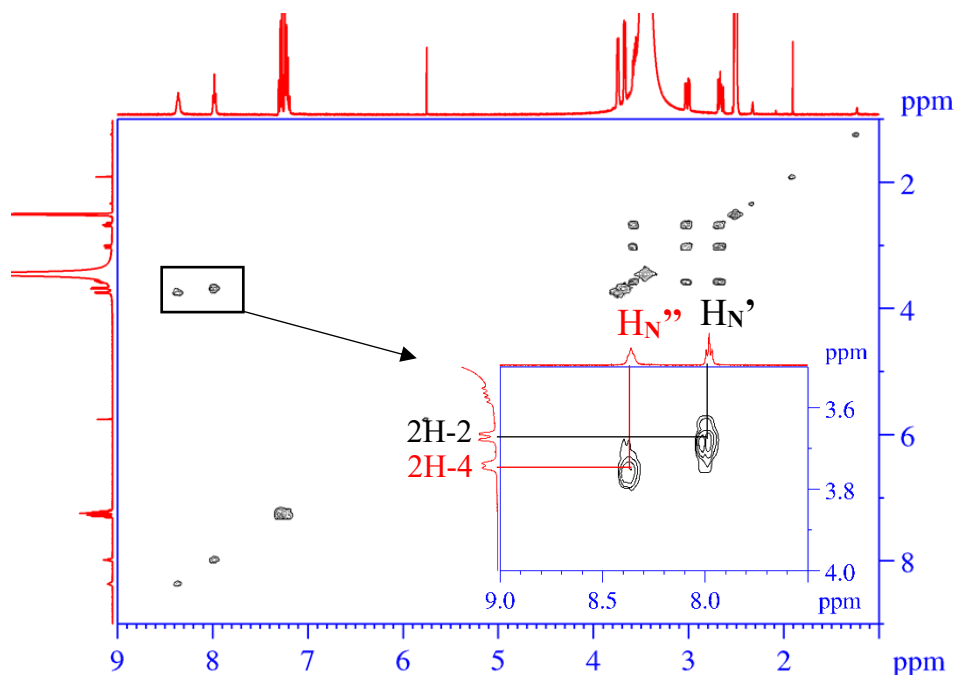


FIGURA 4.5 - Espectro COSY do tripeptídeo PGG em DMSO- d_6 (9,4 T), destacando as correlações dos prótons das amidas ($H_{N'}$ e $H_{N''}$) com os hidrogênios (2H-2 e 2H-4).

Na estrutura química do ligante PGG têm-se um total de 13 carbonos, porém no espectro de RMN ^{13}C , Figura 4.6, observamos sinais de apenas 12 carbonos. O carbono metilênico da posição C-2 tem seu sinal em δ 41,3, bem ao lado, tem-se o sinal do carbono da posição C-4, o carbono metínico da posição C-6 tem deslocamento de δ 55,7. Na região aromática, o sinal em δ 126,3 é referente ao carbono na posição C-4', o qual está na posição *para* em relação a cadeia lateral, em δ 128,3 o sinal intenso é referente aos carbonos das posições C-3' e C-5', ambos nas posições *meta* em relação a cadeia lateral, o outro sinal intenso em δ 129,4 pertence aos carbonos C-2' e C-6' na posição *orto* em relação a cadeia lateral, o carbono não hidrogenado na posição C-1' tem seu sinal em δ 138,1, o fato de ser não hidrogenado é refletido na baixa intensidade de seu sinal. Os

carbonos acilas das posições C-1, C-3 e C-5 possuem deslocamentos respectivos em 171,0 ppm, 168,7 ppm e 173,4 ppm.

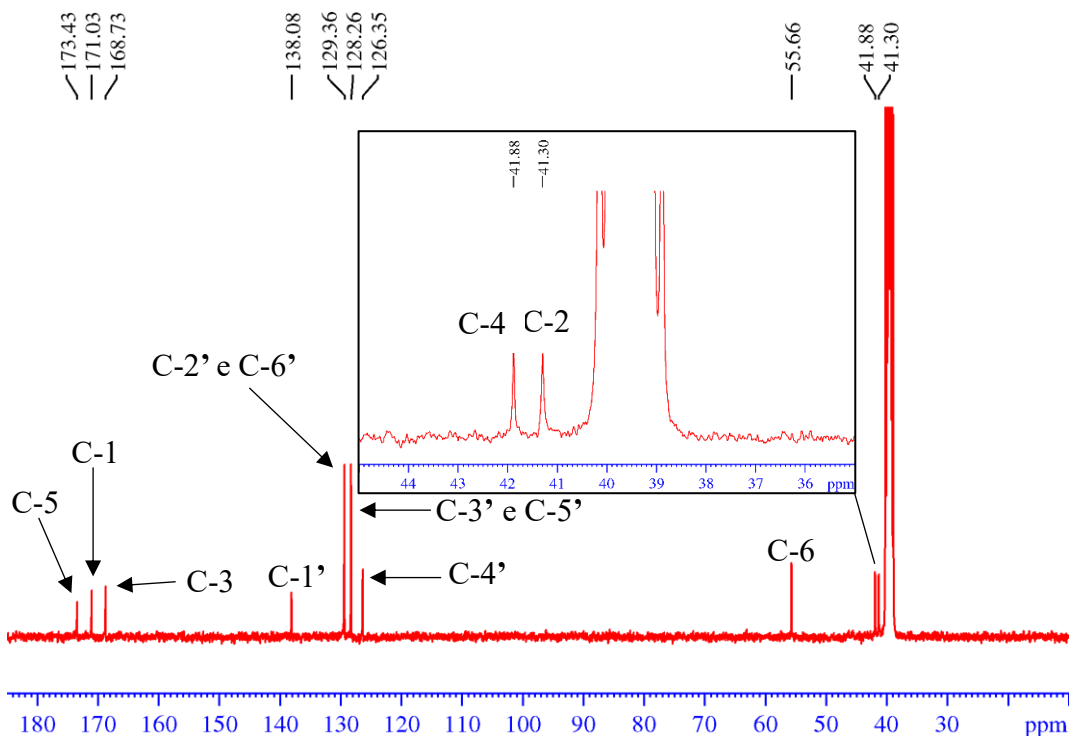


FIGURA 4.6 - Espectro de RMN ^{13}C do tripeptídeo PGG em DMSO-d_6 (9,4 T), com ampliação da região 35 ppm a 45 ppm para diferenciar os sinais dos carbonos C-4 e C-2.

O décimo terceiro carbono foi observado pelo experimento de DEPT 135, o qual mostra sinais apenas de carbonos hidrogenados, carbonos com o número par de hidrogênio (metilênicos) tem sinais para baixo e carbonos com números ímpares (metilas e metínicos) tem sinal para cima. Na Figura 4.7, os três sinais de carbonos metilênicos para baixo, confirmam que o sinal do carbono metilênico da posição C-7, está junto do sinal residual do solvente.

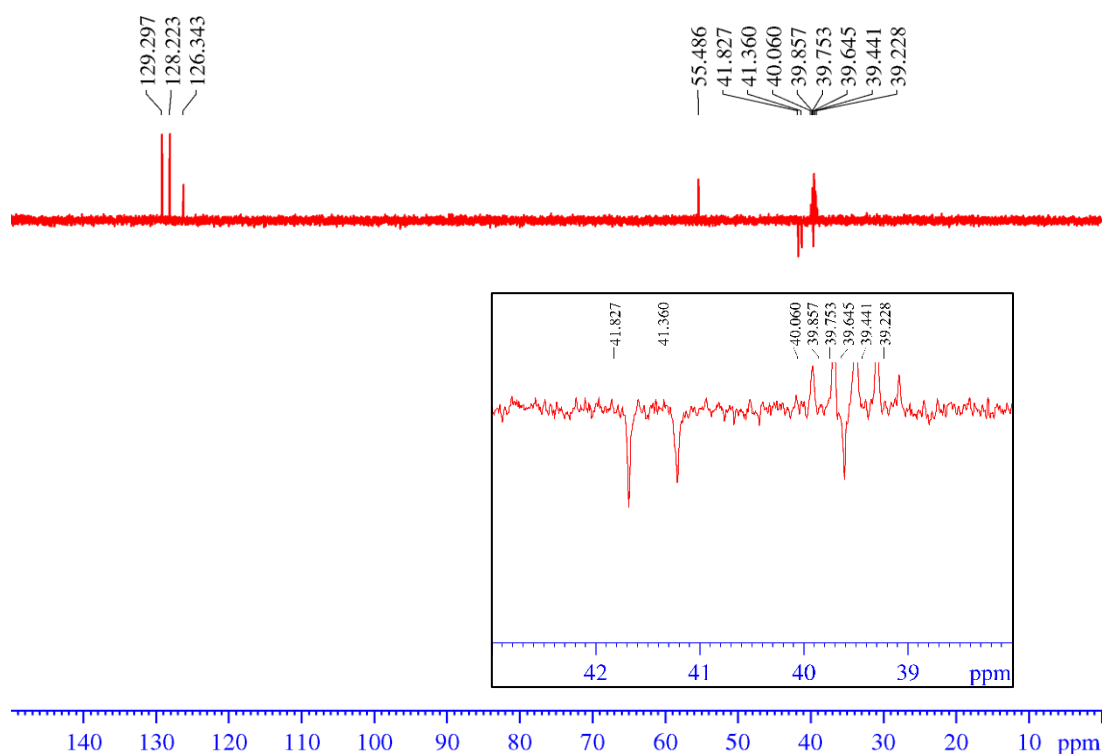


FIGURA 4.7 - Espectro de DEPT 135 do tripeptídeo PGG em DMSO-d₆ (9,4 T), mostrando os sinais de carbonos hidrogenados, na região aromática os carbonos do anel aromático. Na região alifática, o sinal do C-6 em δ 55.5 mostrado para cima, na ampliação da região de 38 ppm a 43 ppm têm-se os carbonos metilênicos, onde o carbono C-7 está junto do sinal residual do solvente.

4.2 COMPLEXOS [Metal(PGG)]

Os complexos com o tripeptídeo PGG, foram caracterizados por RMN 1D e 2D em DMSO-*d*₆, espectrometria de massas de alta resolução em ionização por eletrospray (IES), espectroscopia de absorção na região do UV-Vis e infravermelho e análise elementar. No RMN unidimensional é apresentado apenas o espectro do [Ag(PGG)] para exemplificar a formação do complexo por RMN de ¹H e ¹³C{¹H}, pois o princípio da análise é a mesma para os quelatos [Metal(PGG)], as diferenças entre os complexos são apresentadas em formas de

tabelas e ampliações dos mapas de contorno. Todos os espectros usados para a caracterização estrutural dos quelatos estão disponíveis no material suplementar.

O complexo com centro metálico de cobre [Cu(PGG)]NO₃, possui análise por RMN dificultada, por se tratar de um íon paramagnético, porém apresentaram sinais no RMN de ¹H e ¹³C{¹H}, mas não apresentou correlações nos experimento 2D. Com a mudança do contra-íon para (BF₄⁻), as correlações no mapa de contorno HSQC foram observadas, portanto optou-se por fazer uma discussão desses complexos separadamente.

Os dados de análise elementar, Tabela 4.2, foram comparados com os valores percentuais teóricos de cada proposta de complexação, o que resultou no conhecimento das proporções químicas de átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos complexos sintetizados, os quais possuem moléculas de água de hidratação e sais gerados após a secagem do solvente.

TABELA 4.2 - Análise Elementar.

Complexos	%C*	%H*	%N*
[Ag(PGG)].NaBF ₄ .H ₂ O	30,38	3,53	8,18
(PGG-1)**	(30,70)	(3,47)	(8,41)
[Zn(PGG)]CH ₃ COO.CH ₃ COONa	42,12	4,57	8,67
(PGG-2)**	(42,10)	(3,80)	(8,60)
[Cu(PGG)]NO ₃ .NaNO ₃ .2,5H ₂ O	29,25	3,96	13,12
(PGG-3)**	(29)	(3,44)	(12,8)
[Cu(PGG)]BF ₄ .NaBF ₄	29	3	7,8
(PGG-4)**	(30,21)	(3,29)	(7,99)

*Valores experimentais entre parênteses. **Código dos complexos.

4.2.1 Susceptibilidade magnética

Os valores da susceptibilidade magnética para os complexos **PGG-3** e **PGG-4** são apresentados na Tabela 4.3. Para o cálculo foram utilizados 0,0767

g de **PGG-3** e 0,0975 g de **PGG-4**. Os resultados obtidos foram próximos de 1, indicando que ambos os complexos possuem apenas um elétron desemparelhado. Os cálculos considerando os complexos binucleares não apresentou o resultado de 2 elétrons desemparelhados, o que corroborou para a proposta de complexos mononucleares.

TABELA 4.3 - Susceptibilidade magnética dos complexos **PGG-3** e **PGG-4**.

Complexo	Suscetibilidade magnética molar (χ_m)	Número de elétrons desemparelhados (n)
PGG-3	$0,297 \times 10^{-5}$	0,97
PGG-4	$0,222 \times 10^{-5}$	0,96
PGG-3*	$0,297 \times 10^{-5}$	1,22
PGG-4*	$0,222 \times 10^{-5}$	1,05

*Considerado como complexos binucleares.

4.2.2 Caracterização por espectroscopia no infravermelho

Na comparação dos espectros de IV do PGG com os complexos, Figura 4.8, é perceptível que há uma diminuição de bandas nas moléculas **PGG-1**, **PGG-2**, **PGG-3** e **PGG-4**, pois a complexação ao centro metálico deixa a estrutura do tripeptídeo rígida em comparação com o ligante livre, modificando os modos vibracionais.

Cada molécula apresenta um espectro de infravermelho característico, sendo necessário a sobreposição de todas as bandas para afirmar que uma estrutura molecular é igual a outra. Como os espectros na região do infravermelho são identidades das moléculas, as mudanças nos modos vibracionais (estiramento e/ou dobramento), podem sugerir que há formação de outras estruturas.

No tripeptídeo os pontos de coordenação são grupos que possuem absorção bem características na região do infravermelho, sendo uma sugestão na

interpretação desses espectros.⁴⁸ No PGG livre, o OH do ácido carboxílico não faz ligação de hidrogênio, o que resultou em uma banda aguda acima de 3500 cm^{-1} . Como a carboxila foi desprotonada gerando um carboxilato, o qual foi proposto como ponto de coordenação, a banda referente ao OH desaparece nos espectros dos complexos, e banda alargada acima de 3000 cm^{-1} foi atribuída a água de hidratação. Outras duas bandas do NH_2 e NH (3076 cm^{-1} e 3244 cm^{-1} respectivamente) corroboraram para o modo de coordenação, pois estas foram deslocadas para número de onda maiores. Os sinais da frequência vibracional de estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ das carboxilas das amidas deslocam para frequências menores, resultado do enfraquecimento da ligação carbono-oxigênio que pode ser melhor observado na Tabela 4.4.

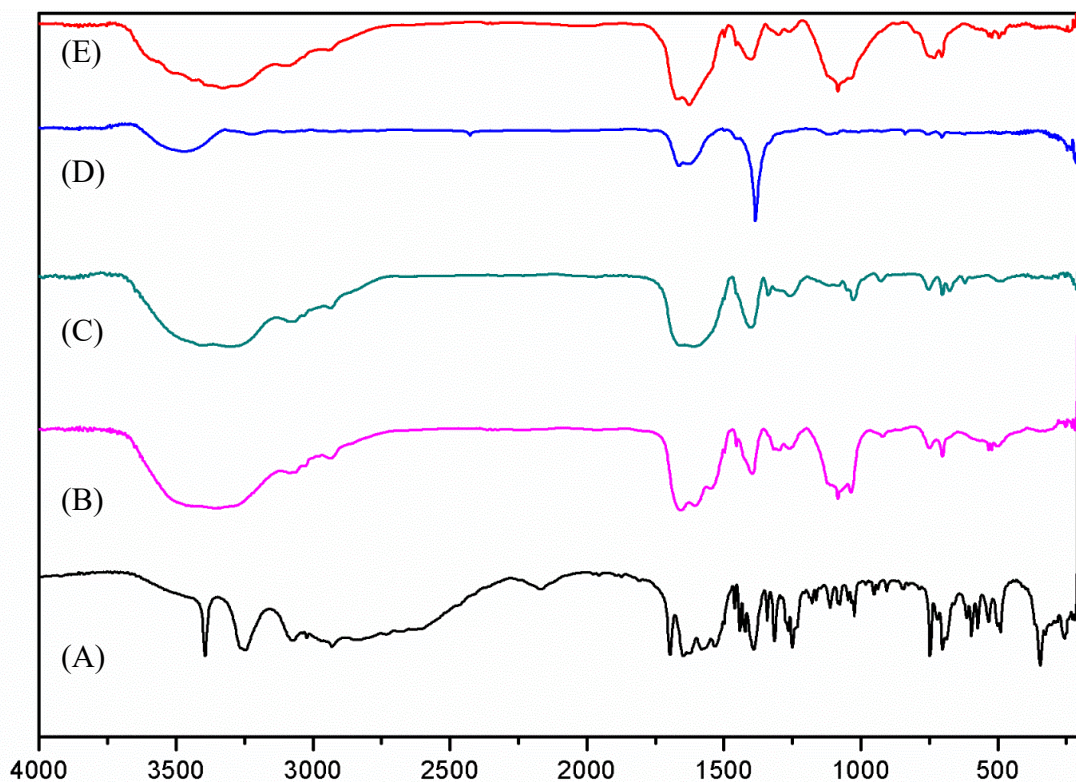


FIGURA 4.8 - Espectros de absorção na região do infravermelho, onde: (A) PGG, (B) **PGG-1**, (C) **PGG-2**, (D) **PGG-3** e (E) **PGG-4**. As mudanças nas bandas vibracionais indicam a formação dos complexos.

TABELA 4.4 – Atribuição tentativa de algumas bandas observadas.

Atribuição	PGG (cm ⁻¹)	PGG-1 (cm ⁻¹)	PGG-2 (cm ⁻¹)	PGG-3 (cm ⁻¹)	PGG-4 (cm ⁻¹)
ν N-H amida	3244	***	3406	***	***
ν N-H ₂	3072	***	3296	***	***
ν C ₁ =O	1695	1659	1656	1662	1668
ν C=O amidas	1647-1581	1605- 1541	1608	1628	1626
δ (NH ₂)	1527	1547	***	***	***
δ_{sim} C-H	1390	1396	1400	***	1398

***Não observado ou sobreposta.

4.2.3 Caracterização por UV-Vis

A caracterização dos complexos por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, foram feitas em dois solventes, água e DMSO. Em água, os espectros dos complexos (**PGG-1**, **PGG-2**, **PGG-3** e **PGG-4**) foram obtidos em várias diluições, exemplificado no espectro do **PGG-1**, Figura 4.9. Todos os complexos apresentaram as transições intramoleculares do ligante nos comprimentos de onda (λ) 194 nm e 212 nm, do tipo $n-\pi^*$. Para **PGG-1**, foi observada uma banda alargada em 260 nm, característica da transição $\pi-\pi^*$. Para os complexos **PGG-3** e **PGG-4**, além das transições intramoleculares do ligante, foram observadas as transições $d-d$ em 694 nm quando utilizada uma solução concentrada (12,2 mM) para as medidas de Uv-Vis.

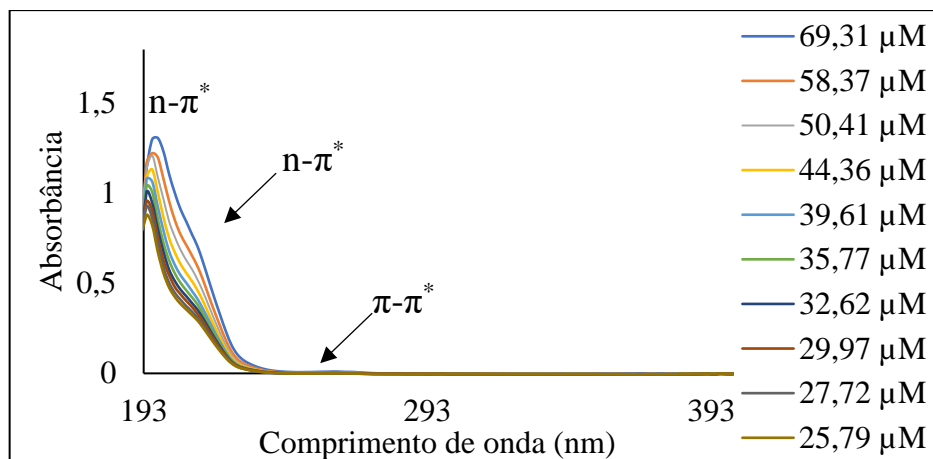


FIGURA 4.9 - Espectro de Uv-Vis, em água, com várias diluições do complexo **PGG-1**.

Os valores de absorvância molar (ϵ) para cada transição estão apresentados na Tabela 4.5, como \log de ϵ . É observado que após a formação dos complexos, não há deslocamentos nas bandas dos ligantes para todos os quelatos formados, apenas o aparecimento das transições $d-d$ do centro metálico do cobre (II), as quais em complexos octaédricos são proibidas por Laporte, devido ao centro de inversão, porém como em solução esses complexos não são estáticos, as vibrações causam distorções que possibilitam essas transições. Em complexos tetraédricos são permitidas por Laporte, pois não há centro de inversão, possibilitando esse tipo de transição. Outro fator importante para a observação das transições $d-d$ é a degenerescência dos orbitais d da primeira série de transição, o desdobramento do seu campo cristalino baixo, permitindo que radiação de baixa energia (visível) possibilitem a transição eletrônica $d-d$, por esse motivo complexos com cobre(II) apresentam colorações azul ou verde, sem considerar cores geradas por bandas de transferência de cargas. A prata(I) e Zn(II) são metais com configuração d^{10} (camada preenchida), o que impossibilita estes de possuírem transições $d-d$. Os pontos de coordenação propostos para esse ligante inviabilizam bandas de transferência de carga metal-ligante (TCML).

TABELA 4.5 – Atribuição das transições do PGG e dos complexos, em água, com os respectivos valores de (ϵ) nos (λ).

	λ (nm)	ϵ [$\log \epsilon$ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Transição
PGG	194	4,63	n- π^*
	212	4,15	n- π^*
	262	-	π - π^*
PGG-1	194	3,85	n- π^*
	212	3,91	n- π^*
	262	2,12	π - π^*
PGG-2	194	4,44	n- π^*
	210	3,96	n- π^*
	262	-	π - π^*
PGG-3	194	4,39	n- π^*
	212	4,29	n- π^*
	694	1,39	<i>d-d</i>
PGG-4	194	4,14	n- π^*
	212	3,85	n- π^*
	694	1,3	<i>d-d</i>

Nos espectros de Uv-Vis obtidos em DMSO para os complexos **PGG-1** e **PGG-2** apresentaram as bandas intramoleculares do ligante, porém com uma intensidade menor, nos comprimentos de 264 nm, 272 nm e 288 nm, essa última observada só no **PGG-1**. Uma banda bem alargada entre 358 nm e 558 nm foi identificada no espectro do **PGG-1**, Figura 4.10, sendo das transições π - π^* . O complexo **PGG-2** não teve uma boa solubilidade em DMSO, gerando um espectro com baixa intensidade nas bandas de absorção no Uv-Vis, apresentando uma banda em 374 nm, atribuída a transição π - π^* .

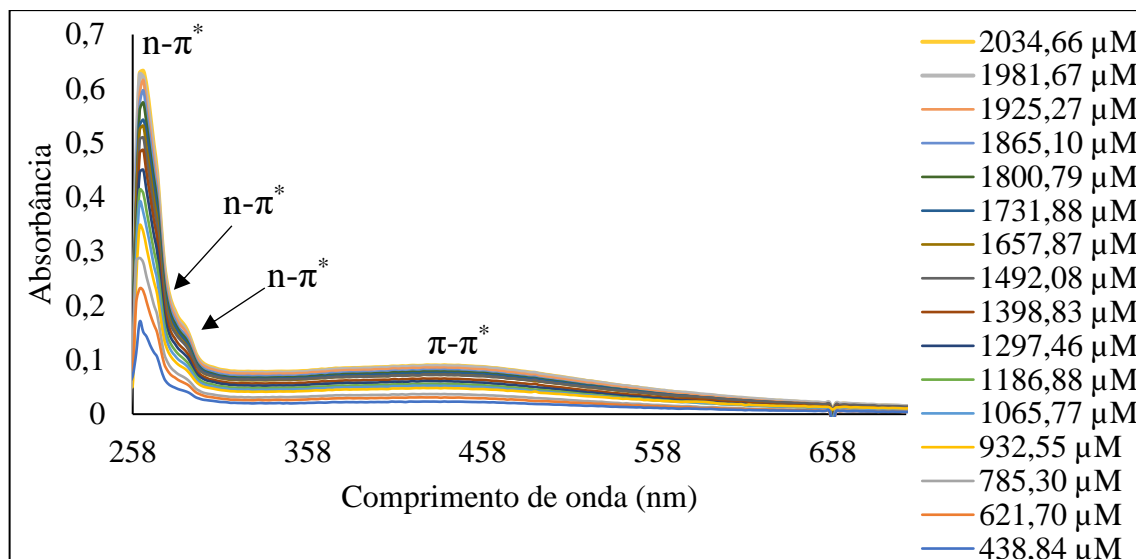


FIGURA 4.10 - Espectro de absorção na região do Uv-Vis, feito em DMSO, do **PGG-1**.

Os espectros obtidos em DMSO para os complexos **PGG-3** e **PGG-4**, apresentaram duas bandas, exemplificado na Figura 4.11, a primeira no comprimento de onda 266 nm e a segunda em 694 nm, sendo ambas bandas largas. A primeira banda é atribuída a transições $n-\pi^*$, havendo uma sobreposição de bandas das diferentes carboxilas. A segunda é referente a transição $d-d$ do centro metálico cobre(II).

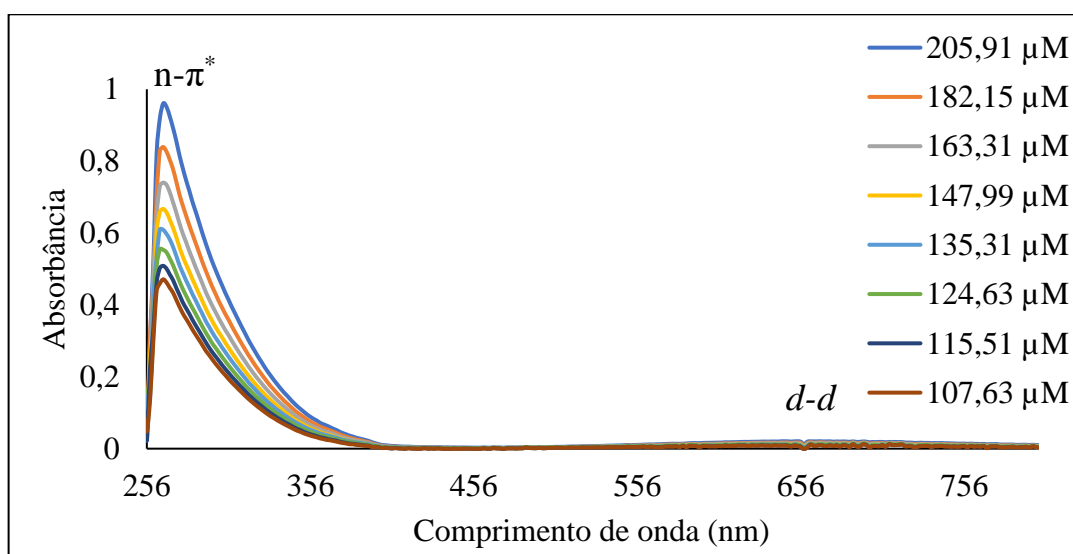


FIGURA 4.11 - Espectro de absorção na região do Uv-Vis do **PGG-4**.

Os valores de absorvidade molar para os complexos solubilizados em DMSO, estão apresentados na Tabela 4.6.

TABELA 4.6 - Atribuição das transições do PGG e dos complexos, em DMSO, com os respectivos valores de (ϵ) com relação a (λ).

	λ (nm)	ϵ [$\log \epsilon$ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Transição
PGG	262	2,15	$n-\pi^*$
	272	1,99	$n-\pi^*$
	305	-	$\pi-\pi^*$
PGG-1	264	2,52	$n-\pi^*$
	272	2,35	$n-\pi^*$
	288	1,92	$n-\pi^*$
	438	1,66	$\pi-\pi^*$
PGG-2	266	2,50	$n-\pi^*$
	272	2,44	$n-\pi^*$
	374	-	$\pi-\pi^*$
PGG-3	266	3,44	$n-\pi^*$
	664	1,71	$d-d$
PGG-4	266	3,65	$n-\pi^*$
	650	1,82	$d-d$

4.2.4 Caracterização do [Metal(PGG)] por RMN

O espectro de RMN de ^1H do complexo **PGG-1**, Figura 4.12, mostra os valores das integrais abaixo do espectro, o deslocamento químico acima e os hidrogênios estão representados em seus respectivos sinais. Os hidrogênios da posição 2H-7 tem deslocamento químico (δ) de 2,72 e 2,99 com multiplicidade de dd para ambos os sinais, os hidrogênios da posição 2H-2 encontram-se em δ 3,55 com multiplicidade de d , o hidrogênio da posição H-6 ressona em δ 3,70, seu sinal tem uma multiplicidade de um tripleto aparente. Os hidrogênios da posição

2H-4 encontram-se em δ 3,64 e δ 3,79, com multiplicidade de *dd* para ambos. Os hidrogênios aromáticos da fenilalanina, possuem um multiplete em δ 7,25, os prótons das posições H_{N'} e H_{N''} possuem deslocamentos δ 7,71 e 8,72, respectivamente.

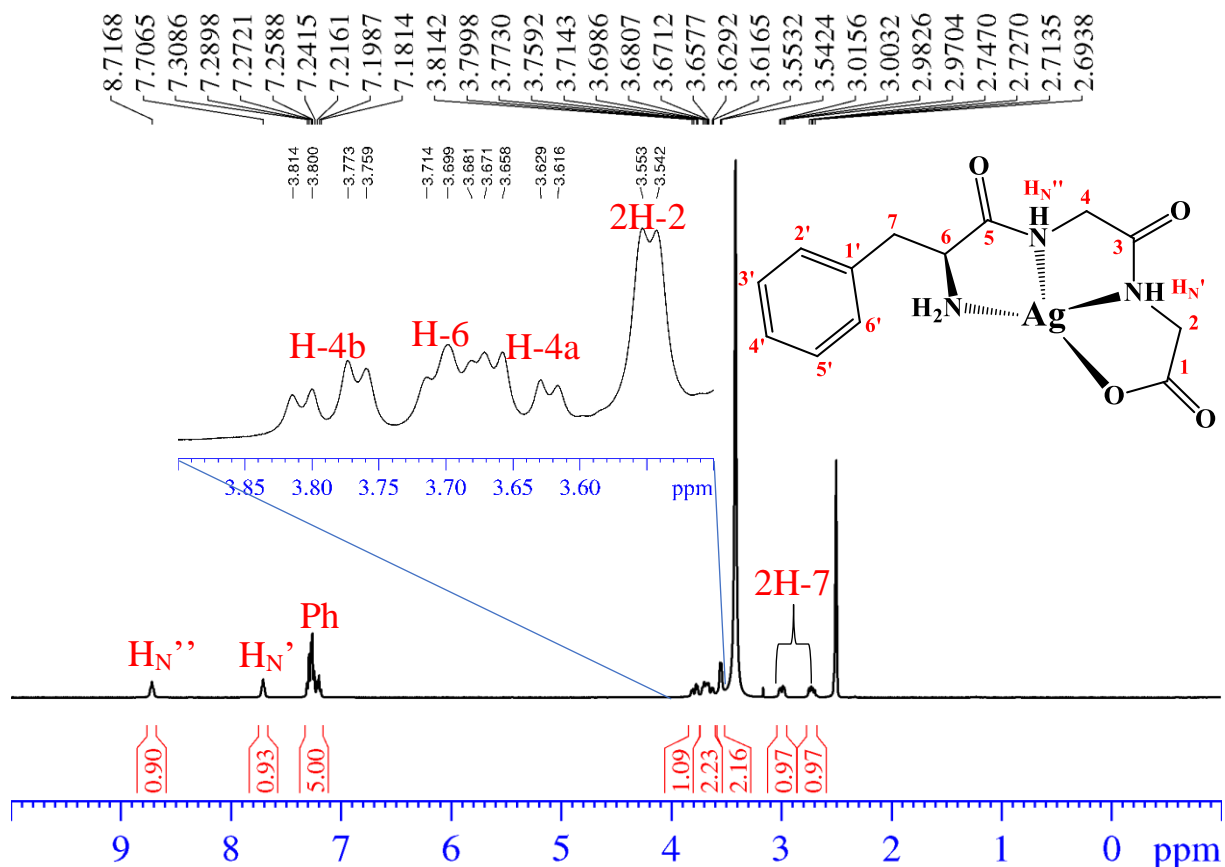


FIGURA 4.12 - Espectro de RMN de ¹H do **PGG-1** em DMSO-d₆ (9,4 T), com os valores das integrais abaixo do espectro, deslocamento acima e atribuição dos hidrogênios para cada sinal referente as posições da estrutura do complexo.

Na comparação dos espectros de RMN de ¹H do complexo com o ligante PGG, todos os sinais dos hidrogênios do **PGG-1** foram deslocados indicando a formação do complexo, Figura 4.13, com exceção dos hidrogênios do anel aromático. Os hidrogênios da posição 2H-4, no espectro do PGG possuem multiplicidade de duplete, pois acoplam com hidrogênio vicinal sentindo o mesmo ambiente químico, já no complexo, esses possuem deslocamentos

químicos diferentes devido a formação de um novo centro estereogênico no nitrogênio da posição $H_{N''}$. Essa formação do centro estereogênico fez os hidrogênios 2H-4 sentirem ambientes químicos diferentes, ocasionando em um acoplamento geminal (acoplam entre si) e um acoplam vicinal com o hidrogênio da posição $H_{N''}$, o que é refletido nos deslocamentos diferentes desses sinais e na multiplicidade deles.

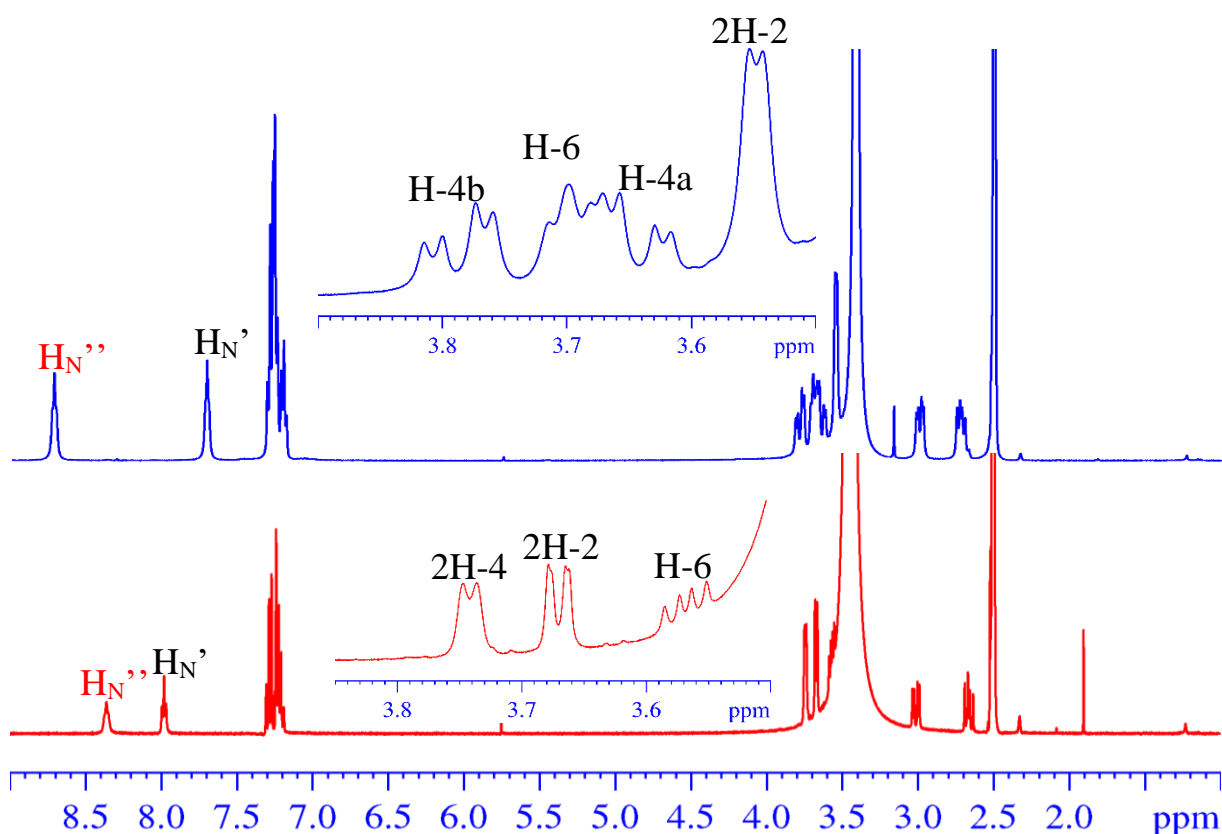


FIGURA 4.13 - Comparação dos espectros de RMN de 1H do tripeptídeo PGG, em vermelho, com o complexo **PGG-1**, em azul, [DMSO- d_6 (9,4 T)], onde os deslocamentos dos hidrogênios em cada sinal do espectro indica a formação do complexo. Dando ênfase ao sinal do próton 2H-4 que tem multiplicidade de d no **PGG** e dd no complexo.

Na Tabela 4.7, é apresentado os deslocamentos dos hidrogênios para o PGG e dos complexos **PGG-1**, **PGG-2** e **PGG-3** respectivamente, os hidrogênios 2H-4 possuem dois deslocamentos diferentes em cada complexo,

indicando que a formação do centro estereogênico é comum para todos os quelatos formados com os centros metálicos Ag^+ , Zn^{2+} e Cu^{2+} .

Tabela 4.7 - Valores dos deslocamentos químicos dos prótons do PGG e dos complexos $[\text{Ag}(\text{PGG})]$, $[\text{Zn}(\text{PGG})]\text{CH}_3\text{COO}$ e $[\text{Cu}(\text{PGG})]\text{NO}_3$.

Composto	$\delta_{2\text{H-2}}$	$\delta_{2\text{H-4}}$	$\delta_{2\text{H-7}}$	$\delta_{\text{H-6}}$	Ph	$\delta_{\text{H}_\text{N}'}$	$\delta_{\text{H}_\text{N}''}$
PGG	3,74	3,67	2,67 e 3,02	3,58	7,25	7,98	8,36
PGG-1	3,55	3,64 e 3,79	2,72 e 2,99	3,70	7,25	7,71	8,72
PGG-2	3,51*	3,62 e 3,72	2,69 e 2,96	3,56*	7,25	7,63	8,44
PGG-3	X	2,75 e 3,45*	2,88 e 3,10	4,07	7,22	8,16	7,89

*Junto do sinal da água. X= não observado.

O hidrogênio da posição H_N'' no PGG encontram-se em δ 8,36, após a formação do complexo de prata há uma desblindagem desse hidrogênio para δ 8,72. O mesmo padrão é observado no complexo de zinco, ocorrendo uma desblindagem desse hidrogênio para δ 8,44. Em ambos os complexos o hidrogênio da posição H_N' é blindado, porém, no complexo **PGG-3**, o hidrogênio H_N'' é blindado para δ 7,89 e o H_N' é desblindado para δ 8,16 em relação ao ligante livre,

Essas variações seguem um padrão nos centros metálico Ag^+ e Zn^{2+} , pois esses íons são d^{10} , justificando a similaridade no deslocamento desses hidrogênios, já o centro metálico Cu^{2+} é um íon d^9 , paramagnético, o que corrobora para a divergência nos deslocamentos químicos dos hidrogênios das amidas.

A comparação entre os mapas de contorno HSQC na região alifática do PGG com o complexo **PGG-1**, Figura 4.14, evidencia a formação do centro estereogênico, já mencionado, e a distinção dos sinais dos hidrogênios 2H-6 e 2H-

4. Analisando apenas o mapa de contorno do PGG, em vermelho, o carbono C-4 apresenta um único sinal de correlação com seus hidrogênios, pois estes estão no mesmo ambiente químico, gerando um mesmo deslocamento para ambos os hidrogênios. Quando comparamos esse mesmo carbono C-4 no mapa de contorno do complexo **PGG-1**, em azul, aparecem duas correlações, as quais são justificadas pela formação do centro estereogênico. A correlação do C-6 com o H-6 no mapa de contorno do complexo mostra que o tripleto aparente está entre os sinais dos prótons da posição H₄.

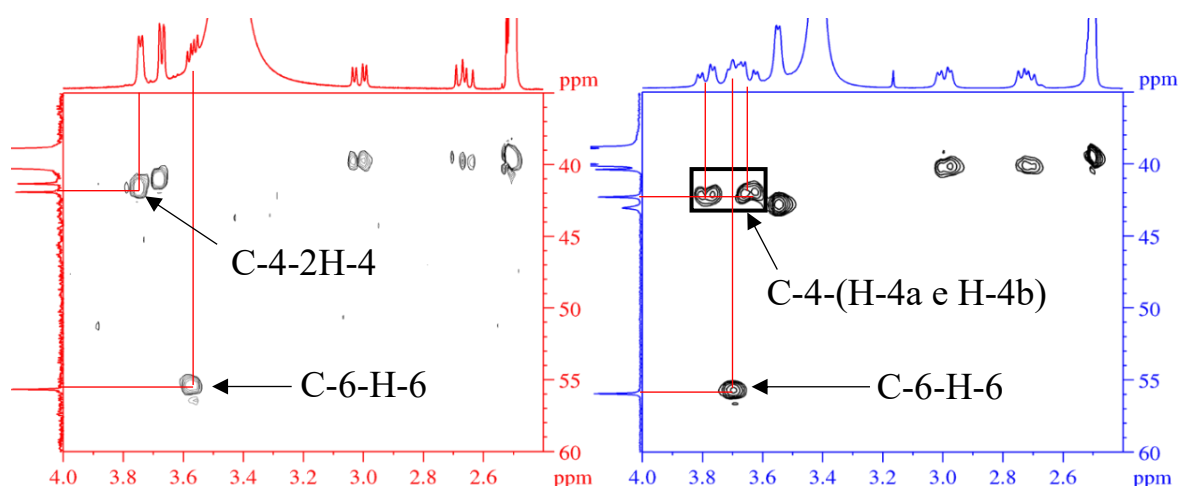


FIGURA 4.14 - Em vermelho mapa de contorno HSQC do **PGG** e em azul mapa de contorno HSQC do **PGG-1**, [DMSO-d₆ (9,4 T)], onde pode ser observado desdobramento de sinais do 2H-4 e o deslocamento do hidrogênio metínico H-6.

O complexo com o centro metálico de zinco, apresentou similaridade nos deslocamentos em relação ao complexo com a prata, observado na Tabela 4.7, possuindo maior diferença nos deslocamentos dos hidrogênios H-6 e 2H-2, os quais foram distinguidos no mapa de contorno HSQC.

Na ampliação do mapa de contorno HSQC da região alifática para o complexo **PGG-2**, Figura 4.15, é observado as duas correlações dos 2H-4 com o C-4 devido a formação do centro estereogênico, porém para esse centro metálico, os prótons das posições H-6 e 2H-2 tem seus sinais junto do sinal da água, e seus

δ foram atribuídos considerando o centro do sinal de cada correlação. A correlação da metila do acetato é observada, indicando a presença do contra-íon.

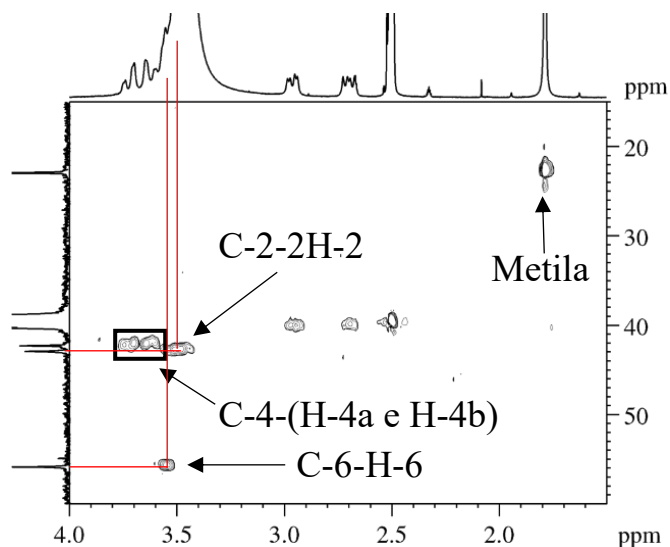


FIGURA 4.15 - Mapa de contorno HSQC do **PGG-2**, [DMSO- d_6 (9,4 T)].

Na comparação dos espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do PGG com o complexo **PGG-1**, Figura 4.16, é mostrada uma ampliação da região dos carbonos acila, para a visualização no espectro do deslocamento do carbono C-1. No PGG tal carbono tem δ de 171,0, enquanto no complexo esse carbono deslocou-se para δ de 172,7, confirmando que o carboxilato formado com a adição de NaHCO_3 está sendo um sítio de coordenação ao centro metálico. O carbono C-4 no PGG tem δ de 41,3, já no complexo esse carbono é desblindado para δ 42,3, e o C-2 possui δ de 43,1, concluindo-se que o carbono metilênico está mais desblindado. Na ampliação da região de 36 ppm - 46 ppm, no complexo é observado o sinal do C-7, o qual estava junto do sinal residual do solvente no PGG.

Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos do PGG e dos complexos estão na Tabela 4.8, onde pode ser feita uma comparação com o ligante livre com as moléculas sintetizadas. Os valores de deslocamentos para os complexos de zinco e prata são similares, apenas o carbono da posição C-1' que tem uma diferença de 1,1 ppm entre os complexos. Quando comparados ao centro

metálico de cobre, o sinal do carbono C-1' varia em quase 2 ppm e um dos carbonos acilas não é observado no espectro de RMN de ^{13}C , o qual foi atribuído ao átomo de carbono da posição C-1. Os carbonos das posições C-3 e C-5 sofrem uma blindagem de 3,2 ppm e 6,4 ppm, respectivamente, não podendo ser diferenciados no espectro, pois não foi observado nenhuma correlação no mapa de contorno HMBC dos complexos de cobre(II).

O campo magnético eletrônico causado pelo elétron desemparelhado do centro metálico de cobre(II) justifica os valores dos deslocamentos dos carbonos C-3 e C-5, e o não aparecimento do sinal do carbono C-1.

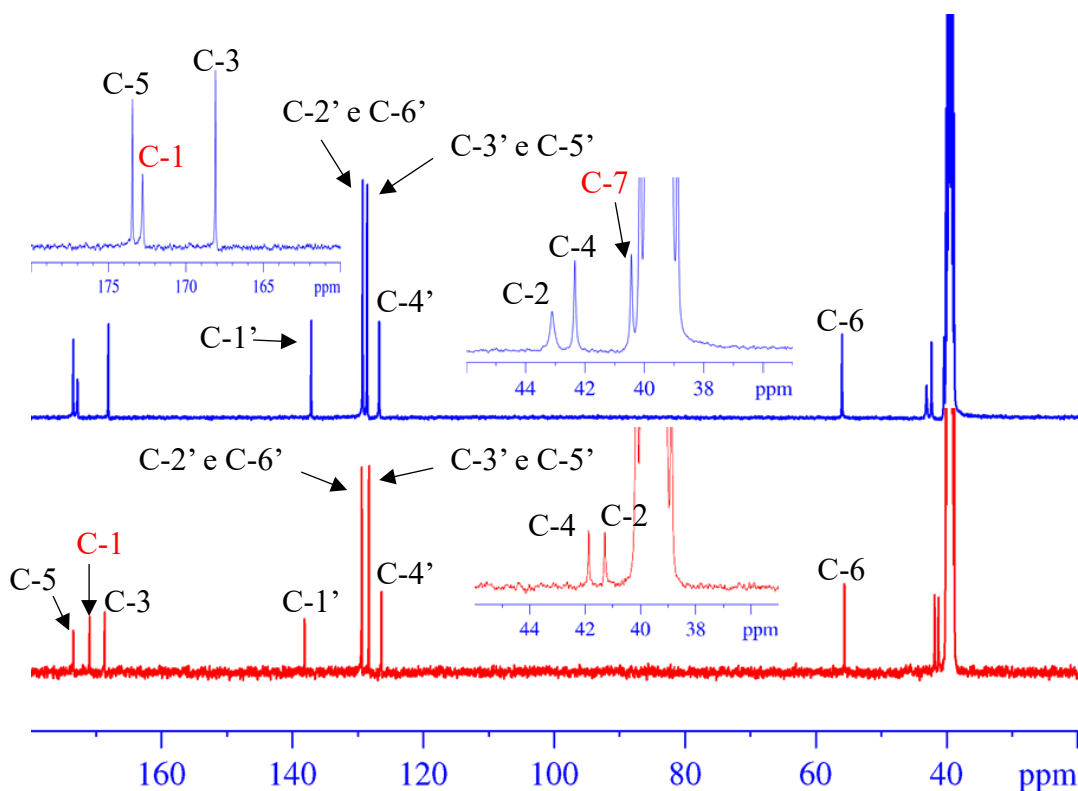


FIGURA 4.16 - Sobreposição dos espectros de RMN de ^{13}C do **PGG** com o **PGG-1** (vermelho e azul, respectivamente), $[\text{DMSO-d}_6(9,4\text{ T})]$. Na ampliação da região dos carbonos alifáticos, o sinal do C-7 é observado no complexo, C-2 e C-4 deslocam para δ maiores, C-2 com maior desblindagem. Na ampliação da região de carbono acila, C-1, destacado em vermelho, tem maior deslocamento, indicando a coordenação pelo carboxilato.

TABELA 4.8 - Deslocamento químico dos carbonos do PGG e dos complexos.

Carbono	PGG	PGG-3	PGG-4	PGG-1	PGG-2
	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
1'	138,1	135,8	135,8	137,0	138,2
2' e 6'	129,4	130,0	130,0	129,1	129,3
3' e 5'	128,3	128,0	128,0	128,4	128,2
4'	126,3	126,6	126,6	126,6	126,2
7	40,6	38,6	38,6	40,4	40,3
6	55,7	55,3	55,3	56,0	55,9
5	173,4	167,0*	167,0*	173,5	174,2
4	41,3	44,8 ^a	44,8 ^a	42,3	42,3
3	168,7	165,5*	165,5*	168,0	168,1
2	41,9	43,5	43,5	43,1	42,9
1	171,0	X	X	172,7	172,6
Metila do acetato					22,9

X = Não observado. O acetato é referente apenas para o complexo **PGG-2**.

Dentre os complexos, o **PGG-1** apresentou todas as correlações no mapa de contorno HMBC, possibilitando diferenciar os carbonos das posições C-1, C-3 e C-5, como os deslocamentos dos carbonos nos complexos de prata e zinco são similares, a atribuição dos carbonos acilas para o **PGG-2** foi baseada no complexo de prata. Ressaltando que o carbono acila do acetato tem correlação no HMBC a $^2J_{CH}$ com os hidrogênios da metila, este foi diferenciado dos demais carbonos acilas do complexo **PGG-2**.

No **PGG-1** o carbono C-1 tem correlação apenas com o 2H-2 a duas ligações, o C-3 tem correlações a duas ligações com o hidrogênio H_N', três ligações com 2H-2 e a duas ligações com 2H-4. O carbono C-5 tem correlações a

duas ligações com os hidrogênios H_N' e H-6, a três ligações com os hidrogênios das posições 2H-7 e 2H-4. Na Tabela 4.9, têm-se todas as correlações observadas.

TABELA 4.9 – Dados de RMN de ¹³C e HMBC para o **PGG-1**.

Carbono	δ_C (ppm)	HMBC	
		$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
1'	137,0	2H-7 e Ph	Ph*
2' e 6'	129,1	Ph*	2H-7 e Ph*
3' e 5'	128,4	Ph*	Ph*
4'	126,6	Ph*	Ph*
7	40,4	H-6	H-2' e H-6'
6	56,0	2H-7	-
5	173,5	H-6 e H _N '	2H-7 e 2H-4
4	42,3	-	-
3	168,0	2H-4	H _N ' e 2H-2
2	43,1	-	-
1	172,7	2H-2	-

Os experimentos 1D para o complexo de cobre contendo o contra-íon nitrato, apresentaram sinais no RMN de ¹³C e ¹H, já experimentos 2D (mapas de contorno HSQC e HMBC) não apresentaram nenhum sinal, o que torna difícil a atribuição dos hidrogênios. Entretanto, com a mudança do sal nitrato de cobre para o tetrafluoroborato de cobre, o complexo formado a partir do novo sal apresentou os mesmos sinais no deslocamento dos hidrogênios em comparação com o complexo contendo nitrato, com uma única diferença de um sinal em δ 6,54, Figura 4.17, que só apareceu no complexo com o BF₄⁻, como todos os outros sinais apresentaram os mesmos deslocamentos, atribuiu-se os hidrogênios do **PGG-3** embasado nas correlações observadas no **PGG-4**.

Os complexos com o cobre(II) tem seus sinais alargados devido a contribuição do momento magnético do elétron desemparelhado, o qual possui momento magnético eletrônico 10^3 vezes maior que o momento magnético nuclear dos hidrogênios.⁴⁹ Gerando um campo magnético local(B_{loc}).

O íon paramagnético afeta o tempo de relaxação T_2 (relaxação transversal), fazendo com que este seja menor, pois interação do spin do elétron com o spin de cada núcleo dos hidrogênios reduz rapidamente a magnetização transversal, fazendo o T_1 (relaxação longitudinal) retornar mais rapidamente ao seu estado inicial,⁵⁰ isso implica em alargamento e baixa resolução do sinal dos hidrogênios.

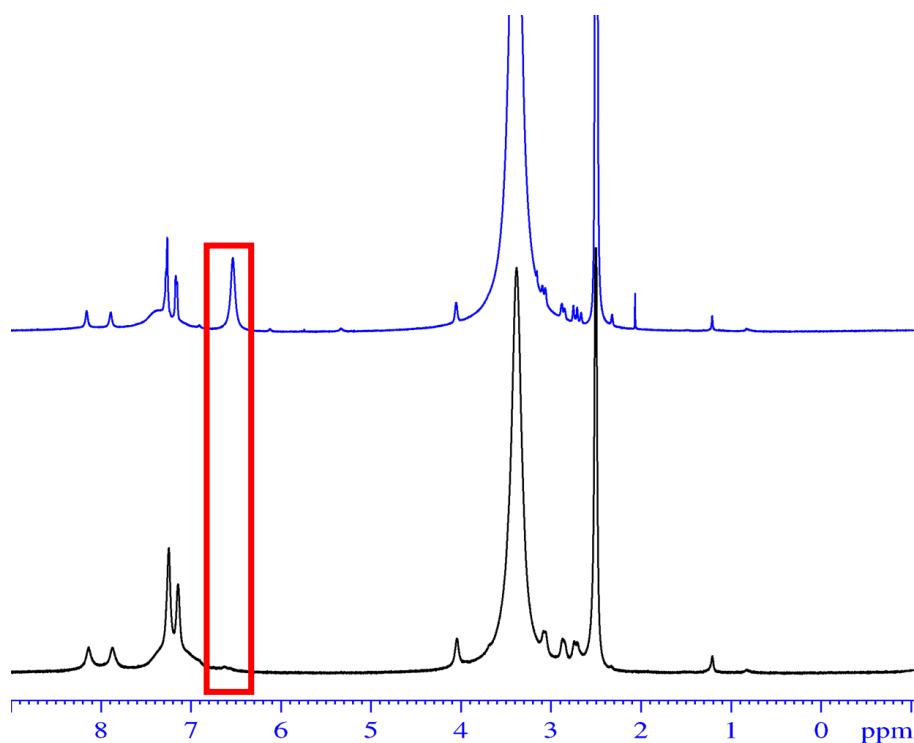


FIGURA 4.17 - Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H dos complexos **PGG-3** em preto e **PGG-4** em azul, [DMSO- d_6 (9,4 T)],destacando a região do espectro onde o complexo [Cu(PGG)]BF₄ apresenta um sinal diferente do seu análogo.

O mapa de contorno HSQC do complexo **PGG-4**, Figura 4.18, mostra que o sinal observado em δ 6,54, não tem correlação com o carbono,

sugerindo a hipótese de que não foi observado por algum efeito no tempo de relaxação.

É observada uma correlação de um carbono em 44,8 ppm com um hidrogênio em 3,88 ppm, porém seus sinais nas projeções não são observados, esta correlação foi atribuída ao CH₂ da posição C-2, pois o carbono metínico (C-6) é diferenciado no DEPT 135, possuindo um δ 55,3, este carbono tem correlação no HSQC com o sinal do hidrogênio em δ 4,07. Os sinais dos hidrogênios do carbono C-4 são desdobrados, confirmando o aparecimento do centro estereogênico para os complexos de cobre(II) com o PGG, com uma variação no deslocamento químico maior que as observadas nos complexos de prata e de zinco, causada pela contribuição do campo magnético do elétron desemparelhado. O carbono da posição C-7 está junto do sinal residual do solvente usado para análise.

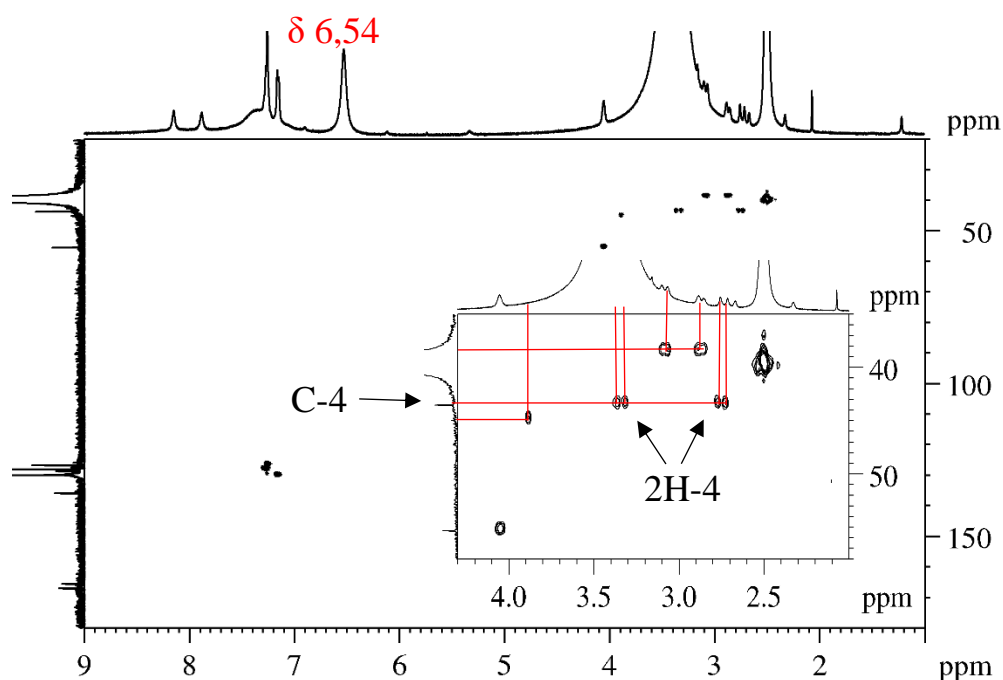


FIGURA 4.18 - Mapa de contorno HSQC, [DMSO-d₆ (9,4 T)], para o complexo **PGG-4** mostrando as correlações não observadas no complexo **PGG-3**.

Um espectro de RMN de ^1H com uma expansão da janela de aquisição foi adquirido, Figura 4.19, nesse espectro nenhum sinal fora da janela comum foi observado. Apesar de todos os hidrogênios terem sido identificados pelo mapa de contorno HSQC, considerando a correlação C-2-2H-2, o experimento em janela expandida para moléculas contendo íons paramagnéticos pode mostrar sinais fora da janela de aquisição, conhecido como “chemical shift”, esse deslocamento químico paramagnético é mais pronunciado quando moléculas de solventes estão coordenadas com o centro metálico. O resultado de não mostrar sinais fora da janela, indica que não há moléculas de solvente coordenada ao Cu^{2+} . O espectro em janela ampliada para o complexo **PGG-3** mostrou a mesma característica, (Apêndice).

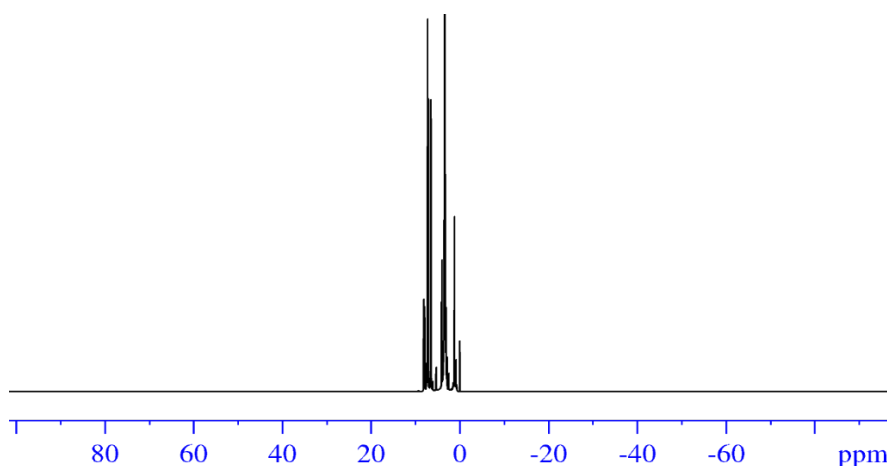


FIGURA 4.19 - Espectro de RMN de ^1H , [DMSO- d_6 (9,4 T)], para o complexo **PGG-4** em janela expandida, mostrando que não há sinais de hidrogênios fora da região de 0 – 20 ppm.

4.2.5 Caracterização por espectrometria de massas

Nas sínteses com o PGG o carboxilato balanceia sua carga negativa com o centro metálico, fazendo com que os complexos com o cobre e zinco tenham carga 1+, naturalmente são íons positivos. O complexo com a prata é uma molécula neutra, entretanto, quando solubilizado em água o **PGG-1** é protonado,

formando uma molécula com carga 1+, por esse motivo foi possível sua identificação na espectrometria de massas. Na Tabela 4.10, estão apresentados os valores de m/z para cada complexo no *fullscan*, valor esse que é usado para calcular o erro da massa em ppm, o erro aceitável é até 5 ppm.

TABELA 4.10 - Valores das massas teóricas e calculadas para os complexos [Metal(PGG)].

Complexos	Massas teórica (m/z)	Massa experimental (m/z)	(erro em ppm)
PGG-1*	386,0270	386,0268	-0,518098
PGG-2	342,0432	342,0420	-3.508329
PGG-3	341,0437	341,0448	3,225393
PGG-4			

*Molécula protonada.

O espectro de massas do complexo **PGG-1**, Figura 4.20, com ampliação da região de 368-408 m/z , destacando apenas o pico do íon precursor m/z 386 para a observação do padrão isotópico da prata observado com o teórico no quadro em cinza, esse padrão isotópico do metal nos picos de m/z (329, 283 e 226) no espectro de MS/MS indica que a complexação do PGG ao centro metálico Ag(I) possui estabilidade na ligação metal-ligante, Figura 4.21, apenas o íon 120 não mostrou o padrão isotópico, indicando que a prata fica coordenada até o íon 226, com a saída do metal, o íon 120 é originado. Na Figura 4.22 têm-se algumas propostas de fragmentações, o m/z 329 é originado com as clivagens das ligações peptídicas ou com a clivagens das ligações das carboxilas com os carbonos α . A protonação no oxigênio ligado a Ag(I) faz com que este fique positivo e recupere os pares de elétrons usados na coordenação e libere HCOOH, originando o íon m/z 283, e deste os íons m/z 226 e 283 são formados com a clivagem da ligação carbono α com a carboxila. Do íon m/z 283 é originado o íon m/z 120.

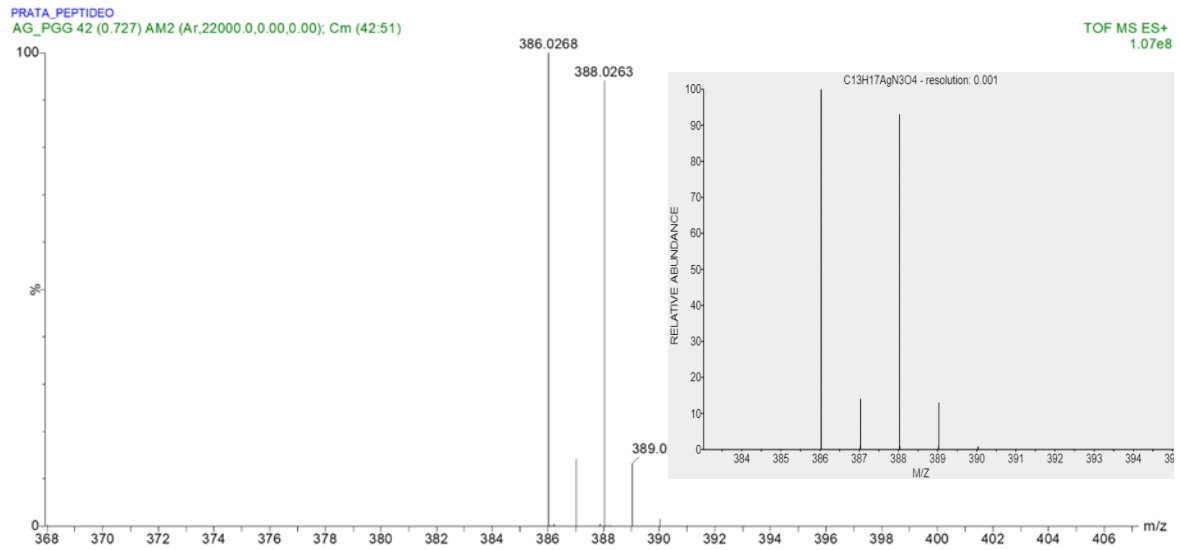


FIGURA 4.20 - Espectro de massas MS com ampliação da região m/z 368-408 para visualização dos sinais com complexo **PGG-1**. O padrão isotópico teórico é demonstrado no quadro cinza.

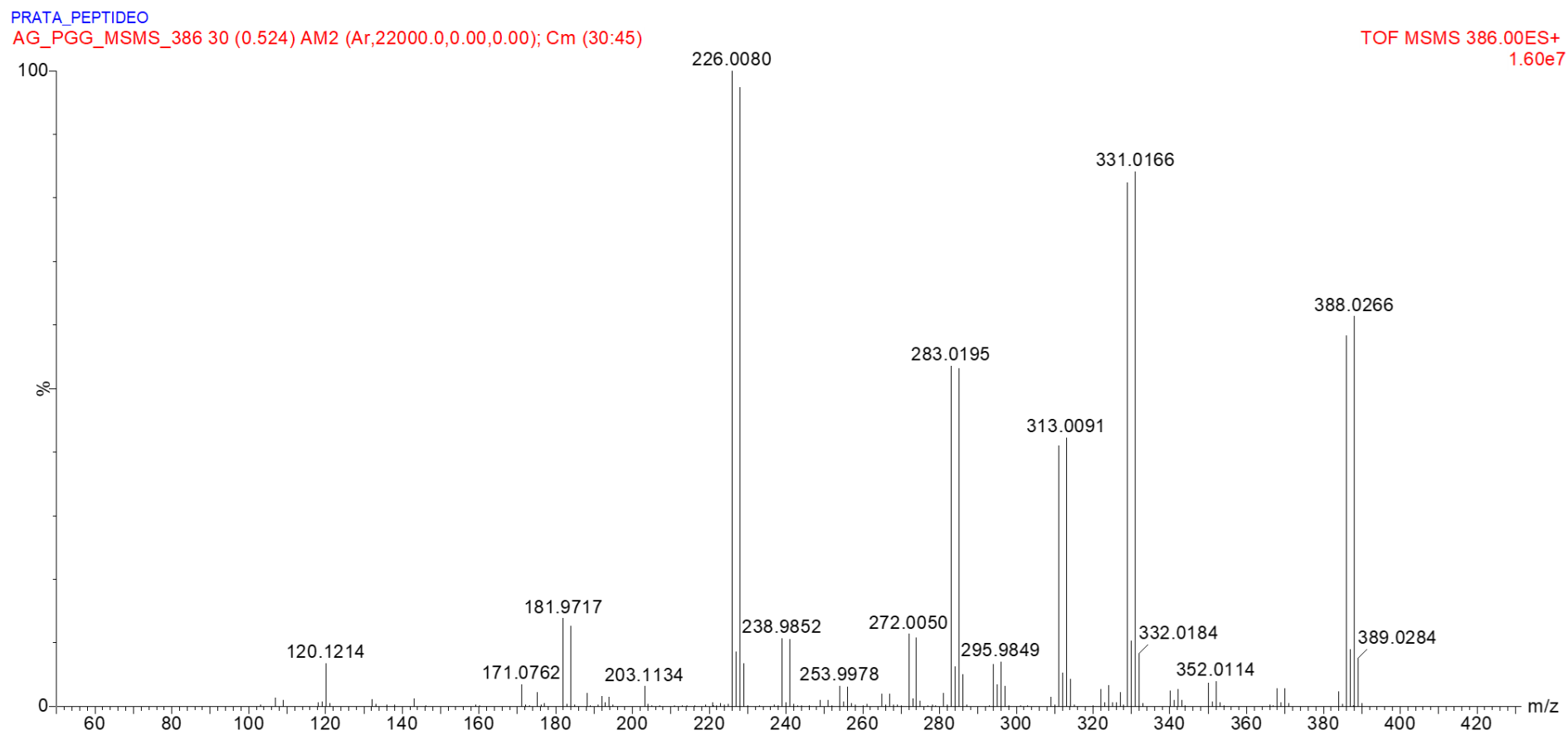


FIGURA 4.21 - Espectro de MS/MS do complexo **PGG-1**.

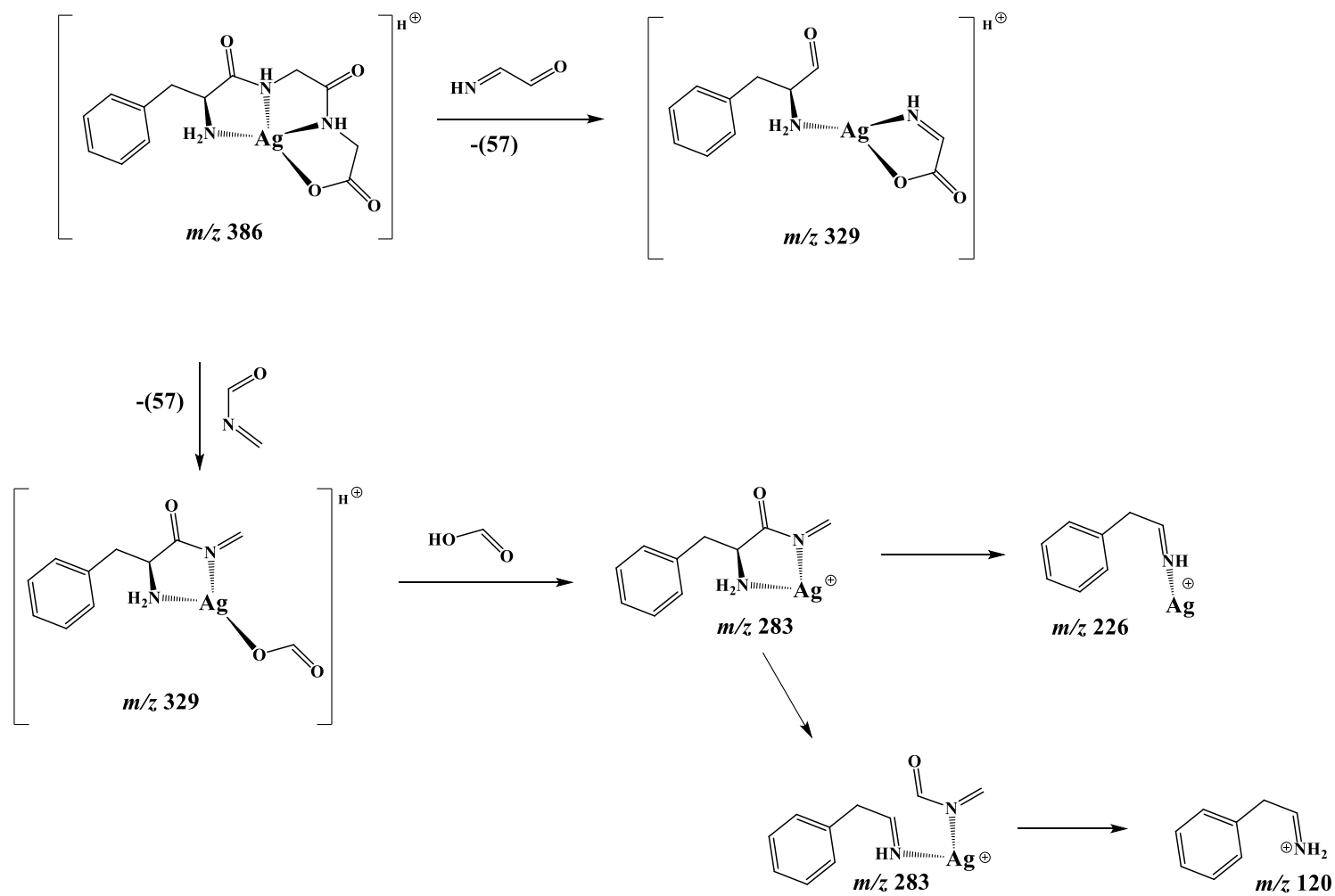


FIGURA 4.22 – Algumas propostas de fragmentações para o PGG-1.

O processo de ionização por eletrospray (IES) gerou outras espécies na fonte de ionização, essas espécies foram mais ionizáveis que a molécula de interesse, acarretando em uma supressão do sinal do complexo **PGG-2**, como pode ser observado no (Apêndice). Com a ampliação da região de m/z 335-357, o padrão isotópico do metal foi observado no íon m/z 342, Figura 4.23, proposto para o complexo sintetizado.

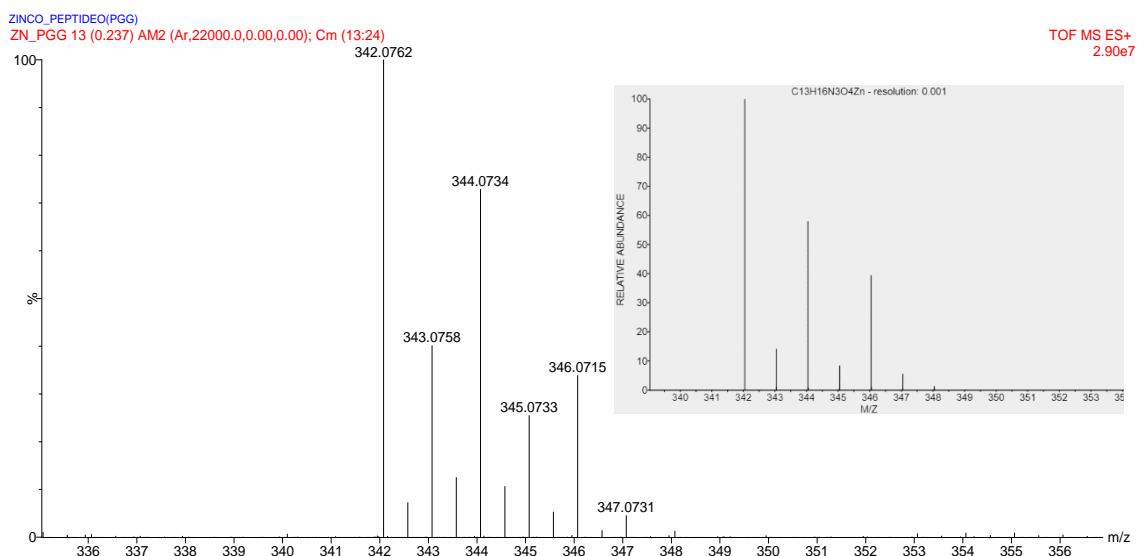


FIGURA 4.23 - Espectro de MS do **PGG-2** com ampliação da região de 335-357, para comparação dos padrões isotópicos teóricos e observados, caracterizando a formação do complexo.

O espectro MS/MS do íon positivo m/z 342, Figura 4.24, gerou os íons que continham o padrão isotópico do zinco m/z (324, 314 e 296), o íon m/z 120 foi observado para esse complexo. A proposta de fragmentação de alguns dos íons está apresentada na Figura 4.25.

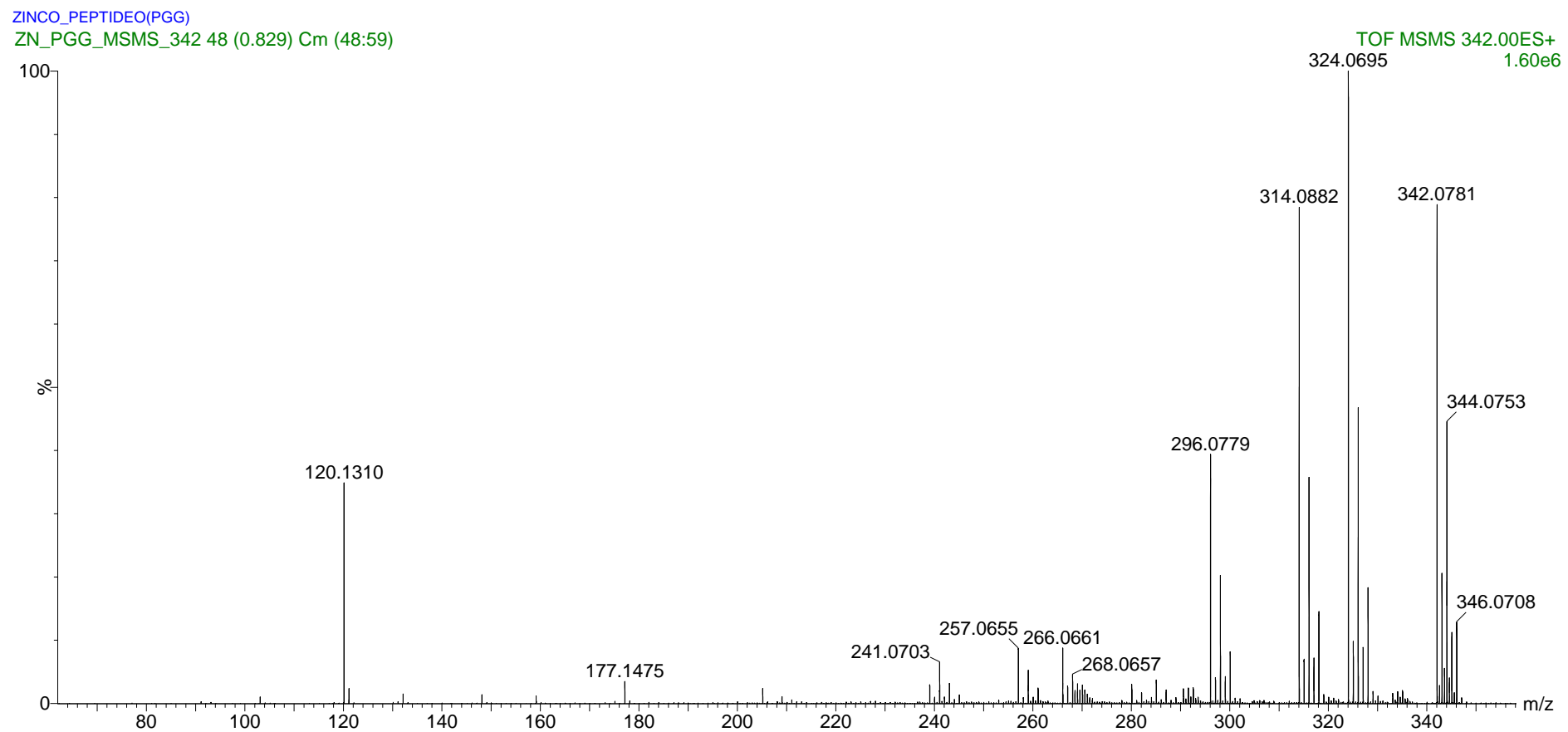


FIGURA 4.24 - Espectro MS/MS do complexo de **PGG-2**.

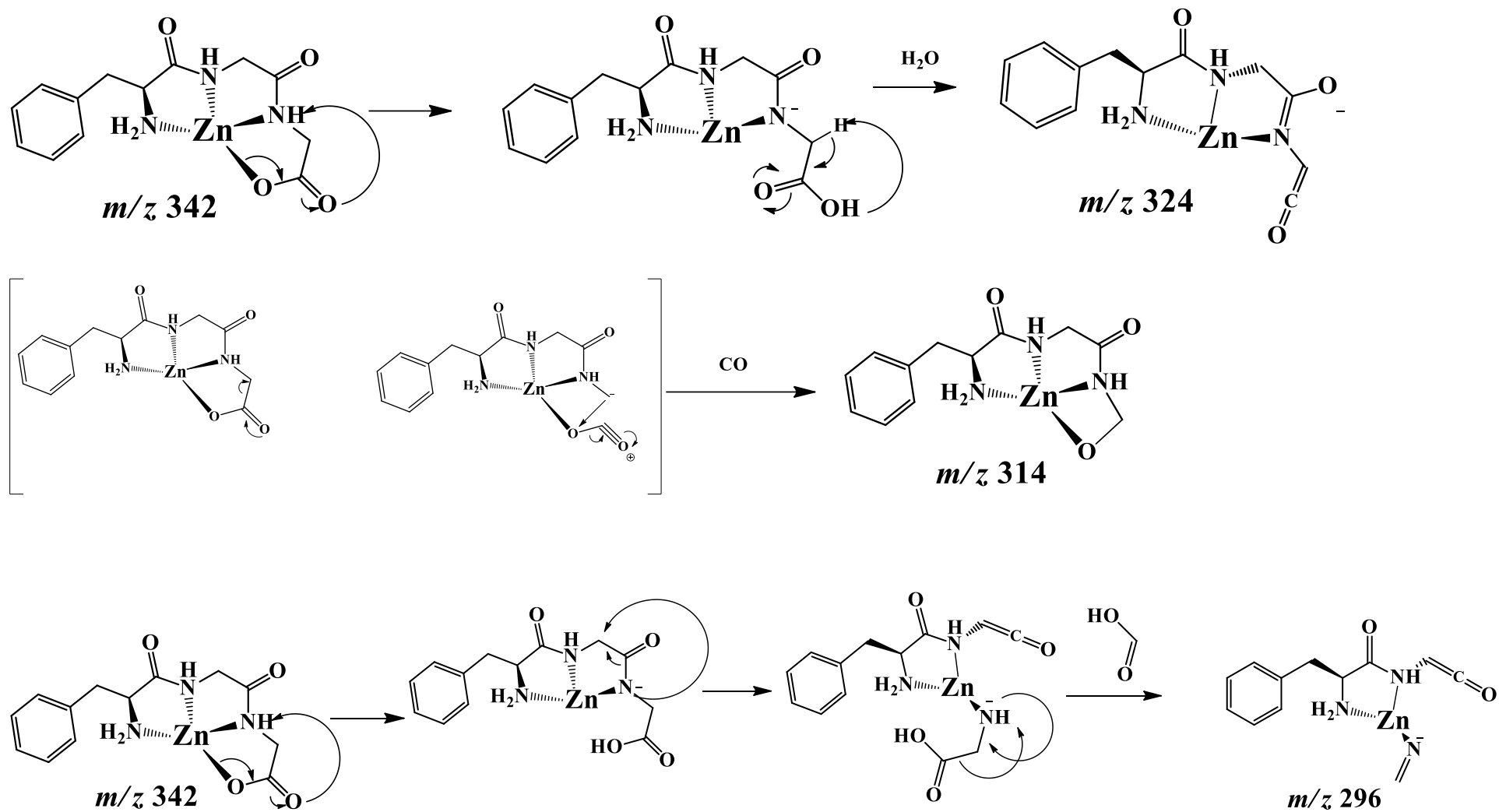


Figura 4.25 - Algumas propostas de fragmentações do PGG-2.

O complexo **PGG-3** apresentou o padrão isotópico do centro metálico Cu(II), no íon m/z 341 (Figura 4.26), o qual foi fragmentado e forneceu o espectro de MS/MS (Figura 4.27). Na fragmentação desse íon têm-se o padrão isotópico do metal nos íons m/z (267, 239 e 182). O íon m/z 120, foi comum para todos os complexos com o PGG. Para o **PGG-3** e **PGG-4** não foi possível atribuir propostas de fragmentações.

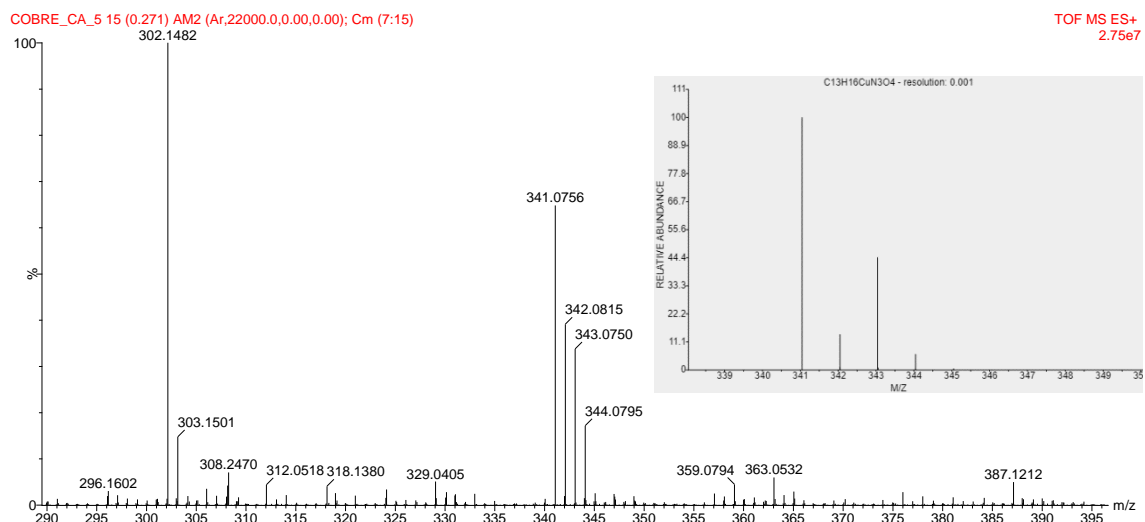
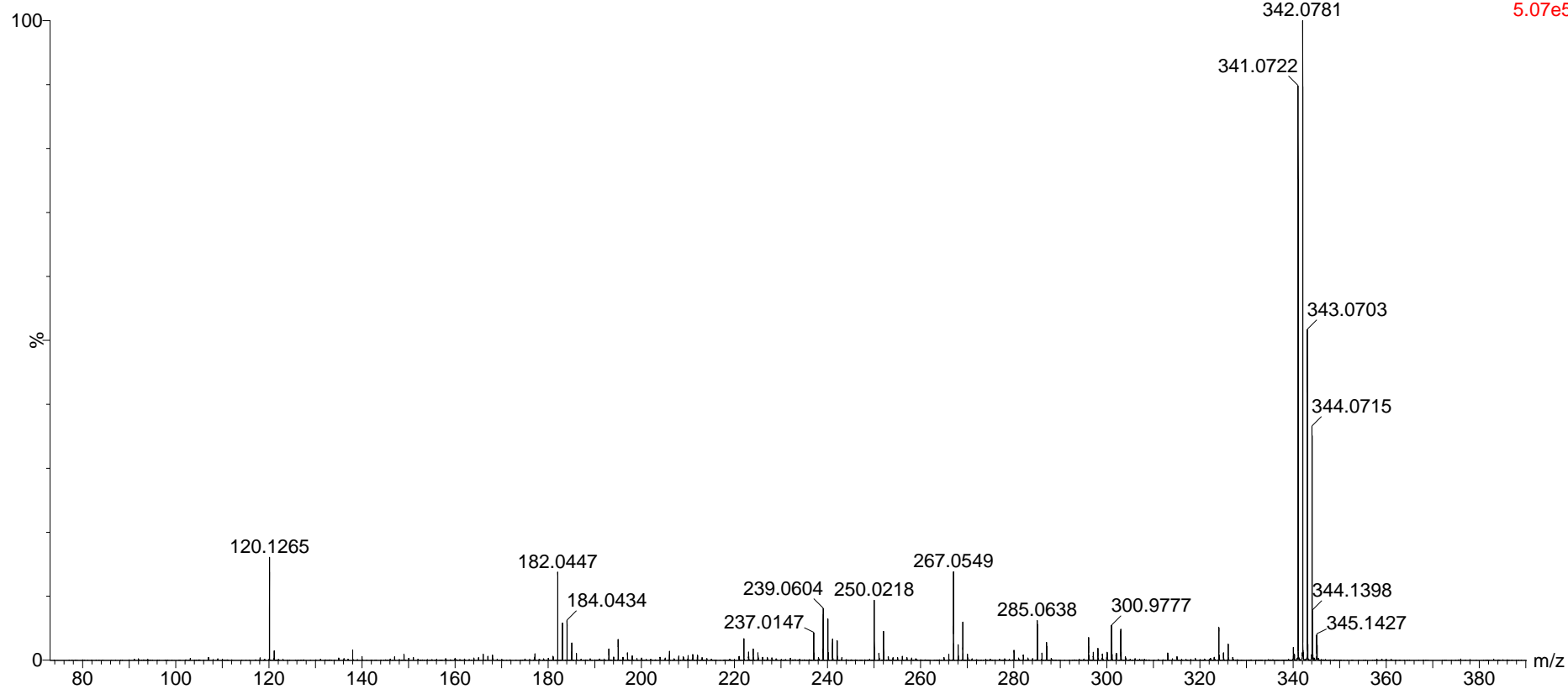


FIGURA 4.26 - Espectro MS do **PGG-3**.

COBRE_CA_5_MSMS_341 14 (0.254) Cm (2:22)

TOF MSMS 341.00ES+
5.07e5FIGURA 4.27 - Espectro de massas MS/MS do complexo **PGG-3**.

4.3 CARACTERIZAÇÃO GGH

O GGH, mesmo pouco solúvel em DMSO- d_6 , foi caracterizado por RMN de 1H nesse solvente, onde observou-se os sinais dos hidrogênios ligados aos nitrogênios das amidas. Os sinais dos hidrogênios do NH_2 , OH e NH do anel imidazol não foram observados. Para uma melhor leitura dos resultados, a estrutura do GGH foi enumerada de forma usual.

4.3.1 Caracterização por infravermelho

O GGH apresentou uma banda larga acima de 2600 cm^{-1} , sobrepondo todas as bandas que podem absorver entre $2600\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, Figura 4.28, por esse motivo, as bandas características de $\nu O-H$ e $\nu N-H$ (aminas/amidas) acima de 3000 cm^{-1} têm suas atribuições dificultadas.

A banda conjugada em 1660 e 1600 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento $\nu C=O$, podendo haver uma sobreposição com o dobramento $\delta(NH_2)$ que tem banda em 1650 cm^{-1} . Em 1390 cm^{-1} tem-se o dobramento simétrico dos $\delta(CH_2)$, em 1250 cm^{-1} o estiramento C-O do ácido carboxílico, em 1100 cm^{-1} o estiramento C-N. O anel imidazol têm três ou quatro bandas na região $670\text{-}320\text{ cm}^{-1}$ devido às vibrações de estiramento $C=C$ e $C=N$. As intensidades dessas bandas dependem das posições do substituinte e dos heteroátomos do anel. O 4-monossustituído, presente na L-His, pode ter quatro bandas de absorção, $670\text{-}625\text{ cm}^{-1}$ forte; $630\text{-}606\text{ cm}^{-1}$ forte; $445\text{-}355\text{ cm}^{-1}$ médio, $360\text{-}325\text{ cm}^{-1}$ médio.

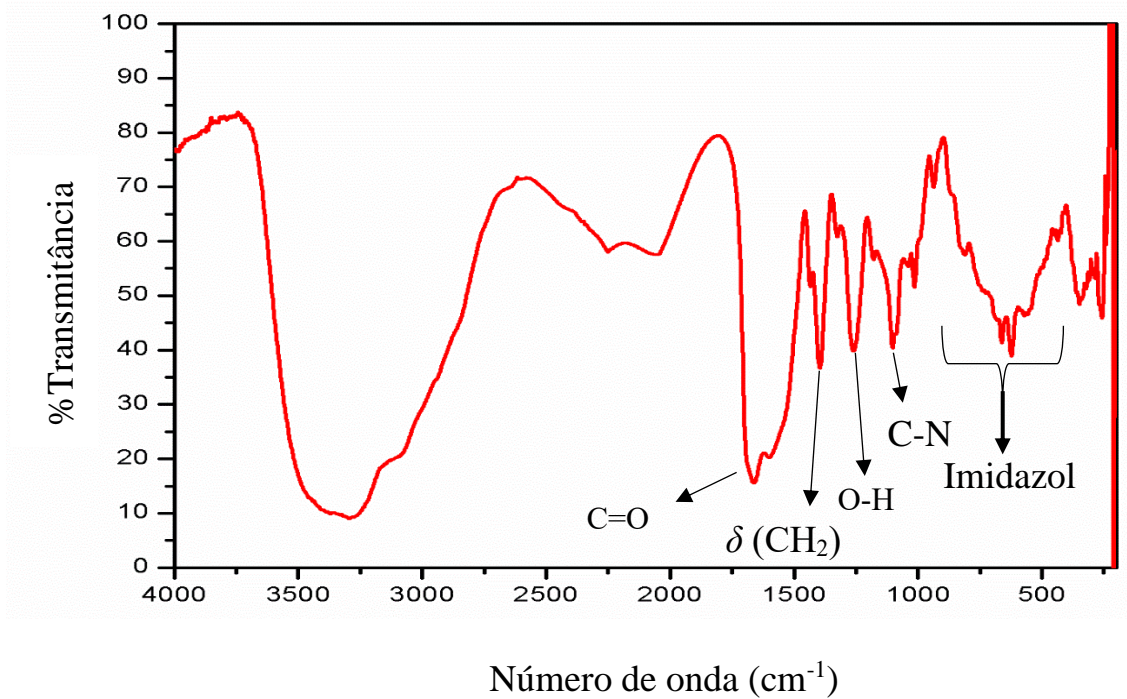


FIGURA 4.28 - Espectro de absorção na região do infravermelho do GGH feito em KBr.

4.3.2 Caracterização por UV-Vis

O espectro de absorção na região do UV-Vis para o GGH foi obtido apenas em água, Figura 4.29, apresentou transições do ligante em 198 nm e 220 nm com os respectivos coeficientes de absorvidade molar [$\log \epsilon (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$] de 4,04 e 2,1, atribuídos as transições $n-\pi^*$.

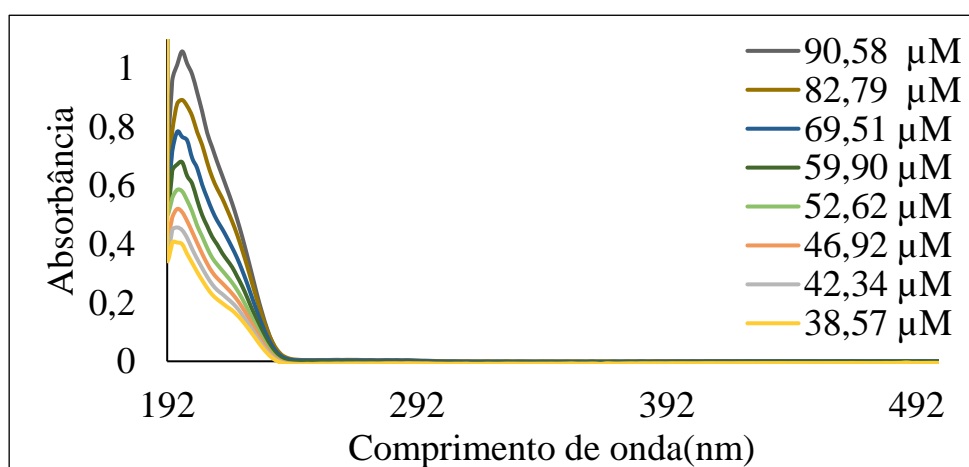


FIGURA 4.29 - Espectro de absorção na região do UV-Vis do GGH obtido em água. Ao lado estão as concentrações das várias diluições.

4.3.3 Caracterização por RMN

No espectro de RMN de ^1H do tripeptídeo GGH, Figura 4.30, os primeiros sinais na região alifática são referentes aos hidrogênios na posição 2H-3, os quais estão vizinhos ao centro estereogênico e seus sinais são desdobrados em um duplo duplete em δ 2,83 integrando para 1H, e outro duplo duplete em δ 2,96 integrando para 1H. O simpleto em δ 3,75 integra para 2H, atribuído para os hidrogênios da posição 2H-2', o sinal em δ 3,41, o qual tem aparência de duplete sobreposto, integrou para 2H e foi atribuído aos hidrogênios da posição 2H-4', o quarteto em δ 4,22, está junto do sinal da água, pertencente ao hidrogênio do centro estereogênico, na posição H-2. Na região aromática, têm-se um duplete em δ 6,73 e outro em δ 7,52, ambos integrando para 1H, os quais foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios do anel imidazol em H-5 e H-6. Os dois últimos sinais do espectro foram atribuídos para os hidrogênios ligados aos nitrogênios das amidas. O duplete em 7,99 ppm integrando par 1H, é referente ao hidrogênio da posição H_N' . Consequinte, o simpleto largo em 8,63 ppm foi atribuído para o hidrogênio da posição H_N'' .

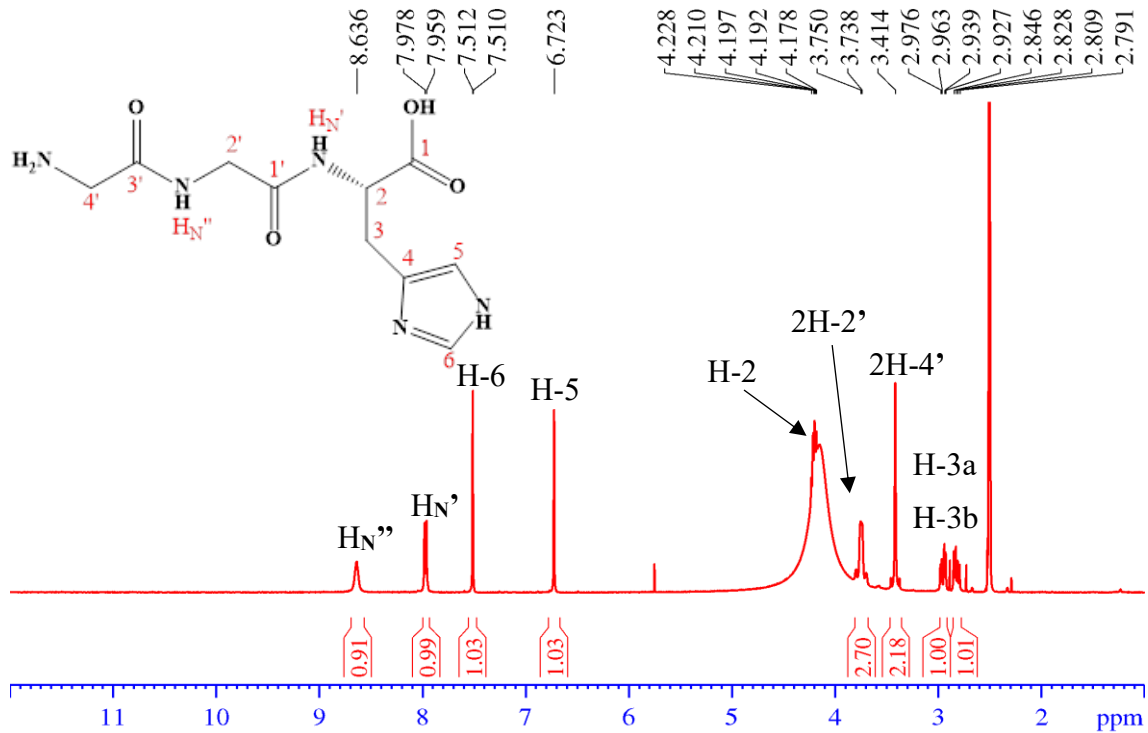


FIGURA 4.30 - Espectro de RMN de ^1H do tripeptídeo GGH em DMSO-d_6 (9,4 T) com os valores das integrais abaixo do espectro, deslocamento acima e atribuição dos hidrogênios para cada sinal.

No experimento COSY, os hidrogênios das amidas puderam ser diferenciados, o da posição $\text{H}_{\text{N}'}$ tem correlação com os dois 2H-2, já o hidrogênio da posição $\text{H}_{\text{N}''}$ tem correlação com os hidrogênios 2H-2'. A correlação do hidrogênio H-2 com os hidrogênios 2H-3 foi observado, e o hidrogênio aromático H-5 tem correlação com os hidrogênios do CH_2 alílico, Figura 4.31.

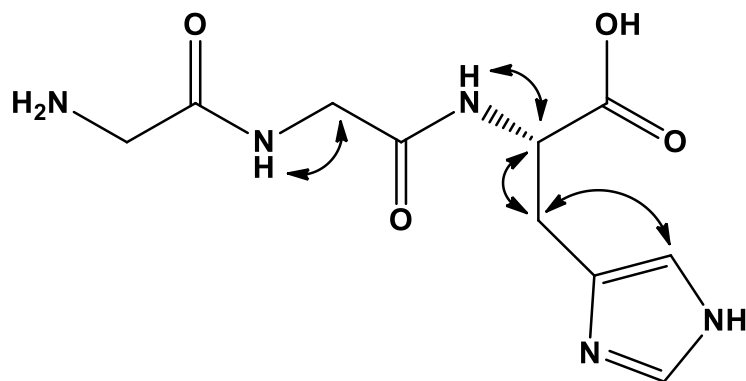


FIGURA 4.31 - Correlações observados no COSY.

O espectro de RMN de ^{13}C , Figura 4.32, apresentou os sinais de todos os carbonos da estrutura do GGH. Os carbonos metilênicos das posições C-3, C-2' e C-4' apresentam deslocamentos em δ 29,0, 41,9 e 42,1 ppm, respectivamente. Em δ 53,6 observa-se o sinal do carbono metínico da posição C-2.

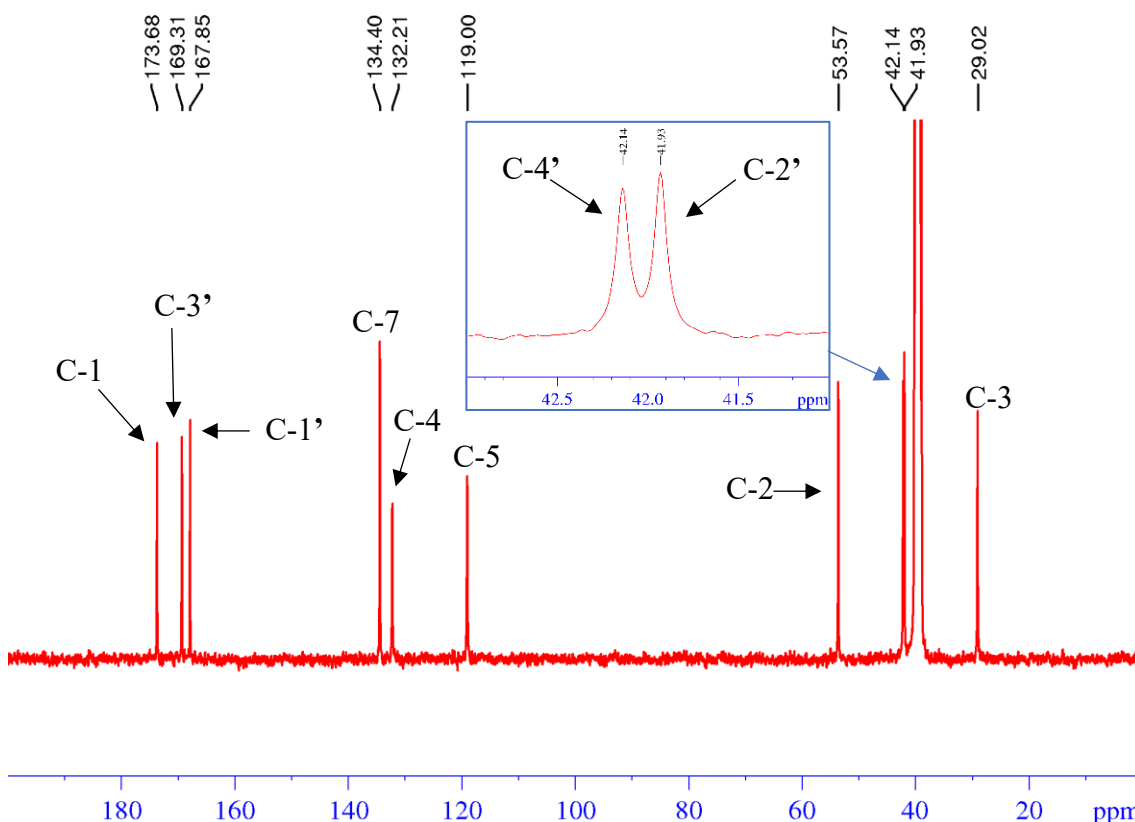


FIGURA 4.32 - Espectro de RMN de ^{13}C do tripeptídeo GGH em DMSO-d_6 (9,4T), com ampliação da região de 41 ppm a 43 ppm.

Os carbonos aromáticos hidrogenados das posições C-5 e C-6 do anel imidazol, tem deslocamentos respectivos em δ 119,0 e δ 134,4. O sinal em δ 132,2 foi atribuído ao carbono aromático não hidrogenado, posição C-4, por fim, os carbonos acilas em δ 167,8, δ 169,3 e δ 173,7 são atribuídos na devida ordem C-1', C-3' e C-1. Na Tabela 4.11, é apresentado os deslocamentos químicos dos carbonos, hidrogênios, multiplicidade e as constantes de acoplamento. Os carbonos acilas foram identificados pelas correlações no mapa de contorno HMBC, as quais são apresentadas na Tabela 4.12.

TABELA 4.11 - Informações sobre os deslocamentos dos carbonos e dos prótons.

Posição	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
1	173,7	-
2	53,6	4,22 (<i>m</i>)*
3	29,0	2,83 (<i>dd</i> , $J = 7,3$ e $14,8$ Hz) 2,96 (<i>dd</i> , $J = 4,9$ e $14,8$ Hz)
4	132,2	-
5	119,0	6,72 (<i>s</i>)
6	134,4	7,51 (<i>d</i> , $J = 1,0$ Hz)
1'	167,8	-
2'	42,1	3,41 (<i>s</i>)
3'	169,3	-
4'	41,9	3,74 (<i>d</i> , $J = 5,0$ Hz)
H _N '	-	7,97 (<i>d</i> , $J = 7,56$ Hz)
H _N ''	-	8,63 (<i>sl</i>)

Tabela 4.12 - Correlações observadas no mapa de contorno HMBC do GGH.

Carbono	δ_C	HMBC	
		$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
1	173,7	H ₂	H ₃
2	53,6	H ₃	-
3	29,0	H ₂	-
4	132,2	H ₅ e H ₃	H ₆ e H ₂
5	119,0	-	H ₆ e H ₃
6	134,4	-	H ₅
1'	167,8	H _N '	-
2'	41,9	-	-
3'	169,3	H ₄ '	-
4'	42,1	-	-

4.4 Caracterização [Metal(GGH)]

Os complexos com o centro metálico cobre (II) apresentaram sinais nos espectros de RMN de ^1H , porém não foi possível distingui-los pela complexidade dos sinais e por não apresentarem nenhuma correlação nos mapas de contornos. O complexo com o zinco não foi solúvel em DMSO- d_6 . Desse modo é apresentada a caracterização completa por RMN 1D e 2D apenas para o complexo de prata.

Os dados de análise elementar, Tabela 4.13, corroboram para a proposta das estruturas dos complexos, e que estes possuem moléculas de água de hidratação, para os complexos que possuem erros maiores que 0,5% os espectros de massas de alta resolução confirmam a molécula proposta. Os valores de condutividade molar confirmam que os complexos com o GGH são eletrólito 1:1(com a prata), 1:2 (complexos com o cobre). O zinco foi proposto sendo eletrólito 1:2, confirmado na espectrometria de massas de alta resolução, pois não foi observado sinais referentes ao acetato coordenado ao metal.

TABELA 4.13 - Análise Elementar dos complexos [Metal(GGH)] e valores de condutividade obtidos em água.

Complexos	%C*	%H*	%N*	Λ^{**}
[Ag(GGH)]BF ₄ (GGH-1)***	25,89 (26,10)	3,26 (3,15)	15,10 (14,70)	91,36
[Zn(GGH)](CH ₃ COO) ₂ .2H ₂ O (GGH-2)***	34,4 (34,00)	5,16 (3,8)	14,33 (14,80)	113,00
[Cu(GGH)](NO ₃) ₂ .3,4H ₂ O (GGH-3)***	23,18 (23,76)	4,24 (4,39)	18,93 (18,57)	161,73
[Cu(GGH)](BF ₄) ₂ (GGH-4)***	23,72 (24,30)	2,99 (3,7)	13,83 (14,90)	176,80

*Massa calculada. **Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). ***Código dos complexos.

O número de elétrons desemparelhados para os complexos **GGH-3** e **GGH-4**, confirmam que esses complexos são mononucleares, os quais apresentaram o valor de 1 elétron desemparelhado na proporção 1:1 (metal:ligante), foi considerado a formação de complexos binucleares, esperava-se um valor de 2 elétrons desemparelhados se o complexo com dois centros metálicos fossem formados, o resultado obtido foi de 1 elétron e este confirmou que não ocorreu a formação de complexos binucleares, Tabela 4.14.

TABELA 4.14 - Susceptibilidade magnética dos complexos **GGH-3** e **GGH-4**.

Complexo	Suscetibilidade magnética molar (χ_m)	Número de elétrons desemparelhados (n)
GGH-3	$0,247 \times 10^{-5}$	1,00
GGH-4	$0,214 \times 10^{-5}$	1,00
GGH-3*	$0,247 \times 10^{-5}$	1,02
GGH-4*	$0,214 \times 10^{-5}$	0,98

*Considerado como complexo binuclear.

4.4.1 Caracterização por infravermelho

Na comparação visual dos espectros na região do infravermelho do GGH (A) com os complexos, Figura 4.33, banda alargada acima de 2600 cm^{-1} dificultou a análise dos deslocamentos dos grupos característicos dessa região $\nu(\text{OH}, \text{NH}_2 \text{ e } \text{NH})$. Entre a região de 1750 cm^{-1} a 1550 cm^{-1} os estiramentos das ligações C=O das carboxilas das amidas são deslocadas nos complexos para número de ondas menores, indicando a complexação pelos nitrogênios das amidas. A região das bandas características do anel imidazol monossustituído, apresentaram modificações, confirmando a coordenação pelo anel imidazol.

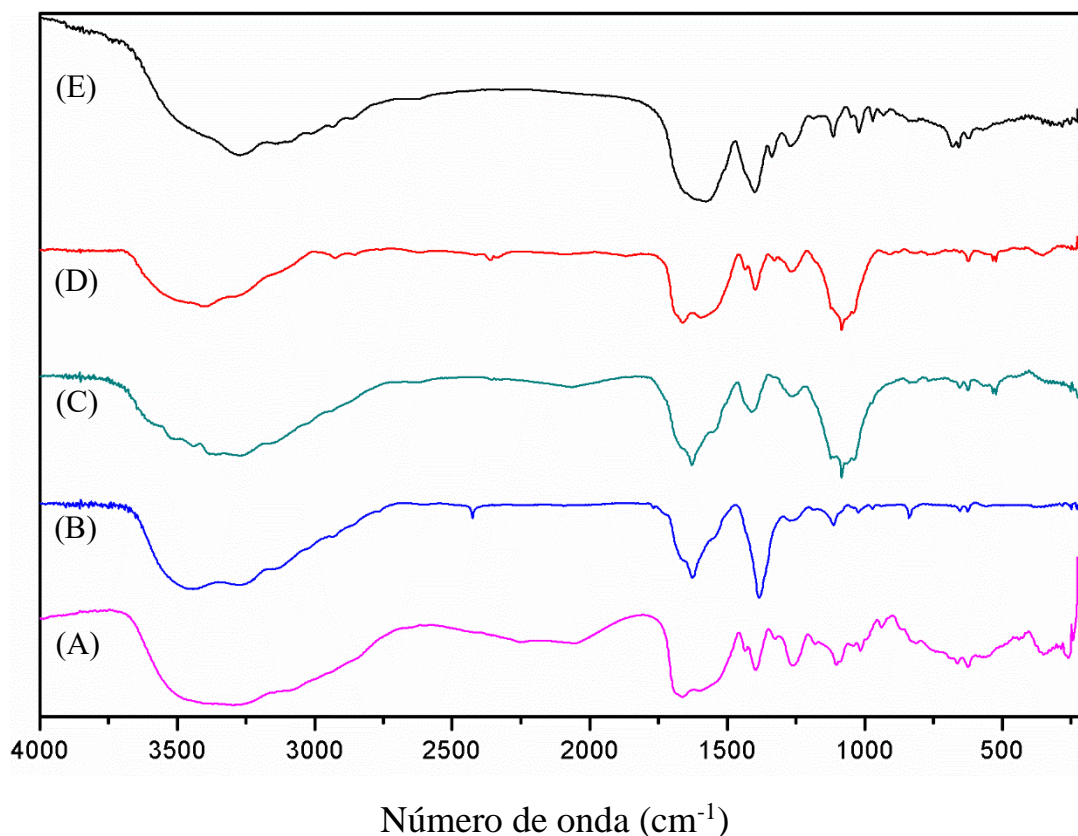


FIGURA 4.33 - Comparação dos espectros na região do infravermelho, obtidos em KBr, onde as mudanças nas bandas de absorção dão indicio da formação do complexo. Os espectros são referentes a: (A) **GGH**, (B) **GGH-3**, (C) **GGH-4**, (D) **GGH-1**, (E) **GGH-2**.

Na Tabela 4.15, é apresentada a tentativa de atribuição das principais bandas de estiramento encontradas nos complexos, em comparação com os valores de número de onda com o ligante livre. O anel imidazol do GGH tem suas bandas deslocadas em todos os complexos, não podendo ser diferenciadas, pois ocorreu o desaparecimento ou sobreposição de bandas. Para os complexos contendo BF_4^- o estiramento C-N está sobreposto com a banda desse contra-íon.

TABELA 4.15 - Tentativa de atribuição dos valores dos números de ondas dos principais grupos do ligante GGH e dos complexos [Metal(GGH)].

	GGH	GGH-1	GGH-2	GGH-3	GGH-4
HNC=O	1660 cm ⁻¹	1658 cm ⁻¹	1575 cm ⁻¹	1626 cm ⁻¹	1628 cm ⁻¹
	1600 cm ⁻¹	1595 cm ⁻¹	**	**	**
CH ₂	1390 cm ⁻¹	1396 cm ⁻¹	1400 cm ⁻¹	**	1406 cm ⁻¹
O-H	1260 cm ⁻¹	1265 cm ⁻¹	1269 cm ⁻¹	1265 cm ⁻¹	1261 cm ⁻¹
C-N	1100 cm ⁻¹	*	1113 cm ⁻¹	1111 cm ⁻¹	*
Imidazol	663 cm ⁻¹	623 cm ⁻¹	677 cm ⁻¹	653 cm ⁻¹	654 cm ⁻¹
	623 cm ⁻¹	532 cm ⁻¹	657 cm ⁻¹	625 cm ⁻¹	532 cm ⁻¹
	349 cm ⁻¹	212 cm ⁻¹	621 cm ⁻¹		224 cm ⁻¹
	258 cm ⁻¹				

* Bandas sobreposta com o estiramento do BF₄⁻. ** Não observado.

4.4.2 Caracterização por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta ao visível

Na espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, o complexo **GGH-1** apresentou transições nos comprimento de onda 196 nm e um ombro em 216 nm, com os respectivos coeficientes de absorvidade molar [$\log \epsilon$ (M⁻¹ cm¹)] de 4,23 e 3,94, Figura 4.34, ambas transições intramoleculares das carboxilas do GGH n- π^* . Com a mudança do solvente para DMSO, o espectro apresentou três bandas, 262 nm, 292 nm, atribuídas as transições do tipo n- π^* , e uma transição de baixa intensidade em 424 nm, atribuída a banda de transferência de carga do

metal para o ligante (TCML), Figura 4.35. A banda TCML é justificável para esse tripeptídeo, pois o anel imidazol da L-his os nitrogênios estão hibridizados sp^2 , o nitrogênio usado como ponto de coordenação tem os pares de elétrons em um orbital sigma, disponíveis para ser usados na coordenação. O nitrogênio da outra posição do anel imidazol tem seus pares de elétrons no π (p puro), por este estar conjugado no sistema aromático. Por ter orbitais π^* ($p\pi^*$) vazios, o anel imidazol é caracterizado como ligante sigma doador e π aceptor, desse modo o imidazol recebe densidade eletrônica do orbital $d\pi^*$ do centro metálico Ag^+ , o qual tem o orbital $4d^{10}$, como esse orbital está preenchido, o metal doa densidade eletrônica para o ligante.

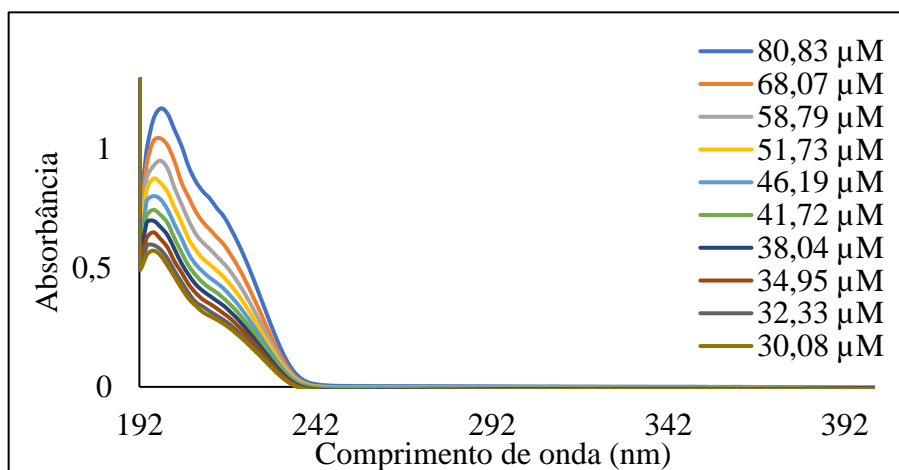


FIGURA 4.34 - Espectro de absorção na região do UV-Vis do **GGH-1** obtido em água.

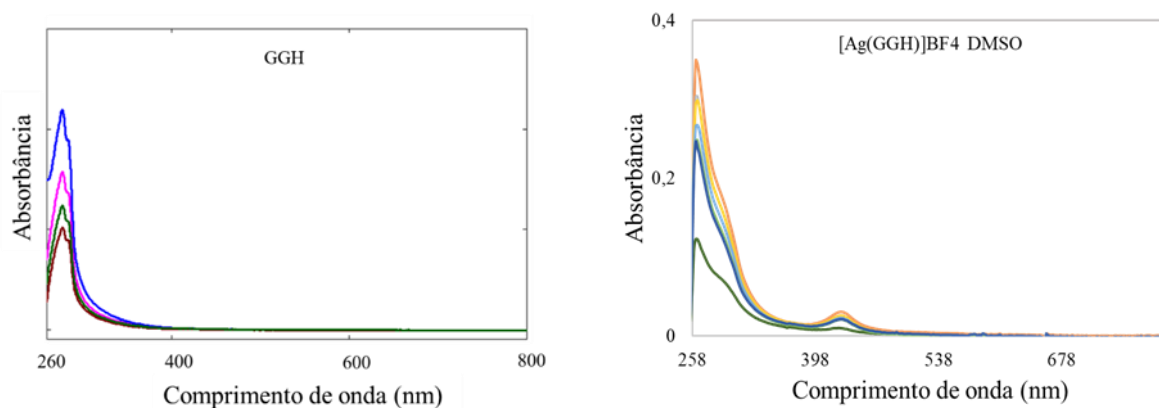


FIGURA 4.35 - Comparação dos espectros de absorção na região do UV-Vis do GGH com o $[Ag(GGH)]BF_4$, dando ênfase para região próxima a 400 nm, onde têm-se o aparecimento da banda TCML.

As medidas do complexo de zinco apresentaram transições do ligante em 196 nm e 218 nm, ambas referente as transições $n-\pi^*$, como observado na Figura 4.36.

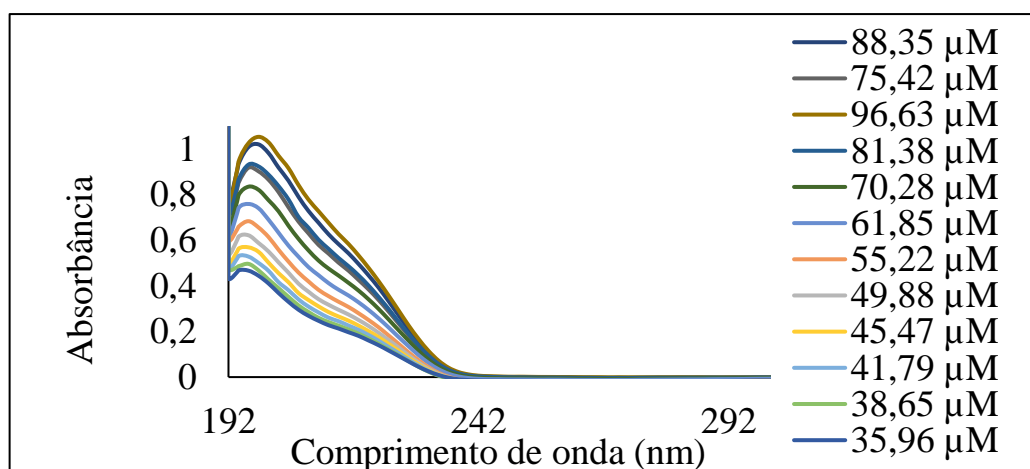


FIGURA 4.36 - Espectro de absorção na região do UV-Vis do **GGH-2**.

Os complexos **GGH-3** e **GGH-4**, em água, apresentaram as transições intramoleculares do ligante GGH nos comprimentos de onda 198 nm, 216 nm e 254 nm, banda TCML em 536 nm e a transição $d-d$ em 766 nm, as duas

últimas só puderam ser observadas com uma elevada concentração do complexo, Figura 4.37 e Figura 4.38, respectivamente.

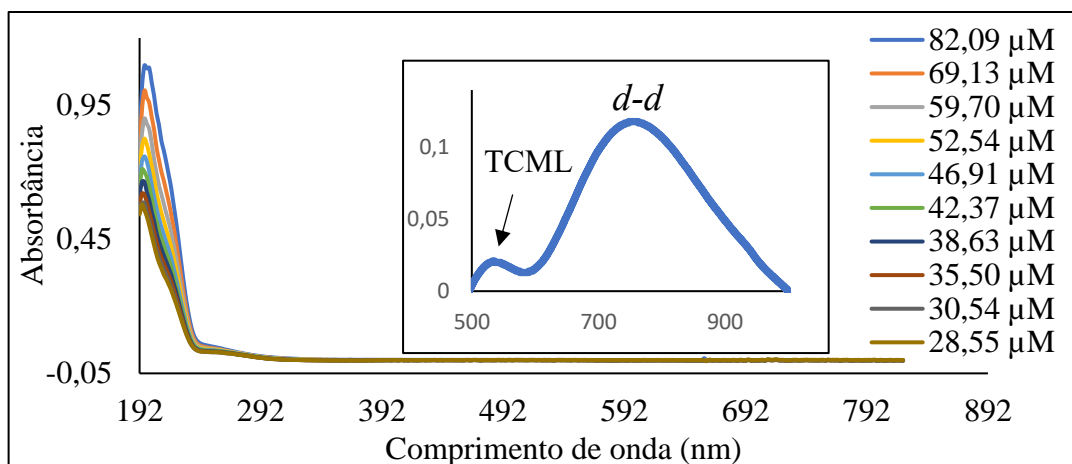


FIGURA 4.37 - Espectro de absorção na região do UV-Vis **GGH-3**.

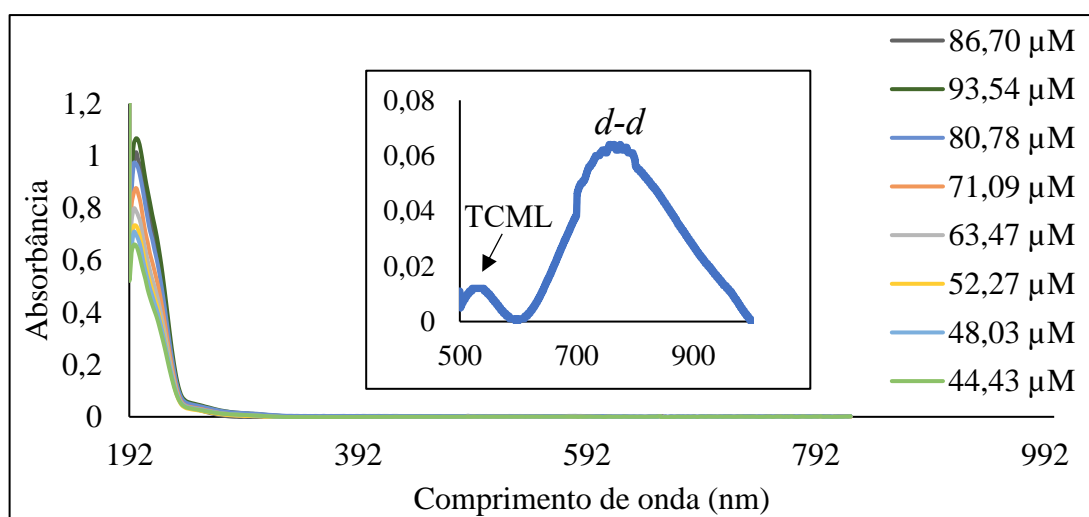


FIGURA 4.38 - Espectro de absorção na região do UV-Vis **GGH-4**.

4.4.3 Caracterização por RMN

Os complexos **GGH-2**, **GGH-3** e **GGH-4** não foram caracterizados por RMN comparando-os com o ligante livre, pois os sinais apresentados nos espectros não poderiam ser atribuídos para os dois primeiros, e o complexo **GGH-2** não solubilizou em DMSO- d_6 . Por esses motivos, apenas o **GGH-1** tem uma discussão detalhada por RMN.

Os prótons do **GGH-1** apresentaram deslocamentos diferentes em relação ao ligante livre, indicando a formação do complexo, como observado na Figura 4.39. Todos os hidrogênios da região alifática apresentaram uma desblindagem nos seus deslocamentos químicos quando comparados ao ligante livre, os hidrogênios da posição 2H-3 são deslocados para δ 3,02 e δ 3,10, os hidrogênios 2H-2' e 2H-4' sofrem uma desblindagem para δ 3,79 e δ 3,51, respectivamente. O hidrogênio H-2 tem seu sinal em δ 4,37. Na região aromática, o hidrogênio da posição H-5 tem deslocamento em δ 7,04, enquanto o sinal do H-6 está junto do sinal do H_N'', δ 7,89 para o H-6 e δ 7,86 para o H_N'', o sinal mais desblindado é referente ao hidrogênio H_N'', o qual tem uma variação de 0,01 ppm. No experimento COSY, as mesmas correlações observadas no ligante livre, são identificadas no complexo **GGH-1**, Figura 4.40.

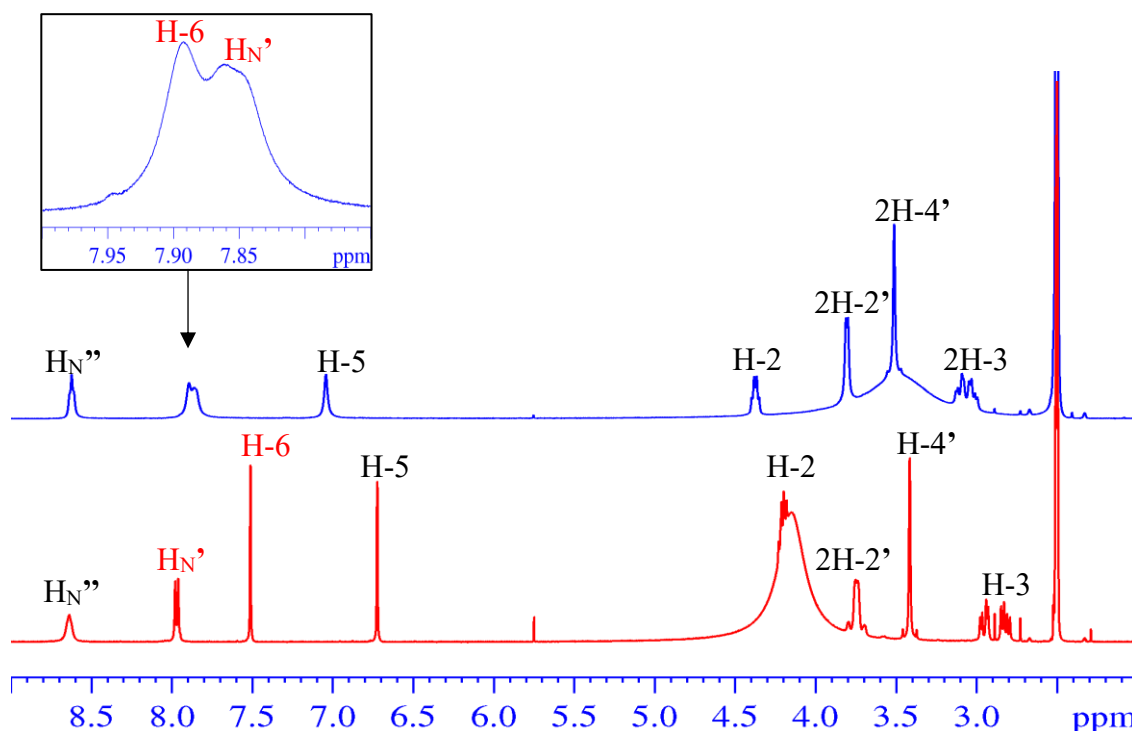


FIGURA 4.39 - Sobreposição dos espectros de RMN ^1H , DMSO- d_6 (9,4T), do **GGH** em vermelho com o complexo **GGH-1** em azul, na qual pode-se visualizar os diferentes deslocamentos dos hidrogênios do GGH livre e quando é complexado.

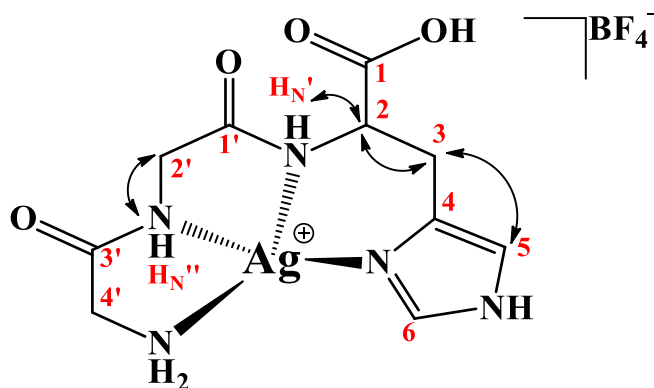


FIGURA 4.40 - Correlações no COSY do **GGH-1**.

No mesmo tubo de ressonância contendo o **GGH-1** para obtenção do espectro de RMN ^1H em DMSO-d_6 , adicionou-se algumas gotas D_2O , para obtenção de um segundo espectro de RMN de ^1H , no qual ocorreu a diminuição dos sinais referentes aos hidrogênios ligados aos nitrogênios das amidas, confirmando a sobreposição dos sinais do H-6 com o $\text{H}_{\text{N}'}$, mostrado na Figura 4.41.

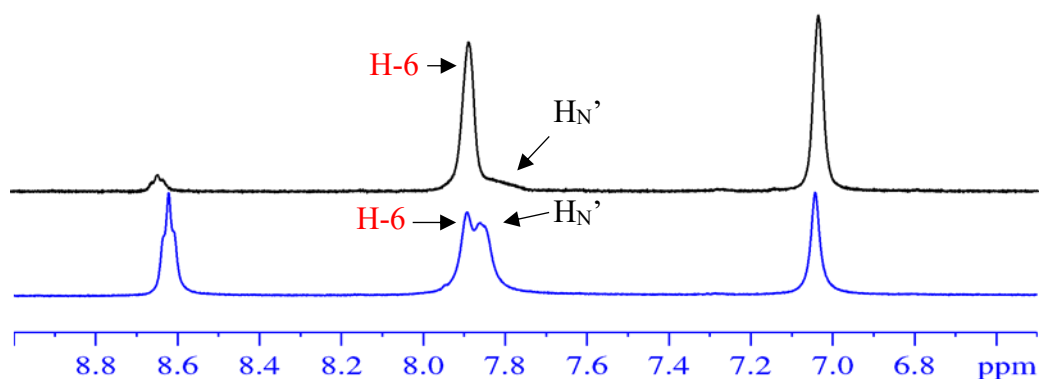


FIGURA 4.41 - Comparação do espectro de RMN ^1H do **GGH-1** em DMSO-d_6 (9,4T), mostrado em azul, com o espectro do adquirido em $\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O}$, em preto, onde ocorreu a troca dos hidrogênios ácido por deutério, o que indica a diminuição dos sinais para esse hidrogênio.

No espectro de RMN de ^{13}C , os sinais do carbono acila C-3' e do carbono C-6 apresentaram maiores deslocamentos quando comparados ao ligante livre, com uma diferença de 3,3 ppm para o C-6 e 1,2 ppm para o C-3', Figura 4.42. Dois carbonos, C-4 e C-5, não são observados, o carbono C-3 aparece com uma baixa intensidade, porém o mapa de contorno HSQC mostra a correlação do C-3 com os hidrogênios ligados a ele, Figura 4.43, o que não foi observado para o C-5.

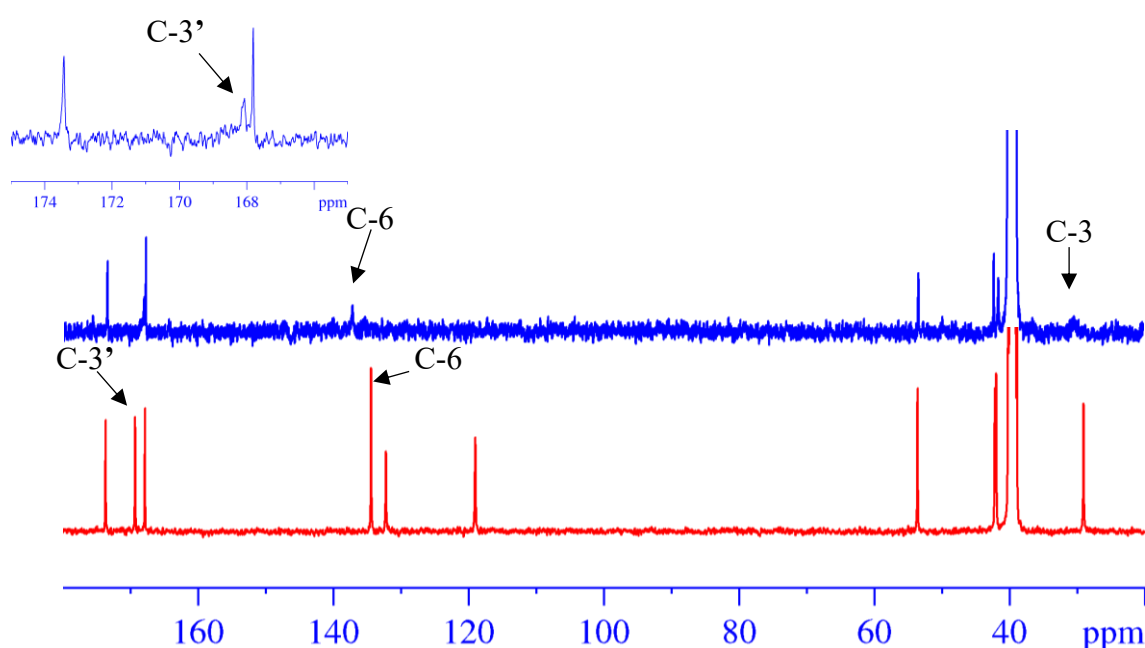


FIGURA 4.42 - Sobreposição dos espectros de RMN ^{13}C do GGH em vermelho, com o complexo em azul. Destacando os carbonos das posições C-6 e C-3', os quais tiveram maior deslocamento na formação do complexo.

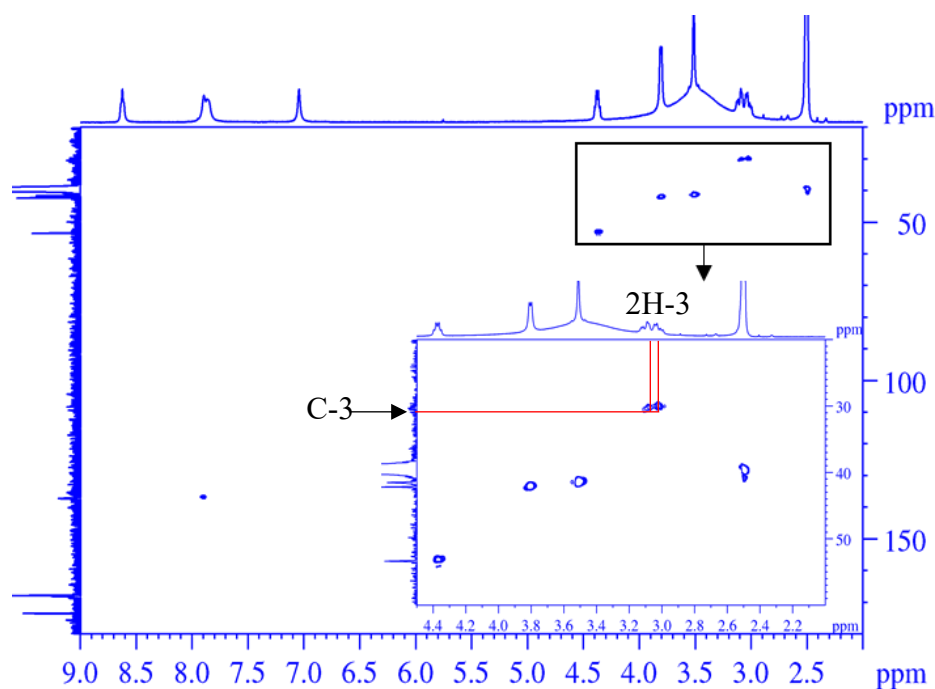


FIGURA 4.43 - Mapa de contorno HSQC do **GGH-1**, DMSO- d_6 (9,4T), destacando a correlação dos hidrogênios da posição 2H-3 ligados aos carbono C-3, o qual teve baixa intensidade do seu sinal no RMN ^{13}C , e a não visualização da correlação do H-5 com o C-5.

Os complexos com o centro metálico de cobre não puderam ter seus sinais atribuídos pela ausência das correlações nos mapas de contorno e pela complexidade do espectro de RMN 1H , contudo, é apresentado na Figura 4.44 o espectro de RMN 1H obtido para o **GGH-4**, onde foi realizado o experimento em janela expandida, para verificar se nesse complexo o efeito de deslocamento químico paramagnético poderia apresentar sinais fora de janela comum de aquisição dos espectros de RMN de 1H e se teria solvente coordenado ao complexo. Como o experimento não mostrou sinais acima de 20 ppm e a baixo de 0 ppm, indica que não há moléculas de solvente coordenada ao centro metálico para os complexos de cobre com o GGH.

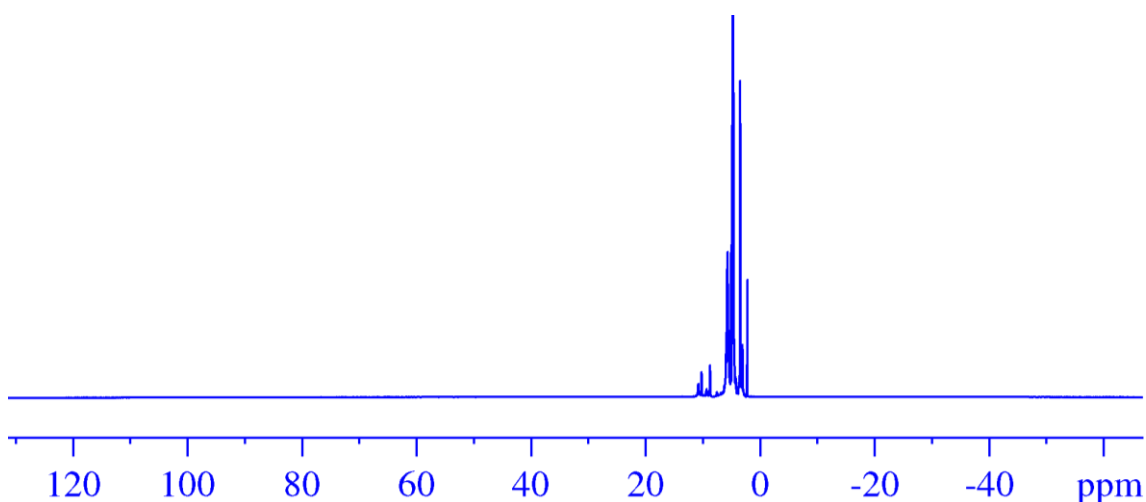


FIGURA 4.44 - Espectro obtido em expansão de janela de ppm para o complexo **GGH-4**, DMSO-d₆ (9,4T), para verificar a presença de sinais fora da janela comum de aquisição.

4.4.4 Caracterização por Espectrometria de Massas

Nas sínteses com o GGH, os complexos com cobre e zinco possuem carga 2+, porém ocorreu uma desprotonação da molécula no processo de ionização por eletrospray, resultou em uma carga 1+, o que possibilitou corresponder o íon m/z 331 e 332 para os complexos **GGH-3/GGH-4**, e o íon m/z 332 para o **GGH-2**. No complexo de com a prata, não ocorre nenhuma desprotonação da molécula, a qual tem carga 1+. É demonstrado na Tabela 4.16, os valores das massas teóricas, massas observadas e o erro.

TABELA 4.16 - Valores das massas teóricas e calculadas para os complexos [Metal(GGH)].

Complexos	Massas teórica (m/z)	Massa experimental (m/z)	(erro em ppm)
GGH-1*	376,0169	376,0179	2,65
GGH-2*	332,0331	332,0309	-6.6
GGH-3	331,0347	331,0358	3,32
GGH-4			

*Molécula protonada.

O espectro MS do complexo **GGH-1**, Figura 4.45, mostrou o padrão isotópico do metal para no pico m/z 376, este íon foi selecionado e fragmentado por CID, o espectro MS/MS, Figura 4.46, contém os íons produtos m/z 332, 285, 264, 239, 201 e 182, todos com o padrão isotópico do metal. Não ocorreu a saída do Ag(I) de nenhum fragmento, o que pode ser explicado pela forte ligação com o anel imidazol, o qual faz retrodoação com a prata. As propostas de fragmentações estão apresentadas nas Figuras 4.47 e 4.48.

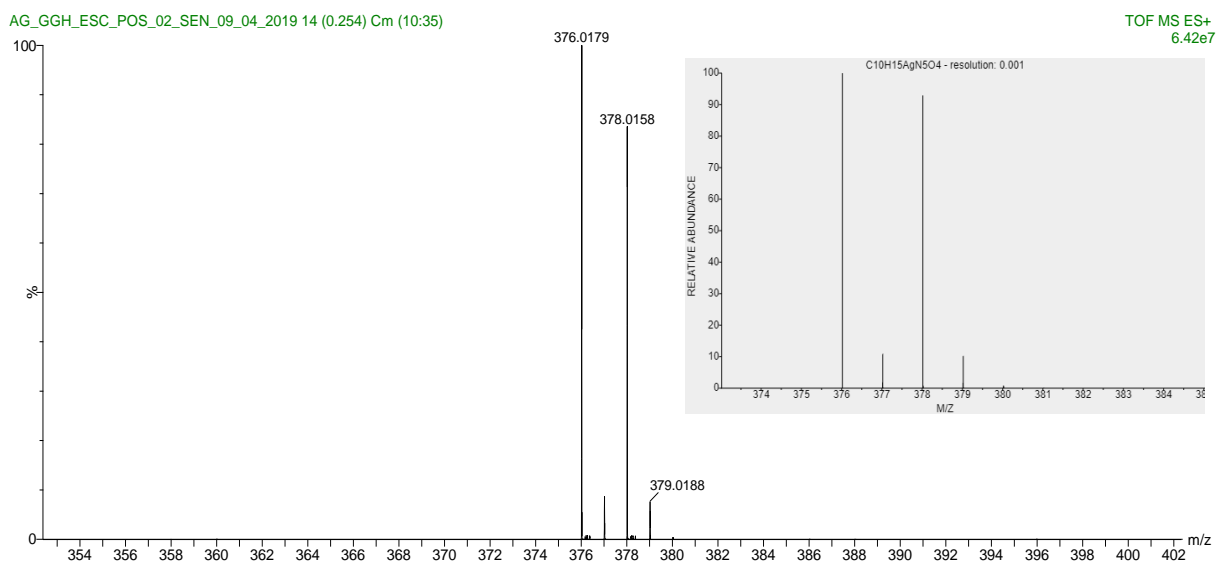


FIGURA 4.45 - Espectro MS do complexo **GGH-1**.

AG_GGH_ESC_MSMS_376_POS_02_SEN_09_04_2019 47 (0.812) Cm (46:55)

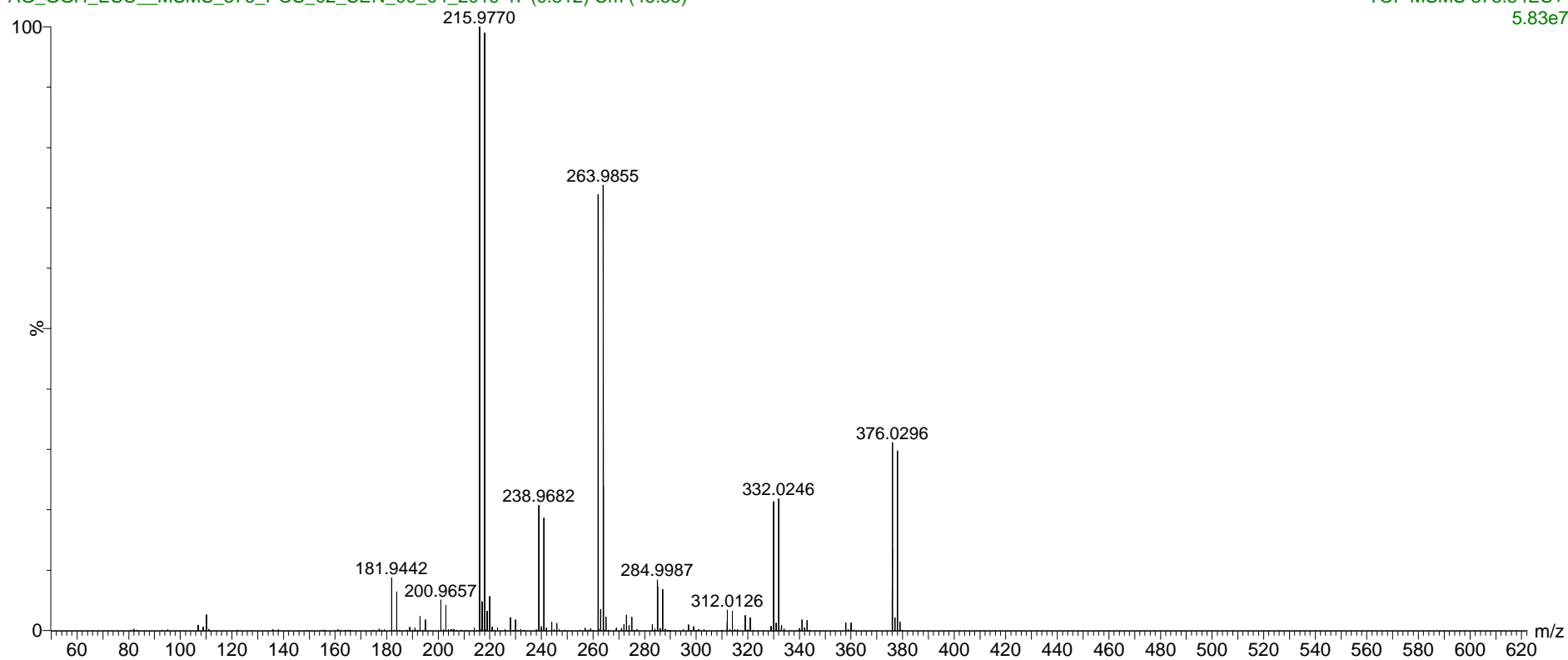
TOF MSMS 375.84ES+
5.83e7

FIGURA 4.46 – Espectro de massas MS/MS do **GGH-1** para visualização do padrão isotópico nos fragmentos do íon positivo m/z 376.

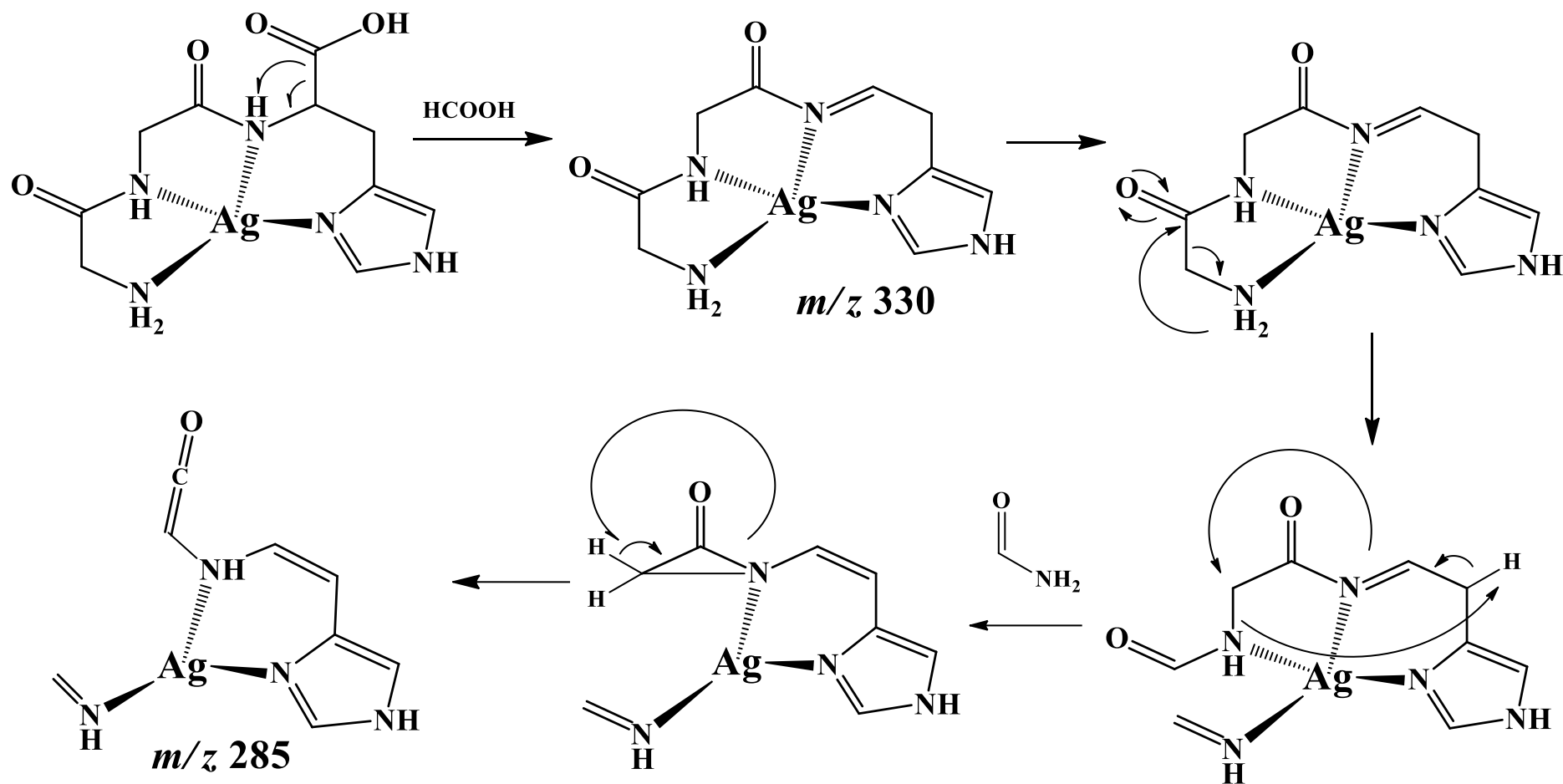


FIGURA 4.47 – Proposta de fragmentação para a formação dos íons m/z 330 e 285 do **GGH-1**.

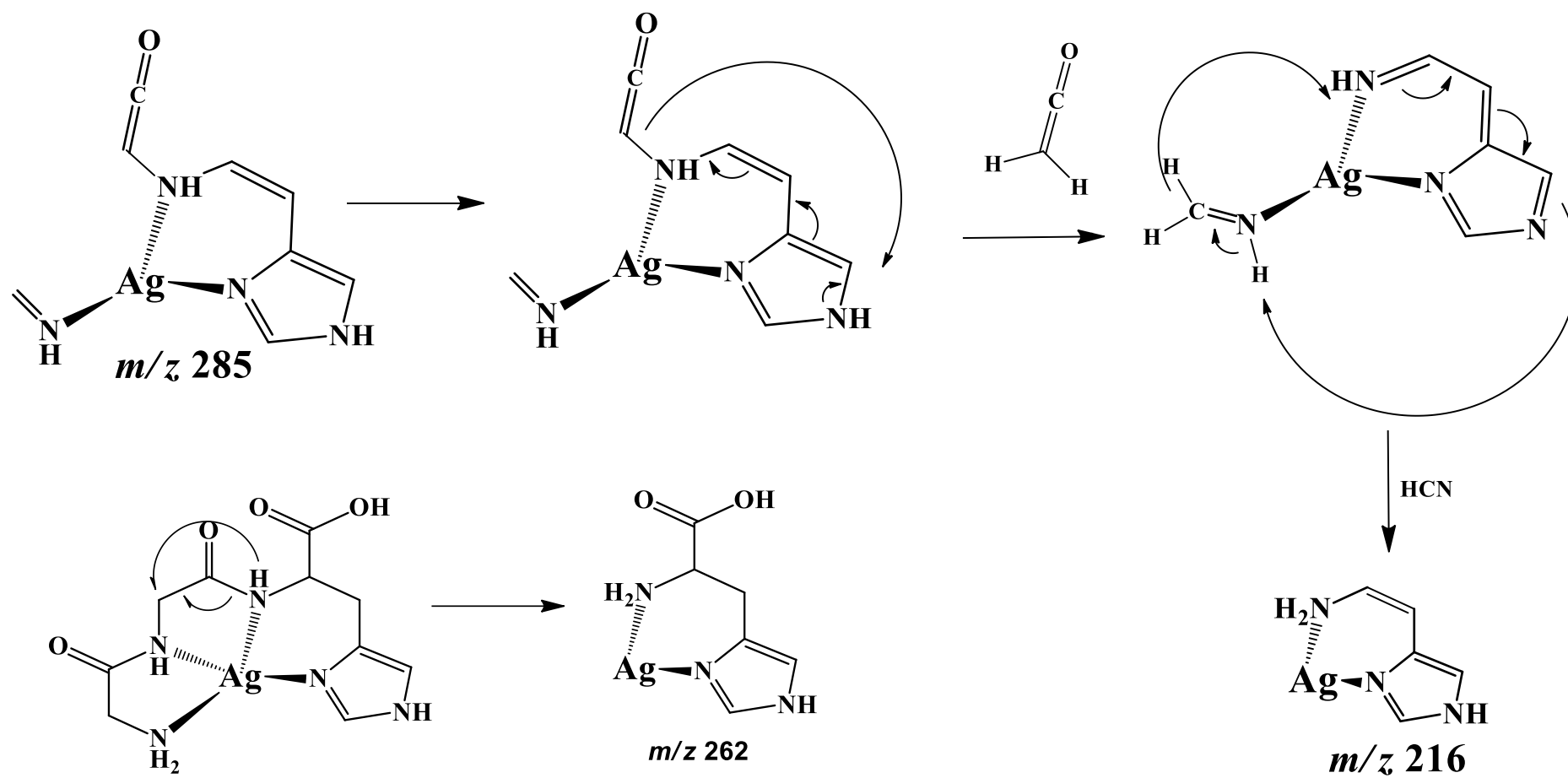


FIGURA 4.48 – Proposta de fragmentação para a formação dos íons m/z 216 e 262 do GGH-1.

O espectro de MS do **GGH-2**, Figura 4.49, apresentou o íon m/z 332 atribuído ao complexo proposto, têm-se uma supressão de sinal deste íon, igualmente ao **PGG-2** (complexo contendo zinco), de modo a relacionar que os complexos contendo zinco com os peptídeos (PGG e GGH), são menos ionizáveis que fragmentos o que podem ser gerados na fonte de eletrospray.

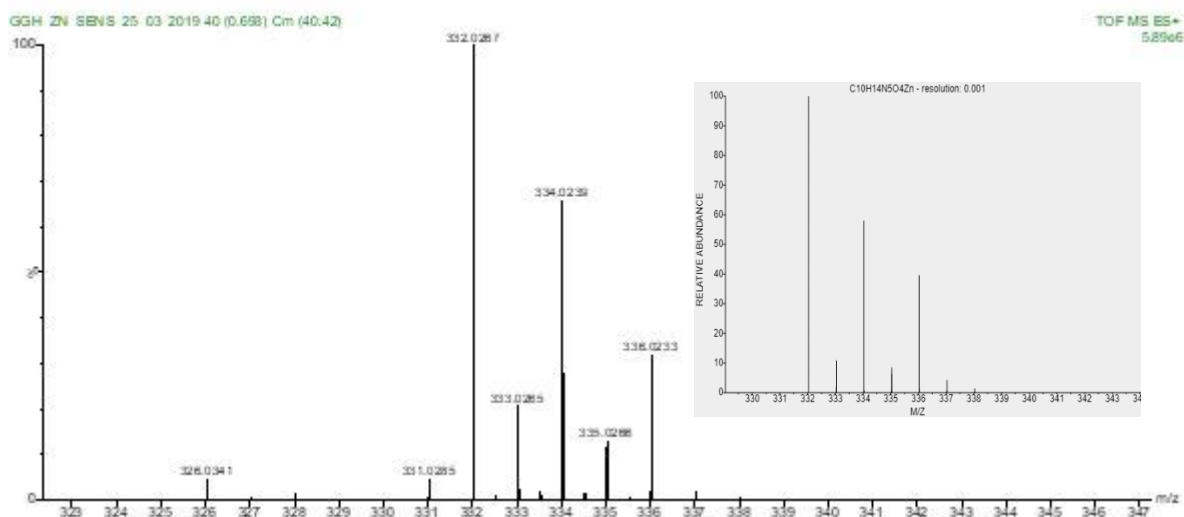


FIGURA 4.49 – Espectro de massas MS do **GGH-2**.

O espectro MS/MS do **GGH-2**, Figura 4.50, mostrou os fragmentos m/z 314, 286 e 257 contendo o padrão isotópico do Zn(II) com o GGH coordenado. Porém, apresentou o íons m/z 110, o qual não possui o padrão isotópico do metal, ou seja, a ligação ao centro metálico de zinco(II) não é tão forte quando comparado a ligação ao Ag(I). As propostas de fragmentações estão apresentadas na Figura 4.51.

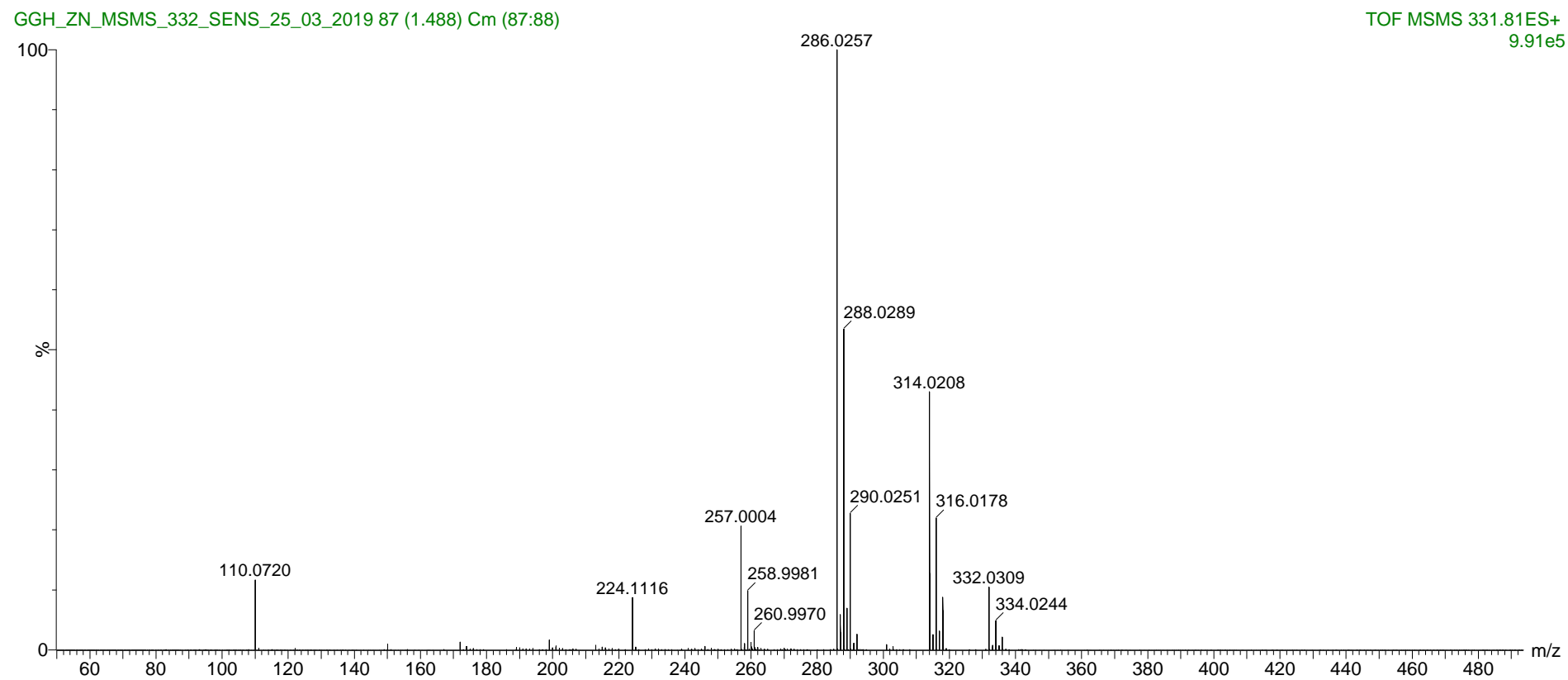


FIGURA 4.50 – Espectro de massas MS/MS do íon m/z 332.

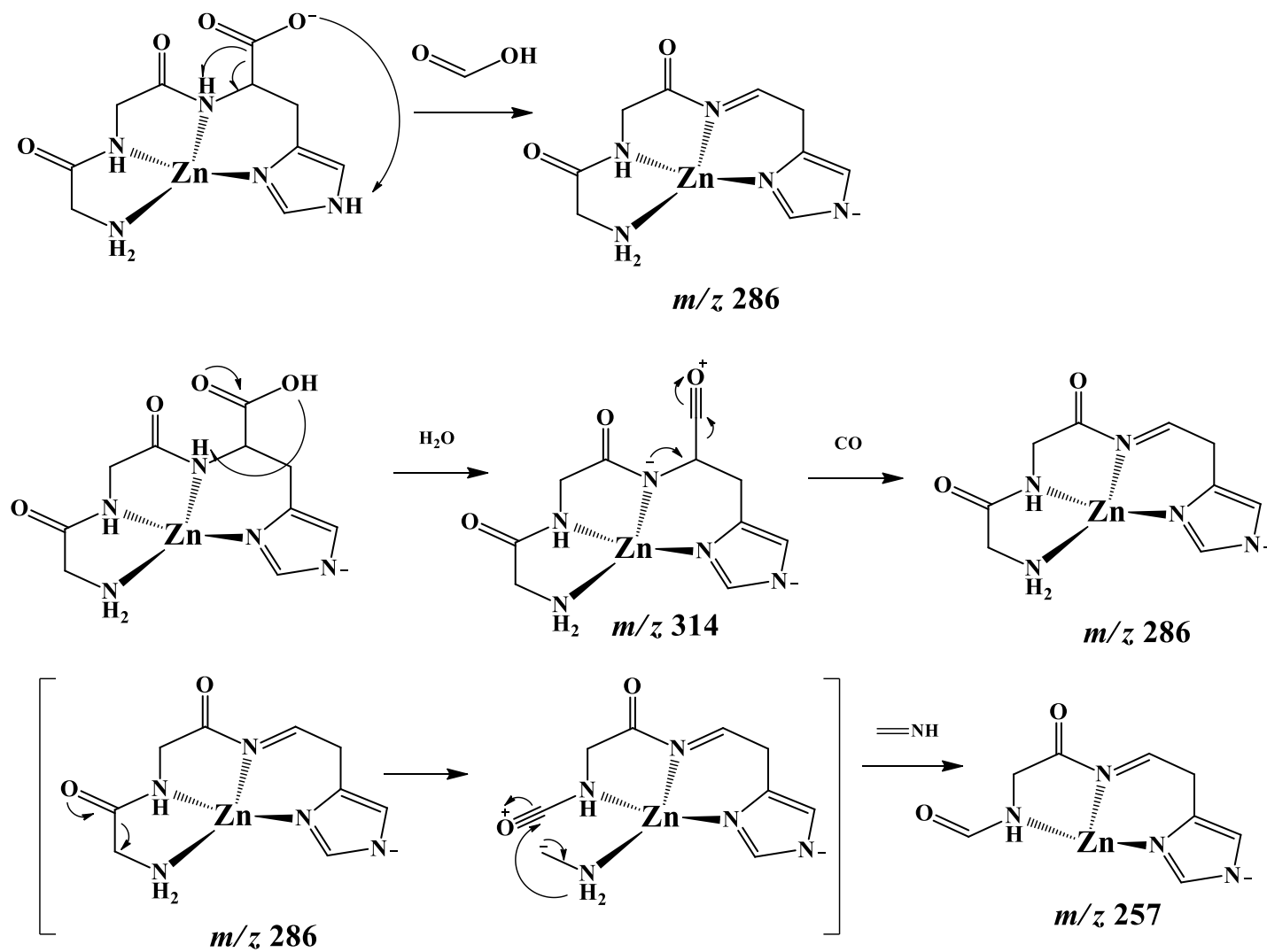


FIGURA 4.51 - Propostas de fragmentações do **GGH-2**.

Os complexos **GGH-3** e **GGH-4** possuem diferença no contra-íon, como na espectrometria de massas de alta resolução em ionização por eletrospray, foi observado apenas o tripeptídeo coordenado ao metal Cu(II), os espectros de MS e MS/MS para esses complexos são similares. Na Figura 4.52 é demonstrado o espectro MS do **GGH-3**, do **GGH-4** está disponível no Apêndice.

O íon m/z 331 é atribuído aos complexos **GGH-3** e **GGH-4**, neste íon é observado o padrão isotópico do metal. A fragmentação do m/z 331, Figura 4.53, gerou os íons m/z 301, 286, 255, 200 e 172, todos contendo o padrão isotópico do Cu(II), e não ocorreu a observação do íon m/z 110. Igualmente ao complexo **GGH-1**, o **GGH-3** e **GGH-4** fazem retrodoação com o anel imidazol, a qual faz com que a coordenação do anel imidazol com o cobre(II) seja mais forte, por esse motivo não foi rompida durante o processo de fragmentação, o que confirmou a estabilidade do complexo proposto. Nas Figuras 4.54 e 4.55, estão apresentadas as propostas de fragmentações.

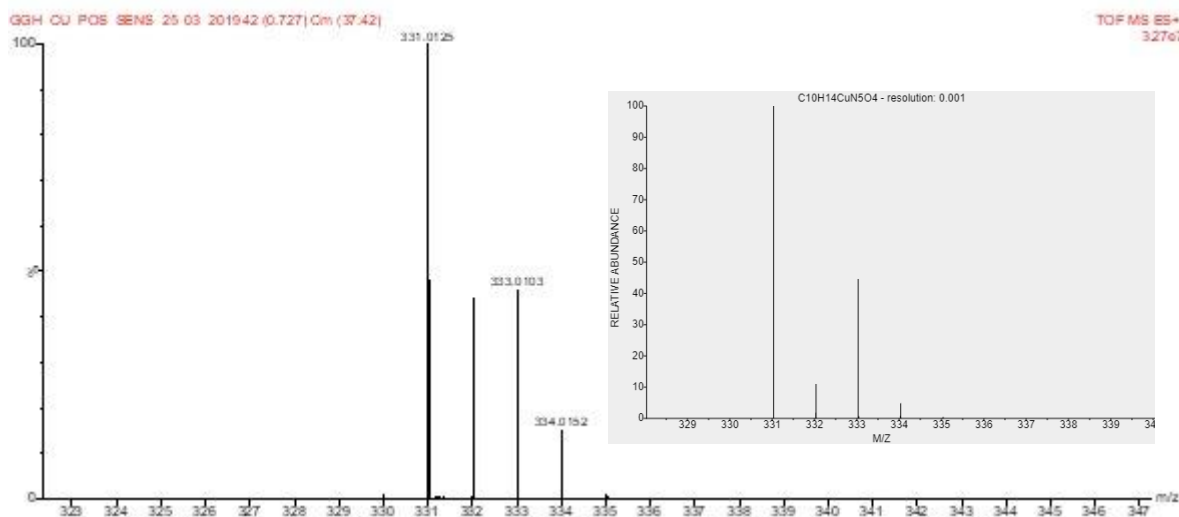
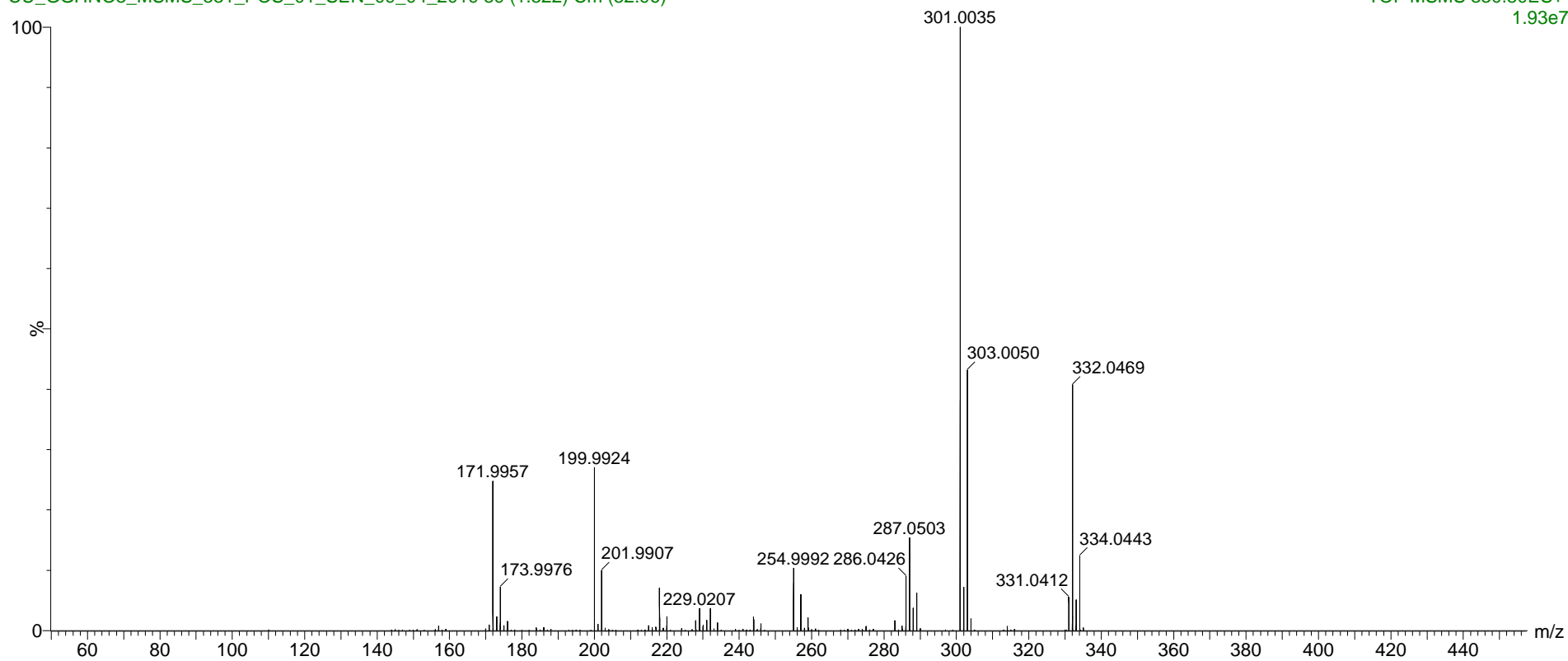


FIGURA 4.52 – Espectro de massas MS do **GGH-3**.

CU_GGHNO3_MSMS_331_POS_01_SEN_09_04_2019 89 (1.522) Cm (82:96)

TOF MSMS 330.80ES+
1.93e7FIGURA 4.53 – Espectro de massas MS/MS do íon m/z 331.

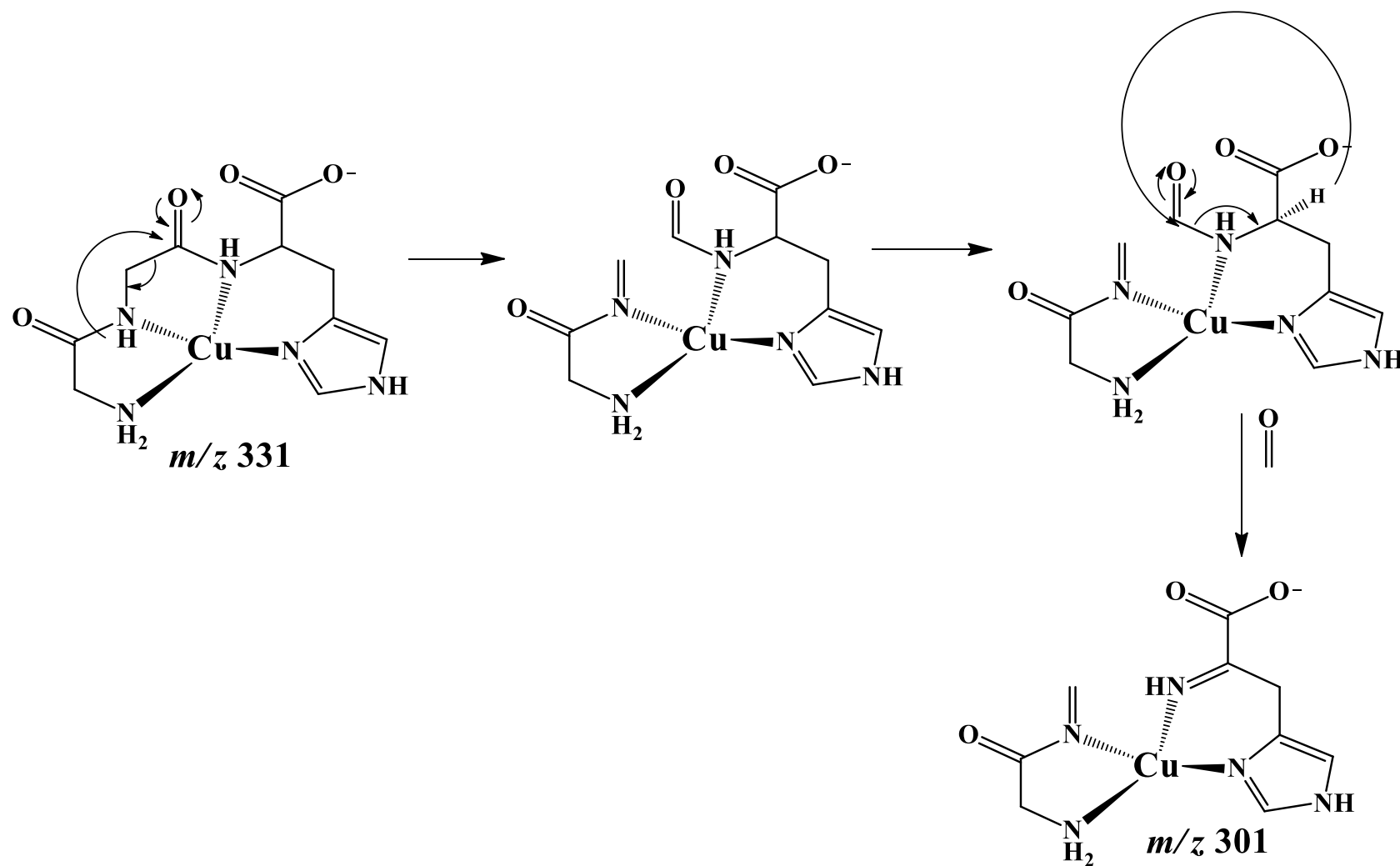


FIGURA 4.54 – Proposta de fragmentação para a formação do íon m/z 301.

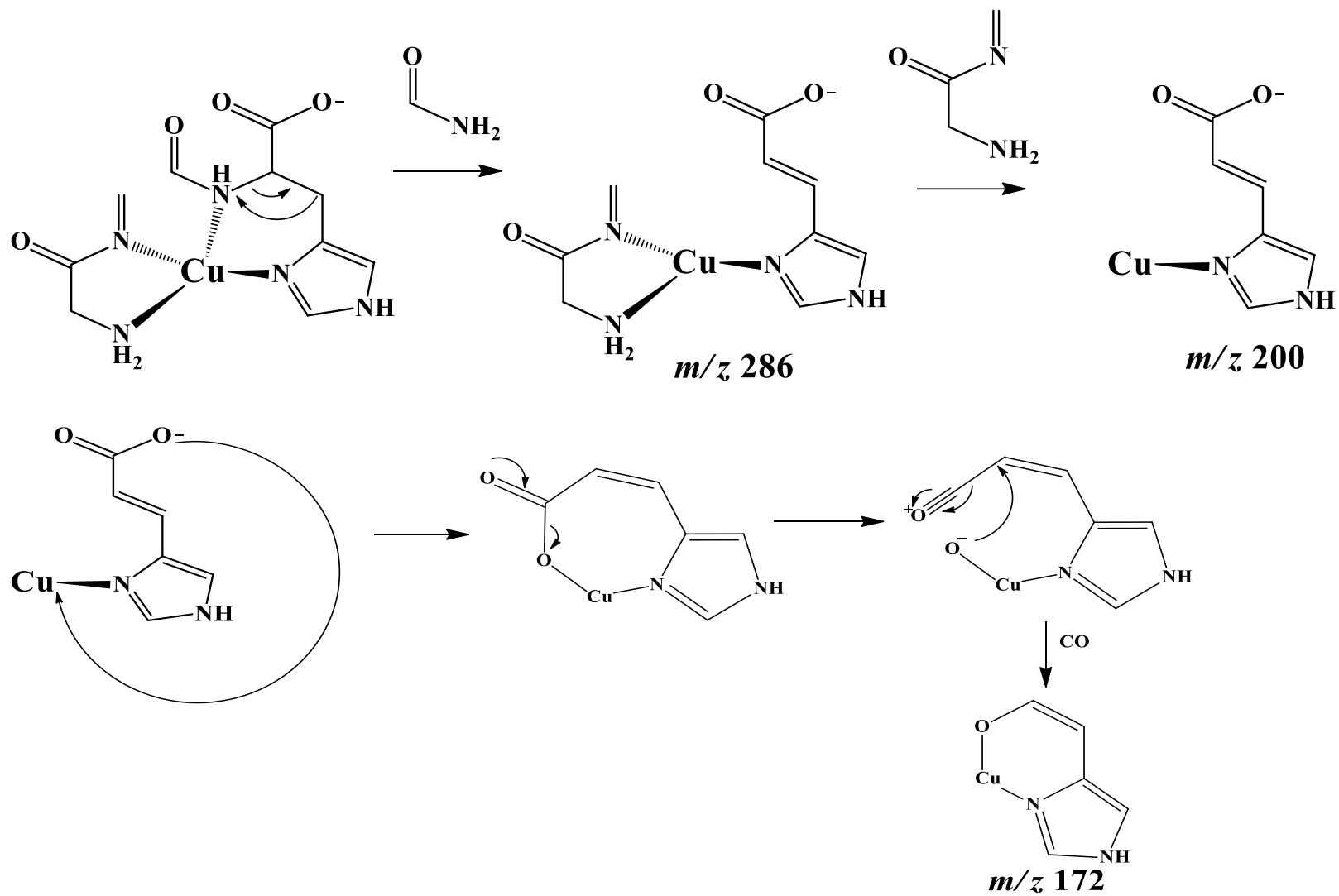


FIGURA 4.55 – Propostas de fragmentações na formação dos íons m/z 286, 200 e 172.

4.5 TESTE BIOLÓGICO

Os resultados na determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foram obtidos por coloração, com a utilização do corante resazurina, o qual na presença de bactérias viáveis sofre redução para resorufina, passando de uma coloração púrpura para uma cor rósea (Figura 4.56), podendo inferir a atividade bacteriostática em *Xanthomonas citri subsp. citri*.

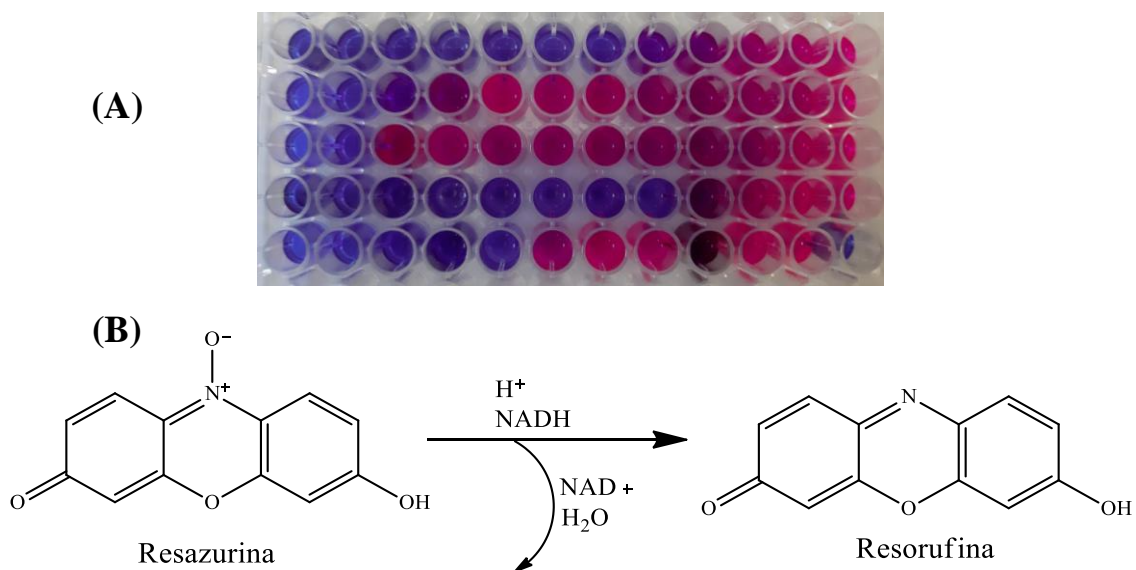


FIGURA 4.56 – (A) Leitura do teste CIM, coloração azul indica que não ocorreu o crescimento bacteriano e a cor rósea indica o crescimento bacteriano. (B) Mecanismo simplificado da redução da resazurina(púrpura) em resorufina(rósea) no meio bacteriano

O tripeptídeos PGG, não possui atividade biológica de inibição do crescimento de bactérias, não sendo relatado na literatura ou não foi encontrado trabalhos até a finalização dos testes bacteriostáticos. Por outro lado, os sais de cobre são os mais utilizados na profilaxia do cancro cítrico, nesse sentido, pôde

ser feita uma comparação direta da atividade do cobre(II), o ligante livre e o complexo formado.

A concentração do PGG inicial para os testes foi de 3500 μM e este não inibiu o crescimento bacteriano, os sais nitrato de cobre e tetrafluoroborato de cobre inibiram o crescimento das *Xanthomonas*, nas respectivas concentrações de 517,38 μM e 1054 μM . Uma vez que há a formação de NaNO_3 e NaBF_4 nas sínteses do **PGG-3** e **PGG-4**, estes sais foram testados como bacteriostáticos, o quais não apresentaram atividade. Na comparação do PGG, **PGG-3** e nitrato de cobre, Figura 4.57, é observado que o complexo **PGG-3** possui atividade na inibição do crescimento das bactérias *Xanthomonas* em uma concentração 8 vezes menor que a do sal de cobre usado na síntese. Tais resultados suportam a proposta de que a atividade não esteja relacionada apenas ao sal de cobre, mas à molécula sintetizada como um todo. O complexo PGG-4 apresentou atividade de inibição em concentração 2 vezes menor que o sal de cobre usado na síntese.

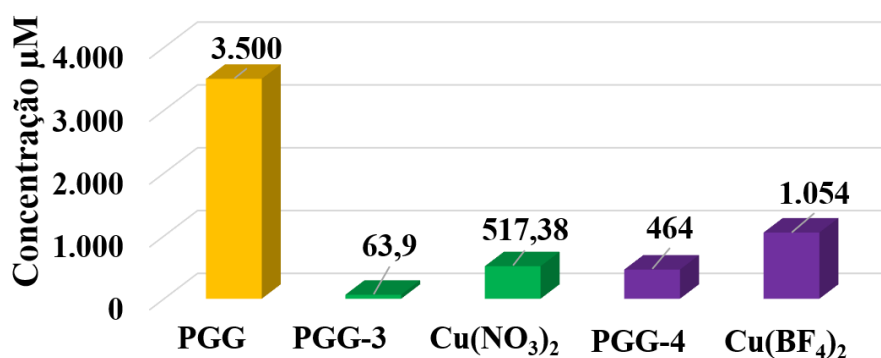


FIGURA 4.57 – Valores das menores concentrações que inibiram o crescimento bacteriano, as colunas de mesmas cores fazem referência ao sal de cobre usado na síntese de cada complexo

O complexo com o centro metálico zinco(II) apresentou uma concentração próxima ao nitrato de cobre, 515,73 μM , mas o acetato de zinco inibiu o crescimento das bactérias em uma concentração de 228 μM . Quando foi analisado o complexo com a prata(I), este foi o mais ativo na inibição do

crescimento das bactérias, comparados com o **PGG-2**, **PGG-3** e **PGG-4**. O **PGG-1** apresentou uma CIM de 6,29 μM , apesar da prata(I) ter atividade bactericida, o sal de prata usado para fazer a síntese teve uma concentração inibitória mínima de 80 μM , aproximadamente 13 vezes maior que o complexo **PGG-1**, como observado na Figura 4.58.

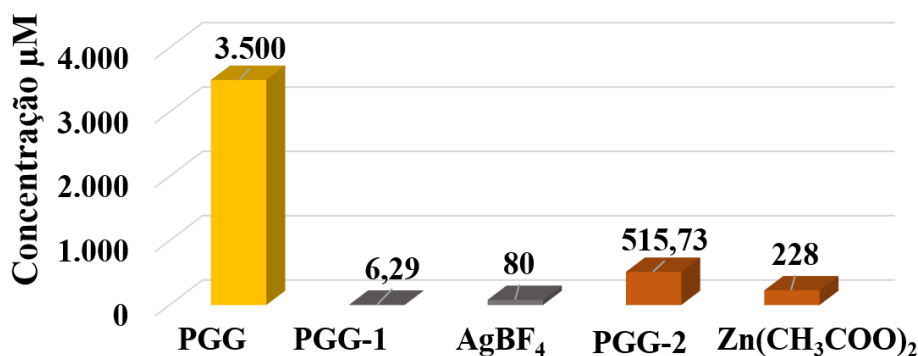


FIGURA 4.58 - Valores das menores concentrações que inibiram o crescimento bacteriano, as colunas de mesmas cores fazem referência ao sal de cobre usado na síntese de cada complexo

O GGH, igualmente ao PGG, não possui atividade na inibição de bactérias, o CIM para esse ligante foi iniciado na concentração de 3.710 μM e não houve inibição do crescimento bacteriano. O complexo **GGH-3** inibiu o crescimento das bactérias em uma concentração de 880 μM , comparado ao nitrato de cobre, tem uma concentração 1,7 vezes maior, não podendo inferir a atividade ao complexo, o mesmo raciocínio foi usado para o **GGH-4**, o qual teve uma concentração elevada para o teste de CIM, Figura 4.59.

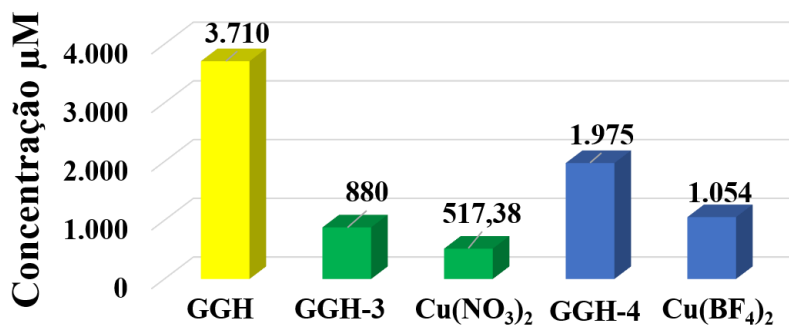


FIGURA 4.59 - Valores das menores concentrações que inibiram o crescimento bacteriano, as colunas de mesmas cores fazem referência ao sal de cobre usado na síntese de cada complexo

O complexo **GGH-2**, teve a CIM de 552,2 µM, este foi mais ativo que os complexos **GGH-3** e **GGH-4**, porém menos ativo quando comparado ao acetato de zinco, o qual inibiu o crescimento em uma menor concentração de 228 µM. Este resultado dificultou inferir a atividade para os complexos sintetizados com o Zn(II). Entretanto, a leitura das placas contendo o complexo **GGH-1**, apresentou inibição em concentração de 13 µM, ao ser comparado ao AgBF₄, a concentração desse complexo foi 6 vezes menor, concluindo-se que a atividade é própria do complexo sintetizado, e não do sal de prata utilizado na síntese, Figura 4.60.

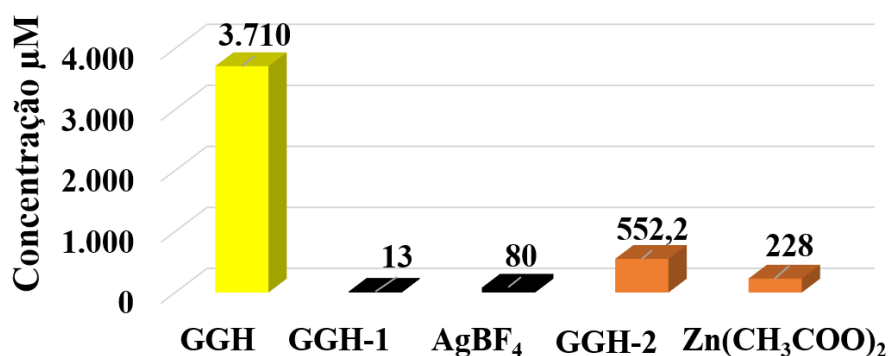


FIGURA 4.60 - Valores das menores concentrações que inibiram o crescimento bacteriano, as colunas de mesmas cores fazem referência ao sal de cobre usado na síntese de cada complexo

Os complexos sintetizados com o centro metálico Ag(I), inibiram o crescimento bacteriano em concentrações menores que a do tetrafluoroborato de prata, igualmente para o complexo **PGG-3**, o qual teve a CIM menor do que o nitrato de cobre, o que não foi observado para os complexos de zinco (**PGG-2** e **GGH-2**) e nem para os complexos sintetizados com o $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2$. Analisou-se, a concentração percentual teórica dos metais de transição nos sais usados nas sínteses e para os complexos usando a plataforma ChemCalc, de Patiny, L. & Borel,⁵¹ (Figura 4.61), e isto demonstrou que a prata e o cobre estão em maiores concentrações em seus sais, 55,41% de prata no AgBF_4 e 26,3% no $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, já para os complexos **PGG-1** e **GGH-1** o valor obtido foi de 21,75% e 23,25% de prata, respectivamente. De modo similar, a porcentagem de Cu(II) no nitrato de cobre trihidratado é de 26,3%, enquanto que nos complexos **PGG-3** e **GGH-3**, têm-se a metade desse valor, 13% para o **PGG-3** e 13,91% para o **GGH-3**. Este último, não apresentou uma atividade em menor concentração que o sal de cobre, contudo, o **PGG-3** tem metade da porcentagem de cobre(II) em sua composição e apresentou atividade bacteriostática em concentração 8 vezes menor comparado ao $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

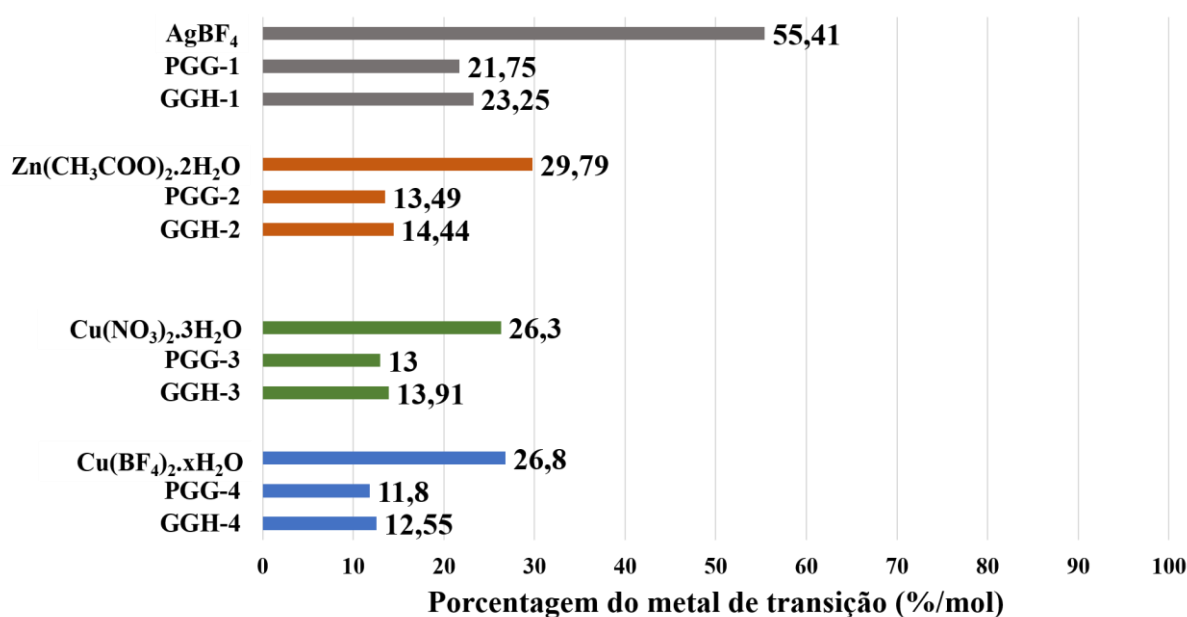


FIGURA 4.61 - Percentual dos metais de transição para os sais usados nas sínteses e complexos formados usando a plataforma ChemCalc, de Patiny, L. & Borel.⁵¹

5 CONCLUSÃO

Nesta pesquisa foram apresentadas as sínteses e caracterizações de oito complexos dos tripeptídeos PGG e GGH coordenados aos centros metálicos Cu(II), Ag(I) e Zn(II). Os resultados das caracterizações corroboraram para a conclusão de que houve formação dos complexos, como por exemplo, as variações nos deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (unidimensional e bidimensional), mudança nas bandas de absorção no infravermelho, que se apresentaram em menor quantidade devido a rigidez dos complexos, observação de bandas de transferência de carga (TCML) e transições *d-d* na espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, composição percentual (carbono, nitrogênio e hidrogênio) obtidas na análise elementar, juntamente com os dados da espectrometria de massas de alta resolução, foram atribuídas as possíveis estruturas. Após as caracterizações, os quelatos foram ensaiados em *Xanthomonas*, e todos os complexos apresentaram atividades em concentrações menores comparados com o PGG e GGH.

Os complexos contendo zinco, apesar de serem mais ativos que os tripeptídeos, apresentaram uma concentração maior em relação ao sal de zinco utilizado na síntese, diferentemente dos outros complexos que apresentaram atividade em concentrações menores que os sais usados para fazer as sínteses. Resultados como do **PGG-1**, **GGH-1** e **PGG-3** os quais inibiram o crescimento bacteriano em concentrações menores que as dos sais usados para sintetizar esses complexos, suportam a hipótese de que tripeptídeos quando quelados a metais podem adquirir atividade biológica. Esse estudo precisa ser mais explorado, desde avaliação em outros testes biológicos como concentração bactericida mínima e inibição do biofilme, como teste em outros patógenos e fitopatógenos.

6 REFERÊNCIA

1. Ministério da agricultura pecuária e Abastecimento. Agropecuária Brasileira em Números. (2019). Available at: <http://www.agricultura.gov.br/>. (Accessed: 14th July 2019)
2. CASTRO, C. N. de. *A agropecuária na região norte: oportunidades e limitações ao desenvolvimento*. (Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2013).
3. XAVIER, A. *et al.* *Transformação produtiva e sustentabilidade*. (Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – ipea, 2016).
4. SOARES FILHO, W. dos S. *Plano estratégico da equipe técnica de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura 2017-2021*. (2019).
5. NEVES, M. F. & TROMBIN, V. G. Os desafios na cadeia produtiva do suco de laranja. *Anuário Citric*. **1º Edição**, (2017).
6. RANGEL, L. E. P. Defesa Agropecuária, Perdas e danos para o agronegócio. *Agroanalysis* 30–31 (2015).
7. SILVA, M. L., SILVA, S. X. de B., SUGAYAMA, R. L., RANGEL, L. E. P. & RIBEIRO, L. C. *Defesa vegetal : fundamentos, ferramentas, políticas e perspectivas*. (SBDA/ANDEF, 2016).
8. AGROLINK. Pragas causam perdas de até R\$ 55 bilhões à agricultura no Brasil. (2015). Available at: https://www.agrolink.com.br/noticias/pragas-causam-perdas-de-ate-r--55-bilhoes-a-agricultura-no-brasil_220429.html. (Accessed: 13th July 2019)
9. G1 São Carlos e Araraquara. Pesquisas ajudam produtores a vencer doenças e pragas nos pomares de laranja. (2019). Available at: <https://g1.globo.com/sp/sao-carlos-regiao/noticia/2019/01/24/pesquisas-ajudam-produtores-de-laranja-a-vencer-doencas-e-pragas-nos-pomares.ghtml>. (Accessed: 14th July 2019)
10. IROKAWA, F. Psilídeo, o inimigo número 1 da citricultura. *Revista Cultivar* (2015).
11. Fundo de Defesa da Citricultura. Cancro cítrico. *Manual técnico* (2008).
12. RYAN, R. P., VORHÖLTER, F., POTNIS, N. & JONES, J. B. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium – plant interactions. *Nat. Publ. Gr.* **9**, 344–355 (2011).
13. SAVIETTO, A. *et al.* Antibacterial activity of monoacetylated alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp . *citri*. *Arch. Microbiol.* **200**, 929–937 (2018).
14. Fundo De Defesa Da Citricultura. Doenças e pragas. *FUNDECITRUS*

Available at: <https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>. (Accessed: 14th July 2019)

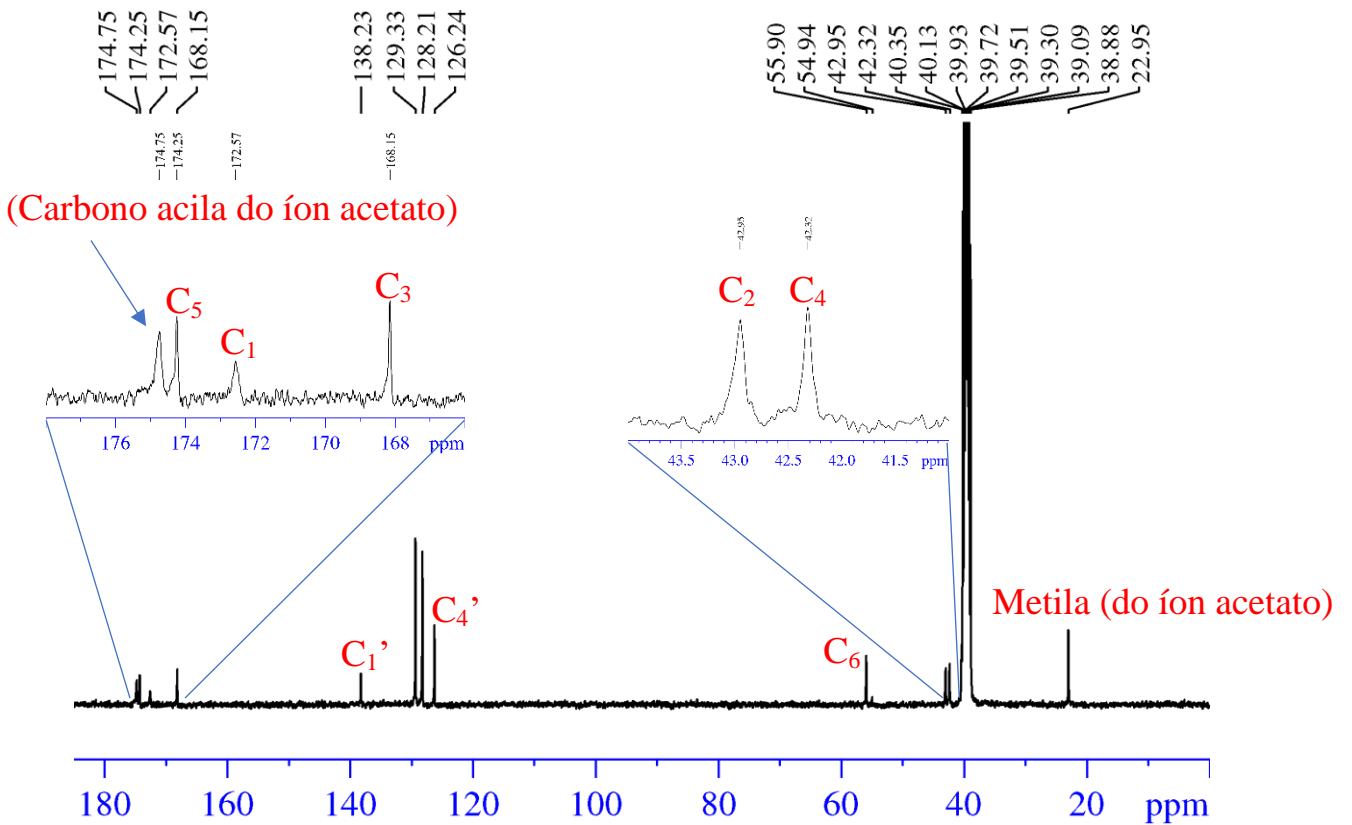
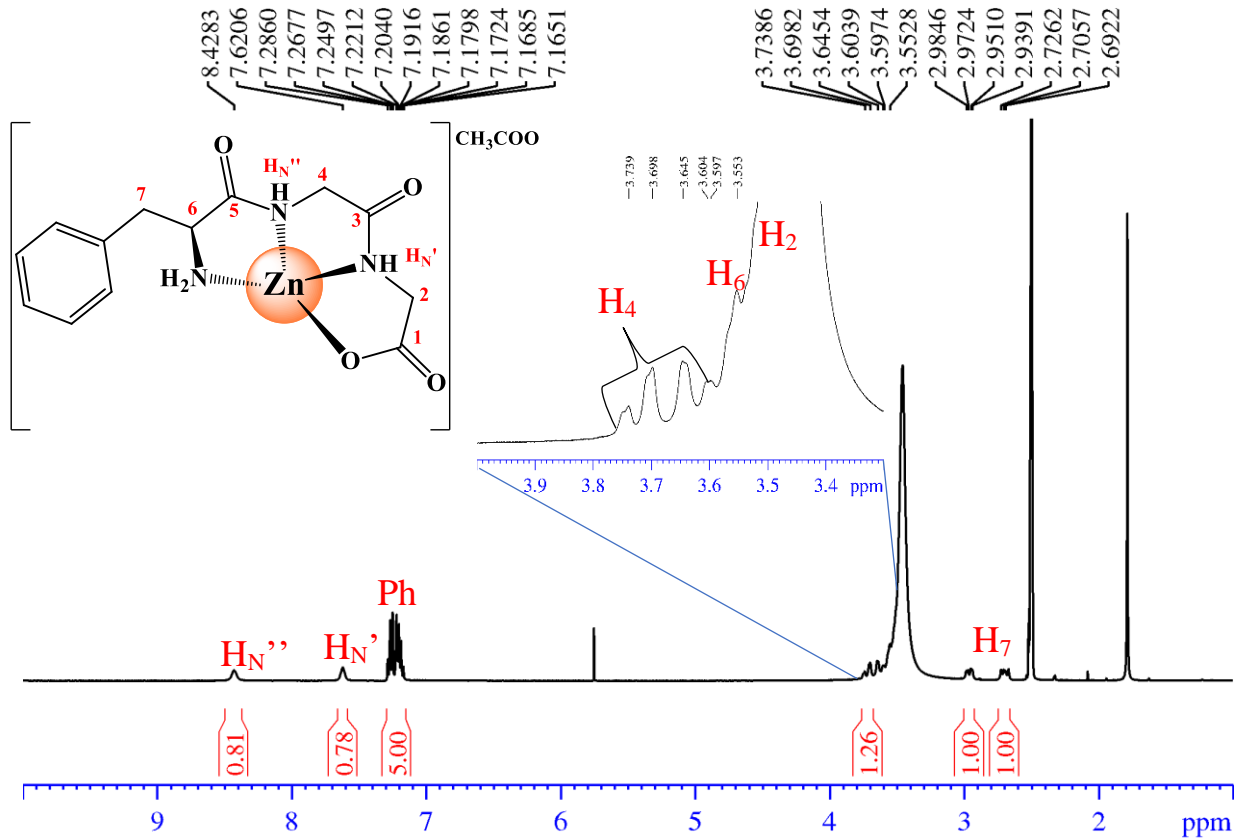
15. Fundo de Defesa da Citricultura. *Levantamento da incidência das doenças dos citros: Greening, CVC e cancro cítrico*. (Fundecitrus, 2018).
16. SILVA, D. F. Eficácia dos flavonóides hesperidina e naringenina e o fenol ácido isovanílico complexados com mg (ii), para o controle da bactéria xanthomonas citri ssp. Citri. (Universidade Federal de São Carlos, 2017).
17. CANTRELLI, C. L., DAYAN, F. E. & DUKE, S. O. As Sources for New Pesticides. *Nat. Prod.* (2012).
18. BRAIBANTE, M. E. F. & ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. *Química Nov. na Esc.* **34**, 10–15 (2012).
19. SANTOS, M. A. T., AREAS, M. A. & REYES, F. G. R. Piretróides - uma visão geral. *Aliment. e Nutr.* **18**, 339–349 (2007).
20. VIEGAS, C. J., BOLZANI, V. da S. & BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim. Nova* **29**, 326–337 (2006).
21. SOUZA, P. P. “Estudo do perfil químico de *Cyperus rotundus* e avaliação do seu potencial de absorção de metais”. (Universidade Federal de São Carlos, 2016).
22. GEERSING, A., SEGAUD, N., WIJST, M. G. P. van der, ROTS, M. G. & ROELFES, G. Importance of Metal-Ion Exchange for the Biological Activity of Coordination Complexes of the Biomimetic Ligand N4Py'. *Inorg. Chem.* **57**, 7748–7756 (2018).
23. HANCOCK, R. E. . Host Defence (Cationic) Peptides What Is Their Future Clinical Potential? *Drugs* **57**, 469–473 (1999).
24. XIE, J., WEI, T., YU, Q. & LIU, R. Practical Preparation of Infection-Resistant Biomedical Surfaces from Antimicrobial β -Peptide Polymers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11**, 18907–18913 (2019).
25. MADANCHI, H. & SARDARI, S. AurH1 : a new heptapeptide derived from Aurein1 . 2 antimicrobial peptide with specific and exclusive fungicidal activity. *J. Pept. Sci.* 1–9 (2019). doi:<https://doi.org/10.1002/psc.3175>
26. JENSSEN, H. 7 th International Meeting on Antimicrobial Peptides. *J. Pept. Sci.* 3116 (2018). doi:[10.1002/psc.3116](https://doi.org/10.1002/psc.3116)
27. ZHANG, L. & GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. *Curr. Biol. Mag.* **26**, 14–19 (2016).
28. Microbiology Department of Pathology &, Center, Medical, U. of N. & Omaha. The Antimicrobial Peptide Database. (2019). Available at: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>. (Accessed: 15th July 2019)

29. PICKART, L. & MARGOLINA, A. Regenerative and Protective Actions of the GHK-Cu Peptide in the Light of the New Gene Data. *Int J Mol Sci* **7**, (2018).
30. IUPAC & JCBN. Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. *Pure Appl. Chem.* **56**, 595–624 (1984).
31. BERESTOVA, T. V *et al.* ATR-FTIR spectroscopic investigation of the cis- and trans-bis-(amino acids) copper(II) complexes. *J. Mol. Struct.* **1137**, 260–266 (2017).
32. MOGA, T. G. Counting on copper. *Nat. Chem.* **4**, 334 (2012).
33. CONRY, R. R. Copper : Inorganic & Coordination Chemistry. *Encycl. Inorg. Chem.* (2006). <https://doi.org/10.1002/0470862106.ia052>
34. AMANCIO, O. M. S. Cobre. *Série publicações ILSI Bras. função plenamente reconhecidas Nutr.* **19**, 28 (2017).
35. MELNÍK, M., KABEŠOVÁ, M., KOMAN, M., MACÁŠKOVÁ, L. U. & HOLLOWAY, E. Copper (ii) coordination compounds : classification and analysis of crystallographic and structural data . V . Polymeric compounds. *J. Coord. Chem.* **50:1**, 177–322 (2006).
36. IAKOVIDIS, I., DELIMARIS, I. & PIPERAKIS, S. M. Copper and Its Complexes in Medicine : A Biochemical Approach. *Mol. Biol. Int.* **2011**, 13 (2011). <https://doi.org/10.4061/2011/594529>
37. FÉLIX, F. F. Comportamento do cobre aplicado no solo por calda bordalesa. (Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005).
38. GROCHALA, W. & MAZEJ, Z. Chemistry of silver (II): a cornucopia of peculiarities. *Philos. Trans. A R. Soc.* 0–11 (2015).
39. YANAGISAWA, A. *Ag(I), Au(I) Lewis Acids.* (WILEY-VCH Verlag GmbH, D-69469 Weinheim (Federal Republic of Germany), 2000, 2000). [doi:https://doi.org/10.1002/9783527618309.fmatter](https://doi.org/10.1002/9783527618309.fmatter)
40. BORRELLI, N. F., SENARATNE, W., WEI, Y. & PETZOLD, O. Physics and Chemistry of Antimicrobial Behavior of Ion-Exchanged Silver in Glass. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 2195–2201 (2015).
41. FOX, C. L. J. Silver sulfadiazine for control of burn wound infections. *Int. Surg.* **5**, 275–7 (1975).
42. BARAK, P. & HELMKE, P. A. *The Chemistry of Zinc. Developments in Plant and Soil Sciences* **55**, (Springer, Dordrecht, 1993).
43. LIU, Z. *et al.* Five-Coordinate Zinc (II) Complex : Synthesis , Characterization , Molecular Structure , and Antibacterial Activities of Bis- [(E) -2- hydroxy- N? - { 1- (4-methoxyphenyl) ethylidene }]

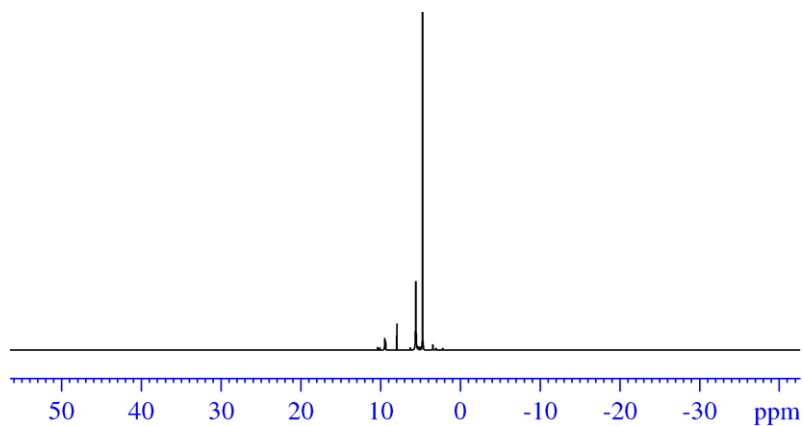
- benzohidrazido] dimethylsulfoxidezinc (II) Complex. *Int. J. Inorg. Chem.* **2017**, 8 (2017).[https:// doi.org/10.1155/2017/7520640](https://doi.org/10.1155/2017/7520640)
44. Frassinetti, S., Bronzetti, G., Caltavuturo, L., Cini, M. & Croce, C. Della. The Role of Zinc in Life : A Review. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **25**, 597–610 (2006).
 45. BETTIOL, W., MORAES, G. J. de, STEULLA Jr., C. S., NICOLINO, C. & GALVÃO, J. A. H. Control of citrus scab, melanose and leprosis with fungicides and miticide mixed to foliar fertilizer. *Sci. Agric.* **51** (3), 494–499 (1994).
 46. SOCRATES, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts.* (John Wiley and Sons, Ltd, 2004).
 47. KHIRICH, G., HOLLIDAY, M. J., LIN, J. C. & NANDY, A. Measurement and Characterization of Hydrogen- Deuterium Exchange Chemistry Using Relaxation Dispersion NMR Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **122** (8), 2368–2378 (2018).
 48. ROBERT M, S., FRANCIS X, W. & DAVID J, K. *Spectrometric identification of organic compounds.* (2005, 2005).
 49. GIL, V. M. S. & GERALDES, C. F. G. C. *Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações.* (Fundação Calouste Gulbenkian, 2002).
 50. KOCK, F. V. C. *Análise Relaxométrica para Compostos de Coordenação Contendo Íons Paramagnéticos em Solução.* (Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, 2017).
 51. PATINY, L. & BOREL, A. ChemCalc. *Journal of Chemical Information and Modeling* (2013). doi:10.1021 / ci300563h

APÊNDICE

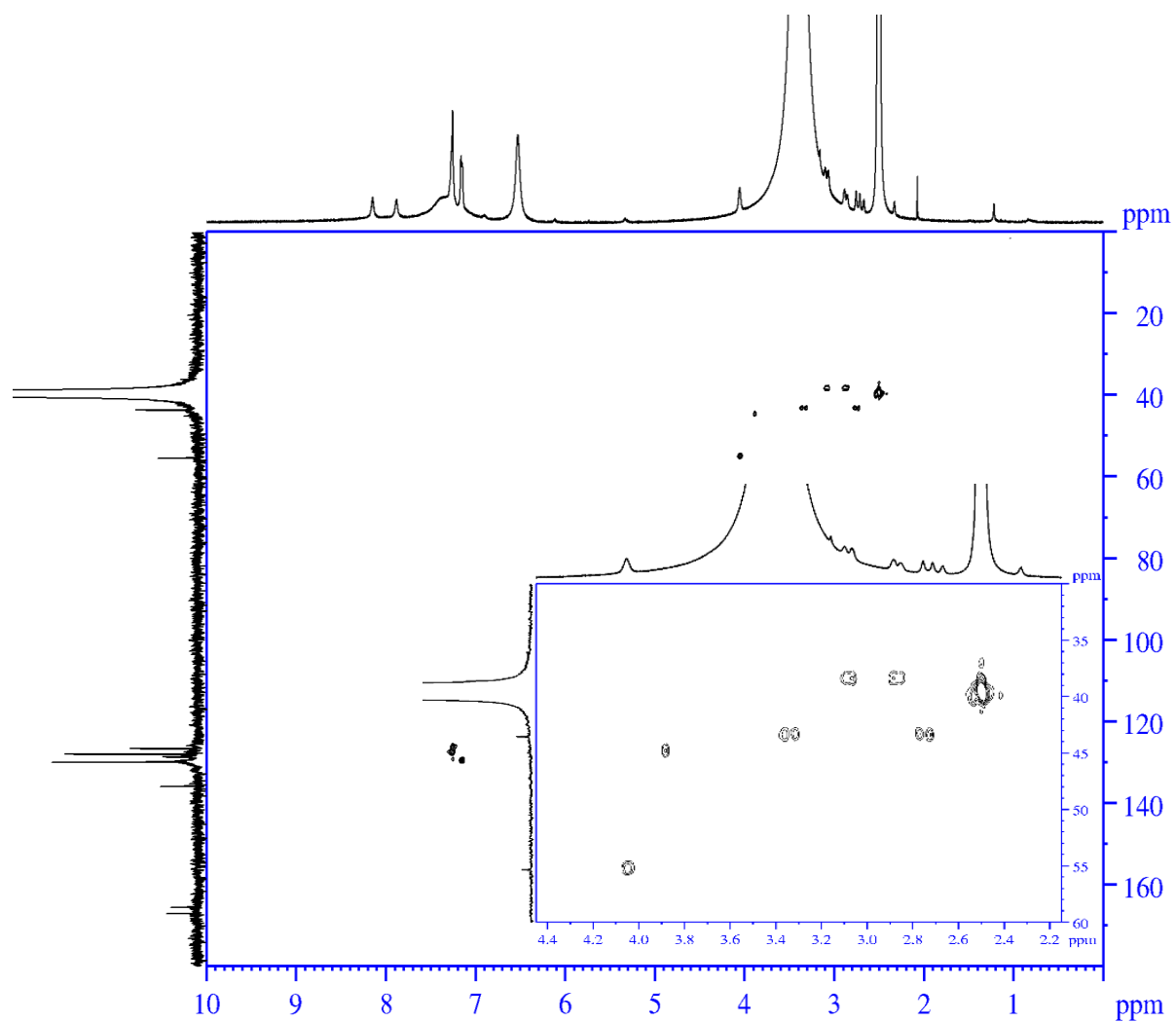
Espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do **PGG-2** em DMSO-d_6 (9,4 T)

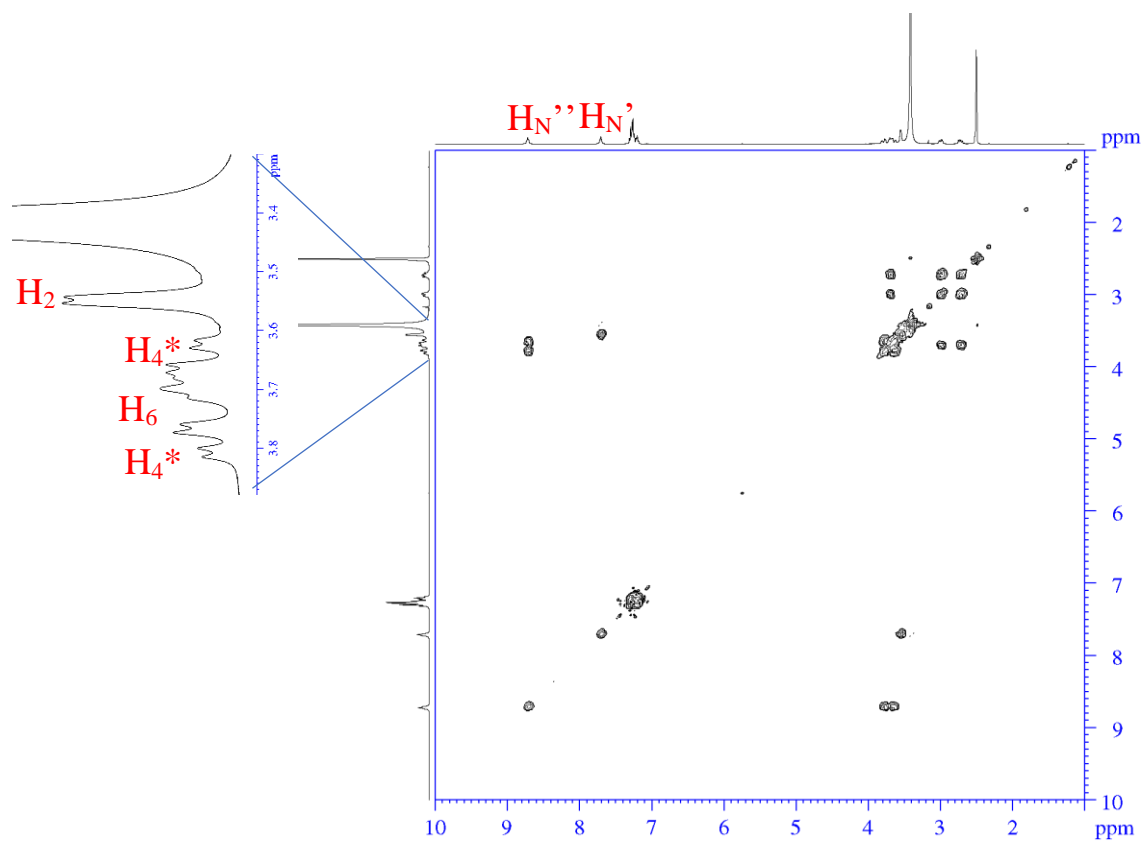


RMN de ^1H [DMSO- d_6 (9,4 T)] em janela expandida do complexos **PGG-3**

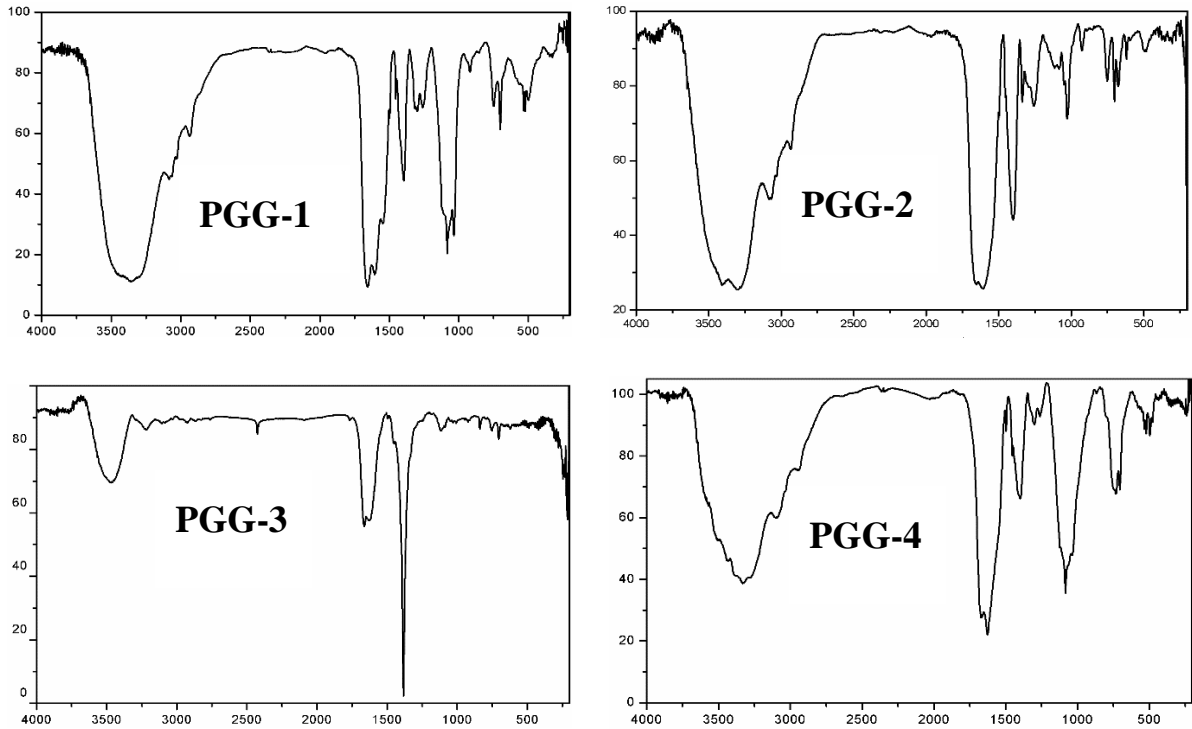


Mapa de contorno HSQC do **PGG-4** em DMSO- d_6 (9,4 T)

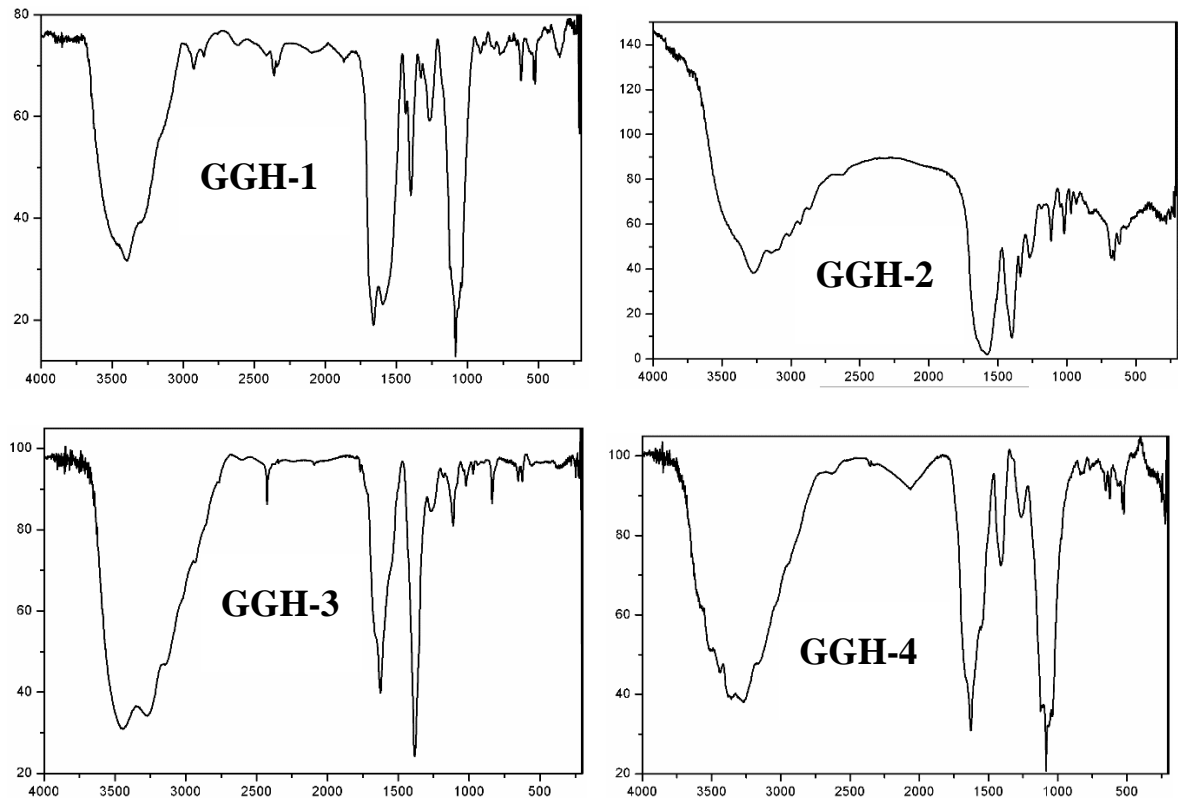


COSY do **PGG-1** em DMSO-d₆ (9,4 T)

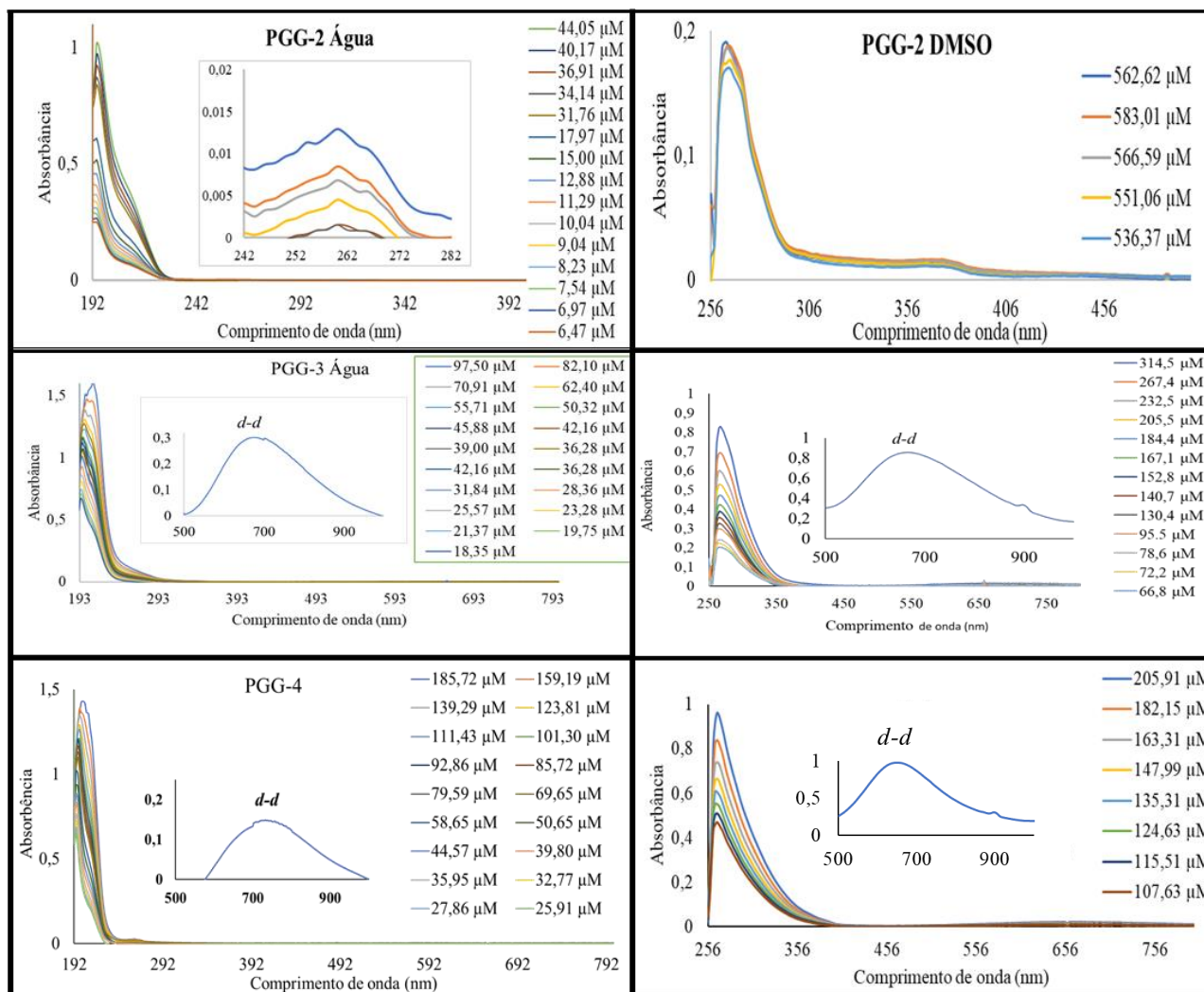
Espectros de absorção na região do infravermelho (em KBr) [metal(PGG)]



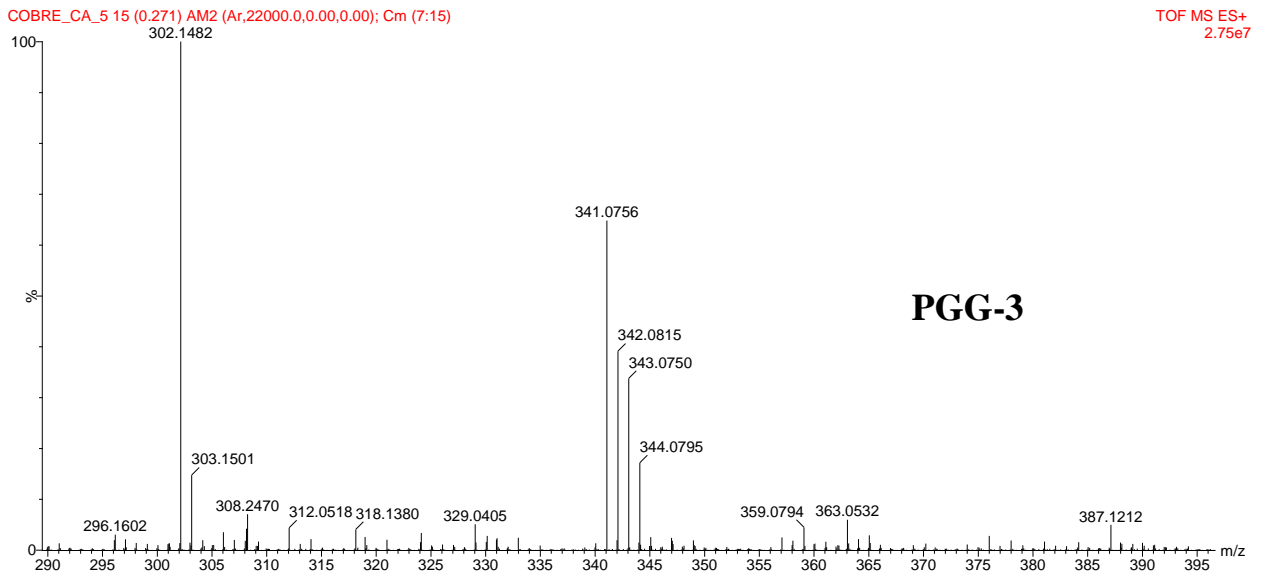
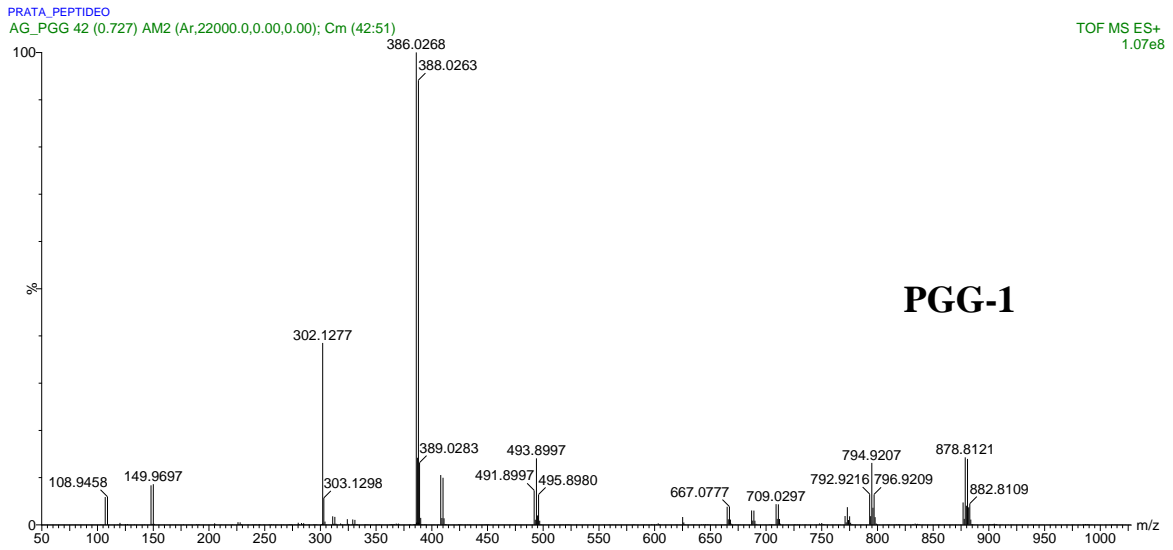
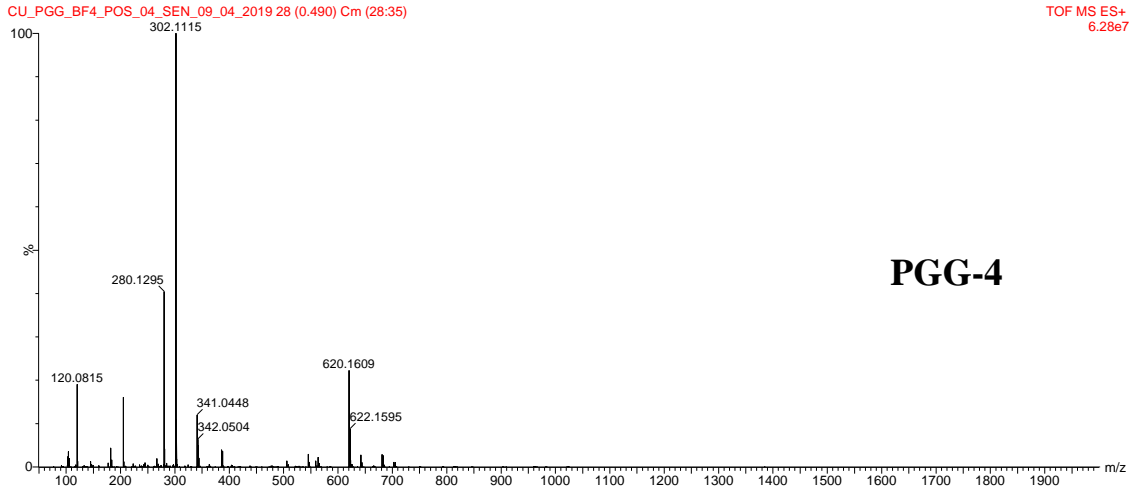
Espectros de absorção na região do infravermelho (em KBr) [metal(PGG)]

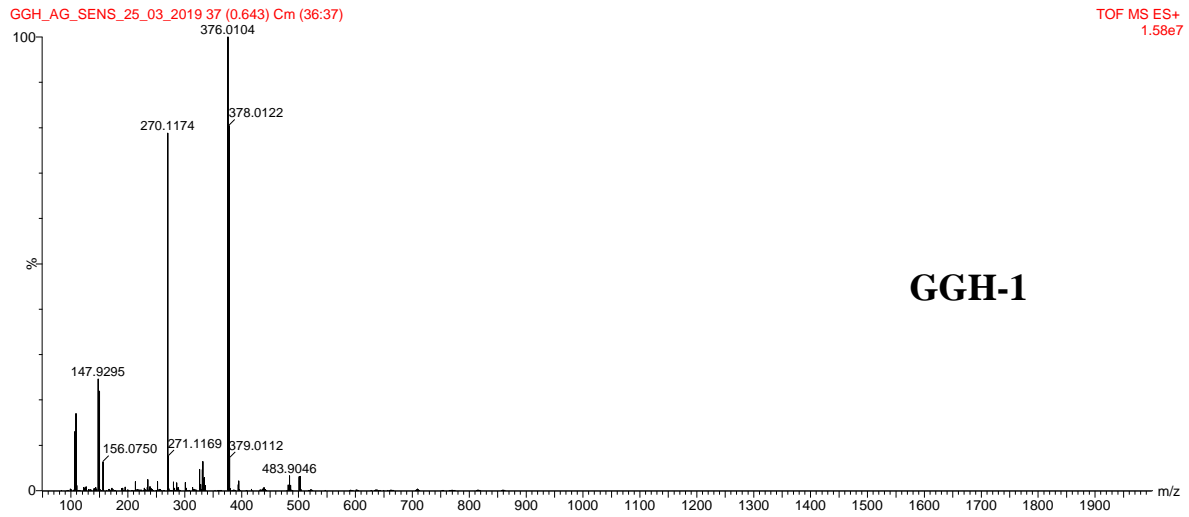
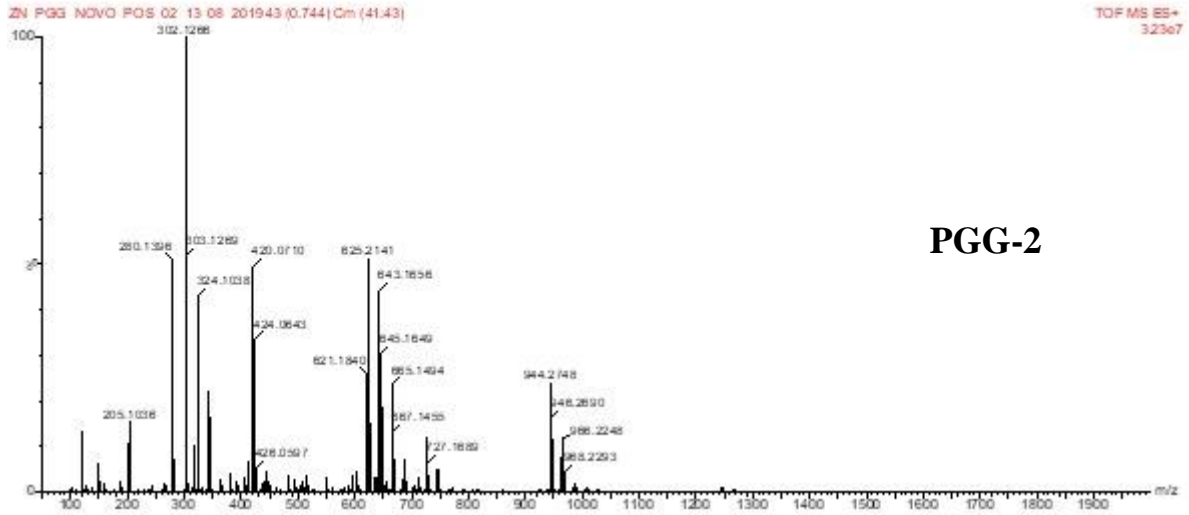


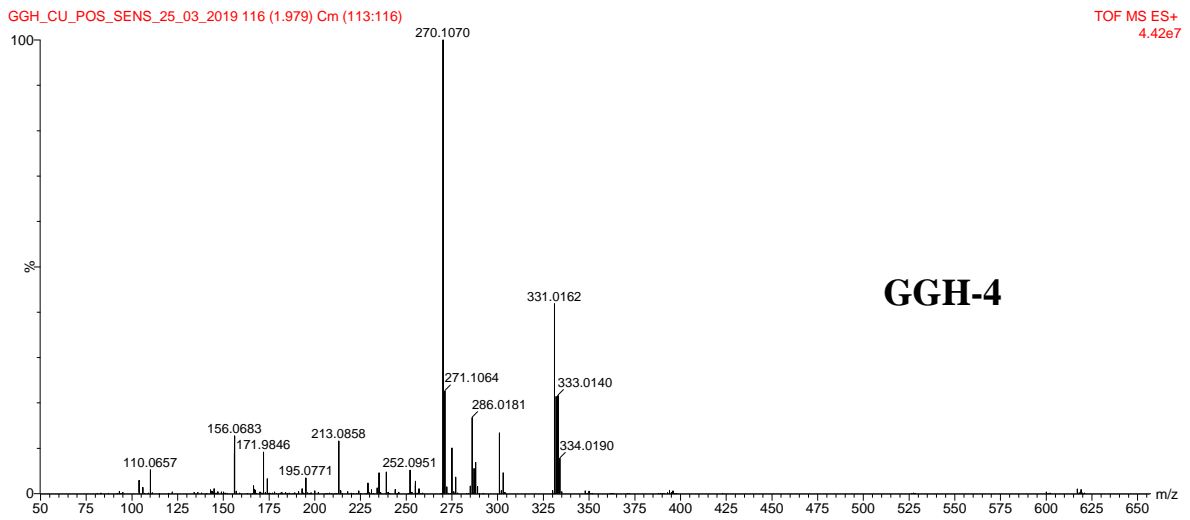
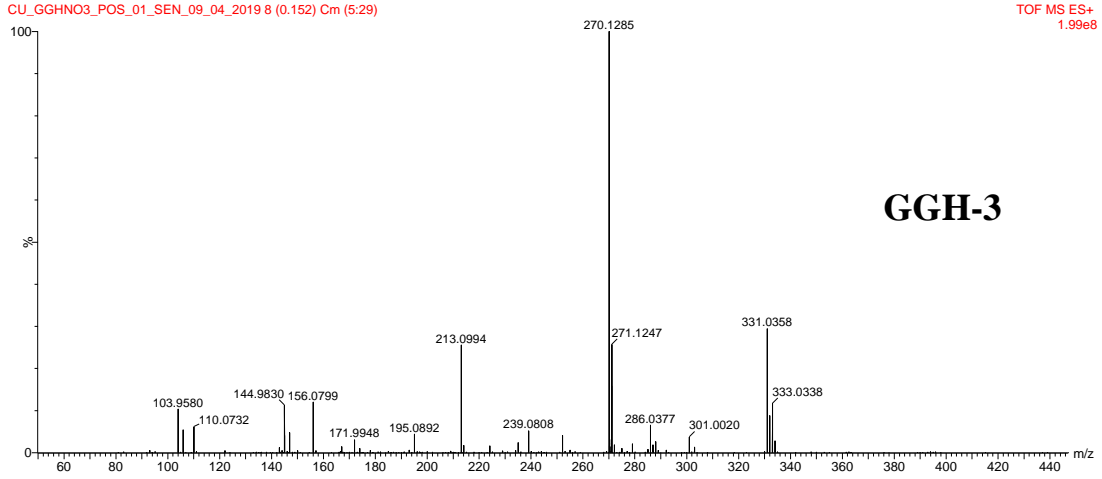
Espectros de absorção na região do Uv-Vis dos complexos, obtidos em água e DMSO



Espectros de massas MS dos complexos







Espectro de MS/MS do GGH-4

